Proteomische Methoden zur Identifizierung acetylierungsabhängiger Interaktionspartner von Histon H4

von

Dipl. NanoSc. Diana Lang

aus Bernburg/Saale

von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Berlin

> zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften -Dr. rer. nat.-

> > genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

- Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Friedrich
- Gutachter: Prof. Dr. Roderich Süssmuth
- Gutachter: Prof. Dr. Dirk Schwarzer
- Gutachter: Dr. Eberhard Krause

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Juli 2012

Berlin 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2009 bis Mai 2012 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie unter Leitung von Dr. Eberhard Krause angefertigt.

"The closer one looks at the [..] performance of matter in living organisms the more impressive the show becomes."

MAX DELBRÜCK: A Physicist Looks at Biology

Kurzfassung

Die systematische Analyse von Protein-Protein-Interaktionen ist eine wichtige Voraussetzung für die Aufklärung molekularer Zusammenhänge und biologischer Funktionen innerhalb einer Zelle. Für die proteomweite Identifizierung interagierender Proteine haben sich in den letzten Jahren vermehrt Methoden durchgesetzt, die auf Affinitäts-*Pulldown*-Experimenten in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie basieren (Affinitäts-MS-Experiment).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Ansatz, bestehend aus einer Kombination von mehrdimensionaler Peptidauftrennung mittels Flüssigchromatographie und hochaufgelöster Tandem-Massenspektrometrie, zur effektiven Identifizierung und Quantifizierung komplexer Proteingemische aus Affinitäts-Pulldown-Experimenten entwickelt. Die Methode beruht auf der Verwendung von Umkehrphasen-Chromatographie (RP) mit pH-sauren Elutionsbedingungen in beiden chromatographischen Dimensionen und führt durch Anwendung eines spezifischen Fraktionierungsschemas in der ersten Dimension zu einer optimalen Trenn- und somit MS/MS-Kapazität in der zweiten Dimension. Die Entwicklung und Validierung der Methodik erfolgte zunächst durch proteomweite Interaktionsanalysen mit gut charakterisierten, Tyrosin 595-phosphorylierten, Peptiden des T-Zelladapterproteins ADAP. In Kombination mit verschiedenen Isotopenmarkierungsverfahren (SILAC, enzymatische ¹⁸O-Markierung) konnten unter Anwendung der entwickelten 2-D RP-RP LC-MS/MS Methodik phosphorylierungsspezifische Interaktionspartner der ADAP-595-Peptidsequenz identifiziert werden.

Im weiteren Verlauf wurde die 2-D RP-RP LC-MS/MS Methodik für die proteomweite Analyse von Interaktionspartnern des Zellkernproteins Histon H4 angewandt. Da Lysinacetylierungen generell mit einer Genaktivierung assoziiert sind, sollte insbesondere die Rolle dieser Modifizierungen als potentielle Erkennungsmotive bzw. als Werkzeug der Ladungsneutralisierung untersucht werden. Dazu wurden verschiedene acetylierte Peptide der N-terminalen Histon H4-Sequenz synthetisiert und als Matrix-gebundene Köder in differenziellen, SILAC-basierten Peptid-*Pulldown*-Experimenten eingesetzt. Dabei konnten additive Effekte der Histonacetylierung auf das Bindungsverhalten beobachtet werden, d.h. mit zunehmender Anzahl der Lysinacetylierungen erhöhte sich auch die Anzahl der Proteine, die nicht mehr mit dem Peptid interagierten. Darüber hinaus wurden potentielle, acetylierungsabhängige Interaktionspartner mehrfach acetylierter H4-Peptide identifiziert, wobei die Mehrzahl bekannte Chromatin- sowie RNA-Polymerase II-Interaktoren darstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Peptid-basierte Affinitäts-MS Experimente einen wertvollen Beitrag zum Verständnis von Protein-Protein-Interaktionen leisten können.

Schlagworte: 2-D LC-MS/MS, Histon H4 Acetylierung, Quantitative Interaktomanalyse

Abstract

The systematic analysis of protein-protein-interactions is a prerequisite for a comprehensive understanding of the molecular correlations within a cell and the exploration of fundamental biological functions. In recent years affinity-based pulldown experiments in combination with quantitative mass spectrometry (affinity-MS experiments) have been established to identify interacting proteins in a proteome-wide manner.

In the present work, a new approach combining multidimensional peptide separations by liquid chromatography with high-resolution tandem mass spectrometry was developed and used for an efficient identification and quantification of complex protein mixtures from affinity-based pulldown experiments. The method utilizes reversed-phase (RP) capillary columns with acetonitrile-containing eluents in both chromatographic dimensions. Furthermore, by applying a specific fractionation scheme in the first dimension, samples with evenly distributed peptides were obtained, fully utilizing the separation space and MS/MS capacity in the second dimension.

The well-characterized interactions of Tyr-595-phosphorylated peptides derived from the T-cell adaptor protein ADAP with SH2-domain containing proteins were used to validate this approach. Two different stable isotope labeling strategies (SILAC, enzymatic ¹⁸O-labeling) were successfully applied to identify phosphorylation-specific interaction partners of the ADAP-595 peptide.

The developed 2-D RP-RP LC-MS/MS methodology was further used to analyze interaction partners of the nuclear protein histone H4 in a proteome-wide manner. Since the acetylation of specific lysine residues within the N-terminal tail regions of histones is a general means of gene activation, a possible role as recognition motif for effector proteins or simple means of charge neutralization within histone tails was the main focus of this investigations. For this reason, differentially acetylated peptides derived from the N-terminal tail of histone H4 were synthesized and served as matrix-bound baits in the following SILAC-based pulldown experiments.

An additive effect of histone H4 acetylation with regard to the binding behavior was observed. An increasing number of acetylation marks resulted in a higher number of proteins that were excluded from the peptide bait. In addition, some potential acetylation-specific binding partners were recruited to multiple acetylated H4-peptides. Most of these proteins represent known chromatinand RNA-polymerase II interactors. In summary, the results illustrate that peptide-based affinity-MS experiments provide a valuable contribution to the understanding of protein-protein-interactions.

Keywords: 2-D LC-MS/MS, histone H4 acetylation, quantitative interactome analysis

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	1
Abstract	111
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Chromatin	1
1.1.1 Struktur und Aufbau	1
1.1.2 Histone und Histonmodifizierungen	3
1.1.3 Histon-Modifizierungsenzyme	6
1.1.4 Rolle von Histonacetylierungen	9
1.1.5 Rolle von Ser1-Phosphorylierung an Histon H4	12
1.1.6 Bindungsmodule an Histon PTMs	13
1.1.7 Histon-Code Theorie oder Ladungsneutralisierung?	15
1.2 Protein-Protein-Wechselwirkungen	16
1.2.1 Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen	17
1.3 Biologische Massenspektrometrie	20
1.3.1 Methoden der MS-basierten Analyse komplexer Proteingemische	21
1.3.2 Quantitative Massenspektrometrie	
1.4 Zielsetzung	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.2 Puffer, Lösungen und Medien	29

2.3 Molekularbiologische Methoden	29
2.3.1 Transformation von Bakterien	29
2.3.2 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	30
2.4 Proteinbiochemische Methoden	32
2.4.1 Reinigung von His ₆ -Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie	32
2.4.2 Größenausschlusschromatographie	33
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.4.4 Western Blotting	35
2.5 Zellbiologische Methoden	37
2.5.1 Kultivierung von HeLa-S3 Zellen	37
2.5.1.1 Adhärente Kultivierung	37
2.5.1.2 Suspensionskultur	37
2.5.2 Kultivierung von Jurkat Zellen	38
2.5.3 Stabile Isotopenmarkierung in Zellkultur	38
2.5.4 Präparation von HeLa-S3 Kernextrakten	38
2.5.5 Präparation von humanen primären T-Zellen	40
2.6 Synthesechemische Methoden	40
2.6.1 Peptidsynthese	40
2.6.2 Analytische und präparative HPLC	41
2.6.3 Kovalente Kopplung der Peptide an eine feste Phase	42
2.7 Pulldown-Experimente	42
2.7.1 Gcn5-Pulldowns	42
2.7.2 SILAC-Experimente	43
2.7.2.1 Histon H4-Pulldowns mit GeLC-MS Ansatz	43
2.7.2.2 Histon H4-Pulldowns mit 2-D RP-RP LC-MS Ansatz	44
2.7.2.3 ADAP-595-Pulldowns mit 2D RP-RP LC-MS Ansatz	44
2.7.3 ¹⁸ O-Experimente	45
2.7.3.1 ADAP-595-Pulldowns mit 2D RP-RP LC-MS Ansatz	45
2.8 Enzymatische Spaltung von Proteinen	46
2.8.1 Tryptische In-Gel Spaltung	46
2.8.2 Tryptische <i>on-bead</i> Spaltung	46
2.8.2.1 Tryptische on-bead Spaltung: SILAC	47
2.8.2.2 Tryptische <i>on-bead</i> Spaltung: ¹⁸ O	47
2.9 Biologische Massenspektrometrie	48
2.9.1 NanoLC-ESI-MS/MS	48
2.9.2 2-D RP-RP LC-MS/MS	49
2.9.3 Proteinidentifizierung und Quantifizierung	50
2.10 NMR-Spektroskopie	51

3	Erg	ebı	nisse	53		
3.1 Entwicklung der 2-D RP-RP LC MS/MS Methodik						
	3.	1.1	Einfluss von Säulenparametern auf die Trennleistung und Orthogonalität	. 54		
	3.	1.2	Entwicklung eines Fraktionierungsschemas in der 1.Dimension	. 57		
	3.	1.3	2-D RP-RP LC-MS/MS in Kombination mit SILAC	. 59		
	3.	1.4	2-D RP-RP LC-MS/MS in Kombination mit ¹⁸ O-Markierung	. 62		
	3.2	Syr	nthese und Immobilisierung von H4 Peptiden	.67		
	3.3	Int	eraktion der Gcn5-Bromodomäne mit acetylierten H4-Peptiden	.69		
	3.4	Ide	entifizierung von modifizierungsabhängigen H4-Interaktionspartnern	.72		
	3.	4.1	Peptid-Pulldown-Experimente mit tetraacetylierten H4-Peptiden	. 75		
	3.	4.2	Peptid-Pulldown-Experimente mit bisacetylierten H4-Peptiden	. 79		
	3.	4.3	Peptid-Pulldown-Experimente mit monoacetylierten H4-Peptiden	. 82		
	3.	4.4	Peptid-Pulldown-Experimente mit Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden	. 84		
	3.	4.5	Validierung potentieller acetylierungsabhängiger Bindungspartner an Histon H4	. 86		
4	Dis	kus	sion	.89		
	4.1	Ent	twicklung der 2-D RP-RP LC MS/MS Methodik	.89		
	4.	1.1	Orthogonalität und Fraktionierung in der ersten Dimension	. 91		
	4.	1.2	Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Bindungspartner	. 93		
	4.	1.3	Enzymatische ¹⁸ O-Markierung in Kombination mit 2-D RP-RP LC-MS/MS	. 95		
4.2 Einfluss von Histonmodifizierungen						
	4.	2.1	Einfluss auf Protein-Protein Wechselwirkungen	. 98		
	4.	2.2	Einfluss auf transkriptioneller Ebene	100		
	4.3	Ide	entifizierung acetylierungsabhängiger Bindungspartner von Histon H4	101		
	4.4	Zus	sammenfassung und Ausblick	110		
5	Lite	erat	tur1	13		
•				:		
A	nnai	ng .				
	Abk	ürzı	ungsverzeichnis	i		
	Abb	ildu	ngsverzeichnis	vi		
	Tabe	elle	nverzeichnis	viii		
D	anks	sag	ung	. xi		
Ei	dess	stat	ttliche Versicherung	. xv		

1.1 Chromatin

Die Gesamtheit der Erbinformation einer Zelle bzw. deren materielle Träger (Chromosomen, Gene, DNA) wurde erstmals 1920 von dem Botaniker Hans Winkler unter dem Begriff "Genom" zusammengefasst. Die Genomgröße wird über den Gesamtbestand an Basenpaaren (bp) in der DNA eines Individuums definiert und beträgt für den menschlichen haploiden Chromosomensatz 3,27 x 10⁹ bp (Venter *et al.* 2001; Vinogradov 2005). Mit einer Länge von 0,34 nm pro Basenpaar ergibt sich für den unkomprimierten DNA-Doppelstrang eine Gesamtlänge von 2,18 m. Die Verpackung der rund zwei Meter langen DNA in den nur wenige Mikrometer großen Zellkern erfolgt durch Kondensation zu einer DNA-Proteinstruktur (Nukleoproteinkomplex), die als Chromatin bezeichnet wird.

1.1.1 Struktur und Aufbau

Der erste Schritt der DNA-Kompaktierung wird über die Ausbildung einer dreidimensionalen Helixstruktur der DNA realisiert (Watson und Crick 1953). Die weitere Kompaktierung erfolgt durch Wechselwirkung der DNA mit Kernproteinen, den sogenannten Histonproteinen. Diese wurden als universeller Bestandteil eukaryotischen Chromatins erstmals im Jahr 1884 von dem Mediziner und Physiologen Albrecht Kossel als kleine, basische Proteine beschrieben (Kossel 1884). Erst 90 Jahre später schlug Roger Kornberg ein Modell vor, in dem jeweils zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 ein Oktamer bilden (Histon-*Core*), um das sich die DNA organisiert (Kornberg 1974). Der Histonoktamer-DNA Komplex wird als Nukleosom bezeichnet und bildet die kleinste, sich wiederholende Einheit des Chromatins.



Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der DNA-Kompaktierung durch Histonproteine. Verpackung des DNA Doppelstrangs durch ein Oktamer bestehend aus den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 zur *"Beads on a string"* Form des Chromatins. Die Einheit aus einem Histonoktamer und 147 bp DNA wird als Nukleosom bezeichnet und ist die kleinste sich wiederholende Einheit des Chromatin. Durch Wechselwirkung mit Histon H1 (gelb) kommt es zur weiteren Kompaktierung, die letzlich in der Chromosomenstruktur endet. Die Darstellung der DNA-Kompaktierung wurde nach Tonna *et al.* verändert (Tonna *et al.* 2010). Die Darstellung des Nukleosoms (rechts) basiert auf der Kristallstuktur 1KX5 (Davey *et al.* 2002).

Für die Ausbildung des Histonoktamers lagern sich zunächst die Histonproteine H2A und H2B sowie H3 und H4 zu Dimeren zusammen. Aus zwei H3/H4 Dimeren entsteht ein stabiles Tetramer, an das sich wiederum zwei H2A/H2B Dimere anlagern. Die Interaktion zwischen den Histonproteinen wird dabei über die zentral gelegenen Histon-Faltungsdomänen vermittelt. Pro Nukleosom sind ca. 147 bp der DNA als linksgängige Schraube 1,65 mal um das Histonoktamer gewunden (Luger *et al.* 1997; Davey *et al.* 2002). Wie in Abbildung 1-1 zu erkennen ist, erfolgt die Verknüpfung einzelner Nukleosomen über ein kurzes Stück (10-80 bp) ungebundener DNA, die auch als Linker-DNA bezeichnet wird (Felsenfeld und Groudine 2003; Peterson und Laniel 2004). Die Bindung des Histons H1, auch als Linker-Histon bezeichnet, an die Linker-DNA, bewirkt eine Stabilisierung der Nukleosomenstruktur und moduliert gleichzeitig den Ein- und Austrittswinkel der DNA (Thoma *et al.* 1979; Luger *et al.* 1997; Bednar *et al.* 1998). Der Komplex aus Nukleosom und gebundenem Histon H1 wird als Chromatosom bezeichnet (Simpson 1978). Durch Mechanismen, die bisher nicht vollständig aufgeklärt wurden, führt die Interaktion des Linker-Histons mit der Linker-DNA zur weiteren Kompaktierung der DNA (30 nm Chromatinfasern). Diese spiralenförmige Selenoidstruktur bildet Schleifendomänen aus, aus denen die Chromosomenstruktur resultiert (Paul und Ferl 1999; Tremethick 2007). Die korrekte Verpackung der DNA ist essentiell für viele zelluläre Prozesse wie beispielsweise Transkription, Replikation und DNA-Reparatur. Je nach Struktur, Funktion und Packungsgrad des Chromatins unterscheidet man zwischen Heterochromatin und Euchromatin. Trotz eindeutiger Unterschiede in der Funktion von Eu- und Heterochromatin, ist der molekulare Aufbau der unterschiedlichen Chromatinarten noch nicht vollständig aufgeklärt. Aktiv transkribierte Gene sind im weniger stark kondensierten Euchromatin lokalisiert. Es enthält die Mehrheit aller Gene, hat nur wenige sich wiederholende DNA-Abschnitte und kann in der Meiose frei rekombiniert werden (Fischle 2009). Im Gegensatz dazu sind inaktive Gene durch eine starke DNA-Kondensation mit nur wenigen Protein-kodierenden DNA-Abschnitten gekennzeichnet (Heterochromatin).

1.1.2 Histone und Histonmodifizierungen

Wie in Abschnitt 1.1.1 bereits beschrieben, spielen Histonproteine eine zentrale Rolle bei der Kondensation der DNA. Man unterscheidet dabei fünf verschiedene Histonproteine: H2A, H2B, H3 und H4, die den nukleosomalen Kern bilden, sowie H1, das als Linker-Histon bezeichnet wird (Richmond et al. 1983; Luger et al. 1997). Die vier Kernhistone sind evolutionär konserviert und besitzen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit. Das zentrale Faltungsmotiv der Kernhistone besteht aus drei α -Helices, die über zwei Schleifen miteinander verbunden sind und mit der DNA interagieren (globuläre Domäne oder auch Histonfaltungsdomäne). Die positiv geladenen aminoterminalen Enden (tails) liegen außerhalb der strukturierten Domäne und ragen aus dem Nukleosom heraus (Arents et al. 1991; Arents und Moudrianakis 1995; Luger et al. 1997; Fischle et al. 2003; Cruickshank et al. 2010). Eine weitere Gemeinsamkeit der Kernhistone ist der hohe Anteil an basischen Aminosäuren (Arginin und Lysin), wobei diese nicht gleichmäßig über die Proteinsequenzen verteilt sind, sondern bevorzugt in den N-terminalen Enden (tails) vorkommen. Im Gegensatz zur relativ statischen Nukleosomenstruktur, kann es im Bereich der N-terminalen Histon-tails aufgrund zahlreicher chemischer Veränderungen (posttranslationale Modifizierungen, PTMs) zu molekularen Unterschieden zwischen verschiedenen Nukleosomen kommen. Diese Modifizierungen scheinen als Signal oder Schalter für unterschiedliche Regionen des Chromatin zu fungieren und erlauben die Rekrutierung von Chromatin-bearbeitenden Proteinen und Proteinkomplexen (Jenuwein und Allis 2001; Kouzarides 2007). Aufgrund dieser Eigenschaften geht man davon aus, dass posttranslationale Modifizierungen an Histonproteinen einen dynamischen Regulationsmechanismus zur Steuerung der transkriptionellen Aktivität in allen Zellen darstellen (Strahl und Allis 2000; Fischle 2009). Als erste

posttranslationale Modifizierungen von Histonen wurden bereits Mitte der 1960er Jahre Lysinmethylierungen und –acetylierungen beschrieben (Frenster *et al.* 1963; Phillips 1963; Allfrey *et al.* 1964; Littau *et al.* 1964; Murray 1964). Mittlerweile ist jedoch eine Vielzahl weiterer PTMs identifiziert worden, die bevorzugt innerhalb der N-terminalen Histon-*tails* auftreten und dort den Ladungszustand und damit die Zugänglichkeit der DNA sowie Protein-Protein-Interaktionen mit dem Nukleosom beeinflussen. Neben der bereits erwähnten Methylierung und Acetylierung konnten Ubiquitinierung und Sumoylierung am Lysin, ADP-Ribosylierung oder Prolinisomerisierung nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden Serin- und Threoninphosphorylierungen sowie Argininmethylierungen identifiziert (Fischle *et al.* 2003; Bhaumik *et al.* 2007; Kouzarides 2007). Die Komplexität der PTMs wird weiter erhöht, bedenkt man, dass Lysinreste mono-, di- oder trimethyliert werden können (Rice *et al.* 2003). Die Methylierung an Argininresten erfolgt unter Einbau einer oder zwei Methylgruppen, wobei diese symmetrisch oder asymmetrisch angeordnet sein können (Bannister *et al.* 2002; Kouzarides 2007).



Abbildung 1-2: Ausgewählte posttranslationale Modifizierungen der *Core*-Histone. Die Mehrzahl aller PTMs treten an den N-terminalen *tails* auf. Diese Modifizierungen beinhalten unter anderem die Acetylierung (Ac) und Methylierung (Me) von Arginin- und Lysinresten, die Phosphorylierung (P) von Serin und Threonin und Ubiquitinierung (Ub) von Lysinen. Die globulären Histonfaltungsdomänen sind als Kristallstruktur (1KX5) dargestellt. (Abbildung modifiziert nach Bhaumik *et al.* 2007)

Obwohl die am häufigsten untersuchten Histon-PTMs hauptsächlich in N-terminalen Histonbereichen lokalisiert sind, konnten auch zahlreiche Modifizierungen C-terminal und innerhalb der Histon-faltungsdomänen identifiziert werden (Felsenfeld und Groudine 2003; Cosgrove *et al.* 2004; Peterson und Laniel 2004). Eine Auswahl der prominentesten *Core*-Histon PTMs ist in Abbildung 1-2 zusammengefasst. Im Gegensatz zu den hochkonservierten *Core*-Histonen (H2A, H2B, H3 und H4), weisen die Linker-Histone H1 eine weitaus größere Variabilität zwischen verschiedenen Spezies auf (Thoma *et al.* 1979; Pruss *et al.* 1996). Alleine in Säugern werden sieben verschiedene H1-Varianten kodiert (Yamamoto und Horikoshi 1996; Happel *et al.* 2005; Wisniewski *et al.* 2007). Die Interaktion zwischen den Linker-Histonen und der Linker-DNA wird über die zentrale, globuläre Domäne des H1 vermittelt. Neben dieser unpolaren, strukturierten Region, verfügt H1 analog zu den *Core*-Histonen über unstrukturierte terminale Enden, die posttranslational modifiziert werden (Thoma *et al.* 1979; Tweedie-Cullen *et al.* 2009).

Die Anzahl der identifizierten Histonmodifizierungen steigt stetig. Durch die Identifizierung verschiedener Histon-PTMs aus unterschiedlichen Bereichen des Chromatins und damit des Genoms, wuchs auch das Interesse an der biologischen Funktion. Da Methylierungen im Gegensatz zu den meisten anderen posttranslationalen Histonmodifizierungen biochemisch besonders stabil sind, gehören sie zu den am besten charakterisierten Histon-PTMs (Kouzarides 2007; Fischle 2009). Die bekanntesten Methylierungen N-terminaler H3- und H4-Bereiche, die mit verschiedenen Chromatinzuständen assoziiert sind und denen somit eine klar definierte biologische Funktion zugeschrieben wird, sind H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3 und H4K20me3 (Vermeulen et al. 2010). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass einige dieser Methylierungen für die zeitlich begrenzte oder dauerhafte Geninaktivierung verantwortlich sind (H3K9me3, H3K27me3 und H4K20me3), während andere die Genaktivierung steuern (H3K4me3 und H3K36me3) (Rice et al. 2003; Bernstein et al. 2005; Li et al. 2007a; Vermeulen et al. 2007; Vermeulen et al. 2010). Im Gegensatz zu Methylierungen, die mit Eu- und Heterochromatin assoziiert werden, markieren Histonacetylierungen in der Regel transkriptionell aktive Chromatinbereiche (Chahal et al. 1980; Kouzarides 2007; Li et al. 2007a; Cruickshank et al. 2010). Aufgrund der Schlüsselfunktion, die Histonacetylierungen in der Genaktivierung einnehmen, soll ihre Funktionsweise in den Abschnitten 1.1.3 und 1.1.4 näher betrachtet werden.

Analog hierzu, haben die anderen Histon-PTMs (Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, ADP-Ribosylierung oder Prolinisomerisierung) ebenfalls Einfluss auf verschiedene DNA-assoziierte Prozesse (Transkription, DNA-Reparatur, Chromatinkondensation oder DNA-Replikation), auf die jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

1.1.3 Histon-Modifizierungsenzyme

Die Klasse der Histon-modifizierenden Enzyme umfasst all diejenigen Proteine, die kovalente Verbindungen an bestimmte Aminosäuren knüpfen und solche, die diese Verbindungen wieder entfernen. Dazu zählen unter anderem Histonmethyltransferasen (HMTs), die die Etablierung von Methylierungen katalysieren, sowie Histondemethylasen (HDMs) als deren Gegenspieler (Zhang und Reinberg 2001; Bannister und Kouzarides 2005). Aufgrund ihrer Affinität zu meist nur einer Aminosäure eines bestimmten Histons, zählen die HMTs zu den spezifischsten Histon-Modifizierungsenzymen. Bei HMTs unterscheidet man zwischen Lysin- und Arginin-spezifischen Enzymen. Je nach Art der HMT werden bis zu drei Methylgruppen auf die Lysinseitenkette und bis zu zwei Methylgruppen (symmetrisch oder asymmetrisch) auf Argininseitenketten übertragen. Der bekannteste Vertreter dieser Enzymgruppe ist SUV39H1, das wie die meisten Lysin-spezifischen HMTs über eine hochkonservierte SET-Domäne, die das katalytische Zentrum für die Methylierungsreaktion bildet, verfügt (Jenuwein et al. 1998; Lachner und Jenuwein 2002; Chin et al. 2006). SUV39H1 trimethyliert den H3-tail an Lysin 4 und inaktiviert dadurch die Genaktivität (Rea et al. 2000). Die ersten Proteine mit Demethylaseaktivität wurden erst vor ein paar Jahren nachgewiesen. Diese Enzyme zeichnen sich in der Regel durch katalytisch aktive LSD1-Domänen (Shi et al. 2004) und JmjC-Domänen (Tsukada et al. 2006) als Histondemethylase-Domänen aus.

Eine ähnlich hohe Spezifität wie die HMTs, weisen auch die Proteinkinasen (PK) und die dazugehörigen Proteinphosphatasen (PP) auf, die den Phosphorylierungsgrad von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten kontrollieren. Für Histone wurden zwei Klassen von PK beschrieben. Dazu zählen zum einen sequenzspezifische Kinasen wie die mitogen- und stressaktivierten Proteinkinasen 1 und 2 (MSK1, MSK2) (Chwang *et al.* 2007) oder die extrazellulär-regulierte Proteinkinase (ERK) (Chwang *et al.* 2006). Die zweite Klasse von histonspezifischen PK stellt die Familie der mitotischen Aurora-Kinasen dar (Hsu *et al.* 2000). Für die Dephosphorylierung von Histonresten wurden Mitglieder aus der Typ 1 Phosphatase (PP1)-Familie identifiziert (Murnion *et al.* 2001; Nowak und Corces 2004; Koshibu *et al.* 2009).

Die Histonacetylierung zählt zu den am besten verstandenen Histonmodifizierungen. Ein spezifischer Acetylierungsgrad wird durch die aufeinander abgestimmte Aktivität von Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) eingestellt (Kurdistani und Grunstein 2003; Biel *et al.* 2005). Bereits Anfang der 1970er-Jahre wurden Enzyme mit einer intrinsischen HAT-Aktivität nachgewiesen (Sterner und Berger 2000). Entsprechend ihrer biologischen Funktion, ihrer Lokalisation oder homologer Sequenzbereiche, wurden diese Enzyme in fünf verschiedene Enzymfamilien eingeteilt: 1.) GNAT-Familie, 2.) MYST-Familie, 3.) CBR/p300, 4.) Kernrezeptor Koaktivatoren und 5.) TBP-

assoziierte Transkriptionsfaktoren (Sterner und Berger 2000; Marmorstein und Roth 2001; Roth *et al.* 2001; Cruickshank *et al.* 2010). Strukturell betrachtet zeichnen sich die Mitglieder der GNAT-Familie (*Gcn5-related N-acetyltransferase*) durch eine hochkonservierte, ca. 160 Aminosäuren-umfassende katalytische Domäne (HAT-Domäne) und eine carboxyterminal-gelegene Bromodomäne (siehe Abschnitt 1.1.6) für die spezifische Erkennung acetylierter Lysinreste aus. Zu der GNAT-Familie zählen Gcn5, PCAF, Hat1, Elp3 und Hpa2 (Sterner und Berger 2000; Roth *et al.* 2001; Biel *et al.* 2005). Der Mechanismus der Gcn5-katalysierten Acetylierung von Lysin 14 an Histon H3 ist in Abbildung 1-3 dargestellt.



Abbildung 1-3: Gcn5-katalysierte Acetylierung von H3K14. Der nukleophile Angriff der ε-Aminofunktion des Lysins auf das vorkoordinierte Acetyl-CoA (blau) wird durch Gcn5-Glu122 (fungiert als Base) unterstützt. Die Amidfunktion von Gcn5-Leu126 stabilisiert den Übergangszustand, der unter Bildung von CoASH und acetyliertem H3K14 zerfällt (Rojas *et al.* 1999). (Abbildung modifiziert nach Biel *et al.* 2005)

Die MYST-Familie der HATs ist nach ihren Mitgliedern (<u>M</u>OZ, <u>Y</u>bf2/Sas3, <u>S</u>as2 und <u>T</u>ip60) benannt (Borrow *et al.* 1996). Darüber hinaus werden auch die Enzyme Esa1, HBO1 und MORF zur Familie der MYST-HATs gezählt (Sterner und Berger 2000). Neben der katalytischen Domäne (ca. 250 Aminosäuren), verfügen die MYST-Enzyme außerdem über eine zinkbindende Domäne (C2H2-Zinkfingerdomäne) und eine N-terminale Chromodomäne (siehe Abschnitt 1.1.6) für die spezifische Erkennung von methylierten Lysinresten (Biel et al. 2005; Vonlaufen et al. 2010). Zu den am besten charakterisierten HATs gehören die beiden Koaktivatoren p300 und CBP (CREB-bindendes Protein). Sie zeichnen sich durch mehrere funktionelle, hochkonservierte Domänen, bestehend aus einer etwa 500 Aminosäuren-umfassenden HAT-Domäne, einer Bromodomäne, einer Glutamin-reichen Region und drei Cystein-Histidin-reichen Motiven, aus (Kraus et al. 1999). Die Glutamin- und Cystein-reichen Regionen dienen dabei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Die vierte Klasse der HATs, die Kernrezeptor Koaktivatoren (z.B. SRC1, ACTR, TIF2), kontrollieren die Transkription in Abhängigkeit bestimmter hormoneller Signale (Sterner und Berger 2000). Strukturell weisen sie eine C-terminale HAT-Domäne, eine zentrale Rezeptor-Interaktionsdomäne (RID) und eine N-terminale bHLH-PAS-Domäne (basic helix-loop-helix-PAS) auf (Crews und Fan 1999; Marmorstein 2001). TATA-Box Bindeprotein (TBP)-assoziierte Transkriptionsfaktoren (z.B. humanes-TAF(II)250, Drosophila-TAF(II)230 oder Hefe-Taf(II)130) weisen eine intrinsische HAT-Aktivität auf und bilden die fünfte Klasse der Histonacetyltransferasen (Mizzen et al. 1996). Diese Proteine besitzen neben der zentral gelegenen HAT-Domäne zwei terminale Kinasedomänen sowie eine Bromodomäne, die innerhalb der C-terminalen Kinasedomäne lokalisiert ist (Jacobson et al. 2000; Marmorstein 2001).

Als Gegenspieler zu den HATs werden HDACs, die die Abspaltung der Acetylfunktion katalysieren, aufgrund von Sequenzhomologien in drei Enzymklassen eingeteilt (Gray und Ekstrom 2001). Die erste Klasse der HDACs umfasst die Proteine HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 und leitet sich von der aus der Hefe stammenden HDAC RPD3 ab (Taunton et al. 1996; Gray und Ekstrom 2001). HDACs dieser Klasse werden vorwiegend im Zellkern der meisten Gewebe und Zellkulturen exprimiert (Dangond et al. 1998; Emiliani et al. 1998; Buggy et al. 2000; Hu et al. 2000). Klasse II-HDACs (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 und HDAC10) sind homolog zum Hefeprotein Hda1 (Fischle et al. 1999; Grozinger et al. 1999; Cruickshank et al. 2010). Im Gegensatz zu Klasse I-HDACs werden sie gewebespezifisch exprimiert und können sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden (Verdin et al. 2003). HDACs der Klassen I und II verfügen über eine hochkonservierte, etwa 390 Aminosäuren-umfassende katalytische Domäne. Die Hydrolyse der Acetylgruppe erfolgt letztlich aufgrund der Aktivierung eines Wassermoleküls durch ein Zinkion im aktiven Zentrum (Finnin et al. 1999; Biel et al. 2005). Die HDACs der dritten Klasse gehen auf den Transkriptionsrepressor Sir2 aus Hefe zurück und werden daher auch als Sirtuin-Klasse bezeichnet (Imai et al. 2000). Anders als bei HDACs der Klassen I und II wird die katalytische Aktivität der Enzyme der Sirtuin-Klasse (SIRT1-SIRT7) über den Kofaktor Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) gesteuert (Frye 1999; Frye 2000; Imai *et al.* 2000). Strukturell zeichnen sich die Sirtuine neben einer 275 Aminosäuren großen katalytischen Domäne durch zwei Zinkfingerdomänen, welche Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen vermitteln, aus (Frye 2000).

Neben den beschriebenen Histon-modifizierenden Enzymen wurden auch Enzyme identifiziert, die die Ubiquitinierung (Shilatifard 2006), Sumoylierung (Nathan *et al.* 2006), ADP-Ribosylierung (Hassa *et al.* 2006) und Prolinisomerisierung (Nelson *et al.* 2006) katalysieren.

1.1.4 Rolle von Histonacetylierungen

Bereits kurze Zeit nach der Entdeckung der ersten Histonacetylierungen Anfang der 1960er Jahre (Phillips 1963), wurden diese Modifizierungen als Kennzeichen für transkriptionell aktives Chromatin beschrieben (Allfrey *et al.* 1964; Chahal *et al.* 1980; Csordas 1990; Turner und O'Neill 1995; Brownell *et al.* 1996; Li *et al.* 2007a). Dies kann durch die Abnahme der positiven Nettoladung des Histon*-tails*, als Folge der Acetylierung von Lysinseitenketten, erklärt werden. Dabei werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Rückgrat der DNA-Phosphatreste und dem Histon*-tail* aufgehoben, was in einer weniger kondensierten Chromatin-Struktur und einer erhöhten DNA-Zugänglichkeit resultiert (McGhee *et al.* 1980; Norton *et al.* 1990).

Wie in Abbildung 1-2 zu sehen, können alle vier *Core*-Histone an spezifischen Lysinresten acetyliert werden: H3 (K9, K14, K18, K23, K27, K36, K56), H4 (K5, K8, K12, K16), H2A (K9) und H2B (K5, K12, K15, K20). Einzelne dieser Modifizierungen oder deren Zusammenspiel regulieren dabei Prozesse wie Nukleosomenaufbau, Chromatinkondensation und –konformation oder Gentranskription (Grunstein 1997; Shahbazian und Grunstein 2007), die im Folgenden näher betrachtet werden.

Nukleosomenaufbau

Die Synthese der Histonproteine findet in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus, während der DNA-Replikation, statt (Lucchini *et al.* 2001). Direkt nach der Synthese werden die Histone durch zytoplasmatisch-aktive Histonacetyltransferasen (z.B. Hat1) modifiziert (Ruiz-Carrillo *et al.* 1975; Sobel *et al.* 1995). Während neu synthetisiertes Histon H4 in vielen Eukaryoten spezifisch an den Lysinresten 5 und 12 acetyliert wird, sind die Acetylierungen an neu synthetisiertem Histon H3 weniger konserviert (z.B. K9 und K14 in *Tetrahymena*, K14 und K23 in *Drosophila*, keine Acetylierung in humanen Zellen) (Allis *et al.* 1985; Sobel *et al.* 1995; Kuo *et al.* 1996; Shahbazian und Grunstein 2007). Der Nukleosomenaufbau beginnt mit der Bindung von neu synthetisierten H3/H4-Tetrameren an die DNA mit anschließender Anlagerung von zwei H2A/H2B-Dimeren. Die geordnete Bindung der basischen Histonproteine an die DNA wird durch Histon-Chaperone (z.B. Nukleoplasmin, Nap-1,

CAF-1, Hira) kontrolliert. Das humane Histon-Chaperon CAF-1 (*chromatin assembly factor-1*) ist mit den Histonen H3 und H4 assoziiert, der kontrollierte Einbau der Histone H2A und H2B wird über das Histon-Chaperon Nap-1 (*nucleosome assembly protein-1*) vermittelt (Loyola und Almouzni 2004b). Zunächst wurde vermutet, dass die Erkennung von H3/H4 durch CAF-1 über die spezifische K5/12-Bisacetylierung neu synthetisierter Histon H4-Proteine verläuft (Kaufman *et al.* 1995; Verreault *et al.* 1996). Mittlerweile ist bekannt, dass nicht alleine die Acetylierung an den Aminosäuren Lys 5 und Lys 12, sondern ebenso die Acetylierung an K5, K8 und K12 (jedoch nicht an K16) die Bindung von CAF-1 an H3/H4 und somit den Nukleosomenaufbau vermittelt (Ma *et al.* 1998). In den letzten Jahren wurden neben den erwähnten *tail*-Acetylierungen auch Acetylierungen innerhalb der globulären Histondomänen neu synthetisierter Histone (H3K56 und H4K91) im Zusammenhang mit der Bindung des Histon-Chaperons CAF-1 an H3/H4 diskutiert (Masumoto *et al.* 2005; Ye *et al.* 2005; Recht *et al.* 2006). Acetylierungen innerhalb der N-terminalen Histon-*tails* und der globulären Domänen neu synthetisierter Histone vermitteln somit die spezifische Bindung von Histon-Chaperonen und damit eine geordnete Bindung an die DNA.

Chromatinkondensation und -konformation

Der Acetylierungsgrad der Core-Histone spielt ebenso eine zentrale Rolle bei der Kondensation der DNA in höher geordnete Chromatinstrukturen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die terminalen Enden der Histone sowohl mit der nukleosomalen DNA als auch mit der Linker-DNA interagieren und dabei 30 nm Chromatinfasern bilden (Annunziato et al. 1988; Tse et al. 1998; Angelov et al. 2001). Die Acetylierung der Histon-tails bewirkt eine Abnahme ihrer positiven Nettoladung, wodurch elektrostatische Histon-DNA-Wechselwirkungen aufgehoben werden (McGhee et al. 1980; Norton et al. 1990). Dies führt zur Destabilisierung der 30 nm Chromatinfasern und damit zu einer offeneren Chromatinstruktur. Der Einfluss der Histonacetylierung auf die Chromatinkondensation wurde im Besonderen für Histon H4 diskutiert. Kristallstrukturuntersuchungen zeigen, dass die Aminosäuren 14-23 von Histon H4 viele Wasserstoff- und Salzbrücken mit sauren H2A/H2B-Dimerbereichen benachbarter Nukleosomen ausbilden, die durch H4-Hyperacetylierung terminiert werden (Arents et al. 1991; Luger et al. 1997; Shahbazian und Grunstein 2007). Die Acetylierung von Lysin 16 an Histon H4, die innerhalb des oben genannten Bereichs liegt, scheint dabei eine Schlüsselrolle einzunehmen. In vitro-Experimente haben gezeigt, dass die Monoacetylierung von H4K16 den gleichen Effekt auf die Ausbildung höher geordneter Chromatinstrukturen (30 nm Chromatinfasern) hat, wie eine vollständige Deletion des gesamten H4-tails (Shogren-Knaak et al. 2006; Shogren-Knaak und Peterson 2006). Der Acetylierungsstatus von Lysin 16 beeinflusst dabei sowohl die durch intra- als auch

intermolekulare Wechselwirkungen bedingte Chromatin-Kondensation. Darüber hinaus wurde die K16-Acetylierung an Histon H4 als Schlüsselmodifizierung für die Ausbildung von aktivem Euchromatin (acetyliert) und inaktivem Heterochromatin (nicht acetyliert) beschrieben (Megee *et al.* 1990; Luo *et al.* 2002). Diese Funktion wird über die acetylierungsabhängige Interaktion des H4-*tails* mit verschiedenen SIR (*silencing information regulation*)-Proteinen, Strukturproteinen von inaktivem Chromatin, gesteuert (Gasser und Cockell 2001; Oppikofer *et al.* 2011). Die Acetylierung von Histon-H4K16 vermittelt dabei beispielsweise die Rekrutierung des Proteins Sir2, welches HDAC-Aktivität besitzt. Durch die Deacetylierung des Lysinrest 16 wird die Interaktion von H4 mit dem Protein Sir3 und damit die Ausbreitung von Heterochromatin initiiert (Oppikofer *et al.* 2011). Der bekannteste Prozess, der über Histondeacetylierung (Formierung von Heterochromatin) gesteuert wird, ist die Inaktivierung eines weiblichen X-Chromosoms (Xi) und damit die Dosiskompensation zwischen männlichen und weiblichen Zellen in Säugetieren (Casas-Delucchi *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu führt die H4K16-Acetylierung in dem männlichen X-Chromosom in *Drosophila* zur Ausbildung von aktivem Euchromatin und einer Verdopplung der Transkriptionsrate (Turner *et al.* 1992; Lavender *et al.* 1994).

Gentranskription

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, beeinflussen spezifische Histonacetylierungen die Chromatinkonformation, weshalb sie auch stark mit der Gentranskripition korrelieren. Die Mechanismen der Transkriptionsaktivierung werden dabei verschieden diskutiert. Ein wichtiger Fakt dabei ist vor allem die aufgrund der Acetylierung hervorgerufene Ladungsneutralisierung, die zu einer weniger dicht gepackten Chromatinstruktur führt. Dies wiederum bewirkt eine bessere Zugänglichkeit der DNA für verschiedene Transkriptionsfaktoren (Lee *et al.* 1993). Zusätzlich wird vermutet, dass bestimmte Acetylierungen Bindungsstellen für Proteine darstellen, die mit Genaktivierung und Transkription assoziiert sind. Wie bereits erwähnt, wird der Acetylierungsstatus der Histone durch das Zusammenspiel von HATs und HDACs kontrolliert (siehe Abbildung 1-4).



Abbildung 1-4: Acetylierung und Deacetylierung von Chromatin. Die Acetylierung (Ac) von Histonen durch HATs bewirkt eine Öffnung der Chromatinstruktur und damit eine Genaktivierung. Die Aktivität von HDACs führt zur Histondeacetylierung und somit Geninaktivierung.

Genaktivierung ist dabei mit der Aktivität von HATs, welche meist Untereinheiten größerer Acetyltransferasekomplexe sind (z.B. Gcn5 als Teil des Spt-Ada-Gcn5 [SAGA]-Komplex oder Esa1 als Teil des Nukleosomacetyltransferasekomplex [NuA4]), assoziiert (Grant *et al.* 1997; Allard *et al.* 1999; Kuo *et al.* 2000). Es stellte sich heraus, dass diese Komplexe durch transkriptionelle Aktivatoren direkt an stromaufwärts aktivierende Sequenzelemente (UAS) rekrutiert werden und dort die Rekrutierung weiterer Transkriptions- oder Chromatinumbaufaktoren über spezifische Histonacetylierungen/-deacetylierungen steuern (Fukuda *et al.* 2006; Shahbazian und Grunstein 2007). So wird beispielsweise die Gcn5-katalysierte Acetylierung und Transkription des *HIS3*-Gens in Hefe von dem Aktivator Gcn4 und seiner Bindungsstelle innerhalb der UAS gesteuert (Kuo *et al.* 2000). Gcn5 gehört zur Gruppe der GNAT-HATs, die neben einer katalytischen Domäne auch über eine carboxy-terminale Bromodomäne für die spezifische Erkennung acetylierter Lysinreste verfügen (siehe Abschnitte 1.1.3 und 1.1.6). Diese vermittelt die Bindung der HAT an die aktiven Genbereiche und führt zur Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren, auch wenn die Aktivatoren, die die anfängliche Rekrutierung vermittelt haben, nicht mehr vorhanden sind (Hassan *et al.* 2006).

Neben den beschriebenen Prozessen, die über verschiedene Histonacetylierungen kontrolliert bzw. beeinflusst werden, reguliert das Zusammenspiel von HATs und HDACs auch weitere DNA-assoziierte Prozesse (DNA-Rekombination und –Replikation, DNA-Reparatur), auf die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden soll.

1.1.5 Rolle von Ser1-Phosphorylierung an Histon H4

Die Phosphorylierung von Serin 1 an Histon H4 wurde erstmals 1970 von Michael Sung und Gordon Dixon beschrieben (Sung und Dixon 1970). Darüber hinaus wurden Phosphorylierungen an Histidin 18 und 75 von Histon H4 detektiert, die sonst eher selten sind (Besant und Attwood 2000; Besant *et al.* 2003). Der Einfluss der Phosphorylierung von Histon-*tails* auf Prozesse wie Transkription, DNA-Reparatur, Apoptose und Chromatinkondensation wird dabei ähnlich wie für Histonacetylierungen diskutiert. Durch das Anheften einer negativ geladenen Phosphatgruppe an den positiv geladenen Histon-*tail* kommt es zu einer Verminderung der positiven Nettoladung. Wie bereits für Histonacetylierungen beschrieben, führt das zur Aufhebung der elektrostatischen Wechselwirkungen des *tails* mit dem DNA-Rückgrat und resultiert in einer lockereren Chromatinstruktur (siehe Abschnitt 1.1.4) (Sung und Dixon 1970). Aufgrund dessen wird die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten häufig im Zusammenhang mit der Mitose und der Transkriptionsaktivierung diskutiert (Hsu *et al.* 2000). Trotz der Besonderheit der Histidinphosphorylierungen, soll im Folgenden lediglich der Einfluss von Serin 1-Phosphorylierungen diskutiert werden. Die Phosphorylierung des Ser1 an Histon H4 wird von der Casein Kinase II (CDKII) katalysiert (Cheung et al. 2005) und ist evolutionär hoch konserviert (Barber et al. 2004; Krishnamoorthy et al. 2006). Neuere Studien in S. cerevisiae geben Hinweise darauf, dass die H4-Serin1-Phosphorylierung die Sporulation reguliert und eine evolutionär konservierte Rolle bei der Kompaktierung des Chromatins in späteren Stadien der Gametogenese spielt (Krishnamoorthy et al. 2006; Wendt und Shilatifard 2006; Govin et al. 2010). Die Rolle der Serin 1-Phosphorylierung an Histon H4 bei den eben genannten Prozessen ist dabei bisher nicht vollständig aufgeklärt, jedoch werden drei mögliche Prozesse diskutiert. Die erste Theorie besagt, dass die Serin 1-Phosphorylierung direkt in die Chromatinkondensation involviert ist. Kristallstrukturuntersuchungen in Hefe haben gezeigt, dass es zur Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen des nukleosomalen N-terminalen H4-tails mit DNA benachbarter Nukleosomen kommt (Zheng und Hayes 2003). Durch die Serin 1-Phosphorylierung an H4 würden diese Interaktionen aufgehoben und die Chromatinstruktur gelockert. Der zweite mögliche Mechanismus für die Rolle der H4-Serin 1-Phosphorylierung während der Chromatinkondensation beruht auf der Theorie, dass der phosphorylierte tail als Köder für die spezifische Rekrutierung von Chromatinumbauenden Faktoren dient (Wendt und Shilatifard 2006). Proteine, die spezifisch an Serin 1phosphoryliertes H4 binden, wurden jedoch bisher nicht beschrieben. Aufgrund der besonderen Rolle, die die Serin 1-Phosphorylierung bei der Spermatogenese einnimmt (Krishnamoorthy et al. 2006), beinhaltet der dritte mögliche Mechanismus, dass die Phosphorylierung als Signal für den hochspezifischen Austausch der Histone durch spermienspezifische Histonvarianten dient (Wendt und Shilatifard 2006).

1.1.6 Bindungsmodule an Histon PTMs

Wie in den vergangenen Kapiteln beschrieben, spielen Histonmodifizierungen (PTMs) eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Chromatin-umbauenden Proteinkomplexen und somit bei nahezu allen DNA-assoziierten Prozessen. Untereinheiten dieser Proteinkomplexe weisen meist spezifische Proteindomänen auf, die vermutlich für diese Rekrutierung verantwortlich sind, indem sie modifizierte Aminosäuren erkennen und binden. Die prominentesten Vertreter dieser Proteindomänen sind Bromodomänen, die acetylierte Lysinreste spezifisch erkennen und binden können, und Chromodomänen für die spezifische Bindung an methylierte Lysinreste (Jenuwein und Allis 2001).

Bromodomänen (BRD) sind strukturell hochkonservierte, etwa 110 Aminosäuren-umfassende Proteinstrukturen, die in vielen Chromatin-assoziierten Proteinen, insbesondere in vielen

Histonacetyltransferasen, enthalten sind (Zeng und Zhou 2002; Taverna *et al.* 2007). Insgesamt konnten 121 humane Bromodomänen-enthaltende Proteine identifiziert werden (SMART-Analyse, *Simple Modular Architecture Research Tool*, EMBL Heidelberg (Schultz *et al.* 1998; Letunic *et al.* 2012)). Diese Proteine werden in drei Klassen wie folgt eingeteilt: Die erste Klasse beinhaltet alle BRD-enthaltenden HATs, wie beispielsweise Gcn5 (siehe Abbildung 1-5), PCAF oder TAF(II)250. Die zweite Klasse der BRD-enthaltenden Proteine vereinigt alle ATP-abhängigen Chromatin-umbauenden Komplexe, wie Brahma, Swi2, Snf2 und Brg1. Transkriptionsregulatoren wie Bdf1, Bdf2, Bdr4 und Brd2 gehören der weniger gut charakterisierten dritten Klasse, der BET-Klasse (Bromo- und Extraterminale Domäne) der BRD-Proteine an (Loyola und Almouzni 2004a).



Abbildung 1-5: Kristallstruktur der Gcn5-Bromodomäne (blau) mit gebundenem Lys16-acetyliertem H4-Peptid (AS 14-28, grün). Die Bromodomänenstruktur besteht aus vier α -Helices (A, Z, B, C) und zwei Schleifen (ZA und BC), welche eine hydrophobe Bindungstasche für die Interaktion mit dem acetylierten Peptid bilden. Z' kennzeichnet eine der Z-Helix gegenüber gestellte Helix. Die Abbildung basiert auf der PDP-Struktur 1E6I (Owen *et al.* 2000).

In Abbildung 1-5 ist die aus NMR-Untersuchungen ermittelte Kristallstruktur der Gcn5-BRD dargestellt. Strukturell setzt sie sich, wie alle BRD, aus vier linksgewundenen, antiparallelen α -Helices (α_A , α_z , α_B und α_c) zusammen, wobei die Z- und A-Helices durch eine größere Schleife (ZA) und die B- und C-Helices durch eine kleine Schleife (BC) miteinander verbunden sind (Owen *et al.* 2000). Diese Schleifen sind so organisiert, dass sie eine hydrophobe Bindungstasche gegenüber der N- und C- terminalen Domänenenden ausbilden, in welcher die Bindung von Acetyllysin erfolgt (Zeng und Zhou 2002). Den hydrophoben Charakter erhält die Bindungstasche durch strukturell konservierte aromatische, hydrophobe und ungeladene Aminosäuren, die so ausgerichtet sind, dass die Tasche im wesentlichen hydrophob und neutral ist und eine intrinsische Wasserstoffbindungskapazität an der Oberfläche behält. Die Verankerung der Acetylgruppe in der Bindungstasche erfolgt unter Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Acetylcarbonyl-Gruppe und der Amidfunktion eines

konservierten Asparaginrests (Owen *et al.* 2000; Taverna *et al.* 2007). Die Erkennung des Acetyllysins wird zusätzlich durch die flankierenden Aminosäuren am Histon bestimmt. Während die an der Erkennung des Acetyllysins beteiligten Aminosäuren innerhalb der BRD-Familien hoch konserviert sind, ermöglichen Sequenzunterschiede innerhalb der ZA- und BC-Schleifen die Diskriminierung verschiedener Bindungsstellen (Zhang et al. 2010).

Die Bindung von methylierten Lysinen- oder Argininresten erfolgt je nach Ausprägung durch eine ganze Reihe verschiedener Domänen. Dazu zählen die eng verwandten Chromo-, Tudor- und MBT-Domänen sowie das strukturell unterschiedliche PHD-Motiv (Kim et al. 2006; Li et al. 2007b). Für die spezifische Erkennung phosphorylierter Histone sind darüber hinaus 14-3-3- und BRCT-Proteindomänen bekannt (zusammengefasst in Taverna et al. 2007).

1.1.7 Histon-Code Theorie oder Ladungsneutralisierung?

Die steigende Anzahl identifizierter Histon-PTMs aus unterschiedlichen Bereichen des Chromatins und damit des Genoms sowie die Identifizierung von Proteindomänen, die spezifische Histonmodifizierungen erkennen, führten zu einem gesteigerten Interesse an der biologischen Funktion dieser Modifizierungen.

Im Laufe der Jahre haben sich zwei unterschiedliche Hypothesen über die mechanistische Funktion der Histon-PTMs etabliert. Ein relativ einfaches Modell ist, dass die Histonmodifizierungen die Chromatinstruktur direkt beeinflussen, indem sie die Interaktion der Histonproteine mit sowohl interals auch intranukleosomaler DNA modulieren. Dies resultiert entweder in einer Öffnung oder Schließung des Chromatins und in einer dementsprechend verbesserten bzw. schlechteren Zugänglichkeit der DNA für Chromatin-assoziierte Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren. Diese Theorie wird vor allem für Histonacetylierungen beschrieben, da diese Modifizierung die positive Nettoladung von Lysinresten neutralisiert und somit die Interaktionen mit der negativ geladenen DNA reduziert werden (McGhee *et al.* 1980; Norton *et al.* 1990).

Durch den Einfluss den Histon-PTMs auf die Chromatinstruktur und die Rekrutierung von Chromatinassoziierten Proteinen sowie durch die Identifizierung von Histon-PTM-Bindungsdomänen, entwickelte sich die zweite Hypothese, die als "Sprache kovalenter Histonmodifizierungen" oder "Histon-Code"-Theorie bekannt wurde (Strahl und Allis 2000; Jenuwein und Allis 2001). Die Hypothese besagt, dass spezifische (oder die Kombination mehrerer) Histon-PTMs die Rekrutierung von Proteinen, die den "Code lesen" können, initiieren und deren Zusammenwirken bestimmte biologische Prozesse reguliert.

Im aktuellen Stand der Wissenschaft wird die Theorie des Histon-Codes insbesondere für Histonmethylierungen favorisiert. Als Beispiel hierfür sei die Methylierung von Histon H3 an Lysin 9 genannt, welche von der Chromodomäne des Heterochromatin-Protein 1 (HP1) spezifisch erkannt wird und Chromatinkondensation und Gen-*Silencing* vermittelt (Bannister *et al.* 2001; Lachner *et al.* 2001). In Gegenwart von methyliertem Lysin 4 an H3 und methyliertem H4K20, ist die H3K9-Methylierung jedoch an der Aufrechterhaltung von aktivem Chromatin beteiligt (de la Cruz *et al.* 2005).

Im Gegensatz dazu haben Dion *et al.* gezeigt, dass der Einfluss von Histonacetylierungen an H4 an Lysin 5, 8 und 12 lediglich einen kumulativen Effekt auf die Genexpression hat, während allein die Acetylierung von H4K16 entscheidenden Einfluss auf die Transkriptionsrate hervorruft (Dion *et al.* 2005). Ein ähnlicher Effekt wurde auch von Shogren-Knaak *et al.* beschrieben, die in *in vitro* Experimenten nachgewiesen haben, dass die Monoacetylierung von Lysin 16 an Histon H4 einen entscheidenden Einfluss bei der Ausbildung höher geordneter Chromatinstrukturen hat (Shogren-Knaak *et al.* 2006; Shogren-Knaak und Peterson 2006). Da diese spezifischen Prozesse lediglich von der Acetylierung einer einzelnen Aminosäure (H4K16) beeinflusst werden, kann man in diesem Fall nicht von einem "Code" sprechen (Henikoff 2005). Die Tatsache, dass die anderen Lysinacetylierungen einen kumulativen Effekt auf die Genexpression haben, unterstützt die Theorie der Ladungsneutralisierung.

1.2 Protein-Protein-Wechselwirkungen

Die systematische Analyse von Protein-Protein-Interaktionen stellt heutzutage einen wichtigen Teil der funktionellen Genomforschung dar. In Anlehnung an das Forschungsgebiet der *Genomics*, das sich mit der Untersuchung der Gesamtheit aller Gene (Genom) befasst, bezeichnet man die Erforschung aller Proteine in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment (Proteom) als *Proteomics* (Wilkins *et al.* 1996). Das Proteom reflektiert einen aktuellen physiologischen Zustand innerhalb der Zelle, der durch vielfältige Faktoren, Interaktionen und Umgebungsparameter variiert werden kann (Lottspeich 1999). Im Gegensatz zum relativ statischen Genom mit seinen ca. 23 000 Genen (Flicek *et al.* 2008), ist die Anzahl der in einem Organismus tatsächlich vorhandenen Proteinspezies durch verschiedene posttranskriptionale und -translationale Modifizierungen um ein Vielfaches größer und spiegelt somit den dynamischen Zustand des Proteoms wieder. Die gesteigerte Proteinvielfalt entsteht dabei z.B. durch die Modifizierung von Primärtranskripten durch alternatives Spleißen oder RNA-Editierung, welche die

Zahl der Protein-kodierenden *messenger* RNAs vergrößert (Aebersold und Goodlett 2001). Die Anzahl der Proteine erhöht sich zusätzlich durch chemische Modifizierungen oder limitierte Proteolyse des primären Translationsprodukts auf RNA-Ebene (Hershko *et al.* 2000). Einen entscheidenden Einfluss auf die Dynamik des Proteoms hat nicht zuletzt die Vielzahl der beschriebenen kovalenten Proteinmodifizierungen (Krishna und Wold 1993). Die Komplexität wird zusätzlich erhöht, bedenkt man, dass die Funktion und der Phänotyp einer Zelle nicht durch ein einzelnes Protein, sondern vielmehr durch das komplexe Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Proteine bestimmt wird. Die Funktionsweise dieser Proteinnetzwerke wird dabei nicht allein durch die Aktivität der Proteine, sondern auch durch die Art und Weise wie sie miteinander interagieren, bestimmt (Vazquez *et al.* 2003). So kann z.B. die Bindung von Metallionen oder Einführung einer PTM zu Konformations-änderungen innerhalb des Proteins führen, die wiederum die Affinität, die Kooperativität oder andere kinetische Parameter für die Bindung beeinflussen (Berggard *et al.* 2007).

Die Analyse des Aufbaus und der Regulation komplexer Protein-Protein-Wechselwirkungen wird in dem Forschungsgebiet der *Interactomics* zusammengefasst. Die Erforschung des Interaktoms kann dabei molekulare Zusammenhänge innerhalb der Zelle und Hintergründe biologischer Funktionen aufklären.

1.2.1 Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Für die Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Methoden beschrieben. Diese Methoden ermöglichen entweder die Suche nach bis *dato* unbekannten Interaktionspartnern oder beschränken sich auf die Analyse und Verifizierung einzelner Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels physikalischer, chemischer oder spektroskopischer Methoden (Berggard *et al.* 2007).

Eine der wichtigsten Methoden zur proteomweiten Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist das Hefe-zwei-Hybrid-Verfahren (Y2H, *yeast-two-hybrid*). Dabei handelt es sich um eine *in vivo*-Methode in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, die darauf basiert, dass eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei unterschiedlichen funktionellen Domänen (DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne) aufgebaut sind. Während die DNA-Bindedomäne (DB) die spezifische Erkennung der zu transkribierenden Gene vermittelt, interagiert die Aktivierungsdomäne (AD) mit anderen Proteinen der Transkriptionsmaschinerie und vermittelt so die Transkription (Phizicky und Fields 1995). Die Grundlage des zwei-Hybrid Systems besteht in der Entdeckung, dass die beiden Domänen selbst dann aktiv sind, wenn sie nicht kovalent miteinander verlinkt sind sondern von zwei unterschiedlichen Proteinen über nicht-kovalente Protein-Protein-Interaktionen zusammengebracht werden. Die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* erfolgt über die Fusion eines Proteins X mit der DNA-Bindedomäne (X-DB) und der Fusion eines Proteins Y mit der Aktivierungsdomäne (Y-AD). Nach Transformation der beiden Plasmide in einen Hefestamm, der ein oder mehrere Reportergene trägt, kommt es erst dann zu einer funktionellen Aktivierung des Transkriptionsfaktors und damit zur Expression der Reportergene, wenn die Konstrukte X-DB und Y-AD miteinander interagieren. Die Vorteile dieses Systems liegen darin, das Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* untersucht werden können und selbst schwache Wechselwirkungen aufgrund der Signalverstärkung durch die Reporterexpression nachgewiesen werden können (Berggard *et al.* 2007). Problematisch stellte sich hingegen die Tatsache dar, dass die Genexpression im Zellkern stattfindet. Das bedeutet, dass sich die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei dem klassischen Hefe-zwei-Hybrid-Verfahren auf Interaktionen im Zellkern beschränken. Darüber hinaus liegt die Rate falsch-positiver Wechselwirkungen um 50%, weshalb die Methode lediglich einen Hinweis auf potentielle Interaktionspartner liefern kann (Deane *et al.* 2002).

Eine weitere häufig angewendete Methode für die Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen stellt die Affinitätschromatografie (*Pulldown*) dar. Das Prinzip (siehe Abbildung 1-6) beruht auf der kovalenten bzw. hoch affinen Immobilisierung eines Liganden (exprimiertes Protein mit Affinitätsepitop [z.B. GST, Hexa-Histidin], Antikörper oder gereinigtes Peptid) an eine feste Phase (z.B. Sepharose) und der anschließenden spezifischen Isolierung und Anreicherung von Bindungspartnern aus komplexen Proteingemischen (z.B. Zelllysat).



Abbildung 1-6: Allgemeines Prinzip der Affinitätschromatografie. Inkubation des immobilisierten Liganden mit einem komplexen Proteingemisch. Nach Auswaschen unspezifischer Proteine verbleiben spezifisch an den Liganden bindende Proteine und Proteinkomplexe an der festen Phase. Die Elution der Interaktionspartner kann durch erhöhte Salzkonzentrationen, kompetitive Faktoren oder Natriumdodecylsulfat erfolgen.

Eine spezielle Form der Affinitätschromatografie ist die Methode der Immunpräzipitation (IP), die auf der Interaktion eines Antikörpers mit einem bestimmten Antigen im Zelllysat basiert. Der immobilisierte, mono- oder polyklonale Antikörper ist dabei entweder gegen ein Protein oder gegen ein spezifisches Epitop des Proteins gerichtet (Phizicky und Fields 1995). Eine Erweiterung der Methode stellt die Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) dar, die auf dem gleichen Funktionsprinzip basiert, mit der jedoch ganze Proteinkomplexe isoliert werden können. Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Vorgehensweisen. Bei der ersten Methode werden Zelllinien oder Gewebe mit dem endogenen Proteinbestand für die Ko-IP verwendet. Das hat den Vorteil, dass zumindest in vivoähnliche Bedingungen simuliert werden und endogene Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden. Der Nachteil dieser Vorgehensweise ist jedoch, dass der Antikörper sehr spezifisch sein muss um falsch-positive Identifizierungen auszuschließen. Die zweite Methode basiert auf der Verwendung von Zellen, die mit einem Plasmid eines Proteins (bait) mit Affinitätsepitop- (z.B. HA oder c-Myc) oder Protein-Fusionsanteil (z.B. GST) transfiziert wurden. Der Antikörper ist in diesem Fall gegen den Fusionsanteil gerichtet, was den Vorteil hat, dass diese Antikörper sehr spezifisch sind und falsch-positive Identifizierungen minimiert werden (Berggard et al. 2007). Neben der Ko-IP stellt die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) einen besonderen Typ der IP dar, der sich auf die Analyse von in vivo vorkommenden Protein-DNA-Wechselwirkungen und damit der Aufklärung von Genexpressionsmechanismen konzentriert. Das Grundprinzip der ChIP beruht auf der chemischen Fixierung (cross-linking) der Protein-DNA-Interaktionen in vivo, der anschließenden Zelllyse und dem Scheren der DNA mittels Ultraschall oder DNase-Behandlung in kleinere Fragmente. Die Immunpräzipitation erfolgt mit einem gegen ein gewünschtes Kernprotein-gerichteten (z.B. Transkriptionsfaktor), immobilisierten Antikörper. Nach Elution der gebundenen Protein-DNA-Fragmente wird der cross-link aufgehoben, die DNA-Fragmente aufgereinigt und analysiert (Massie und Mills 2008). Die Analyse kann entweder über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von spezifischen Primern erfolgen (nur möglich wenn eine Hypothese über die vermutete DNA-Region im Genom besteht) oder hypothesefrei mittels DNA-Microarray (ChIP-on-ChIP) (Orlando 2000).

Protein-Protein-Wechselwirkungen werden häufig über kurze Sequenzbereiche vermittelt. Aufgrund dessen können Domänen- oder PTM-vermittelte Protein-Protein-Interaktionen über Peptid-basierte Affinitätsexperimente untersucht werden (Gururaja *et al.* 2003; Schulze und Mann 2004; Vermeulen *et al.* 2007; Lange *et al.* 2010). Der Vorteil dieser Vorgehensweise besteht darin, dass kombinatorische Peptidbibliotheken relativ einfach aufgebaut und die Bindungseigenschaften in Abhängigkeit verschiedener Parameter (z.B. Aminosäuresequenz, PTMs, Einbau nicht-proteinogener Aminosäuren) untersucht werden können (Peptid-*Pulldown*).

Alle beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen basieren auf der Interaktion von einem Köderprotein (*bait*) mit einem oder mehreren Beuteproteinen (*prey*)

innerhalb komplexer Proteingemische. Die Mehrzahl der Proteine bindet dabei nicht an das *bait* bzw. wird durch Waschoperationen leicht wieder entfernt (vgl. Abbildung 1-6). Die Elution der verbliebenen Bindungspartner kann abschließend durch erhöhte Salzkonzentrationen, kompetitive Faktoren oder Natriumdodecylsulfat (SDS) erfolgen. Für die Identifizierung der unbekannten Bindungspartner hat sich in den letzten Jahren die Massenspektrometrie (MS) als Methode der Wahl durchgesetzt (Affinitäts-MS-Experiment). Der besondere Vorteil der MS ist, dass sie in der Lage ist über relative Quantifizierung von isotopenmarkierten Proteinen eine Differenzierung zwischen unspezifisch-bindenden (z.B. an das Trägermaterial-bindende) und spezifisch-bindenden Proteinen zu erreichen (siehe Abschnitt 1.3.2). Peptid-*Pulldowns* in Kombination mit quantitativer MS wurden bereits erfolgreich für die Identifizierung von methylierungsvermittelten Interaktionen von Histon H3 etabliert (Vermeulen *et al.* 2007; Vermeulen *et al.* 2010; Nikolov *et al.* 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden Peptid-*Pulldown*-Experimente und quantitative Massenspektrometrie für die Identifizierung von acetylierungs- und phosphorylierungsabhängigen Interaktionspartnern von Histon H4 eingesetzt.

1.3 Biologische Massenspektrometrie

Die Entwicklung der Massenspektrometrie geht auf Arbeiten des Physikers J.J. Thomson aus dem Jahr 1910 zurück, in denen er zeigte, dass Neon aus zwei Isotopen der Masse 20 und 22 besteht (Thomson 1910). Heute bildet die Massenspektrometrie eine allgemeine Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Molekülmasse freier, gasförmiger Ionen im Hochvakuum (Lottspeich und Zorbas 1998). Die Ionisierung der Analytmoleküle kann durch die Aufnahme oder den Verlust eines Elektrons, Protons oder Kations (z.B. Na⁺) erfolgen. Dies wird z.B. durch den Beschuss der Probe mit Elektronen (Elektronenstoßionisierung, El), mit Atomen oder Ionen bzw. Sekundärionen (Fast Atom Bombardment, FAB), mit hochenergetischen Teilchen (Plasmadesorption, PD) oder durch den Ladungstransfer in der Gasphase (chemische Ionisierung, CI) erreicht (Lehmann 1996; Lottspeich und Zorbas 1998). Diese relativ harschen chemischen und physikalischen Ionisierungsverfahren induzieren eine starke Fragmentierung der zu analysierenden Moleküle und können daher nur für die Analyse von kleinen Molekülen verwendet werden (Bahr et al. 1994). Den Durchbruch in der biologischen Anwendung fand die Massenspektrometrie erst 1989 mit der Entwicklung "sanfter" Ionisierungsmethoden für große, polare, thermisch labile und mehrfach geladene Moleküle. Diese Methoden umfassen die Ionisierung des gelösten Analyten im elektrischen Feld (Elektronenspray-Ionisierung, ESI) (Fenn et al. 1989) oder aus einer festen Phase mittels Matrix-unterstützter LaserDesorption/-Ionisierung (MALDI) (Karas und Hillenkamp 1988; Tanaka *et al.* 1988). Bei der ES-Ionisierung spricht man von einem homogenen Ionisierungsverfahren, da sie eine Dispersion der Analytlösung in sehr viele kleine geladene Tröpfchen im elektrischen Feld ohne erhebliche Temperaturgradienten beschreibt. Im Gegensatz dazu bezeichnet man MALDI als *Hot Spot*- oder *energy sudden*-Ionisierungsverfahren, bei denen lokal begrenzt extreme Temperaturgradienten durch Laserbeschuss auftreten (Lehmann 1996).

Die massenspektrometrische Identifizierung eines Proteins erfolgt nach proteolytischer Spaltung (z.B. mit Trypsin) durch die Analyse der generierten Peptide. Jedes Massenspektrometer lässt sich in drei Funktionsabschnitte unterteilen: 1.) einer Ionenquelle, in der der gelöste Analyt in die Gasphase überführt wird, 2.) einem Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) voneinander separiert und (3) einem Detektor, der die elektronischen Signale digitalisiert und ein MS-Spektrum aufzeichnet. Durch die Kopplung zweier Massenanalysatoren (Tandem-Massenspektrometrie oder MS/MS) lassen sich auch Sequenzinformationen eines gewählten Peptides ableiten. Dazu werden im ersten Massenanalysator sog. Vorläuferionen hinsichtlich ihres m/z-Verhältnisses ausgewählt, die im zweiten Schritt gezielt über Zusammenstöße mit Gasmolekülen (CID) oder Ionen (HCD) fragmentiert werden. Durch den Abgleich der generierten MS- und MS/MS-Spektren mit *in silico* generierten Spektren einer Proteindatenbank (z.B. NCBI, SwissProt) kann eine eindeutige Proteinidentifizierung erfolgen.

Parallel zur Entwicklung der Massenspektrometrie für die Analyse von Biomolekülen wurden auch chromatographischer Trennverfahren für Proteine und Peptide weiter miniaturisiert und hinsichtlich des Probenverbrauches und der Empfindlichkeit optimiert (nano LC). Erst durch eine Kopplung von nano-chromatographischen Trennprinzipien (Fraktionierungsschritten) mit der modernen Tandem-Massenspektrometrie gelang die Identifizierung und Charakterisierung von komplexen Proteingemischen aus z.B. Zelllysat, Subproteomen oder Affinitätsexperimenten.

1.3.1 Methoden der MS-basierten Analyse komplexer Proteingemische

Wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben wird die Funktion einer Zelle nicht durch ein einzelnes Protein, sondern vielmehr durch das komplexe Zusammenwirken vieler unterschiedlicher Proteine vermittelt. Bei der Analyse dieser komplexen Proteinnetzwerke ist daher eine Fraktionierung vor der MS-Analyse unumgänglich. Dabei können die Proteine oder daraus resultierende Proteinfragmente (Peptide) nach verschiedenen Eigenschaften (z.B. Größe, Ladung, Hydrophobizität) voneinander separiert werden, was eine Abnahme der Komplexität der Probe vor der MS-Analyse bewirkt (Krause 2008; Yang *et al.* 2008). Dafür hat sich in den letzten Jahren ein breitgefächertes Methodenspektrum etabliert, von dem im Folgenden drei Strategien (siehe Abbildung 1-7) näher erläutert werden sollen.



Abbildung 1-7: Methoden der MS-basierten Analyse komplexer Proteingemische. Die Fraktionierung komplexer Proteingemische erfolgt entweder direkt auf Proteinebene (A+B) oder nach tryptischer Spaltung auf Peptidebene (C). (A) Proteintrennung über 2D-Gelelektrophorese (2D-GE) und MALDI-PMF-MS-Analyse der tryptischen Peptide. (B) Auftrennung komplexer Proteingemische mittels 1D-Gelelektrophorese (1D-GE). NanoLC-MS/MS Analyse tryptischer Peptide zur Identifizierung von Aminosäuresequenzen. (C) Tryptische in-Lösungs-Spaltung komplexer Proteingemische und LC-basierte Peptidtrennung und Fraktionierung (SCX=Kationenaustausch-, RP= Umkehrphasen-Chromatographie). Analyse von Peptiden mittels NanoLC-MS/MS. (Abbildung modifiziert nach Krause 2008)

Die klassische Analyse komplexer Proteingemische basiert auf der Kombination von 2-dimensionaler Gelelektrophorese (2D-GE) mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MALDI-*time of flight*-MS, vgl. Abbildung 1-7 A). Das Prinzip der 2D-GE beruht darauf, dass die Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt (1. Dimension = Isoelektrische Fokussierung) und anschließend nach ihrem Molekulargewicht (2. Dimension = Größenseparation) aufgetrennt werden (Klose 1975; O'Farrell 1975). Das 2D-Gelbild setzt sich aus vielen Einzelspots zusammen (>2000 Spots pro Gel möglich), von denen jeder idealerweise nur ein einzelnes Protein repräsentiert, das sich aufgrund seiner isoelektrischen Eigenschaften und dem gegebenen Molekulargewicht von allen anderen Proteinen unterscheidet (Gorg *et al.* 2004). Die Analyse dieser gut separierten Proteine erfolgt nach proteolytischer Spaltung (meist mit Trypsin) mittels MALDI-MS und Peptidmassenfingerabdruck (*peptide mass fingerprint*, PMF), bei dem die Peptidmassen mit *in silico* Peptidmassen einer Datenbank abgeglichen werden. Die Methode eignet sich im Besonderen für die Analyse posttranslationaler Proteinmodifizierungen, die keinen entscheidenden Einfluss auf das Molekulargewicht haben, sondern lediglich durch eine Änderung des isoelektrischen Punktes gekennzeichnet sind.
Als Nachteile dieser Methode haben sich jedoch eine begrenzte Reproduzierbarkeit, ein geringer Dynamikbereich sowie Probleme bei der Analyse von Proteinen mit extremen isoelektrischen Eigenschaften bzw. extremem Molekulargewicht herausgestellt (Gorg *et al.* 2004).

Die Verwendung von nanoLC-MS/MS-Methoden bietet erhebliche Vorteile bei der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen. Diese Methodik wird meist mit einer Vorfraktionierung komplexer Proteingemische mittels 1-dimensionaler Gelelektrophorese (1D-GE, Abbildung 1-7 B) oder mehrdimensionaler LC-Peptidtrennung (MDLC, Abbildung 1-7 C) verwendet. Die Auftrennung von Proteingemischen mittels 1D-GE (SDS-Polyacrylamid-GE, vgl. Abschnitt 2.4.3) wird durch die Größe, Form und Proteinnettoladung bestimmt (Löffler und Petrides 2002). Aufgrund dessen ist die Auflösung der 1D-GE im Vergleich zur 2D-GE wesentlich geringer und Proteine mit annähernd gleichem Molekulargewicht (z.B. Proteine mit PTMs) können nicht voneinander separiert werden. Die nanoLCbasierte Auftrennung der durch in-Gel-Spaltung generierten Peptide in Kombination mit hochaufgelöster Tandem-Massenspektrometrie (GeLC-MS/MS Ansatz) erlaubt jedoch die Identifizierung und Charakterisierung von mehreren tausend Proteinen pro Gelspur (de Godoy *et al.* 2006; Shevchenko *et al.* 2006). Darüber hinaus kennzeichnet sich der GeLC-MS/MS-Ansatz durch eine gute Reproduzierbarkeit sowie einen hohen Dynamikbereich für die Identifizierung niedrig abundanter Proteine.

Alternativ zu einer gelbasierten Proteintrennung in Kombination mit nanoLC-MS/MS (GeLC-MS/MS) haben sich in den letzten Jahren zunehmend shotgun-Methoden etabliert. Sie basieren auf der enzymatischen Spaltung eines komplexen Proteingemisches (z.B. Zelllysat, Subproteom) in Kombination mit mehrdimensionaler Peptidauftrennung (MDLC) mittels Flüssigchromatographie (Peng et al. 2003; Motoyama und Yates 2008). In der ersten Dimension der MDLC erfolgt die Separation und Fraktionierung der Peptidgemische häufig über starke Kationenaustausch-Chromatographie (SCX, strong cation exchange) (Peng et al. 2003; Nagele et al. 2004; Tang et al. 2008). Die zweite chromatographische Trennung basiert fast ausschließlich auf dem Prinzip der Umkehrphasen-Chromatographie (RP, reversed phase), da das Elutionssystem aus ESI-MSkompatiblen Lösungsmitteln besteht und die Peakkapazität hervorragend ist. Diese Eigenschaften der RP-Chromatographie sind unerlässlich für die direkte (online) Kopplung mit dem ESI-Massenspektrometer. Die Kombination von SCX- und RP-Chromatographie bildet aufgrund der unterschiedlichen Retentionsmechanismen der ersten und zweiten Dimension ein orthogonales Separationssystem, in dem sich die totale Peakkapazität P aus den Peakkapazitäten der Einzeldimensionen berechnet ($P=P_{SCX} \times P_{RP}$) (Motoyama und Yates 2008; Stephanowitz *et al.* 2012). Die Nachteile der SCX-RP LC-MS/MS bestehen darin, dass die Auflösung und Trennkapazität komplexer Peptidgemische mittels SCX limitiert ist. Zudem enthält das Elutionssystem der SCX einen hohen Salzanteil, der die nanoLC-MS/MS-Analyse empfindlich beeinflusst und daher vor der zweiten Trennung entfernt werden muss (Gilar et al. 2005b). Eine Verbesserung der Auflösung und Trennleistung wurde durch den Einsatz von RP-Chromatographie in beiden Dimensionen erzielt (Gilar et al. 2005a; Toll et al. 2005). Da der Retentionsmechanismus für RP-RP-Systeme in beiden Dimensionen auf demselben Prinzip beruht, handelt es sich um ein System mit begrenzter Orthogonalität. Eine Erhöhung der Orthogonalität für zweidimensionale RP-RP Ansätze wird häufig durch eine pH-Wert Änderung zwischen der ersten und zweiten Dimension erreicht (Gilar et al. 2005b; Gilar et al. 2005a; Song et al. 2010; Zhou et al. 2010). Die Nachteile dieser Vorgehensweise liegen jedoch darin, dass nur wenige Chromatographiematerialien für die Auftrennung im basischen pH-Bereich geeignet sind (z.B. Polymersäulen) und dass die Peakkapazität dieser Säulen bei pHbasischen Bedingungen begrenzt ist (McCalley 2005; Nakamura et al. 2008). Aktuelle proteomische Studien haben jedoch gezeigt, dass selbst bei begrenzter Orthogonalität durch den Einsatz von RP-RP-Chromatographie mit den gleichen Elutionssystemen in beiden Dimensionen, die Anzahl der Identifizierungen im Vergleich zu eindimensionaler RP-nanoLC-MS/MS-Analyse ansteigt (Gokce et al. 2011).

Alle bisher beschriebenen Methoden für die Analyse komplexer Proteingemische mittels MS beschreiben ausschließlich qualitative Ergebnisse, d.h. basieren ausschließlich auf der Identifizierung von Proteinen. Für proteomische Studien, insbesondere für vergleichende Analysen von z.B. Proteinexpressionsmustern in Zellen unter verschiedenen Einflüssen (gesund *vs.* krank, Wildtyp *vs.* Mutante) ist es jedoch unerlässlich, auch quantitative Aussagen über den Gehalt einzelner Proteine zu treffen. Aus diesem Grund werden im nächsten Abschnitt ausgewählte Methoden der quantitativen Proteomanalyse beschrieben.

1.3.2 Quantitative Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie für die Analyse von Proteinen und Peptiden ist *per se* keine quantitative Messmethode, da die Signalintensitäten im MS-Spektrum durch die physikochemischen Analyteigenschaften (Polarität, Ionisierungsverhalten, Ladung) bestimmt werden und nicht direkt mit der Analytkonzentration korrelieren. Aufgrund dessen wurden Methoden entwickelt, die darauf abzielen auch quantitative Aussagen aus MS-Experimenten treffen zu können. Dabei unterscheidet man zwischen Methoden zur Bestimmung absoluter Proteinmengen in einer Probe und Methoden zum relativen Vergleich zweier oder mehrerer Proteingemische (Aebersold und Mann 2003; Ong *et al.* 2003a; Ong und Mann 2005). Die Bestimmung absoluter Proteinmengen (AQUA, *absolute quantification*) basiert auf einer internen Kalibrierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards bekannter Proteine und ist daher für komplexe Proteingemische nicht geeignet (Gerber et al. 2007). Für die Quantifizierung unbekannter Proteine innerhalb komplexer Proteingemische hat sich daher das Prinzip der relativen Quantifizierung durchgesetzt, die entweder markierungsfrei oder unter Verwendung stabiler Isotope erfolgt. Bei markierungsfreien Ansätzen erfolgt die relative Quantifizierung über den Vergleich von Signalintensitäten enzymatisch gespaltener Peptide sowie die Anzahl der Spektren eines Proteins (Wong und Cagney 2010; Zhu et al. 2010). Die große Herausforderung bei markierungsfreien Ansätzen ist, dass die Probenaufarbeitung/-fraktionierung und nanoLC-MS/MS-Analyse der zu vergleichenden Proben unter Umständen nicht vollständig reproduzierbar ist, was zu Fehlern in der Quantifizierung führen kann. Aus diesem Grund beruhen die meisten Methoden zur relativen Quantifizierung mittels MS auf dem Prinzip der Isotopenverdünnungstheorie (Deleenheer und Thienpont 1992). Diese Theorie besagt, dass sich mit stabilen Isotopen markierte Peptide (z.B. ¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O) chemisch identisch zu den jeweils natürlichen Peptiden (z.B. ¹²C, ¹⁴N, ¹⁶O) verhalten und sich lediglich in ihrem Molekulargewicht voneinander unterscheiden. Diese Eigenschaft ist besonders wichtig bei der chromatographischen Trennung, dem Ionisierungsverhalten und der damit verbundenen massenspektrometrischen Analyse (Bantscheff et al. 2007). Die Markierung mit stabilen Isotopen ermöglicht es somit zwei (oder mehr) verschiedene Zustände als "leicht" und "schwer" so früh wie möglich zusammen zu führen und die LC-Trennung und MS/MS-Analyse mit einer vereinigten Probe durchzuführen. Das hat den entscheidenden Vorteil, dass Fehler in der Probenaufarbeitung/-fraktionierung oder Experiment-zu-Experiment-Variationen (z.B. Performance der Chromatographie) immer beide Zustände betreffen, wodurch die Vergleichbarkeit gewährleistet ist. Die Markierung der Probe mit schweren, stabilen Isotopen kann sowohl auf Protein- als auch auf Peptidebene erfolgen (z.B. chemische Markierungsverfahren). Chemische Markierungsverfahren basieren auf dem kovalenten Einbau von Markerverbindungen, die unterschiedliche Isotope enthalten und somit unterschiedliche Massenverschiebungen induzieren. Die Derivatisierung erfolgt dabei entweder über die Thiolgruppen der Cysteine (ICAT) (Gygi et al. 1999) oder N-terminal bzw. an Lysin-Seitenketten (iTRAQ, ICPL) (Ross et al. 2004; Schmidt 2005). Die relative Quantifizierung findet entweder über den Vergleich der Intensitäten der MS-Signale (ICAT, ICPL) oder der MS/MS-Signale (iTRAQ) statt. Der Vorteil dieser Quantifizierungsverfahren liegt darin, dass bis zu acht verschiedene Zustände miteinander verglichen werden können (Ernoult et al. 2008). Die Tatsache, dass es sich um chemische Derivatisierungsverfahren handelt, wird häufig als Nachteil betrachtet.

Neben den chemischen Markierungsverfahren, haben sich auch Methoden, die auf dem metabolischen Einbau schwerer Isotope (¹³C, ¹⁵N) bzw. der Markierung während der enzymatischen Spaltung (¹⁶O/¹⁸O-Markierung) basieren, durchgesetzt (Goshe und Smith 2003; Ong und Mann 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur (SILAC, *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) und die enzymatische Markierung mit ¹⁸O-Wasser zur relativen Quantifizierung von Affinitäts-MS-Experimenten eingesetzt (siehe Abbildung 1-8).

A Metabolische Markierung (SILAC)





Abbildung 1-8: Methoden der quantitativen Proteomanalyse. (A) Stabile Isotopenmarkierung der Proteine mit Aminosäuren in Zellkultur (SILAC).Nach tryptischer Spaltung entsteht in Abhängigkeit von der verwendeten Aminosäure ein charakteristischer Massenunterschied (Δ m) zwischen unmarkierter Probe (Kontrolle) und markierter Probe im Massenspektrum. (B) Enzymatische Markierung mit schwerem Sauerstoff (¹⁸O) während der Trypsinspaltung. Aufgrund des einfachen oder doppelten ¹⁸O-Einbaus in entstehende Carboxylgruppen kommt es zu einer charakteristischen Massendifferenz im Massenspektum von +2 Da (¹⁸O₁) bzw. +4 Da (¹⁸O₂) zwischen Kontrolle und Probe. (Abbildung verändert nach Goshe und Smith 2003)

Die SILAC-Methode (vgl. Abbildung 1-8 A) ist ein metabolisches Markierungsverfahren und basiert auf der parallelen Kultivierung zweier Zellpopulationen in unterschiedlich isotopenmarkierten Nährmedien unter sonst identischen Bedingungen (Ong *et al.* 2002). Der Einbau der Isotope findet *in vivo*

während der Proteinbiosynthese statt, wobei der Einbau schwerer Isotope in die Proteine nach ungefähr sechs Zellteilungen vollständig ist (Ong und Mann 2006). Für die Markierung in Zellkultur hat sich die Zugabe der isotopenmarkierten Aminosäuren Lysin und/oder Arginin (¹³C, ¹⁵N) etabliert (Ong et al. 2003a; Ong et al. 2003b; Ong und Mann 2005). Der Vorteil in der Verwendung dieser beiden Aminosäuren liegt darin, dass Proteine vor LC-MS/MS-Messungen standardmäßig mit der Endoprotease Trypsin, die C-terminal von Lysin- und Argininresten schneidet, gespalten werden. Somit werden Peptide generiert, die mindestens eine markierte Aminosäure enthalten (Ausnahme ist hier der Arg- und Lys-freie Protein-C-Terminus). In Abhängigkeit von der verwendeten Isotopenmarkierung erhält man einen charakteristischen Massenunterschied zwischen "leichtem" und "schwerem" Peptid (z.B. +6 Da für ¹³C₆-Lys und +10 Da für ¹³C₆, ¹⁵N₄-Arg). Der Vergleich der Signalintensitäten des unmarkierten und isotopenmarkierten Peptids ermöglicht eine relative Quantifizierung zwischen zwei Proben. Die Auswertung und Quantifizierung der massenspektrometrischen SILAC-Daten kann über die Auswertesoftware Max Quant (Cox und Mann 2008; Cox et al. 2011) erfolgen. SILAC bietet den Vorteil, dass die beiden zu vergleichenden Proteinproben schon relativ früh (spätestens vor der tryptischen Spaltung) vereinigt werden können, sodass die nachfolgende Probenbehandlung vergleichbar ist.

Das enzymatische ¹⁸O-Markierungsverfahren wurde erstmals 1951 beschrieben (Sprinson und Rittenberg 1951). Darunter versteht man den enzymvermittelten Einbau von ¹⁸O-Molekülen in die Carboxylgruppe von Peptiden (vgl. Abbildung 1-8 B). Die Markierung erfolgt während der tryptischen Spaltung in Gegenwart von ¹⁶O- oder ¹⁸O-Wasser. Je nach Versuchsbedingungen wird dabei entweder ein Carboxylsauerstoff oder beide durch ¹⁸O ausgetauscht (Schnolzer *et al.* 1996; Yao *et al.* 2003; Fenselau und Yao 2009). Dabei ergibt sich ein charakteristischer Massenunterschied von +2 Da (¹⁸O₁) für den einfachen Einbau bzw. +4 Da (¹⁸O₂) für den doppelten ¹⁶O/¹⁸O-Austausch. Aufgrund der Möglichkeit zur Aufspreizung der Peptidsignale in zwei Zustände (¹⁸O₁ und ¹⁸O₂) und der daraus resultierenden Überlagerungseffekte mit dem natürlichen Isotopenmuster unmarkierter Peptide, werden hohe Anforderungen an die Auswertesoftware gestellt, die durch das Programm *Mascot Distiller Quantitation Toolbox* der Firma Matrix Science (Perkins *et al.* 1999) erfüllt werden. Der Vorteil des ¹⁸O-Markierungsverfahrens besteht darin, dass es eine universelle (nicht auf Zellkulturen beschränkte), einfache und vergleichsweise günstige Markierungsmethode für alle Peptide eines Proteins (außer C-Terminus) ist.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle spezifischer Lysinacetylierungen des Zellkernproteins Histon H4 als potentielle Erkennungsmotive bzw. als Werkzeug der Ladungsneutralisierung mittels Affinitäts-Massenspektrometrie untersucht werden.

Dazu sollte zunächst ein *offline* 2-D RP-RP nanoLC-MS/MS System mit pH-sauren Bedingungen in beiden Dimensionen in Kombination mit einem spezifischen Fraktionierungsschema als effektive, robuste und reproduzierbare Alternative zur klassischen gelbasierten Proteomanalyse entwickelt werden. Die Validierung der neuen Methodik sollte zunächst an gut charakterisierten, Tyrosin 595-phosphorylierten, Peptiden des T-Zelladapterproteins ADAP unter Einsatz verschiedener Isotopenmarkierungsverfahren (SILAC, enzymatische ¹⁸O-Markierung) erfolgen.

Für die proteomweite Analyse und Identifizierung acetylierungsabhängiger Bindungspartner von Histon H4 sollten differenzielle Affinitäts-*Pulldown*-Experimente in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt werden. Dazu sollte eine Bibliothek bestehend aus verschieden acetylierten Peptiden des N-terminalen Bereichs von Histon H4 synthetisiert und als Matrixgebundene Köder in SILAC-basierten Peptid-*Pulldown*-Experimenten eingesetzt werden.

Die im Rahmen dieser Untersuchungen identifizierten potentiellen Bindungspartner an acetylierte Histon H4-Peptide sollten hinsichtlich ihrer möglichen physiologischen Relevanz als "Histon-Acetylierungscode-*Reader*" diskutiert und ausgewählte Interaktionspartner mittels Western Blot Analyse verifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel hatten den Reinheitsgrad *pro analysis* bzw. *gradient grade* und wurden, soweit nicht anders angegeben, von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Laborchemikalien (Steinheim), Merck KGaA (Darmstadt), VWR International GmbH (Darmstadt) oder AppliChem GmbH (Darmstadt) bezogen.

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien ist in den jeweiligen Abschnitten angegeben. Die verwendeten Lösungen wurden bei Bedarf autoklaviert (20 Min., 120°C, 2 bar) bzw. durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Transformation von Bakterien

Die cDNA-Sequenz für die Expression der Hefe-Bromodomäne von Gcn5 (AS 325-421, UniProtKB/Swiss-Prot Q03330) lag in dem pET-23b Vektor, der eine Ampicillin-Resistenz trägt, vor. Das verwendete Konstrukt (pET-23b-Gcn5p-His₆) wurde von Dr. Dirk Schwarzer (Arbeitsgruppe Proteinchemie, FMP Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen des Stammes BL21(DE3)pLys erfolgte durch Elektroporation. Bei dieser Methode setzt man die

Bakterien einem kurzen elektrischen Puls aus, wodurch die Zellwand porös wird und die Fremd-DNA aufgenommen werden kann. Dafür wurden 40 µl BL21(DE3)pLys *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 ng Plasmid-DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei einem Puls von 2500 V für 5 ms (Easyject Prima [Equibio GmbH, Willstätt]). Direkt im Anschluss an den Elektropuls wurde die Bakteriensuspension in 500 µl sterilem SOC-Medium aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Thermomixer [Eppendorf AG, Hamburg]). Nach dieser Regenerationszeit wurden die Zellen zur Selektion auf antibiotikahaltige LB (Luria Bertani)-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung von Medien für die Transformation von Bakterien.

SOC-Mediu	m	LB-Medium (Luria Bertani)		
0,5% (w/v)	Hefeextrakt	1% (w/v) g	Trypton	
2% (w/v)	Trypton	0,5% (w/v)	Hefeextrakt	
10 mM	NaCl	1% (w/v)	NaCl	
2,5 mM	KCI	in Wasser		
10 mM	MgCl ₂			
10 mM	MgSO ₄	LB-Agar		
20 mM	Glukose	LB-Medium		
in Wasser		2% (w/v)	Agar-Agar	

2.3.2 Expression rekombinanter Proteine in E. coli

Für die Expression der Hefe-Gcn5-Bromodomäne wurde zunächst ein Einzelklon von der Selektionsplatte (über-Nacht-Kultur auf LB-Agarplatten) unter sterilen Bedingungen in 100 ml eines ebenfalls antibiotikahaltigen Nährmediums (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol) überimpft. Dieser Ansatz wurde für 15 Stunden bei 37°C unter ständigem Schütteln kultiviert (Multitron [Infors HT, Bottmingen, CH]). Aus dieser Über-Nacht-Vorkultur wurden unter sterilen Bedingungen 15 ml in 1 L LB-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin) überführt und erneut bei 37°C unter Schütteln weiter inkubiert, bis die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) einen Wert zwischen 0,6 und 0,8 erreichte. Die Induktion der Proteinexpression steht unter Kontrolle des T7-Promotors und wurde durch Zugabe von 0,5 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) gestartet. Die Proteinexpression erfolgte über Nacht bei 23°C und 200 rpm (Multitron [Infors HT, Bottmingen, CH]). Die Zellernte fand durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C

(Beckman Coulter, JLA 10.500) statt. Das Bakterienpellet wurde in möglichst wenig Wasser gelöst, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut pelletiert (6000 rpm, 15 min, 4°C, Thermo Heraeus Multifuge 3L-R, #F13-14x50C [Thermo Fisher Scientific, Bonn]). Die Pellets wurden bei -20°C gelagert. Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden vor und nach der Induktion jeweils 500 µl Proben aus den Literkulturen entnommen, die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert, in 60 µl 3-fach SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Dokumentation der Proteinexpression erfolgte über SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.4.3).

Für NMR-Messungen (siehe 2.10) wurde die Hefe-Gcn5-Bromodomäne metabolisch sowohl ¹⁵N- als auch ¹⁵N, ¹³C-markiert exprimiert. Dafür wurden die Zellen vor der Induktion der Proteinexpression bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 pelletiert (4000 rpm, 15 min, RT, Beckman Coulter, JLA 10.500). Die Zellpellets aus 2 L LB-Amp-Medium wurden in 0,5 L M9-Minimalmedium resuspendiert und für 1 h bei 37°C unter Schütteln equlibriert (Multitron [Infors HT, Bottmingen, CH]). Nach dieser Zeit erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Expression und Zellernte erfolgte analog zur nicht-markierten Proteinexpression.

M9-Minimalmedium		10xM9-Salzlösung		Vitaminlösung	
100 ml	10xM9-Salzlösung	80 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O		2,2 mg	Biotin
1 mM	MgSO ₄	20 g	KH ₂ PO ₄	2,2 mg	Folsäure
300 µM	CaCl ₂	300 µM	CaCl ₂	220 mg	P-Aminobenzoesäure
10 ml	Spurenelementlösung	ad 1 I	Wasser	220 mg	Riboflavin
1 ml	Vitaminlösung			440 mg	Pantothensäure
1 mg	Biotin	Spurenelementlösung		440 mg	Pyridoxin-HCl
1 mg	Thiamin	2,5 g	EDTA (pH 7,6)	440 mg	Thiamin-HCl
4 g	¹² C- bzw. ¹³ C-Glucose*	250 mg	FeSO ₄	440 mg	Niacinamid
250 mg	¹⁵ NH ₄ Cl*	25 mg	ZnCl ₂	ad 1 I	50% (v/v) Ethanol
1 mM	Ampicillin	5 mg	CuSO ₄		
ad 1 l	Wasser	ad 0,5 l	Wasser		

Tabelle 2-2: Zusammensetzung von Medien und Lösungen für die Expression metabolisch markierter Proteine in E.coli.

*Cambridge Isotopes, Andover, USA

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Reinigung von His₆-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie

Die C-terminale Fusion eines Hexahistidin-*tags* (His₆-*tag*) an die rekombinante Gcn5-Bromodomäne ermöglicht die Proteinreinigung mittels Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC, *immobilized metal ion affinity chromatography*) nach der Methode von Porath *et al.* (Porath *et al.* 1975). Das Prinzip der Affinitätsreinigung beruht auf der reversiblen Chelatisierung immobilisierter Ni²⁺-Ionen des Ni-NTA Säulenmaterials durch die Imidazolgruppen des His₆-*tags*.

Das aufgetaute Bakterienpellet wurde auf Eis in ca. 25 ml Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimalige Lyse in einer FRENCH® Pressure Cell Press (SLM-Aminco, Urbana, USA). Anschließende Zentrifugation des Gesamtzelllysats für 45 Minuten bei 4°C und 10000 rpm (Beckman Coulter, JLA 25.50) führte zur Separation der löslichen und unlöslichen Proteinbestandteile. Der Überstand, der die löslichen Bestandteile enthält, wurde auf die zuvor mit Lysepuffer equilibrierte Ni-NTA Agarosesuspension (ca. 3 ml [Quiagen, Hilden]) gegeben und im Batchverfahren für 30 Minuten bei 4°C und langsamer Rotation inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand vollständig entfernt und die Ni-NTA Agarose mit 25 ml Lysepuffer (8-faches Säulenvolumen) gewaschen. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Affinitätsmatrix zunächst mit 25 ml Waschpuffer I (8-faches Säulenvolumen) und anschließend mit 25 ml Waschpuffer II (8-faches Säulenvolumen) gewaschen. Die Elution der spezifisch mittels His₆-tag gebundenen Proteine erfolgte mit 15 ml Elutionspuffer (6-faches Säulenvolumen) in Fraktionen zu je 1 ml. Die Elutionsfraktionen wurden mittels Absorptionsmessung bei 280 nm und SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.4.3) auf die Anwesenheit von Protein überprüft. Alle proteinenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, über eine 3 kDa-Membran mittels Zentrifugation auf ein Volumen von ca. 2 ml aufkonzentriert (Amicon [Millipore GmbH, Schwalbach]) und über präparative Größenausschlusschromatographie weiter aufgereinigt (vgl. Abschnitt 2.4.2). Um eine erfolgreiche Proteinreinigung zu dokumentieren wurde das Rohlysat, die löslichen und unlöslichen Proteinbestandteile, der Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA Agarose und die Elutionsfraktionen über SDS-PAGE analysiert (siehe Abschnitt 2.4.3).

Lysepuffer		Waschpuffer I		Waschpuffer II	
20 mM	Tris, pH 8,0	20 mM	Tris, pH 8,0	20 mM	Tris, pH 8,0
300 mM	NaCl	1 M	NaCl	300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol	10 mM	Imidazol	30 mM	Imidazol
1 mM	β -Mercaptoethanol	1 mM	β -Mercaptoethanol	1 mM	β -Mercaptoethanol
10 µg/ml	RNase				
10 µg/ml	DNase				
Elutionspuffer					
20 mM	Tris, pH 8,0				
300 mM	NaCl				
300 mM	Imidazol				
1 mM	β -Mercaptoethanol				

Tabelle 2-3: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Ni-Affinitätsreinigung.

2.4.2 Größenausschlusschromatographie

Bei der präparativen Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) handelt es sich um eine Art Filtrationsverfahren, bei dem die Probe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wird. Als stationäre Phase werden poröse Polymere in granulärer Form verwendet, in die kleine Moleküle diffundieren und somit länger auf der Säule verbleiben, während große Moleküle eher von der Säule eluieren. Für die Nachreinigung der His₆-getaggten Gcn5-Bromodomäne (vgl. Abschnitt 2.4.1) wurde eine Superdex S-75-Säule (GE Healthcare) mit einer Partikelgröße von 13 µm an einer Äkta Purifier FPLC-Anlage (GE Healthcare, München) eingesetzt. Vor jeder Chromatographie wurde die Säule mit dem zweifachen Säulenvolumen mit SEC-Puffer (20 mM K-Phosphatpuffer (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol) gespült und equilibriert. Die Probe wurde über eine 2 ml Probenschleife injiziert und mit SEC-Puffer isokratisch eluiert und fraktioniert. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden abschließend vereinigt, in Zentrifugenkonzentratoren (Amicon, MWCO: 3 kDa [Millipore GmbH, Schwalbach]) aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer positiven und negativen Ladungen wandern Proteine im elektrischen Feld. Ihre Wanderung wird dabei durch ihre Größe, Nettoladung und Form bestimmt (Löffler und Petrides 2002). Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) beruht auf der Bindung langkettiger (C12) Alkylgruppen des Natriumdodecylsulfats (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) an hydrophobe Bereiche des Proteins, was bewirkt, dass sich das Protein entfaltet und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Lipiden aufgehoben werden (Laemmli 1970). Aufgrund der negativen Ladung des SDS ergibt sich eine negative Nettoladung der SDS-Proteinkomplexe und sie wandern im elektrischen Feld zur Anode. Dabei werden sie durch ein hochvernetztes Polyacrylamidgel allein nach ihrem Stokes Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Rehm 2006).

Gelelektrophoresen wurden mit der Apparatur Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, München) durchgeführt. Dabei wurde nach der Methode von Laemmli vorgegangen, bei der die Proteinproben in 3-fach Probenpuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 100°C denaturiert werden (Laemmli 1970). Die Zugabe des reduzierenden Reagenz Dithiothreitol (DTT) bewirkt, dass Disulfidbrücken innerhalb eines Proteins gespalten werden. Die so vorbereiteten Proteinproben wurden zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard [Invitrogen, Karlsruhe]) auf ein Mini-PROTEAN® TGX[™] 4-20% Gradientengel (Bio-Rad Laboratories, München) aufgetragen. Die Elektrophorese lief für ca. 35 Minuten bei einer konstanten Spannung von 200 V in Tris/Glycine/SDS-Laufpuffer. Nach der Elektrophorese müssen die Proteine im Gel fixiert, d.h. denaturiert und ausgefällt, werden. Dazu wurden die SDS-Gele für jeweils 1 h in 40% (v/v) Methanol/10% (v/v) Essigsäure geschwenkt. Die Färbung der Proteine erfolgte über Nacht in kolloidaler Coomassie-Färbelösung unter Schwenken. Zur Entfärbung des proteinfreien Hintergrunds wurde das Gel in 2% (v/v) Essigsäure geschwenkt.

Tabelle 2-4: Zusammensetzung de	r Puffer und Lösungen für	die SDS-Polyacrylamid-	Gelelektrophorese.
---------------------------------	---------------------------	------------------------	--------------------

3-fach Probenpuffer		Fixierlösung		Tris/Glycine/SDS-Laufpuffer	
150 mM	Tris-HCl, pH 6,8	40% (v/v)	Methanol	25 mM	Tris, pH 8,3
6% (w/v)	SDS	10% (v/v)	Essigsäure	192 mM	Glycine
30% (v/v)	Glycerol			0,1% (w/v)	SDS
0,003% (w/v)	Bromphenolblau	Entfärbelö	sung		
300 mM	DTT	2% (v/v)	Essigsäure	-	

ciosana
Coomassie-G250
Methanol
Ammoniumsulfat
Phosphorsäure

Fortsetzung Tabelle 2-4: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

2.4.4 Western Blotting

Der Western Blot stellt eine spezifische, hochempfindliche Nachweismethode für Einzelkomponenten aus komplexen Proteingemischen durch Antikörper dar. Der erste Schritt des Western Blottings besteht aus dem Transfer der über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Towbin *et al.* 1979). Dazu wird ein senkrecht zum SDS-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, in dem die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wandern, wo sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Der spezifische Nachweis einzelner Proteine erfolgt über Immundetektion, durch die Bindung eines antigenspezifischen (mono- oder polyklonalen) Primärantikörpers. Der Nachweis der Primärantikörperbindung erfolgt wiederum durch einen Sekundärantikörper, der mit einem Farbstoff oder einem Enzym konjugiert oder radioaktiv markiert ist.

Nach der SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.4.3) wurden die Proteingele zusammen mit einer Nitrocellulosemembran (0.45 µm), Filterpapier und Faservlies in Transferpuffer für ca. 10 Minuten equilibriert. Der Transfer wurde in einer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Zelle durchgeführt (alles Bio-Rad Laboratories, München). Dazu wurden alle Einzelkomponenten in folgender Reihenfolge zusammengefügt: Kathode, Faservlies, Filterpapier, SDS-Gel, Membran, Filterpapier, Faservlies, Anode. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran erfolgte unter konstanter Spannung (100 V) für 1 h von der Kathode zur Anode. Zur Überprüfung der Effektivität des Proteintransfers, wurde die Nitrocellulosemembran mit Pounceau S-Lösung reversibel gefärbt. Die Entfärbung der Membran erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit Wasser. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierlösung geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem gegen das Zielprotein gerichteten Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T-Puffer für jeweils 10 Minuten, wurde die Membran zweimal für je 10 Minuten mit TBS-T-Puffer

Material und Methoden

und einmal für 10 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen. Die Detektion der Antikörpersignale erfolgte mittels Fluoreszenzmessung an einem Odyssey[®] Infrarot-Scanner (LI-COR, Nebraska, USA).

Transferpuffer		Blockierlösung		TBS-T-Puffer	
(Bjerrum und Scha	fer-Nielsen 1986)				
48 mM	Tris (pH 9,2)	4,5% (w/v)	BSA	50 mM	Tris (pH 7,4)
39 mM	Glycine	50 mM	Tris (pH 7,4)	150 mM	NaCl
0,375% (w/v)	SDS	150 mM	NaCl	0,05% (v/v)	Tween-20
20% (v/v)	Methanol	0,05% (v/v)	Tween-20		
Ponceau S-Lösung		TBS-Puffer			
0,1% (w/v)	Ponceau S	50 mM	Tris (pH 7,4)		
5% (v/v)	Essigsäure	150 mM	NaCl		

Tabelle 2-6: Verwendete Antikörper.

Primärantikörper	Spezies	WB-Verdünnung	Firma
Pus1	Kaninchen	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
Aly (11G5)	Maus	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
TRMT6 (F-3)	Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
TAFII p43 (P-13)	Ziege	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
TAFIIp130 (4A6)	Maus	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Sekundärantikörper	Spezies	WB-Verdünnung	Firma
IRDye800 anti-Kaninchen	Esel	1:10000	LI-Cor, Nebraska, USA
IRDye800 anti-Ziege	Esel	1:10000	LI-Cor, Nebraska, USA
IRDye680 anti-Maus	Esel	1:10000	LI-Cor, Nebraska, USA

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von HeLa-S3 Zellen

HeLa Zellen, benannt nach ihrer Spenderin Henrietta Lacks, sind humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Es handelt sich um die ersten menschlichen Zellen aus denen eine permanente Zellkultur zur Züchtung genetisch identischer Zellklone aus Einzelzellen etabliert wurde. Die Zellen sind mit dem humanen Papillomavirus infiziert und zeichnen sich durch eine hohe Teilungsrate sowie Immortalität aus. Die HeLa-S3 Zelllinie wurde 1955 von T.T. Puck, P.I. Marcus, und S.J. Cieciura als Subklon der parentalen HeLa Zelllinie isoliert (Puck *et al.* 1956).

HeLa-S3 Zellen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen (ACC 161 [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig]).

2.5.1.1 Adhärente Kultivierung

HeLa-S3 Zellen wurden adhärent als *Monolayer* in RPMI1640 GlutaMAX[™]-Medium (Gibco [Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt] kultiviert. Dem Medium wurden 10% (v/v) fötales Kälberserum (FBS, *fetal bovine serum* [Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt]) sowie 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (50 U Penicillin/ml und 50 µg Streptamycin/ml [Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt]) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und feuchter Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid. Zum Passagieren wurden konfluente Zellen einmal mit PBS-Puffer (Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt) gespült, durch fünfminütige Inkubation mit 1,5 ml 0,05% Trypsin/EDTA–Lösung (Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt) bei 37°C von der Gewebekulturflasche abgelöst und in einer 1:10 Verdünnung neu ausgesät.

2.5.1.2 Suspensionskultur

Die Kultivierung von HeLa-S3 Zellen in Suspension wurde von Miroslav Nikolov (Forschungsgruppe Massenspektrometrie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst in Dulbecco´s modifiziertem Medium mit 10% (v/v) FBS (PAA, Pasching, AT) vermehrt, in 2 L Spinnerflaschen überführt und bis zu einer Zelldichte von 0,5-1,0 x 10⁶ Zellen/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem 5 L Fermenter (Applikon, Schiedam, NL) solange unter Standardbedingungen kultiviert, bis eine Zelldichte von 2,5-5,0 x 10⁶ Zellen/ml erreicht war (Nikolov *et al.* 2011).

2.5.2 Kultivierung von Jurkat Zellen

Die Jurkat T-Zelllinie wurde im Jahr 1976 von einem Patienten, der an akuter lymphoblastischer Leukämie erkrankt war, isoliert (Schneider *et al.* 1977). Die Kultivierung der Zellen (Subklon Jurkat E6-1) wurde von Benno Kuropka (Arbeitsgruppe Massenspektrometrie, FMP Berlin) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in RPMI1640-Medium (Biochrom AG, Berlin) versetzt mit 10% (v/v) FBS [Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt]), als Suspensionskultur bei 5% Kohlendioxid und 37°C inkubiert. Während der Standardkultivierung wurde eine Zelldichte von $0,05 - 0,6 \times 10^6$ Zellen/ml durch Verdünnen mit Medium aufrechterhalten.

2.5.3 Stabile Isotopenmarkierung in Zellkultur

Die stabile Isotopenmarkierung durch Aminosäuren in Zellkultur (SILAC, stable isotope labeling by amino acids in cell culture) wurde nach dem Protokoll von S.E. Ong und M. Mann durchgeführt (Ong und Mann 2006). Dazu wurde für beide Zelllinien (Jurkat E6-1 und HeLa-S3) Arg- und Lys- defizientes RPMI 1640-Medium sowie 10% (v/v) dialysiertes FBS (beides Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn) verwendet. Eine Zellpopulation wurde jeweils in "leichtem" SILAC-Medium, die andere mit "schwerem" SILAC-Medium kultiviert. Für Jurkat-Zellen wurde das "leichte" Medium mit 0,1 g/L unmarkiertem L-Lysin sowie 0,2 g/L unmarkiertem L-Arginin (beides Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn), das "schwere" Medium mit 0,1 g/L ¹³C₆-L-Lysin (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn) und 0,2 g/L ¹³C₆, ¹⁵N₄-L-Arginin (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) versetzt. Für HeLa-S3 Zellen beinhaltete das "leichte" Medium 0,04 g/L unmarkiertes L-Lysin und 0,2 g/L unmarkiertes L-Arginin. Das "schwere" Medium wurde mit 0,04 g/L¹³C₆-L-Lysin (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn) oder 0,04 g/L ²H₄-L-Lysin (Euriso-Top, Saint-Aubin Cedex, FR) sowie mit 0,2 g/L ¹³C₆, ¹⁵N₄-L-Arginin (Silantes GmbH, München) oder 0,2 g/L ¹³C₆-L-Arginin (Euriso-Top, Saint-Aubin Cedex, FR) eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst über 6 Passagen in einem geringen Volumen kultiviert, bevor sie in größeren Volumina vermehrt wurden. Die Effizienz des Aminosäureeinbaus wurde massenspektrometrisch überprüft. Dazu wurden Gesamtzelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, Einzelbanden tryptisch gespalten (vgl. Abschnitt 2.8.1) und mittels ESI-MS/MS analysiert. Die Lysate wurden nur bei einem Markierungsgrad von \ge 95% für die weiteren Experimente verwendet.

2.5.4 Präparation von HeLa-S3 Kernextrakten

Für die Präparation von Kernextrakten aus HeLa-S3 Zellen wurde nach dem Standardprotokoll von Dignam *et al.* vorgegangen (Dignam *et al.* 1983). Alle Schritte der Extraktpräparation wurden mit

eiskalten Puffern bzw. auf Eis durchgeführt. Nach der Zellernte wurde die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 4°C, 2500 rpm, Eppendorf 5804R, F34-6-38 [Eppendorf AG, Hamburg]) und das gepackte Zellvolumen (pcv, packed cell volume) bestimmt. Das Zellpellet wurde daraufhin zunächst mit dem fünffachen Volumen PBS-Puffer (DPBS Gibco [Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt] gewaschen, erneut pelletiert (10 min, 4°C, 2500 rpm), in dem fünffachen Volumen Puffer A resuspendiert und auf Eis für 10 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen für 10 Minuten bei 4°C und 2500 rpm (Eppendorf 5804R, F34-6-38 [Eppendorf AG, Hamburg]) wurde das Zellpellet in dem zweifachen pcv Puffer A resuspendiert, in einen Dounce-Glashomogenisator überführt und durch 10-15 Stöße mit einem B-Pistill lysiert. Die vollständige Zelllyse wurde mikroskopisch überprüft und die Zellkerne pelletiert (10 min, 4°C, 2500 rpm). Der Überstand nach der Zentrifugation enthält die zytoplasmatische Fraktion. Das nukleare Pellet wurde erneut für 10 Minuten bei 25000 rpm und 4°C zentrifugiert (Optima TLX Ultrazentrifuge, TLA45 [Beckman Coulter GmbH, Krefeld]). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Puffer B pro 10⁸ Zellen durch 10-15 Stöße in einem Dounce-Glashomogenisator (B-Pistill) homogenisiert. Die Kernsuspension wurde für 30 Minuten auf Eis gerührt und die Kernreste durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 4°C, 25000 rpm). Der Überstand enthält das nukleare Extrakt und wurde über Nacht bei 4°C gegen das 50-fache Volumen Puffer C dialysiert. Durch abschließende Zentrifugation (25000 rpm, 30 min, 4°C, Optima TLX Ultrazentrifuge, TLA45 [Beckman Coulter GmbH, Krefeld]) wurden während der Dialyse ausgefallene Proteine und Lipide sedimentiert, der Kernextrakt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration der Extrakte betrug zwischen 5-10 mg/ml (Absorption bei 280 nm). Die Präparation von Kernextrakten aus fermentierten HeLa-S3 Zellen erfolgte am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen.

Puffer A		Puffer B		Puffer C	
10 mM	HEPES (pH 7,9)	20 mM	HEPES (pH 7,9)	20 mM	HEPES (pH 7,9)
1,5 mM	MgCl ₂	25% (v/v)	Glycerol	20% (v/v)	Glycerol
10 mM	КСІ	420 mM	NaCl	100 mM	КСІ
0,5 mM	DTT	1,5 mM	MgCl ₂	0,5 mM	DTT
0,5 mM	AEBSF HCI	0,5 mM	DTT	0,5 mM	AEBSF HCI
		0,5 mM	AEBSF HCI		

Tabelle 2-7: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Kernextraktpräparation.

2.5.5 Präparation von humanen primären T-Zellen

Primäre T-Zellen wurden in Kollaboration mit dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Universität Magdeburg präpariert. Dazu wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation aus 200 ml Vollblut einer weiblichen Spenderin isoliert. Anschließend wurden die T-Zellen durch die Entfernung aller nicht-T-Zellen (z.B. B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten) über negative Selektion angereichert (Pan T Cell Isolation Kit II human [Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach]). Die Ausbeute wurde mittels Zellzahlbestimmung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und betrug ca. 1 x 10⁸ Zellen. Abschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht in antibiotikahaltigem RPMI1640-Medium equilibriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6 Synthesechemische Methoden

2.6.1 Peptidsynthese

Die Synthese von Peptiden, basierend auf der N-terminalen Sequenz von Histon H4 (AS 1-25, UniProtKB/Swiss-Prot P02309) und dem adhäsions- und degranulierungsfördernden Adapterprotein ADAP (AS 586-600, UniProt/Swiss-Prot O15117), erfolgte mittels Festphasenpeptidsynthese (Merrifield 1963) an einem Intavis Respep XL Peptidsyntheseautomaten (INTAVIS Bioanalytical Instruments AG, Köln) im 25 bzw. 50 μ mol Synthesemaßstab. Als Schutzgruppe der α -Aminogruppen der Aminosäuren diente 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc (Carpino und Han 1970)). Die Aminosäureseitenketten waren wie folgt geschützt: Ser(tBu), pSer(OBzl), Arg(Pbf), Lys(Boc), His(Trt), Asp(OtBu), Asn(Trt), Cys(Trt), Gln(Trt). Die Aminosäuren wurden von GLS (GL Biochem Ltd., Shanghai, China), Iris Biotech (Marktredwitz), Bachem (Bubendorf, CH) und Merck Novabiochem (Darmstadt) bezogen. Als Trägermaterial für die Synthese wurde ein Polystyrol-Polyethylenglycol Kopolymer mit einer Beladung von 19 mmol/g (TentaGel R Ram [Rapp Polymere GmbH; Tübingen]) verwendet. Der Aufbau der Peptidkette erfolgte vom C- zum N-Terminus und begann mit der Entschützung des Syntheseharzes mit 20% (v/v) Piperidin in Dimethylformamid (DMF). Die anschließende Kopplung der Fmoc-geschützten Aminosäure erfolgte nach Aktivierung ihrer Carbonylgruppe in 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU) und N-Methylmorpholin (NMM). Der Aufbau der Peptidkette wird somit durch alternierende Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe und Kopplung der C-terminal aktivierten Aminosäure realisiert. Alle Peptide enthalten einen terminalen Cysteinrest, der die spätere kovalente Kopplung an eine Agarosematrix ermöglicht,

H4-Peptide darüber hinaus einen Aminohexansäure-*Linker* (Ahx), der Flexibilität vermittelt. Nach der vollständigen Peptidsynthese wurden die frei vorliegenden N-terminalen Aminogruppen durch eine Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF blockiert (*"Capping"*). Die Abspaltung der Peptide vom Syntheseharz sowie die vollständige Entschützung der Seitenketten erfolgte durch 4 stündige Inkubation in 5% Triisopropylsilan, 5% Phenol und 5% Wasser in Trifluoressigsäure (TFA). Das Produkt wurde in eiskaltem Diethylether ausgefällt, in Wasser gelöst, lyophilisiert und über präparative Hochleistungsflüssigchromatographie (*high-performance liquid chromatography, HPLC,* vgl. Abschnitt 2.6.2) gereinigt.

Kurzbezeichnung	Modifizierung	Peptidsequenz
H4-no Ac	-	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKILRDN-Ahx-C
Н4-К5Ас	Acetylierung	SGRG K⁵ac GGKGLGKGGAKRHRKILRDN-Ahx-C
Н4-К8Ас	Acetylierung	SGRGKGG K⁸ac GLGKGGAKRHRKILRDN-Ahx-C
H4-K12Ac	Acetylierung	SGRGKGGKGLG K¹²ac GGAKRHRKILRDN-Ahx-C
H4-K16Ac	Acetylierung	SGRGKGGKGLGKGGA K¹⁶ac RHRKILRDN-Ahx-C
H4-K5/12Ac	Acetylierung	SGRG K⁵ac GGKGLG K¹²ac GGAKRHRKILRDN-Ahx-C
H4-all Ac	Acetylierung	SGRG K⁵ac GG K⁸ac GLG K¹²ac GGA K¹⁶ac RHRKILRDN-Ahx-C
H4-S1p	Phosphorylierung	S¹p GRGKGGKGLGKGGAKRHRKILRDN-Ahx-C
ADAP-595*	-	C-RPIEDDQEVYDDVAE
ADAP-595p*	Phosphorylierung	C-RPIEDDQEV Y⁵⁹⁵p DDVAE

Tabelle 2-8: Synthetisierte Peptidsequenzen.

*Peptidsynthese dieser Sequenzen wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Beyermann (FMP Berlin) durchgeführt

2.6.2 Analytische und präparative HPLC

Die Aufreinigung von Rohpeptiden nach der Synthese wurde mittels präparativer Hochleistungsflüssigchromatographie (*high-performance liquid chromatography, HPLC*) an einem Varian ProStar 210 HPLC-System (Varian/Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Rohpeptide wurden in 5 ml 0,1% (v/v) TFA gelöst, auf eine VariTide Polymersäule (RPC, 250 x 21,2 mm [Varian/Agilent Technologies, Santa Clara, USA]) aufgetragen und mittels linearer Gradientenelution (Eluent A: 0,1% (v/v) TFA/Wasser, Eluent B: 0,1% (v/v) TFA/80% (v/v) Acetonitril/Wasser) bei einer Flussrate von 10 ml/min aufgetrennt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels MALDI-Massenspektrometrie (Karas *et al.* 1985; Karas *et al.* 1987; Karas und Hillenkamp 1988) und analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Die analytische HPLC erfolgte an einer Nucleosil C18 Säule (250 x 4,6 mm [MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren]) mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem linearen Gradienten von 5-95% Eluent B in Eluent A über 50 Minuten. Die gereinigten HPLC-Fraktionen wurden abschließend lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

2.6.3 Kovalente Kopplung der Peptide an eine feste Phase

Um Affinitätsstudien durchführen zu können, wurden die Peptide über die Sulfhydrylgruppe des terminalen Cysteins an eine Iodoacetyl-funktionalisierte Agarosematrix (SulfoLink[®] *Coupling Resin* [Pierce, Thermo Fischer Scientific, Bonn]) unter Ausbildung einer Thioetherbindung kovalent immobilisiert. Die Kopplung der Peptide an die Agarose erfolgte in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durch einstündige Inkubation einer 1 mM Peptidlösung (in Kopplungspuffer) mit dem Trägermaterial. Nach der Inkubationszeit wurden nicht gebundene Peptide mit Kopplungspuffer (50 mM Tris (pH 8,5), 5 mM EDTA-Na, 1 mM β -Mercaptoethanol) ausgewaschen und freie funktionelle Iodoacetylgruppen durch einstündige Inkubation mit 50 mM β -Mercaptoethanol (in Kopplungspuffer) blockiert. Anschließend wurde die Agarosematrix 6-mal mit 1 M NaCl-Lösung, 2-mal mit Wasser und 4-mal mit 50% (v/v) Acetonitril in Wasser gewaschen. Die Peptid-beladene Agarose wurde abschließend 1:1 (v/v) in 50% (v/v) Acetonitril in Wasser aufgenommen und in Aliquots zu je 20 µl bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Peptidbeladung erfolgte für ausgewählte Konstrukte mittels Aminosäureanalyse (Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach).

2.7 Pulldown-Experimente

2.7.1 Gcn5-Pulldowns

Die durchgeführten *Pulldown*-Experimente wurden in Anlehnung an das Protokoll von S. Lange (Lange 2010) durchgeführt. Für methodische Voruntersuchungen wurde das Bindungsverhalten der rekombinanten Bromodomäne von Gcn5 (vgl. Abschnitt 2.4.1) mit verschiedenen Varianten des immobilisierten H4-*tails* (siehe Tabelle 2-8) untersucht. Dazu wurden je Ansatz 20 µl der Peptidbeladenen Agarose in Ultrafree-MC Zentrifugaleinheiten (Millipore, Schwalbach) überführt und zweimal mit je 200 µl Inkubationspuffer (20 mM K-Phosphatpuffer (pH 7,5), 150 mM NaCl) gewaschen. Die so vorbereitete Peptidmatrix wurde mit 20 µl einer 10 -50 µM Gcn5-Lösung in Gegenwart von 500 µM BSA in Inkubationspuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Thermomixer [Eppendorf AG, Hamburg]). Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand durch Zentrifugation entfernt (2 min, 2000 rpm, Heraeus Biofuge Pico, #3325B [Thermo Fisher Scientific, Bonn]).

Um unspezifisch gebundene Proteine auszuwaschen, wurde 4-mal mit je 200 µl Inkubationspuffer für 5 Minuten gewaschen. Die auf der Peptidmatrix verbliebenen Proteine wurden mit 20 µl 3-fach SDS-Probenpuffer unter Aufkochen eluiert, mittels Zentrifugation bei 12000 rpm für 4 Minuten von der Agarosematrix separiert (Heraeus Biofuge Pico, #3325B [Thermo Fisher Scientific, Bonn]) und über SDS-PAGE aufgetrennt.

2.7.2 SILAC-Experimente

2.7.2.1 Histon H4-Pulldowns mit GeLC-MS Ansatz

Pulldown-Experimente zur Identifizierung acetylierungs- und phosphorylierungsabhängiger Bindungspartner des N-terminalen *tails* von H4 wurden mit HeLa-S3 Kernextrakten durchgeführt. Peptidbindungsstudien wurden mindestens zweimal, entweder mit einer reversen Markierungsstrategie (Überkreuz-Experimente) oder als biologisches Replikat, durchgeführt. Unter reverser Markierungsstrategie versteht man, dass modifizierte Peptidkonstrukte und die entsprechende unmodifizierte Kontrolle sowohl mit "leichtem" als auch mit "schwerem" SILAC-HeLa-S3 Kernextrakt inkubiert wurden, was zu zwei unabhängigen *Pulldown*-Experimenten führte. Ein Wiederholungsexperiment wurde dann als biologisches Replikat bezeichnet, wenn zwei verschiedene Kernextraktpräparationen eingesetzt wurden.

Für die Identifizierung acetylierungsabhängiger Histonbindeproteine wurden die Kernextrakte vor den Pulldown-Experimenten zunächst für 30 Minuten mit 1 µM Trichostatin A (TSA, Histondeacetylaseinhibitor) auf Eis inkubiert. Analog wurden Kernextrakte, die für die Bestimmung phosphorylierungsspezifischer Histonbindeproteine eingesetzt wurden, für 1 h auf Eis mit Phosphataseinhibitor Cocktail (Set V, 50x [Merck Calbiochem, Darmstadt]) inkubiert. Gleiche Proteinmengen des "leichten" und "schweren" SILAC-Kernextrakts (ca. 1 mg Gesamtproteingehalt in 450 µl) wurden mit jeweils 20 µl der Agarose-gebundenen Peptide in Ultrafree-MC Zentrifugalfiltereinheiten in Pulldown-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand nach der Inkubationszeit wurde abzentrifugiert (2000 rpm, 2 min, Heraeus Biofuge Pico, #3325B [Thermo Fisher Scientific, Bonn]) und die Peptidmatrix 6-mal mit je 200 µl Pulldown-Puffer für 5 Minuten gewaschen. Die Elution der verbliebenen Proteine erfolgte durch Aufkochen in je 18 µl 3-fach SDS-Probenpuffer. Die Elutionsfraktionen der unmodifizierten und modifizierten Peptidmatrices ("leicht" unmodifiziert und "schwer" modifiziert, et vice versa) wurden 1:1 vereinigt und mittels SDS-PAGE (2.4.3) aufgetrennt. Die Identifizierung und Quantifizierung modifizierungsabhängiger Bindungspartner erfolgte nach tryptischer In-Gel-Spaltung (2.8.1) massenspektrometrisch an einem LTQ-Orbitrap XL (vgl Abschnitt 2.9.1).

Material und Methoden

Pulldown-Experimente zur Verifizierung spezifischer Bindungspartner mittels Western Blot Analyse (Abschnitt 2.4.4) wurden analog mit nicht markierten HeLa-S3 Kernextrakten durchgeführt.

Tabelle 2-9: Zusammensetzung des Puffers für Pulldown-Experimente.

Pulldown-Puffer

50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
150 mM	NaCl
1% (v/v)	NP-40
0,5 mM	DTT
1 Tbl./10 ml	Protease Inhibitor*

*complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

2.7.2.2 Histon H4-Pulldowns mit 2-D RP-RP LC-MS Ansatz

Für den 2-D RP-RP LC-MS Ansatz (2-dimensionale *reversed phase-reversed phase* LC-MS) wurden *Pulldown*-Experimente analog zu Abschnitt 2.7.2.1 durchgeführt. Die Methodik unterscheidet sich jedoch darin, dass der Separationsaufwand auf Peptidebene verlagert wird. Dazu wurden die Agarosematrices der unmodifizierten und modifizierten Peptide direkt nach der Inkubation mit "leichtem" und "schweren" Kernextrakt und Auswaschen unspezifischer Proteine, 1:1 vereinigt. Die proteolytische Spaltung findet hierbei direkt an der Matrix (*on-bead*) statt (siehe 2.8.2.1) und die Peptide werden mittels 2-dimensionaler *reversed phase-reversed phase* (2-D RP-RP) Flüssig-chromatographie (Abschnitt 2.9.2) aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert.

2.7.2.3 ADAP-595-Pulldowns mit 2D RP-RP LC-MS Ansatz

Der 2-D RP-RP LC-MS Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit an dem Modellsystem ADAP optimiert. Die *Pulldown*-Experimente wurden nach dem Protokoll von Lange *et al.* (Lange *et al.* 2010) durchgeführt. Dazu wurden je Ansatz 2x10⁷ "leicht"- und "schwer"-isotopenmarkierte Jurkat Zellen in jeweils 100 µl Lysepuffer für 30 Minuten auf Eis lysiert. Die nichtlöslichen Zellbestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation entfernt (16000 g, 10 min, 4°C) und der Überstand für 1 h bei Raumtemperatur mit 20 µl der zuvor in Lysepuffer equilibrierten Peptidmatrix (ADAP-595 vs. ADAP-595p immobilisiert an Agarose, Tabelle 2-8) inkubiert. Wie bereits in Abschnitt 2.7.2.1 beschrieben, wurden auch hier Überkreuzexperimente, d.h. zwei *Pulldowns* mit einer reversen Markierungsstrategie, durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Peptidmatrices zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine 4-mal mit je 200 μl Lysepuffer für 5 Minuten gewaschen. Abschließend wurden die unphosphorylierten und phosphorylierten Peptidmatrices 1:1 vereinigt und die gebundenen Proteine direkt *on-bead* mit Trypsin gespalten (2.8.2.1). Die Analyse der resultierenden Peptide erfolgte mittels 2-D RP-RP LC-MS (Abschnitt 2.9.2).

Tabelle 2-10: Zusammensetzung de	es Lysepuffers fü	ür ADAP-595 <i>Pulldov</i>	n-Experimente.
----------------------------------	-------------------	----------------------------	----------------

Lysepuffer		
10 mM	HEPES (pH 7,5)	
150 mM	NaCl	
10 mM	MgCl ₂	
10 mM	КСІ	
0,5 mM	EGTA	
1% (v/v)	NP-40	
0,5 mM	DTT	
1 mM	Na_3VO_4	
1 Tbl./10 ml	Protease Inhibitor*	

*complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

2.7.3 ¹⁸O-Experimente

2.7.3.1 ADAP-595-Pulldowns mit 2D RP-RP LC-MS Ansatz

Die Methode der enzymatischen ¹⁸O-Markierung eignet sich im Besonderen zur Identifizierung und Quantifizierung von Proben, die nicht für SILAC zugänglich sind (z.B. Primärzellen oder Gewebe). Unmarkierte humane primäre T-Zellen (vgl. Abschnitt 2.5.5) sowie vergleichsweise humane kultivierte Jurkat T-Zellen (jeweils ca. 4x10⁷ Zellen pro *Pulldown*) wurden wie in Abschnitt 2.7.2.3 beschrieben in 200 µl Lysepuffer (siehe 2.7.2.3) aufgeschlossen und jeweils 100 µl des Lysats mit 20 µl phosphorylierter- bzw. unphosphorylierter ADAP-595 Peptidmatrix für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (vgl. Lange 2010). Nach der Inkubationszeit wurden die nicht gebundenen Bestandteile des Zelllysats durch Zentrifugation entfernt, die Agarose-gebundenen Peptide 4-mal mit je 200 µl Lysepuffer gewaschen (dabei findet der letzte Waschschritt jeweils in ¹⁶O- bzw. ¹⁸O-Puffer statt) und

einzeln mit Trypsin in Gegenwart von ¹⁶O-Wasser bzw. ¹⁸O-Wasser gespalten (siehe 2.8.2.2). Die *Pulldown*-Experimente wurden in Doppelbestimmung unter Verwendung einer reversen ¹⁸O-Markierungsstrategie durchgeführt.

2.8 Enzymatische Spaltung von Proteinen

Der Abbau von Proteinen erfolgt durch sequenzspezifische Endoproteasen, die die Proteinkette an einer definierten Stelle spalten. Dabei unterscheidet man zwischen spezifischen (Trypsin, Lys-C, Glu-C, Asp-N, Arg-C) und weniger spezifischen Endoproteasen (Elastase, Pepsin, Thermolysin, Thrombin) (Steen und Mann 2004). Die am häufigsten verwendete Endoprotease für die Spaltung von Proteinen vor der massenspektrometrischen Analyse ist Trypsin, das C-terminal von Lysin- und Argininresten spaltet (Finehout *et al.* 2005).

2.8.1 Tryptische In-Gel Spaltung

Für die Spaltung elektrophoretisch aufgetrennter Proteingemische wurde eine In-Gel Spaltung mit Trypsin durchgeführt. Die Methode der proteolytischen Protein-In-Gel Spaltung wurde von Rosenfeld *et al.* (Rosenfeld *et al.* 1992) etabliert und beinhaltet im Wesentlichen drei Schritte: Entfärbung der Gelmatrix, proteolytische Spaltung der Proteine und Extraktion der generierten Peptide.

Zur Entfärbung der Gelbanden wurden diese zunächst in Waschpuffer und Spaltpuffer (siehe Tabelle 2-11) gewaschen, in Acetonitril dehydriert und in einer Vakuumzentrifuge (Thermo-Servant SPD 1010 SpeedVac System [Thermo Fisher Scientific, Bonn]) vollständig getrocknet. Für die enzymatische Hydrolyse wurden die Gelstücke mit 100 ng Trypsin (*sequencing grade modified* [Promega GmbH, Mannheim]) in 20 μ l Spaltpuffer (siehe Tabelle 2-11) rehydratisiert und bei 37°C für 17 h inkubiert (Thermomixer [Eppendorf AG, Hamburg]). Nach dieser Zeit wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 20 μ l Abstopplösung (siehe Tabelle 2-11) und 5 minütige Ultraschallbehandlung terminiert, der abgetrennte Überstand in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 6 μ l 5% (v/v) Acetonitril/0,1% (v/v) TFA/Wasser aufgenommen. Die Proben wurden bis zur massenspektrometrischen Analyse (2.9.1) bei -20°C gelagert.

2.8.2 Tryptische on-bead Spaltung

Die *on-bead* Trypsinspaltung wurde im Rahmen dieser Arbeit für *Pulldown*-Experimente in Kombination mit 2-dimensionaler RP-RP LC (vgl. Abschnitte 2.7.2.2 - 2.7.3.1) angewandt. Im Gegensatz zur In-Gel Spaltung, bei dem die komplexen Elutionsfraktionen der *Pulldown*-Experimente

vor der Enzymspaltung mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden, werden in diesem Ansatz die Proteine direkt an der Agarosematrix (*on-bead*) gespalten.

2.8.2.1 Tryptische on-bead Spaltung: SILAC

Agarosematrices der unmodifizierten und modifizierten Peptide wurden direkt nach den entsprechenden *Pulldown*-Experimenten und Waschschritten 1:1 vereinigt. Die enzymatische Spaltung der gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 4 µg Trypsin (*sequencing grade modified* [Promega GmbH, Mannheim]) in 200 µl Spaltpuffer (Tabelle 2-11) direkt *on-bead* bei 37°C für 17 h (Thermomixer [Eppendorf AG, Hamburg]). Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Abstopplösung (Tabelle 2-11) und 5 minütige Ultraschallbehandlung terminiert und die Agarose durch Zentrifugation sedimentiert. Der Peptid-enthaltene Überstand wurde abgenommen und die Agarose mit 200 µl Acetonitril gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 90 µl 5% (v/v) Acetonitril/0,1% (v/v) TFA/Wasser aufgenommen. Die Proben wurden über 2-D RP-RP LC (Abschnitt 2.9.2) aufgetrennt und mittels LTQ-Orbitrap Massenspektrometrie analysiert.

2.8.2.2 Tryptische on-bead Spaltung: ¹⁸O

Die Optimierung der ¹⁸O-Trypsinspaltung für die 2-dimensionale Flüssigchromatographie wurde von Sabine Anker im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (Anker 2011).

Für die enzymatische ¹⁸O-Markierung wurden die Peptidmatrices nach dem *Pulldown*-Experiment und den Waschschritten einzeln mit je 2 µg Trypsin (*sequencing grade modified* [Promega GmbH, Mannheim]) für 17 h bei 37°C in Spaltpuffer (Tabelle 2-11) in Gegenwart von ¹⁶O-Wasser bzw. ¹⁸O-Wasser inkubiert. Dabei wurden die während der Spaltung generierten Peptide "leicht" und "schwer" (d.h. "¹⁶O", und "¹⁸O") markiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Trypsin bei 95°C für 30 Minuten sowie durch die Zugabe von 25 µl Abstopplösung (Tabelle 2-11) und Ultraschallbehandlung inaktiviert. Die Überstände, die die "leicht"- und "schwer"-markierten Peptide enthalten, wurden nach Zentrifugation vereinigt und die *beads* mit je 100 µl Acetonitril gewaschen. Nach dem Einengen der vereinigten Überstände in einer Vakuumzentrifuge wurden die Proben in 90 µl 5% (v/v) Acetonitril/0,1% (v/v) TFA/Wasser aufgenommen, mittels 2-D RP-RP LC aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert (vgl. Abschnitt 2.9).

Waschpuffer		Spaltpuffer ¹⁶ O		
25 mM	Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7,8)	50 mM	Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7,8)	
50% (v/v)	Acetonitril	in Wasser		
Spaltpuffer ¹⁶ O		Abstopplösung		
50 mM	Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7,8)	0,5% (v/v)	Trifluoressigsäure in Acetonitril	
in ¹⁸ 0-Wa	sser (Campro Scientific GmbH, Berlin)			

Tabelle 2-11: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die Trypsinspaltung.

2.9 Biologische Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Analysemethode, mit der sich Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum bestimmen lassen (Lottspeich und Zorbas 1998). Den Durchbruch in der biologischen Anwendung fand die Massenspektrometrie mit der Entwicklung "sanfter" Ionisierungsmethoden für große, polare, thermisch labile und mehrfach geladene Moleküle. Diese Methoden umfassen die Ionisierung des gelösten Analyten im elektrischen Feld (Elektronenspray-Ionisierung, ESI) (Fenn *et al.* 1989) oder aus einer festen Phase mittels Matrix-assoziierter Laser-Desorption/ -Ionisierung (MALDI) (Karas und Hillenkamp 1988; Tanaka *et al.* 1988). Parallel dazu fand auch die Miniaturisierung von chromatographischen Trennverfahren statt, was die Identifizierung komplexer Protein- und Peptidgemische über nanoLC-gekoppelte Massenspektrometrieverfahren ermöglichte (Lehmann 1996).

2.9.1 NanoLC-ESI-MS/MS

Die nanoLC-ESI-MS/MS Messungen wurden wie beschrieben durchgeführt (Stephanowitz *et al.* 2012). Nach tryptischer In-Gel Spaltung bzw. nach der ersten RP-Chromatographie bei *on-bead* Spaltung wurden nanoLC-MS/MS Analysen an einem LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Scientific, Dreieich) in Kombination mit einer Eksigent NanoLC-Ultra Anlage (Axel Semrau GmbH, Sprockhövel) durchgeführt. Das nanoLC-System war über eine nano-Elektrosprayquelle (Proxeon, Odense, DK) mit einem 10 µm *i.d.* PicoEmitter (New Objective, Woburn, USA) mit dem Massenspektrometer verbunden. Drei (2-D RP-RP LC-MS) bzw. sechs Mikroliter (GeLC-MS) des gelösten Analyten wurden auf eine PepMap C18-Vorsäule (5 µm, 100 Å, 5 mm x 300 µm *i.d.* [Dionex, Idstein]) aufgetragen und durch Spülen mit 2% (v/v) Acetonitril in Eluent A (0,1% (v/v) Ameisensäure in Wasser [Biosolve, Valkenswaard, NL]) entsalzt und aufkonzentriert (Flussrate: 5 µl/min). Die Elution der Probe auf die analytische Säule (Acclaim PepMap100, C18, 3 µm, 100 Å, 250 mm x 75 µm *i.d.* [Dionex, Idstein]) erfolgte in umgekehrter Flussrichtung (*Backflush*-Verfahren) mit einer Flussrate von 200 nl/min. Die Peptide wurden mit einem linearen A-B-Gradienten von 3-24% Eluent B (0,1% (v/v) Ameisensäure in Acetonitril [Biosolve]) in 62 Minuten mit weiterem Anstieg auf 60% B bei 102 Minuten aufgetrennt. Für die Generierung der MS/MS-Spektren wurden im datenabhängigen Modus (*data dependent mode*) parallel ein Übersichtsscan im Massenbereich m/z 375-1500 in der Orbitrap sowie MS/MS Spektren der fünf intensivsten Vorläuferionen in der linearen Ionenfalle (LTQ) erzeugt. Dabei wurde eine dynamische Ausschlusszeit (*dynamic exclusion*) von 120 s für Vorläuferionen berücksichtigt. Die automatische Ioneninjektionskontrolle (*automatic gain control*) betrug 1 x 10⁶ für Orbitrap-MS- und 20000 für LTQ-MS/MS-Scans.

2.9.2 2-D RP-RP LC-MS/MS

Die Methodik der 2-dimensionalen reversed phase-reversed phase (RP-RP) LC beinhaltet zwei aufeinander folgende chromatographische Separationsschritte für Peptide. Dabei sind beide chromatographischen Dimensionen nicht direkt miteinander verbunden (*offline*). Das Trennprinzip beider Dimensionen basiert auf der hydrophoben Wechselwirkung der Peptide mit der unpolaren stationären Phase des Säulenmaterials in einem polaren wässrigen Lösungsmittel (Umkehr-phasenchromatographie, *reversed phase*, RP).

Die erste chromatographische Trennung erfolgte nach tryptischer *on-bead* Spaltung mittels microLC an einer Ultimate HPLC Anlage (LC Packings, Amsterdam, NL). Dazu wurden die chromatographischen Parameter (Flussrate, Gradientenlänge und Säulenlänge) im Hinblick auf Peakbreiten und Peakkapazitäten optimiert. Für die Verwendung von polymeren RP-Säulen (PLRP-S, 3 μ m, 100 Å, 150 x 1,0 mm i.d. [Varian/Agilent Technologies, Santa Clara, USA]) erfolgte die Auftrennung der Peptide bei einer Flussrate von 40 μ l/min und einem linearen A-B-Gradienten von 1-50% in 50 Minuten (Eluent A: 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure, 5% (v/v) Acetonitril in Wasser, Eluent B: 0,085% (v/v) Trifluoressigsäure, 80% (v/v) Acetonitril in Wasser) (Stephanowitz *et al.* 2012). Die eluierten Peptide wurden mit einer Fraktionsdauer von 30 s zu 24 Fraktionen vereinigt (4 Zyklen, vgl. Abschnitt 3.1.2). Bei der Verwendung von C18-Säulen (Acclaim PepMap100, 5 μ m, 100 Å, 250 x 1,0 mm i.d. [Dionex, Idstein]) wurde ein linearer A-B-Gradient von 1-50% in 125 Minuten bei einem Fluss von 40 μ l/min verwendet. Dabei wurden insgesamt 36 Fraktionen mit einer Fraktionsdauer von 40 s (5 Zyklen) gesammelt. Die Elutionsfraktionen aus verschiedenen Bereichen des Chromatogramms wurden gemäß Abbildung 3-4 vereinigt, bis zur Trockne eingeengt und in 6 μ l 5% (v/v) die massenspektrometrische Analyse (*online* LC-MS/MS-Kopplung) erfolgte wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben.

2.9.3 Proteinidentifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung und Quantifizierung von SILAC-Experimenten erfolgte mit der MaxQuant-Software (Versionen 1.0.13.13 bzw. 1.1.1.36) (Cox und Mann 2008; Cox et al. 2009; Cox et al. 2011). Beide MaxQuant Versionen verfügen über einen leicht unterschiedlichen Suchalgorithmus. Während in der 1.0.13.13-Version die mittels MaxQuant generierten Peaklisten (msm-Dateien) zunächst an eine Mascot-Suchmaschine (Version 2.2 [Matrix Science Ltd, London, UK]) übertragen werden, arbeitet die 1.1.1.36-Version mit einer integrierten Andromeda-Suchmaschine (Cox et al. 2011). Beide Suchmaschinen gleichen die generierten MS/MS-Spektren gegen eine IPI-humane Proteindatenbank (international protein index, Version 3.78) ab und ordnen dabei übereinstimmende Peptidsequenzen zu. Die verwendete Datenbank beinhaltete neben allen wahren Peptidsequenzen auch inverse nonsense Varianten dieser Sequenzen (decoy database). Alle Suchen wurden unter Berücksichtigung von Methioninoxidationen und Cystein-Propionamidaddukten als variable Modifizierungen sowie mit einer Massentoleranz von 6 ppm bzw. 0,35 Da für Vorläufer- und Fragmentionen durchgeführt. Für die Suchen waren außerdem maximal zwei Fehlspaltstellen und eine Falschidentifizierungsrate (false discovery rate, FDR) von < 0,01 zugelassen. Ein Protein wurde dann als identifiziert angesehen, wenn mindestens zwei Peptide (unique) der Sequenz zugeordnet wurden. Quantifizierungsergebnisse wurden nur dann berücksichtigt, wenn mindestens zwei Peptidquantifizierungsereignisse (ratio count) beitrugen.

Für ¹⁸O-Markierungsexperimente erfolgte die Proteinidentifizierung und –quantifizierung mit Hilfe der *Mascot Distiller Quantitation Toolbox* (Version 2.4.2.0 [Matrix Science Ltd, London, UK]). Dazu wurden die prozessierten MS/MS-Spektren mit einer Mascot-Suchmaschine (Version 2.2 [Matrix Science Ltd, London, UK]) gegen eine IPI-humane Proteindatenbank zusammen mit der entsprechenden *decoy*-Datenbank (IPI human *decoy*, Version 3.78) gesucht. Für die Suchen wurden zwei Fehlspaltstellen sowie Massentoleranzen von 10 ppm bzw. 0,35 Da für Vorläufer- und Fragmentionen zugelassen. Als variable Modifizierungen wurden Oxidationen am Methionin, Propionamidaddukte am Cystein sowie ein- und zweifache C-terminale ¹⁸O-Markierung berücksichtigt. Peptide wurden als identifiziert angesehen, wenn die Wahrscheinlichkeit einer falschpositiven Identifizierung (Signifikanz) < 0,05 war. Für die Quantifizierung wurden nur Proteine verwendet, die mit mindestens zwei solchen Peptiden identifiziert wurden. Peptidverhältnisse wurden nur dann berücksichtigt, wenn im MS-Spektrum im entsprechenden Massenbereich der Anteil der Vorläuferionenintensität mindestens 50% (*fraction value* > 0,5) und der Korrelationskoeffizient zwischen den Intensitäten der leichten und schweren Peptidsignale > 0,98 war (*correlation threshold* > 0,98). Die relativen Proteinverhältnisse wurden aus den intensitätsgewichteten Mittelwerten aller Peptidverhältnisse gebildet, wobei mindestens zwei proteinspezifische Peptide gefordert wurden. Für die Quantifizierung wurde die Isotopenreinheit des verwendeten ¹⁸O-Wassers von 97% berücksichtigt (Campro Scientific GmbH, Berlin).

2.10 NMR-Spektroskopie

NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Bindung modifizierter H4-Peptide mit der rekombinanten Bromodomäne von Gcn5 wurden von Dr. Sylvain Tourel (Arbeitsgruppe In-Cell NMR, FMP Berlin) durchgeführt. Das Assignment der Gcn5-Bromodomäne wurde von David Neuhaus (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt (Owen et al. 2000). Für NMR-Messungen wurde die Gcn5-Bromodomäne zunächst wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben ¹⁵N- und ¹³Cmetabolisch markiert exprimiert und NMR-spektroskopisch vermessen. Bindungsstudien wurden nach Owen et al. (Owen et al. 2000) mit 350 µM ¹⁵N-markierter Gcn5-Bromodomäne in SEC-Puffer (20 mM K-Phosphatpuffer (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol) in Gegenwart von 10% (v/v) ²H₂O durchgeführt. Für die NMR-spektroskopische Bestimmung von Bindungskonstanten wurden HSQC-Spektren mit steigender Ligandenkonzentration aufgenommen. Acetylierte H4-Peptide wurden zum Protein titriert, bis ein Protein:Peptid Verhältnis von 1:10 erreicht war. Die Aufnahme der NMR-Spektren zur Verfolgung der relativen Peakintensität der Proteinsignale in Abhängigkeit vom Protein: Peptid Verhältnis (1:0 bis 1:10) erfolgte an einem Bruker AV750 Spektrometer (Bruker GmbH, Karlsruhe). Die Berechnung der Bindungsaffinitäten wurde nach Cavanagh et al. durchgeführt (Cavanagh et al. 2007).

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein *offline* 2-D RP-RP LC-MS/MS Verfahren als Alternative zur klassischen gelbasierten Proteomanalyse entwickelt werden. Die Entwicklung und Validierung der neuen Methodik wurde zunächst am gut charakterisierten Modellsystem durchgeführt und im weiteren Verlauf für die Identifizierung und Quantifizierung von Interaktionspartnern des Zellkernproteins Histon H4 verwendet. Dabei sollte insbesondere der Einfluss spezifischer Lysin-Acetylierungsmuster der N-terminalen H4-Sequenz auf die Rekrutierung von Proteinen und Proteinkomplexen mittels quantitativer Massenspektrometrie untersucht werden.

3.1 Entwicklung der 2-D RP-RP LC MS/MS Methodik

Zum Studium von Protein-Protein- oder Peptid-Protein-Interaktionen werden häufig Affinitäts-MS Experimente, d.h. Affinitätsreinigungen in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie, durchgeführt. Diese Vorgehensweise erfordert die Auftrennung komplexer Protein- oder Peptidgemische vor der massenspektrometrischen Analyse. In den letzten Jahren wurden zunehmend Verfahren entwickelt und eingesetzt, die auf der tryptischen Spaltung sehr komplexer Proteingemische, gefolgt von der mehrdimensionalen Trennung der Peptide, basieren (vgl. Abschnitt 1.3.1) (Gilar *et al.* 2005a; Zhou *et al.* 2010; Gokce *et al.* 2011). Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass wenig abundante Proteine sowie Proteine mit extremen Eigenschaften (Größe, Polarität, membrangebundene Proteine), die mittels Proteinauftrennungsverfahren oft verloren gehen, zugänglich für die massenspektrometrische Analyse werden. Für eine effiziente Identifizierung von interagierenden Proteinen in Peptid-basierten Affinitätsexperimenten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine zweidimensionale *reversed phase-reversed phase* (RP-RP) Flüssigchromatographie zusammen mit einem spezifischen Fraktionierungsschema entwickelt. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass in beiden chromatographischen Dimensionen pH-saure, MS-kompatible Elutionssysteme eingesetzt werden (Kombination aus TFA in der ersten Dimension und FA in der zweiten Dimension). Das führt dazu, dass die Anzahl von Zwischenschritten und der damit verbundene Probenverlust vor der MS-Analyse minimiert werden. Durch die Anwendung eines spezifischen Fraktionierungsschemas in der ersten Dimension, erreicht man eine optimale Ausnutzung der Trenn- und MS/MS Kapazität in der zweiten Dimension bei optimierter Messzeit.

3.1.1 Einfluss von Säulenparametern auf die Trennleistung und Orthogonalität

Für die Optimierung der Trennleistung der ersten Dimension wurde ein Set bestehend aus 45 synthetischen Peptiden, die sich in ihrer Hydrophobizität, Ladung und ihrem Molekulargewicht (600-3000 Da) unterschieden (Gropengiesser *et al.* 2009), verwendet. Die Auftrennung dieses Peptidgemisches wurde in Abhängigkeit von dem verwendeten Säulenmaterial sowie der Säulenlänge (Polymersäule vs. C18-Säule, 150 mm vs. 250 mm), der Flussrate (30-70 μ l/min) und der Gradientenlänge (50-150 min) in Gegenwart von 0,1% (v/v) TFA untersucht. Dabei wurde die Trennleistung der Chromatographie an der resultierenden mittleren Peakbreite (w_{av}) und Peakkapazität (P) gemessen. Die Peakbreite wurde über die Halbwertsbreite, d.h. der Peakbreite bei halber Peakhöhe, bestimmt und über alle Peptidsignale gemittelt. Die Peakkapazität ist die Anzahl von Peaks, die in einem bestimmten Retentionszeitraum und bei einer vorgegebenen Auflösung voneinander getrennt werden können und kann vereinfacht mittels Gleichung 1 berechnet werden.

 $P = \frac{W_{av}}{RT_{\max} - RT_{\min}}$

Gleichung 1: Berechnung der Peakkapazität (P) w_{av}= mittlere Peakbreite RT=Retentionszeit

Vergleicht man die chromatographischen Parameter für die Auftrennung von Peptidgemischen in Abhängigkeit vom Säulenmaterial, so wird deutlich, dass unter sonst gleichen Bedingungen (Flussrate, Säulenlänge, Gradientendauer) die beste Auftrennung mit C18-Material erreicht wird (vgl. Abbildung 3-1). Für die verwendete Polymersäule beträgt die durchschnittliche mittlere Peakbreite 0,35 min und ist somit um ca. 0,10 min breiter als bei vergleichbaren Auftrennungen mit einer C18-Säule. Der gleiche Trend ist auch für die Peakkapazitäten erkennbar. Variiert man die Flussrate, so hat das, unabhängig vom gewählten Säulenmaterial, keinen signifikanten Einfluss auf die Peakbreiten und Peakkapazitäten.



Abbildung 3-1: Vergleich der chromatographischen Trennleistung in Abhängigkeit vom Säulenmaterial (A) und der Säulenlänge (B). Auftrennung eines Peptidgemisches an (A) einer PLRP-S- bzw. C18-Säule (150 x 1 mm *i.d.*) und (B) C18-Säulen (150 x 1 mm i.d. und 250 x 1mm *i.d.*) bei verschiedenen Flussraten und einem Acetonitrilgradienten von 5-50% in 50 min (150 mm-Säule) 75 min (250 mmbzw. Säule).

Der entscheidende Vorteil von polymeren Säulenmaterialien (PLRP-S) ist jedoch, dass sie robuster auf pH-Wertänderungen reagieren und bessere Peakprofile für basische Peptide zeigen (McCalley 2005). Darüber hinaus unterscheidet sich das Material der stationären PLRP-S Phase der ersten Dimension von dem der stationären C18 Phase, die standardmäßig zur Peptidauftrennung in der zweiten chromatographischen Dimension verwendet wird. Neben dem verwendeten Säulenmaterial stellt auch die Länge der verwendeten Säule eine wichtige Kenngröße im Hinblick auf die Effizienz der Peptidauftrennung dar. Dazu wurden vergleichend Peakbreiten und Peakkapazitäten für C18-Säulen mit 150 mm und 250 mm Länge in Abhängigkeit von der Flussrate bestimmt (Abbildung 3-1). Peptide wurden mit einem linearen Acetonitrilgradienten von 5-50% in Gegenwart von 0,1% TFA aufgetrennt, wobei die jeweilige Gradientenlänge auf 50 Minuten für die 150 mm C18-Säule und 75 Minuten für die 250 mm C18-Säule angepasst wurde. Unter diesen Voraussetzungen verbreitern sich die Peaks mit der längeren Säule zwar minimal (Anstieg von durchschnittlich 0,23 min auf 0,3 min), aufgrund des höheren Trennraums erhöht sich allerdings dennoch die Peakkapazität um ca. 15%. Die Flussrate hat keinen entscheidenden Einfluss auf die Peakbreiten und Peakkapazitäten und wurde somit für alle weiteren Untersuchungen auf 40 µl/min festgelegt. Als weitere wichtige Einflussgröße wurde die Gradientenlänge variiert. Wie in Abbildung 3-2 exemplarisch für eine 250 mm C18-Säule gezeigt, nehmen zwar die mittleren Peakbreiten in Abhängigkeit von der Gradientenlänge (75 min-150 min Gradienten) zu, die Peakkapazitäten erreichen jedoch ihr Maximum bei einer Gradientenlänge von 125 Minuten. Aufgrund dessen wurde für die in Abschnitt 3.1.4 beschriebenen Versuche eine Kombination aus einer 250 mm C18-Säule, einem Fluss von 40 μ l/min und einem linearen Acetonitrilgradienten von 5-50% in 125 Minuten verwendet.



Abbildung 3-2: Vergleich der chromatographischen Trennleistung in Abhängigkeit von der Gradientenlänge. Auftrennung eines Peptidgemisches an einer 250 mm C18-Säule mittels 5-50% Acetonitril-Gradientenelution in 75, 100, 125 bzw. 150 min und einem konstanten Fluss von 40 μl/min.

Für die mehrdimensionale Flüssigchromatographie ist jedoch nicht nur die Effizienz der Peptidauftrennung in der ersten Dimension, sondern die Kombination aus der chromatographischen Performance der ersten und zweiten Dimension, entscheidend. Diese hängt nicht nur von den Peakbreiten und Peakkapazitäten der einzelnen Dimensionen sondern auch von der Orthogonalität der gewählten Trennprinzipien ab. Unter Orthogonalität versteht man in der Chromatographie, dass die Retentionszeiten in beiden Dimensionen als statistisch unabhängig voneinander angesehen werden können (Gilar et al. 2005b). Bei dem verwendeten 2-D RP-RP LC Verfahren handelt es sich um ein orthogonalitätsbegrenztes System, da beide Dimensionen auf dem gleichen Trennprinzip (Umkehrphasenchromatographie) beruhen. Bei der Verwendung von RP-RP Ansätzen kann die Orthogonalität durch eine pH-Wert Änderung zwischen der ersten und zweiten Dimension verbessert werden (Gilar et al. 2005b; Gilar et al. 2005a; Zhou et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein System mit pH-sauren Bedingungen in beiden chromatographischen Dimensionen entwickelt werden. Dazu wurde zunächst das Retentionsverhalten eines Peptidgemisches mit verschiedenen RP-RP-Kombinationen untersucht. Der Vergleich der Retentionszeiten für diese Systeme ist in Abbildung 3-3 für PLRP-S und C18-Säulen dargestellt. Die normalisierten Retentionszeitplots spiegeln die Orthogonalität der Systeme wieder. Eine große Aufspreizung der Peptide zeigt eine hohe Orthogonalität, d.h. unterschiedliche Retentionsverhalten in der ersten und zweiten Dimension an. Bei der Verwendung von Ammoniumformiat (pH10) als Zusatz in der ersten Dimension und FA in der zweiten Dimension ist das Retentionsverhalten stark unterschiedlich. Bei der Verwendung von pHsauren Elutionsbedingungen in beiden Dimensionen, erfolgte die erste chromatographische Auftrennung in Anwesenheit von 0,1% TFA, während in der zweiten Dimension 0,1% FA verwendet wurde. Der Vorteil dieser Kombination ist, dass TFA in der ersten Dimension zu sehr scharfen Peaks führt, während FA aufgrund der geringen Ionenunterdrückung optimal für die ESI-MS Analyse ist (Apffel *et al.* 1995; Huber und Premstaller 1999). Die Orthogonalität dieses Systems ist jedoch sowohl für PLRP-S als auch für C18-Säulen sehr eingeschränkt (Abbildung 3-3 B+C).



Abbildung 3-3: Normalisierte microLC Retentionszeitplots (norm. RT) für 2-D LC-Systeme. Auftrennung eines Peptidgemisches bestehend aus 45 Peptiden mit (A) PLRP-S, pH10 in der ersten Dimension und C18, pH2 in der zweiten Dimension, (B) PLRP-S, pH2 in der ersten und C18, pH2 in der zweiten Dimension sowie (C) C18 und saure Bedingungen in beiden chromatographischen Dimensionen.

Signifikante Unterschiede im Retentionsverhalten in Abhängigkeit vom Säulenmaterial (PLRP-S *vs.* C18) konnten nicht festgestellt werden (Abbildung 3-3 B+C). Dennoch wird deutlich, dass trotz dieser eingeschränkten Orthogonalität, Peptide, die in der ersten Dimension mit einer mittleren Peakbreite von 0,3 min eluieren, in der zweiten Dimension auf ca. 10 min gespreizt werden ("ausreichende" Orthogonalität).

3.1.2 Entwicklung eines Fraktionierungsschemas in der 1.Dimension

Die Entwicklung eines Fraktionierungsschemas in der ersten Dimension zielt darauf ab, die Orthogonalität des 2-D RP_{TFA}-RP_{FA} Systems zu erhöhen und den Separationsraum der zweiten Dimension voll auszunutzen. Dazu wurden Elutionsfraktionen aus verschiedenen Bereichen der ersten Dimension so vereinigt, dass jede Fraktion eine gleichmäßige Verteilung von Peptiden mit unterschiedlichen Eigenschaften (Hydrophobizität, Ladung, Molekulargewicht) enthält und die Überschneidung von Peptididentifizierungen in benachbarten Fraktionen möglichst gering ist.

Die Fraktionsdauer pro Einzelfraktion wurde dabei an die mittlere Peakbreite der ersten Dimension (Abbildung 3-1) angepasst. Peptide, die mit der gewählten Fraktionsdauer in der ersten Dimension koeluieren, werden in der zweiten Dimension durchschnittlich auf 12 Minuten gespreizt (Daten siehe Diskussion Abbildung 4-1). Basierend auf einer mittleren Peakbreite von 0,35 min für die Auftrennung mit einer 150 mm PLRP-S Säule (Fluss: 40 μ l/min, Gradientenlänge: 50 min) wurden Fraktionierungen mit 0,5 Minuten Fraktionsdauer und einer Zyklusgröße von 24 Fraktionen sowie 0,75 Minuten Fraktionsdauer und 16 Fraktionen verglichen (je 4 Zyklen). Bei der Verwendung einer 250 mm C18-Säule (Fluss: 40 μ l/min, Gradientenlänge: 125 min, mittlere Peakbreite 0,4 min) erfolgte die Auftrennung mit einer Fraktionsdauer von 0,67 Minuten und einer Zyklusgröße von 36 Fraktionen (5 Zyklen).



MS und MS/MS Identifizierung und Quantifizierung

Abbildung 3-4: Schema für die 2-D LC-MS/MS Methodik. In der ersten Dimension werden die Peptide nach *on-bead* Trypsinspaltung mittels RP-Chromatographie und einem linearen Acetonitrilgradienten (Eluent A: 0,1% (v/v) TFA, 5% (v/v) Acetonitril in Wasser, Eluent B: 0,085% (v/v) TFA, 80% (v/v) Acetonitril in Wasser) fraktioniert. Fraktionen aus verschiedenen Bereichen wurden zyklusweise vereinigt (z.B. 1+25, 2+26, 3+27,... in 4 Zyklen bei 24 vereinigten Fraktionen). Nach Einengen wurden die Fraktionen mittels nLC-MS aufgetrennt und analysiert. Basispeak-Chromatogramme für vereinigte microLC-Fraktionen sind im unteren Teil dargestellt.

Durch die Anwendung des Fraktionierungsschemas kommt es zu einer homogenen Peptidverteilung in der zweiten Dimension (vgl. Basispeak-Chromatogramme im unteren Teil von Abbildung 3-4). Orthogonalitätsplots der vereinigten Fraktionen bestätigen eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Retentionszeitbereich der zweiten Dimension (Daten siehe Diskussion Abbildung 4-1).
In Folge dessen ist auch die Anzahl der Peptididentifizierungen in allen vereinigten Fraktionen annähernd gleich (siehe Abbildung 3-5). Daraus folgt, dass obwohl es sich bei dem verwendeten 2-D RP-RP LC Ansatz um ein grundsätzlich nicht-orthogonales System handelt, eine gute Verteilung der Peptide in der zweiten Dimension und damit eine hohe totale Peakkapazität ($P_{total}=P_{1.Dim} \times P_{2.Dim}$) durch Anwendung des entwickelten Fraktionierungsverfahrens realisiert werden kann.

3.1.3 2-D RP-RP LC-MS/MS in Kombination mit SILAC

Die Anwendbarkeit des entwickelten 2-D RP-RP LC Verfahrens sollte zunächst mit dem gut charakterisierten Modellsystem ADAP (adhesion and degranulation promoting adaptor protein) gezeigt werden, da bereits Ergebnisse aus vergleichbaren GeLC-MS Ansätzen publiziert wurden (Lange 2010; Lange et al. 2010). Dazu wurden Tyr-595-phosphorylierte und die entsprechenden unphosphorylierten Peptidsequenzen des Adapterproteins ADAP (AS 586-600, UniProt/Swiss-Prot O15117 [Peptidsynthese AG Beyermann, FMP Berlin]) kovalent an eine Agarosematrix immobilisiert und SILAC-basierte Pulldown-Experimente mit reverser Markierungsstrategie durchgeführt. Die Peptidmatrices wurden mit "schwer" und "leicht" markiertem Jurkat-T-Zelllysat inkubiert, unspezifische Bindungspartner ausgewaschen und bindende Proteine direkt on-bead tryptisch gespalten. Die komplexen Peptidgemische wurden mittels 2-D RP-RP LC-MS/MS aufgetrennt und identifiziert. Dabei wurde das in Abschnitt 3.1.2 beschriebene Fraktionierungsschema angewandt. Für die Fraktionierung in der ersten Dimension wurde die Auftrennung in Abhängigkeit von der Fraktionsanzahl und den Säulenparametern verglichen. Dazu wurden Peptidgemische nach tryptischer on-bead Spaltung entweder über eine PLRP-S Säule (150 mm Länge, Fluss: 40 µl/min, Gradientenlänge: 50 min) wie in 3.1.2 beschrieben in 16 bzw. 24 vereinigte Fraktionen oder über eine C18-Säule (250 mm, Fluss: 40 µl/min, Gradientenlänge: 125 min) in 36 vereinigte Fraktionen aufgetrennt. Die Analyse der vereinigten Fraktionen erfolgte mittels nLC-MS/MS an einem LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer und MaxQuant Auswertung (Version 1.1.1.36). Abbildung 3-5 stellt die Anzahl der Peptididentifizierungen sowie die Überschneidung von Peptididentifizierungen in benachbarten Fraktionen dar. Die Anzahl der Peptididentifizierungen ist über alle vereinigten Fraktionen gleichmäßig verteilt. Der Durchschnitt identifizierter Peptide pro Fraktion liegt für eine Auftrennung mit PRLP-S (150 mm, 40 µl/min, 50 min Gradientenlänge) bei ca. 940 Peptiden für 16 Fraktionen und 890 Peptiden für 24 Fraktionen. Bei 36 Fraktionen-Auftrennung und der Verwendung einer C18-Säule (250 mm, 40 µl/min, 125 min Gradientenlänge) wurden ca. 830 Peptide pro vereinigter Fraktion identifiziert. Daraus ergeben sich insgesamt 10534 proteinspezifische (unique) Peptide, die 1400 Proteinen zugeordnet werden (16 Fraktionen), 13496 sequenzspezifische Peptide

für 1700 Proteine (24 Fraktionen) und 21302 Peptide, die 2000 Proteinsequenzen entsprechen (36 Fraktionen). Für 16, 24 und 36 Fraktionen wurden entsprechend 76%, 65% und 72% aller proteinspezifischen Peptide lediglich in einer Fraktion identifiziert (vgl. Abbildung 3-5 Kreisdiagramme). Obwohl sich die Überschneidung von Peptididentifizierungen zwischen benachbarten Fraktionen nicht signifikant ändert, erhält man eine deutliche Erhöhung identifizierter Peptide/Proteine mit steigender Fraktionsanzahl.



Abbildung 3-5: Peptididentifizierungen in Abhängigkeit von der Fraktionsanzahl sowie Säulenparametern. Gemittelte Anzahl identifizierter Peptide nach *on-bead* Trypsinspaltung von ADAP-Peptid-*Pulldown*-Experimenten in Kombination mit SILAC (unmodifiziert vs. modifiziert, n=2). Die Auftrennung erfolgte entweder mit einer 150 mm-PLRP-S Säule (A+B) oder einer 250 mm-C18-Säule (C) und einem linearen Acetonitrilgradienten von 5-50% in 50 min (A+B) bzw. 125 min (C). Elutions-fraktionen wurden zu (A) 16 Fraktionen, (B) 24 Fraktionen und (C) 36 Fraktionen zyklusweise vereingt. Die Überschneidung von Peptididentifizierungen in benachbarten Fraktionen ist in den entsprechenden Kreisdiagrammen dargestellt.

Die Quantifizierung der gebundenen Proteine erfolgte mit MaxQuant (Version 1.1.1.36). Phosphorylierungsvermittelte Bindungspartner wurden von unspezifischen, z.B. an das Trägermaterial bindenden, Proteinen (Hintergrundproteine) über das Isotopenverhältnis schwer/leicht (*heavy/light*, H/L, *et vice versa*) der tryptischen Peptide detektiert. Proteine mit einem Isotopenverhältnis von 1 binden unabhängig von der Phosphorylierung an das Peptidkonstrukt. Phosphorylierungsspezifische Bindungspartner weisen ein deutlich erhöhtes Verhältnis im Vergleich zu den Hintergrundproteinen auf. Die Mehrzahl aller identifizierten und quantifizierten Proteine aus *Pulldown*-Experimenten mit Tyr595-phosphorylierten ADAP-Peptiden weisen dabei Isotopenverhältnisse um 1 auf (Daten nicht gezeigt). Potentielle phosphorylierungsabhängige Bindeproteine sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Phosphorylierungsspezifische Interaktionspartner an ADAP-595-Peptide. Die Anreicherungsverhältnisse eines GeLC-basierten Ansatz^a sowie verschiedenen 2-D RP-RP LC-Ansätzen wurden mit SILAC unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie doppelt bestimmt. Die Anzahl quantifizierter Peptide wurde aus MaxQuant übernommen (*ratio count*).

	Dro	toinhoschroihung	Ge	eLC-	2-D RP-RP LC-MS/MS					
	FIU		MS	/MS ^ª	16 Fra	ktionen	24 Fra	ktionen	36 Fra	ktionen
Gen- name	UniProtKB acc. Nr.	Proteinname	Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)
CRK	P46108	Proto-oncogene C-crk	18,2	6	>20	8	18,2	14	>20	8
			>20	4	>20	10	>20	11	>20	10
GRAP2	075791	GRB2-related adapter protein 2	>20	22	>20	27	>20	30	>20	20
			>20	7	>20	25	>20	27	>20	35
NCK1	P16333	Cytoplasmic protein NCK1	>20	44	>20	36	>20	42	>20	36
			>20	63	>20	28	>20	38	>20	47
NCK2	O43639	Cytoplasmic protein NCK2	>20	24	>20	6	>20	16	>20	15
			>20	30	>20	10	>20	16	>20	24
PIK3R1	P27986	Phosphatidylinositol 3-kinase	10,5	24	11,1	8	8,3	8	>20	12
		regulatory subunit alpha	>20	38	12,0	7	10,2	9	5,4	14
PLCG1	P19174	1-phosphatidylinositol-4,5-	>20	107	>20	71	>20	80	>20	78
		bisphosphate phosphor- diesterase gamma-1	>20	123	>20	79	>20	59	>20	95
SLP76	Q13094	Lymphocyte cytosolic protein 2	12,7	101	>20	40	>20	47	18,9	55
			>20	106	>20	47	>20	47	>20	79
FER	P16591	Proto-oncogene tyrosine-	6,7	7	6,1	8	5,4	9	13,2	6
		protein kinase FER	16,8	12	17,8	10	6,4	9	14,9	16
RASA1	P20936	Ras GTPase-activating protein 1	11,0	6	>20	7	8,2	11	9,8	4
			>20	6	>20	7	>20	11	>20	11
CRKL	P46109	Crk-like protein	4,7	11	>20	5	>20	3	12,7	5
			>20	25	16,1	9	16,4	7	10,6	13

^a zuvor von Lange *et al.* publizierte Daten eines differenziellen SILAC-Peptid-*Pulldown* mit ADAP-595 (phosphoryliert gegen unphosphoryliert) mit SDS-PAGE Auftrennung gebundener Proteine. Nach tryptischer In-Gel Spaltung erfolgte die Identifizierung und Quantifizierung mittels nLC-MS/MS (Lange *et al.* 2010).

Für die Zusammenstellung der Bindungspartner wurden nur Proteine berücksichtigt, deren Isotopenverhältnis in zwei unabhängigen SILAC-*Pulldown*-Experimenten mit reverser Markierungsstrategie erhöht war und die mit mindestens 2 proteinspezifischen Peptiden identifiziert wurden. Proteinverhältnisse >20 wurden nicht genauer unterschieden, da ab diesem Bereich eine weitere Differenzierung aufgrund von Messungenauigkeiten oder Unterschieden in der Markierungseffizienz nicht sinnvoll wäre. Wie aus Tabelle 3-1 zu entnehmen ist, konnte für alle gewählten Proteomanalysen (GeLC-MS/MS, 2-D RP-RP LC-MS/MS mit 16, 24 und 36 Fraktionen) das gleiche Set aus potentiellen phosphorylierungsanhängigen Bindungspartnern von ADAP-595 identifiziert werden.

3.1.4 2-D RP-RP LC-MS/MS in Kombination mit ¹⁸O-Markierung

Da eine relative Quantifizierung basierend auf der stabilen Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur (SILAC) auf kultivierte Zellen beschränkt ist, wurde die entwickelte 2-D RP-RP LC-MS/MS Methode auch in Kombination mit einem alternativen Markierungsverfahren durchgeführt. Hierfür wurde das enzymatische Markierungsverfahren mit ¹⁸O-Wasser ausgewählt, da es sich um eine einfach durchzuführende, nahezu universell einsetzbare massenspektrometrische Quantifizierungsmethode handelt (vgl. Abschnitt 1.3.2). Die Anpassung der enzymatischen ¹⁸O-Markierung in Kombination mit der on-bead Spaltung wurde von Sabine Anker im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Das Ziel der Anpassung lag darin, den enzymkatalysierten Rücktausch von ¹⁸Omarkierten Peptiden in den nicht markierten Zustand zu unterdrücken. Dazu wurden verschiedene Strategien (Trypsininhibierung im pH-sauren Bereich, Variation des Enzym:Substratverhältnisses, Zugabe von Serinproteaseinhibitoren oder Hitzeinaktivierung des Trypsin) durchgeführt. Die Verwendung des Serinproteaseinhibitors 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (1 mM AEBSF, 30 min) sowie die irreversible thermische Inaktivierung (30 min, 95°C) des Trypsin führte dabei zu einer vollständigen Unterdrückung des Isotopenrücktauschs (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren ¹⁸O-Markierungsexperimente mit anschließender 2-D RP-RP LC wurde die thermische Trypsininaktivierung ausgewählt.

Die Methode des ¹⁸O-Markierungsverfahrens wurde ebenfalls mit dem gut charakterisierten Modellsystem ADAP in Form von Peptid-*Pulldown*-Experimenten validiert. Dazu wurden Tyr-595-phosphorylierte und entsprechende nicht phosphorylierte ADAP-Peptidmatrices mit Jurkat-T-Zelllysat (Abbildung 3-6) bzw. mit Primär-T-Zelllysat (Abbildung 3-7) inkubiert. Nach dem Auswaschen unspezifisch gebundener Proteine erfolgte die tryptische Spaltung *on-bead* in Gegenwart von ¹⁶O-Wasser bzw. ¹⁸O-Wasser. Dabei wurden die generierten Peptide aus *Pulldowns* mit unmodifiziertem ADAP-595 "leicht=¹⁶O" und Peptide aus *Pulldowns* mit phosphoryliertem ADAP-595 "schwer=¹⁸O" markiert (*et vice versa*). Nach Trypsininaktivierung erfolgte die Auftrennung und Analyse der vereinigten Peptidgemische mittels 2-D RP-RP LC MS/MS. Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte an einer 250 mm C18-Säule mit einem Fluss von 40 μ l/min und einem linearen Acetonitrilgradienten (5-50%) in 125 min in Gegenwart von 0,1% (v/v) TFA. Die zweite chromatographische Trennung sowie die massenspektrometrische Analyse erfolgten wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben.

In Abbildung 3-6 A sind die Anzahl der Peptididentifizierungen pro vereinigter Fraktion und die Überschneidungen identifizierter Peptide in benachbarten Fraktionen für differentielle ADAP-*Pulldown*-Experimente mit Jurkat-T-Zelllysat und ¹⁸O-Markierung dargestellt. Die Anzahl proteinspezifisch identifizierter Peptide (20440 Peptide) des 2-D RP-RP-Ansatzes in Kombination mit ¹⁸O-Markierung ist mit denen des SILAC-Ansatzes (21302 Peptide, Abschnitt 3.1.3) vergleichbar. Die Anzahl der Peptididentifizierungen ist über alle vereinigten Fraktionen gleichmäßig verteilt und beträgt im Durchschnitt 770 Peptide, wobei 74% aller Peptide lediglich in einer Fraktion identifiziert wurden (Kreisdiagramm Abbildung 3-6 A, ebenfalls vergleichbar mit den SILAC-*Pulldown* Ergebnissen).



Abbildung 3-6: ¹⁸**O-basierte ADAP-***Pulldown*-Experimente mit Jurkat T-Zellen. (A) Gemittelte Anzahl identifizierter Peptide nach tryptischer *on-bead* Spaltung in Kombination mit ¹⁸O-Markierung (unmodifiziert vs. phosphoryliert, n=2). Die Auftrennung erfolgte zyklusweise in 36 Fraktionen (250 mm-C18-Säule, linearer Acetonitrilgradienten von 5-50% in 125 min). Die Überschneidung von Peptididentifizierungen in benachbarten Fraktionen ist als Kreisdiagramm dargestellt. (B) Gegenüberstellung der Proteinverhältnisse aus zwei unabhängigen *Pulldown*-Experimenten. Ein Punkt repräsentiert ein identifiziertes Protein mit mindestens zwei quantifizierten Peptiden.

Die Quantifizierung der gebundenen Proteine erfolgte mittels Datenanalyse über die Mascot Distiller *Quantitation Toolbox* (Version 2.4.2.0). Die ¹⁸O-Quantifizierungsmethode beruht auf dem Einbau von "leichten=¹⁶O" und "schweren=¹⁸O" Sauerstoffisotopen in die Carboxylgruppe während der tryptischen Spaltung. Der Einbau kann einfach, d.h. nur ein Sauerstoff wird substituiert und doppelt, d.h. beide Sauerstoffe werden substituiert, erfolgen. Der einfache ¹⁸O-Einbau führt zu einer Massendifferenz von 2 Da gegenüber dem "leicht" markierten Peptid, der doppelte ¹⁸O-Einbau bewirkt eine Massendifferenz von 4 Da. Für die Quantifizierung werden die Intensitäten beider Signale (+2 Da und +4 Da) summiert und das natürliche, sich überlagernde Isotopenmuster abgezogen. ¹⁸O-Markierungsexperimente wurden doppelt unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie durchgeführt. Die Berechnung der Proteinverhältnisse erfolgte auf Basis von mindestens zwei quantifizierten Peptiden, die die in Abschnitt 2.9.3 festgelegten Kriterien erfüllten. Die Gegenüberstellung von Proteinverhältnissen aus zwei unabhängigen ¹⁸O-basierten ADAP-Pulldown-Experimenten mit Jurkat-T-Zelllysat ist in Abbildung 3-6 B dargestellt. Für die Gegenüberstellung wurden nur Proteine berücksichtigt, die in beiden Experimenten mit mindestens 2 proteinspezifischen Peptiden identifiziert wurden (insgesamt 1500 Proteine). Potentielle phosphorylierungsspezifische Bindungspartner mussten in beiden Experimenten ein erhöhtes Isotopenverhältnis aufweisen (oberer rechter Quadrant). Analog zu Abschnitt 3.1.3 wurden Proteinverhältnisse >20 nicht genauer unterschieden. Man erhält eine enge Normalverteilung der Proteinverhältnisse um den Wert 1, was bedeutet, dass die Mehrheit aller identifizierten und quantifizierten Proteine in gleichem Maß an die unmodifizierte und phosphorylierte ADAP-Sequenz bindet. Im Vergleich zu Pulldown-Experimenten mit SILAC werden mittels ¹⁸O-Markierung für Jurkat-Zellen, mit Ausnahme von PIK3R1 und CRKL, die gleichen phosphorylierungsspezifischen Bindungspartner an ADAP-595 nachgewiesen (zusammengefasst in Tabelle 3-2).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass das ¹⁸O-Markierungsverfahren in Kombination mit 2-D RP-RP LC-MS/MS eine gute Alternative zu SILAC-basierten *Pulldown*-Experimenten bietet. Der große Vorteil der ¹⁸O-Markierung ist, dass sie nicht auf kultivierte Zellen beschränkt ist, sondern auch für die proteomische Analyse von Primärzellen oder Geweben eingesetzt werden kann. Um dies zu demonstrieren, wurden analog zu den beschriebenen ADAP-*Pulldown*-Experimenten, Experimente mit T-Zelllysat aus Primärzellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Quantifizierung dieser Experimente sind in Abbildung 3-7 für einen ¹⁸O-basierten ADAP-595 *Pulldown* dargestellt. Verglichen mit den beschriebenen ¹⁸O-*Pulldowns* in Jurkat-Zelllysat, beträgt die Anzahl der Peptid- und Proteinidentifizierungen, unter sonst gleichen Bedingungen (gleiche eingesetzte Zellmenge, gleiche *Pulldown* Bedingungen, gleiche Fraktionierungsparameter), ungefähr ein Drittel (6526 proteinspezifische Peptide, 575 Proteine). Diese Tendenz wurde auch schon von Mitarbeitern des Instituts für Molekulare und Klinische Immunologie der Universität Magdeburg festgestellt und wird auf die unterschiedliche Größe von primären- und Jurkat-T-Zellen zurückgeführt (Persönliche Mitteilung von Dr. Stefanie Kliche).

Trägt man die Anzahl quantifizierter Peptide (Mascot Distiller 2.4.2.0) gegen das Proteinverhältnis (log₂) auf (Abbildung 3-7 A) so erhält man eine Normalverteilung aller quantifizierten Hintergrundproteine um 1 (log₂=0). Dabei kann man erkennen, dass die Streuung um den Wert 1 umso größer ist, je weniger Peptide quantifiziert wurden. Potentielle phosphorylierungsspezifische Bindungspartner an ADAP-595 zeigen ein hohes ¹⁸O/¹⁶O-Verhältnis (bzw. ¹⁶O/¹⁸O-Verhältnis für das reverse Experiment).In Abbildung 3-7 B sind die Verhältnisse aller Proteine aus zwei voneinander unabhängigen, reversen Experimenten gegenübergestellt. Dabei wurden die gleichen Kriterien wie für Jurkat-T-Zellen verwendet.



Abbildung 3-7: ¹⁸O-basierte ADAP-*Pulldown*-Experimente mit primären T-Zellen. (A) Streudiagramme zweier unabhängiger ADAP-*Pulldown*-Experimente (unmodifiziert gegen modifiziert). Aufgetragen ist die Anzahl quantifizierter Peptide (^aMascot Distiller 2.4.2.0) gegen das Proteinverhältnis. (B) Reproduzierbarkeit zweier ¹⁸O-*Pulldown*-Experimente, Gegenüberstellung der Proteinverhältnisse aus Experiment 1 und 2. Ein Punkt repräsentiert ein identifiziertes Protein mit mindestens zwei quantifizierten Peptiden.

Tabelle 3-2 enthält die Zusammenfassung der mittels 2-D RP-RP LC-MS/MS in Kombination mit ¹⁸O-Markierung bestimmten potentiellen Bindungspartner an phosphorylierte ADAP-595-Peptide für Jurkat- und Primär-T-Zelllysat. Aus der Tabelle lässt sich erkennen, dass obwohl die Anzahl quantifizierter Proteine für Primärzell-*Pulldowns* nur ungefähr 1/3 von denen aus Jurkat-T-Zell-*Pulldowns* beträgt, ein großer Teil der potentiellen phosphorylierungsspezifischen ADAP-595 Bindungspartnern in beiden Ansätzen bestätigt wurden. Die Proteine GRAP2, NCK1, NCK2, PLCG1,

Ergebnisse

SLP76 konnten in beiden Ansätzen phosphorylierungsspezifisch gebunden identifiziert werden. CRK und RASA1 konnten nur in jeweils einem der beiden Ansätze eindeutig angereichert nachgewiesen werden, während im anderen Ansatz jeweils nur ein Peptid quantifiziert wurde. Die Proteine PIK3R1, CRKL und GRB2 wurden in Primärzellen eindeutig als phosphorylierungsabhängige Bindungspartner an ADAP-595 identifiziert.

Tabelle 3-2: Phosphorylierungsspezifische Interaktionspartner an ADAP-595-Peptide. Die Anreicherungsverhältnisse eines 2-D RP-RP LC-Ansatzes mit 36 Fraktionen wurden mittels ¹⁸O-Markierung im reversen Doppelversuch für Jurkat-Zellen und primäre T-Zellen vergleichend bestimmt. Die Anzahl quantifizierter Peptide wurde aus dem Mascot Distiller Proteinreport übernommen.

		2-D RP-RP LC-MS/MS					
		Proteinbeschreibung	Jurkat-Zellen		Primă	Primärzellen	
Gen- name	UniProtKB acc. Nr.	Proteinname	Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)	
CRK	P46108	Proto-oncogene C-crk	>20	5	>20	1	
			8,2	3	4,9	1	
GRAP2	075791	GRB2-related adapter protein 2	7,8	12	>20	22	
			8,3	16	>20	36	
NCK1	P16333	Cytoplasmic protein NCK1	>20	17	>20	24	
			18,8	26	>20	29	
NCK2	043639	Cytoplasmic protein NCK2	>20	9	>20	14	
			9,3	19	>20	21	
PIK3R1	P27986	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	0,9	4	5,4	3	
			1,4	7	5,3	2	
PLCG1	P19174	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphordiesterase	>20	8	>20	25	
		gamma-1	4,4	14	>20	46	
SLP76	Q13094	Lymphocyte cytosolic protein 2	14,5	19	>20	87	
			5,6	32	>20	115	
FER	P16591	Proto-oncogene tyrosine-protein kingse FER	3,8	2	n.d.	-	
			6,9	5	n.d.	-	
RASA1	P20936	Ras GTPase-activatina protein 1	3.0	1	4.2	2	
-		5,	6.1	2	>20	5	
CRKL	P46109	Crk-like protein	1.7	2	16.6	3	
			9.6	2	>20	5	
			0.9	8	3.4	5	
GRB2	P62993	Growth factor receptor bound protein	1,1	14	3,1	2	

Kursiv: Proteinverhältnisse aus lediglich einem quantifizierten Peptid, n.d.: nicht detektiert

In Primärzellen wurden mittels ¹⁸O-Markierung und 2-D RP-RP LC-MS/MS Analyse insgesamt 10 phosphorylierungsspezifische Bindungspartner an ADAP-595 identifiziert. Die phosphorylierungsabhängige Bindung von neun dieser Proteine wurde zuvor schon in Jurkat-T-Zellen mittels SILAC nachgewiesen (Abschnitt 3.1.3). Das Protein FER wurde in Primärzellen unter den gewählten Bedingungen nicht identifiziert. GRB2 wurde zusätzlich zu den bereits publizierten phosphorylierungsabhängigen Bindern an ADAP-595 in Primärzellen nachgewiesen. Die *Pulldown*-Experimente mit Tyrosin-595-phosphorylierten Peptidsequenzen des Adapterproteins ADAP zeigen, dass die entwickelte 2-D RP-RP LC-MS/MS Methodik eine einfache, robuste und reproduzierbare Alternative zur klassischen, gelbasierten Proteomanalyse ist, die auch für alternative Markierungsverfahren zugänglich ist.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die neue Methodik für die proteomweite Analyse und Identifizierung acetylierungsabhängiger Bindungspartner von Histon H4 eingesetzt werden. Dazu sollte eine Bibliothek bestehend aus verschieden acetylierten Peptiden des N-terminalen Bereichs von Histon H4 synthetisiert und als Matrix-gebundene Köder in SILAC-basierten Peptid-*Pulldown*-Experimenten eingesetzt werden.

3.2 Synthese und Immobilisierung von H4 Peptiden

Nicht modifizierte, phosphorylierte und acetylierte Peptide des N-terminalen Bereichs von Histon H4 (AS 1-25 plus C-terminaler Aminohexansäurelinker und Cystein) wurden mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisiert (vgl. Abschnitt 2.6.1). Die Rohpeptide wurden über präparative HPLC gereinigt und ihre Reinheit mittels analytischer HPLC und MALDI-Massenspektrometrie überprüft (Tabelle 3-3 und Abbildung 3-8).

Die isolierte Ausbeute nach präparativer HPLC lag zwischen 30 und 50%, wobei alle synthetisierten Peptide eine Reinheit von mindestens 93% aufwiesen (Tabelle 3-3).

Bozoichnung	Dentideenuen	Synthese-	A	Reinheit
Bezeichnung	reptiosequenz	maßstab	Ausbeule	anal. HPLC
H4-no Ac	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKILRDN-Ahx-C	50 µM	55%	93%
Н4-К5Ас	SGRG K⁵ac GGKGLGKGGAKRHRKILRDN-Ahx-C	50 µM	39%	98%
Н4-К8Ас	SGRGKGG K⁸ac GLGKGGAKRHRKILRDN-Ahx-C	50 µM	50%	98%
H4-K12Ac	SGRGKGGKGLG K¹²ac GGAKRHRKILRDN-Ahx-C	50 µM	32%	99%
H4-K16Ac	SGRGKGGKGLGKGGA K¹⁶ac RHRKILRDN-Ahx-C	25 μΜ	51%	99%
H4-K5/12Ac	SGRG K⁵ac GGKGLG K¹²ac GGAKRHRKILRDN-Ahx-C	50 μM	34%	98%
H4-all Ac	SGRG K⁵ac GG K⁸ac GLG K¹²ac GGA K¹⁶ac RHRKILRDN-Ahx-C	50 µM	49%	97%
H4-S1p	S¹p GRGKGGKGLGKGGAKRHRKILRDN-Ahx-C	25 μΜ	38%	98%

Tabelle 3-3: Übersicht synthetisierter Histon H4-Peptide.

* isolierte Peptidausbeute nach präparativer HPLC



Abbildung 3-8: HPLC-Chromatogramme und MALDI-MS Spektren synthetisierter H4-Peptide. Synthetisierte Histon H4-Peptidsequenzen wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die Reinheit der Elutionsfraktionen wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-MS überprüft. Die HPLC-Chromatogramme und MALDI-MS Spektren sind exemplarisch für (A) nicht acetyliertes H4 und (B) vierfach acetyliertes H4 dargestellt.

Alle synthetisierten Peptidsequenzen beinhalten ein C-terminal gelegenes Cystein, über dessen Thiolgruppe eine kovalente Immobilisierung der Peptide an eine Iodoacetyl-funktionalisierte Agarosematrix erfolgt (SulfoLink[®] *Coupling Resin*, vgl. Abschnitt 2.6.3). Die C-terminale Immobilisierung der Histon H4-Peptide wurde gewählt, weil dies auch der natürlichen Nukleosomenorientierung entspricht. Das Prinzip der kovalenten Immobilisierung der H4-Peptide an die Agarosematrix ist in Abbildung 3-9 schematisch dargestellt. Nach der Immobilisierung wurde die Peptidbeladung der Agarosematrix für unmodifiziertes und vierfach acetyliertes H4-Peptid mittels Aminosäureanalyse bestimmt (Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach). Die Beladung der Peptide lag bei 16,34±3,06 nmol/mg für die Agarosematrix mit unmodifiziertem H4-Peptid (H4-noAc) und bei 16,86±2,23 nmol/mg für die mit vierfach acetyliertem H4-Peptid beladene Agarose. Die Standardabweichungen beziehen sich auf die Abweichungen der einzelnen Aminosäurewerte. Pro Pulldown-Experiment werden ca. 0.5 mg (20 µl Suspension) der Agarosematrices mit dementsprechend ca. 8 nmol gebundenem Peptid eingesetzt.



Abbildung 3-9: Kopplungsschema für die kovalente Immobilisierung von Cys-Peptiden an Iodoacetyl-funktionalisierte Agarose.

3.3 Interaktion der Gcn5-Bromodomäne mit acetylierten H4-Peptiden

Interaktionsstudien zur Identifizierung acetylierungsabhängiger Bindeproteine an Histon H4 wurden mit Peptidsequenzen der N-terminalen H4-Sequenz in HeLa-S3 Kernextrakten durchgeführt. Dazu wurden die Peptide C-terminal an Agarose immobilisiert und differenzielle *Pulldown*-Experimente durchgeführt. Zur Validierung der eingesetzten Methode wurde im ersten Schritt zunächst die Interaktion bekannter acetylierungsabhängiger Bindungspartner (Bromodomänen-enthaltene Proteine) mit den Peptidkonstrukten untersucht. Dafür wurde die His-*getagte* Bromodomäne der Histonacetyltransferase Gcn5 (AS 325-421, UniProtKB/Swiss-Prot Q03330) rekombinant exprimiert und gereinigt. Die Bindungsaktivität der Gcn5-Bromodomäne an acetylierte H4-Peptide wurde zunächst mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (10-50 µM) in Anwesenheit von 500 µM BSA untersucht. Der große Überschuss an BSA sollte die Bindung der Bromodomäne in Gegenwart von unspezifisch bindenden Proteinen simulieren.



Abbildung 3-10: Interaktionsstudien der Gcn5-Bromodomäne mit immobilisierten, acetylierten H4-Peptiden. Immobilisierte H4-Peptide wurden mit rekombinanter Gnc5-Bromodomäne (hier dargestellt 50 μM) in Anwesenheit von 500 μM BSA inkubiert. Eluierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE (18%) aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Ac=acetyliertes Lysin, BRD=Bromodomäne.

Abbildung 3-10 stellt die Bindung der Gcn5-Bromodomäne in Abhängigkeit von der Acetylierungsposition dar. Während das unspezifisch bindende Protein (BSA) ein ähnliches Bindungsverhalten an allen Peptidkonstrukten zeigt, kann man für die Gcn5-Bromodomäne leichte Abstufungen im Bindungsverhalten (unterschiedliche Bandenintensitäten) erkennen. Unter *Pulldown*-Bedingungen bindet die Gcn5-Bromodomäne am stärksten an das Lysin-12 acetylierte H4-Peptid, etwas weniger stark an das vierfach acetylierte (K5/8/12/16) H4-Peptid. Für K5Ac, K8Ac und K16Ac H4-Peptidmatrices ist das Bindungsverhalten (Bandenintensitäten) der Gcn5-Bromodomäne nahezu gleich. Die Bindung der Gcn5-Bromodomäne an nicht acetyliertes H4-Peptid ist nur sehr schwach. Das heißt,

Ergebnisse

dass die Bindung der Gcn5-Bromodomäne an verschiedene H4-Peptide acetylierungungsabhängig ist, wobei scheinbar bestimmte Acetylierungspositionen leicht bevorzugt sind. Um diese Beobachtung quantitativ zu untersuchen, wurden NMR-Titrationsexperimente zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten durchgeführt. Dazu wurde die Gcn5-Bromodomäne zunächst ¹⁵N,¹³C- oder ¹⁵N-markiert rekombinant exprimiert und über den His-Fusionsanteil gereinigt. Die doppelt isotopenmarkierte Variante des Proteins wurde zur Zuordnung der NMR-Peaks zu den einzelnen Aminosäuren der Gcn5-Bromodomäne (Assignment) vermessen. Diese Arbeiten wurden von Dr. Sylvain Tourel (Arbeitsgruppe In-Cell NMR, FMP Berlin) durchgeführt. Die Bindungsaffinitäten wurden mit 350 μM¹⁵Nmarkierter Gcn5-Bromodomäne NMR-spektroskopisch bestimmt, indem die chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$) von *Backbone*-Amidresonanzen (¹H/¹⁵N) bei unterschiedlichen H4-Peptid-Titration von Ligandenkonzentrationen (acetyliert, 0-3 mM) in 2D-Korrelationsspektren (heteronuclear single quantum coherence, HSQC) gemessen wurden.



Abbildung 3-11: ¹H-¹⁵N-Korrelationsspektrum der ¹⁵N-markierten Gcn5-Bromodomäne und Einfluss vierfach acetylierter H4-Peptide auf die chemische Verschiebung von an der Bindung beteiligten Amidresonanzen. Übersichtspektrum der ungebundenen ¹⁵N-markierten Gcn5-Bromodomäne (Links). Jeder Peak im Spektrum repräsentiert eine Amidresonanz (N-H Bindung). Durch Titration eines vierfach acetylierten H4-Peptids (steigende Konzentration: 0 μ M (schwarz), 75 μ M (rot), 150 μ M (blau), 225 μ M (ocker), 300 μ M (grün), 600 μ M (gelb), 1,5 mM (violett)) kommt es zur Verschiebung der Resonanzen (chemical shift changes, ($\Delta\delta$)) der an der Bindung beteiligten Aminosäuren (Rechts).

Die Veränderung der Amidresonanzen der ¹⁵N-Gcn5-Bromodomäne ist in Abbildung 3-11 dargestellt. Während sich manche Amidresonanzen mit steigender Peptidkonzentration immer weiter verschieben (z.B. E41, D45, N89), bleiben andere (z.B. K70, T23, A16, R11) unbeeinflusst. Man kann erkennen, dass sich die Resonanzen hinsichtlich ihrer Intensität oder Auflösung mit zunehmender Peptidkonzentration nicht signifikant ändern. Lediglich die chemische Verschiebung verändert sich kontinuierlich mit der Erhöhung der Peptidkonzentration. Aufgrund dieser Beobachtung spricht man von einem schnellen Austausch (*fast exchange*) zwischen gebundenem und nicht gebundenem Zustand (Cavanagh *et al.* 2007). Die Änderung der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$) wird durch die Änderung der ¹H^N- und ¹⁵N Resonanzen aufgrund der Bildung des Protein-Peptidkomplexes nach Gleichung 2 berechnet:

$$\Delta \boldsymbol{\delta} = \left[\Delta \boldsymbol{\delta}_{H^N}^2 + (0.1 \cdot \Delta \boldsymbol{\delta}_N)^2 \right]^{1/2}$$

Gleichung 2: Berechnung der Änderung der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ $\Delta\delta_{H}^{N}$ =Änderung der chemischen Verschiebung der ¹H^N-Resonanz $\Delta\delta_{N}$ =Änderung der chemischen Verschiebung der ¹⁵N-Resonanz

Die Änderungen der Aminosäureresonanzen der Gcn5-Bromodomäne in Anwesenheit von Peptid sind in Abbildung 3-12 exemplarisch für K12-acetyliertes und nicht acetyliertes H4-Peptid (je 3 mM) dargestellt.



Abbildung 3-12: Änderung der chemischen Verschiebung der Gcn5-Amidresonanzen durch Bindung von H4-K12Ac. (A) Berechnete Änderungen der chemischen Verschiebung der Gcn5-Aminosäureresonanzen durch die Bindung von nicht acetyliertem H4-Peptid (schwarz) und K12-acetyliertem H4-Peptid (grau). Für Proline wurde $\Delta\delta$ =0,01 gesetzt, da keine Resonanzen bestimmt werden können. (B) Änderung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration (H4-K12Ac) exemplarisch für drei Aminosäuren. (C) Änderungen der Aminosäureresonanzen übertragen auf die Oberflächenstruktur der Gcn5-Bromodomäne für Titration mit nicht acetyliertem H4-Peptid (C.1) und K12-acetyliertem H4-Peptid (C.2). Rot= starke Änderung der chemischen Verschiebung, Grün: Prolin.

Ergebnisse

Durch Titration des nicht acetylierten H4-Peptids ändern sich die chemischen Verschiebungen kaum. Im Gegensatz dazu erhält man hohe chemische Verschiebungen im Bereich der Aminosäuren 35-55 und 85-95 durch Zugabe von K12-acetyliertem H4-Peptid. Überträgt man diese chemischen Verschiebungen auf die Gcn5-Bromodomänenstruktur, erhält man die stärksten Strukturveränderungen im Bereich der Bindungstasche (Abbildung 3-12 C).

Die Bindungsaffinitäten wurden nach Cavanagh *et al.* 2007 berechnet und sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Die mit NMR-Titrationsexperimenten bestimmten Bindungsaffinitäten bestätigen eine acetylierungsabhängige Bindung der Gcn5-Bromodomäne an Histon H4-Peptide. Analog zu den durchgeführten *Pulldown*-Experimenten (vgl. Abbildung 3-10) bindet das Protein am stärksten an K12-acetyliertes H4-Peptid (K_D-Wert: 81 μ M), gefolgt von vierfach- und K16-acetyliertem H4-Peptid (K_D-Werte: 167 μ M und 174 μ M). Die schwächste Bindung findet an H4-K5Ac statt (K_D-Wert: 377 μ M). Die Titration des nicht acetylierten H4-Peptids führt kaum zu Resonanzverschiebungen, die Bindungsaffinität beträgt >1 mM. Im Vergleich zu Chromodomänen, die K_D Werte von 0,5-10 μ M aufweisen (Hughes *et al.* 2007; Schalch *et al.* 2009), sind die Affinitäten der meisten Bromodomänen um 1-2 Größenordnungen geringer.

Tabelle 3-4: Mit NMR-Spektroskopie ermittelte Affinitäten für die Bindung von acetylierten H4-Peptiden an die Gcn5-Bromodomäne.

H4-Peptid	noAc	K5Ac	K8Ac	K12Ac	K16Ac	allAc
K _D -Wert	>1 mM	377 μM	263 µM	81 µM	174 µM	167 μM

3.4 Identifizierung von modifizierungsabhängigen H4-Interaktionspartnern

Für die Identifizierung neuer, potentieller modifizierungsabhängiger Interaktionspartner von Histon H4 wurden *Pulldown*-Experimente in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt. Die dafür verwendete Strategie ist in Abbildung 3-13 dargestellt.

Nicht modifizierte, phosphorylierte und acetylierte H4-Peptide wurden mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisiert, über präparative HPLC aufgereinigt und kovalent an eine Agarosematrix immobilisiert (vgl. Abschnitt 3.2). Differenzielle *Pulldown*-Experimente (modifiziert gegen nicht modifiziert) wurden mit isotopenmarkierten HeLa-S3 Kernextrakten (SILAC) durchgeführt. Die Identifizierung modifizierungsabhängiger Bindungspartner erfolgte nach Auswaschen unspezifisch gebundener Proteine mit zwei verschiedenen proteomischen Ansätzen (GeLC-MS und 2-D LC-MS). Für den GeLC-MS Ansatz liegt der Separationsaufwand vor der massenspektrometrischen Analyse auf Proteinebene. Dazu wurden gebundene Proteine zunächst eluiert, Proteinfraktionen von unmodifizierten und modifizierten Peptidmatrices vereinigt ("leicht" und "schwer") und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach tryptischer In-Gel Spaltung erfolgte die Peptidtrennung und -analyse mittels nLC-MS/MS an einem LTQ-Orbitrap XL. Im Gegensatz dazu basiert der 2-D LC-MS Ansatz auf der Separation komplexer Peptidgemische mittels zweistufiger chromatographischer Auftrennung. Dazu wurden die Peptid-beladenen Agarosen nach dem *Pulldown* und den Waschschritten 1:1 gemischt und gebundene Proteine direkt auf der Agarosematrix (*on-bead*) tryptisch gespalten. Komplexe Peptidgemische wurden zunächst mittels microLC aufgetrennt und anschließend mittels nLC-MS/MS analysiert und identifiziert (vgl. Abschnitt 3.1).



Abbildung 3-13: Prinzip der SILAC-basierten Peptid-Pulldown-Experimente. Nach der Inkubation immobilisierter H4-Peptide mit SILAC- markiertem HeLa-S3 Kernextrakt (NucEx), erfolgte die Identifizierung von Bindungspartnern entweder nach SDS-PAGE Auftrennung der Proteine und anschließender In-Gel Spaltung (GeLC-MS Ansatz) oder nach tryptischer *onbead* Spaltung kombiniert mit 2-dimensionaler Peptidauftrennung (2-D RP-RP LC-MS Ansatz). nLC-MS/MS Analysen wurden an einem LTQ-Orbitrap XL durchgeführt, Identifizierungen und Quantifizierungen erfolgten mit der MaxQuant Software. Die Experimente wurden unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie oder als biologisches Replikat durchgeführt.

Um mögliche Variabilitäten in der Kernextraktpräparation bzw. Kontaminationen auszugleichen, wurden alle Peptid-*Pulldown*-Experimente unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie (Überkreuzexperimente) bzw. als biologisches Replikat durchgeführt. Aufgrund dieser Vorgehensweise ergeben sich für jedes Peptidkonjugat mindestens zwei unabhängige *Pulldown*-Experimente. Durch den Einbau der isotopenmarkierten Aminosäuren Lysin und Arginin kommt es im MS-Spektrum zu einer charakteristischen Massenverschiebung zwischen "leicht" und "schwer" markierten Peptiden. Die Differenzierung zwischen modifizierungsabhängigen Bindungspartnern und

unspezifisch, z.B. an die Agarose, bindenden Proteinen erfolgt über das Isotopenverhältnis (schwer/leicht, bzw. heavy/light, H/L) der Peptide. Proteine, die unabhängig von der Modifizierung an die Peptidmatrices binden, weisen ein Isotopenverhältnis um 1 auf (vgl. Abbildung 3-14 D). Tryptische Peptide von modifizierungsabhängigen Bindungspartnern der Peptidsequenz zeichnen sich hingegen durch hohe Isotopenverhältnisse aus (vgl. Abbildung 3-14 A-C). Für die durchgeführten Peptid-*Pulldown*-Experimente wurden Proteine dann als potentielle, modifizierungsabhängige Bindungspartner betrachtet, wenn diese Proteine a.) mit mindestens 2 proteinspezifischen (unique) Peptiden identifiziert wurden und b.) das Isotopenverhältnis in zwei unabhängigen Experimenten mindestens 2 aufwies. Darüber hinaus mussten diese Kriterien mit beiden proteomischen Ansätzen (GeLC-MS und 2-D RP-RP LC-MS) erfüllt werden bzw. durften sich die Isotopenverhältnisse beider Methoden nicht widersprechen.





3.4.1 Peptid-Pulldown-Experimente mit tetraacetylierten H4-Peptiden

Zunächst wurden Bindungsstudien mit vierfach acetyliertem Peptid (Lysinacetylierung an Position 5, 8, 12 und 16) gegen nicht acetyliertes Peptid mit der in Abbildung 3-13 dargestellten Vorgehensweise durchgeführt. Die verwendeten Kernextrakte wurden aus fermentierten HeLa-S3 Zellen präpariert (Forschungsgruppe Massenspektrometrie und Chromatin Biochemie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen). Für die stabile Isotopenmarkierung in Zellkultur wurde ²H₄-Lys und ¹³C₆-Arg verwendet, was zu einer Massendifferenz von 4 Da oder 6 Da für tryptische Peptide führt (siehe Abbildung 3-14). Nach Inkubation der Peptidkonstrukte mit HeLa-S3 Kernextrakten ("leicht" nicht acetyliert und "schwer" vierfach acetyliert, et vice versa) wurde entweder nach dem GeLC-MS Ansatz oder nach dem 2-D RP-RP Ansatz vorgegangen. Für den GeLC-Ansatz wurden die vereinigten Elutionsfraktionen unmodifizierter und modifizierter Peptidmatrices mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gelspuren nach Sichtbarmachen der Proteine (Coomassie-Färbung) in jeweils 40 Fragmente geschnitten. Die Proteine wurden wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben im Gel tryptisch gespalten. Daraus ergaben sich für jedes SILAC Doppelexperiment zwei Gelspuren (Abbildung 3-15 A) und insgesamt 80 nanoLC-MS Proben. Für den 2-D RP-RP Ansatz wurden die Peptidgemische nach tryptischer on-bead Spaltung mittels microLC an einer PLRP-S Säule in 24 vereinigte Fraktionen aufgetrennt (vgl. Abschnitt 3.1). Für jedes SILAC Doppelexperiment ergaben sich somit 48 nanoLC-MS Proben. Die Chromatogramme der PLRP-S Auftrennung sind für zwei unabhängige Pulldown-Experimente in Abbildung 3-15 B dargestellt.



Abbildung 3-15: SILAC-Pulldown-Experimente mit H4-noAc gegen H4-4Ac. (A) Auftrennung gebundener Proteine über SDS-PAGE und (B) Trennung komplexer Peptidgemische über microLC. Experiment 1 und 2 kennzeichnen zwei unabhängige *Pulldown*-Experimente unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie.

Die Analyse und Identifizierung von Bindungsproteinen erfolgte mittels nanoLC-LTQ-Orbitrap-MS Messung und MaxQuant Auswertung (Version 1.1.1.36). Nur Proteine mit mindestens 2 proteinspezifischen (*unique*) Peptiden galten als sicher identifiziert und gingen in die weiteren Betrachtungen ein. Für GeLC-MS Experimente wurden so im ersten Experiment 2241 Proteine, denen

Ergebnisse

28562 proteinspezifische Peptide zugeordnet wurden, identifiziert und quantifiziert, im zweiten Experiment 2181 Proteine mit 26696 proteinspezifischen Peptiden. Die Überlappung der Proteinidentifizierungen zwischen beiden Experimenten ist sehr hoch und beträgt ca. 90% (2007 Proteine, Abbildung 3-16 Venn-Diagramm A). Mittels 2-D RP-RP LC-MS liegt die Anzahl der Identifizierungen und Quantifizierungen mit 1600 Proteinen (14989 proteinspezifischen Peptiden) im ersten Experiment und 1520 Proteinen und 15172 proteinspezifischen Peptiden im zweiten Experiment etwas tiefer als beim GeLC-MS Ansatz. Die Überlappung der Proteinidentifizierungen liegt bei 1389 Proteinen (ca. 90%) und ist somit vergleichbar gut wie beim GeLC-MS Ansatz (Venn-Diagramm Abbildung 3-16 B). Für die Bestimmung potentieller acetylierungsabhängiger Bindungspartner an H4 wurden nur Proteine betrachtet, die im Doppelexperiment identifiziert und quantifiziert wurden. Die Gegenüberstellung der Proteinverhältnisse aus Experiment 1 (x-Achse) und Experiment 2 (y-Achse) ist in Abbildung 3-16 in Form von Streudiagrammen für den GeLC-MS-basierten und 2-D RP-RP LC-MS-basierten Ansatz dargestellt.





Proteine, die bevorzugt an das acetylierte Peptid binden (angereichert werden), zeigen hohe Isotopenverhältnisse in beiden Experimenten und befinden sich im oberen rechten Quadranten. Im Gegensatz dazu befinden sich Proteine, die aufgrund der Acetylierung nicht mehr an das Peptid binden können (abgereichert werden), wegen ihrer geringen Isotopenverhältnisse in beiden Experimenten im unteren linken Quadranten. Hintergrundproteine weisen ein 1:1 Verhältnis auf und befinden sich um den Schnittpunkt der x- und y-Achse. Ausreißer im oberen linken Quadranten kennzeichnen Kontaminationen (z.B. Keratin oder andere unmarkierte Hintergrundproteine). Falschpositiv quantifizierte Bindungspartner liegen im unteren rechten Quadranten.

Die Verteilung für Pulldown-Experimente mit nicht modifiziertem und vierfach acetyliertem H4-Peptid ist stark in Richtung des unteren linken Quadranten verschoben. Das bedeutet, dass der Großteil der Proteine nur an das nicht modifizierte Referenzpeptid bindet. Dieses Ergebnis stimmt für beide Methoden überein. Proteine wurden nur dann als "abgereichert" bezeichnet, wenn sie in beiden Experimenten ein Isotopenverhältnis von <0,5 aufwiesen (GeLC-MS: 1106 Proteine, 2-D RP-RP LC-MS: 893 Proteine). Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden mit beiden Methoden übereinstimmend 736 abgereicherte Proteine identifiziert, auf die im Folgenden jedoch nicht näher eingegangen wird. Neben wenigen Kontaminationen und falsch-positiv quantifizierten Proteinen, sind im oberen rechten Quadranten acetylierungsspezifisch bindende Proteine identifiziert und quantifiziert worden. Als potentielle Bindungspartner an vierfach acetylierte H4-Peptide wurden nur Proteine berücksichtigt, die in beiden Experimenten ein Isotopenverhältnis von >2 aufwiesen. Für GeLC-MS Experimente erfüllten 39 Proteine dieses Kriterium, für 2-D RP-RP LC-MS Experimente wiesen 30 Proteine Isotopenverhältnisse >2 in beiden Experimenten auf. In die weiteren Betrachtungen gingen nur Proteine ein, die mit beiden Methoden übereinstimmend angereichert wurden bzw. deren Isotopenverhältnisse sich mit beiden Methoden nicht wiedersprachen. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien erhält man 29 potentielle acetylierungsspezifische Bindungspartner an vierfach acetyliertem Histon H4 (Tabelle 3-5).

Als potentielle Bindungspartner konnten unter anderem TAF4, TAF5, TAF6 und TAF8 als Untereinheiten des Transkriptionsfaktors IID (TFIID) angereichert werden. Darüber hinaus wurden die tRNA-Methyltransferasen TRMT61A und TRMT6, zwei Untereinheiten des Spleißfaktors U2AF (U2AF1, U2AF1) sowie verschiedene Varianten des Histons H1 (H1.3, H1.2, H1.x) acetylierungsspezifisch identifiziert.

Ergebnisse

Tabelle 3-5: Potentielle Bindungspartner an vierfach acetylierte Histon H4 Peptide. Die Anreicherungsverhältnisse eines GeLC-MS basierten Ansatzes sowie 2-D RP-RP LC-Ansatzes wurden mit SILAC unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie doppelt bestimmt. Es sind nur Proteine aufgelistet, die im Doppelexperiment mit mindestens zwei proteinspezifischen Peptiden identifiziert wurden, ein Isotopenverhältnis >2 aufweisen und in beiden Methoden übereinstimmen bzw. sich nicht widersprechen (z.B. mit einer Methode nicht detektiert).

Sense UniProt Research Nr.ProteinnameVer hiltsiPeptide hiltsiVer hiltsiPeptide hiltsiVer hiltsiPeptide hiltsiTAF5C15542Transcription initiation factor TFIID subunit 54,514,82TAF6B4D111Transcription initiation factor TFIID subunit 63,98.86,43TAF6B4D111Transcription initiation factor TFIID subunit 83,84.436.7TAF8Q727C8Transcription initiation factor TFIID subunit 43,48.6,914.6TAF400068Transcription initiation factor TFIID subunit 43,48.6,911TAF4000568Transcription initiation factor TFIID subunit 43,48.6,911SYNCRIP060506Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B6,78.44,518SYNCRIP060506Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q2,22.33,74.6DHX57Q6158Putative ATP-dependent RNA helicase DHX572,3100n.d.0Q12906Interleukin enhancer-binding factor 32,22.12.42.54.9DX55Q8NHQ9ATP-dependent RNA helicase DHX572,310.0n.d.0Q1455Vertive ATP-dependent RNA helicase DHX572,213n.d.0Q1550Q8NHQ9ATP-dependent RNA helicase DHX572,213n.d.0Q155Q8NHQ9ATP-dependent RNA helicase DHX57			GeL	.C-MS	2-D LC	RP-RP - MS		
TAF5 Q15542 Transcription initiation factor TFIID subunit 5 4,5 1 4,8 2 TAF6 B4DT11 Transcription initiation factor TFIID subunit 6 3,9 8 6,4 3 TAF6 B4DT11 Transcription initiation factor TFIID subunit 6 3,8 4 n.d. 0 TAF8 Q7Z7C8 Transcription initiation factor TFIID subunit 8 3,8 4 n.d. 0 TAF4 000268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,4 8 6,9 1 TAF4 000268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,4 8 6,9 1 SYNCRIP 060506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B 6,7 8 4,5 18 SYNCRIP 060506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q 5,2 23 4,6 27 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 17 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13		Gen- Un name	iProtKB acc. Nr.	Proteinname	Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)
TAFE BADT11 Transcription initiation factor TFIID subunit 6 2,8 2 2,9 2 TAFE Q7Z7C8 Transcription initiation factor TFIID subunit 8 3,8 4 n.d. 0 TAFE Q7Z7C8 Transcription initiation factor TFIID subunit 8 3,8 4 n.d. 0 TAFA O00268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,2 26 4,6 5 TAFA O00268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,2 26 4,6 5 TAFA O00268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,2 28 4,1 18 SYNCRIP O60506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q 5,2 23 4,6 27 IF3 Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 3,2 2,6 2,5 111 2,3 2,3 1,0 n.d. 0 2,3 2,4 3 DbX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. <t< td=""><td></td><td>TAF5</td><td>Q15542</td><td>Transcription initiation factor TFIID subunit 5</td><td>4,5</td><td>1</td><td>4,8</td><td>2</td></t<>		TAF5	Q15542	Transcription initiation factor TFIID subunit 5	4,5	1	4,8	2
TAF6 B4DT11 Transcription initiation factor TFIID subunit 6 3,9 8 6,4 3 TAF8 Q7Z7C8 Transcription initiation factor TFIID subunit 8 3,8 4 n.d. 0 TAF4 Q00268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,4 8 6,9 1 TAF4 Q00268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,4 8 6,9 1 SYNCRIP O60506 Heterageneous nuclear ribonucleoprotein A/B 6,7 8 4,5 18 SYNCRIP O60506 Heterageneous nuclear ribonucleoprotein Q 5,2 23 4,6 27 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 8 2,7 117 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,3 10 n.d. 0 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 PU51 Q9F58 Putative ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d.	ē				2,8	2	2,9	2
TAFE Q7Z7C8 Transcription initiation factor TFIID subunit 8 2,5 10 3,7 6 TAFE Q7Z7C8 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,8 4 n.d. 0 TAFE Q00268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,4 8 6,9 1 TAFE Q00268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,4 8 6,9 1 TAFE Q00268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,4 8 6,9 1 SYNCRIP O60506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B 6,7 8 4,1 16 SYNCRIP Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 2,5 105 2,5 117 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase DHX57 3,2 26 2,5 111 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,3 10 n.d. 0 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d.	iier en	TAF6	B4DT11	Transcription initiation factor TFIID subunit 6	3,9	8	6,4	3
TAF8 Q7Z7C8 Transcription initiation factor TFIID subunit 8 3,8 4 n.d. 0 TAF4 000268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,2 2 n.d. 0 TAF4 000268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,2 26 4,6 5 HNRNPAB Q99729 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B 6,7 8 4,5 18 SYNCRIP 060506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q 2,1 17 2,8 22 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 LF3 Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 3,2 26 2,5 11 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,3 10 n.d. 0 PUS1 Q9F606 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic 17,4 5 n.d. 0 HUG44 Q9FK77 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRMT61A* 10,1 17	sozi tore				2,5	10	3,7	6
Provide 2,3 2 n.d. 0 TAF4 000268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,4 8 6,9 1 3,2 26 4,6 5 5 18 4,5 18 4,6 5 2,2 8 4,1 16 5 SYNCRIP 060506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q 5,2 2,3 4,6 27 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 2,3 22 117 2,8 22 28 4,1 16 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 2,3 23 23 24 3 23 22 23 10 n.d. 0 1LF3 Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 2,3 10 n.d. 0 2,4 3 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55	-as: -akt	TAF8	Q7Z7C8	Transcription initiation factor TFIID subunit 8	3,8	4	n.d.	0
TAF4 CO0268 Transcription initiation factor TFIID subunit 4* 3,4 8 6,9 1 HNRNPAB Q99729 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B 6,7 8 4,5 18 SYNCRIP O60506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q 5,2 23 4,6 27 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 Q1 17 2,8 2,5 105 2,5 49 ILF3 Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 3,2 26 2,5 11 Q3 2,3 23 2,7 17 2,9 13 n.d. 0 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,2 13 n.d. 0 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 PUS1 Q96606 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic 17,4 5 n.d. 0 U2AF1	85				2,3	2	n.d.	0
NRNPAB Q99729 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B 6,7 8 4,5 18 SYNCRIP O60506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q 5,2 2.3 4,6 27 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 2,5 105 2,5 49 2,3 23 2,7 117 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 2,5 105 2,5 49 3,2 26 2,5 11 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,3 10 n.d. 0 DX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 PUS1 Q9F060 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic 17,4 5 n.d. 0 TRMT61A Q9GFX7 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 6,6 8 n.d. 0		TAF4	000268	Transcription initiation factor TFIID subunit 4*	3,4	8	6,9	1
HNRNPAB Q99729 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B 6,7 8 4,5 18 22 8 4,1 16 2,2 8 4,1 16 SYNCRIP O60506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q 2,2 8 4,1 16 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 2,5 105 2,5 49 17 2,8 22 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 2,5 105 2,5 49 1.1 17 2,8 2.7 17 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,3 10 n.d. 0 2,9 13 2,4 3 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 2,0 12 2,4 2 TRMT61A Q9FX7 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic					3,2	26	4,6	5
Property of the propert		HNRNPAB	Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	6,7	8	4,5	18
SYNCRIP O60506 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q 5,2 23 4,6 27 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 2,5 105 2,5 49 ILF3 Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 3,2 26 2,5 11 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,3 10 n.d. 0 DX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 DX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 PUS1 Q9F6N6 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic 17,4 5 n.d. 0 PUS1 Q9Y606 tRNA pseudouridine synthase A* 10,1 17 9,8 2 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 6,6 8 n.d. 0 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	۵				2,2	8	4,1	16
Phrop Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 2,1 17 2,8 22 DHX9 Q08211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 82 3,7 46 2,5 105 2,5 105 2,5 11 2,3 23 2,7 17 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,3 100 n.d. 0 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 PUS1 Q9FK7 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic 1,7,4 5 n.d. 0 PUS1 Q9Y606 tRNA pseudouridine synthase A* 10,1 17 9,8 2 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non- catalytic subunit TRM6 6,6 8 n.d. 0 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2	ei	SYNCRIP	060506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	5,2	23	4,6	27
High QU8211 ATP-dependent RNA helicase A 3,9 3,2 5,7 46 2,5 105 2,5 105 2,5 49 LF3 Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 2,3 2,3 2,7 17 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,3 10 n.d. 0 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 PUS1 Q96FX7 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRMT61A* 16,0 4 n.d. 0 PUS1 Q9Y606 tRNA pseudouridine synthase A* 10,1 17 9,8 2 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 6,6 8 n.d. 0 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2	rot		000011	ATD demandent DNA believes A	2,1	1/	2,8	22
ILF3 Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 2,3 105 2,5 49 ULF3 Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 3,2 26 2,5 11 Q12906 Interleukin enhancer-binding factor 3 2,3 23 2,7 17 DHX57 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,3 10 n.d. 0 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 PUS1 Q9F606 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic 17,4 5 n.d. 0 TRMT61 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 6,6 8 n.d. 0 TRMT61 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 4,0 35 3,4 19 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4	Ч-Х	DHX9	Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	3,9	82 105	3,7	40
Ltrs Q12506 Interleakth emilancer-binding juctors 5,2 26 2,3 11 Q4 2,3 2,3 2,7 17 Q4 2,3 2,3 10 n.d. 0 Q5 Q6P158 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 2,3 10 n.d. 0 Q5 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 Q0X55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 PUS1 Q9F06 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic 17,4 5 n.d. 0 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 6,6 8 n.d. 0 THOC4 Q86V81 THO complex subunit 4 4,0 35 3,4 19 Q124F1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 Q124F2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48	omple	11 5 2	012006	Interlaukin onbancar hinding factor 2	2,5	105	2,5	49
Line Line <thline< th=""> Line Line <thl< td=""><td>ILFS</td><td>Q12900</td><td>interleukin ennancer-binding jactor 3</td><td>3,2</td><td>20</td><td>2,5</td><td>11</td></thl<></thline<>		ILFS	Q12900	interleukin ennancer-binding jactor 3	3,2	20	2,5	11
Program Constant of the state	P-k		O6D158	Putative ATP dependent RNA holicase DHY57	2,5	10	2,7	1/
Public 2,3 13 2,4 3 DDX55 Q8NHQ9 ATP-dependent RNA helicase DDX55 2,2 13 n.d. 0 2,0 12 2,4 2 1.6 0 2,0 12 2,4 2 TRMT61A Q96FX7 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic is subunit TRMT61A* 16,0 4 n.d. 0 PUS1 Q9Y606 tRNA pseudouridine synthase A* 10,1 17 9,8 2 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 6,6 8 n.d. 0 THOC4 Q86V81 THO complex subunit 4 4,0 35 3,4 19 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 H1FX Q92	RN N	DIIX37	QUF130	Fututive ATF-dependent KNA hencuse DHX37	2,3	13	7 A	3
PUSD Contract Ann dependent num neuese DBNSS 2,2 15 Int. 0 2,0 12 2,4 2 2,0 12 2,4 2 TRMT61A Q96FX7 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRMT61A* 16,0 4 n.d. 0 PUS1 Q9Y606 tRNA pseudouridine synthase A* 10,1 177 9,8 2 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non- catalytic subunit TRM6 6,6 8 n.d. 0 THOC4 Q86V81 THO complex subunit 4 4,0 35 3,4 19 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 H1FX Q92522 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 H1FX P16403 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 2,5 44	2	DDX55		ATP-dependent RNA helicase DDX55	2,5	13	2,4 n.d	0
TRMT61A Q96FX7 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRMT61A* 17,4 5 n.d. 0 PUS1 Q9Y606 tRNA pseudouridine synthase A* 10,1 17 9,8 2 TRMT61 Q9Y606 tRNA pseudouridine synthase A* 10,1 17 9,8 2 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non- catalytic subunit TRM6 3,7 13 n.d. 0 THOC4 Q86V81 THO complex subunit 4 4,0 35 3,4 19 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,3 14 2,2 6 H1FX Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 H1FX P16403 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 L2AF1 P16402 Histone H1.3 0 3,0 5 7		DDAJJ	QUINIQU	All acpendent has henease boxes	2,2	12	2.4	2
Human Loss Subunit TRMT61A* 16,0 4 n.d. 0 PUS1 Q9Y606 tRNA pseudouridine synthase A* 10,1 17 9,8 2 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non- catalytic subunit TRM6 3,7 13 n.d. 0 THOC4 Q86V81 THO complex subunit 4 4,0 35 3,4 19 2,1 322 2,6 19 2,1 322 2,6 19 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,2 6 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 1HTY Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 HIST1H1C P16403 Histone H1.2 2,3 19 2,5 7 HIST1H1D P16402 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9	_	TRMT61A	O96FX7	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic	17.4	5	n.d.	0
PUS1 Q9Y606 tRNA pseudouridine synthase A* 10,1 17 9,8 2 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 3,7 13 n.d. 0 THOC4 Q86V81 THO complex subunit TRM6 6,6 8 n.d. 0 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 H1FX Q92522 Histone H1.2 2,3 19 2,5 7 HIST1H1D P16403 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9	بع			subunit TRMT61A*	16,0	4	n.d.	0
Figure 6,4 13 4,5 1 TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non- catalytic subunit TRM6 3,7 13 n.d. 0 HU021 THOC4 Q86V81 THO complex subunit 4 4,0 35 3,4 19 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,3 14 2,2 6 H1FX Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 HIST1H1C P16403 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 HIST1H1D P16402 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9	IA- IIei	PUS1	Q9Y606	tRNA pseudouridine synthase A*	10,1	17	9,8	2
Region TRMT6 Q9UJA5 tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non- catalytic subunit TRM6 3,7 13 n.d. 0 Image: Problem Series of Complex Ser	tRN soz				6,4	13	4,5	1
Image: Constraint of the second sec	as	TRMT6	Q9UJA5	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-	3,7	13	n.d.	0
THOC4 Q86V81 THO complex subunit 4 4,0 35 3,4 19 2,1 32 2,6 19 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 2,3 49 2,7 23 49 2,7 23 H1FX Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 1HIST1H1C P16403 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 1HIST1H1D P16402 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9				catalytic subunit TRM6	6,6	8	n.d.	0
Light U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,1 32 2,6 19 U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 H1FX Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 HIST1H1C P16403 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 HIST1H1D P16402 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9		THOC4	Q86V81	THO complex subunit 4	4,0	35	3,4	19
U2AF1 Q01081 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit 2,2 14 2,4 5 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 LU2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 LU2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,3 49 2,7 23 H1FX Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 HIST1H1C P16403 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 HIST1H1D P16402 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9	ert ert				2,1	32	2,6	19
Line 14 2,3 14 2,2 6 U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 2,3 49 2,7 23 H1FX Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 HIST1H1C P16403 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 HIST1H1D P16402 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9	<i>icin</i> Dzile	U2AF1	Q01081	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	2,2	14	2,4	5
U2AF2 P26368 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit 2,2 48 2,1 13 Line 2,3 49 2,7 23 H1FX Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 Line Line Line Line 2,4 36 n.d. 0 HIST1H1D P16402 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9	Spli				2,3	14	2,2	6
H1FX Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 HIST1H1C P16403 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 HIST1H1D P16402 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9	- 1 (0	U2AF2	P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	2,2	48	2,1	13
H1FX Q92522 Histone H1x 2,6 19 3,0 5 2,3 19 2,5 7 HIST1H1C P16403 Histone H1.2 2,4 36 n.d. 0 HIST1H1D P16402 Histone H1.3 n.d. 0 3,0 9					2,3	49	2,7	23
HIST1H1C P16403 Histone H1.2 2,3 19 2,5 7 HIST1H1D P16402 Histone H1.3 2,4 36 n.d. 0 N.d. 0 3,0 9 9 10 10 10		H1FX	Q92522	Histone H1x	2,6	19	3,0	5
HISTIHIC P16403 Histone H1.2 HISTIHID P16402 Histone H1.3 2,4 36 n.d. 0 2,5 44 n.d. 0 n.d. 0 3,0 9	H1 ten	LUCTALIA	D4 C 402		2,3	19	2,5	7
HIST1H1D P16402 Histone H1.3 2,5 44 n.d. 0 n.d. 0 3,0 9	iant	HIST1H1C	P16403	HISTONE H1.2	2,4	36	n.d.	U
n.a. 0 3,0 9	Hist Vari		D1C402	listone 111.2	2,5	44	n.d.	0
		HISTIHID	P10402		n.a.	0	3,0	9

	Proteinbeschreibung				GeLC-MS		2-D RP-RP LC - MS	
	Gen- Un name	iProtKB acc. Nr.	Proteinname	Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)	
	MY01G	B0I1T2	Myosin-Ig	8,6	3	n.d.	0	
				6,7	3	n.d.	0	
	PDE12	Q6L8Q7	2',5'-phosphodiesterase 12	7,5	9	2,8	12	
				8,8	10	2,4	7	
	TUT1	Q9H6E5	Speckle targeted PIP5K1A-regulated poly(A)	5,5	35	2,2	14	
e Proteine			polymerase	4,1	30	2,3	12	
	OLA1	Q9NTK5	Obg-like ATPase 1	4,6	4	2,7	19	
				5,0	8	4,5	29	
	NOL7	Q9UMY1	Nucleolar protein 7	3,5	12	n.d.	0	
nel				2,1	3	n.d.	0	
ord	ZFP91	Q96JP5	E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91	2,6	9	n.d.	0	
<u>e</u>				3,1	14	n.d.	0	
t zı	CCNT1	060563	Cyclin-T1	2,4	8	2,2	11	
lich				4,6	15	2,6	21	
Z	C3orf26	Q9BQ75	Uncharacterized protein C3orf26	2,4	14	3,9	4	
				2,2	11	4,9	3	
	CMAS	Q8NFW8	N-acylneuraminate cytidylyltransferase	n.d.	0	2,4	3	
				n.d.	0	2,0	2	
	CIRBP	B3KT17	highly similar to COLD-INDUCIBLE RNA-BINDING	n.d.	0	3,1	3	
			PROTEIN	n.d.	0	2,5	3	

Fortsetzung Tabelle 3-5:

Kursiv: Proteinverhältnisse aus lediglich einem quantifizierten Peptid, n.d.: nicht detektiert, *Peptidspektren dieser Proteine sind in Abbildung 3-14 dargestellt.

3.4.2 Peptid-Pulldown-Experimente mit bisacetylierten H4-Peptiden

Nachdem für vierfach acetylierte H4-Peptide potentielle acetylierungsspezifische Bindungspartner identifiziert werden konnten, sollte untersucht werden, ob einige dieser Proteine auch an bisacetylierte H4-Peptide binden. Dazu wurden differenzielle Peptid-*Pulldown*-Experimente mit K5/12 bisacetyliertem H4-Peptid gegen das unmodifizierte Referenzpeptid durchgeführt. Für die *Pulldown*-Experimente wurde HeLa-S3 Kernextrakt aus fermentierten, ²H₄-Lys- und ¹³C₆-Arg-markierten Zellen verwendet (Forschungsgruppe Massenspektrometrie und Chromatin Biochemie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen). Die massenspektrometrische Analyse (nanoLC-LTQ-Orbitrap Messung) gebundener Proteine erfolgte wie in Abschnitt 3.4.1 unter Verwendung des GeLC-MS Ansatzes sowie des 2-D RP-RP LC-MS Ansatzes und Datenprozessierung mittels MaxQuant Software (Version 1.1.1.36). Die Anzahl identifizierter und quantifizierter Proteine ist in Abbildung 3-17 für beide Methoden dargestellt (Venn-Diagramme) und ist vergleichbar mit der Anzahl der Identifizierungen und Quantifizierungen aus den *Pulldown*-Experimenten mit vierfach acetyliertem H4-Peptid (vgl Abschnitt 3.4.1). Die Überschneidung der Proteinidentifizierungen im Doppelexperiment ist mit beiden Methoden sehr hoch und liegt bei ca. 90%. Diese hohe Überschneidung bestätigt die gute Reproduzierbarkeit der *Pulldown*-Experimente sowie der massenspektrometrischen Analyse.



Abbildung 3-17: SILAC-basierte *Pulldown*-Experimente mit unmodifizierten und K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden. Gegenüberstellung der Proteinverhältnisse (Streudiagramme) und Proteinquantifizierungen (Venn-Diagramme) zweier unabhängiger *Pulldown*-Experimente mittels GeLC-MS Ansatz (A) und 2-D RP-RP LC-MS Ansatz (B). Ein Punkt repräsentiert ein quantifiziertes Protein mit mindestens zwei proteinspezifischen (*unique*) Peptiden. Experimente wurden unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie durchgeführt.

Die Reproduzierbarkeit der Quantifizierungswerte ist in Abbildung 3-17 in Form von Streudiagrammen dargestellt, wobei die Isotopenverhältnisse von Experiment 1 gegen die Isotopenverhältnisse von Experiment 2 aufgetragen sind. Analog zu *Pulldown*-Experimenten mit vierfach acetyliertem H4-Peptid, liegen viele Proteine im unteren linken Quadranten vor. Das bedeutet, dass auch im Fall eines bisacetylierten H4-Peptides (hier K5/12) viele Proteine abgereichert sind, d.h. stärker an das nicht modifizierte Peptid binden. Bei genauerer Betrachtung der Verteilung kann man jedoch feststellen, dass die Anzahl abgereicherter Proteine für doppelt acetylierte H4-Peptide im Vergleich zu vierfach acetylierten H4-Peptiden abnimmt. Im gleichen Maß nimmt die Anzahl der 1:1 Binder, d.h. unabhängig von der Acetylierung bindende Proteine, zu (stärkere Verteilung um 1). Dieses Ergebnis ist unabhängig von der gewählten Methode (GeLC-MS oder 2-D RP-RP LC-MS). Als Kriterium für eine Abreicherung, mussten Proteine in beiden Experimenten ein Isotopenverhältnis von <0,5 aufweisen. Für GeLC-MS Experimente erfüllten 615 Proteine dieses Kriterium, in 2-D RP-RP LC-MS Experimenten wurden 527 Proteine durch die Bisacetylierung abgereichert. Davon wurden insgesamt 424 Proteine (also ca. 300 Proteine weniger als bei *Pulldowns* mit vierfach acetyliertem H4-Peptid) mit beiden Methoden übereinstimmend identifiziert, auf die jedoch nicht näher eingegangen wird. Acetylierungsspezifisch bindende Proteine befinden sich im oberen rechten Quadranten der Streudiagramme. Die Kriterien für potentielle Bindungspartner an K5/12-bisacetyliertes H4-Peptid wurden auf Isotopenverhältnisse von >2 im Doppelexperiment festgelegt. Mit GeLC-MS Experimenten wurden unter Berücksichtigung dieser Kriterien 6 Proteine acetylierungsspezifisch angereichert, mit 2-D RP-RP LC-MS Experimenten 7 Proteine. Fünf dieser Proteine wurden mit beiden Methoden am K5/12-bisacetylierten H4-Peptid angereichert.

Tabelle 3-6: Potentielle Bindungspartner an K5/12-bisacetylierte Histon H4 Peptide. Die Anreicherungsverhältnisse eines GeLC-MS basierten Ansatzes sowie 2-D RP-RP LC-Ansatzes wurden mit SILAC unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie doppelt bestimmt. Es sind nur Proteine aufgelistet, die im Doppelexperiment mit mindestens zwei proteinspezifischen Peptiden identifiziert wurden, ein Isotopenverhältnis >2 aufweisen und in beiden Methoden übereinstimmen bzw. sich nicht widersprechen.

	Proteinbeschreibung				GeLC-MS		2-D RP-RP LC - MS	
	Gen- name	UniProtKB acc. Nr.	Proteinname	Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)	
	PUS1	Q9Y606	tRNA pseudouridine synthase A	4,1	4	2,0	3	
iierte e				2,2	7	2,8	1	
	TRMT1	Q9NXH9	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase	4,0	8	4,5	12	
soz ein				2,6	6	4,4	14	
-as: rot	DUS3L	Q96G46	tRNA-dihydrouridine(47) synthase [NAD(P)(+)]-like	3,8	3	2,0	2	
AN P				2,8	4	2,4	1	
tR	TRM4	Q08J23	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	3,5	26	2,9	22	
				4,1	40	5,2	20	
S	RPS17	P08708	40S ribosomal protein S17	2,2	16	2,3	9	
40				2,0	15	2,1	11	

Kursiv: Proteinverhältnisse aus lediglich einem quantifizierten Peptid

Die Anzahl spezifischer Bindungspartner an K5/12-bisacetylierte H4-Peptide ist wesentlich geringer als für vierfach acetylierte H4-Peptide (5 Proteine gegen 29 Proteine). Davon stimmt lediglich das Protein PUS1 als acetylierungsspezifischer Bindungspartner an sowohl K5/12-bisacetyliertes H4-Peptid als auch vierfach acetyliertes H4-Peptid (K5/8/12/16) überein.

3.4.3 Peptid-Pulldown-Experimente mit monoacetylierten H4-Peptiden

Differentielle Pulldown-Experimente mit unmodifizierten gegen monoacetylierte H4-Peptiden wurden gemäß Abbildung 3-13 zunächst mit Kernextrakten aus adhärent-wachsenden HeLa-S3 Zellen (vgl. Abschnitt 2.5.1.1) durchgeführt. Für die stabile Isotopenmarkierung in Zellkultur wurde ${}^{13}C_6$ -Lys und ¹³C₆, ¹⁵N₄-Arg verwendet, woraus sich ein Massenunterschied von 6 Da oder 10 Da für tryptische Peptide ergibt. Die Pulldown-Experimente wurden entweder als biologisches Replikat (zwei unterschiedliche Kernextraktpräparationen) oder unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie durchgeführt. Die Identifizierung von Bindungspartnern erfolgte nach Inkubation der Peptid-Agarose-Konjugate mit HeLa-S3 Kernextrakt mittels GeLC-MS Analyse. Dazu wurden die Elutionsfraktionen differentieller Pulldown-Experimente zunächst vereinigt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, tryptisch gespalten (40 Einzelbanden pro Pulldown-Experiment) und mittels nanoLC-LTQ-Orbitrap vermessen. Die Identifizierung und Quantifizierung von Bindungsproteinen erfolgte mit MaxQuant (Version 1.0.13.13). Für eine sichere Proteinidentifizierung mussten, wie bei den Experimenten mit mehrfach acetylierten Histon-H4 Peptiden, mindestens zwei Peptide der Proteinsequenz zugeordnet sein. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden für Peptid-Pulldown-Experimente mit monoacetylierten H4-Peptiden an allen vier Positionen (K5Ac, K8Ac, K12Ac, K16Ac) mindestens 1600 Proteine je SILAC Experiment identifiziert und quantifiziert. Von diesen wurden nur solche weiter betrachtet, die im Doppelexperiment identifiziert und quantifiziert wurden. Für Pulldown-Experimente mit Lys5-acetyliertem H4-Peptid wurden 1724 Proteine, für Lys8Ac 1446 Proteine, für Lys12-acetylierte H4-Peptide 1414 Proteine und für H4-Lys16Ac 1718 Proteine übereinstimmend in zwei Experimenten identifiziert und quantifiziert. Abbildung 3-18 stellt die Proteinquantifizierungen aus zwei SILAC-basierten Peptid-Pulldown-Experimenten für die vier monoacetylierten H4-Peptide gegenüber. Die dargestellten Venn-Diagramme zeigen, dass die Übereinstimmung der quantifizierten Proteine zwischen zwei unabhängigen Pulldown-Experimenten sehr hoch ist. Das heißt, dass sowohl die experimentelle Vorgehensweise, als auch die massenspektrometrische Analyse und Datenprozessierung reproduzierbar sind. Die Verteilung der Pulldown-Experimente zeigt, dass für alle vier Acetylierungspositionen die Mehrzahl aller identifizierten und quantifizierten Proteine ein Isotopenverhältnis um 1 aufweist (Normalverteilung um den Wert 1). Das bedeutet, dass die Mehrzahl aller Proteine ein gleiches Bindungsverhalten an unmodifizierte und monoacetylierte H4-Peptide aufweist, also acetylierungsunabhängig bindet.

Im Gegensatz zu Peptid-*Pulldown*-Experimenten mit zwei- und vierfach acetylierten H4-Peptiden (Abbildung 3-16 und Abbildung 3-17), sind nur wenige Proteine im unteren linken Quadranten.

Auch die Anzahl falsch-positiv quantifizierter Proteine (unterer rechter Quadrant) und Kontaminationen (oberer linker Quadrant) ist wesentlich geringer.



A H4-noAc vs. H4-K5Ac

B H4-noAc vs. H4-K8Ac

Abbildung 3-18: SILAC-basierte *Pulldown*-Experimente mit unmodifizierten und monoacetylierten H4-Peptiden. Streudiagramme der Proteinverhältnisse und Reproduzierbarkeit der Proteinquantifizierungen (Venn-Diagramme) zweier unabhängiger Peptid-*Pulldown*-Experimente mit GeLC-MS Ansatz. Ein Punkt repräsentiert ein quantifiziertes Protein mit mindestens zwei proteinspezifischen Peptiden. Experimente (A+C) wurden als biologisches Replikat, Experimente (B+D) unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie durchgeführt.

Das Kriterium für potentielle acetylierungsspezifische Bindungspartner an monoacetylierte H4-Peptide wurde wie in den vorherigen Experimenten auf ein Isotopenverhältnis >2 im Doppelexperiment festgelegt. Für *Pulldown*-Experimente mit Lys5-acetyliertem und Lys12acetyliertem H4-Peptid erfüllt lediglich ein Protein (MAD1) dieses Kriterium. Für H4-Lys8Ac- und H4-Lys16Ac-*Pulldowns* wurde unter diesen Bedingungen kein Protein acetylierungsspezifisch angereichert. Die enge Verteilung um 1 und das nicht-Vorhandensein von Proteinen im oberen rechten Quadranten der Streudiagramme (acetylierungsspezifische Bindeproteine) zeigt, dass eine einzelne Lysinacetylierung keinen großen Einfluss auf das Bindungsverhalten hat. Lediglich das Spindelaufbau-Kontrollpunktprotein MAD1 (*Mitotic spindle assembly checkpoint protein* MAD1) wurde acetylierungsspezifisch an Position H4-Lys5Ac und H4-Lys12Ac angereichert

 Tabelle 3-7: Potentielle Bindungspartner an monoacetylierte Histon H4 Peptide.
 SILAC-basierte Isotopenverhältnisse des

 Protein MAD1 für verschiedene monoacetylierte H4-Peptide (Doppelbestimmung).

Proteinbeschreibung			K5Ac		K8Ac		K12Ac		K16Ac	
Gen- name	Gen- UniProtKB Proteinname ame acc. Nr.		Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)	Ver- hältnis	Peptide (quant)
MAD1	Q9Y6D9	Mitotic spindle assembly	2,0	5	1,8	27	2,6	11	1,6	24
		checkpoint protein MAD1	2,0	15	0,4	34	2,0	14	0,4	20

Die Experimente wurden ebenso mit HeLa-S3 Kernextrakten aus fermentierten Zellen unter Verwendung von ${}^{2}H_{4}$ -Lys und ${}^{13}C_{6}$ -Arg für die stabile Isotopenmarkierung in Zellkultur durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Peptid-*Pulldown*-Experimente unterscheiden sich im Wesentlichen nicht von den hier gezeigten, d.h. es wurden ebenfalls keine acetylierungsspezifisch bindenden Proteine an monoacetylierte H4-Peptide identifiziert (Daten nicht gezeigt).

3.4.4 Peptid-Pulldown-Experimente mit Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden

Neben dem Einfluss spezifischer Lysin-Acetylierungen der N-terminalen H4 Sequenz auf die Rekrutierung von Proteinen und Proteinkomplexen, wurde auch der Einfluss einer Phosphorylierung an Ser1 untersucht. Die Phosphorylierung an Ser1 wurde in Zusammenhang mit der Chromatinkondensierung und DNA-Reparatur beschrieben (Cheung *et al.* 2005; Krishnamoorthy *et al.* 2006; Wendt und Shilatifard 2006; Govin *et al.* 2010). Die Rolle der Ser1-Phosphorylierung ist dabei allerdings noch unklar. Aus diesem Grund wurden differenzielle *Pulldown*-Experimente auch mit Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden durchgeführt. Immobilisierte Peptide wurden gemäß Abbildung 3-13 mit SILAC-HeLa-S3 Kernextrakten (Lys+4-, Agr+6-Markierung) inkubiert. Nach Auswaschen unspezifisch gebundener Proteine, wurden die Elutionsfraktionen entsprechender Peptidmatrices (nicht phosphoryliert inkubiert mit "leichtem" Extrakt und phosphoryliert inkubiert mit "schwerem" Extrakt, *et vice versa*) vereinigt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (GeLC-MS Ansatz). Die Proteinidentifizierung erfolgte nach tryptischer Spaltung (40 Einzelbanden pro Gelspur) durch nanoLC-LTQ-Orbitrap MS-Messungen. Für die weiteren Betrachtungen wurden dieselben Kriterien wie in den Abschnitten 3.4.1-3.4.3 berücksichtigt.

Im Doppelexperiment wurden pro SILAC-*Pulldown* mindestens 2200 Proteine mit mindestens 25000 proteinspezifischen Peptiden identifiziert und quantifiziert. Die Überschneidung der Proteinidentifizierungen und -quantifizierungen für zwei unabhängige *Pulldown*-Experimente mit unmodifizierten gegen Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden ist in Abbildung 3-19 B als Venn-Diagramm dargestellt und liegt bei 2071 Proteinen (ca. 90%). Abbildung 3-19 A stellt das Isotopenverhältnis der Proteine gegen die Anzahl der quantifizierten Peptide (*ratio count*, MaxQuant) dar und zeigt, dass die Mehrzahl aller quantifizierten Proteine ein Isotopenverhältnis um 1 aufweist. Dabei ist die Streuung der Isotopenverhältnisse um den Wert 1 umso höher, je weniger Peptide quantifiziert wurden. Mit zunehmender Anzahl der Peptidquantifizierungen nimmt auch die Streuung ab (Normalverteilung um den Wert 1).



Abbildung 3-19: *Pulldown*-Experimente mit unmodifizierten und Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden in Kombination mit SILAC. (A) Streudiagramme der Proteinverhältnisse in Abhängigkeit von der Anzahl quantifizierter Peptide (*ratio count*, MaxQuant). (B) Reproduzierbarkeit der Proteinverhältnisse (Streudiagramm) und Proteinquantifizierungen (Venn-Diagramm) im Doppelexperiment. Ein Punkt repräsentiert ein quantifiziertes Protein mit mindestens zwei proteinspezifischen Peptiden. Experimente wurden unter Verwendung einer reversen Markierungsstrategie durchgeführt.

Die Gegenüberstellung der Proteinverhältnisse aus zwei unabhängigen (reversen) *Pulldown*-Experimenten ist in Abbildung 3-19 B dargestellt, indem die Isotopenverhältnisse aus dem ersten Experiment gegen die Isotopenverhältnisse aus Experiment 2 aufgetragen sind. Die Mehrzahl aller quantifizierten Proteine weist im Doppelexperiment einen Wert um 1 auf, bindet somit unabhängig von der Phosphorylierung an die Peptidkonstrukte. Darüber hinaus sind im unteren rechten Quadranten des Streudiagramms wenige falsch-positiv quantifizierte Bindungsproteine (z.B. unterschiedlicher Proteingehalt in den Extrakten) sowie einige Kontaminationen im oberen linken Quadranten dargestellt. Proteine mit einem niedrigen Isotopenverhältnis in beiden Experimenten zeichnen sich durch eine stärkere Bindung an nicht phosphorylierte H4-Peptide aus. Auf diese Proteine wird im Weiteren jedoch nicht eingegangen. Die Verteilung des *Pulldowns* mit phosphoryliertem H4-Peptid ist im Vergleich zu der Verteilung von monoacetylierten H4-Peptiden (Abbildung 3-18) wesentlich weiter um den Wert 1 gestreut. Als potentielle phosphorylierungsspezifische Bindungspartner an Histon H4-Peptide wurden nur solche betrachtet, die in beiden Experimenten mit mindestens 2 proteinspezifischen Peptiden identifiziert wurden und ein Isotopenverhältnis >2 aufweisen. Dieses Kriterium wird von insgesamt drei Proteinen erfüllt, die in Tabelle 3-8 zusammengefasst sind.

Tabelle 3-8: Potentielle spezifische Bindungspartner an Ser1-phosphorylierte H4-Peptide. Die Isotopenverhältnisse wurden mit SILAC-basierten *Pulldown*-Experimenten in Kombination mit GeLC-MS im Doppelexperiment (reverse Markierungsstrategie) bestimmt. Es wurden nur Proteine berücksichtigt, die in zwei Experimenten mit mindestens 2 proteinspezifischen Peptiden und einem Isotopenverhältnis von >2 identifiziert und quanifiziert wurden.

		GeLC-MS			
	Gen- name	UniProtKB acc. Nr.	Proteinname	Verhältnis	Peptide (quant)
ť	TRM4	Q08J23	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	2,9	32
JA- ziiei				3,2	21
tRN SSO:	PUS1	Q9Y606	tRNA pseudouridine synthase A	2,6	5
ΰ				2,4	2
۵~	WDR6	2 043379	WD repeat-containing protein 62	2,6	5
3 "				2,5	4

Von diesen potentiellen phosphorylierungsspezifischen H4-Bindungspartnern wurde PUS1 bereits in *Pulldowns* mit vierfach- und K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden modifizierungsspezifisch angereichert. Auch TRM4 wurde bereits im Peptid-*Pulldown* mit K5/12-bisacetyliertem Histon H4 stärker am modifizierten Peptid gebunden.

3.4.5 Validierung potentieller acetylierungsabhängiger Bindungspartner an Histon H4

Über die durchgeführten *Pulldown*-Experimente wurden potentielle modifizierungsabhängige Bindungspartner an Histon H4 identifiziert. Zur Validierung der Quantifizierungsergebnisse wurden Proteine aus dem *Pulldown* mit vierfach acetyliertem Histon H4-Peptid ausgewählt und mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden *Pulldown*-Experimente mit nicht modifizierten, monoacetylierten (K5Ac, K8Ac, K12Ac und K16Ac), bisacetylierten (K5/12Ac), vierfach acetylierten (K5/8/12/16Ac) und Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden in nicht markiertem HeLa-S3 Kernextrakt durchgeführt. Nach Elution der gebundenen Proteine wurden diese einzeln mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Nachweis modifizierungsabhängiger Bindungspartner erfolgte mit Primärantikörpern gegen TAF8 (TAFII p43), TAF4 (TAFII p130), TRMT6, THOC4 (Aly) und PUS1. Diese Proteine wurden in SILAC-basierten *Pulldown*-Experimenten spezifisch an vierfach acetylierten H4-Peptiden angereichert (vgl. Tabelle 3-5). PUS1 wurde darüber hinaus auch als K5/12Ac- und Ser1-phos-Binder identifiziert. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse dieser Bindungspartner sind in Abbildung 3-20 zusammengefasst.



Abbildung 3-20: Western Blot zur Verifizierung modifizierungsabhängiger Histonbindeproteine. Pulldown-Experimente mit modifizierten H4-Peptiden in HeLa-S3 Kernextrakt. Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Detektion der Antikörpersignale erfolgte über Fluoreszenzmessung der Sekundärantikörper. Als Kontrolle wurden 25 µg HeLa-S3 Kernextrakt aufgetragen (Lysat).

Bei der Auswertung der Western Blot Analysen vergleicht man die Intensitäten der Antikörpersignale aus *Pulldowns* mit modifizierten Peptiden mit denen aus nicht modifizierten Peptiden. Dieses Verhältnis spiegelt in gewisser Weise das mit SILAC-Experimenten ermittelte Isotopenverhältnis wieder, da für SILAC-*Pulldowns* immer das unmodifizierte H4-Peptid als Referenz eingesetzt wurde. Die Untereinheiten 4 und 8 des Transkriptionsfaktors IID (TAF8 und TAF4) binden an alle getesteten H4-Peptide, wobei die stärkste Bindung an vierfach acetylierte H4-Peptide detektiert wird. Für alle anderen Positionen erhält man ungefähr ein 1:1 Verhältnis. Gleiches gilt auch für die tRNA-Methyltransferase TRMT6 und den Transkriptionskoaktivator THOC4 (Aly). PUS1 wurde mit SILACbasierten *Pulldown*-Experimenten an vierfach- und K5/12-bisacetylierten sowie Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden angereichert. Mittels Western Blot kann eine spezifische Bindung von PUS1 an H4-all Ac, H4-K5/12Ac und H4-S1p eindeutig nachgewiesen werden. Dabei ist die Bindung an das vierfach acetylierte Peptid am stärksten. Vergleicht man die Bandenintensitäten der Western Blot Analyse mit den durch SILAC ermittelten Isotopenverhältnissen (H4-all Ac: ca. 8, H4-K5/12Ac: ca. 2,7, H4-S1p: ca.2,5) erhält die gleiche Abstufung. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der Western Blot Analyse die Affinitäts-MS-Experimente.

4 Diskussion

Die systematische Analyse von Protein-Protein-Interaktionen stellt heutzutage einen wichtigen Teil der funktionellen Genomforschung dar. Die Analyse des Aufbaus und der Regulation komplexer Proteinnetzwerke gibt Aufschlüsse über die molekularen Zusammenhänge innerhalb einer Zelle und ist somit unerlässlich, um Hintergründe biologischer Funktionen aufzuklären.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein proteomischer Ansatz zur Analyse komplexer Protein- und Peptidgemische entwickelt, der die Identifizierung bisher unbekannter Protein-Protein- bzw. Peptid-Protein-Wechselwirkungen über Affinitäts-*Pulldown*-Experimente erlaubt. Dieser Ansatz basiert auf der enzymatischen Spaltung von komplexen Proteinproben, gefolgt von der mehrdimensionalen chromatographischen Trennung der generierten Peptide und der massenspektrometrischen Analyse zur Identifizierung und Quantifizierung interagierender Proteine. Die Entwicklung und Validierung der Methodik erfolgte zunächst am gut charakterisierten Modellsystem und wurde anschließend für die Identifizierung acetylierungsvermittelter Histon-H4 Proteininteraktionen eingesetzt. Im Rahmen dieser Analysen sollte im Besonderen der Einfluss von Lysinacetylierungen innerhalb der Nterminalen H4-Sequenz auf die Rekrutierung von Proteinen und Proteinkomplexen untersucht werden. Dafür wurden differenzielle Affinitäts-*Pulldown*-Experimente mit immobilisierten, synthetischen Histon H4-Peptiden in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt.

4.1 Entwicklung der 2-D RP-RP LC MS/MS Methodik

Für die hypothesefreie, d.h. proteomweite Analyse komplexer Proteinnetzwerke werden in den letzten Jahren zunehmend Affinitätsreinigungen in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt. Aufgrund der dabei auftretenden Komplexität ist eine Probenfraktionierung vor der massenspektrometrischen Analyse unumgänglich. Diese Methoden basieren auf der Separation von Proteinen oder daraus resultierenden Peptiden nach verschiedenen Eigenschaften (z.B. Größe, Ladung, Hydrophobizität). Am häufigsten wird dabei ein Ansatz, bestehend aus der Auftrennung der komplexen Proteingemische mittels SDS-PAGE in Kombination mit der nanoLC-gekoppelten massenspektrometrischen Analyse der durch in-Gel Spaltung generierten Peptide, angewandt (GeLC-MS/MS). Die Limitationen dieser Vorgehensweise liegen in der Auftrennung der komplexen Gemische auf Proteinebene, der Visualisierung der Proteine im Gel sowie der in-Gel Spaltung und dem damit verbundenen Probenverlust (Granvogl et al. 2007). Bereits bei der Vorbereitung der Proteinproben für die Gelelektrophorese und dem Beladen der SDS-Gele kann es durch die zusätzlich durchzuführenden Schritte zu einem Probenverlust kommen. Die Trennung mittels SDS-PAGE erfolgt nach dem Molekulargewicht, wobei Proteine mit ähnlichen Molekulargewichten nicht bzw. nur sehr schlecht voneinander separiert werden. Die Visualisierung der Proteine nach der Auftrennung erfolgt häufig über Coomassie- oder Silberfärbung, die bei unzureichender Entfärbung die spätere MS-Messung empfindlich beeinflussen können. Darüber hinaus erfolgt die Spaltung der Proteine in der Gelmatrix, die vor der Spaltung mehreren Waschoperationen unterzogen wird. Dabei können unter Umständen bereits niedermolekulare Proteine ausgewaschen werden. Ein weiterer limitierender Faktor der in-Gel Spaltung ist die Extraktion der generierten Peptide aus der Gelmatrix, die in Abhängigkeit von den Peptideigenschaften ebenfalls mit einem Probenverlust einhergehen kann. Dennoch erlaubt die Methode der Protein-in-Gel Spaltung in Kombination mit kapillar-LCgekoppelter, hochaufgelöster Tandem-Massenspektrometrie die Analyse mehrerer tausend Proteine pro Gelspur (de Godoy et al. 2006; Shevchenko et al. 2006) und ist durch eine gute Reproduzierbarkeit sowie einen hohen Dynamikbereich gekennzeichnet.

Als Alternative zur klassischen, gelbasierten Proteomanalyse haben sich sogenannte shotgun Proteomansätze etabliert, die auf der enzymatischen Spaltung komplexer Proteingemische, gefolgt von der mehrdimensionalen chromatographischen Trennung (MDLC) der resultierenden Peptide, basieren (Peng *et al.* 2003; Motoyama und Yates 2008). Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt zum einen darin, dass weniger Zwischenschritte als bei GeLC-Ansätzen notwendig sind und somit die Gefahr von Probenverlusten minimiert wird. Zum anderen ist das Auflösungsvermögen für Peptidtrennungen wesentlich höher als für Proteine (Washburn *et al.* 2001). Für MDLC-Verfahren wird häufig eine zweidimensionale Anordnung der Peptidtrennung gewählt. Die erste Separation erfolgt oftmals über starke Kationenaustausch- (SCX), Größenausschluss-(SEC) oder hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC). Der zweite Separationsschritt basiert fast ausschließlich auf dem Prinzip der Umkehrphasenchromatographie (RP) und ist überwiegend direkt (*online*) an das Massenspektrometer gekoppelt (Motoyama und Yates 2008). Da es sich in beiden Dimensionen um unterschiedliche Retentionsmechanismen handelt, spricht man von orthogonalen Systemen. Die Trennleistung dieser Systeme wird über die Peakkapazität (P), welche die maximale Anzahl von Peaks, die in einem bestimmten Retentionszeitraum mit einer vorgegebenen Auflösung voneinander getrennt werden können, definiert. Die Nachteile dieser 2-D Auftrennungen sind die limitierte Auflösung und die damit verbundene verringerte Peakkapazität in der ersten Dimension. Die RP-Chromatographie in der zweiten Dimension ist hingegen durch eine sehr hohe Auflösung gekennzeichnet und ermöglicht gleichzeitig eine Probenentsalzung und -konzentration über Vorsäulensyteme. Der Einsatz von RP-Chromatographie in beiden Dimensionen, d.h. der Ersatz von SCX- oder HILIC- durch RP-Trennung, erhöht die Auflösung, verringert aber gleichzeitig die Orthogonalität des Systems. Der Einfluss auf die realisierbare (totale) Peakkapazität des gesamten 2-D Systems hängt von den konkreten chromatographischen Bedingungen, d.h. den verwendeten stationären und mobilen Phasen, ab. Um die Orthogonalität der auf RP-RP-basierenden zweidimensionalen Systeme zu erhöhen, wird eine pH-Wert Änderung vom basischen in der ersten Dimension zum sauren pH-Wert in der zweiten Dimension angewandt (Gilar et al. 2005b; Gilar et al. 2005a; Song et al. 2010; Zhou et al. 2010). Die Nachteile dieser Vorgehensweise liegen jedoch darin, dass nur wenige Chromatographiematerialien für die Auftrennung im basischen pH-Bereich geeignet sind (z.B. Polymersäulen) und dass die Peakkapazität dieser Säulen für Peptide bei pH-basischen Bedingungen oft begrenzt ist (McCalley 2005; Nakamura et al. 2008).

Um die Limitationen der bisher gängigen 2-D LC-Verfahren zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Verfahren für die Analyse komplexer Proteingemische aus Peptid-basierten Affinitäts-*Pulldown*-Experimenten und deren Analyse mittels MS entwickelt. Die Methode beruht auf der *reversed phase* Trennung komplexer Peptidgemische mit pH-sauren Elutionsbedingungen in beiden Dimensionen.

4.1.1 Orthogonalität und Fraktionierung in der ersten Dimension

Für die Optimierung der ersten chromatographischen Dimension wurde zunächst ein Set bestehend aus 45 synthetischen Peptiden verwendet. Die Auftrennung dieses Peptidgemisches wurde in Abhängigkeit des verwendeten Säulenmaterials, der Flussrate und der Gradientenlänge untersucht (vgl. Abschnitt 3.1.1). Um die Selektivität der hydrophoben Wechselwirkungen zu erhöhen, wurden in den mobilen Phasen unterschiedliche Ionenpaar-Reagenzien, die das Retentions- und Ionisierungsverhalten von Peptiden in RP-LC-MS-Ansätzen empfindlich beeinflussen können, verwendet (Apffel *et al.* 1995; McCalley 2004; Spicer *et al.* 2007). Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte in Anwesenheit von 0,1% TFA, in der zweiten Dimension mit 0,1% Ameisensäure. Trifluoressigsäure ist ein flüchtiges Ionenpaarreagenz, das in der ersten chromatographischen Trennung zu sehr scharfen Peaks führt, jedoch aufgrund von Ionenunterdrückungseffekten in direkter Kombination mit ESI-MS nicht eingesetzt wird (Apffel et al. 1995). Die Verwendung von geringen Ameisensäurekonzentrationen (<0,1%) im Elutionsmittel geht zwar mit einer leichten Peakverbreiterung und geringfügig schlechterer Auflösung einher, führt aber im Gegensatz zu TFA nicht zu einer Ionenunterdrückung (Huber und Premstaller 1999). Dementsprechend ist die Verwendung von verschiedenen Ionenpaar-Reagenzien ein guter Kompromiss zwischen hoher chromatographischer Auflösung und empfindlicher massenspektrometrischer Analyse. Zusätzlich beeinflusst die Verwendung verschiedener Ionenpaar-Reagenzien den Retentionsmechanismus in beiden Dimensionen leicht, was zu einer Erhöhung der Orthogonalität des Systems führt. Die Orthogonalität verschiedener RP-basierter 2-D Systeme ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Bei der Verwendung von Ammoniumformiat (pH 10) als Zusatz in der ersten Dimension und Ameisensäure als Ionenpaar-Reagenz in der zweiten Dimension, erhält man ein stark unterschiedliches Retentionsverhalten, d.h. eine hohe Orthogonalität. Die Anwendung von RP_{pH 10}-RP_{pH 2}-Systemen ist jedoch dadurch limitiert, dass nur wenige auf RPbasierende Säulenmaterialien (wie z.B. Polymersäulen) unter pH-basischen Bedingungen stabil sind. Viel entscheidender ist jedoch, dass man im Vergleich zu Peptidtrennungen in Anwesenheit von 0,1% TFA eine Peakverbreiterung (FWHM_{pH 10}=0,58 min, FWHM_{0,1% TFA}=0,44 min) und damit eine reduzierte totale Peakkapazität erhält. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass einige Peptide unter pH-basischen Bedingungen nicht von der Säule eluiert werden konnten, d.h. der Analyse verloren gehen. Die normalisierten Retentionszeitplots für RP_{0,1% TFA}-RP_{0,1% FA}-Systeme zeigen, dass die Orthogonalität unter diesen, auf demselben Prinzip beruhenden, Retentionsbedingungen wesentlich geringer ist (Abbildung 3-3 B-C). Aufgrund der geringeren mittleren Peakbreite in der ersten Dimension ergibt sich jedoch eine erhöhte totale Peakkapazität. Trotz ähnlicher Retentionsbedingungen in beiden Dimensionen erhält man eine Aufspreizung von Peptiden, die in der ersten Dimension koeluieren, von ca. 10-15 Minuten zweiten Dimension (vgl. Abbildung 4-1 A). Diese Aufspreizung ist auf die Verwendung verschiedener Chromatographiebedingungen zwischen beiden Dimensionen (z.B. µLC und nLC, unterschiedliche Ionenpaar-Reagenzien, Gradientendauer) zurückzuführen und führt zu einer "ausreichenden" Orthogonalität für proteomische Anwendungen. Dennoch führt die Aufspreizung von 10-15 Minuten in der zweiten Dimension nur zu einer unzureichenden Ausnutzung des chromatographischen Separationsraums und damit der MS/MS-Kapazität. Aus diesem Grund wurde ein Fraktionierungsschema in der ersten Dimension entwickelt, das Peptide mit unterschiedlichem Retentionsverhalten (aus verschiedenen Bereichen des Chromatogramms) vereinigt (vgl. Abschnitt 3.1.2). Durch die Anwendung des Fraktionierungsschemas erhält man sehr homogene Proben (siehe Abbildung 3-5, Anzahl identifizierter Peptide) und minimiert gleichzeitig die Anzahl der zu analysierenden Proben und somit die Messzeit. Durch das Vereinigen von Peptiden aus verschiedenen Retentionszeitbereichen in der ersten Dimension, wird der Separationsraum und somit auch die MS/MS-Kapazität in der zweiten Dimension vollständig ausgenutzt (siehe Abbildung 4-1 B).



Abbildung 4-1: Orthogonalitätsplots des RP_{0,1% TFA}-RP_{0,1% FA}-Systems. Auftrennung eines komplexen Peptidgemisches aus SILAC-basierten ADAP-595-Peptid-*Pulldown*-Experimenten und Analyse der Einzelfraktionen (A) sowie nach Anwendung des entwickelten Fraktionierungsschemas in der ersten Dimension (B). Peptidtrennungen in der ersten Dimension wurden an einer 150 mm × 1 mm PLRP-Säule (3 μ m, 100 Å) mit einem Fluss von 40 μ l/min und einem linearen A-B Gradienten von 1-50% in 50 min durchgeführt [Eluent A: 0,1% (v/v) TFA, 5% (v/v) Acetonitril in Wasser, Eluent B: 0,085% (v/v) TFA, 80% (v/v) Acetonitril in Wasser]. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte mit einer 250 mm × 75 μ m C18RP-Säule (3 μ m, 100 Å) bei einer Flussrate von 200 nl/min und einem linearen A-B Gradienten von 3-24% in 62 min mit weiterem Anstieg auf 60% B bei 102 min [Eluent A: 0,1% (v/v) FA in Wasser, Eluent B: 0,01% (v/v) FA in Acetonitril].

4.1.2 Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Bindungspartner

Für die Validierung der entwickelten Methode wurde die bekannte phospho-Tyrosin-abhängige Wechselwirkung des T-Zell Adapterproteins ADAP mit SH2-Domänen-enthaltenden Proteinen untersucht. Das Adapterprotein ADAP verfügt neben einer prolinreichen Sequenz und zwei SH3-Domänen über zahlreiche Tyrosin-Phosphorylierungsmotive, die SH2-Domänen-vermittelte Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (da Silva et al. 1993; Schraven et al. 1997; Krause et al. 2000). Drei dieser Phosphorylierungsstellen (Y595, Y625, Y771) wurden zuvor bereits in gelbasierten Peptid-Pulldown-Experimenten hinsichtlich der Identifizierung phosphorylierungsvermittelter Bindungspartner innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht (Lange et al. 2010). Aufgrund der aus diesen Experimenten erhaltenen Vergleichsdaten, wurden Tyrosin 595-phosphorylierte ADAP-Peptide für die Validierung der 2-D RP_{0,1% TFA}-RP_{0,1% FA} LC-MS/MS Methodik eingesetzt. Wie in Abschnitt 3.1.3 SILAC-basierte Peptid-Pulldown-Experimente beschrieben, wurden mit verschiedenen

Diskussion

Chromatographiebedingungen (Säulenmaterial, Fraktionsanzahl) durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Anzahl identifizierbarer Proteine und Peptide von der Anzahl der vereinigten Fraktionen abhängt (16 Fraktionen: 1400 Proteine, 10534 proteinspezifische Peptide; 24 Fraktionen: 1700 Proteine, 13496 proteinspezifische Peptide). Durch die Anwendung eines Fraktionierungsschemas mit 36 vereinigten Fraktionen wird die Zahl der Protein- und Peptididentifizierungen weiter gesteigert (2000 Proteine, 21302 proteinspezifische Peptide). Vergleicht man die Ergebnisse dieser Pulldown-Experimente mit denen zuvor von Lange et al. beschriebenen Ergebnissen aus gelbasierten Peptid-Pulldowns, in denen pro Gelspur ca. 1800 Proteine mit 15000 proteinspezifischen Peptiden identifiziert wurden (Lange et al. 2010), so wird deutlich, dass die Anzahl der Identifizierungen in derselben Größenordnung liegt. Durch die Fraktionierung in 16 und 24 vereinigte Fraktionen wurden entsprechend ca. 400 bzw. 100 Proteine weniger identifiziert, während in 36 vereinigten Fraktionen ca. 200 Proteine mehr identifiziert wurden. Dem ist allerdings hinzu zu fügen, dass für die vorgestellten GeLC-MS Ansätze jeweils 6 µl (das gesamte Probenvolumen) der nach in-Gel Spaltung gelösten Peptide mittels nLC-MS/MS analysiert wurden. Im Gegensatz dazu wurden lediglich 3 µl (das halbe Probenvolumen) der vereinigten Fraktionen aus 2-D RP-RP LC-MS/MS Ansätzen analysiert, was zur Folge hat, dass eine Probe für etwaige zusätzliche Analysen vorhanden ist ("technisches Replikat"). Dies wäre insbesondere für die Proteom- bzw. Subproteomanalyse von Vorteil.

Die Analyse und Quantifizierung phosphorylierungsabhängiger Bindungspartner an ADAP-595-Peptide erfolgte mittels SILAC. Die Mehrzahl der im Doppelexperiment detektierten Proteine interagierten unabhängig von der Phosphorylierung mit den ADAP-Peptiden, d.h. sie wiesen Isotopenverhältnisse um den Wert 1 auf (Daten nicht gezeigt). Nur Proteine, deren Isotopenverhältnis im reversen Experiment (Überkreuzexperiment) übereinstimmend erhöht war (>5), stellen potentielle, phosphorylierungsspezifische Bindungspartner dar. So konnten insgesamt 10 potentielle Interaktionspartner der Tyr 595-phosphorylierten ADAP-Peptide mit allen durchgeführten 2-D RP-RP LC-MS/MS Experimenten identifiziert werden (zusammengefasst in Tabelle 3-1). Das gleiche Set an phosphorylierungsvermittelten Interaktionspartnern der ADAP-595-Sequenz wurde zuvor bereits von Lange *et al.* mittels GeLC-MS/MS-Ansätzen beschrieben und wird aus diesem Grund hier nicht weiter diskutiert (Lange 2010; Lange *et al.* 2010).
4.1.3 Enzymatische ¹⁸O-Markierung in Kombination mit 2-D RP-RP LC-MS/MS

Seit ihrer Einführung hat sich die SILAC-Methode als "Goldstandard" für die quantitative Untersuchung proteomischer Fragestellungen etabliert (Ong *et al.* 2002; Mann 2006). Der Vorteil der SILAC-Methode besteht darin, dass die zu vergleichenden Proben bereits auf Proteinebene vereinigt werden können und so die nachfolgenden Schritte der Probenaufarbeitung für beide Zustände identisch sind, d.h. etwaiger Probenverlust immer beide Zustände betrifft. Die Anwendbarkeit der Methode ist jedoch mit einigen Ausnahmen, die kostenintensive Isotopendiäten erfordern (Kruger *et al.* 2008; Sury *et al.* 2010; Westman-Brinkmalm *et al.* 2011), auf die quantitative Analyse von Proteinen aus Zellkulturen beschränkt. Aufgrund dieser Limitation ist es notwendig für die quantitative Analyse von Proteinen aus Geweben, Organen oder primären Zellen auf alternative, nicht auf Zellkultur-beschränkte Markierungsverfahren zurückzugreifen.

Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die enzymatische ¹⁸O-Markierung in das entwickelte 2-D RP-RP LC-MS/MS Verfahren einzubetten. Dies würde einen wesentlichen Vorteil im Vergleich zu GeLC-MS-basierten ¹⁸O-Ansätzen darstellen. Für GeLC-MS Ansätze in Kombination mit enzymatischer ¹⁸O-Markierung werden die zu vergleichenden Proben zunächst separat mittels SDS-PAGE aufgetrennt, parallel in einzelne Banden geschnitten und erst während der tryptischen in-Gel Spaltung markiert. Das bedeutet, dass bei ¹⁸O-basierten GeLC-MS Ansätzen die zu vergleichenden Proben während des ersten Separationsschritts, der in-Gel-Spaltung und dem Extrahieren der Peptide aus der Gelmatrix quasi getrennt voneinander behandelt werden, was die Gefahr von Varianzen zwischen beiden Proben stark erhöht. Im Gegensatz dazu findet die enzymatische ¹⁸O-Markierung unter Verwendung des 2-D RP-RP LC-MS/MS Verfahrens direkt nach der Affinitätsreinigung durch tryptische *on-bead*bzw. in-Lösung-Spaltung statt. Das hat den Vorteil, dass die generierten ¹⁶O- und ¹⁸O-markierten Peptide bereits vor dem ersten Separationsschritt (erste Dimension LC) vereinigt werden können und Einflüsse aus nachfolgenden Separationsschritten immer beide Zustände betreffen.

Die ¹⁸O-Isotopenmarkierung ist eine vergleichsweise einfache und kostengünstige Quantifizierungsmethode, die auf der enzymatischen Markierung proteolytisch generierter Peptide mit schwerem Sauerstoff (¹⁸O) basiert. Eine essentielle Voraussetzung von Isotopenmarkierungsverfahren ist, dass diese Markierungen stabil sind. Kommt es zum Austausch bzw. zum Verlust der Markierung, wird das Verhältnis und somit das Ergebnis der Quantifizierung verändert. Die Herausforderung bei der enzymatischen ¹⁸O-Markierung ist, dass in Gegenwart von H₂¹⁶O ein enzym- und/oder säurekatalysierter Sauerstoffrücktausch der eingebauten ¹⁸O-Atome stattfinden kann (Staes *et al.* 2004; Storms *et al.* 2006; Sevinsky *et al.* 2007). Da die zu vergleichenden Proben (¹⁶O- und ¹⁸O-Peptide) spätestens vor der chromatographischen Trennung vereinigt in H₂¹⁶O vorliegen, muss das nach der Spaltung noch aktive Trypsin irreversibel inaktiviert werden. Dazu wurden in der Literatur bereits zahlreiche Methoden beschrieben, die entweder auf der Hitzedenaturierung des Trypsins (Qian *et al.* 2005; Petritis *et al.* 2009) oder auf der Blockierung des aktiven Zentrums durch die Zugabe von Serinproteaseinhibitoren (TLCK und AEBSF) basieren (Petra *et al.* 1965; Selwood *et al.* 2005). Untersuchungen für die optimalen Bedingungen der irreversiblen Inaktivierung des Trypsins bei 2-D RP-RP LC-MS/MS Ansätzen wurden von Sabine Anker im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (Anker 2011). Dazu wurden trypsinhaltige Modellpeptidproben entweder bei 95°C denaturiert (10-30 min) oder durch Inkubation mit 1 mM TLCK und AEBSF inhibiert (30 min-2 h). Beim Vergleich der beiden Serinproteaseinhibitoren konnte durch 30-minütige Inkubation mit 1 mM AEBSF bereits eine vollständige Trypsininhibierung beobachtet werden, während bei der Verwendung von 1 mM TLCK selbst nach 2-stündiger Inkubationszeit noch aktives Trypsin vorhanden war (Anker 2011). Eine vollständige Trypsininaktivierung konnte auch durch 30-minütige Hitzebehandlung beobachtet werden. Da diese Form der Inaktivierung des Trypsins ohne den Zusatz weiterer Reagenzien verläuft, wurde die 30-minütige Hitzedenaturierung auch in Verbindung mit der 2-D RP-RP LC-MS/MS

Die ¹⁸O-Markierung in Kombination mit 2-D RP-RP LC-MS/MS wurde zunächst für ADAP-595-Peptid-Pulldowns in Jurkat T-Zelllysat angewandt (vgl. Abschnitt 3.1.4). Analog zu Pulldown-Experimenten mit SILAC-Markierungsstrategie interagierte die Mehrzahl der mittels der ¹⁸O-Quantifizierungsmethode detektierten Proteine unabhängig von der Phosphorylierung mit den ADAP-595-Peptidkonstrukten, was sich in einem Isotopenverhältnis (¹⁸O/¹⁶O) um 1 wiederspiegelt. Während die Anzahl der Proteinidentifizierungen geringfügig niedriger ist als bei vergleichbaren SILAC-Ansätzen, wurde ungefähr die gleiche Anzahl proteinspezifischer Peptide identifiziert (¹⁸O: 1500 Proteine aus 20440 proteinspezifischen Peptiden, SILAC: 20440 Proteine aus 21302 proteinspezifischen Peptiden). Das kann darauf zurückgeführt werden, dass zum einen unterschiedliche Zelllysate für SILAC- und ¹⁸O-basierte *Pulldown*-Experimente verwendet wurden, die in ihrer Zusammensetzung und Konzentration leicht unterschiedlich sein können. Viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass die unterschiedliche Anzahl an Identifizierungen durch die Notwendigkeit der Verwendung unterschiedlicher Auswertesoftware für SILAC- und ¹⁸O-Quantifizierungen zustande kommt. Darüber hinaus ist die Sensitivität der Detektion von ¹⁶O-¹⁸O-Peptidpaaren aufgrund der sich überschneidenden Isotopenmuster im Vergleich zu SILAC-Peptidpaaren, die einen größeren Massenabstand aufweisen, reduziert. Deshalb kann es vor allem zu Verlusten von niedrig abundanten Proteinen mit einem ¹⁸O/¹⁶O-Verhältnis um 1 kommen. Im Vergleich zu *Pulldown*-Experimenten mit SILAC wurden mittels ¹⁸O-Markierung für Jurkat-Zellen, mit Ausnahme von PIK3R1 und CRKL, die gleichen phosphorylierungsspezifischen Bindungspartner an ADAP-595 nachgewiesen (zusammengefasst in Tabelle 3-2). Das Protein CRKL wurde nur in einem der durchgeführten Doppelexperimente phosphorylierungsspezifisch an ADAP-595 angereichert (H/L=9,6), während es im zweiten Experiment lediglich ein Isotopenverhältnis von 1,7 aufwies. Das Protein PIK3R1 wurde unter Verwendung der ¹⁸O- und 2-D RP-RP LC-MS/MS-Methodik im Doppelexperiment mit einem Isotopenverhältnis um 1 quantifiziert. Der Grund für die Abweichung der detektierten ¹⁸O/¹⁶O-Isotopenverhältnisse dieser beiden Proteine von denen zuvor mittels SILAC-ermittelten Verhältnissen kann nicht abschließend geklärt werden. Mögliche Gründe für das unterschiedliche Bindungsverhalten können zum einen in der Verwendung unterschiedlicher Zelllysate (Zusammensetzung und Konzentration), leichten Experiment-zu-Experiment Varianzen (z.B. durch unterschiedliche Inkubationsbedingungen, Waschschritte) oder zum anderen aufgrund des zugrundeliegenden Quantifizierungsalgorithmus falschnegative/falsch-positive Quantifizierungen sein.

Zusammenfassend kann jedoch festgehalten werden, dass die ¹⁸O-Quantifizierungsmethode eine gute Alternative zur stabilen Isotopenmarkierung in Zellkultur (SILAC) darstellt und abschließend für die Identifizierung phosphorylierungsabhängiger Interaktionspartner der ADAP-595 Sequenz in primären T-Zellen verwendet wurde.

Primäre T-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.5.5 beschrieben aus Vollblut isoliert, aufgeschlossen und das Zelllysat mit Tyr-595-phosphorylierten ADAP-Peptiden und der entsprechenden unmodifizierten Kontrolle inkubiert. Nach tryptischer on-bead Spaltung und Hitzedenaturierung des Trypsins erfolgte die Analyse der generierten Peptidgemische mittels 2-D RP-RP LC-MS/MS. Aus Primär-T-Zelllysat wurden insgesamt 6526 und 5390 proteinspezifische Peptide, die 575 und 515 verschiedenen Proteinen zugeordnet werden konnten, identifiziert. Verglichen mit den beschriebenen ¹⁸O-Pulldowns in Jurkat-Zelllysat, beträgt die Anzahl der Peptid- und Proteinidentifizierungen, unter sonst gleichen Bedingungen (gleiche eingesetzte Zellmenge, gleiche Pulldown Bedingungen, gleiche Fraktionierungsparameter), somit ungefähr ein Drittel. Vergleicht man die Zellgröße kultivierter Jurkat Zellen (Durchmesser: 12-20 µm) mit der Größe primärer T-Zellen (Durchmesser: 7-10 µm), so sieht man, dass diese stark voneinander abweichen können (Deng et al. 2003; Douglas et al. 2009; Looney et al. 2011). Da kultivierte Jurkat-Zellen im Extremfall um bis zu 2,8-mal größer als primäre T-Zellen sind, unterscheidet sich auch deren Proteingehalt um bis zu 2,8-mal. Da für beide Ansätze identische Zellmengen eingesetzt wurden, ist es nicht erstaunlich, dass sich die Anzahl der Proteinund Peptididentifizierungen für Jurkat- und primäre T-Zellen um zwei Drittel unterscheidet. Interessanterweise wurden selbst unter diesen Bedingungen mittels ¹⁸O-Markierung und 2-D RP-RP LC-MS/MS Analyse insgesamt 10 phosphorylierungsspezifische Bindungspartner an ADAP-595 identifiziert. Die phosphorylierungsabhängige Bindung von neun dieser Proteine wurde zuvor schon in Jurkat-T-Zellen mittels SILAC nachgewiesen (Abschnitt 3.1.3). Das Protein FER wurde in Primärzellen unter den gewählten Bedingungen nicht identifiziert. GRB2 wurde zusätzlich zu den bereits publizierten phosphorylierungsabhängigen Bindern an ADAP-595 in Primärzellen nachgewiesen.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten 2-D RP-RP Methodik in Kombination mit einem Fraktionierungsschema, mit dem Peptide mit verschiedenen Retentionseigenschaften vereinigt werden, um eine einfache, robuste und gut reproduzierbare Methode für Interaktomanalysen handelt. Die Methode eignet sich gleichermaßen zur quantitativen Bestimmung von spezifisch bindenden Proteinen in Anwesenheit einer großen Menge an Hintergrundproteinen mittels SILAC und ¹⁸O-Markierung.

4.2 Einfluss von Histonmodifizierungen

Histonmodifizierungen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Einzelne oder die Kombination mehrerer Histonmodifizierungen dienen als molekulare Schalter für viele DNA-assoziierte Prozesse (z.B. Chromatinkondensation, Genaktivität, DNA-Reparatur). Eine besondere Rolle hierbei nehmen Histonacetylierungen ein, die fast immer mit einer Genaktivierung einhergehen und somit ein Kennzeichen für transkriptionell aktives Chromatin darstellen (Brownell *et al.* 1996; Roh *et al.* 2005; Li *et al.* 2007a; Wang *et al.* 2008). Weniger eindeutig ist jedoch die Rolle der Histonmethylierungen. Während die Monomethylierungen von H3K4, H3K9, H3K27, H4K20, H2BK5 sowie die Trimethylierung von H3K4 mit einer Genaktivierung assoziiert sind (Euchromatin), kennzeichnen Trimethylierungen der Lysinreste 9 und 27 an Histon H3 inaktive Genabschnitte (Heterochromatin) (Bernstein *et al.* 2005; Barski *et al.* 2007; Guenther *et al.* 2007; Tian *et al.* 2011).

4.2.1 Einfluss auf Protein-Protein Wechselwirkungen

Aufgrund ihrer kombinatorischen Natur und der Assoziation der Histon PTMs mit dem Chromatinzustand hat sich die Theorie der Sprache kovalenter Histonmodifizierungen, die sog. Histon-Code-Theorie, entwickelt (Strahl und Allis 2000; Jenuwein und Allis 2001). Diese besagt, dass einzelne oder die Kombination mehrerer Histon PTMs als Erkennungsstelle für die Rekrutierung von Proteinen und Proteinkomplexen dienen, deren Zusammenwirken bestimmte biologische Prozesse reguliert. In Übereinstimmung mit der Histon-Code-Theorie wurden Proteindomänen (z.B. Chromo-, Tudor- oder Bromodomänen) für die spezifische Erkennung modifizierter Histonreste identifiziert (vgl. Abschnitt 1.1.6). Um ein besseres Verständnis der mechanistischen Rolle der Histonmodifizierungen bei der Kontrolle zellulärer Prozesse zu entwickeln ist es wichtig, nachgeschaltete Effektor-Proteine oder Histon-Code-Reader, die für die Erkennung verschiedener Histon PTMs und deren biologischen Folgen verantwortlich sind, zu identifizieren. Da Histonmethylierungen sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren der Gentranskription fungieren können, wurde in den vergangenen Jahren im Besonderen der Einfluss der Histonmethylierung auf die Rekrutierung von Proteinen und Proteinkomplexen untersucht. Für eine hypothesefreie, proteomweite Identifizierung von methylierungsabhängigen Histon-Interaktionspartner wurden zunehmend Affinitäts-Pulldown-Experimente in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt (Bartke et al. 2010; Vermeulen et al. 2010; Nikolov et al. 2011; Li et al. 2012). Da Wechselwirkungen zwischen bereits bekannten Effektor-Proteinen nur über kurze Sequenzbereiche (ca. 10 Aminosäuren) der Interaktionspartner vermittelt werden (Wysocka 2006) und lediglich die N- und C-terminalen Bereiche der Histonproteine im nukleosomalen Kontext frei zugänglich sind, konnten Peptidsequenzen, die auf diesen Bereichen basieren, als Köder für Affinitäts-Experimente verwendet werden. So wurden für verschieden methylierte H3- und H4-Peptide zahlreiche modifizierungsspezifische Interaktionspartner mit entsprechenden Bindungsmotiven identifiziert (Vermeulen et al. 2010; Li et al. 2012). Darüber hinaus konnten durch die native chemische Verknüpfung (Dawson et al. 1994; Dawson und Kent 2000) verschiedene methylierte H3-Peptide mit globulären H3-Domänen (Shogren-Knaak und Peterson 2004) oder ganzen Nukleosomen verknüpft werden (Bartke et al. 2010; Nikolov et al. 2011). Die Identifizierung von methylierungsvermittelten Bindungspartnern mit entsprechenden Erkennungsmotiven für methylierte Lysinreste sowie die Assoziation bestimmter Histonmodifizierungen mit aktiven bzw. inaktiven Genabschnitten sind Anhaltspunkte für die Histon-Code-Theorie. Dennoch kann die Funktion der Histonmethylierung auch durch strukturelle Alternativen geklärt werden. Als Beispiel hierzu dient die Trimethylierung an H3K9, welche eine epigenetische "Markierung" für Heterochromatinbereiche darstellt und als Bindungsstelle für das Heterochromatin-assoziierte Protein 1 (HP-1) fungiert (Jenuwein und Allis 2001). Bisher konnte allerdings nicht aufgeklärt werden, ob die Trimethylierung des H3-tails innerhalb der Chromatinstruktur erfolgt, was als "Schreiben" eines Codes interpretiert werden kann, oder bereits vor dem Nukleosomenaufbau am freien Histon H3, was den Aufbau der Heterochromatinstruktur bewirkt (Sarraf und Stancheva 2004; Henikoff 2005).

4.2.2 Einfluss auf transkriptioneller Ebene

Aufgrund ihrer besonderen Rolle bei der Genaktivierung stellt auch die mechanistische Funktion der Histonacetylierungen ein besonders interessantes Forschungsgebiet dar. Neben der bereits erwähnten Histon-Code-Theorie, wird in diesem Zusammenhang häufig die Ladungsneutralisierungs-Theorie diskutiert, die besagt, dass Histonacetylierungen einen direkten Einfluss auf die Chromatinstruktur haben, indem sie die positive Nettoladung des Histon-*tails* und somit die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen DNA-Rückgrat vermindern (McGhee *et al.* 1980; Norton *et al.* 1990). Dies resultiert in einer Öffnung des Chromatins (Tse *et al.* 1998; Wolffe und Hayes 1999) und einer damit verbundenen besseren Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren (Vettese-Dadey *et al.* 1996; Anderson *et al.* 2001).

Der Einfluss der Acetylierung auf die Genaktivität wurde insbesondere für den N-terminalen Bereich des Histons H4, welcher vier Acetylierungsstellen an Lys5, Lys8, Lys12 und Lys16 aufweist, untersucht (Megee et al. 1990; Park und Szostak 1990; Kurdistani et al. 2004; Dion et al. 2005). Diese Untersuchungen basieren auf der kombinatorischen Mutation der acetylierbaren Lysinreste (K5, K8, K12 und K16) zu Arginin, welches als nicht acetylierbares Mimetikum das positiv geladene, nicht acetylierte Lysin imitiert. Die anschließende Analyse der Genexpression mittels DNA-Mikroarray ergab, dass $K \rightarrow R$ Mutationen an den Positionen 5, 8 und 12 die Gesamtgenexpression kaum beeinflussen. Die Mutationen von K5R und K8R zeigten keinen Einfluss auf die Genexpression, K12R beeinflusste die Expression von 4 Genen. Der Einfluss der K→R Mutation auf die Genexpression wurde erhöht, wenn zwei oder drei Lysinreste an den Positionen 5, 8 und 12 durch Arginin ausgetauscht wurden. Der Austausch aller vier Lysine zu Arginin ist letal (Megee et al. 1990). Diese kumulativen Effekte korrelieren mit der Theorie der Ladungsneutralisierung. Im Gegensatz dazu hat der Lysin-Arginin-Austausch an der Position 16 einen großen Einfluss auf die Genexpression. Im Vergleich zum Wildtyp werden durch die K16R-Mutation insgesamt 125 Gene beeinflusst (Dion et al. 2005). Aus diesen Arbeiten kann man ableiten, dass die Effekte, die sich auf Genebene aufgrund verschiedener Histon H4-Acetylierungen ergeben, mit Ausnahme von K16 kumulativ sind und keinem "Code" entsprechen (Dion et al. 2005; Henikoff 2005). Es kann jedoch nicht abschließend unterschieden werden, ob die Effekte die sich aufgrund der Histonacetylierungen ergeben: a) der klassischen Theorie der Ladungsneutralisierung entsprechen, d.h. aus der Neutralisierung der positiven Ladung und der damit verbundenen besseren Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren resultieren, b) durch ladungsabhängige Protein-Protein-Interaktionen der Histonproteine hervorgerufen werden oder c) über die Interaktion von Proteinen, die Domänen für die Erkennung acetylierter Lysinreste (Bromodomänen) enthalten, vermittelt werden.

Aus diesem Grund bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die Rolle der Histon H4-Acetylierungen in einem kombinatorischen Ansatz auf Proteinebene zu untersuchen und damit die aufgrund der Nettoladung des Histon H4-*tails* vermittelten Protein-Protein-Interaktionen sowie acetylierungsspezifische, Bromodomänen-enthaltene, Bindungspartner zu identifizieren. Dazu wurden Affinitäts-*Pulldown*-Experimente mit verschieden acetylierten Histon H4-Peptiden in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt.

4.3 Identifizierung acetylierungsabhängiger Bindungspartner von Histon H4

Die Interaktion der Gcn5-Bromodomäne mit verschieden acetylierten Lysinen ist gut charakterisiert (Dhalluin et al. 1999; Hudson et al. 2000; Owen et al. 2000) und sollte als Modellsystem zur Validierung der eingesetzten Methoden untersucht werden. Die mittels NMR-Titration ermittelten Bindungsaffinitäten für mono- und vierfach acetylierte H4-Peptide lagen im Bereich von 80-380 µM. Im Vergleich zu Chromodomänen, die K_D Werte von 0,5-10 µM aufweisen (Hughes et al. 2007; Schalch et al. 2009), ist die Affinität der Gcn5-Bromodomän zu acetylierten Lysinen somit um 1-2 Größenordnungen geringer. Ähnlich moderate Bindungsaffinitäten wurden auch für andere Bromodomänen-Interaktionen beschrieben. Mit Ausnahme der Bindung an K12-acetylierte H4-Peptide (80 µM) konnten keine signifikanten Unterschiede des Bindungsverhaltens der Gcn5-Bromodomäne zu acetylierten Lysinresten des N-terminalen H4-Bereichs festgestellt werden. Dem zufolge scheint die Affinität der Gcn5-Bromodomäne für ausgewählte Lysinreste (K12Ac) spezifisch zu sein und lasst sich selbst in Gegenwart zusätzlicher Lysinacetylierungen (Tetraacetylierung) nicht erhöhen. Die Ergebnisse der NMR-Titrationsexperimente stimmen mit den experimentellen Daten aus isolierten Peptid-Pulldowns überein (vgl. Abbildung 3-10). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Methode der Peptid-basierten Pulldown-Experimente in der Lage ist acetylierungsabhängige Interaktionen in Gegenwart eines großen Überschusses an Hintergrundproteinen spezifisch nachzuweisen.

Für die Identifizierung von unbekannten, acetylierungsspezifischen Interaktionspartnern der Histon H4-Peptide wurden differenzielle *Pulldown*-Experimente mit modifizierten und entsprechend unmodifizierten Peptidsequenzen in SILAC-markiertem HeLa-S3 Zellkernextrakt durchgeführt. Die Identifizierung von Interaktionspartnern beschränkte sich auf Zellkernextrakt, da Chromatinassoziierte Prozesse im Zellkern stattfinden und die Komplexität des proteomischen Inputs somit reduziert werden konnte. Die HeLa-S3 Zelllinie wurde gewählt, weil sie nicht an die adhärente Zellkultivierung gebunden ist sondern auch in Suspension kultiviert werden kann, was die Zellausbeute erhöht. Peptid-*Pulldown*-Experimente wurden sowohl unter Verwendung des klassischen GeLC-MS/MS-Ansatzes als auch mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten 2-D RP-RP LC-MS/MS-Ansatz durchgeführt.

Für monoacetylierte Histon H4-Peptide konnte kein signifikanter Einfluss der Acetylierung auf die Rekrutierung von Proteinen- und Proteinkomplexen detektiert werden (vgl. Abschnitt 3.4.3). Die Mehrzahl aller identifizierten und quantifizierten Proteine aus Pulldown-Experimenten mit monoacetyliertem H4-Lys5, Lys8, Lys12 oder Lys16 interagiert unabhängig von der Acetylierung mit den Peptidkonstrukten, was sich in einem Isotopenverhältnis um den Wert 1 wiederspiegelt. Auch die Anzahl der quantifizierten Proteine aus zwei unabhängigen Pulldown-Experimenten mit monoacetylierten H4-Peptiden ist vergleichbar, wobei die Mehrzahl aller Proteine übereinstimmend in beiden Experimenten detektiert wurde (vgl. Abbildung 3-18). Dies lässt auf eine hohe Reproduzierbarkeit der durchgeführten Pulldown-Experimente und massenspektrometrischen Analysen rückschließen. Geringe Unterschiede in der Anzahl der Proteinidentifizierungen und -quantifizierungen ergeben sich aus unvermeidbaren kleinen Unterschieden in der Probenaufarbeitung. Lediglich für monoacetylierte H4K5- und H4K12-Peptide wurde das Protein MAD1 als acetylierungsabhängiger Bindungspartner mit Isotopenverhältnissen >2 in zwei unabhängigen Experimenten identifiziert. Das Spindelaufbau-Kontrollpunktprotein MAD1 (Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1) gehört zur der Gruppe der Myc/Max/Mad-Transkriptionsfaktoren, die zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung oder Apoptose regulieren (Grandori et al. 2000; Ge et al. 2010). Myc- und Max-Proteine bilden dabei Dimere aus, die an spezifische DNA-Sequenzen (5'-CACGTG-3') binden und somit die Genaktivierung sowie die Rekrutierung von HATs initiieren (Cole und Henriksson 2006). Proteine der Mad-Familie bilden ebenfalls Dimere mit Max-Proteinen aus, die jedoch durch ihre Bindung an die gleiche Promoterregion (5'-CACGTG-3') eine Geninaktivierung durch die Rekrutierung von HDACs und Kernrezeptor-Korepressoren bewirken (Ayer et al. 1995; Ge et al. 2010). Demzufolge ist MAD1 als Mitglied des Myc/Max/Mad-Netzwerkes direkt an der Histondeacetylierung, die zur Chromatinkondensation führt, beteiligt. Aufgrund der beschriebenen Interaktion der Mad/Max-Dimere mit chromosomaler DNA ist eine direkte Interaktion von MAD1 mit monoacetylierten H4K5- und H4K12-Peptiden unwahrscheinlich. Darüber hinaus beinhaltet die Proteinsequenz keine Bromodomäne. Mit einem maximalen Anreicherungsfaktor von 2,6 zählt das MAD1-Protein nicht zu hoch spezifischen Interaktionspartnern.

Neben MAD1 konnten keine weiteren acetylierungsabhängigen Interaktionspartner von monoacetylierten Histon H4-Peptiden identifiziert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Ausnahme der K16-Acetylierung mit den zuvor von Dion *et al.* beschriebenen Einflüssen der Acetylierung auf das Genexpressionsmuster überein (Dion *et al.* 2005). Während Dion *et al.* für die Monoacetylierung der Lysinreste 5, 8 oder 12 keine signifikante Änderung der Genexpression feststellen konnten, beeinflusste die Monoacetylierung an K16 die Genexpression in hohem Maße. Auf Proteinebene konnte dieser Effekt der K16-Acetylierung nicht bestätigt werden. Shogren-Knaak *et al.* haben gezeigt, dass die Acetylierung von H4K16 einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der 30 nm Chromatinfasern und somit höher geordneter Chromatinstrukturen hat (Shogren-Knaak *et al.* 2006; Shogren-Knaak und Peterson 2006). Dieser Einfluss hat eine starke Auswirkung auf die Genexpression, was mit den von Dion *et al.* publizierten Daten übereinstimmt, beeinflusst jedoch das Proteinbindungsverhalten nicht. Die Monoacetylierung an Histon H4 hat keinen signifikanten Einfluss auf das Bindungsverhalten.

In Übereinstimmung mit den beschriebenen kumulativen Effekten, die sich durch eine Bis- oder Triacetylierung auf das Genexpressionsmuster auswirken (Dion et al. 2005), unterschied sich auch auf Proteinebene das Bindungsverhalten an K5/12-bisacetylierte H4-Peptide stark von der nicht acetylierten Kontrolle. Die Ergebnisse aus SILAC-Pulldown-Experimenten mit K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden sind in Abschnitt 3.4.2 dargestellt. Sowohl die Anzahl von Proteinquantifizierungen im Doppelexperiment (reverse Markierungsstrategie) als auch deren Überschneidung ist in GeLC-MS/MS- und 2-D RP-RP LC-MS/MS-Experimenten reproduzierbar. Die Verteilung der Isotopenverhältnisse aus zwei unabhängigen Pulldown-Experimenten zeigt, dass ein großer Teil aller identifizierten und quantifizierten Proteine im Doppelexperiment Isotopenverhältnisse von <0,5 aufwiest. Das heißt, dass aufgrund der Bisacetylierung von H4-K5/12 ein Großteil der detektierten Proteine diskriminiert (abgereichert) wird, mit anderen Worten nicht mehr an das Peptidkonstrukt bindet. Da dieser Effekt für monoacetylierte H4-Peptide nicht beobachtet werden konnte, kann man auch auf Proteinebene von einem additiven Effekt der Acetylierung sprechen. Dieser Effekt lässt sich durchaus mit der Theorie der ladungsabhängigen Bindung in Einklang bringen. Die Verteilung der Isotopenverhältnisse aus diesen Pulldown-Experimenten zeigt weiterhin, dass die meisten anderen identifizierten Proteine um den Wert 1 verteilt sind, d.h. in gleichem Maß an das K5/12-bisacetylierte H4-Peptid und die nicht acetylierte Kontrolle binden.

Im Vergleich zu *Pulldown*-Experimenten mit monoacetylierten H4-Peptiden, in denen lediglich ein Protein acetylierungsspezifisch angereichert wurde, konnten an K5/12-bisacetylierte H4-Peptide fünf Proteine angereichert werden. Das Kriterium für eine Proteinanreicherung war, dass diese Proteine im Doppelexperiment übereinstimmend mit einem Isotopenverhältnis >2 quantifiziert wurden und dass sich die Ergebnisse aus GeLC-MS/MS- und 2-D RP-RP LC-MS/MS-Ansätzen nicht widersprachen.

Diskussion

Die potentiellen acetylierungsspezifischen Bindungspartner sollen im Folgenden hinsichtlich ihrer möglichen physiologischen Relevanz im chromosomalen Kontext diskutiert werden.

Keines der acetylierungsspezifisch angereicherten Proteine verfügt über eine Bromodomäne oder wurde zuvor in Zusammenhang mit Histonproteinen bzw. Histonacetylierungen beschrieben. Das Protein RPS17 gehört zur Gruppe der 40S-ribosomalen Proteine. Da ribosomale Proteine zuvor schon als unspezifische, an das Trägermaterial-bindende Proteine beschrieben wurden (Trinkle-Mulcahy *et al.* 2008), handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische (falsch-positive) Anreicherung an die Agarosematrix. Die vier anderen angereicherten Proteine (PUS1, TRMT1, DUS3L und TRM4) können in die Gruppe der tRNA-assoziierten Proteine eingeordnet werden. Über STRING 9.0-Analyse (Szklarczyk *et al.* 2011) konnte festgestellt werden, dass alle vier angereicherten Proteine über TRM4 miteinander interagieren (vgl. Abbildung 4-2).



Abbildung 4-2: Ergebnis der STRING-Analyse der an K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden angereicherten Proteine. Die Analyse erfolgte mit der STRING Datenbank 9.0 (string-db.org).

Die Interaktion mit dem bisacetylierten H4-tail verläuft möglicherweise über PUS1, während die anderen angereicherten Proteine sekundäre Bindungspartner von PUS1 sein könnten. Die Pseudouridinsynthase 1 (PUS1) katalysiert die Umwandlung von Uridinresten in tRNA-Abschnitten in das entsprechende C5-Glykosid-Isomer Pseudouridin (vgl. Abbildung 4-3B). Diese Umwandlung stellt eine der häufigsten posttranskriptionalen Modifizierungen dar (Gu et al. 1999; Hamma und Ferre-D'Amare 2006). Eine mögliche Erklärung, warum PUS1 auch an bisacetyliertem Histon H4 angereichert wurde, ist, dass zwei benachbarte acetylierte Lysinreste eine strukturelle Ähnlichkeit zu Uracil aufweisen (siehe Abbildung 4-3 A), d.h. als Pseudosubstrat erkannt werden. Unter diesen Umständen würde es sich um eine acetylierungsabhängige, jedoch artifizielle Bindung handeln. Die Bindung von PUS1 aus HeLa-S3 Zellkernextrakt an K5/12-bisacetylierte H4-Peptide konnte mittels Western Blot bestätigt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Bisacetylierung an Histon-H4 (K5/12) einen wesentlich größeren Einfluss auf das Proteinbindungsverhalten hat als eine Monoacetylierung. Die identifizierten Bindungspartner an K5/12-bisacetylierte H4-Peptide weisen Anreicherungsfaktoren bis 4 auf. Dementsprechend handelt es sich entweder um niedrig abundante Proteine oder um eine sehr schwache Bindung an die bisacetylierten H4-Peptide. Im Gegensatz dazu ist der Einfluss der zwei Acetylgruppen auf die Diskriminierung, d.h. Abreicherung von Proteinen, viel entscheidender. Eine mögliche Erklärung dieses Effektes ist, dass durch die Bisacetylierung des Histon H4-*tails* zwei positive Ladungen neutralisiert werden und ladungsabhängige Interaktionen nicht mehr vermittelt werden können. Im nukleosomalen Kontext wäre dies ein deutlicher Hinweis auf die Ladungsneutralisierungs-theorie.



Abbildung 4-3: Struktur acetylierter Lysinreste und möglicher Reaktionsmechanismus von PUS1. (A) Struktur von Lysin und Acetyllysin sowie die schematische Darstellung (*) der Bisacetylierung benachbarten Lysinreste (z.B. des H4). (B) Möglicher Reaktionsmechanismus für die Umsetzung von Uridin in Pseudouridin durch PUS1 (blau). Abbildung modifiziert nach Gu *et al.* 1999.

Einen ähnlichen Ladungseffekt, wie durch die Bisacetylierung hervorgerufen wird, erhält man auch indem man eine einzelne Aminosäure des N-terminalen Histon H4-*tails* phosphoryliert (Einführung zweier negativer Ladungen). Aus diesem Grund wurden *Pulldown*-Experimente mit dem an Serin 1

Diskussion

phosphorylierten H4-*tail* durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abschnitt 3.4.4 dargestellt. Im Gegensatz zu *Pulldown*-Experimenten mit K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden interagiert die Mehrzahl aller identifizierten und quantifizierten Proteine im selben Maß mit Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden und der unphosphorylierten Kontrolle. Das heißt, obwohl die positive Nettoladung des H4-*tails* durch die Phosphorylierung (Einführung zweier negativer Ladungen) in gleichem Maße reduziert wurde wie durch eine K5/12-Bisacetylierung (Neutralisierung zweier vorhandener positiver Ladungen), findet man kaum abgereicherte Proteine am phosphorylierten H4-*tail.* Das bedeutet, dass die Bisacetylierung neben der Ladungsneutralisierung möglicherweise noch einen anderen Effekt ausübt, der zur Diskriminierung von Proteinbindungen führt. Eine andere Erklärung hierfür ist, dass die Phosphorylierung am Serin 1 lediglich N-terminal "lokalisiert" ist, während sich die beiden acetylierten Lysine an Position 5 und 12 verteilen.

Im Doppelexperiment konnten drei phosphorylierungsvermittelte Interaktionspartner von H4 mit Proteinverhältnissen >2 in zwei unabhängigen Experimenten identifiziert werden. Interessanterweise wurden zwei dieser phopshorylierungsabhängigen Interaktionspartner (TRM4 und PUS1) bereits in Pulldown-Experimenten mit K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden angereichert. Dies ist ein Hinweis für eine ladungsabhängige Interaktion dieser Proteine mit dem H4-tail. Darüber hinaus wurde das WDrepeat enthaltende Protein 62 (WDR62) spezifisch am Ser1-phosphorylierten H4-tail angereichert. WDR62 ist ein Protein, das in den Aufbau der mitotischen Spindelpole involviert ist (Nicholas et al. 2010). Die Wechselwirkung des WDR62-Proteins mit Histonen bzw. Histonmodifizierungen wurde bisher noch nicht beschrieben. Dennoch ist das WDR-Protein ein interessanter Kandidat, da der Einfluss anderer WD-repeat enthaltender Proteine (z.B. WDR5) auf Histon-PTMs bereits beschrieben wurde. WDR5 ist ein Protein des MLL1/MLL-Komplexes und ist in die Methylierung und Demethylierung von H3-Lys4 involviert (Han et al. 2006; Patel et al. 2009). Darüber hinaus könnte WDR5 auch als Teil des NSL-Komplexes ebenso in die Acetylierung nukleosomaler H4-Proteine involviert sein (Guelman et al. 2009; Feller et al. 2012). Dementsprechend könnte das in Pulldown-Experimenten mit Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden angereicherte WDR62-Protein eine ähnliche Funktion wie WDR5 besitzen.

Der von Dion *et al.* beschriebene kumulative Effekt, den Lysinacetylierungen an Histon H4 auf die Genexpression ausüben (Dion *et al.* 2005), konnte mit den durchgeführten *Pulldown*-Experimenten auf Proteinebene bestätigt werden. Wie bereits diskutiert, führt die Bisacetylierung der Lysinreste 5 und 12 an Histon H4 zu einer eindeutigen Diskriminierung/Abreicherung vieler Proteine. Dieser additive Effekt wird in *Pulldown*-Experimenten mit vierfach acetylierten H4-Peptiden (K5, K8, K12 und

K16) noch deutlicher (vgl. Abschnitt 3.4.1). Die Verteilung der relativen Quantifizierungswerte dieser Pulldown-Experimente zeigen, dass der Großteil der Proteine nur an das nicht modifizierte H4-Peptid bindet. Die Anzahl der 1:1-Binder, d.h. Proteine die unabhängig von den Acetylierungen an beide Peptidkonstrukte binden, ist im Vergleich zu Pulldown-Experimenten mit mono- und bisacetylierten H4-Peptiden stark reduziert. Demzufolge hat die vierfache Acetylierung des H4-tails einen starken Einfluss auf das Bindungsverhalten und führt zur Diskriminierung zahlreicher Bindungspartner an H4. Wahrscheinlich ist die Abreicherung dieser großen Anzahl an Proteinen auf die Ladungsneutralisierung des H4-tails durch die Einführung von vier Acetylgruppen zurückzuführen. Da sich die Anzahl der abgereicherten Proteine im Vergleich zu K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden verstärkt hat, bestätigt sich auch in diesem Fall ein additiver Einfluss der Lysinacetylierung auf das H4-Bindungsverhalten. Die vierfache Acetylierung an H4 führt jedoch nicht ausschließlich zur Diskriminierung von Bindungspartnern, sondern auch zur Anreicherung weniger acetylierungsspezifisch interagierender Proteine an H4. So konnten 29 potentielle acetylierungsspezifische Interaktionspartner an vierfach acetylierte H4-Peptide mittels GeLC-MS/MS und 2-D RP-RP LC-MS/MS identifiziert werden (zusammengefasst in Tabelle 3-5). Die Bindungspartner wurden nach ihrer Funktion und Zugehörigkeit in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 4-4).

Interessanterweise wurden erneut tRNA-assoziierte Proteine (PUS1, TRMT61A und TRM6) mit vergleichsweise hohen Isotopenverhältnissen acetylierungsspezifisch angereichert (auch durch Western Blot bestätigt). Das bestätigt eine potentielle Erkennung von acetylierten Lysinresten als Pseudosubstrat von PUS1 und der damit assoziierten Proteine. Nicht zugeordnete Proteine weisen nach STRING-Analyse keine bekannten oder vorhergesagten Interaktionen miteinander bzw. mit anderen Proteinen aus dem Netzwerk auf. Einige dieser nicht zugeordneten Proteine (MYO1G, NOL7, CIRBP) sind bekannte Hintergrundproteine in Pulldown-Experimenten (Tweedie-Cullen et al. 2009) und sind vermutlich falsch-positive Ergebnisse unspezifischer Interaktoren. Die Interaktion der Proteine PDE12, TUT1, OLA1, ZFP91, C3orf26 und CMAS mit vierfach acetylierten Histon H4-Peptiden bzw. Histonproteinen im Allgemeinen wurde bisher nicht beschrieben. Da keines dieser Proteine über eine Bromodomäne für die spezifische Erkennung acetylierter Lysine verfügt, kann der Mechanismus bzw. die Funktion dieser Proteine im chromosomalen Kontext nicht geklärt werden. Das Protein Cyclin-T1 (CCNT1) konnte mittels STRING-Analyse nicht mit weiteren angereicherten Proteinen assoziiert werden, dennoch stellt es einen interessanten Bindungspartner an acetylierte Histone dar. Die Zellzyklus-regulierten Cycline bilden Komplexe mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und regulieren so deren Aktivität. Cyclin T1 ist die regulatorische Untereinheit des CDK9/ Cyclin-T1-Komplexes, der auch als P-TEFb-Komplex (positiver Elongationstranskriptionsfaktor b)

Diskussion

bekannt ist (Marshall und Price 1995). P-TEFb ist direkt an der eukaryotischen Genexpression beteiligt, indem es sowohl die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (Marshall *et al.* 1996; Peng *et al.* 1998) als auch die negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF phosphoryliert, was den Übergang von der arrestierten zur produktiven Elongation initiiert (Fujinaga *et al.* 2004; Yamada *et al.* 2006). Aktuelle Untersuchungen der Funktion von P-TEFb haben ergeben, dass die CDK9/Cyclin-T1-Kinase auch *S/T PXK*-Konsensussequenzen C-terminaler Histon H1-Bereiche, die die H1-Chromatinbindung regulieren, phosphoryliert (Hendzel *et al.* 2004; O'Brien *et al.* 2010). Demzufolge ist Cyclin-T1 als regulatorische Untereinheit des CDK9/Cyclin-T1-Kinasekomplexes eng mit Histon H1 assoziiert. In Übereinstimmung damit wurden neben Cyclin-T1 auch verschiedene Histon H1-Varianten (H1FX, HIST1H1C, HIST1H1D) am vierfach acetylierten H4-*tail* angereichert.



Abbildung 4-4: STRING-Analyse der Bindungspartner an vierfach acetylierte H4-Peptide. Netzwerk bekannter und vorhergesagter Interaktionen der angereicherten Proteine aus Peptid-*Pulldown*-Experimenten mit vierfach acetylierten H4-Peptiden sowie Einteilung in funktionelle Gruppen, erstellt mit STRING 9.0 (string-db.org).

Das Histon H1 (oder auch Linker-Histon) bindet an das Nukleosom und die umgebende DNA und ist maßgeblich an der Chromatinkondensation beteiligt (Woodcock *et al.* 2006). Das bedeutet, je nach Chromatinzustand existiert Histon H1 im ungebundenen (Euchromatin) oder gebundenen (Heterochromatin) Equilibrium, wobei ungebundenes H1 meist phosphoryliert vorliegt (Catez *et al.* 2006; O'Brien *et al.* 2010). Die Anreicherung von Cyclin-T1 am vierfach acetylierten H4-*tail* könnte demzufolge zu einer Rekrutierung von Histon H1 führen, welches im nukleosomalen Kontext betrachtet durch eine C-terminale Phosphorylierung eine offene/transkriptionell aktive Chromatinstruktur bewirkt. Unter dieser Voraussetzung würde Histon H1 über Cyclin-T1 einen sekundären Binder an vierfach acetylierte H4-Peptide darstellen.

Die Gruppe der mRNP (oder auch hnRNP)-Komplex Proteine, die ebenfalls an vierfach acetylierten H4-Peptiden angereichert wurden, besteht aus Chromatin-assoziierten, RNA-bindenden Proteinen, die vorwiegend mit Transkripten der RNA-Polymerase II interagieren (Krecic und Swanson 1999; Dreyfuss *et al.* 2002). Aufgrund ihrer direkten Interaktion mit Transkripten der RNA-Polymerase II sind diese Proteine nah mit der aktiven Gentranskription und somit auch der Histonacetylierung verknüpft. Da keines der identifizierten mRNP-Proteine eine Bromodomäne enthält, kann aufgrund der durchgeführten Experimente nicht geklärt werden, ob es sich um direkte Interaktionen mit vierfach acetylierten H4-Peptiden handelt. Die STRING-Analyse der Bindungspartner an vierfach acetylierte H4-Peptide (Abbildung 4-4) zeigt, dass die Splicing-assoziierten Proteine THOC4, U2AF1 und U2AF2 ebenfalls zur Gruppe der mRNP-Proteine gehören. Die acetylierungsabhängige Interaktion

In *Pulldown*-Experimenten mit vierfach acetylierten H4-Peptiden wurden außerdem vier Untereinheiten (TAF4, TAF5, TAF2E und TAF8) der TATA-Box Bindeprotein (TBP)-assoziierten Transkriptionsfaktoren angereichert. Alle vier identifizierten Proteine sind Untereinheiten des TFIID-Komplexes, der durch seine Bindung an die DNA die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription initiiert (Van Dyke *et al.* 1988; Buratowski *et al.* 1991). Von den identifizierten Untereinheiten des TFIID-Komplexes verfügt ein Protein (TAF8) über eine Bromodomäne. Da TAF8 jedoch nicht acetylierungsspezifisch in *Pulldown*-Experimenten mit monoacetylierten H4-Peptiden angereichert wurde, handelt es sich nicht um eine spezifische Bindung im Sinne der Histon-Code-Theorie. Dies wäre nur dann der Fall, wenn die TAF8-Bromodomäne in der Lage wäre zwei (oder mehr) acetylierte Lysinreste zu binden und dadurch eine höhere Affinität zu mehrfach acetylierten Histon-*tails* aufweisen würde. Die kooperative Bindung von zwei Acetyllysinen durch eine einzelne Bromodomäne wurde zuvor schon für das Protein Brdt1 beschrieben (Moriniere *et al.* 2009). Da die anderen identifizierten Untereinheiten keine Bromodomänen enthalten, handelt es sich möglicherweise um sekundäre Bindungspartner. Die acetylierungsabhängige Interaktion von TAF8 und TAF4 konnte mittels Western Blot verifiziert werden. Die Identifizierung der TAFs an vierfach acetylierten H4-tails lässt sich nicht mit der Theorie der Ladungsneutralisierung erklären, da die Untereinheiten scheinbar spezifisch über die TAF8-Bromodomäne mit den Peptiden interagieren. Diese Art der spezifischen Bindung konnte allerdings nur an vierfach acetylierten H4-Peptiden beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass die Acetylierung an Histon H4 einen additiven Effekt auf die Identifizierung von spezifischen Bindungspartnern hat. Möglicherweise können Mehrfachacetylierungen innerhalb eines H4-tails eine multivalente Wechselwirkung mit Effektorproteinen ausüben, die durch Monoacetylierungen blockiert werden. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurden in in vitro Experimenten Proteine identifiziert, die zwei oder mehrere Bromodomänen enthalten und eine höhere Affinität zu mehrfach acetylierten H4-Peptiden aufweisen (Jacobson et al. 2000; Taverna et al. 2007). In den durchgeführten Pulldown-Experimenten konnten Polybromodomänen-Proteine allerdings nicht eindeutig am vierfach acetylierten H4-tail angereichert werden. Das Protein PBRM1, das sechs Bromodomänen enthält, konnte zwar in einigen SILAC-basierten Ansätzen am vierfach acetylierten H4-tail angereichert werden, die acetylierungsabhängige Interaktion konnte im Western Blot jedoch nicht eindeutig verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die multivalente Interaktion mit mehrfach acetyliertem Histon H4 könnte allerdings auch über die Bindung mehrerer Untereinheiten eines Komplexes erfolgen, der dadurch stabilisiert wird.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die systematische Analyse des Aufbaus und der Regulierung komplexer Netzwerke ist wichtig um molekulare Zusammenhänge innerhalb einer Zelle und die damit verbundenen biologischen Funktionen und Regulierungsprozesse aufzuklären. Eine der wichtigsten Methoden zur proteomweiten Interaktomanalyse kombiniert Affinitäts-*Pulldown*-Experimente mit quantitativer Massenspektrometrie. Bei der Analyse dieser komplexen Proteinnetzwerke ist eine Fraktionierung der Probe vor der massenspektrometrischen Analyse unumgänglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die auf der enzymatischen Spaltung komplexer Proteingemische, gefolgt von der mehrdimensionalen chromatographischen Trennung der generierten Peptide, basiert. Die Methode beinhaltet die zweidimensionale RP-RP-Trennung komplexer Peptidgemische mit pH-sauren Elutionsbedingungen (0,1% TFA/0,1% FA) in beiden chromatographischen Dimensionen, was zu einer Steigerung der totalen Peakkapazität im Vergleich zu gängigen 2-D LC-Systemen führt. Durch die Verwendung eines Fraktionierungsschemas, das Peptide mit unterschiedlichen Retentionseigenschaften in der ersten Dimension vereinigt, wird die

Trenn- und somit die MS/MS-Kapazität in der zweiten Dimension optimal ausgenutzt.

Die Entwicklung und Validierung der 2-D RP_{0,1% TFA}-RP_{0,1% FA} LC-MS/MS Methode erfolgte zunächst an gut charakterisierten, Tyrosin 595-phosphorylierten Peptiden des T-Zelladaperproteins ADAP. In SILAC-basierten Peptid-*Pulldown*-Experimenten in Kombination mit der entwickelten 2-D RP-RP LC-MS/MS Methodik konnten 10 potentielle phosphorylierungsspezifische Interaktionspartner dieser Peptidsequenz identifiziert werden. Alle identifizierten Interaktionspartner sind SH2-Domänenproteine und bekannte Adapterproteine oder Kinasen im T-Zellrezeptor-proximalen Komplex und wurden zuvor schon als phosphorylierungsspezifische Bindungspartner dieser Peptidsequenz beschrieben. Die Analyse von phosphorylierungsabhängigen Bindungspartnern der ADAP-595-Sequenz in primären T-Zellen unter Verwendung der enzymatischen ¹⁸O-Markierung lieferte annähernd das gleiche Set an spezifischen Interaktionspartnern. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die 2-D RP-RP LC-MS/MS Methode ein einfaches, robustes, reproduzierbares und für alternative Markierungsverfahren zugängliches Verfahren für die Interaktomanalyse darstellt.

Im weiteren Verlauf wurde die 2-D RP-RP LC-MS/MS Methodik für die Interaktomanalyse verschieden acetylierter Histon H4-Peptide eingesetzt. Die durchgeführten Peptid-Pulldown-Experimente bestätigten additive Effekte der Histonacetylierung auf das Bindungsverhalten. Demzufolge führten Monoacetylierungen an H4 kaum zu einer Veränderung des Bindungsverhaltens im Vergleich zur unmodifizierten Kontrolle, d.h. es konnten keine acetylierungsspezifischen Interaktionspartner identifiziert werden. Die K5/12-Bisacetylierung von H4 bewirkte eine Diskriminierung/ Abreicherung vieler Proteine. Dieser Effekt wurde verstärkt auch für vierfach acetylierte H4-Peptide beobachtet. Die Diskriminierungseffekte resultieren wahrscheinlich aus der Ladungsneutralisierung der H4-tails als Folge der Lysinacetylierungen. Da jedoch darüber hinaus auch potentielle, acetylierungsabhängige Interaktionspartner an mehrfach acetylierte H4-Peptide identifiziert werden konnten, kann die Lysinacetylierung nicht ausschließlich als Werkzeug der Ladungsneutralisierung angesehen werden. So konnten an K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden verschiedene tRNA-assoziierte Proteine spezifisch angereichert werden. Die Rolle dieser Proteine im chromosomalen Kontext konnte nicht geklärt werden, weshalb eine unspezifische Interaktion über PUS1, welches mehrfach acetylierte Lysinreste als Pseudosubstrat erkennen könnte, vermutet wird. An vierfach acetylierte H4-Peptide konnten 29 potentielle Interaktionspartner identifiziert werden, wovon die Mehrzahl bekannte Chromatin- sowie RNA-Polymerase II-Interaktoren darstellen. Lediglich eines der acetylierungsabhängigen Interaktionspartner (TAF8) enthält eine Bromodomäne, die die spezifische Interaktion mit acetylierten Lysinresten vermittelt.

Es kann zusammengefasst werden, dass die im Rahmen der Arbeit gesetzten Ziele erreicht wurden. Die entwickelte 2-D RP-RP Methodik in Kombination mit verschiedenen quantitativen Massenspektrometrieverfahren erwies sich als einfaches, robustes und reproduzierbares Verfahren für die Interaktomanalyse phosphorylierter ADAP-Sequenzen und acetylierter Histon H4-Sequenzen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Peptid-*Pulldown*-Experimente bestätigen, dass quantitative proteomweite Interaktionsanalysen einen wertvollen Beitrag leisten können, um potentielle acetylierungsspezifische Interaktionspartner zu identifizieren.

Zukünftige Experimente könnten die Interaktomanalyse der acetylierten H4-Peptidsequenzen unter Einbeziehung weiterer bekannter Histon H4-Modifizierungen (Methylierung an K20 und/oder R3, Phosphorylierung an S1) umfassen. Darüber hinaus wäre die proteomweite Interaktomanalyse im nukleosomalen Kontext über semisynthetische Ansätze (z.B. native chemische Verknüpfung) denkbar. Diese Vorgehensweise könnte das Interaktom unter nahezu physiologischen Bedingungen (in Gegenwart von DNA) identifizieren und weitere Aufschlüsse über die Rolle der Histonacetylierungen als Werkzeug der Ladungsneutralisierung oder Erkennungsstelle für Effektorproteine liefern.

5 Literatur

Aebersold, R., Goodlett, D. R. "Mass spectrometry in proteomics." <u>Chem Rev</u> (2001) 101(2): 269-295.

Aebersold, R., Mann, M. "Mass spectrometry-based proteomics." <u>Nature (2003)</u> 422(6928): 198-207.

Allard, S., Utley, R. T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C. J., Pillus, L., Workman, J. L., Cote, J. "NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p." <u>EMBO J (1999)</u> 18(18): 5108-5119.

Allfrey, V. G., Faulkner, R., Mirsky, A. E. "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1964) 51: 786-794.

Allis, C. D., Chicoine, L. G., Richman, R., Schulman, I. G. "Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1985) 82(23): 8048-8052.

Anderson, J. D., Lowary, P. T., Widom, J. "Effects of histone acetylation on the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites." J Mol Biol (2001) 307(4): 977-985.

Angelov, D., Vitolo, J. M., Mutskov, V., Dimitrov, S., Hayes, J. J. "Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA." Proc Natl Acad Sci U S A (2001) 98(12): 6599-6604.

Anker, S. "Untersuchung zur Stabilität von 18O-Isotopen-markierten Proteinen", Masterarbeit, <u>Beuth</u> <u>Hochschuhe für Technik Berlin</u>.(2011)

Annunziato, A. T., Frado, L. L., Seale, R. L., Woodcock, C. L. "Treatment with sodium butyrate inhibits the complete condensation of interphase chromatin." <u>Chromosoma (1988)</u> 96(2): 132-138.

Apffel, A., Fischer, S., Goldberg, G., Goodley, P. C., Kuhlmann, F. E. "Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases." <u>J Chromatogr A (1995)</u> 712(1): 177-190.

Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., Moudrianakis, E. N. "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> (1991) 88(22): 10148-10152.

Arents, G., Moudrianakis, E. N. "The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **(1995)** 92(24): 11170-11174.

Ayer, D. E., Lawrence, Q. A., Eisenman, R. N. "Mad-Max Transcriptional Repression Is Mediated by Ternary Complex-Formation with Mammalian Homologs of Yeast Repressor Sin3." <u>Cell (1995)</u> 80(5): 767-776.

Bahr, U., Karas, M., Hillenkamp, F. "Analysis of Biopolymers by Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization (Maldi) Mass-Spectrometry." <u>Fresenius Journal of Analytical Chemistry</u> (1994) 348(12): 783-791.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., Kouzarides, T. "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." <u>Nature</u> (2001) 410(6824): 120-124.

Bannister, A. J., Schneider, R., Kouzarides, T. "Histone methylation: dynamic or static?" <u>Cell (2002)</u> 109(7): 801-806.

Bannister, A. J., Kouzarides, T. "Reversing histone methylation." <u>Nature (2005)</u> 436(7054): 1103-1106.

Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B. "Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review." <u>Anal Bioanal Chem</u> (2007) 389(4): 1017-1031.

Barber, C. M., Turner, F. B., Wang, Y., Hagstrom, K., Taverna, S. D., Mollah, S., Ueberheide, B., Meyer, B. J., Hunt, D. F., Cheung, P., Allis, C. D. "The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved." <u>Chromosoma (2004)</u> 112(7): 360-371.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K. "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome." <u>Cell (2007)</u> 129(4): 823-837.

Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S. C., Mann, M., Kouzarides, T. "Nucleosomeinteracting proteins regulated by DNA and histone methylation." <u>Cell (2010)</u> 143(3): 470-484.

Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J., Woodcock, C. L. "Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1998) 95(24): 14173-14178.

Berggard, T., Linse, S., James, P. "Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions." <u>Proteomics (2007)</u> 7(16): 2833-2842.

Bernstein, B. E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Huebert, D. J., McMahon, S., Karlsson, E. K., Kulbokas, E. J., 3rd, Gingeras, T. R., Schreiber, S. L., Lander, E. S. "Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse." <u>Cell (2005)</u> 120(2): 169-181.

Besant, P. G., Attwood, P. V. "Detection of a mammalian histone H4 kinase that has yeast histidine kinase-like enzymic activity." Int J Biochem Cell Biol (2000) 32(2): 243-253.

Besant, P. G., Tan, E., Attwood, P. V. "Mammalian protein histidine kinases." <u>Int J Biochem Cell Biol</u> (2003) 35(3): 297-309.

Bhaumik, S. R., Smith, E., Shilatifard, A. "Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis." <u>Nat Struct Mol Biol</u> (2007) 14(11): 1008-1016.

Biel, M., Wascholowski, V., Giannis, A. "Epigenetik - ein Epizentrum der Genregulation: Histone und histonmodifizierende Enzyme." <u>Angew. Chem. (2005)</u> 117(21): 3248-3280.

Bjerrum, O. J., Schafer-Nielsen, C. "Analytical Electrophoresis", Weinheim, Verlag Chemie (1986).

Borrow, J., Stanton, V. P., Jr., Andresen, J. M., Becher, R., Behm, F. G., Chaganti, R. S., Civin, C. I., Disteche, C., Dube, I., Frischauf, A. M., Horsman, D., Mitelman, F., Volinia, S., Watmore, A. E., Housman, D. E. "The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein." Nat Genet (1996) 14(1): 33-41.

Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., Allis, C. D. "Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation." <u>Cell (1996)</u> 84(6): 843-851.

Buggy, J. J., Sideris, M. L., Mak, P., Lorimer, D. D., McIntosh, B., Clark, J. M. "Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8." <u>Biochem J</u> (2000) 350 Pt 1: 199-205.

Buratowski, S., Sopta, M., Greenblatt, J., Sharp, P. A. "RNA polymerase II-associated proteins are required for a DNA conformation change in the transcription initiation complex." <u>Proc Natl Acad Sci U</u> <u>S A (1991)</u> 88(17): 7509-7513.

Carpino, L. A., Han, G. Y. "9-Fluorenylmethoxycarbonyl fundtion, a new base-sensitive amino-protecting group." J. Am. Chem. Soc (1970) 92(19): 5748-5749.

Casas-Delucchi, C. S., Brero, A., Rahn, H. P., Solovei, I., Wutz, A., Cremer, T., Leonhardt, H., Cardoso, M. C. "Histone acetylation controls the inactive X chromosome replication dynamics." <u>Nat Commun</u> (2011) 2: 222.

Catez, F., Ueda, T., Bustin, M. "Determinants of histone H1 mobility and chromatin binding in living cells." <u>Nat Struct Mol Biol</u> (2006) 13(4): 305-310.

Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G. I., Rance, M., Skelton, N. J. "Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice", California, USA, <u>Elsevier Academic Press</u> (2007).

Chahal, S. S., Matthews, H. R., Bradbury, E. M. "Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function." <u>Nature (1980)</u> 287(5777): 76-79.

Cheung, W. L., Turner, F. B., Krishnamoorthy, T., Wolner, B., Ahn, S. H., Foley, M., Dorsey, J. A., Peterson, C. L., Berger, S. L., Allis, C. D. "Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in S. cerevisiae." <u>Curr Biol</u> (2005) 15(7): 656-660.

Chin, H. G., Patnaik, D., Esteve, P. O., Jacobsen, S. E., Pradhan, S. "Catalytic properties and kinetic mechanism of human recombinant Lys-9 histone H3 methyltransferase SUV39H1: participation of the chromodomain in enzymatic catalysis." <u>Biochemistry</u> **(2006)** 45(10): 3272-3284.

Chwang, W. B., O'Riordan, K. J., Levenson, J. M., Sweatt, J. D. "ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning." <u>Learn Mem</u> **(2006)** 13(3): 322-328.

Chwang, W. B., Arthur, J. S., Schumacher, A., Sweatt, J. D. "The nuclear kinase mitogen- and stressactivated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation." J <u>Neurosci (2007)</u> 27(46): 12732-12742.

Cole, M. D., Henriksson, M. "25 years of the c-Myc oncogene." <u>Semin Cancer Biol</u> (2006) 16(4): 241.

Cosgrove, M. S., Boeke, J. D., Wolberger, C. "Regulated nucleosome mobility and the histone code." <u>Nat Struct Mol Biol</u> (2004) 11(11): 1037-1043.

Cox, J., Mann, M. "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." <u>Nat Biotechnol</u> **(2008)** 26(12): 1367-1372.

Cox, J., Matic, I., Hilger, M., Nagaraj, N., Selbach, M., Olsen, J. V., Mann, M. "A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics." <u>Nat Protoc</u> **(2009)** 4(5): 698-705.

Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., Mann, M. "Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment." <u>J Proteome Res</u> (2011) 10(4): 1794-1805.

Crews, S. T., Fan, C. M. "Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins." <u>Curr Opin Genet Dev (1999)</u> 9(5): 580-587.

Cruickshank, M. N., Besant, P., Ulgiati, D. "The impact of histone post-translational modifications on developmental gene regulation." <u>Amino Acids (2010)</u> 39(5): 1087-1105.

Csordas, A. "On the biological role of histone acetylation." <u>Biochem J (1990)</u> 265(1): 23-38.

da Silva, A. J., Janssen, O., Rudd, C. E. "T cell receptor zeta/CD3-p59fyn(T)-associated p120/130 binds to the SH2 domain of p59fyn(T)." J Exp Med (1993) 178(6): 2107-2113.

Dangond, F., Hafler, D. A., Tong, J. K., Randall, J., Kojima, R., Utku, N., Gullans, S. R. "Differential display cloning of a novel human histone deacetylase (HDAC3) cDNA from PHA-activated immune cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> (1998) 242(3): 648-652.

Davey, C. A., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W., Richmond, T. J. "Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution." J Mol Biol (2002) 319(5): 1097-1113.

Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S. B. "Synthesis of proteins by native chemical ligation." <u>Science (1994)</u> 266(5186): 776-779.

Dawson, P. E., Kent, S. B. "Synthesis of native proteins by chemical ligation." <u>Annu Rev Biochem</u> (2000) 69: 923-960.

de Godoy, L. M., Olsen, J. V., de Souza, G. A., Li, G., Mortensen, P., Mann, M. "Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system." <u>Genome Biol</u> (2006) 7(6): R50.

de la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, S., Martinez-Balbas, M. A. "Do protein motifs read the histone code?" <u>Bioessays</u> (2005) 27(2): 164-175.

Deane, C. M., Salwinski, L., Xenarios, I., Eisenberg, D. "Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations." <u>Mol Cell Proteomics</u> **(2002)** 1(5): 349-356.

Deleenheer, A. P., Thienpont, L. M. "Applications of Isotope-Dilution Mass-Spectrometry in Clinical-Chemistry, Pharmacokinetics, and Toxicology." <u>Mass Spectrometry Reviews</u> (1992) 11(4): 249-307.

Deng, J., Schoenbach, K. H., Buescher, E. S., Hair, P. S., Fox, P. M., Beebe, S. J. "The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells." <u>Biophys J</u> (2003) 84(4): 2709-2714.

Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., Zhou, M. M. "Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain." <u>Nature (1999)</u> 399(6735): 491-496.

Dignam, J. D., Martin, P. L., Shastry, B. S., Roeder, R. G. "Eukaryotic gene transcription with purified components." <u>Methods Enzymol (1983)</u> 101: 582-598.

Dion, M. F., Altschuler, S. J., Wu, L. F., Rando, O. J. "Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (2005) 102(15): 5501-5506.

Douglas, E. S., Hsiao, S. C., Onoe, H., Bertozzi, C. R., Francis, M. B., Mathies, R. A. "DNA-barcode directed capture and electrochemical metabolic analysis of single mammalian cells on a microelectrode array." Lab Chip (2009) 9(14): 2010-2015.

Dreyfuss, G., Kim, V. N., Kataoka, N. "Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry." <u>Nature Reviews Molecular Cell Biology</u> (2002) 3(3): 195-205.

Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al-Abed, Y., Verdin, E. "Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1998) 95(6): 2795-2800.

Ernoult, E., Gamelin, E., Guette, C. "Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation." <u>Proteome Science (2008)</u> 6.

Feller, C., Prestel, M., Hartmann, H., Straub, T., Soding, J., Becker, P. B. "The MOF-containing NSL complex associates globally with housekeeping genes, but activates only a defined subset." <u>Nucleic</u> <u>Acids Res (2012)</u> 40(4): 1509-1522.

Felsenfeld, G., Groudine, M. "Controlling the double helix." <u>Nature (2003)</u> 421(6921): 448-453.

Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. "Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules." <u>Science (1989)</u> 246(4926): 64-71.

Fenselau, C., Yao, X. "18O2-labeling in quantitative proteomic strategies: a status report." J Proteome Res (2009) 8(5): 2140-2143. Finehout, E. J., Cantor, J. R., Lee, K. H. "Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin." <u>Proteomics (2005)</u> 5(9): 2319-2321.

Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., Pavletich, N. P. "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." <u>Nature (1999)</u> 401(6749): 188-193.

Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M. J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W., Verdin, E. "A new family of human histone deacetylases related to Saccharomyces cerevisiae HDA1p." J Biol Chem (1999) 274(17): 11713-11720.

Fischle, W., Wang, Y., Allis, C. D. "Histone and chromatin cross-talk." <u>Curr Opin Cell Biol</u> (2003) 15(2): 172-183.

Fischle, W. "Epigenetics: Regulation of gene activity by histone modifications " <u>Forschungsbericht</u> **(2009)** Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie.

Flicek, P., Aken, B. L., Beal, K., Ballester, B., Caccamo, M., Chen, Y., Clarke, L., Coates, G., Cunningham, F., Cutts, T., Down, T., Dyer, S. C., Eyre, T., Fitzgerald, S., Fernandez-Banet, J., Graf, S., Haider, S., Hammond, M., Holland, R., Howe, K. L., Howe, K., Johnson, N., Jenkinson, A., Kahari, A., Keefe, D., Kokocinski, F., Kulesha, E., Lawson, D., Longden, I., Megy, K., Meidl, P., Overduin, B., Parker, A., Pritchard, B., Prlic, A., Rice, S., Rios, D., Schuster, M., Sealy, I., Slater, G., Smedley, D., Spudich, G., Trevanion, S., Vilella, A. J., Vogel, J., White, S., Wood, M., Birney, E., Cox, T., Curwen, V., Durbin, R., Fernandez-Suarez, X. M., Herrero, J., Hubbard, T. J., Kasprzyk, A., Proctor, G., Smith, J., Ureta-Vidal, A., Searle, S. "Ensembl 2008." <u>Nucleic Acids Res (2008)</u> 36(Database issue): D707-714.

Frenster, J. H., Allfrey, V. G., Mirsky, A. E. "Repressed and Active Chromatin Isolated from Interphase Lymphocytes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A (1963)</u> 50: 1026-1032.

Frye, R. A. "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun (1999)</u> 260(1): 273-279.

Frye, R. A. "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> (2000) 273(2): 793-798.

Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., Peterlin, B. M. "Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element." <u>Mol Cell Biol (2004)</u> 24(2): 787-795.

Fukuda, H., Sano, N., Muto, S., Horikoshi, M. "Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression." <u>Brief Funct Genomic Proteomic (2006)</u> 5(3): 190-208.

Gasser, S. M., Cockell, M. M. "The molecular biology of the SIR proteins." Gene (2001) 279(1): 1-16.

Ge, Z., Li, W., Wang, N., Liu, C., Zhu, Q., Bjorkholm, M., Gruber, A., Xu, D. "Chromatin remodeling: recruitment of histone demethylase RBP2 by Mad1 for transcriptional repression of a Myc target gene, telomerase reverse transcriptase." <u>FASEB J</u> (2010) 24(2): 579-586.

Gerber, S. A., Kettenbach, A. N., Rush, J., Gygi, S. P. "The absolute quantification strategy: application to phosphorylation profiling of human separase serine 1126." <u>Methods Mol Biol</u> (2007) 359: 71-86.

Gilar, M., Olivova, P., Daly, A. E., Gebler, J. C. "Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions." <u>J Sep Sci</u> (2005a) 28(14): 1694-1703.

Gilar, M., Olivova, P., Daly, A. E., Gebler, J. C. "Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography." <u>Anal Chem (2005b)</u> 77(19): 6426-6434.

Gokce, E., Andrews, G. L., Dean, R. A., Muddiman, D. C. "Increasing proteome coverage with offline RP HPLC coupled to online RP nanoLC-MS." <u>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci</u> (2011) 879(9-10): 610-614.

Gorg, A., Weiss, W., Dunn, M. J. "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics." <u>Proteomics (2004)</u> 4(12): 3665-3685.

Goshe, M. B., Smith, R. D. "Stable isotope-coded proteomic mass spectrometry." <u>Curr Opin</u> <u>Biotechnol</u> (2003) 14(1): 101-109.

Govin, J., Schug, J., Krishnamoorthy, T., Dorsey, J., Khochbin, S., Berger, S. L. "Genome-wide mapping of histone H4 serine-1 phosphorylation during sporulation in Saccharomyces cerevisiae." <u>Nucleic Acids Res</u> (2010) 38(14): 4599-4606.

Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., Eisenman, R. N. "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior." <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u> (2000) 16: 653-699.

Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L., Workman, J. L. "Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex." <u>Genes Dev</u> (1997) 11(13): 1640-1650.

Granvogl, B., Ploscher, M., Eichacker, L. A. "Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics." <u>Anal Bioanal Chem</u> **(2007)** 389(4): 991-1002.

Gray, S. G., Ekstrom, T. J. "The human histone deacetylase family." Exp Cell Res (2001) 262(2): 75-83.

Gropengiesser, J., Varadarajan, B. T., Stephanowitz, H., Krause, E. "The relative influence of phosphorylation and methylation on responsiveness of peptides to MALDI and ESI mass spectrometry." J Mass Spectrom (2009) 44(5): 821-831.

Grozinger, C. M., Hassig, C. A., Schreiber, S. L. "Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1999) 96(9): 4868-4873.

Grunstein, M. "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." <u>Nature (1997)</u> 389(6649): 349-352.

Gu, X. R., Liu, Y. Q., Santi, D. V. "The mechanism of pseudouridine synthase I as deduced from its interaction with 5-fluorouracil-tRNA." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United</u> <u>States of America (1999)</u> 96(25): 14270-14275.

Guelman, S., Kozuka, K., Mao, Y. F., Pham, V., Solloway, M. J., Wang, J., Wu, J. S., Lill, J. R., Zha, J. P. "The Double-Histone-Acetyltransferase Complex ATAC Is Essential for Mammalian Development." <u>Molecular and Cellular Biology</u> (2009) 29(5): 1176-1188.

Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R., Young, R. A. "A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells." <u>Cell (2007)</u> 130(1): 77-88.

Gururaja, T. L., Li, W., Payan, D. G., Anderson, D. C. "Utility of peptide-protein affinity complexes in proteomics: identification of interaction partners of a tumor suppressor peptide." <u>J Pept Res</u> (2003) 61(4): 163-176.

Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R. "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags." <u>Nat Biotechnol</u> (**1999**) 17(10): 994-999.

Hamma, T., Ferre-D'Amare, A. R. "Pseudouridine synthases." Chem Biol (2006) 13(11): 1125-1135.

Han, Z., Guo, L., Wang, H., Shen, Y., Deng, X. W., Chai, J. "Structural basis for the specific recognition of methylated histone H3 lysine 4 by the WD-40 protein WDR5." <u>Mol Cell</u> (2006) 22(1): 137-144.

Happel, N., Schulze, E., Doenecke, D. "Characterisation of human histone H1x." <u>Biol Chem</u> (2005) 386(6): 541-551.

Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M., Hottiger, M. O. "Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?" <u>Microbiol Mol Biol Rev</u> (2006) 70(3): 789-829.

Hassan, A. H., Awad, S., Prochasson, P. "The Swi2/Snf2 bromodomain is required for the displacement of SAGA and the octamer transfer of SAGA-acetylated nucleosomes." J Biol Chem (2006) 281(26): 18126-18134.

Hendzel, M. J., Lever, M. A., Crawford, E., Th'ng, J. P. H. "The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo." Journal of Biological Chemistry (2004) 279(19): 20028-20034.

Henikoff, S. "Histone modifications: combinatorial complexity or cumulative simplicity?" <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A (2005)</u> 102(15): 5308-5309.

Hershko, A., Ciechanover, A., Varshavsky, A. "Basic Medical Research Award. The ubiquitin system." Nat Med (2000) 6(10): 1073-1081.

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. "Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes." <u>Cell</u> (2000) 102(3): 279-291.

Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G. F., Johanson, K., Sung, C. M., Liu, R., Winkler, J. "Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor." J Biol Chem (2000) 275(20): 15254-15264.

Huber, C. G., Premstaller, A. "Evaluation of volatile eluents and electrolytes for high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis-

electrospray ionization mass spectrometry of proteins - I. Liquid chromatography." <u>Journal of</u> <u>Chromatography A (1999)</u> 849(1): 161-173.

Hudson, B. P., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., Wright, P. E. "Solution structure and acetyllysine binding activity of the GCN5 bromodomain." <u>J Mol Biol</u> (2000) 304(3): 355-370.

Hughes, R. M., Wiggins, K. R., Khorasanizadeh, S., Waters, M. L. "Recognition of trimethyllysine by a chromodomain is not driven by the hydrophobic effect." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> (2007) 104(27): 11184-11188.

Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., Guarente, L. "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." <u>Nature (2000)</u> 403(6771): 795-800.

Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S., Tjian, R. "Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module." <u>Science (2000)</u> 288(5470): 1422-1425.

Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R., Reuter, G. "SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin." <u>Cell Mol Life Sci (1998)</u> 54(1): 80-93.

Jenuwein, T., Allis, C. D. "Translating the histone code." <u>Science (2001)</u> 293(5532): 1074-1080.

Karas, M., Bachmann, D., Hillenkamp, F. "Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet-Laser Desorption Mass-Spectrometry of Organic-Molecules." <u>Analytical Chemistry</u> **(1985)** 57(14): 2935-2939.

Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F. "Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds." <u>International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes</u> (1987) 78: 53-68.

Karas, M., Hillenkamp, F. "Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons." <u>Analytical Chemistry</u> (1988) 60(20): 2299-2301.

Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N., Stillman, B. "The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication." <u>Cell</u> (1995) 81(7): 1105-1114.

Kim, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., Zhang, Y., Bedford, M. T. "Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation." <u>EMBO Rep</u> (2006) 7(4): 397-403.

Klose, J. "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals." <u>Humangenetik</u> **(1975)** 26(3): 231-243.

Kornberg, R. D. "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." <u>Science</u> (1974) 184(4139): 868-871.

Koshibu, K., Graff, J., Beullens, M., Heitz, F. D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M., Mansuy, I. M. "Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory." <u>J Neurosci</u> (2009) 29(41): 13079-13089.

Kossel, A. "Über einen peptoartigen Bestandteil des Zellkern." Z. Physiol. Chem (1884) 8: 511–515.

Kouzarides, T. "Chromatin modifications and their function." <u>Cell (2007)</u> 128(4): 693-705.

Kraus, W. L., Manning, E. T., Kadonaga, J. T. "Biochemical analysis of distinct activation functions in p300 that enhance transcription initiation with chromatin templates." <u>Mol Cell Biol</u> (1999) 19(12): 8123-8135.

Krause, E. Proteomics. <u>Encyclopedia of Molecular Pharmacology</u>. Offermann, S. and Rosenthal, W. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag **(2008)**.

Krause, M., Sechi, A. S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F. B., Wehland, J. "Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton." <u>J Cell Biol</u> **(2000)** 149(1): 181-194.

Krecic, A. M., Swanson, M. S. "hnRNP complexes: composition, structure, and function." <u>Curr Opin</u> <u>Cell Biol (1999)</u> 11(3): 363-371.

Krishna, R. G., Wold, F. "Post-translational modification of proteins." <u>Adv Enzymol Relat Areas Mol</u> <u>Biol (1993)</u> 67: 265-298.

Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W. L., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, C. D., Guacci, V., Khochbin, S., Fuller, M. T., Berger, S. L. "Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis." <u>Genes Dev</u> (2006) 20(18): 2580-2592.

Kruger, M., Moser, M., Ussar, S., Thievessen, I., Luber, C. A., Forner, F., Schmidt, S., Zanivan, S., Fassler, R., Mann, M. "SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function." <u>Cell (2008)</u> 134(2): 353-364.

Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., Allis, C. D. "Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines." <u>Nature (1996)</u> 383(6597): 269-272.

Kuo, M. H., vom Baur, E., Struhl, K., Allis, C. D. "Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription." <u>Mol Cell (2000)</u> 6(6): 1309-1320.

Kurdistani, S. K., Grunstein, M. "Histone acetylation and deacetylation in yeast." <u>Nat Rev Mol Cell</u> <u>Biol</u> (2003) 4(4): 276-284.

Kurdistani, S. K., Tavazoie, S., Grunstein, M. "Mapping global histone acetylation patterns to gene expression." <u>Cell (2004)</u> 117(6): 721-733.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T. "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." <u>Nature (2001)</u> 410(6824): 116-120.

Lachner, M., Jenuwein, T. "The many faces of histone lysine methylation." <u>Curr Opin Cell Biol</u> (2002) 14(3): 286-298.

Laemmli, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature (1970)</u> 227(5259): 680-685.

Lange, S. "Proteomische Methoden zur Charakterisierung von phosphorylierungsvermittelten Wechselwirkungen des Adapterproteins ADAP", Institut für Biotechnologie, <u>Technische Universität</u> <u>Berlin</u>.(2010)

Lange, S., Sylvester, M., Schumann, M., Freund, C., Krause, E. "Identification of phosphorylationdependent interaction partners of the adapter protein ADAP using quantitative mass spectrometry: SILAC vs (18)O-labeling." J Proteome Res (2010) 9(8): 4113-4122.

Lavender, J. S., Birley, A. J., Palmer, M. J., Kuroda, M. I., Turner, B. M. "Histone H4 acetylated at lysine 16 and proteins of the Drosophila dosage compensation pathway co-localize on the male X chromosome through mitosis." <u>Chromosome Res (1994)</u> 2(5): 398-404.

Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., Wolffe, A. P. "A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA." <u>Cell (1993)</u> 72(1): 73-84.

Lehmann, W. D. "Massenspektrometrie in der Biochemie", Heidelberg, <u>Spektrum Akademischer</u> Verlag (1996).

Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. "SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource." <u>Nucleic Acids Res</u> (2012) 40(Database issue): D302-305.

Li, B., Carey, M., Workman, J. L. "The role of chromatin during transcription." <u>Cell</u> (2007a) 128(4): 707-719.

Li, H., Taverna, S. D., Ruthenburg, A. J., Patel, D. J., Allis, C. D. "Readout of chromatin marks by histone-binding modules." <u>Nat Rev Mol Cell Biol (2007b)</u>.

Li, X., Foley, E. A., Molloy, K. R., Li, Y., Chait, B. T., Kapoor, T. M. "Quantitative chemical proteomics approach to identify post-translational modification-mediated protein-protein interactions." J Am Chem Soc (2012) 134(4): 1982-1985.

Littau, V. C., Allfrey, V. G., Frenster, J. H., Mirsky, A. E. "Active and Inactive Regions of Nuclear Chromatin as Revealed by Electron Microscope Autoradiography." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1964) 52: 93-100.

Löffler, G., Petrides, P. E. "Biochemie und Pathobiochemie ", Springer-Verlag GmbH (2002).

Looney, M. R., Thornton, E. E., Sen, D., Lamm, W. J., Glenny, R. W., Krummel, M. F. "Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung." <u>Nat Methods (2011)</u> 8(1): 91-96.

Lottspeich, F., Zorbas, H. "Bioanalytik", Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH (1998).

Lottspeich, F. "Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins." <u>Angew Chem</u> Int Ed Engl (1999) 38(17): 2476-2492.

Loyola, A., Almouzni, G. "Bromodomains in living cells participate in deciphering the histone code." <u>Trends Cell Biol (2004a)</u> 14(6): 279-281.

Loyola, A., Almouzni, G. "Histone chaperones, a supporting role in the limelight." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta (2004b)</u> 1677(1-3): 3-11.

Lucchini, R., Wellinger, R. E., Sogo, J. M. "Nucleosome positioning at the replication fork." <u>EMBO J</u> (2001) 20(24): 7294-7302.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J. "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution." <u>Nature (1997)</u> 389(6648): 251-260.

Luo, K., Vega-Palas, M. A., Grunstein, M. "Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast." <u>Genes Dev</u> (2002) 16(12): 1528-1539.

Ma, X. J., Wu, J., Altheim, B. A., Schultz, M. C., Grunstein, M. "Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1998) 95(12): 6693-6698.

Mann, M. "Functional and quantitative proteomics using SILAC." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> (2006) 7(12): 952-958.

Marmorstein, R. "Structure and function of histone acetyltransferases." <u>Cell Mol Life Sci</u> (2001) 58(5-6): 693-703.

Marmorstein, R., Roth, S. Y. "Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis." <u>Curr</u> <u>Opin Genet Dev (2001)</u> 11(2): 155-161.

Marshall, N. F., Price, D. H. "Purification of P-Tefb, a Transcription Factor Required for the Transition into Productive Elongation." <u>Journal of Biological Chemistry</u> **(1995)** 270(21): 12335-12338.

Marshall, N. F., Peng, J., Xie, Z., Price, D. H. "Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase." Journal of Biological Chemistry (1996) 271(43): 27176-27183.

Massie, C. E., Mills, I. G. "ChIPping away at gene regulation." EMBO Rep (2008) 9(4): 337-343.

Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R., Verreault, A. "A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response." <u>Nature (2005)</u> 436(7048): 294-298.

McCalley, D. V. "Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography." <u>J Chromatogr A (2004)</u> 1038(1-2): 77-84.

McCalley, D. V. "Comparison of an organic polymeric column and a silica-based reversed-phase for the analysis of basic peptides by high-performance liquid chromatography." J Chromatogr A (2005) 1073(1-2): 137-145.

McGhee, J. D., Felsenfeld, G., Eisenberg, H. "Nucleosome structure and conformational changes." <u>Biophys J</u> (1980) 32(1): 261-270.

Megee, P. C., Morgan, B. A., Mittman, B. A., Smith, M. M. "Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation." <u>Science (1990)</u> 247(4944): 841-845.

Merrifield, R. B. "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide." <u>J Am Chem Soc</u> (1963) 85(14): 2149-2154.

Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., Nakatani, Y., Allis, C. D. "The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity." <u>Cell (1996)</u> 87(7): 1261-1270.

Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A. L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D. J., Krijgsveld, J., Khochbin, S., Muller, C. W., Petosa, C. "Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain." <u>Nature (2009)</u> 461(7264): 664-668.

Motoyama, A., Yates, J. R., 3rd. "Multidimensional LC separations in shotgun proteomics." <u>Anal</u> <u>Chem</u> (2008) 80(19): 7187-7193.

Murnion, M. E., Adams, R. R., Callister, D. M., Allis, C. D., Earnshaw, W. C., Swedlow, J. R. "Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation." J Biol Chem (2001) 276(28): 26656-26665.

Murray, K. "The Occurrence of Epsilon-N-Methyl Lysine in Histones." <u>Biochemistry</u> (1964) 3: 10-15.

Nagele, E., Vollmer, M., Horth, P., Vad, C. "2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures." <u>Expert Rev Proteomics</u> (2004) 1(1): 37-46.

Nakamura, T., Kuromitsu, J., Oda, Y. "Evaluation of comprehensive multidimensional separations using reversed-phase, reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry for shotgun proteomics." J Proteome Res (2008) 7(3): 1007-1011.

Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D. E., Bylebyl, G. R., Dokmanovic, M., Dorsey, J. A., Whelan, K. A., Krsmanovic, M., Lane, W. S., Meluh, P. B., Johnson, E. S., Berger, S. L. "Histone sumoylation is a negative regulator in Saccharomyces cerevisiae and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications." <u>Genes Dev</u> (2006) 20(8): 966-976.

Nelson, C. J., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T. "Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression." <u>Cell (2006)</u> 126(5): 905-916.

Nicholas, A. K., Khurshid, M., Desir, J., Carvalho, O. P., Cox, J. J., Thornton, G., Kausar, R., Ansar, M., Ahmad, W., Verloes, A., Passemard, S., Misson, J. P., Lindsay, S., Gergely, F., Dobyns, W. B., Roberts, E., Abramowicz, M., Woods, C. G. "WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly." <u>Nature Genetics</u> (2010) 42(11): 1010-U1138.

Nikolov, M., Stutzer, A., Mosch, K., Krasauskas, A., Soeroes, S., Stark, H., Urlaub, H., Fischle, W. "Chromatin affinity purification and quantitative mass spectrometry defining the interactome of histone modification patterns." <u>Mol Cell Proteomics (2011)</u> 10(11): M110 005371.

Norton, V. G., Marvin, K. W., Yau, P., Bradbury, E. M. "Nucleosome linking number change controlled by acetylation of histones H3 and H4." <u>J Biol Chem</u> (1990) 265(32): 19848-19852.

Nowak, S. J., Corces, V. G. "Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation." <u>Trends Genet (2004)</u> 20(4): 214-220.

O'Brien, S. K., Cao, H., Nathans, R., Ali, A., Rana, T. M. "P-TEFb kinase complex phosphorylates histone H1 to regulate expression of cellular and HIV-1 genes." Journal of Biological Chemistry (2010) 285(39): 29713-29720.

O'Farrell, P. H. "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." J Biol Chem (1975) 250(10): 4007-4021.

Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." <u>Mol Cell Proteomics (2002)</u> 1(5): 376-386.

Ong, S. E., Foster, L. J., Mann, M. "Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics." <u>Methods (2003a)</u> 29(2): 124-130.

Ong, S. E., Kratchmarova, I., Mann, M. "Properties of 13C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)." <u>J Proteome Res</u> (2003b) 2(2): 173-181.

Ong, S. E., Mann, M. "Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative." <u>Nature Chemical</u> <u>Biology</u> (2005) 1(5): 252-262.

Ong, S. E., Mann, M. "A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)." <u>Nat Protoc (2006)</u> 1(6): 2650-2660.

Oppikofer, M., Kueng, S., Martino, F., Soeroes, S., Hancock, S. M., Chin, J. W., Fischle, W., Gasser, S. M. "A dual role of H4K16 acetylation in the establishment of yeast silent chromatin." <u>EMBO J</u> (2011) 30(13): 2610-2621.

Orlando, V. "Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation." <u>Trends Biochem Sci (2000)</u> 25(3): 99-104.

Owen, D. J., Ornaghi, P., Yang, J. C., Lowe, N., Evans, P. R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., Travers, A. A. "The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p." <u>EMBO J</u> **(2000)** 19(22): 6141-6149.

Park, E. C., Szostak, J. W. "Point mutations in the yeast histone H4 gene prevent silencing of the silent mating type locus HML." <u>Mol Cell Biol (1990)</u> 10(9): 4932-4934.

Patel, A., Dharmarajan, V., Vought, V. E., Cosgrove, M. S. "On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex." J Biol Chem **(2009)** 284(36): 24242-24256.

Paul, A. L., Ferl, R. J. "Higher-order chromatin structure: looping long molecules." <u>Plant Mol Biol</u> (1999) 41(6): 713-720.

Peng, J., Marshall, N. F., Price, D. H. "Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb." Journal of Biological Chemistry (1998) 273(22): 13855-13860.

Peng, J., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Licklider, L. J., Gygi, S. P. "Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome." <u>J Proteome Res</u> (2003) 2(1): 43-50.

Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. S. "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." <u>Electrophoresis (1999)</u> 20(18): 3551-3567.

Peterson, C. L., Laniel, M. A. "Histones and histone modifications." Curr Biol (2004) 14(14): R546-551.

Petra, P. H., Cohen, W., Shaw, E. N. "Isolation and characterization of the alkylated histidine from TLCK inhibited trypsin." <u>Biochem Biophys Res Commun (1965)</u> 21(6): 612-618.

Petritis, B. O., Qian, W. J., Camp, D. G., 2nd, Smith, R. D. "A simple procedure for effective quenching of trypsin activity and prevention of 18O-labeling back-exchange." J Proteome Res (2009) 8(5): 2157-2163.

Phillips, D. M. "The presence of acetyl groups of histones." <u>Biochem J (1963)</u> 87: 258-263.

Phizicky, E. M., Fields, S. "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." <u>Microbiol Rev (1995)</u> 59(1): 94-123.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." <u>Nature (1975)</u> 258(5536): 598-599.

Pruss, D., Bartholomew, B., Persinger, J., Hayes, J., Arents, G., Moudrianakis, E. N., Wolffe, A. P. "An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres." <u>Science (1996)</u> 274(5287): 614-617.

Puck, T. T., Marcus, P. I., Cieciura, S. J. "Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer." <u>J Exp Med (1956)</u> 103(2): 273-283.

Qian, W. J., Monroe, M. E., Liu, T., Jacobs, J. M., Anderson, G. A., Shen, Y., Moore, R. J., Anderson, D. J., Zhang, R., Calvano, S. E., Lowry, S. F., Xiao, W., Moldawer, L. L., Davis, R. W., Tompkins, R. G., Camp, D. G., 2nd, Smith, R. D. "Quantitative proteome analysis of human plasma following in vivo lipopolysaccharide administration using 160/180 labeling and the accurate mass and time tag approach." Molecular & Cellular Proteomics (2005) 4(5): 700-709.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., Jenuwein, T. "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." <u>Nature (2000)</u> 406(6796): 593-599.

Recht, J., Tsubota, T., Tanny, J. C., Diaz, R. L., Berger, J. M., Zhang, X., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Burlingame, A. L., Hunt, D. F., Kaufman, P. D., Allis, C. D. "Histone chaperone Asf1 is required for histone H3 lysine 56 acetylation, a modification associated with S phase in mitosis and meiosis." <u>Proc</u> Natl Acad Sci U S A (2006) 103(18): 6988-6993.

Rehm, H. "Der Experimentator - Proteinbiochemie/Proteomics", <u>Spektrum Akademischer Verlag</u> (2006).

Rice, J. C., Briggs, S. D., Ueberheide, B., Barber, C. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Shinkai, Y., Allis, C. D. "Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains." <u>Mol Cell</u> (2003) 12(6): 1591-1598.

Richmond, T. J., Finch, J. T., Klug, A. "Studies of nucleosome structure." <u>Cold Spring Harb Symp</u> <u>Quant Biol</u> (1983) 47 Pt 1: 493-501. Roh, T. Y., Cuddapah, S., Zhao, K. "Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping." <u>Genes Dev (2005)</u> 19(5): 542-552.

Rojas, J. R., Trievel, R. C., Zhou, J., Mo, Y., Li, X., Berger, S. L., Allis, C. D., Marmorstein, R. "Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide." <u>Nature (1999)</u> 401(6748): 93-98.

Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., Ferrara, P. "In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis." <u>Anal Biochem</u> **(1992)** 203(1): 173-179.

Ross, P. L., Huang, Y. L. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D. J. "Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents." <u>Molecular & Cellular Proteomics (2004)</u> 3(12): 1154-1169.

Roth, S. Y., Denu, J. M., Allis, C. D. "Histone acetyltransferases." <u>Annu Rev Biochem</u> (2001) 70: 81-120.

Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L. J., Allfrey, V. G. "Processing of newly synthesized histone molecules." <u>Science (1975)</u> 190(4210): 117-128.

Sarraf, S. A., Stancheva, I. "Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly." <u>Mol Cell (2004)</u> 15(4): 595-605.

Schalch, T., Job, G., Noffsinger, V. J., Shanker, S., Kuscu, C., Joshua-Tor, L., Partridge, J. F. "Highaffinity binding of Chp1 chromodomain to K9 methylated histone H3 is required to establish centromeric heterochromatin." <u>Mol Cell</u> (2009) 34(1): 36-46.

Schmidt, A. "A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels (vol 5, pg 4, 2005)." <u>Proteomics (2005)</u> 5(3): 826-826.

Schneider, U., Schwenk, H. U., Bornkamm, G. "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma." Int J Cancer (1977) 19(5): 621-626.

Schnolzer, M., Jedrzejewski, P., Lehmann, W. D. "Protease-catalyzed incorporation of 180 into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." <u>Electrophoresis (1996)</u> 17(5): 945-953.

Schraven, B., Marie-Cardine, A., Koretzky, G. "Molecular analysis of the fyn-complex: cloning of SKAP55 and SLAP-130, two novel adaptor proteins which associate with fyn and may participate in the regulation of T cell receptor-mediated signaling." <u>Immunol Lett (1997)</u> 57(1-3): 165-169.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C. P. "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1998) 95(11): 5857-5864.

Schulze, W. X., Mann, M. "A novel proteomic screen for peptide-protein interactions." J Biol Chem (2004) 279(11): 10756-10764.

Selwood, T., Smolensky, H., McCaslin, D. R., Schechter, N. M. "The interaction of human tryptasebeta with small molecule inhibitors provides new insights into the unusual functional instability and quaternary structure of the protease." <u>Biochemistry</u> **(2005)** 44(9): 3580-3590.

Sevinsky, J. R., Brown, K. J., Cargile, B. J., Bundy, J. L., Stephenson, J. L., Jr. "Minimizing back exchange in 180/160 quantitative proteomics experiments by incorporation of immobilized trypsin into the initial digestion step." <u>Anal Chem</u> (2007) 79(5): 2158-2162.

Shahbazian, M. D., Grunstein, M. "Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation." <u>Annu Rev Biochem</u> (2007) 76: 75-100.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., Mann, M. "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." <u>Nat Protoc (2006)</u> 1(6): 2856-2860.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. "Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1." <u>Cell</u> (2004) 119(7): 941-953.

Shilatifard, A. "Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression." <u>Annu Rev Biochem (2006)</u> 75: 243-269.

Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J., Davie, J. R., Peterson, C. L. "Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions." <u>Science</u> (2006) 311(5762): 844-847.

Shogren-Knaak, M., Peterson, C. L. "Switching on chromatin: mechanistic role of histone H4-K16 acetylation." <u>Cell Cycle (2006)</u> 5(13): 1361-1365.

Shogren-Knaak, M. A., Peterson, C. L. "Creating designer histones by native chemical ligation." <u>Methods Enzymol (2004)</u> 375: 62-76.

Simpson, R. T. "Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones." <u>Biochemistry (1978)</u> 17(25): 5524-5531.

Sobel, R. E., Cook, R. G., Perry, C. A., Annunziato, A. T., Allis, C. D. "Conservation of depositionrelated acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **(1995)** 92(4): 1237-1241.

Song, C., Ye, M., Han, G., Jiang, X., Wang, F., Yu, Z., Chen, R., Zou, H. "Reversed-phase-reversed-phase liquid chromatography approach with high orthogonality for multidimensional separation of phosphopeptides." <u>Anal Chem</u> (2010) 82(1): 53-56.

Spicer, V., Yamchuk, A., Cortens, J., Sousa, S., Ens, W., Standing, K. G., Wilkins, J. A., Krokhin, O. V. "Sequence-specific retention calculator. A family of peptide retention time prediction algorithms in reversed-phase HPLC: applicability to various chromatographic conditions and columns." <u>Anal Chem</u> (2007) 79(22): 8762-8768.

Sprinson, D. B., Rittenberg, D. "Nature of the Activation Process in Enzymatic Reactions." <u>Nature</u> **(1951)** 167(4247): 484-484.

Staes, A., Demol, H., Van Damme, J., Martens, L., Vandekerckhove, J., Gevaert, K. "Global differential non-gel proteomics by quantitative and stable labeling of tryptic peptides with oxygen-18." J Proteome Res (2004) 3(4): 786-791.

Steen, H., Mann, M. "The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> (2004) 5(9): 699-711.

Stephanowitz, H., Lange, S., Lang, D., Freund, C., Krause, E. "Improved two-dimensional reversed phase-reversed phase LC-MS/MS approach for identification of peptide-protein interactions." J <u>Proteome Res (2012)</u> 11(2): 1175-1183.

Sterner, D. E., Berger, S. L. "Acetylation of histones and transcription-related factors." <u>Microbiol Mol</u> <u>Biol Rev</u> (2000) 64(2): 435-459.

Storms, H. F., van der Heijden, R., Tjaden, U. R., van der Greef, J. "Considerations for proteolytic labeling-optimization of 180 incorporation and prohibition of back-exchange." <u>Rapid Commun Mass</u> <u>Spectrom (2006)</u> 20(23): 3491-3497.

Strahl, B. D., Allis, C. D. "The language of covalent histone modifications." <u>Nature (2000)</u> 403(6765): 41-45.

Sung, M. T., Dixon, G. H. "Modification of histones during spermiogenesis in trout: a molecular mechanism for altering histone binding to DNA." <u>Proc Natl Acad Sci U S A (1970)</u> 67(3): 1616-1623.

Sury, M. D., Chen, J. X., Selbach, M. "The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo." Mol Cell Proteomics (2010) 9(10): 2173-2183.

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguez, P., Doerks, T., Stark, M., Muller, J., Bork, P., Jensen, L. J., von Mering, C. "The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored." <u>Nucleic Acids Res</u> (2011) 39(Database issue): D561-568.

Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T. "Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry." <u>Rapid</u> <u>Communications in Mass Spectrometry (1988)</u> 2(8): 151-153.

Tang, J., Gao, M., Deng, C., Zhang, X. "Recent development of multi-dimensional chromatography strategies in proteome research." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci (2008) 866(1-2): 123-132.

Taunton, J., Hassig, C. A., Schreiber, S. L. "A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p." <u>Science (1996)</u> 272(5260): 408-411.

Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., Patel, D. J. "How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers." <u>Nat Struct Mol Biol</u> **(2007)** 14(11): 1025-1040.

Thoma, F., Koller, T., Klug, A. "Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin." J Cell Biol (1979) 83(2 Pt 1): 403-427.

Thomson, J. J. "Rays of positive electricity." <u>Philosophical Magazine (1910)</u> 20(115-20): 752-767.
Tian, Y., Jia, Z., Wang, J., Huang, Z., Tang, J., Zheng, Y., Tang, Y., Wang, Q., Tian, Z., Yang, D., Zhang, Y., Fu, X., Song, J., Liu, S., van Velkinburgh, J. C., Wu, Y., Ni, B. "Global mapping of H3K4me1 and H3K4me3 reveals the chromatin state-based cell type-specific gene regulation in human Treg cells." PLoS One (2011) 6(11): e27770.

Toll, H., Oberacher, H., Swart, R., Huber, C. G. "Separation, detection, and identification of peptides by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry at high and low pH." J Chromatogr A (2005) 1079(1-2): 274-286.

Tonna, S., El-Osta, A., Cooper, M. E., Tikellis, C. "Metabolic memory and diabetic nephropathy: potential role for epigenetic mechanisms." <u>Nat Rev Nephrol (2010)</u> 6(6): 332-341.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." <u>Proc Natl Acad Sci U S A (1979)</u> 76(9): 4350-4354.

Tremethick, D. J. "Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber." <u>Cell (2007)</u> 128(4): 651-654.

Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F. M., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H., Lamond, A. "Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes." Journal of Cell Biology (2008) 183(2): 223-239.

Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P., Hansen, J. C. "Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III." <u>Mol</u> <u>Cell Biol (1998)</u> 18(8): 4629-4638.

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., Zhang, Y. "Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins." <u>Nature (2006)</u> 439(7078): 811-816.

Turner, B. M., Birley, A. J., Lavender, J. "Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in Drosophila polytene nuclei." <u>Cell (1992)</u> 69(2): 375-384.

Turner, B. M., O'Neill, L. P. "Histone acetylation in chromatin and chromosomes." <u>Semin Cell Biol</u> (1995) 6(4): 229-236.

Tweedie-Cullen, R. Y., Reck, J. M., Mansuy, I. M. "Comprehensive mapping of post-translational modifications on synaptic, nuclear, and histone proteins in the adult mouse brain." <u>J Proteome Res</u> **(2009)** 8(11): 4966-4982.

Van Dyke, M. W., Roeder, R. G., Sawadogo, M. "Physical analysis of transcription preinitiation complex assembly on a class II gene promoter." <u>Science (1988)</u> 241(4871): 1335-1338.

Vazquez, A., Flammini, A., Maritan, A., Vespignani, A. "Global protein function prediction from protein-protein interaction networks." <u>Nat Biotechnol (2003)</u> 21(6): 697-700.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J.

R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., Zhu, X. "The sequence of the human genome." <u>Science (2001)</u> 291(5507): 1304-1351.

Verdin, E., Dequiedt, F., Kasler, H. G. "Class II histone deacetylases: versatile regulators." <u>Trends</u> <u>Genet (2003)</u> 19(5): 286-293.

Vermeulen, M., Mulder, K. W., Denissov, S., Pijnappel, W. W., van Schaik, F. M., Varier, R. A., Baltissen, M. P., Stunnenberg, H. G., Mann, M., Timmers, H. T. "Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4." <u>Cell (2007)</u> 131(1): 58-69.

Vermeulen, M., Eberl, H. C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K. K., Olsen, J. V., Hyman, A. A., Stunnenberg, H. G., Mann, M. "Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers." <u>Cell (2010)</u> 142(6): 967-980.

Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Stillman, B. "Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4." <u>Cell (1996)</u> 87(1): 95-104.

Vettese-Dadey, M., Grant, P. A., Hebbes, T. R., Crane- Robinson, C., Allis, C. D., Workman, J. L. "Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro." <u>EMBO J</u> (1996) 15(10): 2508-2518. **Vinogradov, A. E.** "Genome size and chromatin condensation in vertebrates." <u>Chromosoma (2005)</u> 113(7): 362-369.

Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., Coppens, I., Sullivan, W. J., Jr. "MYST family lysine acetyltransferase facilitates ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase-mediated DNA damage response in Toxoplasma gondii." J Biol Chem (2010) 285(15): 11154-11161.

Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Peng, W., Zhang, M. Q., Zhao, K. "Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome." <u>Nat Genet</u> (2008) 40(7): 897-903.

Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R., 3rd. "Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology." <u>Nat Biotechnol</u> (2001) 19(3): 242-247.

Watson, J. D., Crick, F. H. "The structure of DNA." <u>Cold Spring Harb Symp Quant Biol</u> (1953) 18: 123-131.

Wendt, K. D., Shilatifard, A. "Packing for the germy: the role of histone H4 Ser1 phosphorylation in chromatin compaction and germ cell development." <u>Genes Dev (2006)</u> 20(18): 2487-2491.

Westman-Brinkmalm, A., Abramsson, A., Pannee, J., Gang, C., Gustavsson, M. K., von Otter, M., Blennow, K., Brinkmalm, G., Heumann, H., Zetterberg, H. "SILAC zebrafish for quantitative analysis of protein turnover and tissue regeneration." J Proteomics (2011) 75(2): 425-434.

Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L. "Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it." <u>Biotechnol Genet Eng Rev (1996)</u> 13: 19-50.

Wisniewski, J. R., Zougman, A., Kruger, S., Mann, M. "Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue." <u>Mol Cell Proteomics (2007)</u> 6(1): 72-87.

Wolffe, A. P., Hayes, J. J. "Chromatin disruption and modification." <u>Nucleic Acids Res</u> (1999) 27(3): 711-720.

Wong, J. W., Cagney, G. "An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry." <u>Methods Mol Biol (2010)</u> 604: 273-283.

Woodcock, C. L., Skoultchi, A. I., Fan, Y. "Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length." <u>Chromosome Res</u> **(2006)** 14(1): 17-25.

Wysocka, J. "Identifying novel proteins recognizing histone modifications using peptide pull-down assay." <u>Methods (2006)</u> 40(4): 339-343.

Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., Handa, H. "P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation." <u>Molecular Cell</u> (2006) 21(2): 227-237.

Yamamoto, T., Horikoshi, M. "Cloning of the cDNA encoding a novel subtype of histone H1." <u>Gene</u> **(1996)** 173(2): 281-285.

Yang, W., Steen, H., Freeman, M. R. "Proteomic approaches to the analysis of multiprotein signaling complexes." <u>Proteomics (2008)</u> 8(4): 832-851.

Yao, X., Afonso, C., Fenselau, C. "Dissection of proteolytic 18O labeling: endoprotease-catalyzed 16O-to-18O exchange of truncated peptide substrates." J Proteome Res (2003) 2(2): 147-152.

Ye, J., Ai, X., Eugeni, E. E., Zhang, L., Carpenter, L. R., Jelinek, M. A., Freitas, M. A., Parthun, M. R. "Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly." <u>Mol Cell</u> (2005) 18(1): 123-130.

Zeng, L., Zhou, M. M. "Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain." <u>FEBS Lett</u> **(2002)** 513(1): 124-128.

Zhang, Q., Chakravarty, S., Ghersi, D., Zeng, L., Plotnikov, A. N., Sanchez, R., Zhou, M. M. "Biochemical Profiling of Histone Binding Selectivity of the Yeast Bromodomain Family." <u>PLoS One</u> **(2010)** 5(1): -.

Zhang, Y., Reinberg, D. "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails." <u>Genes Dev (2001)</u> 15(18): 2343-2360.

Zheng, C., Hayes, J. J. "Intra- and inter-nucleosomal protein-DNA interactions of the core histone tail domains in a model system." J Biol Chem (2003) 278(26): 24217-24224.

Zhou, F., Cardoza, J. D., Ficarro, S. B., Adelmant, G. O., Lazaro, J. B., Marto, J. A. "Online nanoflow RP-RP-MS reveals dynamics of multicomponent Ku complex in response to DNA damage." <u>J Proteome</u> <u>Res</u> (2010) 9(12): 6242-6255.

Zhu, W., Smith, J. W., Huang, C. M. "Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics." J Biomed Biotechnol (2010) 2010: 840518.

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden Einheiten nach dem Internationalen Einheitensystem (SI) und chemische Elementsymbole entsprechend den IUPAC-Richtlinien verwendet. Proteinnamen wurden gemäß der UniProt KB Eintragung abgekürzt (www.uniprot.org).

¹⁶ 0/ ¹⁸ 0	Sauerstoffisotop mit dem Atomgewicht 16 bzw. 18
1D-GE	Eindimensionale Gelelektrophorese
2-D	zweidimensional
Ac	Acetylierung/acetyliert
ACN	Acetonitril
AD	Aktivierungsdomäne
ADAP	Adhesion and degranulation promoting adaptor protein
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
Ahx	Aminohexansäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BET	Bromo- und extraterminale Domäne
Вос	tertiär-Butoxycarbonyl
bp	Basenpaar
BRD	Bromodomäne
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)

C3orf26	Uncharacterized protein C3orf26
CCNT1	Cyclin-T1
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CI	Chemische Ionisierung
CID	Collision-induced dissociation
CIRBP	highly similar to COLD-INDUCIBLE RNA-BINDING PROTEIN
CMAS	N-acylneuraminate cytidylyltransferase
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DB	DNA-Bindedomäne
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRB	5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol
DSIF	DRB sensitivity-inducing factor
DTT	Dithiothreitol
DUS3L	tRNA-dihydrouridine(47) synthase [NAD(P)(+)]-like
E. coli	Escherichia coli
EGTA	Ethylenglykoltetraacetyt
EI	Elektronenstoßionisierung
ERK	extrazellulär-regulierte Proteinkinase
ESI	Elektronensprayionisierung (electrospry ionization)
FA	Ameisensäure
FAB	Fast atom bombardment
FBS	Fötales Kälberserum (fetal bovine serum)
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FWHM	Halbwertsbreite (full width at half maximum)
Gcn5	Histon Acetyltransferase GCN5
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	Histonacetyltransferase
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HCD	Higher-energy collisional dissociation
HDAC	Histondeacetylase
HDM	Histondemethylase
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
His ₆ -tag	Hexahistidin-Fusionsanteil
НМТ	Histonmethyltransferase
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins

ICAT	Isotopen-markierter Affinitätsanteil (isotope-coded affinity tag)
ICPL	Isotopen-vermittelte Proteinmarkierung (isotope-coded protein label)
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
itraq	Isobare Markierung für relative und absolute Quantifizierung (isobaric tag
	for relative and absolute quantification)
JmjC	Jumonji
Kd	Dissoziationskonstante
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
LC	Flüssigchromatographie
LSD1	Lysine-spezifische Demethylase 1
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisierung (matrix assisted laser
	desorption/ionization)
MDLC	Mehrdimensionale Flüssigchromatographie
Ме	Methylierung/methyliert
MeCAT	Metallkodierte Affinitätsmarkierung (metal coded affinity tag)
MLL	mixed lineage leukemia
mRNP	Messenger ribonucleoprotein
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSK	Mitogen- und stressaktivierte Proteinkinase
MYO1G	Myosin-Ig
NELF	Negative elongation factor
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
NOL7	Nucleolar protein 7
NSL	Non-Specific Lethal
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Amino-Terminus
OBzl	O-Benzyl
OLA1	Obg-like ATPase 1
Р	Phosphorylierung/phosphoryliert
Р	Peakkapazität
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pbf	2, 2', 4, 6, 7-Pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl
PBRM1	Protein polybromo-1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Plasmadesorption
PDE12	2',5'-phosphodiesterase 12
PHD	plant homeodomain
РК	Proteinkinase
PLRP-S	Polystyren/Divinylbenzen HPLC-Material
PMF	Peptidmassenfingerabdruck
PP	Phosphatase
P-TEFb	Positiver Elongationstranskriptionsfaktor b
РТМ	posttranslationale Modifizierung
PUS1	tRNA pseudouridine synthase A
RNA	Ribonukleinsäure
RNA pol II	RNA Polymerase II
RP	Umkehrphasen (reversed phase)
RPS17	40S ribosomal protein S17
RT	Retentionszeit
SCX	staker Kationenautausch (strong cation exchange)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEC	Größenausschluss (size exclusion)
SET	Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax
SILAC	Stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur (stable isotope
	labeling by amino acids in cell culture)
TAF	TATA-Box Bindeprotein-assoziierter Faktor
TAF4	Transcription initiation factor TFIID subunit 4
TAF8	Transcription initiation factor TFIID subunit 8
ТВР	TATA-Box Bindeprotein
tBu	tert-Butyl
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluorameisensäure
THOC4	THO complex subunit 4
TOF	Flugzeit (time of flight)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRM4	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase
TRMT1	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase
TRMT6	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6
Trt	Triphenylmethyl
TSA	Trichostatin A
TUT1	Speckle targeted PIP5K1A-regulated poly(A) polymerase

U2AF	Splicing factor U2AF
UAS	stromaufwärts aktivierende Sequenz (upstream activation sequence)
Ub	Ubiquitinierung/ubiquitiniert
W _{av}	Mittlere Peakbreite
WDR62	WD repeat-containing protein 62
ZFP91	E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91

Symbole für Aminosäuren

А	Ala	Alanin
С	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
Н	His	Histidin
1	lle	Isoleucin
К	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
Μ	Met	Methionin
Ν	Asn	Asparagin
Р	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
Т	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der DNA-Kompaktierung durch Histonproteine2
Abbildung 1-2: Ausgewählte posttranslationale Modifizierungen der Core-Histone4
Abbildung 1-3: Gcn5-katalysierte Acetylierung von H3K147
Abbildung 1-4: Acetylierung und Deacetylierung von Chromatin
Abbildung 1-5: Kristallstruktur der Gcn5-Bromodomäne (blau) mit gebundenem Lys16-acetyliertem H4-Peptid (AS 14-28, grün)
Abbildung 1-6: Allgemeines Prinzip der Affinitätschromatografie18
Abbildung 1-7: Methoden der MS-basierten Analyse komplexer Proteingemische
Abbildung 1-8: Methoden der quantitativen Proteomanalyse
Abbildung 3-1: Vergleich der chromatographischen Trennleistung in Abhängigkeit vom Säulenmaterial (A) und der Säulenlänge (B) 55
Abbildung 3-2: Vergleich der chromatographischen Trennleistung in Abhängigkeit von der Gradientenlänge
Abbildung 3-3: Normalisierte microLC Retentionszeitplots (norm. RT) für 2-D LC-Systeme
Abbildung 3-4: Schema für die 2-D LC-MS/MS Methodik 58
Abbildung 3-5: Peptididentifizierungen in Abhängigkeit von der Fraktionsanzahl sowie Säulen- parametern
Abbildung 3-6: ¹⁸ O-basierte ADAP-Pulldown-Experimente mit Jurkat T-Zellen
Abbildung 3-7: ¹⁸ O-basierte ADAP-Pulldown-Experimente mit primären T-Zellen
Abbildung 3-8: HPLC-Chromatogramme und MALDI-MS Spektren synthetisierter H4-Peptide
Abbildung 3-9: Kopplungsschema für die kovalente Immobilisierung von Cys-Peptiden an Iodoacetyl- funktionalisierte Agarose
Abbildung 3-10: Interaktionsstudien der Gcn5-Bromodomäne mit immobilisierten, acetylierten H4- Peptiden
Abbildung 3-11: ¹ H- ¹⁵ N-Korrelationsspektrum der ¹⁵ N-markierten Gcn5-Bromodomäne und Einfluss vierfach acetylierter H4-Peptide auf die chemische Verschiebung von an der Bindung beteiligten Amidresonanzen
Abbildung 3-12: Änderung der chemischen Verschiebung der Gcn5-Amidresonanzen durch Bindung von H4-K12Ac.
Abbildung 3-13: Prinzip der SILAC-basierten Peptid-Pulldown-Experimente
Abbildung 3-14: SILAC-Isotopenverhältnisse für einen <i>Pulldown</i> mit nicht acetyliertem H4-Peptid gegen vierfach acetyliertes H4-Peptid

Abbildung 3-15: SILAC-Pulldown-Experimente mit H4-noAc gegen H4-4Ac
Abbildung 3-16: SILAC-basierte <i>Pulldown</i> -Experimente mit unmodifizierten und vierfach acetylierten H4-Peptiden
Abbildung 3-17: SILAC-basierte <i>Pulldown</i> -Experimente mit unmodifizierten und K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden
Abbildung 3-18: SILAC-basierte <i>Pulldown</i> -Experimente mit unmodifizierten und monoacetylierten H4-Peptiden
Abbildung 3-19: Pulldown-Experimente mit unmodifizierten und Ser1-phosphorylierten H4-Peptiden in Kombination mit SILAC
Abbildung 3-20: Western Blot zur Verifizierung modifizierungsabhängiger Histonbindeproteine 87
Abbildung 4-1: Orthogonalitätsplots des RP _{0,1% TFA} -RP _{0,1% FA} -Systems
Abbildung 4-2: Ergebnis der STRING-Analyse der an K5/12-bisacetylierten H4-Peptiden angereicherten Proteine
Abbildung 4-3: Struktur acetylierter Lysinreste und möglicher Reaktionsmechanismus von PUS1 105
Abbildung 4-5: STRING-Analyse der Bindungspartner an vierfach acetylierte H4-Peptide 108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Zusammensetzung von Medien für die Transformation von Bakterien. 30
Tabelle 2-2: Zusammensetzung von Medien und Lösungen für die Expression metabolisch markierterProteine in <i>E.coli</i> .31
Tabelle 2-3: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Ni-Affinitätsreinigung. 33
Tabelle 2-4: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektro-phorese
Tabelle 2-5: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse. 36
Tabelle 2-6: Verwendete Antikörper. 36
Tabelle 2-7: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Kernextraktpräparation
Tabelle 2-8: Synthetisierte Peptidsequenzen. 41
Tabelle 2-9: Zusammensetzung des Puffers für Pulldown-Experimente. 44
Tabelle 2-10: Zusammensetzung des Lysepuffers für ADAP-595 Pulldown-Experimente
Tabelle 2-11: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die Trypsinspaltung. 48
Tabelle 3-1: Phosphorylierungsspezifische Interaktionspartner an ADAP-595-Peptide
Tabelle 3-2: Phosphorylierungsspezifische Interaktionspartner an ADAP-595-Peptide
Tabelle 3-3: Übersicht synthetisierter Histon H4-Peptide. 67
Tabelle 3-4: Mit NMR-Spektroskopie ermittelte Affinitäten für die Bindung von acetylierten H4-Peptiden an die Gcn5-Bromodomäne
Tabelle 3-5: Potentielle Bindungspartner an vierfach acetylierte Histon H4 Peptide. 78
Tabelle 3-6: Potentielle Bindungspartner an K5/12-bisacetylierte Histon H4 Peptide. 81
Tabelle 3-7: Potentielle Bindungspartner an monoacetylierte Histon H4 Peptide. 84
Tabelle 3-8: Potentielle spezifische Bindungspartner an Ser1-phosphorylierte H4-Peptide. 86

Danksagung

Diese Arbeit entstand zwischen Mai 2009 und Mai 2012 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin. Ich möchte die folgenden Zeilen dazu nutzen, den Menschen, die direkt oder indirekt am Gelingen der Arbeit beteiligt waren, meinen Dank auszusprechen.

An erster Stelle danke ich Herrn **Dr. Eberhard Krause** für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die stetige Unterstützung. Als Wissenschaftler, kritischer Betrachter und Motivator hat er jede Phase dieser Arbeit begleitet. Für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die im Zuge der Arbeit gewährten Freiheiten bin ich sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt auch den Gutachtern dieser Arbeit: **Prof. Dr. Roderich Süssmuth, Prof. Dr. Dirk Schwarzer und Dr. Eberhard Krause.** Danke für die wertvollen Anregungen und Hilfestellungen, die Begutachtung der Arbeit und für ihre Bereitschaft die Dissertation vor der Technischen Universität Berlin zu vertreten.

Herrn **Prof. Dr. Dirk Schwarzer** möchte ich darüber hinaus für seine stetige Diskussionsbereitschaft sowie freundliche, erfahrene und wertvolle Unterstützung bei der Peptidsynthese aber auch allen anderen Fragestellungen rund ums Chromatin herzlich danken.

Bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der **Arbeitsgruppe Massenspektrometrie** bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme, Zusammenarbeit und Unterstützung. Ohne euch wäre die Zeit am FMP für mich doppelt so schwer aber nur halb so schön gewesen.

Ein besonderes Dankeschön gilt **Heike Stephanowitz** für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei der Entwicklung der 2-D LC-Methodik sowie die ausgesprochen angenehme Zusammenarbeit und daraus entstandene Freundschaft.

Weiterhin möchte ich mich bei **Dr. Michael Schümann** für seine große Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei allen MS-Fragestellungen herzlich bedanken.

Meinen Mitdoktoranden und Freunden **Benno Kuropka** und **Sabine Lange** danke ich für viele anregende Diskussionen und Hilfestellungen im täglichen Laboralltag und beim Verfassen dieser Arbeit. Bei **Sabine Anker** bedanke ich mich für die Anpassung des ¹⁸O-Markierungsverfahrens für die 2-D LC-MS/MS-Methodik.

Dr. Henning Urlaub und **Miroslav Nikolov** vom MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen danke ich für eine freundliche, unkomplizierte Kooperation und die Bereitstellung von SILAC-HeLa-S3 Kernextrakten. Des Weiteren gilt mein Dank **Dr. Philipp Selenko** und **Dr. Sylvain Tourel** für die Hilfe bei der Gcn5-Expression und die Durchführung der NMR-Messungen zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten.

Für die Einführung und Hilfestellung bei der Kultivierung von HeLa-S3 Zellen bedanke ich mich bei Dr. Ingolf Blasig und Barbara Eilemann.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit und jegliche wissenschaftliche Hilfestellungen möchte ich mich außerdem bei Alexander Dose, Rebecca Klingberg, Oliver Jost, Till Teschke sowie Daniela Kosslick und Ramona Günther bedanken.

Meinem Mann und besten Freund **Mathias** sowie meiner **Familie** möchte ich von Herzen dafür danken, dass sie immer für mich da sind. Ohne euer Verständnis, den permanenten Zuspruch und die kontinuierliche Unterstützung wären einige Hürden kaum zu meistern, wenn nicht gar unüberwindbar gewesen – DANKE!

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und die verwendeten Quellen und Hilfsmittel vollständig in meiner Dissertationsschrift angegeben habe.

Teile dieser Arbeit sind in Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern entstanden, deren Namen ebenfalls in der Dissertation angegeben wurden. Diese haben Teile der vorliegenden Arbeit nicht für ihre Dissertation benutzt oder ein Promotionsverfahren beantragt.

Berlin, den