

# **Anreicherung und Charakterisierung von TRIM28-Interaktionspartnern mit massenspektrometrischen Methoden**

DISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Thomas Eickner

aus Rostock

Rostock, März 2012

urn:nbn:de:gbv:28-diss2013-0043-0

**Gutachter:**

1. Gutachter:

Prof. Dr. Michael O. Glocker

Institut für Immunologie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Ralf Zimmermann

Institut für Chemie, Universität Rostock

**Datum der Einreichung:** 02.03.2012

**Datum der Verteidigung:** 20.11.2012

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael O. Glocker für die interessante Themenstellung, die wertvollen Diskussionen und Anregungen sowie sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern des Institutes für Immunologie, insbesondere Dr. Peter Lorenz, Eva Lorbehr-Rehfeldt und Nadine Born für die unermessliche Hilfe bei den zellbiologischen Arbeiten. Manuela Russ danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und für aufmunternde Gespräche auch abseits dieser. Dr. Cornelia Koy, Dr. Stefan Mikkat, Claudia Röwer und Dr. Reham Elkased danke ich für die zahlreichen Diskussionen, Anregungen und Hilfestellungen sowohl theoretischer als auch praktischer Natur.

Besonderer Dank gilt meiner Familie.

# **INHALTSVERZEICHNIS**

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Einleitung.....   | 1  |
| 1.1   | Die Repression der Genexpression.....                     | 1  |
| 1.1.1 | Allgemeine Prozesse der Genrepression .....               | 1  |
| 1.1.2 | Die TRIM28 assoziierte Genrepression.....                 | 3  |
| 1.2   | Proteinanalytische Methoden .....                         | 13 |
| 1.2.1 | Affinitätschromatographie.....                            | 13 |
| 1.2.2 | Massenspektrometrie .....                                 | 15 |
| 1.3   | Ziel der Arbeit.....                                      | 20 |
| 2     | Materialien und Methoden.....                             | 21 |
| 2.1   | Zellzucht.....  | 21 |
| 2.2   | Zellernte .....   | 22 |
| 2.3   | Zellzahlbestimmung .....                                  | 22 |
| 2.4   | Indirekte Immunfärbung .....                              | 23 |
| 2.5   | Proteinextraktion .....                                   | 24 |
| 2.5.1 | Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkernplasma ..... | 24 |
| 2.5.2 | Herstellung von Proteinextrakten aus Zellplasma .....     | 26 |
| 2.6   | Affinitätschromatographie.....                            | 27 |
| 2.7   | Bestimmung der Proteinkonzentration .....                 | 29 |
| 2.8   | chemische Proteinpräzipitation.....                       | 30 |
| 2.9   | Immunpräzipitation .....                                  | 31 |
| 2.10  | Gelelektrophorese .....                                   | 32 |
| 2.11  | Western Blotting.....                                     | 34 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.12   | Lyophilisierung.....   | 38 |
| 2.13   | Mikropräparation von Proteinproben nach Gelelektrophorese.....                 | 38 |
| 2.14   | Enzymatische Proteolyse.....   | 39 |
| 2.14.1 | In-Gel Proteinverdau.....  | 39 |
| 2.14.2 | In-Lösung Proteinverdau.....   | 40 |
| 2.15   | Entsalzung von Peptidgemischen.....  | 41 |
| 2.16   | Phosphopeptidanreicherung.....   | 41 |
| 2.16.1 | Herstellung der Titandioxid- Säulen.....                                       | 41 |
| 2.16.2 | Herstellung der Oligo-R3-Säulen.....   | 41 |
| 2.16.3 | Durchführung der Phosphopeptidanreicherung.....                                | 42 |
| 2.17   | Präparation von Peptidgemischen auf Träger für die<br>Massenspektrometrie..... | 44 |
| 2.18   | LCMS- Probenvorbereitung.....  | 44 |
| 2.19   | Massenspektrometrie.....   | 45 |
| 2.19.1 | MALDI-Massenspektrometrie.....   | 45 |
| 2.19.2 | nanoLC-ESI-Massenspektrometrie.....  | 46 |
| 2.19.3 | Spektrenauswertung.....  | 47 |
| 3      | Ergebnisse.....  | 49 |
| 3.1    | Zellsystem und Generierung von Proteinextrakten.....                           | 49 |
| 3.1.1  | Ermittlung der optimalen Proteinexpression.....                                | 49 |
| 3.1.2  | Optimierung der Extraktionsbedingungen und<br>Affinitätschromatographie.....   | 52 |
| 3.2    | Die RBCC-TRIM28 –Interaktion.....  | 56 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.2.1 | Strukturcharakterisierung von RBCC durch MS-Analysen .....  | 56  |
| 3.2.2 | Strukturuntersuchungen am TRIM28 .....  | 57  |
| 3.3   | KRAB-Zinkfingerproteine als TRIM28-Interaktionspartner .....                                      | 63  |
| 3.3.1 | KRAB-Domäne enthaltende Zinkfingerproteine.....   | 67  |
| 3.3.2 | Nicht-klassische KRAB-Zinkfingerproteine .....  | 71  |
| 3.3.3 | POGK.....   | 72  |
| 3.3.4 | Untersuchungen zu anderen TRIM28 – bindenden Proteinen.....                                       | 75  |
| 3.3.5 | Chemische Charakterisierung der TRIM28-TRIM28- und<br>der TRIM28-KRAB-Interaktion.....            | 79  |
| 3.4   | Phosphopeptidanreicherungen.....  | 82  |
| 3.4.1 | Phosphopeptidanalyse mit Standardmethoden .....   | 82  |
| 3.4.2 | Methodenentwicklung zur Optimierung der<br>Affinitätschromatographie.....                         | 84  |
| 3.4.3 | Die Verwendung von THAP/DHB für eine neue<br>Matrixpräparation für die Phosphopeptidanalytik..... | 89  |
| 3.4.4 | Anwendungsbeispiele .....   | 90  |
| 4     | Diskussion und Ausblick.....  | 95  |
| 4.1   | TRIM28-Komplexe .....   | 95  |
| 4.2   | Massenspektrometrische Charakterisierung von<br>Proteinphosphorylierungen.....                    | 98  |
| 5     | Verzeichnisse .....   | 101 |
| 5.1   | Abkürzungen .....   | 101 |
| 5.2   | Literatur .....   | 103 |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 6      | Anhang .....   | 113 |
| 6.1    | SDS-Gele und Listen der identifizierten Proteine.....                    | 113 |
| 6.1.1  | Gel 1 .....  | 113 |
| 6.1.2  | Liste der identifizierten Proteine des Gel 1 .....                       | 114 |
| 6.1.3  | Gel 2 .....  | 115 |
| 6.1.4  | Liste der identifizierten Proteine des Gel 2 .....                       | 116 |
| 6.1.5  | Gel 3 .....  | 118 |
| 6.1.6  | Liste der identifizierten Proteine des Gel 3 .....                       | 119 |
| 6.1.7  | Gel 4 .....  | 122 |
| 6.1.8  | Liste der identifizierten Proteine des Gel 4 .....                       | 123 |
| 6.1.9  | Liste der identifizierten Proteine aus Abbildung 24 B.....               | 125 |
| 6.1.10 | Liste der identifizierten Proteine aus Abbildung 24 B.....               | 127 |
| 6.1.11 | Gel 5 .....  | 128 |
| 6.1.12 | Liste der identifizierten Proteine des Gel 5 .....                       | 129 |
| 6.2    | TRIM28-Spektren .....  | 130 |
| 6.2.1  | nach in-Gel-Verdau mit LysC und GluC.....                                | 130 |
| 6.2.2  | MS/MS-Messungen sequenzierter Peptide des TRIM28 .....                   | 131 |
| 6.3    | MS/MS-Spektren und BLAST-Ergebnisse der<br>KRAB-Zink-Fingerproteine..... | 134 |
| 6.3.1  | ZNF41 .....  | 134 |
| 6.3.2  | ZNF316.....  | 135 |

|        |                          |     |
|--------|--------------------------|-----|
| 6.3.3  | ZNF20 .....              | 137 |
| 6.3.4  | ZNF761 .....             | 137 |
| 6.3.5  | ZNF769/RBAK.....         | 138 |
| 6.3.6  | ZNF7 .....               | 140 |
| 6.3.7  | ZNF8 .....               | 140 |
| 6.3.8  | ZNF460 .....             | 142 |
| 6.3.9  | ZNF14 .....              | 144 |
| 6.3.10 | ZNF324 .....             | 145 |
| 6.3.11 | ZNF426 .....             | 146 |
| 6.3.12 | ZNF791 .....             | 147 |
| 6.3.13 | ZNF527 und ZNF354B ..... | 148 |
| 6.3.14 | ZNF799 .....             | 148 |
| 6.3.15 | ZNF101 .....             | 149 |
| 6.3.16 | ZNF764 .....             | 151 |
| 6.3.17 | ZNF562 .....             | 151 |
| 6.3.18 | ZNF552 .....             | 153 |
| 6.3.19 | ZNF302 .....             | 154 |
| 6.3.20 | ZFP1 .....               | 154 |
| 6.3.21 | ZNF669 .....             | 156 |
| 6.3.22 | ZNF584 .....             | 158 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 6.3.23 | ZNF707/ZNF747 .....   | 158 |
| 6.4    | NDKA-Spektren .....   | 160 |
| 6.5    | Endoplasmin-Spektren.....   | 161 |
| 6.6    | Phosphopeptidanreicherung von $\beta$ -Casein .....                   | 162 |
| 6.7    | Gegenüberstellung der DHB- und der<br>THAP/DHB-Matrixpräparation..... | 163 |

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Die Repression der Genexpression**

### **1.1.1 Allgemeine Prozesse der Genrepression**

Die gesamte Erbinformation eines Organismus, das Genom, befindet sich im Zellkern, codiert in der DNA, die als Doppelhelix vorliegt. Die Herstellung eines Proteins (Expression) läuft im Allgemeinen in folgender Reihenfolge ab. Zuerst wird ein Gen im Laufe der Transkription, die im Zellkern stattfindet, in eine messengerRNA (mRNA) „übersetzt“. Dazu bindet das Enzym RNA Polymerase II an eine bestimmte DNA-Sequenz, den Promoter und während die daran benachbarten DNA-Bereiche abschnittsweise entwunden und in ihre Einzelstränge geteilt werden, synthetisiert die RNA Polymerase II einen RNA-Strang, dessen Basensequenz komplementär zu der des abgelesenen DNA-Stranges ist. Dieser RNA-Strang wird prä-mRNA genannt und weiter prozessiert. Nach der Reifung, zu der vor allem das „Splicing“ (deutsch: Spleißen) gehört, wird die prozessierte mRNA im Rahmen der Translation aus dem Zellkern in das Cytoplasma geschleust und dient zur Vorlage der Proteinsynthese an den Ribosomen.

Doch nicht jedes Gen wird ständig „abgelesen“ und in ein Protein „übersetzt“. Zwar gibt es Proteine, die dauerhaft exprimiert werden müssen, doch genauso werden einige nur in bestimmten Zellzuständen zeitlich begrenzt benötigt. Demzufolge ist eine Regulationsmaschinerie vonnöten, die zum richtigen Zeitpunkt die Expression der Gene an- oder abschaltet oder die Stärke und Dauer ihrer Expression den Bedürfnissen der Zelle anpasst. Durch die gesteuerte Variation der Genexpression werden Zellen erst in die Lage versetzt zu wachsen, sich zu teilen, zu differenzieren und auf Änderungen der Umweltbedingungen zu reagieren.

Eine bedeutende Möglichkeit der „Genregulation“ ist die „Genrepression“. Im Wesentlichen kann die Genrepression auf zwei Ebenen, der transkriptionellen und der post-transkriptionellen Ebene stattfinden.

## ***Posttranskriptionelle Repression***

Zur Repression auf post-transkriptioneller Ebene gehört die Regulation der mRNA-Synthese für die ribosomale Translation, die insbesondere durch die RNA-Interferenz gewährleistet wird (Hannon 2002). Bei der RNA-Interferenz werden aus doppelsträngiger RNA zuerst durch „Dicer“ genannte Nukleasen 20-30 bp lange doppelsträngige RNA-Moleküle (siRNA, small interference RNA) geschaffen, die sich im weiteren Verlauf trennen und in einen „RNA-induced-silencing-complex“ (RISC, RNA-Induzierter-Stilllegungskomplex) aufgenommen werden. Dieser Komplex, bestehend aus der siRNA und Proteinen der Argonauten-Familie, komplexiert die zur siRNA komplementäre mRNA und spaltet diese, sodass sie abgebaut werden kann bzw. verhindert durch die Komplexierung und die dadurch erfolgte sterische Hinderung, die Übersetzung an den Ribosomen (Hannon 2002).

## ***Transkriptionelle Repression***

Dem gegenüber steht die transkriptionelle Repression. Die Methylierung der DNA, genauer der Cytosin-Basen, stellt eine Variante dieser Repression dar. Hierbei werden, insbesondere in Säugetieren, DNA-Methyltransferasen, z.B. DNMT1, an die DNA rekrutiert. Das führt zur Aufrechterhaltung der methylierten „GpC-Inseln“, was wiederum zu einer vererbaren Stilllegung des entsprechenden Gens führt (Bestor 2000; Mathieu und Bender 2004). In Pflanzen gibt es eine weitere Möglichkeit, die RNA-dirigierte DNA-Methylierung. Diese Art der Repression wird wie die RNA-Interferenz über doppelsträngige RNA-Moleküle vermittelt. So werden in *Arabidopsis thaliana* durch „Dicer“ ebenfalls 21-26 bp lange Moleküle hergestellt. Diese führen durch Interaktion mit Ago4 und SUVH zur Methylierung des Lysins 9 am Histon 3 (H3K9me) was seinerseits DNA Methyltransferasen wie DRM und CRT rekrutiert (Mathieu und Bender 2004). Diese führen laut Mathieu et al. ebenfalls zu Cytosinmethylierungen auch außerhalb der „CpG-Inseln“. Beide DNA-Methyltransferasen, sowohl die DRM als auch die CRT, kommen in Säugetieren nicht vor (Mathieu und Bender 2004).

Die oben erwähnte Methylierung des Lysins 9 am Histon 3 (H3K9) stellt einen wichtigen Marker für die Ausbildung des sogenannten „Heterochromatins“ dar (Bartkova, Moudry et al. 2011). Als Heterochromatin bezeichnet man sehr dicht

gepackte DNA, die sich durch eine sehr geringe Expressionstätigkeit auszeichnet. Die Transkriptionsmaschinerie ist aufgrund der dichten Packung der DNA nicht in der Lage, an diese zu binden und in RNA zu kopieren (Grewal und Jia 2007). Aktive Expression findet vor allem an den weniger dicht verpackten Bereichen der DNA, dem Euchromatin, statt.

Die Ausbildung des Heterochromatins ist ebenfalls der transkriptionellen Repression zuzuordnen. Dazu gehören die bereits erwähnte RNA-dirigierte DNA-Methylierung sowie die in dieser Arbeit näher untersuchte und auf den nächsten Seiten detaillierter dargestellte TRIM28 assoziierte Genrepression.

### 1.1.2 Die TRIM28 assoziierte Genrepression

#### TRIM28

TRIM28 oder auch KAP-1, TIF1 $\beta$ , KRIP1, SMP1 wurde erstmals von Deuschle et al. beschrieben (Deuschle, Meyer et al. 1995) und von Moosmann et al., Friedman et al. und Kim et al. genauer charakterisiert (Friedman, Fredericks et al. 1996; Kim, Chen et al. 1996; Moosmann, Georgiev et al. 1997). TRIM28 ist ein 89 kDa-Multidomänenprotein, das aus 835 Aminosäuren besteht. Es gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die das sogenannte „tripartite motif“ (TRIM) besitzen. Dieses auch RBCC-Domäne genannte Motiv setzt sich aus einem RING-Finger, zwei B-Boxen und einer coiled-coil-Domäne zusammen (Reymond, Meroni et al. 2001; Nisole, Stoye et al. 2005). Desweiteren besitzt TRIM28 eine HP1-bindende Domäne (HP1BD) und eine PHD-Bromo-Domäne (Abbildung 1).

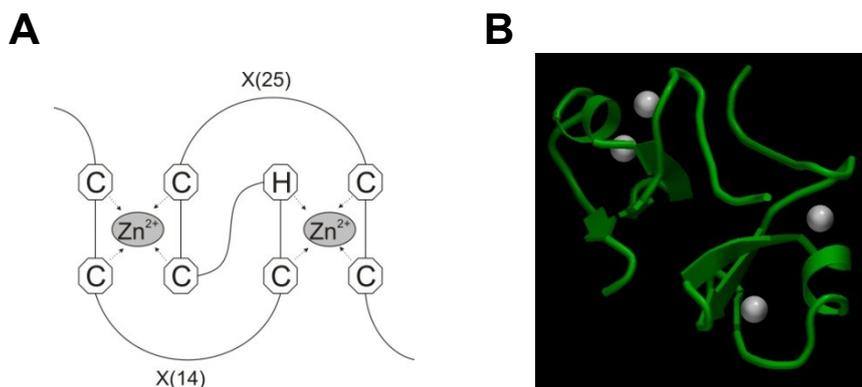


Abbildung 1: Schema des TRIM28, aufgeführt sind die Domänen. Die Zahlen unter dem Schema bezeichnen die Stelle der Aminosäuren

Alle Domänen im TRIM28 stellen Protein-Protein-Interaktions-Domänen dar. Am N-Terminus befindet sich der RING (Really Interesting New Gene)-Finger. Dieser bindet zwei Zinkionen (siehe Abbildung 2) (Borden 2000). In allen sogenannten

Zinkfinger-Domänen, zu denen auch der RING-Finger gehört, wird ein Zink-Ion von vier Aminosäuren, meistens Cystein (C) und/oder Histidin (H) gebunden. Der RING-Finger im TRIM28 hat eine C3HC4-Struktur (siehe Abbildung 2 A). Das erste und das dritte Zink-bindende Aminosäure-Paar binden das erste Zink-Ion und das zweite und das vierte Zink-bindende Aminosäure-Paar binden das zweite Zink-Ion (Borden 2000). Der RING-Finger des TRIM28 kann als E3-Ubiquitin-Ligase fungieren. So führt die Interaktion von TRIM28 mit MDM2 oder MAGE-C zur Ubiquitinylierung und nachfolgend zum Abbau des p53 (Wang, Ivanov et al. 2005; Doyle, Gao et al. 2010). Vor allem aber stellt der RING-Finger eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar. Im TRIM28 ist sie zur Interaktion mit der KRAB-Domäne der KRAB-Domäne-enthaltenden Proteine nötig (Peng, Gibson et al. 2007).

An den RING-Finger schließen sich die B-Box genannten Domänen an. Diese sind je etwa 40 Aminosäuren lang, weisen eine CHC3H2-Struktur auf und komplexieren im Protein je ein Zink-Ion. In Abbildung 2 B ist eine dreidimensionale Struktur der B2-Box des TRIM28 dargestellt.



**Abbildung 2 A:** Schema der RING-Finger-Domäne des TRIM28, C-Cystein; H-Histidin,  $Zn^{2+}$  Zink, X-beliebige andere Aminosäure, Zahl in Klammern entspricht der Anzahl der dazwischenliegenden Aminosäuren; **B:** Dreidimensionale Struktur der B-Box des TRIM28,  $Zn^{2+}$  ist in grau, die Aminosäurekette in grün dargestellt (PDB-Eintrag: 2yvr ((Wang, Kishita et al.) *Crystal structure of MS1043 To be Published*)).

Fast alle TRIM-Proteine weisen zwei B-Boxen in der Reihenfolge B1, B2 auf (Nisole, Stoye et al. 2005). Im TRIM28 tragen die B-Boxen gemeinsam mit dem RING-Finger zur KRAB-Bindung und zur TRIM28-Trimerisierung bei (Peng, Gibson et al. 2007).

Das dritte Motiv der RBCC-Domäne ist die Coiled-Coil-Domäne. Diese stellt ebenfalls eine Protein-Interaktions-Domäne dar, durch die TRIM-Proteine in der Lage sind, Homo-Oligomere zu bilden (Reymond, Meroni et al. 2001; Nisole, Stoye et al. 2005). Im TRIM28 trägt die Coiled-Coil maßgeblich zur Trimerisierung und zur KRAB-Bindung bei (Peng, Gibson et al. 2007). Weitere Untersuchungen zeigten ebenfalls eine coiled-coil-vermittelte Interaktion des TRIM28 mit anderen Proteinen wie MDM2 (Wang, Ivanov et al. 2005), MAGE-Proteinen (Yang, O'Herrin et al. 2007; Doyle, Gao et al. 2010) und E2F1 (Wang, Rauscher et al. 2007).

Als weitere Vertreter der Gruppe der TRIM-Proteine sind das Ro52/SSA (TRIM21), welches als E3-Ubiquitin-Ligase wirkt (Wada und Kamitani 2006) und das PML (TRIM19) zu nennen. Letzteres spielt eine Rolle in der Apoptose sowie in der transkriptionellen und translationellen Regulation (Nisole, Stoye et al. 2005). Charakterisiert wurde das PML als Teil des Fusionsproteins PML/RAR $\alpha$ , das eine bedeutende Rolle in der akuten Promyelocytenleukämie (APL) spielt (Dethe, Lavau et al. 1991; Goddard, Borrow et al. 1991; Kakizuka, Miller et al. 1991).

Weiterhin besitzt das TRIM28 eine HP1-bindende Domäne. Sie beinhaltet das sogenannte PxVxL-(Prolin, Valin, Leucin, x=beliebige Aminosäure) Motiv. Sie interagiert über dieses Motiv mit den Proteinen HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ , HP1 $\gamma$  (HP1-Heterochromatin Protein 1) und bindet an deren Chromoshadow-Domäne (Nielsen, Ortiz et al. 1999; Ryan, Schultz et al. 1999; Cammas, Oulad-Abdelghani et al. 2002; Ayyanathan, Lechner et al. 2003; Cammas, Janoshazi et al. 2007)

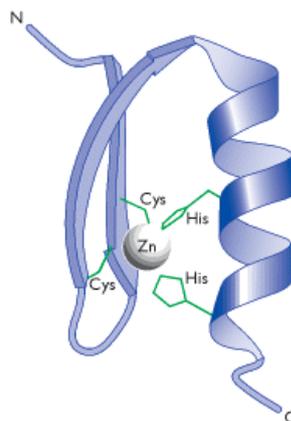
Der PHD-Finger (plant homeo domain) ist ebenfalls ein Zinkfinger, der, ähnlich dem RING-Finger, zwei Zink-Ionen bindet. Er bildet zusammen mit der Bromo-Domäne im C-terminalen Teil des TRIM28 eine funktionelle Einheit (Schultz, Friedman et al. 2001). Durch eine intramolekulare Sumoylierung der Bromo-Domäne durch den als E3-Sumo-Ligase wirkenden PHD-Finger (Ivanov, Peng et al. 2007), wird die Bromo-Domäne einer Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinen und Proteinkomplexen, die zur Reorganisation des Chromatins nötig sind, zugänglich gemacht. So bindet sie an die Komplexe NuRD und NCoR, die ihrerseits Histondeacetylasen beinhalten (Underhill, Qutob et al. 2000; Schultz, Friedman et al. 2001) und an die Methyltransferase SETDB1 (Schultz, Ayyanathan et al. 2002).

## C2H2-Zinkfinger

Diese spezielle DNA-bindende Domäne wurde erstmals im TFIIIA des *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) von Miller et al. entdeckt (Miller, Mclachlan et al. 1985). Später konnte sie auch im „Krüppel“ genannten Gen der *Drosophila* (Fruchtfliege) nachgewiesen werden. (Schuh, Aicher et al. 1986). Die C2H2-Zinkfinger sind Domänen der Konsensussequenz:



wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Die Aminosäuren Cystein (C) und Histidin (H) koordinieren ein  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion tetraedrisch. Dadurch wird die räumliche Struktur der Domäne bestimmt (siehe Abbildung 3). Die Domäne faltet in zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter und eine  $\alpha$ -Helix.



**Abbildung 3: C2H2-Zinkfingerdomäne des SWI5-Proteins aus der Hefe, Blau: Sekundärstruktur der Domäne, Grün: Zinkbindene Aminosäurereste Cys-Cystein, His-Histidin, Grau: Zink-Ion (Brown 2002) (Chapter 9, Assembly of the Transcription Initiation Complex)**

Begrenzt wird dieses Motiv vom sogenannten HC-Linker, dessen Sequenz TGEKP ebenfalls hochkonserviert ist und zur DNA-Bindung beiträgt (Choo und Klug 1993). Die Aminosäuren -1, 3 und 6 der  $\alpha$ -Helix bestimmen maßgeblich die DNA-Bindung (Emerson und Thomas 2009) zu einem Strang, während die Aminosäure Nummer 2 der Helix in einigen Fällen zwar ebenfalls zur DNA-Bindung beiträgt, allerdings an den Komplementärstrang bindet (Wolfe, Nekludova et al. 2000). Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Röntgenstruktur des DNA-gebundenen EGR1/Zif268 (Pavletich und Pabo 1991; Lorenz, Dietmann et al. 2010). Die 1 stellt



Aminosäuren lang (Bellefroid, Poncelet et al. 1991) und besteht aus der KRAB-A-Domäne und oft aus einer weiteren, der KRAB-B-, KRAB-b- oder KRAB-C-Domäne (Vissing, Meyer et al. 1995; Urrutia 2003; Looman, Hellman et al. 2004; Peng, Gibson et al. 2007). Während im Falle der KRAB-AB-Proteine, die B-Domäne für die Repression nötig ist, scheint die KRAB-b-Domäne keinen nennenswerten Einfluss auf die Repression zu haben (Urrutia 2003). Bemerkenswert ist hier, dass sowohl die KRAB-A- als auch die jeweilige zusätzliche KRAB-B-Domäne jeweils durch ein eigenes Exon codiert werden. Proteine, in denen nur die KRAB-A-Domäne zu finden ist, können also entweder von einem Gen, das nur eine KRAB-A-Domäne enthält, stammen oder von einem Gen, das sowohl für eine KRAB-A- als auch für eine KRAB-B-Domäne codiert, das durch alternatives Splicen der mRNA die KRAB-B-Domäne wieder verliert (Urrutia 2003).

Einige KRAB-Domäne enthaltenden Proteine besitzen noch eine weitere Domäne, die SCAN-Domäne. Deren Name leitet sich von den Anfangsbuchstaben der vier Proteine ab, in denen sie zuerst nachgewiesen wurde: SRE-ZBP, CTfin51, AW-1, und Nummer 18 cDNA. Über die SCAN-Domäne werden ausschließlich Homo- bzw. Heterodimerisierungen zu anderen SCAN-Domänen vermittelt (Urrutia 2003).

Wie bereits erwähnt, enthalten die KRAB-Zinkfinger Proteine mehrere C2H2-Zinkfinger-Domänen. So erstreckt sich die Anzahl im Protein von 5 bis über 30 Zinkfingerstrukturen. Im Gegensatz zur KRAB-Domäne werden in KRAB-Zinkfinger-Proteinen die Zinkfinger-Domänen in einem einzigen Exon codiert. Andere Zinkfinger-Proteine wie z.B. das SP1-like protein weisen in ihren Genen mehrere Zinkfinger-Exons auf (Urrutia 2003).

Im Falle der KRAB-vermittelten Genrepression bindet die KRAB-Domäne an die RBCC-Domäne im TRIM28 (Friedman, Fredericks et al. 1996; Agata, Matsuda et al. 1999; Peng, Begg et al. 2000; Abrink, Ortiz et al. 2001). Dadurch bildet es zusammen mit TRIM28 Komplexe über die im Abschnitt „Modell der TRIM28 assoziierten Genrepression“ noch genauer eingegangen wird.

## ***KRAB-Domäne-enthaltende Proteine***

Obwohl es über 400 KRAB-Zinkfinger Proteine im Menschen gibt, ist über deren Funktionen wenig bekannt. Einigen KRAB-Zinkfinger-Proteinen konnte allerdings eine Beteiligung in humanen Krankheiten nachgewiesen werden (Shoichet, Hoffmann et al. 2003; Lugtenberg, Yntema et al. 2006; Scherneck, Nestler et al. 2009). Shin et al konnten zeigen, dass das Zinkfingerprotein PARIS/ZNF746 an sogenannte Insulin-Response-Elemente bindet und dadurch die Expression von PGC-1 $\alpha$  und dessen Ziel-Gen NRF-1 reprimiert. Damit stellten sie eine Verbindung des PARIS/ZNF746-parkin/PGC-1 $\alpha$  Systems zur Parkinson'schen Krankheit her (Shin, Ko et al. 2011). Eine Autoregulation der KRAB-Zinkfinger Gene durch die Bindung der TRIM28 Repressorkomplexe im codierenden 3'-Bereich wurde durch O'Geen et al. gezeigt (O'Geen, Squazzo et al. 2007).

Eine Ausnahme im Reich der KRAB-Domäne-enthaltenden Proteine stellt das POGK dar. Dieses KRAB-Protein enthält anstatt der Zinkfinger-Domänen ein Helix-Schleife-Helix-Motiv. Desweiteren besitzt es eine DDE-Domäne, die es als einen Vertreter der Transposasen kennzeichnet. Weitere KRAB-Proteine mit Ähnlichkeiten zu Transposasen sind das „ZNF862“ und das „KRAB-domain containing Protein 2“. Beide besitzen eine „RNAse H-like“-Domäne, die topologisch mit der DDE-Domäne verwandt ist (Katayanagi, Miyagawa et al. 1990).

Weitere Ausnahmen sind die sogenannten KRAB-O-Proteine (Peng, Ivanov et al. 2009). Diese Proteine bestehen nur aus der KRAB-Domäne und entstehen wahrscheinlich durch alternatives Splicen der KRAB-Zinkfinger mRNAs. Sie werden über ein separates Protein an die DNA gebunden. So zeigten Peng et al., dass das „sex-determining region Y-Protein“ SRY an die DNA bindet und einen stabilen Komplex aus KRAB-O und TRIM28 bildet (Peng, Ivanov et al. 2009). Peng et al. zeigten außerdem mit Hilfe von Gal4-Luciferase Reportersystemen, dass dieser Komplex in der Lage ist, die Repression zu vermitteln (Peng, Ivanov et al. 2009).

## ***Modell der TRIM28 assoziierten Genrepression***

Wie bereits dargestellt, ist TRIM28 ein Multidomänenprotein und interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen. Die so gebildeten Komplexe können dann Proteine

modifizieren, die Transkription aktivieren oder reprimieren. So bildet TRIM28 einen Komplex mit MDM2 und p53 und stimuliert die p53-HDAC1 Interaktion. Diese führt zur Deacetylierung des p53 (Wang, Ivanov et al. 2005). Laut Wang et al. stimuliert TRIM28 außerdem die Ubiquitylierung und damit den Abbau des p53. Eine Interaktion von TRIM28 und p53, die zum Abbau von p53 führt, wurde ebenfalls von Yang et al. beobachtet und auf die Deacetylierung des p53 durch den MAGE-C-TRIM28-Komplex zurückgeführt (Yang, O'Herrin et al. 2007). Doyle et al. zeigten die Fähigkeit des TRIM28 in einem Komplex mit MAGE-C2, p53 zu ubiquitylieren und lokalisierten die E3-Ubiquitin-Ligase-Eigenschaft auf dem RING-Finger des TRIM28 (Doyle, Gao et al. 2010). Eine Regulation der E2F1-Funktion durch TRIM28 ist von Wang et al. beschrieben worden. Sie zeigten die Interaktion des E2F1 mit TRIM28 über dessen Coiled-coil-Domäne. Der Komplex führte zur Bindung der Histondeacetylase 1, die ihrerseits E2F1 deacetylierte. Die Überexpression an TRIM28 führte zur Inhibierung des E2F1 und der Apoptose, wogegen die Reduktion des TRIM28 zur E2F1-Aktivierung und damit zur Aktivierung der Apoptose führte (Wang, Rauscher et al. 2007).

Die zweite Kategorie, die TRIM28 bedingte Aktivierung der Expression, wurde von Rambaud et al. in einer Untersuchung, den nukleären Rezeptor NGFI-B/Nur77 betreffend, gezeigt (Rambaud, Desroches et al. 2009). Sie konnten darlegen, dass TRIM28 die Transkription des POMC (Proopiomelanocortin)-Genes durch „Nur orphan NRs“ in Folge der Stimulation durch CRH (Corticotropin releasing hormone) steigert. Weiterhin erhöhte TRIM28 die Nur-abhängige CRH- und PKA-Antwort (Rambaud, Desroches et al. 2009).

Chang et al. wiesen die Interaktion von TRIM28 mit C/EBP $\beta$  und Glucocorticoid Receptor nach und führten die Aktivierung der Expression des  $\alpha$ 1-Acid Glycoproteins darauf zurück. Die bZIP-Domäne des C/EBP $\beta$  bindet an die RBCC-Domäne des TRIM28. Für die Expressionssteigerung des, in der Studie als Reporter genutzten *agp*-Genes, ist die Präsenz des funktionstüchtigen PHD-Fingers des TRIM28 nötig. Weiterhin steigerte TRIM28 die Expression des „mouse mammary tumor virus“ und des *agp*-Genes in Anwesenheit von Dexamethason und dem Glucocorticoid Rezeptor (Chang, Chen et al. 1998).

Andere Studien zeigen die Transkriptionsaktivierung des „fibroblast-specific protein 1“ (FSP1) während der epithelialen mesenchymalen Transition (Venkov, Link

et al. 2007) und die Aktivierung der Nrf2-abhängigen Transkription (Maruyama, Nishikawa et al. 2011).

Die weitaus größte Bedeutung jedoch kommt der TRIM28-KRAB-vermittelten Genrepression zu (Friedman, Fredericks et al. 1996; Agata, Matsuda et al. 1999; Gebelein und Urrutia 2001; Cao, Wang et al. 2005; Medugno, Florio et al. 2005; Groner, Meylan et al. 2010; Shin, Ko et al. 2011).

In Abbildung 5 ist das Modell der KRAB-vermittelten Genrepression schematisch zusammengefasst.

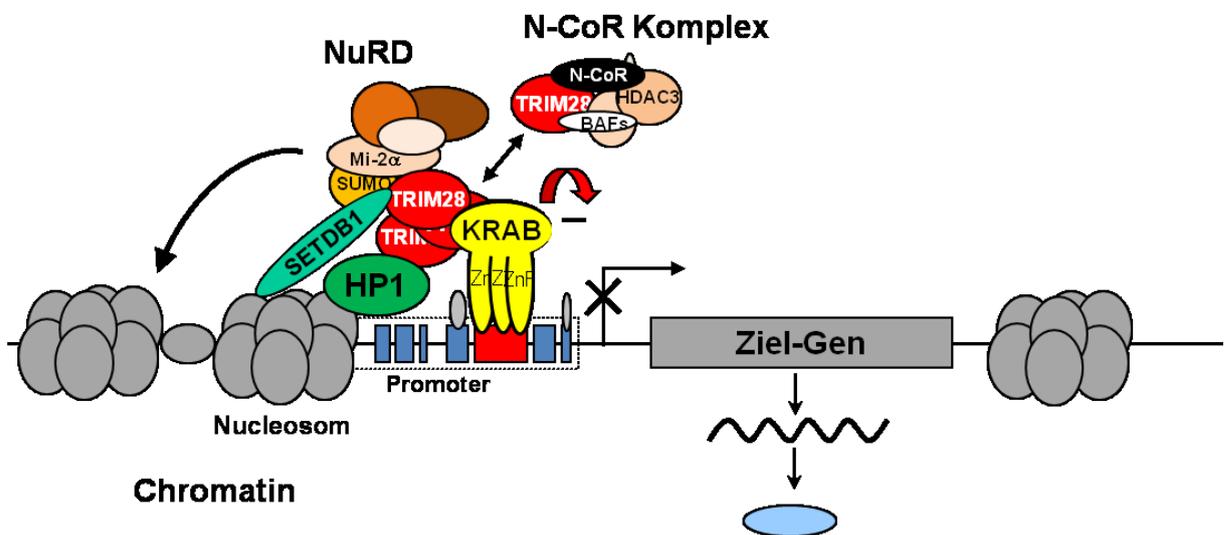


Abbildung 5: Modell der KRAB-vermittelten Genrepression. Ein TRIM28-Trimer (rot mit weißer Beschriftung) bindet an ein DNA-gebundenes KRAB-ZNF-Protein (gelb). Sumoyliertes (Orange) TRIM28 rekrutiert histonmodifizierende Proteine (SETDB1 (hellgrün) NuRD-, N-CoR-Komplexe (ocker, schwarz)) und bildet mit HP1 (Grün mit schwarzer Beschriftung) Heterochromatin. (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Lorenz)

TRIM28 bindet mit seiner N-terminalen RBCC-Domäne an KRAB-Domänen im stöchiometrischen Verhältnis 3:1 (Peng, Begg et al. 2000; Peng, Begg et al. 2000). Für diese Bindung ist die Trimerisierung des TRIM28 nötig, die ebenfalls über die RBCC-Domäne geschieht (Peng, Begg et al. 2000; Peng, Gibson et al. 2007). Die KRAB-Zinkfinger Proteine binden über ihre C2H2-Zinkfinger an die DNA und lokalisieren dort auf diese Weise ebenfalls TRIM28 (Huntley, Baggot et al. 2006). Der PHD-Finger fungiert als E3-Sumo-Ligase und sumoyliert die Bromodomäne (Ivanov, Peng et al. 2007). Diese ist nun in der Lage, Mi2α/CHD3 zu binden. Mi2α/CHD3 ist ein integraler Bestandteil des NuRD-Komplexes, der Histondeacetylasen enthält

(Schultz, Friedman et al. 2001) und eine Rolle in der Chromatindeacetylierung spielt (Tong, Hassig et al. 1998). Ein weiterer Histondeacetylase-Komplex, der „Nuclear Receptor Corepressor Complex“ (NCoR), wird ebenfalls an die sumoylierte Bromodomäne gebunden (Mascle, Germain-Desprez et al. 2007). Zusammen mit der Beobachtung, dass Trichostatin A (TSA), ein Inhibitor der Histondeacetylase, der TRIM28-assoziierten Repression entgegenarbeitet (Le Douarin, Nielsen et al. 1996; Nielsen, Ortiz et al. 1999) geht man davon aus, dass die Deacetylierung der Histone über diese Komplexe vermittelt wird. Die Histonmethyltransferase SETDB1 stellt einen weiteren TRIM28-Interaktionspartner dar (Schultz, Ayyanathan et al. 2002), der ähnlich der Deacetylase-Komplexe, ebenfalls an die sumoylierte PHD-Bromodomäne bindet (Ivanov, Peng et al. 2007). Infolgedessen wird das Lysin 9 am Histon 3 (H3K9) dreifach methyliert. Das trimethylierte Lysin besitzt eine hohe Affinität zur Chromodomäne des Heterochromatinproteins 1 (Schultz, Ayyanathan et al. 2002). HP1 homodimerisiert über die ChromoShadow-Domäne und bindet über diese ebenfalls an die HP1-bindende Domäne des TRIM28 (Schultz, Ayyanathan et al. 2002). Der entstandene Komplex aus DNA, KRAB-Protein, TRIM28 und HP1 führt zur Bildung von Heterochromatin und damit zu einer sehr dichten Verpackung der DNA. Somit kann die Transkriptionsmaschinerie nicht mehr angreifen und das Gen ist reprimiert. Durch Phosphorylierungen des TRIM28 ist die Möglichkeit zur Regulation der Repression gegeben. So reguliert eine Phosphorylierung am Serin473 die Interaktion des TRIM28 zum HP1 (Chang, Chou et al. 2008). Die durch die Kinase PKC $\delta$  erfolgende Phosphorylierung hat die Dissoziation des HP1 vom TRIM28 zur Folge und damit die Auflösung der dicht gepackten Heterochromatinstruktur (Chang, Chou et al. 2008). Eine weitere Phosphorylierung, die am Serin 824 erfolgt, wird durch die Kinase „ataxia telangiectasia mutated“ (ATM) katalysiert und ist eine Folge von DNA Doppelstrangbrüchen. Diese Modifikation reguliert die Sumoylierung des TRIM28 in der Weise, dass sie zur Desumoylierung führt. In der Folge dissoziiert das phosphorylierte TRIM28 von der beschädigten DNA und verteilt sich im Nucleoplasma (Ziv, Bielopolski et al. 2006; Lee, Thomas et al. 2007; Li, Lee et al. 2007; Li, Lin et al. 2010). Dadurch wandelt sich das Heterochromatin um und die DNA-Reparaturmechanismen bekommen Zugang zur DNA. Anschließend folgt die Dephosphorylierung durch PP1-Phosphatasen und schließlich die „Resumoylierung“ (Li, Lin et al. 2010).

## 1.2 Proteinanalytische Methoden

### 1.2.1 Affinitätschromatographie

Als Affinitätschromatographie bezeichnet man ein Verfahren zur Anreicherung und Aufreinigung von Zielmolekülen durch Ausnutzen einer hoch spezifischen Interaktion zu einem anderen Molekül. Häufig verwendete Affinitätschromatographie-Systeme sind das Glutathion S-Transferase (GST) System (Frangioni und Neel 1993), das Ni-NTA-System zur Anreicherung von Proteinen mit His-Tag (Hochuli, Bannwarth et al. 1988; Hengen 1995), das Streptavidin-Biotin/Streptag-System (Wu 2006; Schmidt und Skerra 2007) oder das TiO<sub>2</sub>-System zur Anreicherung von Phosphoproteinen und -peptiden (Pinkse, Uitto et al. 2004; Olsen, Blagoev et al. 2006).

Eine der stärksten biologischen nichtkovalenten Interaktionen stellt die Interaktion des Avidins mit Biotin dar. Streptavidin, ein Protein, das von der Bakterienart *Streptococcus* gebildet wird, ist mit Avidin verwandt und zeigt ebenfalls eine hohe Affinität zu Biotin. Schmidt et al. modifizierten Streptavidin in einer Weise, dass eine flexible Schleife in der Sekundärstruktur, die sich im unmodifizierten Streptavidin nach Bindung des Biotins schließen würde (Abbildung 6 B), offenbleibt (Abbildung 6 D, E) (Skerra 2003).

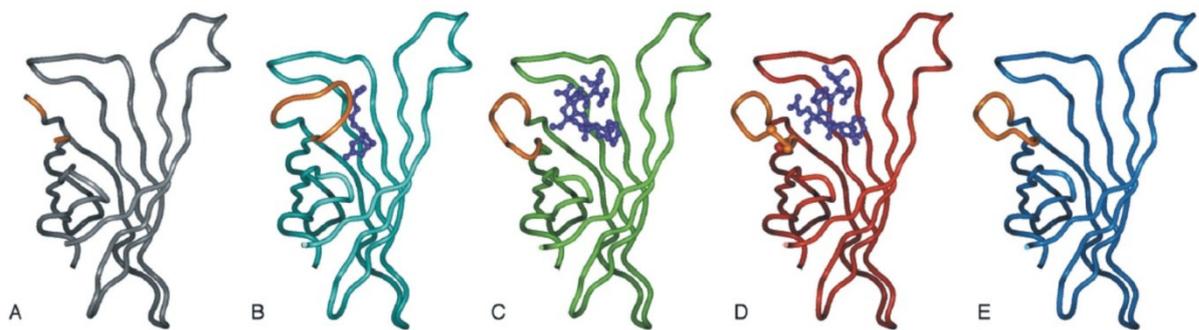
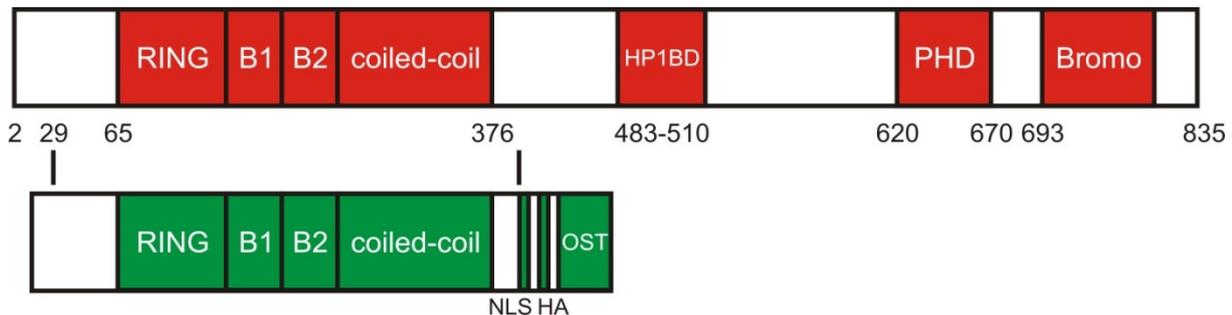


Abbildung 6 A: apo-Streptavidin, B: Streptavidin mit gebundenem Biotin und geschlossener Schleife; C: Streptavidin mit gebundenem OneStrepTag; D: Streptavidin mit gebundenem OneStrepTag und mutierter offener Schleife; E: apo-Streptavidin mit mutierter offener Schleife (Skerra 2003)

Dadurch wurde die Bindung größerer Strukturen z.B. Peptiden möglich (Abbildung 6 C, D). Dieses modifizierte Streptavidin, nun als Streptactin bezeichnet, weist eine hohe Affinität zum Peptid mit der Sequenz WSHQPFEK auf. Dieser sogenannte

OneStrepTag kann in Fusionsproteine eingebaut und mit Hilfe der Affinitätschromatographie über die Streptactin-Matrix isoliert werden. Die Elution kann mit Biotin oder Desthiobiotin erfolgen (Schmidt und Skerra 2007). Desthiobiotin bindet kompetitiv an Streptactin und eluiert damit die StrepTag-Fusionsproteine. Dieses System wurde auch in dieser Arbeit genutzt. Weitere ebenfalls angewendete affinitätschromatographische Systeme waren die TiO<sub>2</sub>-Phosphopeptidanreicherung und die Immunpräzipitation.

Die in dieser Arbeit verwendete Strategie zur Anreicherung TRIM28-interagierender Proteine basiert auf der Funktion der RBCC-Domäne des TRIM28 (siehe Abschnitt 1.1.2). Da diese sowohl für die Homotrimerisierung als auch zur Bindung der KRAB-Domäne nötig ist, wurde sie zusammen mit einer nukleären Lokalisierungssequenz (NLS), einem HA-Tag (HA) und einem OneStrepTag (OST) stabil in HeLa-Zellen transfiziert. Das resultierende Protein wird in der Folge RBCC-Konstrukt genannt (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Das obere Schema stellt TRIM28 (siehe auch Abbildung 1) dar. Die RBCC-Domäne sowie eine NLS-Sequenz, ein HA-Tag und der OneStrepTag ergeben das unten schematisch dargestellte RBCC-Konstrukt.

Die dafür verwendete Zelllinie exprimiert bereits einen tetR-VP16-Transaktivator (Gossen, Freundlieb et al. 1995), welcher es ermöglichen soll, das RBCC-Konstrukt unter Zugabe von Doxycyclin induzierbar zu exprimieren (Eickner, Lorenz et al. in Vorbereitung). Durch einen geeigneten Zellaufschluss mit nachfolgender StrepTactin-Affinitätschromatographie sollen diese Proteinkomplexe angereichert und aufgereinigt werden. Nach der Elution der Komplexe erfolgt dann die Trennung der Komplexe und die massenspektrometrische Identifizierung und Charakterisierung der erhaltenen Proteine (Abbildung 8).

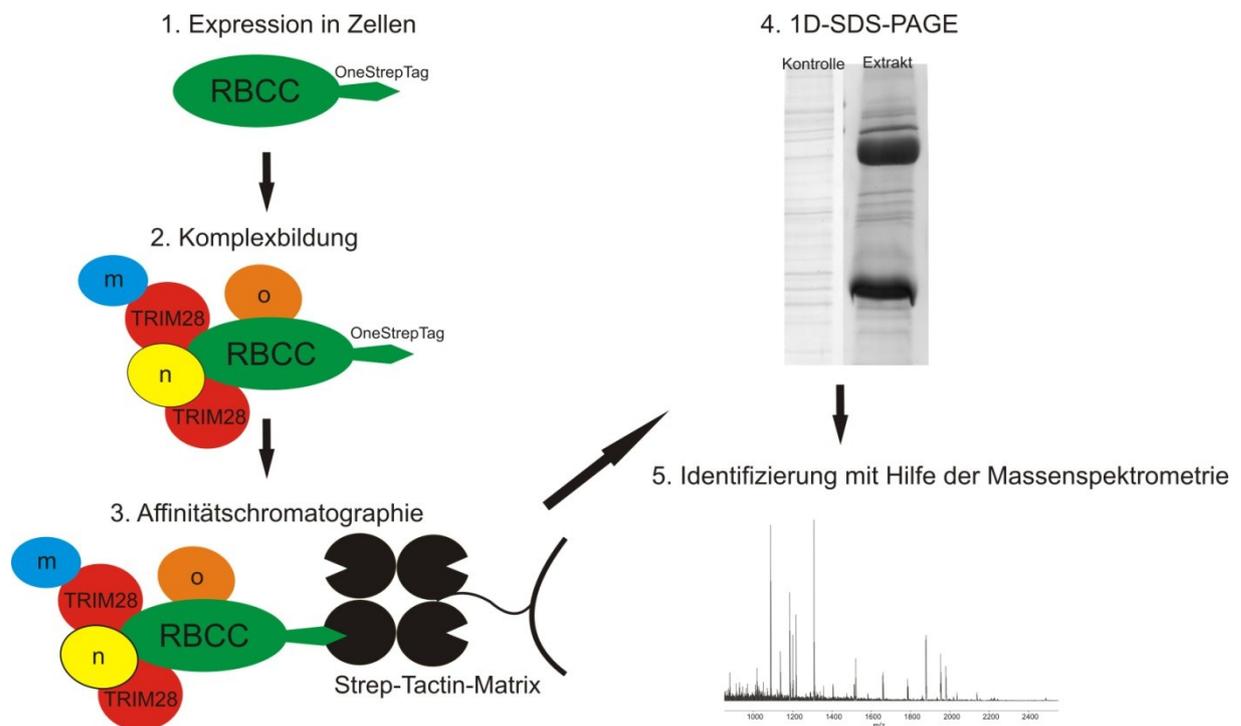


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Anreicherungsstrategie zur Analyse TRIM28-interagierender Proteine. Grün: RBCC-Konstrukt; Rot: TRIM28; Gelb, Blau, Orange: TRIM28-interagierende Proteine; Schwarz: Streptactin-Matrix

## 1.2.2 Massenspektrometrie

### Molekulargewichtsbestimmungen

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Methode zur Molekulargewichtsbestimmung. Dazu werden Analyten ionisiert, in die Gasphase überführt und anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt. Ionen verschiedener Masse-zu-Ladung-Verhältnisse ( $m/z$ ) verhalten sich unterschiedlich und geben dadurch die Möglichkeit der Sortierung. Durch Kenntnis der Ladung lässt sich die Masse des Ions bestimmen.

Massenspektrometer bestehen grundsätzlich aus drei Hauptkomponenten: der Ionenquelle, dort werden die Analyten ionisiert und in die Gasphase überführt; dem Analysator, dort werden die erhaltenen Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis sortiert und dem Detektor, der die Ionen letztendlich registriert. Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI-) und Elektrospray-Ionisierungs- (ESI-) Quellen verwendet. Die MALDI-

Massenspektrometrie wurde von Karas et al. entwickelt (Karas, Bachmann et al. 1985; Tanaka, Waki et al. 1988). Dabei wird der Analyt auf einem Target aufgebracht und zusammen mit einer Matrix kokristallisiert. Die verwendete Matrix sollte folgende Eigenschaften besitzen. Sie sollte in der Lage sein, die Wellenlänge des verwendeten Lasers zu absorbieren und weiterhin gute Kokristallisationseigenschaften besitzenden, d.h. die Analytmoleküle so in das Kristallgitter einbauen, dass jedes dieser vollständig von Matrix-Molekülen umgeben ist. Verbreitete Matrices in der Proteinanalytik, insbesondere zur Aufnahme von Peptidgemischspektren, sind  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure (HCCA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). Zur Messung größerer Peptide und Proteine werden außerdem Ferulasäure und Sinapinsäure eingesetzt (Beavis und Chait 1989). 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP) findet unter anderem Verwendung in der Analyse von Polysacchariden (Hsu, Yang et al. 2007). Anschließend wird mit einem Laser Energie auf das Matrix-Analytgemisch übertragen. Dadurch kommt es zu einer schnellen Erhitzung und daraus resultierenden explosionsartigen Verdampfung der Matrix. Dabei werden die Analyt-Moleküle mitgerissen. Während dieser Desorption kommt es durch Kontakt mit den Matrixmolekülen oder auch durch die Energieübertragung des Lasers zur Ionisierung der Analyten (Knochenmuss 2006).

Im Gegensatz zur MALD-Ionisierung, die in der Regel im Vakuum stattfindet, handelt es sich bei der Elektrospray-Ionisierung um eine ausschließlich bei Atmosphärendruck durchgeführte Ionisierung. Dabei wird eine Analytlösung, in der die Analyten bereits zum Teil ionisiert vorliegen, z.B. durch eine Glaskapillare geleitet. Diese Glaskapillare ist metallbedampft, sodass es möglich ist, ein elektrisches Feld anzulegen. Durch eine Spannung zwischen 1,2 und 2 kV werden die entgegengesetzt geladenen Ionen an die Kapillarwand gezogen, während die gleich geladenen Ionen aus der Kapillare austreten und einen sogenannten Taylor-Konus bilden (Taylor 1964). Aus diesem Konus tritt ein Jet heraus, der sich aufgrund der abstoßenden Coulomb-Kräfte der in der Lösung befindlichen Ionen in ein feines Spray aufteilt. Da die Ionenquelle geheizt ist und mit Stickstoff durchströmt wird, schrumpfen die Spray-Tröpfchen aufgrund der Evaporation des Lösemittels. Sobald das Raleigh-Limit, das Gleichgewicht zwischen Oberflächenspannung und abstoßender Coulomb-Wechselwirkung, überschritten wird, kommt es zur sogenannten Coulomb-Explosion in deren Folge kleinere, geringer geladene Tröpfchen entstehen. Dieser Prozess wiederholt sich bis vollständig desolvatisierte

(„nackte“) Ionen vorliegen, die in den Einlass des Massenspektrometers eintreten. Dieses Modell wird „Charged Residue Model“ genannt (Dole, Mack et al. 1968). Ein weiteres Modell der Ionisierung nennt sich „Ion Evaporation Model“ (Iribarne und Thomson 1976). In diesem Modell führt nicht die Coulomb-Explosion, sondern der Übergang eines „nackten“ Ions aus dem Spray-Tröpfchen in die Gasphase zur Verringerung der Ladungsdichte im Tröpfchen.

Als Analysator werden bei der Untersuchung von Proteinen häufig Flugzeitanalysatoren (Time-of-flight, ToF) verwendet. Diese bestehen aus einer Beschleunigungsstrecke und einem feldfreien Flugrohr. Heutzutage werden oft zusätzlich ein oder zwei Reflektoren eingebaut. Die Ionen werden in der Beschleunigungsstrecke in einem konstanten, elektrischen Feld beschleunigt. Dadurch, dass sowohl die Strecke als auch das Feld für alle Ionen gleich ist, wird auf jedes Ion die gleiche Energie übertragen. Die resultierende Geschwindigkeit der Ionen und damit ihre Flugzeit ist proportional zu ihrer Masse und umgekehrt proportional zu ihrer Ladung entsprechend der nachfolgenden Formel (Wolff und Stephens 1953).

$$\frac{m}{z} = \frac{2t^2 eU}{l^2}$$

$m/z$  = Verhältnis Masse zu Ladung

$t$  = Flugzeit

$l$  = Fluglänge

$U$  = Spannung

$e$  = Elementarladung

Nach Messung der Flugzeit kann das Masse-zu-Ladung-Verhältnis der Analyt-Ionen berechnet werden. Durch den Einsatz eines Reflektors kann die Auflösung weiter erhöht werden (Mamyrin, Karataev et al. 1973). Die Funktionsweise des Reflektors gleicht die etwas unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Ionen gleicher  $m/z$ -Werte aus. Dabei dringen schnellere Ionen tiefer in den Reflektor ein als langsame Ionen. So wechselt die Flugreihenfolge, die schnelleren Ionen waren vor dem Eintritt in den Reflektor den langsameren voraus. Nach Austritt aus dem Reflektor werden die schnelleren durch die „langsameren Ionen“ eingeholt und treffen gleichzeitig am Detektor auf. Die Lage des Detektors wird nun so gewählt, dass die jeweils schnelleren und langsameren Ionen über einen großen Massenbereich möglichst

gleichzeitig auftreten. Die Auflösung lässt sich auf diese Weise erheblich steigern. Durch den Einsatz eines Reflektors zeigt das Bruker Reflex III MALDI-ToF-Massenspektrometer, das neben anderen Instrumenten in dieser Arbeit verwendet wurde, Auflösungen von  $m/\Delta m=10000$  (FWHM) bei  $m/z$  2000. Durch Neutralisierungsprozesse der Ionen während der Flugphase vor dem Reflektor und den Umstand, dass neutrale Moleküle im Reflektor nicht abgelenkt werden, geht der Gewinn an Auflösung allerdings zu Lasten der Sensitivität. Weitere Analysatoren sind z.B. der Quadrupol und die FT-ICR-Zelle.

Als Detektor dient in vielen Fällen ein Sekundärelektronenvervielfacher, z.B. in Form einer sogenannten Multichannelplate (MCP). Eine MCP ist ein Wafer, in den feine Kanäle eingätzt und mit einem elektronenabgebenden Material beschichtet sind. Er wird so im Massenspektrometer platziert, dass Ionen auf die Kanalwände schlagen können, dadurch Elektronen aus diesen herauslösen, die ihrerseits wiederum Elektronen herausschlagen. Es kommt zu einer Kaskade, in deren Folge es zu einer Verstärkung des Signals kommt (Wiza 1979). Letztlich wird dieses Signal von einem elektronischem Datensystem aufgezeichnet. Die so erhobenen Daten können mit Hilfe einer speziellen Software am Computer ausgewertet werden.

### ***Peptide-Mass-Fingerprint***

Durch den Einsatz der oben beschriebenen Massenspektrometer zur Messung von Peptidgemischen, die vorher aus Proteinen durch proteolytischen Verdau erzeugt wurden, gelangt man zu Massenlisten, die eine Identifizierung der zugrundeliegenden Proteine mit hoher Sicherheit zulassen. Die experimentell bestimmten Massen lassen sich mit theoretisch berechneten, in Datenbanken abgelegten Listen abgleichen und statistisch auswerten. Dieses Verfahren wird Peptide-Mass-Fingerprint genannt (Pappin, Hojrup et al. 1993). Das Peptide-Mass-Fingerprint Verfahren hat aber den Nachteil, dass es Signale nicht zuordnen kann, wenn das entsprechende Peptid eine von dem Datenbankeintrag verschiedene Sequenz aufweist oder eine unbekannt posttranslationale Modifikation trägt.

## ***Peptide Mapping***

Das Peptide Mapping Verfahren beschreibt die manuelle Inspektion der Spektren und das Vergleichen mit individuell angefertigten Massenlisten, womit es möglich ist, den gesamten Sequenzbereich eines Proteins abzudecken bzw. anhand der Peptidionensignale posttranslationale Modifikationen (PTMs) sowie weitere Prozessierungen aufzuklären (Glocker, Borchers et al. 1994). Damit können demzufolge nicht nur Proteine identifiziert, sondern auch komplexe Proteinstrukturen sowie deren Veränderungen untersucht werden. (Bantscheff und Glocker 1998; Happersberger, Cowgill et al. 2002).

## ***Peptid-Fragment-Analyse***

Eine Möglichkeit, nicht zugeordnete Peptidionensignale aufzuklären, stellt die Peptid-Fragment-Analyse dar. Peptidfragmente erhält man durch Tandem-Massenspektrometrie. Man wählt ein Signal aus, filtert es über einen Quadrupol oder hält es in einer Ionenfalle zurück, um es z.B. mit Hilfe kollisionsinduzierter Dissoziation (Collision Induced Dissociation, CID) zu fragmentieren. Das Axima MALDI-QIT-ToF-MS<sup>n</sup> Gerät der Firma Shimadzu ermöglicht die Anwendung dieses Prinzips. Es besitzt eine Quadrupol-Ionen-Falle (Quadrupole Ion Trap, QIT), die vor dem Flugrohr platziert ist. Diese Quadrupol-Ionen-Falle ist ein „Paul-Käfig“ (Paul und Steinwedel 1953; March 2000), der es ermöglicht, Ionen einzufangen. Durch Einleiten eines Stoßgases wie Argon lassen sich die ausgewählten Ionen mit Hilfe kollisions-induzierter Dissoziation fragmentieren (Koy, Resch et al. 2004). Nach der CID können die Fragment-Ionen aus dem Käfig entlassen werden und durch die Flugzeitbestimmung gemessen werden. Alternativ kann ein erzeugtes Ion ausgewählt und weiter fragmentiert werden. Auf diese Weise ist eine komplexe Fragmentierung von Ionen möglich, wodurch man weitere, die Sequenz betreffende Informationen erhält.

Peptide fragmentieren überwiegend auf vergleichbare Weise. In Abbildung 9 ist die Nomenklatur nach Roepstorff dargestellt. So sind in den Spektren des MALDI-QIT-ToF-MS<sup>n</sup> Massenspektrometers überwiegend B- und Y''-Fragmente zu beobachten. Diese entstehen durch eine Spaltung der Peptidbindung, die die labilste Bindung im Protein-Rückgrat darstellt. Befindet sich die Ladung im N-terminalen Bereich, handelt



## **2 MATERIALIEN UND METHODEN**

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck, Roth oder Sigma bezogen. Das verwendete Wasser in allen angesetzten Puffern und Reaktionsansätzen stammt aus einer institutseigenen Reinstwasser-Anlage von TKA Genpure. Bei der Arbeit mit Zellkulturen wurden alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **2.1 Zellzucht**

Adhäsiv wachsende HeLa-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen (Greiner Bio-One, Kremsmünster Österreich) in je 15 ml DMEM- Medium (Medium DMEM high Glucose (4,5 g/l) +FCS + Penicillin/ Streptomycin, PAA, Linz, Österreich,) für etwa drei Tage im Brutschrank (Water Jacked Incubator, Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA) bei 37°C wachsen gelassen. Sobald die Zellen den Boden der Flaschen vollständig bedeckten, wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen einmal mit 3 ml PBS gespült, bevor 2 ml Trypsin-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pro Flasche zum Ablösen der Zellen dazugegeben wurden. Durch die Zugabe von 1 ml Medium nach 10 min wurde die Reaktion gestoppt und die erhaltene Zellsuspension zu je 0,5 ml pro neue Flasche verteilt. In diesen wuchsen die Zellen wie oben beschrieben weiter. Dieses „Passagieren“ genannte Weiterverteilen wurde wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an Flaschen mit erforderlicher Zelldichte erreicht war. Zur Aussaat der Zellen zur Zellfixierung (siehe 2.4) wurde statt des Passagierens die Zellzahl bestimmt (siehe 2.3) und die gewünschte Anzahl an Zellen in die Vertiefungen der Titerplatte gegeben (Lorenz, Koczan et al. 2001).

Für Untersuchungen der Zellen in Gegenwart von Doxorubicin wurde dem Medium drei Stunden vor der Zellernte Doxorubicin zu einer Endkonzentration von 1 µmol/l zugegeben.

## 2.2 Zellernte

Sobald in den Zellkulturflaschen die Zellen die gewünschte Zelldichte erreichten, erfolgte die Induktion der Expression des RBCC-Konstruktes mit Doxycyclin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Die Dauer der Induktion und die resultierende Endkonzentration an Doxycyclin hingen vom jeweiligen Experiment ab (siehe 3.1.1, 3.1.2 und 3.3.4). Die Ernte der Zellen wurde nach Standardmethoden durchgeführt. Dazu wurde das Medium entfernt, und die Zellen einmal mit 3 ml PBS pro Flasche gespült. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Accutase (PAA, Linz, Österreich) pro Flasche für 10 min im Brutschrank abgelöst. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Die benötigten Materialien und Puffer wurden im Vorfeld gekühlt. Nach Zugabe von 4 ml eisgekühltem PBS pro Flasche wurde die resultierenden Zellsuspensionen in 50 ml Röhrchen (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) zu je 40 ml Suspension vereinigt.

### Lösungen:

*PBS*: 13,6 mmol/l NaCl, 0,27 mmol/l KCl, 0,81 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,176 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## 2.3 Zellzahlbestimmung

Fünzig Mikroliter der Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau gemischt. Unter Verwendung einer Bürker- Kammer (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurde die Zellzahl bestimmt. Dafür wurden zweimal 25 Quadrate ausgezählt. Die Berechnung der Zellkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$C [ml^{-1}] = N * F * 10^4 [ml^{-1}]$$

C – Gesuchte Zellkonzentration in Zellen pro ml

N – Mittelwert der Anzahl an Zellen pro 25 Quadrate

F – Verdünnungsfaktor (in diesem Fall 2, da die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt wurde)

## 2.4 Indirekte Immunfärbung

Die indirekte Immunfärbung der Zellen wurde nach einem Protokoll von Lorenz et al. durchgeführt (Lorenz, Baker et al. 1998). Dazu wurden 500000 Zellen pro Vertiefung in einer 6-Well-Titerplatte auf je ein Deckglas ausgesät. Die Zellen wurden 24 h wachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Induktion der RBCC-Expression durch Zugabe von Doxycyclin. Nach Ablauf der, dem entsprechenden Experiment eigenen Induktionszeit (siehe 3.1.1), wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 3 ml PBS gespült und mit je 2 ml Paraformaldehyd-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Danach wurde einmal mit 3 ml PBS gespült und einmal 5 min mit 3 ml PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Plasmamembran erfolgte durch Zugabe von 0,5 % Triton X-100 in 3 ml PBS für 5 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut mit 3 ml PBS gespült und 5 min gewaschen. Anschließend wurden sie auf dem Deckglas für 30 min mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert (Verdünnungen der Antikörper siehe Tabelle 1). Fünfzig Mikroliter der Antikörper-Lösung wurden als Tropfen auf einen mit Parafilm (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) überzogenen Deckel einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Deckgläser mit den Zellen wurden mit der Zellseite auf den Tropfen gelegt und inkubiert. Danach wurde das Deckglas zurück in die Mikrotiterplatte gelegt und dreimal mit 3 ml PBS für 5 min gewaschen. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte analog der Präparation der Primärantikörper für 30 min. Da der Sekundärantikörper an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, der durch Tageslicht ausbleicht (Bleaching), wurde die Platte mit Alufolie abgedeckt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 3 ml PBS gewaschen und 5 min bei Raumtemperatur mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Endkonzentration 1 µg/ml) in 2 ml PBS zur Färbung der DNA inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 3 ml PBS wurden die Deckgläser in einem Einbettmedium auf Objektträgern platziert. Die Seiten des Deckgläschens wurden mit Nagellack abgedichtet. Die Analyse der gefärbten Präparate erfolgte mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica, TCS SP2 AOBS).

Lösungen:

*Paraformaldehyd-Lösung:* 4 % Paraformaldehyd in PBS

*Einbettmedium:* 8,5 ml Glycerol, 750 µl PBS 10 mg 1,4-Phenylendiamin, pH mit Carbonat-Bicarbonat Puffer auf 8,0 einstellen

*Antikörper-Verdünnungslösung:* PBS, 1 % Normal-Ziegen Serum, 1 % BSA

**Tabelle 1: Verdünnung der verwendeten Antikörper**

|                           |                  |              |
|---------------------------|------------------|--------------|
| <u>Primärantikörper</u>   | StrepMAB-classic | HA-Tag       |
| <u>[Verdünnung]</u>       | [1:250]          | [1:800]      |
| <u>Sekundärantikörper</u> | GAM-IgG-         | GARb-IgG-Cy5 |
| <u>[Verdünnung]</u>       | Alexa488 [1:500] | [1:500]      |

## 2.5 Proteinextraktion

### 2.5.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkernplasma

Jede Zentrifugation erfolgte bei 4°C. Geerntete iTR- und HR5- Zellen wurden in 5 ml Puffer A vorsichtig resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Danach folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1000 rpm in einer Heraeus Megafuge 1.0R (Heraeus, Hanau, Deutschland). Das entstandene Zellpellet wurde im zwei- bis dreifachen Zellpelletvolumen Puffer A (2 ml) aufgenommen und in einen vorgekühlten Dounce-Homogenisator überführt. Nach 20 Hüben unter Drehen wurde die erhaltene Suspension in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und in der Megafuge Zentrifuge bei 1800 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Überführung in ein 2 ml-Reaktionsgefäß nochmals mit 2000 rpm zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden vereinigt, in 2 ml Puffer A vorsichtig resuspendiert und anschließend in der Megafuge mit 1800 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 3 ml Puffer B resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Vier Zyklen aus 10 Sekunden Beschallung und zwei Minuten Stehen auf Eis wurden gefolgt von einer 20-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm in der Biofuge Fresco

(Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand (ca. 3 ml) wurde der Affinitätschromatographie zugeführt. (Lorenz, Pepperkok et al. 1993)

Als zweite Methode zur Zellkernextraktion wurde die von Challberg et al. veröffentlichte (Challberg und Kelly 1979) angewendet. Die geernteten Zellen ( $2,5 \cdot 10^8$ ) wurden bei 3000 g für 5 min zentrifugiert und danach in kaltem hypotonischem Puffer C (20 ml für  $4-5 \cdot 10^8$  Zellen) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 500 g für 5 min wurden die Zellen in 3 ml kaltem Puffer C ohne Sucrose aufgenommen und 10 min auf Eis stehen lassen. Danach wurde die Zellsuspension in einen Dounce Homogenisator überführt und es wurden 20 Hübe mit einem B-Pistill vorgenommen. Die resultierende Suspension wurde anschließend bei 2000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals bei 15000 g für 20 min zentrifugiert, Das Zellkernpellet in 2,5 ml Puffer D aufgenommen. Pro 1 ml der Zellkernsuspension in Puffer D wurden 20  $\mu$ l 5 mol/l NaCl dazugegeben und 60 min auf Eis stehen gelassen. Nach einer Zentrifugation bei 15000 g für 20 min wurde der klare Überstand (ca. 2,5 ml) abgenommen und der Affinitätschromatographie zugeführt.

#### Lösungen:

*Puffer A:* 10 mmol/l HEPES/KOH pH 7,9, 1,5 mmol/l  $MgCl_2$ , 10 mmol/l KCl, Complete (Roche), 1 mmol/l DTT, 1 mmol/l  $Na_3VO_4$

*Puffer B:* 20 mmol/l HEPES/KOH pH 7,9, 0,42 mol/l NaCl, 1,5 mmol/l  $MgCl_2$ , 0,2 mmol/l EDTA, Complete, 1 mmol/l DTT, 1 mmol/l  $Na_3VO_4$ , 50 mmol/l NaF, 40 mmol/l  $\beta$ -Glycerophosphate

*Puffer C:* 20 mmol/l HEPES pH 7,5, 5 mmol/l KCl, 0,5 mmol/l  $MgCl_2$ , 0,5 mmol/l DTT, 0,2 mmol/l Sucrose, Complete

*Puffer D:* 50 mmol/l HEPES pH 7,5, 10 % Sucrose, Complete

## 2.5.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellplasma

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C.

*RIPA-Extrakt:* Die Zellen wurden in RIPA-Puffer im Verhältnis 1 ml Puffer auf 20 Millionen Zellen aufgenommen, geschüttelt, 10 min auf Eis gestellt und nochmals geschüttelt. Sie wurden mit einem QiaShredder (Qiagen GmbH, Düsseldorf, Germany) homogenisiert und anschließend 10 min bei 13000 rpm in der Zentrifuge „Fresco“ zentrifugiert. Die Überstände (5 ml) wurden der Affinitätschromatographie zugeführt.

*TST-Extrakt:* Die vereinigten Zellsuspensionen (40 ml) wurden für 5 min bei 6000 rpm in der Megafuge 1.0R zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellpellets in je 10 ml eiskaltem PBS aufgenommen und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt. Die erhaltene Zellsuspension wurde nochmals für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das resultierende Pellet wurde in 12 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet (**P**) wurde im achtfachen PCV (packed cell volume; Zellpelletvolumen) des TST/komplett-Puffers resuspendiert. Der Zyklus aus 10 s Beschallung auf Eis (Ultraschall-Sonifikator Laborette 19, Fritsch, Idar-Oberstein, Deutschland) und anschließender 2 min Ruhigstellung auf Eis wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Probe zweimal geschüttelt, unterbrochen von einer 10-minütigen Pause auf Eis. Nach einer Zentrifugation mit einer Avanti-J25-Zentrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) für 30 min bei 20331 rpm wurde der resultierende Überstand abgenommen. In den Fällen in denen nach der Zentrifugation weiterhin eine Trübung der Lösung zu erkennen war, erfolgte eine Filtrierung des Überstandes mit einem sterilen Rotilabo-Spritzenfilter (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland). 500 µl des erhaltenen Extraktes der Lösung wurden für die nachfolgende Proteinbestimmung und den Gelauftrag abgenommen. Weiterhin wurde der Überstand für die affinitätschromatographische Reinigung genutzt (Eickner, Lorenz et al. in Vorbereitung).

Für Experimente in Gegenwart von *N*-Ethylmaleimid (NEM) wurde dem TST/komplett 10 mmol/l NEM zugesetzt.

*Igepal-LBH-Extrakt:* Das Pellet (**P**) wird in fünffachem packed-cell-volume LBH-Puffer resuspendiert. Danach werden 6 µl Igepal CA-630 pro 100 µl Suspension dazugegeben und für 10 s stark geschüttelt und sofort bei 11000 g für 30 s zentrifugiert (Zentrifuge Avanti). Der erhaltene Überstand wurde der Affinitätschromatographie zugeführt.

Die erhaltenen Pellets wurden mit zweifachem PCV in RIPA/komplett resuspendiert, geschüttelt, für 10 min auf Eis gestellt und nochmals geschüttelt. Danach wurden die erhaltenen Suspensionen unter Verwendung der QiaShredder durch eine Zentrifugation (Biofuge Fresco) für 10 min bei 13000 rpm homogenisiert.

#### Lösungen:

*RIPA-Puffer:* 50 mmol/l TRIS/HCl pH 8, 150 mmol/l NaCl, 1 % Nonidet P40, 0,5 % Natrium-Desoxycholat, 0,1 % SDS

*RIPA/komplett:* RIPA Puffer, 1 Complete pro 10 ml, 1 mmol/l DTT, 1 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, + 40 mmol/l beta-Glycerophosphat

*TST-Puffer:* 20 mmol/l TRIS/HCl pH 7,5; 60 mmol/l KCl, 15 mmol/l NaCl, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 250 mmol/l Saccharose, 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 0,5 % Triton X-100

*TST/komplett:* TST-Puffer, 1 Complete pro 10 ml, 1 mmol/l DTT, 1 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 40 mmol/l β-Glycerophosphat

*LBH-Puffer:* 10 mmol/l HEPES pH 7,9, 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l KCl

## **2.6 Affinitätschromatographie**

Zu Beginn wurde der Puffer W (verbleibt zu Lagerzwecken in den Säulen) aus den Streptactin-Säulen (Gravity flow **Strep**-Tactin<sup>®</sup> Superflow<sup>®</sup> column, 1 ml und Gravity flow **Strep**-Tactin<sup>®</sup> Sepharose column, 1 ml, IBA GmbH, Göttingen, Deutschland; und Gravity flow **Strep**-Tactin<sup>®</sup> Superflow<sup>®</sup> column, 0,2 ml für die Chromatographie des Zellkernextraktes nach Challberg) abgelassen. Das Equilibrieren der Säulen erfolgte zweimal mit 2 ml (im Falle der Kernextrakte nach Challberg mit 0,5 ml) des Puffers des entsprechenden Experimentes. Wenn nicht extra gekennzeichnet, wurde vor der Beladung der Säulen den Zellextrakten Avidin (ca. 1,5 µl pro 1 ml Proteinlösung)

zugemischt und 30 min geschüttelt. Die Zugabe von Avidin führt zu Maskierung des natürlichen proteingebundenen Biotins (Schmidt und Skerra 2007). Ohne diese Maskierung würden biotinylierte Proteine, insbesondere die Carboxylasen, ebenfalls an das Streptactin der Säule binden und angereichert werden. Der Durchlauf der Säulen wurde aufgefangen und vereinigt. Zum Waschen der gebundenen Proteine und Proteinkomplexe wurde fünfmal 1 ml Puffer hinzu gegeben und der erste und zweite Waschdurchlauf aufgefangen. Die Elution erfolgte sechsmal mit 0,5 ml des dem Experiment entsprechenden Elutionspuffers (siehe 3.3.4). Im Falle der Extraktion mit TS0-Phenanthrolin erfolgten sechs weitere Elutionen mit je 0,5 ml TS0-Desthiobiotin. Die einzelnen Fraktionen wurden mit a bis f bezeichnet. Alle Eluate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Säulen wurden dreimal mit 5 ml Regenerationspuffer (Strep-tag Regenerationspuffer zehnfach, IBA GmbH) und zweimal mit 4 ml Puffer W gewaschen. Es verblieben 2 ml Puffer W zur Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  in der Säule.

Lösungen:

*Puffer W:* 0,1 mol/l TRIS/HCl pH 8, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0,05 % Natriumazid

*Avidin:* 5 mg/ml Avidin in PBS, 25 % Glycerin

*TS0-Puffer:* 20 mmol/l TRIS/HCl pH 7,5; 60 mmol/l KCl, 15 mmol/l NaCl, 10 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 250 mmol/l Saccharose, 1 mmol/l  $\text{CaCl}_2$

*TS0/komplett:* TS0-Puffer, 1 Complete pro 10 ml, 1 mmol/l DTT, 1 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 40 mmol/l  $\beta$ -Glycerophosphat

*Elutionspuffer:*

Puffer D -Desthiobiotin: 5 mmol/l Desthiobiotin, Puffer D

RIPA-Desthiobiotin: 5 mmol/l Desthiobiotin, RIPA-Puffer

TST- Desthiobiotin: 5 mmol/l Desthiobiotin, TST-Puffer/komplett

Igepal-LBH-Desthiobiotin: 5 mmol/l Desthiobiotin, Igepal-LBH-Puffer/komplett

TS0- Phenanthrolin: 20 mmol/l 1,10-Phenanthrolin, TS0-Puffer/komplett

TS0- Desthiobiotin: 5 mmol/l Desthiobiotin, TS0-Puffer/komplett

## 2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der jeweiligen Extrakte erfolgte nach Bradford (Bradford 1976). Die Proteinbestimmung nutzt die Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion eines Farbstoffes in einer Lösung. Der Zusammenhang wird im Lambert-Beerschen Gesetz dargestellt.

$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon cd$$

E – Extinktion

$I_0$  – eingestrahlte Lichtintensität

I – Lichtintensität nach Durchgang durch die Lösung

$\varepsilon$  - Extinktionskoeffizient

c – Konzentration

d – Schichtdicke

Die Absorption des eingestrahnten Lichtes der Wellenlänge  $\lambda=595$  nm erfolgt dabei an dem proteingebundenen Farbstoff Coomassie Brilliant Blue. Der ungebundene Farbstoff in saurer Lösung absorbiert Licht der Wellenlänge  $\lambda=465$  nm. Je nach Proteinkonzentration verschiebt sich das Verhältnis des ungebundenen zum gebundenen Farbstoff und damit ändert sich die Intensität der Absorption der eingestrahnten Wellenlänge. Zur Erstellung einer Kalibriergerade wurde eine Verdünnungsreihe einer 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA-Lösung (Albumin Fraction V, Carl Roth GmbH & Co. KG) als Doppelansatz angefertigt, die aus 6 Verdünnungsstufen sowie einem Blindwert besteht. Zuletzt erfolgt die Zugabe des Bradford-Reagenzes (BioRad Protein Assay) nach Herstellerangaben. Alle Proben wurden geschüttelt und zur Messung am Photometer (Ultrospec 2000 UV/visible Spectrophotometer, GE Healthcare (Pharmacia Biotech), Chalfont St Giles, Großbritannien) in 1,5 ml Einweg-Küvetten gefüllt. Die erhaltenen Extinktions-Messwerte der jeweilig vorliegenden Konzentrationen durften höchstens eine Differenz von 0,04 aufweisen. Zur Messung der Extinktionen der Probenlösungen wurden diese so verdünnt, dass die vom Photometer ausgegebenen Extinktionswerte innerhalb des von der Kalibriergerade erfassten linearen Bereiches lagen. Anhand der Geradengleichung der Kalibrierung und mit Hilfe des Verdünnungsfaktors wurde die Proteinkonzentration der Ausgangslösung berechnet (Rower, Vissers et al. 2009).

Tabelle 2: Mengenangaben zur Anfertigung der Kalibrier- Reihe für die BSA- Proteinbestimmung

|                            |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| BSA [ $\mu$ l]             | 0   | 30  | 60  | 90  | 120 | 150 | 180 |
| [ $\mu$ g]                 | 0   | 3   | 6   | 9   | 12  | 15  | 18  |
| Wasser [ $\mu$ l]          | 800 | 770 | 740 | 710 | 680 | 650 | 620 |
| Bradfordreagenz [ $\mu$ l] | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |

## 2.8 chemische Proteinpräzipitation

Die Fällung der Proteine zur Vorbereitung der 1D-SDS-PAGE erfolgte nach der Methode von Wessel und Flügge (Wessel und Flügge 1984). Zur Proteinlösung wurde zuerst das vierfache Probenvolumen an Methanol zugegeben, geschüttelt und zentrifugiert. Danach wurde das einfache Probenvolumen an Chloroform zugegeben, geschüttelt, zentrifugiert und anschließend das dreifache Probenvolumen an Wasser zugegeben. Es kommt zur Ausbildung einer wässrigen (oben) und einer organischen Phase (unten). Nun wurden die Proben geschüttelt und für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die präzipitierten Proteine befanden sich zwischen den beiden Phasen erkennbar als weißliche feste Schicht. Nach Entfernen der oberen, wässrigen Phase wurde das dreifache Probenvolumen an Methanol zugesetzt. Die Probe wurde geschüttelt und für 15 min zentrifugiert. Die präzipitierten Proteine befanden sich nun im Pellet am Boden des Gefäßes. Der Überstand wurde entfernt. Die erhaltenen Pellets wurden in einer SpeedVac (SpeedVac Spd 111V, Thermo Scientific (Savant), Waltham, MA, USA) vom Rest des Lösemittels befreit.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 10  $\mu$ l SDS-Probenpuffer je Probe und das Erhitzen aller Proben für 5 min bei 95°C im Thermoschüttler (TM 130-6, Ditabis (HLC), Pforzheim, Deutschland) (Rower, Vissers et al. 2009).

### Lösungen:

*Fünffach-SDS-Probenpuffer:* 312,5 mmol/l TRIS/HCl pH 6,8, 10 % SDS, 325 mmol/l DTT, 0,08 g Bromphenolblau, 50 % Glycerin

Verdünnung mit Wasser: 1:5 für einfachen Probenpuffer

2:5 für zweifachen Probenpuffer

## 2.9 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation ist man in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Das interessierende Protein wird mit Hilfe eines Antikörpers aus einem Proteingemisch präzipitiert. Dabei bleiben Interaktionen zu anderen Proteinen bestehen, sodass diese Proteine ebenfalls präzipitiert werden. Protein G beschichtete Agarose-Beads binden die Antigen-Antikörper-Komplexe aufgrund der hohen Affinität des Protein G zum Fc-Teil von Immunglobulinen. Zusammen mit den Beads können die interessanten Proteine und Proteinkomplexe vom Rest der Mischung abgetrennt werden. Protein G ist ein Protein, das von Bakterien der Art *Streptococcus* exprimiert wird (Sjoberg, Bjorck et al. 1991).

Die Immunpräzipitation wurde durchgeführt wie in Lorenz et al. 2001 beschrieben (Lorenz, Koczan et al. 2001). 4 Flaschen HR5-Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.2 und 2.5.2 beschrieben unter Verwendung des TST-Puffers extrahiert. Die Extrakte wurden bei 4°C gelagert und nicht eingefroren. Die Weiterverarbeitung erfolgte am selben Tag.

Achtzig Mikroliter packed volume Protein-G-Agarose Beads (Roche) wurden fünfmal mit 1 ml PBS gespült und zweimal 10 min mit 1 ml TST-Puffer ohne Inhibitoren gewaschen.

Dann wurden 0,75 ml Proteinextrakt (2,87 mg Protein) mit 10 µl Primärantikörper-Lösung MAb anti-T1b ((Nielsen, Ortiz et al. 1999) 1TB1A9, eine freundliche Gabe von Régine Losson) für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Zellextrakt-Antikörper-Lösung zu den 80 µl Beads (packed volume) pipettiert und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Agarose-Beads wurden anschließend 2 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Biofuge Fresco). Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Die Beads wurden einmal mit 1 ml TST-Puffer/komplett gespült, zentrifugiert und danach zweimal mit 1 ml des TST-Puffers/komplett 10 min im Überkopfschüttler gewaschen und wieder zentrifugiert. Abschließend wurde einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, ohne das Pellet zu berühren.

Die Elution der Proteine von den Beads erfolgte durch Zugabe von 40 µl des zweifachen SDS-Probenpuffers und anschließendem Erhitzen auf 95°C für 5 min. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 5 min wurde möglichst viel des Überstandes abgenommen. Eine weitere Zugabe von 40 µl einfachem-SDS-Probenpuffer, Zentrifugation, Abnahme des Überstandes und Vereinigung der erhaltenen Überstände ergab ein Volumen von 70 µl, das direkt der 1D-SDS-PAGE zugeführt wurde.

## 2.10 Gelelektrophorese

Zur Gelelektrophorese wurden verschiedene Arten von Gelen verwendet. Zum einen 10 % NuPage Bis-TRIS Gele (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zum anderen nach dem Lämmli-System (Laemmli 1970) angefertigte Gele.

Zur Gelelektrophorese mit den Fertiggelen der Firma Invitrogen wurde die Invitrogen Novex Mini Cell (Phase: ca. B 8 cm x H 6,3 cm) genutzt. Die Gele liefen in 3-(*N*-Morpholin)-propansulfonsäure (MOPS)-Puffer. Eine konstante Spannung von 200 V wurde eingestellt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, kurz bevor die blaue Front das Gelende erreichte.

Tabelle 3: Zusammensetzung von Sammelgel (15 ml) und Trenngel (30 ml)

| Inhalt                  | Sammelgel | Trenngel<br>10 % | Trenngel<br>12 % |
|-------------------------|-----------|------------------|------------------|
| AA/BisAA                | 2,25 ml   | 10,5 ml          | 12 ml            |
| 1 mol/l TRIS/HCl pH 6,8 | 1,87 ml   | -                | -                |
| 1 mol/l TRIS/HCl pH 8,8 | -         | 12 ml            | 12 ml            |
| Wasser                  | 10,5 ml   | 7,5 ml           | 6 ml             |
| 10 % SDS                | 150 µl    | 324 µl           | 324 µl           |
| 10 % APS                | 100 µl    | 240 µl           | 240 µl           |
| TEMED                   | 15 µl     | 30 µl            | 30 µl            |

Sowohl zur präparativen Trennung der Proteine nach der Affinitätschromatographie als auch zur Herstellung der Western Blots zur qualitativen Auswertung der, bei der

Affinitätschromatographie, erhaltenen Fraktionen wurden Gele hergestellt (Tabelle 3).

Dazu wurde die Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) Apparatur nach Herstellerangaben aufgebaut und die Lösungen des Trenn- und Sammelgels (Tabelle 3) vorbereitet. Die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und *N,N,N',N'*-Tetramethylethylen-1,2-diamin (TEMED) erfolgte erst kurz vor dem Gießen des Trenngels. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel aufgetragen. Je nach Experiment wurde ein 10 % Gel oder ein 12 % Gel mit 10 Taschen und einer Dicke von 1 mm hergestellt (siehe 3.1.2). Analog erfolgte die Herstellung der Gele zur qualitativen Auswertung der erhaltenen Fraktionen mit Hilfe des Western Blot (Lorenz, Pepperkok et al. 1993). Die Proteintrennung erfolgte in einfachem SDS-Laufpuffer bei 200 V. Danach wurden sie für eine Stunde in Fixierlösung auf einem Schüttler (Schüttler Promax 2020, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland) inkubiert. Für die bessere Sichtbarkeit der Banden wurden die Gele über Nacht in Coomassie- Lösung gefärbt (Kang, Gho et al. 2002) und nachfolgend 1 h in Entfärber inkubiert. Die Mengen der Fixier-, Färbe- und Entfärbelösung wurde so gewählt, dass das Gel vollständig umspült wurde, ohne am Boden der Färbeschale liegen zu bleiben. Zur Dokumentation der Banden wurden die Gele im 16Bit Graustufenformat gescannt (Mirage II Scanner, Umax Data Systems, Willich, Germany) und die Banden mit dem Programm Progenesis PG 200 Version 2006 markiert.

#### Lösungen:

*MOPS-Puffer:* 1 mol/l MOPS, 1 mol/l TRIS, 69,3 mmol/l SDS, 20,5 mmol/l EDTA

*SDS-Laufpuffer:* zehnfache Stammlösung: 25 mmol/l TRIS, 192 mmol/l Glycin, 0,1 % SDS

Zur Verwendung wurde die Stammlösung 1:10 mit Wasser verdünnt.

*Fixierlösung:* 50 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 40 % Wasser

*Coomassie Färbelösung:* 0,02 % Coomassie-Brilliant-BlauG-250, 5 % Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat, 10 % Ethanol (96 %), 2,3 % ortho-Phosphorsäure (85 %)

*Entfärber:* 10 % Ethanol (96 %), 2 % ortho-Phosphorsäure (100 %)

## 2.11 Western Blotting

Zur Übertragung der, mit Hilfe der 1D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, getrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran durch semi-dry-Western-Blotting wurde nach der Gelelektrophorese das Sammelgel entfernt und die resultierenden Längenmaße des Gels bestimmt. Zwölf Lagen Blot-Papier (GB002, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Germany) und eine PVDF-Membran (Immobilon- Membran PVDF 0,04 µm Porengröße, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) wurden nach diesen Maßen zurechtgeschnitten. Die Maße sind einzuhalten, da sonst die Ladungsträger am Gel vorbei durch die Blot-Apparatur fließen und die Übertragung der Proteine auf die Membran nicht gleichmäßig geschieht. Die PVDF-Membran wurde mit Isopropanol und anschließend mit Wasser und danach mit Anodenpuffer II benetzt. Das Gel wurde maximal für 30 min im Kathodenpuffer aufbewahrt. Die Benetzung des Blot-Papiers erfolgte wie in Abbildung 10 dargestellt. Sechs Lagen wurden mit Anodenpuffer I, 3 Lagen mit Anodenpuffer II und 3 Lagen mit Kathodenpuffer getränkt. Der Aufbau der Blotting-Apparatur (Semi- Dry- Blotter Pegasus, PHASE GmbH, Lübeck, Deutschland) oder BioRAD electroblotter (BioRad) erfolgte von unten nach oben (Abbildung 10). Die Kathode wurde mit Kathodenpuffer benetzt. Danach wurden die 3 Lagen Blot-Papier des Kathodenpuffers aufgelegt. Anschließend wurden zuerst das Gel und danach die Membran platziert. Die 3 Lagen Blot-Papier aus dem Anodenpuffer II und die 6 Lagen Blot-Papier des Anodenpuffers I folgten. Die Anode wurde mit Anodenpuffer I benetzt. Während des Aufbaus ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den Lagen verbleiben. Der Stromfluss wäre sonst an diesen Stellen unterbrochen. Damit wäre die Übertragung der Proteine unmöglich gemacht.

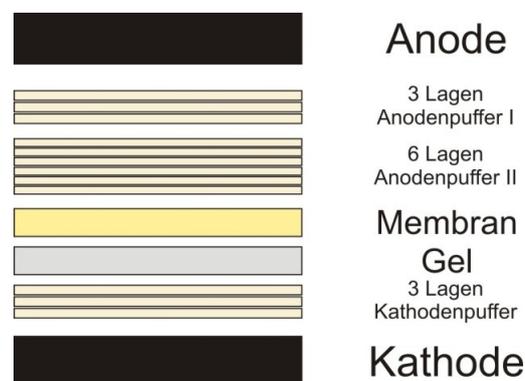


Abbildung 10: Aufbau der Blotting-Apparatur

Die anzulegende Stromstärke wurde der Größe des Gels angepasst. Dazu wurde der Flächeninhalt des Gels in cm<sup>2</sup> mit 1,2 multipliziert. Der resultierende Wert ergab die einzusetzende Stromstärke in mA. Die Dauer des Western-Blotting betrug ca. 2 h. Bei der Benutzung des BioRad Electrobloppers wurden 25 V konstant eingestellt.

Nach den zwei Stunden wurde die Blot-Apparatur abgebaut und die PVDF-Membran zur Färbung kurz (ca. 1 min) in Ponceau-Lösung gefärbt und danach mit Wasser entfärbt. Auch hier wurde die Menge der Färbe- und Entfärbelösung so gewählt, dass die Membran vollständig bedeckt war. Die Banden der Proteine wurden als rote Banden auf der Membran sichtbar. Das Gel wurde für mindestens 2 h in Coomassie-Lösung gelegt, um dessen Restproteingehalt abzuschätzen.

Zur Vorbereitung der Immunfärbung der Proteine TRIM28 und des RBCC-Konstruktes wurde die PVDF-Membran im zwischenliegenden Bereich (etwa im Bereich 70-80 kDa) zerschnitten. Dadurch konnten beide Proteine trotz gleicher Sekundärantikörper gleichzeitig, aber nun auf separaten Membranstücken angefärbt werden. Zur Immunfärbung der Proteine wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen die nachfolgend beschriebene Methode, bei der die Visualisierung der Färbung über eine Peroxidase-Reaktion auf Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde sowie eine weitere, darauffolgend beschriebene, in der fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet wurden. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgelistet.

Die Membranen wurden über Nacht in Blocking- Puffer bei 4°C geblockt. Sowohl bei der Wahl der Volumina des Blocking-Puffers als auch des Waschpuffers, wurde darauf geachtet, dass die Membran vollständig benetzt wurde. Stellen an denen Antikörper unspezifisch binden würden, wurden auf diese Weise maskiert. Der Blocking-Puffer wurde entfernt und die Membranen im Anschluss mit Waschpuffer gespült. Die Volumina der Antikörperlösungen wurden so gewählt, dass die Membranen vollständig benetzt wurden. Dabei wurde das kleinstmögliche Volumen gewählt. Die Primärantikörper- Lösungen wurden auf die Membranen gegeben und für 2 h geschüttelt. Danach wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Membran dreimal mit Waschpuffer für jeweils 10 min leicht geschüttelt. Nach dem Waschen der Membranen erfolgte die Zugabe des Sekundär- Antikörpers (siehe Tabelle 4). Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Sekundärantikörper-

haltigen Lösungen entfernt und die Membranen wie zuvor dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Streptavidin-Peroxidase (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde 1:20.000 mit Blocking-Puffer verdünnt und auf die Membranen gegeben. Die Membranen wurden 1 h inkubiert. Danach wurde viermal mit Waschpuffer für je 10 min gewaschen. Zuletzt wurde das Substrat (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) durch die Herstellung von 10 ml einer 1:1 Mischung der beiden Komponenten hergestellt und auf die Membranen gegeben. Die Aufnahme der Chemilumineszenz erfolgte auf einem Röntgenfilm (CL-XPosure Film, 18 x 24 cm, Clear Blue X-Ray Film, Thermo Scientific), die Entwicklung des Filmes erfolgte mit Hilfe des Entwicklersystems Agfa CURIX 60 (Lorenz, Pepperkok et al. 1993)

Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe (IRDye800CW und IRDye680CW, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) konnten verschiedene Sekundärantikörper (goat anti Rabbit IgG und goat anti mouse IgG) gleichzeitig verwendet werden. Zur Färbung durch fluoreszenzmarkierte Antikörper wurden die Membranen in Odyssey Blockingpuffer (LI-COR), der vorher aus der Stammlösung durch eine 1:2-Verdünnung mit PBS hergestellt wurde, über Nacht inkubiert. Die Inkubation der Membran mit den Primärantikörpern erfolgte in LI-COR-Blockingpuffer für 2 Stunden. Danach wurde die Membran viermal für je 5 min mit PBS, 0,1 % Tween 20 gewaschen. Nach der anschließenden einstündigen Inkubation mit den Sekundärantikörperlösungen wurde erneut viermal mit PBS, 0,1 % Tween 20 gewaschen. Alle Lösungen wurden so zugegeben, dass die Membran vollständig benetzt wurde.

Die Auswertung der Western Blots erfolgten am Odyssey fluorescence imager (LI-COR). Dazu wurde die Fluoreszenz des IRDye800CW in grün und die des IRDye680CW in rot aufgenommen. Die Bearbeitung der 16 bit Original-Aufnahmen erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop CS3 v10.0.1. Die Bilder wurden bearbeitet durch Verwendung der Befehle: „auto-contrast“ und „invert“ und anschließend auf 8 bit verkleinert.

**Tabelle 4: Für die Immunfärbung verwendete Primärantikörper**

| Epitop   | Primärantikörper;<br>Immunisterter<br>Organismus    | Verwendete<br>Konzentration<br>(Verdünnung) |
|--|---|---|
| TRIM28<br>Aminosäuren 685-818 des<br>Mausproteins              | BD Biosciences 610681;<br>Mouse antibody            | 0,125 µg/ml                                 |
| anti TRIM28/RBCC<br>Aminosäuren 60-383 des humanen<br>Proteins | Abcam ab22553;<br>Mouse antibody                    | 2 µg/ml                                     |
| anti phospho-Ser-824-<br>TRIM28                                | Bethyl Laboratories<br>A300-767A;<br>Mouse antibody | 2 µg/ml                                     |
| StrepMAB-classic<br>StrepTag                                   | IBA GmbH 2-1507-001;<br>Mouse antibody              | 0,2 µg/ml                                   |
| HA-Tag   | Rockland, 600-401-384<br>Rabbit antibody            | 0,25 µg/ml                                  |
| ZNF544<br>Aminosäuren 510-640 des humanen<br>Proteins          | Sigma HPA002732<br>Rabbit antibody                  | 0,04 µg/ml                                  |
| POGK<br>Aminosäuren 240-378 des humanen<br>Proteins            | Sigma HPA031630<br>Rabbit antibody                  | 0,5 µg/ml                                   |
| ε-Amino-acetyliertes Lysin                                     | Cell Signaling #9814<br>Rabbit antibody             | (1:1000)                                    |

**Tabelle 5: Für die Immunfärbung verwendete Sekundärantikörper**

| Sekundärantikörper   | Verdünnung mit<br>Blocking Puffer |
|--|-----------------------------------|
| GAM IgG-biotin<br>(Jackson ImmunoResearch<br>Laboratories Inc Dianova, Code<br>115-065-068)  | 0,065 µg/ml                       |
| GARb IgG-biotin<br>(Jackson ImmunoResearch<br>Laboratories Inc Dianova, Code<br>111-065-144) | 0,05 µg/ml                        |
| GARb IgG-biotin<br>(Jackson ImmunoResearch<br>Laboratories Inc Dianova, Code<br>111-065-144) | 0,05 µg/ml                        |
| GAM IgG- IRDye 800CW   | 0,1 µg/ml                         |
| GARb IgG- IRDye<br>800CW (LI-COR, 926-32211)   | 0,1 µg/ml                         |
| GAM IgG- IRDye 680CW<br>(LI-COR, 926-68020)  | 0,1 µg/ml                         |

Lösungen:

*Anodenpuffer I:* 0,3 mol/l TRIS, 20 % Methanol, pH 10,4

*Anodenpuffer II:* 0,025 mol/l TRIS, 20 % Methanol, pH 10,4

*Kathodenpuffer:* 0,04 mol/l  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 0,025 mol/l TRIS, 20 % Methanol

*Ponceau-Lösung:* 0,3 % Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure

*TRIS-buffered saline (TBS):* 50 mmol/l TRIS/HCl pH 7,4; 150 mmol/l NaCl

*Blockingpuffer:* 1 x TBS, 5 % Magermilchpulver, 1 % BSA, 0,02 % Thiomersal

*Waschpuffer:* 1x TBS, 0,05 % Tween 20, 0,1 % BSA

## **2.12 Lyophilisierung**

Die Lyophilisierung erfolgte durch Einfrieren der Proben und anschließender Zentrifugation im Vakuum mit Hilfe der SpeedVac. Diese ist an eine Kühlfalle (Refrigerated Vapor Trap RVT 400, Savant) und eine Vakuumpumpe angeschlossen (ValuPump VLP 120, Savant) (Bantscheff, Ringel et al. 2004).

## **2.13 Mikropräparation von Proteinproben nach Gelelektrophorese**

Alle Arbeiten wurden unter Verwendung von Vollschutz (Kittel, Armschützer, Haube, Mundschutz und Handschuhe) ausgeführt.

Die Banden (im Falle des Stathmins, der Spot in einem 2D-Gel) wurden entweder mit einem Skalpell ausgeschnitten oder mit Hilfe einer 1 ml-Pipettenspitze, die an der Spitze abgeschnitten wurde (Öffnungsdurchmesser ca. 1-2 mm), ausgestochen. Die Gelstückchen wurden sofort in 1,5 ml bzw. 0,5 ml Protein LoBind Tubes (Eppendorf) überführt (Mikkat, Lorenz et al. 2010).

## 2.14 Enzymatische Proteolyse

Alle Arbeiten wurden unter Verwendung von Vollschutz (Kittel, Armschützer, Haube, Mundschutz und Handschuhe) ausgeführt.

### 2.14.1 In-Gel Proteinverdau

Zu den ausgeschnittenen Gelstücken wurde je 150 µl Waschlösung 1 gegeben, für 20 min geschüttelt, zentrifugiert und wieder entfernt. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl Waschlösung 2 und erneutes Schütteln für 20 min, anschließendes Zentrifugieren und Schrumpfen der Gelstücke durch Zugabe von 100 µl Acetonitril. Überschüssiges Acetonitril wurde verworfen. Die Reduktion der Disulfidbrücken erfolgte durch Zugabe von 20 µl DTT-Lösung zu den Gelstückchen und Inkubation für 30 min bei 56°C. Nach Zentrifugation wurde die Lösung entfernt. Nach Schrumpfen der Gelstücke durch Zugabe von 100 µl Acetonitril für 10 min (überschüssiges Acetonitril wurde verworfen) erfolgte die Alkylierung der reduzierten Thiolgruppen durch Zugabe von 20 µl Iodacetamid-Lösung für 20 min im Dunkeln. Die Gelstücke wurden mit 200 µl 0,1 mol/l Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung für 15 min gewaschen und anschließend mit 100 µl Acetonitril erneut geschrumpft. Nach Zentrifugation und Entfernung des Acetonitrils erfolgte der Verdau der Proteine über Nacht bei Raumtemperatur mit 5 µl Trypsin-Lösung (sequencing grade modified Promega Corp., Madison, WI, USA) (10 ng/µl) und 5 µl 3 mmol/l TRIS/HCl, pH 8,5 zur vollständigen Bedeckung der Gelstückchen. Für die massenspektrometrischen Untersuchungen des TRIM28 zur Erhöhung der Sequenzabdeckung wurden außerdem die Proteasen AspN sequencing grade (Roche, Basel, Switzerland) bei 37°C, GluC sequencing grade (Roche, Basel, Switzerland) bei Raumtemperatur sowie LysC sequencing grade (Roche, Basel, Switzerland) bei 37°C, verwendet. Der Verdau durch diese Proteasen erfolgte ebenfalls über Nacht. Zur Extraktion der Peptide für die MALDI-MS-Messungen wurden die Gelstückchen nach Zugabe von 10 µl Extraktionslösung für 30 min geschüttelt (Heitner, Koy et al. 2006).

Für die nanoLC-ESI-Massenspektrometrie wurden die Gelstückchen zweimal mit je 10 µl 5 % Ameisensäure für je 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Die resultierenden Lösungen wurden dann vereinigt.

### **2.14.2 In-Lösung Proteinverdau**

Im Zuge der Entwicklung einer neuen Methode zur Phosphopeptidanreicherung wurden Proteine ebenfalls in Lösung verdaut. Dazu wurden 550 µg β-Casein (bovine milk) in 100 µl Lösungspuffer gelöst. Das ergab eine Proteinkonzentration von 0,2 nmol/µl. Die Proteine wurden mit 2 µl 0,1 mol/l DTT in 100 mmol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> über 20 min bei 56°C reduziert und anschließend mit 4 µl einer Lösung aus 0,1 mol/l Iodacetamid in 100 mmol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln alkyliert. Der Verdau geschah durch Zugabe von 8 µl einer 1 µg/µl Trypsin (Promega) Lösung in 3 mmol/l TRIS/HCl, pH 8,5 über Nacht bei Raumtemperatur. Die resultierende Peptidmischung wurde mit 0,1 % RapiGest in 50 mmol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> auf 80 fmol/µl, 120 fmol/µl, 180 fmol/µl und 20 pmol/µl verdünnt (Eickner, Mikkat et al. 2011).

#### Lösungen:

*Waschlösung 1:* 30 % Acetonitril, 25 mmol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

*Waschlösung 2:* 50 % Acetonitril, 10 mmol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

*DTT-Lösung:* 10 mmol/l Dithiothreitol, 100 mmol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

*IAA-Lösung:* 55 mmol/l Iodacetamid, 100 mmol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

*Trypsin-Lösung:* 10 ng/µl in 3 mmol/l TRIS/HCl pH 8,5

*AspN-Lösung:* 40 ng/µl in 10 mmol/l TRIS /HCl pH 7,5

*LysC-Lösung:* 40 ng/µl in 50 mmol/l HEPES, pH 8,0

*GluC-Lösung:* 10 ng/µl in 3 mmol/l TRIS/HCl pH 8,5

*Extraktionslösung:* 0,3 % TFA, 5 mmol/l *n*-Octylglucopyranosid, 50 % ACN

*Lösungspuffer:* 0,1 % RapiGest (Waters, Massachusetts; USA), 50 mmol/l NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

## **2.15 Entsalzung von Peptidgemischen**

Die ZipTip Säulen (C18 Pipette Tips, Merck Millipore) wurden zweimal mit 10 µl 100 % Acetonitril- Lösung benetzt und danach mit 10 µl 0,1 % TFA-Lösung gewaschen. Aus je 10 µl Probenlösung wurden die Peptide auf ZipTip-Säulen durch abwechselndes Aufziehen und Herausdrücken geladen. Überschüssige Probenlösung wurde verworfen. Nach 2 Waschschritten mit 10 µl 0,1 % TFA-Lösung erfolgte die Elution der Peptide mit 5 µl Elutionslösung 50 % ACN, 0,1 % TFA.

## **2.16 Phosphopeptidanreicherung**

### **2.16.1 Herstellung der Titandioxid- Säulen**

Die Herstellung der Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ )-Säulen als auch der Oligo-R3-Säulen erfolgte nach der Methode von Thingholm et al. (Thingholm, Jorgensen et al. 2006). Aus einer 3M Empore C8 Extraction Disk wurde mit der Spitze einer HPLC-Spritze ein Stopfen ausgestochen und mit Hilfe einer HPLC-fused silica-Kapillare aus der Spitze in die Spitze eines GELoader Tips (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gedrückt. Anschließend wurde ein Volumen einer Suspension von 5 mg  $\text{TiO}_2$ -Beads in 200 µl Acetonitril in den GELoader Tip geladen und mit Druckluft, die mit Hilfe einer angepassten 20 ml Spritze appliziert wurde, verdichtet, bis eine Säulenhöhe von ca. 3 mm erreicht wurde.

### **2.16.2 Herstellung der Oligo-R3-Säulen**

Die Herstellung der Oligo-R3-Säulen erfolgte analog der Herstellung der  $\text{TiO}_2$ -Säulen. Statt der  $\text{TiO}_2$ -Acetonitril Suspension wurde in diesem Fall eine Suspension von 5 mg Oligo-R3 in 200 µl 50 % Acetonitril verwendet. Die Säulenhöhe wurde zwischen 3 und 6 mm gewählt.

### **2.16.3 Durchführung der Phosphopeptidanreicherung**

#### ***Mit DHB im Ladepuffer***

In dieser Arbeit wurden verschiedene Arten von TiO<sub>2</sub>-Säulen zur Phosphopeptidanreicherung verwendet. Die in den vorherigen Abschnitten erwähnten selbst angefertigten Säulen fanden Anwendung in einem Protokoll das auf die Arbeiten von Thingholm (Thingholm, Jorgensen et al. 2006) und Larsen et al. (Larsen, Thingholm et al. 2005) zurückgeht. Dazu wurde die Peptidprobe fünf- bis zehnfach mit Ladepuffer A verdünnt und zur vollständigen Mischung für 3-5 min geschüttelt. Anschließend wurde die entstandene Lösung auf die TiO<sub>2</sub>-Säule geladen. Mit Hilfe einer angepassten 20 ml Spritze wurde ein Überdruck angelegt, sodass die Lösung langsam durchtropfte. Danach wurde die Säule erst mit 5 µl Ladepuffer und anschließend mit 30 µl 80 % Acetonitril, 1 % TFA gewaschen. Zur kompletten Entfernung der TFA wurde ein weiterer Waschschrift mit 5 µl Wasser durchgeführt.

Die Elution der gebundenen Peptide erfolgte mit 25 µl 0,25 % Ammoniaklösung pH ≥10,5. Ein weiterer Elutionsschritt mit 1 µl 30 % Acetonitril eluierte die eventuell an die Membran gebundenen Peptide. Die beiden Eluate wurden vereinigt und mit 1 µl 100 % Ameisensäure pro 10 µl Eluat angesäuert.

Zur Entsalzung und Aufkonzentrierung wurde das komplette, angesäuerte Peptidgemisch auf die Oligo-R3-Säule geladen, langsam durchlaufen gelassen und mit 30 µl 0,1 % TFA gewaschen.

Die Elution der Peptide erfolgte mit 1 µl einer 5 mg/ml DHB-Lösung in 50 % ACN/ 1-2 % Phosphorsäure direkt auf das MALDI-Target.

#### ***Mit Methionin im Ladepuffer***

Bei weiteren Anreicherungsexperimenten wurde statt der DHB, 6 mmol/l Methionin, 12,5 mmol/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oder 10 mmol/l DTT in Ladepuffer A verwendet. Die Probe wurde in den Fällen 1:1 (v:v) mit dem entsprechenden Puffer gemischt.

## ***Mit Zitronensäure im Ladepuffer***

Ein weiteres in dieser Arbeit angewendetes Protokoll verwendet kommerziell erhältliche TiO<sub>2</sub>-Säulen namens NuTips (Glygen Corporation, Columbia, MD, USA). Dieses Protokoll orientiert sich an der von Mikkat et al. (Mikkat, Lorenz et al. 2010) publizierten Methode, beinhaltet aber einige Modifikationen. Fünf Mikroliter eines Trypsin-Verdau einer  $\beta$ -Casein Probe wurden mit 5  $\mu$ l Ladepuffer B bzw. mit Ladepuffer C gemischt. TiO<sub>2</sub>-NuTips wurden fünfmal mit Equilibrierungslösung equilibriert. Danach wurden die Proben fünfzigmal auf die TiO<sub>2</sub>-Säulen aufgezogen und dispensiert. Im Falle des Stathmins und des TRIM28 wurden zuvor 2,5  $\mu$ l 20 mg/ml Zitronensäure Monohydrat-Lösung zu 5  $\mu$ l der Peptidlösungen hinzugegeben. Anschließend an die Beladung erfolgte ein Waschschrift mit 10  $\mu$ l 40 % ACN/ 0,1 % TFA. Die Elution der Phosphopeptide erfolgte durch zehnmaliges Aufziehen und Herausgeben von 2,5  $\mu$ l 0,25 % NH<sub>4</sub>OH, pH >10,5 (Eickner, Mikkat et al. 2011).

### Lösungen:

*Ladepuffer A:* 100-350 mg DHB (Laser Bio Labs, Sophia-Antipolis Cedex, Frankreich) in 1 ml 80 % ACN/ 5 % TFA

*Ladepuffer B:* 60 mg/ml DHB, in 80 % ACN/ 0,1 % TFA

*Ladepuffer C:* 80 mg/ml Zitronensäure Monohydrat in 80 % ACN/ 0,1 % TFA

*Equilibrierungslösung:* 10  $\mu$ l of 40 % ACN/ 0,1 % TFA

*Ammoniaklösung:* 20  $\mu$ l 25 % NH<sub>4</sub>OH/ 980  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, pH  $\geq$ 10,5

## **2.17 Präparation von Peptidgemischen auf Träger für die Massenspektrometrie**

Als Target für die MALDI-Massenspektrometrie dienten Anchor Chip™ 600/384TF bzw. Anchor Chip™ 400/384TF Targets (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Als Matrices wurden 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB) (5 mg/ml in 67 % ACN/ 0,1 % TFA),  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA) (1,6 mmol/l in 67 % Ethanol/ 33 % Aceton) (Just, Gafumbegete et al. 2006; Kienbaum, Koy et al. 2009) und 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon eingesetzt.

Die Präparation erfolgte nach der Dried Droplet Methode (Thomas, Havlis et al. 2004). Dazu wurden jeweils 0,5-1  $\mu$ l Probe und 1  $\mu$ l Matrixlösung auf dem Target gemischt. Als Kalibrant wurde der Peptide Calibration Standard 1000-4000 Da (Bruker Daltonics) verwendet. Die Matrixpräparationen im Falle der Untersuchung der Phosphopeptide sind in Eickner, Mikkat et al., 2011 aufgeführt. Dort wurden 1  $\mu$ l bis 2,5  $\mu$ l des Eluates der Phosphopeptidanreicherung mit 1  $\mu$ l einer 5 mg/ml DHB-Lösung, 0,5  $\mu$ l einer 10 mg/ml THAP-Lösung, oder einer Mischung aus beiden Matrices (0,3  $\mu$ l THAP-Lösung und 1  $\mu$ l DHB-Lösung) auf dem Target gemischt. Die Matrices wurden jeweils in 40 % ACN/ 0,1 % TFA in einer finalen Konzentration von 5 mg/ml DHB und 10 mg/ml THAP gelöst.

### Lösung:

*Kalibrierlösung:* 5  $\mu$ l Peptide Calibration Standard, 42,5  $\mu$ l 30 % ACN/ 0,1 % TFA, 2,5  $\mu$ l *n*-Octylglucopyranosid.

## **2.18 LCMS- Probenvorbereitung**

10  $\mu$ l der jeweiligen Peptidlösung wurden durch den Einsatz von ZipTip C18 Säulen entsalzt (siehe 3.2.2). Die Peptide wurden mit 20  $\mu$ l 50 % ACN/ 0,1 % TFA eluiert und anschließend lyophilisiert. Nach Wiederaufnahme in 10  $\mu$ l 5 % Ameisensäure wurden die Proben der LCMS-Messung zugeführt (Eickner, Lorenz et al. in Vorbereitung).

## 2.19 Massenspektrometrie

### 2.19.1 MALDI-Massenspektrometrie

Die Aufnahme der Peptide-Mass-Fingerprint Massenspektren erfolgte mit Hilfe eines Bruker Reflex III MALDI-ToF Massenspektrometers (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Das Gerät ist mit der SCOUT-Ionenquelle ausgerüstet, verfügt über delayed extraction und wurde im Positiv-Ionen-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV betrieben (Mikkat, Koy et al. 2004). Die Spektren wurden extern mit dem Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics) kalibriert (siehe 2.17) und intern mit Autoproteolysesignalen des Trypsins:  $[M+H]^+$  842,51,  $[M+H]^+$  1045,54,  $[M+H]^+$  2211,10,  $[M+H]^+$  2807,39; oder mit bekannten Ionensignalen der jeweiligen Proteine nachkalibriert.

Stathmin Spektren wurde außerdem auf einem Bruker SolariX FT-ICR-Massenspektrometer mit einer Smartbeam II Lasereinheit und einem 7 T Magneten aufgenommen. Folgende Parameter wurden eingestellt: FT-ICR-Modus: "broadband", 1MSamples, 1.95 s FT\_Transit (ICR-Time) laser power: 32 % bei 200 Hz und „ultra-large spot size“. Die erhaltene Auflösung betrug 78,000 FWHM bei  $m/z$  1621,80. Für die Aufnahme des Übersichtsspektrums wurde der Massenbereich für  $m/z$  800–3000 optimiert und es wurden 32 Spektren aufgenommen und aufsummiert. Für die MS/MS-Messungen des Signals bei  $m/z$  1621 wurde das Auswahlfenster auf 10 u und die Kollisionsenergie auf 45 V gestellt. Kollisions-induzierte Dissoziation (Collision-induced dissociation - CID) wurde unter Verwendung von Argon als Kollisionsgas (1,5 bar externer Druck) ermöglicht. Die Fragmentierung geschah in der Kollisionszelle die sich zwischen dem Quadrupol-Massenfilter und der FT-ICR-Zelle befindet. Der Massenbereich wurde auf  $m/z$  400–2500 optimiert. 64 Spektren wurden aufgenommen und aufsummiert (Eickner, Mikkat et al. 2011).

Zur Aufnahme der  $MS^n$ -Massenspektren wurden die Proben mit DHB-Matrix (5 mg/ml) präpariert. Die  $MS^n$ -Messungen wurden mit einem Axima MALDI-QIT-ToF- $MS^n$  Instrument (Shimadzu Biotech, Manchester, UK) durchgeführt. Dieses Gerät setzt sich aus einer Quadrupol-Ionenfalle mit Helium als Kühlgas und Argon als Kollisionsgas zur Fragmentierung (collisionally induced dissociation - CID)

zusammen. Die Spektren wurden im Positiv-Ionen-Modus aufgenommen (Koy, Mikkat et al. 2003; Koy, Resch et al. 2004). Die Größe des Isolationsfensters für die zu fragmentierenden Precursor-Ionen wurde in Abhängigkeit der Masse gewählt und lag zwischen 2 und 10 Da. Die Spektren wurden extern, mit Hilfe einer manuell angefertigten Kalibrierlösung kalibriert. Diese beinhaltete Angiotensin II  $[M+H]^+$  1046,53, Angiotensin I  $[M+H]^+$  1296,68, Bombesin  $[M+H]^+$  1619,81, N-Acetyl Renin Substrat  $[M+H]^+$  1800,93, ACTH (1–17)  $[M+H]^+$  2093,08, ACTH (18–39)  $[M+H]^+$  2465,19, Somatostatin  $[M+H]^+$  3147,46 und Insulin (oxidized beta chain)  $[M+H]^+$  3494,64. Außerdem wurde bei Bedarf intern nachkalibriert unter Verwendung bekannter Signale des  $MS^n$ -Spektrums.

### **2.19.2 nanoLC-ESI-Massenspektrometrie**

Die Trennung der Peptide erfolgte mit dem Ultimate nanoLC System (LC Packings/Dionex, Thermo Scientific) ausgestattet mit einer Nano Series™ Standard Säule (75  $\mu\text{m}$  i.d. x 15 cm, packed with Acclaim PepMap100 C18, 3  $\mu\text{m}$ , 100 Å; LC Packings/Dionex) bei einer Flussrate von 100 nl/min. Es wurde ein linearer 35 min Gradient von 95 % Lösemittel A zu 40 % A verwendet. Zur Steuerung der nanoLC-Anlage wurde die Ultichrom Software Version 3.1 verwendet. Zwei Mikroliter der jeweiligen Peptidlösung wurden auf die Säule geladen. Die Massenspektren wurden auf einem Micromass QToF II-Massenspektrometer (Waters, Milford, CT, USA) ausgerüstet mit einer nanoESI-Quelle, im „SurveY“ Modus aufgenommen. Die Kalibrierung wurde mit 1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in 50 % Trifluorethanol (TFE) vorgenommen (Madi, Hoffrogge et al. 2004).

#### Lösungen:

*nanoLC-Laufmittel:*           A: 95 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 5 % ACN, 0,1 % FA  
  B: 20 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 80 % ACN, 0,1 % FA

### 2.19.3 Spektrenauswertung

Die Bearbeitung und Auswertung der am Bruker Reflex III-Massenspektrometer aufgenommenen Spektren erfolgte mit den Software-Programmen FlexAnalysis 2.4 und BioTools Version 3.0. Alle Spektren wurden intern mit autoproteolytischen Fragmenten von Trypsin nachkalibriert und die Hintergrundsignale von Trypsin und Keratin aus der Peak-Liste entfernt. Für die Datenbank-Analyse wurde die MASCOT-Software Version 2.2.03 mit der institutseigenen SWALL-Datenbank (diese beinhaltet die Swiss-Prot- und TrEMBL-Datenbank für Proteinsequenzen) verwendet. Die Suche erfolgte anhand der folgenden Parameter: Taxonomie: Homo sapiens, Peptid-Toleranz: 80 ppm, feste Modifikation: Carbamidomethylierung an Cystein, variable Modifikation: Oxidation an Methionin, eine übersprungene Spaltungsstelle. Die Peptide wurden zusätzlich mit der UniProt-Zugangsnummer benannt. Die Signale vom RBCC-Konstrukt wurden außerdem gegen einen theoretischen Verdau mit der Software GPMW 8.10sr1 bestimmt.

Die am Bruker Solarix FT-ICR-Gerät erhaltenen Massenspektren wurden mit der Bruker Compass DataAnalysis 4.0 Software prozessiert und analysiert (Eickner, Mikkat et al. 2011).

Die Auswertung und Bearbeitung der am MALDI-QIT-ToF-MS<sup>n</sup> erhaltenen Spektren erfolgte durch die Shimadzu Biotech Launchpad<sup>TM</sup> Software, Version 2.8.4 sowie mit dem Programm GPMW, Version 8.10sr1.

Die BLAST-Suchen der Peptidsequenzen wurden über die Website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> unter Verwendung des BLAST-Programms p-blast mit folgenden Parametern durchgeführt: Database: Non-redundant protein sequences (nr); Organism: Homo Sapiens (taxid: 9606); Algorithm: blastp. (Eickner, Lorenz et al. in Vorbereitung)

Die Steuerung des QToF II-Massenspektrometers erfolgte mit der MassLynx 4.0 (Waters, Milford, USA) Software. Massenspektren wurden mit MassLynx 4.0 und dem Protein Lynx Global Server 2.3 (Waters) prozessiert und ausgewertet.

## ***Sequenzielle Identifizierung von KRAB-ZNF-Proteinen***

Jede Signalliste eines Spektrums wurde von den Hintergrundsignalen, z.B. den Trypsin-Autoproteolyse-Signalen befreit und anschließend gegen die Datenbank SWALL gesucht. Die Signale der identifizierten Proteine wurden ebenfalls ausgeschlossen und eine weitere Suche mit den nicht zugeordneten Signalen gestartet. Dieser Vorgang wurde mehrfach durchgeführt, bis die Identifizierung als nicht mehr signifikant einzustufen war. Zur Bewertung der Identifizierung eines Proteins wurden mehrere Faktoren berücksichtigt. Zuallererst war der von dem Mascot Programm ausgegebene Mowse Score (Pappin, Hojrup et al. 1993) entscheidend. Übertraf dieser die angegebene Signifikanz-Schwelle von 60 wurden die Angaben: RMS-Error (sollte kleiner als 50 sein), e-Value (sollte möglichst niedrig sein) und der Anteil der „missed cleavages“ (die von der Protease ausgelassenen Spaltungsstellen) betrachtet. Proteinidentifikationen, die einen Score von weniger als 70 hatten und in mehr als der Hälfte der zugeordneten Peptide eine „missed cleavage“ aufwiesen, wurden als nicht sicher identifiziert betrachtet.

Mit der Liste an verbliebenen Signalen, die in der Suche gegen die SWALL-Datenbank keine weitere sichere Identifizierung erbrachten, wurde eine Suche gegen eine Datenbank getätigt, die ausschließlich die Sequenzen von KRAB-Domäne-enthaltenden Proteinen beinhaltet (Huntley, Baggot et al. 2006; Ding, Lorenz et al. 2009). Der Vorteil dieser Methode liegt in der geringeren Komplexität der Datenbank. Zum Einen wird der Signifikanz-Level in Form des Mowse Scores auf 39 reduziert, zum Anderen werden die KRAB-Proteine nicht von anderen Hintergrundproteinen überlagert. Der große Nachteil ist die erhöhte Anzahl von möglichen falsch positiven Identifizierungen, sodass eine genauere Überprüfung der erhaltenen Proteinlisten durchgeführt werden musste. Zum Einen wurde diese durch Tandem-MS-Messungen am Axima MALDI-QIT-ToF MS<sup>n</sup> Gerät erreicht. Einzelne, dem Zielprotein zugehörige und im MALDI-ToF-Massenspektrum intensive Peptidsignale wurden für die Fragmentierung ausgewählt. Die Auswertung der erhaltenen MS<sup>n</sup>-Massenspektren erfolgte sowohl automatisch als auch manuell. Konnte das fragmentierte Signal einem Peptid des fraglichen Proteins zugeordnet werden, wurde zum Anderen mit der erhaltenen Sequenz eine BLAST-Suche. Durch diesen Abgleich war es möglich, zu erkennen, ob die gesuchte Sequenz tatsächlich ausschließlich dem einen Protein zugeordnet werden kann.

## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Zellsystem und Generierung von Proteinextrakten**

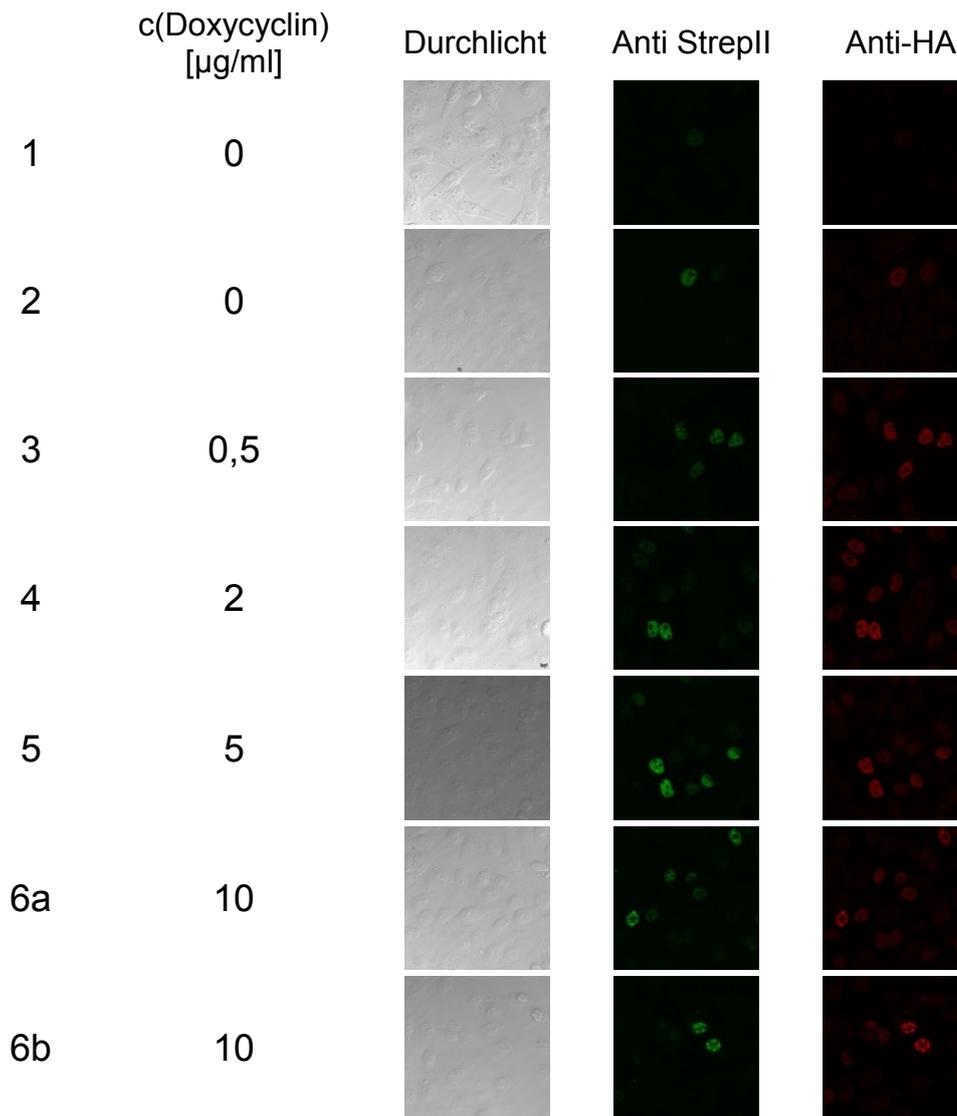
Zur Etablierung eines geeigneten Zellsystems für die Expression der Zielproteine mussten mehrere Parameter optimiert werden. Zu diesen gehörten z.B. die Konzentration an Induktionsreagenz und die Dauer der Induktion. Desweiteren sollte eine Auswahl an geeigneten Klonen mit möglichst homogener Expressionsausbeute getroffen werden. Die Beurteilung der Expression einzelner Zellen einer Zellkultur wurde visuell am konfokalen Laser-Mikroskop vorgenommen. Im Rahmen der indirekten Immunfärbung (siehe 2.4) des zu exprimierenden RBCC-Konstruktes wurde die Intensität der Fluoreszenz als Maß für die Expressionshöhe des RBCC-Konstruktes verwendet. Außerdem wurde auf die Verteilung der jeweils unterschiedlich stark exprimierenden Zellen geachtet.

#### **3.1.1 Ermittlung der optimalen Proteinexpression**

##### ***Ermittlung der Induktionsparameter***

HeLa-Zellen, die mit dem RBCC-Konstrukt stabil transfiziert wurden, wurden in 6-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und nach 24 h Wachstum im Medium (siehe 2.1) mit unterschiedlichen Mengen Doxycyclin induziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe der indirekten Immunfärbung gefärbt.

Die Zellen wurden durch Zugabe von 0,5 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml Doxycyclin induziert. Zwei Proben dienten als Kontrolle und wurden nicht induziert. Die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Die Kontrollen zeigten keine bis wenig Färbung. Zwar wiesen einige Zellen eine geringe basale Expression des RBCC-Konstruktes auf, die Intensität der Fluoreszenz und der Anteil an gefärbten Zellen waren jedoch gering. Durch Zugabe von Doxycycline zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml im Medium stieg sowohl die Intensität der Fluoreszenz als auch der Anteil an gefärbten Zellen an. Dieser Effekt verstärkte sich bei Doxycyclin-Endkonzentrationen von 2 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml noch.



**Abbildung 11:** Immunfluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen nach Induktion mit angegebenen Konzentrationen an Doxycyclin. Nummer 1 und 2 stellen nicht-induzierte Kontrollen dar. Repräsentative Aufnahmen. Zu sehen sind Durchlichtaufnahmen, Färbungen mit Antikörpern gegen den StrepII-Tag des RBCC-Konstruktes (grün) sowie gegen den HA-Tag desselben Proteins (rot). Die Stärke der Expression nimmt mit steigender Doxycyclin-Konzentration im Medium zu. In allen induzierten Proben ist zu erkennen, dass eine Expression des RBCC-Konstruktes nicht in jeder Zelle stattfindet.

Zur Bestimmung der optimalen Expressionsdauer wurden die Zellen 2, 3 und 4 Tage unter Zugabe von Doxycyclin auf Deckgläschen kultiviert. Da HeLa-Zellen adhäsiv wachsende Zellen sind, gab die Zeit, die die Zellen brauchen, um den ihnen zu Verfügung stehenden Platz vollständig zu bewachsen, die maximale Expressions- und Induktionsdauer an.

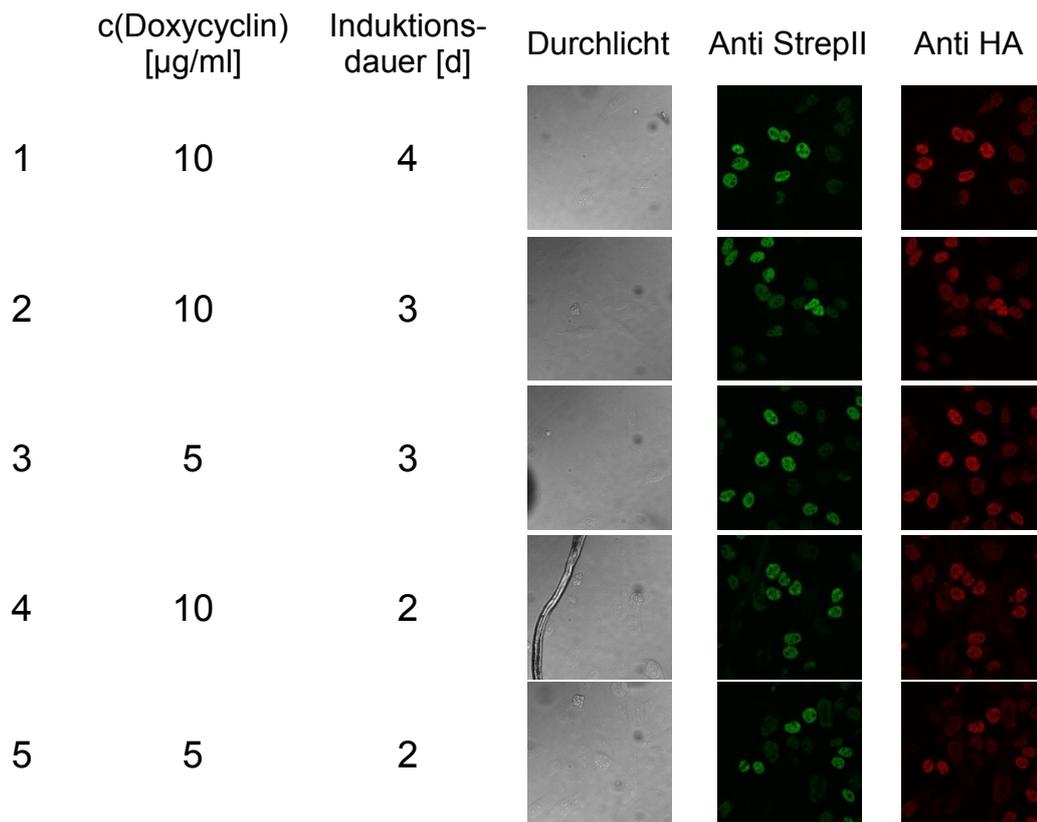


Abbildung 12: Immunfluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen nach Induktion mit angegebenen Konzentrationen an Doxycyclin. Repräsentative Aufnahmen. Zu sehen sind Durchlichtaufnahmen, Färbungen mit Antikörpern gegen den StrepII-Tag des RBCC-Konstruktes (grün) sowie gegen den HA-TAG desselben Proteins (rot). Eine Änderung der Stärke der Expression ist nicht erkennbar. Auch in diesem Experiment exprimieren nicht alle Zellen das RBCC-Konstrukt.

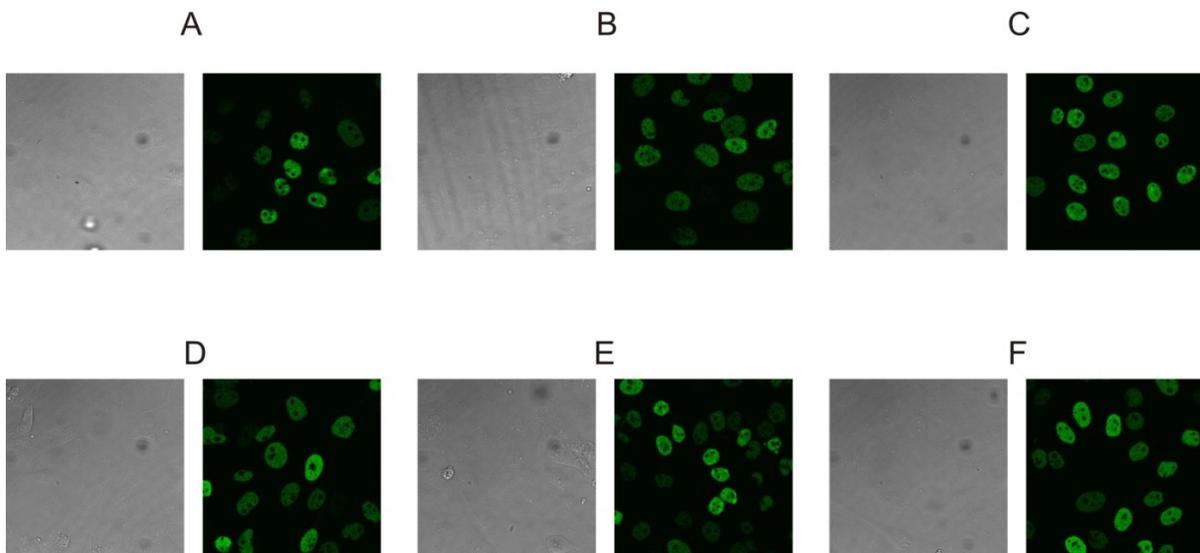
In der Abbildung 12 sind Fluoreszenzaufnahmen der unterschiedlichen Induktionszeiträume zu sehen. Für die Zeiträume von 2 und 3 Tagen wurden außerdem zwei Proben mit verschiedenen Doxycyclin-Endkonzentrationen (5 µg/ml und 10 µg/ml) induziert. Sowohl die unterschiedlichen Konzentrationen an Doxycyclin als auch die unterschiedliche Induktionsdauer ließen keine Unterschiede in der Expression feststellen. Die Färbung des Nucleoplasmas und die Anzahl der gefärbten Zellen unterschieden sich nicht.

### **Auswahl geeigneter Klone**

Die zellspezifische unterschiedliche Expressionshöhe des RBCC-Konstruktes machte die Auswahl eines geeigneten Klons für die weiteren Experimente nötig. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellsuspensionen verdünnt und in Mikrotiterplatten gegeben, sodass statistisch nur noch eine Zelle pro Vertiefung vorhanden war. Nach

einer Induktionszeit von 24 h mit 5 µg/ml Doxycyclin wurden diese Zellen fixiert und gefärbt (Abbildung 13).

Zur Auswahl der Klone wurden folgende Kriterien angelegt. Bevorzugt wurden die Zellen, die eine hohe Intensität der Fluoreszenzfärbung bei möglichst gleichmäßiger Verteilung der Fluoreszenz über alle Zellen aufwiesen.



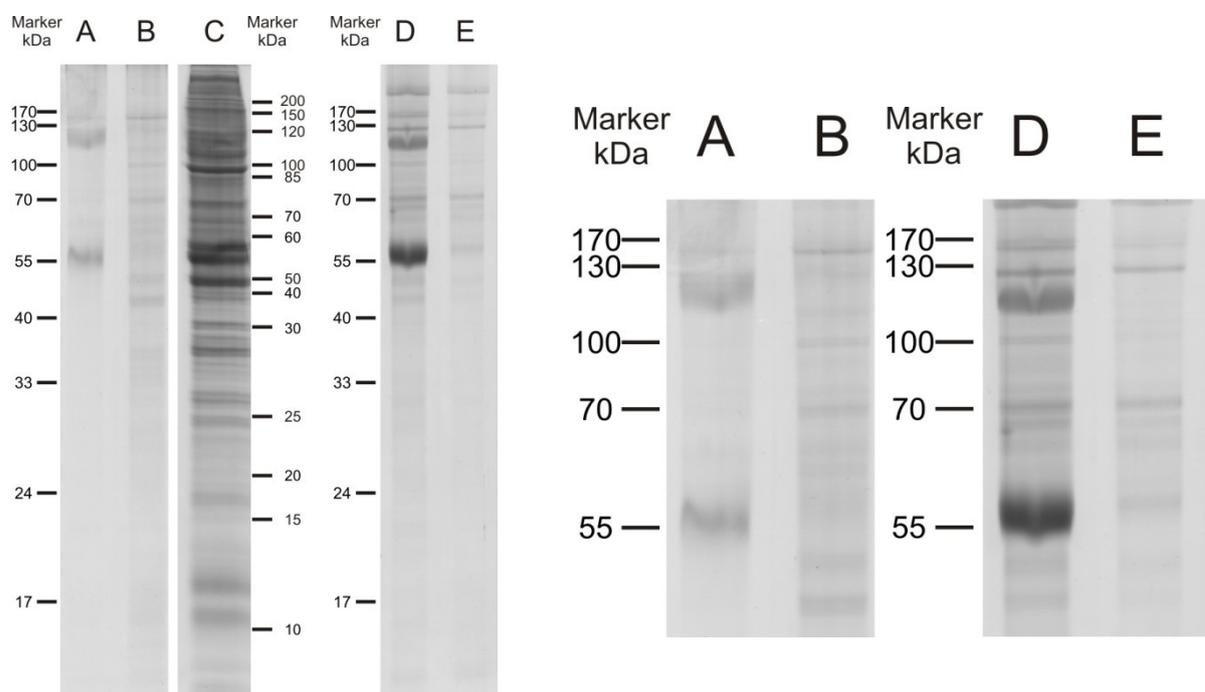
**Abbildung 13: Selektion verschiedener Klone.** Induktion erfolgte mit 5 µg/ml Doxycycline für 24 h. Zu sehen sind die Durchlichtaufnahmen sowie die Fluoreszenz durch Anfärbung des StreptII-Tag.

Der Anteil an exprimierenden Zellen sollte sehr hoch sein. So wurden zwei Klone (Abbildung 13 C und D) ausgewählt. In einem weiteren Experiment wurde ein zusätzlicher Klon ausgewählt, da die Zellen der hier gezeigten Klone nach einigen Passagen wieder eine heterogene Expression des RBCC-Konstruktes aufwiesen. Die RBCC exprimierenden Zellen werden im Folgenden als iTR-Zellen und die Zellen der Vorgängerzelllinie ohne RBCC-Konstrukt als HR5-Zellen bezeichnet.

### ***3.1.2 Optimierung der Extraktionsbedingungen und Affinitätschromatographie***

Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen der Zellaufarbeitung und der Proteinextraktion wurden verschiedene Extraktionsverfahren getestet. Da es sich bei Transkriptionsfaktoren um nukleäre Proteine handelt, wurden Zellkernextrakte hergestellt (Abbildung 14). Dazu wurden iTR- und HR5-Zellen für 24 h mit 5 µg/ml Doxycyclin (Spur A, B) bzw. 48 h mit 2 µg/ml Doxycyclin (Spur C) induziert.

Außerdem wurden Gesamtzellextrakte unter Verwendung des RIPA-Puffers hergestellt. (Abbildung 14 Spur D und E). Alle Chromatographien wurden ohne Zusatz von Avidin durchgeführt. Von jeder Fraktion der Elutionen der Affinitätschromatographien wurden 1D-SDS-Polyacrylamid-Gele und Western Blots angefertigt und die Proteine TRIM28 sowie das RBCC-Konstrukt mit Hilfe der Immunfärbung sichtbar gemacht (siehe 2.11). Die Fraktionen der Elution, die eine Färbung des RBCC-Konstruktes bzw. des endogenen TRIM28 zeigten (für Beispiel siehe Abbildung 24 A), wurden vereinigt und nachfolgend der präparativen 1D-SDS-PAGE zugeführt.



**Abbildung 14: SDS-PAGE Analyse der Proteinextrakte.** Links: Spur A: Zellkernextrakt von induzierten iTR-Zellen, Proteinmenge: 16,22 mg auf der Säule. Spur B: Zellkernextrakt von HR5-Zellen, Proteinmenge: 19,95 mg auf der Säule. Spur A, B: Elution mit Puffer B-Desthiobiotin. Spur C: Zellkernextrakt nach Challberg, Proteinmenge: 5,1 mg auf der Säule. Elution mit Puffer D-Desthiobiotin. Spur D: Gesamtzellextrakt von iTR-Zellen unter Verwendung des RIPA-Puffers. Zellen wurden für 48 h mit 2 µg/ml Doxycyclin induziert. Proteinmenge: 40 mg auf der Säule. Spur E: Gesamtzellextrakt von HR5-Zellen unter Verwendung des RIPA-Puffers. Zellen wurden für 48 h mit 2 µg/ml Doxycyclin induziert. Proteinmenge: 39,52 mg auf der Säule, Spur D, E: Elution mit RIPA-Desthiobiotin. Rechts: vergrößerte Ansicht der Spuren A, B, D und E. Vergrößert wurde der Bereich zwischen 40 und 200 kDa.

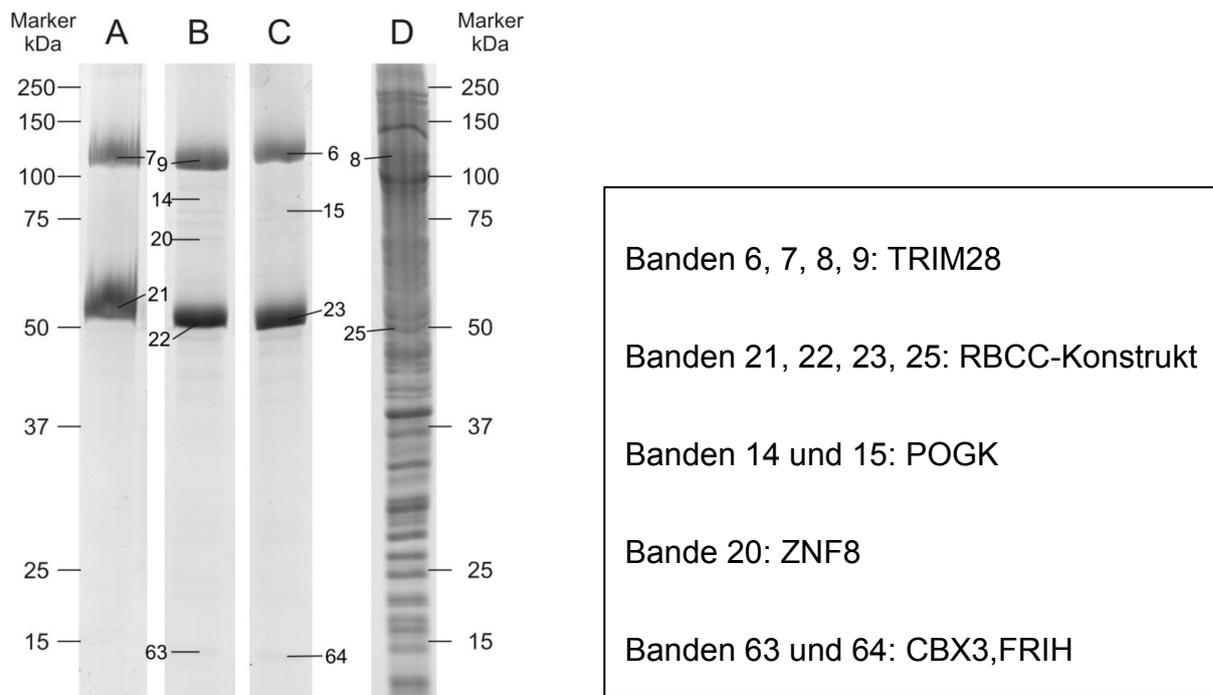
Der Vergleich der Zellkernextrakte in Spur A und Spur B zeigt eine differentielle Anreicherung von Proteinen mit einer Masse von etwa 110 kDa und 55 kDa. Die nachfolgende massenspektrometrische Identifizierung ergab, dass es sich bei diesen Proteinen um endogenes TRIM28 (110 kDa) und das RBCC-Konstrukt (55 kDa)

handelt (siehe 3.2). In der Extraktion C konnten weder TRIM28 noch das RBCC-Konstrukt bzw. bekannte TRIM28-Interaktionspartner nachgewiesen werden. Außerdem war der Anteil an Hintergrundproteinen trotz der geringeren, aufgetragenen Proteinmenge größer als in den anderen durchgeführten Extraktionen. Die Aufarbeitung nach Challberg erwies sich somit nicht als geeignet.

Die Gesamtzellextrakte unter Verwendung des RIPA-Puffers (Spur D und E) zeigen ein ähnliches Bild wie die Kernextrakte A und B. Die Intensität der Färbung dieser Proteine ist stärker im Vergleich zu den Spuren der Zellkernextrakte. Auch hier sind die Banden des TRIM28 und des RBCC-Konstruktes gut zu erkennen. Ein weiterer Unterschied zu den Kernextrakten ist die stärkere Anreicherung der Hintergrundproteine.

Die Gesamtzellextrakte zeigen im Vergleich zu den Zellkernextrakten eine höhere Menge an Zielproteinen (siehe Abbildung 14). Deshalb wurde die weitere Optimierung der Extraktionsbedingungen an der Gesamtzellextraktherstellung vorgenommen. Dazu wurden weitere Extraktionspuffer getestet (Abbildung 15). Die Spuren A, B und C zeigen die affinitätschromatographisch gereinigten Gesamtzellextrakte unter Verwendung des TST-Puffers, während Spur D eine Extraktion unter Verwendung des Igepal-Puffers darstellt. Die Spur A zeigt das Ergebnis einer Chromatographie ohne Einsatz von Avidin.

Die Verwendung des TST-Puffers zeigt im Vergleich zum HEPES/Igepal-Puffer einen deutlich reduzierten Hintergrund. Die massenspektrometrische Analyse ergab für Spur D eine große Anzahl ribosomaler Proteine (Proteinliste Tabelle 9 im Anhang). Dieses fiel ebenfalls bei der Zellkernextraktion nach Challberg auf. Zwar konnten in Spur D das TRIM28 in Bande 8 sowie das RBCC-Konstrukt in Bande 25 nachgewiesen werden, jedoch war eine Identifizierung von weiteren TRIM28-interagierenden Proteinen nicht möglich. In den Spuren B und C konnte jeweils das Protein POGK identifiziert werden. Zusätzlich gelang in Spur B die Identifizierung des KRAB-Zinkfinger Proteins 8 (ZNF8). Der Zusatz von Avidin, der hier zum ersten Mal erfolgte, verringerte den Anteil an angereicherten Carboxylasen nach der Chromatographie.



**Abbildung 15: SDS-PAGE Analyse der Proteinextrakte. Links: Spur A: Zellextrakt von induzierten iTR-Zellen. Proteinmenge: 39,75 mg auf der Säule, ohne Zusatz von Avidin; Spur B: Zellextrakt von iTR-Zellen. Proteinmenge: 39,75 mg auf der Säule. Spur C: Streptactin-Sepharose-Säule. Proteinmenge: 39,75 mg auf der Säule. Die Elution erfolgte in allen 3 Fällen mit TST/komplett + Desthiobiotin. Spur D: Gesamtzellextrakt von iTR-Zellen unter Verwendung des Hepes/Igepal-Puffers. Proteinmenge: 39,9 mg auf der Säule. Elution erfolgte mit LBHI/komplett-Desthiobiotin. Zahlen bezeichnen die Lage der Banden, die die im Kasten (Rechts) genannte Proteine enthielten. Siehe Anhang 6.1.1 und 6.1.2 für die Darstellung aller analysierten Banden des Gels und der Liste der identifizierten Proteine**

Im Folgenden wurden alle weiteren Zellextrakte unter Verwendung des TST-Puffers angefertigt. Diese enthielten diejenigen Proteine aller Zellkompartimente, die durch den Aufschluss unter Verwendung des nichtionischen Tensids Triton X-100 zugänglich geworden waren.

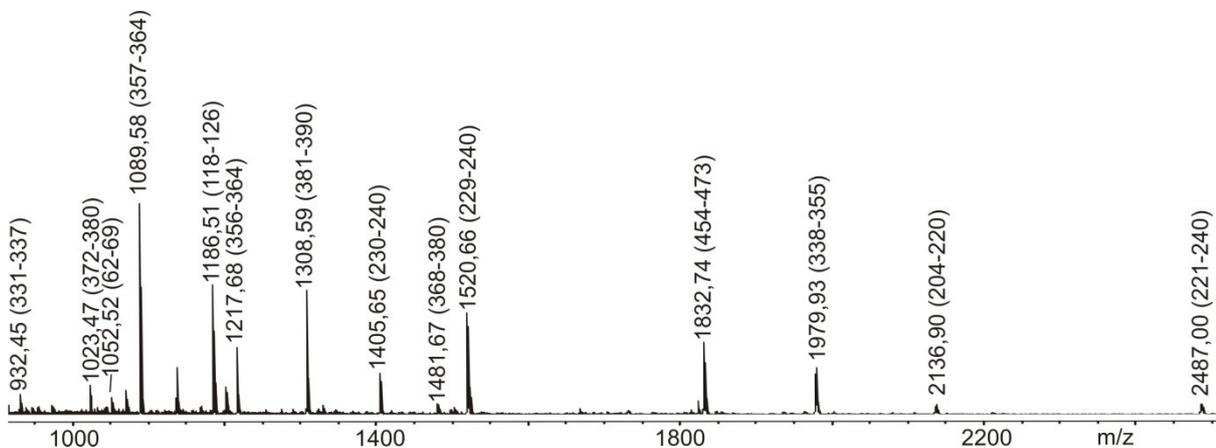
Die nachfolgenden Affinitätschromatographien wurden in Streptactin-Superflow-Säulen durchgeführt und die gebundenen Proteine wurden mit TS0-Desthiobiotin eluiert.

## 3.2 Die RBCC-TRIM28 –Interaktion

Die vorherrschenden Banden in der Abbildung 15 sind die Banden 21, 22, 23, 25 sowie die Banden 6, 7, 8, 9. Da das RBCC-Konstrukt nicht in der SWALL-Datenbank (siehe 2.19.3) enthalten war, ergab die massenspektrometrische Analyse für alle diese Banden nach der Datenbanksuche folgerichtig TRIM28 als Ergebnis. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Auswertungen der einzelnen Spektren zur Unterscheidung des TRIM28 und des RBCC-Konstruktes dargestellt.

### 3.2.1 Strukturcharakterisierung von RBCC durch MS-Analysen

In der Abbildung 16 ist ein Massenspektrum des RBCC-Konstruktes aus der Bande 22 dargestellt. Das Signal bei  $m/z$  1832,74 entspricht dem Peptid GGGSGGGSGGGSWSHPQFEK (454-473). Diese Sequenz ist ein Teil des OneStrepTags und im endogenen TRIM28 nicht vorhanden. Weiterhin entspricht dieses Signal dem C-Terminus des RBCC-Konstruktes. Die anderen Signale sind ebenfalls im Spektrum des TRIM28 zu finden (vgl. Abbildung 19).



**Abbildung 16:** MALDI-Massenspektrum des RBCC-Konstruktes (Abbildung 15, Bande 22) nach Proteolyse mit Trypsin, ausgesuchte Peptid-Ionensignale wurden gekennzeichnet. Die Zahlen in Klammern bezeichnen den Aminosäuresequenzbereich des zugeordneten Peptids. Matrix: DHB

Mithilfe dieser Untersuchungen ist eine genaue Unterscheidung des RBCC-Konstruktes von TRIM28 möglich. Insgesamt erhält man eine Sequenzabdeckung von 26 %. Die gefundenen Sequenzbereiche sind in Abbildung 17 zusammengefasst.

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100
M D R G P E F E L G T R G S L E M G E K R S T A P S A A A S A S A A A S S P A G G G A E A L L E H C G V C R E R L R P E R E P R L L P C L H S A C S A C L G P A A P A A A N S S G D G G A A G
.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200
D G T V V D C P V C K Q Q C F S K D I V E N Y F M R D S G S K A A T D A Q D A N Q C C T S C E D N A P A T S Y C V E C S E P L C E T C V E A H Q R V K Y T K D H T V R S T G P A K S R D G E R T V Y C N
.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300
V H K H E P L V L F C E S C D T L T C R D C O L N A H K D H Q Y Q F L E D A V R N Q R K L L A S L V K R L G D K H A T L Q K S T K E V R S S I R Q V S D V Q K R V Q V D V K M A I L Q I M K E L N K R G
.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400
R V L V N D A Q K V T E G Q Q E R L E R Q H W T M T K I Q K H Q E H I L R F A S W A L E S D N N T A L L S K K L I Y F O L H R A L K M I V D P V E P H G E M K F O W D L N A W T K S A E A F G K I V A
.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470
E R P G T N S T E F C S R G P K K K R K V G R Y P Y D V P D Y A V E V D L Q G D H G L S A W S H P Q F E K G G G S G G G S G G S W S H P O F E K

```

Sequenzabdeckung: 26% — Trypsin

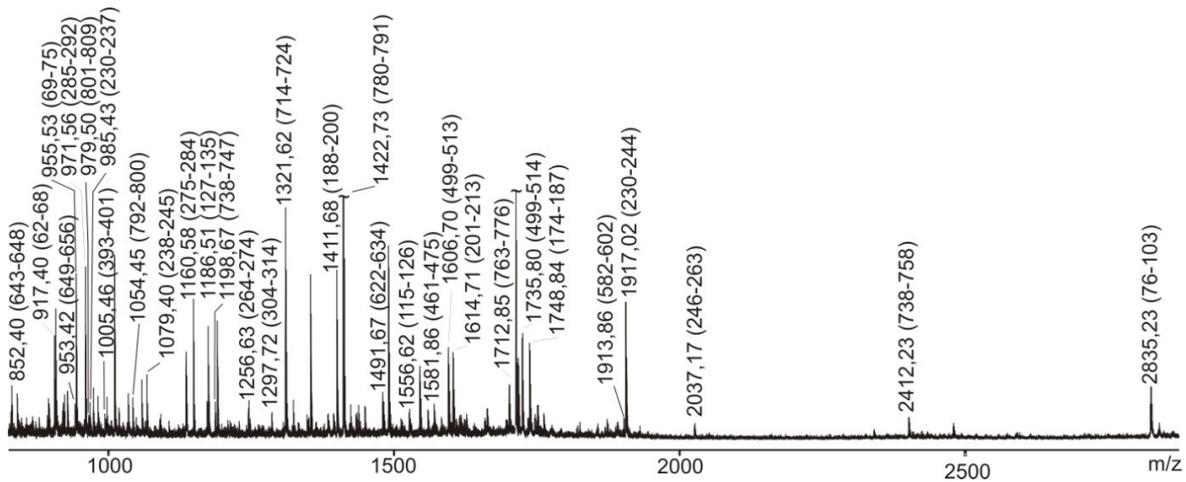
Abbildung 17: Sequenz des RBCC-Konstruktes, Die grünen Balken zeigen die Peptide deren Signale im Massenspektrum nachgewiesen wurden.

### 3.2.2 Strukturuntersuchungen am TRIM28

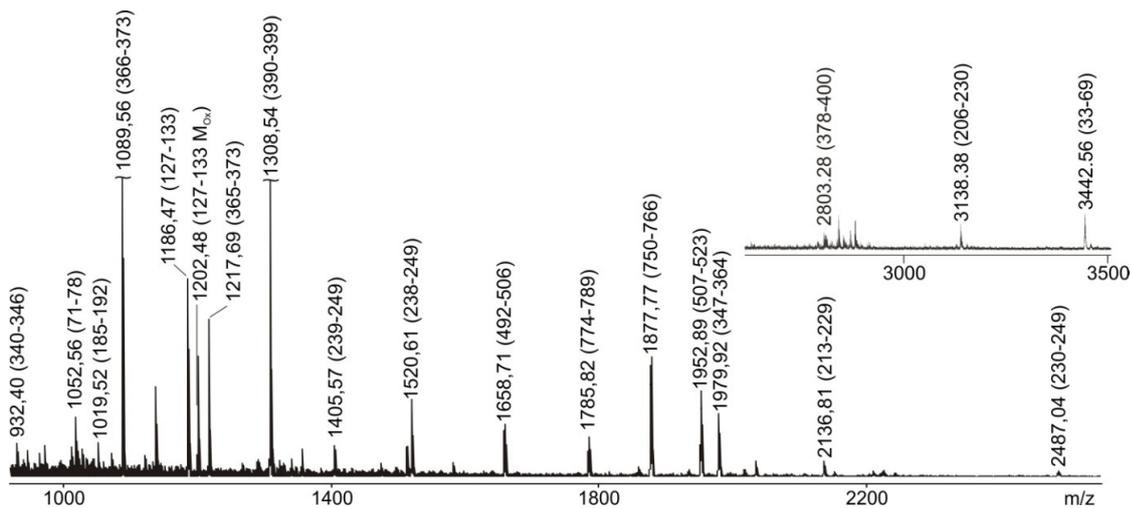
Eine weitere prominente Bande in den angefertigten Gelen ist diejenige bei etwa 110 kDa. (siehe Abbildung 14). Um in der Lage zu sein, eventuelle posttranslationale Modifikationen bzw. Mutationen der Aminosäuresequenz eines Proteins, hier des TRIM28, aufzuklären, ist es erforderlich, die tatsächliche Sequenz des Proteins genau zu kennen. Die nun dargestellten Experimente zeigen die Charakterisierung von TRIM28, welches mit Hilfe verschiedener Proteasen verdaut wurde. Zum Einsatz kamen Trypsin, LysC, AspN und GluC. Die erhaltenen Peptidmischungen wurden mit unterschiedlichen massenspektrometrischen Methoden untersucht.

#### **MALDI-MS-Messungen**

Zuerst wurden MALDI-ToF-Massenspektren angefertigt. Dies geschah unter Verwendung der DHB-Matrix. In Abbildung 18 und Abbildung 19 sind Massenspektren des TRIM28 nach Verdau mit AspN bzw. Trypsin zu sehen.



**Abbildung 18: MALDI-Massenspektrum des TRIM28 nach Proteolyse mit AspN. Ausgesuchte Signale wurden gekennzeichnet. Die Zahlen in Klammern bezeichnen den Aminosäuresequenzbereich des zugeordneten Peptids. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert. Matrix: DHB**



**Abbildung 19: MALDI-Massenspektrum des TRIM28 nach Proteolyse mit Trypsin. Ausgesuchte Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern bezeichnen den Aminosäuresequenzbereich des zugeordneten Peptids. Im Insert sieht man den Massenbereich von m/z 2500-3500 mit weiteren TRIM28-Signalen. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert. Matrix: DHB**

Die Spektren nach LysC- bzw. GluC-Verdau sind dem Anhang (Abbildung 59 und Abbildung 60) beigelegt. Zu beachten ist außerdem die Abwesenheit des RBCC-Konstrukt-typischen Signals bei m/z 1832,74 (454-473). Umgekehrt sind Signale im Spektrum des endogenen TRIM28 zu beobachten, die nicht im RBCC-Spektrum auftreten. Diese Signale entsprechen Peptiden, die in der Sequenz des RBCC-Konstruktes nicht vorzufinden sind, da sie zum C-terminalen Teil des TRIM28 gehören. Die Signale bei m/z 1877,77 (750-766) und m/z 1952,89 (507-523) für

TRIM28 und bei  $m/z$  1832,74 (454-473) für das RBCC-Konstrukt ermöglichen eine eindeutige Unterscheidung zwischen diesen beiden Proteinen.

### MS/MS-Messungen

Um Sequenzinformationen zu erhalten, wurden von einigen Peptiden MS/MS-Spektren aufgenommen. In Abbildung 20 ist ein solches MS/MS-Spektrum des Signals bei  $m/z$  1520,8 (238-249) dargestellt. Das intensivste Fragment-Ionensignal ist in diesem Fall das  $Y''_{11}$ -Ion bei  $m/z$  1405,8. Es handelt sich dabei um das Ion, das durch Abspaltung der *N*-terminalen Asparaginsäure entsteht. Diese Spaltung ist eine bevorzugte Spaltung. Die Asparaginsäure ist in der Lage eine intramolekulare Ringschlussreaktion unter Spaltung der Peptidbindung einzugehen (Yu, Vath et al. 1993; Gu, Tsaprailis et al. 2000).

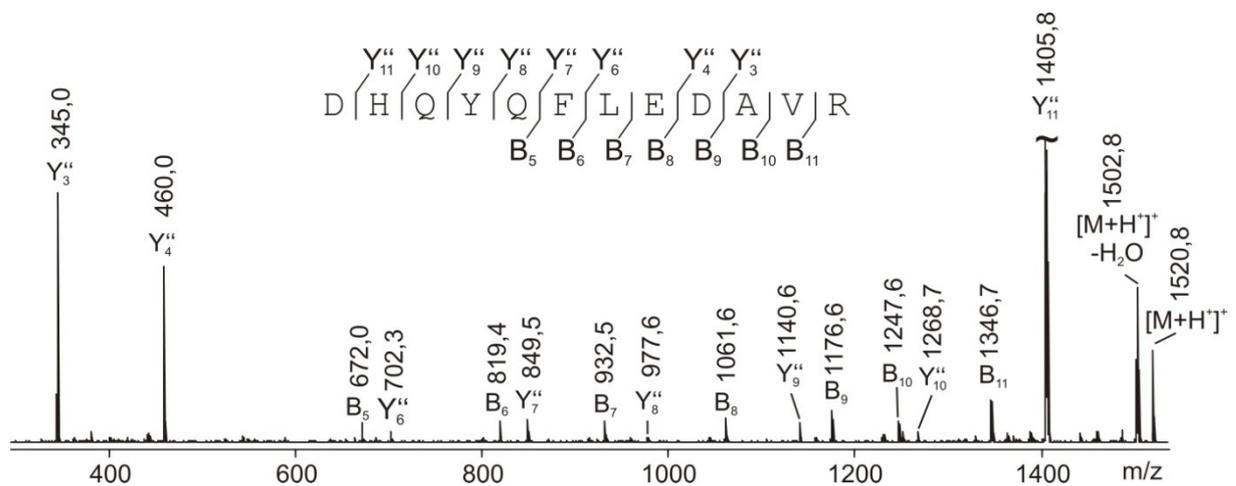


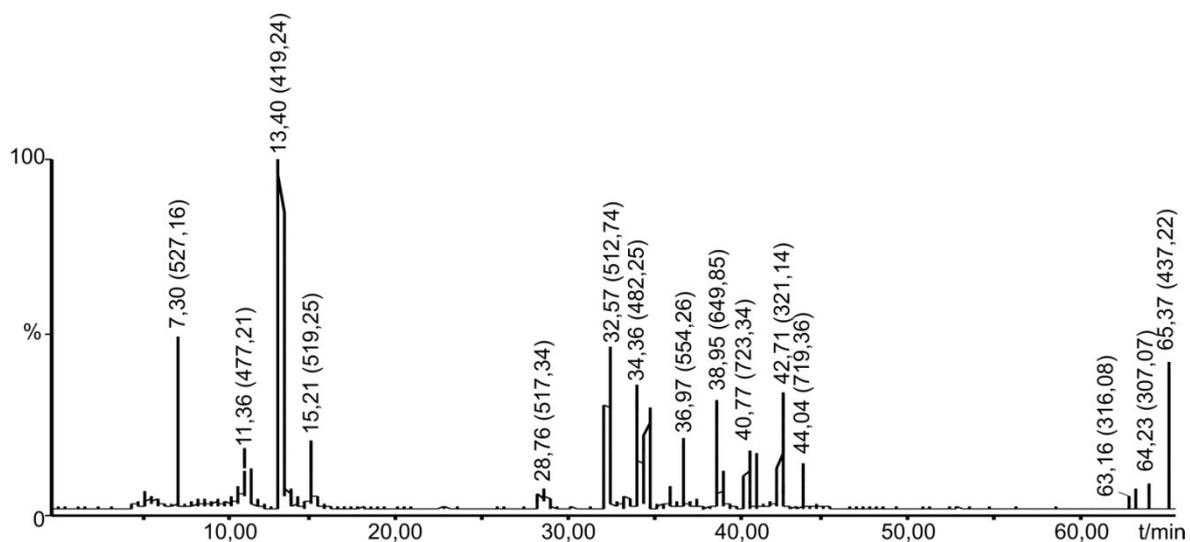
Abbildung 20: MALDI-QIT-ToF-MS/MS Spektrum des Peptids DHQYQFLEDAVR des TRIM28 bei  $m/z$  1520,7 (238-249). B- und  $Y''$ - Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und  $Y''$ - und B-Ionenserie über dem Spektrum angegeben.

Die hier vorhandene D-H-Peptidbindung ist dermaßen labil, dass die Spaltung bereits während der MALDI-ToF-Messung auftritt und dadurch im Spektrum der Abbildung 19 ebenfalls zu finden ist.

Weitere Beispiele sequenzierter Peptide des TRIM28 und die dazugehörigen MS/MS-Spektren sind im Anhang (Abbildung 61 bis Abbildung 65) aufgeführt.

## LCMS-Messungen

Da es sich bei der Elektrospray-Ionisierung um eine von der MALDI unterschiedliche Ionisierungsart darstellt, lassen sich in den ESI-MS-Analysen oft andere Peptidionensignale eines komplexen Gemischen beobachten als mit MALDI-MS. Die Untersuchung der Peptidgemische der verschiedenen TRIM28-Proteolysen mit Hilfe der nanoLC-ESI-Massenspektrometrie ermöglichte die Gewinnung weiterer Sequenzinformationen. In Abbildung 21 ist ein sogenanntes Basis-Peak-Ionen (BPI)-Chromatogramm dargestellt. In einem BPI-Chromatogramm werden die Intensitäten der intensivsten Signale pro Spektrum gegen die Zeit aufgetragen. Es wurde nach nanoLC-ESI-Massenspektrometrie eines LysC-Verdaus des TRIM28 erhalten.



**Abbildung 21: Basis-Peak-Intensitäten Chromatogramm einer Messung des TRIM28 nach LysC in-Gel-Proteolyse. Die Peakbezeichnungen stellen die Retentionszeiten dar. In Klammern steht der jeweilige m/z-Wert des Basis-Peaks.**

Das Spektrum, welches man nach Aufsummieren des Peaks bei Minute 32,57 erhält, ist in Abbildung 22 dargestellt. Der Basispeak bei m/z 512,49 trägt eine vierfach positive Ladung. Das Peptid hat demzufolge eine Masse von 2045,96 Da und kann dem Sequenzbereich 238-250 von TRIM28 zugeordnet werden. Man findet die zugehörigen dreifach und zweifach geladenen Peptidionensignale bei m/z 683,00 und m/z 1024,03.

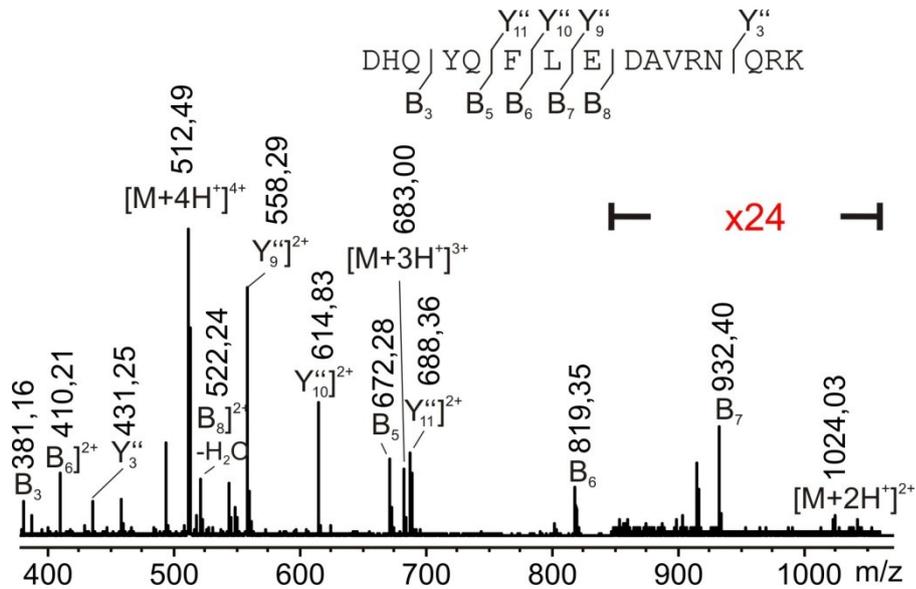


Abbildung 22: nanoLC-ESI-QToF-Massenspektrum des Basispeaks  $m/z$  512,74 bei Retentionszeit 32,57 min (siehe Abbildung 21). Zusätzlich zu den mehrfach geladenen Peptid-Ionen ( $[M+2H]^2+$ ,  $[M+3H]^3+$  und  $[M+4H]^4+$ ) sind Fragment-Ionensignale sichtbar. Das Peptid DHQYQFLEDAVRNQRK konnte somit identifiziert werden. Die Aminosäuresequenz mit den B- und Y'-Ionen ist über dem Spektrum dargestellt.

In diesem Fall kam es während der Messung innerhalb der Ionenquelle zur Fragmentierung dieses Peptids (Stewart und Horlick 1996; Barnett und Horlick 1997) und damit zur Generierung eines Fragment-Ionen-Spektrums. Dadurch lassen sich aus dem Spektrum weitere Sequenzinformationen des Peptids ablesen. Die identifizierten Ionensignale der B- und Y'-Ionenserie sind im Spektrum angegeben.

Das RBCC-Konstrukt konnte zusammen mit endogenem TRIM28 in allen affinitätschromatographisch gereinigten iTR-Zellextrakten angereichert werden. Dadurch war es möglich genaue Untersuchungen an der TRIM28-Primärstruktur vorzu nehmen. Die Sequenz des TRIM28 wurde durch kombinierte Experimente zu 99,8 % abgedeckt (Abbildung 23). Zwei Phosphorylierungen wurden identifiziert (siehe 3.4.1). Durch die MS/MS-Messungen des phosphorylierten *N*-Terminus konnte zusätzlich zur Phosphorylierung am Serin19 die Eliminierung des initialen Methionins sowie die Acetylierung des dadurch *N*-terminal stehenden Alanins (Bienvenut, Kanor et al. 2006) nachgewiesen und bestätigt werden.

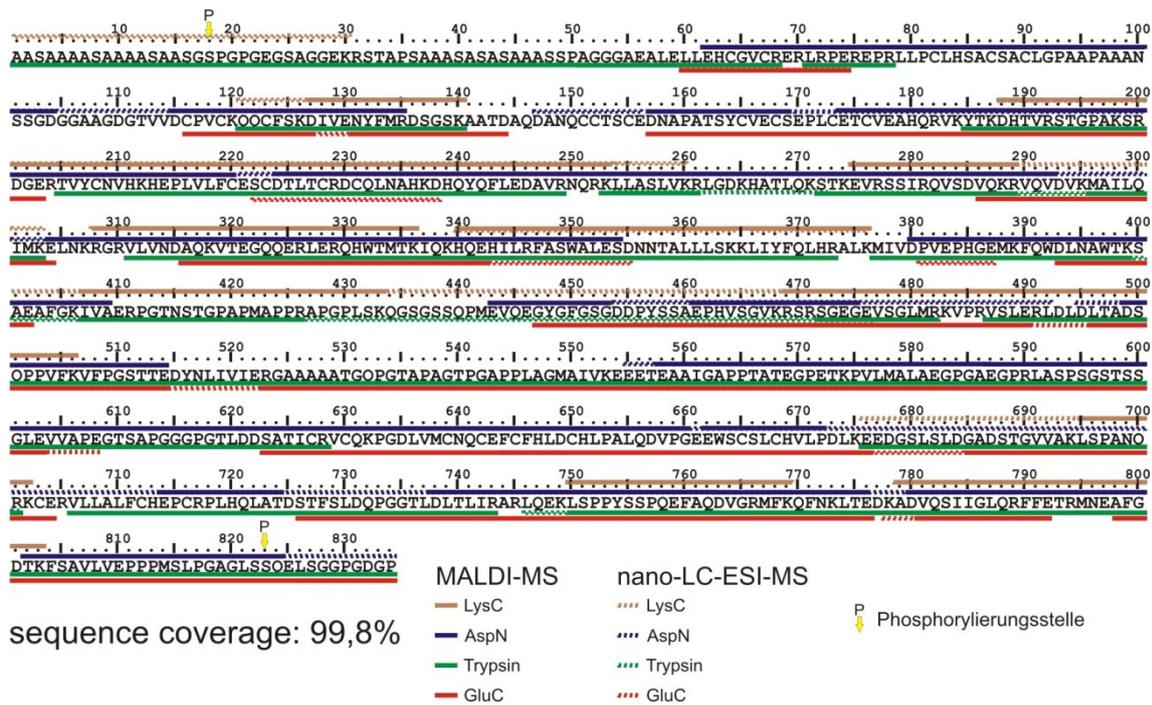


Abbildung 23: Sequenz des TRIM28. Die Farben der Balken entsprechen verwendeten Enzymen. Die Balken kennzeichnen die nachgewiesenen Peptide. Nachgewiesene Phosphorylierungsstellen sind mit gelben Pfeilen gekennzeichnet.

Letzteres stellt offensichtlich eine quantitative Modifizierung dar, da weder ein nichtacetyliertes TRIM28 gefunden wurde, noch ein TRIM28 mit N-terminalem Methionin. Beide Phosphorylierungsstellen fanden bereits Erwähnung in der Literatur (Olsen, Blagoev et al. 2006) und im Falle der Phosphorylierung am Serin 824, wie in 1.1.2 dargestellt, ebenfalls eine Verknüpfung mit einer biologischen Funktion (Ziv, Bielopolski et al. 2006; Lee, Thomas et al. 2007; Li, Lee et al. 2007; Li, Lin et al. 2010). Dagegen ist eine biologische Funktion der Serin19-Phosphorylierung bisher nicht bekannt.

Weitere posttranslationale Modifikationen, wie eine Phosphorylierung am Serin 473 (Chang, Chou et al. 2008) konnten nicht gefunden werden. Eine Interaktion des angereicherten TRIM28 mit CBX3/HP1 $\gamma$  wäre demzufolge zu erwarten und konnte durch die Identifizierung des CBX3/HP1 $\gamma$  nach der Affinitätschromatographie auch bestätigt werden.

### 3.3 KRAB-Zinkfingerproteine als TRIM28-Interaktionspartner

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse einer weiteren Affinitätschromatographie-Anreicherung von RBCC, TRIM28 und anderen, an diesen Komplex gebundenen Proteinen dargestellt. Der Vergleich des aufgetragenen Extraktes mit dem Durchlauf der Säule im Western Blot (Abbildung 24 A: Spuren E und DL) zeigt, dass das RBCC-Konstrukt vollständig auf der Säule verbleibt. Im Durchlauf DL lässt sich kein RBCC-Konstrukt nachweisen. TRIM28 wird ebenfalls aus dem Extrakt zurückgehalten, der Durchlauf zeigt eine starke Abreicherung dieses Proteins. Allerdings wird nicht jedes TRIM28-Molekül zurückgehalten, erkennbar an der Färbung des TRIM28 in der DL-Spur. Daraus folgt, dass auch nicht RBCC-gebundenes TRIM28 in den Zellen vorhanden ist.

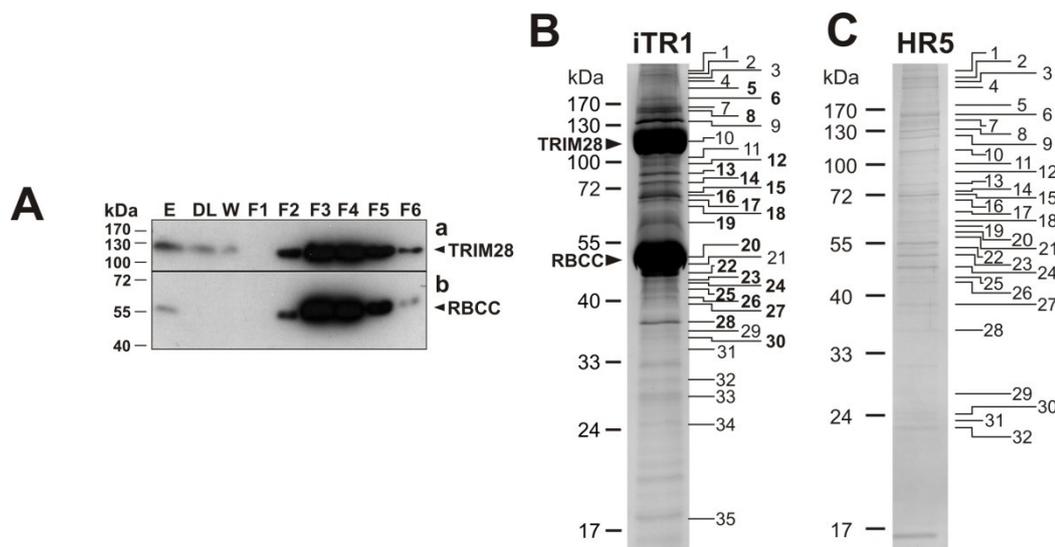


Abbildung 24 A: Western Blot der einzelnen Fraktionen nach der Affinitätschromatographie des iTR-Extraktes. E-Extrakt, DL-Durchlauf, W-Waschfraktion, F1-6-Elutionsfraktionen. B: 1D-SDS-PAGE (10 %) vereinigt Fraktionen F3, 4, 5 des iTR-Zellextraktes, 55 mg auf der Säule, kontrastverstärkt. C: 1D-SDS-PAGE (10 %) eines affinitätschromatographisch gereinigten HR5-Zellextraktes zur Kontrolle, 55 mg auf der Säule, kontrastverstärkt. Die Nummerierung der Spuren ist individuell für jede Spur vorgenommen worden. Gleiche Nummern bedeuten nicht gleiche Proteine! Die fettgedruckten Bandenbezeichnungen kennzeichnen die Lage der Banden, in denen KRAB-Domäne-enthaltende Proteine identifiziert wurden. B stellt ein Referenzgel, zusammengefasst aus Gel 3 (siehe Anhang Abbildung 56) und C ein Referenzgel aus Gel 4 (siehe Anhang Abbildung 57) dar. Im Anhang befinden sich sowohl die Proteinlisten zu diesen Referenzen (Für B: Tabelle 17 und Tabelle 18 und für C: Tabelle 19) als auch die, aus denen diese hervorgingen (Tabelle 11 bis Tabelle 16).

In allen Experimenten konnte man am Vergleich der Intensitäten der Banden des TRIM28 und des RBCC-Konstruktes feststellen, dass sie etwa in der gleichen Menge angereichert wurden. Die anderen, in zusätzlichen Banden angefärbten Proteine sind dagegen in deutlich geringeren Mengen vorhanden, erkennbar an der schwächeren Färbung. So konnten einige dieser Banden nur durch elektronische Bildbearbeitung und Verstärkung sichtbar gemacht werden. Das Kontrollexperiment mit der Vorgängerzelllinie HR5 (Abbildung 24 C) wurde mit Hilfe einer separaten Gelelektrophorese durchgeführt. Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass die vorhandenen Banden durchweg weniger stark gefärbt sind. Außerdem fehlen die prominenten Banden des endogenen TRIM28 bzw. des RBCC-Konstruktes.

Zur Identifizierung der TRIM28 Interaktionspartner mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden zuerst die Banden aus dem mikro-präparativen Gel ausgeschnitten und wie in 2.14.1 dargestellt, proteolytisch verdaut. Die dadurch erhaltenen Peptidmischungen wurden auf ein MALDI anchor target aufgebracht und massenspektrometrisch untersucht. Als MALDI-Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet. Die Spektren wurden manuell unter individueller Einstellung der Laserpower aufgenommen.

Zur Identifizierung der Proteine wurden eine neue Strategie entwickelt, die sequenzielle Datenbank-Suchen zugrundelegt (siehe 2.19.3). Die Ergebnisse der Identifizierungen der KRAB-Proteine sowie die Ergebnisse der entsprechenden Tandem-MS-Messungen sind in der Tabelle 6 zusammengestellt. Es war nicht möglich, auch nur eines der in aufgeführten Proteine ebenfalls im Kontrollgel zu identifizieren, obwohl dieselbe Datenauswertestrategie verwendet wurde.

Auf den nächsten Seiten sind die Identifizierungsergebnisse der KRAB-Domäne enthaltenden Proteine in tabellarischer Form zusammengestellt. Die dazugehörigen Spektren und Ergebnisse der BLAST-Suchen sind im Anhang (6.3) dargestellt.

**Tabelle 6: Auflistung der affinitätschromatographisch isolierten KRAB-Domäne enthaltenden Proteine. a) Banden Nr. bezogen auf die Bandenbezeichnung des iTR-Extraktes in Abbildung 24; b) Uniprot Accession Nummer (Apweiler, Martin et al. 2010; Consortium 2010); c) basierend auf den volle-Länge Sequenzen und HMMer Matrizen für verschiedene Typen der KRAB-Domäne; d) Gen-Namen des BLAST Ergebnisses; f) BLAST-Score; Für d), e), f), g), h), i) gilt: oben 1. Treffer, unten 2. Treffer; f) e-Value (BLAST); g) Übereinstimmungen der Aminosäureidentitäten von gesuchter und gefundener Sequenz; h) Anzahl der gleichen und ähnlichen Aminosäuren von gesuchter und gefundener Sequenz; i) Anzahl der Lücken; j) einem dominanten Ionensignal zugeordnete Sequenz; k) durch MS/MS-Experimente bestätigte Sequenz**

| Banden Nr. <sup>a)</sup> | Gen Name        | Accession Nr. <sup>b)</sup> | Art der KRAB Domäne <sup>c)</sup> | Sequenzbereich | Aminosäuresequenz                          | BLAST-p Result <sup>d)</sup> | Score <sup>e)</sup> | e-Value <sup>f)</sup> | Identity (%) <sup>g)</sup> | Positives (%) <sup>h)</sup> | Gaps (%) <sup>i)</sup> |
|--------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------|--|------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 5                        | ZNF862          | ZN862_HUMAN                 | A-AB                              | 524-535        | AHRLCVNTVEIK <sup>j)</sup>                 | ZNF862                       | 42.2                | 2 e-4                 | 12/12 (100)                | 12/12 (100)                 | 0/12 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | CEP72                        | 24.0                | 51                    | 7/10 (70)                  | 7/10 (70)                   | 0/10 (0)               |
| 5,6                      | ZNF41           | ZNF41_HUMAN                 | AB                                | 433-445        | GFSQNSDLSIHQK <sup>j)</sup>                | ZNF41                        | 43.9                | 5 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13(0)                |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF175                       | 32.9                | 0.11                  | 11/13 (85)                 | 11/13 (85)                  | 0/13(0)                |
| 8                        | ZNF316          | ZN316_HUMAN                 | AB                                | 160-171        | GSALLEFAGGTSFGSEHQAFAGPSGAYR <sup>k)</sup> | ZNF316                       | 89.3                | 1 e-18                | 29/29 (100)                | 29/29 (100)                 | 0/29 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | FOX1                         | 25.2                | 20                    | 8/10 (80)                  | 9/10 (90)                   | 0/10 (0)               |
| 12                       | ZNF20           | Q86XA2_HUMAN                | AC                                | 406-415        | YFSSLRIHER <sup>j)</sup>                   | ZNF20                        | 36.7                | 0.008                 | 10/10 (100)                | 10/10 (100)                 | 0/10 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF442                       | 28.6                | 2.0                   | 8/8 (100)                  | 8/8 (100)                   | 0/8 (0)                |
| 12                       | ZNF761          | ZN761_HUMAN                 | A                                 | 430-439        | KIHTEDNAYK <sup>j)</sup>                   | ZNF761                       | 36.3                | 0.01                  | 10/10 (100)                | 10/10 (100)                 | 0/10 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF765                       | 30.3                | 0.62                  | 8/10 (100)                 | 9/10 (100)                  | 0/10 (0)               |
| 13                       | POGK            | POGK_HUMAN                  | AB                                | 410-418        | MESTAYPLNLSLKEEEEEEEIQSR <sup>k)</sup>     | POGK                         | 81.2                | 3.0 e-16              | 24/24 (100)                | 24/24 (100)                 | 0/24 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | STAG3                        | 34.1                | 0.0042                | 11/15 (73)                 | 12/15 (80)                  | 2/15 (0)               |
| 13                       | ZNF769/<br>RBAK | RBAK_HUMAN                  | AB                                | 547-559        | LFNELSYYTEHYR <sup>k)</sup>                | RBAK                         | 48.6                | 2 e-6                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ASTN2                        | 26.1                | 12                    | 6/10 (60)                  | 9/10 (90)                   | 0/10 (0)               |
| 13,18                    | ZNF7            | ZNF7_HUMAN                  | AB                                | 342-354        | AFSQQSQLVRHQQR <sup>j)</sup>               | ZNF7                         | 44.8                | 3 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF569                       | 37.1                | 0.006                 | 11/13 (85)                 | 12/13 (92)                  | 0/13 (0)               |
| 15,16,19                 | ZNF8            | ZNF8_HUMAN                  | AB                                | 292-205        | AFSQNSLQVHER <sup>j)</sup>                 | ZNF8                         | 43.9                | 5 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF501                       | 40.9                | 4 e-4                 | 12/13 (92)                 | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
| 16,18,19                 | ZNF460          | ZN460_HUMAN                 | A                                 | 372-384        | AFTHYSTYVLHER <sup>k)</sup>                | ZNF460                       | 46.9                | 6 e-6                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF543                       | 32.5                | 0.14                  | 10/13 (77)                 | 11/13 (85)                  | 0/13 (0)               |
| 17                       | ZNF14           | ZNF14_HUMAN                 | AC                                | 283-295        | ECGKAFLSSFR <sup>13)</sup>                 | ZNF14                        | 44.3                | 4 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF490                       | 36.7                | 0.007                 | 11/13 (85)                 | 11/13 (85)                  | 0/13 (0)               |
| 19                       | ZNF324          | Z324A_HUMAN                 | AB                                | 293-305        | AFSQTSHLTQHQR <sup>j)</sup>                | ZNF324B                      | 44.8                | 3 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | Z324A                        | 44.8                | 3 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
| 19                       | ZNF426          | ZN426_HUMAN                 | AB                                | 316-328        | AFNYSNSFQIHGR <sup>j)</sup>                | ZNF426                       | 46                  | 1 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF226                       | 32                  | 0.19                  | 9/12 (75)                  | 9/12 (75)                   | 0/12 (0)               |
| 19,24                    | ZNF791          | ZN791_HUMAN                 | AC                                | 76-93          | EGSQCAENFSPNLSVTKK <sup>j)</sup>           | ZNF791                       | 59.2                | 1 e-9                 | 18/18 (100)                | 18/18 (100)                 | 0/18 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | MTMR2                        | 27.8                | 3.5                   | 8/10 (80)                  | 9/12 (90)                   | 0/10 (0)               |
| 19                       | ZNF527          | ZN527_HUMAN                 | AB                                | 366-378        | AFSRYAFLVEHQQR <sup>j)</sup>               | ZNF527                       | 46                  | 1 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF502                       | 33.3                | 0.078                 | 10/13 (77)                 | 11/13 (85)                  | 0/13 (0)               |
| 19                       | ZNF354B         | Z354B_HUMAN                 | AB                                | 558-570        | TFRQSSSLIAHQQR <sup>j)</sup>               | ZNF354B                      | 43.9                | 5 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF354A                      | 37.5                | 0.004                 | 12/13 (92)                 | 12/13 (92)                  | 0/13 (0)               |
| 20                       | ZNF799          | ZN799_HUMAN                 | AC                                | 177-192        | SFSSLGNLQRHMAVQR <sup>j)</sup>             | ZNF443                       | 54.1                | 4 e-8                 | 16/16 (100)                | 16/16 (100)                 | 0/16 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF799                       | 54.1                | 3 e-8                 | 16/16 (100)                | 16/16 (100)                 | 0/16 (0)               |
| 22                       | ZNF556          | ZN556_HUMAN                 | A                                 | 183-195        | AFSRPSYLQTHEK <sup>k)</sup>                | ZNF556                       | 45.2                | 2 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF44                        | 29.9                | 0.82                  | 10/12 (83)                 | 10/12 (83)                  | 0/12 (0)               |
| 22                       | ZNF331          | ZN331_HUMAN                 | A                                 | 363-375        | AFNCGYHLTQHER <sup>k)</sup>                | ZNF331                       | 47.7                | 4 e-6                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |                 |                             |                                   |                |  | ZNF283                       | 30.3                | 0.61                  | 9/12 (75)                  | 10/12 (83)                  | 0/12 (0)               |

## ERGEBNISSE

| Banden Nr. <sup>a)</sup> | Gen Name | Accession Nr. <sup>b)</sup> | Art der KRAB Domäne <sup>c)</sup> | Sequenzbereich | Aminosäuresequenz              | BLAST-p Result <sup>d)</sup> | Score <sup>e)</sup> | e-Value <sup>f)</sup> | Identity (%) <sup>g)</sup> | Positives (%) <sup>h)</sup> | Gaps (%) <sup>i)</sup> |
|--------------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 24                       | ZNF764   | ZN764_HUMAN                 | AB                                | 268-278        | FSQSSALYQHR <sup>j)</sup>      | ZNF764                       | 38.4                | 0.002                 | 11/11 (100)                | 11/11 (100)                 | 0/11 (0)               |
|                          |          |                             |                                   |                |                                | ZNF3                         | 29.5                | 1.1                   | 9/10 (90)                  | 9/10 (90)                   | 0/10 (0)               |
| 25                       | ZNF562   | ZN562_HUMAN                 | A                                 | 268-280        | SFTNFSQLSAHAR <sup>k)</sup>    | ZNF562                       | 40.1                | 7 e-4                 | 12/12 (100)                | 12/12 (100)                 | 0/12 (0)               |
|                          |          |                             |                                   |                |                                | ZNF812                       | 37.5                | 0.004                 | 11/11 (100)                | 11/11 (100)                 | 0/11 (0)               |
| 25                       | ZNF552   | ZN552_HUMAN                 | A                                 | 252-264        | YDSFNSHQGVHTR <sup>j)</sup>    | ZNF552                       | 46.0                | 1 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |          |                             |                                   |                |                                | ZNF814                       | 31.6                | 0.25                  | 10/12 (83)                 | 10/12 (83)                  | 0/12 (0)               |
| 25                       | ZNF302   | ZN302_HUMAN                 | AB                                | 428-440        | AFCCSSHLTQHQR <sup>j)</sup>    | ZN302                        | 46.9                | 6 e-6                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |          |                             |                                   |                |                                | ZNF181                       | 42.6                | 1 e-4                 | 12/13 (92)                 | 12/13 (92)                  | 0/13 (0)               |
| 26,27                    | ZFP1     | ZFP1_HUMAN                  | A                                 | 89-100         | ALNLNTDFVSLR <sup>k)</sup>     | ZFP1                         | 40.5                | 5 e-4                 | 12/12 (100)                | 12/12 (100)                 | 0/12 (0)               |
|                          |          |                             |                                   |                |                                | ADAMTS6                      | 27.4                | 4.8                   | 8/9 (89)                   | 8/9 (89)                    | 0/9 (0)                |
| 26,27                    | ZNF669   | ZN669_HUMAN                 | AC                                | 258-267        | AFYFLNSVER <sup>k)</sup>       | ZNF669                       | 36.3                | 0.01                  | 10/10 (100)                | 10/10 (100)                 | 0/10 (0)               |
|                          |          |                             |                                   |                |                                | ZNF20                        | 24                  | 51                    | 6/6 (100)                  | 6/6 (100)                   | 0/6 (0)                |
| 26                       | ZNF584   | ZN584_HUMAN                 | A                                 | 306-318        | FFKYNSFILHQR <sup>j)</sup>     | ZNF584                       | 48.1                | 3 e-5                 | 13/13 (100)                | 13/13 (100)                 | 0/13 (0)               |
|                          |          |                             |                                   |                |                                | ZNF485                       | 34.6                | 0.032                 | 10/12 (83)                 | 10/12 (83)                  | 0/12 (0)               |
| 30                       | ZNF707   | ZNF707_HUMAN                | AB                                | 95-105         | RPCDHPAWAHK <sup>j)</sup>      | ZN707                        | 42.2                | 2 e-4                 | 11/11 (100)                | 11/11 (100)                 | 0/11 (0)               |
|                          |          |                             |                                   |                |                                | ESYT2                        | 25.2                | 21                    | 7/10 (70)                  | 7/10 (70)                   | 0/10 (0)               |
| 30                       | ZNF747   | B7ZAD9_HUMAN                | AB                                | 17593          | KPGAVSFADVAVYFSR <sup>k)</sup> | ZN747                        | 2.4                 | 1 e-7                 | 16/16 (100)                | 16/16 (100)                 | 0/16 (0)               |
|                          |          |                             |                                   |                |                                | ZNF785                       | 46                  | 1 e-5                 | 14/14 (100)                | 14/14 (100)                 | 0/14 (0)               |

Eine weitere Möglichkeit zur Validierung dieser Ergebnisse bestand in der Anfertigung von Western Blots mit Immunfärbung gegen die zu verifizierenden Proteine. Dieses gelang allerdings nur im Fall des POGK (siehe 3.3.1), da nur für dieses Protein ein entsprechender Antikörper zur Verfügung stand. Die große Menge an TRIM28 und RBCC-Konstrukt auf dem Gel führte zu einer Kontamination der gesamten Spur mit diesen Proteinen. Signale von, zu diesen Proteinen zugehörigen Peptiden konnten in fast jeder Bande der Spur nachgewiesen werden.

Tabelle 11 bis Tabelle 16 (siehe Anhang) führen alle weiteren identifizierten Proteine auf. Die Proteine, die sowohl in den iTR- als auch in den HR5-Spuren bzw. ausschließlich in letzteren nachgewiesen wurden, werden als „Hintergrundproteine“ angesehen. Dazu gehören zuallererst die Carboxylasen, die aufgrund ihrer prosthetischen Gruppe (Biotin) direkt mit der StrepTactin-Matrix wechselwirken und deshalb angereichert werden. Ein weiteres, direkt mit der Säule interagierendes Protein ist die Lipoamidacyltransferase (ODB2). Dieses Protein trägt ein Molekül Liponsäure als prosthetische Gruppe, welches ebenfalls in der Lage ist, an StrepTactin zu binden. Freie Liponsäure kann ebenso wie Desthiobiotin als Elutionsmittel eingesetzt werden (Schmidt und Skerra 1993). Weiterhin als Hintergrundproteine anzusehen waren Proteine des Zytoplasmas, wie zum Beispiel Actin, Actinin, etc. und Hitzeschock-Proteine wie GRP78, HSP7C etc. Letztere

konnten während der Affinitätschromatographie aufgrund ihrer Häufigkeit im Zytoplasma vermutlich nicht komplett abgereichert werden.

### **3.3.1 KRAB-Domäne enthaltende Zinkfingerproteine**

Durch die Verwendung der dargestellten Extraktionsmethode konnten 29 KRAB-Domäne-enthaltende Proteine aus iTR-Zellen isoliert werden (Tabelle 6). Siebenundzwanzig davon sind der Gruppe der KRAB-C2H2-Zinkfinger Proteine zuzuordnen, während zwei, das POGK und das ZNF862, keine C2H2-Zinkfinger besitzen und damit Sonderfälle darstellen.

Ein Vergleich der KRAB-Domänen der 29 identifizierten Proteine ergab, dass 14 der Proteine eine KRAB-AB-Domäne, 9 eine KRAB-A-Domäne und 6 eine KRAB-AC-Domäne besitzen. Auch hier stellt das ZNF862 eine Besonderheit dar, da es zwei KRAB-Domänen besitzt, eine verkürzte KRAB-A- und eine vollständige KRAB-AB-Domäne.

### **ZNF556 und ZNF331**

Anhand der Proteine ZNF556 und ZNF331 soll die analytische Vorgehensweise sowohl bei der massenspektrometrischen Datenerhebung als auch der bioinformatischen Datenbanksuche dargestellt werden. ZNF556 und ZNF331 wurden in Bande 22 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 25 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des ZNF556 beträgt 28 % und des ZNF331 beträgt 18 %. Eine Acetylierung des *N*-Terminus des ZNF556 ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich den Proteinen TRIM28 und ODB2 zuordnen (siehe Abbildung 26). In einer ersten Suche wurden die Proteine TRIM28 (TIF1B\_HUMAN) und die Lipoamidacyltransferase (ODB2\_HUMAN) identifiziert. Bereits in diesem Ergebnis erfolgte die Identifizierung des ZNF556, jedoch mit einem Score unterhalb der Signifikanzschwelle (Abbildung 26 A). Nach Entfernung der Signale für TRIM28 und ODB2 und erneuter Suche gegen die SWALL-Datenbank konnte ZNF556 mit hoher Signifikanz identifiziert werden (Abbildung 26 B). Eine weitere Suche gegen die SWALL-Datenbank lieferte keine weitere positive Identifizierung (Abbildung 26 C).

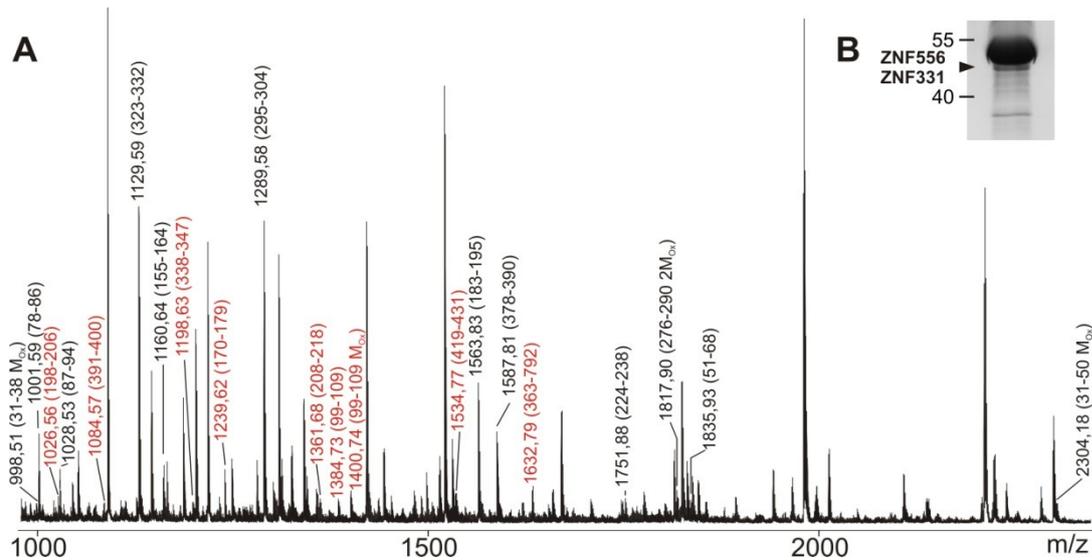


Abbildung 25: A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum der KRAB-ZNF-Proteine ZNF556 und ZNF331. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Schwarz: Signale des ZNF556; Rot: Signale des ZNF331. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an, Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF556 und ZNF331 ist gekennzeichnet.

Die Signale, die in die dritte Suche eingingen, wurden nun gegen die KRAB-Datenbank gesucht und ergaben die Identifizierung des KRAB-Zinkfingerproteins ZNF331 (Abbildung 26 D).

|          |   |
|----------|---|
| <b>A</b> | 2. Mixture 2 Total score: 310 Expect: 1.2e-26 Queries matched: 54<br>Components (only one family member shown for each component):<br><a href="#">TIF1A_HUMAN</a> Mass: 90261 Score: 125 Expect: 3.7e-08 Queries matched: 26<br>Transcription intermediary factor 1-beta OS=Homo sapiens GN=TRIM28 PE=1 SV=5<br><a href="#">CDB2_HUMAN</a> Mass: 53852 Score: 105 Expect: 3.7e-06 Queries matched: 21<br>Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase<br><a href="#">ZNF556_HUMAN</a> Mass: 53144 Score: 48 Expect: 2 Queries matched: 12<br>Zinc finger protein 556 OS=Homo sapiens GN=ZNF556 PE=2 SV=1 |
|          | <b>B</b>  |
| <b>C</b> | 1. <a href="#">ZNF556_HUMAN</a> Mass: 53144 Score: 80 Expect: 0.0011 Queries matched: 11<br>Zinc finger protein 556 OS=Homo sapiens GN=ZNF556 PE=2 SV=1<br>2. <a href="#">MYH4_HUMAN</a> Mass: 223902 Score: 61 Expect: 0.1 Queries matched: 17<br>Myosin-4 OS=Homo sapiens GN=MYH4 PE=1 SV=2<br><a href="#">B6RJH6_HUMAN</a> Mass: 7874 Score: 49 Expect: 1.5 Queries matched: 4<br>Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=PTCD2 PE=4 SV=1   |
|          | <b>D</b>  |
|          | 1. <a href="#">ZNF331</a> Mass: 55358 Score: 62 Expect: 0.00029 Queries matched: 9<br>NM_018555 NP_061025 (Ax2)<br><a href="#">ZNF667</a> Mass: 72225 Score: 16 Expect: 11 Queries matched: 4<br>NM_022103 NP_071386 (ABx2)<br><a href="#">ZNF320</a> Mass: 61113 Score: 13 Expect: 20 Queries matched: 3<br>XM_001131514 XM_001718247 XM_001718808 XP_001131514 XP_001718299 XP_001718860 (Ax2)<br><a href="#">ZSCAN1</a> Mass: 45771 Score: 12 Expect: 31 Queries matched: 2<br>NM_182572 NP_872578 (Sx2)   |

Abbildung 26: Ergebnisse der sequentiellen Identifizierung von KRAB-Zinkfinger-Proteinen. A, B, C: Ergebnisse der ersten, zweiten und dritten Suche gegen die SWALL-Datenbank. D: Ergebnis der Suche gegen die KRAB-Datenbank.

Zur Validierung der Identifizierungen wurden MS/MS-Experimente durchgeführt. Dazu wurde das zum ZNF556 gehörende Signal bei  $m/z$  1563,7 (183-195) und das zum ZNF331 gehörende Signal bei  $m/z$  1632,7 (363-375) ausgewählt und im Axima-QIT-ToF-MS<sup>n</sup> Massenspektrometer fragmentiert (Abbildung 28).

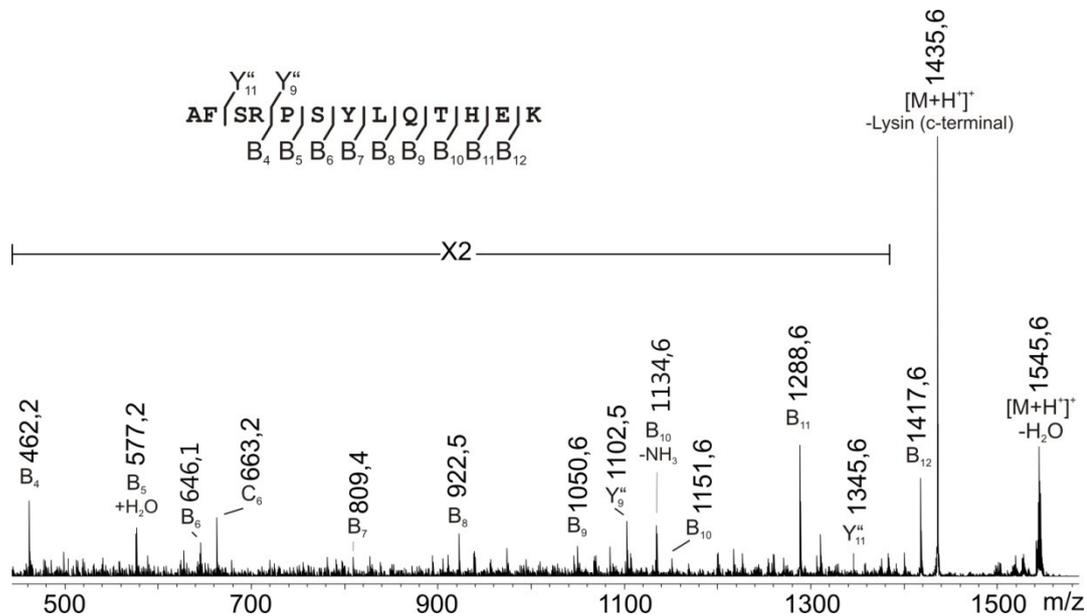


Abbildung 27: MS/MS Spektrum des Peptids AFSRPSYLQTHEK des ZNF556. Precursor-Ionensignal:  $m/z$  1563,7 (183-195); B- und Y'-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y'-Ionenserie über dem Spektrum angegeben.

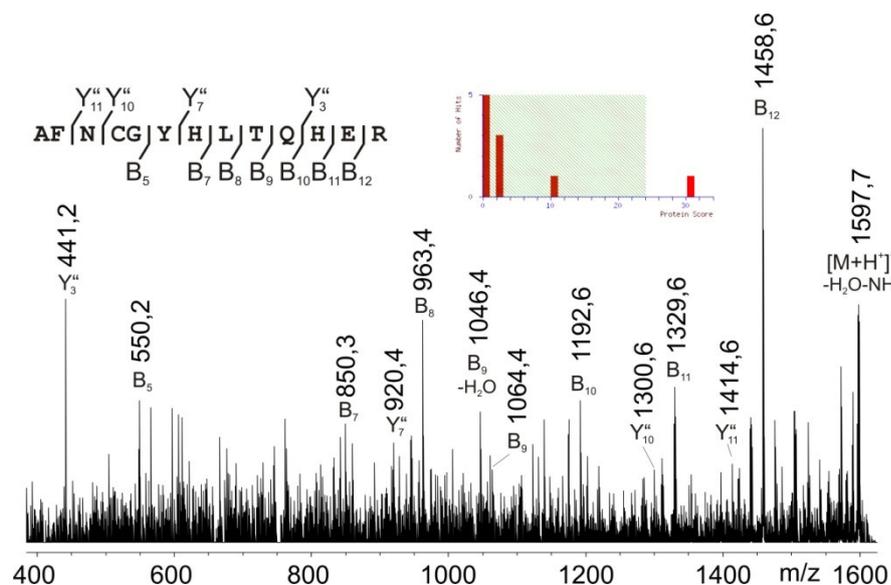


Abbildung 28: MS/MS Spektrum des Peptids AFNCGYHLTQHER des ZNF331. Precursorsignal:  $m/z$  1632,7 (363-375); B- und Y'-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y'-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. Rechts: Mowse-Score des Ergebnisses der Mascot-Suche mit der aus diesem Spektrum resultierenden Signalliste.

Die MS/MS-Spektren (Abbildung 27 und 28) zeigen eine Vielzahl an Signalen, die alle den vermuteten Sequenzen zugeordnet werden konnten. Die am rechten Rand der Abbildung 28 gezeigte Grafik illustriert die Signifikanz der Identifizierung. Der Score von 30 zur Identifizierung des ZNF331 wurde durch die Mascot-Suche unter ausschließlicher Verwendung der automatisch generierten Massenliste des hier dargestellten MS/MS-Spektrums erhalten. Die mindere Qualität des Spektrums in Abbildung 28 ergibt sich aus der niedrigen Konzentration des Proteins sowie der Entstehung einer Vielzahl an internen Fragmenten sowie mehrfachem Verlust an Wasser und Ammoniak während des Fragmentierungsprozesses.

Ergebnis der BLAST-Suche des Peptids AFSRPSYLQTHEK des ZNF556:

1. Treffer: GENE ID: 80032 ZNF556 | zinc finger protein 556 [Homo sapiens]

|                                |               |
|--------------------------------|---------------|
| Gesuchte Aminosäuresequenz:    | AFSRPSYLQTHEK |
| Übereinstimmung                | AFSRPSYLQTHEK |
| Zugeordnete Aminosäuresequenz: | AFSRPSYLQTHEK |

Score = 45,2 bits (99), Expect = 2e-5; Identities = 13/13 (100 %),  
Positives = 13/13 (100 %), Gaps = 0/13 (0 %)

2. Treffer: GENE ID: 51710 ZNF44 | zinc finger protein 44 [Homo sapiens]

|                                |              |
|--------------------------------|--------------|
| Gesuchte Aminosäuresequenz:    | AFSRPSYLQTHE |
| Übereinstimmung                | AFSR SYL THE |
| Zugeordnete Aminosäuresequenz: | AFSRFSYLKTHE |

Score = 29,9 bits (63), Expect = 0,82; Identities = 10/12 (83 %),  
Positives = 10/12 (83 %), Gaps = 0/12 (0 %)

Die BLAST-Suche ergibt als ersten Hit das gesuchte Protein, dem die vollständige Sequenz des Peptids zugeordnet wurde. Als zweiten Treffer erhält man eine Sequenz, die weder vollständig zugeordnet wurde, noch in der Masse des entsprechenden Peptid-Ions mit dem ursprünglichen übereinstimmt. Damit ist ausgeschlossen, dass das sequenzierte Peptid des ZNF556 aus anderen Proteinen erhalten werden kann. Es handelt sich somit um eine "proteotypische" Sequenz bzw. ein "proteotypisches" Peptid und bestätigt damit die korrekte Identifizierung.

Ergebnis der BLAST-Suche des Peptids AFNCGYHLTQHER des ZNF331:

1. Treffer: GENE ID: 55422 ZNF331 | zinc finger protein 331 [Homo sapiens]

|                                |               |
|--------------------------------|---------------|
| Gesuchte Aminosäuresequenz:    | AFNCGYHLTQHER |
| Übereinstimmung                | AFNCGYHLTQHER |
| Zugeordnete Aminosäuresequenz: | AFNCGYHLTQHER |

Score = 47,7 bits (105), Expect = 4e-6; Identities = 13/13 (100 %),  
Positives = 13/13 (100 %), Gaps = 0/13 (0 %)

2. Treffer: GENE ID: 284349 ZNF283 | zinc finger protein 283 [Homo sapiens]

|                                |              |
|--------------------------------|--------------|
| Gesuchte Aminosäuresequenz:    | AFNCGYHLTQHE |
| Übereinstimmung                | AF GYHLTQH+  |
| Zugeordnete Aminosäuresequenz: | AFSRGYHLTQHQ |

Score = 30,3 bits (64), Expect = 0,61; Identities = 9/12 (75 %),  
Positives = 10/12 (83 %), Gaps = 0/12 (0 %)

Das Ergebnis der BLAST-Suche schließt aus, dass das sequenzierte Peptid des ZNF331 in anderen Proteinen vorkommt und bestätigt damit die korrekte Identifizierung.

### **3.3.2 Nicht-klassische KRAB-Zinkfingerproteine**

#### **ZNF862**

Neben den 27 KRAB-C2H2-Zinkfingerproteinen wurde mit ZNF862 ein KRAB-Zinkfingerprotein identifiziert, das statt der C2H2-Zinkfingerdomänen zwei TTF-Zinkfinger enthält. Somit stellt es ein nicht klassisches KRAB-Zinkfingerprotein dar. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Identifizierung erfolgte nach Suche gegen die KRAB-Datenbank. Die sich ergebende Sequenzabdeckung beträgt 19,8 %. Das Signal m/z 975,43 weist auf eine N-terminale Acetylierung hin. Weitere in der Bande identifizierte Proteine sind Myosin-9 und ZNF41 (siehe Anhang Tabelle 11 und 6.3.1). ZNF862 besitzt zwei nicht-klassische Zinkfingerdomänen, bekannt als ZnF\_TTF. Diese werden üblicherweise in Verbindung mit Transposasedomänen (SMART database entry

SM00597) gefunden. Tatsächlich weist ZNF862 an seinem C-Terminus eine „Ribonuclease H-like domain“ (InterPro IPR012337) auf, dessen Topologie der aktiven Tasche von DNA-Transposasen ähnelt.

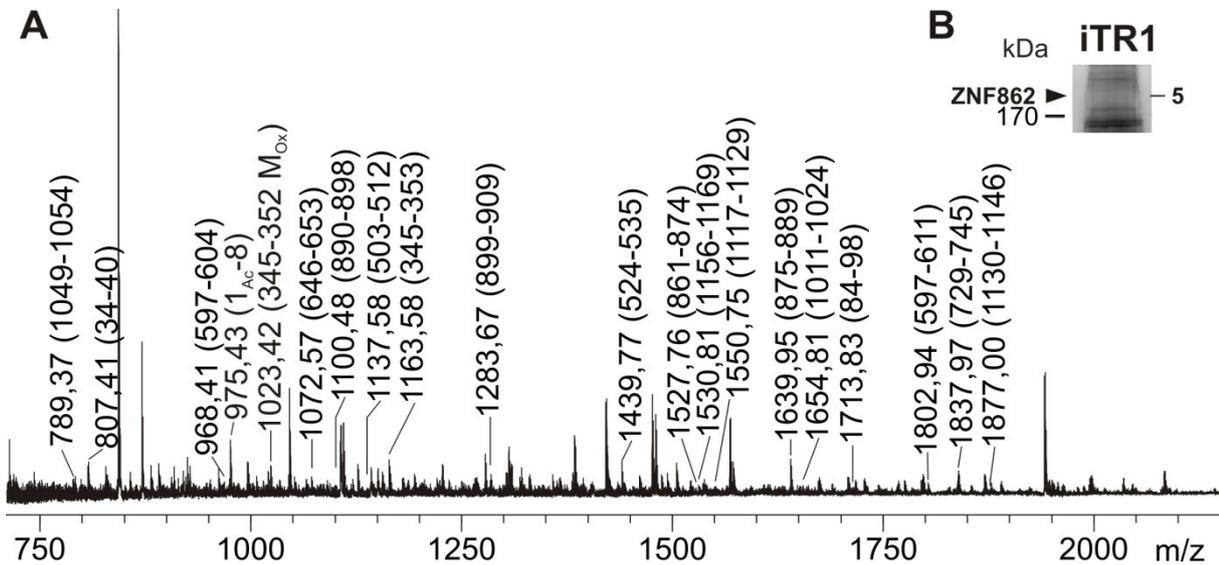
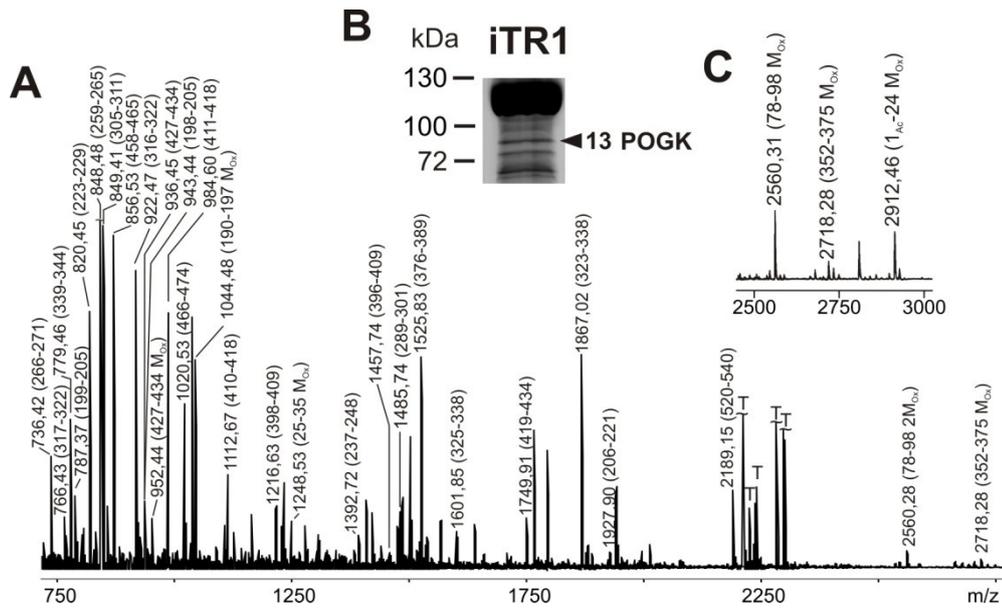


Abbildung 29 A: Massenspektrum der Bande, die das ZNF862 enthält. Zum ZNF862 gehörende Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich von ZNF862 an. Matrix: DHB, B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF862 ist gekennzeichnet.

### 3.3.3 POGK

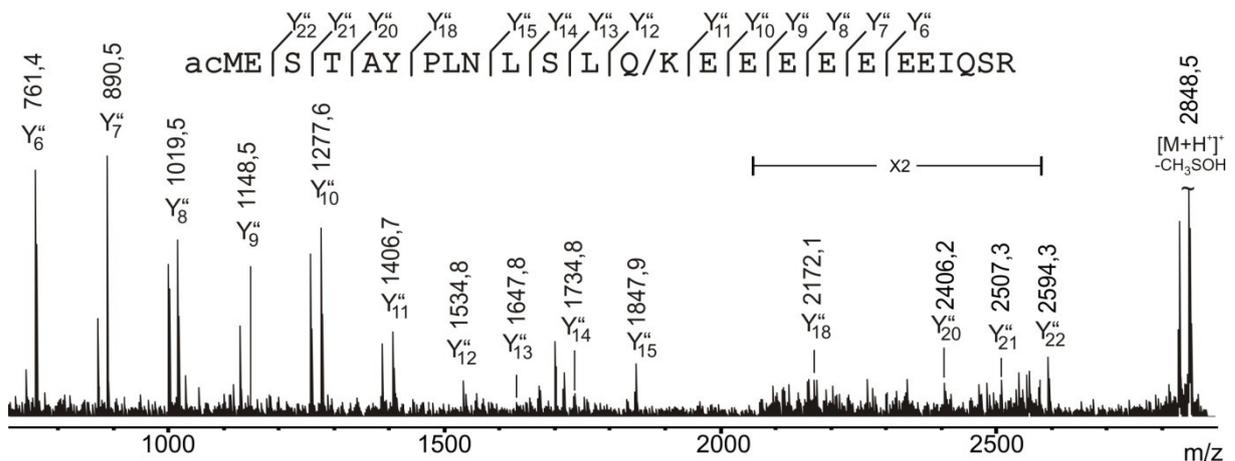
Das zweite nicht-klassische KRAB-Domäne-enthaltende Protein ist das POGK. Dieses Protein weist keinerlei Zinkfingerstrukturen auf, besitzt allerdings ein Helix-Schleife-Helix-Motiv zur DNA-Bindung und eine DDE-Transposase Domäne (Interpro IPR004875). Diese ist ebenfalls topologisch verwandt mit der bereits bei dem ZNF862 erwähnten Ribonuclease H-like Domäne.

In Abbildung 30 ist das aus Bande 13 der Abbildung 24 B erhaltene Massenspektrum zusammen mit einem Ausschnitt des dazugehörigen SDS-Polyacrylamid-Gels aus Abbildung 24 dargestellt. Die Bande, in der das POGK identifiziert wurde, ist extra gekennzeichnet. Die Sequenzabdeckung, die sich aus den dem POGK zugeordneten Signalen des Spektrums ergibt, beträgt 49 %. Weitere in der Bande identifizierte Proteine sind TRIM28, ZNF7 (siehe Anhang Tabelle 13, Tabelle 14 und 6.3.6) und ZNF769/RBAK (siehe Anhang Tabelle 13, Tabelle 14 und 6.3.5). Die zwei letztgenannten sind ebenfalls KRAB-Zinkfingerproteine.



**Abbildung 30 A:** Massenspektrum der Bande die das POGK enthält. Zum POGK gehörende Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich von POGK an. **C:** Ausschnitt aus einem anderen Spektrum des POGK. Zu erkennen ist ein weiteres Peptid bei  $m/z$  2912,46. Matrix: DHB **B:** Ausschnitt des Gels. Die Bande, die das POGK enthält, ist gekennzeichnet. T-Trypsinsignale, Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

Ein Signal bei  $m/z$  2912,5 kann der Sequenz 1-24 von POGK zugeordnet werden, wenn man es als *N*-terminal acetyliert und am Methionin oxidiert annimmt. In dem Fall stellt es den *N*-Terminus des POGK dar.



**Abbildung 31:** MS/MS-Spektrum des oxidierten und *N*-terminal acetylierten Peptids acMoxESTAYPLNLSLKEEEEEEEIQSR des POGK bei  $m/z$  2912 (1-24).  $Y'$ -Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen  $Y'$ -Ionenserie über dem Spektrum angegeben.  $-CH_3SOH$  bedeutet den Neutralverlust der Methansulfensäure (Lagerwerf, vandeWeert et al. 1996) aus dem oxidierten Methionin. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden der zur besseren Übersicht verkleinert.

Um die Annahme bezüglich der veränderten Peptidzusammensetzung und somit der Zuordnung des Signals bei  $m/z$  2912,5 zu überprüfen, wurde dieses für die massenspektrometrische Fragmentierung ausgewählt. In Abbildung 31 ist das erhaltene Spektrum dargestellt. Die daraus ersichtliche Sequenz bestätigt die aufgestellte Hypothese und klärt zudem die *N*-terminale Acetylierung als post-translationale Modifikation des POGK Proteins auf. Ein weiteres Peptid bei  $m/z$  1112,7 (410-418) wurde ebenfalls sequenziert (Abb. 26 A).

Ergebnis der BLAST-Suche gegen die NCBI Datenbank:

1. Treffer: GENE ID: 57645 POGK | pogo transposable element with KRAB domain [Homo sapiens]

|                                |                        |
|--------------------------------|------------------------|
| Gesuchte Aminosäuresequenz:    | MESTAYPLNLSLKEEEEEEIQR |
| Übereinstimmung                | MESTAYPLNLSLKEEEEEEIQR |
| Zugeordnete Aminosäuresequenz: | MESTAYPLNLSLKEEEEEEIQR |

Score = 81,2 bits (184), Expect = 5e-21, Identities = 24/24 (100 %)  
Positives = 24/24 (100 %), Gaps = 0/24 (0 %)

2. Treffer: hypothetical protein [Homo sapiens]

|                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| Gesuchte Aminosäuresequenz:    | LSLKEEEEEE--EIQ |
| Übereinstimmung                | LSL EE+EEE EIQ  |
| Zugeordnete Aminosäuresequenz: | LSLMEEDEEELEIQ  |

Score = 34,1 bits (73), Expect = 2e-04, Identities = 11/15 (73 %),  
Positives = 12/15 (80 %), Gaps = 2/15 (13 %)

Auch im Fall des POGK schließt das Ergebnis der BLAST-Suche aus, dass das sequenzierte Peptid in anderen Proteinen vorkommt und bestätigt damit die korrekte Identifizierung.

Zur Validierung der massenspektrometrischen Identifizierung wurde, wie oben angesprochen im Fall des POGK, eine Western Blot Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 32 B). Im Western Blot erkennt man in den Spuren A (Kontrolle) und B (Gesamtzellextrakt vor der Affinitätschromatographie) kaum eine Färbung. In der Elution der Affinitätschromatographie (Spur C) dagegen ist die Immunfärbung deutlich zu erkennen. Damit erfolgte die Bestätigung der chromatographischen Anreicherung und Identifizierung des POGK ebenfalls mit Hilfe der Immunfärbung und stützt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung.

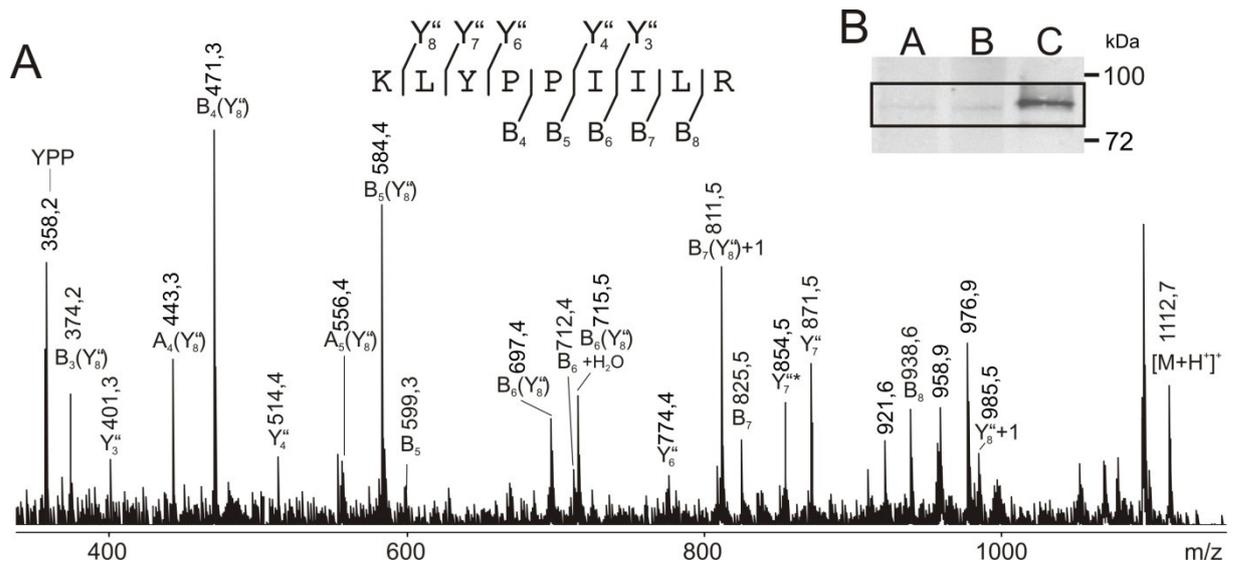


Abbildung 32 A: MS/MS Spektrum des Peptids KLYPPIILR des POGK bei m/z 1112,7 (410-418). B- und Y"- Fragment-Ionensignale sowie Signale interner Fragmente wurden bezeichnet. Signale, deren Bezeichnungen (Y"8) enthalten, entsprechen den Fragment-Ionen des Y"8-Fragmentes. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen Y"- und B-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. Intensive unbezeichnete Signale sind auf den Verlust von Wasser oder Ammoniak zurückzuführen. B: Western Blot mit Immunfärbung des POGK. Spur A: HR5-Zellextrakt ohne Affinitätschromatographie, Spur B: iTR-Zellextrakt vor der Affinitätschromatographie, Spur C: iTR-Zellextrakt nach Elution von der StrepTactinsäule. Zu erkennen ist eine Anreicherung des POGK im Eluat im Vergleich zu den Kontrollspuren.

### 3.3.4 Untersuchungen zu anderen TRIM28 – bindenden Proteinen

#### CBX3/HP1 $\gamma$

Das TRIM28 interagierende Protein CBX3/HP1 $\gamma$  wurde ebenfalls angereichert. Die Interaktion mit TRIM28 findet C-terminal von der RBCC-Domäne in einem Bereich statt, der nicht im RBCC-Konstrukt vorhanden ist. Die zugehörigen Daten zum Nachweis dieses Proteins sind nachfolgend in Abbildung 33 und Abbildung 34 dargestellt. In Abbildung 33 ist das aus Bande 35 der Abbildung 24 B erhaltene Massenspektrum zusammen mit einem Ausschnitt des dazugehörigen SDS-Polyacrylamid-Gels aus Abbildung 24 dargestellt. Die Sequenzabdeckung, die sich aus den dem CBX3/HP1 $\gamma$  zugeordneten Signalen des Spektrums ergibt, beträgt 44 %. Weitere in der Bande identifizierte Proteine sind FRIH, auf das im Weiteren

gesondert eingegangen wird. In Abbildung 34 ist das MS/MS-Spektrum des Peptids CPQIVIAFYEER mit  $m/z=1524,8$  Da (160-171) dargestellt.

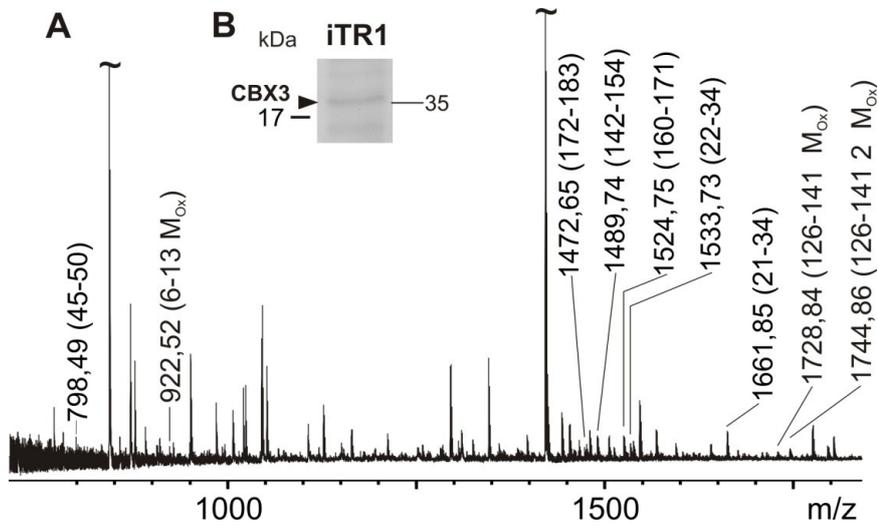


Abbildung 33: Massenspektrum der Bande, die das CBX3/HP1 $\gamma$  enthält. Zum CBX3/HP1 $\gamma$  gehörende Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich von CBX3/HP1 $\gamma$  an. Matrix: DHB B: Ausschnitt des Gels. Die Bande, die das CBX3/HP1 $\gamma$  enthält, ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

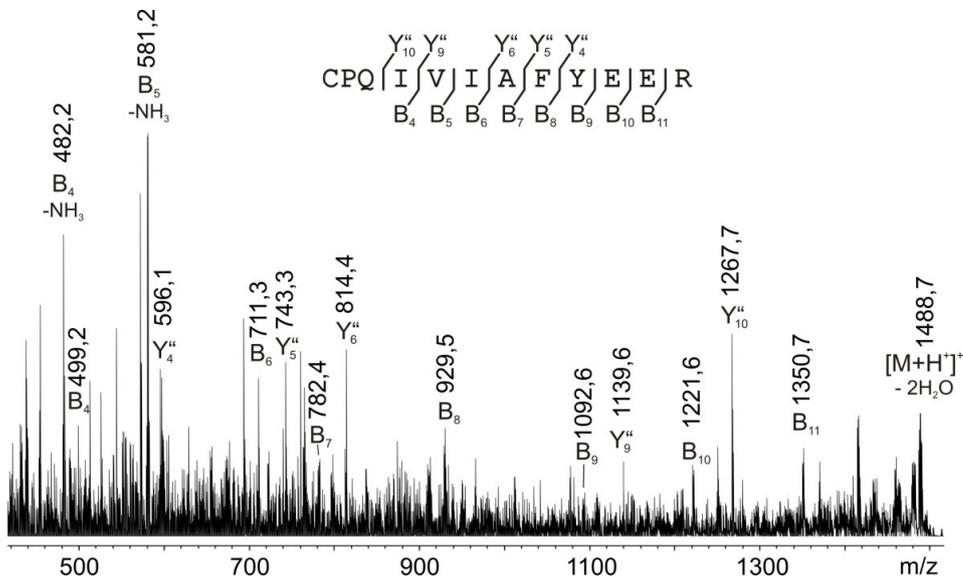
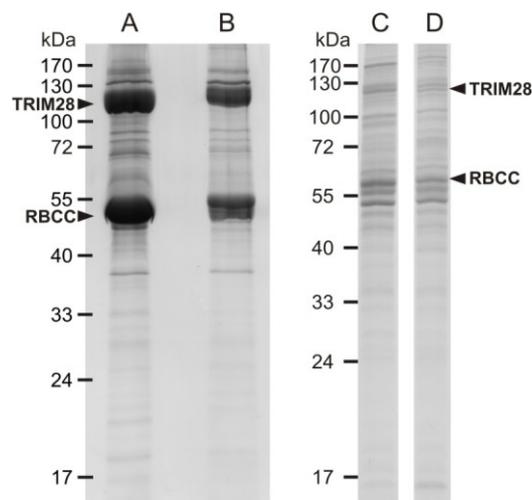


Abbildung 34: MS/MS-Spektrum des Peptids CPQIVIAFYEER des CBX3/HP1 $\gamma$  bei  $m/z 1524,8$  (160-171). B- und Y'- Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y'-Ionenserie über dem Spektrum angegeben.

## Untersuchung zur Sumoylierung des TRIM28

Im Abschnitt 1.1.2 wurde dargelegt, dass die Sumoylierung des TRIM28 nötig ist, um die Interaktion des TRIM28 mit einer Reihe weiterer Proteine wie SETDB1 und CHD3 zu ermöglichen. Um eine Desumoylierung während der Extraktion bzw. der Affinitätschromatographie zu verhindern und dadurch die Isolierung dieser Proteine zu ermöglichen, wurden Experimente unter Zugabe von *N*-Ethylmaleimid (NEM), einem Desumoylase-Inhibitor, durchgeführt (siehe 2.1 und 2.5.2).



**Abbildung 35: SDS-PAGE Analyse der Proteinextrakte.** Spur A: ohne Doxorubicin, ohne NEM, 55 mg auf der Säule. Spur B: mit NEM während Extraktion und Affinitätschromatographie, 45 mg auf der Säule. Spur C und D: Doxorubicin während der Zellzucht, mit NEM während Extraktion und Affinitätschromatographie. Je 60 mg auf der Säule. Die Banden des TRIM28 und RBCC-Konstruktes sind gekennzeichnet.

Doxorubicin dagegen wurde im Zusammenhang mit TRIM28 als Reagenz beschrieben, welches die Sumoylierung des TRIM28 herunter reguliert (Lee, Thomas et al. 2007). Gleichzeitig führt es zu Aktivierung der ATM-Proteinkinase, in Folge dessen TRIM28 am Serin 824 phosphoryliert wird. Um diese Phosphorylierung nachweisen zu können, wurden ebenfalls Experimente unter Verwendung der genannten Reagenzien durchgeführt (siehe 2.1) (Abbildung 35).

Im Vergleich der Spuren A und B ist festzustellen, dass die TRIM28- und RBCC-Konstrukt-Banden in der Spur B schwächer gefärbt sind. Die KRAB-Zinkfinger-Proteine sind in beiden Spuren zu finden. Trotz des Zusatzes von NEM zum TST-Puffer während der Proteinextraktion sowie während der Affinitätschromatographie

konnten weder ein Sumo-Protein noch die Proteine SETDB1 oder ein zu den Histondeacetylase-Komplexen gehörendes Protein nachgewiesen werden.

In den Spuren C und D wurde dem Medium während der Zellzucht Doxorubicin zugesetzt. Die Extraktion und Chromatographie erfolgte wie im Fall der Spur B unter Verwendung des TST-Puffers inklusive NEM. Die massenspektrometrische Auswertung zeigte das Vorhandensein des TRIM28 und des RBCC-Konstruktes an. Im Vergleich zur Spur A sind in den Spuren C und D die Banden dieser beiden Proteine jedoch viel schwächer gefärbt und auch viel schmaler. Auch hier konnten weder Sumo noch SETDB1 oder HDAC-Komplex-Proteine nachgewiesen werden. Ebenfalls nicht möglich war die Identifikation von KRAB-Zinkfinger-Proteinen.

## Ferritin

Die Identifizierung des Ferritins erfolgte wiederholt in den iTR-Extrakten, aber nicht in den Kontrollen. Hutchins et al. gelang ebenfalls die Anreicherung des FRIH-Proteins unter Verwendung von TRIM28 als Köder (Hutchins, Toyoda et al. 2010) (<http://www.ebi.ac.uk/intact> (Kerrien, Aranda et al. 2012) ). In Abbildung 36 ist das MS-Spektrum mit den FRIH-zugeordneten Signalen dargestellt. Aus dem Spektrum lässt sich eine Sequenzabdeckung von 56 % ablesen.

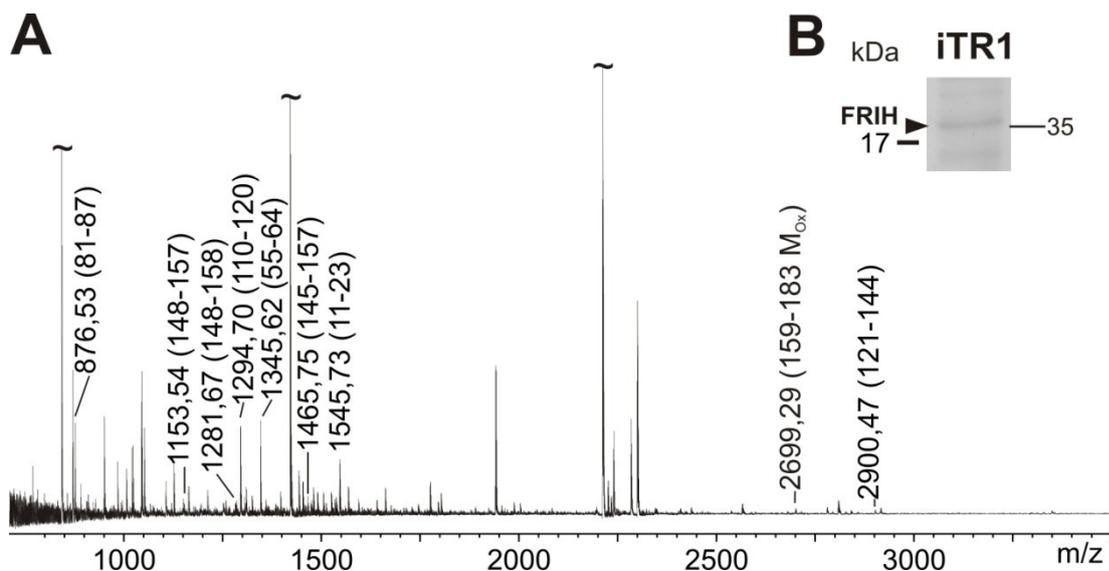
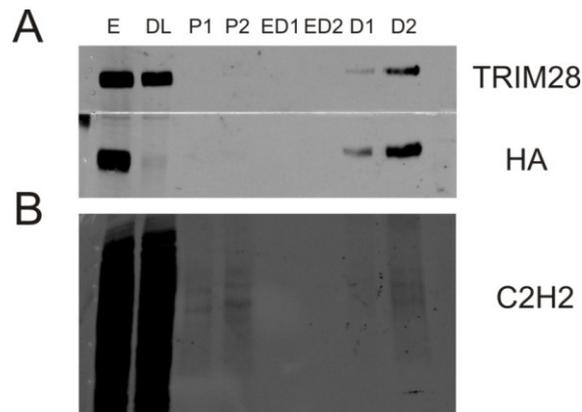


Abbildung 36 A: Massenspektrum der Bande, die das FRIH enthält. Zum FRIH gehörende Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich von FRIH an. Matrix: DHB, B: Ausschnitt des Gels. Die Bande die das FRIH enthält, ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

Ferritin dient vor allem in der Eisen-Homöostase als Speicherprotein für Eisen sowie als Eisenlieferant (Harrison und Arosio 1996). Allerdings wurden auch Hinweise zur Beteiligung an der Regulation der Proteinexpression gefunden (Harrison und Arosio 1996). So zeigten Wu et al. die Hochregulation von an Globin-Promoter fusionierten Reportergen nach Co-Transfektion mit Ferritin-cDNA (Wu und Noguchi 1991). Ob Ferritin tatsächlich eine Rolle in der TRIM28-vermittelten Genregulation spielt, wird in zukünftigen Studien genauer untersucht werden müssen.

### **3.3.5 Chemische Charakterisierung der TRIM28-TRIM28- und der TRIM28-KRAB-Interaktion**

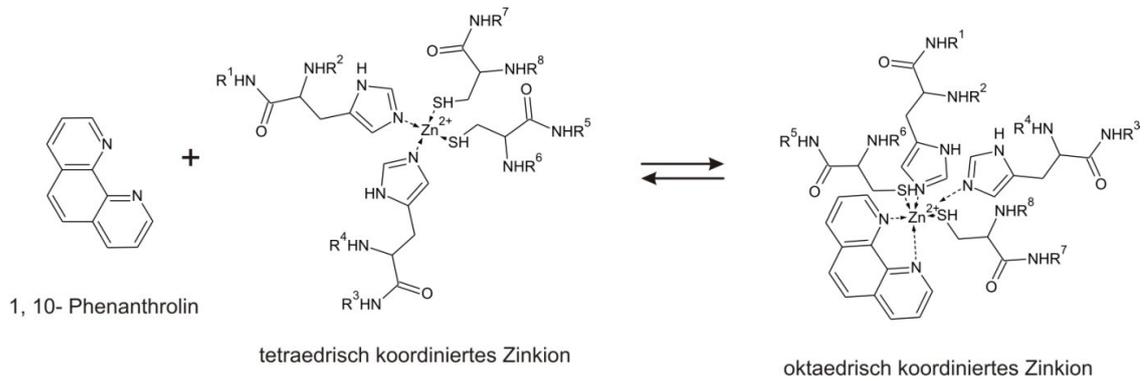
Um zu testen, ob die TRIM28-TRIM28-Interaktion allein über die Coiled-coil Domäne und die TRIM28-KRAB-Interaktion über die zinkbindenden RING-Finger und/oder B-Box-Domänen des RBCC-Parts und damit getrennt voneinander vermittelt werden, wurden dem Elutionspuffer während der Affinitätschromatographie unterschiedliche Additive zugesetzt. So wurde das Desthiobiotin gegen Phenanthrolin bzw. EDTA ausgetauscht. Beide letztgenannten Reagenzien sind in der Lage, freies Zink zu komplexieren und damit möglicherweise die RING-Finger- und/oder die B-Box-Strukturen von TRIM28 zu zerstören, indem das dort gebundene Zink herausgelöst wird. Die Ergebnisse der Elutionen sind exemplarisch in Abbildung 37 dargestellt. Die Immunfärbung der Western Blots erfolgte mit einem Antikörper, der gegen die C2H2-Zinkfinger-Domänen des ZNF544 gerichtet ist. Dieser erwies sich geeignet, viele der Zinkfingerdomänen unterschiedlicher Zinkfingerproteine zu erkennen, sodass er als „quasi-ZNF-Antikörper“ eingesetzt werden konnte. Der Western Blot zeigt in der aufzutragenden Lösung (E) sowohl das Vorhandensein des RBCC-Konstrukts als auch das von TRIM28. Ebenfalls ist eine starke Färbung gegen eine Vielzahl nicht aufgetrennter Zinkfinger-Proteine in Abbildung 37 B zu erkennen. Diese führen zu einer fast vollständigen Schwärzung der Spuren E und DL. Die Färbung des RBCC-Konstruktes im Durchlauf ist kaum noch zu erkennen, da es nahezu vollständig auf der Säule verbleibt. Im Gegensatz dazu sind sowohl für das TRIM28 als auch für die Zinkfinger-Proteine weiterhin starke Färbungen zu erkennen.



**Abbildung 37 A:** Western Blot der unterschiedlichen Elutionen. E- aufzutragender Zellextrakt, DL- Durchlauf, P1, P2- zwei aufeinanderfolgende Elutionsfraktionen mit Phenanthrolin; ED1, ED2- zwei aufeinanderfolgende Elutionsfraktionen mit EDTA; D1, D2- zwei aufeinanderfolgende Elutionsfraktionen mit Desthiobiotin. Die Immunfärbung geschah im oberen Teil mit einem Antikörper gegen TRIM28, im unteren Teil gegen den HA-Tag des RBCC-Konstruktes. **B:** Western Blot der gleichen unter A genannten Fraktionen. Gefärbt wurde diese Membran mit dem Antikörper gegen ZNF544.

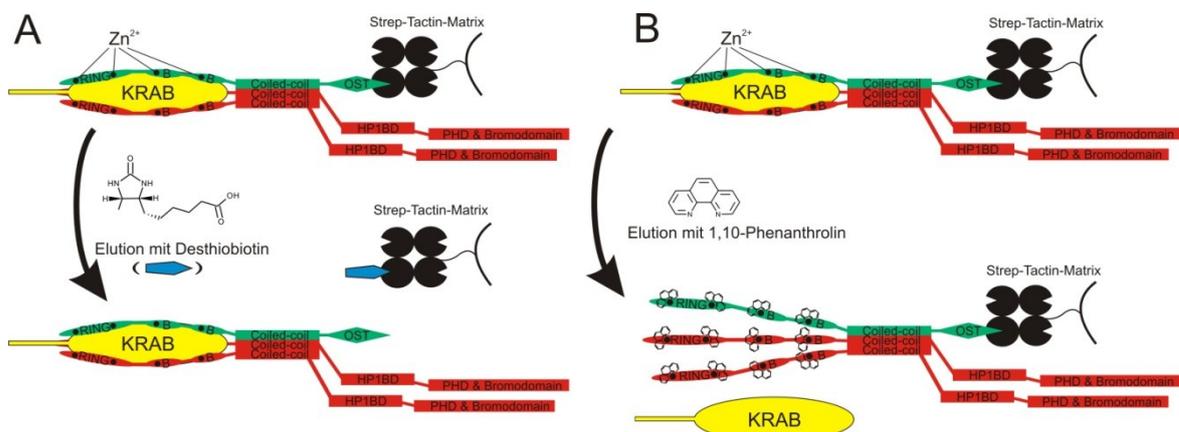
Ein Vorhandensein weiterer TRIM28-KRAB-Proteinkomplexe ist deshalb sehr wahrscheinlich. Allerdings werden in den Spuren E und DL auch Zinkfingerproteine angefärbt, die keine KRAB-Domäne besitzen. Durch die Verwendung von 1,10-Phenanthrolin (P1, P2), aber nicht durch die Verwendung von EDTA (ED1, ED2) im Elutionspuffer, wurden Zinkfinger-Proteine spezifisch eluiert. Dagegen blieb eine gleichzeitige Elution des TRIM28 als auch des RBCC-Konstruktes aus. Sowohl Zinkfingerproteine als auch TRIM28 und das RBCC-Konstrukt werden allein durch Desthiobiotin gemeinsam eluiert.

EDTA-gebundenes  $Zn^{2+}$  weist eine Dissoziationskonstante von  $k_d=10^{-16}$  mol/l auf (Nyborg und Peersen 2004). Trotz dieser starken Bindung wurden weder Zinkfingerproteine noch TRIM28 bzw. RBCC-Konstrukt von der Säule eluiert. Offensichtlich führt der Zusatz von EDTA nicht zum Lösen des in den Zinkfinger-Motiven gebundenen Zinks. In der Untersuchung von Vallee et al. wurde die Dissoziationskonstante des Phenanthrolin-LADH-Zink-Komplexes mit  $k_d=3,3 \cdot 10^{-5}$  mol/l bestimmt (Vallee und Coombs 1959). Diese ist damit ein schwächerer Bindungspartner als EDTA und führt trotzdem zu einer Elution der Zinkfingerproteine. Ein Mechanismus, ähnlich dem von Vallee et al. gezeigten, spielt wahrscheinlich auch in diesem Fall eine Rolle. Phenanthrolin ist in der Lage, in den hydrophoben Bereich zu gelangen, in der die KRAB-Domäne gebunden wird (Peng, Gibson et al. 2007).



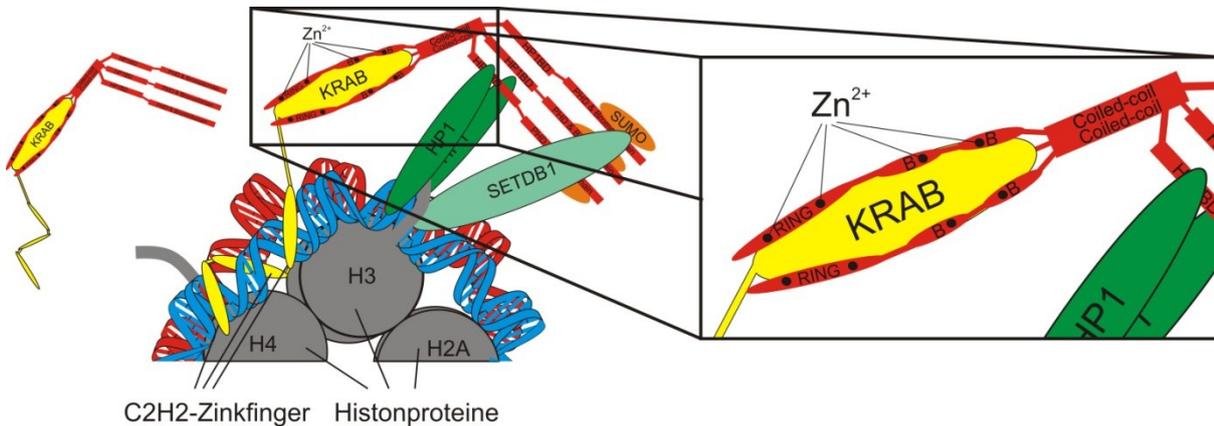
**Abbildung 38: Prinzip der Zerstörung der Zink-bindenden Proteinstrukturen.** Das Phenanthrolin bindet an das tetraedrisch konfigurierte Zinkion. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer oktaedrischen Konfiguration. Die dreidimensionale Struktur der Proteindomäne wird derart verändert, dass die Funktionsfähigkeit verloren geht. R<sup>1</sup>-R<sup>8</sup> stehen für Peptidylreste.

Je ein Phenanthrolin-Molekül bindet an ein Zink-Ion des RING-Fingers bzw. der B-Boxen. Dadurch wechseln diese von der tetraedrischen in die oktaedrische Konfiguration (siehe Abbildung 38) (Vallee und Coombs 1959). Die dreidimensionale Struktur der Zink-bindenden Domänen wird in dem Maße gestört, dass die Interaktion zum KRAB-Protein aufgehoben und eine Elution des KRAB-Proteins somit möglich wird. Dabei bleibt die Interaktion zwischen den coiled-coil-Domänen erhalten und eine Elution des TRIM28 tritt nicht auf. Dass die Proteine unter Zusatz von EDTA statt 1,10-Phenanthrolin nicht eluiert werden konnten, zeigt eine Hinderung der EDTA-Moleküle, die sterischer, aber auch polarer Natur sein kann. Abbildung 39 illustriert die unterschiedlichen Elutionsprinzipien.



**Abbildung 39: Graphische Darstellung der Elutionsprinzipien.** A: Elution mit Desthiobiotin; B: Elution mit 1,10-Phenanthrolin; Gelb: KRAB-Domäne- stellvertretend für die KRAB-Domäne-enthaltenden Proteine. Rot: TRIM28; Grün: RBCC-Konstrukt, Blau: Desthiobiotin, Schwarz ausgefüllte Kreise: Zn<sup>2+</sup>-Ionen; Schwarze Kreise mit weißen Winkeln: StrepTactin-Matrix der Säule

Die Vorstellung, nach der die RBCC-Domänen vorwiegend über ihre coiled-coil-Domänen interagieren, während der RING Finger und die B-Boxen zur Interaktion mit den KRAB-Proteinen genutzt werden (siehe Abbildung 40), konnte durch Elution von KRAB-Domäne enthaltenden Proteinen mit Hilfe von Phenanthrolin gestützt werden.

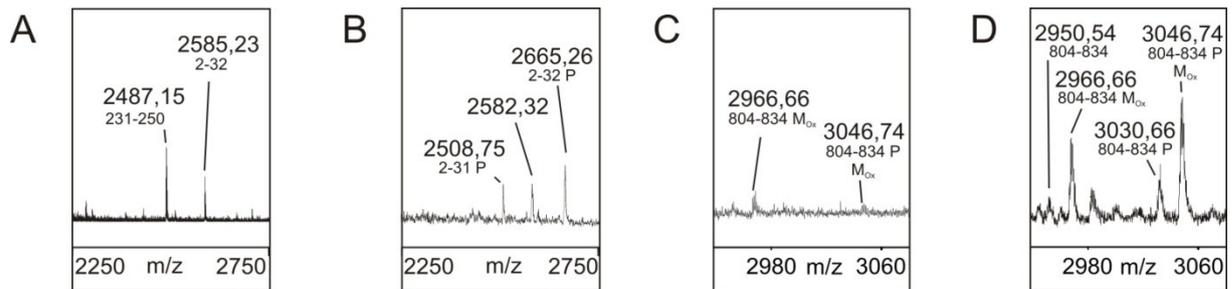


**Abbildung 40: Schema der TRIM28-KRAB-Komplexe.** Links: Ein freies TRIM28-Trimer mit über die KRAB-Domäne gebundenem Protein (gelb), rechts daneben: Ausschnitt eines Histons (Histonproteine in grau, mit darum gewundener DNA in blauer vorderer DNA-Windung des Nukleosoms und roter hinterer DNA-Windung des Nukleosoms mit gebundenem TRIM28-KRAB-Komplex. Vergrößerung zeigt die wahrscheinliche lokale Separation der TRIM28-Trimerisierungsstelle und der KRAB-Bindungsdomäne. Grün: HP1-Dimer, Hellgrün: SETDB1

### 3.4 Phosphopeptidanreicherungen

#### 3.4.1 Phosphopeptidanalyse mit Standardmethoden

Zur Aufklärung posttranslationaler Modifikationen, insbesondere von Phosphorylierungen am TRIM28 (siehe 3.2.2), wurden folgende Ansätze angewendet (siehe 2.16). TRIM28 aus dem in Abbildung 24 B, Kapitel 3.3, dargestellten Gel wurde zuerst mit der Methode nach Thingholm (Thingholm, Jorgensen et al. 2006) bearbeitet. Die verwendeten Säulen wurden selbst angefertigt. Desweiteren wurden kommerziell erhältliche  $\text{TiO}_2$ -Säulen (NuTips) verwendet. Außerdem wurde immunpräzipitiertes TRIM28 zur Phosphopeptidanreicherung eingesetzt (Abbildung 41 C, D).



**Abbildung 41** A: Massenbereich 2250-2750 des tryptisch verdauten TRIM28 vor der Phosphopeptidanreicherung. B: nach der Phosphopeptidanreicherung. C: Massenbereich 2900-3100 des tryptisch verdauten immunpräzipitierten TRIM28 vor der Phosphopeptidanreicherung. D: nach der Phosphopeptidanreicherung (Thingholm, Jorgensen et al. 2006). Matrix: DHB

In Abbildung 41 sind Ausschnitte aus Spektren vor und nach der Phosphopeptidanreicherung von tryptischen Peptiden des TRIM28 gezeigt. In A und B erkennt man die Signale der Peptide des N-Terminus des TRIM28 (A:  $m/z=2585,23$  Da (1-31); B:  $m/z=2665,22$  Da (1-31 P),  $m/z=2508,75$  Da (1-30 P), in C und D die Signale der Peptide des C-Terminus (C:  $m/z=2966,66$  Da (805-835  $M_{Ox}$ ),  $m/z=3046,74$  Da (805-835 P,  $M_{Ox}$ ); D:  $m/z=2950,54$  Da (805-835),  $m/z=2966,66$  Da (805-835  $M_{Ox}$ ),  $m/z=3030,66$  Da (805-835 P),  $m/z=3046,74$  Da (805-835 P,  $M_{Ox}$ ). Um die genaue Lage der Phosphorylierung im N-terminalen Peptid mit der Aminosäuresequenz: AASAAAASAAAASAASGSPGPGEGSAGGEKR aufzuklären, wurde dieses Signal einer MS/MS-Fragmentierung zugeführt.

Das Peptid bei  $m/z$  2665,2 eliminierte vorrangig Phosphorsäure im MS/MS-Experiment. Das resultierende Spektrum zeigte daher wenige Fragment-Ionensignale. Das entstandene Hauptsignal bei  $m/z$  2567,3 wurde deshalb in einem  $MS^3$  weiterfragmentiert und ergab das in Abbildung 42 dargestellte Fragment-Ionenspektrum. Durch den Verlust der Phosphorsäure durch  $\beta$ -Eliminierung kam es zur Umwandlung des zuvor phosphorylierten Serins zu Dehydroalanin. Die Lage dieses Dehydroalanins, in der Sequenz mit einem roten X gekennzeichnet, zeigt die ehemals phosphorylierte Aminosäure. Ebenfalls zu erkennen ist die N-terminale Acetylierung des Peptids.

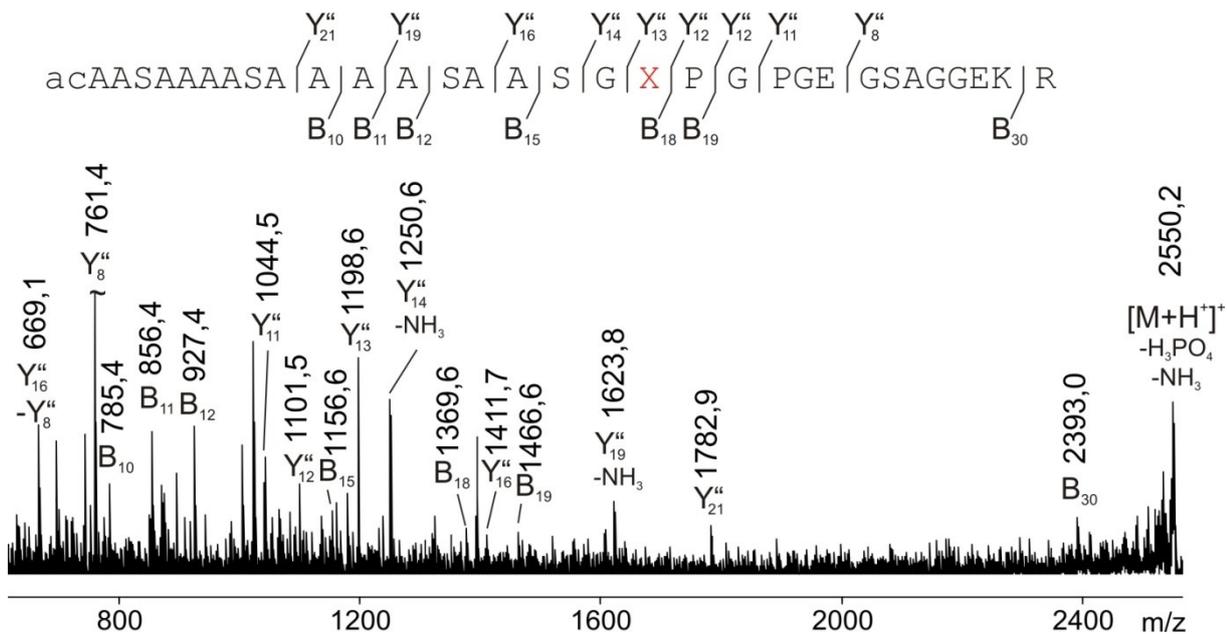


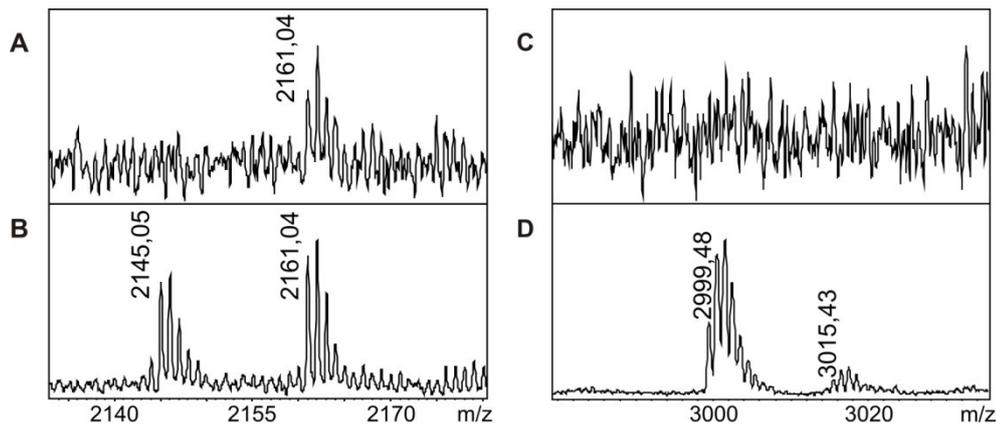
Abbildung 42: MS<sup>3</sup>-Spektrum des am Serin 19 phosphorylierten und am Alanin 2 acetylierten Peptids acAASAAAASAASpSPGPGEGSAGGEKR des TRIM28. B- und Y"- Fragment-Ionensignale sowie interne Fragmente wurden bezeichnet. X kennzeichnet das entstandene Dehydroalanin und damit die Phosphorylierungsstelle. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y"- Ionenserie über dem Spektrum angegeben. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

Die Position der Phosphorylierung am C-Terminus konnte nicht mit Hilfe von MS/MS-Messungen aufgeklärt werden. Das einfach phosphorylierte Peptid 805-835 mit der Sequenz FSAVLVEPPPMSLPGAGLSSQELSGGPGDGP beinhaltet Serin 824, gegen dessen phosphorylierte Variante Antikörper erhältlich sind. Durch Western Blot Untersuchungen unter Verwendung dieses Antikörpers wurde die Phosphorylierung am Serin 824 bestätigt (Eickner, Lorenz et al. in Vorbereitung).

### 3.4.2 Methodenentwicklung zur Optimierung der Affinitätschromatographie

Die unter 3.4.1 angewandten Methoden erfolgten sämtlich unter Verwendung von DHB im Ladepuffer nach etablierten Methoden (Thingholm, Jorgensen et al. 2006; Mikkat, Lorenz et al. 2010). Im Zuge dieser Experimente fiel auf, dass neben phosphorylierten auch oft saure Peptide angereichert wurden. Da saure Peptide eine geringere Protonenaffinität besitzen als basische Peptide und die Ausbeute an [M+H]<sup>+</sup>-Ionen während der massenspektrometrischen Messung geringer ist, wurde versucht diese Eigenschaft der TiO<sub>2</sub>-Säulen zu nutzen, um die sauren Peptide anzureichern und somit massenspektrometrisch besser nachweisen zu können.

Dazu wurden Experimente ohne DHB im Ladepuffer mit den selbst angefertigten Säulen durchgeführt. Entgegen den Erwartungen konnte eine verstärkte Anreicherung saurer Peptide jedoch nicht erreicht werden. Allerdings konnte eine Anreicherung Methionin-oxidierter Peptide beobachtet werden. Dieses wird anhand der Untersuchung von Nucleophosmin, NDKA und Endoplasmin aus 2D-Gelen von Mamma-Karzinom-Proben illustriert (Abbildung 43) (Rower, Vissers et al. 2009).



**Abbildung 43: MS-Charakterisierung von tryptischen Peptiden vor Anreicherung mit Hilfe der TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie bzw. nach Anreicherung in Abwesenheit von DHB. A: Ausschnitt aus einem MS-Spektrum von Nucleophosmin nach Phosphopeptidanreicherung ohne DHB im Ladepuffer. B: Ausschnitt aus dem Spektrum nach Trypsin Proteolyse. Das Signal bei m/z 2145,05 entspricht dem Peptid 55-73 des Nucleophosmin, das Signal bei m/z 2161,04 dem entsprechenden am Methionin oxidierten Peptid. C: Ausschnitt aus einem Spektrum des NDKA nach Phosphopeptidanreicherung. D: Ausschnitt aus einem Spektrum des NDKA ohne Anreicherung. Das Signal bei m/z 2999,48 entspricht dem nichtoxidierten Peptid 128-151 des NDKA, das Signal bei m/z 3015,43 dem oxidierten Pendant. Dieser Sequenzabschnitt enthält kein Methionin aber ein Tryptophan. Die Oxidation muss also am Tryptophan stattgefunden haben. Zur Ansicht der vollständigen Spektren des NDKA siehe Anhang Abbildung 98.**

In Abbildung 43 A erkennt man nach der TiO<sub>2</sub>-Chromatographie das Signal des Peptids 55-73 von Nucleophosmin mit oxidiertem Methionin, wogegen das nicht-oxidierte nicht mehr nachzuweisen ist. Zwar kommt es insgesamt zu einer Abreicherung der Peptide, erkennbar an dem Intensitätsverlust der entsprechenden Signale. Dieser Intensitätsverlust führt jedoch im Falle der nicht-oxidierten Peptide zum Verlust des Signals. Daraus lässt sich entweder eine stärkere Zurückhaltung der oxidierten Peptide auf der TiO<sub>2</sub>-Säule ableiten oder eine (verstärkte) Oxidation dieser Peptide an der Säulenoberfläche. Dieses Anreicherungsphänomen wurde schon früher beobachtet und auf eine Oxidation während der Chromatographie zurückgeführt (Imanishi, Kochin et al. 2007), jedoch nicht genauer untersucht. Dieses „Anreicherungsverhalten“ ist offenbar auf Methionin beschränkt, denn eine

Anreicherung oder Oxidation Tryptophan-tragender Peptide ließ sich nicht beobachten (Abbildung 43 C, D). Andere zum NDKA gehörende Signale wurden, wie erwartet, durch die TiO<sub>2</sub>-Chromatographie abgereichert (siehe Anhang Abbildung 98).

### Zusatz von Methionin

Das Auftreten oxidierter Peptide führt zu zusätzlichen Signalen, wodurch die resultierenden Spektren komplexer werden. Im weiteren Verlauf wurde deshalb untersucht, wie sich die Anreicherung unter Zugabe von Methionin zum Ladepuffer sowie von zwei Reduktionsmitteln (DTT und Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) verhält.

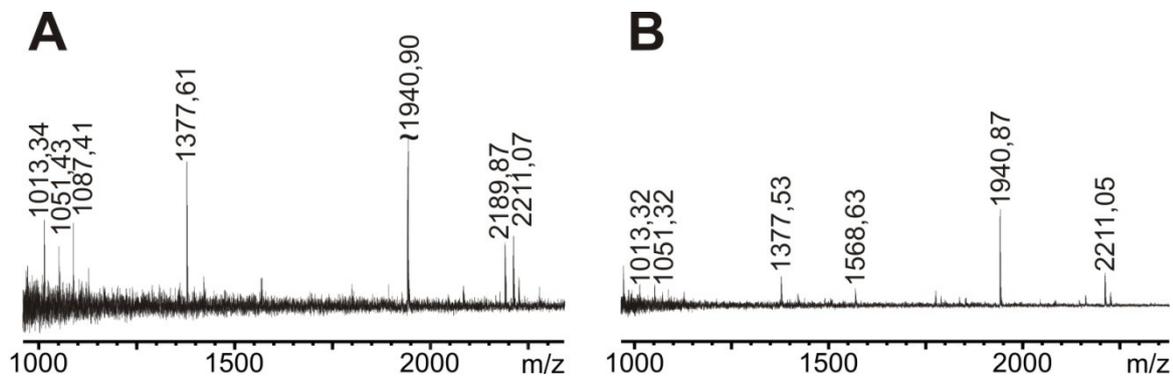
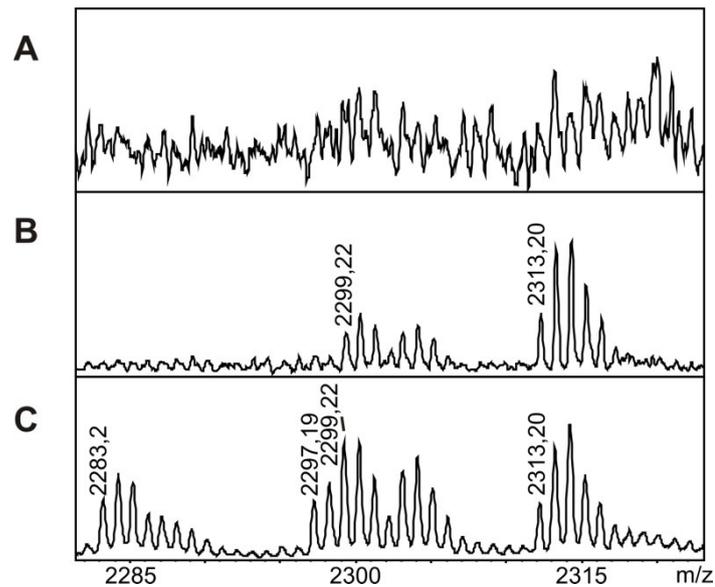


Abbildung 44: Spektren eines Nucleophosminverdaus nach Phosphopeptidanreicherung unter Verwendung von DTT (links) und Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (rechts). Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

In den Experimenten unter Zugabe von DTT oder Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> zeigte sich eine komplette Abwesenheit fast aller Peptide nach der Chromatographie. Davon ausgenommen war nur das Trypsin-Autoproteolyse-Signal bei m/z 2211,10 (Abbildung 44). Die anderen Signale in Abbildung 44 sind Hintergrundsignale, die sich wahrscheinlich auf die DHB-Matrix zurückführen lassen. Die Experimente unter Zusatz von Methionin zeigten keine Anreicherung der Signale des Trypsins, die den Methionin-oxidierten Peptiden entsprechen (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Ausschnitte aus Spektren des ENPL. A: nach Phosphopeptidanreicherung in Gegenwart von Methionin im Ladebuffer. B: ohne Methionin im Ladebuffer. C: Spektrum vor der Anreicherung. Zu sehen ist der Ausschnitt, in dem einige Autoproteolysesignale des Trypsins sowie deren oxidierte Vertreter zu finden sind. Die Anwendung der  $\text{TiO}_2$ -Säule auf den ENPL-Verdau zeigt eine Abreicherung der nichtoxidierten Signale, während die Anwendung der  $\text{TiO}_2$ -Säule unter Zugabe von Methionin sowohl die nichtoxidierten als auch die oxidierten Peptide abreichert.**

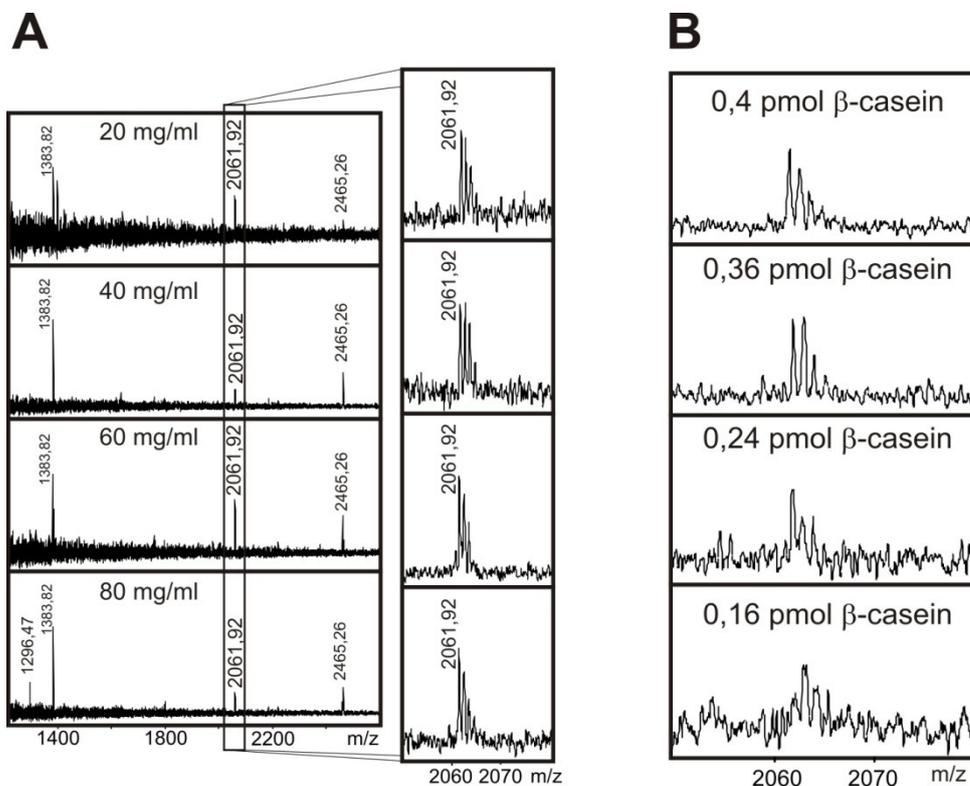
Trotzdem sind Signale wie das bei  $m/z$  1322,12, welches einem oxidierten Peptid des Endoplasmins entspricht (614-623  $M_{\text{Ox}}$ ), angereichert, während der nicht-oxidierte Vertreter abgereichert erscheint (siehe Anhang Abbildung 99). Weitere, in Abbildung 45 nicht dargestellte Signale, zeigen den gleichen Effekt. Die vollständigen Spektren sind im Anhang in Abbildung 100 aufgeführt.

### ***Die Verwendung von Zitronensäure anstatt DHB***

Die im Folgenden vorgestellten Daten sind im Rahmen einer Publikation (Eickner, Mikkat et al. 2011) veröffentlicht worden.

Bei Phosphopeptidanreicherungen des tryptisch verdauten  $\beta$ -Casein, unter Verwendung des Methionins im Ladebuffer, ergab sich eine enorme Intensitätssteigerung des vierfach phosphorylierten Peptids 16-40 bei  $m/z$  3122,00 (siehe Anhang Abbildung 101). Dieser Effekt beschränkte sich allerdings auf hochkonzentrierte  $\beta$ -Casein-Peptidlösungen (20 pmol/ $\mu\text{l}$ ) und konnte bei stärkeren Verdünnungen (1 pmol/ $\mu\text{l}$ ) nicht beobachtet werden.

Die Überlegung, dass die Zugabe von Methionin ähnliche Effekte bei der Affinitätschromatographie zeigt, wie die bei DHB-Zugabe, indem bestimmte Bindungsstellen der TiO<sub>2</sub>-Matrix besetzt werden (Larsen, Thingholm et al. 2005), lenkte den Fokus auf EDTA und Zitronensäure als mögliche Additive zur Phosphopeptidanreicherung. EDTA erwies sich aufgrund der schlechten Löslichkeit im sauren wässrigen Milieu als ungeeignet, sodass die Zitronensäure als Additiv genauer untersucht wurde. Als Modellprotein wurde weiterhin  $\beta$ -Casein gewählt, da es kommerziell erhältlich und quantitativ phosphoryliert ist und die Phosphorylierungsstellen bekannt sind. Die Abhängigkeit der Intensität der Peptidionensignale von der Konzentration der Zitronensäure und die Abhängigkeit von der Konzentration des  $\beta$ -Caseins wurden untersucht (Abbildung 46).



**Abbildung 46 A:** Spektren von Phosphopeptidanreicherungen von 1 pmol  $\beta$ -Casein unter Verwendung verschiedener Konzentrationen an Zitronensäure im Ladepuffer. Das Signal bei m/z 2061,92 des Peptids 48-63 ist vergrößert dargestellt. Zitronensäurekonzentrationen sind aufgeführt. **B:** Phosphopeptidanreicherungen von unterschiedlichen Konzentrationen an  $\beta$ -Casein unter Verwendung von 80 mg/ml Zitronensäure (Eickner, Mikkat et al. 2011).

Während die Intensität des Signals bei m/z 2061,92 keine Abhängigkeit zur Konzentration der Zitronensäure zeigt (Abbildung 46 A), diese also über einen großen Konzentrationsbereich wirksam ist, lassen sich in Abbildung 46 B noch

160 fmol  $\beta$ -Casein auf dem Target nachweisen. Bemerkenswert ist in diesen Experimenten, dass ein Signal des nichtphosphorylierten  $\beta$ -Casein Peptids nicht zu beobachten ist.

### **3.4.3 Die Verwendung von THAP/DHB für eine neue Matrixpräparation für die Phosphopeptidanalytik**

Durch die Bildung von charakteristischen nadelförmigen Kristallen bei der DHB-Matrix-Präparation ist es unvermeidbar, eine lokale Aufkonzentrierung des Analyten zu erreichen, einen sogenannten „sweet spot“. Dadurch können zwar geringere Mengen an Analyt einer massenspektrometrischen Untersuchung als bei einer homogenen Matrixpräparation zugänglich werden, allerdings ist für solche „sweet spot“-Präparationen eine manuelle Aufnahme der Spektren nötig, da weder der Operateur noch die Software in der Lage ist, diese „sweet spots“ zu erkennen oder deren Bildung gar experimentell zu steuern. Für eine automatisch durchgeführte Messung, gerade auch im Hinblick auf quantitative Analysen, ist deshalb eine homogene Matrixpräparation mit einer homogenen Analytverteilung bevorzugt. Um solch eine homogene Matrix-Präparation auch für die massenspektrometrische Analyse von Phosphopeptiden reproduzierbar zu präparieren, wurden verschiedene MALDI-Matrices bezüglich ihrer Charakteristika für o.g. Eigenschaften getestet (Eickner, Mikkat et al. 2011). Abbildung 47 zeigt den Unterschied zwischen einer Matrixpräparation von 1  $\mu$ l einer 5 mg/ml DHB-Lösung und einer Präparation von zuerst 0,3  $\mu$ l einer 10 mg/ml 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP)-Lösung mit darauffolgender Präparation von 1  $\mu$ l der 5 mg/ml DHB-Lösung.



**Abbildung 47 A:** Präparation mit 1  $\mu$ l 5 mg/ml DHB auf einem Anchor Target. **B:** Präparation mit 0,3  $\mu$ l THAP-Lösung (10 mg/ml) mit darauffolgender Präparation von 1  $\mu$ l der 5 mg/ml DHB-Lösung; Balken entspricht einer Länge von 400  $\mu$ m (Eickner, Mikkat et al. 2011).

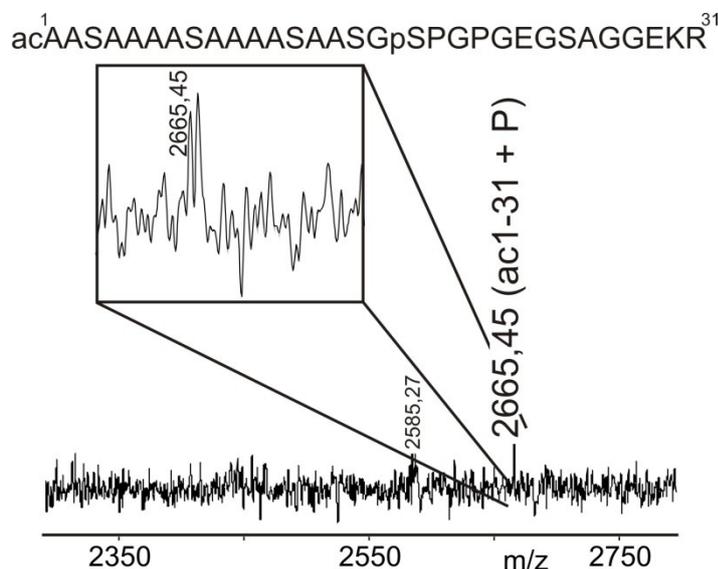
Die Präparation und damit auch die Verteilung des Analyten auf der Target-Position in Abbildung 47 B ist im Gegensatz zu Abbildung 47 A gleichmäßig (siehe Anhang Abbildung 102) und damit den bisherigen Präparationstechniken überlegen. Weitere

Matrices wie Sinapinsäure, Ferulasäure,  $\alpha$ -Cyano-4-chlorzimtsäure (Cl-CCA) (Jaskolla, Lehmann et al. 2008) wurden ebenfalls getestet. Ein weiterer Vorteil der THAP-Zugabe gegenüber den anderen getesteten Matrices war die hohe Ausbeute an Peptidionen auch im Massenbereich über  $m/z$  2000, was zu gut auswertbaren Spektren mit intensiven Ionensignalen führt.

### 3.4.4 Anwendungsbeispiele

#### **TRIM28-Phosphorylierung**

Die Anwendung auf gelseparierte Proben, wie das TRIM28 (Abbildung 48) für ein 1D-SDS-Gel und das Stathmin (Abbildung 49) als Anwendungsbeispiel für ein Protein aus einem 2D-SDS-Polyacrylamid Gel (Kirschstein, Mikkat et al. 2012), ergab die nachfolgend dargestellten Ergebnisse. In Abbildung 48 ist das Spektrum des tryptischen In-Gel Verdau von TRIM28 nach Phosphopeptidanreicherung mit Zugabe von Zitronensäure im Ladepuffer für die Affinitätschromatographie und Verwendung der THAP/DHB-Matrix-Präparation gezeigt.



**Abbildung 48:** Ausschnitt aus einem Spektrum des tryptisch verdauten TRIM28 nach Phosphopeptid-Anreicherung. Die Signale entsprechen dem *N*-terminalen Peptid. Die Sequenz des Peptids ist über dem Spektrum angegeben; Matrix: THAP/DHB (Eickner, Mikkat et al. 2011)

Die mindere Qualität der Signale im Vergleich zu den im Abschnitt 3.4.1 gezeigten Spektren kann auf die gleichmäßige Matrixpräparation, der damit verbundenen Gleichverteilung der Analyten im Matrix-Spot und der dadurch resultierenden lokal

sehr niedrigen Konzentration des Analyten zurückgeführt werden. Es sei außerdem auf das Signal des nichtphosphorylierten Peptids 1-31 bei  $m/z$  2585,3 hingewiesen.

## Stathmin

Stathmin wurde als weitere Beispielanwendung eines Phosphoproteins ausgewählt, da es bekannte Phosphorylierungen enthält. In Abbildung 49 B sind einige Peptide zu erkennen, die zwei verschiedenen Peptidsequenzen des Stathmins zugeordnet werden könnten. Da es, wie in Abbildung 49 C, zur Klärung der korrekten Phosphorylierungsstelle notwendig ist, den richtigen Sequenzbereich festzustellen, die MALDI-ToF-Spektren aufgrund zu geringer Massenauflösung diese Informationen aber nicht enthalten, wurde die Messung des Stathmin an einem Bruker SolariX FT-ICR-Massenspektrometer wiederholt (Abbildung 50). Diese Aufnahmen wurden mit einer Auflösung von  $m/\Delta m = 78000$  FWHM durchgeführt und sind somit auch in der dritten Stelle nach dem Komma bei  $m/z$  1621,7876 präzise.

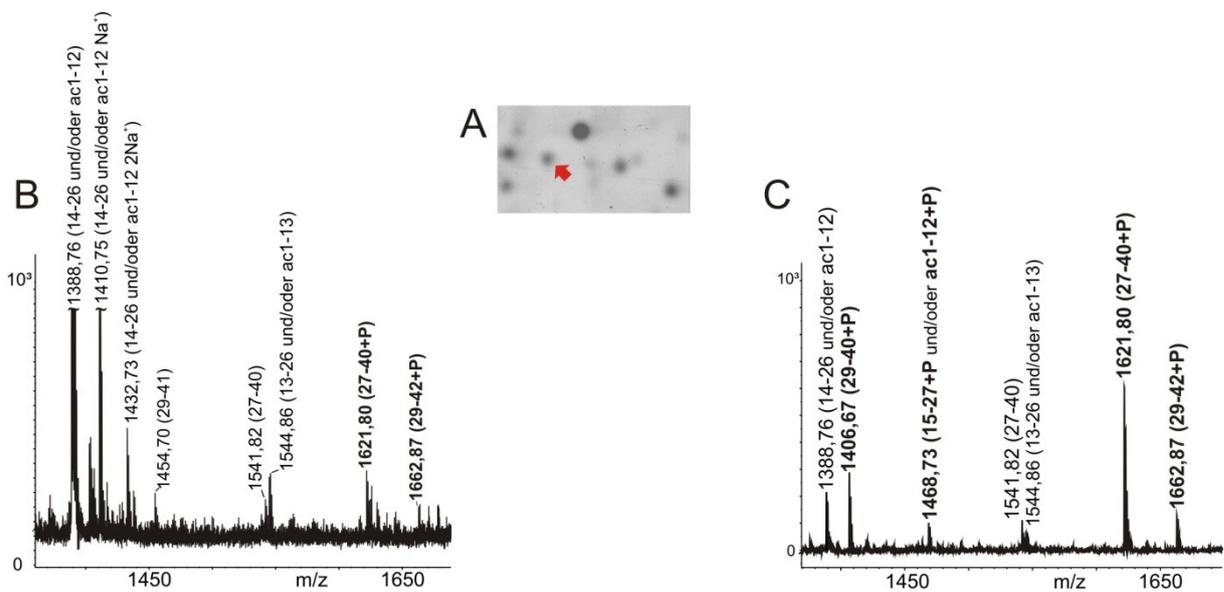
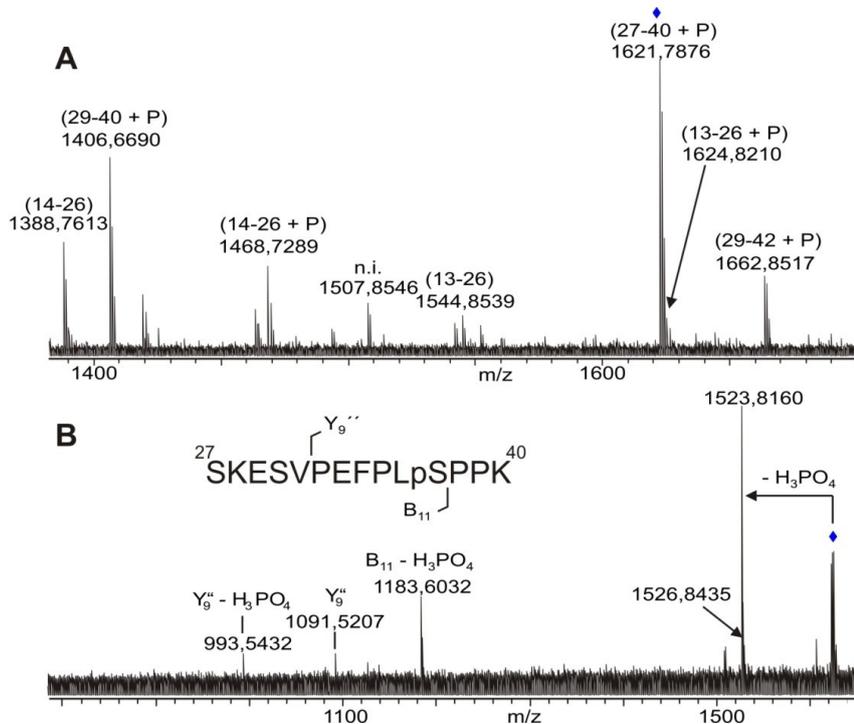


Abbildung 49 A: Ausschnitt aus einem 2D-Gel, der rote Pfeil zeigt den Stathmin Spot, der für die Phosphopeptid-Anreicherungen ausgeschnitten und tryptisch verdaut wurde. B: MALDI-Massenspektrum des Stathmins nach Trypsin-Proteolyse. C: Spektrum nach Phosphopeptidanreicherung mit Zitronensäure im Ladepuffer. Neben den Phosphopeptidsignalen sind auch die Signale der korrespondierenden, nichtphosphorylierten Peptide zu erkennen. Matrix THAP/DHB Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert (Eickner, Mikkat et al. 2011).

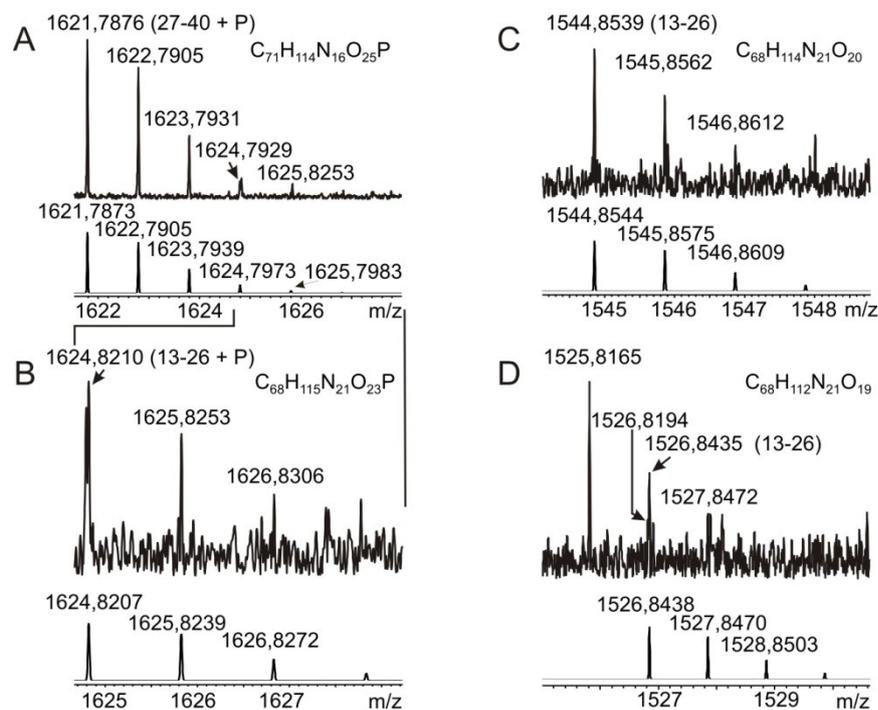
Die beiden in Frage kommenden Peptide weisen einen Massenunterschied von 0,026 Da auf. Durch die hohe Massengenauigkeit konnte das Peptid des

*N*-Terminus ( $m/z=1388,7267$  Da (1-12)) ausgeschlossen werden. Wie erwartet, zeigt das MS/MS-Spektrum des Peptids mit  $m/z=1621,7876$  Da (27-40 + P) vor allem den Neutralverlust der Phosphorsäure.



**Abbildung 50 A:** MALDI-FT-ICR-MS-Spektrum nach Phosphopeptidanreicherung des Stathmins. **B:** MS/MS-Spektrum des Peptids 27-40 + P mit dem Signal bei  $m/z$  1621,7876. Die Peptidsequenz ist mit den dazugehörigen B- und Y''- Fragmenten über dem Spektrum angegeben. Matrix: THAP/DHB (Eickner, Mikkat et al. 2011)

Daneben sind einige weitere Fragmentierungen aufgetreten, insbesondere das Y''<sub>9</sub>-Fragment, durch das die Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle eindeutig gezeigt wird. Weiterhin sieht man im Spektrum nach der Phosphopeptidanreicherung (Abbildung 50 A) vor allem die gefundenen Phosphopeptide und ihre nichtphosphorylierten Vertreter. Außerdem fällt das Signal bei  $m/z$  1544,854 auf, dem das Signal des korrespondierenden phosphorylierten Peptids fehlt, dieses läge bei  $m/z$  1624,85. Wäre es im Spektrum vorhanden, würde es mit den Isotopensignalen des Peptids bei  $m/z$  1621,788 überlagern. Tatsächlich lässt es sich in den Aufnahmen vom Bruker Reflex III Massenspektrometer nicht vom Isotopenmuster unterscheiden. Am FT-ICR-Massenspektrometer dagegen ist die Auflösung der Isotopenpeaks ausreichend, so dass das Signal bei  $m/z$  1624,85 klar erkennbar ist (Abbildung 51) und somit das phosphorylierte Peptid 13-26 + P zeigt.



**Abbildung 51 A:** vergrößerter Ausschnitt des Signals m/z 1621,7876 aus dem MS-Spektrum (Abbildung 50). **B:** aus A vergrößerter Ausschnitt, er zeigt den Doppelpeak bei m/z 1624. **C:** vergrößerter Ausschnitt des Signals m/z 1544,876 (= -HPO<sub>3</sub>) aus dem MS-Spektrum (Abbildung 50). **D:** Der Doppelpeak bei m/z 1526,8 entspricht dem Verlust an H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> durch  $\beta$ -Eliminierung aus dem Peptid m/z=1624,8210 Da (13-26 + P). Unter jedem Ausschnitt ist sowohl das theoretische Isotopenmuster als auch die theoretische akkurate Masse des Peptids angegeben. Als Insert in jedem Ausschnitt ist die aus der akkuraten Masse bestimmte Summenformel angegeben (Eickner, Mikkat et al. 2011).

Das Peptid mit m/z=1624,8210 Da (13-26 + P) wurde zusammen mit dem mit m/z=1621,7876 Da (27-40 + P) zur Fragmentierung ausgewählt, da das Massenfenster groß genug gewählt worden war. Es zeigte ebenfalls den Neutralverlust von Phosphorsäure. Auch stimmte die berechnete Summenformel des phosphorylierten Peptids mit der überein, die aufgrund der hohen Massengenauigkeit bestimmt werden konnte. Gleiches galt für das Peptid mit m/z=1621,7876 Da (27-40 + P) und dessen entsprechendem Signal nach Phosphorsäureverlust (Abbildung 51).

Auffällig in den Spektren der nach TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie erhaltenen Peptidgemische (Abbildung 49) ist das gleichzeitige Auftreten der phosphorylierten und der korrespondierenden nichtphosphorylierten Peptide. Während eine Dephosphorylierung während der MS-Fragmentierungsanalyse durch  $\beta$ -Eliminierung erfolgt (Neutralverlust), und damit einen Massenshift von -98 Da ergibt, liegen die Abstände im MALDI-MS-Spektrum zur einfachen Massenbestimmung bei

-80 Da. Das Signal bei  $m/z$  1388,76 in Abbildung 49 B entspricht dem nichtphosphorylierten Peptid 14-26. Dieses Signal ist das intensivste Signal vor der Phosphopeptidanreicherung gewesen. Nach der Phosphopeptidanreicherung ist es dagegen sehr klein, was für eine starke Abreicherung spricht. Zu erwarten wäre, dass die anderen nichtphosphorylierten Peptide in ähnlichem Maße abgereichert sein würden. Stattdessen sind die Intensitäten der Signale kaum verändert.

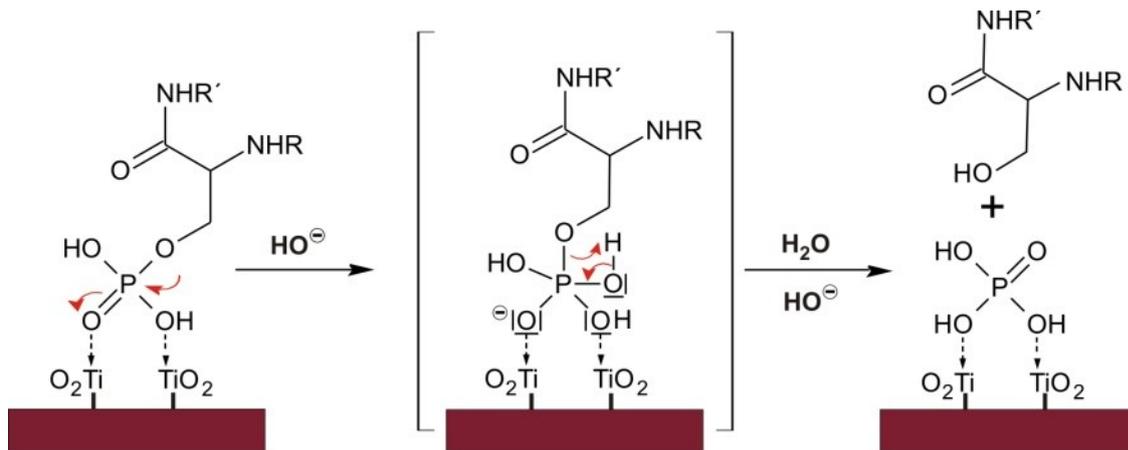


Abbildung 52: Postulierter Mechanismus der  $\text{TiO}_2$ -katalysierten Dephosphorylierung (Eickner, Mikkat et al. 2011).

Der Verdacht liegt nahe, dass es im Laufe der Phosphopeptidanreicherung zu einer Dephosphorylierung kommt. Ein solcher Effekt wurde im Zusammenhang mit Ceroxid ( $\text{CeO}_2$ ) gezeigt. Sun et al. haben die dephosphorylierende Wirkung des Ceroxids in einem Experiment genutzt, in dem sie  $\text{CeO}_2$  als Anreicherungsmatrix für Phosphopeptide verwendeten (Sun, Ma et al. 2011). Dabei trat ebenfalls eine Dephosphorylierung unter Erhalt eines -80 Da-Massenshifts auf. Die Vermutung liegt nahe, dass  $\text{TiO}_2$  ähnliche Eigenschaften aufweist. Denkbar wäre, dass es während der basischen Elution als Lewis-Säure wirkt, die Ladung der Phosphorsäure neutralisiert und damit die elektrostatische Abstoßung des Hydroxid-Ions verhindert. Dieses Hydroxid-Ion ist nun in der Lage, den Phosphor nucleophil anzugreifen und die Abspaltung des Peptids unter Erhalt des Serins zu bewirken. Dieser postulierte Mechanismus ist in Abbildung 52 dargestellt.

## 4 DISKUSSION UND AUSBLICK

### 4.1 TRIM28-Komplexe

Im Gegensatz zur Anreicherung des TRIM28 aus iTR-Zellen war eine Anreicherung aus Kontrollzellen, die das RBCC-Konstrukt nicht exprimieren, nicht festzustellen. Folglich findet die RBCC-vermittelte Heteromerisierung, bestehend aus RBCC-Konstrukt- und TRIM28-Molekülen, in dem hier verwendeten System tatsächlich statt. Die Identifizierung der an den TRIM28-RBCC-Heterokomplex gebundenen KRAB-Domäne-enthaltenden Proteine, z.B. des POGK, zeigt darüber hinaus, dass die TRIM28-RBCC-Heteromere bzw. die RBCC-Homomere in der Lage sind, mit KRAB-Domäne-enthaltenden Proteinen Komplexe zu bilden, sodass auch diese angereichert werden konnten. Somit ist dieser Ansatz in der Lage, TRIM28-interagierende Proteine, genauer: KRAB-Domäne-enthaltende Proteinkomplexe, anzureichern. Das ebenfalls identifizierte TRIM28-interagierende Protein CBX3/HP1 $\gamma$  zeigt weiterhin die Fähigkeit des verwendeten Systems, Proteine, die C-terminal von der RBCC-Domäne binden, anzureichern. Dieser Umstand leitet zur Frage, weshalb keine Identifizierung weiterer TRIM28 interagierender Proteine wie HDAC, CHD3, SETDB1 und vor allem Sumo gelang.

Zur Beantwortung dieser Frage lassen sich drei Hypothesen aufstellen:

Die erste Hypothese besagt, dass die Stöchiometrie der Sumoylierung zu gering ist, als dass sie während der hier durchgeführten Experimente sichtbar geworden wäre. Gegen diese Hypothese als alleinige Erklärung sprechen die große Menge an isoliertem TRIM28 sowie der Umstand, dass, die Sumoylierung des TRIM28 betreffende, verstärkende Bedingungen vorlagen. So erhöht laut Mascle et al. sowohl die Trimerisierung als auch die KRAB-Bindung die Sumoylierung des TRIM28 (Mascle, Germain-Desprez et al. 2007). Beides trat nachgewiesenermaßen auf, trotzdem ließ sich eine Sumoylierung nicht beobachten.

Die zweite Hypothese lautet, dass ein TRIM28-Homotrimer vorliegen muss, damit die Sumoylierung stattfindet. So ist denkbar, dass z.B. nur *intermolekulare* E3-Ligase-Aktivität zur Sumoylierung führt, d.h. der PHD-Finger des einen TRIM28 sumoyliert ein anderes TRIM28-Molekül desselben Komplexes. Da Homotrimere nicht

angereichert werden, würden die sumoylierten Spezies aus den hier vorgestellten Analysen herausfallen.

Da zur Extraktion relativ milde Bedingungen verwendet wurden, ist es wahrscheinlich, dass vor allem die leicht löslichen Proteinkomplexe angereichert wurden. Dieses vorausgesetzt, lautet die dritte Hypothese, dass die sumoylierten TRIM28-Spezies in einer unlöslichen Fraktion des Zellextraktes verbleiben, beispielsweise bedingt durch eine Chromatin-Bindung des TRIM28-KRAB-Komplexes. Eine unterschiedliche Lokalisierung im Zellkern, bestehend aus löslichen nicht-sumoylierten TRIM28-KRAB-Komplexen im Nucleoplasma und unlöslichen sumoylierten TRIM28-KRAB-Komplexen, gebunden an Chromatin, wäre die Folge. Dieses würde eine Vorassemblierung des TRIM28-KRAB-Komplexes bedeuten, der erst nach der Bindung an die DNA sumoyliert wird und anschließend zur Bildung von Heterochromatin führt. Experimente, die diese Hypothesen überprüfen könnten, sind vergleichende Western Blots gegen Sumo, SETDB1 und andere im C-terminalen Bereich des TRIM28 bindende Interaktionspartner nach der Trennung der einzelnen Fraktionen. Ähnliche Experimente wurden bereits durchgeführt, allerdings nicht gegen Sumo oder SETDB1 (Eickner, Lorenz et al. in Vorbereitung).

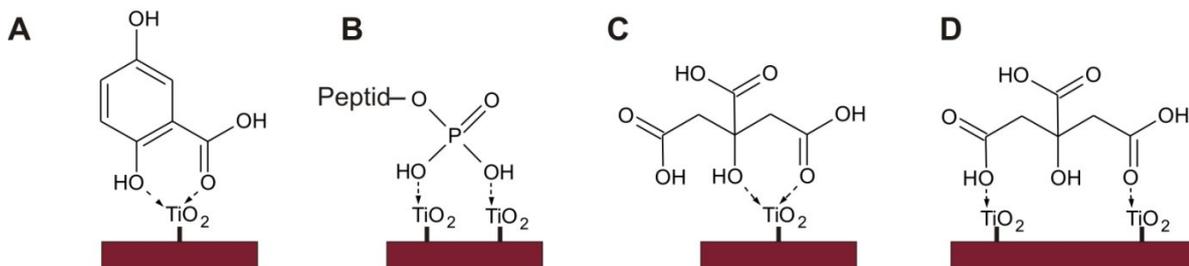
In einer Untersuchung aus dem Jahre 2010 haben Hutchins et al. neben anderen Komplexen auch TRIM28-Komplexe affinitätschromatographisch angereichert (Hutchins, Toyoda et al. 2010). Im Zuge dessen konnten sie 18 Proteine anreichern, von denen 11 folgende KRAB-Proteine waren: POGK, ZFP1, ZNF8, ZNF124, ZNF250, ZNF324; ZNF331; ZNF460, ZNF566, ZNF552, ZNF769/RBAK. Außerdem fanden sie die Proteine C1QBP, CALU, DDB1, FRIH, IPO8, RCN1, RCN2 (Hutchins, Toyoda et al. 2010). Neben weiteren wurden acht der von Hutchins et al. gefundenen KRAB-Domäne-enthaltenden Proteine ebenfalls in unseren Experimenten identifiziert, nämlich POGK, ZFP1, ZNF8, ZNF324; ZNF331; ZNF460, ZNF552 und ZNF769/RBAK. Ebenfalls gefunden wurde das Protein FRIH. Die Anreicherung dieses Proteins lenkt das Augenmerk auf ein neues, bisher unbeachtetes Zielprotein. In den hier dargestellten Experimenten, wurde es in 3 von 8 Experimenten gefunden, allerdings nicht in der Kontrolle. Weitere Experimente werden nötig sein, um eine mögliche Beteiligung des FRIH im Rahmen der TRIM28-Interaktionen genauer zu evaluieren.

In Bezug auf die TRIM28-KRAB-Interaktion ist es interessant, dass sowohl KRAB-AB- als auch KRAB-A- und KRAB-AC-Domänen zur Anreicherung führten. Eine tatsächliche höhere Affinität einer speziellen KRAB-Domäne gegenüber den anderen zum TRIM28/RBCC-Komplex konnte nicht festgestellt werden. Neben der Affinität sind für Anreicherungen von Proteinen zwei weitere Parameter von Bedeutung, nämlich die Konzentration der anzureichernden Stoffe und die Extrahierbarkeit. Um auf die Konzentration der KRAB-Proteine zu schließen, kann auf RNA-Daten zurückgegriffen werden, die anschließend mit den Ergebnissen der Anreicherung der Proteine verglichen werden. TaqMan-Daten zu einigen der gefundenen KRAB-Proteine zeigten keine Korrelation zwischen der Expressionshöhe auf RNA-Ebene und der Häufigkeit der angereicherten KRAB-Proteine (Eickner, Lorenz et al. in Vorbereitung). Ein ähnliches Ergebnis liefert der Vergleich mit den Ergebnissen des Ansatzes von Nagaraj et al. zur Quantifizierung von Proteinen in HeLa-Zellen (Nagaraj, Wisniewski et al. 2011). In der dort resultierenden Proteinliste sind ebenfalls einige der hier gefundenen KRAB-Domäne enthaltenden Proteine enthalten. Zwar tritt POGK dort mit 7700 Molekülen pro Zelle als häufigstes Protein der hier erhaltenen Liste auf, wird aber von anderen KRAB-Proteinen in der Anzahl der Moleküle weit übertroffen. So weist das ZNF33B als häufigstes KRAB-Protein eine Menge von 26000 Molekülen pro Zelle auf. Somit kann auch hier kein Zusammenhang mit der Konzentration hergestellt werden.

Somit bleibt die Extrahierbarkeit unter den verwendeten Bedingungen als dritter Parameter. Fest an bestimmte, nicht-extrahierbare Zellkernkompartimente, z.B. an Chromatin gebundene Komplexe, können nicht oder nur in geringem Maße isoliert werden (siehe 4.1). Ein Resultat wäre eine, von der Expressionshöhe bzw. der tatsächlichen vorkommenden Menge unterschiedliche, angereicherte Menge an Zielproteinen. Eine Minimierung dieser Einflüsse könnte in zukünftigen Experimenten durch größere Zellzahlen und verschärfte Extraktionsbedingungen erreicht werden.

## 4.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinphosphorylierungen

Im Zuge der Experimente zur Phosphopeptidanreicherung wurde eine neue Methode entwickelt (Eickner, Mikkat et al. 2011). Diese Methode ersetzt die DHB während der Phosphopeptidanreicherung durch Zitronensäure. Laut Larsen et al. (Larsen, Thingholm et al. 2005) nimmt die Effektivität der Anreicherung durch DHB Zugabe mit der Menge an gelöster DHB zu und wird letztendlich nur durch deren Löslichkeit begrenzt. Der Effekt der DHB, der verhindert, dass saure Peptide vom  $\text{TiO}_2$  zurückgehalten werden, wird laut Larsen et al. durch die chelatisierende Wirkung der DHB (Larsen, Thingholm et al. 2005) erklärt. Zitronensäure besitzt die gleichen funktionellen Gruppen, die außerdem ähnliche Abstände aufweisen und sollte demzufolge einen vergleichbaren Effekt zeigen. Die Art der Bindung der DHB bzw. der Zitronensäure im Vergleich zu Phosphorsäure ist in Abbildung 53 dargestellt.



**Abbildung 53** A: Chelatkomplex der DHB am  $\text{TiO}_2$ . B: Brückenbindung der Phosphorgruppe. C: Chelatkomplex der Zitronensäure am  $\text{TiO}_2$ . D: Brückenbindung der Zitronensäure am  $\text{TiO}_2$ . (Eickner, Mikkat et al. 2011)

In Experimenten konnte weiterhin beobachtet werden, dass unpolare Peptide ebenfalls während der Phosphopeptidanreicherung zurückgehalten wurden. Um die Limitierungen durch die Löslichkeit zu umgehen und die Affinität für unpolare Peptide aufgrund des Aromaten zu verringern, wurde die DHB durch Zitronensäure ersetzt.

Die scheinbare Anreicherung des oxidierten Methionins könnte ebenso auf eine Oxidation des Methionins während der Chromatographie zurückzuführen sein. Es wurde gezeigt, dass  $\text{TiO}_2$  unter UV-Strahlung als Oxidationsmittel wirkt (Thiruvengkatachari, Vigneswaran et al. 2008). Der Zusatz des Methionins während der  $\text{TiO}_2$ -Chromatographie würde somit zur Besetzung der Bindestellen führen, die

ansonsten die peptidgebundenen Methionine binden würden. Eine höhere Affinität des Peptids zur TiO<sub>2</sub>-Matrix, verglichen zur Affinität des freien Methionins, könnte für die Beobachtung ursächlich sein, dass in einzelnen Fällen trotz des Zusatzes von Methionin eine Oxidation des peptidgebundenen Methionins stattfindet.

Die Dephosphorylierung der Peptide erfolgte in einem unterschiedlichen Umfang. So wurde das Phosphopeptid des  $\beta$ -Caseins nicht dephosphoryliert, während die Peptide des TRIM28 und des Stathmins dephosphoryliert wurden. Da die Sequenz der Peptide den offensichtlichsten Unterschied zwischen den verschiedenen Peptiden darstellt, hängt auch die Stabilität wahrscheinlich von der Sequenz der Peptide ab. Diese Abhängigkeit zu untersuchen, könnte in der Zukunft Einblicke in die Stabilität der Phosphorylierungen ermöglichen.



## 5 VERZEICHNISSE

### 5.1 Abkürzungen

|             |   |
|-------------|---|
| 1D-SDS-PAGE | eindimensionale-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese                        |
| Å           | Ångstrom  |
| AA          | Acrylamid   |
| Ac          | Acetyl-   |
| ACN         | Acetonitril   |
| APS         | Ammoniumpersulfat   |
| Bis-AA      | Bisacrylamid  |
| Bis-TRIS    | Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan                        |
| BLAST       | Basic Local Alignment Search Tool   |
| bp          | Basenpaare  |
| BSA         | bovines Serum Albumin   |
| cDNA        | komplementäre DNA   |
| CID         | kollisionsinduzierte Dissoziation   |
| Cl-CCA      | $\alpha$ -Cyano-4-chlorozimtsäure   |
| DAPI        | 4',6'-Diamidino-2-phenylindol   |
| DHB         | Dihydroxybenzoesäure  |
| DMEM        | Dulbecco`s minimal essential medium                                       |
| DTT         | 1,4-Dithiothreitol  |
| EDTA        | Ethylendiamintetraacetat  |
| ESI         | Electrospray Ionisierung  |
| FA          | Ameisensäure  |
| FCS         | fötales Kälberserum   |
| Fc-Teil     | konstanter Bereich von Immunglobulin G Proteinen                          |
| FT-ICR      | Fourier-Transform Ionenzyklotronresonanz                                  |
| FWHM        | full width at half maximum  |
| HCCA        | $\alpha$ -Cyano 4-hydroxyzimtsäure  |
| HeLa        | Zelllinie hervorgegangen aus den Cervixkarzinomzellen von Henrietta Lacks |
| HEPES       | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure                    |
| HMM         | Hidden Markov Model   |
| HPLC        | High Purance Liquid Chromatography  |
| HR5         | Vorgängerzelllinie der iTR-Zelllinie                                      |
| IAA         | Iodacetamid   |
| iTR         | induzierbares TRIM28-RBCC   |
| KAP-1       | KRAB-associated Protein 1   |
| kDa         | Kilodalton  |
| KRAB        | Krüppel associated box  |
| KRIP1       | KRAB-interacting Protein 1  |
| MALDI       | Matrix assisted Laser Desorption/Ionization                               |
| MCP         | Multi-Channel Plate   |
| MOPS        | 3-( <i>N</i> -Morpholin)-propansulfonsäure                                |

|                  |   |
|------------------|---|
| M <sub>Ox</sub>  | oxidiertes Methionin                            |
| MS               | Massenspektrometrie                             |
| MS/MS            | Tandem-Massenspektrometrie                      |
| nanoLC           | nano Liquid Chromatography                      |
| NEM              | N-Ethylmaleimid                                 |
| Ni-NTA           | Nickel-N-triethylamin                           |
| NLS              | Nuclear localization site                       |
| OST              | OneStrepTag                                     |
| PBS              | phosphate buffered Saline                       |
| PCV              | packed cell volume                              |
| PHD              | Plant homeo domain                              |
| PTM              | Posttranslationale Modifikation                 |
| PVDF             | Polyvinylidifluorid                             |
| QIT              | Quadrupol-Ion-Trap                              |
| QToF             | Quadrupole Time of Flight                       |
| RBCC             | Ring-Finger B-Box-Coiled-coil                   |
| RING-Finger      | Really Interesting New Gene-Finger              |
| RMS              | Root Mean Square                                |
| rpm              | Umdrehungen pro Minute                          |
| RT               | Raumtemperatur                                  |
| SDS              | Natriumdodecylsulfat                            |
| SETDB1           | Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1       |
| SMP1             | silencing-mediating protein 1                   |
| SUMO             | small ubiquitin modifier                        |
| TBS              | Tris-buffered saline                            |
| TEMED            | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylen-1,2-diamin |
| TFA              | Trifluoro acetic acid                           |
| TFE              | Trifluorethanol                                 |
| THAP             | 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon                  |
| TIF1 $\beta$     | Transcription intermediary factor 1 $\beta$     |
| TiO <sub>2</sub> | Titandioxid                                     |
| ToF              | Time of Flight                                  |
| TRIM28           | Tripartite Motif-containing Protein 28          |
| TRIS             | <i>Tris</i> (hydroxymethyl)-aminomethan         |
| TSO              | TRIS + Saccharose                               |
| TSA              | Trichostatin A                                  |
| TST              | TRIS + Saccharose + Triton X-100                |
| u                | atomare Masseneinheit                           |
| ZNF              | Zink-Finger                                     |

## 5.2 Literatur

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Abrink, M., J. A. Ortiz, C. Mark, C. Sanchez, C. Looman, L. Hellman, P. Chambon und R. Losson (2001). "Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(4): 1422-1426.

Agata, Y., E. Matsuda und A. Shimizu (1999). "Two novel Krüppel-associated Box-containing Zinc-finger Proteins, KRAZ1 and KRAZ2, Repress Transcription through Functional Interaction with the Corepressor KAP-1 (TIF1 $\beta$ /KRIP-1)." The Journal of Biological Chemistry **274**(23): 16412-16422.

Apweiler, R., M. J. Martin, C. O'Donovan, M. Magrane, Y. Alam-Faruque, R. Antunes, D. Barrell, B. Bely, M. Bingley, D. Binns, L. Bower, P. Browne, W. M. Chan, E. Dimmer, R. Eberhardt, A. Fedotov, R. Foulger, J. Garavelli, R. Huntley, J. Jacobsen, M. Kleen, K. Laiho, R. Leinonen, D. Legge, Q. Lin, W. D. Liu, J. Luo, S. Orchard, S. Patient, D. Poggioli, M. Pruess, M. Corbett, G. di Martino, M. Donnelly, P. van Rensburg, A. Bairoch, L. Bougueleret, I. Xenarios, S. Altairac, A. Auchincloss, G. Argoud-Puy, K. Axelsen, D. Baratin, M. C. Blatter, B. Boeckmann, J. Bolleman, L. Bollondi, E. Boutet, S. B. Quintaje, L. Breuza, A. Bridge, E. deCastro, L. Ciapina, D. Coral, E. Coudert, I. Cusin, G. Delbard, M. Doche, D. Dornevil, P. D. Roggli, S. Duvaud, A. Estreicher, L. Famiglietti, M. Feuermann, S. Gehant, N. Farriol-Mathis, S. Ferro, E. Gasteiger, A. Gateau, V. Gerritsen, A. Gos, N. Gruaz-Gumowski, U. Hinz, C. Hulo, N. Hulo, J. James, S. Jimenez, F. Jungo, T. Kappler, G. Keller, C. Lachaize, L. Lane-Guermonprez, P. Langendijk-Genevaux, V. Lara, P. Lemercier, D. Lieberherr, T. D. Lima, V. Mangold, X. Martin, P. Masson, M. Moinat, A. Morgat, A. Mottaz, S. Paesano, I. Pedruzzi, S. Pilbout, V. Pillet, S. Poux, M. Pozzato, N. Redaschi, C. Rivoire, B. Roechert, M. Schneider, C. Sigrist, K. Sonesson, S. Staehli, E. Stanley, A. Stutz, S. Sundaram, M. Tognolli, L. Verbregue, A. L. Veuthey, L. N. Yip, L. Zuletta, C. Wu, C. Arighi, L. Arminski, W. Barker, C. M. Chen, Y. X. Chen, Z. Z. Hu, H. Z. Huang, R. Mazumder, P. McGarvey, D. A. Natale, J. Nchoutmboube, N. Petrova, N. Subramanian, B. E. Suzek, U. Ugochukwu, S. Vasudevan, C. R. Vinayaka, L. S. Yeh, J. Zhang und U. Consortium (2010). "The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010." Nucleic Acids Research **38**: D142-D148.

Ayyanathan, K., M. S. Lechner, P. Bell, G. G. Maul, D. C. Schultz, Y. Yamada, K. Tanaka, K. Torigoe und F. J. I. Rauscher (2003). "Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation." Genes & Development **17**: 1855-1869.

Bantscheff, M. und M. O. Glocker (1998). "Probing the tertiary structure of multidomain proteins by limited proteolysis and mass spectrometry." European Mass Spectrometry **4**(4): 279-285.

Bantscheff, M., B. Ringel, A. Madi, R. Schnabel, M. O. Glocker und H. J. Thiesen (2004). "Differential proteome analysis and mass spectrometric characterization of germ line development-related proteins of *Caenorhabditis elegans*." Proteomics **4**(8): 2283-2295.

Barnett, D. A. und G. Horlick (1997). "Quantitative electrospray mass spectrometry of halides and halogenic anions." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **12**(5): 497-501.

Bartkova, J., P. Moudry, Z. Hodny, J. Lukas, E. Rajpert-De Meyts und J. Bartek (2011). "Heterochromatin marks HP1 gamma, HP1 alpha and H3K9me3, and DNA damage response activation in human testis development and germ cell tumours." International Journal of Andrology **34**(4): E103-E113.

Beavis, R. C. und B. T. Chait (1989). "Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins." Rapid Commun Mass Spectrom **3**(12): 432-435.

Bellefroid, E. J., D. A. Poncelet, P. J. Lecocq, O. Revelant und J. A. Martial (1991). "The evolutionary conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **88**: 3608-3612.

Bestor, T. H. (2000). "The DNA methyltransferases of mammals." Human Molecular Genetics **9**(16): 2395-2402.

Bienvenut, W. V., S. Kanor, J.-D. Tissot und M. Quadroni (2006). UniProtKB.

Borden, K. L. B. (2000). "RING domains: Master builders of molecular scaffolds?" Journal of Molecular Biology **295**(5): 1103-1112.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brayer, K. J. und D. J. Segal (2008). "Keep your fingers off my DNA: Protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains." Cell Biochemistry and Biophysics **50**(3): 111-131.

Brown, T. A. (2002). Genomes.

Cammas, F., A. Janoshazi, T. Lerouge und R. Losson (2007). "Dynamic and selective interactions of the transcriptional corepressor TIF1 beta with the heterochromatin protein HP1 isotypes during cell differentiation." Differentiation **75**(7): 627-637.

Cammas, F., M. Oulad-Abdelghani, J.-L. Vonesch, Y. Huss-Garcia, P. Chambon und R. Losson (2002). "Cell differentiation induces TIF1 $\beta$  association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction." Journal of Cell Science **115**: 3439-3448.

Cao, L., Z. Wang, C. B. Zhu, Y. L. Zhao, W. Z. Yuan, J. Li, Y. Q. Wang, Z. C. Ying, Y. Q. Li, W. S. Yu, X. S. Wu und M. Y. Liu (2005). "ZNF383, a novel KRAB-containing zinc finger protein, suppresses MAPK signaling pathway." Biochemical and Biophysical Research Communications **333**(4): 1050-1059.

Challberg, M. D. und T. J. Kelly (1979). "Adenovirus DNA-Replication In vitro." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(2): 655-659.

Chang, C. J., Y. L. Chen und S. C. Lee (1998). "Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha1-acid glycoprotein gene expression." Mol Cell Biol **18**(10): 5880-5887.

Chang, C. W., H. Y. Chou, Y. S. Lin, K. H. Huang, C. J. Chang, T. C. Hsu und S. C. Lee (2008). "Phosphorylation at Ser473 regulates heterochromatin protein 1 binding and corepressor function of TIF1beta/KAP1." BMC Mol Biol **9**: 61-76.

Choo, Y. und A. Klug (1993). "A role in DNA binding for the linker sequences of the first three zinc fingers of TFIIIA." Nucleic Acids Res **21**(15): 3341-3346.

Consortium, T. U. (2010). "www.uniprot.org."

Dethe, H., C. Lavau, A. Marchio, C. Chomienne, L. Degos und A. Dejean (1991). "The Pml-Rar-Alpha Fusion Messenger-Rna Generated by the T(15-17) Translocation in Acute Promyelocytic Leukemia Encodes a Functionally Altered Rar." Cell **66**(4): 675-684.

Deuschle, U., W. K. Meyer und H. J. Thiesen (1995). "Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters." Mol Cell Biol **15**(4): 1907-1914.

Ding, G., P. Lorenz, M. Kreutzer, Y. X. Li und H. J. Thiesen (2009). "SysZNF: the C2H2 zinc finger gene database." Nucleic Acids Research **37**: D267-D273.

Dole, M., L. L. Mack und R. L. Hines (1968). "Molecular Beams of Macroions." Journal of Chemical Physics **49**(5): 2240-2249.

Doyle, J. M., J. Gao, J. Wang, M. Yang und P. R. Potts (2010). "MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases." Mol Cell **39**(6): 963-974.

Eickner, T., P. Lorenz, M. Glocker und H.-J. Thiesen (in Vorbereitung).

Eickner, T., S. Mikkat, P. Lorenz, M. Sklorz, R. Zimmermann, H. J. Thiesen und M. O. Glocker (2011). "Systematic studies on TiO<sub>2</sub>-based phosphopeptide enrichment procedures upon in-solution and in-gel digestions

of proteins. Are there readily applicable protocols suitable for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometrybased phosphopeptide stability estimations?" European Journal of Mass Spectrometry **17**(5): 507-523.

Emerson, R. O. und J. H. Thomas (2009). "Adaptive Evolution in Zinc Finger Transcription Factors." PLoS Genetics **5**(1): e1000325.

Frangioni, J. V. und B. G. Neel (1993). "Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione-S-Transferase (Pgex) Fusion Proteins." Analytical Biochemistry **210**(1): 179-187.

Friedman, J. R., W. J. Fredericks, D. E. Jensen, D. W. Speicher, X. P. Huang, E. G. Neilson und F. J. Rauscher, 3rd (1996). "KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain." Genes Dev **10**(16): 2067-2078.

Gebelein, B. und R. Urrutia (2001). "Sequence-specific transcriptional repression by KS1, a multiple-zinc-finger-Kruppel-associated box protein." Mol Cell Biol **21**(3): 928-939.

Glocker, M. O., C. Borchers, W. Fiedler, D. Suckau und M. Przybylski (1994). "Molecular Characterization of Surface-Topology in Protein Tertiary Structures by Amino-Acylation and Mass-Spectrometric Peptide-Mapping." Bioconjugate Chemistry **5**(6): 583-590.

Goddard, A. D., J. Borrow, P. S. Freemont und E. Solomon (1991). "Characterization of a Zinc Finger Gene Disrupted by the T(15,17) in Acute Promyelocytic Leukemia." Science **254**(5036): 1371-1374.

Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen und H. Bujard (1995). "Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian-Cells." Science **268**(5218): 1766-1769.

Grewal, S. I. S. und S. T. Jia (2007). "Heterochromatin revisited." Nature Reviews Genetics **8**(1): 35-46.

Groner, A. C., S. Meylan, A. Ciuffi, N. Zangger, G. Ambrosini, N. Denervaud, P. Bucher und D. Trono (2010). "KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading." PLoS Genet **6**(3): e1000869.

Gu, C. G., G. Tsaprailis, L. Brechi und V. H. Wysocki (2000). "Selective gas-phase cleavage at the peptide bond terminal to aspartic acid in fixed-charge derivatives of asp-containing peptides." Analytical Chemistry **72**(23): 5804-5813.

Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-251.

Happersberger, H. P., C. Cowgill und M. O. Glocker (2002). "Structural characterization of monomeric folding intermediates of recombinant human macrophage-colony stimulating factor beta (rhM-CSF beta) by chemical trapping, chromatographic separation and mass spectrometric peptide mapping." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **782**(1-2): 393-404.

Harrison, P. M. und P. Arosio (1996). "Ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation." Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1275**(3): 161-203.

Heitner, J. C., C. Koy, M. Kreutzer, B. Gerber, T. Reimer und M. O. Glocker (2006). "Differentiation of HELLP patients from healthy pregnant women by proteome analysis--on the way towards a clinical marker set." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **840**(1): 10-19.

Hengen, P. N. (1995). "Methods and Reagents - Purification of His-Tag Fusion Proteins from Escherichia-Coli." Trends in Biochemical Sciences **20**(7): 285-286.

Hochuli, E., W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz und D. Stuber (1988). "Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent." Bio-Technology **6**(11): 1321-1325.

- Hsu, N. Y., W. B. Yang, C. H. Wong, Y. C. Lee, R. T. Lee, Y. S. Wang und C. H. Chen (2007). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of polysaccharides with 2',4',6'-trihydroxyacetophenone as matrix." Rapid Communications in Mass Spectrometry **21**(13): 2137-2146.
- Huntley, S., D. M. Baggot, A. T. Hamilton, M. Tran-Gyamfi, S. Yang, J. Kim, L. Gordon, E. Branscomb und L. Stubbs (2006). "A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc finger genes: Insights into the evolutionary history of a large family of transcriptional repressors." Genome Research **16**: 669-677.
- Hutchins, J. R. A., Y. Toyoda, B. Hegemann, I. Poser, J. K. Heriche, M. M. Sykora, M. Augsburg, O. Hudecz, B. A. Buschhorn, J. Bulkescher, C. Conrad, D. Comartin, A. Schleiffer, M. Sarov, A. Pozniakovsky, M. M. Slabicki, S. Schloissnig, I. Steinmacher, M. Leuschner, A. Ssykor, S. Lawo, L. Pelletier, H. Stark, K. Nasmyth, J. Ellenberg, R. Durbin, F. Buchholz, K. Mechtler, A. A. Hyman und J. M. Peters (2010). "Systematic Analysis of Human Protein Complexes Identifies Chromosome Segregation Proteins." Science **328**(5978): 593-599.
- Imanishi, S. Y., V. Kochin, S. E. Ferraris, A. de Thonel, H. M. Pallari, G. L. Corthals und J. E. Eriksson (2007). "Reference-facilitated phosphoproteomics - Fast and reliable phosphopeptide validation by microLC-ESI-Q-TOF MS/MS." Molecular & Cellular Proteomics **6**(8): 1380-1391.
- Iribarne, J. V. und B. A. Thomson (1976). "Evaporation of Small Ions from Charged Droplets." Journal of Chemical Physics **64**(6): 2287-2294.
- Iuchi, S. (2001). "Three classes of C2H2 zinc finger proteins." Cellular and Molecular Life Sciences **58**(4): 625-635.
- Ivanov, A. V., H. Z. Peng, V. Yurchenko, K. L. Yap, D. G. Negorev, D. C. Schultz, E. Psulkowski, W. J. Fredericks, D. E. White, G. G. Maul, M. J. Sadofsky, M. M. Zhou und F. J. Rauscher (2007). "PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing." Molecular Cell **28**(5): 823-837.
- Jaskolla, T. W., W. D. Lehmann und M. Karas (2008). "4-Chloro-alpha-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12200-12205.
- Just, T., E. Gafumbegete, J. Gramberg, I. Pruffer, S. Mikkat, B. Ringel, H. W. Pau und M. O. Glocker (2006). "Differential proteome analysis of tonsils from children with chronic tonsillitis or with hyperplasia reveals disease-associated protein expression differences." Anal Bioanal Chem **384**(5): 1134-1144.
- Kakizuka, A., W. H. Miller, K. Umesono, R. P. Warrell, S. R. Frankel, V. V. V. S. Murty, E. Dmitrovsky und R. M. Evans (1991). "Chromosomal Translocation T(15-17) in Human Acute Promyelocytic Leukemia Fuses Rar-Alpha with a Novel Putative Transcription Factor, Pml." Cell **66**(4): 663-674.
- Kang, D., Y. S. Gho, M. Suh und C. Kang (2002). "Highly sensitive and fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." Bulletin of the Korean Chemical Society **23**(11): 1511-1512.
- Karas, M., D. Bachmann und F. Hillenkamp (1985). "Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet-Laser Desorption Mass-Spectrometry of Organic-Molecules." Analytical Chemistry **57**(14): 2935-2939.
- Katayanagi, K., M. Miyagawa, M. Matsushima, M. Ishikawa, S. Kanaya, M. Ikehara, T. Matsuzaki und K. Morikawa (1990). "3-Dimensional Structure of Ribonuclease-H from Escherichia-Coli." Nature **347**(6290): 306-309.
- Kerrien, S., B. Aranda, L. Breuza, A. Bridge, F. Broackes-Carter, C. Chen, M. Duesbury, M. Dumousseau, M. Feuermann, U. Hinz, C. Jandrasits, R. C. Jimenez, J. Khadake, U. Mahadevan, P. Masson, I. Pedruzzi, E. Pfeifferberger, P. Porras, A. Raghunath, B. Roechert, S. Orchard und H. Hermjakob (2012). "The IntAct molecular interaction database in 2012." Nucleic Acids Research **40**(D1): D841-D846.
- Kienbaum, M., C. Koy, H. V. Montgomery, S. Drynda, P. Lorenz, H. Illges, K. Tanaka, J. Kekow, R. Guthke, H. J. Thiesen und M. O. Glocker (2009). "MS characterization of apheresis samples from rheumatoid arthritis patients for the improvement of immunoabsorption therapy - a pilot study." Proteomics Clin Appl **3**(7): 797-809.

- Kim, S. S., Y. M. Chen, E. O'Leary, R. Witzgall, M. Vidal und J. V. Bonventre (1996). "A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15299-15304.
- Kirschstein, T., S. Mikkat, U. Mikkat, R. Bender, M. Kreutzer, R. Schulz, R. Kohling und M. O. Glocker (2012). "The 27-kDa heat shock protein (HSP27) is a reliable hippocampal marker of full development of pilocarpine-induced status epilepticus." Epilepsy Research **98**(1): 35-43.
- Knochenmuss, R. (2006). "Ion formation mechanisms in UV-MALDI." Analyst **131**(9): 966-986.
- Koy, C., S. Mikkat, E. Raptakis, C. Sutton, M. Resch, K. Tanaka und M. O. Glocker (2003). "Matrix-assisted laser desorption/ionization-quadrupole ion trap-time of flight mass spectrometry sequencing resolves structures of unidentified peptides obtained by in-gel tryptic digestion of haptoglobin derivatives from human plasma proteomes." Proteomics **3**(6): 851-858.
- Koy, C., M. Resch, K. Tanaka und M. O. Glocker (2004). "Primary structure details of haptoglobin alpha chain proteins from human plasma samples are resolved by matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight multiple-stage tandem mass spectrometry sequencing." European Journal of Mass Spectrometry **10**(3): 393-399.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lagerwerf, F. M., M. vandeWeert, W. Heerma und J. Haverkamp (1996). "Identification of oxidized methionine in peptides." Rapid Communications in Mass Spectrometry **10**(15): 1905-1910.
- Larsen, M. R., T. E. Thingholm, O. N. Jensen, P. Roepstorff und T. J. D. Jorgensen (2005). "Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns." Molecular & Cellular Proteomics **4**(7): 873-886.
- Le Douarin, B., A. L. Nielsen, J. M. Garnier, H. Ichinose, F. Jeanmougin, R. Losson und P. Chambon (1996). "A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors." EMBO J **15**(23): 6701-6715.
- Lee, Y. K., S. N. Thomas, A. J. Yang und D. K. Ann (2007). "Doxorubicin down-regulates Kruppel-associated box domain-associated protein 1 sumoylation that relieves its transcription repression on p21(WAF1/CIP1) in breast cancer MCF-7 cells." Journal of Biological Chemistry **282**(3): 1595-1606.
- Li, X., Y. K. Lee, J. C. Jeng, Y. Yen, D. C. Schultz, H. M. Shih und D. K. Ann (2007). "Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression." J Biol Chem **282**(50): 36177-36189.
- Li, X., H. H. Lin, H. Chen, X. Xu, H. M. Shih und D. K. Ann (2010). "SUMOylation of the transcriptional co-repressor KAP1 is regulated by the serine and threonine phosphatase PP1." Sci Signal **3**(119): ra32.
- Looman, C. (2003). The ABC of KRAB Zinc Finger Proteins. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology. **864**.
- Looman, C., L. Hellman und M. Abrink (2004). "A novel Kruppel-associated box identified in a panel of mammalian zinc finger proteins." Mammalian Genome **15**(1): 35-40.
- Lorenz, P., B. F. Baker, C. F. Bennett und D. L. Spector (1998). "Phosphorothioate antisense oligonucleotides induce the formation of nuclear bodies." Mol Biol Cell **9**(5): 1007-1023.
- Lorenz, P., S. Dietmann, T. Wilhelm, D. Koczan, S. Autran, S. Gad, G. P. Wen, G. H. Ding, Y. X. Li, M. F. Rousseau-Merck und H. J. Thiesen (2010). "The ancient mammalian KRAB zinc finger gene cluster on human chromosome 8q24.3 illustrates principles of C2H2 zinc finger evolution associated with unique expression profiles in human tissues." BMC Genomics **11**: 206.

Lorenz, P., D. Koczan und H.-J. Thiesen (2001). "Transcriptional Repression Mediated by the KRAB Domain of the Human C2H2 Zinc Finger Protein Kox1/ZNF10 Does Not Require Histone Deacetylation." *Biological Chemistry* **382**: 637-644.

Lorenz, P., R. Pepperkok, W. Ansorge und W. Pyerin (1993). "Cell Biological Studies with Monoclonal and Polyclonal Antibodies against Human Casein Kinase-II Subunit-Beta Demonstrate Participation of the Kinase in Mitogenic Signaling." *Journal of Biological Chemistry* **268**(4): 2733-2739.

Lugtenberg, D., H. G. Yntema, M. J. G. Banning, A. R. Oudakker, H. V. Firth, L. Willatt, M. Raynaud, T. Kleefstra, J. P. Fryns, H. H. Ropers, J. Chelly, C. Moraine, J. Cecz, J. van Reeuwijk, S. B. Nabuurs, B. B. A. de Vries, B. C. J. Hamel, A. P. M. de Brouwer und H. van Bokhoven (2006). "ZNF674: A new Kruppel-associated box-containing zinc-finger gene involved in nonsyndromic X-linked mental retardation." *American Journal of Human Genetics* **78**(2): 265-278.

Madi, A., R. Hoffrogge, B. Blasko, M. O. Glocker und L. Fesus (2004). "Amine donor protein substrates for transglutaminase activity in *Caenorhabditis elegans*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **315**(4): 1064-1069.

Mamyrin, B. A., V. I. Karataev, D. V. Shmikk und V. A. Zagulin (1973). "Mass-Reflectron a New Nonmagnetic Time-of-Flight High-Resolution Mass-Spectrometer." *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki* **64**(1): 82-89.

March, R. E. (2000). "Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century." *International Journal of Mass Spectrometry* **200**(1-3): 285-312.

Maruyama, A., K. Nishikawa, Y. Kawatani, J. Mimura, T. Hosoya, N. Harada, M. Yamamoto und K. Itoh (2011). "The novel Nrf2-interacting factor KAP1 regulates susceptibility to oxidative stress by promoting the Nrf2-mediated cytoprotective response." *Biochem J* **436**(2): 387-397.

Masclé, X. H., D. Germain-Desprez, P. Huynh, P. Estéphan und M. Aubry (2007). "Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain." *J Biol Chem* **282**(14): 10190-10202.

Mathieu, O. und J. Bender (2004). "RNA-directed DNA methylation." *Journal of Cell Science* **117**(21): 4881-4888.

Medugno, L., F. Florio, R. De Cegli, M. Grosso, A. Lupo, P. Costanzo und P. Izzo (2005). "The Kruppel-like zinc-finger protein ZNF224 represses aldolase A gene transcription by interacting with the KAP-1 co-repressor protein." *Gene* **359**: 35-43.

Mikkat, S., C. Koy, M. Ulbrich, B. Ringel und M. O. Glocker (2004). "Mass spectrometric protein structure characterization reveals cause of migration differences of haptoglobin  $\alpha$  chains in two dimensional gel electrophoresis." *Proteomics* **4**: 3921-3932.

Mikkat, S., P. Lorenz, C. Scharf, X. Yu, M. O. Glocker und S. M. Ibrahim (2010). "MS characterization of qualitative protein polymorphisms in the spinal cords of inbred mouse strains." *Proteomics* **10**(5): 1050-1062.

Miller, J., A. D. Mclachlan und A. Klug (1985). "Repetitive Zinc-Binding Domains in the Protein Transcription Factor Iiia from *Xenopus Oocytes*." *Embo Journal* **4**(6): 1609-1614.

Moosmann, P., O. Georgiev, H. J. Thiesen, M. Hagmann und W. Schaffner (1997). "Silencing of RNA polymerases II and III-dependent transcription by the KRAB protein domain of KOX1, a Kruppel-type zinc finger factor." *Biol Chem* **378**(7): 669-677.

Nagaraj, N., J. R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, J. Kelso, S. Paabo und M. Mann (2011). "Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line." *Molecular Systems Biology* **7**: 548.

Nielsen, A. L., J. A. Ortiz, J. You, M. Oulad-Abdelghani, R. Khechumian, A. Gansmuller, P. Chambon und R. Losson (1999). "Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family." *EMBO J* **18**(22): 6385-6395.

- Nisole, S., J. P. Stoye und A. Saib (2005). "TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence." Nat Rev Microbiol **3**(10): 799-808.
- Nyborg, J. K. und O. B. Peersen (2004). "That zincing feeling: the effects of EDTA on the behaviour of zinc-binding transcriptional regulators." Biochem Journal **381**: e3-e4.
- O'Geen, H., S. L. Squazzo, S. Iyengar, K. Blahnik, J. L. Rinn, H. Y. Chang, R. Green und P. J. Farnham (2007). "Genome-Wide Analysis of KAP1 Binding Suggests Autoregulation of KRAB-ZNFs." PLoS Genetics **3**(6): e89.
- Olsen, J. V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen und M. Mann (2006). "Global, In Vivo, and Site-specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks." Cell **127**: 635-648.
- Pappin, D. J. C., P. Hojrup und A. J. Bleasby (1993). "Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting." Current Biology **3**(6): 327-332.
- Paul, W. und H. Steinwedel (1953). "\*\*Ein Neues Massenspektrometer Ohne Magnetfeld." Zeitschrift Fur Naturforschung Section a-a Journal of Physical Sciences **8**(7): 448-450.
- Pavletich, N. P. und C. O. Pabo (1991). "Zinc Finger DNA Recognition - Crystal-Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1-A." Science **252**(5007): 809-817.
- Peng, H., L. C. Gibson, A. D. Capili, K. L. Borden, M. J. Osborne, S. L. Harper, D. W. Speicher, K. Zhao, R. Marmorstein, T. A. Rock und F. J. Rauscher, 3rd (2007). "The structurally disordered KRAB repression domain is incorporated into a protease resistant core upon binding to KAP-1-RBCC domain." J Mol Biol **370**(2): 269-289.
- Peng, H., A. V. Ivanov, H. J. Oh, Y. F. Lau und F. J. Rauscher, 3rd (2009). "Epigenetic gene silencing by the SRY protein is mediated by a KRAB-O protein that recruits the KAP1 co-repressor machinery." J Biol Chem **284**(51): 35670-35680.
- Peng, H. Z., G. E. Begg, S. L. Harper, J. R. Friedman, D. W. Speicher und F. J. Rauscher (2000). "Biochemical analysis of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repression domain - Spectral, kinetic, and stoichiometric properties of the KRAB.KAP-1 complex." Journal of Biological Chemistry **275**(24): 18000-18010.
- Peng, H. Z., G. E. Begg, D. C. Schultz, J. R. Friedman, D. E. Jensen, D. W. Speicher und F. J. Rauscher (2000). "Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: A model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions." Journal of Molecular Biology **295**(5): 1139-1162.
- Pinkse, M. W. H., P. M. Uitto, M. J. Hilhorst, B. Ooms und A. J. R. Heck (2004). "Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-nanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns." Analytical Chemistry **76**(14): 3935-3943.
- Rambaud, J., J. Desroches, A. Balsalobre und J. Drouin (2009). "TIF1beta/KAP-1 is a coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77." J Biol Chem **284**(21): 14147-14156.
- Reymond, A., G. Meroni, A. Fantozzi, G. Merla, S. Cairo, L. Luzi, D. Riganelli, E. Zanaria, S. Messali, S. Cainarca, A. Guffanti, S. Minucci, P. G. Pelicci und A. Ballabio (2001). "The tripartite motif family identifies cell compartments." EMBO J **20**(9): 2140-2151.
- Roepstorff, P. und J. Fohlman (1984). "Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass-Spectra of Peptides." Biomedical Mass Spectrometry **11**(11): 601-601.
- Rower, C., J. P. Vissers, C. Koy, M. Kipping, M. Hecker, T. Reimer, B. Gerber, H. J. Thiesen und M. O. Glocker (2009). "Towards a proteome signature for invasive ductal breast carcinoma derived from label-free nanoscale LC-MS protein expression profiling of tumorous and glandular tissue." Anal Bioanal Chem **395**(8): 2443-2456.
- Ryan, R. F., D. C. Schultz, K. Ayyanathan, P. B. Singh, J. R. Friedman, W. J. Fredericks und F. J. Rauscher (1999). "KAP-1 Corepressor Protein Interacts and Colocalizes with Heterochromatic and Euchromatic HP1 Proteins: a Potential Role for Krüppel-Associated Box-Zinc Finger Proteins in Heterochromatin-Mediated Gene Silencing." Molecular and Cellular Biology **19**(6): 4366-4378.

Scherneck, S., M. Nestler, H. Vogel, M. Blüher, M. D. Block, M. B. Diaz, S. Herzig, N. Schulz, M. Teichert, S. Tischer, H. Al-Hasani, R. Kluge, A. Schürmann und H. G. Joost (2009). "Positional Cloning of Zinc Finger Domain Transcription Factor Zfp69, a Candidate Gene for Obesity-Associated Diabetes Contributed by Mouse Locus Nidd/SJL." PLoS Genetics **5**(7): e1000541.

Schmidt, T. G. und A. Skerra (2007). "The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins." Nat Protoc **2**(6): 1528-1535.

Schmidt, T. G. M. und A. Skerra (1993). "The Random Peptide Library-Assisted Engineering of a C-Terminal Affinity Peptide, Useful for the Detection and Purification of a Functional Ig Fv Fragment." Protein Engineering **6**(1): 109-122.

Schuh, R., W. Aicher, U. Gaul, S. Cote, A. Preiss, D. Maier, E. Seifert, U. Nauber, C. Schröder, R. Kemler und H. Jackle (1986). "A Conserved Family of Nuclear Proteins Containing Structural Elements of the Finger Protein Encoded by Kruppel, a Drosophila Segmentation Gene." Cell **47**(6): 1025-1032.

Schultz, D. C., K. Ayyanathan, D. Negorev, G. G. Maul und F. J. Rauscher, 3rd (2002). "SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins." Genes Dev **16**(8): 919-932.

Schultz, D. C., J. R. Friedman und F. J. Rauscher (2001). "Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 $\alpha$  subunit of NuRD." Genes & Development **15**: 428-443.

Schuster-Bockler, B., J. Schultz und S. Rahmann (2004). "HMM Logos for visualization of protein families." BMC Bioinformatics **5**: 7.

Shin, J. H., H. S. Ko, H. Kang, Y. Lee, Y. I. Lee, O. Pletinkova, J. C. Troconso, V. L. Dawson und T. M. Dawson (2011). "PARIS (ZNF746) Repression of PGC-1 $\alpha$  Contributes to Neurodegeneration in Parkinson's Disease." Cell **144**(5): 689-702.

Shoichet, S. A., K. Hoffmann, C. Menzel, U. Trautmann, B. Moser, M. Hoeltzenbein, B. Echenne, M. Partington, H. van Bokhoven, C. Moraine, J. P. Fryns, J. Chelly, H. D. Rott, H. H. Ropers und V. M. Kalscheuer (2003). "Mutations in the ZNF41 gene are associated with cognitive deficits: Identification of a new candidate for X-linked mental retardation." American Journal of Human Genetics **73**(6): 1341-1354.

Sjöbring, U., L. Björck und W. Kastern (1991). "Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties." J Biol Chem **266**(1): 399-405.

Skerra, A. (2003). "Das Strep-tag als molekulares Werkzeug zur Hochdurchsatz-Proteinreinigung in der Proteomforschung." Biospektrum **2**: 189-192.

Stewart, I. I. und G. Horlick (1996). "Developments in the electrospray mass spectrometry of inorganic species." Trac-Trends in Analytical Chemistry **15**(2): 80-90.

Sun, S., H. Ma, G. Han, R. Wu, H. Zou und Y. Liu (2011). "Efficient enrichment and identification of phosphopeptides by cerium oxide using on-plate matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis." Rapid Commun Mass Spectrom **25**(13): 1862-1868.

Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida und T. Yoshida (1988). "Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **2**(8): 151-153.

Taylor, G. (1964). "Disintegration of Water Drops in Electric Field." Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences **280**(1380): 383-397.

Thiesen, H. J. (1990). "Multiple genes encoding zinc finger domains are expressed in human T cells." New Biol **2**(4): 363-374.

Thingholm, T. E., T. J. Jørgensen, O. N. Jensen und M. R. Larsen (2006). "Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide." Nat Protoc **1**(4): 1929-1935.

- Thiruvengkatachari, R., S. Vigneswaran und I. S. Moon (2008). "A review on UV/TiO<sub>2</sub> photocatalytic oxidation process." Korean Journal of Chemical Engineering **25**(1): 64-72.
- Thomas, H., J. Havlis, J. Peychl und A. Shevchenko (2004). "Dried-droplet probe preparation on AnchorChip targets for navigating the acquisition of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectra by fluorescence of matrix/analyte crystals." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(9): 923-930.
- Tong, J. K., C. A. Hassig, G. R. Schnitzler, R. E. Kingston und S. L. Schreiber (1998). "Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex." Nature **395**(6705): 917-921.
- Underhill, C., M. S. Qutob, S. P. Yee und J. Torchia (2000). "A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1." J Biol Chem **275**(51): 40463-40470.
- Urrutia, R. (2003). "KRAB-containing zinc-finger repressor proteins." Genome Biology **4**(10): 231.
- Vallee, B. L. und T. L. Coombs (1959). "Complex Formation of 1,10-Phenanthroline with Zinc Ions and the Zinc of Alcohol Dehydrogenase of Horse Liver." Journal of Biological Chemistry **234**(10): 2615-2620.
- Venkov, C. D., A. J. Link, J. L. Jennings, D. Plieth, T. Inoue, K. Nagai, C. Xu, Y. N. Dimitrova, F. J. Rauscher und E. G. Neilson (2007). "A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **117**(2): 482-491.
- Vissing, H., W. K. Meyer, L. Aagaard, N. Tommerup und H. J. Thiesen (1995). "Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins." FEBS Lett **369**(2-3): 153-157.
- Wada, K. und T. Kamitani (2006). "Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase." Biochemical and Biophysical Research Communications **339**(1): 415-421.
- Wang, C., A. Ivanov, L. Chen, W. J. Fredericks, E. Seto, F. J. Rauscher, 3rd und J. Chen (2005). "MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation." EMBO J **24**(18): 3279-3290.
- Wang, C. G., F. J. Rauscher, W. D. Cress und J. D. Chen (2007). "Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1." Journal of Biological Chemistry **282**(41): 29902-29909.
- Wang, H., S. Kishita, C. Takemoto, T. Terade, M. Shirouzu und S. Yokoyama "Crystal structure of MS1043." To be published.
- Wessel, D. und U. I. Flugge (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." Anal Biochem **138**(1): 141-143.
- Wiza, J. L. (1979). "Microchannel Plate Detectors." Nuclear Instruments & Methods **162**(1-3): 587-601.
- Wolfe, S. A., L. Neklodova und C. O. Pabo (2000). "DNA recognition by Cys(2)His(2) zinc finger proteins." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **29**: 183-212.
- Wolff, M. M. und W. E. Stephens (1953). "A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion." Review of Scientific Instruments **24**(8): 616-617.
- Wu, K. K. (2006). "Analysis of protein-DNA binding by streptavidin-agarose pulldown." Methods Mol Biol **338**: 281-290.
- Wu, Y. J. und C. T. Noguchi (1991). "Activation of Globin Gene-Expression by Cdnas from Induced K562 Cells - Evidence for Involvement of Ferritin in Globin Gene-Expression." Journal of Biological Chemistry **266**(26): 17566-17572.
- Yang, B., S. M. O'Herrin, J. Wu, S. Reagan-Shaw, Y. Ma, K. M. Bhat, C. Gravekamp, V. Setaluri, N. Peters, F. M. Hoffmann, H. Peng, A. V. Ivanov, A. J. Simpson und B. J. Longley (2007). "MAGE-A, mMAGE-b, and MAGE-C

proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines." Cancer Res **67**(20): 9954-9962.

Yu, W., J. E. Vath, M. C. Huberty und S. A. Martin (1993). "Identification of the Facile Gas-Phase Cleavage of the Asp Pro and Asp Xxx Peptide-Bonds in Matrix-Assisted Laser-Desorption Time-of-Flight Mass-Spectrometry." Analytical Chemistry **65**(21): 3015-3023.

Ziv, Y., D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D. C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek und Y. Shiloh (2006). "Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway." Nat. Cell Biol. **8**(8): 870-876.

## 6 ANHANG

### 6.1 SDS-Gele und Listen der identifizierten Proteine

#### 6.1.1 Gel 1

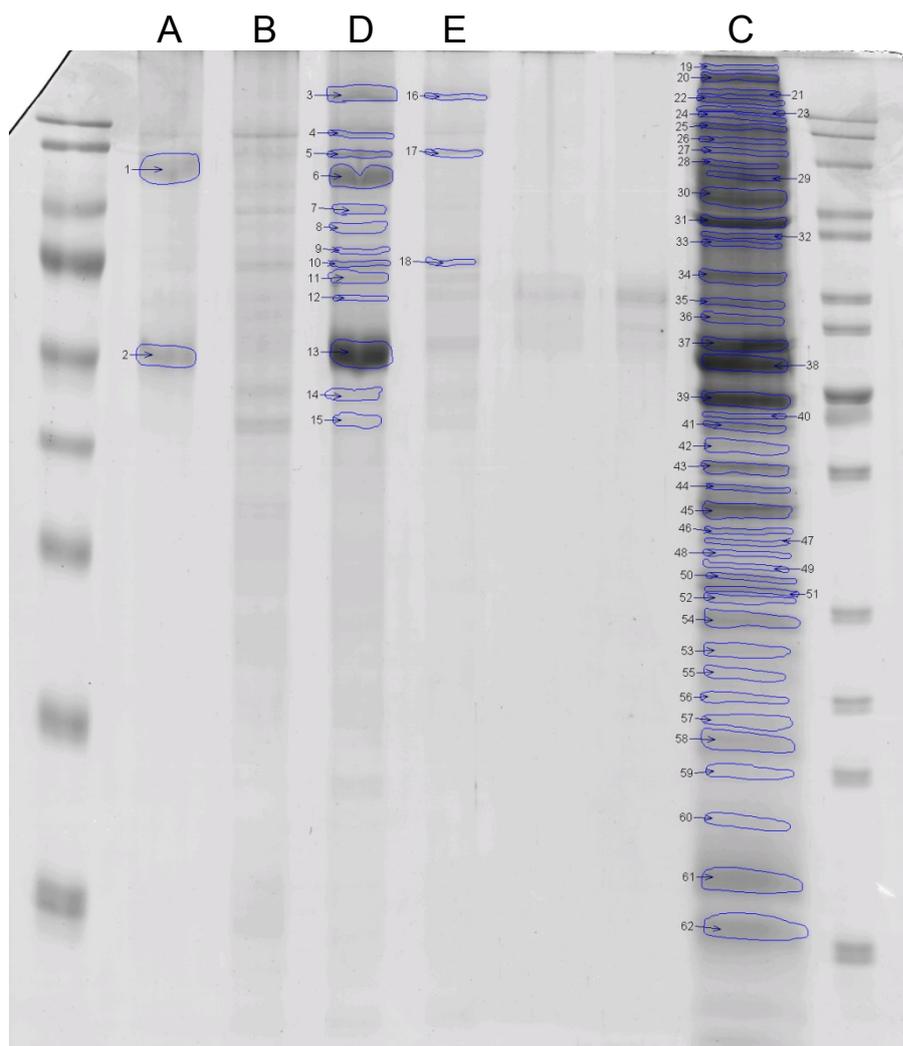


Abbildung 54: SDS-PAGE Analyse der Proteinextrakte (siehe Seite 53). Die Bezeichnung der Spuren ist identisch mit der auf Seite 53 dargestellten. Markerbanden links: 170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17, 11 kDa; rechts: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa.

## 6.1.2 Liste der identifizierten Proteine des Gel 1

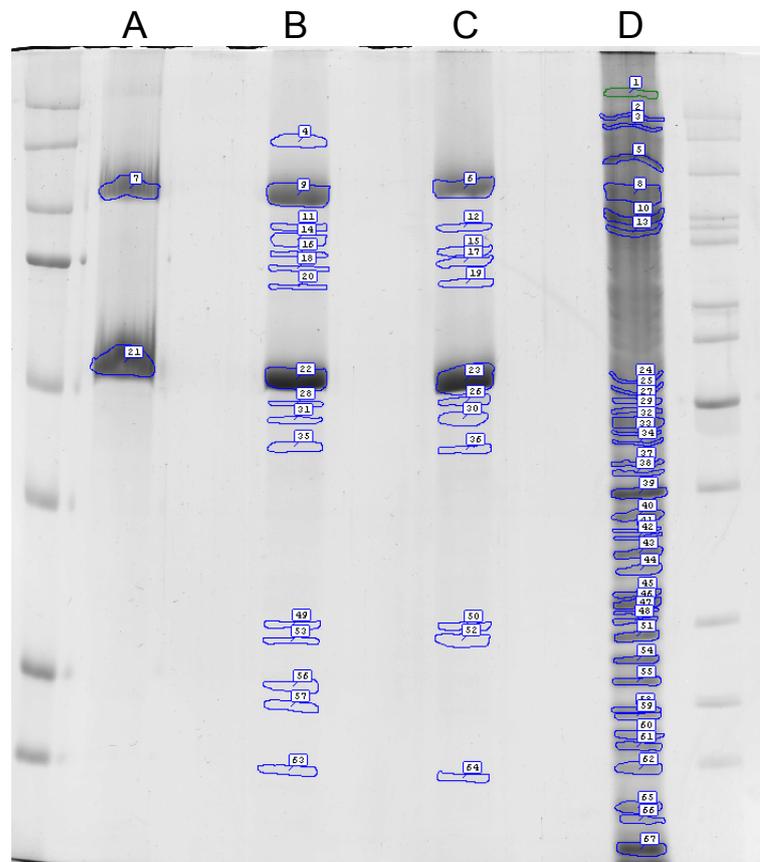
**Tabelle 7: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 1. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 1. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da.**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name   | Mowse Score | Ionsignale zugeordnet/ gekennzeichnet | Sequenz-abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|--|-------------|---------------------------------------|-----------------------|------------|
| 1          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta (Nuclea           | 255         | 21/25                                 | 24                    | 90130      |
| 2          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta                   | 117         | 9/10                                  | 12                    | 51979      |
| 3          | Q7Z561_HUMAN  | Acetyl-CoA carboxylase1                                    | 310         | 41/43                                 | 19                    | 267095     |
| 4          | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                      | 120         | 12/18                                 | 15                    | 113588     |
| 5          | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial [precursor]            | 364         | 37/44                                 | 32                    | 130293     |
| 5          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta (Nuclea           | 51          | 7/44                                  | 13                    | 90130      |
| 6          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta (Nuclea           | 239         | 31/71                                 | 37                    | 90130      |
| 7          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta (Nuclea           | 190         | 14/38                                 | 18                    | 90130      |
| 7          | HS90B_HUMAN   | Heat shock protein HSP 90-beta                             |             | 15/38                                 | 21                    | 83423      |
| 8          | POGK_HUMAN    | Pogo transposable element with KRAB domain                 | 126         | 15/26                                 | 19                    | 69798      |
| 8          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta (Nuclea           | 72          | 10/26                                 | 12                    | 90130      |
| 9          | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein [Precursor]               | 160         | 20/53                                 | 35                    | 72402      |
| 9          | Q8WXQ7_HUMAN  | Propionyl-CoA carboxylase alpha subunit                    | 78          | 11/33                                 | 15                    | 80635      |
| 9          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta (Nuclea           | 62          | 8/22                                  | 12                    | 90130      |
| 9          | MCCA_HUMAN    | Methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitocl       | 55          | 7/22                                  | 13                    | 80935      |
| 10         | Q8WXQ7_HUMAN  | Propionyl-CoA carboxylase alpha subunit                    | 120         | 16/40                                 | 20                    | 80635      |
| 10         | GRP75_HUMAN   | Stress-70 protein, mitochondrial [Precursor]               | 66          | 9/24                                  | 14                    | 73920      |
| 11         | Q96HX3_HUMAN  | Similar to ribophorin I                                    | 169         | 19/54                                 | 43                    | 64656      |
| 12         | K2C1_HUMAN    | Keratin, type II cytoskeletal 1 (67 kDa cytoke             | 76          | 25                                    | 13                    | 66018      |
| 13         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta (Nuclea           | 96          | 13/26                                 | 13                    | 51979      |
| 15         | Q96HG5_HUMAN  | Actin, beta  | 90          | 11/49                                 | 33                    | 41320      |
| 16         | Q6XDA8_HUMAN  | Acetyl-CoA carboxylase alpha                               | 317         | 35/38                                 | 16                    | 265554     |
| 17         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial [precursor]            | 432         | 36/37                                 | 35                    | 130293     |
| 18         | PCCA_HUMAN    | Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial       | 197         | 31/32                                 | 26                    | 77932      |
| 18         | GRP75_HUMAN   | Stress-70 protein, mitochondrial [Precursor]               | 74          | 11/32                                 | 18                    | 73920      |
| 20         | Plectin       | Eine Unterscheidung der Plektine 1,2,3,6,7,8,10,11 war     | >300        | 122/157                               | 22                    | >500000    |
| 20         | PRKDC_HUMAN   | DNA-dependent protein kinase catalytic subunit             | 88          | 24/34                                 | 5                     | 473749     |
| 22         | MYH9_HUMAN    | Myosin-9   | 83          | 22/42                                 | 12                    | 227515     |
| 22         | U520_HUMAN    | U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase        | 63          | 12/20                                 | 5                     | 246006     |
| 23         | U520_HUMAN    | U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase        | 76          | 33/107                                | 19                    | 246006     |
| 23         | MYH9_HUMAN    | Myosin-9   | 70          | 37/107                                | 19                    | 227515     |
| 24         | Q24JU4_HUMAN  | Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 the | 102         | 40/103                                | 25                    | 166768     |
| 25         | SMRCD_HUMAN   | SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent re       | 66          | 15/46                                 | 13                    | 118098     |
| 26         | DHX9_HUMAN    | ATP-dependent RNA helicase A                               | 157         | 28/69                                 | 22                    | 142103     |
| 27         | MCM2_HUMAN    | DNA replication licensing factor MCM2                      | 93          | 20/78                                 | 22                    | 102516     |
| 27         | Q75M85_HUMAN  | Hypothetical protein GTF2I                                 | 72          | 18/78                                 | 23                    | 108415     |
| 30         | ACTN4_HUMAN   | Alpha-actinin-4  | 155         | 26/109                                | 29                    | 105245     |
| 30         | PA24A_HUMAN   | Cytosolic phospholipase A2                                 | 86          | 20/109                                | 30                    | 85669      |
| 30         | ACTN4_HUMAN   | Alpha-actinin-4  | 66          | 17/88                                 | 17                    | 105245     |
| 30         | TRI56_HUMAN   | Tripartite motif-containing protein 56                     | 67          | 14/71                                 | 16                    | 81488      |
| 31         | HS90A_HUMAN   | Heat shock protein HSP 90-alpha                            | 211         | 31/68                                 | 43                    | 84875      |
| 31         | HS90B_HUMAN   | Heat shock protein HSP 90-beta                             | 215         | 31/68                                 | 40                    | 83423      |
| 34         | HSP7C_HUMAN   | Heat shock cognate 71 kDa protein                          | 162         | 29/116                                | 50                    | 71082      |
| 34         | Q6PD71_HUMAN  | Hypothetical protein                                       | 137         | 33/116                                | 48                    | 73333      |
| 34         | HNRPM_HUMAN   | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M                  | 120         | 27/87                                 | 38                    | 77618      |
| 35         | Q2TU64_HUMAN  | PIG48  | 93          | 13/42                                 | 25                    | 61110      |
| 37         | VIME_HUMAN    | Vimentin   | 244         | 23/40                                 | 50                    | 53545      |
| 38         | TBB2C_HUMAN   | Tubulin beta-2C chain                                      | 162         | 17/51                                 | 41                    | 50255      |
| 38         | TBAK_HUMAN    | Tubulin alpha-ubiquitous chain                             | 74          | 10/51                                 | 28                    | 50804      |
| 39         | Q6IQ15_HUMAN  | EEF1A1 protein   | 85          | 12/55                                 | 32                    | 48181      |
| 40         | K1C18_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 18                            | 80          | 13/73                                 | 37                    | 47897      |
| 41         | Q96HG5_HUMAN  | Actin, beta [Fragment]                                     | 100         | 15/102                                | 44                    | 41321      |
| 41         | K1C18_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 18                            | 90          | 17/102                                | 45                    | 47897      |
| 41         | Q2VY69_HUMAN  | KRAB-domain-containing zinc finger protein                 | 65          | 15/71                                 | 24                    | 71198      |
| 43         | ALDOA_HUMAN   | Fructose-bisphosphate aldolase A                           | 144         | 14/44                                 | 44                    | 39720      |
| 43         | Q5VXV2_HUMAN  | SET translocation  | 69          | 7/30                                  | 22                    | 31114      |
| 44         | NPM_HUMAN     | Nucleophosmin  | 74          | 10/53                                 | 27                    | 32726      |
| 45         | G3P_HUMAN     | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                   | 157         | 17/66                                 | 56                    | 36070      |
| 45         | APEX1_HUMAN   | DNA- lyase   | 81          | 11/66                                 | 37                    | 35800      |
| 46         | Q59GX9_HUMAN  | Ribosomal protein L5 variant [Fragment]                    | 106         | 12/37                                 | 32                    | 35409      |

**Tabelle 8: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 1. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 1. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da (Fortsetzung der Tabelle 7).**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name  | Mowse Score | Ionsignale zugeordnet/ gekennzeichnet | Sequenzabdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|---|-------------|---------------------------------------|----------------------|------------|
| 47         | Q59GX9_HUMAN  | Ribosomal protein L5 variant [Fragment]               | 71          | 13/72                                 | 31                   | 35409      |
| 47         | Q3MIB7_HUMAN  | HNRPA1 protein  | 65          | 9/72                                  | 37                   | 29482      |
| 48         | Q6IPF2_HUMAN  | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, isoform a | 89          | 11/58                                 | 37                   | 34180      |
| 49         | RS3A_HUMAN    | 40S ribosomal protein S3a                             | 96          | 8/14                                  | 24                   | 30023      |
| 51         | RS3A_HUMAN    | 40S ribosomal protein S3a                             | 149         | 17/63                                 | 66                   | 26842      |
| 52         | RS3A_HUMAN    | 40S ribosomal protein S3a                             | 182         | 18/53                                 | 69                   | 26842      |
| 53         | RS4X_HUMAN    | 40S ribosomal protein S4, X isoform                   | 130         | 15/57                                 | 38                   | 29676      |
| 54         | RL13_HUMAN    | 60S ribosomal protein L13                             | 69          | 6/17                                  | 33                   | 24173      |
| 57         | PRDX1_HUMAN   | Peroxiredoxin-1                                       | 140         | 10/23                                 | 40                   | 22324      |
| 58         | RS9_HUMAN     | 40S ribosomal protein S9                              | 63          | 8/37                                  | 24                   | 22504      |
| 58         | RS5_HUMAN     | 40S ribosomal protein S5                              | 63          | 6/29                                  | 21                   | 22902      |
| 59         | RL17_HUMAN    | 60S ribosomal protein L17                             | 64          | 9/54                                  | 40                   | 21480      |
| 60         | RL26_HUMAN    | 60S ribosomal protein L26                             | 64          | 9/42                                  | 39                   | 17248      |
| 61         | RS18_HUMAN    | 40S ribosomal protein S18                             | 102         | 11/36                                 | 38                   | 17708      |
| 62         | RS16_HUMAN    | 40S ribosomal protein S16                             | 126         | 12/49                                 | 66                   | 16418      |
| 62         | RS19_HUMAN    | 40S ribosomal protein S19                             | 81          | 9/49                                  | 57                   | 15919      |

### 6.1.3 Gel 2



**Abbildung 55: SDS-PAGE Analyse der Proteinextrakte (siehe Seite 55). Die Bezeichnung der Spuren ist identisch mit der auf Seite 55 dargestellten. Markerbanden links: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa; rechts: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa.**

## 6.1.4 Liste der identifizierten Proteine des Gel 2

**Tabelle 9: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 2. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 2. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war.**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name  | Mowse Score | Ionsignale zugeordnet/<br>gekennzeichnet | Sequenz-<br>abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|---|-------------|--|---------------------------|------------|
| 2          | IQGA1_HUMAN   | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1           | 401         | 52/70                                    | 38                        | 189761     |
| 3          | Q7Z5T5_HUMAN  | EIF3S10 protein [Fragment]                          | 98          | 16/34                                    | 18                        | 97203      |
| 3          | Q15778_HUMAN  | P167 [Fragment]                                     | 53          | 12693                                    | 18                        | 56658      |
| 4          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 95          | 27/124                                   | 28                        | 90130      |
| 4          | Q63ZY4_HUMAN  | ATXN2L protein                                      | 144         | 32/124                                   | 34                        | 112307     |
| 5          | HNRPU_HUMAN   | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U           | 128         | 33/137                                   | 42                        | 80407      |
| 8          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 89          | 21/84                                    | 23                        | 90130      |
| 10         | ACTN1_HUMAN   | Alpha-actinin-1                                     | 257         | 55/156                                   | 57                        | 103058     |
| 10         | ACTN4_HUMAN   | Alpha-actinin-4                                     | 255         | 53/156                                   | 56                        | 104854     |
| 10         | EF2_HUMAN     | Elongation factor 2                                 | 69          | 15/73                                    | 24                        | 96115      |
| 10         | Q5VYM0_HUMAN  | Valosin-containing protein                          | 74          | 15/58                                    | 23                        | 89950      |
| 11         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 103         | 33/147                                   | 30                        | 90130      |
| 11         | HS90A_HUMAN   | Heat shock protein HSP 90-alpha                     | 87          | 27/147                                   | 42                        | 84875      |
| 12         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 91          | 26/121                                   | 27                        | 90130      |
| 13         | TERA_HUMAN    | Transitional endoplasmic reticulum ATPase           | 345         | 41/59                                    | 44                        | 89819      |
| 14         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 70          | 25/128                                   | 25                        | 90130      |
| 14         | Q68CX9_HUMAN  | Hypothetical protein DKFZp686K03205 [Fragment]      | 64          | 17/128                                   | 30                        | 67428      |
| 15         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein [Precursor]        | 71          | 18/135                                   | 33                        | 72402      |
| 15         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 66          | 25/135                                   | 28                        | 90130      |
| 15         | POGK_HUMAN    | Pogo transposable element with KRAB domain          | 58          | 26/135                                   | 30                        | 69798      |
| 16         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 60          | 14/71                                    | 20                        | 90130      |
| 16         | POGK_HUMAN    | Pogo transposable element with KRAB domain          | 58          | 16/72                                    | 22                        | 69798      |
| 17         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein [Precursor]        | 184         | 30/107                                   | 43                        | 72402      |
| 17         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 76          | 18/77                                    | 22                        | 90130      |
| 18         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein [Precursor]        | 182         | 21/47                                    | 35                        | 72402      |
| 18         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 67          | 9/26                                     | 14                        | 90130      |
| 19         | HSP7C_HUMAN   | Heat shock cognate 71 kDa protein                   | 126         | 16/51                                    | 36                        | 71082      |
| 19         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 78          | 14/51                                    | 18                        | 90130      |
| 20         | Q96IS6_HUMAN  | HSPA8 protein [Fragment]                            | 108         | 26/125                                   | 47                        | 64804      |
| 20         | ZNF8_HUMAN    | Zinc finger protein 8                               | 76          | 19/125                                   | 33                        | 66241      |
| 20         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 50          | 20/125                                   | 23                        | 51979      |
| 25         | TBB2C_HUMAN   | Tubulin beta-2C chain                               | 164         | 23/65                                    | 46                        | 50255      |
| 25         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 60          | 15/65                                    | 15                        | 90130      |
| 26         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-cha | 171         | 22/57                                    | 44                        | 53852      |
| 26         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 61          | 10/29                                    | 13                        | 51979      |
| 26         | Q6ZSA8_HUMAN  | CDNA FLJ45684 fis, clone FCBBF3005160               | 62          | 6/57                                     | 50                        | 13983      |
| 28         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-cha | 89          | 13/49                                    | 26                        | 53852      |
| 28         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 76          | 16/49                                    | 17                        | 51979      |
| 30         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 87          | 13/31                                    | 14                        | 51979      |
| 31         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 80          | 15/43                                    | 16                        | 51979      |
| 32         | IF4A1_HUMAN   | Eukaryotic initiation factor 4A-I                   | 109         | 20/78                                    | 49                        | 46353      |
| 33         | Q6PIN5_HUMAN  | PA2G4 protein [Fragment]                            | 183         | 25/61                                    | 55                        | 41996      |
| 34         | RL3_HUMAN     | 60S ribosomal protein L3                            | 121         | 22/80                                    | 45                        | 46234      |
| 34         | EFTU_HUMAN    | Elongation factor Tu, mitochondrial [Precursor]     | 106         | 16/80                                    | 42                        | 49852      |
| 35         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 94          | 9/13                                     | 11                        | 51979      |
| 36         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta            | 86          | 16/42                                    | 17                        | 51979      |
| 36         | Q96HG5_HUMAN  | Actin, beta   | 63          | 8/42                                     | 25                        | 41321      |
| 37         | SET_HUMAN     | Protein SET   | 88          | 10/55                                    | 36                        | 33469      |
| 37         | Q53GE3_HUMAN  | Pyruvate dehydrogenase alpha 1 variant [Fragment]   | 72          | 12/55                                    | 24                        | 43873      |
| 38         | RSSA_HUMAN    | 40S ribosomal protein SA                            | 132         | 15/45                                    | 51                        | 32816      |
| 39         | Q6FHZ5_HUMAN  | SET protein   | 115         | 14/80                                    | 40                        | 32115      |
| 39         | RT09_HUMAN    | 28S ribosomal protein S9, mitochondrial [Precursor] | 67          | 14/80                                    | 37                        | 46022      |
| 39         | RT29_HUMAN    | Mitochondrial 28S ribosomal protein S29             | 61          | 9/52                                     | 29                        | 45880      |

**Tabelle 10: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 2. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 2. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da (Fortsetzung Tabelle 9) Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war.**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name  | Mowse Score | Ionsignale zugeordnet/<br>gekennzeichnet | Sequenz-abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|---|-------------|--|-----------------------|------------|
| 40         | NPM_HUMAN     | Nucleophosmin   | 83          | 12/57                                    | 46                    | 32726      |
| 40         | Q53F64_HUMAN  | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein AB isoform a    | 61          | 8/45                                     | 21                    | 36087      |
| 41         | IF32_HUMAN    | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2    | 68          | 9/45                                     | 31                    | 36878      |
| 42         | RLA0_HUMAN    | 60S acidic ribosomal protein P0                         | 121         | 14/57                                    | 57                    | 34423      |
| 42         | PDL1_HUMAN    | PDZ and LIM domain protein 1                            | 64          | 9/57                                     | 37                    | 36374      |
| 43         | RL6_HUMAN     | 60S ribosomal protein L6                                | 100         | 16/83                                    | 44                    | 32634      |
| 43         | Q59GX9_HUMAN  | Ribosomal protein L5 variant [Fragment]                 | 95          | 17/83                                    | 45                    | 35409      |
| 44         | Q3MIB7_HUMAN  | HNRPA1 protein  | 163         | 15/46                                    | 59                    | 29482      |
| 44         | LRC59_HUMAN   | Leucine-rich repeat-containing protein 59               | 104         | 12/46                                    | 43                    | 35308      |
| 45         | Q6FH47_HUMAN  | GNB2L1 protein [Fragment]                               | 155         | 20/109                                   | 81                    | 35511      |
| 45         | RS3A_HUMAN    | 40S ribosomal protein S3a                               | 140         | 27/109                                   | 68                    | 30023      |
| 46         | Q53HU2_HUMAN  | Guanine nucleotide binding protein , beta polypeptide 2 | 100         | 14/88                                    | 56                    | 35545      |
| 46         | RL8_HUMAN     | 60S ribosomal protein L8                                | 76          | 11/88                                    | 45                    | 28104      |
| 46         | Q6IPX5_HUMAN  | Ribosomal protein S2                                    | 74          | 14/88                                    | 42                    | 31562      |
| 46         | RS6_HUMAN     | 40S ribosomal protein S6                                | 64          | 12/88                                    | 40                    | 28834      |
| 47         | RS3_HUMAN     | 40S ribosomal protein S3                                | 181         | 20/65                                    | 71                    | 26842      |
| 48         | RL7A_HUMAN    | 60S ribosomal protein L7a                               | 154         | 18/64                                    | 60                    | 30017      |
| 49         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta                | 73          | 10/20                                    | 73                    | 51979      |
| 51         | RL7_HUMAN     | 60S ribosomal protein L7                                | 99          | 17/92                                    | 54                    | 29264      |
| 51         | Q6I9V5_HUMAN  | SLC25A6 protein   | 93          | 13/75                                    | 47                    | 33073      |
| 51         | Q96IR1_HUMAN  | RPS4X protein [Fragment]                                | 71          | 11/62                                    | 39                    | 27471      |
| 51         | PHB_HUMAN     | Prohibitin  | 70          | 9/62                                     | 39                    | 29842      |
| 52         | ADT2_HUMAN    | ADP/ATP translocase 2                                   | 58          | 7/37                                     | 32                    | 32971      |
| 53         | ADT2_HUMAN    | ADP/ATP translocase 2                                   | 76          | 8/30                                     | 35                    | 32971      |
| 54         | RS8_HUMAN     | 40S ribosomal protein S8                                | 80          | 10/79                                    | 53                    | 24344      |
| 54         | RL13_HUMAN    | 60S ribosomal protein L13                               | 72          | 12/79                                    | 44                    | 24173      |
| 55         | RL19_HUMAN    | 60S ribosomal protein L19                               | 89          | 15/64                                    | 43                    | 23565      |
| 55         | HCD2_HUMAN    | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2                  | 74          | 12/64                                    | 40                    | 27003      |
| 56         | PIMT_HUMAN    | Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase              | 162         | 15/49                                    | 50                    | 24675      |
| 57         | Q96NL5_HUMAN  | CDNA FLJ30656 fis, clone DFNES2000292                   | 102         | 11/68                                    | 47                    | 21972      |
| 58         | Q2HXT7_HUMAN  | QM protein  | 74          | 12/55                                    | 39                    | 25044      |
| 58         | RL15_HUMAN    | 60S ribosomal protein L15                               | 65          | 8/43                                     | 32                    | 24114      |
| 58         | Q5VXV2_HUMAN  | SET translocation                                       | 66          | 7/35                                     | 21                    | 31114      |
| 59         | Q2HXT7_HUMAN  | QM protein  | 79          | 15/62                                    | 40                    | 25044      |
| 60         | Q53G25_HUMAN  | Ribosomal protein S5 variant [Fragment]                 | 78          | 11/61                                    | 38                    | 23121      |
| 60         | RL18_HUMAN    | 60S ribosomal protein L18                               | 70          | 8/50                                     | 40                    | 21604      |
| 60         | RL9_HUMAN     | 60S ribosomal protein L9                                | 67          | 7/50                                     | 35                    | 21964      |
| 60         | RS9_HUMAN     | 40S ribosomal protein S9                                | 60          | 9/50                                     | 32                    | 22504      |
| 61         | RS5_HUMAN     | 40S ribosomal protein S5                                | 81          | 12/59                                    | 46                    | 22902      |
| 61         | RS9_HUMAN     | 40S ribosomal protein S9                                | 74          | 7/59                                     | 37                    | 22502      |
| 61         | RS7_HUMAN     | 40S ribosomal protein S7                                | 66          | 8/59                                     | 43                    | 22113      |
| 62         | RL18A_HUMAN   | 60S ribosomal protein L18a                              | 103         | 14/75                                    | 53                    | 21034      |
| 62         | Q7M4M5_HUMAN  | Ribosomal protein homolog PD-1                          | 74          | 9/75                                     | 51                    | 15591      |
| 62         | RL21_HUMAN    | 60S ribosomal protein L21                               | 67          | 14/75                                    | 53                    | 18479      |
| 63         | FRIH_HUMAN    | Ferritin heavy chain                                    | 72          | 7/42                                     | 40                    | 21252      |
| 64         | FRIH_HUMAN    | Ferritin heavy chain                                    | 89          | 8/43                                     | 57                    | 21252      |
| 65         | RL26_HUMAN    | 60S ribosomal protein L26                               | 88          | 13/85                                    | 59                    | 17248      |
| 65         | RL23A_HUMAN   | 60S ribosomal protein L23a                              | 65          | 10/85                                    | 59                    | 17684      |
| 66         | RS11_HUMAN    | 40S ribosomal protein S11                               | 77          | 13/94                                    | 59                    | 18459      |
| 66         | RL12_HUMAN    | 60S ribosomal protein L12                               | 60          | 8/61                                     | 64                    | 17979      |
| 67         | RS13_HUMAN    | 40S ribosomal protein S13                               | 64          | 10/112                                   | 51                    | 17081      |
| 67         | RS18_HUMAN    | 40S ribosomal protein S18                               | 66          | 13/102                                   | 65                    | 17708      |

### 6.1.5 Gel 3

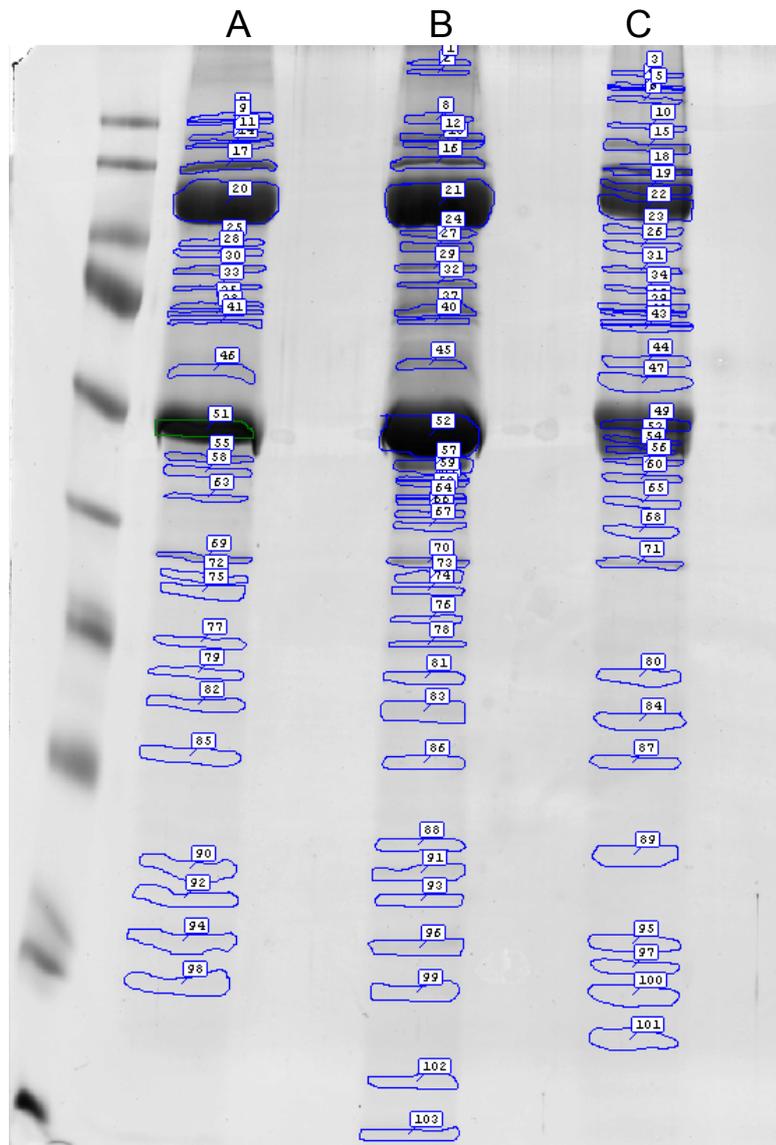


Abbildung 56: SDS-PAGE Analyse (10 %) der Proteinextrakte (siehe Abbildung 24 B). A: vereinigte Fraktionen F2, 3, 4 des iTR-Zellextraktes, 50 mg auf der Säule, kontrastverstärkt. B: vereinigte Fraktionen F3, 4, 5 des iTR-Zellextraktes, 55 mg auf der Säule, kontrastverstärkt (identisch mit Abbildung 24 B). C: mit NEM während Extraktion und Affinitätschromatographie, 45 mg auf der Säule (identisch mit Abbildung 35 B). Markerbanden links: 170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17, 11 kDa.

### 6.1.6 Liste der identifizierten Proteine des Gel 3

Tabelle 11: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 3 durch die Suche gegen die SWALL-Datenbank. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 3. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war.

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name   | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/ gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|--|-------------|---|-----------------------|------------|
| 1          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 83          | 18/95                                   | 26                    | 90261      |
| 1          | DYHC1_HUMAN   | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1                   | 91          | 47/95                                   | 14                    | 534809     |
| 2          | Q5HY54_HUMAN  | Filamin A, alpha                                     | 112         | 29/63                                   | 14                    | 279115     |
| 3          | DYHC1_HUMAN   | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1                   | 65          | 53/125                                  | 15                    | 534809     |
| 4          | CP110_HUMAN   | Centriolin   | 66          | 32/96                                   | 14                    | 269860     |
| 6          | MYH9_HUMAN    | Myosin-9   | 96          | 30/81                                   | 18                    | 227646     |
| 6          | ZNF41_HUMAN   | Zinc finger protein 41                               | 72          | 16/80                                   | 21                    | 96063      |
| 7          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 71          | 17/86                                   | 24                    | 90261      |
| 9          | GNPI_HUMAN    | Glucosamine-6-phosphate isomerase                    | 65          | 10/99                                   | 36                    | 32819      |
| 10         | A0AVL2_HUMAN  | Nebulin-related anchoring protein                    | 81          | 39/128                                  | 21                    | 198115     |
| 11         | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                | 196         | 32/82                                   | 30                    | 113589     |
| 12         | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                | 198         | 36/119                                  | 31                    | 113589     |
| 13         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 94          | 18/95                                   | 26                    | 90261      |
| 13         | B7Z8N7_HUMAN  | cDNA FLJ55440, highly similar to Mus musculus cytop  | 113         | 37/165                                  | 31                    | 147489     |
| 13         | ZN316_HUMAN   | Zinc finger protein 316                              | 76          | 24/165                                  | 26                    | 110422     |
| 14         | ZN316_HUMAN   | Zinc finger protein 316                              | 169         | 18/33                                   | 21                    | 110422     |
| 15         | A8K1R6_HUMAN  | cDNA FLJ77026, highly similar to Homo sapiens ataxin | 84          | 24/107                                  | 23                    | 110360     |
| 15         | A6NFI3_HUMAN  | Zinc finger protein 316                              | 56          | 17/107                                  | 19                    | 110422     |
| 16         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor        | 446         | 64/98                                   | 53                    | 130293     |
| 16         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 84          | 11/34                                   | 16                    | 90261      |
| 17         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor        | 454         | 64/108                                  | 55                    | 130293     |
| 18         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor        | 486         | 74/134                                  | 60                    | 130293     |
| 19         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 178         | 31/104                                  | 34                    | 90261      |
| 24         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 166         | 28/73                                   | 29                    | 90261      |
| 24         | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                | 67          | 16/73                                   | 17                    | 113589     |
| 25         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 169         | 19/58                                   | 26                    | 90261      |
| 26         | Q86XA2_HUMAN  | ZNF20 protein  | 68          | 10/46                                   | 19                    | 59604      |
| 27         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 99          | 30/156                                  | 29                    | 90261      |
| 27         | A8K1R6_HUMAN  | cDNA FLJ77026, highly similar to Homo sapiens ataxin | 58          | 22/156                                  | 22                    | 110360     |
| 28         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 198         | 29/66                                   | 28                    | 90261      |
| 29         | POGK_HUMAN    | Pogo transposable element with KRAB domain           | 157         | 33/146                                  | 39                    | 69799      |
| 30         | POGK_HUMAN    | Pogo transposable element with KRAB domain           | 165         | 34/144                                  | 42                    | 69799      |
| 30         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 41          | 21/144                                  | 25                    | 90261      |
| 31         | POGK_HUMAN    | Pogo transposable element with KRAB domain           | 208         | 34/113                                  | 42                    | 69799      |
| 32         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein precursor           | 301         | 42/106                                  | 60                    | 72402      |
| 32         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 57          | 16/64                                   | 20                    | 90261      |
| 33         | GRP78_HUMAN   | 79 kDa glucose-regulated protein precursor           | 268         | 41/155                                  | 59                    | 72402      |
| 33         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 70          | 19/114                                  | 22                    | 90261      |
| 34         | GRP78_HUMAN   | 80 kDa glucose-regulated protein precursor           | 227         | 29/76                                   | 49                    | 72402      |
| 35         | PCCA_HUMAN    | Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial | 183         | 29/118                                  | 42                    | 77932      |
| 36         | PCCA_HUMAN    | Propionyl-CoA carboxylase alpha subunit              | 170         | 34/128                                  | 45                    | 77932      |
| 36         | GRP75_HUMAN   | Stress-70 protein, mitochondrial precursor           | 78          | 17/94                                   | 29                    | 73920      |
| 37         | HSP7C_HUMAN   | Heat shock cognate 71 kDa protein                    | 214         | 38/110                                  | 62                    | 71082      |
| 37         | GRP75_HUMAN   | Stress-70 protein, mitochondrial precursor           | 69          | 17/110                                  | 31                    | 73920      |
| 38         | HSP7C_HUMAN   | Heat shock cognate 71 kDa protein                    | 73          | 20/112                                  | 28                    | 71082      |
| 39         | HSP7C_HUMAN   | Heat shock cognate 71 kDa protein                    | 140         | 24/71                                   | 31                    | 71082      |
| 40         | HSP71_HUMAN   | Heat shock 70 kDa protein 1                          | 138         | 29/146                                  | 48                    | 70294      |
| 40         | Q59H57_HUMAN  | Fusion   | 66          | 14/146                                  | 36                    | 32316      |
| 41         | Q59EJ3_HUMAN  | Heat shock 70kDa protein 1A variant                  | 154         | 29/125                                  | 50                    | 78018      |
| 41         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 68          | 24/125                                  | 24                    | 90261      |
| 42         | HSP71_HUMAN   | Heat shock 70 kDa protein 1                          | 108         | 18/85                                   | 24                    | 70294      |
| 42         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 61          | 15/85                                   | 18                    | 90261      |
| 43         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 61          | 18/102                                  | 18                    | 90261      |
| 43         | ZN460_HUMAN   | Zinc finger protein 460                              | 60          | 14/102                                  | 26                    | 65220      |
| 43         | HSF2B_HUMAN   | Heat shock factor 2-binding protein                  | 70          | 11/71                                   | 25                    | 38020      |

**Tabelle 12: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 3 durch die Suche gegen die SWALL-Datenbank. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 3. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war. (Fortsetzung Tabelle 11)**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name  | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/ gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|---|-------------|---|-----------------------|------------|
| 45         | Z324A_HUMAN   | Zinc finger protein 324A                              | 71          | 13/82                                   | 32                    | 62263      |
| 45         | ZN426_HUMAN   | Zinc finger protein 426                               | 65          | 12/71                                   | 25                    | 65004      |
| 45         | K1C16_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 16                       | 124         | 29/188                                  | 52                    | 51578      |
| 45         | K2C5_HUMAN    | Keratin, type II cytoskeletal 5                       | 69          | 21/188                                  | 32                    | 62568      |
| 45         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 222         | 44/145                                  | 39                    | 90261      |
| 46         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 202         | 39/137                                  | 39                    | 90261      |
| 47         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 104         | 16/43                                   | 16                    | 90261      |
| 49         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 60          | 33/188                                  | 33                    | 90261      |
| 51         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 74          | 38/150                                  | 27                    | 90261      |
| 52         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 107         | 32/112                                  | 27                    | 90261      |
| 53         | DDX6_HUMAN    | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6              | 67          | 18/151                                  | 45                    | 54781      |
| 53         | K1C10_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 10                       | 64          | 16/151                                  | 31                    | 59703      |
| 53         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 71          | 25/118                                  | 22                    | 90261      |
| 54         | Q96B85_HUMAN  | TUBB protein  | 48          | 2/79                                    | 30                    | 30625      |
| 54         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 103         | 30/125                                  | 29                    | 90261      |
| 55         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-chain | 71          | 16/113                                  | 30                    | 53852      |
| 55         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 60          | 19/113                                  | 24                    | 90261      |
| 55         | Q0VGA5_HUMAN  | SARS protein  | 62          | 11/81                                   | 24                    | 58883      |
| 56         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-chain | 199         | 34/145                                  | 59                    | 53852      |
| 57         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 121         | 26/87                                   | 26                    | 90261      |
| 57         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-chain | 106         | 21/87                                   | 42                    | 53852      |
| 57         | ZN556_HUMAN   | Zinc finger protein 556                               | 79          | 11/44                                   | 28                    | 53144      |
| 58         | YBOX1_HUMAN   | Nuclease-sensitive element-binding protein 1          | 93          | 15/101                                  | 38                    | 35903      |
| 58         | EF1G_HUMAN    | Elongation factor 1-gamma                             | 67          | 11/132                                  | 25                    | 50429      |
| 58         | Q6IPN6_HUMAN  | Elongation factor 1-alpha                             | 65          | 12/121                                  | 29                    | 50433      |
| 59         | Q53HR3_HUMAN  | Enolase   | 104         | 16/129                                  | 49                    | 47453      |
| 59         | YBOX1_HUMAN   | Nuclease-sensitive element-binding protein 1          | 86          | 14/129                                  | 39                    | 35903      |
| 59         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta              | 67          | 22/129                                  | 21                    | 90261      |
| 59         | ZN101_HUMAN   | Zinc finger protein 101                               | 62          | 14/129                                  | 36                    | 51903      |
| 61         | EF1G_HUMAN    | Elongation factor 1-gamma                             | 119         | 16/113                                  | 32                    | 50429      |
| 61         | RRS1_HUMAN    | Ribosome biogenesis regulatory protein homolog        | 75          | 14/97                                   | 33                    | 41225      |
| 62         | ZN552_HUMAN   | Zinc finger protein 552                               | 170         | 21/87                                   | 55                    | 47423      |
| 62         | ZN562_HUMAN   | Zinc finger protein 562                               | 105         | 16/87                                   | 41                    | 49843      |
| 63         | Q96QL0_HUMAN  | Ribosomal protein L3                                  | 64          | 8/26                                    | 15                    | 46376      |
| 63         | K1H1_HUMAN    | Keratin, type I cuticular Ha1                         | 119         | 20/133                                  | 52                    | 48628      |
| 63         | ZN552_HUMAN   | Zinc finger protein 552                               | 101         | 18/133                                  | 48                    | 47423      |
| 66         | B4DW52_HUMAN  | cDNA FLJ5253, highly similar to Actin, cytoplasmic 1  | 102         | 15/121                                  | 55                    | 41321      |
| 66         | ZFP1_HUMAN    | Zinc finger protein 1 homolog                         | 76          | 11/106                                  | 30                    | 48455      |
| 67         | ZFP1_HUMAN    | Zinc finger protein 1 homolog                         | 72          | 12/104                                  | 38                    | 48455      |
| 67         | ZN669_HUMAN   | Zinc finger protein 669                               | 65          | 14/104                                  | 36                    | 54273      |
| 69         | Q5VXV2_HUMAN  | SET translocation                                     | 78          | 11/95                                   | 38                    | 31114      |
| 70         | Q5VXV2_HUMAN  | SET translocation                                     | 96          | 11/111                                  | 39                    | 31114      |
| 70         | HPCL4_HUMAN   | Hippocalcin-like protein 4                            | 64          | 8/79                                    | 47                    | 22359      |
| 71         | Q6PK95_HUMAN  | TOP1 protein  | 69          | 7/101                                   | 40                    | 19624      |
| 71         | B2RCX0_HUMAN  | cDNA, FLJ96345, Homo sapiens SET translocation        | 62          | 6/58                                    | 17                    | 32115      |
| 72         | IFNA5_HUMAN   | Interferon alpha-5 precursor                          | 61          | 6/91                                    | 28                    | 22270      |
| 73         | LANC1_HUMAN   | LanC-like protein 1                                   | 67          | 8/36                                    | 25                    | 45995      |
| 74         | ZN707_HUMAN   | Zinc finger protein 707                               | 121         | 20/112                                  | 50                    | 44258      |
| 74         | B7ZAD9_HUMAN  | cDNA, FLJ79153, highly similar to Homo sapiens zinc f | 72          | 11/66                                   | 34                    | 37086      |
| 75         | B2REB8_HUMAN  | SET translocation                                     | 62          | 6/78                                    | 19                    | 30974      |
| 76         | ANXA2_HUMAN   | Annexin A2  | 149         | 20/95                                   | 57                    | 38808      |
| 76         | Q59GX9_HUMAN  | Ribosomal protein L5 variant                          | 77          | 13/95                                   | 38                    | 35409      |

**Tabelle 13: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 3 durch die Suche gegen die SWALL-Datenbank. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 3. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war. (Fortsetzung Tabelle 11)**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name   | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/<br>gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|--|-------------|--|-----------------------|------------|
| 80         | GBLP_HUMAN    | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 | 97          | 12/70                                      | 29                    | 35511      |
| 80         | PHB2_HUMAN    | Prohibitin-2   | 74          | 11/79                                      | 38                    | 33276      |
| 81         | GBLP_HUMAN    | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 | 161         | 18/109                                     | 47                    | 35511      |
| 81         | PRLD2_HUMAN   | PRELI domain-containing protein 2                        | 68          | 11/89                                      | 51                    | 22175      |
| 81         | RS3A_HUMAN    | 40S ribosomal protein S3a                                | 72          | 15/109                                     | 50                    | 30154      |
| 82         | ADT2_HUMAN    | ADP/ATP translocase 2                                    | 178         | 13/25                                      | 39                    | 33102      |
| 83         | ADT2_HUMAN    | ADP/ATP translocase 2                                    | 112         | 13/47                                      | 41                    | 33102      |
| 84         | Q59E19_HUMAN  | ADP,ATP carrier protein, liver isoform T2 variant        | 99          | 13/82                                      | 38                    | 35589      |
| 87         | KRT86_HUMAN   | Keratin type II cuticular Hb6 piens                      | 83          | 15/88                                      | 27                    | 55120      |
| 96         | FRIH_HUMAN    | Ferritin heavy chain                                     | 80          | 9/71                                       | 56                    | 21383      |
| 96         | CBX3_HUMAN    | Chromobox protein homolog 3                              | 61          | 9/71                                       | 44                    | 20969      |

**Tabelle 14: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 3 durch die Suche gegen die KRAB-SCAN-Datenbank. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 3. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war. (Fortsetzung Tabelle 11)**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name  | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/<br>gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|---|-------------|--|-----------------------|------------|
| 6          | ZNF41_HUMAN   | Zinc finger protein 41  | 80          | 15/80                                      | 21                    | 91430      |
| 6          | ZN862_HUMAN   | Zinc finger protein 862   | 52          | 15/64                                      | 12                    | 141925     |
| 7          | ZNF41_HUMAN   | Zinc finger protein 41  | 50          | 10/66                                      | 13                    | 91430      |
| 26         | Q86XA2_HUMAN  | ZNF20 protein   | 57          | 9/46                                       | 19                    | 63694      |
| 27         | ZN761_HUMAN   | Zinc finger protein 761   | 54          | 18/103                                     | 19                    | 90533      |
| 29         | RBAK_HUMAN    | RB-associated KRAB zinc finger protein  | 45          | 11/78                                      | 19                    | 85393      |
| 30         | ZNF7_HUMAN    | Zinc finger protein 7   | 46          | 10/80                                      | 18                    | 84226      |
| 31         | RBAK_HUMAN    | RB-associated KRAB zinc finger protein  | 39          | 10/76                                      | 17                    | 85393      |
| 35         | ZN323_HUMAN   | Zinc finger protein 323   | 43          | 8/72                                       | 19                    | 48233      |
| 36         | ZNF8_HUMAN    | Zinc finger protein 8   | 42          | 7/54                                       | 13                    | 66241      |
| 37         | ZN460_HUMAN   | Zinc finger protein 460   | 50          | 9/46                                       | 19                    | 72348      |
| 38         | ZNF8_HUMAN    | Zinc finger protein 8   | 42          | 7/54                                       | 13                    | 66241      |
| 40         | ZNF14_HUMAN   | Zinc finger protein 14  | 48          | 13/80                                      | 21                    | 77984      |
| 41         | ZN460_HUMAN   | Zinc finger protein 460   | 55          | 12/70                                      | 25                    | 72348      |
| 45         | ZN791_HUMAN   | Zinc finger protein 791   | 60          | 12/49                                      | 18                    | 66872      |
| 46         | ZNF8_HUMAN    | Zinc finger protein 8   | 56          | 11/83                                      | 21                    | 66241      |
| 46         | ZN527_HUMAN   | Zinc finger protein 527   | 42          | 10/83                                      | 19                    | 72624      |
| 46         | Z354B_HUMAN   | Zinc finger protein 354B  | 55          | 9/57                                       | 19                    | 72366      |
| 46         | ZN460_HUMAN   | Zinc finger protein 460   | 60          | 14/102                                     | 26                    | 65220      |
| 49         | ZN799_HUMAN   | Zinc finger protein 799   | 50          | 16/109                                     | 21                    | 76992      |
| 56         | ZN556_HUMAN   | Zinc finger protein 556   | 44          | 12/91                                      | 27                    | 53144      |
| 57         | ZN331_HUMAN   | Zinc finger protein 331   | 60          | 9/33                                       | 18                    | 55358      |
| 61         | ZN791_HUMAN   | Zinc finger protein 791   | 47          | 10/78                                      | 20                    | 69108      |
| 61         | ZN764_HUMAN   | Zinc finger protein 764   | 45          | 6/78                                       | 16                    | 48772      |
| 62         | ZN302_HUMA    | Zinc finger protein 302   | 46          | 7/37                                       | 16                    | 51874      |
| 66         | ZN669_HUMAN   | Zinc finger protein 669   | 54          | 8/79                                       | 23                    | 54273      |
| 66         | ZN584_HUMAN   | Zinc finger protein 584   | 49          | 8/80                                       | 21                    | 49381      |
| 70         | ZNF7_HUMAN    | Zinc finger protein 7   | 49          | 12/71                                      | 15                    | 84226      |
| 75         | ZN707_HUMAN   | Zinc finger protein 707   | 41          | 6/52                                       | 11                    | 44258      |
| 75         | ZN747_HUMAN   | Zinc finger protein 747   | 58          | 6/46                                       | 24                    | 37131      |
|            | B7ZAD9_HUMAN  | cDNA, FLJ79153, highly similar to Homo sapiens zinc finger protein 689 (ZNF689) |             |  |                       | 37086      |

### 6.1.7 Gel 4

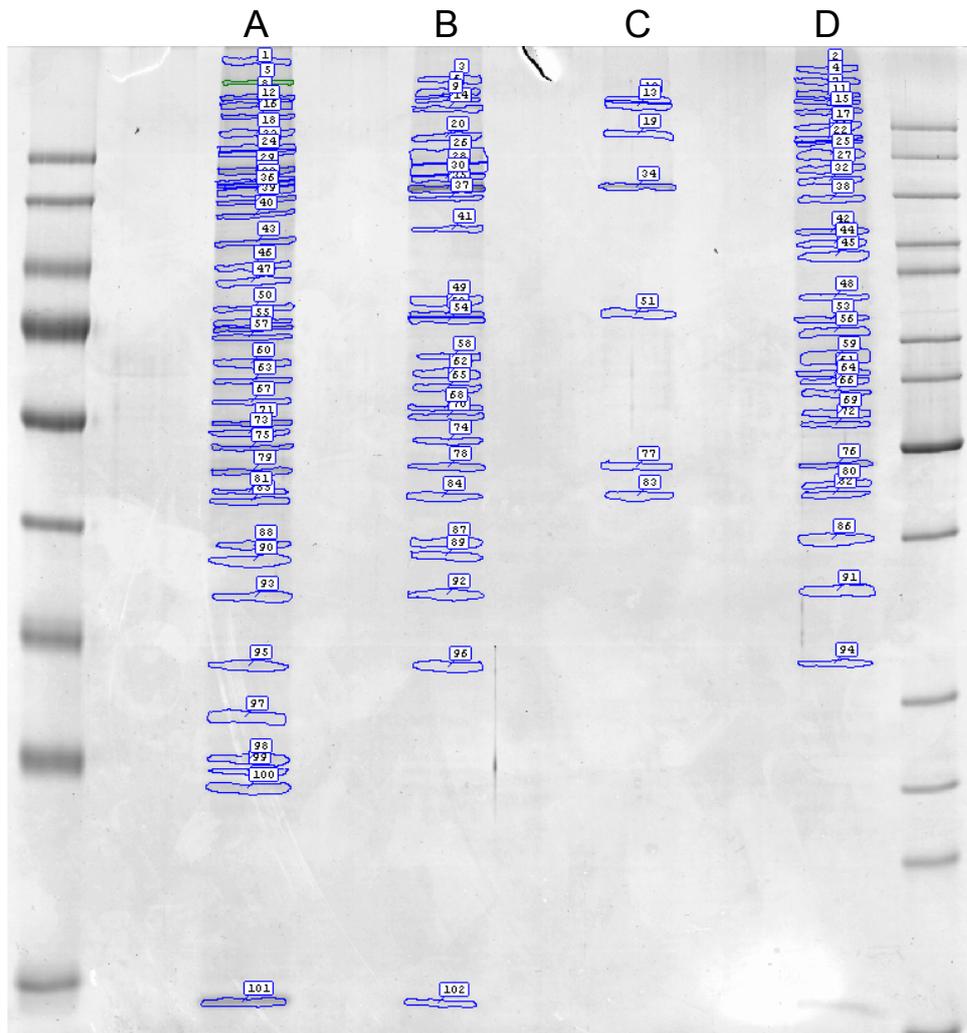


Abbildung 57: SDS-PAGE Analyse (10%) eines HR5 Proteinextraktes zur Kontrolle, 55 mg auf der Säule, kontrastverstärkt. A: Fraktion 2 und 3 nach der Affinitätschromatographie. B: Fraktion 3 und 4 nach der Affinitätschromatographie. C: Fraktion 5 nach der Affinitätschromatographie. D: Fraktion 1 nach der Affinitätschromatographie. Markerbanden links: 170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17, 11 kDa, rechts: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa.

## 6.1.8 Liste der identifizierten Proteine des Gel 4

Tabelle 15: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 4 durch die Suche gegen die SWALL-Datenbank. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 4. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war.

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name  | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/<br>gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|---|-------------|--|-----------------------|------------|
| 1          | CO6A5_HUMAN   | Collagen alpha-5(VI) chain                              | 63          | 31/107                                     | 14                    | 291796     |
| 2          | Q14215_HUMAN  | Nebulin   | 66          | 39/111                                     | 16                    | 350062     |
| 3          | DYHC1_HUMAN   | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1                      | 173         | 69/120                                     | 18                    | 534809     |
| 5          | DYHC1_HUMAN   | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1                      | 176         | 53/81                                      | 13                    | 534809     |
| 6          | FLNA_HUMAN    | Filamin-A   | 290         | 66/130                                     | 33                    | 283301     |
| 8          | FLNA_HUMAN    | Filamin-A   | 439         | 69/96                                      | 34                    | 283301     |
| 11         | Q60FE6_HUMAN  | Filamin A   | 203         | 61/154                                     | 32                    | 280069     |
| 11         | FAS_HUMAN     | Fatty acid synthase                                     | 82          | 41/154                                     | 23                    | 275877     |
| 12         | FAS_HUMAN     | Fatty acid synthase                                     | 308         | 40/48                                      | 22                    | 275877     |
| 14         | MYH9_HUMAN    | Myosin-9  | 89          | 36/96                                      | 22                    | 227646     |
| 15         | FAS_HUMAN     | Fatty acid synthase                                     | 252         | 49/80                                      | 28                    | 275877     |
| 15         | E41L2_HUMAN   | Band 4.1-like protein 2                                 | 78          | 9/31                                       | 10                    | 113032     |
| 15         | MYH9_HUMAN    | Myosin-9  | 202         | 42/71                                      | 26                    | 227646     |
| 16         | MYH9_HUMAN    | Myosin-9  | 157         | 31/52                                      | 18                    | 227646     |
| 17         | K1C17_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 17                         | 68          | 10/72                                      | 28                    | 48361      |
| 19         | CLH1_HUMAN    | Clathrin heavy chain 1                                  | 80          | 22/76                                      | 17                    | 193260     |
| 19         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 62          | 17/76                                      | 19                    | 130293     |
| 20         | CLH1_HUMAN    | Clathrin heavy chain 1                                  | 193         | 34/98                                      | 29                    | 193260     |
| 23         | SYEP_HUMAN    | Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase                  | 116         | 30/80                                      | 19                    | 172080     |
| 23         | CLH1_HUMAN    | Clathrin heavy chain 1                                  | 78          | 22/80                                      | 17                    | 193260     |
| 24         | CLH1_HUMAN    | Clathrin heavy chain 1                                  | 307         | 49/85                                      | 35                    | 193260     |
| 26         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 109         | 27/123                                     | 30                    | 130293     |
| 26         | A8K1R6_HUMAN  | cDNA FLJ77026, highly similar to Homo sapiens ataxin    | 62          | 22/123                                     | 23                    | 110360     |
| 28         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 130         | 26/82                                      | 29                    | 130293     |
| 28         | CYFP2_HUMAN   | Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2                  | 101         | 27/82                                      | 21                    | 150298     |
| 29         | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                   | 110         | 15/58                                      | 19                    | 113589     |
| 30         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 70          | 15/51                                      | 17                    | 130293     |
| 31         | CYFP2_HUMAN   | Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2                  | 128         | 28/121                                     | 28                    | 150298     |
| 31         | B0V043_HUMAN  | Valyl-tRNA synthetase                                   | 119         | 31/121                                     | 27                    | 141632     |
| 33         | CYFP2_HUMAN   | Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2                  | 203         | 41/86                                      | 31                    | 150298     |
| 34         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 383         | 64/142                                     | 52                    | 130293     |
| 35         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 326         | 36/47                                      | 36                    | 130293     |
| 36         | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                   | 102         | 21/85                                      | 19                    | 113589     |
| 36         | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 113         | 25/85                                      | 27                    | 130293     |
| 37         | NCKP1_HUMAN   | Nck-associated protein 1                                | 249         | 50/120                                     | 38                    | 130018     |
| 39         | NCKP1_HUMAN   | Nck-associated protein 1                                | 136         | 26/74                                      | 26                    | 130018     |
| 40         | NCKP1_HUMAN   | Nck-associated protein 1                                | 312         | 57/120                                     | 45                    | 130018     |
| 40         | B4DXN6_HUMAN  | cDNA FLJ53461, highly similar to Eukaryotic translation | 73          | 14/63                                      | 27                    | 77576      |
| 41         | ACTN1_HUMAN   | Alpha-actinin-1   | 310         | 53/147                                     | 56                    | 103563     |
| 41         | ACTN4_HUMAN   | Alpha-actinin-4   | 107         | 21/94                                      | 27                    | 105245     |
| 41         | B4E0E9_HUMAN  | cDNA FLJ55046, highly similar to Methionyl-tRNA synt    | 70          | 10/73                                      | 29                    | 49521      |
| 42         | ACTN4_HUMAN   | Alpha-actinin-4   | 77          | 14/53                                      | 19                    | 105245     |
| 42         | ACTN1_HUMAN   | Alpha-actinin-1   | 256         | 40/93                                      | 43                    | 103563     |
| 43         | ACTN1_HUMAN   | Alpha-actinin-1   | 64          | 10/28                                      | 10                    | 103563     |
| 44         | TERA_HUMAN    | Transitional endoplasmic reticulum ATPase               | 148         | 31/121                                     | 39                    | 89950      |
| 46         | HS90A_HUMAN   | Heat shock protein HSP 90-alpha                         | 121         | 24/101                                     | 42                    | 85006      |
| 47         | XRCC5_HUMAN   | X-ray repair cross-complementing protein 5              | 79          | 18/90                                      | 24                    | 83222      |
| 48         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein                        | 135         | 21/75                                      | 35                    | 72402      |
| 49         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein                        | 122         | 20/64                                      | 33                    | 72402      |
| 50         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein                        | 69          | 7/17                                       | 17                    | 72402      |
| 51         | B4DPF9_HUMAN  | cDNA FLJ56469, highly similar to Propionyl-CoA carbo    | 161         | 21/60                                      | 34                    | 75583      |
| 53         | Q53HF2_HUMAN  | Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant            | 143         | 13/25                                      | 30                    | 53580      |
| 54         | Q53HF2_HUMAN  | Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant            | 84          | 10/32                                      | 29                    | 53580      |
| 54         | B2RDE0_HUMAN  | cDNA, FLJ96567, highly similar to Homo sapiens propi    | 72          | 10/32                                      | 14                    | 77992      |
| 55         | GRP75_HUMAN   | Stress-70 protein, mitochondrial                        | 78          | 9/19                                       | 16                    | 73920      |
| 55         | HSP7C_HUMAN   | Heat shock cognate 71 kDa protein                       | 199         | 26/62                                      | 34                    | 71082      |
| 57         | HSP71_HUMAN   | Heat shock 70 kDa protein 1                             | 169         | 20/50                                      | 33                    | 70294      |

**Tabelle 16: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 4 durch die Suche gegen die SWALL-Datenbank. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 4. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war. (Fortsetzung Tabelle 15)**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name   | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/ gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|--|-------------|---|-----------------------|------------|
| 60         | TCPG_HUMAN    | T-complex protein 1 subunit gamma                        | 94          | 16/55                                   | 27                    | 61066      |
| 60         | B4DEB0_HUMAN  | cDNA FLJ56054, highly similar to 26S proteasome non-     | 63          | 10/39                                   | 23                    | 58626      |
| 61         | CH60_HUMAN    | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial                 | 63          | 11/53                                   | 25                    | 61187      |
| 62         | B4DYD8_HUMAN  | cDNA FLJ52362, highly similar to T-complex protein 1 ε   | 83          | 16/94                                   | 44                    | 49951      |
| 62         | B7Z597_HUMAN  | cDNA FLJ54373, highly similar to 60 kDa heat shock p     | 64          | 13/78                                   | 35                    | 60181      |
| 62         | KPYM_HUMAN    | Pyruvate kinase isozymes M1/M2                           | 63          | 13/78                                   | 31                    | 58470      |
| 63         | TCPA_HUMAN    | T-complex protein 1 subunit alpha                        | 90          | 13/52                                   | 23                    | 60819      |
| 63         | B3GQS7_HUMAN  | Mitochondrial heat shock 60kD protein 1 variant 1        | 69          | 10/40                                   | 24                    | 60813      |
| 64         | TCPQ_HUMAN    | T-complex protein 1 subunit theta                        | 101         | 16/77                                   | 37                    | 60153      |
| 64         | A8K566_HUMAN  | cDNA FLJ78246, highly similar to Homo sapiens splicir    | 78          | 15/77                                   | 35                    | 59096      |
| 65         | MCCB_HUMAN    | Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochor      | 96          | 12/41                                   | 24                    | 61808      |
| 66         | B4DKV4_HUMAN  | cDNA FLJ60647, highly similar to Keratin, type II cytos  | 137         | 20/82                                   | 25                    | 55983      |
| 66         | A8K3C3_HUMAN  | T-complex protein 1, delta subunit                       | 113         | 21/82                                   | 41                    | 58429      |
| 66         | K1C10_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 10                          | 72          | 8/41                                    | 21                    | 59020      |
| 68         | PCCB_HUMAN    | Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial      | 157         | 25/84                                   | 53                    | 58806      |
| 68         | K1C10_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 10                          | 68          | 12/84                                   | 29                    | 59020      |
| 69         | B3KT06_HUMAN  | cDNA FLJ37398 fis, clone BRAMY2027467, highly simi       | 110         | 18/119                                  | 56                    | 46825      |
| 69         | B2R858_HUMAN  | cDNA, FLJ93750, Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-A         | 80          | 16/119                                  | 44                    | 53582      |
| 69         | A8K402_HUMAN  | cDNA FLJ75037, highly similar to Homo sapiens chape      | 124         | 23/119                                  | 55                    | 57782      |
| 70         | DDX6_HUMAN    | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6                 | 179         | 17/31                                   | 36                    | 54781      |
| 71         | DDX6_HUMAN    | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6                 | 197         | 19/37                                   | 40                    | 54781      |
| 72         | TBB5_HUMAN    | Tubulin beta chain                                       | 112         | 11/32                                   | 23                    | 50095      |
| 73         | TBB5_HUMAN    | Tubulin beta chain                                       | 159         | 16/67                                   | 28                    | 50095      |
| 74         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-chai     | 150         | 21/78                                   | 48                    | 53852      |
| 75         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-chai     | 115         | 15/55                                   | 35                    | 53852      |
| 76         | EF1G_HUMAN    | Elongation factor 1-gamma                                | 137         | 13/30                                   | 29                    | 50429      |
| 77         | EF1G_HUMAN    | Elongation factor 1-gamma                                | 125         | 13/56                                   | 34                    | 50429      |
| 78         | B4DTG2_HUMAN  | cDNA FLJ56389, highly similar to Elongation factor 1-g;  | 100         | 10/25                                   | 22                    | 56456      |
| 79         | B4DTG2_HUMAN  | cDNA FLJ56389, highly similar to Elongation factor 1-g;  | 94          | 10/33                                   | 20                    | 56456      |
| 80         | K1C16_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 16                          | 174         | 22/89                                   | 55                    | 51578      |
| 80         | VIME_HUMAN    | Vimentin   | 68          | 12/67                                   | 33                    | 53676      |
| 82         | ACTB_HUMAN    | Actin, cytoplasmic 1                                     | 70          | 6/19                                    | 20                    | 42052      |
| 83         | B4E3A4_HUMAN  | cDNA FLJ57283, highly similar to Actin, cytoplasmic 2    | 92          | 11/54                                   | 36                    | 40116      |
| 84         | ACTB_HUMAN    | Actin, cytoplasmic 1                                     | 70          | 6/15                                    | 20                    | 42052      |
| 85         | ACTG_HUMAN    | Actin, cytoplasmic 2                                     | 154         | 28/142                                  | 71                    | 42108      |
| 85         | K1C17_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 17                          | 97          | 20/142                                  | 48                    | 48361      |
| 86         | RT09_HUMAN    | 28S ribosomal protein S9, mitochondrial                  | 66          | 12/70                                   | 32                    | 46034      |
| 88         | B2REB8_HUMAN  | SET translocation (Myeloid leukemia-associated)          | 120         | 12/58                                   | 36                    | 30974      |
| 88         | B4DY62_HUMAN  | cDNA FLJ57664, highly similar to Mitochondrial 28S rib   | 63          | 9/46                                    | 27                    | 42037      |
| 91         | EF1D_HUMAN    | Elongation factor 1-delta                                | 92          | 12/72                                   | 48                    | 31217      |
| 91         | E7EUT4_HUMAN  | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                 | 69          | 9/60                                    | 32                    | 31699      |
| 92         | G3P_HUMAN     | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                 | 65          | 8/49                                    | 22                    | 36201      |
| 93         | G3P_HUMAN     | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                 | 63          | 12/84                                   | 37                    | 36201      |
| 94         | GBLP_HUMAN    | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 | 97          | 11/60                                   | 54                    | 35511      |
| 97         | Q6PUJ7_HUMAN  | Prohibitin   | 116         | 12/90                                   | 55                    | 29859      |
| 97         | ADT2_HUMAN    | ADP/ATP translocase 2                                    | 68          | 10/90                                   | 34                    | 33059      |
| 98         | SNP23_HUMAN   | Synaptosomal-associated protein 23                       | 128         | 13/48                                   | 56                    | 23682      |
| 99         | LSM12_HUMAN   | Protein LSM12 homolog                                    | 84          | 10/81                                   | 66                    | 21972      |
| 99         | PSB4_HUMAN    | Proteasome subunit beta type-4                           | 77          | 12/81                                   | 47                    | 29242      |
| 99         | PIMT_HUMAN    | Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferas   | 76          | 12/81                                   | 55                    | 24792      |
| 100        | LSM12_HUMAN   | Protein LSM12 homolog                                    | 98          | 11/70                                   | 73                    | 21972      |
| 100        | PSB1_HUMAN    | Proteasome subunit beta type-1                           | 80          | 11/70                                   | 54                    | 26700      |

## 6.1.9 Liste der identifizierten Proteine aus Abbildung 24 B

Tabelle 17: Liste der gekennzeichneten Banden aus Abbildung 24 B. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Abbildung 24 B. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Diese Tabelle stellt eine Zusammenfassung der in Gel 3 identifizierten Proteine dar.

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name   | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/ gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|--|-------------|---|-----------------------|------------|
| 1          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 83          | 18/95                                   | 26                    | 90261      |
| 1          | DYHC1_HUMAN   | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1                   | 91          | 47/95                                   | 14                    | 534809     |
| 2          | Q5HY54_HUMAN  | Filamin A, alpha                                     | 112         | 29/63                                   | 14                    | 279115     |
| 3          | CP110_HUMAN   | Centriolin   | 66          | 32/96                                   | 14                    | 269860     |
| 4          | Q53TG8_HUMAN  | Nebulin  | 67          | 22/47                                   | 9                     | 326352     |
| 5          | MYH9_HUMAN    | Myosin-9   | 96          | 30/81                                   | 18                    | 227646     |
| 5          | ZNF41_HUMAN   | Zinc finger protein 41                               | 72          | 16/80                                   | 21                    | 96063      |
| 5          | ZN862_HUMAN   | Zinc finger protein 862                              | 52          | 15/64                                   | 12                    | 141925     |
| 6          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 71          | 17/86                                   | 24                    | 90261      |
| 6          | ZNF41_HUMAN   | Zinc finger protein 41                               | 50          | 10/66                                   | 13                    | 91430      |
| 7          | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                | 198         | 36/119                                  | 31                    | 113589     |
| 8          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 94          | 18/95                                   | 26                    | 90261      |
| 8          | B7Z8N7_HUMAN  | Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2               | 113         | 37/165                                  | 31                    | 147489     |
| 8          | ZN316_HUMAN   | Zinc finger protein 316                              | 169         | 18/33                                   | 21                    | 110422     |
| 8          | A8K1R6_HUMAN  | highly similar to Homo sapiens ataxin 2-like         | 84          | 24/107                                  | 23                    | 110360     |
| 9          | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor        | 446         | 64/98                                   | 53                    | 130293     |
| 9          | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 84          | 11/34                                   | 16                    | 90261      |
| 10         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 84          | 11/34                                   | 16                    | 90261      |
| 11         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 166         | 28/73                                   | 29                    | 90261      |
| 11         | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                | 67          | 16/73                                   | 17                    | 113589     |
| 12         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 99          | 30/156                                  | 29                    | 90261      |
| 12         | A8K1R6_HUMAN  | cDNA FLJ77026, highly similar to Homo sapiens ataxin | 58          | 22/156                                  | 22                    | 110360     |
| 12         | Q86XA2_HUMAN  | ZNF20 protein  | 68          | 10/46                                   | 19                    | 59604      |
| 12         | ZN761_HUMAN   | Zinc finger protein 761                              | 54          | 18/103                                  | 19                    | 90533      |
| 13         | POGK_HUMAN    | Pogo transposable element with KRAB domain           | 208         | 34/113                                  | 42                    | 69799      |
| 13         | RBAK_HUMAN    | RB-associated KRAB zinc finger protein               | 45          | 11/78                                   | 19                    | 85393      |
| 13         | ZNF7_HUMAN    | Zinc finger protein 7                                | 46          | 10/80                                   | 18                    | 84226      |
| 13         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 41          | 21/144                                  | 25                    | 90261      |
| 14         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein precursor           | 301         | 42/106                                  | 60                    | 72402      |
| 14         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 57          | 16/64                                   | 20                    | 90261      |
| 15         | PCCA_HUMAN    | Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial | 183         | 29/118                                  | 42                    | 77932      |
| 15         | GRP75_HUMAN   | Stress-70 protein, mitochondrial precursor           | 78          | 17/94                                   | 29                    | 73920      |
| 15         | ZNF8_HUMAN    | Zinc finger protein 8                                | 42          | 7/54                                    | 13                    | 66241      |
| 16         | HSP7C_HUMAN   | Heat shock cognate 71 kDa protein                    | 214         | 38/110                                  | 62                    | 71082      |
| 16         | ZN460_HUMAN   | Zinc finger protein 460                              | 50          | 9/46                                    | 19                    | 72348      |
| 16         | GRP75_HUMAN   | Stress-70 protein, mitochondrial precursor           | 69          | 17/110                                  | 31                    | 73920      |
| 16         | ZNF8_HUMAN    | Zinc finger protein 8                                | 133         | 20/69                                   | 35                    | 66241      |
| 17         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 88          | 16/69                                   | 21                    | 90261      |
| 17         | HSP71_HUMAN   | Heat shock 70 kDa protein 1                          | 138         | 29/146                                  | 48                    | 70294      |
| 17         | Q59H57_HUMAN  | fused in sarcoma                                     | 66          | 14/146                                  | 36                    | 32316      |
| 17         | ZNF14_HUMAN   | Zinc finger protein 14                               | 48          | 13/80                                   | 21                    | 77984      |
| 18         | ZN460_HUMAN   | Zinc finger protein 460                              | 55          | 12/70                                   | 25                    | 72348      |
| 18         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 68          | 24/125                                  | 24                    | 90261      |
| 18         | HSF2B_HUMAN   | Heat shock factor 2-binding protein                  | 70          | 11/71                                   | 25                    | 38020      |
| 19         | ZN460_HUMAN   | Zinc finger protein 460                              | 60          | 14/102                                  | 26                    | 65220      |
| 19         | K1C16_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 16                      | 124         | 29/188                                  | 52                    | 51578      |
| 19         | K2C5_HUMAN    | Keratin, type II cytoskeletal 5                      | 69          | 21/188                                  | 32                    | 62568      |
| 19         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta             | 222         | 44/145                                  | 39                    | 90261      |
| 19         | Z324A_HUMAN   | Zinc finger protein 324A                             | 71          | 13/82                                   | 32                    | 62263      |
| 19         | ZN426_HUMAN   | Zinc finger protein 426                              | 65          | 12/71                                   | 25                    | 65004      |
| 19         | ZNF8_HUMAN    | Zinc finger protein 8                                | 56          | 11/83                                   | 21                    | 66241      |
| 19         | ZN527_HUMAN   | Zinc finger protein 527                              | 42          | 10/83                                   | 19                    | 72624      |
| 19         | Z354B_HUMAN   | Zinc finger protein 354B                             | 55          | 9/57                                    | 19                    | 72366      |
| 19         | ZN791_HUMAN   | Zinc finger protein 791                              | 60          | 12/49                                   | 18                    | 66872      |
| 20         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta - Homo sa   | 104         | 16/43                                   | 16                    | 90261      |
| 20         | ZN799_HUMAN   | Zinc finger protein 799                              | 50          | 16/109                                  | 21                    | 76992      |

**Tabelle 18: Liste der gekennzeichneten Banden aus Abbildung 24 B. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Abbildung 24 B. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Diese Tabelle stellt eine Zusammenfassung der in Gel 3 identifizierten Proteine dar. (Fortsetzung Tabelle 17)**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name   | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/ gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|--|-------------|---|-----------------------|------------|
| 21         | DDX6_HUMAN    | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6                     | 67          | 18/151                                  | 45                    | 54781      |
| 21         | K1C10_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 10                              | 64          | 16/151                                  | 31                    | 59703      |
| 21         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta                     | 71          | 25/118                                  | 22                    | 90261      |
| 22         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta                     | 103         | 30/125                                  | 29                    | 90261      |
| 22         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-chain        | 71          | 16/113                                  | 30                    | 53852      |
| 22         | ZN556_HUMAN   | Zinc finger protein 556                                      | 79          | 11/44                                   | 28                    | 53144      |
| 22         | ZN331_HUMAN   | Zinc finger protein 331                                      | 60          | 9/33                                    | 18                    | 55358      |
| 23         | Q53HR3_HUMAN  | Enolase  | 104         | 16/129                                  | 49                    | 47453      |
| 23         | YBOX1_HUMAN   | Nuclease-sensitive element-binding protein 1                 | 86          | 14/129                                  | 39                    | 35903      |
| 23         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta                     | 67          | 22/129                                  | 21                    | 90261      |
| 23         | ZN101_HUMAN   | Zinc finger protein 101                                      | 62          | 14/129                                  | 36                    | 51903      |
| 23         | EF1G_HUMAN    | Elongation factor 1-gamma                                    | 67          | 11/132                                  | 25                    | 50429      |
| 23         | Q6IPN6_HUMAN  | Elongation factor 1-alpha                                    | 65          | 12/121                                  | 29                    | 50433      |
| 24         | EF1G_HUMAN    | Elongation factor 1-gamma                                    | 119         | 16/113                                  | 32                    | 50429      |
| 24         | RRS1_HUMAN    | Ribosome biogenesis regulatory protein homolog               | 75          | 14/97                                   | 33                    | 41225      |
| 24         | ZNF791_HUMAN  | Zinc finger protein 791                                      | 47          | 10/78                                   | 20                    | 69108      |
| 24         | ZN764_HUMAN   | Zinc finger protein 764                                      | 45          | 6/78                                    | 16                    | 48772      |
| 25         | ZN552_HUMAN   | Zinc finger protein 552                                      | 170         | 21/87                                   | 55                    | 47423      |
| 25         | ZN562_HUMAN   | Zinc finger protein 562                                      | 105         | 16/87                                   | 41                    | 49843      |
| 25         | ZN302_HUMAN   | Zinc finger protein 302                                      | 46          | 7/37                                    | 16                    | 51874      |
| 25         | Q96QL0_HUMAN  | Ribosomal protein L3   | 64          | 8/26                                    | 15                    | 46376      |
| 26         | ZFP1_HUMAN    | Zinc finger protein 1 homolog                                | 76          | 11/106                                  | 30                    | 48455      |
| 26         | ZN669_HUMAN   | Zinc finger protein 669                                      | 54          | 8/79                                    | 23                    | 54273      |
| 26         | ZN584_HUMAN   | Zinc finger protein 584                                      | 49          | 8/80                                    | 21                    | 49381      |
| 26         | B4DW52_HUMAN  | FLJ55253, highly similar to Actin, cytoplasmic 1             | 102         | 15/121                                  | 55                    | 41321      |
| 27         | ZFP1_HUMAN    | Zinc finger protein 1 homolog                                | 72          | 12/104                                  | 38                    | 48455      |
| 27         | ZN669_HUMAN   | Zinc finger protein 669                                      | 65          | 14/104                                  | 36                    | 54273      |
| 28         | Q5VXV2_HUMAN  | SET translocation  | 78          | 11/95                                   | 38                    | 31114      |
| 28         | ZNF7_HUMAN    | Zinc finger protein 7  | 49          | 12/71                                   | 15                    | 84226      |
| 28         | Q6PK95_HUMAN  | TOP1 protein   | 69          | 7/101                                   | 40                    | 19624      |
| 28         | HPCL4_HUMAN   | Hippocalcin-like protein 4                                   | 64          | 8/79                                    | 47                    | 22359      |
| 29         | LANC1_HUMAN   | LanC-like protein 1  | 67          | 8/36                                    | 25                    | 45995      |
| 30         | ZN707_HUMAN   | Zinc finger protein 707                                      | 121         | 20/112                                  | 50                    | 44258      |
| 30         | B2REB8_HUMAN  | SET translocation  | 62          | 6/78                                    | 19                    | 30974      |
| 30         | B7ZAD9_HUMAN  | FLJ79153, highly similar to zinc finger protein 689 (ZNF689) | 58          | 6/46                                    | 24                    | 37086      |
| 31         | ANXA2_HUMAN   | Annexin A2   | 149         | 20/95                                   | 57                    | 38808      |
| 31         | Q59GX9_HUMAN  | Ribosomal protein L5 variant                                 | 77          | 13/95                                   | 38                    | 35409      |
| 32         | GBLP_HUMAN    | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2            | 161         | 18/109                                  | 47                    | 35511      |
| 32         | PRLD2_HUMAN   | PRELI domain-containing protein 2                            | 68          | 11/89                                   | 51                    | 22175      |
| 32         | RS3A_HUMAN    | 40S ribosomal protein S3a                                    | 72          | 15/109                                  | 50                    | 30154      |
| 32         | PHB2_HUMAN    | Prohibitin-2   | 74          | 11/79                                   | 38                    | 33276      |
| 33         | ADT2_HUMAN    | ADP/ATP translocase 2  | 178         | 13/25                                   | 39                    | 33102      |
| 34         | KRT86_HUMAN   | Keratin type II cuticular Hb6                                | 83          | 15/88                                   | 27                    | 55120      |
| 35         | FRIH_HUMAN    | Ferritin heavy chain   | 80          | 9/71                                    | 56                    | 21383      |
| 35         | CBX3_HUMAN    | Chromobox protein homolog 3                                  | 61          | 9/71                                    | 44                    | 20969      |

## 6.1.10 Liste der identifizierten Proteine aus Abbildung 24 C

Tabelle 19: Liste der gekennzeichneten Banden aus Abbildung 24 C. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Abbildung 24 C. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 5: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 6: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Diese Tabelle stellt eine Zusammenfassung der in Gel 4 identifizierten Proteine dar.

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name  | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/ gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|---|-------------|---|-----------------------|------------|
| 1          | DYHC1_HUMAN   | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1                      | 176         | 53/81                                   | 13                    | 534809     |
| 2          | FLNA_HUMAN    | Filamin-A   | 439         | 69/96                                   | 34                    | 283301     |
| 3          | FAS_HUMAN     | Fatty acid synthase                                     | 308         | 40/48                                   | 22                    | 275877     |
| 4          | MYH9_HUMAN    | Myosin-9  | 157         | 31/52                                   | 18                    | 227646     |
| 5          | CLH1_HUMAN    | Clathrin heavy chain 1                                  | 307         | 49/85                                   | 35                    | 193260     |
| 5          | SYEP_HUMAN    | Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase                  | 116         | 30/80                                   | 19                    | 172080     |
| 6          | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                   | 110         | 15/58                                   | 19                    | 113589     |
| 6          | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 109         | 27/123                                  | 30                    | 130293     |
| 7          | B0V043_HUMAN  | Valyl-tRNA synthetase                                   | 119         | 31/121                                  | 27                    | 141632     |
| 7          | CYFP2_HUMAN   | Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2                  | 203         | 41/86                                   | 31                    | 150298     |
| 7          | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 130         | 26/82                                   | 29                    | 130293     |
| 8          | ATX2L_HUMAN   | Ataxin-2-like protein                                   | 102         | 21/85                                   | 19                    | 113589     |
| 8          | PYC_HUMAN     | Pyruvate carboxylase, mitochondrial                     | 326         | 36/47                                   | 36                    | 130293     |
| 9          | NCKP1_HUMAN   | Nck-associated protein 1                                | 249         | 50/120                                  | 38                    | 130018     |
| 10         | B4DXN6_HUMAN  | cDNA FLJ53461, highly similar to Eukaryotic translation | 73          | 14/63                                   | 27                    | 77576      |
| 10         | NCKP1_HUMAN   | Nck-associated protein 1                                | 312         | 57/120                                  | 45                    | 130018     |
| 11         | ACTN1_HUMAN   | Alpha-actinin-1   | 310         | 53/147                                  | 56                    | 103563     |
| 11         | ACTN4_HUMAN   | Alpha-actinin-4   | 107         | 21/94                                   | 27                    | 105245     |
| 11         | B4E0E9_HUMAN  | cDNA FLJ55046, highly similar to Methionyl-tRNA synth   | 70          | 10/73                                   | 29                    | 49521      |
| 12         | HS90A_HUMAN   | Heat shock protein HSP 90-alpha                         | 121         | 24/101                                  | 42                    | 85006      |
| 13         | XRCC5_HUMAN   | X-ray repair cross-complementing protein 5              | 79          | 18/90                                   | 24                    | 83222      |
| 14         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein                        | 122         | 20/64                                   | 33                    | 72402      |
| 15         | GRP75_HUMAN   | Stress-70 protein, mitochondrial                        | 78          | 9/19                                    | 16                    | 73920      |
| 16         | B2RDE0_HUMAN  | cDNA, FLJ96567, highly similar to Homo sapiens propi    | 72          | 10/32                                   | 14                    | 77992      |
| 16         | HSP7C_HUMAN   | Heat shock cognate 71 kDa protein                       | 199         | 26/62                                   | 34                    | 71082      |
| 17         | HSP71_HUMAN   | Heat shock 70 kDa protein 1                             | 169         | 20/50                                   | 33                    | 70294      |
| 18         | B4DEB0_HUMAN  | cDNA FLJ56054, highly similar to 26S proteasome non-    | 63          | 10/39                                   | 23                    | 58626      |
| 18         | TCPG_HUMAN    | T-complex protein 1 subunit gamma                       | 94          | 16/55                                   | 27                    | 61066      |
| 19         | B3GQS7_HUMAN  | Mitochondrial heat shock 60kD protein 1 variant 1       | 69          | 10/40                                   | 24                    | 60813      |
| 19         | B4DYD8_HUMAN  | cDNA FLJ52362, highly similar to T-complex protein 1 s  | 83          | 16/94                                   | 44                    | 49951      |
| 19         | B7Z597_HUMAN  | cDNA FLJ54373, highly similar to 60 kDa heat shock pi   | 64          | 13/78                                   | 35                    | 60181      |
| 19         | KPYM_HUMAN    | Pyruvate kinase isozymes M1/M2                          | 63          | 13/78                                   | 31                    | 58470      |
| 19         | TCPA_HUMAN    | T-complex protein 1 subunit alpha                       | 90          | 13/52                                   | 23                    | 60819      |
| 20         | MCCB_HUMAN    | Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochor    | 96          | 12/41                                   | 24                    | 61808      |
| 21         | K1C10_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 10                         | 68          | 12/84                                   | 29                    | 59020      |
| 21         | PCCB_HUMAN    | Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial     | 157         | 25/84                                   | 53                    | 58806      |
| 22         | DDX6_HUMAN    | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6                | 197         | 19/37                                   | 40                    | 54781      |
| 23         | TBB5_HUMAN    | Tubulin beta chain                                      | 159         | 16/67                                   | 28                    | 50095      |
| 24         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-cha     | 150         | 21/78                                   | 48                    | 53852      |
| 25         | B4DTG2_HUMAN  | cDNA FLJ56389, highly similar to Elongation factor 1-g  | 100         | 10/25                                   | 22                    | 56456      |
| 26         | ACTB_HUMAN    | Actin, cytoplasmic 1                                    | 70          | 6/15                                    | 20                    | 42052      |
| 26         | ACTG_HUMAN    | Actin, cytoplasmic 2                                    | 154         | 28/142                                  | 71                    | 42108      |
| 26         | K1C17_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 17                         | 97          | 20/142                                  | 48                    | 48361      |
| 27         | B2REB8_HUMAN  | SET translocation (Myeloid leukemia-associated)         | 120         | 12/58                                   | 36                    | 30974      |
| 27         | B4DY62_HUMAN  | cDNA FLJ57664, highly similar to Mitochondrial 28S rib  | 63          | 9/46                                    | 27                    | 42037      |
| 28         | G3P_HUMAN     | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                | 63          | 12/84                                   | 37                    | 36201      |
| 29         | ADT2_HUMAN    | ADP/ATP translocase 2                                   | 68          | 10/90                                   | 34                    | 33059      |
| 29         | Q6PUJ7_HUMAN  | Prohibitin  | 116         | 12/90                                   | 55                    | 29859      |
| 30         | SNP23_HUMAN   | Synaptosomal-associated protein 23                      | 128         | 13/48                                   | 56                    | 23682      |
| 31         | LSM12_HUMAN   | Protein LSM12 homolog                                   | 84          | 10/81                                   | 66                    | 21972      |
| 31         | PIMT_HUMAN    | Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransfera   | 76          | 12/81                                   | 55                    | 24792      |
| 31         | PSB4_HUMAN    | Proteasome subunit beta type-4                          | 77          | 12/81                                   | 47                    | 29242      |
| 32         | LSM12_HUMAN   | Protein LSM12 homolog                                   | 98          | 11/70                                   | 73                    | 21972      |
| 32         | PSB1_HUMAN    | Proteasome subunit beta type-1                          | 80          | Nov 70                                  | 54                    | 26700      |

6.1.11 Gel 5



Abbildung 58: SDS-PAGE Analyse der Proteinextrakte (siehe Abbildung 35). Die Bezeichnung der Spuren ist identisch mit der auf Seite 77 dargestellten. Markerbanden links: 170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17, 11 kDa

## 6.1.12 Liste der identifizierten Proteine des Gel 5

**Tabelle 20: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 5 nach Suche gegen die SWALL-Datenbank. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 5. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins. Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war.**

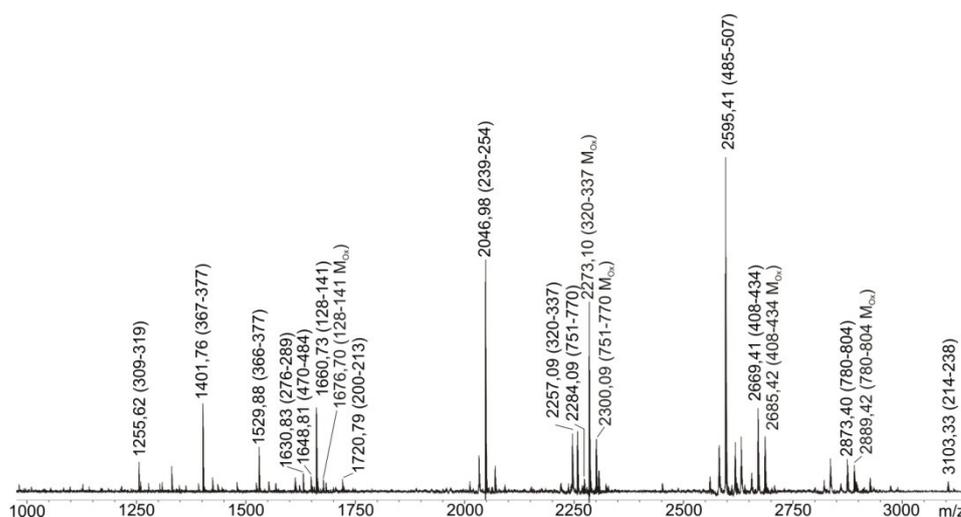
| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name   | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/<br>gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|--|-------------|--|-----------------------|------------|
| 11         | Q59HF8_HUMAN  | Carbamoyl-phosphate synthetase 1 variant (Fragment)    | 73          | 23/68                                      | 16                    | 167153     |
| 11         | SYEP_HUMAN    | Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase                 | 41          | 13/45                                      | 10                    | 172137     |
| 12         | Q59HF8_HUMAN  | Carbamoyl-phosphate synthetase 1 variant (Fragment)    | 344         | 51/93                                      | 31                    | 167153     |
| 13         | SYEP_HUMAN    | Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase                 | 150         | 32/79                                      | 22                    | 172137     |
| 14         | Q63ZY4_HUMAN  | ATXN2L protein   | 115         | 15/38                                      | 19                    | 112307     |
| 15         | Q59HF8_HUMAN  | Carbamoyl-phosphate synthetase 1 variant (Fragment)    | 256         | 37/67                                      | 24                    | 167153     |
| 16         | LPPRC_HUMAN   | Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondri | 112         | 22/59                                      | 14                    | 159003     |
| 17         | A8K1R6_HUMAN  | cDNA FLJ77026, highly similar to Homo sapiens ataxin   | 57          | 10/44                                      | 13                    | 110360     |
| 18         | SMC2_HUMAN    | Structural maintenance of chromosomes protein 2        | 62          | 16/55                                      | 14                    | 136266     |
| 18         | Q8NGB0_HUMAN  | Seven transmembrane helix receptor                     | 57          | 14/55                                      | 11                    | 157779     |
| 19         | LPPRC_HUMAN   | Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondri | 78          | 22/66                                      | 13                    | 159003     |
| 20         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta               | 120         | 20/63                                      | 21                    | 90261      |
| 21         | SYLC_HUMAN    | Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic                    | 75          | 17/50                                      | 17                    | 135577     |
| 22         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta               | 71          | 21/95                                      | 22                    | 90261      |
| 23         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta               | 54          | 21/82                                      | 17                    | 90261      |
| 23         | KIF15_HUMAN   | Kinesin-like protein KIF15                             | 51          | 18/82                                      | 10                    | 161030     |
| 24         | ODO1_HUMAN    | 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochoi    | 150         | 17/29                                      | 16                    | 117059     |
| 25         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta               | 163         | 31/84                                      | 26                    | 90261      |
| 26         | ACTN4_HUMAN   | Alpha-actinin-4  | 96          | 25/118                                     | 26                    | 105245     |
| 27         | ODO1_HUMAN    | 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochoi    | 69          | 16/69                                      | 15                    | 117059     |
| 27         | B2R5Y2_HUMAN  | Putative uncharacterized protein                       | 66          | 13/53                                      | 15                    | 108152     |
| 29         | EF2_HUMAN     | Elongation factor 2                                    | 96          | 25/101                                     | 28                    | 96246      |
| 29         | PYGL_HUMAN    | Glycogen phosphorylase, liver form                     | 97          | 20/76                                      | 25                    | 97486      |
| 30         | HS90B_HUMAN   | Heat shock protein HSP 90-beta                         | 133         | 21/51                                      | 30                    | 83554      |
| 31         | HS90B_HUMAN   | Heat shock protein HSP 90-beta                         | 159         | 23/46                                      | 30                    | 83554      |
| 33         | GRP78_HUMAN   | 78 kDa glucose-regulated protein                       | 141         | 21/74                                      | 39                    | 72402      |
| 34         | Q5I6Y6_HUMAN  | Lamin A/C transcript variant 1                         | 81          | 15/53                                      | 25                    | 74322      |
| 35         | B3KTV0_HUMAN  | cDNA FLJ38781 fis, clone LIVER2000216, highly simila   | 68          | 10/38                                      | 15                    | 68166      |
| 36         | B2RCM1_HUMAN  | cDNA, FLJ96154, highly similar to Homo sapiens heat :  | 94          | 17/81                                      | 30                    | 73890      |
| 37         | Q53GZ6_HUMAN  | Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant (Fragmen  | 114         | 21/81                                      | 29                    | 71083      |
| 41         | A8K5Z4_HUMAN  | cDNA FLJ76660, highly similar to Homo sapiens RasG     | 61          | 9/41                                       | 21                    | 55732      |
| 42         | B3KRY0_HUMAN  | cDNA FLJ35050 fis, clone OCBBF2018167, highly simi     | 66          | 13/70                                      | 25                    | 58596      |
| 43         | B3KRY0_HUMAN  | cDNA FLJ35050 fis, clone OCBBF2018167, highly simi     | 72          | 10/50                                      | 20                    | 58596      |
| 44         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta               | 78          | 20/84                                      | 17                    | 90261      |
| 45         | TIF1B_HUMAN   | Transcription intermediary factor 1-beta               | 82          | 29/116                                     | 20                    | 90261      |
| 46         | B3KML9_HUMAN  | cDNA FLJ11352 fis, clone HEMBA1000020, highly simi     | 160         | 24/97                                      | 48                    | 44916      |
| 46         | B3KPS3_HUMAN  | cDNA FLJ32131 fis, clone PEBLM2000267, highly simi     | 72          | 11/97                                      | 37                    | 46725      |
| 47         | Q5JP53_HUMAN  | Tubulin, beta polypeptide (Tubulin, beta)              | 131         | 22/96                                      | 40                    | 48135      |
| 47         | B3KT06_HUMAN  | cDNA FLJ37398 fis, clone BRAMY2027467, highly simi     | 59          | 10/96                                      | 35                    | 46825      |
| 48         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-chai   | 238         | 27/56                                      | 45                    | 53852      |
| 49         | ODB2_HUMAN    | Lipoamide acyltransferase component of branched-chai   | 175         | 30/111                                     | 50                    | 53852      |
| 50         | EF1G_HUMAN    | Elongation factor 1-gamma                              | 58          | 10/65                                      | 25                    | 50429      |
| 51         | EF1G_HUMAN    | Elongation factor 1-gamma                              | 110         | 14/110                                     | 29                    | 50429      |
| 53         | Q8WVW5_HUMAN  | Putative uncharacterized protein (Fragment)            | 106         | 8/68                                       | 31                    | 40819      |
| 53         | MAP6_HUMAN    | Microtubule-associated protein 6                       | 81          | 12/60                                      | 15                    | 86680      |
| 54         | Q8WVW5_HUMAN  | Putative uncharacterized protein (Fragment)            | 118         | 12/41                                      | 32                    | 40819      |
| 54         | ASSY_HUMAN    | Argininosuccinate synthase                             | 105         | 14/41                                      | 20                    | 46786      |
| 55         | PGK1_HUMAN    | Phosphoglycerate kinase 1                              | 74          | 13/60                                      | 31                    | 44985      |
| 55         | Q5T905_HUMAN  | Chromosome 6 open reading frame 103                    | 77          | 12/47                                      | 20                    | 70309      |
| 56         | PGK1_HUMAN    | Phosphoglycerate kinase 1                              | 118         | 23/92                                      | 44                    | 44985      |
| 56         | ODPA_HUMAN    | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha,     | 93          | 18/92                                      | 35                    | 43952      |
| 57         | PGK1_HUMAN    | Phosphoglycerate kinase 1                              | 168         | 19/52                                      | 44                    | 44985      |
| 58         | Q5VXV2_HUMAN  | SET translocation (Myeloid leukemia-associated)        | 69          | 7/37                                       | 29                    | 31310      |

**Tabelle 21: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Gel 5 durch die Suche gegen die SWALL-Datenbank. Spalte 1: Bandennummern. Diese sind identisch mit den Bandennummern in Gel 1. Spalte 2: Uniprot Accession Nummer. Spalte 3: Protein Name. Spalte 4: Mascot Mowse Score. Spalte 5: Verhältnis der zugeordneten Signale zu den gekennzeichneten. Spalte 6: Aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des identifizierten Proteins, Spalte 7: Molekülmasse des identifizierten Proteins in Da. Fehlende Bandennummern zeigen an, dass keine Identifizierung möglich war. (Fortsetzung Tabelle 20)**

| Banden Nr. | Accession Nr. | Protein Name   | Mowse Score | Ionensignale zugeordnet/ gekennzeichnet | Sequenz Abdeckung [%] | Protein MW |
|------------|---------------|--|-------------|---|-----------------------|------------|
| 61         | Q658L7_HUMAN  | Putative uncharacterized protein DKFZp666C237 (Fragr   | 64          | 7/44                                    | 31                    | 26049      |
| 62         | LDHB_HUMAN    | L-lactate dehydrogenase B chain                        | 71          | 9/50                                    | 30                    | 36900      |
| 63         | LDHA_HUMAN    | L-lactate dehydrogenase A chain                        | 72          | 9/38                                    | 22                    | 36950      |
| 64         | LDHA_HUMAN    | L-lactate dehydrogenase A chain                        | 110         | 14/60                                   | 31                    | 36950      |
| 65         | Q96HI1_HUMAN  | Similar to plastin 3 (T isoform) (Fragment)            | 72          | 10/50                                   | 72                    | 46203      |
| 65         | Q9BRL8_HUMAN  | MTA1 protein   | 70          | 9/50                                    | 35                    | 28802      |
| 67         | ADT3_HUMAN    | ADP/ATP translocase 3                                  | 86          | 10/46                                   | 34                    | 33073      |
| 68         | Q05BJ6_HUMAN  | CEP290 protein   | 65          | 12/60                                   | 16                    | 94392      |
| 68         | ADT2_HUMAN    | ADP/ATP translocase 2                                  | 65          | 8/35                                    | 21                    | 33102      |
| 69         | HSPB1_HUMAN   | Heat shock protein beta-1                              | 66          | 7/63                                    | 36                    | 22826      |
| 70         | HSPB1_HUMAN   | Heat shock protein beta-1                              | 91          | 7/45                                    | 37                    | 22826      |
| 72         | PIMT_HUMAN    | Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferas | 97          | 8/71                                    | 31                    | 24806      |
| 73         | PIMT_HUMAN    | Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferas | 118         | 12/65                                   | 55                    | 24806      |
| 76         | B1AJZ9_HUMAN  | Forkhead-associated                                    | 69          | 11/37                                   | 14                    | 89697      |
| 79         | A8K486_HUMAN  | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase                    | 63          | 7/39                                    | 36                    | 18230      |
| 80         | A8K486_HUMAN  | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase                    | 95          | 8/51                                    | 52                    | 18230      |
| 81         | K1C10_HUMAN   | Keratin, type I cytoskeletal 10                        | 81          | 12/53                                   | 17                    | 59703      |
| 82         | K2C5_HUMAN    | Keratin, type II cytoskeletal 5                        | 65          | 11/55                                   | 18                    | 62568      |
| 83         | PROF1_HUMAN   | Profilin-1   | 110         | 12/72                                   | 70                    | 15216      |
| 84         | PROF1_HUMAN   | Profilin-1   | 132         | 10/75                                   | 71                    | 15216      |
| 86         | HNRPM_HUMAN   | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M              | 78          | 14/49                                   | 18                    | 77749      |

## 6.2 TRIM28-Spektren

### 6.2.1 nach in-Gel-Verdau mit LysC und GluC



**Abbildung 59: MALDI-Massenspektrum des TRIM28 nach Proteolyse mit LysC, ausgesuchte Signale wurden gekennzeichnet. Die Zahlen in Klammern bezeichnen den Aminosäuresequenzbereich des zugeordneten Peptids, Matrix: HCCA**

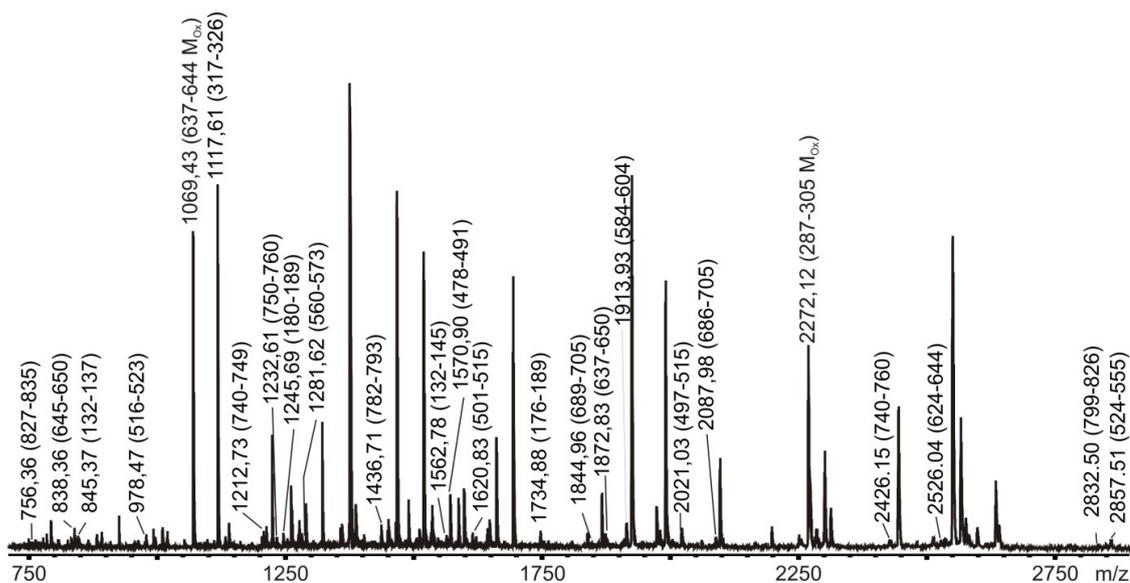


Abbildung 60: MALDI-Massenspektrum des TRIM28 nach Proteolyse mit GluC, ausgesuchte Signale wurden gekennzeichnet. Die Zahlen in Klammern bezeichnen den Aminosäuresequenzbereich des zugeordneten Peptids. Matrix: HCCA

## 6.2.2 MS/MS-Messungen sequenzierter Peptide des TRIM28

### *LSPPYSSPQEFAQDVGR* (751-767) *m/z* 1877,8

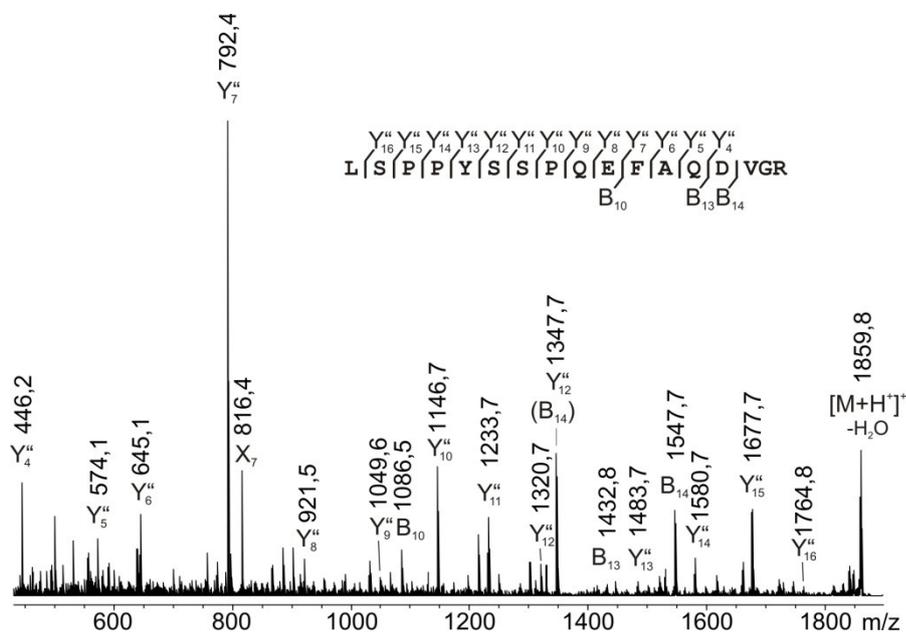


Abbildung 61: MS/MS-Spektrum des Peptids *LSPPYSSPQEFAQDVGR* des TRIM28 nach Trypsin-Verdau. Precursorsignal: *m/z* 1877,9 (751-767). B- und Y''-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y''-Ionenserie über dem Spektrum angegeben.

**VFPFSTTEDYNLIVIER (508-524) m/z 1953,0**

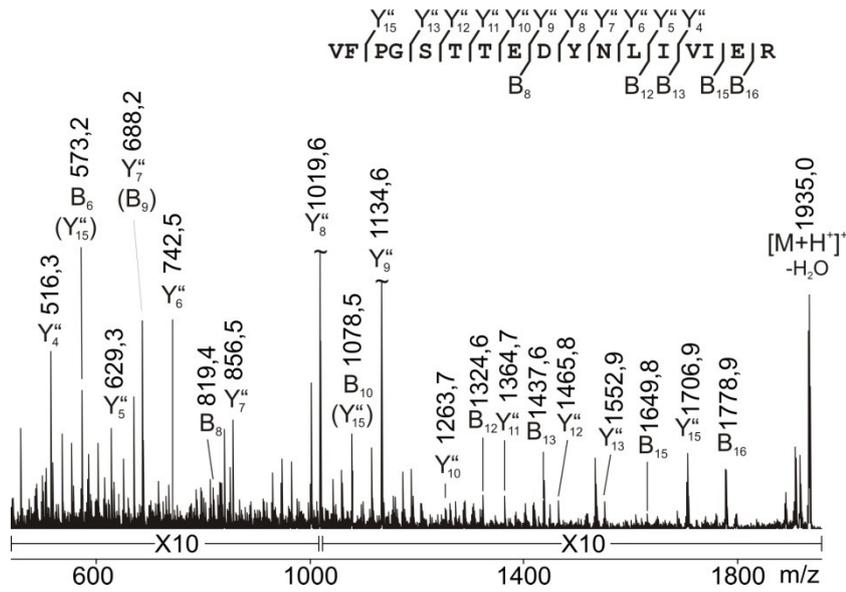


Abbildung 62: MS/MS Spektrum des Peptids VFPFSTTEDYNLIVIER des TRIM28 nach Trypsin-Verdau. Precursorsignal: m/z 1953,0 (508-524). B- und Y"-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y"-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

**FQWDLNAWTK (391-400) m/z 1308,7**

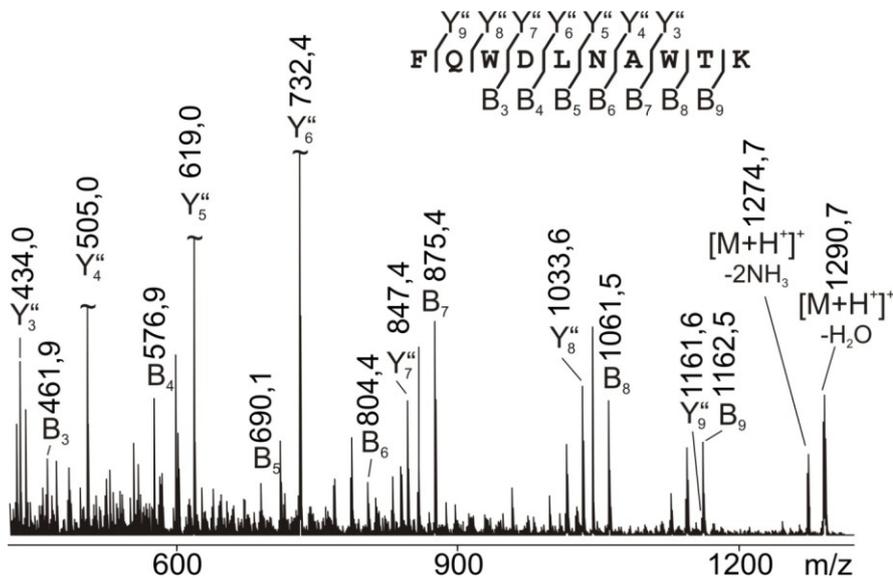


Abbildung 63: MS/MS Spektrum des Peptids FQWDLNAWTK des TRIM28 nach Trypsin-Verdau. Precursorsignal: m/z 1308,7 (391-400). B- und Y"-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y"-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

**DSQPPVFKVFPGSTTE (500-515)  $m/z$  1735,8**

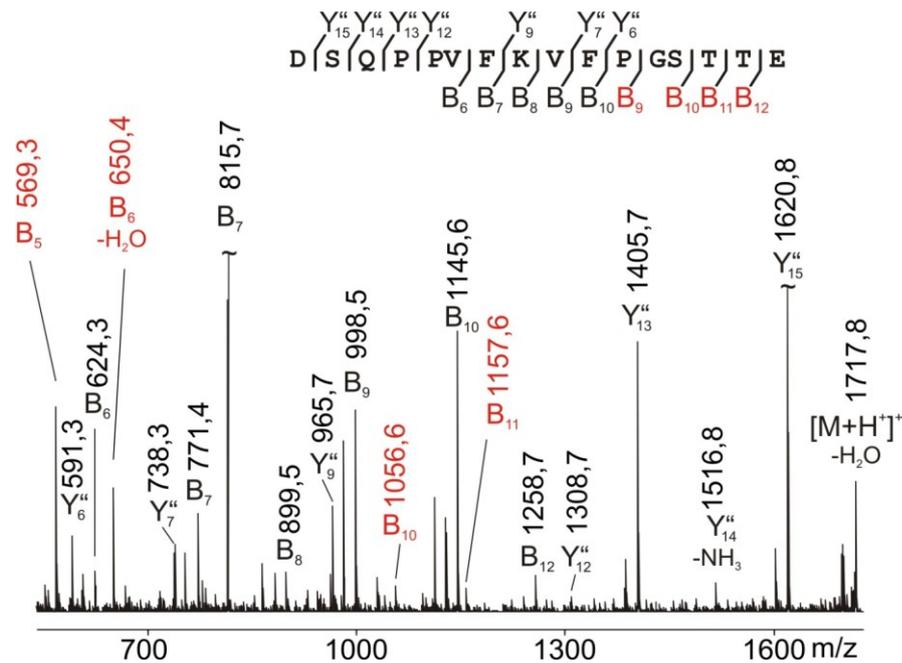


Abbildung 64: MS/MS Spektrum des Peptids DSQPPVFKVFPGSTTE des TRIM28 nach AspN-Verdau. Precursor signal:  $m/z$  1735,8 (500-515). B- und Y"-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y"-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

**DVQSIIGLQRFF (781-792)  $m/z=1422,8$**

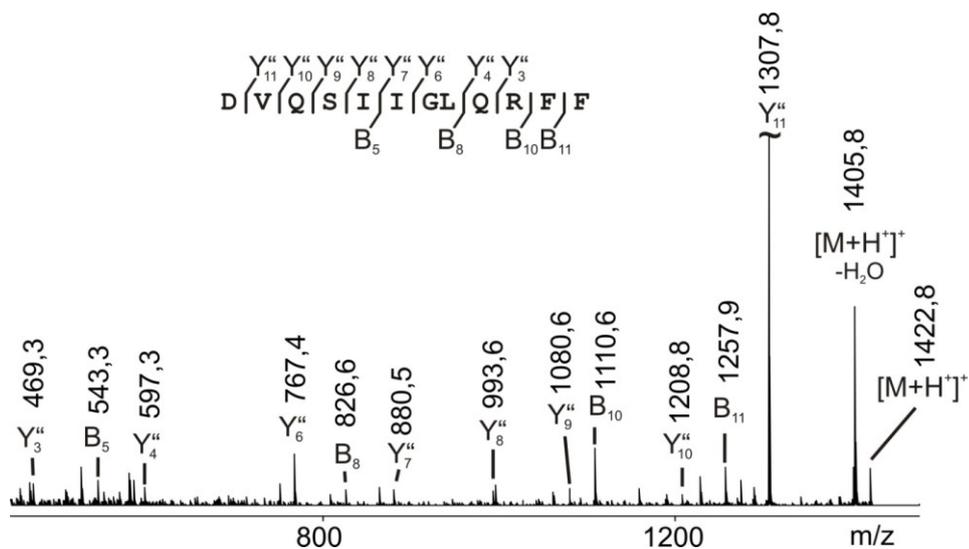


Abbildung 65: MS/MS Spektrum des Peptids DVQSIIGLQRFF des TRIM28 nach AspN-Verdau. Precursor signal:  $m/z$  1422,8 (781-792). B- und Y"-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y"-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

## 6.3 MS/MS-Spektren und BLAST-Ergebnisse der KRAB-Zink-Fingerproteine

In allen folgenden MS-Spektren sind sowohl autoproteolytische Signale des Trypsin als auch Signale des TRIM28 zu finden. Diese sind nicht extra gekennzeichnet. Weitere Proteine, die ebenfalls mit dem jeweiligen Spektrum identifiziert wurden, werden im Text genannt. Deren Signale sind ebenfalls nicht extra gekennzeichnet.

### 6.3.1 ZNF41

ZNF41 wurde in den Banden 5 und 6 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 66 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des ZNF41 beträgt 21 %. Das Signal bei  $m/z$  1955,99 wird der Sequenz zugeordnet, wenn es *N*-terminal acetyliert und am Methionin oxidiert ist. Für die Acetylierung spricht außerdem das Signal bei  $m/z$  2715,41. Allerdings lässt sich das Signal bei  $m/z$  1766,84 ebenfalls dem Protein-*N*-Terminus zuordnen, wenn keine Acetylierung vorhanden und das initiale Methionin abgespalten ist. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich den Proteinen MYH9 und ZNF862 zuordnen.

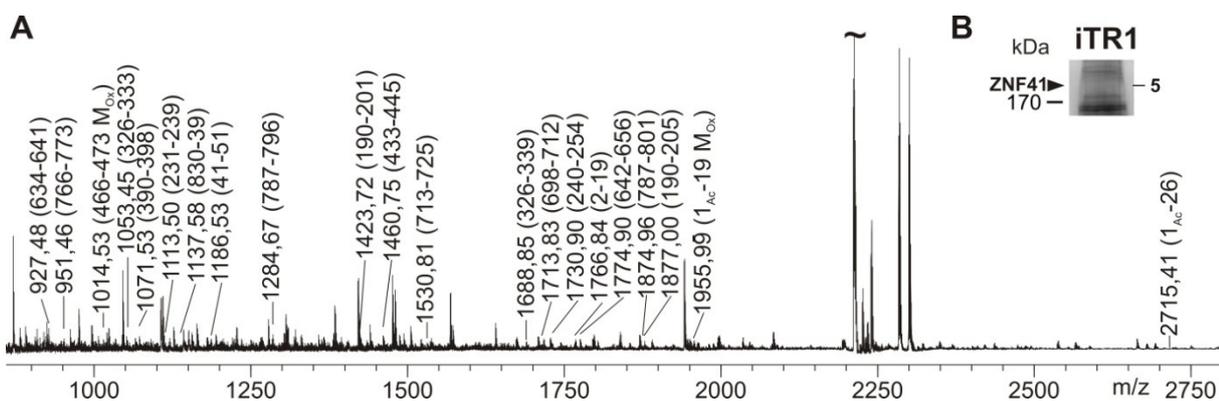


Abbildung 66 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF41. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF41 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.2 ZNF316

ZNF316 wurde in Bande 8 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 67 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung des ZNF316 beträgt 27 %. Eine mögliche Acetylierung des N-Terminus ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich den Proteinen CYFIP2 und ATXN2L zuordnen. Das Signal bei  $m/z$  2843.38 wurde ausgewählt und im Axima-QIT-ToF-MS<sup>n</sup>-Massenspektrometer fragmentiert (Abbildung 68).

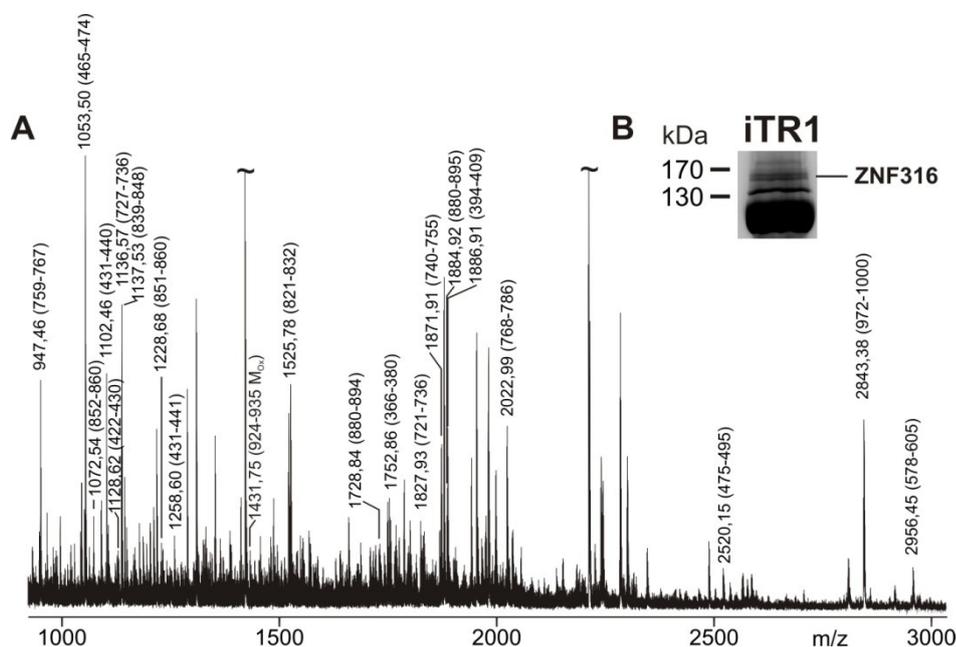
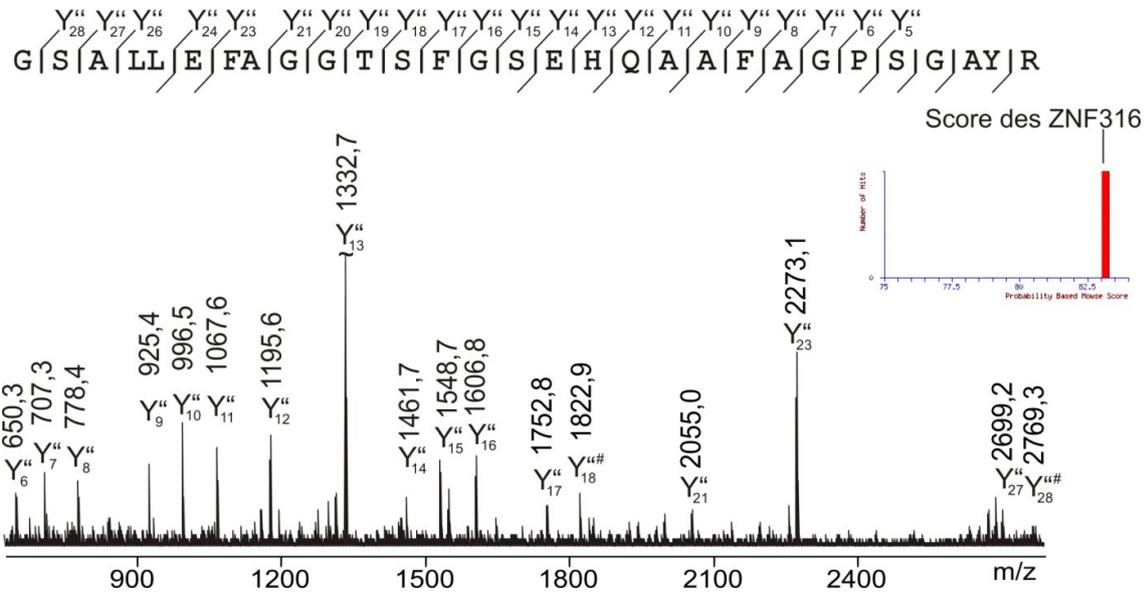


Abbildung 67 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF316. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF316 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

Das MS/MS-Spektrum (Abbildung 68) zeigt eine Vielzahl an Signalen, die alle der vermuteten Sequenz zugeordnet werden konnten. Zur besseren Übersicht wurde im abgebildeten Spektrum auf die Darstellung der B-Ionen (vgl. 1.2.2) verzichtet. Diese sind jedoch als nach links weisende Striche unter der Peptidsequenz in Abbildung 68 kenntlich gemacht. Die am rechten Rand der Abbildung 68 gezeigte Grafik illustriert die Signifikanz der Identifizierung.



**Abbildung 68: MS/MS Spektrum des Peptids GSALLEFAGGTSFGSEHQAAFAGPSGAYR des ZNF316. Precursorsignal: m/z 2843.4 (972-1000). Y"-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen Y"-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. Nach links weisende Striche unter der Sequenz markieren die durch B-Ionen-Signale gefundenen Fragmente. Rechts: Mowse-Score des Ergebnisses der Mascot-Suche mit der aus diesem Spektrum resultierenden Signalliste. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.**

Ergebnis der BLAST-Suche:

**1. Treffer:** GENE ID: 100131017 ZNF316 | zinc finger protein 316 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: GSALLEFAGGTSFGSEHQAAFAGPSGAYR  
 Übereinstimmung GSALLEFAGGTSFGSEHQAAFAGPSGAYR  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: GSALLEFAGGTSFGSEHQAAFAGPSGAYR

Score = 89.3 bits (203), Expect = 2e-23; Identities = 29/29 (100%),  
 Positives = 29/29 (100%), Gaps = 0/29 (0%)

**2. Treffer:** GENE ID: 2304 FOXE1 | forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2) [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: AAFAGPSGAY  
 Übereinstimmung AA+AGP GAY  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: AAYAGPDGAY

Score = 25.2 bits (52), Expect = 0.33; Identities = 8/10 (80%),  
 Positives = 9/10 (90%), Gaps = 0/10 (0%)

### 6.3.3 ZNF20

ZNF20 wurde in Bande 12 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 69 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 19 %. Das Signal bei  $m/z$  1393,70 kann der Sequenz zugeordnet werden, wenn das initiale Methionin als abgespalten und der neu entstandene *N*-Terminus als acetyliert angenommen wird.

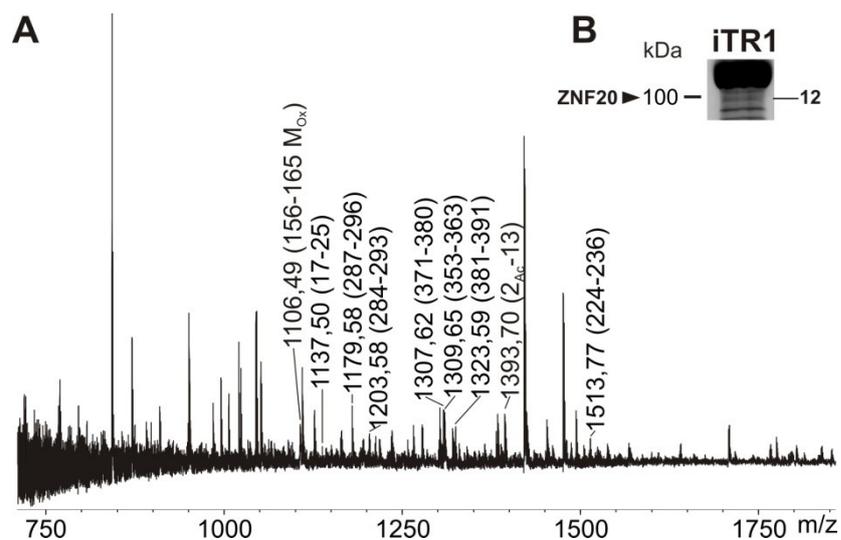


Abbildung 69 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF20. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF20 ist gekennzeichnet.

### 6.3.4 ZNF761

ZNF761 wurde in Bande 12 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 70 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 19 %. Das Signal bei  $m/z$  1181,64 wird der Sequenz zugeordnet, wenn das initiale Methionin als abgespalten und der neu entstandene *N*-Terminus als acetyliert angenommen wird. Allerdings lässt sich ebenfalls das Signal bei  $m/z$  1312,63 dem Protein-*N*-Terminus zuordnen, wenn keine Acetylierung vorhanden ist. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ATXN2L zuordnen.

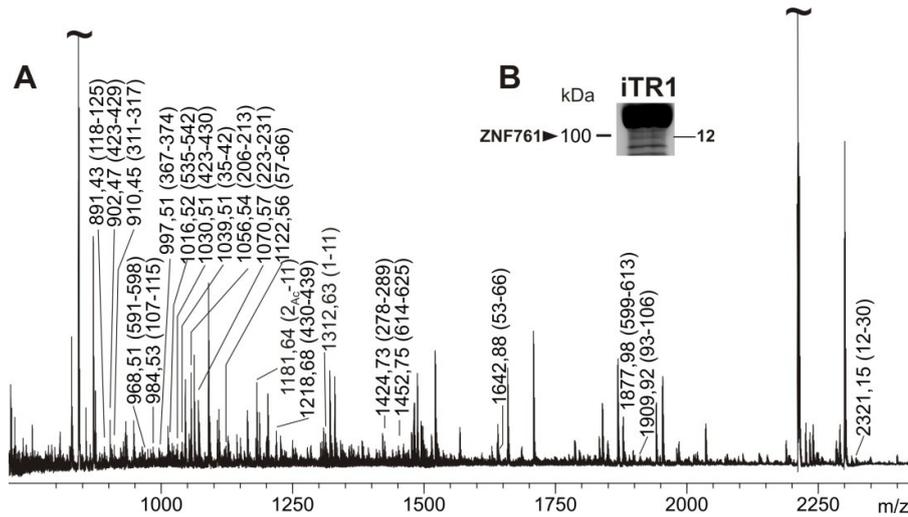


Abbildung 70 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF761. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF761 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.5 ZNF769/RBAK

ZNF769/RBAK wurde in Bande 13 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 71 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 19 %. Das Signal bei m/z 1263,60 wird der Sequenz zugeordnet, wenn das initiale Methionin als acetyliert angenommen wird. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich POGK zuordnen.

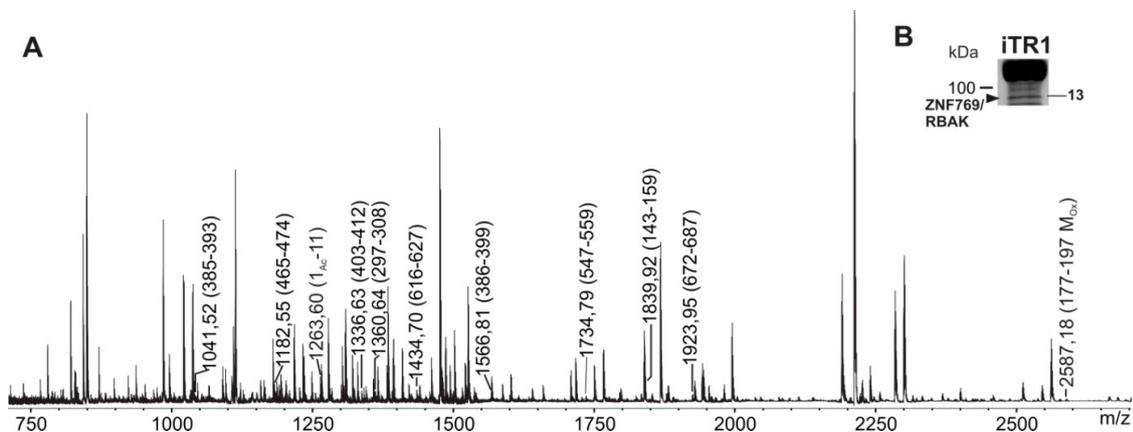


Abbildung 71 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF769/RBAK. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF769/RBAK ist gekennzeichnet.

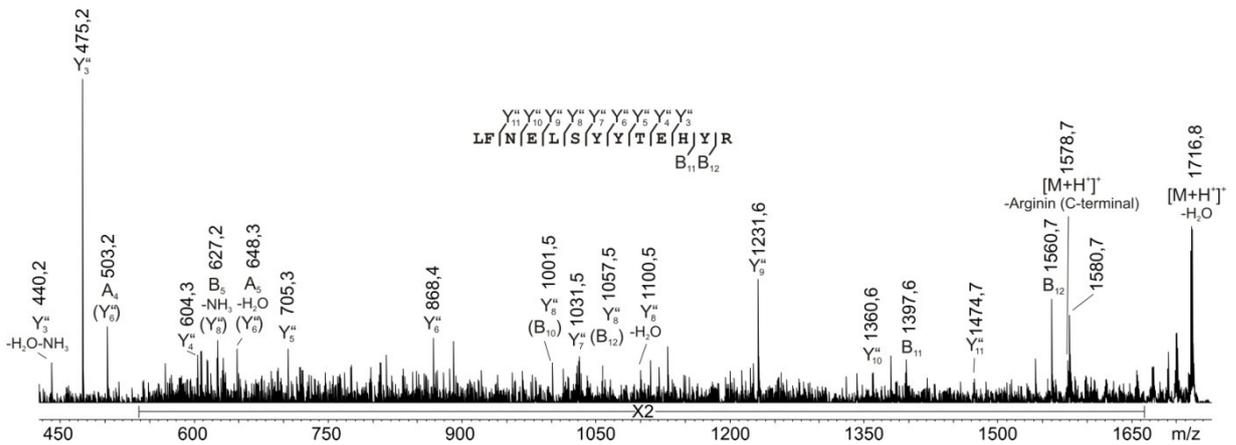


Abbildung 72: MS/MS Spektrum des Peptids LFNELSYYTEHYR des ZNF769/RBAK. Precursorsignal: m/z 1734,8 (547-559). B- und Y''-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y''-Ionenserie über dem Spektrum angegeben.

Ergebnis der BLAST-Suche:

1. Treffer: GENE ID: 57786 RBAK | RB-associated zinc finger [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: LFNELSYYTEHYR  
 Übereinstimmung LFNELSYYTEHYR  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: LFNELSYYTEHYR

Score = 48,6 bits (107), Expect = 1e-9; Identities = 13/13 (100%),  
 Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

2. Treffer: GENE ID: 23245 ASTN2 | astrotactin 2 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: ELSYYTEHYR  
 Übereinstimmung +L +YTE+YR  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: QLTFYTEQYR

Score = 26.1 bits (54), Expect = 0.030; Identities = 6/10 (60%),  
 Positives = 6/8 (75%), Gaps = 1/8 (13%)

### 6.3.6 ZNF7

ZNF7 wurde in Bande 13 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 71 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 19 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich POGK zuordnen.

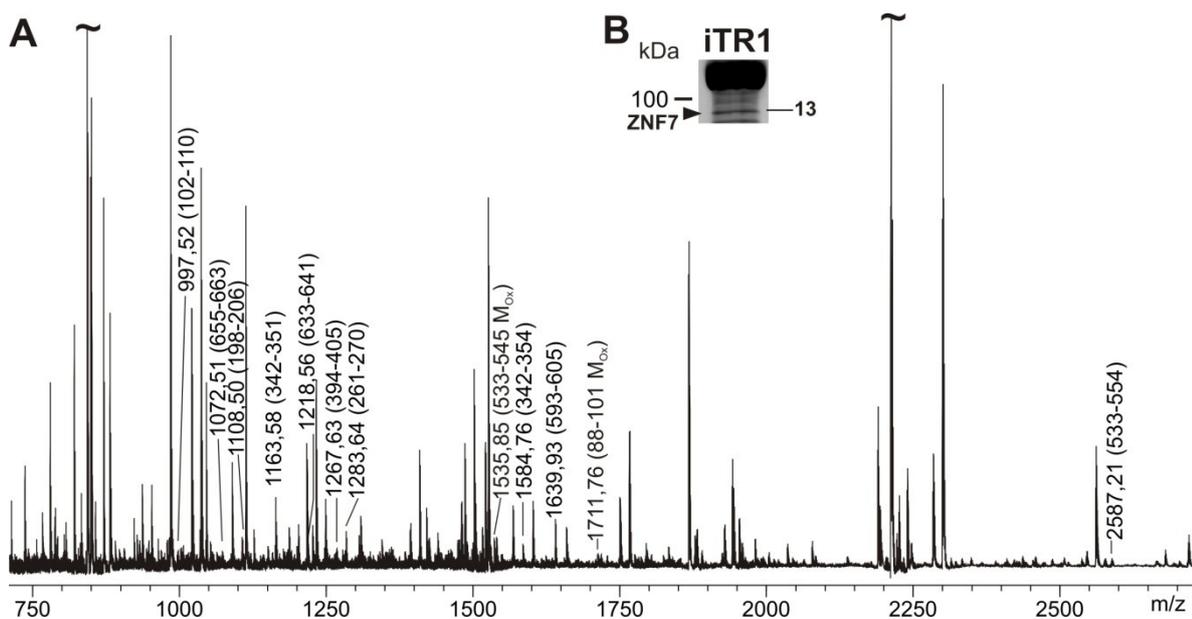


Abbildung 73 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF7. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet, Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF7 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.7 ZNF8

ZNF7 wurde in den Banden 15,16 und 19 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 74 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 13 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich PCCA und GRP75 zuordnen.

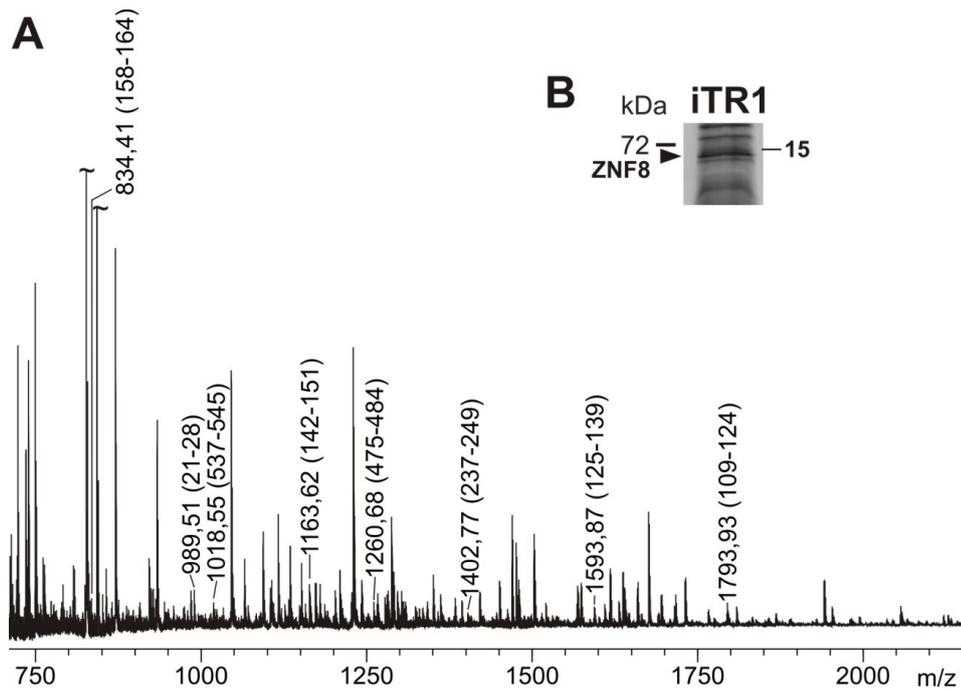


Abbildung 74 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF8. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF8 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

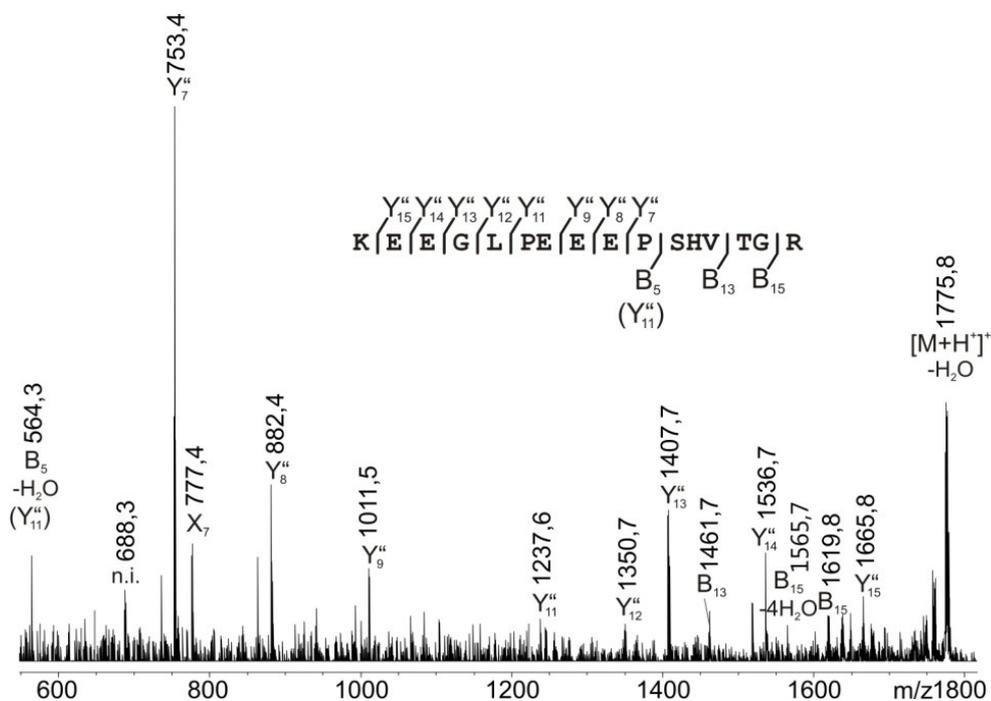


Abbildung 75: MS/MS Spektrum des Peptids KEEGLPEEEPSHVTGR des ZNF8. Precursorsignal: m/z 1793,8 (109-124). B- und Y'-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y'-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. „n.i.“ steht für „nicht identifiziert“.

Ergebnis der BLAST-Suche:

**1. Treffer:** GENE ID: 7554 ZNF8| zinc finger protein 8 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz:                    KEEGLPEEEPSHVTGR  
 Übereinstimmung                                    KEEGLPEEEPSHVTGR  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz:            KEEGLPEEEPSHVTGR

Score = 53,7 bits (119), Expect = 4e-11; Identities = 16/16 (100%),  
 Positives = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)

**2. Treffer:** GENE ID: 149603 RNF187 | ring finger protein 187 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz:                    KEEGLPEEE  
 Übereinstimmung                                    KEEGLPE+E  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz:            KEEGLPEDE

Score = 29,5 bits (62), Expect = 0.003; Identities = 8/9 (89%),  
 Positives = 9/9 (100%), Gaps = 0/9 (0%)

**6.3.8 ZNF460**

ZNF460 wurde in den Banden 16,18 und 19 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 76 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 26 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich HSF2B zuordnen.

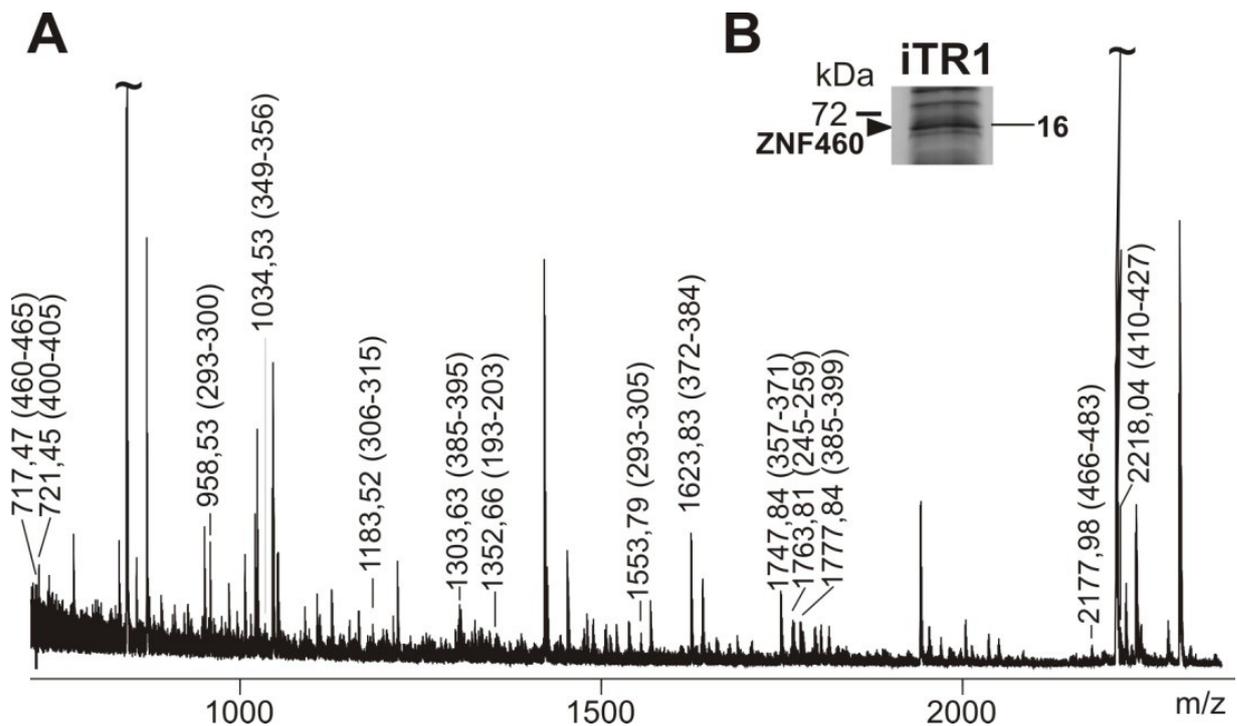


Abbildung 76 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF460. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF460 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

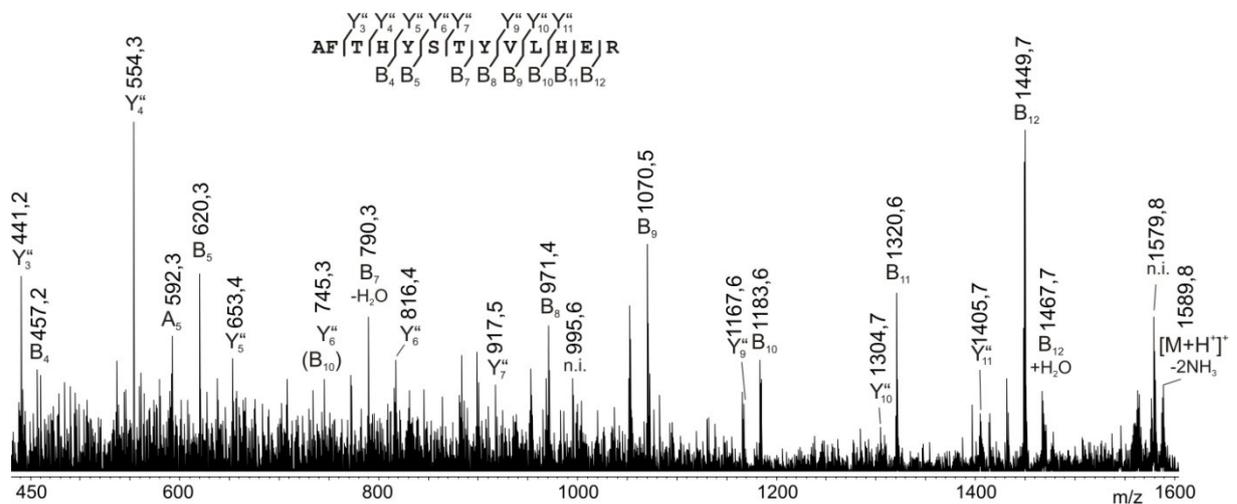


Abbildung 77: MS/MS Spektrum des Peptids AFTHYSTYVLHER des ZNF460. Precursorsignal: m/z 1623,8 (372-384). B- und Y'-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen Y'-Ionenserie über dem Spektrum angegeben.

Ergebnis der BLAST-Suche:

**1. Treffer:** GENE ID: 10794 ZNF460 | zinc finger protein 460 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: AFTHYSTYVLHER  
 Übereinstimmung AFTHYSTYVLHER  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: AFTHYSTYVLHER

Score = 46,9 bits (103), Expect = 5e-9; Identities = 13/13 (100%),  
 Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

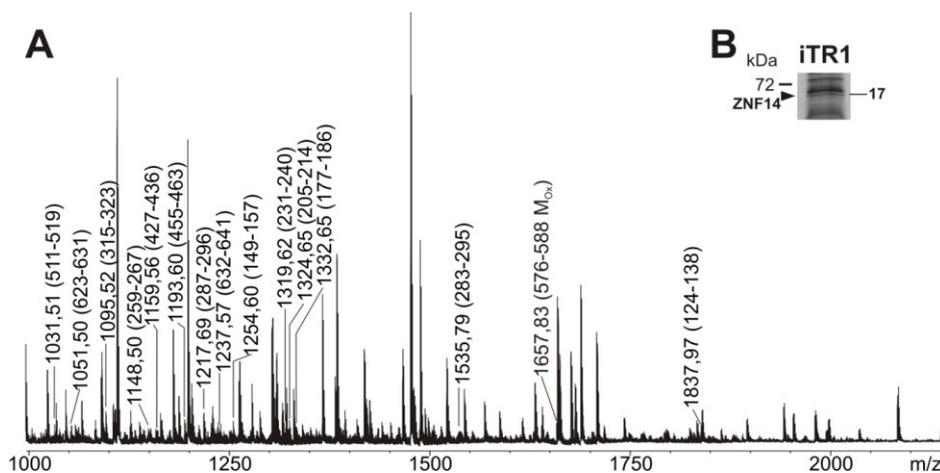
**2. Treffer:** GENE ID: 125919 ZNF543 | zinc finger protein 543 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: AFTHYSTYVLHER  
 Übereinstimmung AFTH ST+VLH R  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: AFTHCSTFVLHKR

Score = 32,5 bits (69), Expect = 3e-4; Identities = 10/13 (77%),  
 Positives = 11/13 (85%), Gaps = 0/13 (0%)

**6.3.9 ZNF14**

ZNF14 wurde in Bande 17 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 78 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 21 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich HSP71 und Q59H57 zuordnen.



**Abbildung 78 A:** „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF14. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; **B:** Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF14 ist gekennzeichnet.

### 6.3.10 ZNF324

ZNF324 wurde in Banden 19 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 79 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 32 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZNF426 und ZNF791 zuordnen.

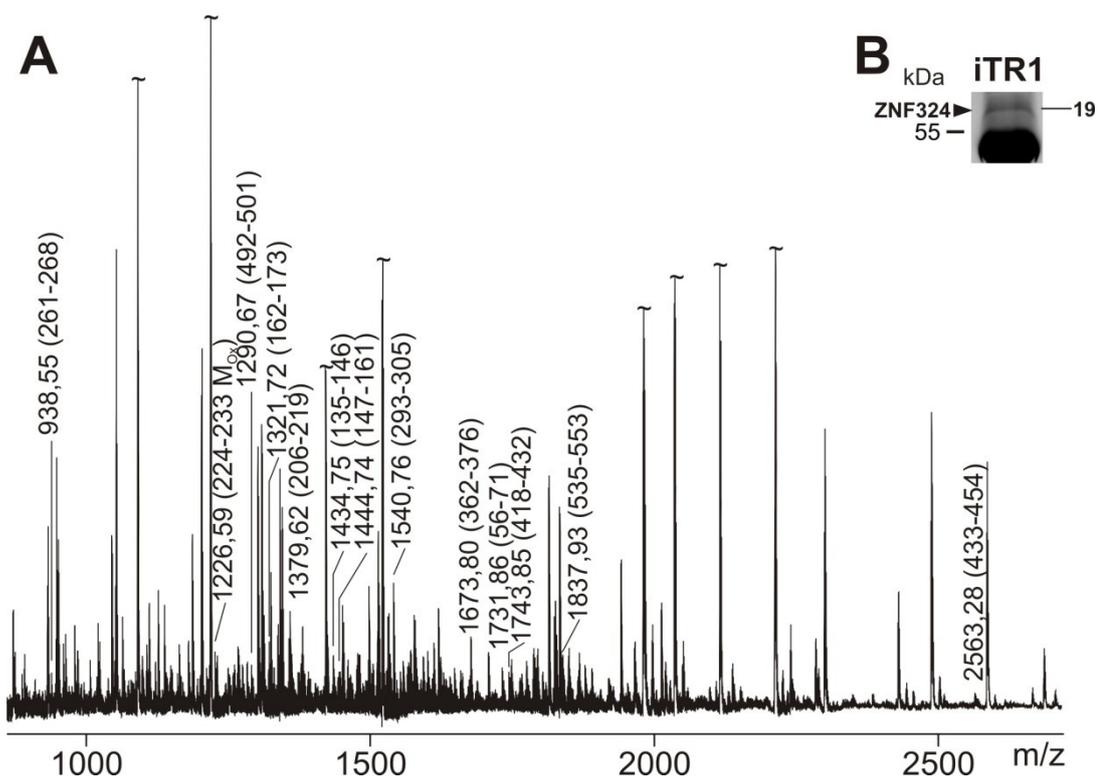


Abbildung 79 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF324. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF324 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.11 ZNF426

ZNF426 wurde in Banden 19 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 80 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 25 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZNF324 und ZNF791 zuordnen.

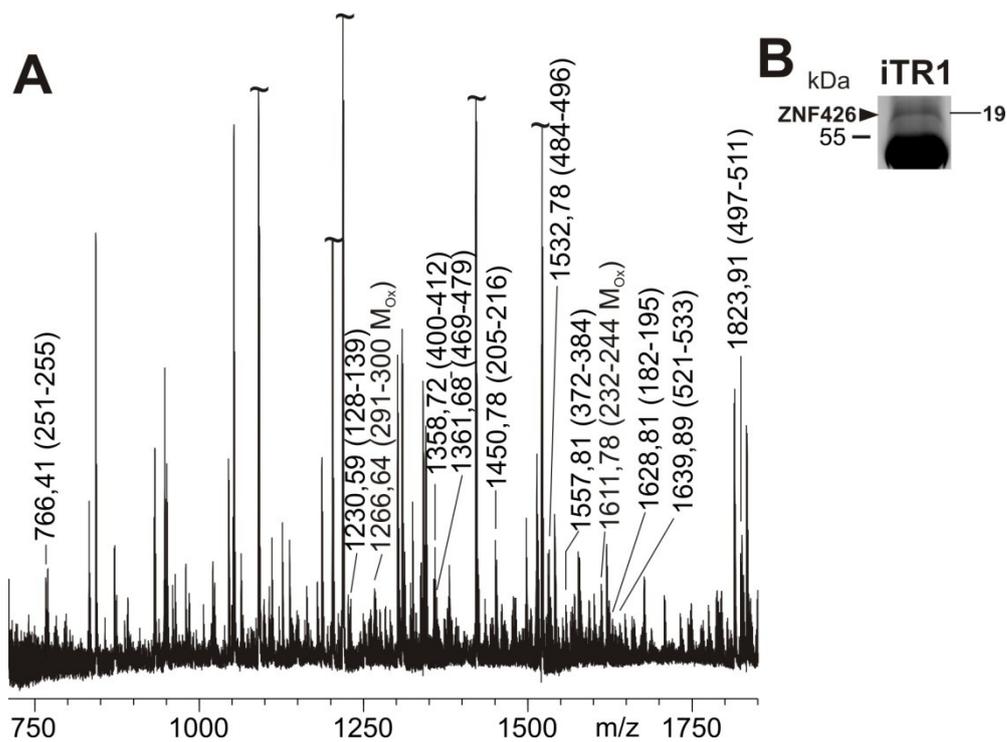


Abbildung 80 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF426. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF426 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.12 ZNF791

ZNF791 wurde in den Banden 19 und 24 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 81 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 18 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZNF324 und ZNF426 zuordnen.

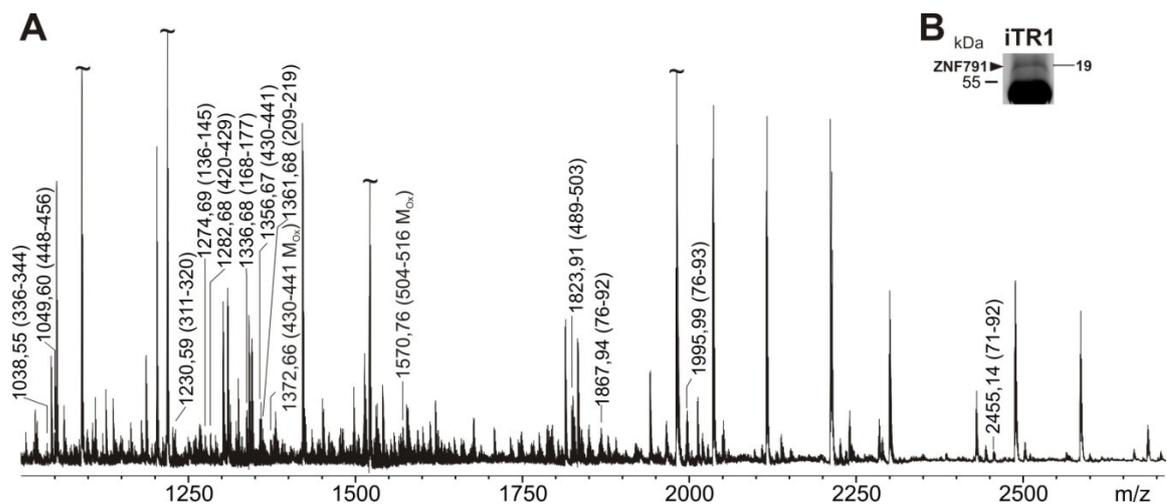


Abbildung 81 A: Massenspektrum des ZNF791. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF791 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.13 ZNF527 und ZNF354B

ZNF527 und ZNF354B wurden in Bande 19 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 82 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt jeweils 19 %. *N*-terminale Acetylierungen sind nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZNF8 und ZNF460 zuordnen.

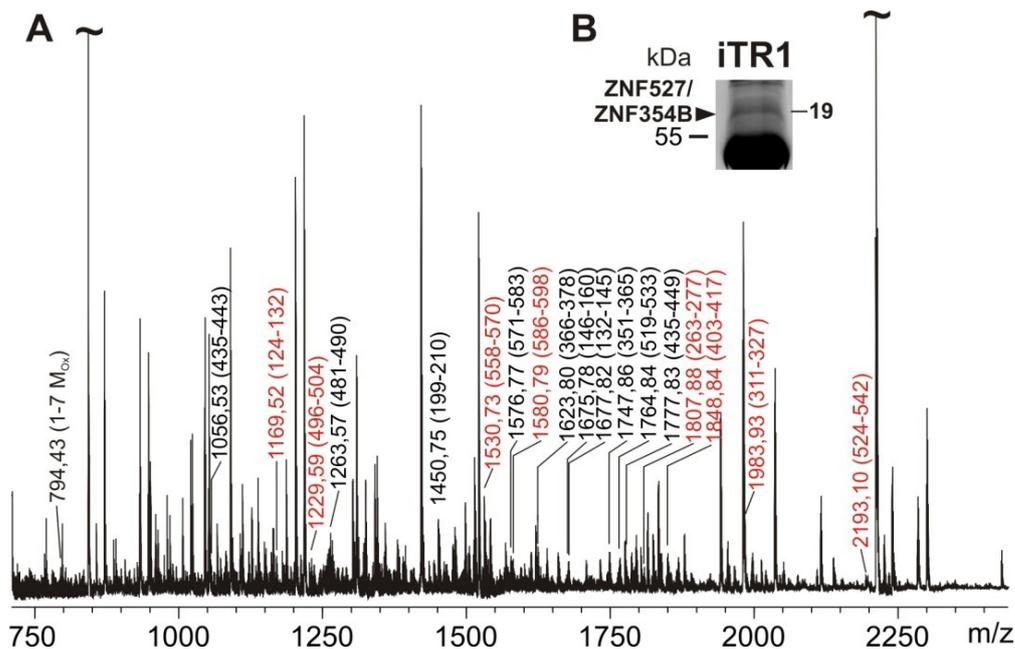


Abbildung 82 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF527 und des ZNF354B (rot gekennzeichnete Signale). Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande der Proteine ZNF527 und ZNF354B ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.14 ZNF799

ZNF799 wurde in Bande 20 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 83 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 21 %. Das Signal bei  $m/z$  1923,97 wird der Sequenz zugeordnet, wenn es *N*-terminal acetyliert und am Methionin oxidiert ist.

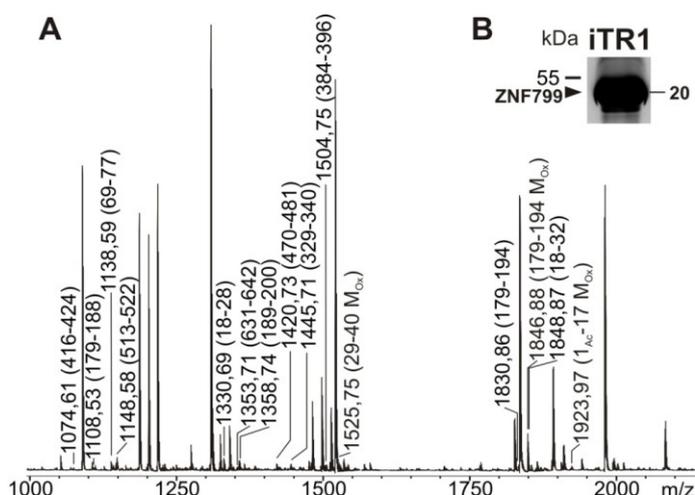


Abbildung 83 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF799. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF799 ist gekennzeichnet.

### 6.3.15 ZNF101

ZNF101 wurde in Banden 23 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 84 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 36 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlic Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich YBOX1 und der Q53HR3 (Gen Name: ENO1) zuordnen.

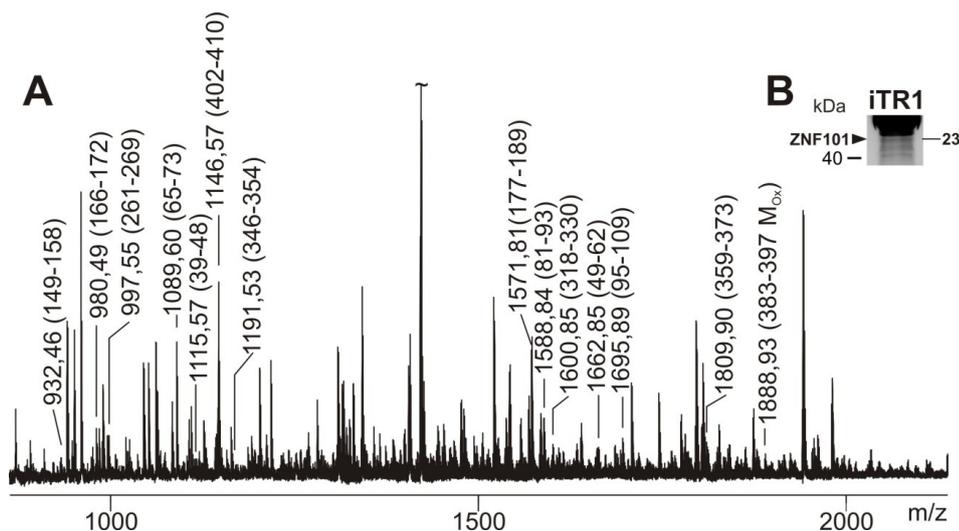


Abbildung 84 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF101. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF101 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

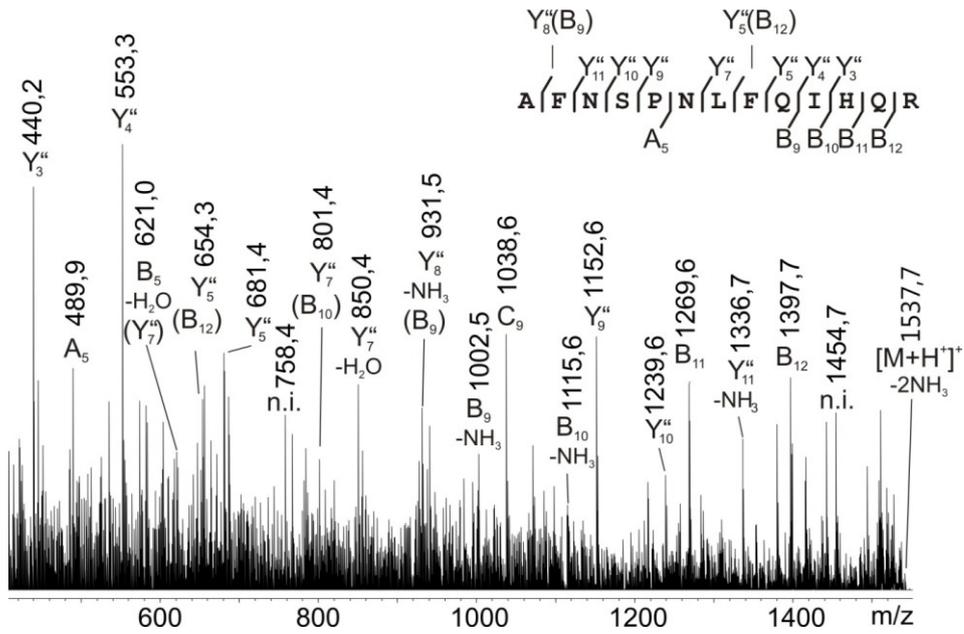


Abbildung 85: MS/MS Spektrum des Peptids AFNSPNLFQIHQR des ZNF101. Precursorsignal: m/z 1571,8 (177-189). B- und Y"-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y"-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. „n.i.“ steht für „nicht identifiziert“

Ergebnis der BLAST-Suche:

**1. Treffer:** GENE ID: 94039 ZNF101 | zinc finger protein 101 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: AFNSPNLFQIHQR  
 Übereinstimmung AFNSPNLFQIHQR  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: AFNSPNLFQIHQR

Score = 46,4 bits (102), Expect = 6e-9; Identities = 13/13 (100%),  
 Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

**2. Treffer:** GENE ID: 163050 ZNF564 | zinc finger protein 564 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: AFNSPNLFQIHQR  
 Übereinstimmung AF+ P LFQIH+R  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: AFDRPSLFQIHER

Score = 33,7 bits (72), Expect = 1e-4; Identities = 9/13 (69%),  
 Positives = 11/13 (85%), Gaps = 0/13 (0%)

### 6.3.16 ZNF764

ZNF764 wurde in den Banden 24 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 86 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 16 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich EF1G, RRS1 und ZNF791 zuordnen.

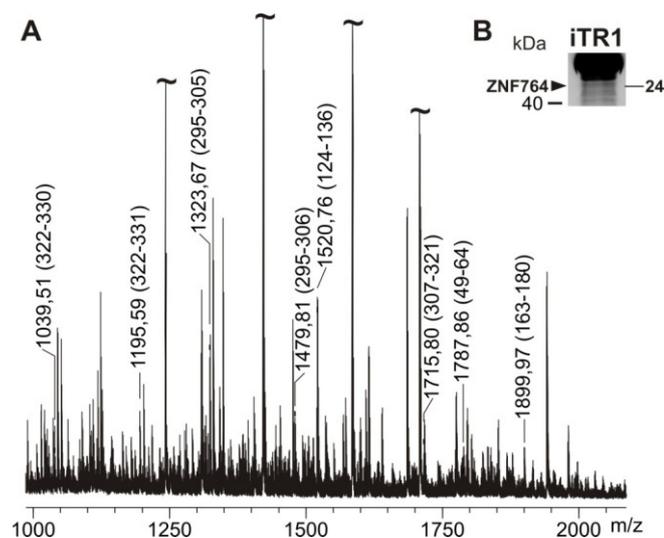


Abbildung 86 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF764. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF764 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.17 ZNF562

ZNF562 wurde in Bande 25 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 87 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 41 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZNF552 und ZNF302 zuordnen.

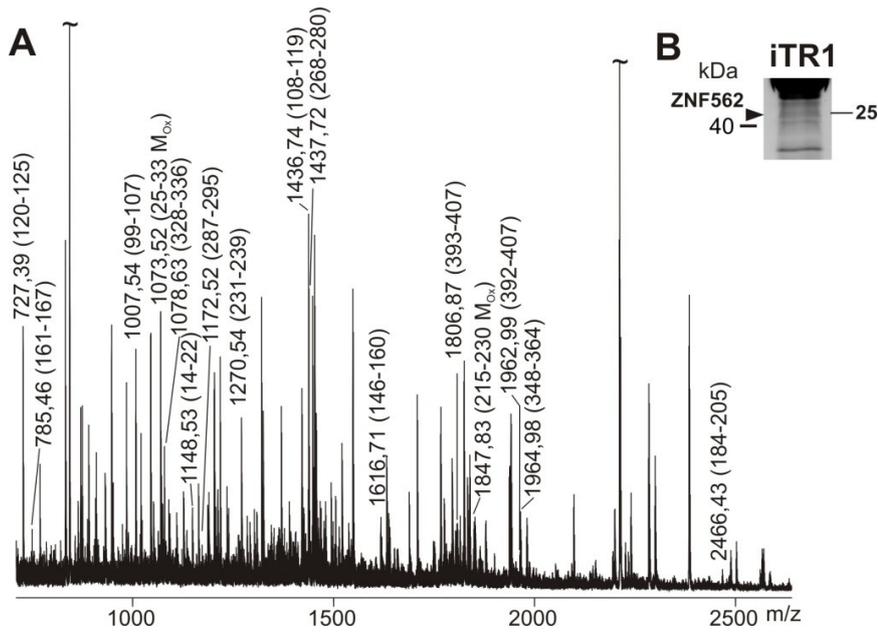


Abbildung 87 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF562. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF562 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

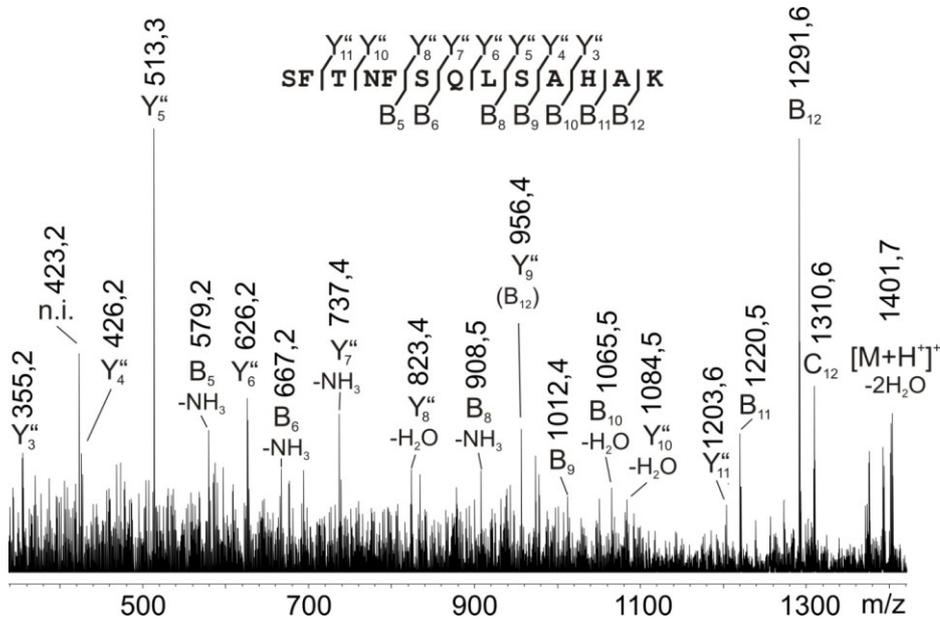


Abbildung 88: MS/MS Spektrum des Peptids SFTNFSQLSAHAK des ZNF562. Precursor-Signal: m/z 1437,7 (547-559). B- und Y'-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen Y'-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. „n.i.“ steht für „nicht identifiziert“.

Ergebnis der BLAST-Suche:

**1. Treffer:** GENE ID: 54811 ZNF562 | zinc finger protein 562 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: SFTNFSQLSAHAK  
 Übereinstimmung SFTNFSQLSAHAK  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: SFTNFSQLSAHAK

Score = 43,1 bits (94), Expect = 9e-8; Identities = 13/13 (100%),  
 Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

**2. Treffer:** GENE ID: 729648 ZNF812 | zinc finger protein 812 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: SFTNFSQLSAHAK  
 Übereinstimmung SFTNFSQLSAH K  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: SFTNFSQLSAHVK

Score = 39,7 bits (86), Expect = 1e-6; Identities = 12/13 (92%),  
 Positives = 12/13 (92%), Gaps = 0/13 (0%)

### 6.3.18 ZNF552

ZNF552 wurde in Banden 25 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 89 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 55 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZNF562 und ZNF302 zuordnen.

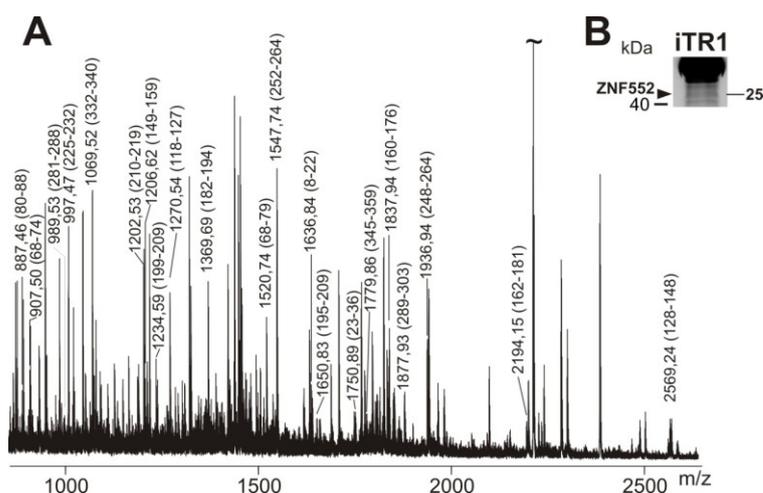


Abbildung 89 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF552. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF552 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.19 ZNF302

ZNF302 wurde in Bande 25 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 90 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 16 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZNF562 und ZNF552 zuordnen.

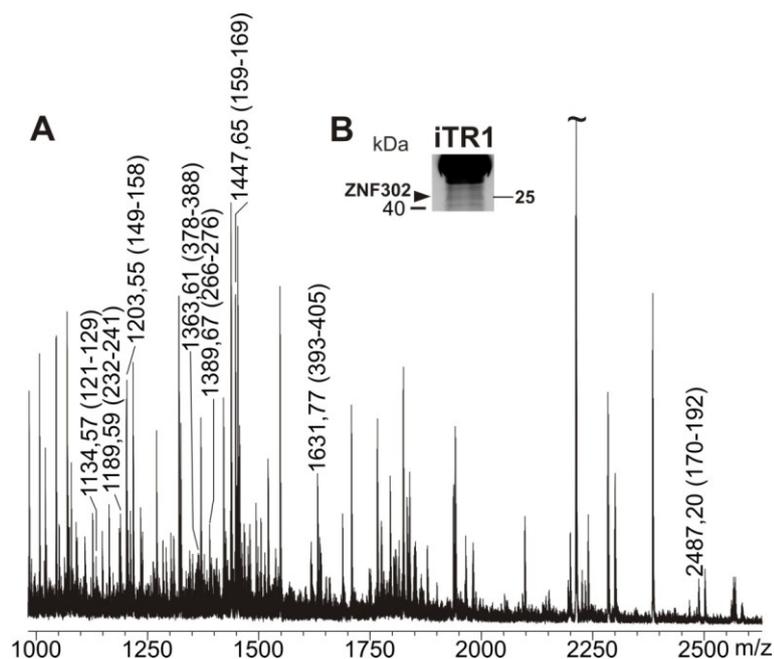


Abbildung 90 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF302. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF302 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.20 ZFP1

ZFP1 wurde in den Banden 26 und 27 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 91 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 38 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZNF669 zuordnen.

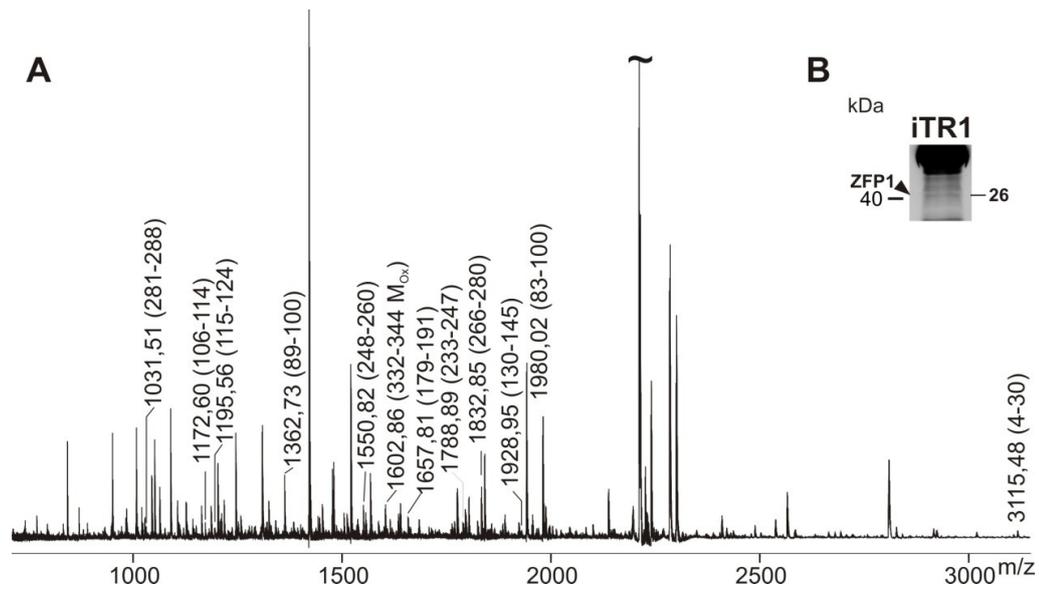


Abbildung 91 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZFP1. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZFP1 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

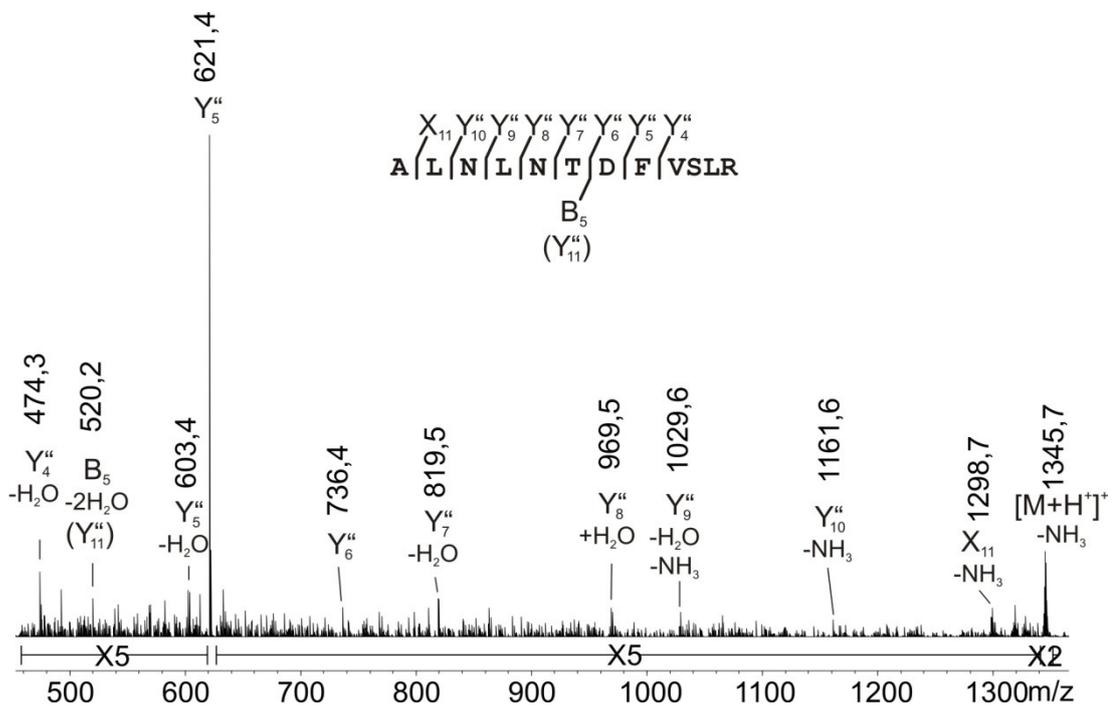


Abbildung 92: MS/MS Spektrum des Peptids ALNLNTDFVSLR des ZFP1. Precursorsignal: m/z 1362,7 (547-559). B- und Y'-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y'-Ionenserie über dem Spektrum angegeben.

Ergebnis der BLAST-Suche:

**1. Treffer:** GENE ID: 162239 ZFP1 | zinc finger protein 1 homolog (mouse) [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: ALNLNTDFVSLR  
 Übereinstimmung: ALNLNTDFVSLR  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: ALNLNTDFVSLR

Score = 40,5 bits (88), Expect = 6e-7; Identities = 12/12 (100%),  
 Positives = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)

**2. Treffer:** GENE ID: 11174 ADAMTS6 | ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 6 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: LNLNTDFVSL  
 Übereinstimmung: L LNTDFVSL  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: LTLNTDFVSL

Score = 27,4 bits (57), Expect = 0,011; Identities = 8/9 (89%),  
 Positives = 8/9 (89%), Gaps = 0/9 (0%)

### 6.3.21 ZNF669

ZNF669 wurde in den Banden 26 und 27 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 93 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 36 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZFP1 zuordnen.

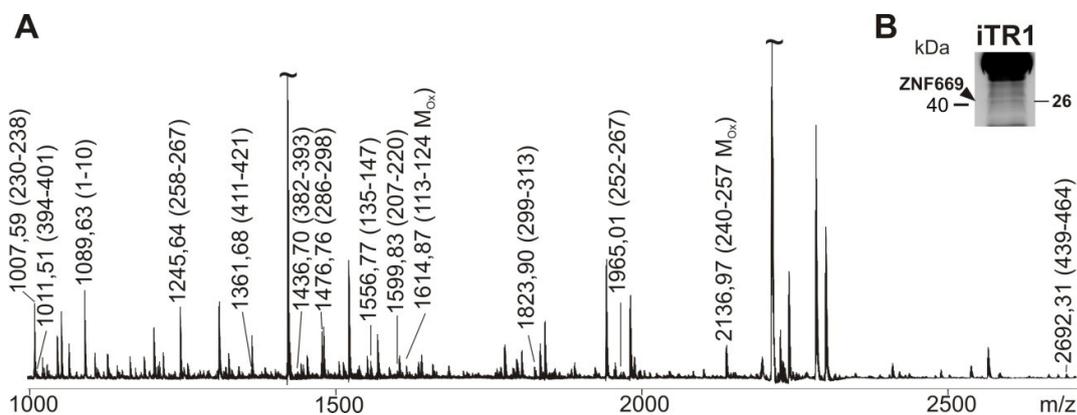


Abbildung 93 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF669. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF669 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

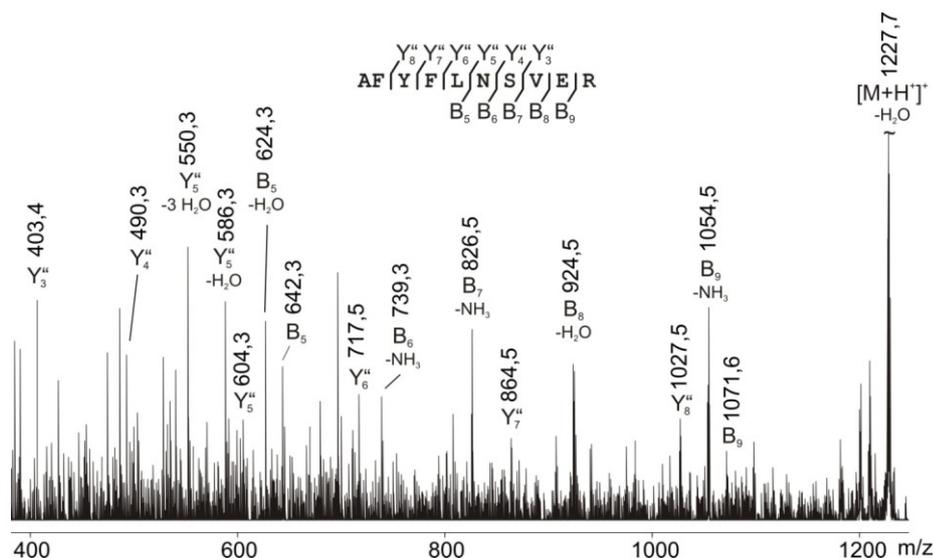


Abbildung 94: MS/MS Spektrum des Peptids AFYFLNSVER des ZNF669. Precursorsignal:  $m/z$  1245,6 (258-267). B- und Y'-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y'-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

Ergebnis der BLAST-Suche:

1. Treffer: GENE ID: 54811 ZNF669| zinc finger protein 669[Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: AFYFLNSVER  
 Übereinstimmung: AFYFLNSVER  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: AFYFLNSVER

Score = 36,3 bits (78), Expect =  $8e-6$ ; Identities = 10/10 (100%),  
 Positives = 10/10 (100%), Gaps = 0/10 (0%)

2. Treffer: GENE ID: 85007 AGXT2L2| alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 2 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: FYFLNS  
 Übereinstimmung: FYFLNS  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: FYFLNS

Score = 24,0 bits (49), Expect = 0,072; Identities = 6/6 (100%),  
 Positives = 6/6 (100%), Gaps = 0/6 (0%)

### 6.3.22 ZNF584

ZNF584 wurde in den Banden 26 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 95 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung beträgt 21 %. Eine N-terminale Acetylierung ist nicht ersichtlich. Die weiteren Signale im Spektrum lassen sich ZFP1, ZNF669 und B4DW52 (Gen Name: ACTB) zuordnen.

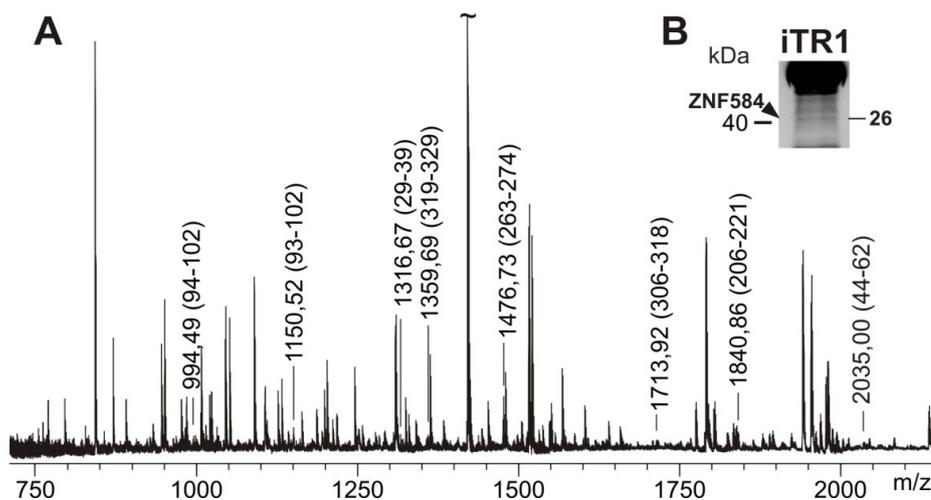


Abbildung 95 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF584. Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande des ZNF584 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

### 6.3.23 ZNF707/ZNF747

ZNF707 und ZNF747 wurde in Bande 30 des in Abbildung 24 dargestellten Gels des iTR-Extraktes nachgewiesen. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 96 gezeigt. Die aus dem Spektrum resultierende Sequenzabdeckung für ZNF707 beträgt 50 % und für ZNF747 34 %. Das Signal bei m/z 947,46 wird der Sequenz des ZNF707 zugeordnet, wenn das initiale Methionin einer alternativen Sequenz als abgespalten angenommen wird.

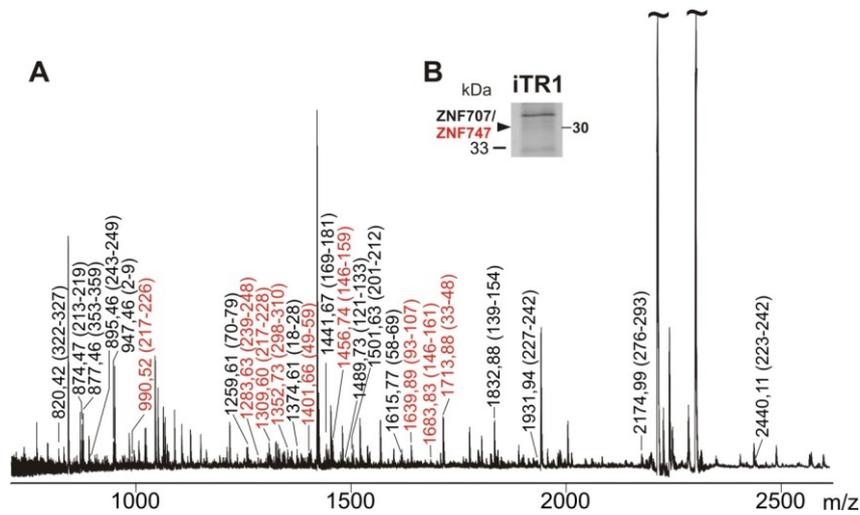


Abbildung 96 A: „Peptide-Mass-Fingerprint“ Massenspektrum des ZNF707 und des ZNF747 (B7ZAD9) (rot gekennzeichnete Signale). Ausgewählte Ionen-Signale wurden gekennzeichnet. Zahlen in Klammern geben den dem Signal zugeordneten Aminosäuresequenzbereich an. Matrix: DHB; B: Ausschnitt des Gels. Die Lage der Bande der Proteine ZNF707 und ZNF747 ist gekennzeichnet. Mit „~“ gekennzeichnete Signale wurden zur besseren Übersicht verkleinert.

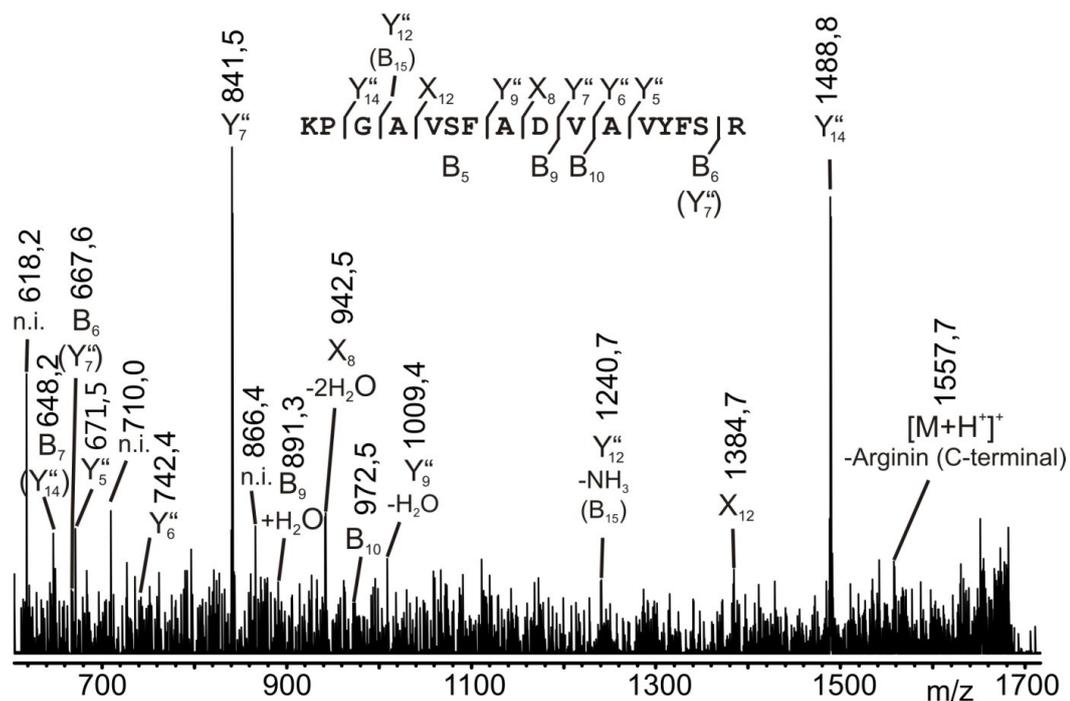


Abbildung 97: MS/MS-Spektrum des Peptids KPGAVSFADVAVYFSR des ZNF747. Precursorsignal: m/z 1734,8 (33-48). B- und Y“-Fragment-Ionensignale wurden bezeichnet. Die Peptidsequenz ist mit der dazugehörigen B- und Y“-Ionenserie über dem Spektrum angegeben. „n.i.“ steht für „nicht identifiziert“.

Ergebnis der BLAST-Suche:

**1. Treffer:** GENE ID: 65988 ZNF747 | zinc finger protein 747 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: KPGAVSFADVAVYFSR  
 Übereinstimmung KPGAVSFADVAVYFSR  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: KPGAVSFADVAVYFSR

Score = 52,4 bits (116), Expect = 3e-11; Identities = 16/16 (100%),  
 Positives = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)

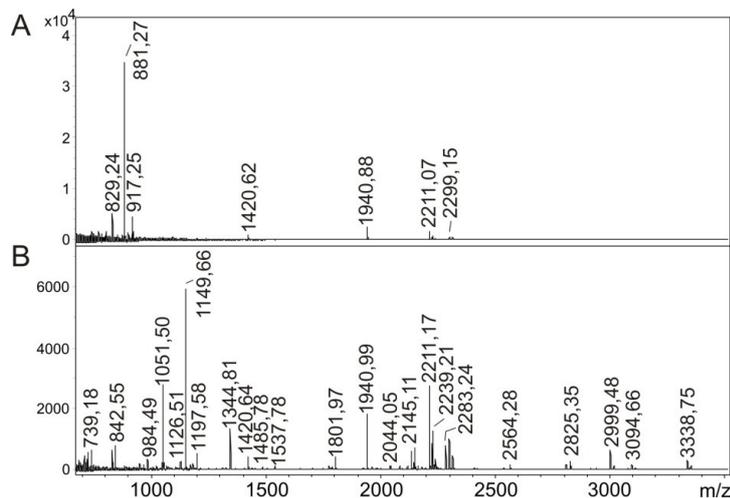
**2. Treffer:** GENE ID: 146542 ZNF688 | zinc finger protein 688 [Homo sapiens]

Gesuchte Aminosäuresequenz: KPGAVSFADVAVYFS  
 Übereinstimmung KPG VSFADVAVYFS  
 Zugeordnete Aminosäuresequenz: KP GTV SFADVAVYFS

Score = 46,0 bits (101), Expect = 4e-9; Identities = 14/15 (93%),  
 Positives = 14/15 (93%), Gaps = 0/15 (0%)

Das Ergebnis der BLAST-Suche schließt aus, dass das sequenzierte Peptid in anderen Proteinen vorkommt und bestätigt damit die korrekte Identifizierung.

### 6.4 NDKA-Spektren



**Abbildung 98: Spektren des NDKA. A: Nach der Phosphopeptidanreicherung ohne DHB im Ladepuffer. B: NDKA nach tryptischem Verdau**

## 6.5 Endoplasmin-Spektren

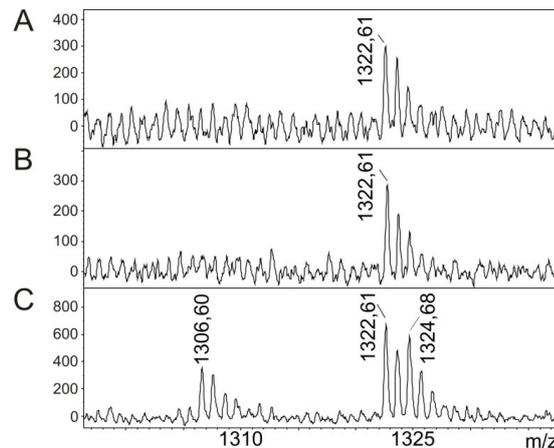


Abbildung 99: Ausschnitte aus Spektren des ENPL. A: nach Phosphopeptidanreicherung in Gegenwart von Methionin im Ladepuffer. B: ohne Methionin im Ladepuffer. C: Spektrum vor der Anreicherung. Zu sehen ist das Signal  $m/z$  1306,60 sowie deren oxidiertes Vertreter bei  $m/z$  1322,61. In diesem Fall zeigt die Anwendung der  $TiO_2$ -Säule auf den ENPL-Verdau eine Abreicherung der nichtoxidierten Signale ebenfalls in der Anreicherung mit Methionin im Ladepuffer.

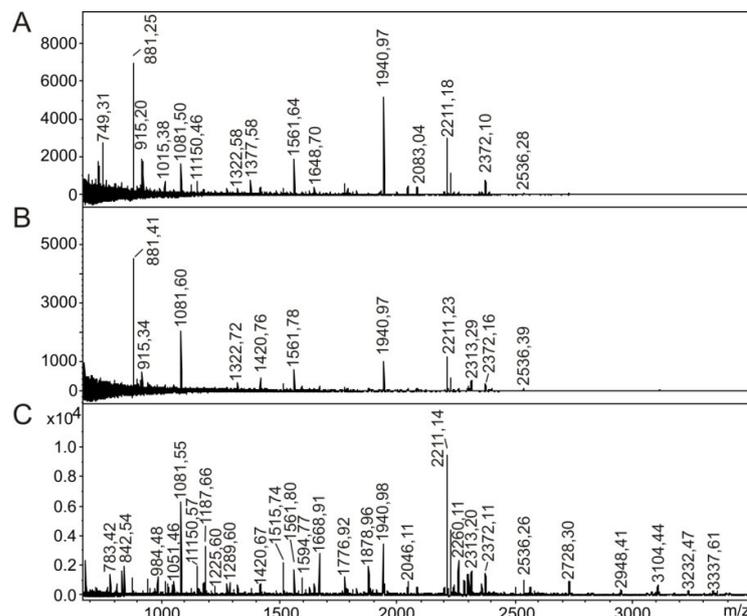


Abbildung 100: Spektren des ENPL. A: nach Phosphopeptidanreicherung in Gegenwart von Methionin im Ladepuffer. B: ohne Methionin im Ladepuffer. C: Spektrum vor der Anreicherung.

## 6.6 Phosphopeptidanreicherung von $\beta$ -Casein

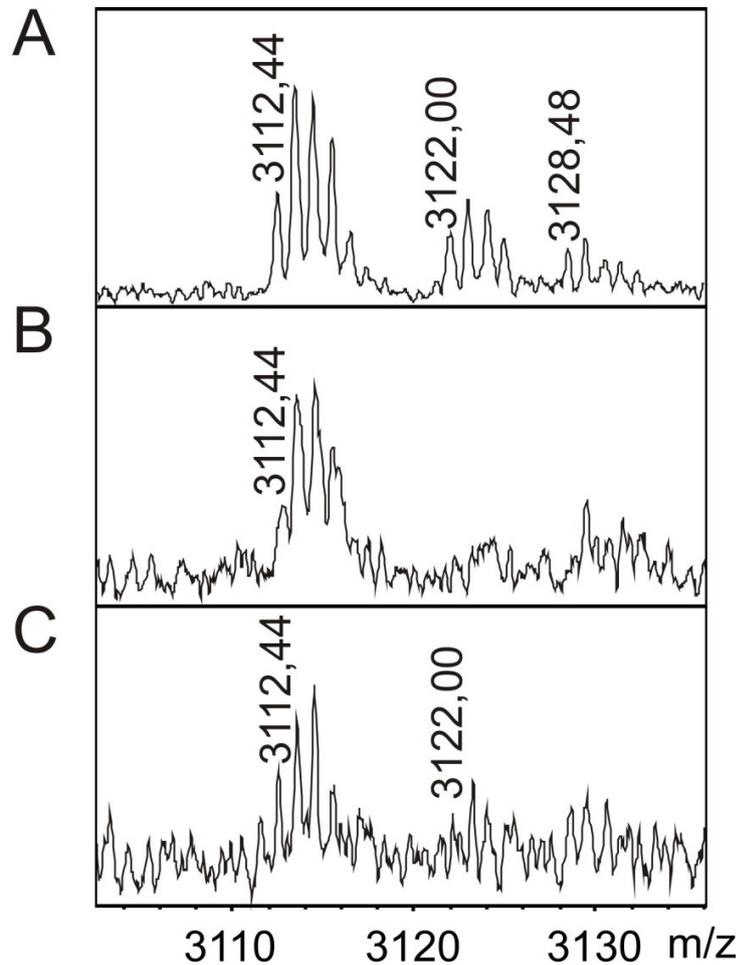


Abbildung 101: Ausschnitte aus Spektren des  $\beta$ -Casein. A: nach Phosphopeptidanreicherung in Gegenwart von Methionin im Ladepuffer. B: ohne Methionin im Ladepuffer. C: Spektrum vor der Anreicherung. Diese Messungen zeigen einen Effekt des Methionins auf die Anreicherung des vierfach phosphorylierten Peptids 16-40 bei  $m/z$  3122,00. Dieser Effekt beschränkte sich allerdings auf hochkonzentrierte  $\beta$ -Casein-Mischungen.

## 6.7 Gegenüberstellung der DHB- und der THAP/DHB-Matrixpräparation

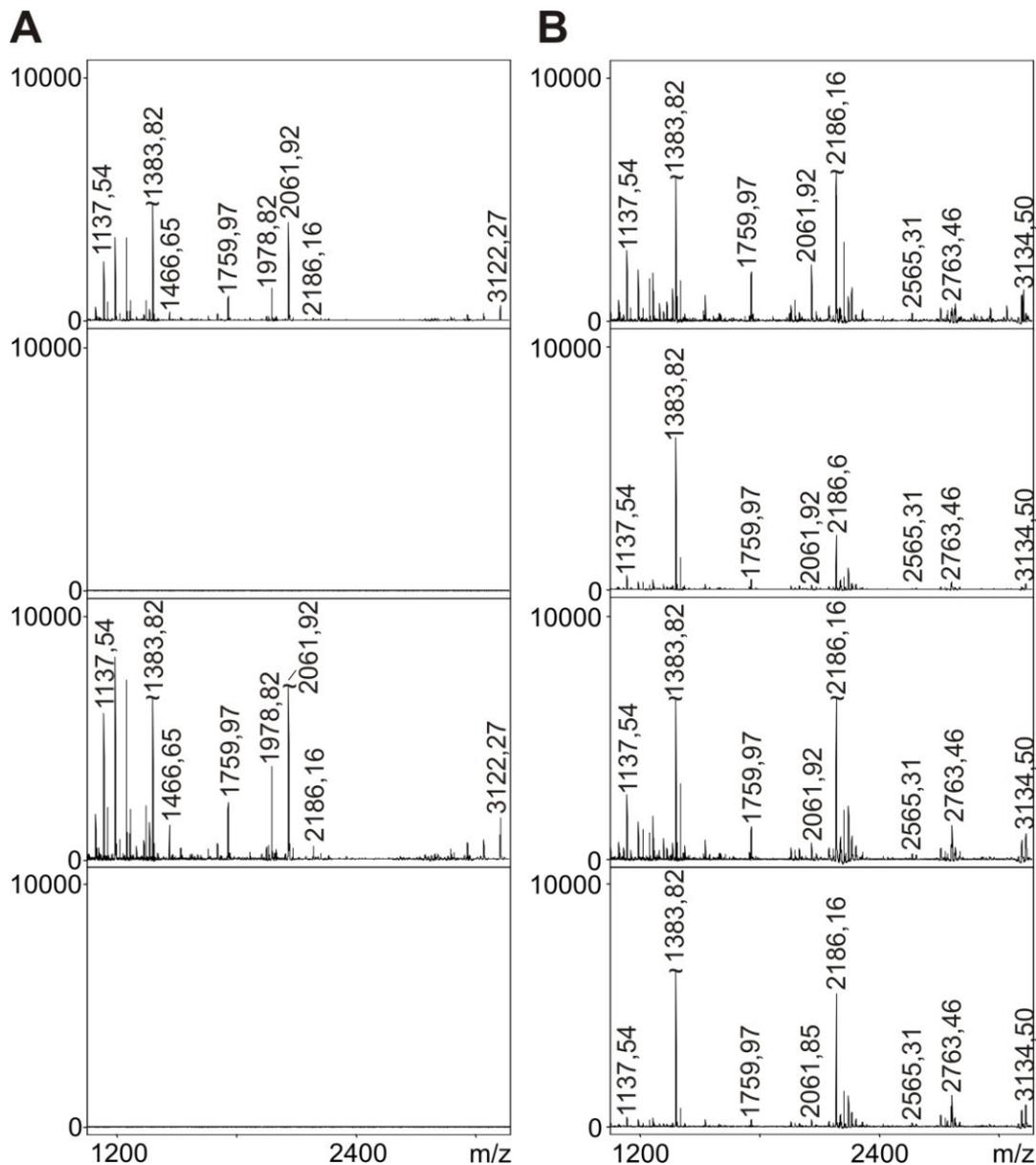


Abbildung 102: Präparationsbedingte lokale Unterschiede. A: Aufnahmen von  $\beta$ -Casein präpariert mit DHB-Matrix. B: Aufnahmen von  $\beta$ -Casein präpariert mit THAP/DHB-Matrix. Jedes Spektrum zeigt eine andere Position auf dem Spot der jeweiligen Präparation. Für jedes Spektrum wurden 100 Profile aufgenommen und aufsummiert. Während sich die Spektren in B in geringem Maße in der Intensität unterscheiden und so eine gleichmäßige Verteilung der Analyten über die gesamte Präparation zeigen, finden sich in A Positionen, in denen kein Analyt zu finden war. Dies resultiert aus der Bildung von Nadeln auf dem MALDI-Target und der damit einhergehenden Bildung lokaler Konzentrationsunterschiede („sweet spots“). (Eickner, Mikkat et al. 2011)



## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Dissertation wurde bisher von mir an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Rostock, März 2012