

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente zur
Identifizierung DNA-bindender und DNA-
reparierender Enzyme**

Eine chemisch-proteomische Studie

Malte Winnacker

aus

Heidelberg

2010

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am

(Malte Winnacker)

Dissertation eingereicht am: 22. Juli 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. Heinz Langhals

Mündliche Prüfung am: 4. Oktober 2010

„Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen, den Glauben zum Handeln.“

Max Planck

Danksagung

Herrn *Prof. Dr. Thomas Carell* danke ich sehr für die interessante und abwechslungsreiche Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine großzügige Unterstützung. Das hervorragende Arbeitsumfeld im Arbeitskreis *Carell* hat den Erfolg dieses Projektes erst möglich gemacht.

Herrn *Prof. Dr. Heinz Langhals* danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats. In diesem Zusammenhang sei hier auch allen anderen Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Mitwirken am Promotionskolloquium herzlich gedankt.

Ich danke Frau *Slava Gärtner* und Frau *Sabine Voß* für die schnelle und unbürokratische Hilfe in organisatorischen und chemischen Belangen.

Dr. Markus Müller danke ich für seine Hilfe und Tipps bei vielen biologischen und Computer-technischen Fragestellungen und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Stephan A. Sieber danke ich für seine Hilfe und Tipps bei vielen proteomischen Fragestellungen, seine Unterstützung und seine Einweisungen in Theorie und Praxis der *nano*-HPLC-ESI-MS/MS-Messungen.

Ich danke *Claudia Gräf, Emine Kaya, Melanie Maul* und *Ralf Strasser* für die mir zur Verfügung gestellten Proteine und Protein-Lysate.

Falk Butter (Arbeitsgruppe *Prof. Dr. M. Mann*, MPI für Biochemie und Neurobiologie, Martinsried) danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den SILAC-Experimenten.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilungen für NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren.

Meinem Vorgänger auf dem in dieser Dissertation beschriebenen Projekt, *Dr. Sascha Breeger*, danke ich für die hervorragende Einweisung in die Thematik und die fachliche Unterstützung.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des AK *Carell* danke ich für die entspannte und immer anregende Atmosphäre sowohl bei der Arbeit als auch bei den vielfältigen Aktivitäten außerhalb des Labors (Bergwanderungen, Skifahren, Oktoberfest, Nockherberg, Kloster Andechs, Grillen, Sport-Veranstaltungen etc.).

Thomas Reißner, Ralf Strasser und *Christian Trindler* danke ich für so manchen unvergesslichen Ausflug ins Münchner Nachtleben, auf die Wiesen oder zum Karneval.

Meiner „Box-Nachbarin“ *Stephanie Schorr* danke ich ganz besonders für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Nachbarschaft.

Allen jetzigen und ehemaligen Laborkollegen des Labors F4.012 („Labor Alpenblick“) - ob bereits genannt oder noch nicht genannt - danke ich für die lockere und angenehme Labor-Atmosphäre.

Meinen F-Praktikanten/-innen *Korbinian Heil, Sophie Putzien, Sandra Amann, Veronika Welzmler, Stefan Weigand, Anika Kern* und *Kathrin Schwinghammer* sowie meinen Bachelor-Studentinnen *Nadja Barl* und *Sabrina Walser* danke ich für ihr Interesse an diesem Projekt und ihren zuverlässigen Einsatz bei der Laborarbeit.

Thomas Reißner, Christian Trindler, Daniel Globisch und *Dr. Dave Pearson* danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen bestimmter Kapitel dieser Dissertation.

Den Mitgliedern des GDCh-Jungchemiker-Regionalforums München danke ich für die gemeinsamen JCF-Aktivitäten, vor allem für die Organisation und Durchführung des JCF-Alpenforums.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meiner ganzen Familie dafür, dass sie mich in privaten und beruflichen Belangen immer unterstützen und mir Rückhalt geben.

Meiner Frau *Christine* danke ich ebenfalls ganz besonders dafür, dass sie mich im letzten Jahr dieser Doktorarbeit begleitet hat, mir immer Rückhalt und Vertrauen gibt und mich vor allem auch in Zukunft begleiten wird.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

- M. Winnacker, S. Breeger, R. Strasser, T. Carell, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 109–118, *Novel Diazirine-Containing DNA Photoaffinity Probes for the Investigation of DNA-Protein-Interactions*.
- M. Winnacker, V. Welzmler, R. Strasser, T. Carell, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1345–1349, *Development of a DNA Photoaffinity Probe for the Analysis of 8-OxodG-Binding Proteins in a Human Proteome*.

Konferenzbeiträge:

- M. Winnacker, S. Breeger, T. Reißner, and T. Carell, *Chemical-Proteomics: Investigation of DNA-Protein-Interactions via Oligonucleotides modified with Photocrosslinking Moieties*, **Posterpräsentation**, XII Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Tihany, Ungarn, Juni **2007**.
- M. Winnacker, S. Breeger, T. Reißner, and T. Carell, *Investigation of DNA-Protein Interactions via Photocrosslinking as a Useful Tool for Chemical Proteomics*, **Posterpräsentation**, Bayer-Doktorandenkurs, Leverkusen, August **2007**.
- M. Winnacker, S. Breeger, T. Reißner, and T. Carell, *Investigation of DNA-Protein Interactions via Photocrosslinking as a Useful Tool for Chemical Proteomics*, **Posterpräsentation**, 10. JCF-Frühjahrssymposium, Rostock, März **2008**.
- M. Winnacker, V. Welzmler, and T. Carell, *DNA-Repair: Novel Modified DNA Oligonucleotides for the Investigation of DNA Repair Enzymes via Photoaffinity Labeling*, **Posterpräsentation**, 11. JCF-Frühjahrssymposium, Essen, März **2009**.
- M. Winnacker, S. Breeger, V. Welzmler, and T. Carell, *DNA-Repair: Photocrosslinking Studies with Novel Modified DNA Oligonucleotides*, **Posterpräsentation**, International Workshop on DNA-based nanotechnology: Construction, mechanics, and electronics, Dresden, Mai **2009**.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xiii
Summary	xvii
1 Einführung	1
1.1 Genom und Proteom	1
1.2 DNA-Schädigung und DNA-Reparatur: kurzer Überblick.....	3
1.3 Allgemeine Methoden der Proteomanalyse.....	6
1.3.1 Gelbasierte Proteomanalyse	7
1.3.2 Proteinanalytik mittels Massenspektrometrie	8
1.3.3 Stabile Isotopenmarkierung für die quantitative und nicht-gelbasierte Proteomanalyse	10
1.3.4 Das <i>Activity Based Protein Profiling</i> (ABPP): Eine chemisch-proteomische Methode	14
1.3.5 Photoaffinitätsmarkierung (<i>photoaffinity labeling</i>)	16
1.3.6 DNA als Substrat in <i>photoaffinity labeling</i> -Experimenten.....	19
1.3.7 Weitere Methoden zur Isolierung und Identifizierung DNA-bindender Proteine	27
2 Aufgabenstellung	32
3 Herstellung von DNA-Sonden zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine... 34	34
3.1 Verwendete DNA-Schäden für die DNA-Festphasensynthese	34
3.2 Synthese der photoreaktiven Nukleoside (<i>photocrosslinker</i>)	35
3.3 Herstellung und Charakterisierung der doppelsträngigen DNA-Sonden.....	39
4 Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine	47
4.1 Methodenentwicklung mit der oxidativ geschädigten DNA-Sonde DS1 und dem <i>L/Fpg</i> -Protein als Standard	47
4.2 Vergleich verschiedener <i>Photocrosslinker</i>	52
4.3 Allgemeines zur Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen in komplexen Lysaten.....	54
4.4 Experimente zur Proteom-Markierung mit einer oxidativ-geschädigten DNA-Sonde und einem <i>E. coli</i> -DH5 α -Zelllysat	55

4.5	Experimente zur Proteom-Markierung mit einer oxidativ-geschädigten DNA-Sonde und einem humanen HCT-116 – Zellkernlysate	58
4.6	Weitere <i>photoaffinity labeling</i> – Studien	62
4.6.1	Verwendung weiterer DNA-Schäden	62
4.6.2	Photoaffinitätsmarkierung mit anschließendem tryptischen Verdau ohne gelelektrophoretische Auftrennung	63
4.7	<i>SILAC</i> -basierende <i>DNA-Protein-Interaction Screenings</i>	64
5	Ausblick	67
6	Experimenteller Teil	70
6.1	Material und Methoden	70
6.2	Durchgeführte Synthesen	77
6.2.1	Synthese des Diazirin-substituierten Phosphoramidits 28	77
6.2.2	Synthese des Benzophenon-substituierten Phosphoramidits 32	83
6.2.3	Synthese des Nitroindol-Nukleosid-Phosphoramidits 39	89
6.2.4	Synthese des Alkin-substituierten Desoxyuridin-Phosphoramidits (42)	92
6.3	Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der Oligonukleotide	93
6.4	<i>Photoaffinity Labeling</i> -Experimente	96
6.4.1	<i>Photoaffinitätsmarkierung</i> von aufgereinigten rekombinanten DNA-bindenden Proteinen	96
6.4.2	<i>Markierung</i> von DNA-bindenden Proteinen in <i>E. coli</i> - und <i>S. cerevisiae</i> - Zellextrakten	97
6.4.3	<i>Markierung</i> von DNA-bindenden Proteinen in humanen Nuklearextrakten	99
6.4.4	In-Gel-Trypsinverdau der <i>gelabelten</i> Proteine	100
6.4.5	Gel-freier Trypsinverdau der <i>gelabelten</i> Proteine in Lösung	102
6.4.6	Durchführung eines <i>Western-Blots</i>	104
6.4.7	Photoaffinitätsmarkierung und anschließendes „Clicken“ des Fluorescein-Labels an die DNA im Protein-Lysat	105
6.4.8	Test zum <i>in vivo</i> – <i>photocrosslinking</i>	106
6.5	Massenspektrometrische Analytik und Bioinformatik	108
7	Anhang	110
7.1	Nuklease-Verdau der Sonde DS4 mit Nukleosid 16	110
7.2	Zusammenstellung der verwendeten Puffersysteme	111
7.3	Testexperiment mit DNA-Sonde DS1 und einem Hefe-Proteom	113

7.4	Ausgewählte MS/MS-Profile und ID-Daten der im <i>E. coli</i> -Proteom und im Hefe-Proteom markierten Proteine	114
7.5	MS/MS-Profile und ID-Daten der im HCT-116-Proteom markierten Proteine	116
7.6	Ausgewählte MS/MS-Spektren wichtiger Peptide der markierten Proteine	118
7.7	Markierung und Charakterisierung DNA-reparierender Proteine mittels <i>DNA-Protein-Interaction-Screenings</i>	121
7.8	<i>Mascot Search Results</i> (Beispiel).....	126
	Abkürzungsverzeichnis	127
	Literaturverzeichnis	130

Zusammenfassung

Die Gesamtheit aller Gene eines Organismus wird als Genom bezeichnet, der zugehörige Wissenschaftszweig als *Genomics*. Dem Genom gegenüber steht das Proteom, das die Gesamtheit aller Proteine eines Organismus darstellt und als Proteinäquivalent eines Genoms betrachtet werden kann. Den ca. 23.000 Genen des menschlichen Organismus steht eine wesentlich größere Anzahl an Proteinen gegenüber (mehrere Hunderttausend), was eine deutliche Zunahme an Komplexität auf dem Weg vom Genom zum Proteom durch verschiedenste Prozesse und Faktoren belegt (Ein- und Ausschalten von Genen, posttranslationale Modifikationen, Stoffwechsellage etc.). In diesem Zusammenhang etablierte sich für die Wissenschaft, die sich mit der Analyse von Proteinen in ihrem komplexen Umfeld befasst, der Begriff *Proteomics*.

Eine signifikante Anzahl dieser Proteine ist für die „Wartung“ der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und somit des Genoms zuständig. Da dieses die gesamte Erbinformation enthält, ist seine Intaktheit für alle Organismen von fundamentaler Bedeutung. So sind spontane oder durch Fremdeinwirkung induzierte Veränderungen der DNA zwar einerseits Voraussetzung für die Evolution und die große Artenvielfalt auf der Erde. Andererseits können Schäden in der DNA Auslöser für Alterungsprozesse oder für schwere Krankheiten wie Tumorbildung sein, was die medizinische Relevanz einer „funktionierenden“ DNA-Reparatur zeigt. Ein wichtiger therapeutischer Ansatz ist es außerdem, gezielt die DNA-Reparatur in Tumorzellen zu stören, um diese zu eliminieren. So ist die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen geschädigter DNA und den Proteinen, die mit dieser interagieren, Gegenstand intensivster Forschung.

Das Thema dieser Arbeit war die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen geschädigter DNA und DNA-Reparaturproteinen mit Hilfe chemisch-proteomischer Methoden. Es stand die Frage im Vordergrund, welche Reparaturenzyme bestimmte DNA-Schäden erkennen und reparieren. Da die Methode der Photoaffinitätsmarkierung (*Photoaffinity Labeling*) es ermöglicht, Wechselwirkungen - auch sehr kurzzeitige - von Biomolekülen aufzuklären, wurde im Zuge dieser Arbeit hauptsächlich dieser Ansatz verwendet, um diese Fragestellungen anzugehen:

Zunächst wurden hierzu mittels DNA-Festphasensynthese DNA-Oligonukleotide synthetisiert, die einen bestimmten DNA-Schaden an einer definierten Stelle enthalten (oxidativer Schaden, UV-Schaden, etc.). Außerdem wurden komplementäre Gegenstränge mit photoreaktiven Gruppen (sogenannten *Photocrosslinkern*) hergestellt. Durch gezielte Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge werden Verbindungen dieses Typs in reaktive Intermediate überführt. Diese können dann die Reparaturenzyme - „geködert“ durch den eingebauten DNA-Schaden im Gegenstrang - durch Ausbildung einer kovalenten Bindung „einfangen“. Außerdem enthielten diese Oligonukleotide ein Fluorescein-Label zu Detektionszwecken und ein Biotin-Label zur Isolierung der DNA-Protein-*crosslinks* mittels Biotin-Affinitäts-Anreicherung. Stränge und Gegenstränge wurden anschließend zu doppelsträngigen DNA-Sonden hybridisiert. Hierzu wurde ausführlich untersucht, ob diese Sonden trotz der vielen eingebauten Modifikationen helikale, den natürlichen Gegebenheiten entsprechende Strukturen ausbilden. Dieses konnte durch die Aufnahme von UV-Schmelzkurven und CD-Spektren eindeutig bestätigt werden. Nach Inkubation dieser Sonden mit einem bestimmten Zell-Proteinlysat von Interesse (*E. coli*, Hefe, humane Zelltypen) und anschließender Bestrahlung wurden die kovalenten DNA-Protein-*crosslinks* über Biotin-Affinitäts-Anreicherung isoliert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden daraufhin proteolytisch gespalten, massenspektrometrisch vermessen (MALDI-TOF-MS oder nano-HPLC-ESI-MS/MS) und durch Datenbankabgleich der erhaltenen Peptide charakterisiert (Abbildung i).

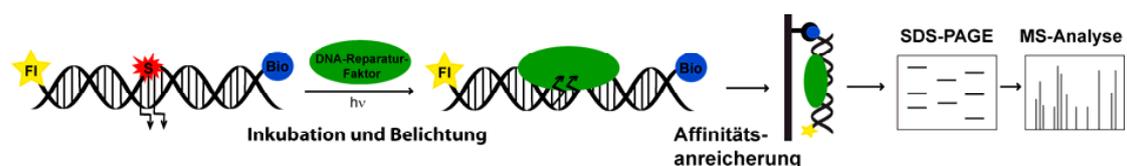


Abbildung i. Die Methode des *photoaffinity labelings* für die kovalente Markierung und Identifizierung von DNA-Reparaturenzymen. Fl = Fluorescein, Bio = Biotin, S = DNA-Schaden; Die Pfeile symbolisieren die *photocrosslinker*.

Für den Einbau der *Photocrosslinker* in DNA wurden unter anderem die in Abbildung ii gezeigten Nucleoside synthetisiert. Diese enthielten als photoreaktive Einheit entweder ein Diazirin (Carbenvorläufer; Nucleoside I und II), ein Benzophenon (Radikalvorläufer; Nucleosid III) oder ein Halogen-Atom (Radikalvorläufer; Nucleosid IV). Die Nucleoside wurden dann mittels DNA-

Zusammenfassung

Festphasensynthese über Standard-Phosphoramidit-Chemie in die DNA-Oligonukleotide eingebaut.

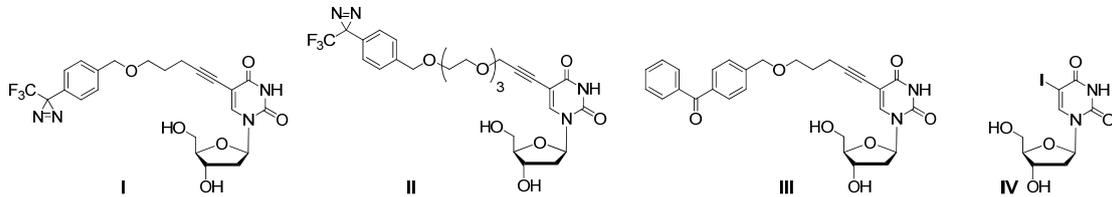


Abbildung ii. Vier synthetisierte Nucleoside (I-IV), die anschließend zu *photoaffinity labeling* – Studien mittels Phosphoramiditchemie in DNA-Oligonukleotide eingebaut wurden. Sie enthalten ein Diazirin (I und II), ein Benzophenon (III) oder ein Halogen-Atom (IV) als photoreaktive Einheit.

Nach Optimierung der Methoden und einem Vergleich der verschiedenen *Photocrosslinker* wurden DNA-Sonden mit verschiedenen DNA-Schäden verwendet, um DNA-bindende und DNA-reparierende Proteine in Zelllysaten selektiv und aktivitätsbasierend zu markieren. Unter anderem wurde ein *E. coli*-Zelllysate (als Vertreter der Prokaryoten) und ein HCT-116-Zelllysate (eine humane Zelllinie) verwendet. Die Studien zeigten viele interessante und neue Wechselwirkungen zwischen geschädigter DNA und DNA-bindenden Enzymen. Verschiedene Kontrollexperimente, wie solche mit ungeschädigten DNA-Sonden oder mit hitzedenaturierten (und somit inaktiven) Proteinen erhöhten die Aussagekraft der Untersuchungen. Abbildung iii zeigt exemplarisch einen Teil einer Fluoreszenz-Aufnahme eines SDS-Gels nach einem Experiment mit einer oxidativ-geschädigten DNA-Sonde und dem humanen HCT-116 Zellkernlysate (links) sowie eine Tabelle mit wichtigen Proteinen, die hierbei markiert wurden (rechts; inklusive wichtiger zugehöriger Daten).

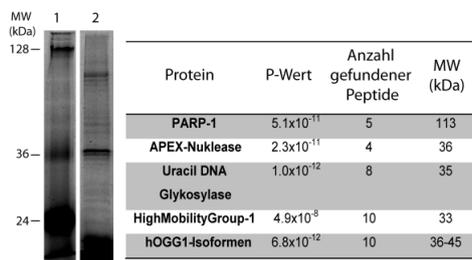


Abbildung iii. Links: Molekulargewichtsmarker (Spur 1) und Proteine, die mit einer fluoreszierenden photoreaktiven DNA-Sonde mit 8-Oxo-dG-Schaden in einem HCT-116 Kernzelllysate markiert wurden (Spur 2). Rechts: Tabelle mit wichtigen Daten einiger markierter DNA-bindenden Reparaturproteine. P-Wert = Artefakt-Wahrscheinlichkeit.

Nach erfolgreicher Markierung und Charakterisierung DNA-bindender und -reparierender Enzyme wurden Experimente mit dem Ziel der Methodenverbesserung durchgeführt. So wurde an einer Variante des beschriebenen Vorgehens gearbeitet, das Fluorescein-Label erst unmittelbar nach den *photoaffinity labeling* – Experimenten mittels „Click“-Chemie an die DNA-Protein-Addukte anzubringen. Ziel dieses Vorgehens war es, zu verhindern, dass der Farbstoff an sich die Schadenserkennung durch die Enzyme beeinflusst. Außerdem wurde an einer Gel-freien Methode derartiger *photoaffinity labeling*-Experimente gearbeitet. Hierzu wurden nach Inkubation der DNA-Sonden mit dem Protein-Lysat und anschließender Belichtung, die DNA-Protein-Addukte über das Biotin isoliert und ohne gelelektrophoretische Auftrennung direkt proteolytisch verdaut und charakterisiert. Dieses Verfahren wurde erfolgreich etabliert, liefert bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht so gute Ergebnisse wie die gelbasierten *photoaffinity labeling*-Experimente.

Zusätzlich wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Mann* vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried weitere Experimente zur DNA-Schadenserkennung durchgeführt, wobei das dort entwickelte *stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC)* angewendet wurde. In sogenannten *DNA-protein-interaction-screenings* konnten dadurch viele DNA-Reparaturenzyme relativ zu den allgemein an DNA bindenden Enzymen quantifiziert werden.

In Rahmen dieser Arbeit wurden somit organische Synthese und Oligonukleotid-Synthese mit biochemischen Experimenten und chemisch-proteomischen Methoden kombiniert, um DNA-bindende und DNA-reparierende Enzyme erfolgreich zu markieren und zu charakterisieren.

Summary

The complete set of all genes of an organism is designated as the genome, the corresponding branch of science as *genomics*. Correspondingly, the proteome is the set of all proteins of an organism, and can be described as the 'protein equivalent of the genome'. The approximately 23 000 genes existing in the human organism are translated into a much higher number of proteins (many hundred thousands), a fact that demonstrates the increase of complexity from genome to proteome due to different processes and factors ("switch-on" and "switch-off" of genes, posttranslational modifications, metabolic status etc.). In this context the concept *proteomics* has been established as the science that addresses the analysis of proteins in their complex environment.

A significant number of these proteins are involved in the maintenance of deoxyribonucleic acids (DNA) and thus of the genome. Containing the complete set of genetic information, genome integrity is essential for all organisms on earth. On one hand, spontaneous or induced changes in, and damage to, DNA are the precondition for evolution and biodiversity on earth. On the other hand, these factors can lead to aging processes and are the basis for serious diseases such as cancer, a fact that demonstrates the medical relevance of functional DNA repair. Furthermore, disrupting DNA repair in cancer cells in order to eliminate them is an important therapeutic approach in cancer treatment. Therefore, the investigation of the interactions between damaged DNA and DNA-interacting and -repairing proteins is a "hot" research area.

The topic of this Ph. D. thesis was to investigate the interactions between damaged DNA and DNA repair proteins using chemical proteomic methods. The major question addressed was which repair enzymes recognize and repair particular forms of DNA damage. As photoaffinity labeling approaches have enabled the analysis of many - even transient - interactions of biomolecules, this method was primarily used to address these questions. For this purpose, DNA oligonucleotides were synthesized via DNA solid phase synthesis, containing a particular form of DNA damage at a defined position (e.g. oxidative damage, UV damage). Furthermore, complementary counter strands were synthesized containing one or two

Summary

photoreactive units (photocrosslinkers). Upon irradiation, these molecules are converted into reactive intermediates that are able to trap nearby DNA repair proteins that have been "baited" by the incorporated DNA lesion. Furthermore, the strands contain a fluorescein tag for detection and a biotin tag for affinity isolation of the crosslinked DNA-protein complex via avidin affinity enrichment. Strands and counter strands were subsequently hybridized to form double stranded DNA probes. Additional investigations confirmed that these DNA probes form undisturbed double helix structures similar to natural DNA, despite these modifications. After incubation with the cellular protein lysates and irradiation, the crosslinked DNA-protein complexes were isolated, separated by SDS-PAGE, isolated from the gel and identified by mass spectrometry (MALDI-TOF-MS or *nano*-HPLC-ESI-MS/MS). For this analysis, proteins were enzymatically cleaved and identified via database comparison of the obtained peptides (Figure i).

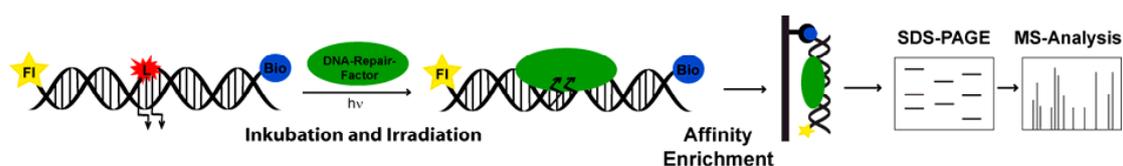


Figure i. Photoaffinity labeling approach for trapping and analyzing DNA lesion binding enzymes.

For the incorporation of the photocrosslinkers into DNA, the nucleosides shown in Figure ii were synthesized (among others). These contain either a diazirine (carbene precursor, nucleoside **I** and **II**) or a benzophenone (radical precursor, nucleoside **III**) or a halogen atom (radical precursor, nucleoside **IV**) as the photoreactive unit. The nucleosides were incorporated into DNA oligonucleotides using standard phosphoramidite chemistry.

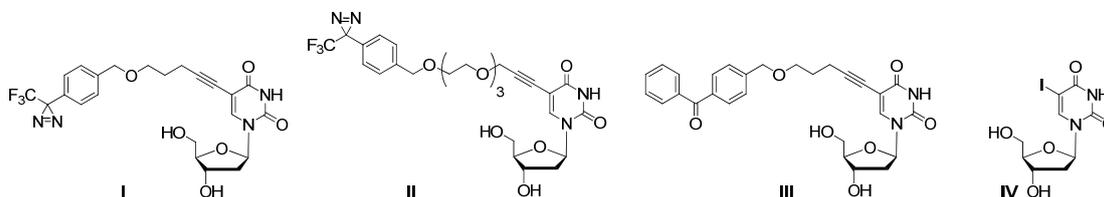


Figure ii. Four synthesized nucleosides (I-IV) that were incorporated into DNA oligonucleotides for photoaffinity labeling studies. They feature either a diazirine (**I** and **II**), a benzophenone (**III**) or a halogen atom (**IV**) as the photoreactive unit.

Summary

After optimization of the methods and comparison of the different photocrosslinkers, different DNA probes with different DNA lesions were used for the selective and activity-based labeling of DNA-binding proteins in cell lysates. An *E. coli* cell lysate (as a representative species for prokaryotes) and a HCT-116 cell nuclear lysate (as a human cell line) were used among others for the photoaffinity labeling experiments. These studies revealed many interesting interactions between damaged DNA and DNA binding and repairing enzymes. Controls such as experiments with undamaged DNA probes and heat deactivated proteins were used to confirm the significance of these results. Figure iii shows as an example a fluorescence picture of an SDS gel prepared during an experiment with an 8-oxo-dG containing DNA and human HCT-116 cell nuclear lysate (left; lane 1: molecular weight marker; lane 2: labeled proteins crosslinked to the fluorescein containing DNA). In addition a table is depicted showing important proteins that were labeled using this oxidatively damaged DNA probe (right, protein names and key data for protein identification).

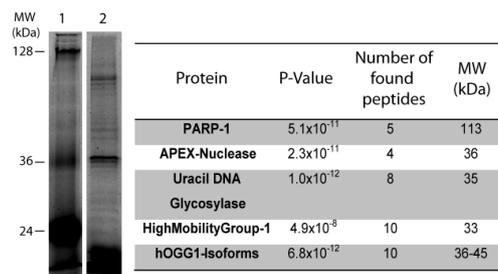


Figure iii. Gel obtained by SDS-PAGE after a photoaffinity labeling experiment (left). The table summarizes important DNA damage binding enzymes (right) that were caught using an 8-oxo-dG containing DNA probe. P-value: Artifact probability.

After successful labeling of DNA binding and repairing proteins we planned to further expand the scope of the method. We first modified the procedure in order to enable the addition of the fluorescein label after the photoaffinity labeling experiment via click-chemistry to the DNA-protein adducts. The aim of this procedure was to avoid the label to influence the damage recognition step. Furthermore, a gel-free version of the method was established. Here, after incubation of the probes with proteins and irradiation, the DNA-protein adducts were again isolated, proteolytically digested without gel electrophoretic separation and characterized. This procedure was successful, but did not yet provide the data quality we got using the gel-based approach.

Summary

Additionally, in cooperation with the *Mann* group of the Max-Planck-Institute for Biochemistry in Martinsried, further DNA damage recognition experiments were performed employing SILAC (stable isotope labeling of amino acids in cell culture). Using this approach, in so called 'DNA-protein-interaction screenings', many DNA lesion recognizing enzymes could be quantified relative to other DNA binding proteins.

In this study we thus combined organic synthesis and oligonucleotide synthesis with biochemical experiments and chemical proteomic methods to label and characterize DNA binding and repair enzymes.

1 Einführung

1.1 Genom und Proteom

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Speicher der genetischen Information jeder Zelle. Sie enthält den Bauplan für alle Proteine, die in einem Organismus vorkommen und für seine Funktion erforderlich sind. Bei dieser und bei der verwandten Ribonukleinsäure (RNA) handelt es sich um Makromoleküle. Diese wiederum sind aus Monomeren, den Nukleotiden, aufgebaut, wobei jedes Nukleotid aus einem Zuckeranteil (Pentose), einer Phosphatgruppe und einer stickstoffhaltigen Base besteht. Die vier DNA-Basen Adenin, Thymin (bei RNA Uracil), Guanin und Cytosin bilden über Wasserstoffbrückenbindungen jeweils komplementäre Basenpaare aus (A-T; G-C). Abbildung 1A zeigt die Strukturformeln der Nukleotide am Beispiel zweier Basenpaare. Die so entstehende doppelsträngige Kette von Nukleotiden kann verschiedene helikale Strukturen ausbilden, wobei die sogenannte B-Form die „Standardform“ ist: Bei dieser stehen die Basenpaare (bp) im 90°-Winkel zur Zentralachse, der Abstand zwischen den Basenpaaren beträgt 0.34 nm, und eine komplette Umdrehung der Helix beinhaltet 10.5 Basenpaare. So entsteht die Struktur der DNA-Doppelhelix.^[1] Der Bereich einer DNA, der die Ausbildung eines konkreten Merkmals codiert, wird als Gen bezeichnet. Die Gesamtmenge an DNA in der Zelle, also die gesamte Erbinformation, nennen wir Genom. Während prokaryotische Genome meist eine einfache Ringstruktur aufweisen, ist die DNA bei Eukaryoten in mehreren Organisationsstufen im Zellkern in Form von Chromosomen verpackt (Abbildung 1B).^[2-3]

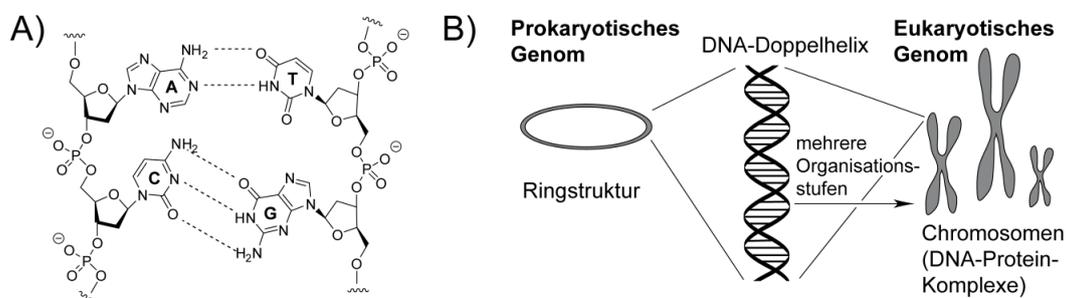


Abbildung 1. A) Strukturformel eines Ausschnittes der DNA mit den Basenpaaren A-T und C-G; B) Schematische Darstellung der DNA-Doppelhelix und der Strukturen eines prokaryotischen sowie eines eukaryotischen Genoms.

In der DNA von Eukaryoten gibt es neben den kodierenden Bereichen (Introns) auch nicht-kodierende Bereiche (Exons).

Zwar weist das menschliche Genom „nur“ ca. 23 000 Gene auf, aus diesen entstehen aber durch verschiedene Prozesse auf dem Weg vom Gen zum Protein (Spleißen, mRNA-*editing*, Prozessierung, posttranslationale Modifikationen etc.) mehrere Hunderttausend, vielleicht sogar Millionen verschiedener Proteinspezies.^[4-5] Somit entstehen aus einem Gen oft mehrere Proteine, die auf molekularer und/oder funktioneller Ebene klar unterschiedlich sein können. Der Australier *Marc Wilkins* prägte 1995 den Begriff *Proteom* und bezeichnete damit das gesamte Proteinäquivalent eines *Genoms*.^[4] Es stellt somit quantitativ das gesamte Proteinexpressionsmuster einer Zelle bzw. eines Organismus unter genau definierten Bedingungen dar. Während das Genom ein gut definiertes, statisches Gebilde ist, das durch die Nukleotidsequenz genau festgelegt ist, ist das Proteom ein sehr dynamisches Objekt, das durch viele Faktoren beeinflusst wird: in einer Zelle bzw. einem Organismus existieren Methoden zum Ein- und Ausschalten von Genen, so dass in bestimmten Zell- und Gewebetypen nur bestimmte Gene eingeschaltet sind und somit auch nur bestimmte Proteine exprimiert werden (Epigenetik).^[6] Zudem kann das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen oder Umweltbedingungen sehr unterschiedlich sein. Die vielen verantwortlichen Faktoren und die Komplexität von Proteomen führen zu einer sensitiven Abhängigkeit der Zustände eines Proteoms von den verschiedensten Parametern. Dies führt zu neuen großen Herausforderungen bezüglich der Reproduzierbarkeit proteomischer Untersuchungen.^[7] Abbildung 2 zeigt schematisch den Zusammenhang zwischen Genom und Proteom sowie die verschiedenen Faktoren, die auf den Zustand eines Proteoms einwirken können.^[8]

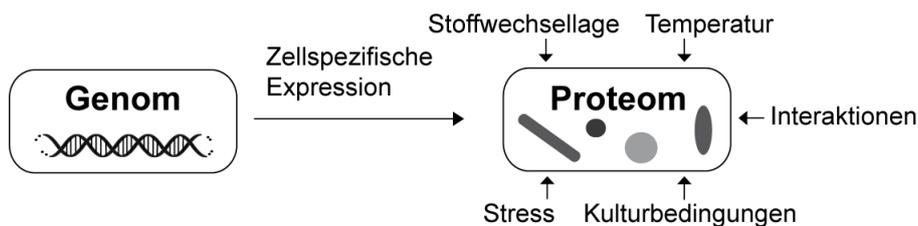


Abbildung 2. Aus dem Genom entsteht durch zellspezifische Expression das Proteom, welches je nach Zelltyp verschieden ist. Seine Beschaffenheit hängt stark von den von außen wirkenden Faktoren ab.

Die wesentlich höhere Anzahl an den in einem Organismus existierenden Proteinen im Vergleich zur Anzahl der Gene zeigt die starke Zunahme an Komplexität auf dem Weg vom Genom zum Proteom. Dies belegt die Schwierigkeit, bei einer proteomischen Untersuchung alle wichtigen Aspekte zu berücksichtigen. So kann die Komplexität zwar reduziert werden, indem man aus dem Gesamtproteom ein sogenanntes Subproteom generiert (z. B. alle im Zellkern vorhandenen Proteine, alle phosphorylierten Proteine etc.). Dadurch besteht aber natürlich auch immer die Gefahr, unerwartete, weitreichende oder transiente Funktionszusammenhänge nicht oder nur unzureichend zu erkennen. Eine zusätzliche Herausforderung bei proteomischen Untersuchungen ist die Analytik von sogenannten „low abundance“-Proteinen, also Proteinen, die aufgrund ihrer sehr geringen Menge (manchmal nur wenige Moleküle pro Zelle) die Nachweisgrenzen der verwendeten Methoden unterschreiten können. In diesem Gesamtzusammenhang hat sich nach der Wissenschaft, die sich mit der Analyse des Genoms befasst (*Genomics*), die Wissenschaft etabliert, die sich mit der Analyse von Proteinen in ihrem komplexen Umfeld befasst. Man spricht von *Proteomics*.^[5, 9-10]

1.2 DNA-Schädigung und DNA-Reparatur: kurzer Überblick

Da in der vorliegenden Arbeit proteomische Untersuchungen im Hinblick auf DNA-reparierende Proteine eine zentrale Rolle spielten, soll an dieser Stelle noch kurz auf einige wichtige Aspekte der DNA-Reparatur eingegangen werden. So ist die „Wartung“ der DNA und somit der genetischen Information von fundamentaler Wichtigkeit für alle Organismen auf der Erde.^[11-13] Die DNA ist stetig wirkenden Einflüssen ausgesetzt, von denen sie geschädigt werden kann.^[14-15] Hierbei wird zwischen endogenen („von innen wirkenden“) und exogenen („von außen wirkenden“) Faktoren unterschieden.^[12-16] Zu ersteren Einflüssen gehören beispielsweise freie OH- oder Peroxid-Radikale, die im Zuge von Stoffwechselfvorgängen entstehen können, oder replikative Falscheinbauten, die entstehen, wenn Polymerasen bei der Replikation „versehentlich“ nicht-komplementäre Basen einbauen.^[17] Durch diese Ablesefehler bei der Transkription können Mutationen in der Basensequenz entstehen, die dementsprechend

weitervererbt werden. Ein weiterer „natürlicher“ Faktor, der unter Umständen zu Mutationen führt, ist die Tatsache, dass die Basen Guanin und Thymin statt in ihrer Ketoform (Strukturformeln siehe Abbildung 1) auch in der sogenannten Enolform vorliegen können (Tautomeriegleichgewicht bei ca. $10^5:1$). Dadurch paart beispielsweise Guanin nicht mehr mit Cytosin, sondern mit Thymin. So können ebenfalls spontane natürliche Ablesefehler bei der Replikation entstehen. Zu den exogenen Faktoren gehören beispielsweise UV-Strahlung, ionisierende Strahlung (die ebenfalls zur Bildung von OH-Radikalen und somit zu oxidativem Stress führt) oder alkylierende Substanzen.^[16]

Die so entstehenden Mutationen und Schäden in der DNA und somit in den Genen waren (bzw. sind) natürlich im Laufe der Evolution auch Voraussetzung für die Entstehung neuer Eigenschaften von Lebewesen bzw. von neuen Arten. Sie können aber auch die Funktion der Genprodukte, der Proteine, einschränken und somit zu vorschnellen Alterungsprozessen oder Krankheiten wie beispielsweise der Entstehung von Tumoren führen.^[18] Somit haben sich im Laufe der Evolution Systeme in den Zellen entwickelt, die für eine Aufrechterhaltung der intakten genetischen Information sorgen.^[19] Bei diesen DNA-Reparaturmechanismen wird zwischen folgenden Möglichkeiten unterscheiden:^[16]

- Direkte Reparatur: Der Schaden wird direkt rückgängig gemacht (beispielsweise die photochemische Spaltung von UV-induzierten Thymin-Dimeren durch Photolyasen^[20] oder die Reparatur von O^6 -Alkylguanin durch Alkyltransferasen).^[21]
- Mismatch-Reparatur: Fehlpaarungen werden durch Austausch mit dem richtigen Nukleotid ersetzt.^[22-23]
- Strangbruch-Reparatur: Man unterscheidet zwischen Einzelstrangbrüchen^[24] und Doppelstrangbrüchen.^[25] Letzere werden durch *homologous recombination (hr)* oder *nonhomologous end joining (nhej)* repariert, wobei das ungeschädigte Schwesterchromatid als Matrize dienen kann.^[25]
- SOS-Reparatur (oft auch bei Strangbrüchen): Durch spezielle Vorgänge wird die Zellteilung blockiert (um Zeit für die Reparatur zu gewinnen) und diese daraufhin eingeleitet.^[26-27]
- Basenexzisionsreparatur (BER): Geschädigte Basen werden ausgeschnitten und ersetzt.^[28-29]

- **Nukleotidexcisionsreparatur (NER):** größere Strang-Stücke werden um den Schaden herum ausgeschnitten und der lückenhafte Strang wird anschließend neu aufgebaut.^[28, 30]

So werden beispielsweise oxidative DNA-Schäden (8-Oxo-dG, 8-Oxo-dA) meist durch den BER-Prozess^[16, 31-38] und UV-induzierte Schäden durch die direkte Reparatur (bei Prokaryoten)^[20] oder den NER-Prozess (bei Eukaryoten) repariert.^[16, 39] Abbildung 3A stellt kurz schematisch die verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen zusammen, Abbildung 3B beschreibt schematisch den BER-Prozess bei Prokaryoten (links), den NER-Prozess bei Prokaryoten (mitte) und den NER-Prozess bei Eukaryoten (rechts). Es werden auch die wichtigsten involvierten Enzyme genannt, von denen viele im späteren Teil der Arbeit noch von Bedeutung sind.^[16, 28]

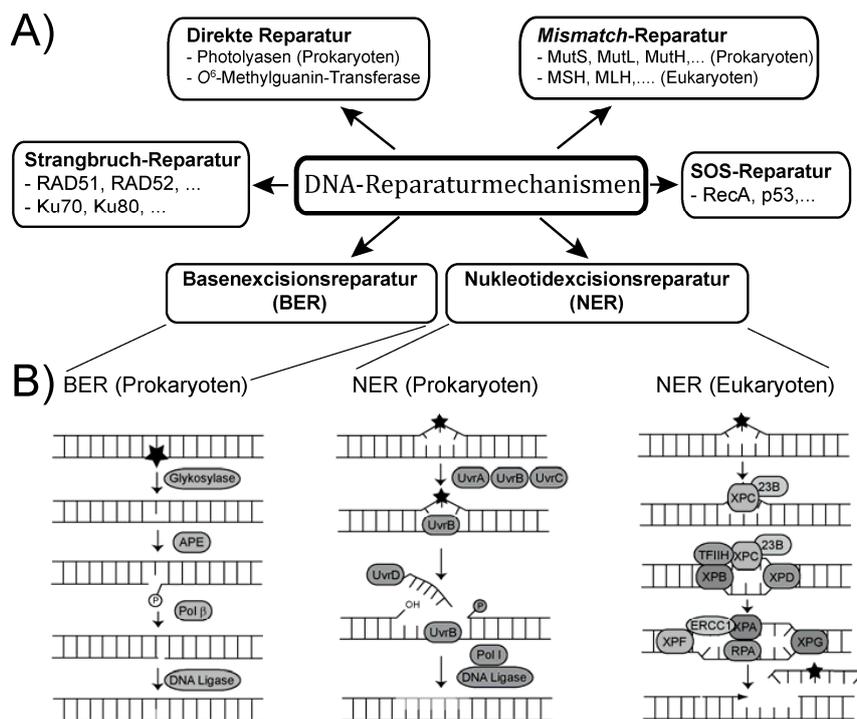


Abbildung 3. A) Verschiedene DNA-Reparaturmechanismen; B) Ablauf und wichtige involvierte Enzyme bei der prokaryotischen Basenexcisions-Reparatur (BER; links), der prokaryotischen Nukleotidexcisions-Reparatur (NER; Mitte) und der eukaryotischen Nukleotidexcisions-Reparatur (NER; rechts).

Ein grundlegendes Verständnis der Mechanismen der DNA-Schadenserkennung und DNA-Reparatur ist somit für ein Verständnis der Lebensvorgänge sowie für die Therapie vieler Krankheiten von größter Bedeutung. So geben beispielsweise

Informationen über krankheitsbedingt geschädigte DNA-Reparaturfaktoren Auskünfte über mögliche Ursachen von Tumorbildung aus gesundem Gewebe heraus.^[40] Ein anderer wichtiger Ansatz bei der Krebstherapie zielt darauf ab, durch gezielte Eingriffe die DNA der Tumorzellen zu schädigen und gleichzeitig selektiv die DNA-Reparatur in diesen Tumorzellen zu unterdrücken, damit diese schnell absterben.^[41]

Wie dargestellt, sind sehr viele Proteine in verschiedensten Funktionen und in verschiedensten Zusammenhängen für das Ablesen der DNA und die Aufrechterhaltung der intakten genetischen Information von Bedeutung. Meistens sind es mehrere Proteine, die nur durch ihr koordiniertes Zusammenspiel derartige Aufgaben erledigen. Viele DNA-Reparatur-Proteine kommen in großer, viele allerdings auch nur in sehr geringer Anzahl pro Zelle vor. So zeigen neuere Studien für das Fpg-Protein, eine wichtige Glykosylase zur Reparatur oxidativer DNA-Schäden, eine Häufigkeit von nur ca. 100 Molekülen pro Zelle an.^[42] Das ist ungefähr 700 Mal weniger als beispielsweise der wichtige Elongationsfaktor TU, der den Polymerasen bei der DNA-Synthese assistiert.^[42]

Die Analyse des komplexen Proteoms von Zellen bezüglich der Bestandteile, die eine Rolle bei der DNA-Schadenserkennung und der Reparatur bestimmter DNA-Schäden spielen, stellt die Naturwissenschaftler somit vor besonders anspruchsvolle analytische Aufgaben.

1.3 Allgemeine Methoden der Proteomanalyse

Zur Untersuchung von Proteingemischen und Proteomen wurden in den letzten Jahrzehnten viele verschiedene Methoden entwickelt. Auf ausgewählte Methoden, insbesondere solche, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

1.3.1 Gelbasierte Proteomanalyse

Oft ist die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen für eine Visualisierung und anschließende Charakterisierung (z. B. mittels Western-Blot, Massenspektrometrie etc.) notwendig. Je nach Art der Fragestellung und der Komplexität des aufzutrennenden Proteoms kann beispielsweise eine Natriumduodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ein- oder zweidimensional durchgeführt werden.^[43] Bei der eindimensionalen Variante erfolgt die Trennung gemäß der Masse der Proteine, während bei der zweidimensionalen PAGE die Proteine zunächst nach ihrer Masse und anschließend nach einer weiteren Eigenschaft, beispielsweise ihrem isoelektrischen Punkt, aufgetrennt werden.^[44-46] Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen können die Proteine anschließend mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe visualisiert werden. Weitere Methoden sind die *Coomassie*-Färbung sowie die Silberfärbung, die die Proteine im Gel auch direkt sichtbar machen.^[47-48] Es muss darauf geachtet werden, dass die Sensitivität der Färbemethode zur Detektion der gesuchten Proteine ausreicht. Die Silberfärbung ist zum Beispiel ca. zehnmal sensitiver als die *Coomassie*-Färbung. Die Proteine können nach der Isolierung aus dem Gel dann genauer analysiert werden. Die Gelelektrophorese eignet sich somit auch für viele diagnostische Zwecke, beispielsweise zum Vergleich der Proteinexpression in gesundem und krankem Gewebe.^[49] Abbildung 4 zeigt die Aufnahme eines 2D-SDS-Gels, auf dem das Proteom von humanem Serum (nach Immunitätsanreicherung der niedrigabundanten Proteine) aufgetrennt wurde. Es verdeutlicht anschaulich die unterschiedlichsten Größen-, Ladungs- und Mengenverhältnisse der Proteine eines komplexen Proteoms.^[50]

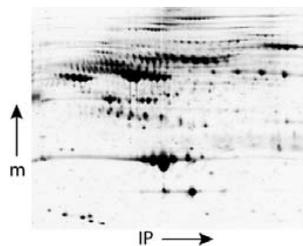


Abbildung 4. 2D-Elektropherogramm von humanem Serum (Sypro Ruby-Färbung) nach Immunitätsanreicherung der niedrigabundanten Proteine.^[50]

Die zweidimensionale Gelelektrophorese stellt einen Trennraum für bis zu 10000 Komponenten zur Verfügung, was ungefähr der Gesamtzahl der Proteine in einfachen Zellen entspricht (z. B. *E. coli*).^[8] Diese hohe Auflösung, die universelle Einsetzbarkeit für alle Proteine (z. B. auch hydrophobe Membranproteine) und die hohe Parallelität (es werden alle Proteine zur gleichen Zeit bearbeitet) machen diese Methode für die Proteomanalyse besonders geeignet. Als Limitationen dieser Methode sind unter anderem die aufwändige technische Durchführung sowie die Schwierigkeit zu nennen, die Proteine direkt in der Gelmatrix zu quantifizieren. Die wohl wichtigste Analyseverfahren für die anschließende Identifizierung der Proteine stellt die Massenspektrometrie dar.^[51-52]

1.3.2 Proteinanalytik mittels Massenspektrometrie

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Massenspektrometrie als eine unabdingbare Methode für die Proteinanalytik etabliert.^[53] Hierzu kommen verschiedene massenspektrometrische Techniken zum Einsatz. Sowohl die MALDI-Methode („Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation“; Analytik aus einer festen kristallinen Phase)^[54-56] als auch die ESI-Methode (Electron Spray Ionisation; Analytik aus einer flüssigen Phase) eignen sich für den Nachweis von Peptiden und Proteinen und sind in diesem Zusammenhang bereits ausführlich in der Literatur beschrieben worden.^[53, 57-62] Eine genaue Erklärung dieser Methoden oder des Aufbaus derartiger Massenspektrometer würde hier zu weit führen. Allerdings sollen im Folgenden kurz einige wichtige neue Konzepte der massenspektrometrischen Proteinanalytik diskutiert werden, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

Für den Nachweis eines Proteins kann folgendermaßen vorgegangen werden (Abbildung 5A): Das Protein wird zunächst mittels eines Spaltzyms an charakteristischen Spaltstellen in seine Peptide zerlegt. Dies geschieht typischerweise mit Hilfe von Proteasen wie Trypsin.^[63] Anschließend werden die Peptide massenspektrometrisch untersucht, wobei sie bei Bedarf vorher chromatographisch aufgetrennt werden können. Von diesen Peptiden kann entweder ein komplettes Massenspektrum aufgenommen werden, oder die Peptide werden im Massenspektrometer weiter in Bruchstücke zerlegt und dann vermessen (MS/MS-

Fragmentierung; siehe später).^[64] Hierdurch ergeben sich die für ein Protein charakteristische Peptidmuster und Sequenzen, die mit einem theoretischen Verdau aller Proteine einer Datenbank des betrachteten Organismus abgeglichen werden, wodurch sich die vorliegenden Proteine identifizieren lassen.^[65-77] Aus diesem Vergleich ergibt sich eine Protein- und Peptid-Liste, die noch durch das Setzen von Filtern modifiziert werden kann (oft auch muss), um zu ungewisse „Kandidaten“ auszuschließen. Hieraus ergibt sich dann eine Liste mit den „*Top Peptide Hits*“, durch die die vorliegenden Proteine eindeutig nachgewiesen werden können.^[78-82] Entsprechende Softwareprogramme wie beispielsweise *BioWorks* von der Firma *ThermoFisherScientific* führen diese Auswertung durch und kreieren ein sogenanntes „*Search Result File*“, das die gefundenen Proteine und Peptide anzeigt. Abbildung 5A zeigt den beschriebenen Ablauf schematisch, Abbildung 5B zeigt das Konzept der MS/MS-Fragmentierung. Hierbei wird ein Peptid, das durch eine Trypsin-Spaltung eines Proteins („Verdau“) entstanden ist, durch anschließende Protonierung in einer Kollisionskammer im Massenspektrometer weiter fragmentiert, wobei die protonierten Peptidbindungen aufbrechen (CID, *collision induced decay*). Dadurch entstehen zu jedem Peptid mehrere charakteristische Ionenpaare (sogenannte b/y-Ionenpaare; Abbildung 5B, links). Aus deren Signalen im Massenspektrum kann die genaue Sequenz des Peptids ermittelt werden (Abbildung 5B, rechts).

Ein neues Konzept, diese Peptide noch genauer als bisher zu untersuchen, ist die Entwicklung der *Orbitrap*-Massenspektrometer der Firma *ThermoFisherScientific* (und entsprechender Anlagen anderer Firmen).^[83-86] Hierbei wird das ursprüngliche, „klassische“ Massenspektrometer (Linear Trap Quadrupol, LTQ), bestehend aus Ionisationsquelle, Ionenoptik, Detektor und Analysator, durch den „*Orbitrap*-Aufsatz“ ergänzt. Dieser besteht aus einer weiteren Ionenoptik, einer konvexen Ionenfalle („C-Trap“) und einer spindelförmigen Ionenfalle („Orbitrap“). Die Ionen werden in der linearen Ionenfalle quasi gelagert, je nach den gewählten Bedingungen axial hinausgeschossen und in der C-Ionenfalle zunächst ebenfalls gelagert. Dort werden sie zu einer kleinen Wolke gebündelt und in die spindelförmige Ionenfalle („Orbitrap“) eingespritzt. Dort rotieren sie um eine zentrale Elektrode und führen axiale Oszillationsbewegungen aus. Dadurch wird ein Strom induziert, der mit Hilfe eines *differential amplifiers* detektiert werden kann (Abbildung 5C). Durch dieses Konzept

ergibt sich eine sehr präzise Auftrennung verbunden mit einer sehr guten Auflösung.^[83-86]

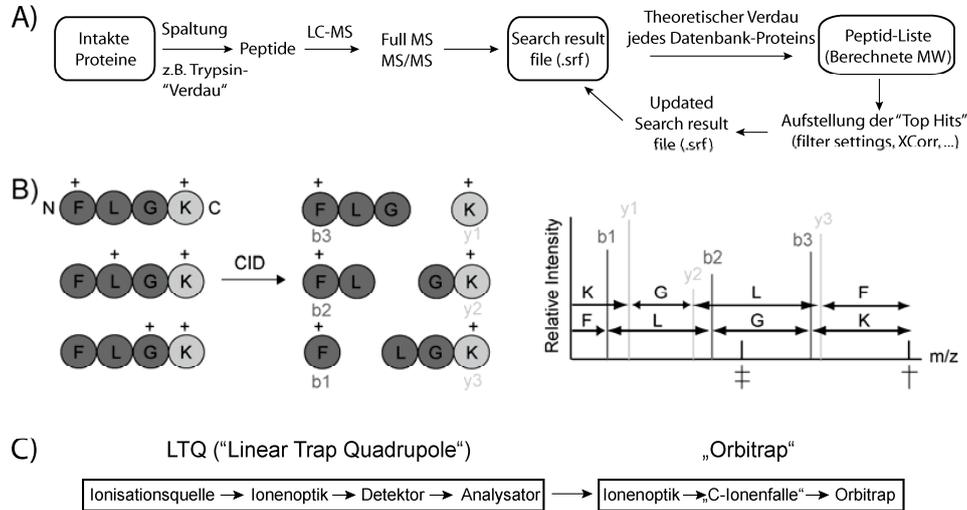


Abbildung 5. A) Schematische Darstellung der Charakterisierung von Proteinen über einen Datenbankabgleich der zugehörigen Peptide; B) Prinzip der MS/MS-Fragmentierung; C) Konzept der Ergänzung eines LTQ-FT-Massenspektrometers durch einen „Orbitrap“-Aufsatz.

Bei den gelbasierten Methoden der Proteomanalyse mit anschließender massenspektrometrischer Analytik stellt sich zunächst das Problem der genauen Quantifizierung. Auch wenn sich natürlich die einzelnen Gel-„Spots“ in unterschiedlicher Intensität erkennen lassen, sind Angaben über die Quantität der betrachteten Proteine hier nur ungenau. In diesem Zusammenhang haben sich in den letzten Jahren Methoden zur massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen etabliert: diese beruhen entweder auf den intrinsischen Signalintensitäten der Proteine/Peptide im Massenspektrum^[52, 87-88] oder aber auf einer gezielten Markierung mit stabilen Isotopen (folgendes Kapitel).^[89-91]

1.3.3 Stabile Isotopenmarkierung für die quantitative und nicht-gelbasierte Proteomanalyse

Das Grundkonzept der Isotopenmarkierungstechniken ist folgendes: In eine von zwei zu vergleichenden Proteomproben werden stabile Isotope eingeführt (z. B. ^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{18}O). Bei den Experimenten und den anschließenden Trennverfahren verhalten

sich die Proteine beider Proteomzustände zunächst identisch, in der Massenspektrometrie sind sie aber unterscheidbar. Da sie sich durch die Anzahl der eingebrachten Isotope unterscheiden, kann für jedes Protein genau bestimmt werden, aus welchem der beiden Proteome es stammt. Somit können die Proteome auch nach dem eigentlichen Experiment zusammengemischt und alle folgenden Arbeitsschritte inklusive der Massenanalytik unter absolut identischen Bedingungen durchgeführt werden. Die Signale der proteolytisch erzeugten Peptide (siehe Kapitel 1.3.2.) liegen bei der anschließenden Analytik nun in ihrer „leichten“ und „schweren“ Form im Massenspektrum vor, je nachdem aus welchem der beiden Proteomzustände sie kommen. Durch das Verhältnis ihrer gemessenen Signalintensitäten können die entsprechenden Vorläuferproteine in den beiden Ausgangsproben relativ zueinander quantifiziert werden. Es werden hierbei zwei grundlegende Konzepte unterschieden (Abbildung 6):

- Bei der metabolischen (*in vivo*)-Markierung werden die Isotope während des Wachstums in die Organismen, aus denen die später zu untersuchenden Proben stammen sollen, eingebaut, beispielsweise durch ^{15}N -angereicherte Nährmedien. So lässt sich beispielsweise eine „leichte“, ^{14}N -markierte Zellkultur und eine „schwere“, ^{15}N -markierte Zellkultur für ein derartiges vergleichendes Experiment herstellen.^[89]
- Bei der chemischen Markierung werden die Proteine vor ihrer Spaltung oder – alternativ – deren Peptide nach der Spaltung mit je einem *Label* versetzt, das in einer leichten und einer schweren Form existiert.^[90-93]

Nach den Experimenten und dem anschließenden Vereinen der beiden Proben entstehen im Massenspektrum pro Peptid zwei Signale, die sich um den Massenunterschied des *Labels* unterscheiden. Durch deren relative Intensitäten können die zugehörigen Vorläufermoleküle quantifiziert werden (Abbildung 6).^[8, 91]

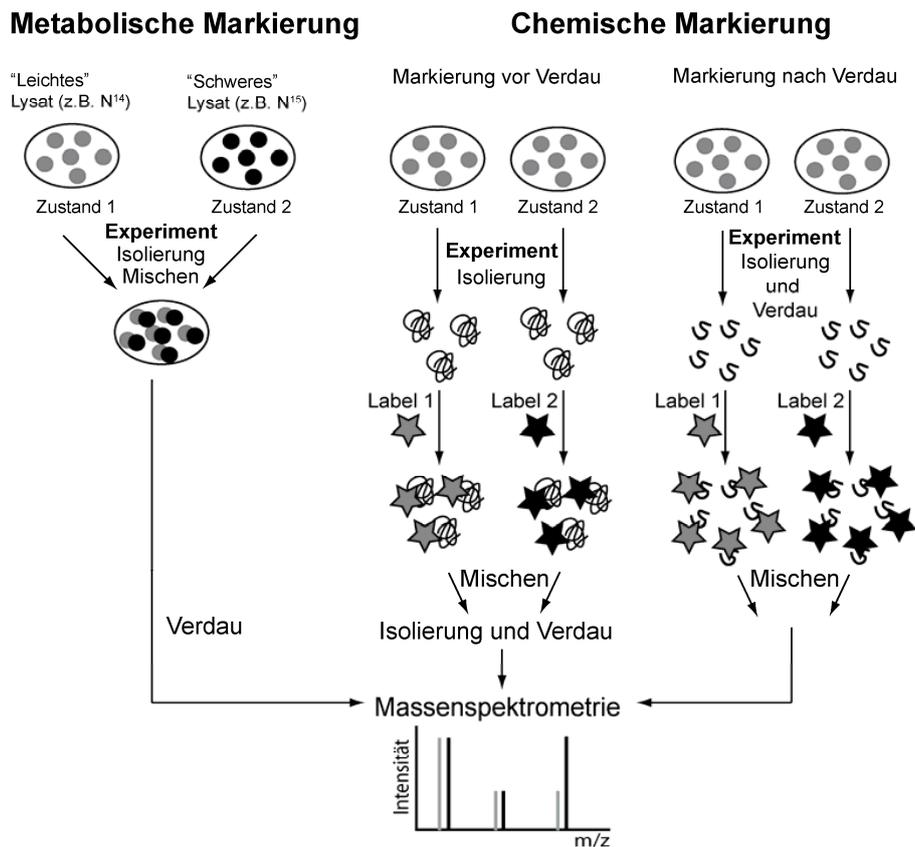


Abbildung 6. Metabolische und chemische Markierung von Proteinen für die anschließende massenspektrometrische Quantifizierung.

Für die metabolische Markierung hat sich vor allem das von *Mann* und Mitarbeitern entwickelte SILAC-Verfahren (*Stable Isotope Labeling of Amino Acids in Cell Culture*) etabliert.^[89] Hierbei werden zwei Zellkulturen parallel kultiviert, die eine in einem normalen Nährmedium, die andere in einem Nährmedium mit ein oder zwei isotope-markierten Aminosäuren. Nach Aufzucht der Zellen werden dann beide Experimente durchgeführt, je nach Fragestellung mit den Zellen direkt oder mit den aus ihnen isolierten Proteinen bzw. dem Gesamtproteom. Als Aminosäuren werden gewöhnlich $^{13}C_6$ -Arginin, 2H_3 -Lysin oder $^{13}C_3$ -Lysin verwendet. Diese eignen sich deshalb so gut, weil meist Trypsin als proteolytisches Enzym für das Zerschneiden der Proteine in die Peptide verwendet wird, welches C-Terminal zu Arginin und Lysin schneidet. Nach dem Experiment und der anschließenden vollständigen tryptischen Spaltung beobachtet man mit dieser Methode im Massenspektrum einheitliche Massenverschiebungen von 6 Da (für $^{12}C/^{13}C$ -Argininpaare) oder 3 Da (für $^1H/^2H$ - oder $^{12}C/^{13}C$ -Lysinpeptidpaare). Aus dem Massenspektrum kann somit auch eine sequenzspezifische Information gewonnen werden.^[89]

Für die chemische Markierung haben sich ebenfalls mehrere Ansätze etabliert, die bereits ausführlich in der Literatur behandelt wurden.^[8, 91-96] Hier soll das ICAT-Reagenz^[91] und das iTRAQ-Reagenz^[96] kurz vorgestellt werden (Abbildung 7). Das ICAT-Reagenz existiert in einer leichten (für X = H) oder in einer schweren Form (für X = D). Werden nach einem Experiment Peptide mit diesem markiert (über die SH-reaktive Gruppe der Aminosäuren) und die beiden Proben für die weiteren Schritte vereinigt, erscheinen die Peptidpaare im Massenspektrum mit einem Unterschied von 8 Da (Abbildung 7A). Beim iTRAQ-Reagens (*Applied Biosystems*) existieren vier isobare Varianten (gleiche Nukleonenzahl, unterschiedliche Protonenzahl), die mit den verschiedenen Proteomen nach deren enzymatischer Spaltung umgesetzt werden (Abbildung 7B). Somit haben korrespondierende Peptide aus den verschiedenen Proteomzuständen zunächst die gleiche Masse. Bei der MS/MS-Analyse werden dann für die einzelnen Proteomzustände unterschiedliche Reportergruppen freigesetzt. Dieses wird durch eine geschickte Kombination dieser Reportergruppen mit zugehörigen Balance-Gruppen erreicht, die jeweils unterschiedliche Isotope beinhalten (Abbildung 7B). Daraus resultieren im Massenspektrum Quartette von Signalen, von denen jedes für ein Peptid eines Proteins eines der betrachteten Proteome steht. Durch diese können die Verhältnisse quantifiziert werden.

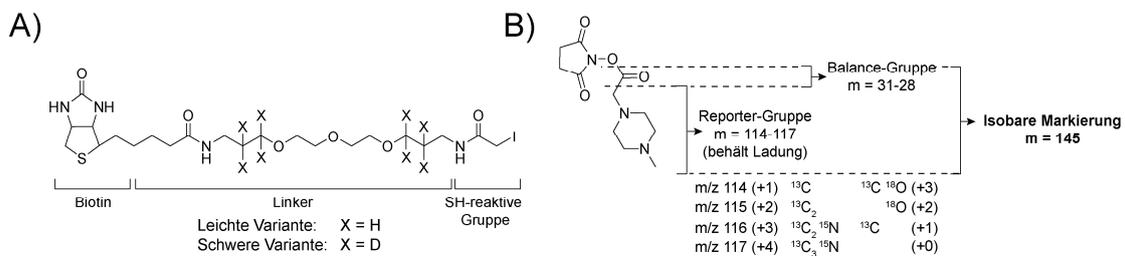


Abbildung 7. A) ICAT-Reagenz und B) iTRAQ-Reagenz für die chemische stabile Isotopenmarkierung von Peptiden für deren Quantifizierung.

Bei Bedarf kann natürlich auch das – zunächst Gel-unabhängige – stabile Isotopenlabeling mit einer gelbasierten Proteomanalyse kombiniert werden.^[46] Zwei Proteinproben können so nach dem durchgeführten Experiment zunächst noch separat voneinander gelelektrophoretisch aufgetrennt und erst anschließend vereinigt und massenspektrometrisch untersucht werden, wenn eine zusätzliche Visualisierung erwünscht ist.

1.3.4 Das *Activity Based Protein Profiling* (ABPP): Eine chemisch-proteomische Methode

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Enzymen und ihren Substraten haben sich in den letzten Jahren verschiedene chemisch-proteomische Ansätze etabliert, wobei oft der Begriff *Activity Based Protein Profiling* (ABPP) verwendet wird (Abbildung 8).^[97-105] Bei einer Variante dieses Konzepts wird ein Substrat mit den Proteinen versetzt, das ein Detektionslabel (z. B. Rhodamin oder Fluorescein) und ein Isolationslabel (Biotin) enthält. Zudem ist es (meist durch eine Modifikation) in der Lage, eine kovalente Bindung zum Enzym auszubilden. Nach Inkubation und Ausbildung der kovalenten Protein-Substrat-*crosslinks* können diese entweder direkt gelelektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert werden (analytischer Ansatz), oder sie können über das Biotin angereichert und anschließend aufgetrennt und visualisiert werden (präparativer Ansatz). Die Proteine können dann aus dem Gel isoliert, tryptisch verdaut und über ihre Peptidmuster mit anschließendem Datenbankabgleich massenspektrometrisch identifiziert werden (Abbildung 8A). Da Detektions- und/oder Isolations-*Label* gewissermaßen sperrig sind und die anfängliche Wechselwirkung von Enzym und Substrat eventuell beeinflussen, können diese auch nach Ausbildung der kovalenten *crosslinks* an das Substrat angebracht werden. Hierzu eignet sich z. B. die [3+2]-Cycloaddition von Alkinen und Aziden, die sogenannte „Click-Chemie“.^[106-108] Dieser ursprünglich von *Huisgen* untersuchte Reaktionstyp^[106] wurde von *Sharpless* und *Meldal* zu einer kupferkatalysierten Variante weiterentwickelt, die viele günstige Eigenschaften für das Arbeiten mit Biomolekülen besitzt, wie Biokompatibilität, kurze Reaktionszeiten, hohe Ausbeuten sowie milde und chemoselektive Bedingungen.^[107-108] Auf die Rolle der „Click-Chemie“ zur gezielten Funktionalisierung speziell von DNA als Substrat wird später noch genauer eingegangen.^[109-110] Bei diesem Reaktionstyp muss das Substrat mit einer Alkinposition und das anzubringende *Label* mit einer Azido-Gruppe modifiziert sein (Abbildung 8B). Viele „Click“-basierende *Profiling*-Ansätze wurden bereits beschrieben.^[111-113] Mit den markierten Proteinen wird dann analog den zuvor beschriebenen Verfahren umgegangen. Als weitere Variante dieser Methode können z. B. die markierten Proteine nach Inkubation mit dem Substrat auch direkt tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide dann über Antikörper-Affinitäts-Anreicherung

über das *Label* angereichert werden (z. B. über Rhodamin mit anti-Rhodamin oder über Biotin mit anti-Biotin). Im Idealfall erhält man so das Peptid, das die genaue Stelle der Markierung (und somit das aktive Zentrum des Enzyms) anzeigt. Dieses lässt sich dann massenspektrometrisch identifizieren und charakterisieren (Abbildung 8C).^[113] Natürlich sind auch weitere Variationen dieser *profiling*-Ansätze denkbar.^[114-119] In diesem Zusammenhang wurden bereits ABPP-Sonden für die verschiedensten Enzymklassen entwickelt, wie beispielsweise für Proteasen,^[120] Kinasen,^[121] Phosphatasen,^[122] Glycosidasen,^[123] Glutathion-S-Transferasen^[124] oder Oxidoreduktasen.^[125]

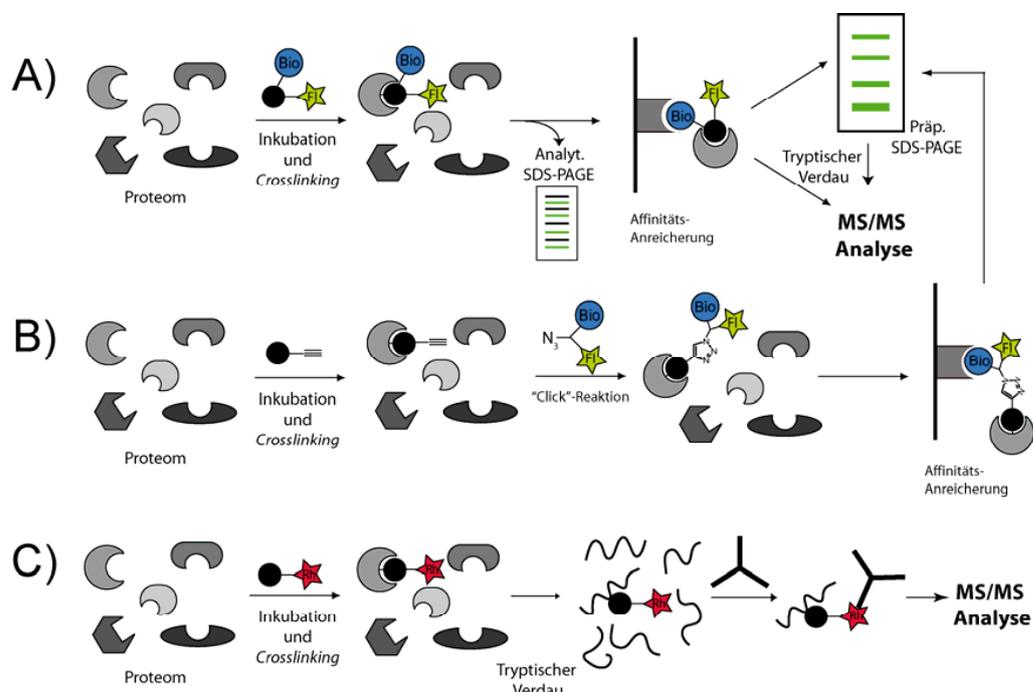


Abbildung 8. Verschiedene ABPP-Ansätze. A) Das Substrat trägt von vornherein Detektions- und Isolations-Label, nach Inkubation erfolgen Isolierung und Charakterisierung des Enzym-Substrat-Komplexes; B) Die Label werden nach der Inkubation mit Hilfe der „Click“-Chemie an den Enzym-Substrat-Komplex angebracht; C) Das Proteom wird unmittelbar nach der Markierung tryptisch verdaut und die markierten Peptide werden über einen Antikörper isoliert, der den Detektionsfarbstoff bindet.

Um eine Bindung des Substrates an das aktive Zentrum des Enzym zu erreichen, die stark genug für die darauffolgende Isolierung des Enzym-Substrat-Komplexes ist, kann man sich verschiedene Ansätze zunutze machen. So kann eine nukleophile Reaktion zur Quervernetzung führen, wie dies beispielsweise bei der von Sieber und Mitarbeitern beschriebenen Markierung verschiedener bakterieller Enzymklassen durch β -Lactone der Fall ist.^[126] Hierbei öffnet der nukleophile Schwefel des Cysteins

die Lactone durch Angriff auf die Carbonylgruppe. Ist die Affinität zum Substrat ohnehin sehr stark, ist eventuell auch gar keine kovalente Quervernetzung nötig (siehe Kapitel 1.3.7.). Eine weit verbreitete und nahezu universell einsetzbare Methode ist es außerdem, diese Quervernetzung durch die lichtinduzierte (und somit steuerbare!) Aktivierung einer vorher stabilen, photoreaktiven Moleküleinheit zu erreichen (*photoaffinity labeling*, folgendes Kapitel).

1.3.5 Photoaffinitätsmarkierung (*photoaffinity labeling*)

Beim sogenannten *photoaffinity labeling* oder *photocrosslinking* werden photoreaktive Gruppen verwendet, um die für derartige Untersuchungen notwendige kovalente Quervernetzung zwischen Enzym und Substrat zu erreichen. Die Gruppen zeichnen sich dadurch aus, dass sie normalerweise stabil sind, aber bei der Einstrahlung von Licht einer definierten Wellenlänge in ein reaktives Intermediat übergehen. Dieses Intermediat kann dann mit Molekülen in der Nachbarschaft reagieren und den kovalenten Enzym-Substrat-*crosslink* ausbilden.^[127-128] Wird dieser Komplex anschließend isoliert und tryptisch verdaut, enthält man eine Reihe von Peptiden, die Aufschluss über das beteiligte Protein geben können.^[129] Eines der Peptide enthält zudem das kovalent gebundene Substrat, dessen Nachweis und Analyse somit Aufschluss über Lage und Beschaffenheit des aktiven Zentrums gibt (Abbildung 9).^[130]

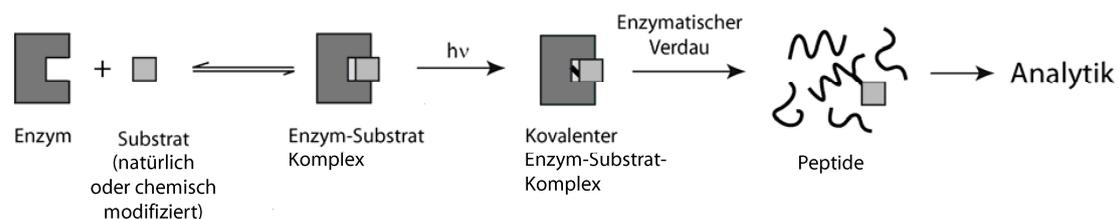


Abbildung 9. Allgemeines Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung.

Als photoreaktive Gruppen können beispielsweise Azide dienen (z. B. Azidoadenosin für DNA), die sich nach Belichtung mit Licht einer Wellenlänge von ca. 320 nm zu reaktiven Nitrenen umwandeln. Diese können dann mit benachbarten Gruppen unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren (Abbildung 10A).^[131] Außerdem dienen halogenierte Heterocyclen bzw. Nucleobasen als *photocrosslinker*, bei denen

es nach Bestrahlung mit Licht von ca. 312 nm zur Spaltung der Kohlenstoff-Halogen-Bindung und somit zur Radikalbildung kommt (z.B. Iod-Desoxyuracil). Das reaktive Radikal reagiert dann mit den entsprechenden Enzymen unter Ausbildung einer kovalenten Bindung (Abbildung 10B).^[131] Als weitere Radikalvorläufer eignen sich Benzophenone, die bei einer Wellenlänge von 365 nm ein Diradikal bilden. Hierbei ist der Vorteil, dass dieses Diradikal wieder rekombinieren kann, wenn sich kein Reaktionspartner findet. Ansonsten kann dieses die peptidischen α -H-Atome benachbarter, mit dem Substrat wechselwirkender Proteine abstrahieren und somit zu einem kovalenten *Crosslink* führen (Abbildung 10C).^[131] Als sehr gute Alternative zu diesen *Photocrosslinking*-Reagenzien wurden in den letzten Jahren vermehrt Diazirine verwendet, besonders 3-Trifluoromethyl-Aryl-Diazirine.^[132-135] Diese zeichnen sich durch hohe Stabilität im biologischen Milieu sowie eine Stabilität gegenüber Säuren, Basen und bei vergleichsweise hohen Temperaturen (bis ca. 90 °C) aus. Sie eignen sich daher gut für den Einbau in Biomoleküle und die hier beschriebenen Anwendungen. Bei Licht von 365 nm – Wellenlänge zerfallen diese unter Verlust von N₂ zu Carbenen,^[136] reaktiven Intermediaten, die ebenfalls mit Proteinen in der Umgebung kovalente DNA-Protein-*crosslinks* ausbilden können (Abbildung 10D).^[127]

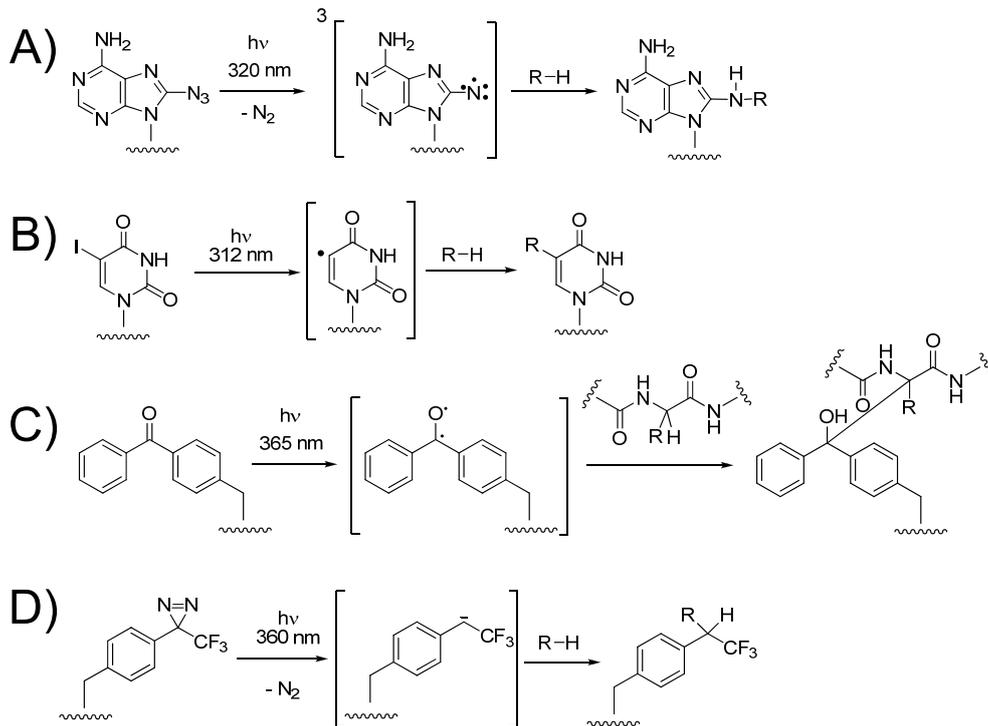


Abbildung 10. Verschiedene *photoaffinity labeling*-Reagenzien. A) Azide (zersetzen sich zu Nitrenen); B) Iod-substituierte Heterocyclen (Radikalvorläufer); C) Benzophenone (Radikalvorläufer); D) Diazirine (zersetzen sich zu Carbenen).

Entsprechend ihrer Anwendungsbreite wird die Photoaffinitätsmarkierung zur Aufklärung verschiedenster Fragestellungen verwendet. So lässt sich gemäß Abbildung 9 untersuchen, von welchen Enzymen bestimmte Substrate gebunden, modifiziert und umgesetzt werden. Dementsprechend populär ist die Verwendung dieser Methode in der Wirkstoffforschung. So wurde beispielsweise die Wirkung verschiedener physiologisch aktiver Substanzen auf den nicotinischen Acetylcholin-Rezeptor^[137] oder auf die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase untersucht.^[138]

Diese Methode lässt sich also auf zwei verschiedenen Ebenen der Enzym-Substrat-Wechselwirkung und -Erkennung anwenden. Zum einen gibt sie Aufschluss darüber, welche Enzyme überhaupt eine Bindung zum Substrat eingehen („Makro-Level“, Abbildung 11A). Zum anderen lassen sich durch eine Analyse der Bindungsstelle in der Umgebung des kovalenten *crosslinks* Aussagen über Beschaffenheit und Struktur des aktiven Zentrums treffen, das für die molekulare Erkennung verantwortlich ist („Mikro-Level“, Abbildung 11A). Die Photoaffinitätsmarkierung als wichtige Methode des *affinity based probings* kann somit quasi als „dritte Säule“ zur Gewinnung von strukturellen Informationen angesehen werden, neben der

hochauflösenden Analytik (Kristallographie und NMR-Spektroskopie) und der Mutagenese mit anschließender Suche nach Homologien (Abbildung 11B).^[139]

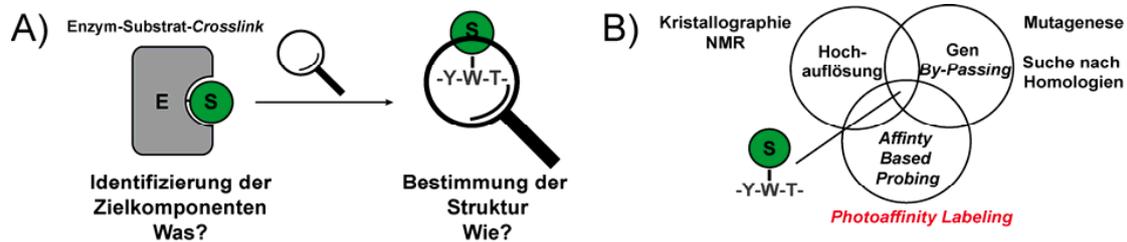


Abbildung 11. A) Die beiden „Ebenen“ der *photoaffinity labeling*-Anwendung, die „makroskopische“ Fragestellung nach dem beteiligten Enzym und die „mikroskopische“ Fragestellung nach der Struktur bzw. dem Bindungsmotiv; B) Graphische Interpretation der Rolle des *photoaffinity labelings* in der Proteinanalytik.^[139]

In diesem Zusammenhang eignet sich diese Methode auch zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen, insbesondere im Hinblick auf die DNA-Schadenserkennung. Eine Zusammenfassung wichtiger literaturbekannter Fakten hierzu wird im folgenden Kapitel dargestellt.

1.3.6 DNA als Substrat in *photoaffinity labeling*-Experimenten

Verschiedenste DNA-Sonden mit diversen photoreaktiven Gruppen wurden bereits eingesetzt, um DNA-bindende und reparierende Proteine selektiv zu markieren. *Lavrik* und Mitarbeiter verwendeten das in Abbildung 12 dargestellte, Azid-substituierte Cytosin-Derivat **1** (FAB-dCTP; *exo-N*-[β -(*p*-azidotetrafluor-benz-amido)-ethyl]deoxycytidin-triphosphat) und bauten dieses *in situ* in DNA ein, wobei eine ³²P-markierte DNA mit einer synthetischen abasischen Stelle verwendet wurde (Abbildung 12A).^[140] Dieser DNA-Schaden wurde in einem Mäuseembryonen-Fibroblasten-Zellextrakt *in situ* durch das APE-Enzym (*apurinic endonuclease*) herausgeschnitten, und das photoreaktive Nukleotid **1** wurde in die entstehende Lücke eingebaut. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) des Gemisches aus DNA-Sonde und Zellextrakt wurden mehrere Proteine markiert. Hierbei handelte es sich um das PARP-1-Protein sowie um die BER-Enzyme Flap-Endonuklease-1, DNA-Polymerase β sowie APE, wobei PARP-1 am effizientesten markiert wurde (Abbildung 12B). Der Nachweis der Enzyme erfolgte durch Immunopräzipitation über

entsprechende Antikörper. Außerdem wurden zum Vergleich die jeweils rekombinanten Proteine markiert und durch ihr Laufverhalten im Gel den Proteinen im Lysat zugeordnet (Abbildung 12C, oben). Das Vorliegen des PARP-1-Proteins wurde durch Verstärkung der entsprechenden Gelbände bei Erhöhung der Konzentration dieses Proteins bestätigt (Abbildung 12C, unten). Massenspektrometrische Untersuchungen wurden jedoch zunächst nicht durchgeführt.^[140]

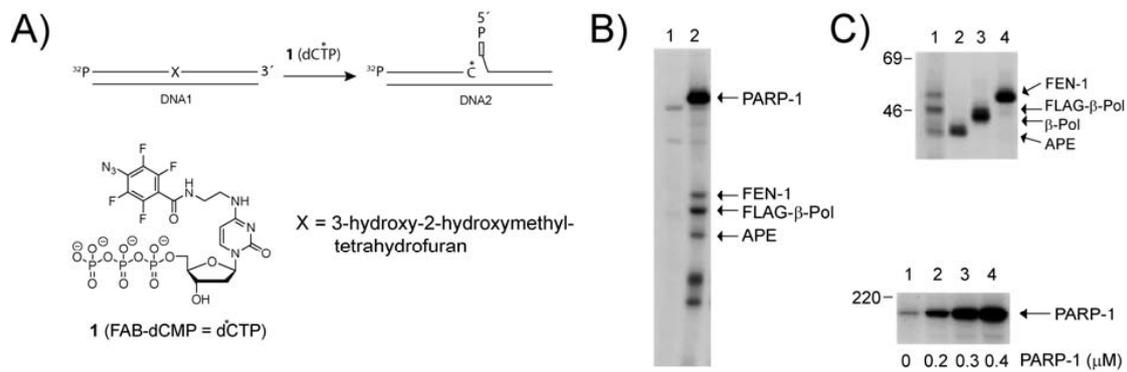


Abbildung 12. A) Schematische Darstellung des von *Lavrik* und Mitarbeitern durchgeführten *in situ* -Einbaus von **1** in DNA sowie Strukturformel dieses Azid-substituierten Nucleotids; B) Mithilfe der ³²P-gelabelten DNA-Sonde ohne *Photocrosslinker* (Spur 1) und mit *Photocrosslinker* (Spur 2) markierte Proteine; C) Oben: Markierte Proteine im Zelllysate (Spur 1) und zum Vergleich markierte rekombinante Proteine (Spuren 2-4); unten: Markiertes PARP-1-Protein bei verschiedenen Konzentrationen.^[140]

Ein weiterer Ansatz der *Lavrik*-Gruppe basiert auf einem sogenannten binären System für die selektive Markierung von Polymerasen in Zellkernlysaten (Abbildung 13).^[141] Hierbei wird zunächst die photoreaktive Arylazidogruppe enzymatisch an einen radioaktiv markierten Primer eingebaut. Dieser bleibt an der Primer-Templat-Bindungsstelle gebunden, während ein analoges Desoxynucleotidtriphosphat von der Polymerase gebunden wird, das einen Photosensibilisator enthält (beispielsweise Pyren). Bei Bestrahlung (365-450 nm) wird die anfangs von dem Photosensibilisator absorbierte Energie auf die Arylazido-Gruppe im photoreaktiven Primer-DNA-Polymerase-Pyr-dUTP-Komplex übertragen. Die Arylazido-Gruppe zersetzt sich daraufhin als Ergebnis dieses Energietransfers zum Nitren, und kann so nur Proteine in unmittelbarer Nachbarschaft markieren. Wenn das Photosensibilisator-Triphosphat nicht gebunden wird, kann keine Photoreaktion stattfinden. Somit können Polymerasen in Multikomponenten-Systemen selektiv „gefischt“ werden.^[141]

Einführung

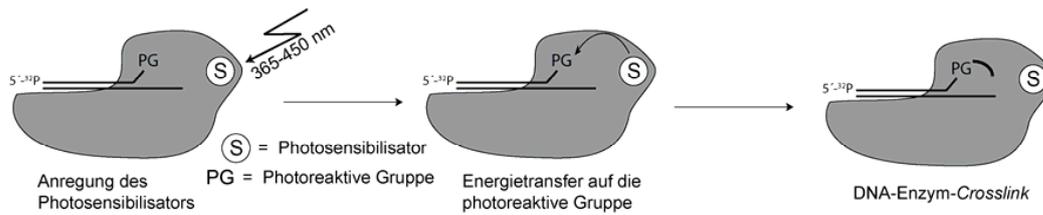


Abbildung 13. Methode der selektiven photoaktivierbaren Markierung von Polymerasen mithilfe einer photoreaktiven Gruppe (PG) und eines Photosensibilisators (S) nach Lavrik.^[141]

Für dieses System wurden die in Abbildung 14A dargestellten Nukleotide FAB-ddUTP (**2**), Pyr-dUTP (**3**) sowie das bereits erwähnte FAB-dCTP (**1**) verwendet. So konnten Lavrik und Mitarbeiter selektiv Polymerasen markieren. Ein in diesem Zusammenhang wichtiges Konzept zum Einbau des photoreaktiven Nukleotids *in situ* zeigt Abbildung 14B. Eine DNA-Sonde, die eine abasische Stelle enthält, wird zum Nuklear-Lysat gegeben und in diesem durch das APE-Enzym geöffnet. Anschließend bauen die Polymerasen, ebenfalls *in situ*, das photoreaktive Nukleotid ein. Es entsteht die photoreaktive DNA-Sonde mit einer aufgeklappten Struktur (*flap*-Struktur, Abbildung 14B). Neben dieser Sonde verwendeten Lavrik und Mitarbeiter auch eine ähnliche photoreaktive Sonde mit abasischer Stelle (*nick*-Struktur), sowie einen *Primer-Templat*-Komplex, und markierten mit diesen in Abhängigkeit verschiedener Bedingungen verschiedene Proteine in einem Rinderhoden-Nuklear-Extrakt (Abbildung 14C). Es folgte allerdings auch in dieser Studie keine umfangreiche Massensanalytik der gefundenen Proteine. Meistens wurde die Identität eines Proteins durch Vergleich des Laufverhaltens mit dem entsprechenden rekombinanten Protein postuliert, oder es folgte ein Nachweis über Immunodetektion.^[142]

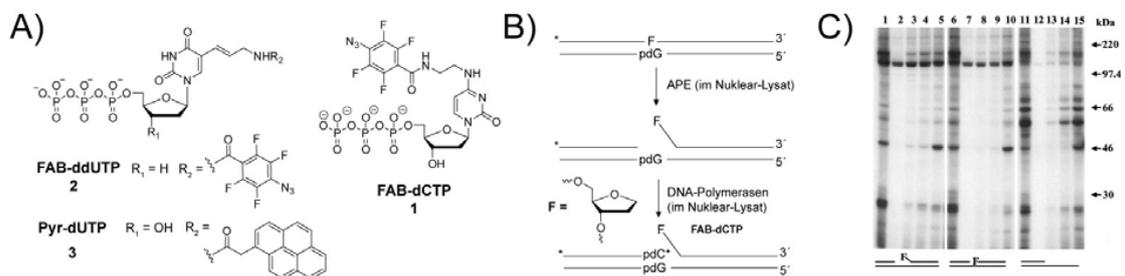


Abbildung 14. A) Strukturformeln Azid-substituierter und Photosensibilisator-substituierter Nukleotid-Triphosphate für das von Lavrik und Mitarbeitern entwickelte binäre System zum „Fischen“ von Polymerasen; B) Schematische Darstellung der *in-situ*-Synthese einer photoreaktiven DNA-Sonde mit *flap*-Struktur; C) SDS-Gel mit den von drei verschiedenen DNA-Sonden markierten Proteinen unter verschiedenen Bedingungen.^[142]

Des weiteren verwendeten *Lavrik* und Mitarbeiter ein FAB-dCTP-Analogon mit einem etwas längeren Linker (**4**) sowie ein entsprechendes Desoxyuridin-Derivat (5-[N-[N-(4-azido-2,5-difluoro-3-chloropyridine-6-yl)-3-aminopropionyl]-trans-3-aminopropenyl-1-2'-deoxyuridine-5'-triphosphat (FAP-dUTP); **5**) und bauten diese ebenfalls enzymatisch in 60mere ein (Abbildung 15A). Hierzu wurden zwei Primer derart mit einem Gegenstrang hybridisiert, dass der entstehende Doppelstrang zunächst noch eine Lücke aufwies. Anschließend wurde mit Hilfe von Polymerase β das photoreaktive Nukleotid-Triphosphat eingebaut. Nach Ligation mit T4 DNA Ligase und anschließender Denaturierung wurde das erhaltene 60mer mit dem entsprechenden Gegenstrang hybridisiert (Abbildung 15B). Dann wurden mit diesen photoreaktiven DNA-Duplexen in *photocrosslinking*-Experimenten die Wechselwirkung der Reparaturfaktoren XPC-HR23B, RPA und XPA (vgl. Kapitel 1.2) mit geschädigter DNA untersucht, wobei einige interessante Ergebnisse erhalten wurden: Nach Belichtung wurde der Faktor RPA stärker von einzelsträngiger DNA (ssDNA) oder von *mismatched* DNA (mmDNA) kovalent markiert als von doppelsträngiger DNA (dsDNA), während der Faktor XPA keine Präferenz zu einer dieser DNA-Spezies zeigte. Außerdem wirkte sich der Cofaktor Mg^{2+} negativ auf die *photocrosslinking*-Ausbeute von XPC und XPA aus, wobei es auf RPA keinen Einfluss hatte. Abbildung 15C zeigt ein SDS-Gel dieser Untersuchungen, auf dem die DNA-XPA-*crosslinks* bzw. die DNA-XPC-*crosslinks* unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu sehen sind. Bei diesem Experiment wurde ebenfalls mit einzelsträngiger DNA (ssDNA), doppelsträngiger DNA (dsDNA) und *mismatched* DNA (mmDNA) gearbeitet. Ein Unterschied in den Markierungs-Ausbeuten unter den verschiedenen Bedingungen ist deutlich zu erkennen.^[143]

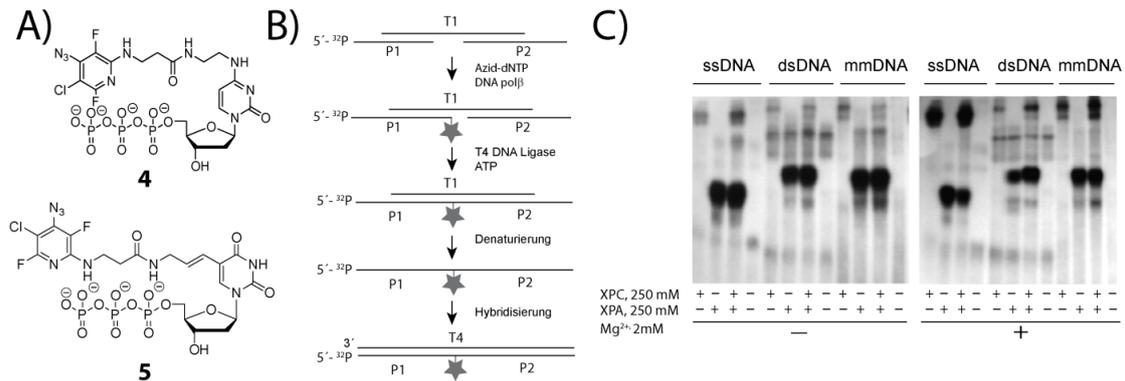


Abbildung 15. A) Photoreaktive Triphosphate **4** und **5**; B) Vorgehen zur Herstellung längerer (60mere) doppelsträngiger DNA-Oligomere über Ligation; C) SDS-Gele einer Reihe von Experimenten mit photoreaktiven DNA-Sonden (60mere; ssDNA, dsDNA, mmDNA) zur Markierung der NER-Enzyme XPA und XPC unter verschiedenen Bedingungen.^[143]

Lippard und Mitarbeiter verwendeten in verschiedenen Studien *Cisplatin*-modifizierte DNA, um die zu diesem DNA-Schaden affinen Proteine mit Hilfe einer Benzophenon-Einheit zu *crosslinken*. Hierzu wurde das Benzophenon-substituierte *cis*-Pt-Derivat **6** verwendet (Abbildung 16A).^[144] Die Visualisierung erfolgte hierbei ebenfalls auf SDS-Polyacrylamidgelen über Autoradiographie, wobei bestimmte Bereiche des Gels ausgeschnitten und nach einem tryptischen Verdau der Proteine einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen wurden (Abbildung 16B). Es wurden u.a. die DNA-Reparaturfaktoren RPA1, Ku70, Ku80, Msh2, DNA Ligase III, PARP-1 und DNA-PKcs markiert, sowie die HMG-Domäne-Proteine HMGB1, HMGB2, HMGB3 und UBF1 (Abbildung 16C). Es wurden sowohl Sonden mit einem 1,2-*cis*-Pt-Motiv als auch Sonden mit einem 1,3-*cis*-Pt-Motiv verwendet, wobei die markierten Proteine teilweise identisch, teilweise verschieden waren. Die Verwendung von *Dumbbell*-Strukturen sollte ausschließen, dass die Proteine nur aufgrund ihrer Affinität zu DNA-Enden markiert würden (Abbildung 16A). Auch wenn in dieser Studie wenige Kontrollen geschildert wurden (nicht-modifizierte DNA, hitzedenaturierte Proteine etc.), gibt sie eine interessante Liste von Proteinen wieder, die offenbar im Zusammenhang mit der zellulären Erkennung und Reparatur des *cis*-Pt-Motivs stehen.

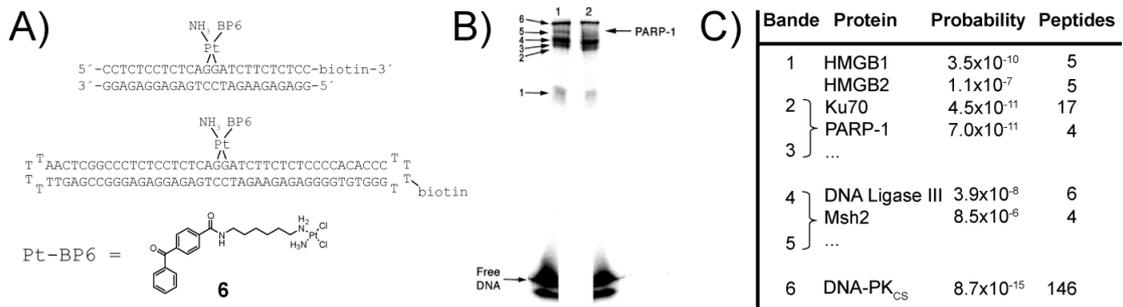


Abbildung 16. A) Von Lippard und Mitarbeitern verwendete DNA-Sonden mit einem Benzophenon-substituierten *cis*-Pt-Derivat **6** für *photocrosslinking*-Studien; B) Autoradiographieaufnahme eines SDS-Gels dieser Studie und Kennzeichnung des PARP-1-Proteins als eines der interessantesten gefundenen Proteine; C) Tabelle mit markierten Proteinen in den entsprechenden Gel-Bereichen und für die Analytik bedeutsamen statistische Daten.^[144]

Marx und Mitarbeiter verwendeten Diazirin-substituierte DNA-Oligonukleotide für Photoaffinitätsmarkierungs-Studien mit humaner Polymerase β .^[145] Die Diazirin-Einheit wurde hierzu in einer sechsstufigen Synthese an die 4'-Position der Ribose angebracht, und das modifizierte Nukleotid **7** wurde als Phosphoramidit über DNA-Festphasensynthese in die DNA eingebaut (Abbildung 17A). So wurde ein Diazirin-substituierter Primer-Templat-Komplex hergestellt, der nach Bestrahlung die Polymerase kovalent markierte (Abbildung 17B). Es wurde allerdings aufgereinigtes Protein (manchmal in Gegenwart von BSA) verwendet, so dass diese Studie keine Auskunft über ein mögliches „Fischen“ von Polymerasen aus komplexen Proteingemischen gibt. Die Visualisierung der DNA-Protein-Komplexe auf SDS-Gelen erfolgte über Autoradiographie (Abbildung 17C).^[145]

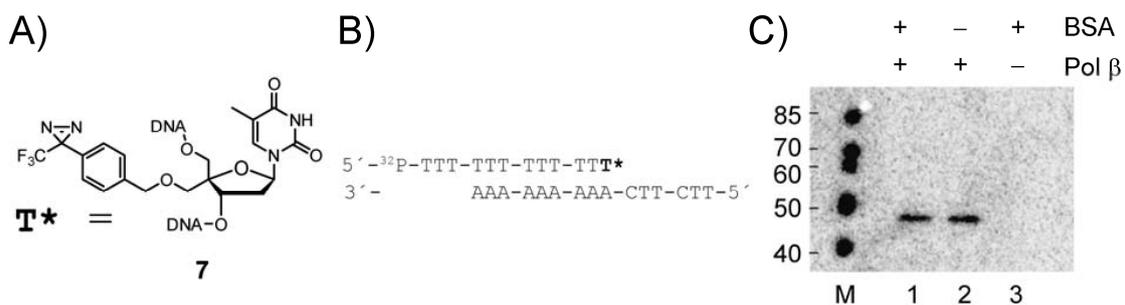


Abbildung 17. A) Von Marx und Mitarbeitern verwendetes, Diazirin-substituiertes Nukleotid **7**; B) Struktur der aus Primer und Templat bestehenden DNA-Sonde; C) Autoradiographieaufnahme eines zugehörigen SDS-Gels, dass die Markierung von Pol β unabhängig vom zugesetzten BSA verdeutlicht.^[145]

Ebenso verwendeten He und Mitarbeiter Diazirin-substituierte Nukleoside, um DNA-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen.^[146] Bei diesen wurde die Diazirin-Einheit

durch nukleophile Substitution an die Aminogruppe von Cytosin oder Guanin angebracht, wobei zwei unterschiedliche *Linker*-Längen verwendet wurden. Dadurch ergaben sich die in Abbildung 18A abgebildeten Strukturen **8** und **9**. Es wurden die Wechselwirkungen der Enzyme DNA-Adenin-Methyltransferase (aus *E. coli*) und O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (human) mit verschiedenen einzelsträngigen und doppelsträngigen DNA-Sonden untersucht, wobei letztere entweder eine *mismatched*-Struktur oder eine abasische Stelle aufwiesen. Abbildung 18B zeigt exemplarisch die Struktur einer derartigen DNA-Sonde, Abbildung 18C zeigt die Aufnahme eines SDS-Gels der entsprechenden Experimente unter verschiedenen Bedingungen. Diese Studie beschreibt gut die Markierung der Alkyltransferasen mit verschiedenen DNA-Sonden unter verschiedenen Bedingungen; allerdings wurde aufgereinigtes Enzym verwendet und es wurden nahezu keine Kontrollen durchgeführt (hitzenaturierte Proteine, kompetitiver Zusatz von BSA oder von anderer DNA etc.), so dass diese Studie zunächst ebenfalls wenig Aufschlüsse über das „Fischen“ dieser Enzyme aus komplexen Zelllysaten ergibt.^[146]

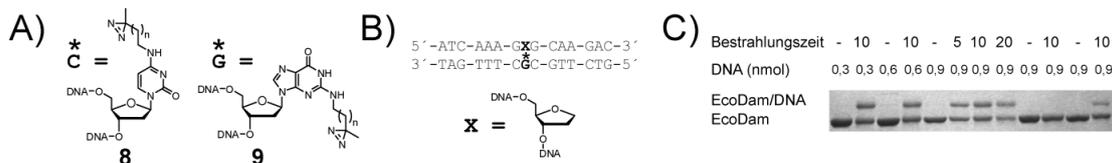


Abbildung 18. A) Strukturformeln der von *He* und Mitarbeitern verwendeten, Diazirin-substituierten Nucleoside; B) Struktur einer verwendeten DNA-Sonde mit einer abasischen Stelle als Schaden; C) Aufnahme eines SDS-Gels derartiger *photocrosslinking*-Experimente unter verschiedenen Bedingungen.^[146]

Sancar und Mitarbeiter postulierten in einer wichtigen Studie, die mit Hilfe von *photocrosslinking*-Experimenten durchgeführt wurde, den Aufbau des humanen Exzisions-Nuklease-Proteinkomplexes.^[147] Hierzu wurde eine durch Ligation hergestellte doppelsträngige DNA-Sonde verwendet, die als *Photocrosslinker* ein Psoralenderivat enthielt (**10**, Abbildung 19A). Dieser Radikalvorläufer (vgl. auch Kapitel 1.3.5) diente gleichzeitig auch als sogenanntes *bulky adduct* und verzerrte die Helixstruktur derart, dass die DNA-Reparaturfaktoren mit dieser in Wechselwirkung treten konnten. Die DNA-Sonde wurde in einer Reihe von Experimenten mit einem oder mehreren rekombinanten Reparaturfaktoren versetzt, inkubiert und anschließend belichtet, wobei die sechs Reparaturfaktoren der humanen Exzisionsnuklease verwendet wurden (XPA, RPA, XPC-HR23B, TFIIH,

XPF-ERCC1 und XPG; siehe auch Kapitel 1.2). Nach einem anschließenden Nuklease-Verdau der DNA wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch visualisiert. Ein Trick bestand darin, dass die DNA-Sonde entweder in 3'-Richtung oder in 5'-Richtung (vom Psoralen aus gesehen) radioaktiv markiert war (Abbildung 19A). Daraus konnte bei einem Vergleich entsprechender Experimente mit je einer der beiden möglichen DNA-Sonden (3'-markiert oder 5'-markiert) geschlossen werden, dass sich die Reparaturfaktoren hauptsächlich am 5'-Ende an den Schaden anlagern (der andere Teil der Sonde wurde durch den Nuklease-Verdau eliminiert). Abbildung 19B zeigt ein SDS-Gel eines derartigen Experiments dieser Studie. Durch Variation der Versuchsbedingungen und entsprechend „designte“ Messreihen wurde so ein Modell postuliert, wie sich der Excisions-Nuklease-Proteinkomplex um eine verzerre DNA-Helixstruktur anlagert (Abbildung 19C).^[147]

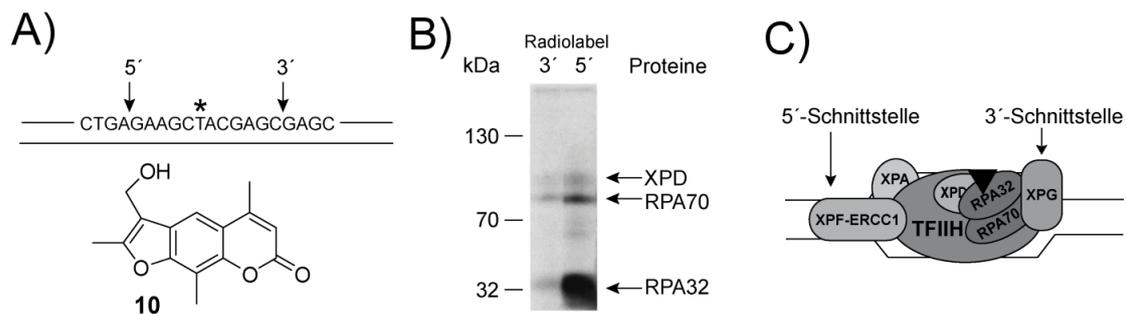


Abbildung 19. A) Schematische Darstellung der von *Sancar* und Mitarbeitern verwendeten DNA-Sonde mit einem Psoralen-substituierten Thymin (T*) sowie Struktur des Psoralen-Derivates (**10**); B) SDS-Gel, das den Unterschied der *photocrosslinking*-Ausbeuten je nach Lage des radioaktiven Labels zum Schaden/*Photocrosslinker* demonstriert; C) Durch derartige Experimente postulierte Struktur des humanen Excisions-Nuklease-Komplexes.^[147]

Nach dem von *Sancar* vorgeschlagenen Modell lagern sich zunächst die RPA-Untereinheiten RPA70 und RPA32 an die geschädigte DNA an, und RPA70 wird bevorzugt *gecrosslinkt*. TFIIH entwindet die Helix weiter um den Schaden herum (ca. 20 Nukleotide), und RPA begeht eine Konformationsänderung, so dass nun die Untereinheit RPA32 bevorzugt *gecrosslinkt* wird. Anschließend werden die Faktoren XPA und XPC-HR23B (nicht gezeigt) und TFIIH (mehrere Untereinheiten, u.a. XPD) hinzugezogen, wobei XPD nun auch in direktem Kontakt mit dem DNA-Schaden ist. Nun wird noch der Faktor XPC-HR23B durch XPG ersetzt (vom Schaden aus in 3'-Richtung), und XPF-ERCC1 lagert sich in 5'-Richtung zum Schaden an.

Anschließend wird das Oligonukleotid durch diese beiden Faktoren herausgeschnitten.^[147]

Auf weitere Studien zur DNA-Schadenserkenkung mit Hilfe verschiedener *photocrosslinking*-Nukleotide soll hier nicht näher eingegangen werden, hierfür sei nur auf die entsprechende Literatur verwiesen.^[148-157]

1.3.7 Weitere Methoden zur Isolierung und Identifizierung DNA-bindender Proteine

Ein kovalenter *crosslink* zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen muss nicht zwangsläufig mit Hilfe einer photoaktivierbaren reaktiven Einheit erfolgen. So verwendeten beispielsweise *Zharkov* und Mitarbeiter die Methode des NaBH_4 -*Crosslinking* („*trapping*“) mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung von mehreren Proteinen aus einem *E. coli*- bzw. einem Hefe-Zelllysate mit einer ^{32}P -gelabelten DNA-Sonde, die eine abasische Stelle enthielt.^[42] Beim „*trapping*“-Prozess kann der DNA-Protein-Komplex, der durch den Angriff des Reparaturenzyms (z. B. einer Glykosylase) auf die abasische Stelle in der DNA mit Ausbildung einer Schiff'schen Base entsteht, durch Hydrid-Ionen aus NaBH_4 abgefangen werden (Abbildung 20A). So können die mit einer abasischen Stelle in der DNA interagierenden Proteine kovalent an die DNA gebunden werden. *Zharkov* und Mitarbeiter verwendeten eine ca. 30 Nukleotide lange DNA-Sonde mit einem Biotin-*Label* zur Biotin-Affinitäts-Anreicherung und einer abasischen Stelle (Abbildung 20B). Derartige Experimente wurden mit einem *E. coli*-Zelllysate aus einer *midlog*-Wachstumsphase-Zellkultur und mit einem *E. coli*-Zelllysate aus einer stationären Zellkultur durchgeführt (Abbildung 20C: analytisches Gel; Spur 1: DNA-Fpg-*crosslink* als Marker; Spur 2: Experiment ohne Zellextrakt; Spur 3: *Midlog*-Wachstumsphase; Spur 4: Stationäre Phase). Die DNA-Protein-*crosslinks* konnten über das Biotin angereichert und massenspektrometrisch charakterisiert werden, wobei sowohl im *E. coli*-Zelllysate als auch im Hefe-Zelllysate einige interessante DNA-bindende Proteine markiert und charakterisiert wurden (Abbildung 20D). Insgesamt wurden im *E. coli*-Proteom sieben Proteine (AroF, Dnak, MutM, PolA, TnaA, TufA und UvrA) und

im Hefe-Proteom zwei Proteine (ARC1 und Ygl245wp) markiert und charakterisiert. Zu bemängeln ist an dieser interessanten Studie allerdings wieder, dass so gut wie keine Kontrollexperimente geschildert werden, wie beispielsweise Kontrollen mit ungeschädigter DNA oder mit hitzedenaturierten Proteinen, die zeigen können, ob die Proteine wirklich auf Grund ihrer Aktivität und Affinität zu geschädigter DNA markiert werden. Massenspektrometrische Messungen des unspezifischen Hintergrundes (zu denen nach eigener Erfahrung z. B. der „TnaA-Treffer“ gehören kann) werden ebenfalls nicht beschrieben.^[42] Auf die damit verbundene Problematik bezüglich derartiger MS/MS-Experimente wird später noch genauer eingegangen.

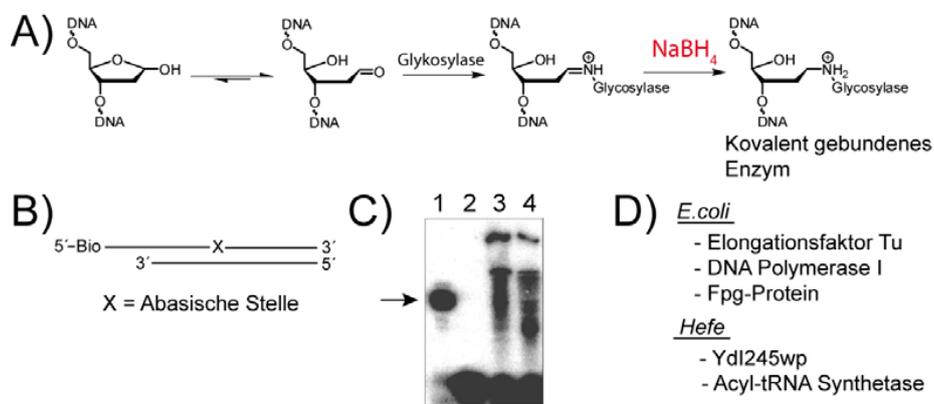


Abbildung 20. A) Schematische Darstellung des NaBH₄-crosslinking-Prozesses („trapping“); B) Struktur der von Zharkov und Mitarbeitern verwendeten DNA-Sonde zur Isolierung und Charakterisierung von Proteinen, die mit einer abasischen Stelle interagieren; C) SDS-Gel eines derartigen Experiments: Spur 1: DNA-Fpg-crosslink als Marker; Spur 2: Experiment ohne Zellextrakt; Spur 3: Extrakt aus Midlog-Wachstumsphase; Spur 4: Extrakt aus stationärer Phase; D) Auswahl an in dieser Studie markierten und charakterisierten Proteinen.^[42]

Zur Identifizierung einer Wechselwirkung zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen muss auch nicht zwangsläufig ein kovalenter *crosslink* zwischen beiden Reaktionspartnern ausgebildet werden. Auch wenn dieser für manche Anwendungen notwendig zu sein scheint, können auch DNA-Protein-Wechselwirkungen allein aufgrund der gegenseitigen Affinität beider Moleküle detektiert und charakterisiert werden: Werden beispielsweise Proteine in einem bestimmten Puffer über immobilisierte DNA gespült, bleiben manche an dieser hängen, die durch andere Bedingungen, z. B. durch eine andere Pufferzusammensetzung, wieder eluiert werden können. Das Eluens enthält dann die Proteine von Interesse, die nach erfolgter Auftrennung identifiziert und charakterisiert werden können. Hieraus ergeben sich viele Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung von DNA-Protein-

Wechselwirkungen. So beschrieben bereits 1999 *Patrick und Mitarbeiter* folgenden Ansatz zur Isolierung und Charakterisierung von Proteinen, die mit *cis-Pt*-geschädigter DNA wechselwirken:^[158] *cis-Pt*-modifizierte Kalbsthymus-DNA wurde zunächst in Sepharose-Säulen gepackt. Dann wurden durch Affinitäts-Chromatographie eines HeLa-Zellysates über diese Säulen mit anschließender Elution der auf der Säule haftenden Proteine *cis-Pt*-bindende Proteine isoliert. Auch wenn in dieser Studie aus heutiger Sichtweise auch zu wenig Kontrolleexperimente und massenspektrometrische Analytik durchgeführt wurden, so beschreibt sie dennoch einen interessanten Ansatz, der – eventuell in Kombination mit anderen hier beschriebenen Methoden – sehr gute Möglichkeiten bietet (Abbildung 21).^[158]

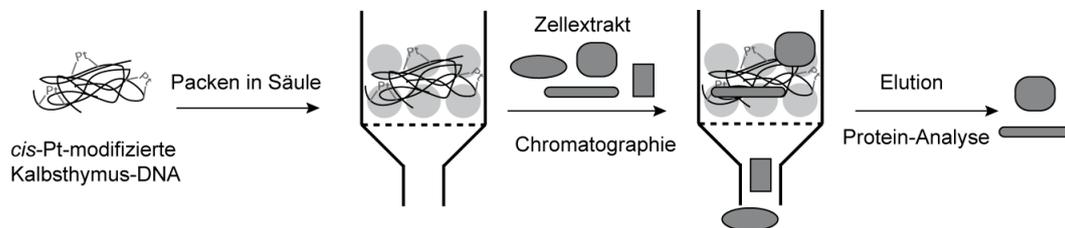


Abbildung 21. Säulenchromatographische Methode zur Charakterisierung von *cis-Pt*-bindenden Proteinen nach *Patrick und Mitarbeitern*.^[158]

Ein solcher oder ähnlicher Ansatz kann auch in Kombination mit den Methoden der stabilen Isotopenmarkierung angewendet werden (SILAC; siehe Kapitel 1.3.3.).^[159] Das Konzept eines von *Mann und Mitarbeitern* entwickelten sogenannten *DNA protein interaction screens* besteht darin, dass wieder mit einem „leichten“ und einem „schweren“ Protein-Lysat gearbeitet wird. Ein Lysat wird über eine (meist immobilisierte) DNA mit dem zu untersuchenden funktionalen Element gespült (z. B. Methyl-CpG-Motiv, Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle, DNA-Schaden etc.), während das andere über eine entsprechende Kontroll-DNA ohne dieses funktionale Element gespült wird. Die mit dem funktionalen Element wechselwirkenden Enzyme bleiben an diesem zunächst „haften“ und können später durch eine andere Pufferzusammensetzung eluiert werden (*affinity purification*). Anschließend werden beide erhaltenen Proteingemische zusammengefügt, bei Bedarf nochmal gelelektrophoretisch aufgetrennt, proteolytisch verdaut und massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert (Abbildung 22A). Wird beispielsweise – wie im Rahmen dieser Arbeit – mit DNA-Oligonukleotiden gearbeitet, kann deren Dichte und somit die „Wechselwirkungs-Ausbeute“ mit den entsprechenden Enzymen durch Ligation mehrerer Oligonukleotide aneinander erhöht werden (Abbildung 22B).^[159]

A) Erhöhung der Schadens-Dichte durch Ligation:



B) SILAC-basierender DNA-Protein Interaction Screen:

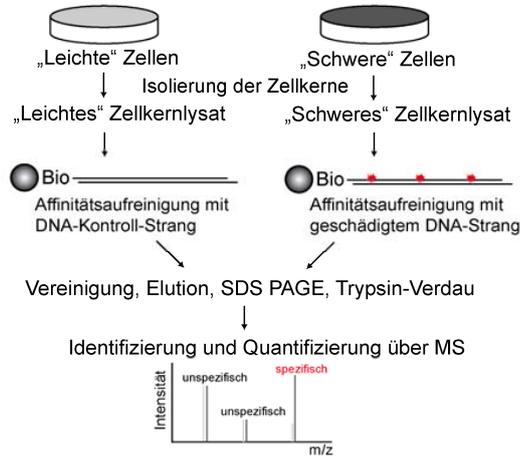


Abbildung 22. A) Konzept des von *Mann* und Mitarbeitern entwickelten *DNA protein interaction screens*; B) Ligation mehrerer Oligos zur Erhöhung der Dichte der zu untersuchenden DNA-Motive.^[159]

In diesem Zusammenhang wurden in der Arbeitsgruppe *Mann* auch derartige Experimente mit verschiedenen RNA-Motiven durchgeführt.^[160]

Ein ähnliches Konzept mit der alternativen chemischen Isotopenmarkierung mit dem ICAT-Reagenz (siehe Kapitel 1.3.2.) wurde von *Aebersold* und Mitarbeitern verwendet, um *Tfb5* zu identifizieren, eine wichtige Komponente des allgemeinen Transkriptionsfaktors IIF (TFIIF).^[161-162] Hierzu wurden Hefe-Nuklearextrakte, die eine Temperatur-sensitive Mutante des TATA-Box-bindenden Proteins (TBP) exprimierten, mit *Beads* inkubiert, an die ein H1S4-Promotor gebunden war, und zwar sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von rekombinantem TBP (Abbildung 23). Der TBP-Zusatz erleichterte bei der einen von beiden Proben die Anreicherung von Proteinen des RNA-Polymerase II-Pre-Initiations-Komplexes (PIC). Beide Proben wurden anschließend mit nicht-deuteriertem (d0) - bzw. deuteriertem (d8) – ICAT-Reagenz markiert (siehe auch Abbildung 7), vereinigt und massenspektrometrisch analysiert und quantifiziert. Hierbei wurde vor allem der *Tfb5*-Faktor als Kernkomponente von TFIIF identifiziert, das auch dafür nötig ist, um TFIIF zu einem Promotor zu „locken“ (Abbildung 23).^[162]

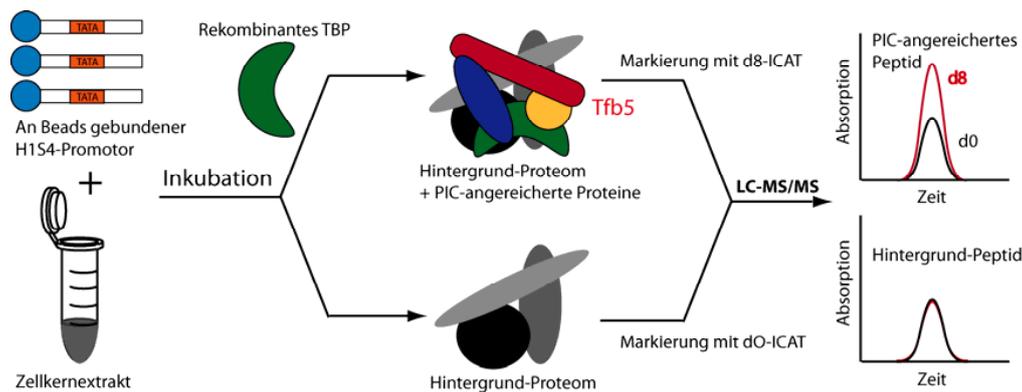


Abbildung 23. Vorgehen zur Identifizierung von Tfb5 als einer Untereinheit von TFIIH, das eine wichtige Rolle bei der Transkription und bei DNA-Reparaturprozessen spielt, mit Hilfe des ICAT-Reagenzes.^[162]

Wie dargestellt, gibt es verschiedenste Konzepte, DNA-bindende und -reparierende Proteine zu identifizieren, zu charakterisieren und zu quantifizieren. Zwischen diesen Methoden sollte weniger eine „Konkurrenz“ ausgemacht werden, als dass sie vielmehr als gegenseitige Ergänzungen betrachtet werden müssen. Je nach Fragestellung muss dann die anzuwendende Methode gewählt werden. So ist es beispielsweise durchaus eine wichtige Frage, ob und wann ein kovalenter *crosslink* zwischen DNA und Protein notwendig ist, oder ob sich alle relevanten Proteine auch durch eine nicht kovalente Bindung über reine Affinität isolieren lassen, was sicherlich nicht immer der Fall sein kann. Auch wenn letztere Methode elegant und teilweise einfacher zu sein scheint, ist gerade für transiente und eher schwächere Wechselwirkungen ein *crosslink* möglicherweise vorteilhaft. Auch die genaue Art des *photocrosslinkers* kann eine entscheidende Rolle spielen (siehe auch Kapitel 4.2), und über Vergleiche der Ergebnisse bei der Verwendung verschiedener derartiger Methoden lassen sich wichtige Informationen gewinnen. Das Anwenden und Weiterentwickeln derartiger *Chemical Proteomics* – Methoden auf Fragestellungen im Zusammenhang mit der DNA-Schadenserkennung und DNA-Reparatur ist somit von größtem Interesse.

2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, moderne chemische Methoden der Proteom-Analyse auf Fragestellungen anzuwenden, die im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur stehen. In erster Linie sollte dazu die beschriebene Methode des *photoaffinity labelings* (Kapitel 1.3.5 und 1.3.6) verwendet werden. Das Ziel war es somit, einen Beitrag zur Aufklärung der Wechselwirkungen von geschädigter DNA mit DNA-bindenden und -reparierenden Proteinen zu leisten.

Zunächst ging es hierbei darum, einen Ansatz zu etablieren und zu optimieren, um diese Proteine über das *photoaffinity labeling* zu *crosslinken*, zu isolieren und zu charakterisieren. Hierzu sollten doppelsträngige DNA-Sonden hergestellt werden, die zum einen den zu untersuchenden DNA-Schaden wie 8-oxo-dG, das CPD-Dimer etc. enthielten. Zum anderen enthielten sie einen oder mehrere *photocrosslinker*, einen Detektionsfarbstoff (z.B. Fluorescein) und ein Biotin-Label zur Anreicherung der kovalenten DNA-Protein-*crosslinks* über die Biotin-Avidin-Wechselwirkung. Diese Sonden sollten anschließend zunächst mit rekombinanten DNA-Reparaturproteinen getestet werden, wie gut sie diese selektiv und aktivitätsbasierend markieren. Dann sollten die Sonden in verschiedenen Zelllysaten (*E. coli*, Hefe, humanes HCT-116) zur Markierung DNA-bindender und -reparierender Enzyme eingesetzt werden. Die mit der Sonde markierten Proteine galt es anschließend über das Biotin an der DNA-Sonde zu isolieren und massenspektrometrisch zu analysieren. In den meisten Fällen sollten die markierten Proteine nach der Isolierung gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter einer Fluoreszenzlampe visualisiert werden, ehe sie aus dem Gel isoliert, proteolytisch verdaut und durch einen Datenbankabgleich charakterisiert werden sollten (siehe Kapitel 1.3.2). Dieses Vorgehen ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

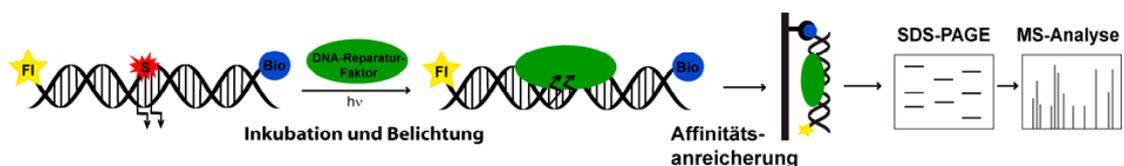


Abbildung 24. Schematische Darstellung des „fishings“ von DNA-Reparatur-Faktoren mittels einer DNA-Sonde, die einen DNA-Schaden und *photocrosslinker* enthält. Die DNA-Protein-*crosslinks* können über das Biotin-Label an der Sonde isoliert, bei Bedarf gelelektrophoretisch aufgetrennt und

Aufgabenstellung

anschließend massenspektrometrisch untersucht werden. S = DNA-Schaden, FI = Fluorescein, Bio = Biotin; Die Pfeile symbolisieren die *photocrosslinker*.

Außerdem sollten verschiedene *Photocrosslinker* verwendet und miteinander bezüglich ihrer Fähigkeit verglichen werden, DNA-reparierende Enzyme selektiv zu markieren. Das ganze Verfahren sollte zu einer allgemein anwendbaren Methode zur Charakterisierung derartiger Enzyme entwickelt werden. Außerdem wurde an einem Ansatz gearbeitet, das Fluorescein-Label erst nach erfolgter Inkubation und Belichtung mittels „Click“-Chemie an die DNA anzubringen (siehe Kapitel 1.3.4). Hierdurch sollte verhindert werden, dass das sperrige Label von vornherein schon die DNA-Enzym-Wechselwirkung beeinflusst. Ebenso ging es darum, die „gefischten“ Proteine direkt nach ihrer Isolierung zu charakterisieren, ohne vorherige gelelektrophoretische Auftrennung. Hierdurch sollte das Verfahren beschleunigt und von der teilweise aufwendigen Gelelektrophorese unabhängig gemacht werden, auch wenn letztere natürlich für eine Visualisierung wichtig ist.

Anschließend sollten – unabhängig von den *photoaffinity labeling* – Studien, in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Mann vom MPI für Biochemie DNA-Schaden-bindende Enzyme durch die in Kapitel 1.3.7 beschriebenen, SILAC-basierenden *DNA protein interaction screens* isoliert und analysiert werden. Dies wurde mit verschiedenen DNA-Schäden durchgeführt. Hierbei ging es somit auch um die exakte Quantifizierung der markierten DNA-reparierenden Enzyme. Für manche DNA-Schäden bzw. Proteine sollten dann die beiden Methoden miteinander verglichen werden (*photocrosslinking* versus SILAC-basierendem *interaction screen*).

Somit sollte im Zuge dieser Arbeit ein umfangreiches Repertoire von proteomischen Methoden auf konkrete Fragestellungen zur DNA-Schadenserkennung und -Reparatur angewendet und erweitert werden.

3 Herstellung von DNA-Sonden zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine

3.1 Verwendete DNA-Schäden für die DNA-Festphasensynthese

Die Untersuchungen zur DNA-Reparatur wurden mit Hilfe von DNA-Oligonukleotiden durchgeführt, die über DNA-Festphasensynthese hergestellt worden waren.^[163] Dazu wurden die DNA-Schäden als Nukleoside synthetisiert oder käuflich erworben und über ihre korrespondierenden Phosphoramidite in die DNA eingebaut. Eine kurze Erläuterung der DNA-Festphasensynthese sowie der konkreten Vorgehensweisen befindet sich im Experimentellen Teil (Kapitel 6.3). Abbildung 25 zeigt die verwendeten DNA-Schäden. Als wichtigster oxidativer DNA-Schaden wurde 8-Oxo-dG (**11**, als Phosphoramidit käuflich erhältlich) und als UV-induzierter Schaden ein T=T-Dimer mit Formacetal-Rückgrat verwendet (**12**). Dieses lässt sich bekanntermaßen im Vergleich zum natürlichen, Phosphat-überbrückten T=T-Dimer leichter synthetisieren und stellt ein gutes Struktur analogon dar.^[164-165] Als Beispiel eines sogenannten *bulky adduct* – Schadens wurde ein Desoxyguanosin eingesetzt, das an der 8-Position durch Aminopyren substituiert war (**13**).^[166-167] Dieses wurde dankenswerter Weise von S. Schorr aus der Arbeitsgruppe Carell als Phosphoramidit zur Verfügung gestellt (ebenso wie ein entsprechendes Aminofluoren-Derivat). Außerdem wurde gemäß einer Vorschrift von Kotera und Mitarbeitern das 3-Nitro-3-deaza-2'-desoxyadenosin **14** synthetisiert,^[168] das – in DNA eingebaut – nach Bestrahlung ($\lambda = 312 \text{ nm}$) gemäß eines gut untersuchten Mechanismus zu DNA-Strangbrüchen führt. Dabei wird in einem radikalischen Prozess durch die angeregte Nitrogruppe ein Wasserstoffatom vom Zucker abstrahiert, wodurch über das entsprechende Desoxyribonolacton die Zucker-Phosphat-Bindung gespalten wird. **14** stellt somit einen Vorläufer für diese Art von DNA-Schäden dar (Abbildung 25).^[168]

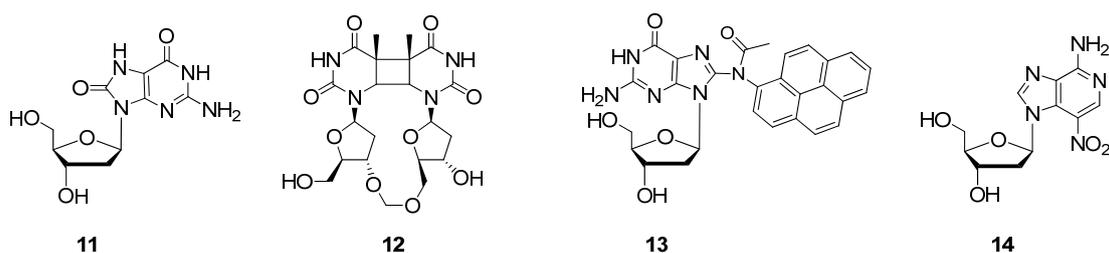


Abbildung 25. Nucleoside der vier DNA-Schäden **11-14**, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Eine genaue Beschreibung der Synthesen von **12** und **13** kann in der Literatur gefunden werden,^[169-170] auf die Synthese von **14** soll allerdings im Experimentellen Teil kurz eingegangen werden.^[168] Alle vier DNA-Schaden-Nucleoside konnten mittels Phosphoramidit-Chemie erfolgreich in DNA-Oligonukleotide eingebaut werden (siehe Kapitel 3.3).

3.2 Synthese der photoreaktiven Nucleoside (*photocrosslinker*)

Es wurden verschiedene, mit *Photocrosslinkern* versehene Nucleoside und ihre entsprechenden Phosphoramidite synthetisiert. Diese enthielten ein Diazirin, ein Benzophenon oder ein Halogen-Atom als photoreaktive Einheit (siehe auch Kapitel 1.3.5). Die Diazirine und Benzophenone wurden meist über einen *Linker* an die 5'-Position von Desoxyuridin angebracht. In dieser Arbeit wurde das Diazirin-substituierte Desoxyuridin-Derivat **15**, das Triethylenglykol-Diazirin-substituierte Desoxyuridin-Derivat **16** und das Benzophenon-substituierte Desoxyuridin-Derivat **17** hergestellt. Iod-Desoxyuridin (**18**) und Br-Desoxyuridin (**19**) wurden in Form ihrer entsprechenden Phosphoramidite käuflich erworben, sowie ersteres als Phosphoramidit zusätzlich auch selbst hergestellt. Zudem wurde mit einem C-8-Br-substituierten Desoxyadenosin-Derivat (**20**) und einem C-8-Benzophenon-substituierten Desoxyadenosin-Derivat (**21**) gearbeitet, die im Rahmen der Diplomarbeit von V. *Welz* in der Arbeitsgruppe *Carell* synthetisiert worden waren.^[171-173]

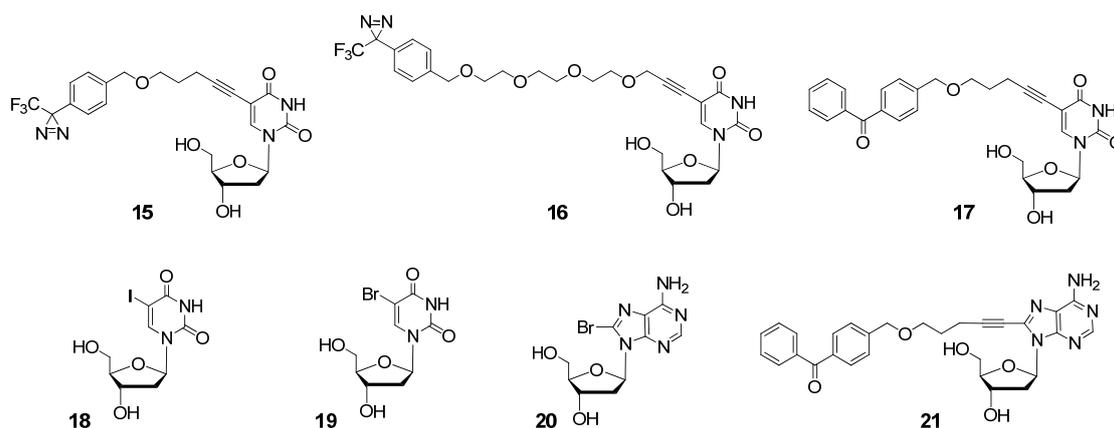
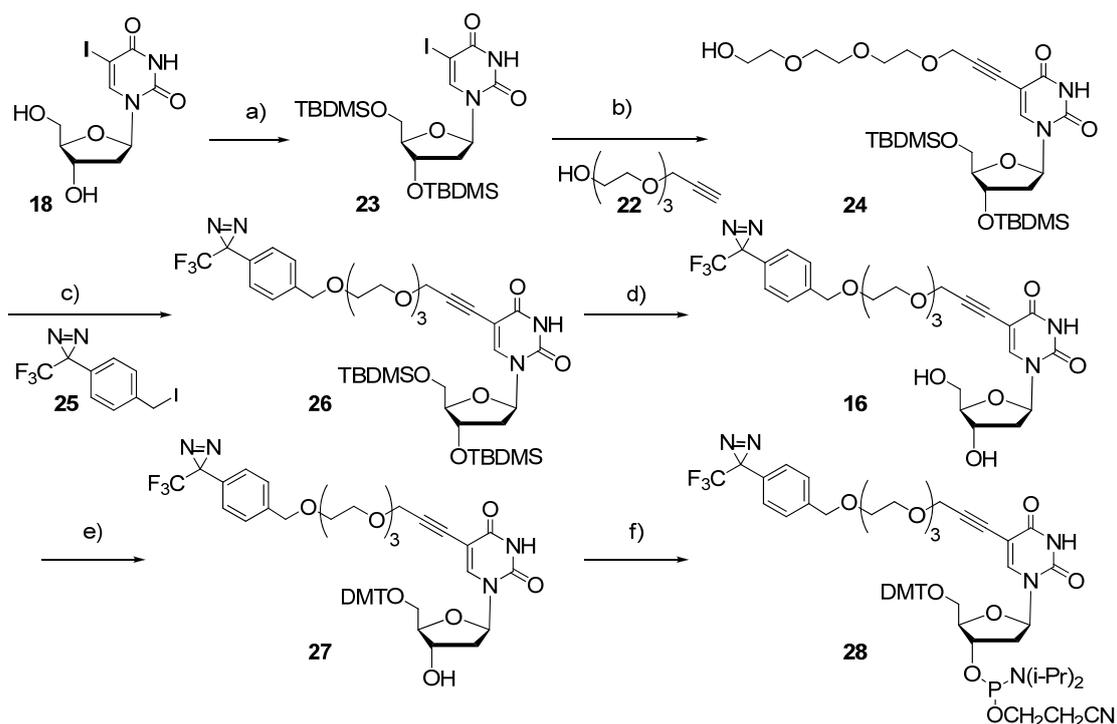


Abbildung 26. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten photoreaktiven Nukleoside **15-21**.

Die Synthese der Diazirin- und Benzophenon-substituierten photoreaktiven Phosphoramidite folgte stets einem ähnlichen Konzept: An die Nucleobase wurde ein *Linker* gekoppelt, an den dann die photoreaktive Einheit angebracht wurde. Die Synthese des Diazirin-substituierten Nucleosids **15** wurde bereits von der eigenen Arbeitsgruppe beschrieben.^[174-175] Die Synthese von Nucleosid **16** verlief nach einem ähnlichen Vorgehen. Zunächst wurde das Triethylenglykol-Alkinol **22** nach einer eigenen Synthese in leichter Anlehnung an eine Vorschrift von Marx und Mitarbeitern synthetisiert, was durch die Umsetzung von Triethylenglykol mit Natriumhydrid und Propargylbromid geschah.^[176-177] Dieser so erhaltene *Linker* wurde dann über eine *Sonogashira*-Kupplung mit Hilfe von Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI und *i*Pr₂NEt₂ („Hünig-Base“) an **23** gekoppelt (durch TBDSM-Schätzung aus **18** hergestellt).^[178] Nach chromatographischer Aufreinigung wurde Nucleosid **24** in einer Ausbeute von 64% erhalten. **24** wurde anschließend mit dem Diazirinioid **25** (hergestellt in Anlehnung an eine achtstufige Synthese nach Brunner^[133]) zum Diazirin-substituierten Nucleosid **26** umgesetzt. Die Ausbeute für diesen Schlüsselschritt betrug 67%. **26** wurde mit TBAF quantitativ zu Nucleosid **16** entschützt. Anschließende DMT-Schätzung der 5'-OH-Gruppe ergab Nucleosid **27** mit einer Ausbeute von 40%. Die Umsetzung von **27** mit *Bannwarth*-Reagenz P(NiPr₂)₂OCH₂CH₂CN^[179] ergab Phosphoramdit **28** mit einer Ausbeute von 55% (Schema 1).

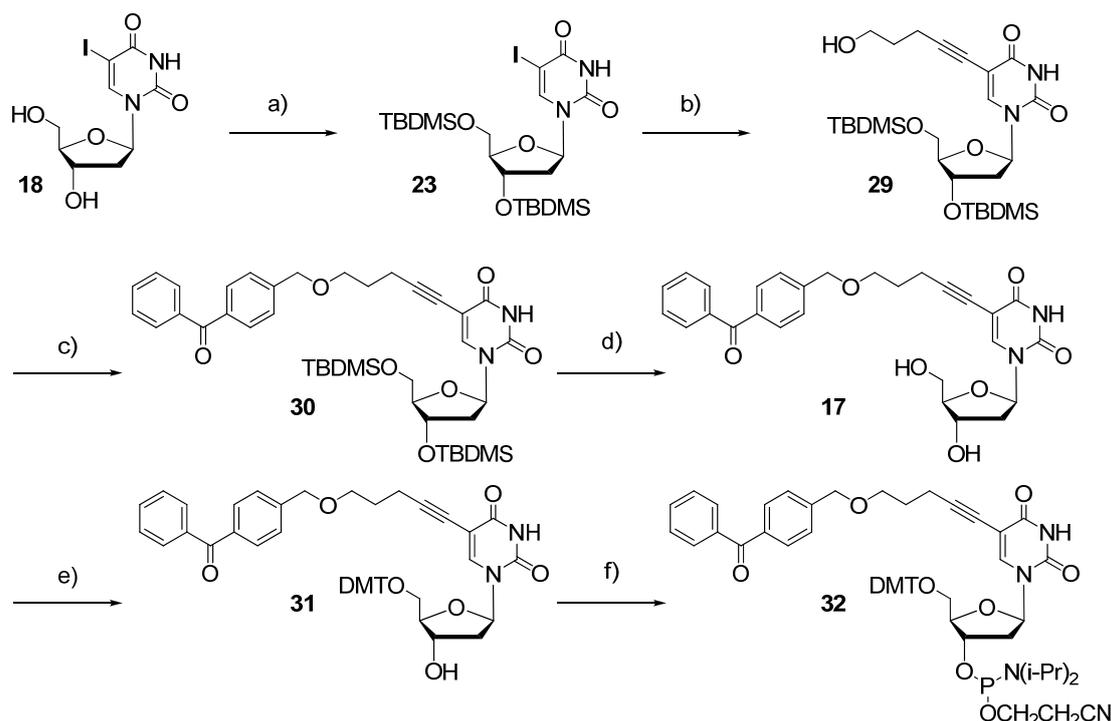
Herstellung von DNA-Sonden zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine



Schema 1. Synthese von Nucleosid **16** bzw. des entsprechenden Phosphoramidits **28**. a) TBDMSCl, DMAP, DMF, RT, 4 h, 95%; b) **22**, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, DMF, *i*Pr₂NEt₂, RT, 12 h, 64%; c) **25**, NaH, THF, RT, 3.5 h, 67%; d) TBAF, THF, RT, 2 h, 100%; e) DMTCl, Pyridin, RT → 0 °C, 2 h, 40%; f) P(NiPr₂)₂OCH₂CH₂CN, Diisopropylammoniumtetrozolat, CH₂Cl₂, RT, 3 h, 55%.

Die Synthese des Benzophenon-substituierten Nucleosids **17** erfolgte ähnlich. TBDMS-geschütztes 2'-Desoxy-5-iod-uridin (**23**) wurde ebenfalls über eine *Sonogashira*-Kupplung mit 5-Pentin-1-ol umgesetzt, wobei Nucleosid **29** entstand. Die Reaktion von **29** mit 4-Methyl-Benzophenon und Natriumhydrid lieferte das Benzophenon-substituierte Nucleosid **30**, das nach chromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 35% für diesen Schlüsselschritt erhalten wurde. Nach quantitativer Entschützung mit TBAF erhielt man Ziel-Nucleosid **17**. Dieses wurde anschließend mit DMT-Cl umgesetzt, wobei wieder die 5'-OH-Gruppe geschützt wurde. Das so entstehende Nucleosid **31** wurde nach chromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 55% erhalten. Die anschließende Umsetzung von **31** mit $P(NiPr_2)_2OCH_2CH_2CN$ lieferte Phosphoramidit **32** mit einer Ausbeute von 90%. **32** wurde somit mit einer Gesamtausbeute von 25% über fünf Stufen hergestellt (Schema 2).

Herstellung von DNA-Sonden zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine



Schema 2. Synthese von Nucleosid **17** und des entsprechenden Phosphoramidits **32**. a) TBDMSCl, DMAP, DMF, RT, 4 h, 95%; b) 4-Pentin-1-ol, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, DMF, *i*Pr₂NEt, RT, 5 h, 87%; c) 4-Methyl-Benzophenon, NaH, THF, RT, 16 h, 35%; d) TBAF, THF, RT, 3 h, 90%; e) DMTCl, Pyridin, RT, 4 h, 55%; f) P(N*i*Pr₂)₂OCH₂CH₂CN, Diisopropylammoniumtetrazolat, CH₂Cl₂, RT, 3 h, 90%.

Alle photoreaktiven Nucleoside aus Abbildung 26 wurden mit Hilfe von Standard-Phosphoramiditchemie durch DNA-Festphasensynthese in DNA-Oligonucleotide mit verschiedenen Längen eingebaut. Es ist naheliegend, dass für sinnvolle *photocrosslinking*-Experimente eine gewisse Mindestlänge der Oligonucleotide erforderlich ist, um eine möglichst „naturnahe“ Wechselwirkung mit den DNA-bindenden Enzymen zu gewährleisten. Eigene sowie literaturbekannte^[146, 180] Erfahrungswerte zeigen, dass bereits ab einer Länge von ca. 15 Nucleotiden (bzw. Basenpaaren) sinnvolle *photocrosslinking*-Experimente möglich sind. Dies entspricht eineinhalb vollständigen Umdrehungen der Helix (ca. 10 Basen/360°-Drehung). Längere Oligonucleotide bzw. DNA-Sonden entsprechen besser den natürlichen Gegebenheiten. Allerdings sinkt mit der Länge der Oligos die Ausbeute bei der DNA-Festphasensynthese. Für lange Oligonucleotide > 50 müsste man dann entweder einen hohen Ausbeuteverlust hinnehmen oder gegebenenfalls auf andere Methoden wie enzymatische Ligation etc. zurückgreifen (vgl. Ausblick, Kapitel 5). Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit Oligonucleotide mit verschiedenen Längen (meist

bis ca. 30 Nukleotide) synthetisiert. Diese Länge ist für die betrachteten Fragestellungen ausreichend.

3.3 Herstellung und Charakterisierung der doppelsträngigen DNA-Sonden

Mit den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Phosphoramiditen wurden unterschiedliche doppelsträngige DNA-Sonden hergestellt, die schematisch in Abbildung 27 dargestellt sind. Hierbei wurde zwischen kürzeren Sonden mit einer photoreaktiven Gruppe (A) und längeren DNA-Sonden mit zwei photoreaktiven Gruppen (B) unterschieden. Die DNA-Sonden wurden entweder mit einem Fluorescein-Farbstoff versehen (A und B),^[181] oder alternativ mit einer Alkin-Position zum nachträglichen „Anklicken“ des Farbstoffs über die „Click“-Chemie (C; siehe später).^[106, 109] Zudem wurde im Hinblick auf eine möglicherweise höhere Nuklease-Stabilität an der Herstellung von „Dumbbell-Strukturen“ gearbeitet (D).

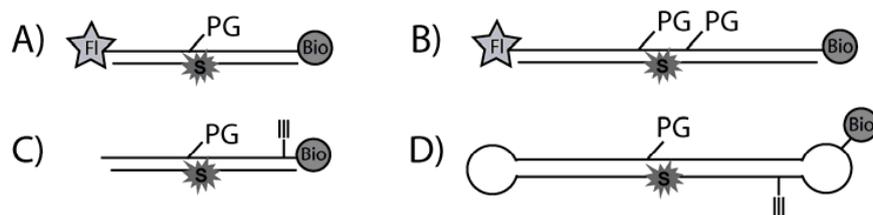


Abbildung 27. Schematische Darstellung der Strukturen von DNA-Sonden für die *photoaffinity labeling* Experimente. FI = Fluorescein, Bio = Biotin, PG = Photoreaktive Gruppe (*photocrosslinker*), S = DNA-Schaden.

Die genauen Sequenzen einiger dieser DNA-Stränge, mit denen in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich gearbeitet wurde, sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten *photocrosslinker*-enthaltenden Stränge, die zudem das Biotin-Label zur Isolierung der DNA-Protein-*crosslinks* und das Fluorescein-Label zu deren Detektion enthalten.

Herstellung von DNA-Sonden zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine

Tabelle 1. Über DNA-Festphasensynthese synthetisierte DNA-Stränge mit *photocrosslinker*, Biotin- und Isolations-Label (*T* = *photocrosslinker*, *Bio* = Biotin; *Fl* = Fluorescein). Die Spalte *Photocrosslinker T =* gibt dessen Kurzbezeichnung sowie die Nummer des entsprechenden Nucleosids an (siehe Kapitel 3.2, Abbildung 26).

Strang	Sequenz	Photocrosslinker T =
S1	5'- <i>Fl</i> -AAT-GAC-CAG- <u>TCI</u> -CAA-GTA-CTT-GAC-TT- <i>Bio</i> -3'	C-5-Diazirin-dU (15)
S2	5'- <i>Fl</i> -AAT-GAC-CAG- <u>TAAI</u> -CAA-GTA-CTT-GAC-TT- <i>Bio</i> -3'	C-5-Diazirin-dU (15)
S3	5'- <i>Fl</i> -GAT-GAT- <u>TCA</u> -TGA-GCT- <i>Bio</i> -3'	C-5-Diazirin-dU (15)
S4	5'- <i>Fl</i> -GAT-GAT- <u>TCA</u> -TGA-GCT- <i>Bio</i> -3'	TEG-Diazirin-dU (16)
S5	5'- <i>Fl</i> -GAT-GAT- <u>TCA</u> -TGA-GCT- <i>Bio</i> -3'	C-5-Benzophenon-dU(17)
S6	5'- <i>Fl</i> -GAT-GAT- <u>TCA</u> -TGA-GCT- <i>Bio</i> -3'	I-dU (18)
S7	5'- <i>Fl</i> -GAT-GAT- <u>TCA</u> -TGA-GCT- <i>Bio</i> -3'	Br-dU (19)
S8	5'- <i>Fl</i> -GAT-GAT- <u>TCA</u> -TGA-GCT- <i>Bio</i> -3'	Br-dA (20)
S9	5'- <i>Fl</i> -GAT-GAT- <u>TCA</u> -TGA-GCT- <i>Bio</i> -3'	C-5-Benzophenon-dA(21)
S10	5'- <i>Fl</i> -GAT-GAT-TCA-TGA-GCT- <i>Bio</i> -3'	-

Tabelle 2 zeigt eine Auswahl an Strängen, die einen DNA-Schaden enthalten und zu den in Tabelle 1 aufgeführten Strängen komplementär sind.

Tabelle 2. Synthetisierte DNA-Stränge, die einen DNA-Schaden enthalten. G = 8-oxo-dG. TT = CPD (TT)-Dimer

Strang	Sequenz	Schaden
S11	3'-TTA-CTG-GTC- <u>AGA</u> -GTT-CAT-GAA-CTG-AA-5'	8-Oxo-dG (11)
S12	3'-TTA-CTG-GTC-A <u>TTA</u> -GTT-CAT-GAA-CTG-AA-5'	TT-(CPD)-Dimer (12)
S13	3'-CTA-CTA- <u>AGT</u> -ACT-CGA-5'	8-Oxo-dG (11)

Außerdem wurden zusätzlich zu den *photocrosslinker*-Strängen **S1-S10** weitere Stränge synthetisiert, die anstelle des Fluoresceins eine Alkin-substituierte Nucleobase enthalten. Dadurch sollte postsynthetisch das Farbstoff-Label mit Hilfe der „Click“-Chemie angebracht werden können (siehe Kapitel 1.3.2 bzw. dieses Kapitel weiter unten). Die Vorteile dieser Methode werden später eingehender diskutiert. Tabelle 3 zeigt exemplarisch zwei derartige Sequenzen. Genaue Struktur und Synthese des Alkin-substituierten Nucleosids sind im Experimentaltel dargestellt (Kapitel 6.2.4).

Herstellung von DNA-Sonden zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine

Tabelle 3. Synthetisierte DNA-Stränge mit einer „Click“-Position zum nachträglichen Anbringen des Fluorescein-Labels. Bio = Biotin, \underline{T} = photocrosslinker, X = Alkin-substituiertes Desoxyuridin-Derivat (Struktur siehe Experimenteller Teil).

Bezeichnung	Sequenz	Photocrosslinker T =
S14	5'-GAT-GAT- \underline{T} CA-TGA-GC \underline{X} -Bio-3'	I-dU (18)
S15	5'-AAT-GAC-CAG- \underline{TCT} -CAA-GTA-CTT-GAC-T \underline{X} -Bio-3'	I-dU (18)

Die DNA-Stränge wurden nach erfolgter Festphasensynthese mittels HPLC aufgereinigt und mittels MALDI-TOF-Messungen analysiert. Für hochauflösende Massenspektren wurden ESI-MS-Spektren aufgenommen. In der Regel genügte eine einfache HPLC-Aufreinigung, um die DNA-Stränge in > 95%-iger Reinheit zu erhalten. Gelegentlich war auch eine zweifache Aufreinigung notwendig. Abbildung 28 zeigt exemplarisch je ein Chromatogramm mit entsprechendem MALDI-TOF-Spektrum der Oligonukleotide **S1** (A), **S4** (B) und **S13**(C).

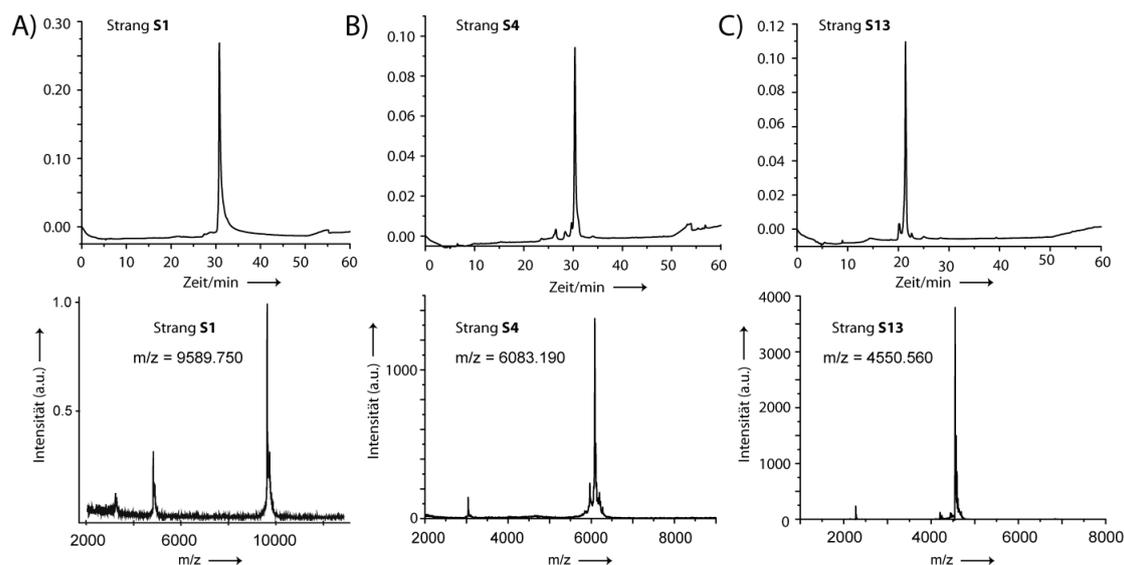


Abbildung 28. HPL-Chromatogramme und MALDI-Spektren der Oligonukleotide **S1** (A), **S4** (B) und **S13** (C).

Weitere analytische MALDI-Daten sowie weitere Sequenzen, die nur wenig verwendet wurden, befinden sich im Experimentellen Teil.

Zusätzlich wurde durch enzymatische Hydrolyse („Nuklease-Verdau“) untersucht, ob die synthetisierten Phosphoramidite intakt in die DNA eingebaut worden waren, oder ob Zersetzung während der Synthese eingetreten war. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit war dies für Diazirin-Nukleosid **15** durchgeführt und bestätigt worden.^[174]

Herstellung von DNA-Sonden zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine

Analog wurde ein derartiger „Verdau“ nun noch mit DNA-Strang **S5** (mit dem Benzophenon-substituierten Nukleosid **17**) und mit DNA-Strang **S4** (mit dem TEG-Diazirin-substituierte Nukleosid **16**) durchgeführt. Dazu wurde die zu verdauende Oligonukleotidlösung zunächst mit Nuklease S1 (*Penicillium citrum*) inkubiert, sowie anschließend mit einer Phosphatase und einer Phosphodiesterase (für das genaue Vorgehen siehe Experimenteller Teil). Die Lösung wurde anschließend 15 min bei 13 400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, chromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch vermessen. Die Ergebnisse der ESI-MS-Analyse des Experiments mit Strang **S5** sind in Abbildung 29 gezeigt. Wie zu erkennen ist, treten in der HPLC-Spur deutliche Signale für alle zu erwartenden Nukleotide auf (A), wobei für alle Modifikationen ein aussagekräftiges Massenspektrum aufgenommen werden konnte (B-D). Die *Peaks* der einzelnen Nukleotide und Modifikationen sind in A gekennzeichnet. Bei den vielen kleinen Signalen bei 40-45 min sowie bei 70-80 min handelt es sich um kleine (nicht vollständig verdaute) Oligonukleotide bzw. um entsprechenden Addukte aus Nukleotid und Modifikation. Somit konnte die Intaktheit der Oligonukleotide erneut bestätigt werden.

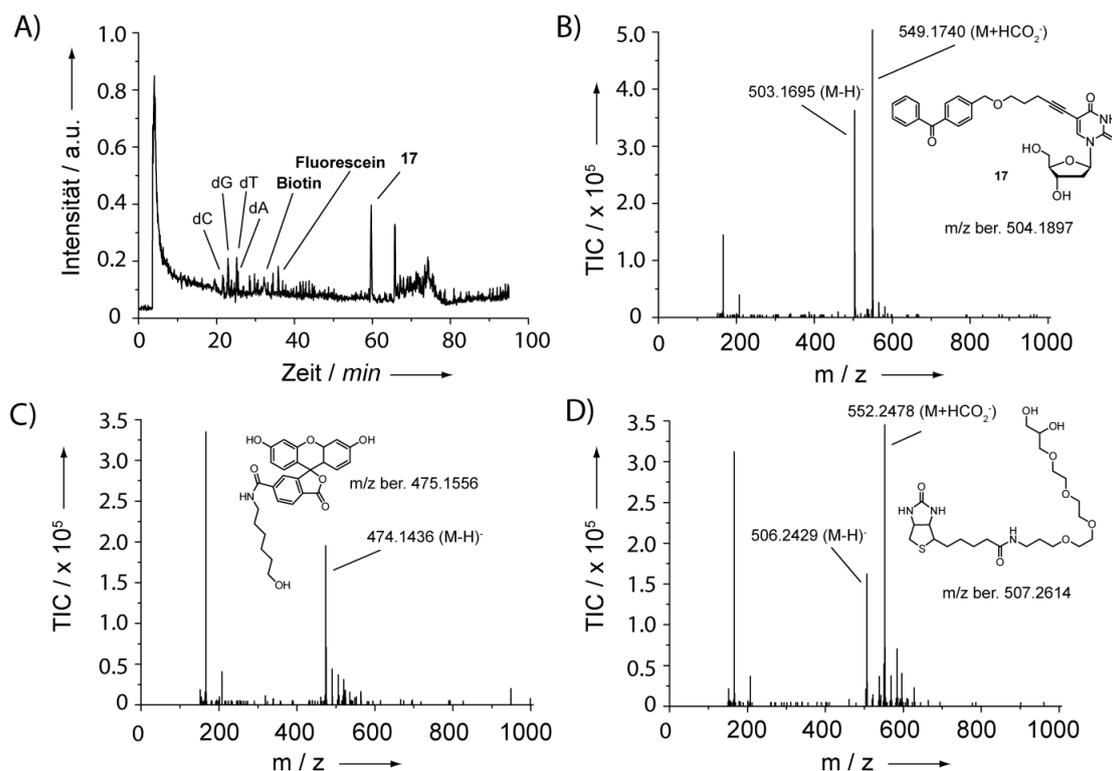


Abbildung 29. A) HPL-Chromatogramm eines Nukleaseverdaus des Stranges **S5** sowie zugehörige Massenspektren des Benzophenon-substituierten Nucleosids **17** (B), des Fluoresceins (C) und des Biotins (D).

Die Ergebnisse des Nuklease-Verdaus von Strang **S4** mit dem TEG-Diazirin-Nucleosid **16** sind im Anhang dargestellt.

Waren gemessene Masse und Reinheit der Oligonukleotide zufriedenstellend, wurden die jeweils komplementären Stränge zu doppelsträngigen DNA-Sonden hybridisiert. Hierzu wurden jeweils gleiche Mengen an Strang und Gegenstrang zusammengegeben und mit einem Hybridisierungspuffer versetzt (siehe Experimentaltteil). Die Lösungen wurden auf 85 °C erhitzt und über 3-4 Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt. Auf diese Weise wurden die in den Tabellen 1, 2 und 3 aufgeführten DNA-Strängen zu verschiedenen doppelsträngigen DNA-Sonden kombiniert, von denen die wichtigsten in Abbildung 30 dargestellt sind. Die Strukturformeln der verschiedenen *Photocrosslinker* (**T** bzw. **A**), die inkorporierten DNA-Schäden (**G** = 8-Oxo-dG; **TT** = T=T-Dimer) sowie die anderen Modifikationen (**FI** und **Bio**) sind hier ebenfalls gezeigt. Für die Kontrollexperimente wurden alle Sonden auch nochmals ohne DNA-Schaden hergestellt, d.h. mit **G** = Guanin anstatt 8-Oxo-dG und **TT** = TT anstatt des T=T-Dimers. Jedes später beschriebene

Herstellung von DNA-Sonden zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine

photoaffinity labeling – Experiment wurde dann jeweils einmal mit der geschädigten und einmal mit der ungeschädigten DNA-Sonde durchgeführt.

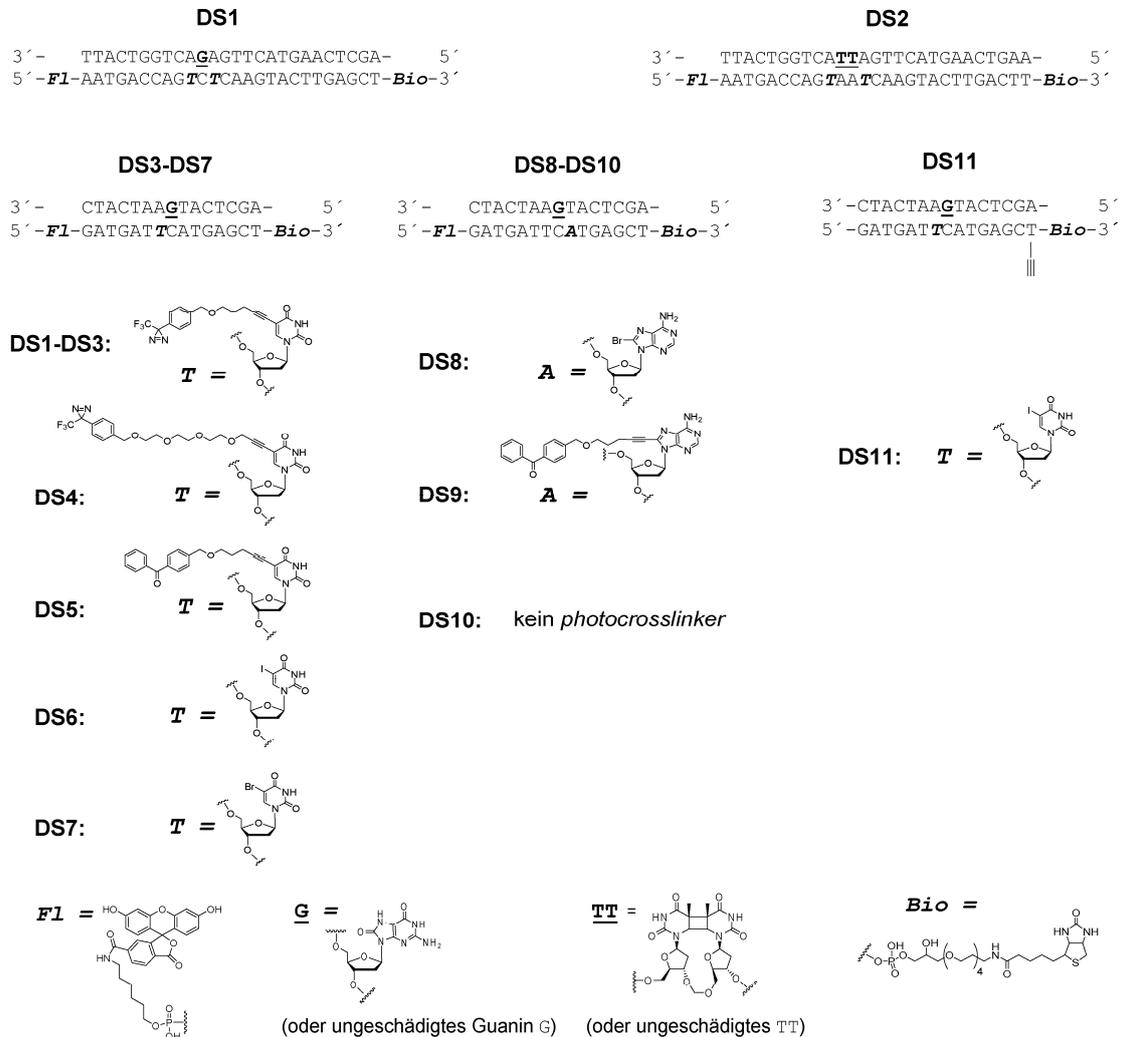


Abbildung 30. Doppelsträngige DNA-Sonden **DS1-DS11**, die im Rahmen dieser Arbeit für *photoaffinity labeling*-Studien verwendet wurden.

Zur Charakterisierung der erhaltenen DNA-Sonden wurden außerdem UV-Schmelzkurven und CD-Spektren aufgenommen, um sicherzustellen, dass die Sonden trotz der enthaltenen Modifikationen eine helikale, den natürlichen Gegebenheiten entsprechende Struktur ausbilden können. Von den mit zwei Diazirin-*Photocrosslinkern* versehenen DNA-Sonden **DS1** und **DS2** waren bereits in früheren Studien derartige Messungen durchgeführt worden, die eine entsprechende DNA-Struktur bestätigten.^[174] Diese Studien wurden nun erweitert und zeigten, dass auch die kurzen DNA-Sonden **DS3-DS11** helikale Strukturen (B-Form) ausbilden und

somit die natürlichen Gegebenheiten gut widerspiegeln. Sowohl der lange Triethylglykol-Diazirin-*Linker* der Sonde **DS4** als auch der Benzophenon-substituierte *Linker* von **DS5** störten die helikale Struktur nicht wesentlich (Smp.-Erniedrigung nur um maximal 1-2 °C), was aufgrund ihrer guten *photocrosslinking*-Ausbeuten (siehe später) eine wichtige Erkenntnis darstellte. Abbildung 31 zeigt die UV-Schmelzkurve (A) und ein CD-Spektrum (B) der Sonde **DS4**.

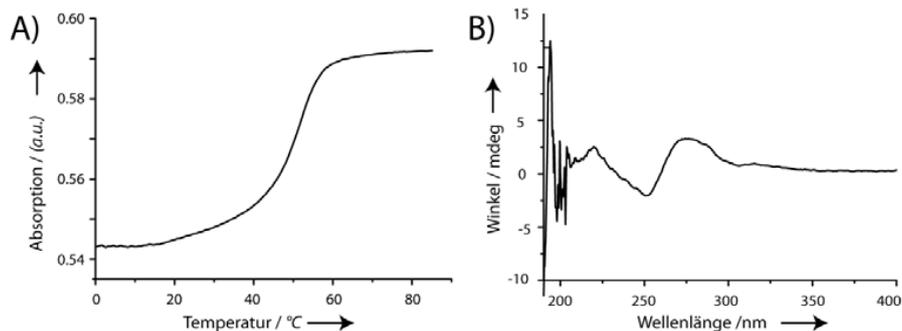


Abbildung 31. UV-Schmelzkurve (A) und CD-Spektrum (B) von DNA-Sonde **DS4**.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass das Fluorecein-*Label* als Phosphoramidit einfach und mit guten Ausbeuten in die DNA eingebracht werden konnte, und dass die synthetisierten DNA-Sonden unverzerrte, den natürlichen Gegebenheiten entsprechende Strukturen aufwiesen. Dennoch sollte in weiteren Untersuchungen das Farbstoff-*Label* auch postsynthetisch mittels „Click“-Chemie (siehe auch Kapitel 1.3.6.)^[106-108] an den DNA-Strang angebracht werden. Durch Arbeiten im AK *Carell* war diese Methode zur Funktionalisierung von DNA weiterentwickelt worden.^[109-110] Zunächst wurde das „Clicken“ als mögliche Alternative zum Fluorescein-Phosphoramidit-Einbau angesehen, weil es eventuell in größeren Ausbeuten und günstiger (hohe Verfügbarkeit des zugehörigen Fluorescein-Azids) durchgeführt werden kann. Wegen des viel höheren Aufwandes stellte sich dies jedoch im Nachhinein als Trugschluß heraus. Außerdem zeigte sich später aber, dass manche DNA-reparierende Enzyme mit dem Fluorescein-*Label* selber in Wechselwirkung treten können. Dies könnte die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Erkennung des eingebauten Schadens verzerren. Vor allem deshalb wurde versucht, den Farbstoff erst später (während des *photoaffinity labeling*-Experimentes, nach Ausbildung der kovalenten DNA-Enzym-*crosslinks*) an die DNA anzubringen. Dieses Vorgehen wurde zunächst *in situ* an DNA-Strang **S14** (Tabelle 3) entwickelt. Gemäß literaturbekannter Vorschrift^[109] und verschiedener eigener Variationen

Herstellung von DNA-Sonden zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine

(Experimenteller Teil) wurde **S14** mit Fluorescein-Azid umgesetzt (Abbildung 32A). Durch MALDI-Messung konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise der Farbstoff erfolgreich an die DNA angebracht werden konnte (Masse **S14**+Fluoresceinazid: ber. 5834,08; gef. 5835,71 (M+H); Abbildung 32B). Auch diese Stränge konnten danach aufgereingt werden und standen in ausreichender Menge zur Verfügung.

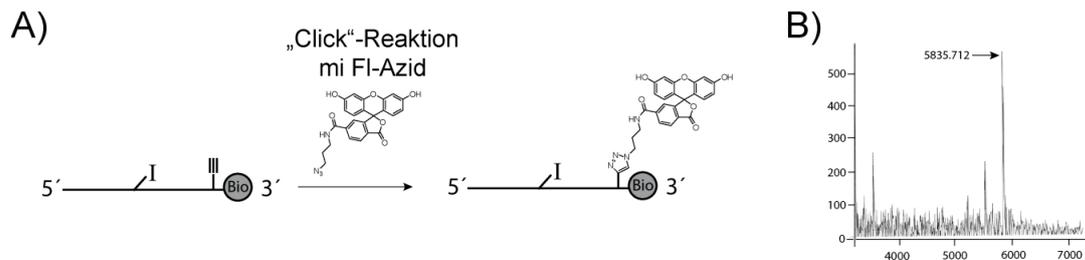


Abbildung 32. A) „Click“-Reaktion zum Anbringen des Fluorescein-Azids an DNA-Sonde **S14**; B) MALDI-Spektrum nach erfolgreicher Reaktion.

Nach diesem erfolgreichen Vorversuch sollte das Fluorescein-Label dann später direkt nach den *photoaffinity labeling*-Experimenten – noch in der Reaktionslösung mit dem Protein-Extrakt - direkt an die entstandenen DNA-Protein-Addukte vor deren Isolierung angebracht werden.

4 Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine

Nach erfolgreicher Synthese der DNA-Sonden wurden diese zur selektiven Markierung DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine in *photoaffinity labeling*-Experimenten eingesetzt. In den ersten Ansätzen wurden die Diazirin-substituierten Sonden **DS1** und **DS2** verwendet (Kapitel 3.3, Abbildung 30). Später erwiesen sich dann die neu synthetisierten DNA-Sonden **DS3–DS7** als gleich gute oder sogar bessere Alternativen. Die DNA-Sonden wurden mit den Proteinen bzw. Proteomen zusammengegeben, inkubiert und belichtet (siehe Kapitel 4.1-4.6 bzw. Experimententeil). Es folgte die Isolierung der DNA-Protein-*crosslinks* über das Biotin. Die Visualisierung der markierten Proteine erfolgte hauptsächlich auf SDS-Gelen über das Fluorescein-*Label* an der DNA. Unabhängig davon wurden die Gele auch mit *Coomassie*-Farbstoff angefärbt. Später wurde die Proteinanalytik dann teilweise auch ohne vorangehende gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt (Kapitel 4.6.2). Mit den verschiedenen Zelllysaten und DNA-Sonden wurden jeweils mehrere Experimente in verschiedenen Kombinationen durchgeführt. Im Folgenden sind die repräsentativsten Experimente und die erhaltenen Gele beschrieben.

4.1 Methodenentwicklung mit der oxidativ geschädigten DNA-Sonde DS1 und dem L/Fpg-Protein als Standard

Zunächst wurde getestet, wie effizient und selektiv die DNA-Sonde **DS1** mit dem wichtigsten oxidativen Schaden, 8-Oxo-dG, das Reparaturenzym Formamidopyrimidin-Glykosylase (Fpg/MutM) aus dem Stamm *Lactococcus Lactis* selektiv markieren kann. Das Fpg-Protein ist eine bifunktionelle DNA-Glykosylase, die oxidierte Purine wie das 8-Oxo-dG oder auch das FaPy-dG^[182] aus geschädigter DNA ausschneiden kann.^[183] Während der katalytische Mechanismus des Fpg-Proteins schon intensiv untersucht wurde,^[184] ist die Frage, wie das Protein zwischen

geschädigter und ungeschädigter DNA unterscheidet, noch Gegenstand intensiver Studien.^[185-186] Die erfolgreiche Markierung des LIFpg-Proteins mit einer einen carbacyclischen FaPy-dG-Schaden enthaltenden DNA-Sonde mittels eines Diazirin-Crosslinkers war bereits in anfänglichen Testexperimenten in der Dissertation von S. Breeger beschrieben worden.^[174] Nun ging es darum, die Methode auf den 8-Oxo-dG-Schaden anzuwenden und vor allem durch die notwendigen Kontrollen zu beweisen, dass die Markierung selektiv und aktivitätsbasierend erfolgt. Die 8-Oxo-dG-enhaltende Sonde **DS1** und – zum Vergleich – die gleiche Sonde ohne Schaden wurden hierzu jeweils in einem *photoaffinity labeling* – Puffer (Experimenteller Teil) mit aufgereinigtem LIFpg-Protein bzw. mit einem *E. coli*-Zelllysate versetzt, in dem das LIFpg-Protein überexprimiert vorlag. Nach Inkubation mit dem Protein (5-10 µg) bzw. dem Zelllysate (200-300 µg) für ca. 30 min und anschließender Belichtung (ebenfalls ca. 30 min) bei 0 °C wurden die Proteine nach Aufkonzentration und Denaturierung via SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dann wurden sie unter einem Fluoreszenz-Imager und anschließend durch Coomassie-Färbung visualisiert (Abbildung 33). Neben den Experimenten mit der ungeschädigten DNA wurden zwei weitere Kontrollen durchgeführt, eine mit hitzedenaturiertem Zelllysate und eine ohne UV-Bestrahlung. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 33 gezeigt. Die Fluoreszenz-Aufnahme (A) zeigt klare definierte Banden, sowohl bei dem Experiment mit dem reinen Protein (Spuren 2 und 3) als auch bei dem Experiment mit dem *E. coli*-Zelllysate, das das überexprimierte LIFpg-Protein enthielt (Spuren 4 und 5). Die Gruppe von Banden im Bereich von 40-45 kDa zeigt die *crosslinks* zwischen dem LIFpg-Protein (33 kDa) und der (nach der SDS-PAGE einzelsträngigen) DNA-Sonde (ca. 10 kDa). Die Tatsache, dass in dem Bereich von 40-45 kDa mehr als ein DNA-Protein-*crosslink* zu sehen ist, kann mit verschiedenen Konformationen des DNA-Protein-Komplexes erklärt werden. Alle auf dem Gel sichtbaren Banden resultieren von Proteinen, die kovalent an die DNA gebunden sind; im Zelllysate (Spuren 4 und 5) wurden also noch viele weitere Proteine selektiv markiert. Vergleicht man die Experimente mit der geschädigten DNA-Sonde (Spuren 2 und 4) mit denen mit der ungeschädigten DNA-Sonde (Spuren 3 und 5), so ist eine wesentlich höhere *crosslinking*-Ausbeute bei der Verwendung der geschädigten Sonde zu erkennen, was erwartungsgemäß die höhere Affinität des LIFpg-Proteins zu geschädigter DNA belegt. Zwei weitere Kontrollexperimente, zum einen ohne Bestrahlung der Sonden (Spur 6), zum anderen mit Bestrahlung, aber mit einem Hitze-denaturierten Zelllysate

Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine

(Spur 7), zeigen nur minimale bis gar keine Bildung von kovalenten DNA-Protein-Addukten. Das Auftreten von Banden auf dem Gel für die *crosslinks* erfordert also eindeutig die Bestrahlung der photoreaktiven Gruppen sowie die Anwesenheit korrekt gefalteter und somit aktiver Proteine. Somit ist ausgeschlossen, dass Proteine nur zufällig, z.B. aufgrund eines reinen Konzentrationseffektes, markiert werden. Die *Coomassie*-Färbung (B) zeigt, dass nur ein kleiner Teil des *LIFpg*-Proteins markiert wurde (roter Kasten), der knapp über der Nachweisgrenze der *Coomassie*-Färbung lag. Ein Großteil des Proteins lag frei vor (bei 33 kDa). Zur Bestimmung der *crosslink*-Ausbeute wurden in Spur 2 der Fluoreszenzaufnahme A die Banden der *crosslinks* bei ca. 45 kDa ins Verhältnis zur freien DNA (ganz unten) gesetzt. Es ergab sich eine Ausbeute von ca. 25%.

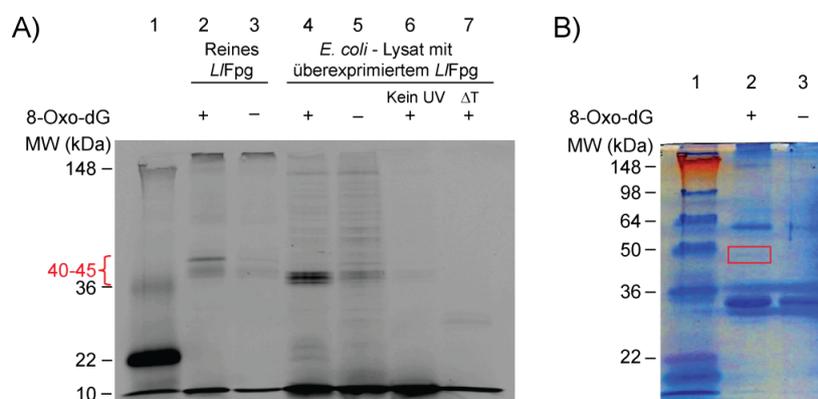


Abbildung 33. A) Fluoreszenzaufnahme ($\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$) eines SDS-Polyacrylamidgels der *Photoaffinity labeling*-Experimente mit der 8-Oxo-dG-enthaltenden DNA-Sonde **DS1** (50 pmol, 1 μM , Spuren 2, 4, 6 und 7) und der gleichen Sonde ohne Schaden (50 pmol, 1 μM , Spuren 3 und 5). Spur 1: Molekulargewichts-Marker; Spuren 2 und 3: Experimente mit rekombinantem *LIFpg*-Protein; Spuren 4–7: Experimente mit einem Zelllysate mit überexprimiertem *LIFpg*-Protein. Spur 6: Kontrollexperiment ohne Bestrahlung (somit keine Aktivierung der *Photocrosslinker*); Spur 7: Kontrollexperiment mit hitzedenaturierte (inaktiven) Proteinen. Die DNA-Sonde **DS1** markiert die Proteine somit selektiv und aktivitätsbasierend. B) Teil des Gels nach *Coomassie*-Färbung.

Zur Verifizierung, dass bei dem Experiment mit dem Zelllysate auch wirklich das *LIFpg*-Protein markiert wurde und dass die nun erforderliche Proteinanalytik mit dieser Methode gut funktioniert, wurde nun das Experiment in einem größeren Maßstab durchgeführt, um die DNA-Protein-*crosslinks* über den Biotin-Tag zu

isolieren und massenspektrometrisch zu charakterisieren. Eine *nano*-HPLC-ESI-MS/MS-Messung bestätigte dann die Identität des *LIFpg*-Proteins. Sonden und Proteine wurden hierzu wieder zusammengegeben, inkubiert, belichtet und gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Experimenteller Teil). Die Ergebnisse des zugehörigen SDS-Gels sind in Abbildung 34A gezeigt. Spuren 2 und 3 zeigen hierzu zunächst noch zwei Vergleichsexperimente im kleinen Maßstab (analytischer Maßstab; 50 pmol, 1 μ M, 100 μ L Gesamtvolumen) wieder mit Sonde **DS1** (8-Oxo-dG-Schaden und entsprechende ungeschädigte Sonde) und 100 μ g des *E. coli*-Zelllysates mit dem überexprimierten *LIFpg*-Protein. Diese beiden Experimente entsprechen also den zuvor in Abbildung 33, Spuren 4 und 5 beschriebenen Ansätzen. Zur Erhöhung der Bandenintensität wurden hierbei die Belichtungsansätze nach dem Experiment noch mittels Zentrifugalfilter eingeengt. Erneut ist auch in Abbildung 34 deutlich die wesentlich höhere *Photocrosslinking*-Ausbeute bei der Verwendung der geschädigten DNA (Spur 2) im Vergleich zur ungeschädigten DNA (Spur 3) zu erkennen. Die Gegenwart von mehr als einer Bande kann mit einer teilweisen Zersetzung des markierten Proteins oder wieder mit verschiedenen Konformationen der DNA-Protein-Addukte erklärt werden. Spur 4 zeigt ein entsprechendes Kontrollexperiment mit hitzedenaturiertem Zelllysate, wobei hier wieder erwartungsgemäß kein *Crosslink* zu erkennen ist. Parallel dazu wurde dieses Experiment nun auch in 20-facher Ansatzgröße durchgeführt (präparativer Ansatz, Spuren 5–7; 1 nmol DNA, 1 μ M, 2 mg Zelllysate, 1 mL Gesamtvolumen). Nach Inkubation und Belichtung wurden die DNA-Protein-*crosslinks* mit Hilfe von Avidin-Agarose-*Beads* angereichert (siehe Experimenteller Teil). Es folgte das Lösen der DNA-Protein-Komplexe von den *Beads* und die gelelektrophoretische Auftrennung. Die Banden des *LIFpg*-Proteins sind deutlich zu erkennen (Spur 7). Vor der Anreicherung über die Avidin-Agarose-*Beads* war ein kleiner Teil der Reaktionslösung entnommen worden, um später den erfolgreichen Anreicherungsprozess demonstrieren zu können. Dieser wurde nach kurzem Erhitzen und SDS-Auftragspuffer-Zugabe direkt auf das Gel aufgetragen (Spur 5). Ein Vergleich zwischen den Banden in Spur 5 und Spur 7 zeigt einen erfolgreichen Anreicherungs-Prozess. Zur Messung der unspezifischen Hintergrund-Proteine (z.B. durch Verunreinigungen von außen, durch unspezifische Bindungen an die Avidin-Agarose-*Beads* etc.) wurde das gleiche Experiment auch ohne Zusatz der DNA-Sonde durchgeführt (Spur 6). Dementsprechend sind hier erwartungsgemäß keine

Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine

fluoreszierenden Banden zu erkennen. Die beiden Hauptbanden in Spur 7 und Gelstücke auf gleicher Höhe in Spur 6 wurden ausgeschnitten, nach einigen Präparations-Schritten einem Protease-Verdau (Trypsin) unterzogen und massenspektrometrisch vermessen. Das Vorliegen des *L/Fpg*-Proteins in Spur 7 wurde dadurch eindeutig bestätigt (MS-Profil siehe Anhang). Abbildung 34B zeigt exemplarisch die UV-Spur dieser Messung sowie die MS-Signale einiger Peptide.

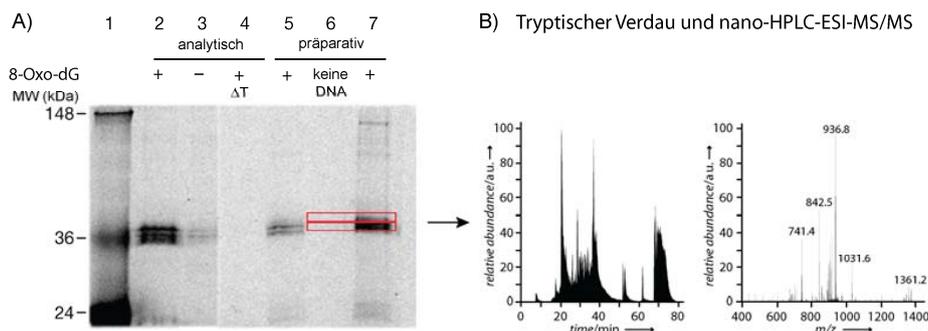


Abbildung 34. *Photoaffinity labeling*-Experimente mit DNA-Sonden **DS1** und *E. coli*-Zelllysate mit überexprimiertem *L/Fpg*-Protein. A) Fluoreszenzaufnahme ($\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$) eines SDS-Polyacrylamidgels der verschiedenen im Text beschriebenen Experimente; Spur 1: Molekulargewichts-Marker; Spur 2-4: analytischer Ansatz; Spur 5: präparativer Ansatz, nicht angereichert; Spur 6-7: präparativer Ansatz, angereichert; B) Exemplarische Aufnahme der UV-Spur und einiger Peptid-Signale (bei $t = 24 \text{ min}$).

Wie im Kapitel 3.3 beschrieben, stört der Fluorescein-Farbstoff an der DNA nicht die helikale Struktur der DNA-Sonden. Deshalb konnte er für die hier beschriebenen Studien gut verwendet werden. Um dennoch eine eventuelle Erkennung des Fluorescein-Labels durch einige Reparaturenzyme auszuschließen,^[174] wurden auch Versuche unternommen, den Farbstoff nach dem *photocrosslinking*-Experiment noch in der Reaktionslösung direkt an die DNA zu „clicken“. Hierzu wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Dieses Vorgehen stellte sich aber zunächst als schwieriger als erwartet heraus. Die Experimente funktionierten in Gegenwart der Proteine und des Puffers bei weitem nicht so gut wie das erfolgreiche, am Ende von Kapitel 3.3. beschriebene „Click“-Experiment. Deshalb sollen sie an dieser Stelle zunächst nicht eingehender beschrieben werden. Da sie jedoch für die Gesamtentwicklung des Projektes von großer Bedeutung sind, wird im Experimentellen Teil noch etwas auf diese Versuchsreihen eingegangen (Kapitel 6.4.7).

4.2 Vergleich verschiedener *Photocrosslinker*

Trotz der vielen möglichen *photocrosslinking*-Reagenzien für DNA-bindende Proteine ist es oft schwer zu beurteilen, welches dieser Reagenzien für welche Anwendungen das Beste ist. So spielen mehrere Faktoren eine Rolle, wobei nicht nur Art und Eigenschaften der photoreaktiven Gruppe selbst (Stabilität, Lebensdauer des reaktiven Intermediates etc.) hierzu von Bedeutung sind,^[187] sondern auch die Position des *Photocrosslinkers* in der DNA (an einer Base oder am Rückgrad), die Lage des *Photocrosslinkers* bezüglich des Schadens oder der Abstand zwischen *Photocrosslinker* und DNA (beispielsweise Variation über verschiedene *Linker*-Längen möglich). Im Zuge dieser Arbeit sollte deswegen auch ein Vergleich verschiedener *Photocrosslinker* durchgeführt werden. Es wurden die DNA-Sonden **DS3–DS10** (Abbildung 30) mit dem 8-Oxo-dG-Schaden und wieder das *E. coli*-Zellysate mit dem überexprimierten *L/Fpg*-Protein verwendet. Somit ließen sich die Diazirin-, die Benzophenon- und die Halogenatom-substituierten Sonden bezüglich ihrer Fähigkeit vergleichen, DNA-bindende Proteine selektiv und aktivitätsbasierend zu markieren. Die oxidativ geschädigten Sonden wurde hierzu, wie bereits beschrieben, mit dem Lysat versetzt, für ca. 30 min inkubiert und anschließend für weitere ca. 30 min belichtet. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die DNA-protein-*crosslinks* wieder unter einer Fluoreszenzlampe visualisiert (Abbildung 35). Ebenso wurde wieder mit den ungeschädigten DNA-Sonden als Kontrollen verfahren. Aus experimentellen Gründen mussten die Ansätze zur Visualisierung auf mehrere Gele verteilt werden (begrenzte gleichzeitige Verfügbarkeit des Materials, nur 10 Spuren pro kleinem SDS-Gel), die strikte Einhaltung gleicher *Imager*-Einstellungen (siehe Experimenteller Teil) sowie absolute, gelunabhängige Aussagen bezüglich Ausbeute und *crosslink*-Verhältnisse ($DNA_{\text{geschädigt}}/DNA_{\text{ungeschädigt}}$) machen die Angaben aber alle untereinander vergleichbar. Wie zu erkennen ist, zeigte ein Großteil der verwendeten Sonden gute Fähigkeiten zur aktivitätsbasierten Markierung des *L/Fpg*-Proteins ((+)-Spuren, roter Kasten). Interessanter Weise zeigen die Sonden neben unterschiedlichen Ausbeuten auch unterschiedlich starke Hintergrund-Signale, wenn in diesen kein Schaden präsent ist (Kontrollen; (-)-Spuren). Neben einer allgemeinen Affinität des *L/Fpg*-Proteins auch zu ungeschädigter DNA führt eventuell zusätzlich noch eine geringe Affinität zu den

Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine

Labeln (Biotin, Fluorescein) und zum jeweiligen *Photocrosslinker* zum Zustandekommen der kovalenten Markierung. Wie zu erkennen ist, zeigen die DNA-Sonden **DS4** (mit TEG-Diazirin-dU), **DS6** (mit I-dU) und **DS7** (mit Br-dU) hohe *crosslink*-Ausbeuten sowie günstige *crosslink*-Verhältnisse ($\text{DNA}_{\text{geschädigt}}/\text{DNA}_{\text{ungeschädigt}}$). Die Benzophenon-substituierten Sonden **DS5** und **DS9** liefern zwar auch relativ hohe *crosslink*-Ausbeuten, jedoch auch bei ihren Kontrollen. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Enzym eine Affinität zum Benzophenon-*photocrosslinker* aufweist. Ein Vergleich zwischen **DS3** und **DS4** zeigt außerdem eine deutliche Auswirkung der *Linker*-Länge auf die *photocrosslinking*-Ausbeute. TEG-Diazirin-dU, I-dU und Br-dU erwiesen sich somit zunächst als die am besten geeigneten *Photocrosslinker*. Ersterer markierte mehr Proteine im interessanten Bereich zwischen 25 und 36 kDa (blauer Kasten) und ist aufgrund seiner Länge wohl gerade in komplexen Zelllysaten von Vorteil. Die Halogen-substituierten Nucleobasen haben allerdings den Vorteil der einfacheren Verfügbarkeit (als Phosphoramidite käuflich erhältlich). Die DNA-Sonde **DS10** ohne *Photocrosslinker* markiert bei Bestrahlung mit 312 nm keine Proteine. Die Ausbildung der DNA-Protein-*crosslinks* ist also nicht auf ungewollte Photoreaktionen zwischen DNA und Proteinen zurückzuführen (Spur 16).

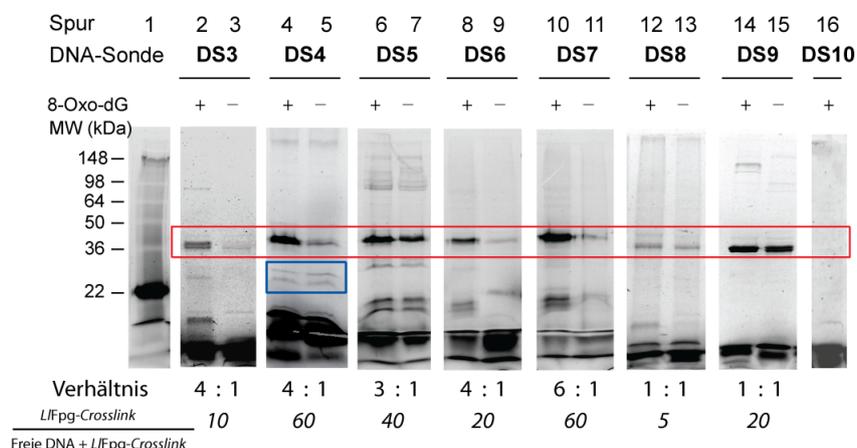


Abbildung 35. Vergleich der DNA-Sonden **DS3–DS10** bezüglich ihrer Fähigkeit, das *L/Fpg*-Protein selektiv und aktivitätsbasierend an oxidativ geschädigter DNA zu fixieren. **DS4** (mit TEG-Diazirin-*photocrosslinker*), **DS6** (mit I-dU-*photocrosslinker*) und **DS7** (mit Br-dU-*Photocrosslinker*) zeigten die höchsten Ausbeuten sowie die geringsten Hintergrund-Signale.

Nach diesen Untersuchungen und Optimierungen mit dem *E. coli*-Zelllysate mit überexprimiertem *L/Fpg*-Protein ging es nun darum, Proteine in komplexen Zelllysaten selektiv und aktivitätsbasierend zu „fischen“.

4.3 Allgemeines zur Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen in komplexen Lysaten

Bei den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Experimenten wurde bereits deutlich, dass viele DNA-Schäden erkennende und -reparierende Enzyme auch an die ungeschädigten DNA-Sonden binden, wenn auch in geringerem Maße. Dies könnte auf die Anwesenheit der Modifikationen zurückzuführen sein (Biotin, Fluorescein und *Photocrosslinker*), die gleichermaßen an der geschädigten wie auch der ungeschädigten Sonde angebracht sind. Da allerdings auch viele an der DNA-Reparatur beteiligte Enzyme von Natur aus eine generelle Affinität zu ungeschädigter DNA haben, kann es schwierig sein, bei *photoaffinity labeling* – Experimenten eine „Spezifität zum DNA-Schaden“ auszumachen. Bei vielen literaturbekannten Studien wird auf diese Tatsache nicht zur Genüge eingegangen (siehe Kapitel 1.3.6). In den folgenden Kapiteln wird daher immer auch die ungeschädigte Kontroll-Sonde als Vergleich verwendet. Generell war es in der Tat bei einigen Enzymen schwierig, eine „Spezifität zum Schaden“ auszumachen. Diese wurde jeweils durch die Bandenintensitäten und die MS-Profile bestimmt (siehe Anhang). Gelegentlich wurde hierzu auch ein Experiment mit dem entsprechenden rekombinanten Enzym durchgeführt. Es zeigte sich ferner, dass es sich bei Gelbanden an der gleichen Stelle in der Schaden-Spur (+) und der Kontroll-Spur (–) auch um völlig unterschiedliche Proteine handeln kann.

Bei der Isolierung und massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen aus komplexen Proteomen muss auf die Limitationen bzw. den „Geltungsbereich“ der verwendeten Methoden geachtet werden.^[188] Bei der Probenvorbereitung,^[189-190] den instrumentellen Gegebenheiten,^[191-192] der Datenauswertung^[79, 193-194] und den genauen Protein-Eigenschaften (z.B. Hydrophobizität, *low-abundance*-Proteine)^[51, 195-196] müssen viele Aspekte beachtet werden, um die erhaltenen Daten korrekt zu interpretieren.^[197-202] So können Verunreinigungen wie Keratine oder Trypsin-Autolyse-Produkte aufgrund der vielen zusätzlichen Signale die Datenauswertung erschweren oder interessante Treffer „verdecken“,^[203] weshalb stets Messungen des unspezifischen Hintergrunds durchgeführt werden sollten. Hohe Hydrophobizität einiger Peptide kann zum Hängenbleiben von diesen auf den vorgeschalteten HPLC-

Säulen führen,^[204] wodurch diese für die Datenauswertung verlorengehen und gegebenenfalls spätere Messungen stören. Aufgrund von posttranslationalen Modifikationen^[205-210] können wichtige Peptide bei der Datenauswertung übersehen werden. Neue wissenschaftliche Erkenntnisse erfordern außerdem stetige Aktualisierungen der Protein-Datenbanken,^[193] und eine nicht exakt mögliche Zuordnung wird von der Software je nach Grad der Ungewissheit oft mit den Begriffen 'hypothetical protein', 'protein with unknown function' oder 'unknown protein' wiedergegeben.^[188] Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Tabellen mit den in den komplexen Lysaten markierten Proteinen (und die zugehörigen MS-Profile im Anhang) lassen sich also eventuell noch durch weitere Verbesserungen der experimentellen Methoden oder der apparativen Anlagen erweitern. Sie stellen somit signifikante und sichere, aber unter Umständen nicht vollständige Listen der jeweils relevanten Proteine dar.

4.4 Experimente zur Proteom-Markierung mit einer oxidativ-geschädigten DNA-Sonde und einem *E. coli*-DH5 α -Zelllysate

Die Sonde **DS1** wurde zunächst in einer Reihe von Experimenten mit einem *E. coli*-DH5 α -Zelllysate versetzt und nach ca. 30 minütiger Inkubationszeit für ca. weitere 30 min belichtet. Hierbei wurde wieder zwischen analytischen und präparativen Ansätzen unterschieden. Bei den analytischen Ansätzen wurden 50-100 pmol DNA-Sonde und 100 mg Protein-Lysate verwendet (100 μ L Gesamtvolumen, in *photoaffinity labeling* Puffer), bei den präparativen Ansätzen 1 nmol DNA-Sonden und 1 mg Protein-Lysate (in 1 mL Gesamtvolumen). Pro Versuchsreihe wurden drei analytische Ansätze angesetzt (mit Sonde **DS1**_{Schaden}, Sonde **DS1**_{ungeschädigt} und ohne Sonde (Blindprobe)), sowie zwei weitere analytische Ansätze (**DS1**_{Schaden}, **DS1**_{ungeschädigt}) mit einem denaturierten Proteinlysate. Außerdem wurden drei präparative Ansätze angesetzt, wieder mit **DS1**_{Schaden}, **DS1**_{ungeschädigt} und ohne Sonde (Blindprobe). Nach Inkubation und Belichtung wurden die analytischen Ansätze etwas eingengt und nach Zugabe von SDS-Auftragspuffer und kurzem Erhitzen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die präparativen Ansätze wurden gemäß dem in Kap. 6.4.2 beschriebenen Protokoll über Streptavidin/Magnetic-Beads (oder alternativ Avidin-

Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine

Agarose-*Beads*) angereichert, aufgearbeitet und anschließend ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Ergebnisse einer derartigen Versuchsreihe sind in Abbildung 36 gezeigt.

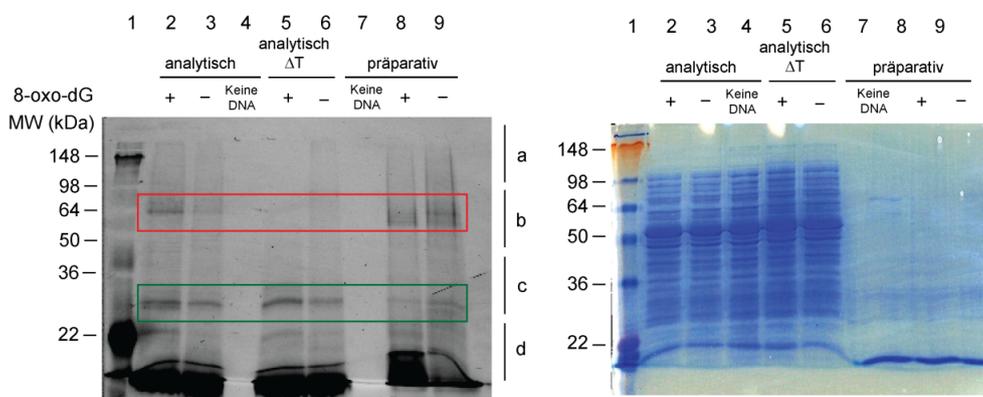


Abbildung 36. Fluoreszenzaufnahme eines SDS-Gels der im Text beschriebenen *Photoaffinity Labeling*- Experimente mit der oxidativ geschädigten DNA-Sonde **DS1** und einem *E. coli*-DH5 α -Zellysat. Spur 1: Molekulargewichts-Marker; Spuren 2-4: analytische Ansätze; Spuren 5-6: analytische Ansätze mit Hitze-denaturierten Proteinen; Spuren 7-9: präparative Ansätze.

Wie Abbildung 36 zeigt, wurden im *E. coli*-Zellysat viele Proteine selektiv „gecrosslinkt“. Der Vergleich zwischen den Experimenten mit aktiven Proteinen (Spuren 2-4 bzw. 7-9) sowie mit den hitzedenaturierten Proteinen (Spuren 5-6) zeigt, dass im Bereich um 50-100 kDa einige Proteine aktivitätsbasierend markiert wurden (roter Kasten; Banden erscheinen nicht in den Spuren 5-6), während es sich bei der starken Bande im Bereich von ca. 30 kDa um einen nicht-aktivitätsbasierenden *crosslink* handelt (grüner Kasten; Bande erscheint auch in den Spuren 5-6). Wie ebenfalls deutlich zu erkennen ist, haben manche dieser Proteine – unabhängig vom eingebauten Schaden – eine allgemeine Affinität zu DNA, d.h. sie wurden auch bei den Experimenten mit der ungeschädigten DNA-Sonde markiert (vergleiche (+)-Spuren und (-)-Spuren). Die interessanten Protein-Banden im präparativen Bereich des Gels (Spuren 7-9) wurden ausgeschnitten, gemäß Kapitel 6.4.2 proteolytisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Hierbei wurde auch immer der entsprechende Gelbereich des Experiments ohne DNA-Sonde (Spur 7) mit vermessen, um später die unspezifischen Hintergrund-Signale rausfiltern zu können. Tabelle 4 zeigt die gefundenen Proteine und die in diesem Zusammenhang wichtigen statistischen Daten, wie sie vom *BioWorks3.3.1*-Programm ausgegeben wurden. Ausführlichere MS-Profil und Identifizierungsdaten werden im Anhang gezeigt. Die Spezifität zum Schaden wurde mit „hoch“ (nur von 8-Oxo-dG-

Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine

enthaltender DNA markiert), mit „gering“ (von 8-Oxo-dG-enthaltender DNA markiert, von ungeschädigter DNA seltener und/oder mit geringeren statistischen Werten markiert) oder mit „keine“ (von beiden DNA-Sonden gleichermaßen markiert) klassifiziert, wobei hierzu immer mehrere Messungen berücksichtigt wurden.

Tabelle 4. Wichtige Proteine, die mit der oxidativ geschädigten DNA-Sonde **DS1** in einem *E. coli*-Zellysate markiert wurden. Die genauen Identifikationsnummern der Proteine (NCBI-IDs) sind im Anhang angegeben.

Protein (~MW)	MW (kDa)	Gel-Bereich(e)	P-Wert	Anzahl gefundener Peptide	Spezifität zum Schaden
RNA-Polymerase β (Untereinheit)	155	a	8.5×10^{-7}	5	keine
Superfamily II DNA/RNA Helikase	110	a	6.2×10^{-4}	2	gering
DNA Polymerase I	103	a	5.4×10^{-6}	2	gering
Elongation Factor Tu	43	a, b	1.3×10^{-12}	7	gering
RNA-Polymerase α (Untereinheit)	37	b	3.3×10^{-8}	2	gering
Helicase IV	80	b	9.9×10^{-4}	8	gering
Tryptophanase	44	c	2.9×10^{-6}	8	keine

Die bei diesem Experiment gefundenen Proteine zeigten, dass es mit den beschriebenen Sonden und Methoden möglich ist, auch in komplexen Lysaten DNA-bindende und -reparierende Proteine selektiv zu markieren. Insbesondere die Polymerasen können in einen klaren Zusammenhang mit der Reparatur des 8-Oxo-dG-Schadens gebracht werden. Glykosylasen konnten hier zunächst keine markiert werden. Diese Proteine waren also offensichtlich in zu geringen Mengen im Lysat vorhanden.

Als nächstes rückten nun eukaryotischen Zelllinien in den Blickpunkt. Ein anfängliches Testexperiment mit einem Hefe-Lysat hatte aus nicht hinreichend geklärten Gründen wenig Aussagekraft, weshalb an dieser Stelle hier nicht näher darauf eingegangen werden soll (siehe aber Anhang 7.3). Wesentlich interessanter und aussagekräftiger waren die nun folgenden Experimente mit den humanen

Zelllinien, von denen zunächst ein HCT-116-Zellkernlysate verwendet wurde. Zellkernlysate können als Subproteome definiert werden (siehe Kapitel 1.1), in denen naturgemäß die DNA-bindenden und DNA-reparierenden Enzyme vorkonzentriert vorliegen.

4.5 Experimente zur Proteom-Markierung mit einer oxidativ-geschädigten DNA-Sonde und einem humanen HCT-116 – Zellkernlysate

Bei den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde mit der oxidativ-geschädigten DNA-Sonde **DS4** gearbeitet (Kapitel 3.3, Abbildung 30, samt zugehöriger Kontrolle ohne Schaden). Es wurden auch wieder entsprechende Experimente ohne DNA-Sonde durchgeführt, um unspezifische Hintergrund-Proteine zu erkennen. Abbildung 37 zeigt die Fluoreszenzaufnahme (A) bzw. die *Coomassie*-Färbung (B) eines SDS-Gels einer derartigen Versuchsreihe (1 μ M DNA-Sonde, 2 mg Zelllysate, 1 mL Gesamtvolumen). Sonden und Protein-Lysate wurden wieder ca. 30 min auf Eis inkubiert und anschließend ca. 30 min auf Eis belichtet. Vor der Anreicherung über mit *Avidin-Agarose-Beads* wurde aus jedem Ansatz 50 μ L entnommen, die nach Aufkonzentration auf 25 μ L auf das Gel mit aufgetragen wurden (analytische Ansätze). Dann wurden die Proben gemäß dem standardisierten Protokoll (Experimentaltitel) über die *Avidin-Agarose-Beads* angereichert (präparative Ansätze). Wie bereits bei den analytischen Ansätzen zu erkennen ist (Spuren 2–6), wurden durch die geschädigte DNA (Spur 2) mehrere bzw. stärkere DNA-Protein-*crosslinks* als bei der Verwendung der nicht geschädigten DNA (Spur 3) erhalten. Bei der Durchführung des Experiments ohne DNA-Sonde (Spur 4) sind erwartungsgemäß keine fluoreszierenden Banden zu erkennen, ebenso wenig wie bei den Experimenten mit hitzedenaturierten Proteinen (Spuren 5–6). Dies zeigt, dass die markierten Proteine in den Spuren 2 und 3 aktivitätsbasierend *gecrosslinkt* wurden. Die präparativen Ansätze (Spuren 7–10) zeigen, dass die DNA-Protein-*crosslinks* wieder erfolgreich über die *Avidin-Agarose-Beads* isoliert und angereichert werden konnten (Spuren 8–9). Auch hier sind bei dem Experiment ohne Sonde (Spur 7) sowie bei dem Experiment mit hitzedenaturierten Proteinen (Spur 10)

Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine

erwartungsgemäß keine Banden zu erkennen (Abbildung 37A). Die *Coomassie*-Färbung dieses Gels ist in Abbildung 37B gezeigt. Da diese Färbemethode wesentlich weniger sensitiv ist als die Fluoreszenz-Detektion, sind hier in den Spuren 7–10 nur sehr schwache Banden zu erkennen, bei denen es sich um die markierten und über die *Beads* isolierten Proteine handelt. Dieser Teil des Gels wurde mit Hilfe der sensitiveren Silberfärbung nachgefärbt (ebenfalls in B gezeigt). Dann wurden die Protein-Banden aus dem Gel isoliert, proteolytisch gespalten und massenspektrometrisch vermessen.

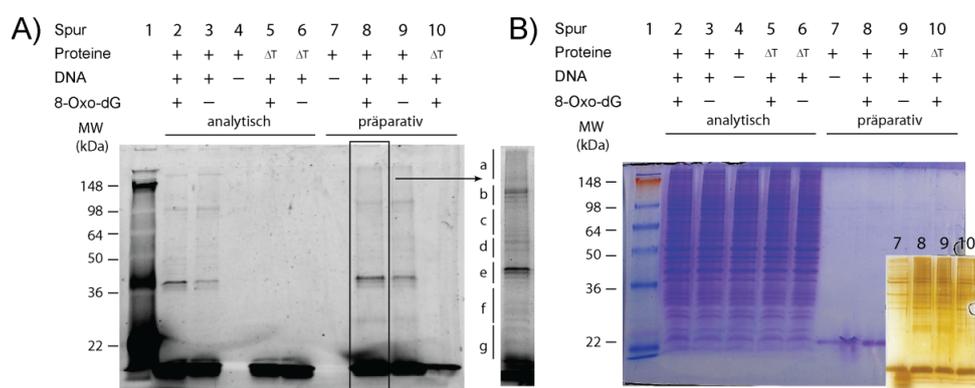


Abbildung 37. A) Fluoreszenzaufnahme eines SDS-Gels der im Text beschriebenen Experimente; B) *Coomassie*-Färbung bzw. Silberfärbung desselben Gels. Spur 1: Molekulargewichts-Marker; Spuren 2-6: analytische Ansätze, Spuren 7-10: präparative Ansätze.

In den verschiedenen Gel-Bereichen wurden durch die massenspektrometrische Analyse viele DNA-bindende und -reparierende Proteine gefunden. Diese wurden entweder nur bei dem Experiment mit der oxidativ-geschädigten DNA ((+); Spur 8) oder zusätzlich auch bei dem Experiment mit der ungeschädigten DNA-Sonde ((-); Spur 9) nachgewiesen. Erscheint eine Bande in beiden Spuren, kann es sich entweder um das gleiche Protein handeln, das mit der ungeschädigten DNA aufgrund seiner allgemeinen Affinität zu DNA auch wechselwirkt (meist in geringerem Maße). Es kann sich aber auch um völlig unterschiedlichere Proteine im gleichen Massenbereich handeln. Auskunft darüber geben die MS-Profile (Anhang). Bei den Proteinen wurde also eine unterschiedlich starke Spezifität zum DNA-Schaden nachgewiesen. Unspezifische Hintergrund-Proteine (z.B. durch Verunreinigungen oder unspezifische Bindung an die *Avidin-Agarose-Beads*) wurden durch die Hintergrundmessung ermittelt und ausgeschlossen (Experiment ohne Sonde; Spur 7), indem die Gelbereiche auf gleicher Höhe ausgeschnitten und entsprechend

Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine

analysiert wurden. Tabelle 5 stellt die wichtigsten markierten Proteine mit den zugehörigen Daten dar. Genauere Informationen über die Signifikanz der einzelnen Treffer und die genaue Schadensspezifität der einzelnen Proteine geben die detaillierteren MS-Profile (Anhang). MS/MS-Spektren von ausgewählten Peptiden der gefundenen Proteine sind ebenfalls im Anhang dargestellt. Die Sequenzabdeckung der identifizierten Proteine lag zwischen 10 und 60 Prozent. Die Klassifizierung 'Spezifität zum Schaden' (hoch/mittel/gering/keine) wurde aufgrund der Intensität der Banden UND der MS-Profile getroffen, oder es wurden zusätzlich noch ein Experiment mit dem entsprechenden rekombinanten Protein durchgeführt (siehe später).

Tabelle 5. Wichtige Proteine, die mit der oxidativ geschädigten DNA-Sonde **DS4** in einem humanen HCT-116-Nuklear-Lysat markiert wurden. Die genauen Identifikationsnummern der Proteine (NCBI-IDs) sind im Anhang angegeben.

Protein	MW (kDa)	Gel- Bereich(e)	P-Wert	Anzahl Peptide (gefunden)	Spezifität zum Schaden
PARP-1	113	a, c	5.1×10^{-11}	5	mittel
hOGG1 (Isoformen)	36-45	e	6.8×10^{-12}	10	hoch
HMG-1	33	e	4.9×10^{-8}	10	gering
APEX-Nuklease	36	e	2.3×10^{-11}	4	hoch
Uracil-DNA- Glycosylase	35	e	1.0×10^{-12}	8	gering
FUSE-binding Protein	68	b	9.8×10^{-7}	4	keine

Die humane Oxo-Guanin-Glycosylase (hOGG1) ist bekanntermaßen an der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden beteiligt.^[211-213] Die entwickelten DNA-Sonden und Methoden sind also dazu in der Lage, dieses Protein auch in einem komplexen Zellkernlysate selektiv zu markieren. Das PARP-1-Protein (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) ist ein wichtiges DNA-Reparaturenzym, das durch die Polymerisierung von ADP-Ribose durch das so entstehende Polymer weitere DNA-Reparaturenzyme zur schadhaften Stelle in der DNA quasi „anlockt“. ^[214] Es wurde bereits eine Funktion dieses Proteins im Rahmen der Reparatur von DNA-Strangbrüchen und auch von oxidativ geschädigter DNA nachgewiesen.^[215] Dies

konnte nun durch die Durchführung der hier beschriebenen *photocrosslinking*-Experimente bestätigt werden. Aufgrund dieser Funktion ist die Inhibierung des PARP-1-Proteins in Verbindung mit DNA-schädigenden Reagenzien auch ein wichtiger Ansatz zur Bekämpfung von Tumorzellen.^[41] Die APEX-Nuklease ist ebenfalls ein wichtiges Reparaturenzym, das bei der Reparatur von oxidativ geschädigter DNA beteiligt ist, indem durch dieses die durch die Glykosylase-Tätigkeit entstehende abasische Stelle aus der DNA entfernt wird (siehe auch Kapitel 1.2).^[215] Die detektierten HMG-Proteine, die auch im Zusammenhang mit der Reparatur von *cis*-Pt-geschädigter DNA gefunden wurden,^[144] sind ebenfalls für das „Anlocken“ von DNA-bindenden und -reparierenden Enzymen von Bedeutung.^[216] Bei der Uracil-DNA-Glykosylase handelt es sich ebenfalls um ein vielseitig funktionelles DNA-Reparaturenzym.^[217] Der Grund für dessen Markierung in diesem Experiment ist jedoch noch nicht ganz eindeutig. Auch wenn dieses sicherlich zum Teil aufgrund des oxidativen Schadens markiert wurde (auch wenn es sich bei diesem um ein Guanin-Derivat handelt), kann ein gewisser Zusammenhang zur Gegenwart des *photocrosslinker*-Nukleotids (Uracil-Derivat) nicht ausgeschlossen werden. Deshalb war wohl auch die Schadens-Spezifität dieses Proteins (im Vergleich zur ungeschädigten DNA) relativ gering. Das far upstream element (FUSE)-binding Protein ist ein wichtiges DNA-bindendes Protein, das zwar in dem beschriebenen Experiment nicht Schaden-spezifisch, aber aufgrund seiner generellen hohen Affinität zu DNA markiert wurde. Deshalb sollte es in diesem Zusammenhang auch genannt werden. Dieses Protein spielt auf verschiedenen Ebenen eine wichtige Rolle u. a. bei der Regulierung der Genexpression.^[218] Es kann aufgrund seiner höheren Affinität zu einzelsträngiger als zu doppelsträngiger DNA ebenfalls in einen Zusammenhang zur DNA-Reparatur gebracht werden. Auch andere Proteine wurden mit der geschädigten und der ungeschädigten DNA gleichermaßen markiert (nichtmehr in Tabelle 5 aufgeführt). Zu diesen gehören beispielsweise die ATP-abhängige DNA-Helicase II (P-Wert: 2.5×10^{-11} , 12 Peptide) oder der Elongationsfaktor 2b (P-Wert 9.2×10^{-6} ; 13 Peptide).

Zusätzlich wurde bei manchen im Lysat markierten Proteinen noch ein *photoaffinity labeling*-Experiment mit dem entsprechenden rekombinanten Enzym durchgeführt. Das SDS-Gel eines derartigen Experimentes mit dem hOGG1-Protein ist in Abbildung 38 gezeigt. Das Vorgehen mit Inkubation, Belichtung und Isolierung der DNA-Protein-

crosslinks verlief wieder analog Kapitel 6.4. Ein Vergleich der Gelbanden zeigt deutlich eine Schaden-spezifische Markierung des hOGG1-Proteins mit Sonde **DS6**.

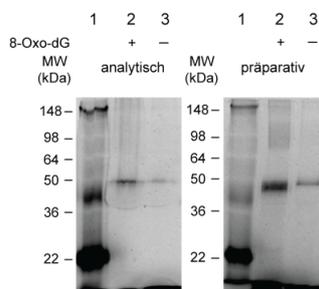


Abbildung 38. Fluoreszenzaufnahme des SDS-Gel eines *photoaffinity labeling*-Experimentes mit der oxidativ geschädigten Sonde **DS6** und rekombinatem hOGG1-Protein.

4.6 Weitere *photoaffinity labeling* – Studien

4.6.1 Verwendung weiterer DNA-Schäden

Ebenso wurden *photoaffinity labeling* - Experimente mit DNA-Sonden durchgeführt, die das T=T-Dimer (**12**, UV-Schaden) und das Aminopyren-substituierte Guanosin (**13**, *bulky adduct* - Schaden) enthielten (Kapitel 3.1, Abbildung 25). Es wurden DNA-Sonde **DS2** (Kapitel 3.3, Abbildung 30) bzw. eine das Pyren-Guanin enthaltende Sonde analog **DS6** verwendet (der Übersichtlichkeit wegen nicht gesondert aufgeführt). Das Vorgehen entsprach dem in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen.

Mit der Pyren-substituierten Sonde konnten unter anderem auch das PARP-1-Protein,^[214-215] der Translationsfaktor 1α ^[219] sowie das Ribonukleoprotein K^[220] eindeutig Schaden-spezifisch markiert werden. Die Tatsache, dass keine NER-Enzyme detektiert werden konnten, die für die Reparatur dieses Schadens verantwortlich sind, kann wohl folgendermaßen erklärt werden:

- Es wurde noch nicht mit dem „besten“ *photocrosslinker* **16** gearbeitet (Kapitel 3.2, Abbildung 26), der zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand.
- Für die Helix-verzerrenden *bulky adduct* - Schäden sind gegebenenfalls längere Sonden notwendig (analog **DS1** oder **DS2**), um eine „naturnahe“ Schadenserkenkung durch die Enzyme zu gewährleisten.
- Das sterisch anspruchsvolle Pyren befindet sich innerhalb der Sonde wohl zu nah am Biotin und stört somit die Anreicherung über die Avidin-Agarose-*Beads*. Nur sehr schwache Banden auf dem zugehörigen SDS-Gel bestätigten eine unvollständige Anreicherung der DNA-Protein-Addukte (nicht gezeigt). Auch dies spricht für die Verwendung längerer Sonden bei derart sperrigen Addukten (siehe auch Ausblick, Kapitel 5).

Mit der das T=T-Dimer enthaltenden Sonde **DS2** konnte in einem ersten Testversuch rekombinante *E. coli*-CPD-Photolyase erfolgreich Schaden-spezifisch markiert und identifiziert werden (MS-Profil siehe Anhang). Weitere Experimente mit dieser Sonde und dem HCT-116-Zellkernlysate sind für die nahe Zukunft geplant. Hier sei aber auch direkt auf Kapitel 4.7 verwiesen, wo erfolgreiche Experimente zur Erkennung dieses Schadens mit Hilfe einer SILAC-basierenden Methode geschildert werden.

4.6.2 Photoaffinitätsmarkierung mit anschließendem tryptischen Verdau ohne gelelektrophoretische Auftrennung

Parallel zu den obigen Arbeiten wurde an einem Verfahren gearbeitet, den tryptischen Verdau direkt nach der Isolation der DNA-Protein-Addukte durch die Avidin-Agarose-*Beads* durchzuführen, ohne vorherige gelelektrophoretische Auftrennung. Auch wenn eine Visualisierung der markierten Proteine auf Gelen aussagekräftig und übersichtlich ist, verspricht ein Gel-freies Vorgehen andere Vorteile wie eine schnellere Durchführbarkeit der Experimente oder eine weniger starke Anfälligkeit der Experimente für Verunreinigungen aufgrund der geringeren Anzahl von Arbeitsschritten. Diese alternative Methode wurde sowohl mit dem *E. coli*-Zelllysate als auch mit dem humanen HCT-116-Zellkernlysate getestet. Am wichtigsten war hierbei die Fragestellung, in welche Lösung die DNA-Protein-

Addukte für die nun unmittelbar folgende Trypsin-Proteolyse von den *Beads* „abgekocht“ werden mussten: schließlich befanden sich die Proteine nun nicht in einer Gelmatrix, zu der die benötigten Lösungen für den tryptischen Verdau einfach zugegeben und wieder abgenommen werden können. Stattdessen befanden sie sich in Lösung, und es sollte auf aufwendige Pufferwechsel (oft mit Ausbeuteverlust verbunden) verzichtet werden. Die für diese Fragestellung notwendigen Versuche sind im Experimentellen Teil beschrieben. Dieses Vorgehen konnte zwar noch nicht zur Anwendungsreife optimiert werden. Dennoch wurden auch hier einige Proteine mit der oxidativ-geschädigten DNA-Sonde **DS4** Schaden-spezifisch markiert, beispielsweise wieder die *Superfamily II DNA/RNA Helicase*^[221] im *E. coli*-Lysat. Im humanen HCT-116 Zellkernlysate erhielt man unter anderem das Raichu404X-Protein^[222] als eindeutigen Treffer. Bei diesem Protein handelt es sich um einen wichtigen Signaltransduktions-Faktor. Ein Zusammenhang mit der Reparatur der oxidativ-geschädigten DNA-Sonde **DS4** konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht eindeutig geklärt werden.

4.7 SILAC-basierende DNA-Protein-Interaction Screenings

Mit einigen DNA-Strängen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Mann* vom Max-Planck-Institut für Biochemie die in Kapitel 1.3.7. beschriebenen *DNA protein interaction screens* durchgeführt.^[159] Dazu wurden die den Schaden enthaltenden Stränge (siehe Kapitel 3.3, Tabelle 2) bzw. deren ungeschädigte Kontrollstränge nach ein bzw. zweifacher chromatographischer Aufreinigung dem Kooperationspartner übergeben, von diesem zur Erhöhung der „Schadens-Dichte“ ligiert und immobilisiert (Kapitel 1.3.7, Abbildung 22). Anschließend folgte die Affinitäts-Chromatographie mit jeweils einem der beiden HeLa-Zellkernlysate (leichte bzw. schwere Variante) und die anschließende Elution der an die DNA gebundenen Proteine gemäß dem in der Arbeitsgruppe *Mann* entwickelten Verfahren.^[159-160, 223] Die Proteine wurden nach einem tryptischen Verdau massenspektrometrisch vermessen. Als Ergebnisse wurden viele interessante Proteine erhalten, die spezifisch an den jeweiligen DNA-Schaden binden. Tabelle 6 stellt eine kleine Auswahl dieser Proteine mit ein paar zugehörigen statistischen Werten dar. Aufgrund

Photoaffinitätsmarkierung und massenspektrometrische Analytik DNA-bindender und DNA-reparierender Proteine

des üblichen Sprachgebrauchs wird der englische Name der Proteine genannt. Ausführlichere Tabellen mit weiteren wichtigen gefundenen Proteinen sind im Anhang wiedergegeben. Besonders wichtig ist hier die Spalte 'Ratio H/L', mit der sich die Affinität der entsprechenden Proteine zum Schaden im Vergleich zur ungeschädigten DNA quantifizieren lässt (siehe auch Kapitel 1.3.3). Die *cis-Pt*-modifizierten Stränge wurden dankenswerter Weise von *T. Reißner* aus der Arbeitsgruppe *Carell* zur Verfügung gestellt.

Tabelle 6. Wichtige Proteine, die nach Durchführung eines SILAC-basierenden *DNA protein interactions screens* für die entsprechenden DNA-Schäden CPD, 8-Oxo-dG, 1,2-*cis-Pt* und 1,3-*cis-Pt* erhalten wurden.

Protein	Abkürzung	Peptide (gefunden)	MW	Ratio H/L
8-Oxo-dG				
Polynucleotide kinase-3'-phosphatase	PNKP	15	57	11.3
DNA polymerase beta	Polβ	12	38	6.2
DNA repair protein XRCC1	XRCC1	15	70	2.8
DNA damage-binding protein 1 (XPE-binding factor)	DDBP-1 XAP-1	13	127	2.0
CPD (T=T-Dimer)				
Protein RRP5 homolog; Programmed cell death protein 11	PDCD11; KIAA0185	339	209	10.1
Aprataxin;Forkhead-associated domain histidine triad-like protein	APTX;AXA1	6	41	3.2
Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15;SUB1 homolog	SUB1;PC4;RPO2TC1;hC G_1781938	15	14	2.9
DNA repair protein XRCC1	XRCC1	11	70	2.4
1,2-<i>cis-Pt</i>				
High mobility group protein B3;High mobility group protein 4	HMGB3, HMGB4	16	23	18.6
ATP-dependent DNA helicase Q1;DNA- dependent ATPase Q1;cDNA FLJ76305	RECQL;RECQL1;hCG_20 09728	7	73	8.1
1,3-<i>cis-Pt</i>				
ATP-dependent DNA helicase Q1;DNA- dependent ATPase Q1	RECQL;RECQL1;hCG_20 09728	10	73	10.3
High mobility group protein B2;High mobility group protein 2;High-mobility group box 2	HMGB2, HMG2	4	24	1.7

Besonders hervorzuheben ist hier der deutliche Schaden-spezifische Nachweis des XRCC1-Proteins bei Verwendung des 8-Oxo-dG - und des T=T-Dimer-Schadens.

Dieser Reparaturfaktor ist Bestandteil des BER-Systems, seine genaue Funktion ist Gegenstand intensiver Studien.^[224-226] Es wechselwirkt bekanntermaßen mit dem hOGG1-Protein, der DNA Ligase III, der Polymerase β und den Proteinen PARP-1 und PARP-2.^[227-228] Interessant ist auch die Tatsache, dass bei *cis-Pt*-Schäden die HMG-Proteine mit einer deutlichen Spezifität zum Schaden markiert wurden. Nach der Markierung dieser Proteine in entsprechenden *Photoaffinity-Labeling*-Studien mit *cis-Pt*-geschädigter DNA (Kapitel 1.3.6^[144]) gelang nun somit die zugehörige Quantifizierung bezüglich deren Affinität zu ungeschädigter DNA (Kapitel 1.3.3.).

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden proteomische Methoden verwendet, um DNA-bindende und -reparierende Enzyme selektiv zu markieren und zu identifizieren. Nach der Synthese vieler DNA-Sonden mit photoreaktiven Gruppen für entsprechende *photocrosslinking*-Experimente wurden die Methoden für diese Studien zunächst optimiert, ehe dann – zunächst für den 8-oxo-dG-Schaden – viele interessante Experimente durchgeführt und Schaden-bindende Enzyme identifiziert wurden. Anschließend wurden auch für weitere DNA-Schäden entsprechende Studien durchgeführt. Außerdem wurden diese Versuche durch SILAC-basierende *DNA protein interaction screens* ergänzt, bei denen ebenfalls sehr interessante Proteine gefunden und quantifiziert wurden. Mit diesem neu erworbenen Kenntnisstand lassen sich in Zukunft viele weitere Experimente und Projekte planen.

Die Visualisierung der „gefischten“ Proteine auf SDS-Gelen mit Hilfe eines Farbstoff-*Labels* an der DNA-Sonde zeigte sich als hilfreiches Konzept, wobei die Problematik eines von vornherein an die DNA angebrachten Farbstoffs im Rahmen dieser Arbeit bereits diskutiert wurde. Als denkbare Lösung, dies zu umgehen, wurde das „Clicken“ des Farbstoffs an den kovalenten DNA-Protein-Komplex unmittelbar nach der Belichtung mit Erfolg getestet, wobei hier noch ausführliche Experimente zur Verbesserung unternommen werden müssen (siehe auch Kapitel 6.4.7). Visualisierung mittels ³²P-gelabelter DNA wäre hier ebenfalls eine denkbare Lösung, die jedoch andere experimentelle Gegebenheiten und Sicherheitsvorschriften erfordert. Eventuell ließen sich diese auch in Kooperation mit einer anderen Arbeitsgruppe mit Autoradiographie-Erfahrung durchführen. Soll auf die an sich wichtige und aussagekräftige Visualisierung auf SDS-Gelen ganz verzichtet werden, so müssen die Gel-freien *Photoaffinity Labeling* – Experimente, mit denen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls schon mit Erfolg begonnen wurde, weiter optimiert werden. Werden bestimmte Proteine „gesucht“ oder als Ergebnisse der Experimente vermutet, so sind, neben der Massenspektrometrie, Western-Blots auch immer eine Möglichkeit, diese auf Gelen exakt nachzuweisen (Kapitel 6.4.6).

Auch mit den in dieser Arbeit beschriebenen DNA-Sonden können noch viele weitere Experimente durchgeführt werden. So sind zunächst noch ausführlichere Studien mit

den *bulky adduct*-Schäden denkbar. Besonders in diesem Zusammenhang sollte der „Click“-Ansatz weiter verfolgt werden, um das sperrige Farbstoff-Label – sofern es überhaupt noch gebraucht wird – nicht als zusätzliches *bulky adduct* von vornherein schon an der DNA zu haben (Abbildung 39 oben). Gleichermäßen interessant wären derartige Untersuchungen von DNA-Strangbrüchen, die beispielsweise durch das Nukleosid **14** (Kapitel 3.1, Abbildung 25) photochemisch induziert werden können. Diese Strangbruch-Induzierung in Verbindung mit *photocrosslinking*-Experimenten lässt ebenfalls sehr interessante Ergebnisse bezüglich der markierten Proteine erwarten (Abbildung 39 unten).

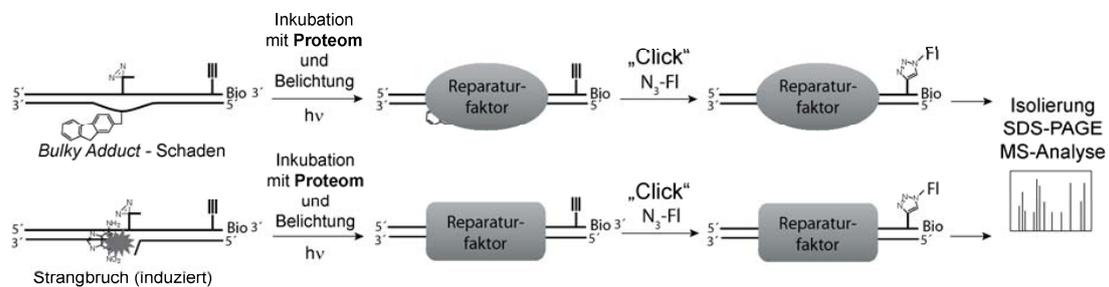


Abbildung 39. Schematische Darstellung der *Photocrosslinking*-Experimenten mit *bulky adduct* - geschädigter DNA (oben) bzw. Strangbruch-geschädigter DNA (unten), wobei anschließend ein Farbstoff-Label an die DNA „geclickt“ wird. Es folgt die Isolierung der DNA-Protein-*crosslinks* über das Biotin, die SDS-Gelelektrophorese und die MS-Analytik.

Ein weiterer interessanter Aspekt wird es sein, direkte Vergleiche zwischen *photoaffinity labeling*-Experimenten und den beschriebenen *DNA protein interaction screens* zu ziehen bzw. beide Methoden auch miteinander zu kombinieren. Außerdem ist daran zu denken, die Experimente mit der chemischen Isotopenmarkierung zu modifizieren (Kapitel 1.3.3), und/oder sich gegebenenfalls eine Variante des ICAT-Reagenzes selbst zu synthetisieren. Dadurch wäre man von dem SILAC-Verfahren und dem damit verbundenen aufwendigen Aufziehen der Isotopen-markierten Zellkulturen unabhängig.

In diesem Zusammenhang sollten auch mal deutlich längere DNA-Sonden für die *photocrosslinking*-Experimente verwendet werden (>100 Basenpaare), die sich durch Ligation herstellen lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem mit einer bisher noch nicht erwähnten Studie zum sogenannten *in vivo photoaffinity labeling* begonnen, die auf jeden Fall weiter verfolgt werden sollte (Abbildung 40). Hierzu wurde die kurze doppelsträngige DNA-Sonde **DS6** mit Hilfe einer CaCl_2 /Hitzeschock-Behandlung in *E. coli*-Zellen eingebracht, die kurz inkubiert und daraufhin belichtet und lysiert wurden. Durch anschließende Behandlung mit den *Streptavidin Magnetic Beads* sowie SDS-PAGE und Proteinanalytik wurden Peptide des Proteins 'COG0583 Transkriptional regulator' identifiziert, eines Transskriptionsfaktors,^[229] der offensichtlich in den lebenden *E. coli*-Zellen markiert wurde (Kapitel 6.4.8). Auch wenn dies noch kein spektakulär neuartiges Ergebnis war, so zeigt es dennoch, dass die Methode funktioniert und auf jeden Fall weiterentwickelt werden sollte. Gegebenenfalls sollten hierzu auch andere DNA-Sonden, beispielweise „gecappte“ Doppelstränge (Nuklease-resistent) oder auch die in Kapitel 3.3 angesprochenen *Dumbbell*-Strukturen verwendet werden. Derartige Studien könnten zu weitreichenden Erkenntnissen zur DNA-Reparatur führen. Die Verwendung lebender Zellen kann auf Grund der Komplexität mancher DNA-Reparaturprozesse gegenüber der Verwendung von „lediglich“ Proteom-Gemischen von Vorteil sein (Abbildung 40).

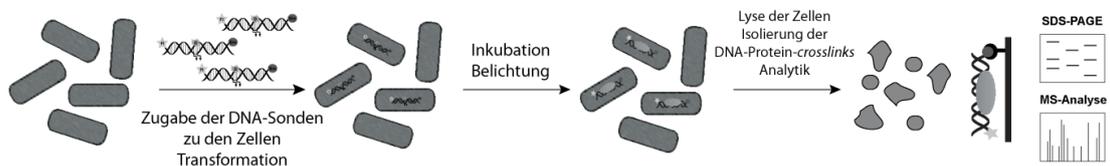


Abbildung 40. Schematische Darstellung einer Möglichkeit des *in vivo photoaffinity labelings*.

Die dargestellten Experimente bieten große Möglichkeiten, weitere detaillierte Untersuchungen zur DNA-Reparatur durchzuführen. Durch zusätzliche methodische und apparative Verbesserungen können dann die Interaktionen DNA-bindender und -reparierender Proteine mit Schäden-enthaltender DNA noch systematischer untersucht werden. Somit ist man nun dabei, die spannende Disziplin der *Chemical Proteomics* auf die medizinisch hoch aktuellen und anwendungsorientierten Fragestellungen zur DNA-Reparatur anzuwenden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Material und Methoden

Alle Reaktionen mit luft- bzw. wasserempfindlichen Substanzen wurden unter Stickstoffatmosphäre in mehrfach ausgeheizten Glasapparaturen durchgeführt.

CD-Spektroskopie (Zirkulardichroismus-Spektroskopie) an DNA-Duplexen wurde mit einem *J 810* Spektropolarimeter der Firma *Jasco* durchgeführt, welches mit einem *CDF 426 S Temperature Controller* ausgestattet war. Es wurden spannungsfreie Küvetten der Fa. *Hellma* mit einem Innendurchmesser von 1 cm und einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die gemessenen Oligonukleotidlösungen besaßen eine Konzentration von 3 μM (Gesamtvolumen 2 mL) in einer wässrigen Pufferlösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4).

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf Aluminium-Fertigplatten der Firma *Merck* (Kieselgel-60, F₂₅₄-Dünnschicht, 5 cm × 10 cm) bzw. Polyesterfertigplatten (Polygram[®] SIL G/UV₂₅₄, 4 cm × 8 cm) der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurden die Platten unter UV-Licht betrachtet ($\lambda = 254$ nm bzw. 366 nm) bzw. mit Anisaldehyd-Tauchreagenz (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL konz. Schwefelsäure, Platte auf 100 °C erwärmen) angefärbt.

Enzymatischer Totalverdau von Oligonukleotiden zur Bestimmung ihrer Zusammensetzung per HPLC-MS/MS wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Der zu verdauenden Oligonukleotidlösung (100 μL , 20 μM) wurden 10 μL eines Puffers (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl₂, 1 mM ZnSO₄, pH 5.7) zugesetzt. Die Lösung wurde mit 22 *units* Nuklease P₁ (*Penicillium citrum*) sowie 0.05 *units* *calf spleen*-Phosphodiesterase versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Es wurden 12 μL eines zweiten Puffers (0.5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) zugesetzt, anschließend wurden 10 *units* *alkaline calf intestinal*-Phosphatase sowie 9 *units* *snake venom*-Phosphodiesterase hinzugegeben und die Lösung weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde zur

Denaturierung der Proteine HCl (6 μ L, 0.1 M) zugegeben. Die Lösung wurde 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführt und für HPLC-MS/MS-Messungen verwendet.

Wahlweise wurde anstelle der Nuklease P1 die Nuklease S1 (80 u) verwendet und die *calf spleen*-Phosphodiesterase weggelassen. Anschließend wurde *Antarktika*-Phosphatase und die bereits oben erwähnte *snake venom*-Phosphodiesterase verwendet. Das Vorgehen entsprach ansonsten dem oben beschriebenen.

Säulenchromatographie wurde nach der *Flash*-Methode durchgeführt. Hierzu wurde Kieselgel-60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Anlegen eines N₂-Überdrucks. Das Lösungsmittelgemisch ist jeweils in Volumenanteilen angegeben.

Kapillargelelektrophorese (CE) wurde mit einem *P/ACE MDQ DNA System* der Firma *Beckman-Coulter* durchgeführt. Es wurden polyimidbeschichtete *fused silica*-Kapillaren (Gesamtlänge 30 cm, Länge zum Detektorfenster 20 cm, Innendurchmesser 100 μ m) verwendet. Als Trennmatrix diente ein 6%iges, unvernetztes Polyacrylamidgel, als Laufpuffer wurde 0.1 M Tris Borat-EDTA/7 M Harnstoff (pH 8.3) verwendet. Die Proben wurden vor der Injektion mit *ZipTip*[®]-C₁₈-Pipettenspitzen der Firma *Millipore* gemäß dem Herstellerprotokoll entsalzt. Die Injektion erfolgte elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von 10 kV für 1-8 s. Für die folgende Trennung wurde eine Spannung von 9-12 kV über 45 min angelegt, die Temperatur betrug je nach Messung zwischen 25 und 50 °C. Die Proben wurden per UV-Detektion ($\lambda = 254$ nm), fluoresceingelabelte Proben per LIF-Detektion (*laser induced fluorescence*, $\lambda_{\text{Anregung}} = 496$ nm, $\lambda_{\text{Emission}} = 520$ nm) sichtbar gemacht.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde auf Apparaturen der Firma *Bio-Rad* durchgeführt. Es wurde entweder eine *Mini Protean 3 cell* (Größe des Gels 8.0 \times 7.3 \times 0.075 cm) oder eine *PROTEAN II xi cell* (Größe des Gels 16 \times 20 \times 0.1 cm) verwendet. Als Spannungsquelle diente ein *E-815* der Firma *Consort* (max. 1200 V, 500 mA). Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach *Laemmli* wurde ein 3.75 %iges Sammelgel (pH 6.8) und ein 10 % bzw. 12.5 %iges Trenngel (pH 8.8) eingesetzt. Alternativ wurden Gradientengele verwendet (linearer Gradient 4 \rightarrow 15 %, erzeugt mit dem Gradientenformer *Model 495*, Fa. *Bio-Rad*). Es wurde ein klassisches SDS-Tris-Glycin-Laufpuffersystem verwendet. Die zu trennenden Proben

wurden jeweils mit einem Volumen 6x-SDS-Auftragspuffer versetzt, 5 min aufgeköcht, auf Eis gesetzt und direkt auf das Gel aufgetragen. Als Proteingrößenstandard wurde jeweils in einer Spur ein *SeeBlue™ Plus2 pre-stained Protein Standard* der Fa. *Invitrogen* aufgetragen.

Mini Protean 3-Gele wurden bei konstanter Spannung von 120 V für ca. 75 min getrennt, *PROTEAN II xi*-Gele wurden bei 300-450 V für ca. 3 h getrennt, wobei die Apparatur mit Eiswasser gekühlt wurde. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurden die Gele anschließend nach Standardprotokoll mit *Coomassie-Blue*, *SilverXpress™ Silver Stain (Invitrogen)* oder *Sypro-Ruby™ (Invitrogen)* gefärbt. Zur Sichtbarmachung fluoresceingelabelter Banden wurden die Gele unter einem *LAS3000-Imager (Fuji)* Geldokumentationssystem ($\lambda_{\text{Anregung}} = 460 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$) betrachtet und mit einer CCD-Kamera fotografiert.

NMR-Spektren (^1H , ^{13}C , ^{31}P) wurden bei Raumtemperatur auf den Geräten *Varian Oxford 200*, *Bruker AMX 300*, *Varian XL 400*, *Bruker AMX 500* und *Bruker ARX 600* aufgenommen; bei den höherfrequenten Spektrometern erfolgte die Messung durch die NMR-Service-Abteilung des Departments Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel sind jeweils in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu TMS (das Lösungsmittel diente als interner Standard) angegeben, die Kopplungskonstanten J in Hz. Die Signalmultiplizitäten wurden mit den Symbolen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quadruplett), m (Multiplett) bzw. deren Kombination gekennzeichnet.

UV-Vis-Spektren wurden auf einem *Varian Cary 100 Bio* mit Temperaturcontroller, Transporteinheit und *MultiCellBlock* aufgenommen. Die Temperaturmessung erfolgte in einer Referenzküvette, der Meßraum wurde während der Messung mit Stickstoff durchspült. Es wurden Quarzküvetten der Fa. *Helma* verwendet, welche 4 mm Innendurchmesser, 10 mm Strahlengang und ein Innenvolumen von 1 mL besaßen. UV-spektroskopische Quantifizierung von DNA-Strängen wurde bei 85 °C durchgeführt, indem man über einen Zeitraum von 20 min mehrmals die Absorption bei 260 nm und 320 nm maß. Anschließend wurde der gemittelte Hintergrund bei 320 nm von der gemittelten Absorption bei 260 nm subtrahiert. Der so erhaltene OD-Wert konnte dann über den für den betreffenden Strang berechneten Extinkti-

onskoeffizienten zur Konzentrationsbestimmung des Oligonukleotids verwendet werden.

Fluoreszenz-Spektren wurden mit einem *FP-750* Spektrofluorometer der Firma *Jasco* mit Peltier-Element aufgenommen. Für die Messung wurden Fluoreszenzküvetten (*Helma*) mit 2 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlengang (Probenvolumen bis 500 μL) verwendet.

Massenspektren wurden durch den MS-Service des Departments Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. ESI-Massenspektren (auch hochaufgelöste Massenspektren) wurden auf einem *Finnigan LTQ-FT FT-ICR*-Spektrometer mit ESI-Quelle aufgenommen. LC-MS/MS-Messungen von Nukleosid-Verdauen wurden ebenfalls auf diesem Gerät gemessen; MS/MS-Fragmentierung erfolgte in der eingebauten Ionenfalle unter Verwendung einer Kollisionsspannung von 30 kV. MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem *Bruker Autoflex II* unter Verwendung einer Beschleunigungsspannung von 19 kV im Reflektormodus aufgenommen. Als Matrix wurden 6-Aza-2-thiothymin (bei Kleinmolekülen, ges. in Wasser/Acetonitril 1:1), 3-Hydroxypicolinsäure (für Oligonukleotide, 7 mg in 100 μL Wasser/Acetonitril 1:1, Zusatz von Diammoniumhydrogencitrat und [15]-Krone-5) oder ein Gemisch aus 3,5-Dihydroxybenzoesäure und α -Cyanohydroxyzimtsäure (für Trypsinverdau von Proteinen, jeweils 10 mg/mL in 0.1 % Trifluoressigsäure/Acetonitril 30:70) verwendet. Die wichtigsten Signale werden in *m/z*-Einheiten angegeben, wobei die prozentualen Intensitäten bezüglich des Basispeaks und, wenn möglich, eine Zuordnung in Klammern angemerkt sind. Für die Auswertung der MS-*Fingerprints* tryptischer Peptide wurde das Programm *BioTools* von *Bruker* (für MALDI-Daten) oder das Programm *BioWorks* von *ThermoFisher* (für ESI-Daten) verwendet. Als Suchalgorithmen wurden *Mascot*, *Sequest* oder *MS-Fit* verwendet. Zur massenspektrometrischen Proteinanalytik siehe auch gesondert Kapitel 6.5.

IR-Spektren wurden auf einem *Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100*-Spektrometer aufgenommen, welches mit einer ATR-Einheit (Totalreflexionsverfahren) ausgestattet war. Die Lage der Banden ist in cm^{-1} angegeben, die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen *s* (stark), *m* (mittel), *w* (schwach) und *br* (breit) gekennzeichnet.

Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide bei 260 nm wurden durch Addition der Extinktionskoeffizienten der Einzelbasen berechnet. Diese betragen: dA 15.0 L/mmol-cm, dC 7.1 L/mmol-cm, dG 12.0 L/mmol-cm, dT 8.4 L/mmol-cm und Fluorescein 13.7 L/mmol-cm. Die Extinktionskoeffizienten von 8-Br-dG, 8-Br-dA und 5-Br-dU entsprechen in erster Näherung denen der unhalogenierten Nukleoside. Für die Diazirine **15** und **16** wurde der Wert von dT verwendet.

Schmelzpunkte wurden auf einer *Büchi B-540*-Schmelzpunktapparatur gemessen und sind nicht korrigiert.

HPL-Chromatographie wurde auf verschiedenen Anlagen von *Merck-Hitachi* bzw. *Waters* durchgeführt. Die Komponenten waren im Einzelnen: Merck_{analytisch}: L-7100 Pumpe, L-7200 Autosampler, L-7400 UV-Detektor, L-7480 Fluoreszenzdetektor; Merck_{präparativ}: L-7150 Pumpe, L-7200 Autosampler, Rheodyne P/N 77 25i Einspritzventil, L-7420 UV-Vis, L-7350 Säulenofen, ERC-3415 Lösungsmittel Entgaser; Waters_{analytisch}: 2996 Diode Array Detector, 2695 Separation Module; Waters_{präparativ}: 1525 HPLC Pump, 2487 Dual Wavelength UV Detector. Für analytische *reversed phase*-Trennungen wurden CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18- und VP 250/4 Nucleodur 100-3 C18 ec- Säulen der Fa. *Macherey-Nagel* verwendet. Für präparative Trennungen wurden VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18 ec- und VP 250/10 Nucleosil 100-7 C18-Säulen eingesetzt. Als Puffersystem wurden 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser (Puffer A) und 0.1 M Triethylammoniumacetat in Acetonitril (Puffer B) verwendet (in den Methoden jeweils als A oder B bezeichnet). Zur Trennung der Nukleoside nach enzymatischem Totalverdau von Oligonukleotiden wurde eine MS Uptisphere 3HDO der Fa. *Interchrom* verwendet. Als Puffersystem diente 2 mM Triethylammoniumacetat in Wasser (Puffer A) und 2 mM Triethylammoniumacetat in 80 % Acetonitril (Puffer B), die Flussrate betrug hier nur 0.2 mL/min (siehe auch Kapitel 6.3).

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde zur analytischen Trennung eine VA 50/4.6 Nucleogel SAX 1000-8-Säule, für präparative Trennungen eine VA 50/7.7 Nucleogel SAX 1000-8-Säule, beide von der Fa. *Macherey-Nagel*, eingesetzt. Als Puffersystem wurden 0.1 M NaCl/0.01 M NaOH, pH 12 (Puffer A) und 1 M NaCl/0.01 M NaOH, pH 12 (Puffer B) verwendet. Präparative Trennungen wurden bei pH 7.4 durchgeführt, hierfür wurden, anstelle der NaOH enthaltenden Puffer, auf 10 mM Tris-HCl basierende Salzlösungen verwendet. Die Detektion der

Oligonukleotide erfolgte über die UV-Absorption bei 260 nm, bzw. über Fluoreszenz. Fluoresceinhaltige Stränge wurden mit 480 nm angeregt, die Emission wurde bei 526 nm detektiert.

Lösungsmittel und Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in den kommerziellen Qualitätsstufen *puriss.*, *p.a.* oder *purum* eingesetzt und von den Firmen *Fluka*, *Acros*, *Aldrich*, *Lancaster* oder *Sigma* bezogen. Bidestilliertes Wasser (Impedanz 18.2 M Ω) wurde mit einer *Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore* erzeugt. Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen *Fluka*, *Acros*, oder *Aldrich* bezogen, Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor Verwendung bei Bedarf destilliert. Zum Einengen von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde ein *Laborota 4001-efficient* Rotationsverdampfer der Fa. *Heidolph* verwendet, welcher mit einem *Vario PC2001*-Membranpumpenstand der Fa. *Vacuubrand* ausgestattet war. Zur Feintrocknung *in vacuo* wurde eine Ölvaakuumpumpe *RZ-4* der Fa. *Vacuubrand* verwendet (Endvakuum 10⁻²-10⁻³ mbar). Kleinere Mengen an wässrigen oder pufferhaltigen Lösungen wurden mittels einer *SpeedVac Plus SC110A*, *SpeedVac SPD 111V* der Fa. *Savant* bzw. einer *RVC 2-25* mit *CT 62-50*-Kompressorkühlfalle der Fa. *Christ* entfernt. Zur Lyophilisierung wässriger Lösungen wurde eine *Alpha 2-4* Lyophilie der Firma *Christ* verwendet.

Oligonukleotidsynthese wurde auf einem *Expedite Nucleic Acid Synthesis System* der Fa. *PerSeptive Biosystems* oder auf einem *Acta Oligopilot 900 System* der Fa. *Amersham (GE Healthcare)* im Maßstab 1-2 μ mol durchgeführt. Die geschützten Amidite wurden von der Fa. *Glen Research* bezogen, die Nukleosid-beladenen CPG-Träger stammten von der Fa. *PE Biosystems* oder der Fa. *Glen Research*. 6-FAM-beladene bzw. biotinbeladene CPG-Träger wurden von *Glen Research* bezogen. Phosphoramidite und Aktivatoren wurden in Acetonitril der Fa. *Riedel de Haen* (Wassergehalt < 0.1 ppm) gelöst, für die übrigen Reagenzien wurde Acetonitril der Fa. *Roth* (Wassergehalt < 0.3 ppm) als Lösungsmittel verwendet. Alle hergestellten Lösungen wurden vor der Synthese 24 h über Molekularsieb 4 Å getrocknet. Die Synthese natürlicher Oligonukleotide erfolgte nach Standardprotokollen des Geräteherstellers, Stränge ohne Sonderbasen wurden von den Firmen *Metabion* bzw. *IBA* bezogen. Einzelheiten zum Einbau modifizierter Bausteine finden sich in Abschnitt 6.3.

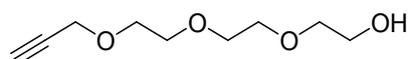
Schmelzpunkte von Oligonukleotiden wurden auf einem *Varian Cary 100 Bio* mit Temperaturcontroller, Transporteinheit und *MultiCellBlock* aufgenommen. Der Temperaturgradient betrug 0.5 °C/min. Es wurden pro Messung je 5 Abkühlkurven (85 °C → 0 °C) und 5 Aufheizkurven (0 °C → 85 °C) bei 260 nm und 320 nm aufgenommen. Die Temperaturmessung erfolgte hierbei in einer Referenzküvette. Der Probenraum wurde während der Messung mit Stickstoff gespült, um ein Anlaufen der Küvetten bei tiefen Temperaturen zu verhindern. Es wurden Küvetten der Fa. *Hellma* mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlengang verwendet. Für die Schmelzkurven wurden 3 µM DNA-Duplexlösungen angesetzt, welche zusätzlich 150 mM NaCl und 10 mM Tris HCl (pH 7.4) enthielten. In den Küvetten wurden die Lösungen mit Dimethylpolysiloxan überschichtet, um ein Verdampfen der Probe zu verhindern. Die Auswertung der Messungen erfolgte unter Verwendung von *Microcal Origin*. Hierzu wurden die erhaltenen Kurven bei 260 nm gemittelt und hiervon die gemittelte Hintergrundmessung bei 320 nm subtrahiert. Die so erzeugte Kurve wurde durch ein Polynom 9. Ordnung approximiert, die Nullstelle der 2. Ableitung der Näherungsfunktion stellt den gesuchten Schmelzpunkt dar.

Proteinkonzentrationen von Zelllysaten wurden photometrisch nach der Methode von *Bradford* bestimmt. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue R250* durch Interaktion mit den basischen Aminosäureseitenketten von Arginin und Lysin von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Es wurden jeweils 200 µL der *Bradford*-Stammlösung (*BioRad*) mit 800 µL bidestilliertem Wasser versetzt. Hierzu wurden 0.5-10 µL der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer anhand von BSA-Standardlösungen bekannter Konzentration ermittelten Kalibriergeraden ließ sich dann die gesuchte Proteinkonzentration ablesen.

6.2 Durchgeführte Synthesen

6.2.1 Synthese des Diazirin-substituierten Phosphoramidits **28**

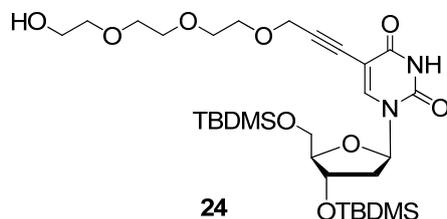
2-Prop-2-ynyloxy-triethylenglykol (O-Propargyl-Triethylenglykol) (**22**)



Zu einer Suspension von NaH (191 mg, 7.96 mmol, 1.20 eq) in THF (15 mL) wurde unter Rühren und Kühlung auf 0 °C innerhalb von 20 Minuten Triethylenglykol (1.00 g, 6.63 mmol, 1.00 eq) zugegeben. Nach 30 Minuten Rühren unter N₂ wurde Propargylbromid (0.789 g, 6.63 mmol, 1.00 eq) zugegeben, einen Tag bei 50 °C gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 30 mL Wasser beendet. Das THF wurde *in vacuo* entfernt und die wässrige Phase viermal mit je 40 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FC (Ø = 3 cm, 20 cm, SiO₂, EE/ MeOH 4:1) gereinigt, und **22** wurde als farbloses Öl erhalten (507 mg, 2,69 mmol, 41 %). Die analytischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.^[176]

R_f = 0.43 (*i*-Hex/EE 10:1); **¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃)**: δ = 4.21 (d, 2H; CC(CH₂)O), 3.59-3.80 (m, 12H; OCH₂CH₂O und CH₂OH), 2.43 (d, 1H; CH), 2.25 (s, 1H; OH) ppm; **HR-MS (ESI)**: ber. für [C₉H₁₈O₄+H]⁺: 189.1127; gef.: 189.1136.

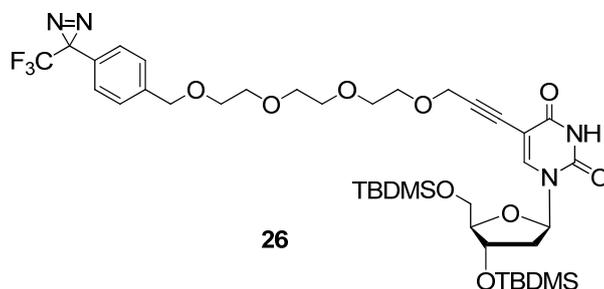
3',5'-O-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-5-(3-{2-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-prop-1-ynyl)-2'-desoxyuridin (24)



In DMF (8 mL) wurde 3',5'-O-Di-*tert*-butyldimethylsilyl-5-iodo-2'-desoxyuridin (**23**, 740 mg, 1.27 mmol, 1.00 eq) gelöst, und die Lösung wurde dreimal entgast. Anschließend wurden $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ (178 mg, 254 μmol , 0.200 eq), Hünigbase (1.50 mL), das Alkin **22** (478 mg, 2.54 mmol, 2.00 eq) und CuI (97,0 mg, 508 μmol , 0.400 eq) zugegeben. Es wurde 10 h unter N_2 bei RT gerührt, dann wurde die Reaktionslösung mit Ether (100 mL) verdünnt und mit je 50 mL Wasser, ges. wässriger NaHCO_3 -Lösung und ges. wässriger NaCl-Lösung extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FC ($\varnothing = 3$ cm, 40 cm, SiO_2 , EE/ MeOH 9:1) gereinigt und **24** als farbloser Feststoff erhalten (529 mg, 815 μmol , 64%). Die analytischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.^[176]

$R_f = 0.70$ (*i*-Hex/MeOH 9:1); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.37$ (s, 1H; NH), 8.01 (s, 1H; H-6), 6.29 (t, $^3J(\text{H-1}', \text{H-2}') = 6.5$ Hz, 1H; H-1'), 4.41-4.37 (m, 1H; H-3'), 4.18 (s, 2H; $\text{CC}(\text{CH}_2)\text{O}$), 3.98-3.97 (m, 1H; H-4'), 3.94 (dd, $^2J(\text{H-5}'\text{a}, \text{H-5}'\text{b}) = 11.4$ Hz, $^3J(\text{H-5}'\text{a}, \text{H-4}') = 2.2$ Hz, 1H; H-5'a), 3.75 (dd, $^2J(\text{H-5}'\text{b}, \text{H-5}'\text{a}) = 11.5$ Hz, $^3J(\text{H-5}'\text{b}, \text{H-4}') = 2.1$ Hz, 1H; H-5'b), 3.73-3.58 (m, 2H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.31 (ddd, $^2J(\text{H-2}'\text{a}, \text{H-2}'\text{b}) = 8.1$ Hz, $^3J(\text{H-2}'\text{a}, \text{H-1}') = 5.5$ Hz, $^3J(\text{H-2}'\text{a}, \text{H-3}') = 2.1$ Hz, 1H; H-2'a), 2.30 (s, 1H; OH), 2.13-1.94 (m, 1H; H-2'b), 0.92 (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.89 (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.14 (s, 6H; $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.08 (s, 6H; $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); **HR-MS (ESI)**: ber. für $[\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_9\text{Si}_2+\text{H}]^+$: 643.3441; gef.: 643.3439.

4',5'-O-Di-*tert*-butyldimethylsilyl -5-{3-[2-(2-{2-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy]-prop-1-ynyl}-2'-desoxyuridin (26)

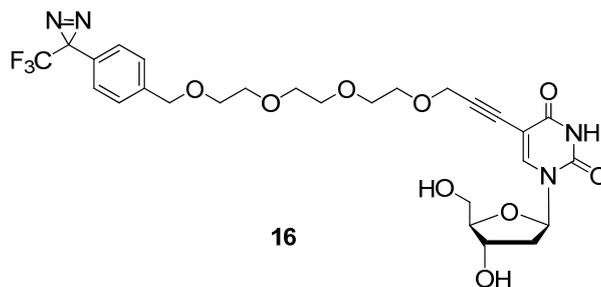


Das modifizierte Nukleosid **24** (529 mg, 823 μmol , 1.00 eq) wurde in THF gelöst (7 mL) und NaH (148 mg, 3.70 mmol, 4.00 eq) wurde zugegeben. Nach 20 Minuten Rühren, unter N_2 , wurde das Diazirin **25** (349 mg, 1.07 mmol, 1.30 eq) zugegeben, weitere 3 h bei RT gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von ges. wässriger NaHCO_3 -Lösung (2 mL) beendet. Es wurde mit Ether (30 mL) verdünnt und mit je 30 mL Wasser und ges. wässriger NaCl-Lösung extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels FC ($\emptyset = 3 \text{ cm}$, 30 cm, SiO_2 , EE/Hex 1:1) gereinigt. Man erhielt **26** in Form eines farblosen Öls (477 mg, 554 μmol , 67 %).

$R_f = 0.21$ (*i*-Hex/EE 1:1); $\delta = 8.51$ (s, 1H; NH), 8.00 (s, 1H; H-6), 7.16 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 8.3 \text{ Hz}$, 2H; H_{arom}), 7.32 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 8.3 \text{ Hz}$, 2H; H_{arom}), 6.28 (dd, $^3J(\text{H-1}', \text{H-2}'\text{a}) = 7.3 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H-1}', \text{H-2}'\text{b}) = 6.0 \text{ Hz}$, 1H; H-1'), 4.57 (s, 2H; $\text{OCH}_2\text{C}_{\text{ar}}$), 4.40-4.39 (m, 1H; H-3'), 4.36 (s, 2H; $\text{CC}(\text{CH}_2)\text{O}$), 3.98-3.97 (m, 1H; H-4'), 3.88 (dd, $^2J(\text{H-5}'\text{b}, \text{H-5}'\text{a}) = 11.5 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H-5}'\text{b}, \text{H-4}') = 2.1 \text{ Hz}$, 1H; H-5'b), 3.76 (dd, $^2J(\text{H-5}'\text{a}, \text{H-5}'\text{b}) = 11.5 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H-5}'\text{a}, \text{H-4}') = 2.1 \text{ Hz}$, 1H; H-5'a), 3.72-3.62 (m, 12H; $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.33-2.16 (m, 1H; H-2'b), 2.03-1.98 (m, 1H; H-2'a), 0.91 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.88 (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.13 (s, 3H; $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.12 (s, 3H; $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.08 (s, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.07 (s, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (MHz, CDCl_3): $\delta = 161.19$ (CO), 149.00 (CO), 143.01 (CH(6)), 140.24 (C_{ar}), 127.85 ($2 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 126.85 ($2 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 99.47 (CH(5)), 89.92 (CC), 88.38 (CH(4')), 85.83 (CH(1')), 72.36 (CH(3')), 69.11-70.60 (m, 7 C; $\text{O}(\text{CH}_2)$), 62.95 ($\text{CH}_2(5')$), 59.03 ($\text{CC}(\text{CH}_2)\text{O}$), 42.00 ($\text{CH}_2(2')$), 25.98 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 25.71 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 18.40 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 17.97 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), -4.67 (SiCH_3), -4.87 (SiCH_3), -5.54 (SiCH_3), -5.41 (SiCH_3); **HR-MS (ESI)**: ber. für $[\text{C}_{39}\text{H}_{59}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_9\text{Si}_2+\text{H}]^+$: 841.3845; gef.: 841.3863; **IR**:

$\tilde{\nu}$ = 2953 (m), 2929 (m), 2884 (m), 2858 (m), 2239 (w), 1698 (s), 1461 (m), 1254 (m), 1183 (s), 1096 (s).

5-{3-[2-(2-{2-[4-(3-Trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-prop-1-ynyl}-2'-desoxyuridin (16**)**



Das modifizierte Nucleosid **26** (396 mg, 471 μ mol, 1.00 eq) wurde in einer TBAF-Lösung in THF (1 M, 20 mL) gelöst und 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in 30 mL Ether aufgenommen und mit jeweils 30 mL ges. wässriger NaHCO₃-Lösung und zweimal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Man erhielt **16** in Form eines farblosen Öls (288 mg, 470 μ mol, 100 %).

R_f = 0.22 (EE); **¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃)**: δ = 8.33 (s, 1H; NH), 7.70 (s, 1H; H-6), 7.36 (d, ²J(H_{arom}, H_{arom}) = 7.3 Hz, 2H; H_{arom}), 7.16 (d, ²J(H_{arom}, H_{arom}) = 7.8 Hz, 2H; H_{arom}), 6.30 (t, ³J(H-1', H-2') = 6.5 Hz, 1H; H-1'), 4.56 (s, 2H; OCH₂C_{ar}), 4.56-4.48 (m, 1H; H-3'), 4.36 (s, 2H; CC(CH₂)O), 3.86-3.82 (m, 1H; H-4'), 3.93-3.63 (m, 1H; H-5'b), 3.67-3.63 (m, 1H; H-5'a), 3.75-3.60 (m, 12H; OCH₂CH₂O), 2.70-2.16 (m, 1H; H-2'b), 1.85-1.83 (m, 1H; H-2'a); **¹³C-NMR (MHz, CDCl₃)**: δ = 161.62 (CO), 149.42 (CO), 140.29 (CH(6)), 140.14 (C_{ar}), 128.11 (2 \times C_{ar}H), 126.76 (2 \times C_{ar}H), 90.20 (CH(5)), 89.35 (CC), 87.50 (CH(4')), 85.96 (CH(1')), 72.59 (CH(3')), 69.27-70.78 (m, 7 C; O(CH₂)), 66.06 (CH₂(5')), 59.41 (CC(CH₂)O), 41.23 (CH₂(2')); **HR-MS (ESI)**: ber. für [C₂₇H₃₁F₃N₄O₉+H]⁺: 613.2121; gef.: 613.2102; **IR**: $\tilde{\nu}$ = 3382 (m), 3060 (w), 2953 (m), 2929 (m), 2859 (m), 2361 (m), 1688 (s), 1462 (m), 1281 (m), 1154 (s).

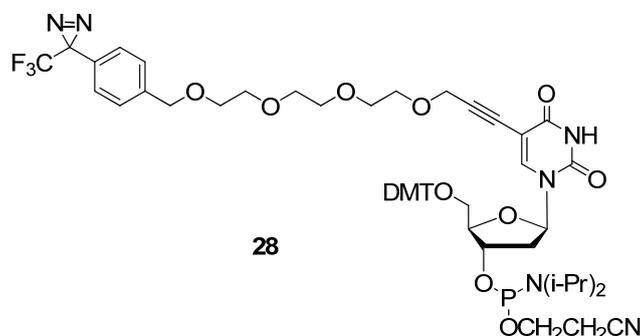
5'-O-Dimethoxytrityl-5-{3-[2-(2-{2-[4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-prop-1-ynyl}-2'-desoxyuridin (27)



Das entschützte Nukleosid **16** (261 mg, 426 μmol , 1.00 eq) wurde unter Zugabe von ausgeheiztem Molsieb in Pyridin (2.50 mL) gelöst. Nach 1 h Rühren unter RT wurde auf 0 °C gekühlt und DMTCl (173 mg, 511 μmol , 1.20 eq) zugegeben, und es wurde weitere 20 Minuten bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 300 μL MeOH wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in 2 mL Ether gelöst und das Molsieb abfiltriert. Nach dem Entfernen des Ethers *in vacuo* wurde das Rohprodukt mittels FC ($\varnothing = 2 \text{ cm}$, 20 cm, SiO_2 , EE/Pyr 98:2) gereinigt. **27** wurde als farbloses Öl erhalten (157 mg, 172 μmol , 40 %).

$R_f = 0.93$ (EE); **$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):** $\delta = 8.38$ (s, 1 H; NH), 8.02 (s, 1H; H-6), 7.67 (tt, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 7.6 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 1.8 \text{ Hz}$ 1H; H_{arom}), 7.40 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 7.5 \text{ Hz}$, 2H; H_{arom}), 7.36 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 8.2 \text{ Hz}$, 2H; H_{arom}), 7.31 (dd, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 8.9 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 3.0 \text{ Hz}$, 2H; H_{arom}), 7.29 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 7.5 \text{ Hz}$, 4H; H_{arom}), 7.16 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 7.5 \text{ Hz}$, 2H; H_{arom}), 6.83 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 8.80 \text{ Hz}$, 4H; H_{arom}), 6.27 (t, $^3J(\text{H-1}', \text{H-2}'\text{a}) = 6.6 \text{ Hz}$, 1H; H-1'), 4.55 (s, 2H; $\text{OCH}_2\text{C}_{\text{ar}}$), 4.10 (s, 2H; $\text{CC}(\text{CH}_2)\text{O}$), 4.14-4.05 (m, 1H; H-3'), 3.93-3.63 (m, 1H; H-5'b), 3.77 (s, 6H, OCH_3), 3.70-3.68 (m, 1H; H-4'), 3.66-3.64 (m, 2H; H-5'a), 3.70-3.58 (m, 12H; $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.16 (s, 1H; H-2'b), 2.03 (s, 1H; H-2'a); **$^{13}\text{C-NMR}$ (MHz, CDCl_3):** $\delta = 160.95$ (CO), 158.86 ($2 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 148.872 (CO), 144.66 ($2 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 142.75 (CH(6)), 140.22 (C_{ar}), 136.00 (C_{ar}), 129.93 ($4 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 129.11 ($2 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 128.03 ($2 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 127.86 ($2 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 126.72 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 123.97 ($2 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 113.32 ($4 \times \text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 99.70 (CH(5)), 90.01 ($\text{COCH}_2(5')$), 87.03 (CC), 86.32 (CH(4')), 85.63 (CH(1')), 72.37 (CH(3')), 72.18-68.95 (m, 7 C; $\text{O}(\text{CH}_2)$), 63.38 ($\text{CH}_2(5')$), 58.77 (CH_3O), 41.43 ($\text{CH}_2(2')$) ppm; **HR-MS (ESI):** ber. für $[\text{C}_{48}\text{H}_{49}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_{11} + \text{H}]^+$: 915.3428; gef.: 915.3397. **IR:** $\tilde{\nu} = 3438$ (m), 3194 (m), 3070 (m), 2870 (s), 2926(s), 1608 (m), 1509 (s), 1461 (s), 1281 (m), 1251 (s).

5'-O-Dimethoxytrityl-4'-O-(2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylphosphoramidit)-5-{3-[2-(2-{2-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-prop-1-ynyl}-2'-desoxyuridin (28**)**



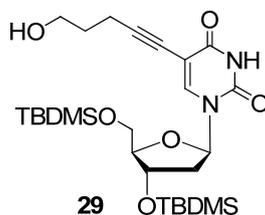
Das modifizierte Nukleosid **27** (123 mg, 314 μmol , 1.00 eq) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (3.5 mL) gelöst, dreimal entgast und mit $\text{P}(\text{NiPr}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ (ca. 70 μL , ca. 1.5 eq) sowie mit Diisopropylammoniumtetrazolat (12.0 mg, 67.2 μmol , 0.500 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4 h unter Lichtausschluss und N_2 gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt mittels FC ($\emptyset = 2 \text{ cm}$, 20 cm, SiO_2 , EE/Pyr 100:1) gereinigt und **28** wurde als farbloses Öl erhalten (82.0 mg, 73.5 μmol , 55 %).

$R_f = 0.71$ (EE); **$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):** $\delta = 8.56$ (s, 1H; NH), 8.07 (s, 1H; H-6), 7.64 (tt, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 7.6 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 1.8 \text{ Hz}$, 1H; $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 7.39 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 7.7 \text{ Hz}$, 2 H; H_{arom}), 7.33 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 8.1 \text{ Hz}$, 2H; H_{arom}), 7.24 (dd, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 7.5 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 1.5 \text{ Hz}$, 2H; H_{arom}), 7.31-7.27 (m, 4H; H_{arom}), 7.12 (d, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 8.2 \text{ Hz}$, 2H; H_{arom}), 6.80 (dd, $^2J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 8.8 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H}_{\text{arom}}, \text{H}_{\text{arom}}) = 3.9 \text{ Hz}$, 4H; H_{arom}), 6.27 (dd, $^2J(\text{H}-1')$, H-2'b) = 13.1 Hz, $^3J(\text{H}-2'b$, H-1') = 7.2 Hz, 1H; H-1'), 4.52 (s, 2H; $\text{OCH}_2\text{C}_{\text{ar}}$), 4.02 (s, 2H; $\text{CC}(\text{CH}_2)\text{O}$), 4.17-4.00 (m, 1H; H-3'), 3.93-3.85 (m, 1H; H-4'), 3.98-3.77 (m, 2H; H-5'b), 3.74 (s, 6H, OCH_3), 3.68-3.50 (m, 3H; H-5'a und POCH_2), 3.63-3.50 (m, 12H; $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.31-3.25 (m, 2H; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 2.58 (t, $^2J(\text{CH}_2, \text{CH}_2) = 6.3 \text{ Hz}$, 2H; CH_2CN), 2.28-2.10 (m, 1H; H-2'b), 2.00-1.97 (m, 1H; H-2'a), 1.50- 0.75 (m, 12H; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); **$^{13}\text{C-NMR}$ (MHz, DCI_3):** $\delta = 161.10$ (CO), 158.59 (2 \times $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 149.76 (CO), 144.44(2 \times $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 142.68 (CH(6)), 140.26 (C_{ar}), 135.89 (C_{ar}), 129.98 (4 \times $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 129.95 (2 \times $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 128.14(2 \times $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 127.83 (2 \times $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 126.45 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 123.67 (2 \times $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 117.28 (CCN), 113.25 (4 \times $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 99.680 (CH(5)), 89.84 ($\text{COCH}_2(5')$), 86.92 (CC), 86.05 (CH(4')), 85.73 (CH(1')), 72.54-68.83 (m, 7 C; $\text{O}(\text{CH}_2)$), 63.01 ($\text{CH}_2(5')$), 58.67 (COP), 55.18 (2 \times

CH₃O), 43.32 (2× CH₃C), 40.60 (CH₂(2')), 24.52 (4×CH₃C), 20.19 (CCN) ppm; **HR-MS (ESI)**: ber. für [C₅₆H₆₄F₃N₆O₁₂P+H]⁺: 1101.4350; gef.: 1115.4540; **IR**: $\tilde{\nu}$ = 2965 (m), 2929 (m), 2870 (m), 2250 (w), 2022 (s), 1698 (s), 1508 (m), 1438 (m), 1249 (s), 977 (s).

6.2.2 Synthese des Benzophenon-substituierten Phosphoramidits **32**.

1-[4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy)-5-(*tert*-butyl-dimethyl-silyloxymethyl) tetrahydro-furan-2-yl]-5-(5-hydroxy-pent-1-ynyl)-1*H*-pyrimidin-2,4-dion (**29**)

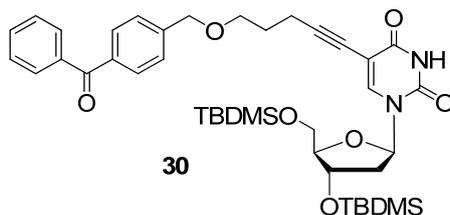


TBDMS-geschütztes 5-Ioddesoxyuridin **23** (1.000 g, 1.72 mmol) wurde in DMF (1 mL) gelöst und dreimal entgast. Anschließend wurden in der angegebenen Reihenfolge PdCl₂(PPh₃)₂ (241 mg, 0.34 mmol, 0.20 eq), Hünig-Base (597 μ L, 3.44 mmol, 2.00 eq), 4-Pentin-1-ol (479 μ L, 5.16 mmol, 3.00 eq) und Kupfer-(I)-iodid (130 mg, 0.69 mmol, 0.40 eq) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht unter Lichtausschluss gerührt. Es wurde mit Diethylether (30 mL) verdünnt, je einmal mit ges. NaHCO₃-Lösung und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung (*brine*) gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das braune Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel- 60, Dichlormethan/Methanol 100:1 \rightarrow 50:1). **29** wurde als farbloser Film isoliert (540 mg, 55%).

R_f = 0.37 (Chloroform/Methanol 10:1); **IR (ATR)**: $\tilde{\nu}$ = 3416 w, 3181 w, 3066 w, 2951 m, 2928 m, 2856 m, 1681 vs, 1627 m, 1575 w, 1461 m, 1404 w, 1360 w, 1322 w, 1278 m, 1251 s, 1190 w, 1099 m, 1065 s, 1028 s, 1005 m, 966 m, 937 w, 919 w, 885 w, 829 vs, 812 s, 775 vs, 670 s; **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ = 9.05 (s, 1H, HN), 7.92 (s, 1H, H-6), 6.28 (dd, 1H, ³J = 5.9 Hz, ³J = 7.4 Hz, H-1'), 4.39 (td, 1H, ³J = 2.6

Hz, $^3J = 5.6$ Hz, H-3'), 3.95 (m, 1H, H-4'), 3.89 (dd, 1H, $^3J = 2.4$ Hz, $^2J = 11.4$ Hz, H-5'a), 3.76 (m, 3H, CH₂OH, H-5'b), 2.49 (t, 2H, $3J = 6.9$ Hz, H₂C-C≡C), 2.29 (ddd, 1H, $^3J = 2.8$ Hz, $^3J = 5.9$ Hz, $^2J = 13.1$ Hz, H-2'a), 2.01 (m, 1H, H-2'b), 1.80 (q, 2H, $3J = 6.0$ Hz, -CH₂-), 0.92 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.88 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.14 (s, 3H, H₃C-TBDMS), 0.12 (s, 3H, H₃CTBDMS), 0.07 (s, 3H, H₃C-TBDMS), 0.06 ppm (s, 3H, H₃C-TBDMS); **¹³C NMR(150 MHz, CDCl₃)**: δ = 162.1, 149.1, 141.5, 100.5, 94.6, 88.3, 85.6, 72.2, 62.9, 61.4, 41.9 (2C), 31.0, 26.0 (3C), 25.7 (3C), 18.4, 18.0, -4.7, -4.9, -5.4, -5.6 ppm; **HRMS (ESI+)**: *m/z* berechnet für C₂₆H₄₈N₂O₆Si₂ [M+H]⁺ : 539.2973; gefunden 539.2968.

5-[5-(4-Benzoyl-benzyloxy)-pent-1-ynyl]-1-[4-(*tert*-butyl- dimethyl-silanyloxy)-5-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-tetrahydro-furan-2-yl]-1*H*-pyrimidin-2,4-dione (30)

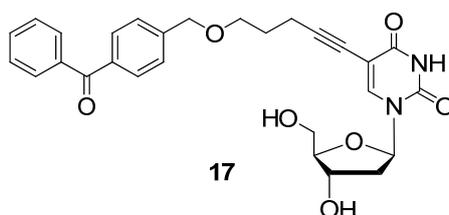


800 mg (1.50 mmol) **29** wurden in 10 mL THF vorgelegt und vorsichtig mit 300 mg (7.5 mmol) NaH (60%ig in Mineralöl) versetzt. Die Apparatur wurde konstant mit N₂ geflutet, so dass der entstehende Wasserstoff entweichen konnte. Nach Abklingen der Reaktion wurden 460 mg (1.65 mmol) 4-Brommethyl-Benzophenon zugegeben, und es wurde 16 h bei RT gerührt. Nach Ende der Reaktion wurde das restliche NaH mit 3 mL NH₄Cl gequencht und das Produkt in 30 mL Diethylether aufgenommen. Es wurde mit jeweils 30 mL dest. Wasser und NaCl gewaschen und über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie über Kieselgel in *i*Hex/EtOAc 1:1 gereinigt. Man erhielt **30** als gelbes Öl (380 mg, 0.52 mmol, 35 %).

R_f = 0.7 (*i*-Hex/EtOAc, 1:1); **IR (ATR)** : $\tilde{\nu}$ = 2916 s, 2848 s, 1720 m, 1463 m, 1371 w, 1279 w, 1243 m, 1104 w, 1022 w, 907 w, 836 w, 782 vw, 730 m, 648 vw cm⁻¹;

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.19 (s, 1H, NH), 7.91 (s, 1H, H-6), 7.80-7.77 (m, 4H, H_{arom}), 7.58 (t, 1H, ³J = 6.6 Hz, H_{arom}), 7.48 (t, 2H, ³J = 8.4 Hz, H_{arom}C), 7.44 (d, 2H, ³J = 7.8 Hz, H_{arom}C), 6.28 (dd, 1H, ³J = 6.0 Hz, ³J = 7.8 Hz, H-1'), 4.60 (s, 2H, H₂C-Bn), 4.40 (m, 1H, H-3'), 3.96 (d, 1H, ³J = 2.4 Hz, H-4'), 3.88 (dd, 1H, ³J = 2.4 Hz, ²J = 11.4 Hz, H-5'a), 3.75 (dd, 1H, ³J = 2.4 Hz, ²J = 11.4 Hz, H-5'b), 3.64 (t, 2H, ³J = 6.6 Hz, H₂C-O-Bn), 2.53 (t, 2H, ³J = 6.6 Hz, H₂C-C≡C), 2.29 (ddd, 1H, ³J = 3.0 Hz, ³J = 6.0 Hz, ²J = 13.2 Hz, H-2'b), 2.03-2.00 (m, 1H, H-2'a), 1.90 (dt, 2H, ³J = 7.2 Hz, ³J = 13.2 Hz, -CH₂-), 0.92 (s, 9H, tBu-TBDMS), 0.89 (s, 9H, tBu-TBDMS), 0.14 (s, 3H, H₃C-TBDMS), 0.13 (s, 3H, H₃C-TBDMS), 0.08 (s, 3H, H₃C-TBDMS), 0.07 (s, 3H, H₃C-TBDMS) ppm; **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ = 196.4, 161.4, 149.0, 143.4, 141.7, 137.7, 136.7, 132.4, 130.3 (2C), 130.0 (2C), 128.2 (2C), 127.0 (2C), 100.6, 94.3, 88.3, 85.6, 72.4, 72.3, 71.8, 69.2, 63.0, 41.9, 28.6, 26.0 (3C), 25.7 (3C), 18.4, 18.0, 16.5, -4.6, -4.8, -5.4, -5.5 ppm; **HRMS (ESI⁺):** *m/z* berechnet für C₄₀H₅₇N₂O₇Si₂ [M + H]⁺ : 733.3699; gefunden 733.3716.

5-[5-(4-Benzoyl-benzyloxy)-pent-1-ynyl]-1-(4-hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidine-2,4-dion (17)

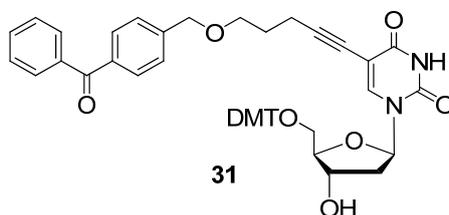


380 mg (0.52 mmol) von Nucleosid **30** wurden in 20 mL 1M TBAF-Lösung (in THF) gelöst und 3 h bei RT gerührt. THF wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 50 mL Diethylether aufgenommen und mit jeweils 30 mL NH₄Cl und dest. Wasser gewaschen. Anschließend wurde über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Vakuum getrocknet. Man erhielt **17** als gelben Feststoff (229 mg, 0.46 mmol, 90 %).

R_f = 0.2 (CH₂Cl₂); **IR (ATR)** : $\tilde{\nu}$ = 3422 br, 3058 w, 2926 w, 2860 w, 2249 vw, 1682 vs, 1654 vs, 1447 m, 1411 w, 1360 w, 1316 m, 1276 vs, 1176 w, 1098 m, 1000 w,

910 m, 839 w, 787 w, 728 s, 700 m, 646 w cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 8.99 (s, 1H, NH), 7.85 (s, 1H, H-6), 7.79-7.76 (m, 5H, H_{arom}), 7.60-7.57 (m, 2H, H_{arom}), 7.49-7.44 (m, 2H, H_{arom}), 6.15 (t, 1H, 3J = 6.0 Hz, H-1'), 4.60 (s, 2H, $H_2\text{C-Bn}$), 4.52-4.50 (m, 1H, H-3'), 4.00-3.99 (m, 1H, H-4'), 3.88 (dd, 1H, 3J = 3.0 Hz, 2J = 12.0 Hz, H-5'a), 3.79 (dd, 1H, 3J = 2.4 Hz, 2J = 11.4 Hz, H-5'b), 3.63 (t, 2H, 3J = 6.0 Hz, $H_2\text{C-O-Bn}$), 2.53 (t, 2H, 3J = 7.2 Hz, $H_2\text{C-C}\equiv\text{C}$), 2.40-2.30 (m, 2H, H-2'a und H-2'b), 1.89 (qi, 2H, 3J = 6.6 Hz, $H_2\text{C}$) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ = 196.9, 161.9, 149.3, 143.5, 137.4, 136.7, 132.6, 130.2 (2C), 130.1 (2C), 128.3 (2C), 127.1 (2C), 100.6, 94.3, 87.1, 86.7, 72.3, 71.0, 69.0, 62.0, 53.4, 40.5, 28.5, 25.6, 16.4 ppm; **HRMS (ESI)**: m/z berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_7$ [M + Cl] $^-$: 505.1969; gefunden: 505.1973. **Smp.**: 80 °C.

5-[5-(4-Benzoyl-benzyloxy)-pent-1-ynyl]-1-{5-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxymethyl]-4-hydroxy-tetrahydro-furan-2-yl}-1H-pyrimidine-2,4-dione (31)

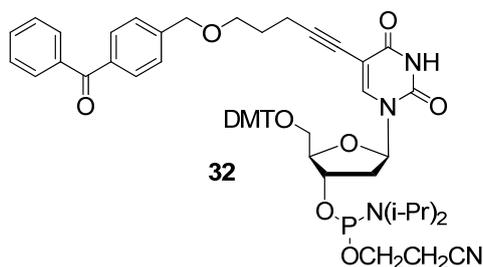


Nukleosid **16** (112 mg, 0.22 mmol) wurde in einem ausgeheizten Schlenkrohr mit Molsieb vorgelegt. Nach Zugabe von 10 mL Pyridin wurde 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 95 mg (0.28 mmol) DMTCl zugegeben und es wurde weitere 4 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von MeOH (900 μL) zum Quenchen wurde das Lösungsmittel an der HV-Pumpe entfernt, der Rückstand in 30 mL CH_2Cl_2 aufgenommen und vom Molsieb abfiltriert. Zur Reinigung des Produktes wurde eine Säulenchromatographie über Kieselgel in EtOAc/Pyridin 1: 0.01 durchgeführt. Man erhielt **31** als gelbes Öl (95 mg, 0.12 mmol, 55 %).

R_f: 0.6 (EtOAc/Pyridin, 1: 0.01); **IR (ATR)** : $\tilde{\nu}$ = 3439 w, 3189 w, 3064 w, 2930 m, 2836 w, 2245 w, 1682 vs, 1606 s, 1507 s, 1445 m, 1412 w, 1355 w, 1276 s, 1247 s, 1174 vs, 1096 s, 1031 s, 934 m, 909 m, 826 m, 790 m, 754 w, 726 s, 700 s, 646 w

cm⁻¹; **¹H NMR (600 MHz, CDCl₃)**: δ = 8.61 (s, 1 H, HN), 7.98 (s, 1H, H-6), 7.79-7.75 (m, 4H, H_{Arom}), 7.68 (tt, 2H, ³J = 1.8 Hz, ³J = 7.2 Hz, H_{Arom}C), 7.58 (t, 1H, ³J = 7.2 Hz, H_{Arom}), 7.47 (t, 2H, ³J = 8.4 Hz, H_{Arom}), 7.42 (d, 2H, ³J = 7.2 Hz, H_{Arom}), 7.38 (d, 2H, ³J = 8.4 Hz, H_{Arom}), 7.34-7.31 (m, 4 H, H_{arom}-DMT), 7.30-7.28 (m, 4 H, H_{arom}-DMT), 7.21-7.16 (m, 1H, H_{arom}-DMT), 6.82 (d, 4H, ³J = 9.0 Hz, H_{arom}-DMT), 6.30 (dd, 1H, ³J = 6.0 Hz, ³J = 7.2 Hz, H-1'), 4.51-4.49 (m, 1 H, H-3'), 4.46 (s, 2 H, H₂C-Bn), 4.07-4.05 (m, 1 H, H-4'), 3.76 (s, 3 H, H₃CO-DMT), 3.76 (s, 3 H, H₃CO-DMT), 3.43-3.41 (m, 3H, H-5'a, H₂C-O-Bn), 3.32 (dd, 1H, ³J = 3.6 Hz, ²J = 10.8 Hz, H-5'b), 2.46 (ddd, 1H, ³J = 3.0 Hz, ³J = 5.4 Hz, ²J = 13.2 Hz, H-2'a), 2.28-2.25 (m, 3 H, H-2'b), C≡C-H₂C-CH₂-), 1.58 (qi, 2 H, ³J = 6.6 Hz, C≡C-CH₂-H₂C-CH₂-O-) ppm; **¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃)**: δ = 196.5, 161.5, 158.6, 149.7, 149.0, 144.5, 143.5, 141.5, 137.7, 136.6, 136.0, 135.6, 135.5, 132.4 (2C), 130.2 (2C), 130.0, 129.9 (2C), 129.1, 128.2, 128.0 (2C), 127.9, 127.0 (2C), 123.7, 113.3 (2C), 100.9, 94.5, 87.0, 86.3, 85.5, 72.2, 72.1, 71.1, 69.2, 63.4, 60.4, 55.2 (2C), 41.4, 28.4, 21.0, 16.4, 14.2 ppm; **HRMS (ESI⁺)**: *m/z* berechnet für C₄₉H₅₀N₃O₉ [M + NH₄]⁺: 824.3542; gefunden: 824.3561.

5-[5-(4-Benzoyl-benzyloxy)-pent-1-ynyl]-1-{5-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxymethyl]-4-hydroxy-tetrahydro-furan-2-yl}-1*H*-pyrimidine-2,4-dion - Phosphoramidit



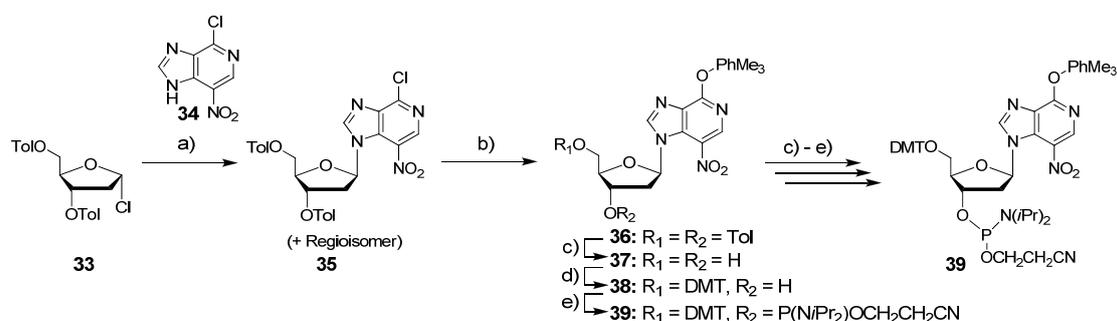
80 mg (0.10 mmol) von **31** wurden in 4 mL CH₂Cl₂ gelöst und dreimal entgast. Es folgte die Zugabe von 11 mg (0.05 mmol) Diisopropylammoniumtetrazolat und 60 µL (0.15 mmol) β-Cyanoethyltetraisopropylphosphordiamidit. Nach zweistündigem Rühren wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie über Kieselgel in CH₂Cl₂/MeOH/Pyridin

15:1:0.15 aufgereinigt. Nach Trocknung im Vakuum erhielt man **32** als gelbes Öl (150 mg, 0.15 mmol, 94 %).

R_f-Wert : 0.6 (CH₂Cl₂/ MeOH, 10: 1); **IR (ATR)**: $\tilde{\nu}$ = 2968 s, 2932 m, 2252 w, 1697 m, 16508 w, 1608 w, 1508 m, 1461 m, 1409 w, 1364 w, 1277 m, 1244 s, 1201 m, 1181 s, 1158 m, 1125 m, 1081 m, 1029 s, 975 vs, 912 s, 827 w, 727 vs, 704 s, 645 m cm⁻¹;
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.59 (s, 1 H, *H_N*), 8.02 (s, 0.5 H, *H-6*), 7.98 (s, 0.5 H, *H-6*), 7.75 (d, 2H, ³*J* = 8.4 Hz, *H_{arom}*), 7.72 (d, 2H, ³*J* = 7.8 Hz, *H_{arom}*), 7.67-7.63 (m, 3H, *H_{arom}*), 7.56-7.54 (m, 1H, *H_{arom}*), 7.46-7.41 (*m*, 4 H, *H_{arom}-DMT*), 7.36-7.30 (*m*, 4 H, *H_{arom}-DMT*), 7.18-7.15 (*m*, 1H, *H_{arom}-DMT*), 6.81-6.79 (*m*, 4H, *H_{arom}-DMT*), 6.39 (s, 1H, *H_{arom}*), 6.30-6.25 (*m*, 1 H, *H-1'*), 4.56-4.52 (*m*, 1 H, *H-3'*), 4.43 (s, 1 H, *H₂C-Bn*), 4.41 (s, 1 H, *H₂C-Bn*), 4.20-4.14 (*m*, 1 H, *H-4'*), 3.73 (s, 6 H, 2× *H₃CO-DMT*), 3.66-3.49 (*m*, 4 H, *H₂C-O-P*, 2× *HC-N-P*), 3.43 (*dd*, 1H, ³*J* = 2.5 Hz, ²*J* = 10.7 Hz, *H-5'a*), 3.34 (*m*, 2H, ³*J* = 6.1 Hz, *H₂C-O-Bn*), 3.29 (*dd*, 1H, ³*J* = 3.5 Hz, ²*J* = 10.7 Hz, *H-5'b*), 2.75-2.55 (*m*, 2 H, *H₂C-CN*, *H-2'a*), 2.41-2.38 (*t*, 1 H, ³*J* = 6.0 Hz, *H₂C-CN*), 2.20 (*m*, 2 H, C≡C-*H₂C-CH₂-*), 1.52-1.47 (*m*, 2 H, C≡C-*CH₂-H₂C-CH₂-O-*), 1.28-1.06 (*m*, 12 H, 4× *H₃C-CH-N-P*) ppm; **¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃)**: δ = 161.8, 158.8, 149.3, 144.3, 141.8, 140.7, 135.8, 130.2 (2C), 129.9 (2C), 128.2 (2C), 127.9 (2C), 127.1 (2C), 126.7 (4C), 124.0, 123.7 (2C), 121.9 (*q*, ¹*J_{C-F}* = 273.3 Hz), 113.5 (4C), 101.2, 94.7, 87.2, 86.3, 85.8, 72.1, 71.3, 69.3, 68.4, 63.3, 58.5, 55.4 (2C), 49.4 (2C), 45.6, 43.5 (2C), 40.8, 39.0, 30.6, 28.9 (*q*, ²*J_{C-F}* = 30.1 Hz), 28.5, 24.8, 23.2, 20.4, 16.5, 14.3, 11.2 ppm; **³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃)**: δ = 149.9, 149.5, 130.0; **HRMS (ESI)**: *m/z* berechnet für C₅₈H₆₄N₄O₁₀³¹P₁ [M - H]⁻ : 1007.4355; gefunden: 1007.4370.

6.2.3 Synthese des Nitroindol-Nukleosid-Phosphoramidits **39**

Die Synthese des photospaltbaren Nitroindol-Nukleosid-Phosphoramidits **39** (Phosphoramidit von Nukleosid **14**, Abbildung 25) wurde gemäß einer Vorschrift von *Kotera* durchgeführt (Schema 3).^[168] Hierzu wurde zunächst **34** gemäß dieser Literatur hergestellt und anschließend an Chlorozucker **33** gekoppelt, wodurch Nukleosid **35** entstand. Es folgte die Umsetzung von **35** mit 2,4,6-Me₃PhOK und die Trennung der beiden entstehenden Regioisomere von **36**. Die Toluoyl-Schutzgruppen wurden abgespalten (**37**), die Umsetzung von **37** mit DMTCl ergab das DMT-geschützte Nukleosid **38**, und anschließende Umsetzung mit P(NiPr₂)₂OCH₂CH₂CN ergab Phosphoramidit **39**.



Schema 3. Synthese des Nitroindol-Phosphoramidits **39**. a) **34**, NaH, MeCN, CH₂Cl₂; b) Trimethylphenol, KOtBu, THF; c) KOH, THF; d) DMTCl, Pyridin; e) P(NiPr₂)₂OCH₂CH₂CN, Diisopropylamin.

4-Chloro-1-[2'-deoxy-3',5'-di-O-(4-toluoyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl-7-nitro-1H-imidazo-[4,5-c]pyridin (**35a**) und 4-Chloro-3-[2'-deoxy-3',5'-di-O-(4-toluoyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl-7-nitro-3H-imidazo-[4,5-c]pyridin (**35b**)

Die gesamte Synthese erfolgte unter N₂-Schutzatmosphäre. 610 mg (3.07 mmol) der Verbindung **34** wurden in 30 mL trockenem Acetonitril aufgenommen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Der Rückstand wurde anschließend in ca. 10 mL trockenem MeCN aufgenommen, mit 40 mg (0.94 mmol) NaH (60% in Mineralöl) versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 0.36 g (0.94 mmol) des α-Chlorozuckers (**33**) in kleinen Portionen zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt, mit 15 mL CH₂Cl₂ versetzt und über Kieselguhr filtriert. Das Lösemittel wurde im Vakuum

entfernt und der braune Rückstand mittels Säulenchromatographie in EtOAc/Isohexan (1:1) gereinigt. Man erhielt 0,53 g (0,96 mmol, 31%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

R_f (EtOAc/Isohexan, 1:1) = 0.5; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 9.06 (s, 1H, H-2), 8.95 (s, 1H, H-8), 7.96 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H-*o*-Tol), 7.85 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H-*o*-Tol), 7.75 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-*m*-Tol), 7.30 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-*m*-Tol), 6.84 (t, 1H, J = 6.8 Hz, H-1'), 5.67 (m, 1H, H-3'), 4.76 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 4.69 (m, 1H, H-4'), 3.07 und 2.67 (m, 2H, H-2'a, H-2'b), 2.45 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3) ppm ; **MS (ESI)**: m/z ber.: 550.95 für $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O}_7$; gef.: 595.12 [M+Formiat] $^-$.

1-[2'-Deoxy-3',5'-di-O-(4-toluoyl- β -D-erythro-pentofuranosyl-7-nitro-4-(2,4,6-trimethylphenoxy)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin (36a) und 3-[2'-Deoxy-3',5'-di-O-(4-toluoyl- β -D-erythro-pentofuranosyl-7-nitro-4-(2,4,6-trimethylphenoxy)-3H-imidazo[4,5-c]pyridin (36b)

170 mg (1.51 mmol) Kalium-butanolat und 460 mg (3.37 mmol) 2,4,6-Trimethylphenol wurden in 3 mL THF gelöst. Diese Lösung wurde unter Eiskühlung zu einer Lösung von 530 mg (0.96 mmol) des Nucleosids **35** (Isomerengemisch) in 12 mL THF gegeben. Die resultierende orange-gelbe Lösung wurde 1.5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch in EtOAc/ Isohexan (1:9 bis 1:1) aufgetrennt. Isomer **36a** befand sich in einer schnell-eluierenden Fraktion und lag nach Trocknung als leicht gelblicher Feststoff vor (280 mg, 0,44 mmol, 46%).

R_f (EtOAc/ Isohexan, 1:1)= 0.25; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 8.80 (s, 1H, H-2), 8.60 (s, 1H, H-8) 7.86 (m, 4H, H-*o*-Tol), 7.11 (m, 4H, H-*m*-Tol), 6.98 (m, 3H, CH_c , H-1'), 5.68 (m, 1H, H-3'), 4.75 (m, 3H, H-4', H-5'a, H-5'b), 2.94 (m, 2H, H-2'a, H-2'b), 2.40 (s, 3H, *o*- CH_3), 2.39 (s, 3H, *o*- CH_3), 2.33 (s, 3H, *p*- CH_3), 2.08 (s, 6H, CH_3 -Tol) ppm.

1-[2'-Deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl]-7-nitro-4-(2,4,6-trimethylphenoxy)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin (37)

280 mg (0.44 mmol) von **36** wurden in 4 mL THF gelöst und bei 0 °C mit 24 mg (0.42 mmol) KOH in 0.5 mL Methanol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei RT gerührt und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie in CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1) aufgetrennt. Man erhielt das entschützte Nukleosid als farblosen Feststoff (110 mg, 0.26 mmol, 61%).

R_f (CH₂Cl₂/ CH₃OH, 9:1)= 0.35; **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD): δ = 9.07 (s, 1H, H-8), 8.72 (s, 1H, H-2), 6.99 (s, 2H, CH_c), 6.96 (t, 1H, J = 6.4, H-1'), 4.56 (m, 1H, H-3'), 4.09 (m, 1H, H-4'), 3.84 (m, 2H, H-5'a und H-5'b), 2.70 (m, 2H, H-2'a und H-2'b), 2.33 (s, 3H, *p*-CH₃), 2.10 (s, 6H, *o*-CH₃) ppm.

1-[5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-deoxy - β -D-erythro-pentofuranosyl]-7-nitro-4-(2,4,6-trimethylphenoxy)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin (38)

In einem ausgeheiztem Kolben mit Molsieb wurden 110 mg (0.26 mmol) des entschützten Nukleosids **37** in 3 mL trockenem Pyridin und 290 mg (0.86 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid unter Stickstoff-Schutzgas für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 0.5 mL MeOH und 20 mL Dichlormethan versetzt und das Molsieb durch Filtration entfernt. Das Filtrat wurde mit 15 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit je 15 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit EtOAc/ Isohexan (1:1 bis reines EtOAc) mit 0.5 % Pyridin aufgetrennt. Man erhielt das DMT-geschützte Nukleosid **38** als gelblichen Feststoff (100 mg, 0.14 mmol, 56%).

R_f (EtOAc/ Isohexan, 1:1)= 0.2 ; **¹H-NMR** (200 MHz, CDCl₃): δ = 8.77 (s, 1H, H-2), 8.51 (s, 1H, H-8), 7.65 (t, 1H, H-1'), 7.31 und 6.81 (m, 13H, DMT), 6.93 (s, 2H, CH_c), 4.55 (m, 1H, H-3'), 4.16 (m, 1H, H-4'), 3.75 (s, 6H, OCH₃), 3.40 (m, 2H, H-5'a und H-5'b), 2.71 und 2.54 (m, 2H, H-2'a und H-2'b), 2.30 (s, 3H, *p*-CH₃), 2.01 (s, 6H, *o*-CH₃) ppm ; **MS (EI)**: m/z ber.: 716.28 für C₄₁H₄₀N₄O₈; gef.: 717.0 [M+H]⁺.

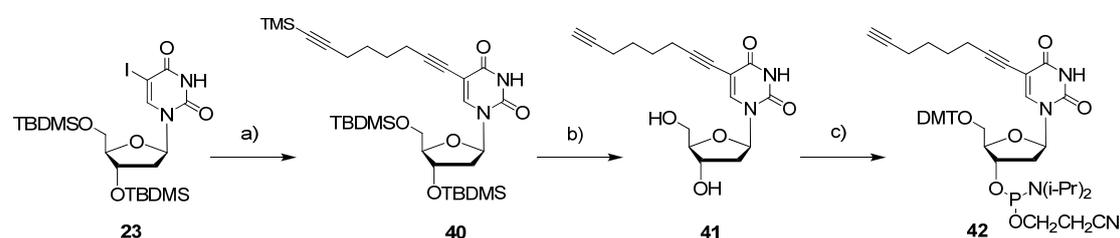
3'-O-(2-Cyanoethyl-*N,N'*-diisopropylphosphoramido)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4-O-(2,4,6-trimethylphenyl)-1-[2'-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]-7-nitro-1*H*-imidazo-[4,5-*c*]pyridin (39**)**

Zu einer Lösung von 100 mg (0.14 mmol) des DMT-geschützten Nucleosids **38** und 146 μ L Diisopropylamin (1.68 mmol) in 1.0 mL Dichlormethan wurden unter Argon-Schutzgas 56 μ L (0.19 mmol) 2-Cyanoethyl-(*N,N'*-diisopropylamino)chlorophosphit gegeben. Der Ansatz wurde 6 h bei RT gerührt. Die Hälfte des Ansatzes wurde direkt säulenchromatographisch mit EtOAc:Isohexan (1:1,5) aufgereinigt. Man erhielt **39** als leicht gelbliches Öl (50 mg, 0,055 mmol, 39%) aus dem halben Ansatz. Die andere Hälfte wurde aufgrund der geringen Menge als Rohprodukt weiterverwendet.

R_f (EtOAc:Isohexan 1:1,5) = 0.5; $^{31}\text{P-NMR}$ (80 MHz, CDCl_3): δ = 150.6, 149.9; Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten stimmten mit den Literaturwerten überein.^[168]

6.2.4 Synthese des Alkin-substituierten Desoxyuridin-Phosphoramidits (42**)**

Das in Kapitel 3.3 erwähnte Alkin-substituierte Uridin bzw. das korrespondierende Phosphoramidit (5-(8-Trimethylsilanyl-okta-1,7-diinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphino)-2'-desoxyuridin) für die "Click"-Chemie wurden gemäß literaturbekannter Vorschrift hergestellt,^[109] auf die hier im Detail nicht näher eingegangen werden soll. Die Synthese verläuft gemäß dem folgenden Schema 4.



Schema 4. Synthese des Alkin-substituierten Uridin-Derivates **41** und des zugehörigen Phosphoramidits **42** nach Literatur.^[109] a) $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI, DMF, $\text{N}(\text{iPr})_2\text{Et}$, Trimethylsilyl-1,7-octadiin; b) TBAF, THF; c) 1) DMTCl, DMAP, Pyridin; 2) $\text{P}[\text{N}(\text{iPr})_2]_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, Diisopropylammoniumtetrazolat, CH_2Cl_2 .

6.3 Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der Oligonukleotide

Für die Kupplung unmodifizierter Nukleotide wurden die vom Gerätehersteller vorgeschlagenen Standardprotokolle verwendet. Für *Deblocking*, *Capping* und Oxidation wurden die folgenden Lösungen genutzt:

Phosphoramidite: 0.1 M in MeCN (10 ppm H₂O), 3 Å Molsieb

Deblocking: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan

Capping A: 0.53 M Phenoxyessigsäureanhydrid + 11.1 % 2,6-Lutidin in Acetonitril

Capping B: 16 % *N*-Methylimidazol in Acetonitril

Oxidation: 0.015 M Iod in 2,6-Lutidin/Acetonitril/Wasser 0.6: 6.5: 3

Aktivator: 0.25 M 5-Benzylthiotetrazol (BTT) in Acetonitril.

Die DNA-Festphasensynthese beginnt mit der Entschützung der 5'-Hydroxygruppe der ersten, sich meist schon am Träger befindlichen Base mit Dichloressigsäure (Abbildung 41). Anschließend werden der Aktivator (BTT) und das nächste zu kuppelnde Phosphoramidit zugegeben. Dabei entsteht der Phosphit-Triester, der die beiden Nucleoside miteinander verknüpft. Im nächsten Schritt (*capping*) werden diejenigen Hydroxygruppen, die nicht bei der Phosphoramit-Kupplung reagiert haben, mit einem großen Überschuss an Phenoxyessigsäureanhydrid (Pac₂O) acyliert. Dadurch wird verhindert, dass diese freien Hydroxygruppen im nächsten Zyklus erneut reagieren, wodurch schwer abzutrennende Deletionsprodukte entstehen würden. Anschließend wird Iodlösung zugegeben, wodurch die Phosphit-Triester-Gruppen zu Phosphorsäuretriestern oxidiert werden. Dieser Schritt verhindert eine Hydrolyse oder Umesterungsreaktionen in späteren Kupplungsschritten, die am Phosphor(III)-Atom deutlich leichter eintreten können als am Phosphor (V). Im Anschluss an den Oxidationsschritt folgt wieder die Entschützung der 5'-DMT-Gruppe des neu eingeführten Nucleotids mit verdünnter Dichloressigsäure, und der Synthesezyklus beginnt von neuem. Durch die Absorption des roten Trityl-Kations, das bei der DMT-Entschützung frei wird, kann die Effizienz des vorangegangenen Kopplungsschritts überprüft werden. Dadurch kann die Synthese *on-line* überwacht werden. Fehlsynthesen, die meist durch mangelnden

Feuchtigkeits-Ausschluss hervorgerufen werden, können dadurch frühzeitig festgestellt werden. Ist die letzte Base gekuppelt und der Strang damit vollständig aufgebaut, kann die Abspaltung vom CPG-Träger und die Entschützung der zur DMT-Gruppe orthogonalen Nucleobasen-Schutzgruppen erfolgen.

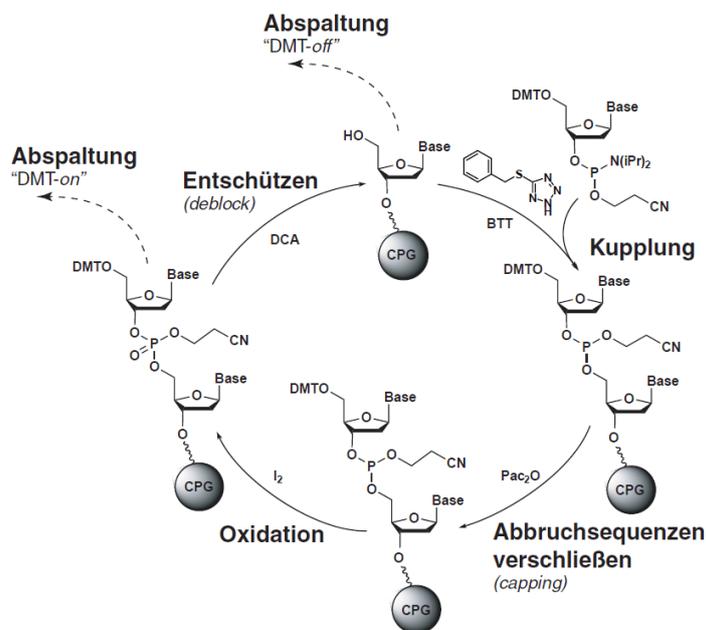


Abbildung 41. Syntheszyklus bei der DNA-Festphasensynthese.

Für die Oligonukleotidsynthese wurden CPG-gefüllte Kartuschen verwendet (Ansatzgröße 1-2 μmol), wobei das Trägermaterial im Allgemeinen bereits mit einer Base beladen war. Die Kupplungszeit für Standardbasen (Konzentration 0.1 M in Acetonitril) betrug 96 s, die Kupplungszeit für die Diazirin- bzw. Benzophenon-substituierten Phosphoramidite von **15**, **16** und **17** wurde auf 10 min erhöht; die den Sonderbasen nachfolgenden Bausteine wurden je 5 min gekuppelt.

Nach der Synthese wurden die DNA-Stränge durch 24 h Behandlung mit ges. Ammoniak (aq.) und Ethanol (3:1, 1 mL) bei Raumtemperatur vom Träger abgespalten und entschützt, wobei diazirinhaltige DNA immer durch Alufolie vor Belichtung geschützt wurde.

Die einen DNA-Schaden enthaltenden Stränge **S11**, **S12** und **S13** wurden ebenfalls nach Standardprotokollen hergestellt, wobei 8-Oxo-dG-Phosphoramidit von der Firma *Glen Research* erworben und das Formacetal-TT-Dimer als Phosphoramidit dankenswerter Weise von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde.

Bei der nachfolgenden Abspaltung vom CPG-Träger/Entschützung mussten für die Schäden gemäß ihrer Basen- und Oxidationsempfindlichkeit unterschiedliche Bedingungen angewendet werden. Es waren dies:

T=T-Dimer: ges. Ammoniak/Ethanol 3:1, 24 h, Raumtemperatur.

8-Oxo-dG: ges. Ammoniak/ges. Methylaminlösung. 1:1 + 0.25 M β -Mercaptoethanol, 40°C, 20 h.

Die Schaden-enthaltenden Stränge wurden für eine leichtere HPLC-Aufreinigung gelegentlich auch im DMT-on-Modus synthetisiert. Zur Entfernung der 5'-Dimethoxytritylgruppe wurde dann nach der HPLC-Aufreinigung eine *SepPak*TM-Kartusche nach dem beschriebenen Protokoll äquilibriert. Die gereinigte DNA-Lösung wurde langsam über die Kartusche gegeben; diese wurde anschließend mit 15 mL bidest. Wasser gewaschen. Eine wässrige Trifluoressigsäurelösung (1.5 %) wurde in 90 s über die Kartusche gepumpt, danach wurde sofort durch Zugabe von Triethylammoniumacetat (6 mL, 0.1 M, pH 7.4) neutralisiert und der Puffer mit bidest. Wasser (15 mL) von der Kartusche gespült. Die DNA wurde mit Acetonitril/Wasser 4:1 (4 mL) eluiert. Anschließend wurde in der *SpeedVac* eingeeengt.

Die entschützten Stränge wurden per *rp*-HPLC gereinigt. Hierzu wurden die folgenden Bedingungen angewendet:

reversed Phase-HPLC: *Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleosil 100/7 C18*

Puffer **A**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser

Puffer **B**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser/80 % Acetonitril

Flussrate: 5 mL/min

Gradient: 0 → 10 % B in 5 min

10 → 40 % B in 45 min bzw. 10 → 65 % B in 45 min

Nach chromatographischer Aufreinigung wurden die Oligonukleotide mit einer *SepPak*TM-Kartusche gemäß dem Hersteller-Protokoll entsalzt.

War die Reinheit der Oligonukleotide in Ordnung, wurden MALDI-Spektren zur genauen Charakterisierung aufgenommen (Kapitel 6.1). Es wurden folgende Werte ermittelt (zur Sequenz der Stränge siehe Kapitel 3.3):

S1: ber. 9589.85, gef. 9589.75.; S2: ber. 9902.92, gef. 9902.74; S3: ber. 5979.23, gef. 5981.32; S4: ber. 6083.27; gef. 6083.19; S5: ber. 5975.26; gef. 5976.75; S6: ber.

5825.04, gef.: 5827.32; S7: ber. 5777.05, gef. 5776.82; S8: ber. 5791.07; gef. 5789.80; S9: ber. 5989.27, gef. 5989.50; S10: ber. 5713.16, gef. 5713.58; S11: ber. 7997.40; gef. 7999.39; S12: ber. 8234.46, gef. 8236.27; S13: ber. 4549.80, gef. 4550.56.

6.4 Photoaffinity Labeling-Experimente

Zur Durchführung der Belichtungsexperimente wurden zunächst Duplex-DNA-Sonden hergestellt. Hierzu wurden äquimolare Mengen der die *Photocrosslinker* enthaltenden Stränge und der komplementären Gegenstränge zusammengegeben, in einem Heizblock für 2 min auf 85 °C erhitzt und über mehrere Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach standen die Doppelstränge für die weiteren Versuche zur Verfügung. Die nachfolgend beschriebenen Schritte wurden zunächst unter Verwendung autoklavierter Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße bzw. später – nachdem sich diesbezüglich kein großer Unterschied bei den erhaltenen MS-Daten feststellen ließ – auch ohne Autoklavierung durchgeführt. Zudem wurden Nitril- oder Latexhandschuhe getragen, um eine Kontamination der Proben durch körpereigene Proteine zu verhindern. Die angegebenen **Temperaturen** und **Lichtausschlussbedingungen** sind unbedingt einzuhalten, da sonst der Erfolg der Experimente durch Zersetzung entweder der Proteine oder der Sonde gefährdet ist.

6.4.1 Photoaffinitätsmarkierung von aufgereinigten rekombinanten DNA-bindenden Proteinen

Um die Methoden zu optimieren bzw. zu verifizieren, wurde einige aufgereinigte Proteinen mit den DNA-Sonden markiert. Das *LIFpg*-Protein wurde hierzu dankenswerter Weise von *R. Strasser*, die CPD-Photolyase von *Dr. M. Maul* und das hOGG1-Protein von *Emine Kaya* zur Verfügung gestellt. Es wurden bei 0 °C je 50-100 pmol des jeweiligen DNA-Duplexes in ein 0.5 mL-PCR-Eppendorf-Cup gegeben und – je nach genauem Experiment – 5-20 µg des Proteins hinzugesetzt. Mit dem *photoaffinity labeling*-Belichtungspuffer oder mit PBS-Puffer (siehe Anhang) wurde

auf ein Gesamtvolumen von 10 mL verdünnt, so dass die DNA-Endkonzentrationen bei 0.5-1.0 μM lagen. Die Ansätze wurden 30 min unter Lichtausschluss auf Eis (bzw. gelegentlich zu Vergleichszwecken bei Raumtemperatur) inkubiert und anschließend für 30 bis 60 min belichtet. Bei Diazirin- und bei Benzophenon-haltigen Sonden wurde hierzu eine Wellenlänge von 365 nm und bei Halogenatom-enthaltenden Sonden eine Wellenlänge von 312 nm verwendet. Sollten diese für den analytischen Maßstab bestimmten Lösungen vor der Gelelektrophorese eingengt werden, wurden diese in Biomax-Zentrifugationsfiltersäulen der Fa. *Millipore* (100 mL Fassungsvermögen, Ausschlussmasse 10 kDa) umpipettiert und diese bei ca. 3500 rpm bei 4 °C zentrifugiert, bis eine Aufkonzentration von ca. 30 μL erreicht war (ca. 30 min). Es wurden 10 mL des 6xSDS-Auftragspuffers zugesetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und die Proben kurz auf ein Eis abgeschreckt. Je 10-15 μL der Probe wurden dann per SDS-PAGE (10 bzw. 12.5% Acrylamid) aufgetrennt und analysiert (Details siehe Material und Methoden). Zur Sichtbarmachung der Fluoreszenz wurden die Gele unter einem *LAS3000-Imager* (*Fuji*) betrachtet und fotografiert. Anschließend wurde mit *Coomassie Blue*, *SimplyBlueTM safe stain* (*Invitrogen*) oder dem *SilverXpressTM Silver Stain* (*Invitrogen*) nach Herstellerangaben gefärbt. Nach der Färbung wurden die Gele in bidest. H_2O bei 4 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

6.4.2 Markierung von DNA-bindenden Proteinen in *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Zellextrakten

Das *E. coli*-Zelllysate mit dem überexprimierten *LIFpg*-Protein, das *E. coli*-Zelllysate ohne molekularbiologische Veränderungen (Stamm Top-10TM) sowie das *S. cerevisiae*-Ganzzelllysate (Stamm *INVSc1*, *Invitrogen*) wurden dankenswerter Weise von *R. Strasser* zur Verfügung gestellt. Je nach Charge besaßen diese Lysate eine Konzentration von 10-50 mg/mL. Die Handhabung erfolgte ausschließlich bei 0-4 °C, zur Lagerung wurde der Ausgangsextrakt meist aliquotiert und bei -80 °C gekühlt und gelagert. Da wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen der Stabilität der Proteine abträglich sind, wurde jedes Aliquot nur ein- oder zweimal verwendet.

Die weitere Durchführung der *photoaffinity labeling*-Experimente mit diesen Lysaten erfolgte analog zu der in Abschnitt 6.4.1 geschilderten Prozedur. Anstelle der gereinigten Proteine wurden nun 100-200 µg des jeweiligen Zellextrakts eingesetzt. Die Experimente wurden wieder im *photoaffinity labeling*-Puffer oder in PBS-Puffer durchgeführt. Die Gesamteinkonzentration betrug 1 mg/mL. Belichtung, Auftrennung und Visualisierung der Ansätze erfolgte dann wieder analog zu Kap. 6.4.1.

Für Experimente im präparativen Maßstab wurde das Protokoll in einigen Punkten geändert und erweitert. Es wurde 1 nmol der jeweiligen DNA-Sonde verwendet, 1-2 mg Zellextrakt zugesetzt und mit dem *photoaffinity labeling*-Belichtungspuffer auf 1 mL verdünnt (Gesamteinkonzentration 1-2 mg/mL). Anschließend wurde wie in 6.4.1 beschrieben für 15-30 min inkubiert und für 30-60 min auf Eis belichtet. Das weitere Vorgehen richtete sich danach, ob Streptavidin-Magnetic-Beads oder Avidin-Agarose-Beads zur Affinitätsanreicherung der DNA-Protein-crosslinks verwendet wurden.

Bei der Verwendung von Streptavidin-Magnetic-Beads wurden 1.0 mg M-270 bzw. MyOne™ C1 Dynabeads (Dyna) zunächst vom Lagerungspuffer befreit, zweimal mit *magnetic beads*-Bindungspuffer (je 500 µL) gewaschen und in 500 µL *magnetic beads*-Bindungspuffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde der Belichtungsansatz gegeben und die Mischung 2-3 h bei Raumtemperatur unter leichtem Rotieren (→ Rotationsverdampfer) inkubiert. Die Magnetpartikel wurden magnetisch fixiert und der nicht gebundene Überstand wurde abgenommen. Die *Beads* wurden nun in mehreren Waschgängen von unspezifisch anhaftendem Protein gereinigt. Hierzu wurden sie zunächst in 1 mL *magnetic beads*-Waschpuffer A suspendiert, kurz gevortext und magnetisch fixiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Diese Prozedur wurde anschließend viermal unter Verwendung von je 1 mL *magnetic beads*-Waschpuffer B wiederholt. Abschließend wurde noch einmal mit 1 mL *magnetic beads*-Waschpuffer A gewaschen, um störende SDS-Reste zu beseitigen. Die *Beads* wurden in 30 µL eines 1:1-Gemischs aus SDS-Auftragspuffer und bidest. H₂O resuspendiert und durch 5 min Erhitzen bei 95 °C wurden die gebundenen Proteine eluiert. Nach magnetischer Fixierung der *Dynabeads* wurde die nun fertige Probe abgenommen, kurz auf Eis abgeschreckt und danach wie beschrieben per SDS-PAGE analysiert.

Bei der Verwendung von Avidin-Agarose-Beads wurde meist zunächst eine Acetonfällung der Proteine bzw. der DNA-Protein-*crosslinks* durchgeführt, um die anderen Bestandteile der Lösung abzutrennen. Hierzu wurde den Proben ein der Reaktionslösung gleiches Volumen an Aceton zugesetzt, und man ließ die Proben für 20-30 min auf Eis stehen, bis das Protein-Präzipitat deutlich zu erkennen war (Flocken). Anschließend wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in vorgekühltem MeOH gelöst, wobei es durch Ultraschall resuspendiert wurde. Nach erneuter Pelletierung wurde dieses Vorgehen mit vorgekühltem MeOH oder – je nach genauem Experiment - mit vorgekühltem Acetonitril wiederholt. Schließlich wurde das Pellet in 1 mL PBS/0.2%SDS-Puffer mittels Ultraschall resuspendiert und NICHTMEHR auf Eis gelagert. Es wurden 50-100 µL der Avidin-Agarose-Beads (*Sigma Aldrich*) zugesetzt, und der Ansatz wurde 1-2 h bei Raumtemperatur leicht rotiert. Anschließend wurden die *Beads* dreimal mit 1 mL PBS/0.2%SDS-Puffer, zweimal mit 1 mL 6 M Harnstoff-Lösung und dreimal mit 1 mL PBS-Puffer gewaschen, wobei zur Pelletierung immer leicht (max. 3500 rpm) zentrifugiert wurde. Anschließend wurde SDS-Auftragspuffer zugesetzt, die Proteine wurden durch ca. 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C in diesen „abgekocht“, und es folgte die SDS-Gelelektrophorese wie in Kapitel 6.1. beschrieben.

6.4.3 Markierung von DNA-bindenden Proteinen in humanen Nuklearextrakten

Die Aufzucht und Ernte humaner Zellen sowie die Präparation der Kernextrakte wurde dankenswerter Weise von C. Gräf durchgeführt, die Prozedur soll daher nur kurz dargestellt werden.

Humane Zellen der Linie HCT-116 (Darmkrebs epithelzellen, DSMZ-Nr. ACC581, adhären wachsend) wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ in *Dulbecco's MEM with high glucose*+ 5 % *FKS* unter mehrfachem Umsetzen bis zu einer Dichte von 50.000-60.000 Zellen/cm² gezüchtet. Die Zellen wurden durch Trypsin/EDTA-Behandlung von der Wandung gelöst und durch Zentrifugation bei 450 rpm für 5 min bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, anschließend wurden die Zellen im fünffachen Pelletvolumen Kernextraktionspuffer A resuspendiert

und auf Eis für 20 min inkubiert. Nach Abzentrifugation wurde in zwei Pelletvolumen Kernextraktionspuffer A suspendiert und die Zellen durch 20 Stöße eines *WheatonDounce*-Homogenisators lysiert. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 15 min) wurde der Überstand abgenommen, nochmals zentrifugiert (13.000 rpm, 20 min) und der Überstand erneut sorgfältig entfernt. Das Zellkernpellet wurde im gleichen Volumen Kernextraktionspuffer B resuspendiert, und durch 20 Stöße eines *WheatonDounce*-Homogenisators lysiert; die Suspension wurde dann für 30 min bei 4 °C gerührt, anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde abgenommen und unter Verwendung von *Slide-A-Lyzer*[™]-Dialysekassetten (*Pierce*), über Nacht gegen das 1000fache Volumen Kernextraktionspuffer C dialysiert. Der Kernextrakt wurde bei 13.000 rpm für 20 min zentrifugiert, anschließend in 1 mg-Aliquote aufgeteilt, welche bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

Die Durchführung der Belichtungsexperimente im analytischen und präparativen Maßstab erfolgte gemäß den in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Methoden.

6.4.4 In-Gel-Trypsinverdau der *gelabelten* Proteine

Zur massenspektrometrischen Untersuchung der gelabelten Banden wurden diese nach Anfärbung bzw. direkt nach Photographie mit dem *LAS3000-Imager* (*Fuji*) ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Hierzu wurde ein Protokoll verwendet, welches eine Kombination aus den Protokollen der Fa. *Promega*, *Bruker* und der *UCSF* darstellt. Bei allen nachfolgenden Schritten mussten Handschuhe getragen werden, um Kontamination der Proben (z. B. durch Keratin aus Hautpartikeln) zu vermeiden.

1. Das Gel wurde zunächst auf eine sterile Unterlage gelegt, z. B. eine zuvor mit Ethanol/Wasser gereinigte Glasplatte. Anschließend wurden mit einem Skalpell die zu untersuchenden Banden ausgeschnitten, wobei darauf zu achten war, möglichst wenig „leeres“ Polyacrylamid auszuschneiden. Die Banden wurden dann in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten, und diese wurden je nach Größe der Banden in 0.5 mL - oder 1.5 mL - Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Im Falle *Coomassie*-gefärbter Banden wurden diese gegebenenfalls zunächst entfärbt. Hierzu wurden die Gelstücke je nach Größe mit 100-200 µL Wasser und anschließend mit 100-200 µL

50 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril 1+1 für je 15 min gewaschen. Die Lösungen wurden abgenommen und die Gelstücke wurden mit Acetonitril bedeckt. Nach Schrumpfen der Gelstücke wurde das Acetonitril abgenommen und die Gelstücke wurden wieder in 100-200 μL 50 mM NH_4HCO_3 - Lösung rehydratisiert. Nach 5 min wurde das gleiche Volumen an Acetonitril zugegeben und nach weiteren 15 min wurden dann die Lösungen wieder abgenommen. Die Gelstücke wurden wieder mit Acetonitril bedeckt, welches nach Schrumpfen der Gelstücke wieder entfernt wurde. Die Gelstücke wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Zur Entfärbung der silbergefärbten Gele wurden die in 1 mm^3 -Stücke geschnittenen Gelpartikel zunächst dreimal für je 5 min mit je 1 mL bidest. H_2O gewaschen. Anschließend wurde frisch ein 1:1-Gemisch aus Lösungen von Kaliumhexacyanoferrat(III) (30 mM) und Natriumthiosulfat (100 mM) hergestellt und die Gelpartikel damit gerade bedeckt. Nachdem die Braunfärbung der Banden vollständig verschwunden war (ca. 5-15 min) wurde der Überstand verworfen und die Gelteilchen in mehreren 30minütigen Waschschrritten mit bidest. H_2O gespült, bis sie wieder vollständig farblos waren. Durch fünfminütiges Inkubieren mit 100 % Acetonitril wurde dehydriert und die Partikel in einer *SpeedVac* bei Raumtemperatur getrocknet (ca. 10 min).

2. Zur Reduktion und Alkylierung der Disulfidbrücken wurde anschließend eine zur Rehydratisierung der Gelstücke gerade ausreichende Menge (meist 15-25 μL) einer Lösung von 10 mM DTT in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (immer frisch hergestellt) zugegeben und für 45 min bei 56 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde evtl. überschüssige Flüssigkeit abpipettiert und schnell durch dasselbe Volumen einer Lösung von 55 mM Iodacetamid (*Sigma, ultra grade*) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat ersetzt. Die Proben wurden dann 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert, um die freien Cysteinreste zu alkylieren. Der Überstand wurde abpipettiert und die Gelstücke zweimal für je 15 min mit je 50 μL 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat/50 % Acetonitril (1:1; v/v) gewaschen. Die Gelstücke wurden mit Acetonitril gerade bedeckt und für 5 min dehydriert. Der Überstand wurde abgenommen und das Gel für 10 min in einer *SpeedVac* getrocknet.

3. Anschließend wurden zu den Gelstücken - je nach Größe – 100 μL oder 200 μL einer Lösung von Trypsin (*Promega, modified sequence grade*), 20 $\mu\text{g/mL}$ in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat) zugegeben, und die Ansätze wurden bei 37 °C über Nacht rehydratisiert und inkubiert. Daraufhin wurde die überschüssige Lösung, die nun bereits z.T. die zu analysierenden Peptide enthielt, in andere Eppendorf-*Tubes* umpipettiert. Zu den Gelstücken wurde nun 100 μL bzw. 200 μL 25mM NH_4HCO_3 -Lösung zugegeben, und die Ansätze wurden für 15 min im Ultraschallbad bestrahlt. Es folgte die Zugabe von 100 μL bzw. 200 μL Acetonitril und erneut eine 15minütige Ultraschall-Bestrahlung. Die gesamte Lösung wurde nun von den Gelstücken abgenommen und zu den anderen, zuerst abgenommenen Peptid-Lösungen gegeben. Diese Prozedur wurde anschließend durch die Zugabe von 100 μL bzw. 200 μL 5%iger Ameisensäure zu den Gelstücken (15min Ultraschall) und weiteren 100 μL bzw. 200 μL Acetonitril (15 min Ultraschall) wiederholt. Die Lösungen wurden wieder abgenommen und zu den anderen Peptid-Lösungen gegeben. Die Peptidlösungen (jetzt insgesamt 0.5-1.0 mL) wurden hiernach in einer *SpeedVac* auf ca. 20 μL eingengt, wobei die Temperatur wenn möglich unter 30 °C gehalten wurde. Kam es zu einer kompletten Einengung, wurden wieder 20 μL 5%ige Ameisensäure, 1%iger Ameisensäure oder Wasser zugegeben. Die Lösungen wurden anschließend – wahlweise nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm - in andere Eppendorf-*Tubes* oder direkt in die HPLC-Röhrchen für die Massenanalytik umpipettiert, wobei genauestens darauf geachtet wurde, dass keine kleinen Gelpartikel in der umpipettierten Lösung verblieben. Diese könnten eventuell später Probleme bei der dem Massenspektrometer vorgeschalteten nano-HPLC-Anlage bereiten. Das weitere Vorgehen richtete sich nach der genauen massenspektrometrischen Analysemethode und ist in Kapitel 6.5. beschrieben.

6.4.5 Gel-freier Trypsinverdau der *gelabelten* Proteine in Lösung

Für eine Gel-freie Peptidanalytik und den damit verbundenen tryptischen Verdau in Lösung musste anders vorgegangen werden als beim Gel-basierten tryptischen Verdau, da die benötigten Lösungen ja nicht – wie zu den Gelstücken – einfach hinzugegeben und wieder abgenommen werden konnten. Es wurden verschiedene

Tests unternommen, in welche Lösung nun ein „Abkochen“ der Proteine am sinnvollsten sei (da ja nun direkt der tryptische Verdau folgen sollte). Es zeigte sich, dass ein direktes Abkochen in eine wässrige Lösung ohne SDS nur sehr schwer möglich war, was durch die Farbe der Lösung unter einer UV-Lampe überprüft wurde (bei erfolgreichem „Abkochen“ muss diese aufgrund des Fluorescein-Labels an der DNA gelb sein). Nach Inkubation, Belichtung und Inkubation mit den *Beads* (siehe Kapitel 6.4.2) wurden die DNA-Protein-*crosslinks* somit nicht in den SDS-Auftragspuffer für die Gelelektrophorese abgekocht, sondern in einer Versuchsreihe in 50 μL einer der folgenden Lösungen:

- 25 mM NH_4HCO_3 -Lösung („Arbeitslösung“ von Trypsin).
- Wasser
- PBS-Puffer
- SDS-Auftragspuffer ohne Farbstoff/ H_2O 1:1

Die Ausführlichkeit an dieser Stelle erwies sich als notwendig, da ja nun direkt der tryptische Verdau bevorstand und wenn möglich auf aufwendige Puffer-Wechsel verzichtet werden sollte. Ungünstiger Weise erwies sich nur letztere Lösung als mit Abstand am besten geeignet für das „Hereinkochen“ der DNA-Protein-*crosslinks*. Es folgte eine Acetonfällung der DNA-Protein-*crosslinks* (+ ca. 400 μL Aceton 15 min Stehenlassen auf Eis, dann Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min, dann Abnahme des Überstandes). Das verbleibende Pellet wurde in 100 μL DTT-Lösung (10 mM in NH_4HCO_3) am Ultraschallstab resuspendiert (Intensität ca. 10%), und ca. 45 min bei 56 °C inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 100 μL Iodacetamid-Lösung (55 mM in NH_4HCO_3) und eine weitere ca. 45min Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 1 μL Mercaptoethanol (zum Stoppen der Reaktion) wurde eine erneute Acetonfällung durchgeführt (ca. 1 mL Aceton, -20 °C über Nacht). Die Protein-Lösungen wurden wieder für 5 min bei 13 000 rpm pelletiert und anschließend in 200 μL 25 mM NH_4HCO_3 -Lösung am Ultraschall resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 4 μL Trypsin-Lösung und anschließende Inkubation für 16 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Peptide in einer *SpeedVac* komplett eingeeengt, in 20 μL 1%iger Ameisensäure aufgenommen, in die HPLC-Gefäße umpipettiert und massenspektrometrisch vermessen.

6.4.6 Durchführung eines *Western-Blots*

Bei den Gel-basierten *photocrosslinking*-Experimenten wurde gelegentlich ein *Western-Blot* zum Nachweis eines DNA-Protein-*crosslinks* durchgeführt. Hierzu wurden die durch SDS-PAGE getrennten Proteine über ein elektrisches Feld im *Semi-Dry*-Verfahren auf eine *HybondTM*-Nitrozellulosemembran (*Amersham Biosciences*) übertragen und für die nachfolgende Immunodetektion fixiert. Dazu wurden sieben *Whatman* Papiere (mm stark), ebenso wie eine Nitrozellulosemembran, auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Drei *Whatman*-Papiere wurden im Kathodenpuffer, jeweils zwei im Anodenpuffer I und Anodenpuffer II getränkt. Die Nitrozellulosemembran wurde im Anodenpuffer II befeuchtet. Nach der Entfernung des Sammelgels wurde das Trenngel mit destilliertem H₂O abgespült und dann zwischen Membran und den *Whatman*-Papieren positioniert. Die *Whatman*-Papiere wurden zuvor durch Abstreifen an der Gefäßkante von überschüssigem Puffer befreit. Der Protein-Transfer erfolgte bei einer der Gelgröße angepassten Stromstärke von 2.5 mA/cm² Gelfläche. Die *Blot*-Dauer betrug 75 min. Die Spannung durfte während des *Blottens* nicht über 20 V steigen, da es sonst zu einer starken Wärmeentwicklung kam. Nach dem *Blot* wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Danach wurden 20 mL *Blocking Buffer* (*Invitrogen* oder 5% Magermilchpulver in TBST) zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die freien Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Anschließend wurde 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper (z.B. anti-PARP-1) für 1 Stunde und ein 10minütiges Waschen mit TBST-Puffer. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (anti-Rabbit) für die Peroxidase-Reaktion. Es wurden die Detektionslösungen angesetzt (Anhang), und die Membran wurde ca. 5 min mit diesen inkubiert und unter dem *LAS3000-Imager* (*Fuji*) im Chemilumineszenz-Modus photographiert (grüne LED, $\lambda_{\text{Anregung}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 570 \text{ nm}$; Abbildung 42).



Abbildung 42. Nachweis des DNA-PARP-1-*crosslinks* durch einen *Western-Blot*.

6.4.7 Photoaffinitätsmarkierung und anschließendes „Clicken“ des Fluorescein-Labels an die DNA im Protein-Lysat

Für den Erfolg der „Click“-Reaktion sind viele Parameter von Bedeutung, wobei u.a. hohe Konzentrationen der beteiligten Komponenten notwendig sind. In Versuchsreihe 1 wurden 100 pmol (5 μ L) der DNA-Sonde **DS11** und 20 μ g (1 μ L) des *E. coli*-Zelllysates mit dem überexprimierten *L/Fpg*-Protein mit 14 μ L PBS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 20 μ L aufgefüllt (für den Kontrollansatz mit den hitzedenaturierten Proteinen wurden nur 12 μ L PBS-Lösung und 2 μ L 5%ige SDS-Lösung zum Auffüllen verwendet, worauf dieser für 5 min auf 90 °C erhitzt wurde). Die Endkonzentration der DNA betrug somit 5 μ M. Anschließend wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und für weitere 30 min mit 312 nm belichtet. Es folgten die Zugaben von 1 μ L 1 mM Fluorescein-Azid-Lösung, 1 μ L 100 mM TCEP-Lösung, 1 μ L 100 mM Ligand-Lösung und 1 μ L 100 mM CuSO₄-Lösung. Die Ansätze wurden 90 min bei Raumtemperatur geschüttelt und nach Denaturierung im SDS-Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 43). Ein Ansatz wurde zur Kontrolle mit Sonde **DS6** durchgeführt, die das Fluorescein-Label schon von vornherein enthielt (Spur 2). Der Ansatz mit der „Click“-Reaktion wurde nach Inkubation und Belichtung, aber vor Zugabe der „Click“-Reagenzien für 5 min auf 90 °C erhitzt (Spur 3). Er zeigte ein erfolgreichen „Anklicken“ des Fluorescein-Labels an den DNA-Protein-crosslinks (Spur 3), wenn auch die Bande nicht so stark ist wie die in Spur 2. Ein weiterer Ansatz wurde mit von vornherein denaturierten Proteinen durchgeführt (Spur 4), und ein weiterer Ansatz wurde mit einem *E. coli*-Lysat ohne überexprimiertem *L/Fpg*-Protein durchgeführt (Spur 5). Wie Abbildung 43 zeigt, verlief das „Clicken“ des Fluorescein-Farbstoffes an den DNA-*L/Fpg*-crosslink zwar erfolgreich, kommt aber bezüglich der Ausbeute noch bei weitem nicht an die Reaktion mit der von vornherein Fluorescein-enthaltenden DNA-Sonde **DS6** heran (Spur 2). Hierfür ist offensichtlich noch weitere Optimierung erforderlich.

Experimenteller Teil

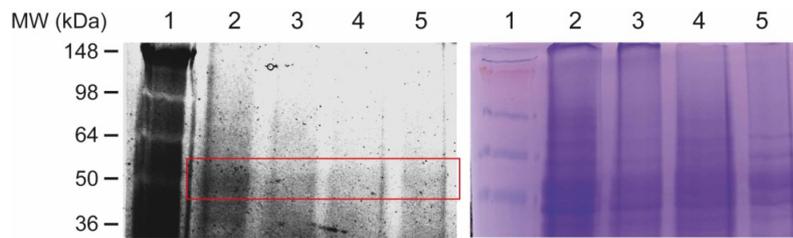


Abbildung 43. Fluoreszenz-Aufnahme (links) und *Coomassie*-Färbung (rechts) des SDS-Gels der *photoaffinity labeling* – Experimente mit dem anschließenden „Clicken“ des Fluorescein-Labels an die DNA (Beschreibung siehe Text). Spur 1: Molekulargewichts-Marker; Spur 2: Experiment mit Sonde **DS6**. Spuren 3-5: „Click-Experimente“ mit Sonde **DS11**.

6.4.8 Test zum *in vivo* – photocrosslinking

Wie in Kapitel 5 erwähnt, wurde auch ein Experiment zum *photocrosslinking in vivo* durchgeführt. Es sollte getestet werden, ob sich die DNA-Sonden auch zur selektiven Markierung DNA-bindender Proteine in lebenden Zellen eigneten. Hierzu wurde mit *E. coli*-Zellen gearbeitet. Auch wenn es sich bei diesem Experiment nur um einen anfänglichen Test handelte, soll es hier aufgrund seiner Relevanz für zukünftige Studien beschrieben werden.

Drei Ansätze á 5 mL einer *E. coli* NEB5 α -Kultur (OD ~ 0,6) wurden 10 min auf Eis gestellt und anschließend 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Rückstände in 2,5 mL RF1-Puffer suspendiert. Anschließend wurden die Ansätze wieder 15 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Rückstände in 400 μ L RF2-Puffer suspendiert und auf Eis gestellt. Zu einem der Ansätze wurde nun 0.5 nmol der DNA-Sonde **DS6** und zu einem weiteren Ansatz 0.5 nmol der entsprechenden ungeschädigten Sonde gegeben. Zum dritten Ansatz wurde keine DNA zugegeben (zur späteren Messung des Hintergrunds). Die drei Ansätze wurden 45 min auf Eis inkubiert und dann 75 sec auf 42 °C erwärmt. Daraufhin wurden sie 30 min auf Eis gestellt und belichtet. Wie erwartet fluoreszierten auf Grund der enthaltenen DNA die Lösungen 1 und 2. Zur Zerstörung der Zellen wurde nun Lysozym zugegeben (0.1 mg je Ansatz) und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden einer Ultraschall-Behandlung unterzogen (Ultraschall-Stab, 2x15 Pulse, 50% Intensität), Schock-

Experimenteller Teil

gefrostet und über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze mit den Streptavidin-Agarose-Beads versetzt und 2,5 Stunden leicht rotiert (Rotationsverdampfer). Die farblosen Überstände wurden verworfen und die Beads wurden gemäß dem bekannten Protokoll gewaschen (Kapitel 6.4.2). Die DNA-Protein-crosslinks wurden in SDS-Auftragspuffer_{ohne Farbstoff} / H_2O ($20\text{ }\mu\text{L}/20\text{ }\mu\text{L}$) abgekocht und die Fluoreszenz-Eigenschaften wurden erneut überprüft (1: stark gelb; 2: schwach gelb; 3: farblos). Nach diesem vielversprechenden Befund wurde zu den Ansätzen nochmal je $10\text{ }\mu\text{L}$ des SDS-Auftragspuffers_{mit Farbstoff} zugegeben, und nach 5-minütigem Erhitzen auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das erhaltene SDS-Gel ist in Abbildung 44 gezeigt.

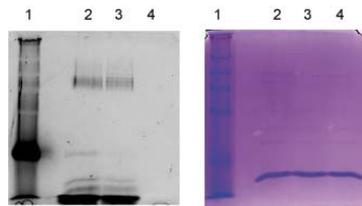


Abbildung 44. Fluoreszenzaufnahme (links) und Coomassie-Färbung (rechts) des SDS-Gels der im Text beschriebenen *in vivo-photocrosslinking*-Experimente mit *E. coli*-Zellen. Spur 1: Molekulargewichtsmarker; Spur 2: Verwendung von **DS6** mit Schaden; Spur 3: Verwendung von **DS6** ohne Schaden; Spur 4: Blindprobe ohne DNA-Sonde.

Es sind klare Banden zu erkennen, die von DNA-Protein-crosslinks herrühren. Die Analytik gemäß bekanntem Vorgehen (Kapitel 6.4.4 und 6.5) ergab unter anderem klare Treffer für Peptide des 'COG0583 Transkriptional regulators', eines Transskriptionsfaktors,^[229] im oberen Gelbereich. Weitere Proteine konnten zunächst nicht sicher genug identifiziert werden, um sie an dieser Stelle schon zu nennen. Es zeigte sich also, dass auch diese Methode vom Prinzip her funktioniert, auch wenn noch viel Arbeit in die Optimierung dieses *in vivo-photocrosslinkings* gesteckt werden muss.

6.5 Massenspektrometrische Analytik und Bioinformatik

Die markierten Proteine wurden mit der ESI-MS/MS-Methode oder mit der MALDI-Methode charakterisiert.

Für die nano-HPLC-ESI-MS/MS-Experimente wurden die gemäß Kapitel 6.4.4 tryptisch verdauten Peptide auf eine *Dionex C18 Nano Trap* Säule (100 µm) geladen, anschließend eluiert und über eine *Dionex C18 PepMap 100* (3 µm) Säule für die Tandem-MS-Analyse aufgetrennt (*Dionex Ultimate 3000 LC*). Es folgte die hochauflösende MS/MS-Messung über das *ThermoFinnegan LTQ-FT Orbitrap* MS-System. Die massenspektrometrischen Daten wurden mittels der *BioWorks 3.3.1 software* mit dem SEQUEST Algorithmus gegen die Datenbanken der entsprechenden Organismen abgeglichen. Die Suche wurde auf nur tryptische Peptide, max. zwei ausgelassene Schnittstellen, monoisotopische Vorläuferionen und eine Peptid-Toleranz von <10 ppm limitiert.

Als Startparameter wurden außerdem folgende Einstellungen verwendet:

- Monoisotopische Massen
- Max. Abweichung 0.1 Da
- Verwendetes Enzym: Trypsin
- Max. zwei übersprungene Schnittstellen
- Feste Modifikation: Carbamidomethyl (C)
- Variable Modifikation: Oxidation (M)
- Suche in der NCBI-Datenbank (neuester Standard)
- Organismus: je nach Experiment *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Homo sapiens*.

Zur Authentifizierung der Treffer wurden folgende Filter gesetzt:

- Distinct peptides
- Number of different peptides: ≥ 2
- Peptide probability: 0.05
- Xcorr vs. Charge state: 1.8, 2.3, and 2.8, 3.0 für die Ladungszustände +1, +2 +3 bzw. +4.

Diese Filter-Werte wurden in Anlehnung an zuvor beschriebene Filter-Werte für SEQUEST-Analysen gesetzt.^[230] Gelegentlich wurden sie leicht modifiziert, da sich zeigte, dass auch kleine Änderungen in der Wahl der Filter zu neuen interessanten und ebenso relevanten Treffern führen können. Im Anhang sind einige MS-Profile der erhaltenen Proteine sowie einige ausgewählte MS/MS-Spektren wichtiger Peptide dargestellt, die bei den präparativen *photocrosslinking*-Experimenten zur Identifizierung der Proteine dienten. Einige wichtige statistische Daten für diese Proteine wurden bereits in Kapiteln 4 dargestellt.

Bei den MALDI-Messungen wurden jeweils 1 μL der gemäß Kapitel 6.4.4 erhaltenen Peptid-Lösungen auf einer *Millipore*-Entsalzungsmembran für ca. 20 min entsalzt. 0.5 μL der entsalzten Lösung wurden mit 0.5 μL HCCA-Matrix auf den *Anchor Chip* aufgetragen, vermischt und nach Kristallisation vermessen. Die erhaltenen Peptid-Daten wurden mit dem Programm *BioTools* von *Bruker* ausgewertet, wobei der MASCOT-Algorithmus verwendet wurde. Die Parameter-Einstellungen entsprachen im Wesentlichen denen bei den ESI-Messungen. Die durch MALDI-Messungen erhaltenen Ergebnisse besaßen allerdings bei weitem nicht die Aussagekraft der ESI-Messungen, weshalb sie wesentlich seltener durchgeführt wurden. Ein Beispiel für ein Ergebnis einer derartigen MALDI-Messung ist in Anhang 7.8 gezeigt.

7 Anhang

7.1 Nuklease-Verdau der Sonde DS4 mit Nukleosid 16

Strang **S4** wurde wie in Kapitel 3.3 und 6.1 beschrieben ebenfalls mit Hilfe einer Nuklease verdaut, um den korrekten Einbau von **16** in die DNA zu bestätigen. Abbildung A1 zeigt ein zugehöriges Chromatogramm (A) sowie die drei Massenspektren der Modifikationen *photocrosslinker*-Nukleosid **16** (B), Fluorescein (C) und Biotin (D). Der große Peak bei ca. 40 min in Chromatogramm A konnte ebenfalls verschiedenen 3'-Biotin- oder 5'-Fluorescein-Addukten zugeordnet werden. Bei den vielen kleinen Signalen bei ca. 30 min sowie zwischen 40 min und 60 min handelt es sich um kleine (nicht vollständig verdaute) Oligonukleotide bzw. auch um entsprechenden Addukte aus Nukleotid und Modifikation. Somit konnte die Intaktheit des Oligonukleotids **S4** erneut bestätigt werden.

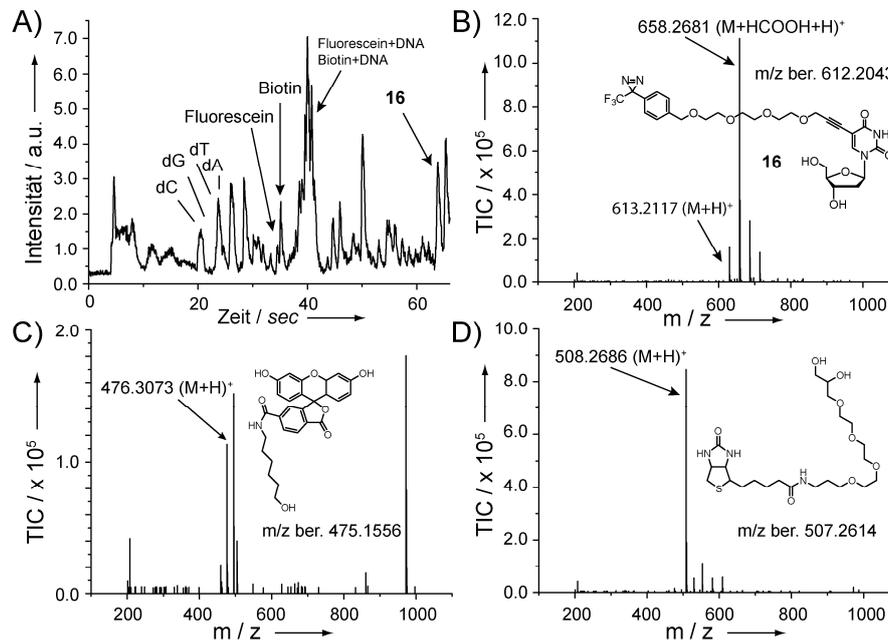


Abbildung A1. HPL-Chromatogramm und Massenspektren des Nuklease-Verdau von Strang **S4**.

7.2 Zusammenstellung der verwendeten Puffersysteme

Photoaffinity labeling-Belichtungspuffer : 10 mM Tris·HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.05 % Nonidet P-40, 0.2 µg/mL BSA, 50 ng/µL *calf thymus* DNA (*Sigma*) bzw. Poly-dI:dC (*Fluka*)

SDS-Auftragspuffer: 62.5 mM Tris·HCl (pH 6.8), 4.0 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS), 20 % (w/v) Glycerin, 5.0 % β-Mercaptoethanol

10x SDS-Laufpuffer: 0.25 M Tris, 1.92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer: 3 M Tris·HCl (pH 8.8)

Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris·HCl (pH 6.8)

CE-Puffer: 0.1 M Tris·Borat (pH 8.3), 7 M Harnstoff, 2 mM EDTA

MonoQ-Säule Puffer A: 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5% (v/v) Glycerin

MonoQ-Säule Puffer B: 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5% (v/v) Glycerin

Heparinsäule Puffer A: siehe MonoQ-Säule Puffer A

Heparinsäule Puffer B: siehe MonoQ-Säule Puffer B

CPD-Photolyase-Assaypuffer: 20 mM Tris·HCl (pH 7.8), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM NaCl

Fpg-Lagerpuffer: 10 mM HEPES·KOH (pH 7.6), 50 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin

Fpg-Assaypuffer: 10 mM HEPES·KOH (pH 7.4), 100 mM KCl, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA

magnetic beads-Bindungspuffer: 10 mM Tris·HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl

magnetic beads-Waschpuffer A: 5 mM Tris·HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl

magnetic beads-Waschpuffer B: 5 mM Tris·HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 5 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Nonidet P-40

Kernextraktionspuffer A: 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1.5 mM MgCl₂

Kernextraktionspuffer B: 20 mM HEPES, pH 7.9, 25 % (v/v) Glycerin, 0.42 M NaCl, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF (immer frisch zugeben, Stocklösung 10 % in Isopropanol)

Kernextraktionspuffer C: 20 mM HEPES, pH 7.9, 20 % (v/v) Glycerin, 100 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF (immer frisch zugeben, Stocklösung 10 % in Isopropanol)

Aktivsterkupplungspuffer: 0.1 M Natriumtetraborat, pH 8.5

Kathodenpuffer: 25 mM Tris, 40 mM ε-Aminocaprinsäure, 0.1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer I: 300 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer II: 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol

TBST- Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween-20, pH 8.0

Transformationspuffer RF1: 100 mM RbCl₂, 50 mM MgCl₂(4H₂O), 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂(2H₂O), 15% Glycerol (mit 0.2 M Essigsäure auf pH = 5.8 gebracht).

Transformationspuffer RF2: 10 mM MOPS (pH=6.8), 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂(2H₂O), 15% Glycerol

7.3 Testexperiment mit DNA-Sonde DS1 und einem Hefe-Proteom

Wie in Kapitel 4.4 erwähnt, wurde auch mit *photoaffinity labeling*-Experimenten in Hefe-Zelllysaten begonnen, die allerdings noch nicht die Aussagekraft der *E. coli*- bzw. der HCT-116-Experimente hatten. Dennoch lieferten sie einige erwähnenswerte Ergebnisse. Abbildung A2 zeigt den analytischen Teil eines SDS-Gels einer derartigen Versuchsreihe (Links: Fluoreszenz-Aufnahme; Rechts: *Coomassie*-Färbung) sowie eine kleine Tabelle mit wichtigen markierten Proteinen, die in dem entsprechenden präparativen Teil des Gels (nicht gezeigt) gefunden wurden. Es wurde gemäß der in Kapitel 6.4.2 beschriebenen Vorschrift vorgegangen (Spur 1: Marker; Spur 2: Experiment mit Sonde **DS6** (IdU als *photocrosslinker*, 8-Oxo-dG); Spur 3: Experiment mit entsprechender ungeschädigter Sonde; Spur 4: Kontrollexperiment ohne DNA). Bei dem Protein Tef2p handelt es sich um einen Translationsfaktor,^[231] der Grund für seine Markierung bei diesem Experiment ist zunächst unklar. Bei dem Protein Cdc19p handelt es sich um einen eukaryotischen DNA-Replikationsfaktor.^[232] Dessen Markierung mit der geschädigten DNA-Sonde ist sehr interessant, durchaus plausibel und verlangt gegebenenfalls eine detailliertere Analyse unter Zuhilfenahme des entsprechenden rekombinanten Proteins.

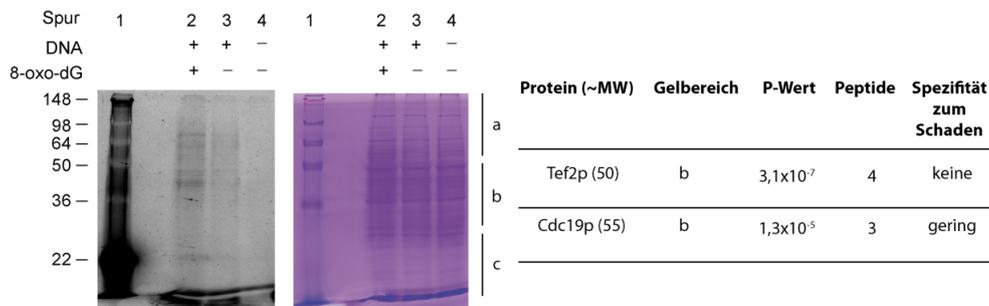


Abbildung A2. SDS-Gel einer *photoaffinity labeling* – Versuchsreihe mit Sonde **DS6** und einem Hefe-Zelllysate. Zur Beschreibung der einzelnen Spuren siehe Text.

Im Nachhinein zeigte sich, dass wohl ein Defekt an der *Orbitrap*-Anlage für die nur sehr spärlichen Protein-*Hits* bei diesem Experiment verantwortlich war: ein durchgeschmorter Widerstand ließ die Intensität der Peptid-Signale um den Faktor 10 geringer werden, weshalb bei den Datenbankabgleichen kaum Peptid-Daten zur Verfügung standen. Dem Gel nach zu urteilen wurden aber durchaus viele wichtige

Proteine Schaden-spezifisch markiert; es sind also in Zukunft auch viele weitere interessante „Treffer“ bei derartigen Experimenten mit Hefe-Lysaten zu erwarten.

7.4 Ausgewählte MS/MS-Profile und ID-Daten der im *E. coli*-Proteom und im Hefe-Proteom markierten Proteine

Die über die nano-HPLC-ESI-MS/MS-Messung erhaltenen Daten ergeben nach der Auswertung (z.B. mit der *BioWorks3.3.1*-software) umfangreiche Tabellen, die sich auch als Excel-Tabellen darstellen lassen. Unter Umständen können dann aus diesen die „Verunreinigungs-Proteine“, die auch im zugehörigen Kontrollexperiment ohne Sonde gemessen wurden, rausgenommen werden. Im Folgenden sind einige repräsentative MS/MS-Profile in Tabellenform dargestellt. Die wichtigsten Proteine sind rot markiert. War nur ein Protein von Bedeutung (wie das *L/Fpg* Protein von Kapitel 4.1), sind auch die einzelnen Peptide dargestellt (Tabelle A1)).

Tabelle A1. Gel Kapitel 4.1, Abbildung 34, *L/Fpg* Protein

Reference	Scan(s)	File	Peptide	MH+	DeltaM	z	Type	P (pro)	Sf	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)
								P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp		Count
<i>Formamidopyrimidine-DNA glycosylase [Lactococcus lactis subsp. cremoris SK11]</i>														
2035	021508	MWZ	K.MQNELQVYQK	1209	99323	1,00484	2	CID	9,15E-09	7,53	80,22	31173,7	116511212	8 (8 0 0 0 0)
2108	021508	MWZ	K.KISPEPTYEDPEK	1987	77991	1,02810	2	CID	1,92E-06	0,95	3,29	1056,3		1
2476	2478	021501	K.KISPEPTYEDPEK	1539	68495	0,00907	2	CID	1,03E-05	0,94	3,58	692,1		1
2528	021508	MWZ	R.MVLTFGEQKK	1293	72352	-0,00021	2	CID	9,21E-08	0,93	3,40	597,1		1
2569	2570	021501	K.KISPEPTYEDPEK	1162	64665	0,00342	2	CID	1,13E-06	0,90	2,77	547,3		1
2838	021508	MWZ	K.FSDGQLYADVR	1383	69031	0,00788	2	CID	4,58E-05	0,93	2,95	728,5		1
4012	021508	MWZ	K.YLFEIGDQFR	1387	68924	0,00990	2	CID	1,14E-08	0,97	4,12	1546,2		1
4172	021508	MWZ	K.EANGTLESSIHLDHDSIEIQK	2831	39882	1,01651	2	CID	6,28E-07	0,96	2,98	1432,5		1
									9,15E-09	0,95	4,41	755,1		1

(Hintergrundmessung: erwartungsgemäß keine Proteine)

Tabelle A2. Kapitel 4.6.1, CPD-Photolyase (Gel nicht gezeigt)

Reference	Scan(s)	File	Peptide	MH+	DeltaM	z	Type	P (pro)	Sf	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)
								P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp		Count
<i>deoxythymidine photolyase, FAD-binding [Escherichia coli K12]</i>														
2554	PhotolyaseB1	R.VQTLAAYEAAR	K	1192	63208	0,00090	2	CID	1,50E-12	4,54	50,18	53633,1	16126883	5 (5 0 0 0 0)
2945	PhotolyaseB1	R.LSASLALGSLSPR	Q	1229	68481	0,00334	2	CID	2,35E-05	0,89	2,59	631,5		1
3155	3157	Protol	K.AVILDYQPIVEIK	1565	97988	0,00379	3	CID	7,67E-05	0,90	2,64	1417,0		1
3565	PhotolyaseB1	R.SSGSEFSPSTLNYPR	Q	1804	90759	0,00762	2	CID	4,94E-05	0,85	3,38	723,2		1
4317	PhotolyaseB1	R.EVDQFVASVEIK	Q	1449	74719	0,00237	2	CID	1,50E-12	0,95	3,67	653,7		1
									1,49E-07	0,95	3,38	1060,0		1

(Hintergrundmessung: erwartungsgemäß keine Proteine)

Anhang

Tabelle A3. Gel Kapitel 4.4, Abbildung 36, Spur 8 (Auswahl)

Reference	Peptide	P (pro)	Sf	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)
Scan(s), File	Peptide	P (pep)	Sf	XC	Sp	RSp	ions
elongation factor Tu [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		4.30E-13	8,60	100,23	43256,4	15803852	10 (10 0 0 0 0)
COG3250: Beta-galactosidase/beta-glucuronidase [Escherichia coli HS]		5.98E-12	1,76	20,20	116388,2	75194567	2 (2 0 0 0 0)
glycerol kinase [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]		8.16E-09	0,96	10,15	56195,4	15834105	1 (1 0 0 0 0)
elongation factor EF-2 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		2.07E-08	0,97	10,19	77532,6	15803853	1 (1 0 0 0 0)
murein lipoprotein [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		2.07E-08	0,95	10,16	8318,3	15802089	1 (1 0 0 0 0)
serine hydroxymethyltransferase [Escherichia coli K12]		2.15E-08	2,36	30,21	45288,0	16130476	3 (3 0 0 0 0)
tryptophanase [Shigella flexneri 2a str. 24571]		7.03E-08	7,46	90,19	52739,7	30065018	9 (9 0 0 0 0)
COG0857: BioD-like N-terminal domain of phosphotransacetylase [Shigella boydii BS512]		2.10E-07	1,55	20,12	76523,7	75177915	2 (2 0 0 0 0)
dihydrodipamide acetyltransferase [Escherichia coli K12]		2.31E-07	2,65	30,14	66055,0	16128108	3 (3 0 0 0 0)
DNA-directed RNA polymerase beta subunit [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		1.44E-06	1,85	30,13	155062,6	15804578	3 (3 0 0 0 0)
DNA-directed RNA polymerase beta subunit [Escherichia coli CF7073]		2.07E-06	3,67	50,16	151790,7	26250758	5 (5 0 0 0 0)
aconitate hydratase [Escherichia coli K12]		2.38E-06	1,11	20,22	93439,1	16128111	2 (2 0 0 0 0)
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		2.56E-06	0,84	10,14	35510,3	15802193	1 (1 0 0 0 0)
DNA polymerase I [Escherichia coli K12]		5.43E-06	2,16	36,13	103053,7	16131704	4 (3 0 1 0 0)
citrate synthase [Escherichia coli K12]		7.63E-06	1,70	20,16	47983,9	16128695	2 (2 0 0 0 0)
hypothetical protein Z2824 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		1.85E-05	0,28	10,08	49419,9	15802198	1 (1 0 0 0 0)
lysyl-tRNA synthetase [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		3.07E-05	0,84	10,12	57790,3	15804722	1 (1 0 0 0 0)
heat shock protein [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]		6.15E-05	0,97	10,16	95526,1	15832709	1 (1 0 0 0 0)
hypothetical protein EcoIH_01000792 [Escherichia coli HS]		7.14E-05	0,05	2,06	8542,4	75195005	1 (0 0 0 1 0)
AF361371_5 NnaA [Escherichia coli]		8.26E-05	0,02	2,07	43788,2	14517805	1 (0 0 0 1 0)
pyruvate dehydrogenase (decarboxylase component) [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		1.09E-04	3,08	50,12	99608,0	15799798	5 (5 0 0 0 0)
hypothetical protein c1939 [Escherichia coli CF7073]		1.72E-04	0,01	10,07	16776,5	26247935	1 (1 0 0 0 0)
OmpA-family lipoprotein [Escherichia coli]		2.00E-04	0,06	20,19	30198,8	73863309	2 (2 0 0 0 0)
hypothetical protein EcoLE_01002658 [Escherichia coli E24377A]		2.92E-04	0,51	10,11	144962,8	75189373	1 (1 0 0 0 0)
BL24_ECOLI Beta-lactamase SHV_24 precursor		3.31E-04	0,02	10,04	31146,3	9106611	1 (1 0 0 0 0)
COG1643: HtpA-like helicases [Escherichia coli HS]		3.40E-04	0,26	10,07	148948,0	75195526	1 (1 0 0 0 0)
COG0553: Superfamily II DNA/RNA helicases_SNF2 family [Escherichia coli 53638]		6.24E-04	0,99	12,16	109746,8	75511717	2 (1 0 0 0 1)
COG3468: Type V secretory pathway, adhesin AidA [Escherichia coli B7A]		6.40E-04	0,12	10,07	147107,5	75227355	1 (1 0 0 0 0)

Tabelle A4. Gel Kapitel 4.4, Abbildung 36, Spur 9 (Auswahl)

Scan(s), File	Peptide	P (pep)	Sf	XC	Sp	RSp	ions
elongation factor Tu [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		1.34E-12	5,71	78,25	43256,4	15803852	8 (7 1 0 0 0)
D-ribose periplasmic binding protein [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		1.63E-09	0,98	10,23	30919,4	15804351	1 (1 0 0 0 0)
translocase [Escherichia coli K12]		2.37E-09	1,12	28,18	101958,9	16128091	3 (2 1 0 0 0)
aconitate hydratase [Escherichia coli K12]		4.11E-09	1,54	28,19	93439,1	16128111	4 (2 0 2 0 2)
serine hydroxymethyltransferase [Escherichia coli K12]		1.46E-08	1,84	30,22	45288,0	16130476	3 (3 0 0 0 0)
tryptophanase [Shigella flexneri 2a str. 24571]		7.55E-08	6,95	80,17	52739,7	30065018	8 (8 0 0 0 0)
30S ribosomal protein S3 [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]		8.21E-08	0,90	10,12	29367,2	15833433	1 (1 0 0 0 0)
murein lipoprotein [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		1.53E-07	1,90	20,19	8318,3	15802089	2 (2 0 0 0 0)
dihydrodipamide acetyltransferase [Escherichia coli K12]		2.88E-07	3,66	40,17	66055,0	16128108	4 (4 0 0 0 0)
50S ribosomal protein L7/L12 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		5.91E-07	0,95	10,15	12287,5	15804578	1 (1 0 0 0 0)
DNA-directed RNA polymerase beta subunit [Escherichia coli CF7073]		8.45E-07	3,44	40,16	151790,7	26250758	4 (4 0 0 0 0)
excinuclease ABC subunit A [Escherichia coli K12]		1.28E-06	0,95	20,16	103802,7	16131884	2 (2 0 0 0 0)
DNA-directed RNA polymerase beta subunit [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		1.08E-05	2,72	30,15	155062,6	15804578	3 (3 0 0 0 0)
COG1020: Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins [Escherichia coli F]		1.55E-05	0,00	6,07	176669,3	75242796	1 (0 0 1 0 0)
pyruvate dehydrogenase (decarboxylase component) [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		2.61E-05	1,59	20,12	99608,0	15799798	2 (2 0 0 0 0)
50S ribosomal protein L2 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		2.72E-05	0,93	20,13	29842,0	15803844	2 (2 0 0 0 0)
COG3250: Beta-galactosidase/beta-glucuronidase [Escherichia coli HS]		2.76E-05	2,02	30,18	116388,2	75194567	3 (3 0 0 0 0)
AF297061_4 unknown [Escherichia coli]		6.98E-05	0,01	8,07	42702,8	11527911	1 (0 1 0 0 0)
Probable peptide chain release factor [Escherichia coli]		1.29E-04	0,06	10,08	22910,7	59889806	1 (1 0 0 0 0)
Putative oligogalacturonide transporter [Escherichia coli CF7073]		1.39E-04	0,04	6,05	57266,5	26246227	1 (0 0 1 0 0)
putative resolase [Escherichia coli O157:H7 EDL933]		1.42E-04	0,10	10,10	20853,2	15804864	1 (1 0 0 0 0)
glutamate decarboxylase A, PLP-dependent [Escherichia coli K12]		1.45E-04	0,87	10,12	52651,2	16131389	1 (1 0 0 0 0)
COG1077: Actin-like ATPase involved in cell morphogenesis [Escherichia coli F11]		3.05E-04	1,16	18,14	14481,7	75241037	2 (1 1 0 0 0)
hypothetical protein EcoIH_01003158 [Escherichia coli HS]		3.39E-04	0,06	14,09	33275,8	75197342	2 (1 0 0 1 0)
COG0582: Integrase [Escherichia coli E22]		3.53E-04	0,47	8,09	47988,4	75254977	1 (0 1 0 0 0)
unknown [Escherichia fergusonii]		3.84E-04	0,05	10,06	74191,6	22034298	1 (1 0 0 0 0)
DNA polymerase I [Escherichia coli K12]		4.55E-04	1,53	20,17	103053,7	16131704	2 (2 0 0 0 0)
integrase [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]		4.69E-04	0,06	10,06	25415,2	15831067	1 (1 0 0 0 0)
COG0753: Catalase [Escherichia coli E24377A]		4.72E-04	0,93	10,18	84079,7	75190765	1 (1 0 0 0 0)
COG0243: Anaerobic dehydrogenases, typically selenocysteine-containing [Escherichia coli E]		5.14E-04	0,04	4,07	89930,0	75190628	1 (0 0 0 1 0)
COG4644: Transposase and inactivated derivatives. TnpA family [Escherichia coli 53638]		6.17E-04	0,09	18,06	64420,7	75511524	2 (1 1 0 0 0)
COG3515: Uncharacterized protein conserved in bacteria [Escherichia coli F11]		6.39E-04	0,06	6,08	59906,2	75241784	1 (0 0 1 0 0)

(In der zugehörigen Spur 7 (Messung des unspezifischen Hintergrundes) tauchten erwartungsgemäß keine Proteine auf).

Tabelle A5. Gel Anhang 7.3, Protein Tef2p

Reference	Peptide	MH+	DeltaM	z	Type	P (pro)	Sf	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)
Scan(s), File	Peptide					P (pep)	Sf	XC	DeltaCn	Sp	RSp	ions
Tef2p [Saccharomyces cerevisiae]						7.56E-08	2,86	30,19		50001,3	6319594	3 (3 0 0 0 0)
1970_Hef64a	K.YGVIVDAPGHR.D	1355,70662	-0,00016	2	CID	7.56E-08	0,97	3,80	0,73	1432,5		18/22
2134_Hef64a	K.IGGSTVIVGVR.V	1025,61021	-0,00005	2	CID	1.36E-03	0,96	5,56	0,70	846,5		17/20
2251_Hef64a	R.LPLQDVYK.I	975,55096	-0,00111	2	CID	2.92E-04	0,92	2,67	0,60	507,0		12/14

Identifizierungs-Daten der markierten Proteine:

Elongationsfaktor Tu: gi|15803852; NP_289886.1; Tryptophanase: gi|30065018; NP_839189.1; DNA-gerichtete RNA Polymerase α (Untereinheit): gi|15803822; NP_289856.1; DNA Polymerase I: gi|16131704; NP_418300.1; DNA-gerichtete RNA Polymerase β (Untereinheit): gi|15804578; NP_290619.1

7.5 MS/MS-Profile und ID-Daten der im HCT-116-Proteom markierten Proteine

Für diese Darstellungen gelten die gleichen Bedingungen wie unter Kapitel 7.4. Bei Messungen mit humanen Proteomen werden oft Keratine als Verunreinigung detektiert. Das liegt in erster Linie daran, dass ohnehin nicht völlig staubfrei gearbeitet werden kann (die Methode soll sich für normale Labor-Messungen eignen und nicht nur für Reinraum-Messungen), und zum anderen daran, dass die Daten ja gegen eine humane Datenbank abgeglichen werden. Bei einem Abgleich gegen die Datenbank eines anderen Organismus würden die humanen Keratine somit nicht in der Tabelle erscheinen, auch wenn sie an sich in der Probe vorhanden sind. Ein Großteil der Keratin-Verunreinigungen kann aber durch die Messung des unspezifischen Hintergrunds eliminiert werden.

Gelegentlich erscheinen auch Proteine in den Tabellen, die mit der erwarteten Funktion zunächst nichts zu tun haben. Sind diese zunächst nicht Bestandteil des unspezifischen Hintergrunds, können sie entweder als Artefakt betrachtet werden, oder es handelt sich doch um ein aussagekräftiges Ergebnis, dessen Zusammenhang mit der ursprünglichen Fragestellung zunächst jedoch noch unklar ist. Die wichtigsten DNA-bindenden Proteine sind der Übersichtlichkeit halber rot markiert.

Tabelle A6. Gel Kapitel 4.5, Abbildung 37, Spur 8, Bande d.

Reference	P (pro)	Sf	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)
uracil DNA glycosylase [Homo sapiens]	1,04E-12	6,84	72,30	35470,1	55053	8 (7 0 0 0 1)
similar to uracil DNA glycosylase [Homo sapiens]	1,04E-12	2,05	22,30	11890,9	27712700	3 (2 0 0 0 1)
Homo sapiens APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 [synthetic construct]	2,31E-11	3,75	40,20	36669,3	30385287	4 (4 0 0 0 0)
APEX nuclease [Homo sapiens]	2,31E-11	3,75	40,20	35546,2	219474	4 (4 0 0 0 0)
PPOL_HUMAN Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) (ADPRT) (NAD(+) ADP-ribosyltransferase-1) (Poly(ADP-ribose) synthetase-1)	5,12E-11	4,37	50,22	113012,4	130781	5 (5 0 0 0 0)
ADP-ribosyltransferase (NAD+; poly (ADP-ribose) polymerase) [Homo sapiens]	5,12E-11	4,37	50,22	112984,4	22802366	5 (5 0 0 0 0)
poly(ADP-ribose) transferase, ADP-ribosyltransferase (NAD+); poly(ADP-ribose) synthetase [Homo sapiens]	5,12E-11	4,37	50,22	113063,5	4501895	5 (5 0 0 0 0)
ribosomal protein L7a, 60S ribosomal protein L7a, surfeit 3, surfeit locus protein 3, PLA-X polypeptide, thyroid hormone receptor uncoupling protein [Homo sapiens]	8,00E-10	1,78	20,15	29977,0	4506861	2 (2 0 0 0 0)
similar to 60S ribosomal protein L7a (surfeit locus protein 3) (PLA-X polypeptide) [Homo sapiens]	8,00E-10	1,78	20,15	20463,1	22044666	2 (2 0 0 0 0)
similar to 60S ribosomal protein L7a (surfeit locus protein 3) (PLA-X polypeptide) [Homo sapiens]	8,00E-10	1,78	20,15	30023,0	18888694	2 (2 0 0 0 0)
similar to 60S ribosomal protein L7a (surfeit locus protein 3) (PLA-X polypeptide) [Homo sapiens]	8,00E-10	1,78	20,15	16964,4	18575985	2 (2 0 0 0 0)
mutant beta-actin (beta-actin) [Homo sapiens]	9,39E-10	2,81	30,18	41785,7	28338	3 (3 0 0 0 0)
A Chain A, Crystal Structure Of A Dicyclohexylammonium CHIMERA Actin (Mutant 646: Q228K T229A A230Y A231K S232E E360H) IN Complex With	9,39E-10	2,81	30,18	41719,9	7245226	3 (3 0 0 0 0)
similar to elongation factor 1 alpha [Homo sapiens]	1,77E-09	2,71	30,22	50140,1	27481160	3 (3 0 0 0 0)
similar to elongation factor 1 alpha [Homo sapiens]	1,77E-09	2,69	30,17	50099,2	27477962	3 (3 0 0 0 0)
similar to elongation factor 1 alpha [Homo sapiens]	1,77E-09	1,92	20,17	42614,8	30149794	2 (2 0 0 0 0)
similar to Elongation factor 1 alpha 1 (EF1A-1) (Elongation factor 1A-1) (eEF1A-1) (Elongation factor Tu) (EF-Tu) [Homo sapiens]	1,77E-09	1,73	20,16	12136,6	22943347	2 (2 0 0 0 0)
IS9398 oncogene P11-1 - human	1,77E-09	1,73	20,16	42787,1	2119924	2 (2 0 0 0 0)
Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa [synthetic construct]	5,47E-09	2,65	30,17	36202,5	30584065	3 (3 0 0 0 0)
eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa; eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 (alpha, 35kDa); eukaryotic translation in	5,47E-09	2,65	30,17	36089,4	4759256	3 (3 0 0 0 0)
similar to keratin 5b [Homo sapiens] [Mus musculus]	7,03E-09	1,91	20,19	103808,1	28487308	2 (2 0 0 0 0)
Homo sapiens lactate dehydrogenase A [synthetic construct]	1,77E-08	4,55	50,17	38778,5	30584487	5 (5 0 0 0 0)
A Chain A, Human Muscle L-Lactate Dehydrogenase M Chain, Ternary Complex With NADH And Oxamate	1,77E-08	4,55	50,17	38554,3	13786849	5 (5 0 0 0 0)
lactate dehydrogenase A [Homo sapiens]	1,77E-08	4,55	50,17	36654,4	9331857	5 (5 0 0 0 0)
A Chain A, Human Heart L-Lactate Dehydrogenase H Chain, Ternary Complex With NADH And Oxamate	1,77E-08	2,63	30,15	36484,1	13786847	3 (3 0 0 0 0)
lactate dehydrogenase B [Homo sapiens]	1,77E-08	2,63	30,15	36615,2	4557032	3 (3 0 0 0 0)
S08228 ribosomal protein S2, cytosolic - human (fragment)	6,49E-08	1,84	20,17	24191,0	88570	2 (2 0 0 0 0)
ribosomal protein S2, 40S ribosomal protein S2 [Homo sapiens]	6,49E-08	1,84	20,17	13304,6	15055539	2 (2 0 0 0 0)
similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L5 [Homo sapiens]	7,87E-08	1,91	20,20	128675,2	30159541	2 (2 0 0 0 0)
APEX nuclease, apurinic/apyrimidinic (abasic) endonuclease, multifunctional DNA repair enzyme, AP lyase, DNA (apurinic or apyrimidinic site) lyase, AP	2,23E-07	2,76	30,19	35532,2	16375501	3 (3 0 0 0 0)
apurinic/apyrimidinic endonuclease [Homo sapiens]	2,23E-07	1,91	20,19	35541,2	218478	2 (2 0 0 0 0)
APEX nuclease=major apurinic/apyrimidinic endonuclease (human, Peptide, 317 aa)	2,23E-07	1,91	20,19	35410,1	299037	2 (2 0 0 0 0)
HAP1 [Homo sapiens]	2,59E-07	1,82	20,15	35447,1	32024	2 (2 0 0 0 0)
neopterin-related C14b product [Homo sapiens]	2,59E-07	1,85	20,18	24028,5	546831	2 (2 0 0 0 0)
Similar to ribosomal protein L6 [Homo sapiens]	2,59E-07	1,85	20,18	32726,7	18088374	2 (2 0 0 0 0)
S5374 ribosomal protein L6, cytosolic - human	2,59E-07	1,85	20,18	32840,6	423071	2 (2 0 0 0 0)
AF261887_1 DNA-binding protein TAXREB107 [Homo sapiens]	2,59E-07	1,85	20,18	32870,7	5802306	2 (2 0 0 0 0)
ribosomal protein L6, 60S ribosomal protein L6, tax-responsive enhancer element-binding protein 107; DNA-binding protein TAXREB107; neopterin-related	2,59E-07	1,85	20,18	32707,6	16753227	2 (2 0 0 0 0)
ribosomal protein L6 [Homo sapiens]	2,59E-07	1,85	20,18	32705,7	21410970	2 (2 0 0 0 0)
ribosomal protein L6 [Homo sapiens]	2,59E-07	1,85	20,18	32721,6	16490263	2 (2 0 0 0 0)
The Crystal Structure Of The Human Dna Repair Endonuclease Hap1 Suggests The Recognition Of Extra-Helical Deoxyribose At Dna Abasic Sites	2,77E-07	1,83	20,19	32234,4	554212	2 (2 0 0 0 0)
A Chain A, Crystal Structure Of Caenorhabditis Elegans Mg-ATP Actin Complexed With Human Gelsolin Segment 1 At 1.75 A Resolution	2,80E-07	1,86	20,16	41637,7	14278147	2 (2 0 0 0 0)
similar to keratin complex-1, acidic, gene C29; keratin complex-1, gene C29 [Homo sapiens]	2,90E-07	1,71	20,14	50463,0	22065094	2 (2 0 0 0 0)
type I inner root sheath specific keratin 25 (ks4) [Homo sapiens]	2,90E-07	1,71	20,14	50564,0	31588823	2 (2 0 0 0 0)
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2, elongation factor-1 alpha; stalin S1; elongation factor-1-alpha 2 [Homo sapiens]	4,08E-07	1,75	20,22	50438,4	4503475	2 (2 0 0 0 0)
ribosomal protein L8, 60S ribosomal protein L8 [Homo sapiens]	7,80E-07	1,93	20,21	28007,3	4506663	2 (2 0 0 0 0)
AH02047 Similar to ribosomal protein L8 [Homo sapiens]	7,80E-07	1,93	20,21	23205,1	12652605	2 (2 0 0 0 0)
AH12197 Similar to ribosomal protein L8 [Homo sapiens]	7,80E-07	1,93	20,21	27983,3	15982586	2 (2 0 0 0 0)

Anhang

Tabelle A7. Gel Kapitel 4.5, Abbildung 37, Spur 9, Bande d.

Reference	P (pro)	Sf	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)
keratin 1; Keratin-1; cytokeratin 1; hair alpha protein [Homo sapiens]	6,66E-14	20,73	228,25	66027,0	17318569	23 (22 1 0 0 0)
K2C1_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1) (K1) (CK 1) (67 kDa cytokeratin) (6,66E-14	18,39	198,25	65977,9	1346343	20 (19 1 0 0 0)
KRHU2 keratin 1, type II, cytoskeletal - human	1,08E-12	15,52	168,23	65454,4	7428712	17 (16 1 0 0 0)
keratin 2a [Homo sapiens]	1,69E-12	16,82	180,25	65825,4	4557703	18 (18 0 0 0 0)
cytokeratin 9 [Homo sapiens]	2,05E-11	4,69	50,27	62091,8	435476	5 (5 0 0 0 0)
keratin 9 [Homo sapiens]	2,05E-11	3,73	40,27	61949,7	4557705	4 (4 0 0 0 0)
mutant keratin 9 [Homo sapiens]	2,05E-11	2,75	30,26	25912,7	1890020	3 (3 0 0 0 0)
similar to keratin protein K6rs [Homo sapiens] [Rattus norvegicus]	2,98E-08	7,52	80,24	181693,3	27665236	8 (8 0 0 0 0)
K2C8_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8) (K8) (CK 8)	2,98E-08	2,76	30,17	53641,2	2506774	3 (3 0 0 0 0)
K2CF_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 6F (Cytokeratin 6F) (CK 6F) (K6F keratin)	5,87E-07	6,33	70,17	60030,3	1346349	7 (7 0 0 0 0)

Tabelle A8. Gel Kapitel 4.5, Abbildung 37, Spur 8, Bande a.

Reference	P (pro)	Sf	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)
clathrin heavy chain; clathrin, heavy polypeptide-like 2 [Homo sapiens]	3,24E-09	5,64	60,21	191491,7	4758012	6 (6 0 0 0 0)
QLTC protein [Homo sapiens]	3,24E-09	5,64	60,21	18770,1	30353925	6 (6 0 0 0 0)
G01880 fatty-acid synthase (EC 2.3.1.85) (version 2) - human	2,72E-08	4,75	50,21	272916,3	7433799	5 (5 0 0 0 0)
fatty acid synthase [Homo sapiens]	2,72E-08	4,75	50,21	273090,5	21618359	5 (5 0 0 0 0)
PPOL_HUMAN Poly [ADP-ribose] polymerase-1 (PARP-1) (ADPRT) (NAD(+) ADP-ribosyltransferase-1) (Poly[ADP-ribose] synthetase-1)	2,84E-08	4,59	50,22	113012,4	130781	5 (5 0 0 0 0)
ADP-ribosyltransferase (NAD+; poly (ADP-ribose) polymerase) [Homo sapiens]	5,21E-08	2,89	30,18	112984,4	22923366	5 (5 0 0 0 0)
poly[ADP-ribose]transferase; ADP-ribosyltransferase (NAD+); poly(ADP-ribose) synthetase [Homo sapiens]	2,84E-08	4,59	50,22	113063,5	4501955	5 (5 0 0 0 0)
cytokeratin 9 [Homo sapiens]	2,99E-08	3,65	40,29	62091,8	435476	4 (4 0 0 0 0)
mutant keratin 9 [Homo sapiens]	2,99E-08	3,65	40,29	25912,7	1890020	4 (4 0 0 0 0)
keratin 9 [Homo sapiens]	2,99E-08	3,65	40,29	61949,7	4557705	4 (4 0 0 0 0)
KRHU2 keratin 1, type II, cytoskeletal - human	3,78E-08	7,53	80,26	65454,4	7428712	8 (8 0 0 0 0)
keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris) [Homo sapiens]	6,80E-08	5,77	60,27	58791,5	21961605	6 (6 0 0 0 0)
KRHU0 keratin 10, type I, cytoskeletal - human	6,80E-08	5,77	60,27	59491,8	71528	6 (6 0 0 0 0)
K1CJ_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10) (K10) (CK 10)	6,80E-08	5,77	60,27	59462,8	547749	6 (6 0 0 0 0)
keratin 10; Keratin-10 [Homo sapiens]	6,80E-08	3,94	40,27	57213,0	457697	4 (4 0 0 0 0)
FUSE binding protein 2 [Homo sapiens]	8,38E-08	2,90	30,22	68393,2	1575607	3 (3 0 0 0 0)
KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2); KH-type splicing regulatory protein (FUSE-binding protein 2) [Homo sapiens]	8,38E-08	2,90	30,22	73116,1	4504865	3 (3 0 0 0 0)
keratin 13 isoform b; keratin, type I cytoskeletal 13; cytokeratin 13 [Homo sapiens]	9,78E-08	1,89	20,20	45836,7	4504911	2 (2 0 0 0 0)

Tabelle A9. Gel Kapitel 4.5, Abbildung 37, Spur 9, Bande a.

Reference	P (pro)	Sf	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)
cytokeratin 9 [Homo sapiens]	5,91E-13	1,65	20,34	62091,8	435476	2 (2 0 0 0 0)
keratin 9 [Homo sapiens]	5,91E-13	1,65	20,34	61949,7	4557705	2 (2 0 0 0 0)
clathrin heavy chain; clathrin, heavy polypeptide-like 2 [Homo sapiens]	5,21E-08	2,89	30,18	191491,7	4758012	3 (3 0 0 0 0)
CLTC protein [Homo sapiens]	5,21E-08	2,89	30,18	18770,1	30353925	3 (3 0 0 0 0)
keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris) [Homo sapiens]	3,53E-07	2,84	30,19	58791,5	21961605	3 (3 0 0 0 0)
KRHU0 keratin 10, type I, cytoskeletal - human	3,53E-07	2,84	30,19	59491,8	71528	3 (3 0 0 0 0)
K1CJ_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10) (K10) (CK 10)	3,53E-07	2,84	30,19	59462,8	547749	3 (3 0 0 0 0)
keratin 10; Keratin-10 [Homo sapiens]	3,53E-07	1,89	20,19	57213,0	457697	2 (2 0 0 0 0)
keratin 1; Keratin-1; cytokeratin 1; hair alpha protein [Homo sapiens]	1,74E-06	6,73	68,25	66027,0	17318569	7 (6 1 0 0 0)
K2C1_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1) (K1) (CK 1) (67 kDa cytokeratin) (1,74E-06	6,73	68,25	65977,9	1346343	7 (6 1 0 0 0)
KRHU2 keratin 1, type II, cytoskeletal - human	1,74E-06	4,80	48,25	65454,4	7428712	5 (4 1 0 0 0)
keratin 7; keratin, simple epithelial type I, K7; keratin, type II cytoskeletal 7; cytokeratin 7; sar	5,05E-06	2,04	28,22	51387,4	30089956	3 (2 1 0 0 0)
Human Serum Albumin In A Complex With Myristic Acid And Tri-iodobenzoic Acid	4,95E-05	1,87	20,25	65992,9	4389275	2 (2 0 0 0 0)
albumin precursor; PRC0883 protein [Homo sapiens]	4,95E-05	1,87	20,25	69321,6	4502027	2 (2 0 0 0 0)
A Chain A, Crystal Structure Of Human Serum Albumin	4,95E-05	1,87	20,25	66429,1	3212456	2 (2 0 0 0 0)
serum albumin [Homo sapiens]	4,95E-05	1,87	20,25	69348,7	23307793	2 (2 0 0 0 0)
A Chain A, Human Serum Albumin Mutant R218h Complexed With Thyroxine (3,3',5,5'-Tetraio	4,95E-05	1,87	20,25	66410,1	31615330	2 (2 0 0 0 0)
A Chain A, Human Serum Albumin Mutant R218p Complexed With Thyroxine (3,3',5,5'-Tetraio	4,95E-05	1,87	20,25	66370,0	31615331	2 (2 0 0 0 0)

Tabelle A10. Gel Kapitel 4.5, Abbildung 37, Spur 8, Bande e.

Reference	P (pro)	Sf	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)
8-oxoguanine DNA glycosylase isoform 1c; 8-hydroxyguanine DNA glycosylase [Homo sapiens]	6,76E-12	8,97	100,25	45732,2	8670532	10 (10 0 0 0 0)
8-oxoguanine DNA glycosylase isoform 2e; 8-hydroxyguanine DNA glycosylase [Homo sapiens]	6,76E-12	8,97	100,25	36062,2	8670542	10 (10 0 0 0 0)
8-oxoguanine DNA glycosylase isoform 1a; 8-hydroxyguanine DNA glycosylase [Homo sapiens]	6,76E-12	8,97	100,25	38757,7	4505495	10 (10 0 0 0 0)
8-oxoguanine DNA glycosylase isoform 2a; 8-hydroxyguanine DNA glycosylase [Homo sapiens]	6,76E-12	8,97	100,25	47206,8	8670534	10 (10 0 0 0 0)
8-oxoguanine DNA glycosylase isoform 1b; 8-hydroxyguanine DNA glycosylase [Homo sapiens]	6,76E-12	8,97	100,25	36409,5	8670530	10 (10 0 0 0 0)
8-oxoguanine DNA glycosylase isoform 2d; 8-hydroxyguanine DNA glycosylase [Homo sapiens]	6,76E-12	8,97	100,25	40069,2	8670540	10 (10 0 0 0 0)
A Chain A, Structural And Biochemical Exploration Of A Critical Amino Acid In Human 8-Oxoguanine Glycosylase	6,76E-12	8,97	100,25	35597,0	28948718	10 (10 0 0 0 0)
8-oxoguanine DNA glycosylase isoform 2b; 8-hydroxyguanine DNA glycosylase [Homo sapiens]	6,76E-12	8,04	90,25	39704,2	8670536	9 (9 0 0 0 0)
OGG1 protein type 2a [Homo sapiens]	6,76E-12	7,08	80,25	26848,5	4587156	8 (8 0 0 0 0)
OGG1 protein type 2d [Homo sapiens]	6,76E-12	7,08	80,25	30855,5	4587154	8 (8 0 0 0 0)
T45069 8-hydroxy-guanine glycosylase homolog ogg1 [imported] - human	6,76E-12	3,76	40,21	39015,8	11281913	4 (4 0 0 0 0)
uracil DNA glycosylase [Homo sapiens]	8,08E-10	2,90	30,22	35470,1	35053	3 (3 0 0 0 0)
beta-lactamase.human IgG3 hinge fusion [synthetic construct]	3,21E-10	4,73	50,28	39017,6	509142	5 (5 0 0 0 0)
OGG1 type 1e [Homo sapiens]	5,52E-10	1,75	20,25	19479,9	10038661	2 (2 0 0 0 0)
keratin [Homo sapiens]	3,59E-08	1,89	20,17	27644,7	7717238	2 (2 0 0 0 0)
8-oxoguanine DNA glycosylase isoform 2c; 8-hydroxyguanine DNA glycosylase [Homo sapiens]	9,52E-08	5,37	60,24	22196,2	8670538	6 (6 0 0 0 0)
Homo sapiens high-mobility group box 1 [synthetic construct]	4,85E-08	1,78	20,15	24991,3	3058414	2 (2 0 0 0 0)
similar to dJ579F2.0.1 (high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 1-like 1) [Homo sapiens]	4,85E-08	1,78	20,15	24222,8	27501004	2 (2 0 0 0 0)
HMG-1 [Homo sapiens]	4,85E-08	1,78	20,15	24977,3	968888	2 (2 0 0 0 0)
high-mobility group box 1; high mobility group box 1; high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 1; Sulfogl	4,85E-08	1,78	20,15	24878,2	4504425	2 (2 0 0 0 0)
high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 1-like 10 [Homo sapiens]	4,85E-08	1,78	20,15	24203,0	28376646	2 (2 0 0 0 0)
similar to High mobility group protein 1 (HMG-1) (Amphoterin) (Heparin-binding protein p30) [Homo sapiens]	4,85E-08	1,78	20,15	21195,4	30154820	2 (2 0 0 0 0)
S29857 nonhistone chromosomal protein HMG-1 - human	4,85E-08	1,78	20,15	24968,2	478813	2 (2 0 0 0 0)

Anhang

Tabelle A11. Gel Kapitel 4.5, Abbildung 37, Spur 9, Bande e.

Reference	P (pro)	Sf	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)
keratin 1; Keratin-1; cytokeratin 1; hair alpha protein [Homo sapiens]	8,64E-11	19,40	208,29	66027,0	17318569	21 (20 1 0 0 0)
K2C1_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1) (K1) (CK 1) (67 kDa cytokeratin) (8,64E-11	18,49	198,29	65977,9	1346343	20 (19 1 0 0 0)
KRHU2 keratin 1, type II, cytoskeletal - human	8,64E-11	14,73	158,29	65454,4	7428712	16 (15 1 0 0 0)
Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [synthetic construct]	7,39E-10	7,46	80,28	36143,5	30584593	8 (8 0 0 0 0)
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]	7,39E-10	7,46	80,28	36031,4	31645	8 (8 0 0 0 0)
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]	7,39E-10	7,46	80,28	36030,4	7669492	8 (8 0 0 0 0)
<u>uracil DNA glycosylase [Homo sapiens]</u>	7,39E-10	5,57	60,28	35470,1	35053	6 (6 0 0 0 0)
similar to Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, liver (GAPDH) [Homo sapiens]	7,39E-10	2,90	30,24	26899,4	29739414	3 (3 0 0 0 0)
G3P1_HUMAN Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, muscle	1,46E-09	1,92	20,23	35853,3	120643	2 (2 0 0 0 0)
mutant keratin 9 [Homo sapiens]	5,96E-09	5,53	60,29	25912,7	1890020	6 (6 0 0 0 0)
similar to keratin protein K6irs [Homo sapiens] [Rattus norvegicus]	3,38E-08	3,88	40,25	181693,3	27665236	4 (4 0 0 0 0)
keratin 14; cytokeratin 14 [Homo sapiens]	4,64E-08	2,88	30,22	51589,5	15431310	3 (3 0 0 0 0)
Keratin 14 [Homo sapiens]	4,64E-08	2,88	30,22	51619,5	12803709	3 (3 0 0 0 0)

Tabelle A12. Gel Kapitel 4.5, Abbildung 37, Spur 7: Charakteristisches Ergebnis einer Messung des unspezifischen Hintergrundes (nur Keratine und sonstige Verunreinigungen, keine relevanten Proteine).

Reference	P (pro)	Sf	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)
keratin 10 (epidemolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris) [Homo sapiens]	1,11E-15	14,62	160,31	58791,5	21961605	16 (16 0 0 0 0)
KRHUO keratin 10, type I, cytoskeletal - human	1,11E-15	13,86	150,31	59491,8	71528	15 (15 0 0 0 0)
K1CJ_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10) (K10) (CK 10)	1,11E-15	13,86	150,31	59482,8	547749	15 (15 0 0 0 0)
keratin 10; Keratin-10 [Homo sapiens]	1,11E-15	12,92	140,31	57213,0	4557697	14 (14 0 0 0 0)
cytokeratin 9 [Homo sapiens]	1,11E-15	8,44	90,35	62091,8	435476	9 (9 0 0 0 0)
keratin 9 [Homo sapiens]	1,11E-15	8,44	90,35	61949,7	4557705	9 (9 0 0 0 0)
mutant keratin 9 [Homo sapiens]	1,11E-15	6,50	70,35	25912,7	1890020	7 (7 0 0 0 0)
keratin 2a [Homo sapiens]	1,55E-14	15,93	180,29	65825,4	4557703	18 (18 0 0 0 0)
keratin 1; Keratin-1; cytokeratin 1; hair alpha protein [Homo sapiens]	2,30E-12	16,86	178,23	66027,0	17318569	18 (17 1 0 0 0)
K2C1_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1) (K1) (CK 1) (67 kDa cytokeratin) (2,30E-12	16,14	168,23	65977,9	1346343	17 (16 1 0 0 0)
KRHU2 keratin 1, type II, cytoskeletal - human	2,30E-12	13,26	138,23	65454,4	7428712	14 (13 1 0 0 0)
keratin 14; cytokeratin 14 [Homo sapiens]	1,14E-11	4,52	50,19	51589,5	15431310	5 (5 0 0 0 0)

Identifizierungs-Daten der wichtigsten markierten Proteine:

PARP-1: gj|130781; APEX-Nuklease: gj|219474; Uracil-DNA-Glycosylase: gj|35053; HMG1: gj|968888; hOGG1: gj|8670532.

7.6 Ausgewählte MS/MS-Spektren wichtiger Peptide der markierten Proteine

Wie dargestellt, wurden zu den markierten Proteinen jeweils mehrere Peptide gefunden, mit denen die Proteine eindeutig charakterisiert werden konnten. Im Folgenden sind exemplarisch von einigen dieser Peptide die MS/MS-Spektren dargestellt, wie sie von der *Orbitrap XL* Massenspektrometrie-Anlage gemessen und von der *BioWorks3.3.1*-software ausgegeben wurden. Farblich markiert sind die gefundenen b/y-Ionenpaare, bei denen es sich um charakteristische Werte der jeweiligen Peptide handelt (siehe auch Kapitel 1.3.2.).

Anhang

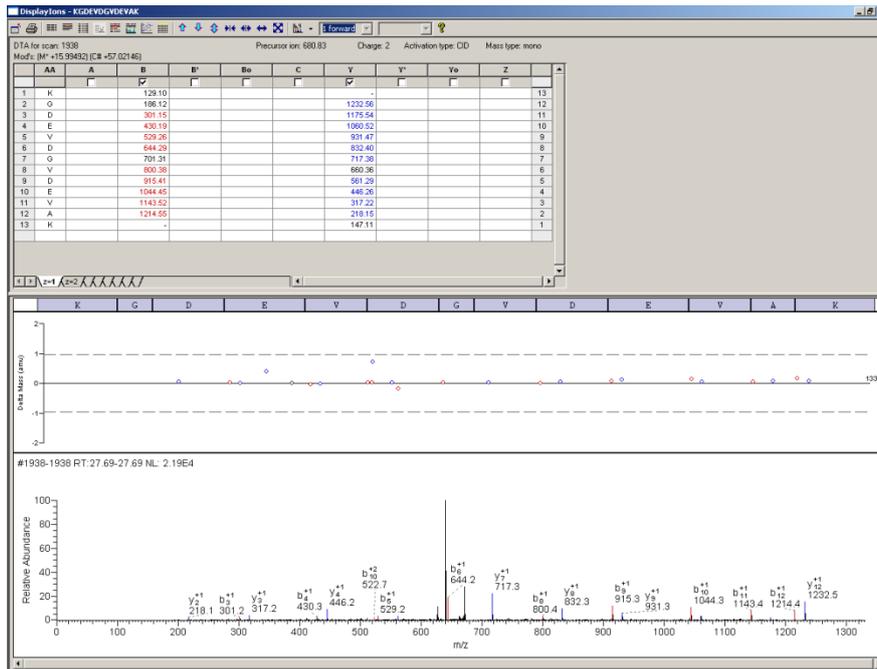


Abbildung A3. Protein: PARP-1; Peptid: KGDEVDGVDEAK; MH^+ : 1360.66; Ionen gefunden/erwartet: 19/24.

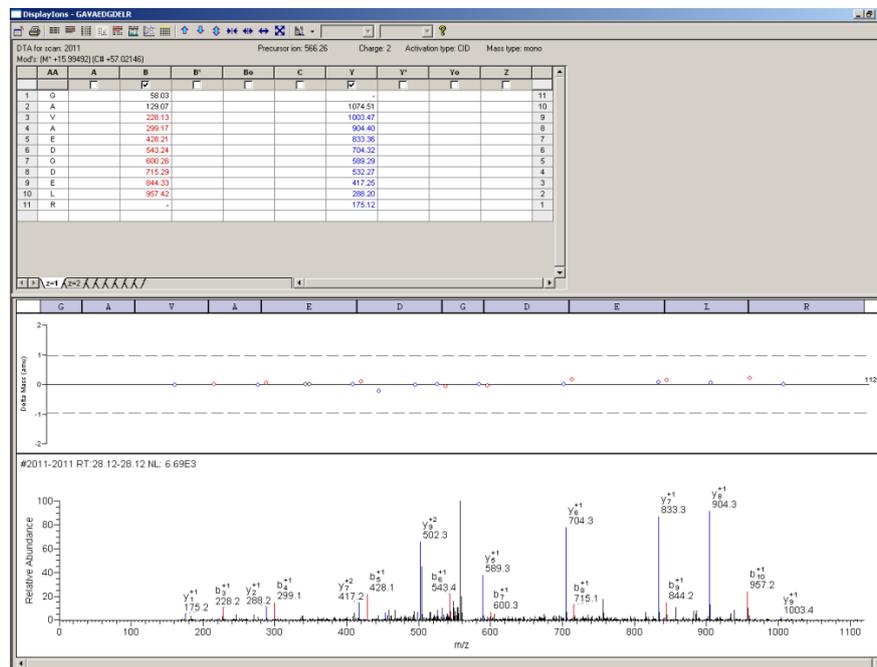


Abbildung A4. Protein: APEX-Nuklease; Peptid: GAVAEDGDEL R; MH^+ : 1131.53; Ionen gefunden/erwartet: 17/20.

Anhang

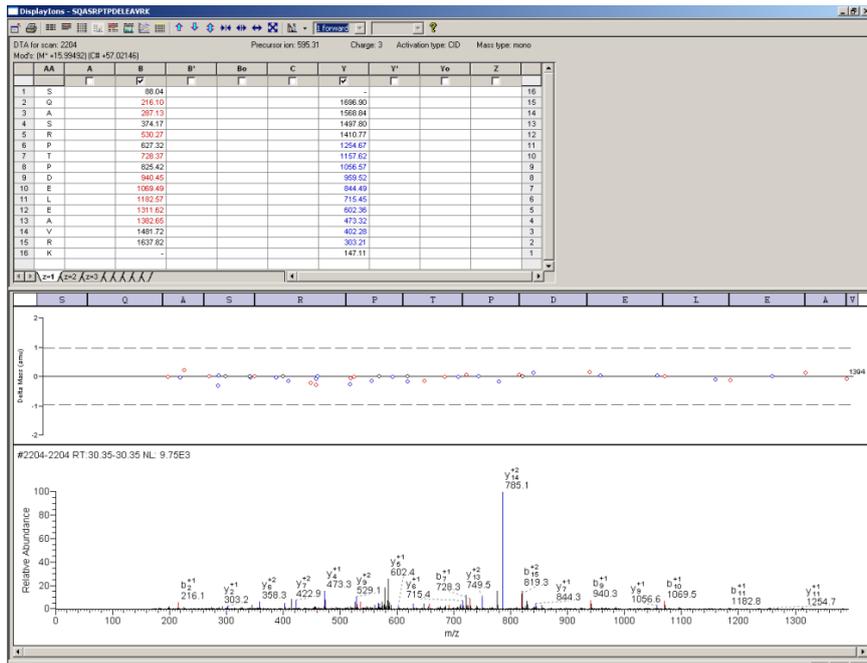


Abbildung A5. Protein: hOGG1; Peptid: SQASRPTPELEAVRK; MH+: 1783.93; Ionen gefunden/erwartet: 19/30.

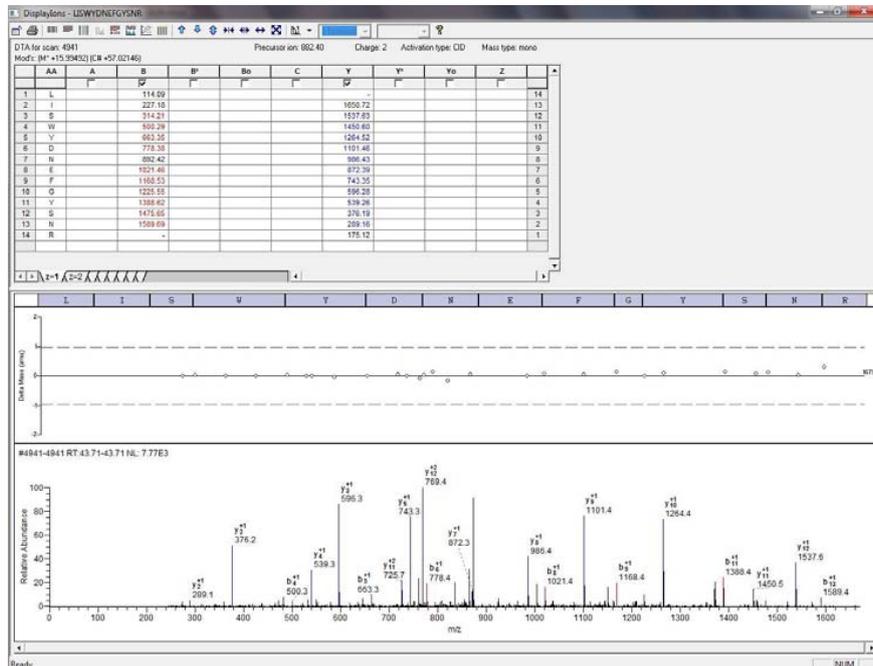


Abbildung A6. Protein: hOGG1; Peptid: LISWYDNEFGYSNIR; Ionen gefunden/erwartet 19/30.

7.7 Markierung und Charakterisierung DNA-reparierender Proteine mittels *DNA-Protein-Interaction-Screenings*

Wie in Kapitel 4.7 beschrieben, wurden in Kooperation mit dem MPI für Biochemie in Martinsried für bestimmte DNA-Schäden *DNA protein interaction screens* durchgeführt, wobei die Schadenserkennung für die „Motive“ 8-Oxo-dG, CPD (T=T-Dimer), 1,2-*cis*-Pt und 1,3-*cis*-Pt untersucht wurden. Detaillierte Tabellen zu diesen Messungen sind im Folgenden dargestellt.

Tabelle A13. Ergebnisse des *interaction screens*: Proteine mit spezifischer Affinität zum 8-Oxo-dG-Motiv (Auswahl).

Protein Names	Gene Names	Ratio forward H/L	Ratio reverse H/L	Ratio H/L Count forward	Ratio H/L Count reverse
Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase; Polynucleotide kinase-3'-phosphatase; DNA 5'-kinase/3'-phosphatase; Polynucleotide 3'-phosphatase; 2'(3')-polynucleotidase; Polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase; PNKP protein	PNKP	11,268	0,034357	14	10
Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1; TDP1 protein; Full-length cDNA clone CS0DI031YK16 of Placenta of Homo sapiens (human)	TDP1	7,1305	0,023276	5	4
DNA polymerase beta	POLB	6,2491	0,11333	14	25
Aprataxin; Forkhead-associated domain histidine triad-like protein; Aprataxin variant LE5	APTX; AXA1; RP11-562M8.1-005	2,9925	0,19639	5	8
DNA repair protein XRCC1; X-ray repair cross-complementing protein 1	XRCC1	2,797	0,18134	29	29
Endonuclease III-like protein 1	NTHL1; NTH1; OCTS3	2,4333	0,21953	7	8
DNA damage-binding protein 1; Damage-specific DNA-binding protein 1; UV-damaged DNA-binding factor; DDB p127 subunit; DNA damage-binding protein a; UV-damaged DNA-binding protein 1; Xeroderma pigmentosum group E-complementing protein; XPE-binding factor; HBV X-associated protein 1	DDB1; XAP1	1,9647	0,27914	12	8
UV excision repair protein RAD23 homolog B; XP-	RAD23B	1,1154	0,57691	8	5

Anhang

C repair-complementing complex 58 kDa protein					
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1;DNA-directed RNA polymerase II subunit E;RPB5;DNA-directed RNA polymerase II 23 kDa polypeptide;XAP4	POLR2E	0,9139	0,56335	5	6
Poly [ADP-ribose] polymerase 1;ADPRT;NAD(+) ADP-ribosyltransferase 1;Poly[ADP-ribose] synthetase 1	PARP1;ADP RT;PPOL	0,89853	0,26696	199	169

Tabelle A14. Ergebnisse des *interaction screens*: Proteine mit spezifischer Affinität zum CPD(T=T-Dimer)-Motiv (Auswahl).

Protein Names	Gene Names	Ratio H/L forward	Ratio H/L reverse	Ratio H/L Count forward	Ratio H/L Count reverse
Protein RRP5 homolog;Programmed cell death protein 11	PDCD11;KIAA0185	0,045995	10,181	339	285
RNA-binding protein 28;RNA-binding motif protein 28	RBM28	0,075004	5,9767	54	43
Nucleolar RNA helicase 2;Nucleolar RNA helicase II;	DDX21;OK/SW-cl.65	0,14237	4,2602	244	133
Nucleolar protein 6;Nucleolar RNA-associated protein	NOL6	0,21574	3,2832	29	18
Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15;SUB1 homolog	SUB1;PC4;RPO2TC1;hCG_1781938	0,21134	2,9039	15	18
Ribosomal L1 domain-containing protein 1;Cellular senescence-inhibited gene protein	RSL1D1;CATX11;CSIG;PBK1;L12	0,28152	2,3703	147	93
DNA ligase 3;DNA ligase III;Polydeoxyribonucleotide synthase [ATP] 3;LIG3 prtein	LIG3	0,25521	2,2602	80	50
Aprataxin;Forkhead-associated domain histidine triad-like protein;Aprataxin, isoform a	APTX;AXA1;RP11-562M8.1-003;RP11-562M8.1-004;hCG_30273	0,19506	3,2777	6	5
DNA repair protein XRCC1;X-ray repair cross-complementing protein 1	XRCC1	0,24769	2,4151	8	11
Ribosomal RNA-processing protein 7 homolog A;Gastric cancer antigen Zg14	RRP7A;CGI-96	0,19621	3,1327	9	8

Anhang

THO complex subunit 4;Ally of AML-1 and LEF-1;Transcriptional coactivator Aly/REF;bZIP-enhancing factor BEF	THOC4;ALY;BEF	0,29992	2,5042	5	5
SPATS2-like protein;DNA polymerase-transactivated protein 6	SPATS2L;DNAPTP6;SP1224;DKF ZP564A2416;hCG_1811464	0,35098	2,0581	4	3
Interferon-stimulated 20 kDa exonuclease-like 2	ISG20L2;HSD38;HSD-38	0,37468	2,0267	7	10
Endonuclease III-like protein 1	NTHL1;NTH1;OCTS3	0,44586	1,3018	6	4
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1;ADPRT;PPOL	0,39198	1,199	317	194
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	XRCC5;G22P2	0,65331	1,1689	177	103

Tabelle A15. Ergebnisse des *interaction screens*: Proteine mit spezifischer Affinität zum 1,2-*cis*-Pt-Motiv (Auswahl).

Protein Names	Gene Names	Ratio H/L forward	Ratio H/L reverse	Ratio H/L Count forward	Ratio H/L Count reverse
High mobility group protein B3;High mobility group protein 4;High mobility group protein 2a;Non-histone chromosomal protein	HMGB3;HMG2A;HMG4	18,559	0,023693	16	17
High mobility group protein B1;High mobility group protein 1;High-mobility group box 1	HMGB1;HMG1;RP11-550P23.1-002;RP11-550P23.1-003;HMG1L10;RP11-550P23.1-005	18,280	0,021904	43	47
High mobility group protein B2;High mobility group protein 2;High-mobility group box 2	HMGB2;HMG2	14,121	0,044195	23	18
Cellular nucleic acid-binding protein;Zinc finger protein 9;Cellular nucleic acid binding protein	CNBP;RNF163;ZNF9	12,913	0,029716	2	3
Transcription factor A, mitochondrial;mtTFA;Mitochondrial transcription factor 1	TFAM;TCF6L2	10,595	0,052357	23	18
ATP-dependent DNA helicase Q1;DNA-dependent ATPase Q1;cDNA FLJ76305, highly similar to Homo sapiens RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like) (RECQL)	RECQL;RECQL1;hCG_2009728	8,0995	0,0936	7	4
DnaJ homolog subfamily C member 13;Required for receptor-mediated endocytosis 8	DNAJC13;KIAA0678;RME8	6,609	0,084157	80	64
DNA repair protein XRCC1;X-ray repair cross-complementing protein 1	XRCC1	3,2606	0,21126	8	10

Anhang

Nucleolar transcription factor 1;Upstream-binding factor 1;Autoantigen NOR-90;UBTF protein;Upstream binding transcription factor, RNA polymerase I	UBTF;UBF;UBF1	2,8123	0,2559	143	159
DNA ligase 3;DNA ligase III;Polydeoxyribonucleotide synthase [ATP] 3;LIG3 protein	LIG3	2,4726	0,23954	44	30
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 30;Mediator complex subunit 30	MED30;THRAP6;TRAP25	1,6776	0,55822	2	2
DNA mismatch repair protein Msh6;MutS-alpha 160 kDa subunit;G/T mismatch-binding protein;p160;GTBP-ALT;MSH6 protein	MSH6;GTBP	1,5492	0,62486	3	16
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3;DNA-directed RNA polymerase II subunit H;DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 17.1 kDa polypeptide;RPB17;hRPB8	POLR2H	1,3071	0,56967	7	4
Cisplatin resistance-associated overexpressed protein;cAMP regulatory element-associated protein 1;Luc7A	CROP;CREAP1;O48	1,0121	0,68979	20	19
Pre-mRNA-splicing factor SYF1;XPA-binding protein 2;Protein HCNP;Putative uncharacterized protein DKFZp762C1015;Crn-related protein kim1	XAB2;HCNP;KIAA1177;SYF1;PP3898 ;DKFZp762C1015	0,81288	0,75386	21	11
Poly [ADP-ribose] polymerase 1;ADPRT;NAD(+) ADP-ribosyltransferase 1;Poly[ADP-ribose] synthetase 1;PARP1 protein;Poly(ADP-ribose) polymerase	PARP1;ADPRT;PPOL	0,66438	0,79203	599	587

Tabelle A16. Ergebnisse des *interaction screens*: Proteine mit spezifischer Affinität zum 1,3-*cis*-Pt-Motiv (Auswahl).

Protein Names	Gene Names	Ratio H/L forward	Ratio H/L reverse	Ratio H/L Count forward	Ratio H/L Count reverse
ATP-dependent DNA helicase Q1;DNA-dependent ATPase Q1;cDNA FLJ76305, highly similar to Homo sapiens RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like) (RECQL), transcript variant 1, mRNA;RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like), isoform CRA_a;Putative uncharacterized protein RECQL	RECQL;RECQL1;hCG_2009728	10,348	0,041394	10	10
Alpha-tropomyosin;Tropomyosin;Tropomyosin alpha-1 chain;Tropomyosin-1;Tropomyosin 1 alpha variant 6;TPM1 protein variant;Tropomyosin 1 (Alpha)	TPM1;C15orf13;TMSA;hCG_33495 ?	2,0749	0,22134	2	2
High mobility group protein B2;High mobility group protein 2;High-mobility	HMGB2;HMG2	1,7722	0,46165	4	5

Anhang

group box 2					
Transcriptional activator protein Pur-beta;Purine-rich element-binding protein B;Purine-rich element binding protein B	PURB;hCG_1640255;tcag7.811	1,4837	0,62233	5	4
High mobility group protein B1;High mobility group protein 1;High-mobility group box 1;High-mobility group box 1 variant;High mobility group protein 1-like 10;High mobility group 1 protein;High mobility group protein HMG1;Similar to nonhistone chromosomal protein HMG-1 [Homo sapiens];	HMGB1;HMG1;RP11-550P23.1-002;RP11-550P23.1-003;HMG1L10;RP11-550P23.1-005;WUGSC:H_NH0244E06.1	1,4065	0,40192	8	3
ATP-dependent RNA helicase DDX54;DEAD box protein 54;ATP-dependent RNA helicase DP97;DEAD box RNA helicase 97 kDa	DDX54	1,2608	0,9111	49	54
DNA mismatch repair protein Msh2;MutS protein homolog 2;Truncated mutS homolog 2 protein;MSH2-Ex10 isoform;MutS homolog 2 variant;Putative uncharacterized protein MSH2;Mutant mismatch repair protein	MSH2	1,1566	0,92418	15	11
Elongation factor 1-alpha 1;eEF1A-1;Elongation factor Tu;Leukocyte receptor cluster member 7;Elongation factor 1-alpha;EEF1A1 protein;Putative elongation factor 1-alpha-like 3;eEF1A-like 3;Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1;Putative uncharacterized protein;Elongation factor 1-alpha 2;eEF1A-2;Statin S1	EEF1A1;EEF1A;EF1A;LENG7;PTI-1;EEF1A1L14;RP11-505P4.2-001;hCG_2033271;EEF1A13;RP11-505P4.2-003;EEF1A2;EEF1A1;STN	1,0835	0,60864	25	32
DNA mismatch repair protein Msh6;MutS-alpha 160 kDa subunit;G/T mismatch-binding protein;p160;GTBP-ALT;MSH6 protein	MSH6;GTBP	1,0746	0,86835	24	26
Endonuclease III-like protein 1	NTHL1;NTH1;OCTS3	1,0657	0,8773	3	3
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC5;DNA-directed RNA polymerase III subunit L;RPB10;DNA-directed RNA polymerase II 7.6 kDa polypeptide;RPB7.6;POLR2L protein;cDNA, FLJ92271, Homo sapiens polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L,7.6kDa (POLR2L), mRNA	POLR2L	1,0651	0,77032	2	2
DNA damage-binding protein 1;Damage-specific DNA-binding protein 1;UV-damaged DNA-binding factor;DDB p127 subunit;DNA damage-binding protein a;UV-damaged DNA-binding protein 1;Xeroderma pigmentosum group E-complementing protein;XPE-binding factor;HBV X-associated protein 1	DDB1;XAP1	1,0142	0,74439	7	7
DNA repair protein complementing XP-C cells;Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein;p125;cDNA FLJ76216, highly similar to Homo sapiens xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC), mRNA	XPC;XPCC	0,91514	0,74208	2	3
Poly [ADP-ribose] polymerase 1;ADPRT;NAD(+) ADP-ribosyltransferase 1;Poly[ADP-ribose] synthetase 1;PARP1 protein;Poly(ADP-ribose) polymerase	PARP1;ADPRT;PPOL	0,72011	0,74221	474	440

7.8 Mascot Search Results (Beispiel)

Die MALDI-Messungen mit anschließender Peptidanalytik über die *BioTools*-Software von *Bruker* (Mascot-Algorithmus) hatten bei weitem nicht die Aussagekraft der oben geschilderten ESI-Messungen. Da diese Methode jedoch auch oft getestet wurde und aufgrund einiger Vorteile auch weiter in Bearbeitung ist, soll hier exemplarisch ein derartiger Datensatz gezeigt werden (*photoaffinity-labeling*-Experiment mit dem Hefe-Lysat, siehe Kapitel 6.4.8, Gelbände im Bereich B). Die Peptide der aufgelisteten Proteine sind nicht im Detail gezeigt.

Mascot Search Results

User: Winacker
 Email: malte.winacker@cup.uni-muenchen.de
 Search title: HeFe-4a
 Database: MCBur 20100507 (1894950 sequences; 372637036 residues)
 Taxonomy: Saccharomyces Cerevisiae (baker's yeast) (26180 sequences)
 Timestamp: 11 May 2010 at 11:39:58 GMT
 Top score: 32 Ex q1207344913_Y08250p-Like protein [Saccharomyces cerevisiae AMR11631]

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 57 are significant ($p < 0.05$).

Protein Summary Report

Format As: Protein Summary Help
 Significance threshold p < 0.05 Max number of hits 20

Overview Table

Click on column header to jump to entry in results list.
 Move mouse over any indicator to highlight identical peptides.
 Click on an indicator to see details of individual match.
 Use check boxes to select sub-set of queries for new search.

Mouse over: Query Accession Sequence

Hit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
222.0506 (1+)																					
280.5014 (1+)																					
280.8456 (1+)																					
296.3378 (1+)																					
296.5085 (1+)																					
1000.1592 (1+)																					
1009.9571 (1+)																					
1016.7959 (1+)																					
1068.5207 (1+)																					
1085.2095 (1+)																					
1101.0841 (1+)																					
1101.0886 (1+)																					
1173.4953 (1+)																					
1279.5310 (1+)																					
1312.3105 (1+)																					

Select All Select None Search Selected

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. q1207344913	41740	32	Y08250p-Like protein [Saccharomyces cerevisiae AMR11631]
2. q11632212	55889	30	Forkhead Associated domain containing protein and putative transcription factor found associated with
3. q119049252	55869	30	conserved hypothetical protein [Saccharomyces cerevisiae PH1-1a]
4. q123214812	56235	30	Tus4p [Saccharomyces cerevisiae EC118]
5. q118358	56417	28	putative cyclohexane P450 [Saccharomyces cerevisiae]
6. q116320618	56435	27	pat1p [Saccharomyces cerevisiae]
7. q1151794232	56482	27	N-formyltryptophan oxidase [Saccharomyces cerevisiae Y0N789]
8. q119232653	59911	27	Y08404p-Like protein [Saccharomyces cerevisiae AMR11631]
9. q116322938	72799	24	Out2p [Saccharomyces cerevisiae]
10. q1151013185	72827	24	Y1155c [Saccharomyces cerevisiae]
11. q116323172	77113	23	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit [Saccharomyces cerevisiae]
12. q116323914	64934	22	Protein of unknown function with similarity to F-box proteins; physically interacts with Skp1; green
13. q115040804	64904	22	conserved hypothetical protein [Saccharomyces cerevisiae PH1-1a]
14. q1207342111	64921	22	Y08250cp-Like protein [Saccharomyces cerevisiae AMR11631]
15. q1139535945	62392	22	Class A, Solution Structure of The U-Box of Fcp19
16. q116323223	55399	21	Hos1p [Saccharomyces cerevisiae]
17. q1151342831	55310	21	conserved protein [Saccharomyces cerevisiae Y0N789]
18. q1150440804	55311	21	histone deacetylase HD1 [Saccharomyces cerevisiae PH1-1a]
19. q119232659	55316	21	Y08080cp-Like protein [Saccharomyces cerevisiae AMR11631]
20. q1163268938	55309	21	Hos1p [Saccharomyces cerevisiae JAY291]

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABPP	<i>activity-based protein profiling</i>
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
aq.	wässrig
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i>
ber.	berechnet
BER	Basenexcisionsreparatur
BTT	5-Benzylthiotetrazol
Bz	Benzoyl
C	Cytosin
CD	Zirkulardichroismus
CE	Kapillarelektrophorese
CED-Cl	β -Cianoethyl-diisopropylaminochlorophosphin
CHCA	α -Cyanohydroxymethylsäure
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CPG	<i>controlled pore glass</i>
d	Tage
dA	2'-Desoxyadenosin
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	2'-Desoxycytidin
dG	2'-Desoxyguanosin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4, 4'-Dimethoxytrityl-
DMTrCl	4, 4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dT	Thymin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Enzyme mobility shift assay</i>
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i> , Elektronenspinresonanz
eq	Äquivalente
ESI	<i>electron spray injection</i> , Elektronensprayinjektion
EtOAc	Essigsäureethylester
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
β -cFaPydG	carbozyklisches β -FaPydG
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FTICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
FT-IR	Fourier Transform-Infrarotspektroskopie
G	Guanin

Abkürzungsverzeichnis

G	freie Enthalpie
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Hochaufgelöstes Massenspektrum
HUGO	<i>human genome project</i>
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
I	Intensität
ICAT	<i>isotope-coded affinity tagging</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	isoelektrischer Punkt
<i>i</i> Pr	Isopropyl
<i>i</i> Pr-Pac	Isopropyl-phenoxyacetyl
ISC	<i>intersystem crossing</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin
k	Geschwindigkeitskonstante
k	Boltzmannkonstante
kcal	Kilokalorien
L	Liter
<i>LI</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
M	molar
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute
MPI	Max-Planck-Institut
MS	Massenspektrometrie
MS	Molekularsieb
<i>MudPIT</i>	<i>multidimensional protein identification technology</i>
MW	Molekulargewicht
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse/Ladung
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
NEt ₃	Triethylamin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetresonanz
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
Nu.	Nukleophil
5-OH-dU	5-Hydroxydesoxyuridin
8-Oxo-dA	8-Hydroxydesoxyadenosin
8-Oxo-dG	8-Hydroxydesoxyguanosin
Ox.	Oxidation, oxidiert
Pac ₂ O	Phenoxyessigsäureanhydrid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pK _a	Säurekonstante

Abkürzungsverzeichnis

PMF	<i>peptide mass fingerprinting</i>
ppm	<i>parts per million</i>
<i>p</i> -TsCl	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
<i>Py</i>	Pyridin
quant.	quantitativ
Red.	Reduktion, reduziert
rel.	relativ
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
<i>rp</i>	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
RPA	<i>replication protein A</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S.</i>	<i>cerevisiae Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	<i>stable isotope labeling of amino acids in cell culture</i>
Smp.	Schmelzpunkt
T	Thymin
T	Temperatur
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>TF</i>	<i>transcription factor</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS-OMe	Methoxytrimethylsilan
<i>TOF</i>	<i>time of flight</i> , Flugzeit
Tol	Toluol
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
<i>t</i> RNA	<i>transport-RNA</i>
U	<i>units</i>
UV	ultraviolett
ü. N.	über Nacht
Vis	<i>visible</i>
W	Watt
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum A complementing protein</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum C complementing protein</i>

Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171(4356), 737–738. *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.*
- [2] S. D. Bentley, J. Parkhill, *Annu. Rev. Genet.* **2004**, 38, 771–792. *Comparative genomic structure of prokaryotes.*
- [3] C. Tyler-Smith, H. F. Willard, *Curr. Opin. Gen. Dev.* **1993**, 3(3), 390–397. *Mammalian chromosome structure.*
- [4] M. R. Wilkins, K. L. Williams, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser, *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer, Heidelberg, **1997**.
- [5] M. Tyers, M. Mann, *Nature* **2003**, 422(6928), 193–197. *From genomics to proteomics.*
- [6] R. K. Slotkin, R. Martienssen, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, 8(4), 272–285. *Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome.*
- [7] A. Saghatelian, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1(3), 130–142. *Assignment of protein function in the postgenomic era.*
- [8] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, **2006**.
- [9] E. Phizicky, P. I. H. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, S. Fiels, *Nature* **2003**, 422(6928), 208–215. *Protein analysis on a proteomic scale.*
- [10] S. D. Patterson, R. Aebersold, *Nat. Genet.* **2003**, 33(3s), 311–323. *Proteomics: the first decade and beyond.*
- [11] T. Lindahl, *Nature* **1993**, 362(6422), 709–715. *Instability and decay of the primary structure of DNA.*
- [12] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington D.C., **1995**.
- [13] J. Rouse, S. P. Jackson, *Science* **2002**, 297(5581), 547–551. *Interfaces Between the Detection, Signaling, and Repair of DNA Damage.*
- [14] T. Lindahl, R. D. Wood, *Science* **1999**, 286(5446), 1897–1905. *Quality Control by DNA Repair.*
- [15] G. A. Garinis, G. T. J. van der Horst, J. Vijg, J. H.J. Hoeijmakers, *Nat. Cell Biol.* **2008**, 10(11), 1241–1247. *DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem.*
- [16] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42(26), 2946–2974. *Chemistry and Biology of DNA Repair.*
- [17] E. C. Friedberg, R. Wagner, M. Radman, *Science* **2002**, 296(5573), 1627–1630. *Specialized DNA Polymerases, Cellular Survival, and the Genesis of Mutations.*
- [18] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, 411(6835), 366–374. *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.*
- [19] G. L. Verdine, S. D. Bruner, *Chem. Biol.* **1997**, 4(5), 329–334. *How do DNA repair proteins locate damaged bases in the genome?*
- [20] T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5(5), 491–498. *The mechanism of action of DNA photolyases.*
- [21] P. A. Aas, M. Otterlei, P. O. Falnes, C. B. Vagbo, F. Skorpen, M. Akbari, O. Sundheim, M. Bjoras, G. Slupphaug, E. Seeberg, H. E. Krokan, *Nature* **2003**, 421(6925), 859–863. *Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA.*

- [22] T. A. Kunkel, D. A. Erie, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 681–710. *DNA Mismatch Repair**.
- [23] R. P. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett, P. L. Modrich, *Chem. Rev.* **2006**, *106*(2), 302–323. *DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms*.
- [24] K. W. Caldecott, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*(8), 619–631. *Single-strand break repair and genetic disease*.
- [25] D. C. van Gent, J. H. J. Hoeijmakers, R. Kanaar, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*(3), 196–206. *Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection*.
- [26] R. Napolitano, R. Janel-Bintz, J. Wagner, R. P. P. Fuchs, *EMBO J* **2000**, *19*(22), 6259–6265. *All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis*.
- [27] J. Heitman, P. Model, *J. Bacteriol.* **1987**, *169*(7), 3243–3250. *Site-Specific Methylases Induce the SOS DNA Repair Response in Echerichia Coli*.
- [28] A. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 43–81. *DNA Excision Repair*.
- [29] E. Seeberg, L. Eide, M. Bjørås, *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, *20*(10), 391–397. *The base excision repair pathway*.
- [30] W. L. de Laat, N. G. J. Jaspers, J. H. J. Hoeijmakers, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 768–785. *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*.
- [31] J. Cadet, S. Bellon, M. Berger, A.-G. Bourdat, T. Douki, V. Duarte, S. Frelon, D. Gasparutto, E. Muller, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 933–943. *Recent Aspects of Oxidative DNA Damage: Guanine Lesions, Measurement and Substrate Specificity of DNA Repair Glycosylases*.
- [32] J. Cadet, A.-G. Bourdat, C. D’Ham, V. Duarte, D. Gasparutto, A. Romieu, J.-L. Ravanat, *Mut. Res.* **2000**, *462*, 121–128. *Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes*.
- [33] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*(3), 1109–1151. *Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission*.
- [34] S. S. David, V. L. O’Shea, S. Kundu, *Nature* **2007**, *447*(7147), 941–950. *Base-excision repair of oxidative DNA damage*.
- [35] S. L. Allinson, I. I. Dianova, G. L. Dianov, *EMBO J* **2001**, *20*(23), 6919–6926. *DNA polymerase [beta] is the major dRP lyase involved in repair of oxidative base lesions in DNA by mammalian cell extracts*.
- [36] O. D. Schärer, L. Deng, G. L. Verdine, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*(4), 526–531. *Chemical approaches toward understanding base excision DNA repair*.
- [37] S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*(3), 1221–1262. *Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair*.
- [38] S. D. Bruner, D. P. G. Norman, G. L. Verdine, *Nature* **2000**, *403*(6772), 859–866. *Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA*.
- [39] L. C. J. Gillet, O. D. Schärer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*(2), 253–276. *Molecular Mechanisms of Mammalian Global Genome Nucleotide Excision Repair*.
- [40] B.-B. S. Zhou, S. J. Elledge, *Nature* **2000**, *408*(6811), 433–439. *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*.
- [41] T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, R. A. Shara, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*(3), 193–204. *DNA repair pathways as targets for cancer therapy*.
- [42] R. A. Rieger, E. I. Zaika, W. Xie, F. Johnson, A. P. Grollman, C. R. Iden, D. O. Zharkov, *Mol. Cell. Prot.* **2006**, *5*, 858–867. *Proteomic Approach to Identification of Proteins Reactive for Abasic Sites in DNA*.

- [43] K. S. Lilley, A. Razzaq, P. Dupree, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6(1), 46–50. *Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation.*
- [44] V. Santoni, M. Molloy, T. Rabilloud, *Electrophoresis* **2000**, 21(6), 1054–1070. *Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible?*
- [45] G. L. Corthals, V. C. Wasinger, D. F. Hochstrasser, J.-C. Sanchez, *Electrophoresis* **2000**, 21(6), 1104–1115. *The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research.*
- [46] W. F. Patton, B. Schulenberg, T. H. Steinberg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13(4), 321–326. *Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT?*
- [47] C. Winkler, K. Denker, S. Wortelkamp, A. Sickmann, *Electrophoresis* **2007**, 28(12), 2095–2099. *Silver- and Coomassie-staining protocols: Detection limits and compatibility with ESI MS.*
- [48] M. F. Lopez, K. Berggren, E. Chernokalskaya, A. Lazarev, M. Robinson, W. F. Patton, *Electrophoresis* **2000**, 21(17), 3673–3683. *A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling.*
- [49] P. Oh, Y. Li, J. Yu, E. Durr, K. M. Krasinska, L. A. Carver, J. E. Testa, J. E. Schnitzer, *Nature* **2004**, 429(6992), 629–635. *Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy.*
- [50] C. Reichel, V. Jordan, M. Friesen, R. Kulovics, in *Proteomanalyse zur Mesotheliomfrüherkennung, Austrian Research Centers*, **2007**.
- [51] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, 68(5), 850–858. *Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamid Gels.*
- [52] M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19(3), 242–247. *Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology.*
- [53] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, 422(6928), 198–207. *Mass spectrometry-based proteomics.*
- [54] M. A. Baldwin, K. F. Medzihradszky, C. M. Lock, B. Fisher, T. A. Settineri, Burlingame, *Anal. Chem.* **2001**, 73(8), 1707–1720. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Coupled with Quadrupole/Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometry for Protein Discovery, Identification, and Structural Analysis.*
- [55] S. L. Cohen, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **1996**, 68(1), 31–37. *Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins.*
- [56] K. Gevaert, J. Vandekerckhove, *Electrophoresis* **2000**, 21, 1145–1154. *Protein identification methods in proteomics.*
- [57] W. M. Bodnar, R. K. Blackburn, J. M. Krise, M. A. Moseley, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14(9), 971–979. *Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage.*
- [58] G. L. Glish, R. W. Vachet, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2(2), 140–150. *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century.*
- [59] W.-Q. Chen, S.-U. Kang, G. Lubec, *Nat. Protocols* **2006**, 1(3), 1446–1452. *Protein profiling by the combination of two independent mass spectrometry techniques.*
- [60] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B. A. Thomson, *J. Mass Spectrom.* **2001**, 36(8), 849–865. *An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry.*

- [61] Y. Du, F. Meng, S. M. Patrie, L. M. Miller, N. L. Kelleher, *J. Prot. Res.* **2004**, 3(4), 801–806. *Improved Molecular Weight-Based Processing of Intact Proteins for Interrogation by Quadrupole-Enhanced FT MS/MS.*
- [62] M. S. Lipton, L. Paša-Tolić, G. A. Anderson, D. J. Anderson, D. L. Auberry, J. R. Battista, M. J. Daly, J. Fredrickson, K. K. Hixson, H. Kostandarithes, C. Masselon, L. M. Markillie, R. J. Moore, M. F. Romine, Y. Shen, E. Stritmatter, N. Tolić, H. R. Udseth, A. Venkateswaran, K.-K. Wong, R. Zhao, R. D. Smith, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(17), 11049–11054. *Global analysis of the Deinococcus radiodurans proteome by using accurate mass tags.*
- [63] J. V. Olsen, S. E. Ong, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, 3, 608–614. *Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues*.*
- [64] J. V. Olsen, M. Mann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101(37), 13417–13422. *Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectromeric fragmentation.*
- [65] J. Eriksson, D. Fenyö, *J. Prot. Res.* **2004**, 3(5), 979–982. *The Statistical Significance of Protein Identification Results as a Function of the Number of Protein Sequences Searched.*
- [66] M. Eisenacher, J. de Braaf, S. König, *Bioinformatics* **2006**, 22(8), 1002–1003. *Mass Analysis Peptide Sequence Prediction (MAPSP).*
- [67] F. Eisenhaber, P. Bork, *Bioinformatics* **1999**, 15(7), 528–535. *Evaluation of human-readable annotation in biomolecular sequence databases with biological rule libraries.*
- [68] R. Craig, R. C. Beavis, *Bioinformatics* **2004**, 20(9), 1466–1467. *TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra.*
- [69] P. Bork, A. Bairoch, *Trends Genet.* **1996**, 12(10), 425–427. *Go hunting in sequence databases but watch out for the traps.*
- [70] D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Proteomics* **2004**, 4(6), 1534–1536. *Unimod: Protein modifications for mass spectrometry.*
- [71] A. Keller, A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **2002**, 74(20), 5383–5392. *Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search.*
- [72] D. C. Chamrad, G. Koerting, J. Gobom, H. Thiele, J. Klose, H. E. Meyer, M. Blueggel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 376, 1014–1022. *Interpretation of mass spectrometry data for high-throughput proteomics.*
- [73] C. L. Chepanoske, B. E. Richardson, M. v. Rechenberg, J. M. Peltier, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2005**, 19(1), 9–14. *Average peptide score: a useful parameter for identification of proteins derived from database searches of liquid chromatography/tandem mass spectrometry data.*
- [74] K. R. Clauser, P. Baker, A. L. Burlingame, *Anal. Chem.* **1999**, 71(14), 2871–2882. *Role of Accurate Mass Measurement (± 10 ppm) in Protein Identification Strategies Employing MS or MS/MS and Database Searching.*
- [75] J. K. Eng, A. L. McCormack, J. R. Yates lii, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, 5(11), 976–989. *An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database.*
- [76] M. Fälth, K. Sköld, M. Norrman, M. Svensson, D. Fenyö, P. E. Andren, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, 5(6), 998–1005. *SwePep, a Database Designed for Endogenous Peptides and Mass Spectrometry.*
- [77] R. D. LeDuc, G. K. Taylor, Y.-B. Kim, T. E. Januszyk, L. H. Bynum, J. V. Sola, J. S. Garavelli, N. L. Kelleher, *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32, W340–345. *ProSight PTM: an integrated environment for protein identification and characterization by top-down mass spectrometry.*

- [78] D. Fenyő, R. C. Beavis, *Anal. Chem.* **2003**, 75(4), 768-774. *A Method for Assessing the Statistical Significance of Mass Spectrometry-Based Protein Identifications Using General Scoring Schemes.*
- [79] J. Grossmann, F. F. Roos, M. Cieliebak, Z. Lipták, L. K. Mathis, M. Müller, W. Gruissem, S. Baginsky, *J. Prot. Res.* **2005**, 4(5), 1768–1774. *AUDENS: A Tool for Automated Peptide de Novo Sequencing.*
- [80] Y. Chen, S. W. Kwon, S. C. Kim, Y. Zhao, *J. Prot. Res.* **2005**, 4(3), 998–1005. *Integrated Approach for Manual Evaluation of Peptides Identified by Searching Protein Sequence Databases with Tandem Mass Spectra.*
- [81] J. Colinge, A. Masselot, M. Giron, T. Dessingy, J. Magnin, *Proteomics* **2003**, 3(8), 1454–1463. *OLAV: Towards high-throughput tandem mass spectrometry data identification.*
- [82] J. J. Coon, B. Ueberheide, J. E. Syka, D. D. Dryhurst, J. Ausio, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102(27), 9463–9468. *Protein identification using sequential ion/ion reactions and tandem mass spectrometry.*
- [83] A. Makarov, Scigelova, *Encycl. Gen. Gen. Prot. Bioinform.* **2006**, Part 3, Chapter 3.1. *Specialist Review: Orbitrap mass analyzer.*
- [84] R. H. Perry, R. G. Cooks, R. J. Noll, *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, 27(6), 661–699. *Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications.*
- [85] J. V. Olsen, L. M. F. de Godoy, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Pesch, A. Makarov, O. Lange, S. Horning, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, 4(12), 2010–2021. *Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap.*
- [86] <http://www.thermo.com/com/cda/article/general/1,,21168,00.html?ca=orbitrap>, Stand April 2010.
- [87] H. Liu, R. G. Sadygov, J. R. Yates III, *Anal. Chem.* **2004**, 76(14), 4193–4201. *A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics.*
- [88] W. M. Old, K. Meyer-Arendt, L. Aveline-Wolf, K. G. Pierce, A. Mendoza, J. R. Sevinsky, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, 4(10), 1487–1502. *Comparison of Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics.*
- [89] M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 952–958. *Functional and quantitative proteomics using SILAC.*
- [90] X. Chen, L. Sun, Y. Yu, Y. Xue, P. Yang, *Expert Rev. Proteomics* **2007**, 4(1), 25–37. *Amino acid-coded tagging approaches in quantitative proteomics.*
- [91] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17(10), 994–999. *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.*
- [92] B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4(6), 663–668. *Chemical strategies for the global analysis of protein function.*
- [93] K. C. Parker, D. Patterson, B. Williamson, J. Marchese, A. Graber, F. He, A. Jacobson, P. Juhasz, S. Martin, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, 3(7), 625–659. *Depth of Proteome Issues: A Yeast Isotope-Coded Affinity Tag Reagent Study.*
- [94] D. K. Han, J. Eng, H. Zhou, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19(10), 946–951. *Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry.*

- [95] K. C. Hansen, G. Schmitt-Ulms, R. J. Chalkley, J. Hirsch, M. A. Baldwin, A. L. Burlingame, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, 2(5), 299-314. *Mass Spectrometric Analysis of Protein Mixtures at Low Levels Using Cleavable ¹³C-Isotope-coded Affinity Tag and Multidimensional Chromatography*.
- [96] T. J. Griffin, H. Xie, S. Bandhakavi, J. Popko, A. Mohan, J. V. Carlis, L. Higgins, *J. Prot. Res.* **2007**, 6(11), 4200-4209. *iTRAQ Reagent-Based Quantitative Proteomic Analysis on a Linear Ion Trap Mass Spectrometer*.
- [97] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20(8), 805-809. *Proteomic profiling of mechanistically distinct enzyme classes using a common chemotype*.
- [98] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, 1(10), 781-790. *Chemical Strategies for Functional Proteomics*.
- [99] N. Jessani, B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8(1), 54-59. *The development and application of methods for activity-based protein profiling*.
- [100] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, 106(8), 3279-3301. *Mechanism-Based Profiling of Enzyme Families*.
- [101] S. A. Sieber, B. F. Cravatt, *Chem. Commun.* **2006**, 2311-2319. *Analytical platforms for activity-based protein profiling - exploiting the versatility for functional proteomics*.
- [102] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *ChemBioChem* **2004**, 5(1), 41-47. *Chemical Strategies for Activity-Based Proteomics*.
- [103] A. B. Berger, P. M. Vitorino, M. Bogyo, *Am. J. Pharmacogenomics* **2004**, 4(6), 371-381. *Activity-Based Protein Profiling: Applications to Biomarker Discovery, In Vivo Imaging and Drug Discovery*.
- [104] M. J. Evans, A. Saghatelian, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23(10), 1303-1307. *Target discovery in small-molecule cell-based screens by in situ proteome reactivity profiling*.
- [105] T. Böttcher, M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2010**, 122(15), 2740-2759. *Naturstoffe und ihre biologischen Angriffsziele: proteomische und metabolomische Markierungsstrategien*.
- [106] R. Huisgen, *1,3 [One,Three]-Dipolar Cycloaddit. Chem.* **1984**, 1, 1-176. *1,3-Dipolar cycloaddition - introduction, survey, mechanism*.
- [107] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41(14), 2596-2599. *A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes*.
- [108] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67(9), 3057-3064. *Peptidotriazoles on solid-phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides*.
- [109] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, 8(17), 3639-3642. *Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA*.
- [110] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(5), 1398-1399. *Directed DNA Metallization*.
- [111] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, 11(4), 535-546. *Profiling Enzyme Activities in Vivo Using Click Chemistry Methods*.
- [112] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(16), 4686-4687. *Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3+2]-Cycloaddition*.
- [113] G. C. Adam, J. Burbaum, J. W. Kozarich, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(5), 1363-1368. *Mapping Enzyme Active Sites in Complex Proteomes*.

- [114] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. F. Medzihradszky, M. Bogyo, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, 1(1), 60–68. *Chemical Approaches for Functionally Probing the Proteome*.
- [115] D. C. Greenbaum, W. D. Arnold, F. Lu, L. Hayrapetian, A. Baruch, J. Krumrine, S. Toba, K. Chehade, D. Brömme, I. D. Kuntz, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2002**, 9(10), 1085–1094. *Small Molecule Affinity Fingerprinting: a Tool for Enzyme Family Subclassification, Target Identification, and Inhibitor Design*.
- [116] G. Blum, S. R. Mullins, K. Keren, M. Fonovic, C. Jedeszko, M. J. Rice, B. F. Sloane, M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1(4), 203–209. *Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes*.
- [117] N. Jessani, S. Niessen, B. Q. Wei, M. Nicolau, M. Humphrey, Y. Ji, W. Han, D.-Y. Noh, J. R. Yates, S. S. Jeffrey, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2005**, 2(9), 691–697. *A streamlined platform for high-content functional proteomics of primary human specimens*.
- [118] S. A. Sieber, T. S. Mondala, S. R. Head, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(48), 15640–15641. *Microarray Platform for Profiling Enzyme Activities in Complex Proteomes*.
- [119] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(28), 10018–10019. *A Tandem Orthogonal Proteolysis Strategy for High-Content Chemical Proteomics*.
- [120] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101(27), 10000–10005. *Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases*.
- [121] Y. Liu, K. R. Shreder, W. Gai, S. Corral, D. K. Ferris, J. S. Rosenblum, *Chemistry & Biology* **2005**, 12(1), 99–107. *Wortmannin, a Widely Used Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor, also Potently Inhibits Mammalian Polo-like Kinase*.
- [122] S. Kumar, B. Zhou, F. Liang, W.-Q. Wang, Z. Huang, Z.-Y. Zhang, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101(21), 7943–7948. *Activity-based probes for protein tyrosine phosphatases*.
- [123] D. J. Vocadlo, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43(40), 5338–5342. *A Strategy for Functional Proteomic Analysis of Glycosidase Activity from Cell Lysates*¹³.
- [124] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, 11(11), 1523–1531. *Discovering Disease-Associated Enzymes by Proteome Reactivity Profiling*.
- [125] N. Jessani, Y. Liu, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(16), 10335–10340. *Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness*.
- [126] T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47(24), 4600–4603. *β -Lactones as Privileged Structures for the Activity-Site Labeling of Versatile Bacterial Enzyme Classes*.
- [127] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, 51, 12479–12520. *Chemical Reagents in Photoaffinity Labeling*.
- [128] F. Kotzyba-Hilbert, I. Kapfer, M. Goeldner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34(12), 1296–1312. *Recent Trends in Photoaffinity Labeling*.
- [129] D. Robinette, N. Neamati, K. B. Tomer, C. H. Borchers, *Expert Rev. Proteomics* **2006**, 3(4), 399–408. *Photoaffinity labeling combined with mass spectrometric approaches as a tool for structural proteomics*.
- [130] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 483–514. *New Photolabeling and Crosslinking Methods*.

- [131] K. M. Meisenheimer, T. H. Koch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, 32(2), 101–140. *Photocross-Linking of Nucleic Acids to Associated Proteins.*
- [132] A. Blencowe, W. Hayes, *Soft Matter* **2005**, 1(3), 178–205. *Development and application of diazirines in biological and synthetic macromolecular systems.*
- [133] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255(8), 3313–3318. *3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine.*
- [134] M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**(15), 2513–2523. *Recent Progress in Diazirine-Based Photoaffinity Labeling.*
- [135] G. A. Korshonova, N. V. Sumbatyan, A. N. Topin, M. T. Mtchedlize, *Mol. Biol.* **2000**, 34(6), 823–839. *Photoactivatable Reagents Based on Aryl(trifluoromethyl)diazirines: Synthesis and Application for Studying Nucleic Acid–Protein Interactions.*
- [136] R. A. Moss, *Accounts Chem. Res.* **2006**, 39(4), 267–272. *Diazirines: Carbene Precursors Par Excellence.*
- [137] F. Kotzyba-Hilbert, T. Grutter, M. Goeldner, *Mol. Neurobiol.* **1999**, 20, 45–59. *Molecular Investigations on the Nicotinic Acetylcholine Receptor.*
- [138] M. Hashimoto, Y. Hatanaka, K. Nabeta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10(21), 2481–2483. *Photoreactive Cinnamic Acid Analogues to Elucidate Phenylalanine Ammonia-lyase.*
- [139] Y. Hatanaka, Y. Sadakane, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2, 271–288. *Photoaffinity Labeling in Drug Discovery and Developments: Chemical Gateway for Entering Proteomic Frontier.*
- [140] O. I. Lavrik, R. Prasad, R. W. Sobol, J. K. Horton, E. J. Ackerman, S. H. Wilson, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(27), 25541–25548. *Photoaffinity Labeling of Mouse Fibroblast Enzymes by a Base Excision Repair Intermediate.*
- [141] O. I. Lavrik, D. M. Kolpashchikov, R. Prasad, R. W. Sobol, S. H. Wilson, *Nucleic Acid Res.* **2002**, 30(14), e73. *Binary system for selective photoaffinity labeling of base excision repair DNA polymerases.*
- [142] N. A. Lebedeva, N. I. Rechkunova, S. N. Khodyreva, A. Favre, O. I. Lavrik, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2002**, 297(4), 714–721. *Photoaffinity labeling of proteins in bovine testis nuclear extract.*
- [143] E. A. Maltseva, N. I. Rechkunova, L. C. Gillet, I. O. Petrusseva, O. D. Schärer, O. I. Lavrik, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1770, 781–789. *Crosslinking of the NER damage recognition proteins XPC-HR23B, XPA and RPA to photoreactive probes that mimic DNA damages.*
- [144] E. R. Guggenheim, D. Xu, C. X. Zhang, P. V. Chang, S. J. Lippard, *ChemBioChem* **2009**, 10(1), 141–157. *Photoaffinity Isolation and Identification of Proteins in Cancer Cell Extracts that Bind to Platinum-Modified DNA.*
- [145] M. Liebmann, F. Di Pascale, A. Marx, *ChemBioChem* **2006**, 7(12), 1965–1969. *A New Photoactive Building Block for Investigation of DNA Backbone Interactions: Photoaffinity Labeling of Human DNA Polymerase β .*
- [146] U. K. Shigdel, J. Zhang, C. He, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 90–93. *Diazirine-Based DNA Photo-Crosslinking Probes for the Study of Protein-DNA Interactions.*
- [147] J. T. Reardon, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22(16), 5938–5944. *Molecular Anatomy of the Human Excision Nuclease Assembled at Sites of DNA Damage.*
- [148] S. V. Doronin, M. I. Dobrikov, O. I. Lavrik, *FEBS Letters* **1992**, 313(1), 31–33. *Photoaffinity labeling of DNA polymerase [alpha] DNA primase complex based on the catalytic competence of a dNTP reactive analog.*

- [149] V. N. Pandey, N. Kaushik, M. J. Modak, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269(34), 21828–21834. *Photoaffinity Labeling of DNA Template-Primer Binding Site in Escherichia coli DNA Polymerase I.*
- [150] M. Zofall, B. Bartholomew, *Nucl. Acid Res.* **2000**, 28(21), 4382–4390. *Two Novel dATP Analogs for DNA Photoaffinity Labeling.*
- [151] T. Yamaguchi, K. Suyama, K. Narita, S. Kohgo, A. Tomikawa, M. Saneyoshi, *Nucl. Acid Res.* **1997**, 25(12), 2325–2358. *Synthesis and Evaluation of Oligodeoxyribonucleotides Containing an Aryl(trifluoromethyl)diazirine Moiety as the Crosslinking Probe: Photoaffinity Labeling of Mammalian DNA Polymerase β .*
- [152] S.-W. Yang, H. A. Hash, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91(25), 12183–12187. *Specific Photocrosslinking of DNA-Protein-Complexes: Identification of Contacts between Integration Host Factor and its Target DNA.*
- [153] K. Musier-Forsyth, P. Schimmel, *Biochemistry* **1994**, 33(3), 773–779. *Acceptor Helix Interactions in a Class II tRNA Synthetase: Photoaffinity Cross-linking of an RNA Miniduplrx Substrate.*
- [154] S. D. Westerheide, J. M. Boss, *Nucl. Acid Res.* **1999**, 27(7), 1635–1641. *Orientation and Positional Mapping of the Multicomponent Transcription Factors RFX and X2BP to the Major Histocompatibility Complex Class II Transcriptional Enhancer.*
- [155] A. N. Mayer, F. Barany, *Gene* **1995**, 153(1), 1–8. *Photoaffinity-Crosslinking of TaqI Restriction Endonuclease Using an Aryl Azide Linked to the Phosphate Backbone.*
- [156] U. Schweizer, T. Hey, G. Lipps, G. Krauss, *Nucl. Acid Res.* **1999**, 27(15), 3183–3189. *Photocrosslinking locates a binding site for the large subunit of human replication protein A to the damaged strand of cisplatin-modified DNA.*
- [157] N. Hori, S. Iwai, H. Inoue, E. Ohtsuka, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267(22), 15591–15594. *Photoaffinity Labeling of T4 Endonuclease V with a Substrate Containing a Phenyl diazirine Derivative.*
- [158] J. J. Turchi, K. M. Henkels, I. L. Hermanson, S. M. Patrick, *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 77(1–2), 83–87. *Interactions of mammalian proteins with cisplatin-damaged DNA.*
- [159] G. Mittler, F. Butter, M. Mann, *Gen. Res.* **2009**, 19, 284–293. *A SILAC-based DNA protein interaction screen that identifies candidate binding proteins to functional DNA elements.*
- [160] F. Butter, M. Scheibe, M. Mörl, M. Mann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106(26), 10626–10631. *Unbiased RNA-protein interaction screen by quantitative proteomics.*
- [161] B. F. Cravatt, G. M. Simon, J. R. Yates III, *Nature* **2007**, 450(7172), 991–1000. *The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics.*
- [162] J. A. Ranish, S. Hahn, Y. Lu, E. C. Yi, X.-j. Li, J. Eng, R. Aebersold, *Nature Genet.* **2004**, 36(7), 707–713. *Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIH.*
- [163] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1993**, 49(28), 6123–6194. *The synthesis of modified oligonucleotides by the phosphoramidite approach and their applications.*
- [164] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. M. Eker, T. Carell, L.-O. Essen, *Science* **2004**, 306(5702), 1789–1793. *Crystal Structure of a Photolyase Bound to a CPD-Like DNA Lesion After in Situ Repair.*
- [165] F. Brueckner, U. Hennecke, T. Carell, P. Cramer, *Science* **2007**, 315(5813), 859–862. *CPD Damage Recognition by Transcribing RNA Polymerase II.*

- [166] R. P. P. Fuchs, N. Schwartz, M. P. Daune, *Nature* **1981**, 294(5842), 657–659. *Hot spots of frameshift mutations induced by the ultimate carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene.*
- [167] R. P. Fuchs, S. Fujii, *DNA Repair* **2007**, 6(7), 1032–1041. *Translesion synthesis in Escherichia coli: Lessons from the NarI mutation hot spot.*
- [168] C. Crey-Desbiolles, J. Lhomme, P. Dumy, M. Kotera, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(31), 9532–9533. *3-Nitro-3-deaza-2'-deoxyadenosine as a Versatile Photocleavable 2'-Deoxyadenosine Mimic.*
- [169] J. Butenandt, A. P. M. Eker, T. Carell, *Chemistry - A European Journal* **1998**, 4(4), 642–654. *Synthesis, Crystal Structure, and Enzymatic Evaluation of a DNA-Photolesion Isostere.*
- [170] L. C. J. Gillet, O. D. Schärer, *Org. Lett.* **2002**, 4(24), 4205–4208. *Preparation of C8-Amine and Acetylamine Adducts of 2'-Deoxyguanosine Suitably Protected for DNA Synthesis.*
- [171] V. Welzmueller, Diploma thesis, LMU München (München), **2009**.
- [172] R. A. I. Abou-Elkhair, T. L. Netzel, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2005**, 24(2), 85–110. *Synthesis of two 8-[(anthraquinone-2-yl)-linked]-2'-deoxyadenosine-3'-benzylhydrogenphosphates for studies of photoinduced hole transport in DNA.*
- [173] M. T. Tierney, M. W. Grinstaff, *Org. Lett.* **2000**, 2(22), 3413–3416. *Synthesis and stability of oligonucleotides containing C8-labeled 2'-deoxyadenosine: Novel redox nucleobase probes for DNA-mediated charge-transfer studies.*
- [174] S. Breeger, PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2007**.
- [175] M. Winnacker, S. Breeger, R. Strasser, T. Carell, *ChemBioChem* **2009**, 10(1), 109–118. *Novel Diazirine-Containing DNA Photoaffinity Probes for the Investigation of DNA-Protein Interactions.*
- [176] A. Baccaro, S. H. Weisbrod, A. Marx, *Synthesis* **2007**, 13, 1949–1954. *DNA Conjugation by Staudinger Ligation: New Thymidine Analogues.*
- [177] P. G. McDougal, J. G. Rico, Y.-I. Oh, B. D. Condon, *J. Org. Chem.* **1986**, 51(17), 3388–3390. *A Convenient Procedure for the Monosilylation of Symmetric 1,n-Diols.*
- [178] L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* **2003**, 103(5), 1875–1916. *Palladium-Assisted Routes to Nucleosides.*
- [179] W. Bannwarth, A. Trzeciak, *Helv. Chim. Act.* **1987**, 70(1), 175–186. *A Simple and Effective Chemical Phosphorylation Procedure for Biomolecules.*
- [180] S. A. Kane, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1996**, 35(7), 2180–2188. *Photoreactivity of Platinum(II) in Cisplatin-Modified DNA Affords Specific Cross-Links to HMG Domain Proteins.*
- [181] T. Hey, G. Lipps, G. Krauss, *Biochemistry* **2001**, 40(9), 2901–2910. *Binding of XPA and RPA to damaged DNA investigated by fluorescence anisotropy.*
- [182] M. Ober, H. Müller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(51), 18143–18149. *Base Pairing and Replicative Processing of the Formamidopyrimidine-dG DNA Lesion.*
- [183] S. Boiteux, T. R. O'Connor, F. Lederer, A. Gouyette, J. Laval, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265(7), 3916–3922. *Homogenous Escherichia coli FPG Protein.*
- [184] J. Tchou, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270(19), 11671–11677. *The catalytic mechanism of Fpg protein. Evidence for a Schiff base intermediate and amino terminus localization of the catalytic site.*
- [185] A. Banerjee, W. Yang, M. Karplus, G. L. Verdine, *Nature* **2005**, 434(7033), 612–618. *Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA.*

- [186] A. Banerjee, W. L. Santos, G. L. Verdine, *Science* **2006**, 311(5764), 1153–1157. *Structure of a DNA glycosylase searching for lesions.*
- [187] J. J. Tate, J. Persinger, B. Bartholomew, *Nucl. Acids Res.* **1998**, 26(6), 1421–1426. *Survey of four different photoreactive moieties for DNA photoaffinity labeling of yeast RNA polymerase III transcription complexes.*
- [188] G. Lubec, L. Afjehi-Sadat, *Chem. Rev.* **2007**, 107(8), 3568–3584. *Limitations and Pitfalls in Protein Identification by Mass Spectrometry.*
- [189] O. Jahn, D. Hesse, M. Reinelt, H. D. Kratzin, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 92–103. *Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry.*
- [190] F. Schmidt, M. Schmid, P. R. Jungblut, J. Mattow, A. Facius, K.-P. Pleissner, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14(9), 943–956. *Iterative data analysis is the key for exhaustive analysis of peptide mass fingerprints from proteins separated by two-dimensional electrophoresis.*
- [191] G. L. Peele, D. A. Brent, *Anal. Chem.* **1977**, 49(4), 674–674. *Cleaning of mass spectrometer ion sources by electropolishing.*
- [192] B. Domon, R. Aebersold, *Science* **2006**, 312(5771), 212–217. *Mass Spectrometry and Protein Analysis.*
- [193] S. D. Patterson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21(3), 221–222. *Data analysis – the Achilles heel of proteomics.*
- [194] M. Hilario, A. Kalousis, C. Pellegrini, M. Müller, *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, 25(3), 409–449. *Processing and classification of protein mass spectra.*
- [195] A. Delobel, F. Halgand, B. Laffranchise-Gosse, H. Snijders, O. Laprèvote, *Anal. Chem.* **2003**, 75(21), 5961–5968. *Characterization of Hydrophobic Peptides by Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry.*
- [196] C. C. Chao, Y. S. Ma, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94(7), 2969–2974. *Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems.*
- [197] S. Carr, R. Aebersold, M. Baldwin, A. Burlingame, K. Clauser, A. Nesvizhskii, *Mol. Cell Proteomics* **2004**, 3, 531–533. *The Need for Guidelines in Publication of Peptide and Protein Identification Data.*
- [198] M. A. Baldwin, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, 3, 1–9. *Protein Identification by Mass Spectrometry: Issues to be Considered.*
- [199] A. Armirotti, E. Millo, G. Damonte, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, 18(1), 57–63. *How to Discriminate Between Leucine and Isoleucine by Low Energy ESI-TRAP MSn.*
- [200] N. G. Faux, S. P. Bottomley, A. M. Lesk, J. A. Irving, J. R. Morrison, M. G. de la Banda, J. C. Whisstock, *Genome Res.* **2005**, 15(4), 537–551. *Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins.*
- [201] R. A. Bradshaw, A. L. Burlingame, S. Carr, R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, 5, 787–788. *Reporting Protein Identification Data: The next Generation of Guidelines.*
- [202] M. Mann, M. Wilm, *Anal. Chem.* **1994**, 66(24), 4390–4399. *Error-Tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags.*
- [203] Q. Ding, L. Xiao, S. Xiong, Y. Jia, H. Que, Y. Guo, S. Liu, *Proteomics* **2003**, 3(7), 1313–1317. *Unmatched masses in peptide mass fingerprints caused by cross-contamination: An updated statistical result.*

- [204] D. Craft, L. Li, *Anal. Chem.* **2005**, 77(8), 2649–2655. *Integrated Sample Processing System Involving On-Column Protein Adsorption, Sample Washing, and Enzyme Digestion for Protein Identification by LC-ESI MS/MS.*
- [205] M. Baumann, S. Meri, *Expert Rev. Proteomics* **2004**, 1(2), 207–217. *Techniques for studying protein heterogeneity and post-translational modifications.*
- [206] W. Dormeyer, M. Ott, M. Schnölzer, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, 4(9), 1226–1239. *Probing Lysine Acetylation in Proteins.*
- [207] H. C. Beck, E. C. Nielsen, R. Matthiesen, L. H. Jensen, M. Sehested, P. Finn, M. Grauslund, A. M. Hansen, O. N. Jensen, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, 5(7), 1314–1325. *Quantitative Proteomic Analysis of Post-translational Modifications of Human Histones.*
- [208] O. Buczek, D. Yoshikami, G. Bulaj, E. C. Jimenez, B. M. Olivera, *J Biol. Chem.* **2005**, 280(6), 4247–4253. *Post-translational Amino Acid Isomerization.*
- [209] T.-L. Chung, H.-H. Hsiao, Y.-Y. Yeh, H.-L. Shia, Y.-L. Chen, P.-H. Liang, A. H.-J. Wang, K.-H. Khoo, S. Shoei-Lung Li, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279(38), 39653–39662. *In Vitro Modification of Human Centromere Protein CENP-C Fragments by Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Protein: DEFINITIVE IDENTIFICATION OF THE MODIFICATION SITES BY TANDEM MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF THE ISOPEPTIDES.*
- [210] M. Mann, O. N. Jensen, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21(3), 255–261. *Proteomic analysis of post-translational modifications.*
- [211] T. Tchou, H. Kasai, S. Shibutani, M.-H. Chung, J. Laval, A. P. Grollman, Nishimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88(11), 4690–4694. *8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity.*
- [212] J. P. Radicella, C. Dherin, C. Desmaze, M. S. Fox, S. Boiteux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94(15), 8010–8015. *Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*.*
- [213] A. E. Vidal, I. D. Hickson, S. Boiteux, J. P. Radicella, *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29(6), 1285–1292. *Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step.*
- [214] S. A. Andrabi, N. S. Kim, S.-W. Yu, H. Wang, D. W. Koh, M. Sasaki, J. A. Klaus, T. Otsuka, Z. Zhang, R. C. Koehler, P. D. Hurn, G. G. Poirier, V. L. Dawson, T. M. Dawson, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103(48), 18308–18313. *Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal.*
- [215] J. L. Harris, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, G. L. Dianov, O. J. Becherel, M. F. Lavin, *Human Molecular Genetics* **2009**, 18(21), 4102–4117. *Aprataxin, poly-ADP ribose polymerase 1 (PARP-1) and apurinic endonuclease 1 (APE1) function together to protect the genome against oxidative damage.*
- [216] M. Stros, D. Launholt, K. D. Grasser, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64, 2590–2606. *The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins.*
- [217] L. C. Olsen, R. Aasland, C. U. Wittwer, H. E. Krokan, D. E. Helland, *EMBO J.* **1989**, 8, 3121–3125. *Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme.*
- [218] L. R. Benjamin, H.-J. Chung, S. Sanford, F. Kouzine, J. Liu, D. Levens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105(47), 18296–18301. *Hierarchical mechanisms build the DNA-binding specificity of FUSE binding protein.*

- [219] A. Lund, S. M. Knudsen, H. Vissing, B. Clark, N. Tommerup, *Genomics* **1996**, 36(2), 359–361. *Assignment of Human Elongation Factor 1[alpha] Genes:EEF1AMaps to Chromosome 6q14 andEEF1A2to 20q13.3.*
- [220] E. Michelotti, G. Michelotti, A. Aronsohn, D. Levens, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16(5), 2350–2360. *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor.*
- [221] K. Büttner, S. Nehring, K.-P. Hopfner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, 14(7), 647–652. *Structural basis for DNA duplex separation by a superfamily-2 helicase.*
- [222] N. Mochizuki, S. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Ohba, T. Nagai, A. Miyawaki, M. Matsuda, *Nature* **2001**, 411(6841), 1065–1068. *Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1.*
- [223] F. Butter, D. Kappei, F. Buchholz, M. Vermeulen, M. Mann, *EMBO Rep.* **2010**, 11(4), 305–311. *A domesticated transposon mediates the effects of a single-nucleotide polymorphism responsible for enhanced muscle growth.*
- [224] A. E. Vidal, S. Boiteux, I. D. Hickson, J. P. Radicella, *EMBO J.* **2001**, 20(22), 6530–6539. *XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions.*
- [225] M. Masson, C. Niedergang, V. Schreiber, S. Muller, J. Menissier-de Murcia, G. De Murcia, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, 18(6), 3563–3571. *XRCC1 Is Specifically Associated with Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Negatively Regulates Its Activity following DNA Damage.*
- [226] Y. Kubota, R. A. Nash, A. Klungland, P. Schär, D. E. Barnes, T. Lindahl, *EMBO J.* **1996**, 15(23), 6662–6670. *Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein.*
- [227] S. Marsin, A. E. Vidal, M. Sossou, J. M.-d. Murcia, F. Le Page, S. Boiteux, G. de Murcia, J. P. Radicella, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278(45), 44068–44074. *Role of XRCC1 in the Coordination and Stimulation of Oxidative DNA Damage Repair Initiated by the DNA Glycosylase hOGG1.*
- [228] V. Schreiber, J.-C. Amé, P. Dollé, I. Schultz, B. Rinaldi, V. Fraulob, J. Ménissier-de Murcia, G. de Murcia, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277(25), 23028–23036. *Poly(ADP-ribose) Polymerase-2 (PARP-2) Is Required for Efficient Base Excision DNA Repair in Association with PARP-1 and XRCC1.*
- [229] I. B. Rogozin, K. S. Makarova, J. Murvai, E. Czabarka, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, L. A. Szekely, E. V. Koonin, *Nucl. Acids Res.* **2002**, 30(10), 2212–2223. *Connected gene neighborhoods in prokaryotic genomes.*
- [230] S. P. Mirza, B. D. Halligan, A. S. Greene, M. Olivier, *Physiol. Genomics* **2007**, 30(1), 89–94. *Improved method for the analysis of membrane proteins by mass spectrometry.*
- [231] D. Denning, B. Mykytka, N. P. C. Allen, L. Huang, Al Burlingame, M. Rexach, *J. Cell Biol.* **2001**, 154(5), 937–950. *The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p–GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex.*
- [232] D. A. Sherman, S. G. Pasion, S. L. Forsburg, *Mol. Biol. Cell* **1998**, 9(7), 1833–1845. *Multiple Domains of Fission Yeast Cdc19p (MCM2) Are Required for Its Association with the Core MCM Complex.*

Curriculum Vitae

Malte Winnacker

Geburtsdatum: 20. Juni 1980
Geburtsort: Heidelberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1987–1991 Grundschole (Loschschule Erlangen)
1991–2000 Gymnasium (Fridericianum Erlangen)
Mai 2000 Abitur: Note 1.5

Militärdienst

Juli 2000–April 2001 Grundwehrdienst bei der Luftwaffe in Mengen und Klosterlechfeld als Fernmelder

Studium

2001–2006 Studium der Chemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
März 2003 Vordiplom: Note 1.40 ("sehr gut")
Juni 2005 Diplomprüfungen
Juni 2005–März 2006 Diplomarbeit ("Enantioselektive Synthese 2-Hydroxymethyl-substituierter Morpholine und Piperazine über Epoxid-Ringöffnungen")
März 2006 Diplom; Abschlussnote: 2.08 ("gut")

Promotion

Mai 2006 – Oktober 2010 Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München