

Massenspektrometrische Untersuchungen am Tumorsuppressorprotein p53

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



Von Dipl.-Biochem. Christian Arlt

Geb. 28.11.1986 in Wippra

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andrea Sinz
2. PD Dr. Ralph Golbik
3. Prof. Dr. Kevin Pagel (Freie Universität Berlin)

Datum der öffentlichen Verteidigung: 26. Februar 2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis Anhang.....	X
Tabellenverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis Anhang.....	XII
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
Zusammenfassung	1
Summary	4
1 Einleitung	6
1.1 Intrinsisch ungeordnete Proteine: Ein Überblick	6
1.2 p53 – „Der Wächter des Genoms“	7
1.2.1 Geschichtlicher Überblick	7
1.2.2 Struktur-Funktions-Beziehung	8
1.3 Strukturaufklärung von intrinsisch ungeordneten Proteinen.....	14
1.4 p53-Tetramerstruktur: Status Quo.....	15
1.5 Massenspektrometrische Grundlagen.....	16
1.5.1 Elektrospray-Ionisierung (ESI).....	17
1.5.2 Massenanalysatoren.....	19
1.5.2.1 Flugzeit-Analysator.....	19
1.5.2.2 Orbitrap-Analysator	20
1.5.2.3 Linearer Quadrupol	21
1.5.3 Verwendete Massenspektrometer.....	22

1.5.3.1	Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer.....	22
1.5.3.2	High-Mass Q-TOF II-Massenspektrometer	23
1.5.4	Fragmentierung	25
1.5.5	Chemisches Cross-Linking in Kombination mit Massenspektrometrie	26
1.5.6	Native Massenspektrometrie	30
2	Zielstellung.....	32
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Material.....	33
3.1.1	Chemikalien.....	33
3.1.2	Geräte.....	35
3.1.2.1	Chromatographiesysteme	35
3.1.2.2	Massenspektrometer.....	35
3.1.2.3	Laborgeräte	35
3.1.2.4	Verbrauchsmaterialien	36
3.1.3	Plasmide.....	37
3.1.4	Oligonukleotide	37
3.1.5	Bakterienstämme	38
3.1.6	Medien und Antibiotika.....	38
3.1.7	Puffer und Lösungen.....	39
3.1.8	Cross-Linking-Reagenzien	40
3.1.9	Enzyme	40
3.1.10	Kommerziell verfügbare Kits	40
3.1.11	Software.....	41
3.2	Methoden.....	42
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	42
3.2.1.1	Präparation chemisch kompetenter Zellen	42

3.2.1.2	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	42
3.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
3.2.1.4	Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge.....	43
3.2.1.5	Agarosegelelektrophorese	43
3.2.1.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	43
3.2.1.7	DNA-Sequenzierung	43
3.2.2	Zellbiologische Methoden	43
3.2.2.1	Expression von rekombinantem, humanem p53 in <i>E.coli</i>	43
3.2.2.2	Zellaufschluss mittels Ultraschall	44
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	45
3.2.3.1	Pufferaustausch und Konzentrierung von Proteinlösungen	45
3.2.3.2	Reinigung von humanem Volllängen-Wildtyp-p53	45
3.2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
3.2.3.4	Enzymatische Proteolyse in Lösung	48
3.2.3.5	Enzymatische In-Gel-Proteolyse.....	49
3.2.4	Cross-Linking-Methoden.....	50
3.2.4.1	Cross-Linking von p53.....	50
3.2.4.2	Automatisierter Arbeitsablauf für die Analyse von Cross-Linking- Produkten unter Verwendung von BuUrBu	51
3.2.5	Massenspektrometrische Methoden.....	52
3.2.5.1	Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie	52
3.2.5.2	Native Massenspektrometrie	53
3.2.6	Identifizierung von Cross-Linking-Produkten.....	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Herstellung des humanen Volllängen-Wildtyp-p53	55
4.1.1	Expression von HLT-p53 und ¹⁵ N-markiertem HLT-p53	56
4.1.2	Reinigung von HLT-p53 und ¹⁵ N-markiertem HLT-p53	56

4.1.3	Funktionsstudien des gereinigten p53 mittels nativer MS.....	63
4.1.3.1	Tetramerisierung des gereinigten p53 in Abwesenheit von Response-Element-DNA.....	63
4.1.3.2	Spezifische DNA-Bindung des gereinigten p53	65
4.2	Untersuchungen zur Tetramerisierung von p53 mittels nativer MS	68
4.3	Strukturaufklärung von p53 mittels Cross-Linking/MS.....	72
4.3.1	Cross-Linking-Experimente in Abwesenheit von Response Element- DNA.....	72
4.3.1.1	Auswertung der BS ² G-Cross-Linking-Daten.....	77
4.3.1.2	Auswertung der BuUrBu-Cross-Linking-Daten	82
4.3.1.3	Struktur des p53-Tetramers im DNA-freien Zustand	84
4.3.2	Cross-Linking-Experimente in Anwesenheit von Response Element- DNA.....	89
4.3.2.1	„Native“ Cross-Linking-Massenspektrometrie	90
4.3.2.2	Struktur des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand	94
4.4	Entwicklung eines automatisierten Arbeitsablaufes für strukturelle Proteinanalytik unter Verwendung des MS/MS spaltbaren Cross-Linkers BuUrBu.....	96
4.4.1	Vergleich verschiedener Fragmentierungsmethoden	97
4.4.2	Identifizierung von Cross-Linking-Produkten.....	98
4.4.3	Die Analyse komplexer Proteingemische am Beispiel eines <i>E. coli</i> - Zelllysates	104
5	Diskussion	106
5.1	Expression und Reinigung von humanem Vollängen-Wildtyp-p53	106
5.2	Tetramerisierung des Vollängen-Wildtyp-p53 und DNA-Bindung.....	108
5.3	Strukturaufklärung von IDPs mit Hilfe von Cross-Linking/MS	110
5.4	Strukturuntersuchung des p53-Tetramers mittels Cross-Linking-MS	112

5.4.1	Strukturuntersuchungen der <i>C</i> -terminalen Region von p53 (Tetramerisierungsdomäne und regulatorische Domäne).....	112
5.4.2	Strukturuntersuchungen der <i>N</i> -terminalen Region von p53 (Transaktivierungsdomäne und Prolin-reiche Region).....	116
5.4.3	Strukturuntersuchungen der Zentralen Region von p53 (DNA- Bindedomäne).....	118
5.5	Automatisierung der Cross-Linking-Analysen.....	119
5.6	Vergleichbarkeit von Cross-Linking-Daten	122
6	Ausblick.....	124
	Literaturverzeichnis	XVIII
	Anhang.....	XXVIII
	Anhang Abbildungen.....	XXVIII
	Anhang Tabellen.....	XX
	Danksagung.....	XVIII
	Publikationen	XIX
	Lebenslauf	XXII
	Selbstständigkeitserklärung	XXIII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Vereinfachte Darstellung der Kernelemente des p53-Regulationsnetzwerkes.	9
Abb. 1.2:	Modularer Aufbau von p53.....	10
Abb. 1.3:	Zwei Strukturmodelle für das p53-Tetramer im DNA-freien (a und c) und DNA-gebundenen (b und d) Zustand.....	16
Abb. 1.4:	Aufbau einer ESI-Quelle.....	18
Abb. 1.5:	Querschnitt einer C-Trap und einer Orbitrap.....	20
Abb. 1.6:	Detailansicht eines Quadrupol-Massenfilters.	21
Abb. 1.7:	Schematische Darstellung des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers.	23
Abb. 1.8:	Schematische Darstellung des modifizierten High-Mass Q TOF II-Massenspektrometers.	24
Abb. 1.9:	Nomenklatur der Fragmentierung nach Roepstorff, Fohlmann und Biemann.	26
Abb. 1.10:	Schematische Darstellung der Cross-Linking-Reaktion mit BS ² G.	28
Abb. 1.11:	Schematische Darstellung der Fragmentierung von BuUrBu mit resultierendem Dublett-Muster.	29
Abb. 4.1:	Ausschnitt aus der Plasmidkarte von HLT_p53FL_pET28a.	62
Abb. 4.2:	Expressionstest des HLT-p53-Fusionsproteins.....	63
Abb. 4.3:	Affinitätschromatographischer Schritt (IMAC) der Reinigung von HLT-p53.	64
Abb. 4.4:	Identifizierung des HLT-p53-Fusionsproteins anhand der Aminosäuresequenz.	65
Abb. 4.5:	Größenausschlusschromatographischer Schritt (SEC) der Reinigung von HLT-p53.	67
Abb. 4.6:	Größenausschlusschromatographischer Schritt nach Abspaltung des HLT-Tags.....	69
Abb. 4.7:	Natives Massenspektrum von p53 in Abwesenheit von DNA.....	71
Abb. 4.8:	Fragmentationenspektrum des 29-fach positiv geladenen p53-Tetramers in Abwesenheit von DNA.....	71
Abb. 4.9:	Natives Massenspektrum von p53 in Anwesenheit von RE-DNA	73

Abb. 4.10:	Fragmentionenspektrum des 29-fach positiv geladenen p53-Tetramers in Anwesenheit von RE-DNA	74
Abb. 4.11:	Native Massenspektren einer äquimolaren Mischung aus nicht markiertem und ¹⁵ N-markiertem p53	76
Abb. 4.12:	Theoretische und experimentelle Intensitätsverteilung der Signale für verschiedene p53-Mischspezies.	77
Abb. 4.13:	Schematische Darstellung zur p53-Tetramerisation.	78
Abb. 4.14:	Eindimensionale SDS-PAGE der p53-Cross-Linking-Reaktionsansätze in Abwesenheit von RE-DNA.....	80
Abb. 4.15:	Massenspektren ausgewählter BS ² G Cross-Linking-Produkte mit charakteristischen Isotopenmustern.	83
Abb. 4.16:	Identifizierung eines intermolekularen BS ² G-Cross-Links zwischen K-357 und K-357 im p53-Tetramer	86
Abb. 4.17:	Strukturmodell des p53-Tetramers im DNA-freien Zustand, basierend auf den Daten von Tidow <i>et al.</i>	92
Abb. 4.18:	Kennzeichnung von BS ² G-Cross-Links innerhalb der NMR-Struktur der tetrameren p53-Tetramerisierungsdomäne	94
Abb. 4.19:	Darstellung der BuUrBu-Cross-Links anhand des Strukturmodells des p53-Tetramers im DNA-freien Zustand von Tidow <i>et al.</i>	95
Abb. 4.20:	Eindimensionale SDS-PAGE der p53 Cross-Linking-Reaktionsansätze in Anwesenheit von RE-DNA.....	97
Abb. 4.21:	„Native“ XL-MS-Analyse von p53 in Anwesenheit von RE-DNA.	98
Abb. 4.22:	„Native“ XL-MS von p53 in Anwesenheit von RE-DNA.....	100
Abb. 4.23:	Strukturmodell des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand von Tidow <i>et al.</i>	101
Abb. 4.24:	Erweiterte schematische Darstellung der Cross-Linking-Ergebnisse mit BuUrBu für das p53-Tetramer im DNA-gebundenen Zustand von Tidow <i>et al.</i>	102
Abb. 4.25:	Anzahl an Fragmentionen-Spektren im Verlauf eines 90-minütigen LC-Gradienten.	105
Abb. 4.26:	Darstellung einer Decoy-Analyse der Software MeroX.....	106
Abb. 4.27:	HCD-MS/MS-Massenspektrum eines Cross-Linking-Produktes, dargestellt in MeroX.	107
Abb. 4.28:	Vergleich von identifizierten („identified“) und einzigartigen („unique“) Cross-Links für die Analyse verschiedener Proteine.....	108

Abb. 4.29:	Schematische Darstellung von automatisch detektierten BuUrBu-Cross-Links eines mit Hilfe von MeroX erstellen p53-Datensatzes.....	109
Abb. 4.30:	Vergleich der Identifizierung von einzigartigen Cross-Linking-Produkten mittels steppd HCD und EThcD mit Hilfe von Venn-Diagrammen.....	110
Abb. 5.1:	Oberflächenkartierung saurer Aminosäurereste des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand anhand des Modelles von Tidow <i>et al.</i> .	124
Abb. 5.2:	Modell des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand von Demir <i>et al.</i>	125

Abbildungsverzeichnis Anhang

Abb. A1:	Reaktionsschemata der verwendeten Cross-Linking-Reagenzien. .	XXVII
Abb. A2:	Identifizierung des humanen Vollängen-Wildtyp-p53 anhand der Aminosäuresequenz.	XXVIII
Abb. A3:	Hybridisierung der verwendeten Response-Element DNA.	XXVIII
Abb. A4:	Natives Massenspektrum von p53 in Anwesenheit von RE-DNA (REI)	XXVIII
Abb. A5:	Potenzielle Cross-Linking-Reaktionsstellen innerhalb der p53-Aminosäuresequenz.....	XXIX
Abb. A6:	Lokalisation der Cysteine in der DBD von p53.....	XXX
Abb. A7:	Theoretisch mögliche Cross-Links mit Sulfo-GMBS anhand des p53-Tetramer Modells im DNA-freien Zustand. von Tidow <i>et al.</i>	XXX
Abb. A8:	Massenspektren ausgewählter BuUrBu-Cross-Linking-Produkte mit charakteristischen Isotopenmustern.....	XXXII
Abb. A9:	Fragmentationenspektren eines intermolekularen BuUrBu-Cross-Links zwischen K-357 und K-357 im p53-Tetramers	XXXIV
Abb. A10:	Distanzen der mit BS ² G erhaltenen intramolekularen Cross-Links anhand des Strukturmodelles des p53-Tetramers im DNA-freien Zustand von Tidow <i>et al.</i>	XXXV
Abb. A11:	Distanzen der mit BS ² G erhaltenen intermolekularen Cross-Links anhand des Strukturmodells eines p53-Tetramers im DNA-freien Zustand.	XXXV
Abb. A12:	Schematische Darstellung der Cross-Linking-Reaktion mit SDH.	XXXVI

Abb. A13:	„Native“ Cross-Linking-MS-Analyse von p53 in Anwesenheit von RE-DNA.	XXXVII
Abb. A14:	„Native“ Cross-Linking-MS-Analyse von p53 in Anwesenheit von DNA.	XXXVIII
Abb. A15:	Vergleich verschiedener Fragmentierungsmethoden anhand eines BuUrBu-Cross-Linking-Produktes von p53:	XL
Abb. A16:	Schematische Darstellung der Bildung des p53-Tetramers	XLI
Abb. A17:	Schematische Darstellung zur p53-Tetramerisation.	XLII
Abb. A18:	Fragmentationenspektrum eines intramolekularer Cross-Link zwischen dem N-terminalen S-1 und K-357.....	XVIII
Abb. A19:	Fragmentationenspektrum eines intramolekularer Cross-Link zwischen dem N-terminalen S-1 und S-372.	XIX
Abb. A20:	Schematische Darstellung der Reaktion von Glycinethylester (GEE) zur Oberflächenkartierung von sauren Aminosäureresten.	XVIII
Abb. A21:	Mit Glycinethylester (GEE) modifizierte Aminosäurereste in p53.	XVIII
Abb. A22:	Mit DMTMM modifizierte Aminosäurereste in p53.	XVIII
Abb. A22:	Isobare Vorläuferionen eines Typ 0 und Typ 2 Cross-Links.....	XIX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.	47
Tabelle 4.1:	Intra- und intermolekulare BS ² G-Cross-Links im p53-Tetramer.	81
Tabelle 4.2:	Intra- und intermolekulare einzigartige BuUrBu-Cross-Links im p53-Tetramer.	83
Tabelle 4.3	Vergleich verschiedener Datenaufnahme-Bedingungen für die Analyse von Cross-Linking-Produkten eines komplexen Peptidgemisches (<i>E.coli</i> -Zellysate).	105

Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle:A1:	Modifizierung von Cysteinen der DBD von p53 in Abwesenheit von RE-DNA mit Sulfo-GMBS.....	XX
Tabelle A2:	Intra- und Intermolekulare BS ² G-Cross-Linking-Produkte im p53-Tetramer im DNA-freien Zustand.	XVIII
Tabelle A3:	Zusammenfassung BuUrBu-Cross-Linking-Produkte für p53 in An- und Abwesenheit von RE-DNA.	XXI

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AGC	<i>automatic gain control</i>
AcOH	Essigsäure
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BS ² G	Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat
BuUrBu	4-{3-[3-(2,5-Dioxo-pyrrolidin-1-yloxycarbonyl)-propyl]-ureido}-butansäure 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-ester
CE	Kollisionsenergie (<i>collision energy</i>)
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision-induced dissociation</i>)
CD	Circulardichroismus
CRM	<i>charged residue model</i>
DBD	DNA-Bindedomäne von p53
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholiniumchlorid
DSSO	Disuccinimidylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECD	Fragmentierung durch Elektroneneinfang (<i>electron capture dissociation</i>)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDE	<i>extended dynamic exclusion</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ESI	Elektrosprayionisation
ETD	Elektronen-Transfer-Dissoziation (<i>electron transfer dissociation</i>)

ET _h cD	Elektronen-Transfer-Dissoziation mit zusätzlicher HCD-
ET _c iD	Elektronen-Transfer-Dissoziation mit zusätzlicher CID-
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure
FDR	Falschidentifizierungsrate (<i>false discovery rate</i>)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FTICR	Fourier-Transformation-Ionencyclotronresonanz
GEE	Glycinethylester
GMBS	<i>N</i> -γ-Maleimidobutyryloxysuccinimid-ester
HC	<i>highest charge</i>
HCD	<i>higher energy collision induced dissociation</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	<i>high fidelity</i>
HLT	Histidin-Lipoyl-TEV- <i>Tag</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Iodacetamid
IDP	intrinsisch ungeordnetes Protein (<i>intrinsically disordered protein</i>)
IDR	intrinsisch ungeordnete Region (<i>intrinsically disordered region</i>)
IEM	<i>ion evaporation model</i>
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IM-MS	Ionen-Mobilitäts-Massenspektrometrie
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie
LTQ	lineare Ionenfalle (Markenname Thermo Fisher Scientific)
LIT	lineare Ionenfalle (<i>linear ion trap</i>)
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung
MD	Molekulardynamik

MDM	<i>mouse double minute</i>
MeOH	Methanol
M	Molekulargewicht
mgf	<i>Mascot generic format</i>
MG	Molekulargewicht
MI	<i>most intense</i>
MWCO	Molekulargewichtsausschluss (<i>molecular weight cut-off</i>)
MS	Massenspektrometrie; Massenspektrometer
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
PONDR	Predictor of Natural Disordered Regions
ppm	<i>parts-per-million</i>
PRR	Prolin-reiche Region von p53
RE-DNA	Response Element-DNA
Reg.	regulatorische Domäne von p53
RF	Radiofrequenz
RISE	<i>reporter ion scan event</i>
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (<i>small angle x-ray scattering</i>)
SCX	starker Kationenaustauscher (<i>strong cation exchange</i>)
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDH	Suberinsäure-1,8-dihydrazid
SOC	<i>super optimal broth</i> -Medium mit Glucose

SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (<i>signal-to-noise ratio</i>)
TAD	Transaktivierungsdomäne von p53
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet.	Tetramerisierungsdomäne von p53
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
Tfb1	Transkriptionsfaktor B Untereinheit 1 aus Hefe
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
Th	Thomson (alternative Einheit zu m/z)
TIC	Totalionenstrom (<i>total ion current</i>)
TOF	<i>time-of-flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	atomare Masseneinheit
v/v	Volumen pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
w/v	Masse pro Volumen
XL	Cross-Linking; Cross-Link
YT	<i>yeast tryptone</i>
z	Ladungszahl

Proteinogene Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Iso	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Modifizierte Aminosäuren

oxidiertes Methionin	Met _{ox}	m
carbamidomethyliertes Cystein		B

Zusammenfassung

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist auch bekannt als „Wächter des Genoms“. Es kontrolliert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die zur Verhinderung der Karzinogenese dienen. Obwohl fast 40 Jahre seit der Entdeckung von p53 vergangen sind, ist dessen Struktur noch nicht gänzlich aufgeklärt. p53 gehört mit einem Anteil von ca. 40% an ungeordneter Struktur zur Klasse der intrinsisch ungeordneten Proteine (IDPs), bei der die klassischen Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen, wie beispielsweise die Röntgenkristallographie, an ihre Grenzen stoßen.

Chemisches Cross-Linking* in Kombination mit hochauflösender Massenspektrometrie (MS) und native MS sind alternative Methoden zur strukturellen Charakterisierung von Proteinen und Proteinkomplexen. Beim Cross-Linking werden mit Hilfe von chemischen Reagenzien kovalente Verknüpfungen in Proteine, oder zwischen interagierenden Proteinen in Proteinkomplexen, eingeführt. Diese liefern Distanzinformationen über die miteinander verknüpften Aminosäurereste. Die native MS dient der Bestimmung der Masse von intakten Proteinkomplexen, um Aussagen über deren Stöchiometrie und direkten Interaktionen zwischen verschiedenen Untereinheiten sowie über deren Anordnung im Komplex zu erhalten. Beide massenspektrometrische Ansätze wurden in dieser Arbeit kombiniert, um komplementäre Strukturinformationen von p53 zu erlangen.

Humanes Vollängen-Wildtyp-p53 wurde als Fusionsprotein mit einer N-terminalen, löslichkeitsvermittelnden Lipoyl-Domäne der Dihydrolipoyl-Transacetylase des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus *Bacillus stearothermophilus* löslich in *Escherichia coli* exprimiert, gereinigt und für Strukturanalysen verwendet. Die Lipoyl-Domäne wurde über eine TEV-Schnittstelle (*tobacco etch virus*) von p53 abgespalten. Dabei musste sichergestellt werden, dass das gereinigte p53 in aktiver Form vorlag. Als Kriterien für die Aktivität dienten die Bildung der *in vivo* aktiven, tetrameren p53-Spezies sowie die spezifische Bindung von Response Element-DNA (RE-DNA). So konnte mittels nativer MS sichergestellt werden, dass die strukturierten Bereiche des Proteins, die DNA-Bindedomäne und die Tetramerisierungsdomäne, korrekt gefaltet waren und ihre Funktion ausüben konnten.

* Es wird in dieser Arbeit dem englischen Begriff „Cross-Linking“ der Vorzug gegenüber dem deutschen Begriff „Quervernetzung“ gegeben.

Mittels nativer MS wurden Untersuchungen zum Tetramerisierungsverhalten von humanem Vollängen-Wildtyp-p53 durchgeführt. Durch die Verwendung eines äquimolaren Gemisches aus nicht-markiertem und ^{15}N -markiertem p53 konnte gezeigt werden, dass das aktive p53-Tetramer in An- und Abwesenheit von RE-DNA aus initialen Dimeren gebildet wird. Dadurch ergab sich eine Vereinfachungen für die nachfolgenden Cross-Linking-Experimente.

So wurden für die Cross-Linking-Reaktionen äquimolare Mischungen aus nicht-markiertem und ^{15}N -markiertem p53 verwendet, um zwischen intra- und intermolekularen Cross-Linking-Produkten zu unterscheiden. Aufgrund der Bildung des p53-Tetramers aus Dimeren konnte es sich bei intermolekularen Cross-Linking-Produkten nur um Verknüpfungen zwischen den zuvor gebildeten p53-Dimeren im Tetramerkomplex handeln. Auf diese Weise wurden mit Hilfe von zwei homobifunktionellen, aminreaktiven Cross-Linking-Reagenzien (BS^2G und BuUrBu) Informationen über die Topologie der C-terminalen regulatorischen Domäne von p53 innerhalb des aktiven Tetramers erhalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die räumliche Anordnung der C-terminalen Domäne von dem veröffentlichten Strukturmodell des p53-Tetramers von Tidow *et al.* abweicht und eine wesentlich kompaktere p53-Tetramerstruktur als bislang postuliert vorliegen muss.

Zur strukturellen Untersuchung der N-terminalen p53-Domäne wurde ein carboxyl- und aminreaktives Kopplungsreagenz (DMTMM) verwendet. Mit Hilfe einer in dieser Arbeit erstmalig eingesetzten Kombination aus chemischem Cross-Linking und nativer MS konnte gezeigt werden, dass durch die Modifikation mit diesem Reagenz die spezifische DNA-Bindung des p53-Tetramers verloren ging. Bei der Verwendung des homobifunktionellen, aminreaktiven Cross-Linkers BuUrBu hingegen blieb diese erhalten. Die Kombination aus chemischen Cross-Linking und nativer MS bewährte sich als geeignete Methode zur Etablierung der Cross-Linking-Bedingungen und zur Auswahl geeigneter Cross-Linking-Reagenzien für die strukturelle Analyse von p53. So mussten für p53 eine wesentlich niedrigere Reaktionstemperatur, kürzere Reaktionszeiten und ein sehr geringer molarer Überschuss an Cross-Linker verwendet werden als für globuläre Proteine. So konnte das Risiko des Auftretens artifizierender Strukturen im Verlauf der Cross-Linking-Reaktion minimiert werden.

Die eindeutige massenspektrometrische Identifizierung von Cross-Linking-Produkten gestaltet sich oft als schwierig. Durch die Anwendung des aminreaktiven, MS/MS-spaltbaren Cross-Linkers BuUrBu konnten vielversprechende Resultate für p53

erzielt werden, was die Entwicklung eines automatisierten Arbeitsablaufes zur strukturellen Proteinanalytik betrifft. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Cross-Linking-Produkte von p53 anhand charakteristischer Dublett-Signale mit Hilfe der Software MeroX identifiziert. Die Fragmentierung der Cross-Linking-Produkte im Massenspektrometer unter definierten Bedingungen (*stepped HCD, higher energy collision induced dissociation*) lieferte hierbei die höchsten Identifizierungsraten an einzigartigen Cross-Linking-Produkten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der hier erstellte Arbeitsablauf geeignet ist, Cross-Linking-Produkte zur strukturellen Analyse gereinigter Proteine und Proteinkomplexe eindeutig zu identifizieren. Für die Analyse komplexer Gemische, wie Zellysate, sind allerdings Vortrennungsschritte nötig.

Summary

The tumor suppressor protein p53 is also referred to as the “guardian of the genome“. p53 controls a large variety of genes that are involved in the prevention of carcinogenesis, but despite nearly 40 years of p53 research, its structure remains elusive. p53 belongs to the intrinsically disordered proteins (IDPs) with 40% of its structure natively unfolded. IDPs frequently escape structural analysis with classical techniques, like X-ray crystallography.

Chemical cross-linking in combination with high-resolution mass spectrometry (MS) and native MS presents alternative techniques for 3D-protein structure elucidation and protein-complex topology analysis. Cross-linking reagents allow connecting proteins or protein complexes covalently to yield information on the distances between the respective amino acid residues. Native MS is a technique for determining intact masses, studying the stoichiometry and investigate the topology of protein assemblies. A combination of both techniques will allow generating complementary structural data of p53.

Human full-length wildtype p53 was expressed in *Escherichia coli* as soluble fusion protein with an *N*-terminal lipoyl domain, derived from the dihydrolipoyl transacetylase of the *Bacillus stearothermophilus* pyruvate dehydrogenase complex. During p53 purification, the fusion protein was cleaved via its TEV (*tobacco etch virus*) cleavage site, which allowed separating the lipoyl domain from p53. Formation of the p53 tetramer as functional unit *in vivo*, as well as the specific binding of response element (RE) DNA were used as controls for confirming the activity of purified p53. Both criteria guaranteed at least a proper folding of the DNA binding domain and the tetramerization domain of p53.

The tetramerization behavior of human full-length wildtype p53 was investigated by native MS. Using equimolar mixtures of non-labeled and ¹⁵N-labeled p53 indicated p53 tetramer formation, in the presence and absence of RE-DNA, to originate from a dimerization of initially formed dimers. This allowed a simplification regarding the unambiguous identification of cross-linked products. As such, every unambiguously identified intermolecular cross-link has to be located in the interface region of p53 dimers according to the dimer-of-dimers scenario. The use of the homobifunctional, amine-reactive cross-linkers BS²G and BuUrBu provided information about the topology of the *C*-terminal regulatory domain of p53 within the active p53 tetramer. Comparing cross-linking data obtained herein with a tetrameric p53 model published by Tidow *et al.* indicated a more compact tetrameric p53 structure than perceived in that model.

Structural investigation of the *N*-terminal transactivation domain of p53 was carried out using the carboxylic- and amine-reactive, zero-length cross-linker DMTMM. A combination of chemical cross-linking and native MS, which is first described in this work, revealed a loss of specific DNA binding by p53 after modification by DMTMM. On the other hand, p53 cross-linking with BuUrBu fully retained specific DNA binding. The combination of cross-linking and native MS has proven to be a powerful tool for evaluating cross-linking reaction conditions and for selecting suitable cross-linkers to investigate the structure of p53. Low reaction temperatures, short reaction times, and low molar excess of cross-linker have to be employed compared cross-linking experiments of globular proteins to minimize the risk of extensive cross-linking and creating structural artifacts.

An unambiguous identification of cross-linked products is often challenging. The amine-reactive, MS/MS-cleavable cross-linker BuUrBu yielded promising results for analyzing the p53 tetrameric structure. An automated workflow for structural proteomics was established based on this reagent. For p53, cross-linked products were identified with the software MeroX by utilizing characteristic doublet signals provided by the defined MS/MS-cleavage of BuUrBu. Fragmentation in the mass spectrometer under defined conditions (*stepped* HCD, *higher energy collision-induced dissociation*) delivered maximum identification rates of unique cross-links. The workflow established herein provided optimum results for analyzing cross-linking data originating from purified proteins or protein complexes, but also showed limitations for the analysis of more complex mixtures, such as whole cell lysates. Here, extensive pre-fractionation steps are required for an unambiguous identification of cross-links.

1 Einleitung

1.1 Intrinsisch ungeordnete Proteine: Ein Überblick

Ende der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts postulierte Anfinsen, bestärkt durch seine Experimenten an Ribonuklease A, dass jedes Protein unter physiologischen Bedingungen eine native Proteinfaltung minimaler Energie besitzt, die in dessen Aminosäuresequenz codiert ist, wodurch die Funktionalität dieses Proteins gewährleistet wird [1, 2]. Wie kann dieses Prinzip nun für Proteine angewandt werden, die keine feste Struktur besitzen und dennoch eine Funktion ausüben?

Beobachtungen, die mit Anfinsens Dogma brechen, wurden verneint und weitestgehend ignoriert. Um den Jahrtausendwechsel wurden einige konzeptionelle Studien veröffentlicht, die besagen, dass viele Proteine unter nativen Bedingungen unstrukturierte Regionen enthalten oder komplett „intrinsisch ungeordnet“ sind [3-6]. Diese Studien legten den Grundstock für ein neues Forschungsgebiet. Eine Vielzahl von Studien und Beobachtungen begründeten das Gebiet der „unstrukturierten“ Biologie, die heute ein integraler Bestandteil der Strukturbiologie und Biochemie ist [7]. Der Paradigmenwechsel wurde durch eine Reihe experimenteller Beobachtungen von „Unordnung“ in einigen wenigen Proteinen erreicht. Die Strukturbiologie um den Jahrtausendwechsel beruhte auf ca. 18.000 in der *Protein Data Bank* (PDB) hinterlegten Strukturen, während die PDB mittlerweile annähernd 129.000 Strukturen umfasst. Wie man mittlerweile herausgefunden hat, enthalten Tausende dieser Proteine ebenfalls unstrukturierte bzw. ungeordnete Bereiche, die nur eine geordnete Struktur annehmen, wenn sie an einen bestimmten Interaktionspartner gebunden sind [7]. Dieser Sachverhalt erklärt, warum viele Proteine nur mit Bindungspartnern kristallisiert werden können und viele Regionen oft strukturell ungeklärt sind [8]. Die Untersuchung dieser strukturell ungeklärten Proteinregionen mit weiterführenden Strukturaufklärungsmethoden wie Circular dichroismus (CD), Kernresonanzspektroskopie (NMR) und Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) ermöglichte die Erstellung einer Datenbank für intrinsisch ungeordnete Proteine (IDPs) und intrinsisch ungeordnete Regionen (IDRs), die sogenannte DisProt-Datenbank, welche mittlerweile (Zugriff: 21.04.2017) 2970 Einträge umfasst [8, 9].

Einen weiteren Entwicklungsschub für das Feld der IDPs stellen neu entwickelte Algorithmen zur Sekundärstrukturvorhersage aus Aminosäuresequenzen dar. So existierte im Jahre 2002 nur ein einziger Algorithmus (PONDR; Predictor of Natural Disor-

dered Regions) [10], wohingegen man heute auf 50 Algorithmen zurückgreifen kann. Diese liefern komplementäre Ergebnisse, da sie auf verschiedenen Prinzipien beruhen [11], jedoch zeichnen sich die Algorithmen ebenfalls durch eine hohe Genauigkeit aus [12]. Mit Hilfe dieser weiterentwickelten Vorhersagemethoden konnte gezeigt werden, dass weit mehr Proteine als bisher angenommen zu den IDPs zählen oder IDRs aufweisen. So liegt der geschätzte Anteil an Proteinen, die IDRs enthalten, in Eukaryoten bei 15-45% [13]. Dabei handelt es sich zum Großteil um regulatorische oder in Signaltransduktionsprozesse involvierte Proteine, welche mit möglichst vielen Bindungspartnern interagieren müssen [14, 15]. Prominente Vertreter der IDPs sind zum Beispiel der Transkriptionsfaktor p65 (RelA), Cadherin, RIP1/RIP3-Kinase-Komplex (RIP1/RIP3-Nekrosom), der Cdk1-Inhibitor Sic1 und nicht zuletzt p53 [16, 17].

1.2 p53 – „Der Wächter des Genoms“

1.2.1 Geschichtlicher Überblick

Im Jahr 1979 wurde bei Untersuchungen zur Funktionsweise des *simian virus* (SV40), welches zur Familie der Polyomaviridae gehört, ein Protein der transformierten Wirtszelle entdeckt, welches sich im Laufe der nächsten Dekaden als einer der wichtigsten Ansatzpunkte für die moderne Krebstherapie herausstellen sollte [18]. Die Arbeitsgruppen von Arnold J. Levine von der Princeton University, und David P. Lane vom Imperial College in London identifizierten unabhängig voneinander ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa, welches augenscheinlich einen Komplex mit dem T-Antigen des SV40 bildete [19, 20]. Als klar wurde, welche Schlüsselposition das T-Antigen als virales Onkoprotein bei der Initiation und der Aufrechterhaltung einer stabilen Transformation der Wirtszelle mit dem SV40-Virus einnimmt, erzeugte dieses neu entdeckte Wirtsp Protein große Aufregung. Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde spekuliert, dass p53 “[...] *may normally act as a regulator of certain cellular functions related to growth control and itself be neutralized by binding to T antigen.*“ [19].

In den 1980er Jahren wurden weitere Interaktionen von Virusproteinen mit dem nun als p53 bekannten Protein beobachtet. Es konnte sowohl eine Komplexbildung mit einem Onkoprotein des Adenovirus, als auch mit dem E6-Onkogen des humanen Papillomavirus nachgewiesen werden [21-23]. Fälschlicherweise bestärkte dies die Schlussfolgerung, dass p53 in die virale Replikation und die Tumorgenese sogenannter „kleiner

DNA-Tumolviren“ involviert sei. Zusätzlich konnten verschiedene p53-cDNA-Klone identifiziert werden, von denen viele in Kombination mit dem Ras-Onkogen Zellen transformieren können, was p53 als Onkogen etablierte [24-26]. Diese Annahme wurde am Ende der 1980er Jahre revidiert, da viele der identifizierten cDNA-Klone Mutationen enthielten und der p53-Wildtyp die Transformation von Zellkulturen mittels Onkogenen verhinderte [27, 28]. In der Tat wurden sowohl bei Tumoren von Mäusen, bei Tumorzelllinien in Kultur, und am wichtigsten, in der DNA von humanen Darmkrebszellen Mutationen in beiden Allelen des p53-Gens gefunden, was schlagartig den p53-Wildtyp als Tumorsuppressorprotein klassifizierte und nicht als Onkoprotein [29-31].

Die Erkenntnisse der 1980er Jahre wurden hauptsächlich durch vier Beobachtungen der 1990er Jahre bestätigt. I) Patienten mit dem Li-Fraumeni-Syndrom, welche eine Mutation im p53-Gen aufweisen, erkrankten mit einer 100%igen Wahrscheinlichkeit an Krebs und bildeten verschiedene, voneinander unabhängige Tumore aus [32]. II) Mäuse mit einer *loss of function*-Mutation im p53-Gen bildeten frühzeitig Tumore [33]. III) Bis zu 50% aller humanen Tumorerkrankungen liegt eine Mutation im p53-Gen zugrunde [34]. IV) In vielen Tumorgeweben wird eine ungewöhnlich hohe Expressionsrate von p53 beobachtet [35, 36]. Diese vier Beobachtungen verdeutlichen, dass p53 eine entscheidende Rolle in der Verhinderung der Krebsentstehung spielt. Als 1992 eine Reihe von Veröffentlichungen zeigten, dass p53 an spezifische DNA-Sequenzen (Response-Elemente; RE) bindet und so die Transkription verschiedener Ziel-Gene verstärkt, wurde klar dass p53 die Funktion eines Transkriptionsfaktors innehat [37-39].

1.2.2 Struktur-Funktions-Beziehung

Das Tumorsuppressorprotein p53 erfüllt im Prinzip nur eine Aufgabe: die eines Transkriptionsfaktors [39]. Dabei wird eine spezielle DNA-Sequenz (Response-Element, RE) *upstream* des Zielgens erkannt und gebunden. Auf diese Weise wird die Transkription des Zielgens initiiert oder verstärkt. p53 aktiviert eine Vielzahl an Genen, die lebensnotwendige Regulationsprozesse der jeweiligen Zelle steuern. Zu diesen gehören Apoptose, Seneszenz, Anti-Angiogenese und Zellzyklus-Arrest [40-43]. Ein Sonderfall, der nicht zwangsläufig den programmierten Zelltod oder Stasis der Zelle mit sich bringt, ist die Aktivierung von DNA-Reparatur-Mechanismen, welche durch DNA-Schäden initiiert werden [44]. Damit der betitelte „Wächter des Genoms“ nicht zum Henker wird, bedarf es eines komplexen Regulationsnetzwerkes, um p53 bei Nichtbedarf zu inaktivieren (Abb. 1.1).

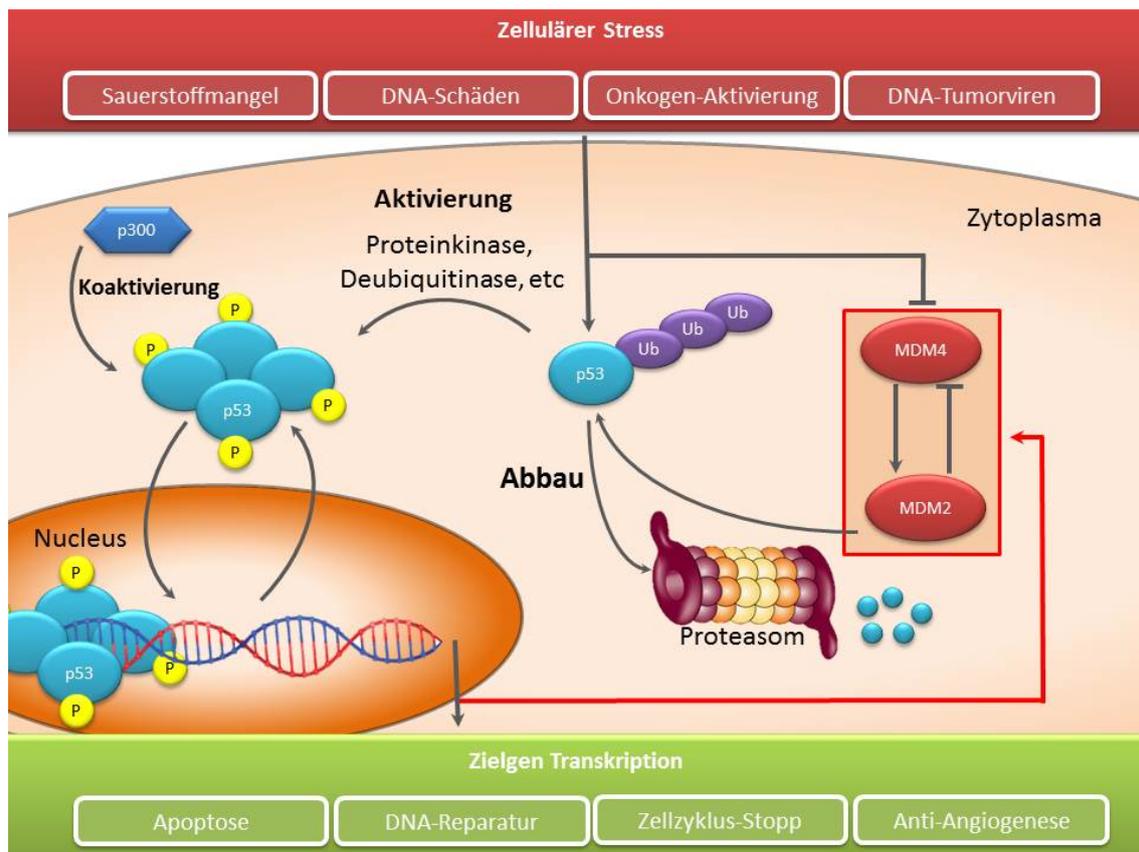


Abb. 1.1: Vereinfachte Darstellung der Kernelemente des p53-Regulationsnetzwerkes. Durch zelluläre Stresssignale wird p53 über einen nur zum Teil verstandenen Mechanismus aktiviert, in den unter anderem mehrere Proteinkinasen involviert sind. In Verbindung mit Koaktivatoren, wie der Acetyltransferase p300/CBP, reguliert p53 die Transkription verschiedener Zielgene, welche die zelluläre Reaktion bestimmen. Eine streng kontrollierte Rückkopplungsschleife, in der p53 die Expression seiner Negativ-Regulatoren, wie der E3 Ubiquitin-Ligase MDM2, kontrolliert, hält bei Nichtbedarf die intrazelluläre Konzentration von p53 sehr niedrig. Dies geschieht durch Ubiquitinierung, gefolgt von einem proteasomalen Abbau. MDM2 und p300/CBP konkurrieren hierbei um Bindestellen am N-Terminus von p53. Das MDM2-Homolog MDM4 ist ebenfalls an dem Rückkopplungsmechanismus beteiligt und arbeitet entweder synergetisch mit diesem oder ihm entgegen. Die Aktivierungsmechanismen stören diese Rückkopplungsschleife.

Im nicht-gestressten Zustand der Zelle, liegt p53 in Konzentrationen im niederen nanomolaren Bereich vor. Dafür verantwortlich sind die Negativ-Regulatoren *mouse double minute* (MDM) 2 und MDM4 bzw. MDMX, welche zur Familie der E3-Ubiquitin-Proteinligasen gehören. Diese sorgen für die Ubiquitinierung von p53 und führen somit zu dessen Abbau [45, 46]. Sollte es zu zellulären Stresssignalen kommen, wie zum Beispiel Onkogen-Aktivierung, Sauerstoffmangel oder DNA-Schäden, wird

p53 posttranslational modifiziert [47]. Auf diese Weise wird die Bindung der Negativ-Regulatoren inhibiert und die der Coaktivatoren, wie p300/CBP (CREB-Bindeprotein), initiiert [48]. Dies führt zur Anreicherung von p53 in der Zelle, wodurch dessen aktive Form, ein Homotetramer, gebildet werden kann. Welches Ziel-Gen aktiviert wird, hängt vom ursächlichen Stresssignal und der daraus resultierenden posttranslationalen Modifikationen (PTMs) ab [47]. Es sind Acetylierungen, Phosphorylierungen, SUMOylierungen, Methylierungen und Neddylierungen bekannt, welche wie eine Art „Barcode“ für die Aktivierung des Ziel-Gens fungieren sollen [49]. Trotz der mittlerweile fast 40 Jahre andauernden p53-Forschung, ist das Regulationsnetzwerk von p53 noch nicht vollkommen verstanden, was ebenfalls für dessen Struktur gilt.

Wie in Abb. 1.2 gezeigt, besitzt p53 einen modularen Aufbau, der seine Struktur in Domänen gliedert.

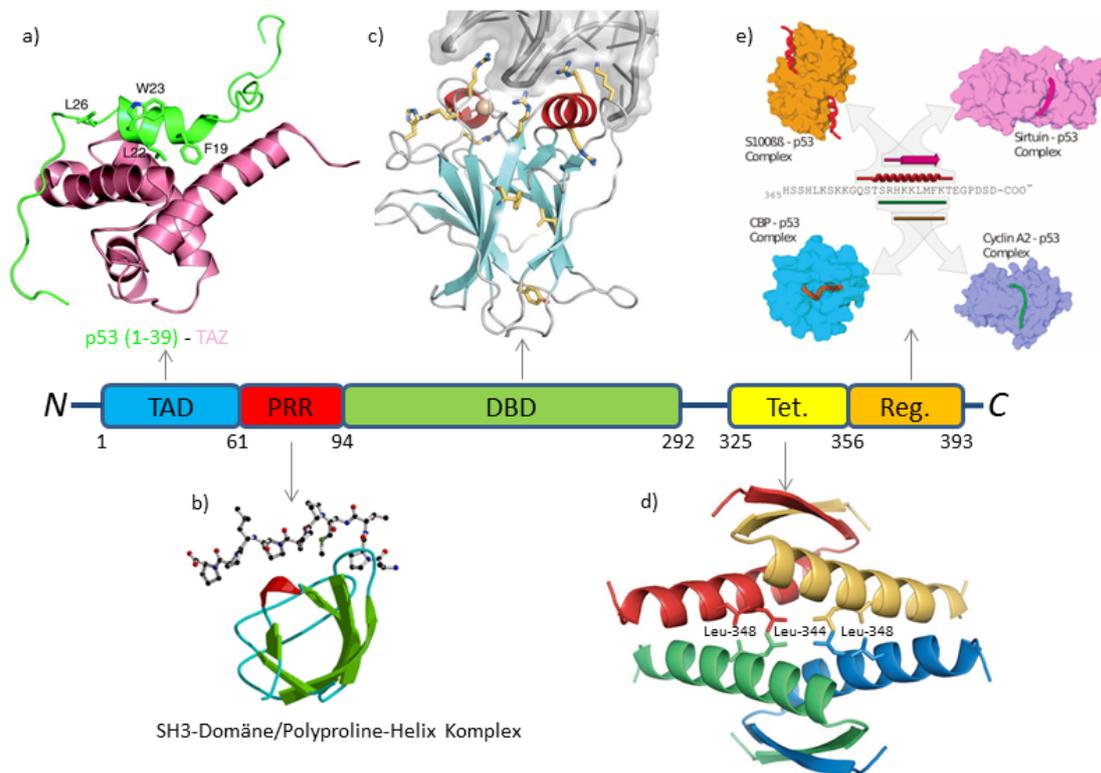


Abb. 1.2: Modularer Aufbau von p53. Der Transkriptionsfaktor p53 kann in fünf wichtige Domänen unterteilt werden: Die Transaktivierungsdomäne (TAD, blau), die Prolin-reiche Region (PRR, rot), die DNA-Bindedomäne (DBD, grün), die Tetramerisierungsdomäne (Tet., gelb) und die regulatorische C-terminale Domäne (Reg., orange), a) TAD im Komplex mit einer TAZ-Domäne [50]; b) Polyprolin-Helix im Komplex mit einer SH3-Domäne [51]; c) DBD im Komplex mit RE-DNA [40], d) Tet. als tetramerer Komplex [40], e) Annahme verschiedener Sekundärstrukturen durch die regulatorische C-terminale Domäne in Abhängigkeit vom Bindungspartner [52].

Es besteht aus einer Transaktivierungs-Domäne (TAD), einer Prolin-reichen Region (PRR) und einer regulatorischen Domäne (Reg.), welche alle IDRs darstellen, sowie zwei unabhängig voneinander faltenden Domänen, der DNA Bindedomäne (DBD) und der Tetramerisierungsdomäne (Tet.) [40].

Die Transaktivierungsdomäne (TAD) unterteilt sich nochmals in TAD1 und -2. Diese Unterdomänen sind für die Regulation der Transkriptionsaktivität von p53 verantwortlich. Hier binden sowohl die Negativ-Regulatoren MDM2/4, als auch Koaktivatoren, wie p300/CBP [53, 54]. Die TAD ist intrinsisch ungeordnet, um als zentralem Regulationspunkt möglichst viele Effektor-Proteine mit einer möglichst hohen Affinität binden zu können [55, 56]. In solchen Regionen befinden sich in IDPs auch immer wieder sogenannte *molecular recognition features*, welche aus ca. 20 Aminosäuren bestehen und von einer latent ungeordneten Struktur schnell in eine geordnete Struktur übergehen können [57, 58]. Ein Beispiel hierfür ist die latente α -Helix im *N*-Terminus von p53 (Aminosäuren 15-29), welche sich zu einer rigiden α -Helix nach der Bindung an eine hydrophobe Furche in MDM2/4 verfestigt [59]. Ebenso existiert eine amphipatische α -Helix im Bereich von TAD2, welche sich erst während der Bindung des Replikationsproteins A oder von Tfb1, einer Untereinheit des TFIID-Komplexes aus Hefen, bildet [60]. Interessanterweise sind auch überlappende Bindungsmotive für gänzlich gegenläufige Wege vorhanden. So überlappen die Bindestellen für den Koaktivator p300 und den Negativ-Regulator MDM2 [61]. Dieses Bindungsverhalten kann nur durch die enorme Flexibilität der IDRs ermöglicht werden. Ein *N*-terminales p53-Konstrukt bindet vier verschiedene Motive in p300: Taz1, CH1, Kix, Taz2/CH3 [61]. Dabei zeigte Taz2/CH3 mit einem K_D -Wert von 27 nM eine um sechsfach erhöhte Affinität im Vergleich zum Negativ-Regulator MDM2 [61]. Die Bindung verschiedener Effektoren wird ebenfalls stark durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) geprägt. So sind hauptsächlich Phosphorylierungen der *N*-terminalen Lysine und Serine dafür verantwortlich, Affinitäten zu einem jeweiligen Bindungspartner zu verschieben [62, 63].

Der TAD1/2 folgt die Prolin-reiche Region (PRR). Sie zeichnet sich durch das wiederholte Auftreten eines PXXP-Motivs (X steht für eine variable Aminosäure) aus [64]. Es ist bekannt, dass die PRR von p53 Protein-Interaktionen durch Bindung an Src-Homologie-3-Domänen (SH3-Domäne) vermitteln kann [65]. Das PXXP-Motiv ist in p53 nicht *per se* konserviert, aber der hohe Prolin-Anteil ist typisch, um diesen Bereich des Proteins rigider zu gestalten [66]. Es wird angenommen, dass die PXXP-Motive

eine Art Polyprolin-Helix-Struktur annehmen. Die Funktion der PRR ist noch nicht komplett geklärt. Es ist allerdings bekannt, dass ein rigider *Linker* mit einer definierten Länge zwischen der TAD und der DBD eine Notwendigkeit für die Funktionalität von p53 darstellt [66].

Die erste strukturierte und gleichzeitig größte Domäne in p53 ist die DNA-Bindedomäne (DBD). Diese Domäne nimmt einen Immunglobulin-ähnlichen β -Sandwich-Faltungstyp ein und stellt so ein basisches Gerüst dar, welches ideal für die DNA-Bindung geeignet ist [67-69]. Man kann die DBD in zwei Teile gliedern: Ein *loop-sheet-helix*-Motiv, welches die große Furche der DNA bindet und ein aus zwei *loops* bestehendes Motiv, welches durch ein koordiniertes Zink-Ion stabilisiert wird und an die kleine Furche der DNA bindet [40]. Das Zink-Ion wird von einem Histidin und drei Cysteinen tetrahedral koordiniert und trägt maßgeblich zur thermischen Stabilität der DBD bei. In Abwesenheit des Zink-Ions kommt es zu starken *loop*-Fluktuationen, was neben der Stabilität auch die Spezifität der DNA-Bindung vermindert [70, 71]. Die DBD diktiert ebenfalls die Stabilität des gesamten Proteins und ist mit einer Schmelztemperatur von 45 °C eher instabil [72]. Ein Grund hierfür sind vermutlich die polaren Aminosäuren, welche im hydrophoben Kern der DBD liegen und deshalb keine polaren Wechselwirkungen eingehen können. Analysen ergaben, dass die Aminosäuren an denselben Positionen bei den phylogenetisch älteren Vertretern, wie p63 und p73, noch hydrophober Natur sind und so das gesamte Protein stabilisieren können [40]. Tauscht man nur zwei der polaren Aminosäuren der DBD gegen hydrophobe Aminosäuren aus, so lässt sich die Stabilität um 1,6 kcal/mol steigern [68, 73, 74]. Es wird vermutet, dass durch die Instabilität der DBD eine sehr viel schnellere Umwandlung zwischen den aktiven und inaktiven Zuständen von p53 möglich wird. Die Hauptaufgabe der DBD ist die spezifische Bindung von RE-DNA. Diese bestehen aus zwei dekameren Halbseiten-Palindromen der allgemeinen Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3' (R=A,G; W=A,T and Y=C,T), die durch 0-13 Basenpaare voneinander getrennt sind [37]. Dabei besteht jede Halbseite aus einer Wiederholung einer invertierten pentameren Viertelseite. Jede dieser Viertelseiten soll von jeweils einer DBD des aktiven p53-Tetramers gebunden werden. Wie diese Bindungsmodalität genau funktioniert, wird jedoch noch diskutiert. Eine weit verbreitete Ansicht ist, dass p53-Dimere je eine Halbseite binden und so das komplette RE von einem p53-Tetramer gebunden wird [75]. Eine andere Studie zeigte, dass ein Dimer alternierende RE-Viertelseiten bindet und somit bereits beide Halbseiten von einem p53-Dimer gebunden werden können [76].

Die DBD endet mit einem unstrukturierten *linker*, der die Verknüpfung zur nächsten Domäne, der Tetramerisierungsdomäne (Tet), herstellt. Die Struktur der Tetramerisierungsdomäne wurde sowohl mittels Röntgenkristallographie als auch mittels Lösungs-NMR aufgeklärt und besteht aus einem kurzen β -Faltblattstrang, gefolgt von einem engen *turn* und einer α -Helix [77, 78]. Zwei dieser Domänen bilden ein initiales Dimer durch die Ausbildung eines intermolekularen, antiparallelen β -Faltblattes und eines antiparallelen α -Helix-Stapels. Zwei dieser Dimere assoziieren über ihre Helices und bilden ein α -Helix-Bündel mit D2-Symmetrie (Abb. 1.2) [40]. Der Tetramerisierungsprozess der isolierten Tetramerisierungsdomäne wird hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen getrieben. Dies konnte durch Mutation der hydrophoben Kernaminoacidsäuren und der damit ausbleibenden Tetramerisierung gezeigt werden. Es wurde lediglich ein stabiles Dimer gebildet, welches nur bei extrem hohen Konzentrationen ein Tetramer bildete [79]. Es existiert eine Studie, welche die Dimerisierung von p53 als einen kotranslationalen Prozess beschreibt und die anschließende Tetramerisierung als einen posttranslationalen, wobei lediglich Tetramere aus kotranslational gebildeten Dimeren assoziieren [80].

Die regulatorische C-terminale Domäne ist ebenfalls intrinsisch ungeordnet und weist lokale Unordnung-zu-Ordnungs-Übergänge auf. Hier befinden sich Bindestellen für regulatorische Zielproteine. Eine so vielseitige Bindung von Interaktionspartnern ist nur möglich, da der im ungebundenen Zustand intrinsisch ungeordnete C-Terminus verschiedene Sekundärstrukturelemente imitieren kann, wie ein β -Faltblatt durch Bindung von Sirtuin, eine α -Helix durch die Bindung von S100 β und verschiedene *Loop*-Strukturen bei der Bindung von Cyclin A2 und CBP (Abb. 1.2 e) [81]. Weiterhin kann die regulatorische Domäne aufgrund ihrer hohen Dichte an Lysinen unspezifisch an DNA binden [82, 83]. Sollte DNA am C-Terminus gebunden sein, könnte dies die spezifische DNA-Bindung der DBD inhibieren. Diese unspezifische DNA Bindung kann durch Acetylierung einiger Lysine vermindert oder gar komplett verhindert werden [82]. Außerdem geht sowohl die spezifische DNA-Bindung als auch die transkriptionelle Aktivität verloren, wenn man die C-terminalen 30 Aminosäuren des p53 entfernt [83]. Aufgrund dieser Beobachtungen wird angenommen, dass der C-Terminus sowohl an verschiedene regulatorischer Proteine, als auch an die Ziel-DNA bindet und an dieser entlang gleitet bis ein DNA-RE gefunden wurde. Nun kann die DBD das RE binden und die regulatorische Domäne gleichzeitig die DNA entlassen. Ob dies durch eine parallel ablaufende Acetylierung geschieht, ist nicht abschließend geklärt [40].

1.3 Strukturaufklärung von intrinsisch ungeordneten Proteinen

IDPs stellen für die traditionellen Methoden der Strukturaufklärung eine große Herausforderung dar. Durch die hohe Flexibilität der ungeordneten Regionen in diesen Proteinen ist es nahezu unmöglich, diese mittels Röntgenkristallographie zu untersuchen, da keine geeigneten Kristalle gebildet werden. Es stellt schon eine Herausforderung dar, wenn nur einige hochflexible *loop*-Bereiche in Proteinen vorhanden sind, so dass diese in der Kristallstruktur oftmals fehlen. Zum Teil ist es möglich, IDPs bzw. IDRs im Komplex mit Bindungspartnern zu kristallisieren, da hier ein Unordnung-zu-Ordnungs-Übergang durch die Bindung des Partners eintreten kann und Sekundärstrukturelemente fixiert werden, das Wachstum eines geeigneten Kristalles begünstigen kann. Die Methode der Wahl zu strukturellen Untersuchungen von IDPs ist die Kernspinresonanzspektroskopie in Lösung (Lösungs-NMR) [84]. Damit besteht in Theorie die Möglichkeit, auch hochflexible Proteine strukturell zu untersuchen. In der Praxis bestehen auch hier starke Limitierungen. Einerseits kann sich die Auswertung der NMR-Daten mit zunehmender Größe und Flexibilität des zu untersuchenden Proteins als sehr aufwendig gestalten. Zudem werden Hochfeld-Spektrometer mit einer sehr hohen Auflösung benötigt, um aussagekräftige Struktur- und Dynamikdaten zu erzeugen [85]. Weiterhin werden für die NMR-Analytik meist hoch konzentrierte Proteinlösungen (mg/ml) benötigt, was bei den meisten IDPs ein Problem darstellt. Falls die IDPs in solchen Konzentrationen erhalten werden, steigt mit der Konzentration das Aggregationsrisiko [86].

Mit wachsendem Interesse an IDPs wurden auch alternative Strukturaufklärungstechniken, computergestützte Techniken und Kombinationen aus diesen interessant [85]. Mit zunehmender Rechenleistung der heutigen Computersysteme nehmen auch Strukturvorhersageprogramme, oder - in diesem Fall - Unordnungsvorhersageprogramme, einen immer höheren Stellenwert ein. Dabei werden zwei Arten von Algorithmen verwendet, die auf biophysikalischen Modellen der Proteinfaltung [4, 87, 88], oder auf maschinellen Lernprozessen basieren, die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen zwischen strukturierten und ungeordneten Regionen vergleichen [85]. So zeigen aktuelle Studien basierend auf der Primärstrukturinformation, dass Proteome von Archaeen 12-24%, bakterielle Proteome 15-30% und eukaryotische Proteome sogar bis zu 50% aus ungeordnete Strukturen enthalten sollen [89]. Eine experimentelle Alternative zur NMR-Spektroskopie stellt das Verfahren der Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) dar, welches, in der letzten Dekade enorme Verbesserungen in Bezug auf Anwendbarkeit und vor allem Auflösung erfahren hat [90, 91]. Weiterhin haben sich in

den letzten 15 Jahren diverse Massenspektrometrie (MS)-basierte Verfahren etabliert. Dazu gehören die native MS [92], die Ionen-Mobilitäts-Massenspektrometrie (IM-MS) [93, 94] und die massenspektrometrische Analyse von chemisch quervernetzten Proteinen und Proteinkomplexen (Cross-Linking/MS, XL-MS) [95, 96]. Diese Methoden liefern in der Regel niederaufgelöste Strukturdaten, sind aber besonders vorteilhaft, wenn sie gleichzeitig genutzt werden, um komplementäre Daten zu erzeugen, oder direkt miteinander kombiniert werden [97].

1.4 p53-Tetramerstruktur: Status Quo

Trotz der nun fast 40 Jahre andauernden p53-Forschung, sind die Struktur des Monomers sowie die Topologie des Tetramers noch nicht aufgeklärt. Die Strukturen für die DNA-Bindedomäne und die Tetramerisierungsdomäne sind beide unabhängig voneinander aufgeklärt worden [67, 78]. Die Struktur der DBD im Komplex mit RE-DNA wurde mittels Röntgenkristallographie, die Struktur Tetramerisierungsdomäne mittels Röntgenkristallographie und in Lösungs-NMR aufgeklärt (1.2). Für intrinsisch ungeordnete Bereiche, wie die TAD, konnten bisher nur kleine Peptide im Komplex mit Bindungspartnern kristallisiert werden [20]. Für das p53-Volllängenprotein in seiner biologisch aktiven Form, dem Homotetramer, existieren bisher zwei Modelle (Abb. 1.3).

Das erste Modell beruht auf dem Versuch, die Strukturen der DBD und Tetramerisierungsdomäne mit Hilfe eines kombinierten Ansatzes aus NMR, Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, *Small Angle X-Ray Scattering*), EM (Negativfärbung) und molekularen Modellierungsmechanismen zu erfassen [98]. Dabei entstanden Modelle des p53-Tetramers im DNA-gebundenen und -freien Zustand. Im DNA-freien Zustand erscheint p53 als ausladendes, sternförmiges Konstrukt von lose miteinander interagierenden Dimeren (Abb. 1.3 a). Durch DNA-Bindung wird das p53-Tetramer zu einer kompakteren Struktur fixiert, welche die Ziel-DNA umklammert. Dabei binden die vier DNA-Bindedomänen jeweils eine Viertelseite des RE (Abb. 1.3 b). Das zweite Modell basiert nur auf Kryo-EM-Daten, wurde aber in den letzten 10 Jahren stetig weiter entwickelt. Bei diesem Modell bildet das p53-Tetramer eine kompakte, würfelförmige Struktur, in der die initialen Dimere wie Schichten aufeinander liegen [99]. Die Monomere hingegen zeigen eine Kopf-zu-Schwanz-Anordnung (Abb. 1.3 c). Die DNA-Bindung induziert hierbei nur eine leichte Konformationsänderung, bei der am Ende nur zwei der insgesamt vier DNA-Bindedomänen eine Halbseite der RE-DNA binden (Abb. 1.3 d) [100]. Welches der beiden sehr unterschiedlichen Modelle eher der Wahrheit entspricht, wird durch weitere Strukturuntersuchungen geklärt werden müssen [101].

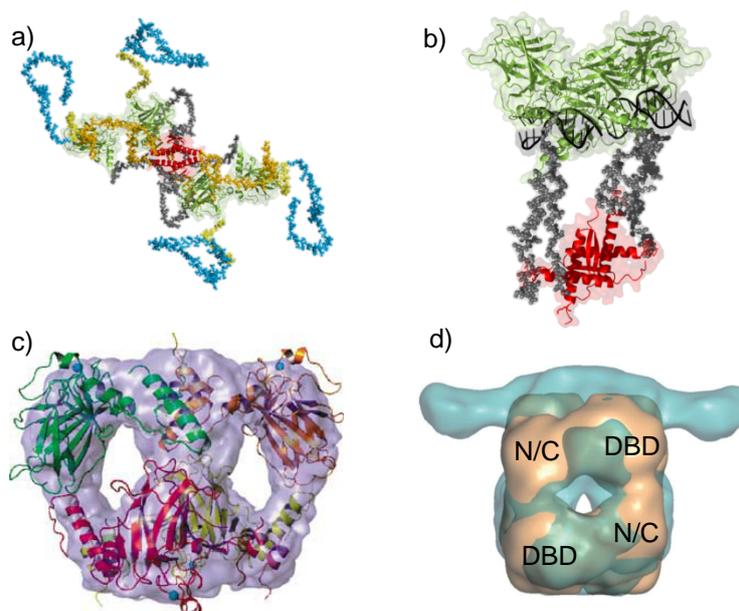


Abb. 1.3: Zwei Strukturmodelle für das p53-Tetramer im DNA-freien (a und c) und DNA-gebundenen (b und d) Zustand. a) und b) basieren auf einer Kombination aus verschiedenen Strukturaufklärungstechniken und wurden mit Hilfe des Programms Pymol dargestellt [98], c) und d) basieren auf Kryo-EM-Experimenten. N/C = N- und C-terminaler Kontakt c) entnommen aus [99], d) entnommen aus [100]. DBD: DNA-Bindedomäne; N/C: Kontakt N- und C-Terminus

1.5 Massenspektrometrische Grundlagen

Wie bereits in 1.3 beschrieben, stellt die Massenspektrometrie (MS) ein wichtiges Werkzeug für die Strukturaufklärung von Proteinen dar. Das grundsätzliche Ziel der MS ist die Identifizierung einer Verbindung anhand der Molekül- bzw. Atommassen ihrer Bestandteile [102]. Hierbei werden Ionen aus anorganischen oder organischen Substanzen erzeugt und in die Gasphase überführt. Die anschließende Trennung nach dem Verhältnis von Masse zu Ladungszahl (m/z) ermöglicht die qualitative sowie quantitative Charakterisierung der erzeugten Ionen [102]. Der Ionisierungsprozess kann unter Atmosphärendruck oder im Vakuum erfolgen. Die Detektion hingegen erfolgt immer im Hochvakuum. Um die MS effizient zur Analyse von Makromolekülen einsetzen zu können, bedarf es sanfter Ionisationsmethoden. Diese gewährleisten, dass Peptide, Proteine und Proteinkomplexe intakt in die Gasphase überführt werden können. Neben der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisierung (MALDI) zählt vor allem die Elektrospray-Ionisierung (ESI) zu den am häufigsten eingesetzten sanften Ionisationsmethoden [103, 104]. Vor allem wird ESI zunehmend verwendet, um Proteine und Proteinkomplexe aus ihrem nativen Zustand in Lösung in die Gasphase zu transferieren. Sollen diese Proteine im weiteren Verlauf massenspektrometrisch identifiziert werden, basiert

dies hauptsächlich auf der Analyse proteolytisch erzeugter Peptide [105]. Um eine falsch positive Identifizierung aufgrund des Auftretens isobarer Peptide in komplexen, proteolytischen Mischungen auszuschließen, wird sich der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) bedient [105, 106]. Dabei wird die genaue Abfolge der Aminosäuren bestimmt. Dafür muss im Massenspektrometer ein Vorläuferion ausgewählt werden und mit Hilfe einer geeigneten Fragmentierungstechnik, wie kollisionsinduzierter Dissoziation (CID), in Fragmentionen zerlegt werden. Diese werden dann in einem Fragmentionenspektrum aufgezeichnet. Zur Bestimmung der m/z -Werte sowohl von Vorläuferion als auch von Fragmentionen finden in der Proteomanalytik verschiedene Massenanalytoren Anwendung. Am häufigsten werden Ionenfallen, Fourier Transformation-Ionenzyklotronresonanz (FTICR)-, Flugzeit-, Quadrupol- und Orbitrap-Analysatoren verwendet [107].

Im Weiteren werden neben der ESI-Technik, die verschiedenen Fragmentierungstechniken und Massenanalytoren vorgestellt, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

1.5.1 Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Die zurzeit am häufigsten eingesetzte Methode zur Ionisation von Biomolekülen in Kombination mit der massenspektrometrischen Analyse ist die Elektrospray-Ionisation. Bei dieser handelt es sich um eine der wenigen Methoden, bei der die Ionisierung bei Atmosphärendruck erfolgt. Ihr kontinuierlicher Charakter macht ESI für eine Kopplung mit flüssigkeitschromatographischen Methoden optimal geeignet. Die heute bekannte Methode der ESI wurde bereits 1968 von Dole beschrieben [108] und in den achtziger Jahren von John Fenn mit der Massenspektrometrie gekoppelt [104], was im Jahre 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt wurde. Der schematische Aufbau einer ESI-Quelle ist in Abb. 1.4 gezeigt. Im Grunde beruht die Ionisation mittels Elektrospray auf der Erzeugung eines Aerosols aus geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld [104]. Dabei wird eine Potentialdifferenz zwischen der Kapillare und dem Massenspektrometer erzeugt, wodurch es zu einer Ladungsverteilung innerhalb der Flüssigkeit kommt. Im positiven Ionisationsmodus dient die Kapillare als Anode, welche die negativ geladenen Ionen in der Flüssigkeit anzieht und der Eingang des Massenspektrometers als Kathode, in dessen Richtung sich die positiv geladenen Ionen der Lösung ausrichten. Verbindet man diese Art der Ionenausrichtung im elektrischen Feld mit einem kontinuierlichen

Flüssigkeitsstrom, der an der Kapillare anliegt, so bildet sich durch die Kationen in Lösung an der dem Massenspektrometer zugewandten Seite ein Flüssigkeitskonus, der sogenannte Taylor-Konus [109].

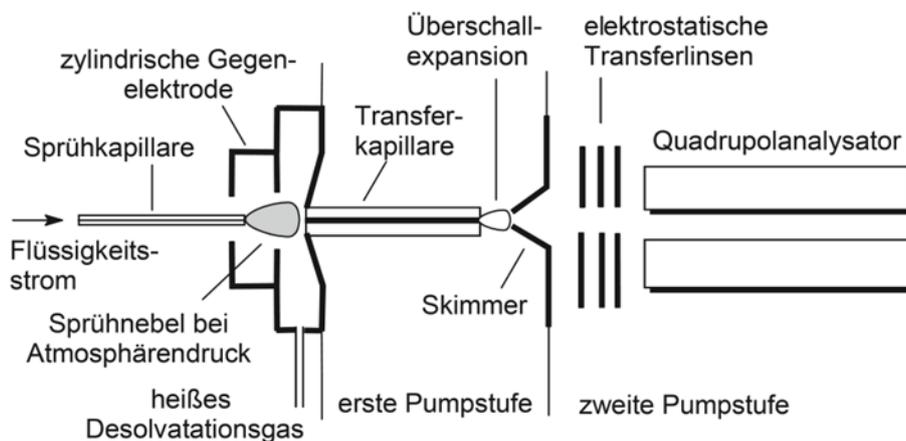


Abb. 1.4: Aufbau einer ESI-Quelle. Schematischer Aufbau einer ESI-Quelle. Die Analytlösung wird mittels einer Kapillare zum Eingang des Massenspektrometers geführt. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung entsteht ein Spray, das zur Desolvatisierung der Ionen und deren Eintritt ins Massenspektrometer führt. Abbildung nach [102].

Die Anionen der Flüssigkeit reichern sich auf der entgegengesetzten Seite an und führen zu einer Aufhebung des elektrischen Feldes in der Flüssigkeit. Durch die zunehmende Feldstärke an der Spitze des Taylor-Konus kommt es zu einem feinen Flüssigkeitsstrom, von dem sich kleine Tröpfchen mit einer sehr hohen Ladungsdichte abtrennen. Diese Tröpfchen verringern ihr Volumen durch Verdampfungsprozesse nun so weit, bis eine kritische Ladungsdichte, das sogenannte Rayleigh-Limit, überschritten wird und es zur Entstehung von „Nanotröpfchen“ (Tropfen sehr hoher Ladungsdichte mit nur wenigen Nanometern Durchmesser) kommt. Dieser Prozess wird auch als Coulomb-Explosion bezeichnet [110-112]. Aus diesen Nanotröpfchen gehen freie Ionen in die Gasphase über. Die Bildung dieser freien Ionen kann mittels zwei verschiedener Modelle erklärt werden: 1) das Modell des geladenen Rückstandes (CRM, *charged residue model*) und 2) das Modell der Ionenverdampfung (IEM, *ion evaporation model*). Beim CRM entsteht aus einem Nanotröpfchen durch Verlust des Lösungsmittels ein desolvatisiertes Ion, welches die Gesamtanzahl aller verbliebenen Ladungen übernimmt [108, 113]. Beim IEM wird davon ausgegangen, dass einzelne, desolvatisierte, hoch geladene Ionen von der Oberfläche der Nanotröpfchen direkt verdampfen [114, 115]. Beide Modelle sind weder bewiesen noch widerlegt und es gibt Sachverhalte, die jeweils nur

durch ein Modell erklärt werden können. So kann das Auftreten relativ großer, niedrig geladener Moleküle eher mit dem CRM und das Auftreten großer, hoch geladener Moleküle besser mit dem IEM erklärt werden.

1.5.2 Massenanalysatoren

1.5.2.1 Flugzeit-Analysator

Flugzeitanalysatoren (TOF, *time-of-flight*) werden seit den 1940er Jahren verwendet [116]. Hier beruht die Trennung der Ionen aufgrund ihres m/z -Verhältnisses auf ihrer Flugzeit im feldfreien Raum. Ionen werden im elektrischen Feld auf eine bestimmte kinetische Energie beschleunigt und dann in ein feldfreies Flugrohr transferiert. Dabei gilt folgender physikalischer Zusammenhang:

$$\text{Gl. 1.1} \quad E_{el} = ezU = \frac{1}{2}m_i v^2 = E_{kin}$$

$$\text{Gl. 1.2} \quad t = \frac{s}{v}$$

$$\text{Gl. 1.3} \quad \frac{m_i}{z} = \frac{2eUt^2}{s^2}$$

Nach der Beschleunigung im elektrischen Feld sollten alle Ionen eine identische kinetische Energie aufweisen und in der feldfreien Region entsprechend ihrer Masse nach verschiedenen Zeiten den Detektor erreichen. Um die Auflösung eines TOF-Analysators zu erhöhen, kann die Strecke (s), welche die Ionen zurücklegen, erhöht werden. Um dies zu erreichen, ohne das Flugrohr stark zu verlängern, kommt ein sogenanntes Reflektron zum Einsatz [117]. Beim Reflektron handelt es sich um eine Reihe ringförmiger Elektroden die als Ionenspiegel fungieren. Beim Eindringen der Ionen in das Reflektronfeld, werden diese abgebremst und anschließend entgegen ihrer ursprünglichen Richtung aus dem Feld katapultiert. Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis weisen bei initial unterschiedlicher kinetischer Energie eine variable Eindringtiefe auf. So können leicht abweichende Flugbahnen und Unterschiede in der kinetischen Energie identischer Ionenspezies ausgeglichen werden, da mit Hilfe des Reflektrons die Ankunftszeit am Detektor angeglichen wird.

1.5.2.2 Orbitrap-Analysator

Erstmalig beschrieb Kingdon im Jahr 1923 das Prinzip, Ionen auf Kreisbahnen um eine in z-Richtung ausgedehnte Zentralelektrode einzufangen. Diese Zentralelektrode ist von einer zylinderförmigen und an beiden Enden verschlossenen Außenelektrode umgeben [118]. Dieses Prinzip wurde von Knight weiterentwickelt, indem er die Form der Außenelektrode so änderte, dass der Radius von der Mitte zu den Außenseiten abnimmt [119]. Auf diese Weise konnten Ionen gespeichert werden und gezielt einem Detektor zugeführt werden. Diese sogenannte ideale Kingdon-Falle wurde von Alexander Markov zum heute bekannten Orbitrap-Massenanalysator weiterentwickelt [120, 121]. Er nutzte die spindelförmige Zentralelektrode und ummantelte diese mit einer in der Mitte geteilten, fassförmigen Außenelektrode. An der Zentralelektrode wird ein Potential von 3,5 kV angelegt, wobei die beiden Hälften der Außenelektrode geerdet sind [120]. Damit sich die zu analysierenden Ionen auf stabilen Kreisbahnen um die Zentralelektrode bewegen können, müssen sie tangential mittels der *C-trap* (*curved trap*) in die Orbitrap eingebracht werden. Dieser Prozess ist in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt. Aufgrund des quadrol logarithmischen statischen, elektrischen Feldes der Orbitrap bewegen sich die Ionen, zusätzlich zu ihren stabilen Kreisbahnen, periodisch entlang der z-Achse der Zentralelektrode. Diese Bewegung induziert einen Bildstrom in der geteilten Außenelektrode. Unabhängig von ihrer initialen Energie kann so die axiale Oszillationsfrequenz (ω_z) der gefangenen Ionen bestimmt werden. Diese ist indirekt proportional zur Quadratwurzel des m/z -Verhältnisses, was in Gleichung 2 beschrieben wird.

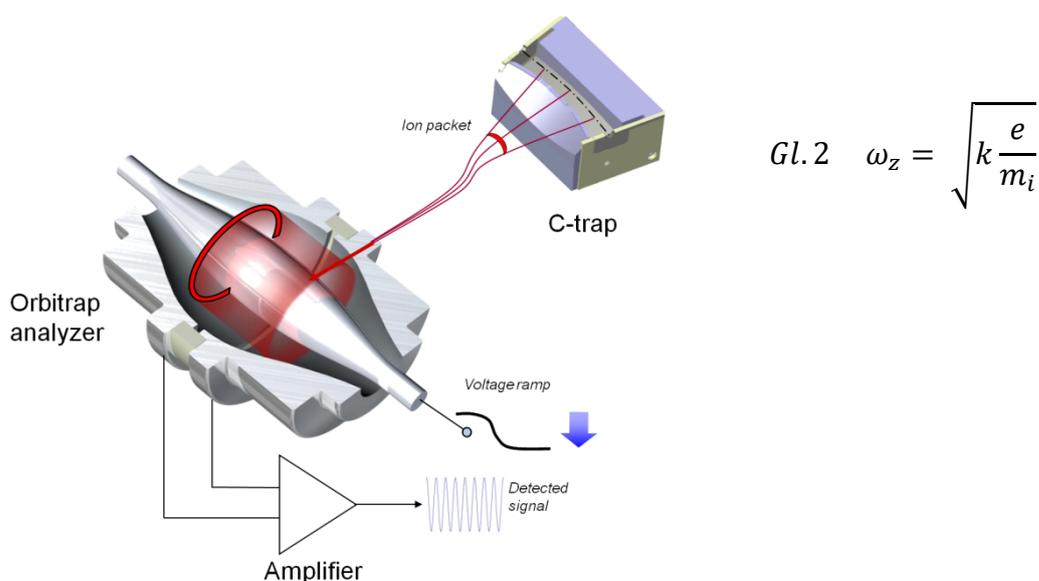


Abb. 1.5: Querschnitt einer C-Trap und einer Orbitrap. Links: Es wird der Detektionsprozess während eines Spannungsgradienten gezeigt (Abbildung entnommen aus [122]). Rechts: Gleichung zur Berechnung der axialen Oszillationsfrequenz in der Orbitrap.

1.5.2.3 Linearer Quadrupol

Lineare Quadrupole finden zahlreiche Einsatzmöglichkeiten in der MS. Einerseits können sie als reine Ionenoptik-Elemente zum gerichteten Transfer von Ionen im Massenspektrometer oder als Massenfiter eingesetzt werden. Sie bestehen, wie der Name erahnen lässt, aus vier hyperbolischen oder zylindrischen Elektroden (Abb. 1.6), die quadratisch um eine Längsachse angeordnet sind. Sich gegenüberliegende Elektroden besitzen jeweils das gleiche Potential. Dieses besitzt gleichzeitig eine Gleich- und eine Wechselstromkomponente. Dieses Potential alterniert mit einer bestimmten Frequenz, wodurch Ionen in x- und y-Richtung abwechselnd angezogen und abgestoßen werden (Abb. 1.6a). Das so erzeugte quadrupolare Feld kann mit Hilfe der *Mathieu*'schen Gleichungen beschrieben werden [123]. Die Werte für Gleichstrom- und Wechselstromspannung sowie die Frequenz bestimmen nun, welche Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis bzw. m/z -Bereich den Quadrupol in z-Richtung auf einer stabilen Bahn durchqueren. Ionen, die nicht im stabilisierten m/z -Bereich liegen, beschreiben keine stabilen Bahnen und bewegen sich radial aus dem Quadrupol heraus oder parallel zu den Stabelektroden. Ohne die Gleichstromkomponente operiert der Quadrupol als reiner Transferquadrupol für einen breiten m/z -Bereich. Der Quadrupol arbeitet dann im *RF-only*-Modus, wobei RF für Radiofrequenz steht [102].

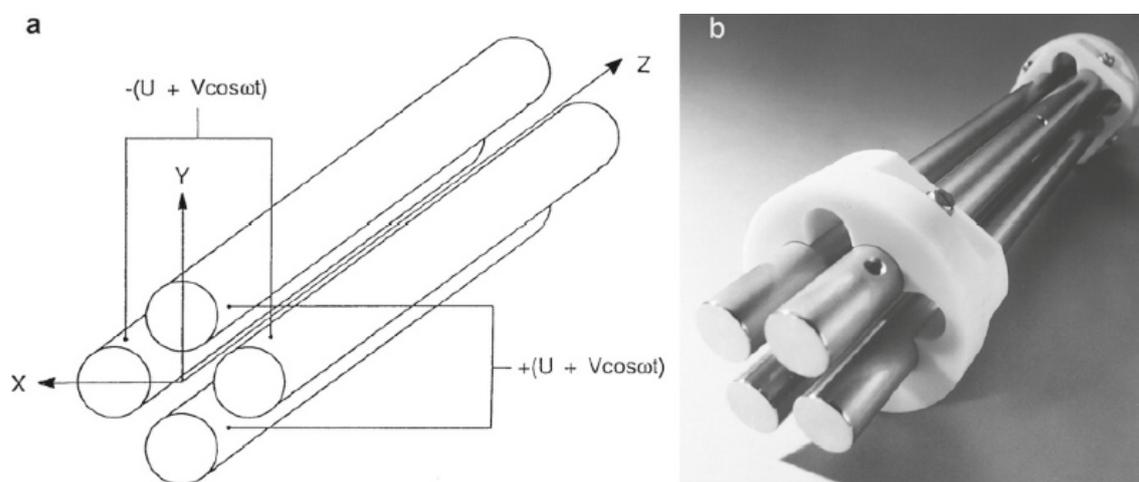


Abb. 1.6: Detailansicht eines *Quadrupol-Massenfilters*. *a)* Schematische Darstellung des *Quadrupols* mit eingezeichneten Achsen; Spannungen (U = Gleichspannung, V = Wechselspannung). *b)* Detailansicht eines *Quadrupols* (Abbildungen entnommen aus [102]).

1.5.3 Verwendete Massenspektrometer

Die in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer Orbitrap Fusion Tribrid [124] und High-Mass Q-TOF II [125] sind Hybridgeräte, die verschiedene Massenanalysatoren in sich vereinen und dadurch eine vielseitige Analytik ermöglichen.

1.5.3.1 Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer

Bei dem Orbitrap Fusion Tribrid-Gerät (Abb. 1.7) wird für eine verbesserte Transmission der Ionen anstatt eines Skimmers, wie er in älteren Geräten, z.B. dem LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer, üblich ist, ein Ionentrichter (S-Lens) verwendet [124]. Durch die Geometrie des folgenden gebogenen Transferquadrupols können Neutralteilchen effektiv vom restlichen Ionenstrom abgetrennt werden. Im Quadrupol-Massenfilter können Ionen eines m/z -Wertes isoliert oder alle Ionen in im RF-*only*-Modus hindurchgeleitet werden (1.5.2.3). Die Ionen werden zunächst gesammelt, um anschließend in den gewünschten Analysator transferiert zu werden. Sie können entweder in die Orbitrap überführt werden oder gelangen in die zweizellige lineare Ionenfalle. Für die Analyse in der Orbitrap müssen die gesammelten Ionen-Pakete in die gekrümmte Ionenfalle (*C-Trap*) überführt und für die tangentielle Injektion in die Orbitrap zentriert werden. Dies geschieht durch die Verringerung der kinetischen Energie der Ionen durch sogenannte Stoßkühlung (*collisional cooling*). Dabei wird Energie durch Zusammenstöße der Analytionen mit einem Inertgas, wie Stickstoff, die kinetische Energie auf die Gas-moleküle übertragen. Ein kurzer Hochspannungspuls injiziert nun das zentrierte Ionenpaket in den Orbitrap-Analysator. Dieser Transferschritt ist entscheidend für die Funktion der Orbitrap. So wird während der Injektion das anziehende Potential der Zentralelektrode verringert und die Ionen werden während eines sehr kurzen Zeitfensters, in einem bestimmten Winkel und leicht seitlich versetzt injiziert. An der Zentralelektrode liegt nach Injektion ein Potential von -3,5 kV (anziehend, im Positivionenmodus) und die Ionen nehmen ihre Kreisbahnen um die Zentralelektrode ein und oszillieren entlang der z -Achse. Um einen ausreichend langen Transienten aufzeichnen zu können, muss im Bereich der Orbitrap ein Hochvakuum von $10^{-8} - 10^{-10}$ mbar herrschen. Die Orbitrap der Fusion ist im Vergleich zu älteren Modellen (LTQ-Orbitrap XL-Gerät) kleiner und mit einer dickeren Zentralelektrode ausgestattet. Durch das stärkere elektrische Feld (*High-Field Orbitrap*) von bis zu 5 kV kann hier eine Auflösung von bis zu 500.000 bei m/z 200 bei gleichzeitig schnelleren Analysenzeiten gegenüber den vorherigen Orbitrap-Massenanalysatoren erreicht werden [124]. Die zweite Möglichkeit ist die Analyse in

der linearen Ionenfalle (LIT, *Linear Ion Trap*). Hier können die Ionen mit einer niedrigeren Auflösung, aber einer wesentlich besseren Sensitivität analysiert werden.

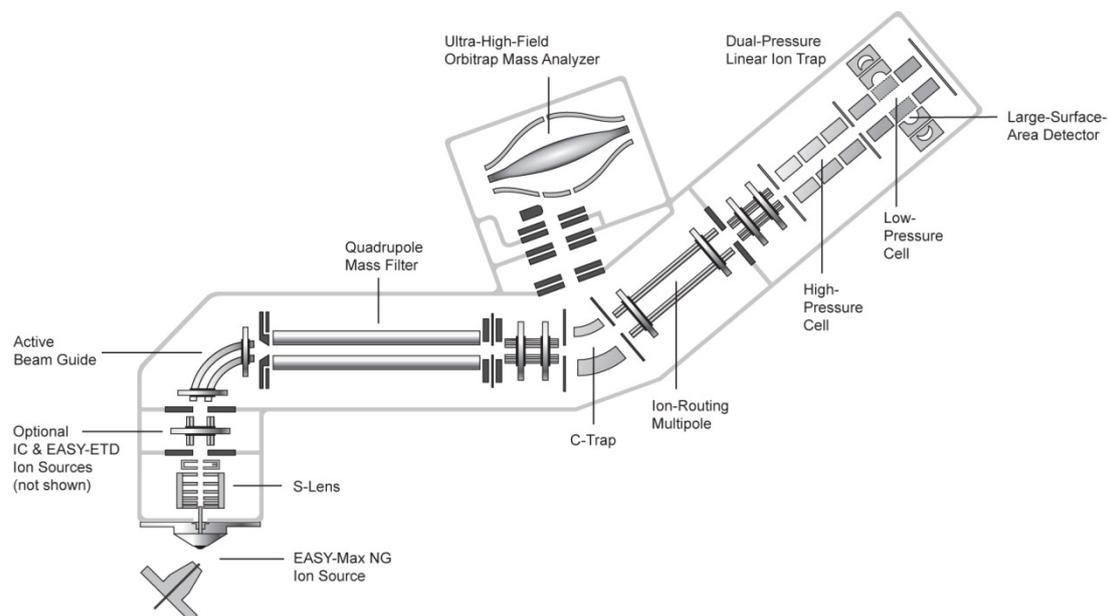


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers. (Thermo Fisher Scientific, www.planetorbitrap.com/orbitrap-fusion, Abbildung nach [124]).

1.5.3.2 High-Mass Q-TOF II-Massenspektrometer

Im Jahre 1996 wurde eine neue Art von Massenspektrometer von der Firma Micromass konstruiert [126]. Dieses Hybridgerät kombiniert einen Quadrupol-Massenfilter mit einem dazu senkrecht angeordneten TOF-Analysator. Zur Ionisation kommt eine ESI-Quelle zum Einsatz. Dieses erste Q-TOF-Gerät entwickelte sich zum Q-TOF II-Massenspektrometer weiter, welches durch diverse Modifikationen der Firma Waters/Micromass, in Kooperation mit dem Labor von Carol Robinson, zum ersten Tandem-Massenspektrometer zur Analyse großer makromolekularer Komplexe reifte [125]. Dieses als High-Mass Q-TOF II (Abb. 1.8) bezeichnete Massenspektrometer unterscheidet sich im Aufbau nicht von einem Standard Q-TOF II-Instrument. Als Ionisationseinheit dient eine sogenannte Z-Spray-ESI-Quelle von Waters, welche Neutralteilchen vom Eintritt in das Massenspektrometer abhalten soll. Es folgt ein Transfer-Hexapol, der die Ionen in den Quadrupol-Massenfilter leitet. Hier können, analog zu den Orbitrap-Hybridgeräten, Ionen eines bestimmten m/z -Wertes isoliert oder alle Ionen im RF-only-Modus durchgeleitet werden. Die weiteren Segmente des Gerätes sind eine Hexapol-Kollisionszelle, ein weiterer Transport-Hexapol gefolgt von fokussierender

Ionenoptik und einem orthogonal installiertem TOF mit Reflektron (1.5.2.1). Um dieses Massenspektrometer für die Analyse großer makromolekularer Komplexe nutzbar zu machen, bedarf es vier Modifikationen. Bei der Ionisation großer Ionen erhalten diese eine hohe kinetische Energie und weisen starke Abweichungen von ihrer eigentlichen Bewegungsrichtung im Massenspektrometer auf. Um dem entgegen zu wirken, werden sowohl der Druck in der Quellen-Region (p1), als auch in der Kollisionszelle (p3) kontrollierbar gestaltet, um ihn für *collisional cooling* (1.5.3.1) erhöhen zu können (Abb. 1.8) [125]. Dadurch wird die kinetische Energie verringert und die Flugbahn der Ionen stabilisiert.

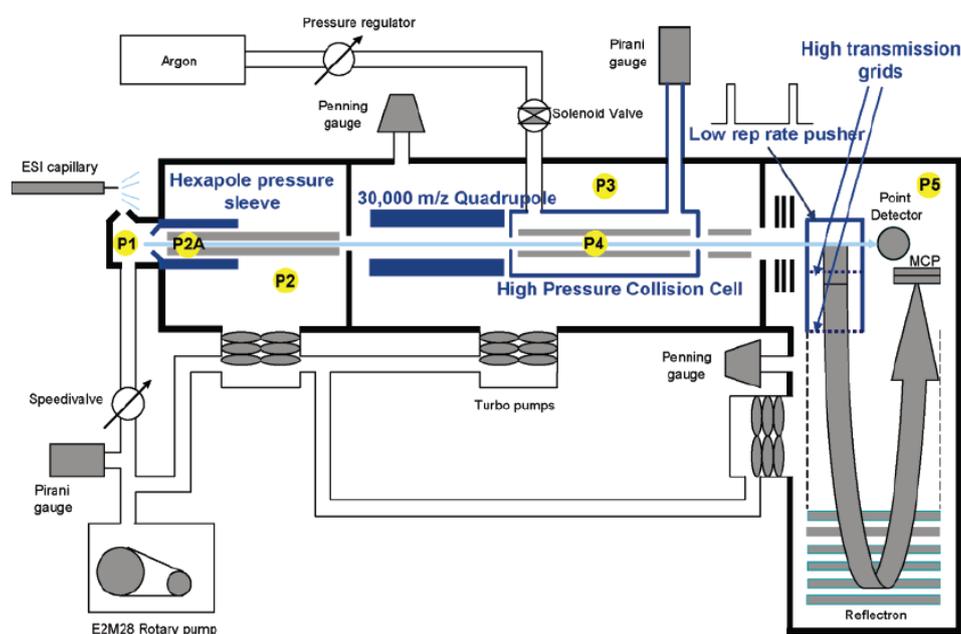


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des modifizierten High-Mass Q TOF II-Massenspektrometers. Die vorgenommenen Modifikationen für die Analyse sehr großer Ionen sind blau hervorgehoben. (Q-TOF II der Firma Waters/Micromass modifiziert durch MSVision, Abbildung entnommen aus [125].)

Weiterhin wird die Frequenz des Quadrupol-Massenfilters von standardisierten 832 kHz auf 300 kHz verringert, um Ionen mit einem m/z -Verhältnis von maximal ~ 30.000 den Durchtritt zu gewähren [125]. Um die Ionen mit dem orthogonalen TOF analysieren zu können, müssen Ionenpakete aus dem kontinuierlichen Ionenstrahl durch einen elektrischen Puls in Richtung des Reflektrons katapultiert werden. Dies geschieht im sogenannten *pusher stack* des orthogonalen TOF-Analysators (Abb 1.8, *high transmission grids*, p5). Jeder elektrische Puls stellt einen Analysezyklus dar. Die Puls-Intervalle sind hierbei automatisiert. Durch die deutlich erhöhte Transmission des Quadrupol-Massenfilters können nun Ionen in den TOF-Analysator gelangen, die eine längere

Flugzeit aufweisen als ein Messzyklus andauern würde und so für falsch detektierte Signale sorgen. Dieses Problem wird durch eine Verdopplung der Zeit zwischen den elektrischen Pulsen und einer damit verbundenen Verdopplung der Zeit eines Messzyklus gelöst. So dauert ein Messzyklus lange genug, um auch Makromoleküle im Bereich mehrerer Megadalton detektieren zu können.

1.5.4 Fragmentierung

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedener Fragmentierungstechniken angewandt. Die bekannteste davon ist die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID, *collision induced dissociation*). Hierbei werden Vorläuferionen mit Hilfe eines elektrischen Potentials beschleunigt und zur Kollision mit Molekülen eines Inertgases (z.B. Stickstoff, Argon, Helium) gebracht [127]. Dies erfolgt beim Orbitrap Fusion-Massenspektrometer im Hochdruck-Teil der Ionenfalle und beim Q-TOF II in der Kollisionszelle. Durch effektive Stoßvorgänge werden Bindungsbrüche in den Vorläuferionen hervorgerufen. Hierbei brechen erst die schwächsten Bindungen, welche im Falle von Peptiden und Proteinen die Peptid-Bindungen darstellen. So entstehen Fragmentionen, welche man nach dem Verbleib der Ladung in b- und y-Ionen unterteilt. Bei b-Ionen verbleibt die Ladung nach Bindungsbruch am N-terminalen und bei y-Ionen am C-terminalen Fragment (Abb. 1.9). Eine analoge Fragmentierungsmethode ist die kollisionsinduzierte Dissoziation mit höherer Energie (HCD, *higher energy collision induced dissociation*) [128]. Hierbei wird ebenfalls zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem angrenzenden Stickstoffatom der Peptidbindung ein Bruch induziert. In diesem Falle erfolgt die Anregung der Vorläuferionen mit einem Radiofrequenzpuls, was zu einer effektiveren Fragmentierung von vor allem kleineren Vorläuferionen und zur Bildung von sekundären Fragmentionen führt, wobei posttranslationale Modifikationen weitestgehend intakt bleiben [128]. Mit dem Orbitrap Fusion-Massenspektrometer können die durch HCD erzeugten Fragmentionen sowohl in der LIT als auch in der Orbitrap analysiert werden. Weiterhin stehen bei Verwendung des Orbitrap Fusion-Massenspektrometers die ETD-Fragmentierung und Variationen davon zu Verfügung [124]. Dabei werden niederenergetische Elektronen auf die Vorläuferionen übertragen (ETD, *electron transfer dissociation*), was zu deren Dissoziation führt [129]. In einer speziellen Reaktionskammer in unmittelbarer Nähe der S-Lens wird durch das Anlegen eines starken, elektrischen Feldes ein Elektron des zugeführten Stickstoffs auf ein Fluoranthren-Molekül übertragen. Das so erzeugte Fluoranthren-Radikalanion wird in die lineare Ionenfalle überführt, wo

bereits die ausgewählten Vorläuferionen gespeichert sind. Die Übertragung des niederenergetischen Elektrons vom Fluorantten-Radikal auf das Analyt ion führt zu dessen Fragmentierung. Dabei wird die Bindung zwischen dem Amid-Stickstoff und dem folgenden C α -Atom gespalten, was zur Entstehung von *N*-terminalen *c*-Ionen und C-terminalen *z*-Radikalfragmentionen führt (Abb. 1.9). Das Orbitrap Fusion-Massenspektrometer ist in der Lage, die oben genannten kollisionsbasierten Fragmentierungstechniken mit der ETD-Fragmentierung zu kombinieren und somit möglichst viele komplementäre Fragmentationen in einer Analyse zu erzeugen. So ist es möglich, EThcD- und ETciD-Experimente durchzuführen. Diesen liegt eine ETD-basierte Fragmentierung zu Grunde, welche durch eine zusätzliche Kollisionsaktivierung mittels HCD (bei EThcD) oder CID (ETciD) unterstützt wird.

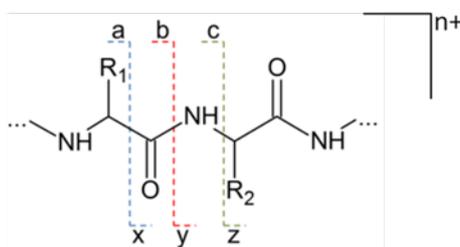


Abb. 1.9: Nomenklatur der Fragmentierung nach Roepstorff, Fohlmann und Biemann. In Abhängigkeit der Fragmentierungstechnik werden unterschiedliche Bindungsbrüche erzeugt und es kommt zur Bildung von *a*- und *x*-, *b*- und *y*- oder *c*- und *z*-Ionen [130, 131].

1.5.5 Chemisches Cross-Linking in Kombination mit Massenspektrometrie

Die traditionellen Techniken der Strukturaufklärung von Proteinen kommen bei intrinsisch ungeordneten Proteinen an ihrer Grenzen, wodurch alternative Techniken, wie die Kombination aus chemische Quervernetzung (XL, *cross-linking*) und Massenspektrometrie (MS) immer mehr in den Vordergrund rücken. XL-MS wird hauptsächlich als Methode zur Strukturaufklärung, Interaktionsanalyse von Proteinkomplexen und Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken verwendet [95, 96, 132]. Dabei werden sowohl selektiv, als auch unspezifisch Seitenketten von Aminosäuren durch organische Reagenzien (*cross-linking*-Reagenzien, *cross-linker*) kovalent verknüpft. So können komplexbildende Proteine, oder bestimmte Konformationen isolierter Proteine fixiert werden. Die Auswahl eines Cross-Linkers hängt stets von der primären Fragestellung ab. Hier ist es wichtig, ob mit Hilfe der Technik niederaufgelöste Strukturdaten generiert werden sollen oder ob unbekannte Interaktionspartner eines bestimmten Proteins gefunden werden sollen.

Quervernetzungsexperimente können sowohl mit unspezifischen Reagenzien (z.B. Formaldehyd oder Glutaraldehyd), als auch mit speziell für diesen Zweck entwickelten Reagenzien durchgeführt werden [132, 133]. Im Normalfall weisen die für Cross-Linking-Experimente optimierten Reagenzien zwei reaktive Kopfgruppen auf, die über einen Platzhalter (*spacer*) mit definierter Länge und Funktionalität miteinander verknüpft sind. Die reaktiven Gruppen zeichnen sich durch die gleiche Reaktivität (homobifunktionell) oder verschiedene Reaktivitäten (heterobifunktionell) aus. So können verschiedene Kombinationen aus selektiven Kopfgruppen kombiniert werden. Man unterscheidet hier spezifisch (z.B. aminreaktiv, carboxylreaktiv oder sulfhydrylreaktiv) und unspezifisch reagierende Kopfgruppen (Arylazide, Diazirine oder Benzophenone) [95, 132, 133]. Letztere können auch in Form unnatürlicher Aminosäuren (z.B. Diazirine in Photomethionin oder Photoleucin) mittels rekombinanten Expressionsmethoden direkt in Proteine integriert werden [134]. Für die Ableitung von Interaktionsregionen zwischen zwei Proteinen, kann sich der zweistufigen Reaktion eines heterobifunktionellen Reagenz bedient werden. Hierbei wird zuerst ein Interaktionspartner mit der ersten reaktiven Gruppe des Cross-Linkers modifiziert und überschüssiger Cross-Linker abgetrennt. Anschließend wird der Protein-Interaktionspartner hinzugefügt und die zweite Reaktivität des Cross-Linkers genutzt. Eine Sonderstellung bei den heterobifunktionellen Reagenzien nehmen die Kopplungsreagenzien oder auch „Nulllängen-Reagenzien“ wie zum Beispiel die Carbodiimide ein [133]. Sie verknüpfen die Carboxylgruppen von Glutamat- und Aspartat-Seitenketten sowie dem C-Terminus direkt mit primären Aminen der Lysine oder dem N-Terminus von Proteinen.

In dieser Arbeit wurden die homobifunktionellen, aminreaktiven Reagenzien Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (BS²G) und das CID-spaltbare Reagenz 4-(3-[3-(2,5-Dioxo-pyrrolidin-1-yloxycarbonyl)-propyl]-ureido)-butansäure-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-ester, kurz BuUrBu, verwendet [135]. Diese reagieren bevorzugt mit primären Aminen von Lysin-Seitenketten oder dem N-Terminus eines Proteins. Als Nebenreaktion wurde eine Esterbildung mit Aminosäuren, die eine Hydroxyl-Gruppe enthalten wie Serin, Threonin und Tyrosin, beobachtet [136]. Nach erfolgter Reaktion können verschiedene Cross-Linking-Produkte identifiziert werden. Diese lassen sich nach Art der Verknüpfung als intrapeptidale (Typ 1), interpeptidale (Typ 2) und lineare Peptide, die mit partiell hydrolysiertem Cross-Linker modifiziert sind (Typ 0, „*dead end*“) klassifizieren (Anhang Abb. A1 d). BS²G stellt einen Standard dieser Reagenzien-Klasse dar,

bei dem zwei *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester über eine kurze Kohlenwasserstoffkette miteinander verbunden sind (Abb 1.10).

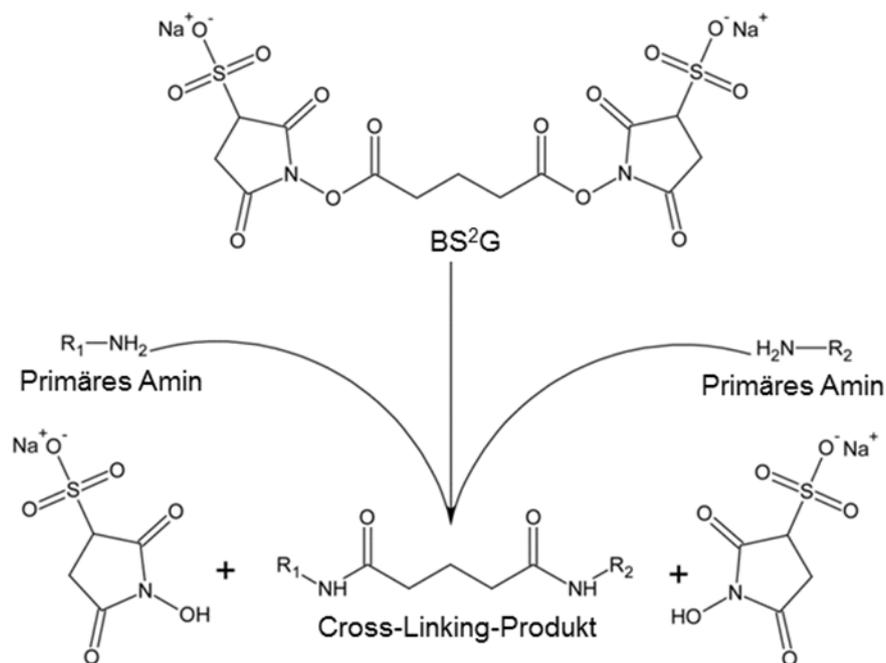


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Cross-Linking-Reaktion mit BS²G. Zwei primäre Amingruppen werden durch Reaktion mit dem Cross-Linker kovalent verknüpft und es entsteht ein Typ 2-Cross-Link.

BuUrBu unterscheidet von BS²G hinsichtlich des *spacers*. Dieser enthält hier eine Harnstoffgruppe, bei der unter CID-Bedingungen die Bindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem Stickstoff-Atom auf beiden Seiten mit gleicher Wahrscheinlichkeit gespalten werden kann. Dies geschieht unter ähnlichen energetischen Bedingungen wie die Fragmentierung des Proteinrückgrates. Die Fragmentierung von BuUrBu führt zur Bildung eines spezifischen Dublett-Musters (Abb. 1.11), was zu einer wesentlich vereinfachten Identifizierung der Cross-Linking-Produkte führt.

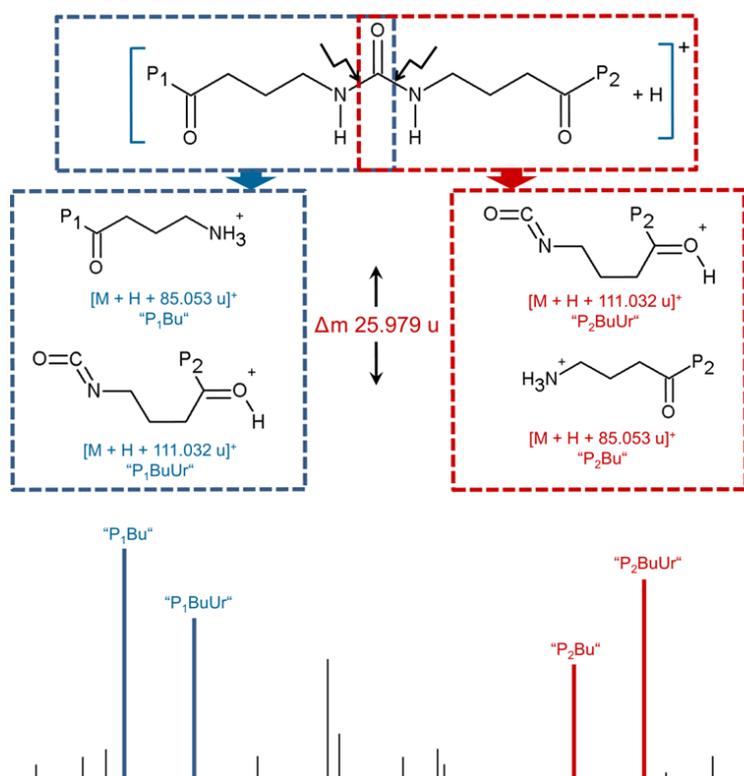


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der Fragmentierung von BuUrBu mit resultierendem Dublett-Muster. Durch die kollisionsinduzierte Fragmentierung der Harnstoff-Funktion im Spacer des Cross-Linkers, kommt es zu spezifischen Dublett-Signalen („Bu“ bzw. „BuUr“), die eine Massendifferenz von 25,979 u aufweisen. Diese dienen der Software MeroX [137] als Identifizierungskriterium bei der automatisierten Suche nach Cross-Linking-Produkten. P: Peptid.

Die Analyse von Cross-Linking Experimenten kann auf zwei verschiedene Arten angegangen werden: Man unterscheidet die „bottom-up“- und die „top-down“-Strategie. Beim „bottom-up“ Ansatz wird der entsprechende Cross-Linking-Ansatz mit Hilfe geeigneter Endoproteasen in ein komplexes Peptidgemisch überführt [95, 96]. Dies kann direkt nach der Reaktion der Proteine in Lösung oder nach gelelektrophoretischer Trennung geschehen, um die Komplexität der Probe zu verringern. So kann nach der Elektrophorese ein bestimmtes Protein oder ein Proteinkomplex selektiv enzymatisch gespalten werden. Die resultierenden Peptidgemische enthalten vorwiegend unmodifizierte Peptide und nur zu einem kleinen Anteil Cross-Linking-Produkte. Diese werden chromatographisch getrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Der erhaltene massenspektrometrische Datensatz wird anschließend mittels geeigneter Software nach Cross-Linking-Produkten durchsucht. Hier werden die erhaltenen Fragmentationenspektren mit theoretisch von der Software erzeugten Spektren verglichen und entsprechende Übereinstimmungen dokumentiert. Damit die massenspektrometrische Analyse optimal durchgeführt werden kann, sollten nach proteolytischer Spaltung Peptide im

Massenbereich von 1000-3000 u erhalten werden. Die am häufigsten verwendete Protease Trypsin spaltet spezifisch C-terminal von Lysin und Arginin, was bei der Verwendung von aminreaktiven Reagenzien zu Fehlschnittstellen führen kann. Um dennoch Peptide im optimalen Massenbereich zu erhalten, empfiehlt sich die Nutzung einer zweiten Protease mit alternativer Spezifität.

Bei der „*top-down*“-Strategie werden die Analyten (Proteine oder Proteinkomplexe) ohne vorherige proteolytische Spaltung in die Gasphase überführt [132]. Da es zur Auswertung von Experimenten mittels der „*top-down*“-Strategie bislang keine optimale Softwarelösung gibt und in der massenspektrometrischen Analyse Limitierungen bestehen, ist eine „*top-down*“-Cross-Linking-Strategie noch nicht konkurrenzfähig.

1.5.6 Native Massenspektrometrie

Proteine erkennen durch nicht-kovalente elektrostatische-, van der Waals- und hydrophobe-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken nahezu alle Bindungspartner. Dazu gehören Proteine, Nucleinsäuren, Lipide, Zucker und kleine Moleküle. Da diese Interaktionen eine grundlegende Rolle in der Biologie spielen, ist deren strukturelle Untersuchung notwendig. Eine in den letzten Jahren stark aufstrebende Technik ist die native Massenspektrometrie. Hierbei werden Bedingungen verwendet, welche nicht-kovalente Interaktionen intakt halten und die Bestimmung der Masse von intakten Komplexen, deren Stöchiometrie und deren direkte Interaktionen zwischen Untereinheiten und ihre relative Position im Komplex ermöglichen [138-143]. Durch schrittweises Mischen von Untereinheiten eines Multiproteinkomplexes können sogar Assemblierungs-Hierarchien bestimmt werden [144]. Bei der nativen MS werden Proteine und Proteinkomplexe aus leicht flüchtigen Salzlösungen, wie Ammoniumacetat, ionisiert. Diese garantieren notwendige Ionenstärken und stabile pH-Werte, die nahe an den physiologischen Bedingungen liegen. Nach Ionisation müssen die Ionen mit hohen m/z -Werten (meist $m/z > 4000$) in geeigneten Instrumenten analysiert werden. Hierbei müssen modifizierte Massenspektrometer verwendet werden, die auf die Transmission und die Detektion von großen, makromolekularen, fragilen Strukturen ausgelegt sind. Das High-Mass Q-TOF II- (Waters/MSVision) und das Orbitrap EMR (*extended mass range*, Thermo Fisher Scientific)-Massenspektrometer sind Beispiele für kommerziell verfügbare, modifizierte Massenspektrometer [125, 145]. Die native Massenspektrometrie bringt zur Analyse von Struktur und Dynamik von makromolekularen Komplexen etliche Vorteile mit sich. Sie kann für Proben angewendet werden, die sich drastisch in

Hinsicht auf Masse, Flexibilität, Symmetrie und Polydispersität unterscheiden. Außerdem können multiple, oligomere Zustände gleichzeitig untersucht werden, ohne Daten für einzelne Spezies getrennt akkumulieren zu müssen [92]. So können Dynamikstudien zur Quartärstruktur von Komplexen in Echtzeit angefertigt werden. Außerdem ist es bei der nativen MS nicht notwendig, die zu analysierenden Proben aufwendig chemisch zu markieren oder mittels vorigen Cross-Linkings zu fixieren. Dennoch ist dies möglich und eröffnet ein noch breiteres Anwendungsspektrum [146]. Trotz der enormen Vorteile birgt die native MS auch Nachteile. So findet die Analyse der Proteinkomplexe in der Gasphase statt, was Abweichungen in den relativen Häufigkeiten detektierter Spezies zur Folge haben kann [147]. Diese hängt in der nativen MS natürlich von der Ionisationseffizienz, der Transmission und der Detektierbarkeit der einzelnen Komplexe ab [140]. Weiterhin verändert sich die Stärke nicht-kovalenter Wechselwirkungen in der Gasphase. So werden hydrophobe Wechselwirkungen schwächer, bei gleichzeitiger Verstärkung der elektrostatischen Anziehungskräfte. Dadurch wird die Analyse von speziellen Komplexen, die zum Beispiel hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen, unmöglich, solange sie vor der Analyse nicht durch vorangegangenes Cross-Linking fixiert werden [148]. Nichtsdestotrotz gibt es rechnerische und experimentelle Beweise, dass die Überführung aus der Lösung in die Gasphase, Makromoleküle in Bezug auf ihre Struktur und Funktion nicht drastisch verändert [149]. So wurde die Funktionalität von Trypsin und Lysozym nach Ionisation, Selektion in der Gasphase und anschließender „weicher Landung“ (*soft landing*) auf einer speziellen Oberfläche eindeutig nachgewiesen [123, 126].

Die native MS kann zusätzlich mit anderen Techniken, wie Ionenmobilitäts-Spektroskopie (IMS) oder chemischem Cross-Linking, gekoppelt werden [93, 97, 150]. IMS liefert zusätzlich Informationen über die räumliche Anordnung Proteine. IMS funktioniert in diesem Zusammenhang wie eine Gelfiltration in der Gasphase, bei der die „stationäre Phase“ ein inertes Gas darstellt, mit dem die zu analysierenden Ionen kollidieren [151]. Analyten mit kompakter Konformation durchqueren eine „*drift tube*“ schneller, also mit weniger Gaskontakten, als Analyten mit einer ausgestreckten Konformation [152]. So können isobare Spezies, die sich nur durch ihr räumliches Erscheinungsbild voneinander unterscheiden, durch ihre Driftzeiten differenziert werden [153]. Chemisches Cross-Linking, kann im Gegenzug verwendet werden, um transiente und schwache Interaktionen zu fixieren, niederaufgelöste Strukturdaten zu erhalten oder Interaktionsflächen der Proteine in Komplexen zu bestimmen [96, 97, 146].

2 Zielstellung

In mehr als 50% aller Fälle ist die Entstehung eines Malignoms (bösartigen Tumors) auf eine Inaktivierung von p53 zurückzuführen. Trotz des enormen Forschungsaufwandes innerhalb der letzten 40 Jahre ist die Struktur dieses Proteins immer noch nicht aufgeklärt. Die Tatsache, dass es sich bei p53 um ein intrinsisch ungeordnetes Protein handelt und traditionelle Methoden der Strukturaufklärung von Proteinen an ihre Grenzen stoßen, erschwert dieses Vorhaben weiterhin. Bisher existieren lediglich Modelle der aktiven Form von p53, das *in vivo* als Homotetramer agiert.

Ziel dieser Arbeit war es, Beiträge zur Strukturaufklärung dieses bedeutenden Tumorsuppressorproteins zu leisten. Dafür sollte humanes Vollängen-Wildtyp-p53 rekombinant in *E.coli* exprimiert und gereinigt, sowie anschließend dessen Funktionalität basierend auf der Tetramerisierung und der spezifischen DNA-Bindung überprüft werden. Anschließend sollten mit Hilfe von chemischem Cross-Linking in Kombination hochauflösender Massenspektrometrie und nativer Massenspektrometrie Informationen über die Struktur des p53-Tetramers und dessen Topologie gewonnen werden. Eine Schwierigkeit stellte dabei die Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularen Cross-Linking-Produkten dar, was die Verwendung von nicht-markiertem und ¹⁵N-markiertem p53 nötig machte. Zudem sollte ein automatisierter Arbeitsablauf zur Identifizierung von Cross-Linking-Produkten unter Verwendung eines MS/MS-spaltbaren Cross-Linkers etabliert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acetonitril (HPLC <i>gradient grade</i> , HiPerSolv)		VWR
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37.5:1); 40 % (w/v)		Roth
Agar-Agar		Merck
Agarose (SeaKem LE)		Lonza
Ameisensäure	(FA)	Roth
Ammoniumacetat	(NH ₄ (CH ₃ COO))	Sigma-Aldrich
¹⁵ N-Ammoniumchlorid	(¹⁵ NH ₄ Cl)	Eurisotop
Ammoniumchlorid	(NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat	(NH ₄ HCO ₃)	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat	(APS)	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
Brillantblau G250		Sigma-Aldrich
Brillantblau R250		Sigma-Aldrich
Borsäure	(H ₃ BO ₃)	Roth
Calciumchlorid	(CaCl ₂)	Roth
Cäsiumiodid	(CsI)	Sigma-Aldrich
Cobalt(II)-chlorid	(CoCl ₂)	Merck
cOmplete Protease Inhibitor		Roche
Cocktail-Tabletten (EDTA-frei)		
D-Glukose	(C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	(DMSO)	Thermo Fisher Scientific
Dithiothreitol	(DTT)	AppliChem
DNA ladder (1 kb, 100 bp)		Thermo Fisher Scientific
DNA-Probenpuffer (6x)		Thermo Fisher Scientific
Eisen(III)-chlorid	(FeCl ₃)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	(CH ₃ COOH)	Roth
Ethanol	(C ₂ H ₅ OH)	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure	(EDTA)	Sigma-Aldrich
GelGreen		Biotium

Glycerol		Merck
Harnstoff		Roth
Hefeextrakt		Roth
Hydrochlorsäure, 0.1 M (endotoxinfrei)		Sigma-Aldrich
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan- sulfonsäure	(HEPES)	Roth
Iodacetamid	(IAA)	Sigma-Aldrich
Imidazol		Merck
Isopropanol		Merck
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid	(IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	(KCl)	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	(KH ₂ PO ₄)	Merck
Kupfer(II)chlorid	(CuCl ₂)	Merck
Laemmli-Probenpuffer (2x)		Bio-Rad
Magnesiumchlorid	(MgCl ₂)	Thermo Fisher Scientific
Magnesiumsulfat	(MgSO ₄)	Sigma-Aldrich
Mangan(II)chlorid	(MnCl ₂)	Merck
Methanol	(CH ₃ OH)	VWR
2-Mercaptoethanol		Roth
Natriumhydroxid	(NaOH)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	(NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat	(SDS)	Roth
Natriumhydrogenphosphat	(Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Nickel(II)chlorid	(NiCl ₂)	Merck
PageRuler Prestained Protein Ladder		Thermo Fisher Scientific
PageRuler Unstained Protein Ladder		Thermo Fisher Scientific
Rotiphorese 10x SDS-PAGE		Roth
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin	(TEMED)	Bio-Rad
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	(TRIS)	Sigma-Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid	(TCEP)	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure	(TFA)	Merck
2,2,2-Trifluorethanol	(TFE)	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton aus Casein		Roth
Zinkchlorid	(ZnCl ₂)	Sigma-Aldrich

3.1.2 Geräte

3.1.2.1 Chromatographiesysteme

Nano-HPLC-System	UltiMate 3000	Dionex
Vorsäulen:	Acclaim PepMap C8 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å	Thermo Fisher Scientific
Trennsäulen:	Acclaim PepMap C18 75 µm x 150 mm, 3 µm, 100 Å	Thermo Fisher Scientific
	Acclaim PepMap C18 75 µm x 250 mm, 2 µm, 100 Å	Thermo Fisher Scientific
FPLC-Systeme:	ÄKTA FPLC mit Fraktionssammler Frac-920	GE Healthcare
	Äkta Prime Plus	GE Healthcare
Säulen:	HisTrap FF, 1 ml	GE Healthcare
	HisTrap FF, 5 ml	GE Healthcare
	HiLoad Superdex 200 pg 16/600	GE Healthcare
	HiLoad Superdex 200 pg 26/600	GE Healthcare

3.1.2.2 Massenspektrometer

Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific
mit Nanospray Flex Nano-ESI-Quelle	Thermo Fisher Scientific
High-Mass Q-TOF II-Hybridmassenspektrometer	Micromass/MSVision

3.1.2.3 Laborgeräte

Analysenwaage LE225D	Sartorius
Autoklav V75	Systemec
Brutschrank BKE 40	Memmert

<i>Coater</i> Scancoat Six	HHV
DNA Electrophorese-Kammer Mini-Sub-Cell GT	Bio-Rad
Elektrophorese-System Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Geldokumentationssystem Gel Doc XR	Bio-Rad
Inkubationsschüttler innova 44	New Brunswick Scientific
Inkubationsschüttler Thermoshake	Gerhardt
<i>Micropipette Puller</i> P-1000	Sutter Instruments
Magnetrührer R3T	mLw
Magnetrührer M21/1	Framo
pH-Meter PH211	Hanna Instruments
Pipetten (2,5-5000 µl)	Eppendorf und VWR
Plattformschüttler Titramax 101	Heidolph
Reinstwasseranlage TKA Pacific	Thermo Electron LED
Sicherheitswerkbank Polaris 48	Thermo Fisher Scientific
Sicherheitswerkbank Herasafe KS 12	Thermo Fisher Scientific
Spannungsgeber PowerPac 300	Bio-Rad
Spektralphotometer Ultrospec 100 pro	GE Healthcare
Spektralphotometer V-630	Jasco
Thermocycler TPersonal	Biometra
Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner	VWR
Ultraschallhomogenisator Vibra-Cell 75185	Sonics & Materials
Vakuumkonzentrator Savant SPD1010	Thermo Fisher Scientific
Vortexmischer 7-2020	neoLab
Wiegetisch See-saw rocker SSL4	Stuart
Zentrifuge Centrifuge 5414R	Eppendorf
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifuge Minizentrifuge	Kisker Biotech
Zentrifuge Optimal L-90K	Beckmann Coulter

3.1.2.4 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra 15 Zentrifugenfiltrationseinheit (Molekulargewichtsausschluss: 10kDa, 30 kDa)	Millipore
Amicon Ultra 0.5 Zentrifugenfiltrationseinheit (Molekulargewichtsausschluss: 10kDa, 30 kDa)	Millipore

Einmalspritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun
Plastikküvetten	Sarstedt
Precise Tris-HEPES (4-20%) Gradientengel	Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Spritzenvorsatzfilter (Filtropur S 0.2)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Corning

3.1.3 Plasmide

HLT_p53FL_pET28a Bastian Bräuning, Weizmann Institute, Rehovot, Israel

3.1.4 Oligonukleotide

Alle für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion International AG (Martinsried) und Microsynth AG (Balgach, Schweiz) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden nach Synthese durch die jeweilige Firma mittels HPLC gereinigt. Es erfolgte die direkte Nutzung gemäß Herstellerangaben ohne weitere Reinigungsschritte.

REP_TS	5'-CGCGGACATGTCCGGACATGTCCCGC-3'
REP_BS	5'-GCGGGACATGTCCGGACATGTCCGCG-3'
REI_TS	5'-tTGACATGCCCAGGCATGTCT-3'
REI_BS	5'-tAGACATGCCTGGGCATGTCA-3'

3.1.5 Bakterienstämme

BL21 (DE3) *E. coli*, $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B (r^-_B m^-_B)$ λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*])

DH5 α *E. coli*, $F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG \Phi80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK- mK+), \lambda^-$

3.1.6 Medien und Antibiotika

Antibiotika:

Kanamycin: 30 mg/ml in H₂O, Endkonzentration: 30 μ g/ml, Roth

Medien:

2 x YT-Medium: 16g /l Trypton, 10g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl, pH 7,0

Agarplatten: 15 g/l Agar-Agar in M9-Minimal- oder LB-Medium

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,2

M9-Mineralsalzmedium: 10 % (v/v) M9-Salzlösung, , 0,4 % (w/v) Glucose, 0,1 % (v/v) 1 x Spurenelementelösung I und II, 0,1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄

Spurenelementelösung I: 11,3 g/l CaCl₂ x 2H₂O, 372,2 g/l Na₂EDTA, 270,3 g/l

(1000 x) FeCl₃ x 6H₂O

Spurenelementelösung II: 250 g/l CuSO₄ x 5H₂O, 170 g/l MnSO₄ x H₂O, 287,5 g/l

(10.000 x) ZnSO₄ x 7H₂O, 238 g/l CoCl₂ x 6H₂O

SOC-Medium 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl,

2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose

3.1.7 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit hochreinem, entionisiertem Milli-Q-H₂O hergestellt.

10 x KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ :	0,17 M KH ₂ PO ₄ , 0,72 M K ₂ HPO ₄	
TAE-Puffer (50 x):	100 ml EDTA (0,5 M pH 8,0), 5,71% (v/v) CH ₃ COOH, 2 M Tris	
IMAC-Bindepuffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 2.5 mM TCEP, 20 mM Imidazol	
IMAC-Elutionspuffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 2.5 mM TCEP, 500 mM Imidazol	
SEC-Puffer:	50 mM HEPES pH 7,2, 300 mM NaCl, 2,5 mM TCEP, 10% (v/v) Glycerin	
Phusion Puffer	5 x HF-Puffer	New England Biolabs

PAGE-Lösungen:

PAGE-Färbelösung:	1% (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R250 in 40 % (v/v), Methanol/ 10% (v/v) Essigsäure
PAGE-Entfärber:	10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol
Fixierlösung:	40% (v/v) Methanol/ 10% (v/v) Essigsäure
Färbelösung A:	5% (w/v) Coomassie-Brillant-Blau G250
Färbelösung B:	2% (w/v) ortho-Phosphorsäure, 10% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄

HPLC-Fließmittel:

Injektionslösung HPLC:	0.1% (v/v) TFA; Wasser (LC/MS grade, VWR)
Fließmittel A HPLC:	0.1% (v/v) FA; Wasser (LC/MS grade, VWR)
Fließmittel B HPLC:	0,08% (v/v) FA; Acetonitril

3.1.8 Cross-Linking-Reagenzien

Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat	(BS ² G)	Thermo Fisher Scientific
(4-(3-[3-(2,5-Dioxo-pyrrolidin-1-yloxy carbonyl)-propyl]-ureido)-butansäure-2,5- dioxo-pyrrolidin-1-yl-ester	(BuUrBu)	Dr. Francesco Falvo, Universität Köln
4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)- 4-methyl-morpholiniumchlorid	(DMTMM)	Sigma Aldrich
<i>N</i> -γ-Maleimidobutyryloxysuccinimidester	(GMBS)	Thermo Fisher Scientific

3.1.9 Enzyme

AspN	Promega
GluC	Promega
Benzonase Nuclease	Sigma-Aldrich
ProTEV Plus	Promega
porcines Trypsin (<i>sequencing grade</i>)	Promega

3.1.10 Kommerziell verfügbare Kits

GeneJET Plasmid Miniprep-Kit	Thermo Fisher Scientific
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up-System	Promega

3.1.11 Software

Chromeleon (6.8)	Steuerung des HPLC-Systems der Orbitrap Fusion Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific)
Mascot	Identifizierung von Proteinen anhand massenspektrometrischer Daten (Matrixscience)
Masslynx (4.1)	Akquisition und Prozessierung von Daten des High-Mass Q-TOF II-Massenspektrometers (Waters)
MeroX (1.4.1-1.6.0)	Identifizierung und Auswertung von Cross-Linking-Produkten anhand massenspektrometrischer Daten MS/MS-spaltbarer Cross-Linker (Michael Götze, MLU Halle-Wittenberg, www.StavroX.com)
Proteome Discoverer	Analyse von MS-, MS/MS- und LC/MS Daten (Thermo Fisher Scientific)
ProtParam	Berechnung von pI-Werten und Extinktionskoeffizienten von Proteinen (<i>Expasy</i> , www.expasy.org)
Qual Browser (2.07)	Visualisierung und Prozessierung von Massenspektren (Thermo Fisher Scientific)
Quantity One (4.6.2)	Steuerung für das Geldokumentationsgerät Gel Doc XR (Bio-Rad)
SnapGene (2.8.1)	Visualisierung von DNA-Sequenzen (www.snapgene.com)
StavroX (3.0 – 3.5.1)	Identifizierung und Auswertung von Quervernetzungs-produkten anhand massenspektrometrischer Daten (Michael Götze, MLU Halle-Wittenberg, www.StavroX.com)
Unicorn (5)	Steuerung des ÄKTA-FPLC-System (GE Healthcare)
Xcalibur (2.0.7-2.2)	Aufnahme und Prozessierung von Daten des Orbitrap Fusion-MS (Thermo Fisher Scientific)
xVis	Darstellung von Cross-Linking-Produkten (https://xvis.genzentrum.lmu.de)

3.2 Methoden

Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, wurden alle Arbeiten mit Milli-Q-H₂O durchgeführt.

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Präparation chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte gemäß dem Protokoll der CaCl₂-Methode nach Sambrook und Russell [154]. 200 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur von DH5 α - oder BL21 (DE3)-Zellen inokuliert und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ ~ 0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 4.000 x g (4 °C) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml einer 0,1 M CaCl₂-Lösung (4 °C und steril filtriert) resuspendiert und für 90-120 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Sedimentationsschritt (15 min, 4.000 x g, 4 °C) wurde das Zellpellet in 2 ml einer 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut für 90-120 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurde die Suspension mit Glycerol versetzt (Endkonzentration 10 % (v/v)), in Aliquoten von 50 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein Aliquot (50 μ l) chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1-5 μ l Plasmid-DNA versetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 4 °C. Für DH5 α -Zellen betrug die Dauer des Hitzeschocks 90 s, respektive 45 s bei Verwendung von BL21 (DE3). Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 4 °C für 5 min. Anschließend wurden den Zellen 950 μ l, auf 37 °C vorgewärmtes, SOC-Medium hinzugefügt und diese für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific) stets aus Übernachtskulturen der *E. coli*-Zelllinie DH5 α gemäß den Herstellerangaben.

3.2.1.4 Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge

Aus zwei komplementären Oligonukleotiden (3.1.4) wurde mittels Hybridisierung doppelsträngige RE-DNA hergestellt. Dafür wurden äquimolare Mengen des jeweiligen oberen und unteren Stranges (40 μM) in einem Ansatzvolumen von 25 μl in Phusion-HF-Puffer gemischt. Der Hybridisierungsansatz wurde mittels eines PCR-Cyclers erhitzt (98 $^{\circ}\text{C}$, 5 min) und graduell auf 4 $^{\circ}\text{C}$ gekühlt (Gradient 0.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Die Hybridisierung wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.1.5) verfolgt und das entstandene Produkt aus dem Gel extrahiert.

3.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

Die Trennung der DNA anhand ihrer molekularen Größe erfolgte mittels elektrophoretischer Trennverfahren unter Verwendung von Agarosegelen (1% (w/v) für Plasmide 4,5% (w/v) für hybridisierte p53 Response-Element-DNA) in TAE-Puffer unter Zusatz von *GelGreen*-Färbelösung gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde mit DNA-Probenpuffer gemischt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung wurde bei 200 V durchgeführt. Die Detektion der DNA im Agarosegel erfolgte mittels UV-Licht der Wellenlänge 302 nm.

3.2.1.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mittels eines kommerziellen Kits (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte abweichend vom Protokoll mit DNase-freiem Wasser (50 $^{\circ}\text{C}$).

3.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit genutzten oder hergestellten DNA-Konstrukte wurden zur Sequenzierung der Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) überstellt und die Ergebnisse wurden anschließend mit der Software SnapGene überprüft.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Expression von rekombinantem, humanem p53 in *E.coli*

Das entsprechende Expressionsplasmid (HLT_p53_pET28a, 3.1.3) wurde zur Transformation chemisch kompetenter *E.coli* B121(DE3)-Zellen verwendet. Kanamycin-LB-Agar Selektionsmedium wurde verwendet, um erfolgreich transformierte Klone zu ver-

einzelnen. Von den entsprechenden Kulturen wurden nach erfolgreicher Testexpression Kryo-Kulturen angelegt und diese für weitere Expressionsansätze verwendet. Es wurde 1 l 2 x YT-Medium, versetzt mit Kanamycin (30 µg/ml), mit einer 5 ml-Vorkultur inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 kultiviert. Anschließend erfolgte eine Akklimatisierung der Expressionskultur bei 18 °C für 1h. Die Induktion mit 1 mM D-Isopropylthiogalactose (IPTG) erfolgte frühestens nach der Akklimatisierungsdauer und spätestens bei einer OD₆₀₀ von 1,2. Parallel zur Induktion wurde ZnCl₂ zum Expressionsansatz gegeben (Endkonzentration 0,1 mM), um ausreichende Mengen an Zn²⁺-Ionen für die Produktion des rekombinanten HLT-p53-Fusionsprotein bereit zu stellen. Die Expression erfolgte ebenfalls bei 18 °C über Nacht. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (4.000 x g, 5 min, 4 °C) geerntet. Die Expression von rekombinanten, ¹⁵N-markiertem p53 wurde analog durchgeführt. Das 2 x YT-Medium wurde gegen Minimalmedium auf der Basis des M9-Mineralsalzmediums (3.1.6) ersetzt, welches als einzige Stickstoff-Quelle ¹⁵N-Ammoniumchlorid (¹⁵NH₄Cl) enthielt. Zusätzlich wurde die Vorkultur sedimentiert (4.000 x g, 5 min, 4 °C), mit Mineralsalzmedium gewaschen, erneut sedimentiert und anschließend nach erneutem Resuspendieren in Mineralsalzmedium genutzt, um die Hauptkultur zu inokulieren.

3.2.2.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die sedimentierten Zellen wurden in Wasser resuspendiert und erneut sedimentiert (4.000 x g, 30 min, 4 °C). Anschließend wurde das Zellpellet in IMAC-Bindepuffer (5 ml/1g Biofeuchtmasse) unter Zugabe von Protease-Inhibitor (Roche cOmplete, EDTA-frei) bei 4 °C resuspendiert. Es folgte ein Zellaufschluss mittels Ultraschall bei einer Amplitude von 35 % mit Aufschlussintervallen von 30 s Dauer und einer Gesamtschalldauer von 2 min im Eisbad. Um die DNA zu spalten, wurde der Mischung Benzonase Nuklease (2,5 U/ml) und Magnesiumchlorid (3 mM) hinzugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden durch Sedimentation (40000 x g) Zelltrümmer und andere unlöslichen Bestandteile des Zellaufschlusses von der löslichen Fraktion getrennt (Subfraktionierung). Der dekantierte Überstand (lösliche Fraktion) wurde für die anschließende Reinigung des rekombinanten p53 verwendet.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Pufferaustausch und Konzentrierung von Proteinlösungen

Die aufgeführte Methode zum Wechsel von Puffersystemen und zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurde bei 4 °C durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der verschiedenen Proteinlösungen erfolgte mittels UV-Absorptionsmessung bei 280 nm oder unter Anwendung des Bio-Rad Protein-Assays nach der Bradfordmethode gemäß Herstellerangaben [155].

Pufferaustausch und Konzentrierung mittels Zentrifugenfiltrationseinheiten

Für den Wechsel des Puffersystems von p53-Lösungen wurden Zentrifugationsfilter (Amicon Ultra 15 oder 0,5, 3.2.1.4) mit einem Molekulargewichtsausschluss von 30 kDa verwendet. Zunächst wurden die Filter zweimal mit maximalem Füllvolumen des entsprechenden Puffers gewaschen (5 min, 4.000 x g). Anschließend wurde die p53-Lösung in die Filtrationseinheit überführt und bei 4.000 x g auf ca. 1/10 des Maximalvolumens eingengt. Das Konzentrat wurde mit Zielpuffer aufgefüllt und erneut konzentriert. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünf bis sechs Mal wiederholt. So ergab sich eine 1:10⁵ bzw. 1:10⁶ Verdünnung des Ausgangspuffers, was einen effizienten Pufferaustausch darstellt. Für die Konzentrierung von Proteinlösungen wurden diese nach dem Waschen der Zentrifugenfiltrationseinheit auf das gewünschte Endvolumen oder die gewünschte Endkonzentration mittels Zentrifugation bei 4.000 x g eingestellt.

3.2.3.2 Reinigung von humanem Volllängen-Wildtyp-p53

Die Reinigung von humanem Volllängen-Wildtyp-p53 erfolgte über eine Vier-Schritt-Reinigungsstrategie bestehend aus einem Affinitätschromatographischen und einem anschließenden Größenausschlusschromatographischen Schritt, Tag-Abspaltung mittels TEV-Protease und einem weiteren Gelfiltrationsschritt. Das erzeugte Expressionsprodukt des Plasmides HLT_p53_pET28a ist ein Fusionsprotein, bestehend aus einem Oktahistidin-Tag gefolgt von einer Lipoyl-Domäne, einer TEV-Schnittstelle und dem humanem Volllängen-Wildtyp-p53.

Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC, immobilized metal ion affinity chromatography)

Als Affinitätschromatographischer Schritt wurde eine IMAC durchgeführt. Hierbei kommt es zu einer partiellen Komplexierung des Polyhistidin-Tags an den immobilisierten Nickel-Ionen der IMAC-Säule. Die Reinigung erfolgte mittels eines ÄKTA-FPLC System (GE Healthcare) unter Verwendung von Nickel-NTA-Säulen (HisTrap

FF, 1 bzw. 5 ml). Diese wurden mit IMAC-Bindepuffer äquilibriert (5-10 Säulenvolumen), bevor die lösliche Fraktion des *E.coli*-Lysates (3.2.2.2) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen wurde. Nach der Probenapplikation wurde mit IMAC-Bindepuffer gewaschen, bis das UV-Absorptionssignal bei 280 nm ein konstantes Niveau nahe der Basislinie zeigte. Danach wurde mit 20% (v/v) IMAC-Elutionspuffer (100 mM Imidazol) gewaschen und anschließend wurde p53 mit 80% (v/v) desselben Puffers (300 mM Imidazol) und einer Flussrate von 1 (bzw. 5) ml/min (Fraktionsgröße 2 ml) eluiert. Der Verlauf der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE-Analyse überprüft.

Konzentrierung des Eluates

p53-enhaltende Fraktionen wurden vereinigt und mittels Zentrifugenfiltrationseinheiten erfolgte ein Austausch des Puffersystems gegen SEC-Puffer und eine Konzentrierung der Probe (3.2.3.1).

Größenausschlusschromatographie 1 (SEC)

Mittels Größenausschlusschromatographie können Proteine in Bezug auf ihren hydrodynamischen Radius voneinander getrennt werden. So konnte das p53-Fusionsprotein von weiteren Verunreinigungen abgetrennt werden. Hierfür wurde eine SEC-Säule mit einem Trennbereich von 1×10^4 bis 6×10^5 (HiLoad Superdex 200, 26/600 bzw. 16/600) verwendet. Die isokratische Trennung erfolgte mit SEC-Puffer bei einer Flussrate von 2 ml/min. Es wurden 1,5 ml-Fractionen gesammelt und mittels SDS-PAGE und LC/MS/MS analysiert.

Proteolytische Spaltung mit TEV-Protease

Anschließend wurde die proteolytische Spaltung mit TEV-Protease (ProTEV Plus, Promega) laut Protokoll des Herstellers durchgeführt. Es wurde nicht der mitgelieferte Reaktionspuffer, sondern der SEC-Puffer verwendet. Es wurde ein zweifacher Überschuss der empfohlenen Menge an Protease (2 x 0,5 U/ μ g Fusionsprotein) eingesetzt. Die Proteolyse wurde für 16 h über Nacht bei 4 °C durchgeführt und der Erfolg der Spaltung mittels SDS-PAGE Analyse überprüft.

Größenausschlusschromatographie 2 (SEC)

Der abgespaltene HLT-Tag, die TEV-Protease sowie nicht gespaltenes p53-Fusionsprotein von gespaltenem HLT-p53 wurden mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie unter identischen Bedingungen wie oben beschrieben abgetrennt.

Die Reinigung von humanem Volllängen-Wildtyp-p53 wurde partiell von Vanessa Flegler während ihrer Arbeiten zur Erlangung des M.Sc. unter Anleitung durchgeführt [156].

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eine Trennung der Proteine bezüglich ihrer apparenten Molekulargewichte (*Stokes-Radien*) erfolgt mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Zusammensetzung der Sammel- und der Trenngele können Tabelle 3.1 entnommen werden. Für 8%ige bzw. 10%ige Trenngele wurden die Volumina entsprechend angepasst. Für Proben von Cross-Linking-Experimenten wurden kommerzielle Gradientengele verwendet (Precise Tris-HEPES; 4-20%; Thermo Fisher Scientific)

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.

	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 % (w/v)	3000 µl	650 µl
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2500 µl	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1250 µl
MilliQ-H₂O	4340 µl	3000 µl
10 % (v/v) SDS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
10 % (v/v) APS	50 µl	25 µl

Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese mit reduzierendem Laemmli-Puffer im Verhältnis 1:1 (v:v) gemischt und einer Denaturierung unterzogen (95 °C, 10 min). Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte zunächst für 10 min bei 100 V gefolgt von ca. 50-70 min bei 200 V, entsprechend der gewünschten Trennleistung. Die kommerziell erworbenen Gradientengele wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Protein-signale wurden anschließend mittels kolloidaler Coomassie Brillant-Blau-Lösung sichtbar gemacht.

Proben aus Cross-Linking-Experimenten wurden einer Coomassie-Blue-Silver-Färbung unterzogen [157]:

Fixierlösung: 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) H₂O
Färbelösung: 2 % (v/v) Lösung A [5 % (w/v)
Coomassie-Brillant-Blau G250 in H₂O]
98 % (v/v) Lösung B [2 % (w/v) Phosphorsäure,
20 % (w/v) (NH₄)₂SO₄ in H₂O]

Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 1h bei Raumtemperatur fixiert, anschließend 2-4 mal gründlich mit Wasser gewaschen, bevor sie für 4-16 Stunden auf dem Schwenkschüttler gefärbt wurden. Für das Entfärben reichte mehrmaliges Waschen mit Wasser aus. Alle anderen Proben wurden einer konventionellen Coomassiefärbung unterzogen [158]:

Färbelösung: 0,1 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Ethanol, 50 % (v/v) H₂O
Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Methanol, 65 % (v/v) H₂O

Die Gele wurden kurz mit Wasser gespült und anschließend für 1-12 h bei Raumtemperatur gefärbt. Entfärbt wurden die Gele unter mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung bis zum gewünschten Grad der Entfärbung.

3.2.3.4 Enzymatische Proteolyse in Lösung

20-40 µl der Proteinlösung wurden fast bis zur Trockne eingengt und anschließend mit 5 µl einer 8 M Harnstofflösung (in NH₄HCO₃; 400 mM) versetzt. Anschließend erfolgte ein reduzierender Arbeitsschritt mit DTT (7,5 mM) für 15 min bei 56 °C. Die reduzierten Sulfhydrylgruppen der Cysteine wurden mit dem Alkylierungsreagenz Iodacetamid (IAA; 20 mM) behandelt und für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Vor der eigentlichen Proteolyse wurde der Reaktionsansatz 1:6 (v/v) mit Wasser verdünnt. Im Falle einer einfachen Proteolyse wurde die Endoprotease Trypsin zugefügt (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:20 (w/w)) und die Probe für 16 h bei 37 °C inkubiert. Für eine doppelte proteolytische Spaltung wurde zunächst das Enzym AspN

(bzw. GluC) zugefügt (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:25) und für 16h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Trypsin zugegeben (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:12) und erneut für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TFA-Lösung (10 % (v/v)) gestoppt und das proteolytische Peptidgemisch wurde für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Hierfür musste das Volumen im Vakuumkonzentrator auf 5-40 µl reduziert werden.

3.2.3.5 Enzymatische In-Gel-Proteolyse

Für die In-Gel-Proteolyse wurden folgende Lösungen stets frisch hergestellt:

<i>Reduktionslösung:</i>	10 mM DTT in 100 mM NH ₄ HCO ₃
<i>Alkylierungslösung:</i>	55 mM IAA in 100 mM NH ₄ HCO ₃
<i>Entfärbelösung:</i>	ACN und 100 mM NH ₄ HCO ₃ , 1:1 (v/v)
<i>Trypsinlösung:</i>	2 µl Trypsin-Stammlösung, 78 µl 20 mM NH ₄ HCO ₃
<i>Extraktionslösung:</i>	ACN und TFA (5 % (v/v)), 1:2 (v/v)

Proteinbanden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und in Würfel mit einem Volumen von ca. 1 mm³ zerteilt. Diese wurden anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl ACN dehydratisiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Zugabe von 50 µl Reduktionslösung. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 56 °C unter stetigem Schütteln wurden die Gelproben erneut mit 500 µl ACN versetzt. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Die trockenen Gelstücke wurden mit 50 µl Alkylierungslösung versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke für 10 min mit 500 µl ACN, dann 30 min in 100 µl Entfärbelösung und wieder 10 min in ACN gewaschen. Die trockenen Gelstücke wurden mit ca. 20 µl Trypsinlösung (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:15 (w/w)) überschichtet, für 2 h bei 4 °C inkubiert und bei Bedarf erneut mit NH₄HCO₃-Lösung überschichtet. Die Proteolyse erfolgte für 16 h bei 37 °C. Für eine doppelte proteolytische Spaltung wurden die Proteine vornehmlich mit dem Enzym AspN (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:25) proteolytisch gespalten. Dabei wurde ebenso wie für die Spaltung mit Trypsin vorgegangen. Anschließend wurden 3 µl einer konzentrierten Trypsin-Lösung (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:15) den Proben beigemischt und erneut

für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden zwei Extraktionsschritte mit je 100 µl Extraktionslösung durchgeführt, wodurch ebenfalls die Proteolyse gestoppt wurde. Das extrahierte Peptidgemisch wurde mittels Vakuumkonzentrator auf 5-40 µl eingengt.

3.2.4 Cross-Linking-Methoden

3.2.4.1 Cross-Linking von p53

Die Cross-Linking Reaktionen wurden in HEPES-Puffer (pH 7,2) durchgeführt (SEC-Puffer, 3.1.7). Als Negativkontrolle diente jeweils ein Reaktionsansatz, dem eine entsprechende Menge DMSO zugesetzt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, eine maximale Konzentration von 10% (v/v) DMSO im Reaktionsansatz nicht zu überschreiten. Falls nicht anders beschrieben, wurden äquimolare Mengen an nicht-markiertem p53 mit ¹⁵N-markiertem p53 gemischt und eine Konzentration von 10 µM (p53-Monomer) eingestellt. Für die Reaktionen in Anwesenheit von RE-DNA, wurde hybridisierte RE-DNA in einer Endkonzentration von 2,5 µM hinzugefügt. Die Reaktionsansätze wurden bei 4 °C für 12h inkubiert. Das Ergebnis der Reaktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die Reaktionsschemata der verwendeten Cross-Linking-Reagenzien sind im Anhang Abb. A1 dargestellt.

Der homobifunktionelle, aminreaktive Cross-Linker BS²G

Frisch hergestellte Stammlösung von BS²G (in DMSO) wurde in einem 50-fachen molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben. Die Reaktionen wurden bei 4 °C für 120 min durchgeführt und anschließend durch die Zugabe von NH₄HCO₃ (Endkonzentration 20 mM) beendet.

Der homobifunktionelle, aminreaktive, CID-spaltbare Cross-Linker BuUrBu

Frisch hergestellte Stammlösung von BuUrBu (in DMSO) wurde in einem 5 bis 50-fachen molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben. Die Reaktionen wurden bei 4 °C für 30 min durchgeführt und anschließend durch die Zugabe von NH₄HCO₃ (Endkonzentration 20 mM) beendet.

Das heterobifunktionelle, carboxyl- und aminreaktive, Kopplungsreagenz DMTMM

Frisch hergestellte Stammlösung von DMTMM (in H₂O) wurde in einem 20 bis 8000-fachen molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben. Die Reaktion bei 4 °C wurde nach 2 h durch Entfernen von überschüssigem DMTMM mittels Zentrifugfiltrationseinheiten (MWCO, 10 kDa) gestoppt.

Der heterobifunktionelle, sulfhydryl- und aminreaktive Cross-Linker Sulfo-GMBS

Es wurde eine 10 μ M Lösung von nicht-markiertem p53 verwendet. Frisch hergestellte Stammlösung von Sulfo-GMBS (in DMSO) wurde in einem 50-fachen molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben. Die Reaktionen wurden bei 4 °C für 120 min durchgeführt und anschließend durch die Zugabe von NH_4HCO_3 (Endkonzentration 20 mM) beendet.

Kovalente Markierung mit dem carboxylreaktiven Reagenz GEE

GEE dient zur kovalenten Markierung aktivierter Carboxylgruppen [159]. Es wurde eine 10 μ M Lösung von nicht-markiertem p53 verwendet. Zur Aktivierung der Carboxylgruppen wurde frisch hergestellte Stammlösung von EDC (in DMSO) in einem 500-fachen molaren Überschuss und GEE in einem 20.000-fachen molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben. Die Reaktionen wurden bei 4 °C für 120 min durchgeführt und anschließend durch die Zugabe von NH_4HCO_3 (Endkonzentration 500 mM) beendet. Die kovalente Markierung mit GEE wurde von Vanessa Flegler im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik unter Anleitung durchgeführt [156].

3.2.4.2 Automatisierter Arbeitsablauf für die Analyse von Cross-Linking-Produkten unter Verwendung von BuUrBu

Bei der automatisierten Analyse von Cross-Linking-Produkten wurden wässrige Lösungen der Proteine p53, BSA und β -Lactoglobulin (jeweils 10 μ M) verwendet. p53 wurde mit einem 50-fachen molaren Überschuss, BSA und β -Lactoglobulin mit einem 100-fachen molaren Überschuss an frisch hergestellter BuUrBu-Stammlösung (in DMSO) versetzt. Es wurde zudem die lösliche Fraktion eines *E.coli*-Zelllysates verwendet, welche auf eine Konzentration von 1 mg/ml Gesamtprotein eingestellt wurde und mit einer Endkonzentration von 5 mM BuUrBu versetzt wurde. Die Reaktionen wurden bei 4 °C für 120 min durchgeführt und anschließend durch die Zugabe von NH_4HCO_3 (Endkonzentration 20 mM) beendet. Die Reaktionsansätze wurden einer enzymatischen Proteolyse in Lösung (3.2.3.4) unterzogen und die entstandenen Peptidgemische mittels LC/MS/MS (3.2.5.1) analysiert.

3.2.5 Massenspektrometrische Methoden

3.2.5.1 Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie

Die komplexen Peptidgemische wurden vor der massenspektrometrischen Analyse mittels Nano-HPLC chromatographisch getrennt. Die Analytlösungen wurden mit einem programmierbaren Probengeber in eine Probenschleife überführt und auf eine 5 mm-Vorsäule (C18) aufgetragen. Die Proben wurden durch 15-minütiges Waschen mit 0,1 % (v/v) TFA bei einer Flußrate von 20 µl/min entsalzt. Anschließend wurden die Proben mit 100 % (v/v) Fließmittel A (3.1.7) und einer Flußrate von 300 nl/min auf eine 15 cm-Trennsäule (C18) eluiert und mit einem 30-bis 300-minütigen Gradienten von 0 % (v/v) Fließmittel B (3.1.7) auf 25 bzw. 35% (v/v) B getrennt. Anschließend wurden mit einem 5-minütigen-Gradienten von 25% (bzw. 35%) bis 85% B hydrophobe Peptide eluiert. Nach 5-minütigem Spülen mit 85% B wurde das System für 15 min mit 100 % (v/v) A äquilibriert, um die nächste Probe zu applizieren. Die Trennung der Peptide wurde durch die Aufzeichnung des Totalionenstroms verfolgt. Auf eine Detektion des UV-Signals bei 214 nm wurde zu Gunsten eines geringeren Totvolumens verzichtet. Das Nano-HPLC-System war direkt über eine Nano-ESI-Quelle (3.1.2.2) an das Orbitrap Fusion-Massenspektrometer gekoppelt. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte über den gesamten Zeitraum der Trennung. Für die LC/MS-Analysen wurden Übersichtsmassenspektren in einem Massenbereich von m/z 300-2000 bei einer Auflösung von $R = 120.000$ bei m/z 200 registriert. Datenabhängig wurden nach jedem Übersichts-scan für fünf Sekunden die Signale mit den höchsten Intensitäten einzeln mit einem Massenfenster von 2 u isoliert und bei einer normalisierten Fragmentierungsenergie (NCE, *normalized collision energy*) von 29% mittels HCD fragmentiert. Dabei wurden nur Signale mit Ladungszuständen zwischen +2 und +8 ausgewählt. Die Detektion der Fragmentionen erfolgte in der Orbitrap mit einer Auflösung von $R = 15.000$. Zur Erfassung auch gering abundanter Signale, wurden bereits fragmentierte Signale automatisch auf eine Ausschlussliste gesetzt und für 60 s nicht fragmentiert. Diese Bedingungen gelten für die Strukturanalysen von p53 mittels chemischen Cross-Linking. Die Bedingungen zur automatisierten Analyse von Cross-Linking-Produkten mit Hilfe des CID-spaltbaren Reagenzes BuUrBu sind im Folgenden separat aufgeführt.

Automatisierter Arbeitsablauf für die Analyse von Cross-Linking-Produkten unter Verwendung von BuUrBu

Die beschriebene Nano-HPLC/MS-Methode wurden ebenfalls für die systematischen Fragmentierungsversuche eingesetzt, doch für die Selektion der Vorläuferionen, und deren Fragmentierung wurden verschiedene Methoden angewendet. So wurden datenabhängig nach jedem MS-Übersichtsscan für fünf Sekunden die höchsten Signale, oder jene mit der höchsten Ladung einzeln mit einem Massenfenster von 2 u isoliert und mittels CID (35% NCE), „stepped“ HCD 29% ($\pm 3\%$ NCE), ETciD (25 und 30 % NCE als zusätzliche Aktivierungsenergie) und EThcD (25% und 29% NCE als zusätzliche Aktivierungsenergie). *Stepped* bedeutet in diesem Zusammenhang, dass statt einer definierten normalisierten Kollisionsenergie (NCE 29%), drei verschiedene Kollisionsenergien (NCE 26%, 29%, 32%) zur Generierung eines Fragmentationenspektrums verwendet wurden. Es wurden nur Vorläuferionen mit einer Ladung ≥ 3 für die Fragmentierung ausgewählt und die dynamische Ausschlusszeit wurde auf 120 s erhöht (*extended dynamic exclusion*, EDE).

3.2.5.2 Native Massenspektrometrie

Ausgewählte Proteine und Proteinkomplexe wurden zudem mittels nativer Massenspektrometrie analysiert. Hierfür wurden die entsprechenden Proteinlösungen auf eine Endkonzentration von 10 μM eingestellt, bei Bedarf RE-DNA zugegeben (2,5-3 μM) und bei 4 °C für 16h über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte ein Austausch des Puffers gegen Ammoniumacetat (500 mM, pH 6,8) mittels Zentrifugentrifugationseinheiten (3.2.3.1). Cross-Linking-Reaktionsansätze, welche mittels nativer MS weiter analysiert werden sollten, wurden analog behandelt. Die Ionisation der Proben erfolgte mittels Nano-ESI. Es wurden selbst hergestellte, goldbeschichtete Borosilikatglas-Kapillaren verwendet, mit je 5 μl Analyt-Lösung befüllt und in die dafür vorgesehen Halterung der Quelle eingebracht wurden. Zur Initiation des Elektrospray-Prozesses wurde ein leichter Druck an der Kapillare mittels einer Spritze erzeugt. Es wurden eine Kapillarspannung von 12-1,4 kV und eine *Sample-Cone*-Spannung von 120-160 V angelegt (1.5.3.2, Abb. 1.8). Der Druck wurde abhängig von der zu untersuchenden Probe im Quellenbereich des Massenspektrometers (p_1 , Abb. 1.8) auf 9,2-10 mbar und der Druck in der Kollisionzelle (p_3 , Abb. 1.8) auf $1-2 \times 10^{-2}$ mbar eingestellt. Der Transmissionsbereich im TOF-MS-Modus (Übersichtsmassenspektrum) wurde im „sweep-Modus“ zu Beginn der Messung festgelegt oder im „MS-Profil-Modus“ während der Messung justiert. Die

Beschleunigungsspannung in der Kollisionszelle bewegte sich im Bereich von 30-60 V für Übersichtsmassenspektren. Für Dissoziationsexperimente wurde in den „TOF-MS/MS-Modus“ (CID) gewechselt. Es konnte nun ein Signal von Interesse aus dem Übersichtsmassenspektrum isoliert werden. Hierfür wurde die Extraktorspannung (Abb. 1.8) auf 5-15 V angehoben und die Beschleunigungsspannung in der Kollisionszelle bis auf 180 V erhöht. Kalibriermessungen mit Cäsiumiodid (CsI) dienen zur Überprüfung der Signale, ihre Auflösung und Massengenauigkeit sowie zur Nachkalibrierung der Datensätze. Die Experimente zur nativen MS wurden partiell von Vanessa Flegler im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik unter Anleitung durchgeführt [156].

3.2.6 Identifizierung von Cross-Linking-Produkten

Die Identifizierung Cross-Linking-Produkten erfolgte unter Nutzung der Software StavroX [160]. Bei Verwendung des spaltbaren BuUrBu wurde das für MS/MS-spaltbare Cross-Linker entwickelte Programm MeroX verwendet [137]. Aus den massenspektrometrischen Rohdaten wurden mit dem Programm Proteome Discoverer mgf (*Mascot generic format*)-Dateien erstellt. Die in den mgf-Dateien enthaltenen, experimentell ermittelten Massen wurden durch StavroX bzw. MeroX mit einer Liste der theoretischen Cross-Linking-Produkte abgeglichen, welche die beiden Programme während des Suchprozesses selbst erstellen. Für den Abgleich wurden eine maximale Massenabweichungen von 3 ppm für die Vorläuferionen bzw. 10 ppm für die Fragmentionen, sowie ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens zwei eingestellt ($S/N \geq 2$). Endoproteasen mit definierten Schnittstellen sowie Reaktionsstellen (Aminosäuren) für Cross-Linker wurden entsprechend dem verwendeten Datensatz definiert. Des Weiteren wurden als mögliche Modifikationen die Carbamidomethylierung von Cysteinen und die Oxidation von Methioninen berücksichtigt. Die Übersichtsspektren sowie die Fragmentationenspektren der durch StavroX ermittelten potentiellen Vernetzungsprodukte wurden manuell überprüft. Für MeroX wurde der *RISE*-Modus (*Reporter Ion Scan Event*) genutzt. Dieser berücksichtigt nur die Fragmentationenspektren, welche das charakteristische Dublett, resultierend aus der Fragmentierung des BuUrBu-Linkers aufweisen (Abb. 1.11). Bei der Suche mit MeroX wurden die Ergebnisse statistisch anhand einer Falsch-Positiv-Rate (FDR, *false discovery rate*) gefiltert. Hierbei wurden nur Cross-Linking-Daten mit einer $FDR \leq 5\%$ als korrekt bewertet. Diese wurden anschließend manuell verifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung des humanen Volllängen-Wildtyp-p53

Um rekombinantes, humanes p53 aus *E. coli* zu gewinnen, wurde es mit N-terminalem HLT-Tag (His-Lipoyl-TEV) exprimiert (Abb. 4.1). Dieser setzt sich aus einer Oktahistidin-Sequenz, gefolgt von der ersten Lipoyl-Domäne der Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2p) des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes von *Bacillus stearothermophilus* und einer TEV-Schnittstelle zusammen [161].

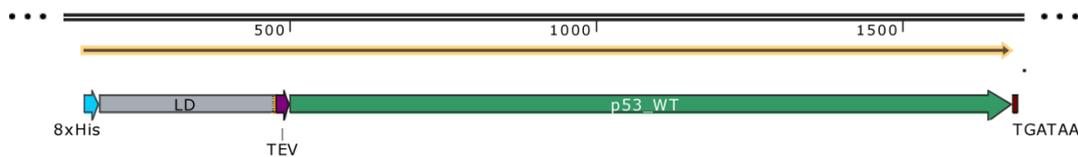


Abb. 4.1: Ausschnitt aus der Plasmidkarte von *HLT_p53FL_pET28a*. Der obere Bereich zeigt die schematische Darstellung eines Ausschnittes der Plasmid-DNA (schwarz) und dem sich darauf befindenden offenen Leseraster (orangener Pfeil). Im unteren Bereich sind detailliert die Bestandteile des offenen Leserasters gezeigt. Dieser setzt sich aus einem Oktahistidin-Sequenz (8xHis), der Lipoyl-Domäne mit Glu-Phe-Linker (LD), einer TEV-Schnittstelle (TEV) und dem humanem p53-Gen (p53_WT) zusammen.

Das verwendete Plasmid wurde als Plasmidpräparation auf Filterpapier von Bastian Bräuning (Weizmann Institute, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt. Es wurde mit TE-Puffer eluiert und chemisch kompetente *E.coli* DH5 α -Zellen damit transformiert (3.2.1.2). Eine Übernachtskultur (5 ml) wurde zur erneuten Präparation der Plasmid-DNA verwendet (3.2.1.3). Nach Bestätigung der gewünschten Sequenz mittels DNA-Sequenzierung (3.2.1.7) wurden ebenfalls chemokompetente *E.coli* BL21(DE3)-Zellen mit der bestätigten Plasmid-DNA transformiert und Kryokulturen angelegt.

4.1.1 Expression von HLT-p53 und ^{15}N -markiertem HLT-p53

Die Expression von HLT-p53 und ^{15}N -markierten HLT-p53 wurde, wie in 3.2.2.1 beschrieben, durchgeführt. Für die Expressionskultur zur Herstellung des nicht-markierten HLT-p53-Fusionsproteins konnten 6-10 g Biofeuchtmasse pro Liter verwendetes Medium erhalten werden. Für die Herstellung von ^{15}N -markiertem HLT-p53 wurden 6-8 g Biofeuchtmasse geerntet.

Die SDS-PAGE-Analyse der Testexpression (Abb. 4.2) in beiden Medien zeigte, dass sowohl die ^{15}N -markierte Variante (M9), als auch nicht-markiertes ^{14}N -Fusionsprotein (2 x YT) zu einem hohen prozentualen Anteil löslich und in ausreichenden Mengen exprimiert werden konnten.

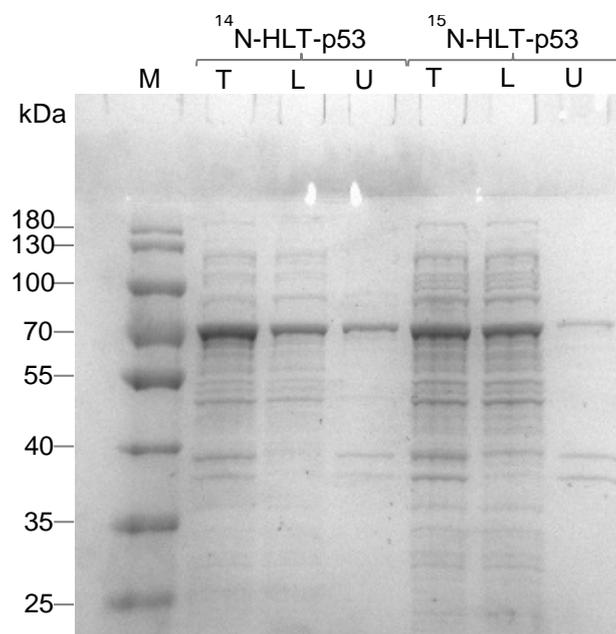


Abb. 4.2: Expressionstest des HLT-p53-Fusionsproteins in 2 x YT-Vollmedium (nicht-markiertes HLT-p53) und M9-basiertem Mineralsalzmedium (^{15}N -markiertes HLT-p53). Die entnommenen Proben der Testexpressionen wurden anhand der Zellzahl normiert, mittels Ultraschall lysiert und fraktioniert. Aufgetragen wurden gleiche Volumina von Gesamtlysat (T), löslichem Überstand (L) und unlöslicher Fraktion (U).

4.1.2 Reinigung von HLT-p53 und ^{15}N -markiertem HLT-p53

Vorversuche zur Reinigung des ^{15}N -markiertem und nicht-markierten HLT-p53-Fusionsproteins zeigten, dass eine vierstufige Reinigungsstrategie am geeignetsten zur Gewinnung des Zielproteins war. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt, da es sich bei p53 um ein thermolabiles Protein handelt. Als initialer Schritt wurde eine Affinitätschromatographie mittels einer IMAC durchgeführt (Abb. 4.3).

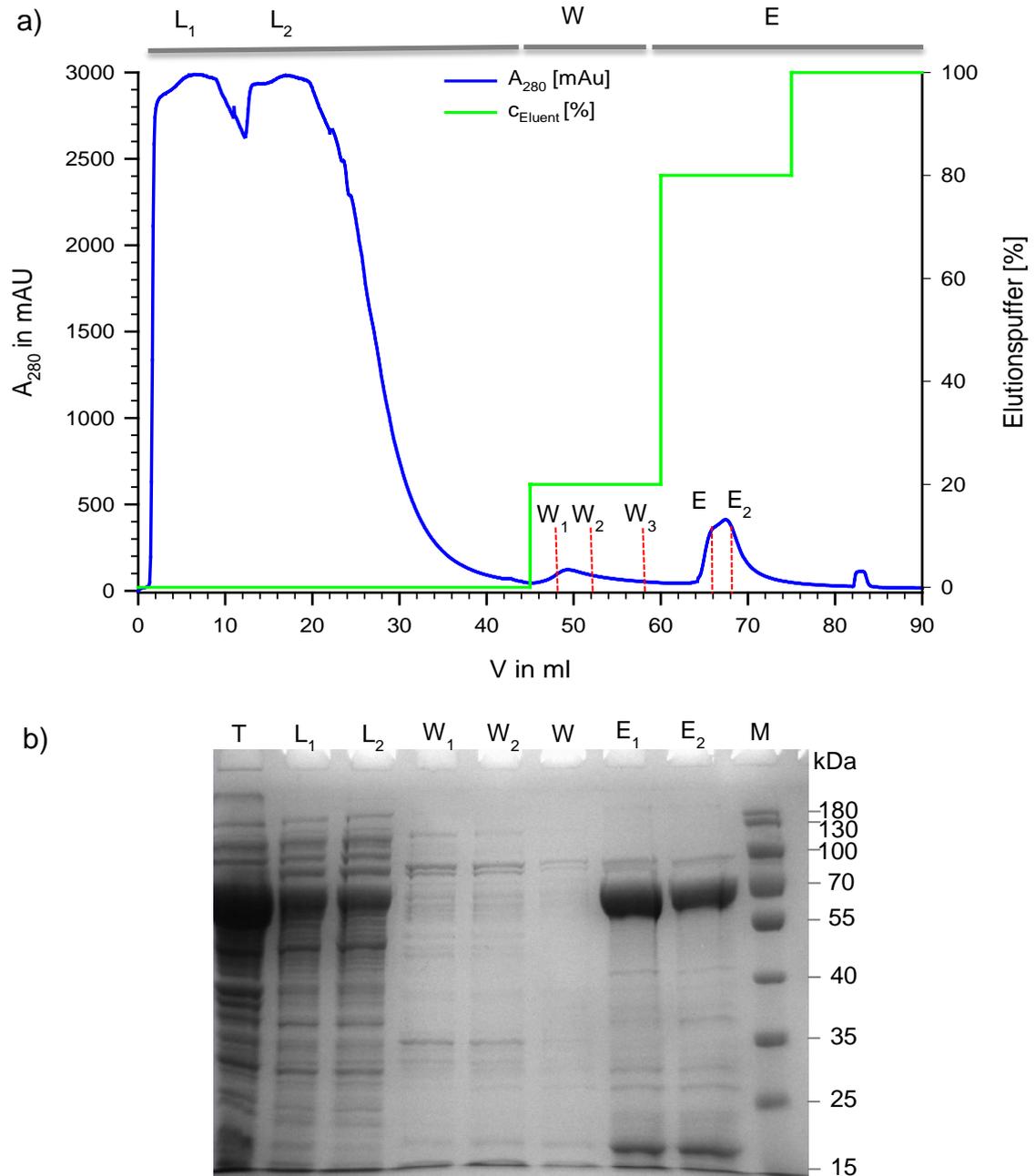


Abb. 4.3: Affinitätschromatographischer Schritt (IMAC) der Reinigung von HLT-p53. a) Chromatogramm der IMAC mit Imidazol-Stufengradienten-Elution: Dargestellt sind die Phasen des Reinigungsschrittes bestehend aus Probenapplikation (L), einem Waschschrift (W) und der Elution (E). Die Markierungen (rote Striche) im Chromatogramm zeigen die Zeitpunkte der Probenentnahme an. Die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau) und die Konzentration des Elutionspuffers in % (grün) sind aufgetragen. b) Korrespondierende SDS-PAGE-Analyse zur Verfolgung des IMAC-Reinigungsschrittes. Aufgetragen wurden variable Volumina von Gesamtlisat (T), löslicher Fraktion des Zelllysates (L), Waschfraktionen (W) und Elutionsproben (E). Zusätzlich wurde ein Größenstandard (M) mitgeführt.

Die Probe wurde in Anwesenheit von 20 mM Imidazol zweimal zu je 10 ml injiziert (L_1 und L_2 , Abb 4.3), um eine unspezifische Bindung von Histidin-reichen *E.coli*-Proteinen zu minimieren. Die Elution erfolgte mit 320 mM Imidazol und wurde mittels UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die FPLC-Fractionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.3 b).

Wie die SDS-PAGE-Analyse zeigt, konnten mit der ersten Stufe des Elutionsgradienten (Abb. 4.3 Waschfraktionen W_1 - W_3) einige unspezifisch gebundene Proteine des Wirtsorganismus erfolgreich vom Zielprotein getrennt werden. Die Analyse der Elutionsfraktionen E_1 und E_2 wiesen jeweils ein deutliches Signal bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 70 kDa auf, welches dem Fusionsprotein HLT-p53 zugeordnet werden konnte. HLT-p53 besitzt ein Molekulargewicht von 56,2 kDa und wies demzufolge ein Migrationsverhalten auf, was nicht dem Molekulargewicht entsprach. Es ist bekannt, dass p53 (43,8 kDa) bei einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa mittels SDS-PAGE-Analyse detektiert werden kann. Demzufolge kann auch das Fusionsprotein bei einem höheren apparenten Molekulargewicht detektierbar sein.

Die Identität des Zielproteins wurde mittels enzymatischer Proteolyse im Gel und Nano-HPLC/Nano-ESI-MS/MS überprüft. Dabei konnte die Sequenz des HLT-p53 mit einer Abdeckung von 95% bestätigt werden (Abb. 4.4). Die Fraktionen des Elutionspeaks zwischen einem Elutionsvolumen von 65-72 ml (Abb. 4.3) wurden vereinigt und für den weiteren Reinigungsverlauf auf ein Volumen von 4,0-4,5 ml konzentriert.

```

1      MGHHHHHHHH EFSGAFEFKL PDIGEGIHG EIVKWFVKPG DEVNEDDVLC EVONDKAVVE
61     IPSPVKGKVL EILVPEGTVA TVGQTLITLD APGYENMTTG SDTGEFENLY FQSMEEQSD
121    PSVEPPLSQE TFSDLWKLTP ENNVLSPLPS QAMDDLMLSP DDIEQWFTED PGPDEAPRMP
181    EAAPRVAPAP AAPTPAAPAP APSWPLSSSV PSQKTYQGSY GFRIGFLHSG TAKSVTCTYS
241    PALNKMFCQL AKTCPVQLWV DSTPPPGRTRV RAMAIYKQSQ HMTEVVRRCF HHERCSDSHG
301    LAPPOHLIRV EGNLRVEYLD DRNTFRHSVV VPYEPPEVGS DCTTIHYNM CNSSCMGGMN
361    RRPILTIITL EDSSGNLLGR NSFEVRVCAC PGRDRRTEEE NLRKKGEPH ELPPGSTKRA
421    LPNNTSSSPQ PKKKPLDGEY FTLQIRGRER FEMFRELNEA LCLKDAQAGK EPGGSRAHSS
481    HLKSKKGQST SRHKKLMFKT EGPDS

```

Abb. 4.4: Identifizierung des HLT-p53-Fusionsproteins anhand der Aminosäuresequenz. Der N-Terminus ist schwarz, der Oktahistidin-Sequenz hellblau, die Lipoyl-Domäne grau, Spacer orange, die TEV-Spaltstelle lila und p53 grün eingefärbt. Die Sequenzbereiche, die massenspektrometrisch bestätigt wurden, sind rot unterstrichen.

Es folgte eine Größenausschlusschromatographie als zweiter Schritt der Reinigung. Der Trennbereich der verwendeten Säule (3.1.2.1) liegt mit 10-600 kDa im Bereich der zu trennenden Proteinspezies. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Aufzeichnung der UV-Absorption bei 280 nm verfolgt (Abb. 4.5 a). Nach Erreichen des Totvolumens (107 ml) wurden 2-ml Fraktionen gesammelt. Es konnten zwei Signale (E_1 und E_3) bei Elutionsvolumina von 125 ml und 143 ml detektiert werden. Im weiteren chromatographischen Verlauf konnten weitere drei Signale (E_4 - E_6) mit wesentlich geringeren Signalintensitäten detektiert werden. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.5 b). Die Fraktionen E_1 - E_3 wiesen hauptsächlich ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 70 kDa auf, was dem Zielprotein entsprach. Das Elutionsverhalten der detektierten Spezies korrelierte nicht mit dem Molekulargewicht von HLT-p53. Ein Vergleich mit der Kalibrierung der verwendeten Säule (Abb. 4.5 a) zeigte in Bezug auf das apparente Molekulargewicht eine starke Abweichung des HLT-p53 vom erwarteten Molekulargewicht. Die detektierten Spezies, welche mit Molekulargewichten im Bereich 500-550 kDa im Falle von E_1 bzw. 300-400 kDa im Falle von E_3 korrelieren, schienen einen wesentlich höheren hydrodynamischen Radius aufzuweisen als für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 56,2 kDa typisch wäre. Unter physiologischen Bedingungen liegt p53 hauptsächlich als Dimer und Tetramer vor, welche Molekulargewichte von 112,4 kDa, respektive 224,8 kDa, aufweisen. Weiterhin handelt es sich bei p53 um ein IDP, was einen deutlich vergrößerten hydrodynamischen Radius sowohl des Monomers, als auch der Dimere und Tetramere zur Folge haben kann. Aus den aufgeführten Gründen wurden die gesammelten Fraktionen (E_1 - E_3) zwischen 115 ml und 160 ml vereinigt, konzentriert und für die folgende Abspaltung des HLT-Tags mittels TEV-Protease verwendet. Der Erfolg der enzymatischen Reaktion wurde mittels SDS-PAGE verfolgt (Abb. 4.6 b). Mit den gewählten Bedingungen konnte eine Effizienz der Spaltungsreaktion von nahezu 100% beobachtet werden. Das größere Spaltprodukt des Fusionsproteins erschien bei einem apparenten Molekulargewicht von 53 kDa (p53) und das kleinere Spaltprodukt (HLT-Tag; MG: 12,4 kDa) migrierte mit der Laufmittelfront. Die verwendete TEV-Protease besitzt ein Molekulargewicht von 48 kDa und war, da nur sehr geringe Mengen eingesetzt wurden, nach der SDS-PAGE-Analyse im Gel nicht sichtbar.

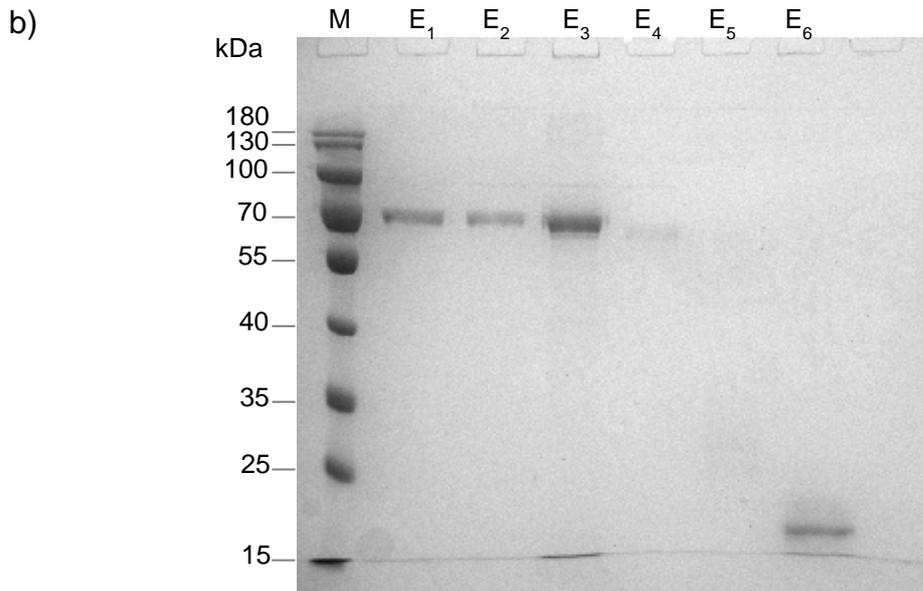
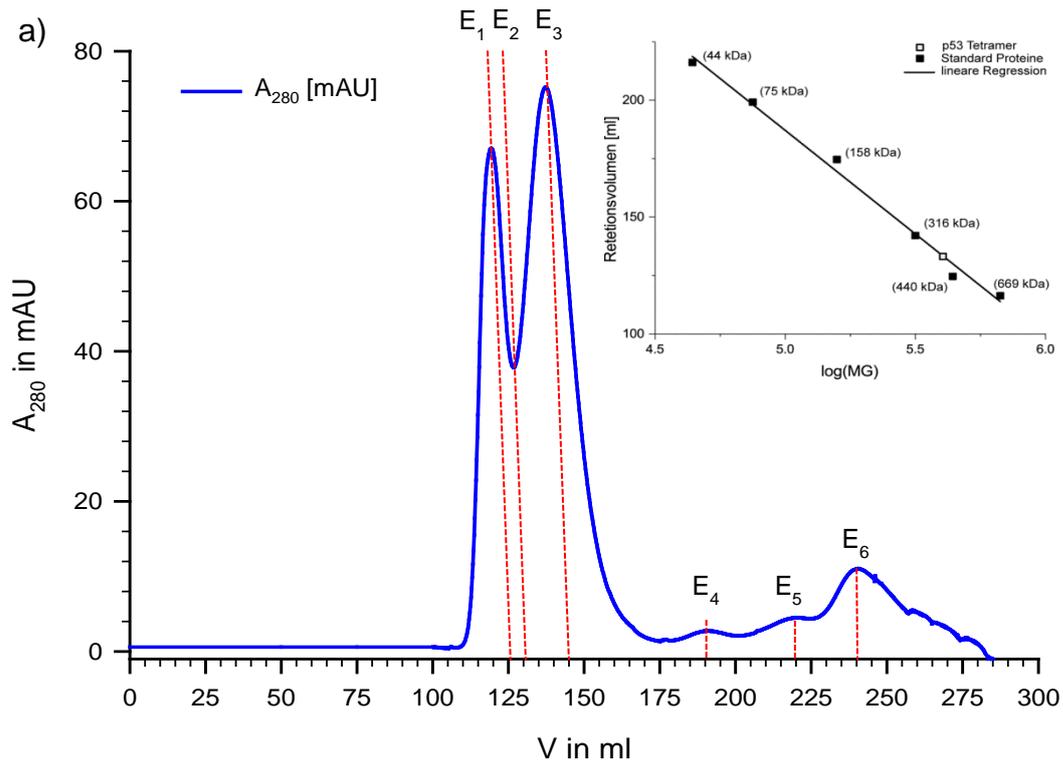


Abb. 4.5: Größenausschlusschromatographischer Schritt (SEC) der Reinigung von HLT-p53. a) Chromatogramm der SEC: Rote Striche zeigen die Probenentnahme während der Elution (E_1 - E_6). Das Chromatogramm zeigt die UV-Absorption bei 280 nm (blau). Im Einschub ist die Kalibriergerade zur Abschätzung der Molekulargewichte dargestellt. **b)** SDS-PAGE-Analyse zur Verfolgung der Reinigung. Aufgetragen wurden identische Proben-Volumina (E). Zusätzlich wurde ein Größenstandard (M) mitgeführt.

Zur Abtrennung des HLT-Tags und der TEV-Protease vom Zielprotein p53 wurde ein weiterer größenausschlusschromatographischer Trennschritt unter identischen Bedingungen wie zuvor beschrieben durchgeführt. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Aufzeichnung der UV-Absorption bei 280 nm verfolgt (Abb. 4.6 a). Das Chromatogramm zeigt ein Signal mit einem Intensitätsmaximum bei 145 ml, was mit einem Molekulargewicht von ca. 300-400 kDa korreliert. Das Signal bei einem Elutionsvolumen von 124 ml ist nun stark vermindert. Weiterhin wurden zwei zusätzliche Signale detektiert. Eines bei ~250 ml (E_3), wobei es sich um den HLT-Tag handeln könnte, und ein weiteres bei 285 ml, welches nicht weiter analysiert wurde.

Auch hier korrelierte das chromatographische Verhalten nicht mit dem apparenten Molekulargewicht in der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 4.6). Die Elutionsfraktionen der Signale E_1 und E_2 (Abb. 4.6) wurden vereinigt und mittels Zentrifugenfiltrationseinheiten konzentriert und als 200 μ l-Aliquots (10-15 μ M) nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert. Es wurde eine Probe für eine proteolytische Spaltung mit anschließender Nano-HPLC/Nano-ESI-MS/MS-Analyse entnommen, um die Identität des Zielproteins zu verifizieren und auf eventuelle Verunreinigungen mit *E.coli*-Proteinen zu untersuchen. p53 wurde mit einer Sequenzabdeckung von 88% identifiziert (Abb. A2). 1668 Fragmentationenspektren konnten p53 zugeordnet werden. Die abundanteste Verunreinigung stellte das Chaperon DnaK (69,1 kDa), mit einer Sequenzabdeckung von 62,85 % dar. β -Galactosidase (116,4 kDa), Chaperon DnaJ (41 kDa) und Chaperonin GroL1 (57,3 kDa) komplettieren die Auswahl an Verunreinigungen, welche bei entsprechenden apparenten Molekulargewichten gefunden wurden (Abb. 4.6 v.T. und n.T.). Weitere Verunreinigungen wurden in so geringem Maße identifiziert, dass sie vernachlässigt wurden.

Die Reinigung wurde analog für ^{15}N -markiertes p53 mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt. So konnten für p53 durchschnittlich 1,5 mg Protein und für ^{15}N -markiertes p53 durchschnittlich 1,1 mg Protein pro Liter Expressionsmedium gewonnen werden.

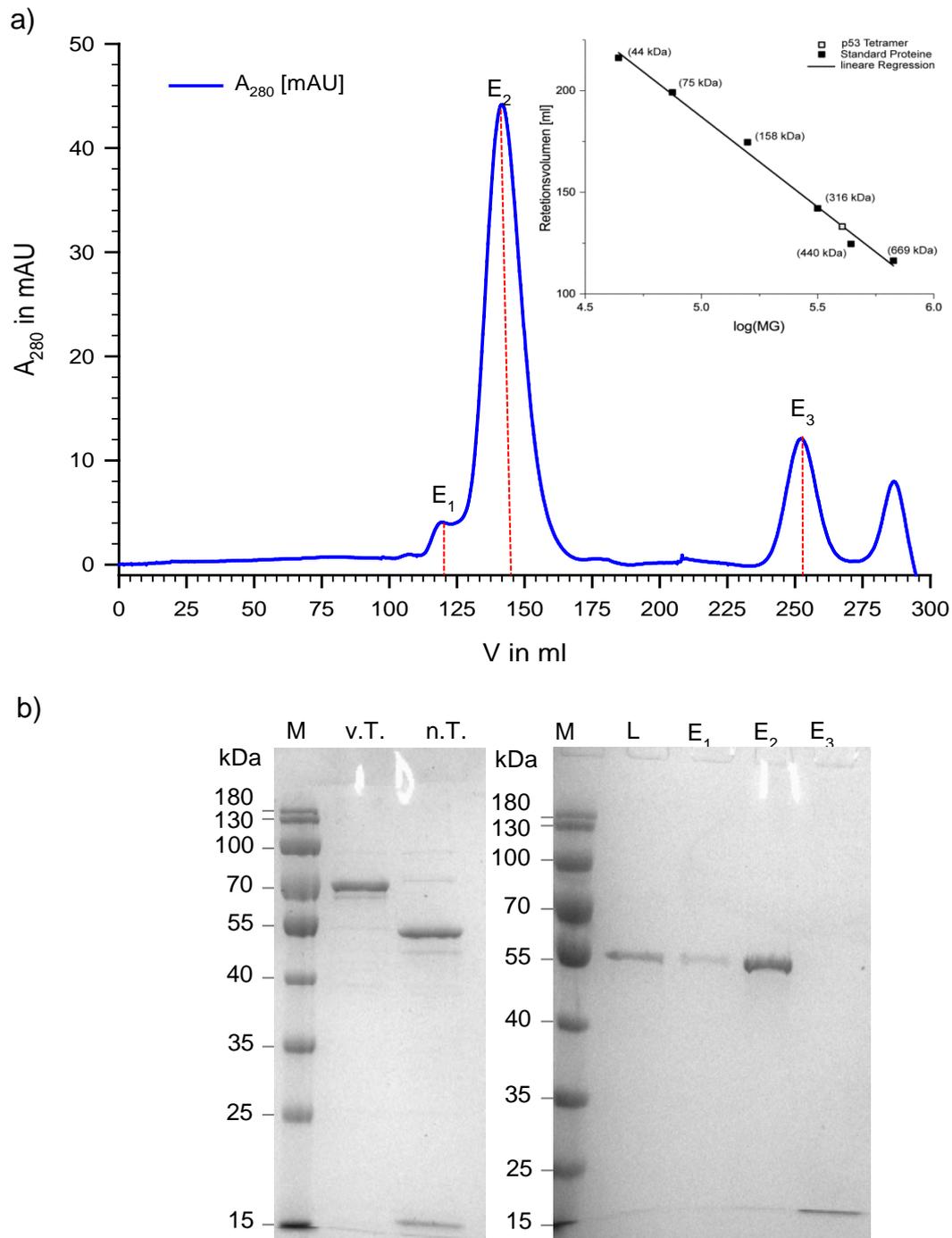


Abb. 4.6: Größenausschlusschromatographischer Schritt nach Abspaltung des HLT-Tags: **a)** Chromatogramm der SEC: rote Striche zeigen die Probenentnahme während der Elution (E_1 - E_6). Das Chromatogramm zeigt die UV-Absorption bei 280 nm (blau). Im Einschub ist die Kalibriergerade abgebildet. **b)** SDS-PAGE Analyse zur Verfolgung der Reinigung. Analysiert wurden die Proben vor TEV-Spaltung (v.T.) und nach Spaltung (n.T.), die aufgetragene Probe (L) und Elutionsfraktionen (E). Zusätzlich wurde ein Größenstandard (M) mitgeführt.

4.1.3 Funktionsstudien des gereinigten p53 mittels nativer MS

Nach jeder Reinigung wurde p53 auf seine Funktionalität geprüft. Hierfür wurden zwei Kriterien herangezogen: I) Die Fähigkeit zur Tetramerisierung, um die Funktion und korrekte Faltung der Tetramerisierungsdomäne zu überprüfen; II) die Fähigkeit der spezifischen DNA-Bindung, um die Funktion und Faltung der zentralen DNA-Bindedomäne (DBD) richtigzustellen. Beide Domänen sind die einzigen geordneten Domänen in p53 und sollten somit einen Indikator für die erfolgreiche Reinigung von funktionellem p53 darstellen.

4.1.3.1 Tetramerisierung des gereinigten p53 in Abwesenheit von Response-Element-DNA

Die Tetramerisierung von p53 wurde mittels nativer MS überprüft. Es wurden nur Signale im m/z -Bereich 3000-8000 detektiert, welche den nativen p53-Spezies zugeordnet werden konnten (Abb. 4.7). Im m/z -Bereich über 8000 wurden keine Signale detektiert, wodurch p53-Multimere mit höheren Oligomerisierungsgraden ausgeschlossen werden konnten. Unterhalb von m/z 3000 konnten ebenfalls keine Signalverteilungen mit hohen Ladungszuständen detektiert werden, die auf denaturiertes p53 hindeuten würden. p53 selbst konnte in vier Hauptladungsverteilungen gefunden werden. Die experimentell bestimmten Molekulargewichte der unterschiedlichen p53-Spezies zeigten nach Kalibrierung der Spektren eine Abweichung von durchschnittlich 3 u von den berechneten Werten. Wie in Abbildung 4.7 gezeigt, konnten die Signale der monomeren Spezies (43,9 kDa) mit Ladungen von 12+ bis 15+, einem Dimer (87,8 kDa) mit Ladungen von 18+ bis 23+, einer trimeren Spezies (131,7 kDa) mit Ladungen von 25+ bis 28+ und dem Tetramer (175,7 kDa) mit einer Ladungsverteilung von 26+ bis 32+ zugeordnet werden. Zusätzlich wurden Signale für DnaK (69,0 kDa), welches bereits als Verunreinigung bekannt war, beobachtet. Signale, die einem Protein oder Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 145 kDa entsprechen, wurden ebenfalls detektiert. Hierbei könnte es sich um das bifunktionelle Protein PutA (143,8 kDa) oder um einen Komplex aus mehreren Proteinen handeln. Um dies zu prüfen, wurde versucht, das 27-fach positiv geladene Ion dieser Spezies bei m/z 5350 zu isolieren und mittels Dissoziationsexperimenten zu prüfen, ob es sich um einen Komplex handelt. Allerdings war eine Isolierung des Signals mit ausreichender Intensität nicht möglich. Zur Bestätigung der Identität des p53-Tetramers wurde die 29-fach positiv geladene Ionenspezies bei m/z 6150 für weiterführende kollisionsinduzierte Dissoziationsexperimente (MS/MS) ausgewählt (Abb. 4.8).

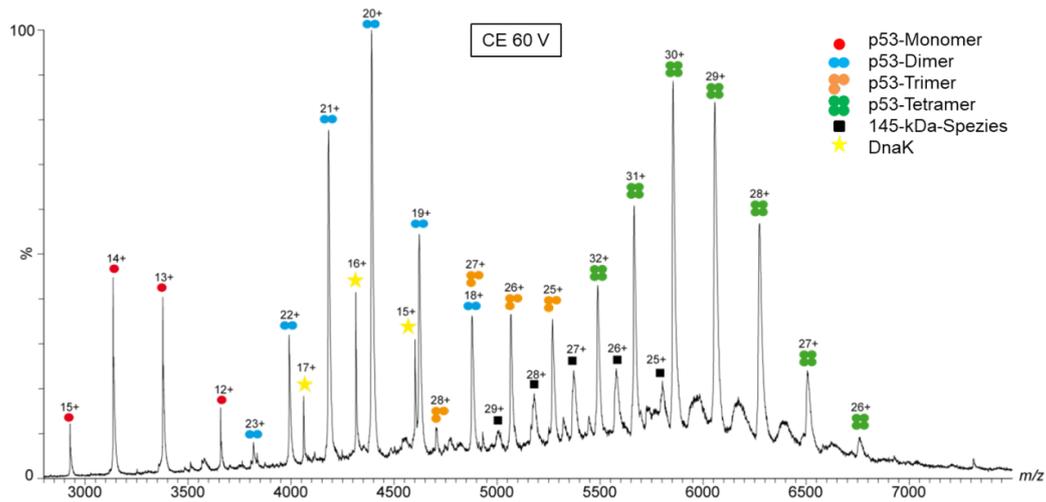


Abb. 4.7: Natives Massenspektrum von p53 in Abwesenheit von DNA: Es sind sowohl das p53 Monomer (rot), als auch die verschiedenen Oligomere, wie Dimer (hellblau), Trimer (orange) und Tetramer (grün) detektierbar. Neben den p53 zugeordneten Signalen, wurden Signale für DnaK (gelb) und eine nichtidentifizierte Spezies (schwarz) beobachtet. CE=Kollisionsenergie.

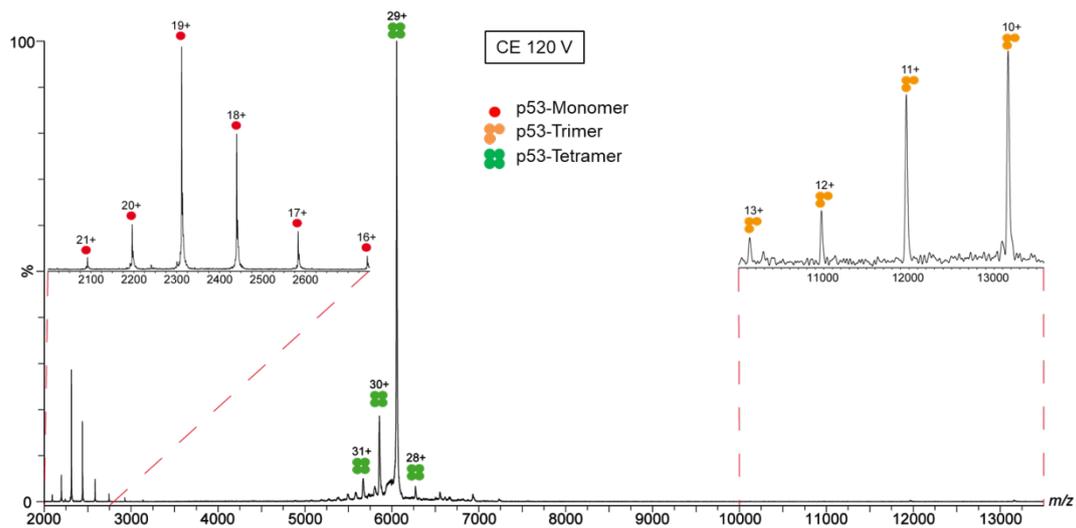


Abb. 4.8: Fragmentationenspektrum des 29-fach positiv geladenen p53-Tetramers in Abwesenheit von DNA: Das isolierte p53-Tetramer (grün) dissoziiert in ein hochgeladenes Monomer (rot) und ein Trimer (orange), welches die Restladung trägt. CE=Kollisionsenergie.

Durch sukzessive Erhöhung der Beschleunigungsspannung in der Kollisionszelle von 60 V auf 120 V konnte aus dem p53-Tetramer ein hochgeladenes p53-Monomer (16- bis 21-fach positiv geladen, m/z 2100-2700) entfernt werden. Auch das resultierende Trimer, welches die restlichen Ladungen der ursprünglichen tetrameren Ionenspezies trug (Abb. 4.8), wurde detektiert (10-bis-13-fach positiv geladen, m/z 10000-13500). Die

Signalintensitäten des Trimers sind in diesem Beispiel sehr gering, da die Ionenoptik auf die Fokussierung des resultierenden Monomers optimiert war.

4.1.3.2 Spezifische DNA-Bindung des gereinigten p53

Ein weiteres Kriterium für die Funktionalität des gereinigten p53 stellt die spezifische DNA-Bindung dar. Diese ist ein Indikator für eine funktionale DBD. Dafür wurde gereinigtes p53 mit spezifischer RE-DNA versetzt und für 10 bis 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die massenspektrometrischen Untersuchungen, wie zuvor beschrieben, vorbereitet und durchgeführt (3.2.5.2). Als DNA diente ein artifizielles Response-Element (REP; 3.1.4), welches mit einer höheren Affinität gebunden wird als das affinste natürlich vorkommende Response-Element [162]. Dieses besteht aus zwei typischen Halbseiten flankiert von einem „CGC“-Triplet, um die Hybridisierungseffizienz zu steigern und eine Selbsthybridisierung zu verringern. Parallel dazu wurde das natürlich vorkommende Response-Element p53R2 (REI; 3.1.4) verwendet, welches ein Ribonukleotidreduktase-kodierendes Gen kontrolliert [163]. Die erfolgreiche Hybridisierung beider DNA-Fragmente ist im Anhang (Abb. A3) dargestellt. Die Aufzeichnung der nativen Massenspektren in Anwesenheit von RE-DNA wurde analog zu den bereits in 4.1.3.1 beschriebenen Experimenten durchgeführt. Wiederum konnten Signale für das p53-Monomer (rot), Dimer (hellblau) und Trimer (orange) in identischen Ladungsverteilungen, wie in 4.1.3.1 beschrieben, detektiert werden. Die Ladungsverteilung für das p53-Tetramer wies eine Verschiebung zu höheren m/z -Werten zwischen 5700 und 8000 auf (Abb. 4.9). Die experimentelle Masse dieser Spezies betrug 191,6 kDa, was einer Massenverschiebung von 15,9 kDa im Vergleich zu den Analysen ohne RE-DNA entsprach. Dabei handelte es sich exakt um das Molekulargewicht des verwendeten Response-Elements (REP). Zusätzlich wurden Signale für ein Dimer (m/z 4500-5750) und ein Trimer (m/z 5250-6750) im Komplex mit RE-DNA beobachtet. Die Signale des Trimers wiesen vergleichsweise geringe Intensitäten auf. Die Signalintensitäten des DNA-gebundenen Dimers entsprachen annähernd der des ungebundenen Dimers. Da identische Messbedingungen wie bei den Proben ohne DNA verwendet wurden, lies sich eindeutig eine Verschiebung der relativen Signalintensitäten zu Gunsten der tetrameren p53-Spezies im Komplex mit RE-DNA erkennen.

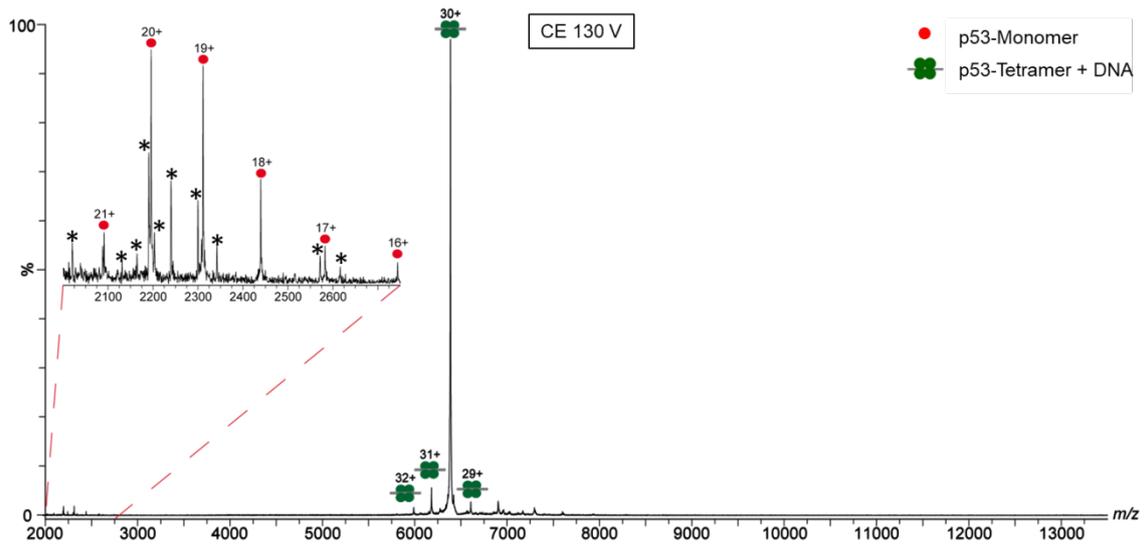


Abb. 4.10: Fragmentationenspektrum des 29-fach positiv geladenen p53-Tetramers in Anwesenheit von RE-DNA: Das isolierte p53-Tetramer (grün) dissoziiert in hochgeladenes Monomer (rot). Außerdem werden Fragmentionen des Proteinrückgrates detektiert (schwarze Sterne). CE=Kollisionsenergie.

Somit wurde mit Hilfe nativer Massenspektrometrie die Funktionalität im Hinblick auf Tetramerisierung und DNA-Bindung des gereinigten, humanen Vollängen-Wildtyp-p53 bestätigt. Damit konnte das gereinigte p53 für die Strukturaufklärung mittels Cross-Linking/MS verwendet werden.

4.2 Untersuchungen zur Tetramerisierung von p53 mittels nativer MS

Es ist bekannt, dass p53 seine Funktion als Transkriptionsfaktor nur als Homotetramer ausführen kann [40]. Diese Tetramerisierung wird in der Regel von mehreren Faktoren wie Konzentration, posttranslationalen Modifikationen (PTMs), Temperatur und dem Vorhandensein spezifischer RE-DNA, beeinflusst. Für strukturelle Untersuchungen an p53 ist daher von vorrangiger Bedeutung, wie sich das p53-Tetramer unter bestimmten Bedingungen *in vitro* verhält. Die folgenden Experimente sollten Aufschluss darüber geben ob sich die Assoziation von p53-Tetrameren in An- und Abwesenheit von Response-Element-DNA grundlegend voneinander unterscheidet.

Für die Untersuchung der Tetramerisierung von p53 wurden äquimolare Mischungen aus nicht-markiertem und ^{15}N -markiertem p53 verwendet. Für Messungen in Anwesenheit von RE-DNA (REP) wurde dieses direkt zum Zeitpunkt der Mischung von ^{15}N -p53 und ^{14}N -p53 hinzugegeben. Unabhängig von der DNA-Zugabe wurden die Gemische für mindestens 10 Stunden bei 4 °C inkubiert, um die Bildung von gemischten p53-Dimeren und -Tetrameren zu gewährleisten. Die resultierenden nativen Massenspektren sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von RE-DNA konnten Signale für p53-Monomere, -Dimere, -Trimere und -Tetramere als einheitliche ^{15}N - und ^{14}N -Spezies (Abb. 4.11) erhalten werden. Zudem wurden Signale für DnaK detektiert. p53-Dimer und -Tetramer wiesen die höchsten relativen Signalintensitäten auf. Zusätzlich wurde in Anwesenheit von RE-DNA ungebundenes p53-Tetramer detektiert, was auf eine zu geringe Konzentration an RE-DNA hindeutet. DNA-Bindung wurde sowohl für das p53-Dimer als auch das Tetramer beobachtet. Die Verteilung der Signale und ihre relativen Intensitäten für isotoopenreine und gemischt-isotope Spezies entsprachen allerdings nicht den theoretisch erwarteten Werten.

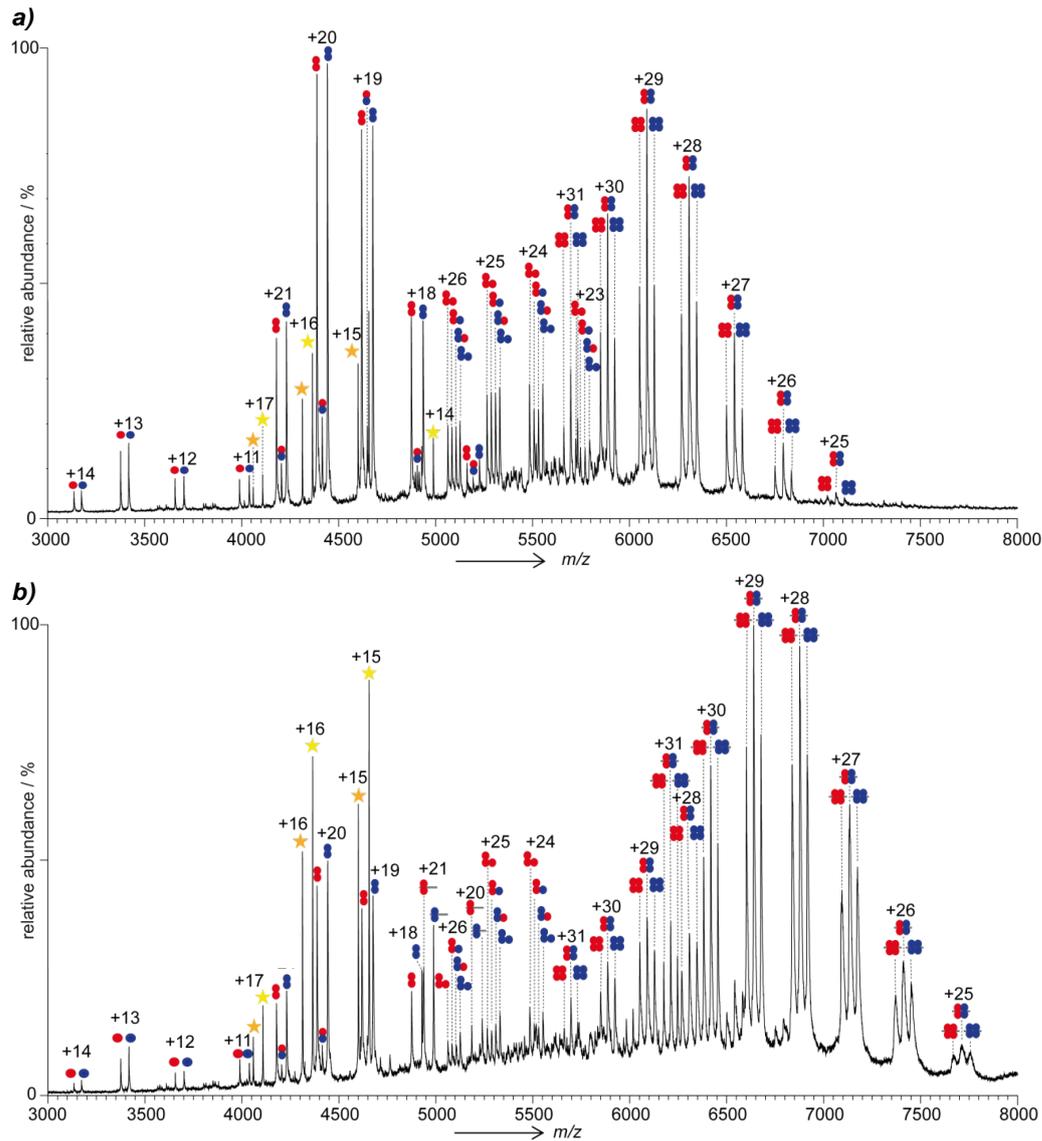


Abb. 4.11: Native Massenspektren einer äquimolaren Mischung aus nicht markiertem und ^{15}N -markiertem p53 a) in Abwesenheit und b) Anwesenheit von RE-DNA. Sowohl reine ^{14}N -p53-(rot) und ^{15}N -p53-(blau) Spezies als auch Mischspezies wurden detektiert. Es wurden ebenfalls Signale für nicht markiertes (orange) und ^{15}N -markiertes DnaK (gelb) beobachtet. Abbildung entnommen aus [146]

Bei der Ausbildung eines Homotetramers bei kompletter, statistischer Durchmischung von ^{15}N - und ^{14}N -Spezies ergäbe sich eine Intensitätsverteilung von 1:4:6:4:1 ($^{14}\text{N}_4$: $^{14}\text{N}_3^{15}\text{N}$: $^{14}\text{N}_2^{15}\text{N}_2$: $^{14}\text{N}^{15}\text{N}_3$: $^{15}\text{N}_4$) und entsprechend eine 1:2:1-Verteilung ($^{14}\text{N}_2$: $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$: $^{15}\text{N}_2$) für das korrespondierende Dimer (Abb. 4.12). Stattdessen wurde für das p53-Dimer nahezu keine $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ -Mischspezies detektiert (ca. 1:0,2:1-Verhältnis). Das p53-Tetramer wies eine 1:2:1-Verteilung ($^{14}\text{N}_4$: $^{14}\text{N}_2^{15}\text{N}_2$: $^{15}\text{N}_4$, Abb. 4.11 und 4.12) und das p53-Trimer eine 1:1:1-Verteilung ($^{14}\text{N}_3$: $^{14}\text{N}_2^{15}\text{N}$: $^{14}\text{N}^{15}\text{N}_2$: $^{15}\text{N}_3$) der Signale auf. Die beobachtete Verteilung des p53-Tetramers von 1:2:1 zeigte, dass es sich hier um

eine Dimerisierung initial gebildeter Dimere handelte und dass auch nach längerer Inkubation (über Nacht) bei 4 °C nahezu kein Austausch der monomeren p53-Untereinheiten erfolgte.

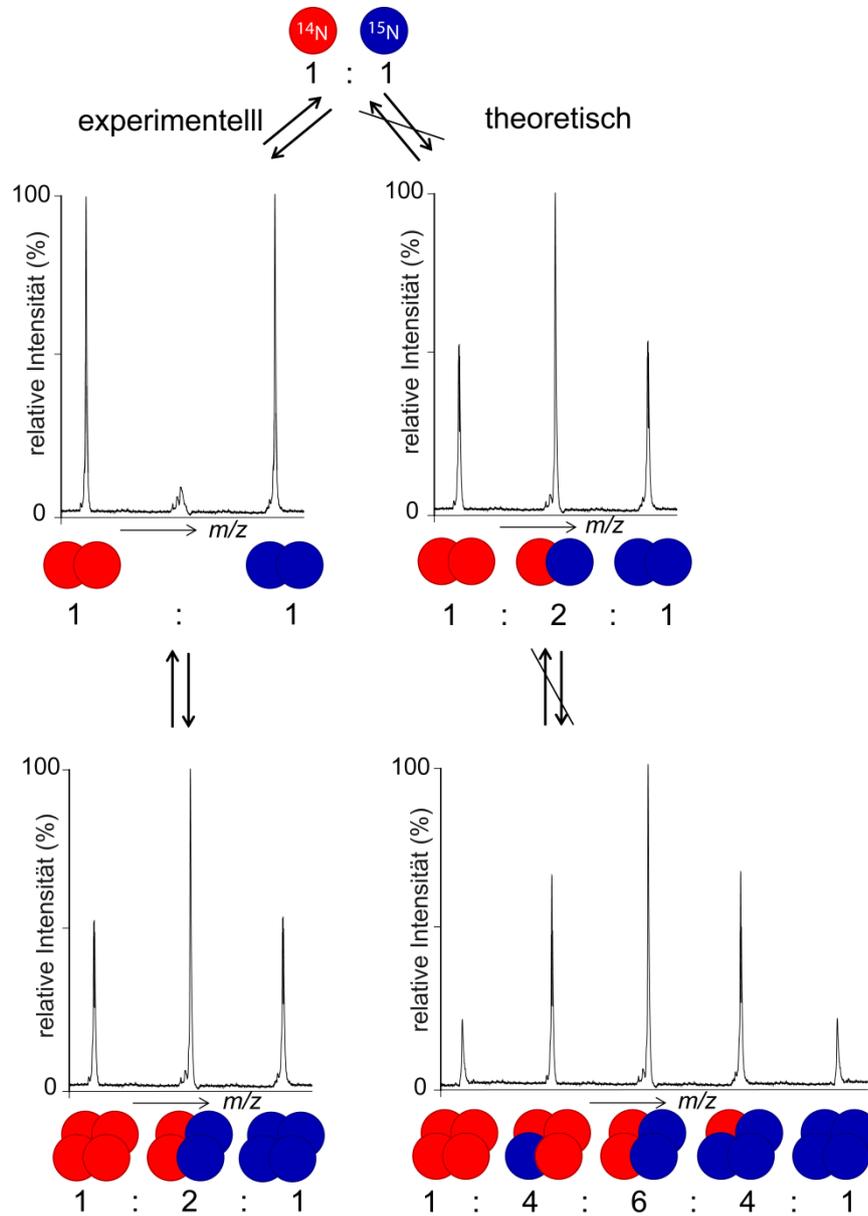


Abb. 4.12: Theoretische und experimentelle Intensitätsverteilung der Signale für verschiedene p53-Mischspezies. Die Signalverteilung wird durch die Isotopenmarkierungsstrategie erhalten. Abbildung entnommen aus [146].

Dieses Szenario eröffnete eine Simplifizierung der Analytik mittels Cross-Linking/MS. Jeder identifizierte intermolekulare Cross-Link musste sich demzufolge an der Interaktionsfläche zweier Dimere gebildet haben, die ein Tetramer ausbildeten. Jedoch ergab sich daraus auch eine zusätzliche Schwierigkeit für die sichere Identifizierung von intramolekularen Cross-Linking-Produkten, da eine Unterscheidung von intra- und intermolekularen Cross-Links innerhalb eines initialen p53-Dimers basierend auf der Isotopenmarkierung nicht möglich war. Die Assoziation der Dimere und ihre Orientierung im p53-Tetramer sind weiterhin nicht gänzlich geklärt (Abb. 4.13). Zu diesem Sachverhalt existieren kontroverse Literaturdaten, so dass die mittels Cross-Linking/MS erhaltenen Daten zur Klärung dieser Frage beitragen könnten [101].

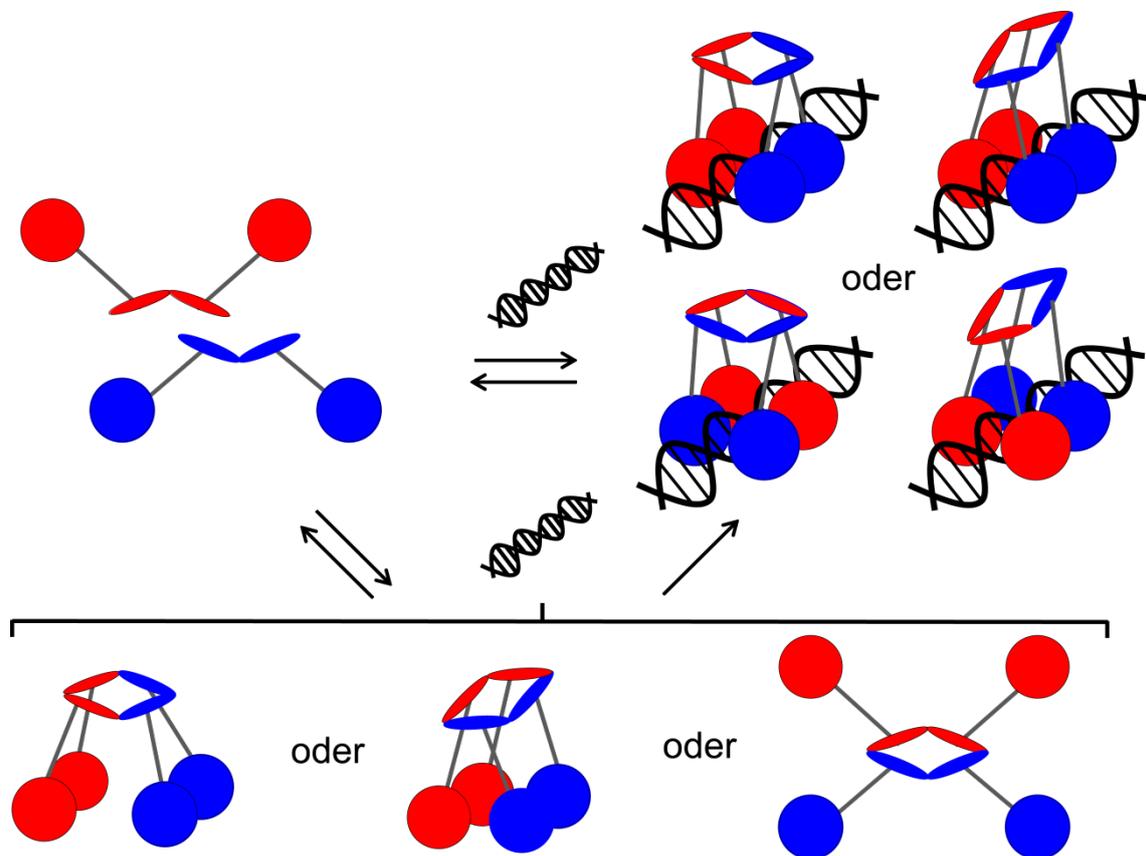


Abb. 4.13: Schematische Darstellung zur p53-Tetramerisation. Theoretische Bildung von p53-Tetrameren aus Dimere und deren Umwandlung ineinander. Es assoziieren initiale Dimere aus ^{15}N -markiertem- (blau) und nichtmarkiertem p53 und bilden tetramere Mischspezies.

4.3 Strukturaufklärung von p53 mittels Cross-Linking/MS

Aufgrund des IDP-Charakters von p53 existieren nur wenige Strukturdaten des Volllängenproteins. Die erfolgreiche Reinigung von funktionellem, humanen Volllängen-Wildtyp-p53 in dieser Arbeit ermöglichte es neue Informationen in Form räumlicher Distanzbeschränkungen durch Cross-Linking-Experimente zu erhalten. So wurden Informationen über die Interaktionsflächen von p53-Monomeren innerhalb des aktiven Tetramers und Einblicke in die Orientierung der intrinsisch ungeordneten Regionen sowohl im Monomer als auch im Tetramer in An- und Abwesenheit von RE-DNA erhalten. Aufgrund des hohen Anteils an Lysin, vor allem in der C-terminalen regulatorischen Domäne von p53, wurden homobifunktionelle, aminreaktive Cross-Linker (BS²G und BuUrBu) verwendet, um strukturelle Einblicke in die C-terminale Region von p53 zu erhalten (Anhang Abb. A5). Die N-terminale Transaktivierungsdomäne enthält vor allem saure Aminosäuren, wie Asparaginsäure und Glutaminsäure. Diese Domäne sollte mit carboxylreaktiven Cross-Linkern (DMTMM, SDH) untersucht werden. Zusätzlich enthält die DBD elf Cysteine, welche als potenzielle Reaktionsstellen des heterobifunktionellen, sulfhydryl- und aminreaktiven Cross-Linkers Sulfo-GMBS dienen (Anhang Abb. A6). Für die Differenzierung von intramolekularen (innerhalb des p53-Monomers bzw. initialen Dimers) und intermolekularen (zwischen einzelnen p53-Monomeren bzw. initialen Dimeren) Cross-Linking-Produkten wurde sich einer Isotopenmarkierungsstrategie bedient [164-166]. Dabei wurden nicht-markiertes und ¹⁵N-markiertes p53 in äquimolaren Anteilen gemischt, um die Bildung dimerer und tetramerer Mischspezies zu erlauben. Auf diese Weise sollten topologische Informationen aus allen Regionen des p53-Monomers, -Dimers und -Tetramers in Anwesenheit und in Abwesenheit spezifischer RE-DNA erlangt werden.

4.3.1 Cross-Linking-Experimente in Abwesenheit von Response Element-DNA

Die Cross-Linking-Experimente in Abwesenheit von RE-DNA wurden mit Hilfe der homobifunktionellen, aminreaktiven Reagenzien BS²G und BuUrBu, sowie dem heterobifunktionellen, sulfhydryl- und aminreaktiven Sulfo-GMBS durchgeführt (3.2.4). Zur Unterscheidung intra- und intermolekularer Cross-Links wurde, wie bereits beschrieben, ein äquimolares Gemisch von nicht-markiertem ¹⁴N-p53 und ¹⁵N-markiertem p53 verwendet. Nach erfolgter Reaktion wurden die Reaktionsansätze mittels eindimensionaler SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.14).

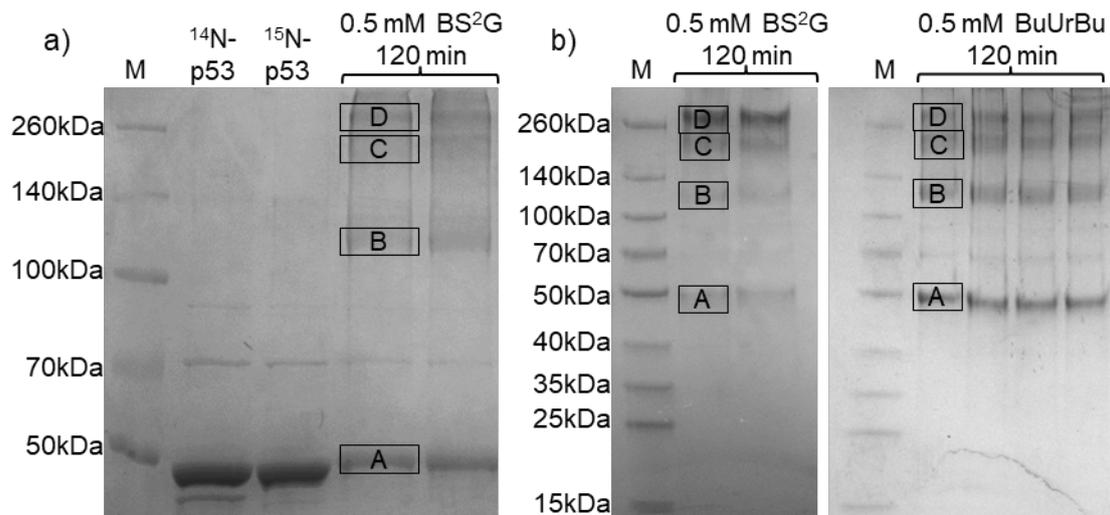


Abb. 4.14: Eindimensionale SDS-PAGE der p53-Cross-Linking-Reaktionsansätze in Abwesenheit von RE-DNA: *a)* Ergebnis der Gelelektrophorese der Cross-Linking-Reaktion mit 50-fachem molarem Überschuss an BS²G unter Verwendung eines 8%igen SDS-Gels. Zusätzlich wurden Kontrollen ohne Cross-Linker (¹⁴N-p53; ¹⁵N-p53) eingesetzt. *b)* Verläufe der Cross-Linking-Reaktion von p53 mit BS²G und BuUrBu unter identischen Bedingungen mittels Tris-HEPES-Gradientengelen (4-20%). Die unterschiedlichen p53-Spezies sind markiert: Monomer (A), Dimer (B), Trimer (C), Tetramer (D).

Im Vergleich zu nicht vernetztem p53 konnte in den Cross-Linking-Ansätzen eine Abnahme der Signalintensitäten für monomeres p53 (A) und das Auftreten von p53-Dimer (B), Trimer (C) und Tetramer (D) -Signalen beobachtet werden (Abb. 4.14). Entsprechende Oligomersignale von p53 wurden für die Kontrollen ohne Cross-Linker (Abb. 4.14.a) für nicht-markiertes ¹⁴N-p53 und ¹⁵N- markiertes p53 unter den gegebenen Bedingungen nicht beobachtet. Durch die Verwendung eines denaturierenden und reduzierenden gelelektrophoretischen Trennverfahrens könnte es sich bei Monomer, Dimer und Trimer um die so in Lösung vorliegenden und durch die Cross-Linking-Reaktion fixierten p53-Spezies oder die durch Zerfall von nicht-kovalent fixierten p53-Tetrameren entstandenen Spezies handeln. Die Banden entsprechender p53-Spezies wurden anschließend ausgeschnitten und die Proteinkomplexe mittels AspN und Trypsin im Gel proteolytisch gespalten. Resultierende Peptidgemische wurden mittels LC/MS/MS analysiert (3.2.5.1). Für die Identifizierung der Cross-Linking-Produkte wurden die N-Termini der Proteine sowie die Seitenketten von Lysin als reaktive Gruppen beachtet. Mögliche Reaktionen mit Hydroxylfunktionen von Serinen, Threoninen oder Tyrosinen wurden nur bei der Auswertung der mit BS²G gewonnenen Daten in Betracht gezogen (3.2.6).

Für Sulfo-GMBS konnten keine Cross-Linking-Produkte identifiziert werden, obwohl ausreichend reaktive Aminosäurereste in überbrückbarer Distanz vorhanden waren (Anhang Abb. A7). Die erhaltenen Daten wurden demnach zur Oberflächenkartierung der vorhandenen Cysteine verwendet (Anhang Abb. A6 und Tabelle A1). Die Lokalisation der Cysteine in der DNA-Bindedomäne, sowie die Ergebnisse der kovalenten Markierung mit Sulfo-GMBS sind im Anhang Abb. A6 und A7 sowie Tabelle A1 dargestellt.

Die Verwendung einer 1:1-Mischung aus ^{15}N -markiertem und nicht-markiertem p53 und die damit möglichen Kombinationen unterschiedlich isotoopenmarkierter Peptide ermöglichte die Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularen Cross-Links anhand des Auftretens charakteristischer Isotopenmuster. Intramolekulare Produkte weisen nur Signale für reine ^{14}N - oder ^{15}N -Spezies auf. Bei intermolekular verknüpften Produkten sind neben reinen Spezies (^{14}N -Peptid/ ^{14}N -Peptid; ^{15}N -Peptid/ ^{15}N -Peptid) auch Kombinationen aus ^{14}N -Peptiden und ^{15}N -Peptiden (^{14}N -Peptid/ ^{15}N -Peptid; ^{15}N -Peptid/ ^{14}N -Peptid) möglich. Wird ein Cross-Linking-Produkt aus identischen oder überlappenden Sequenzabschnitten identifiziert, kann dieses nur auf eine intermolekulare Verknüpfung zurückgeführt werden. Abb. 4.15 a zeigt das Vorläuferionenmassenspektrum eines dreifach positiv geladenen Cross-Linking-Produktes mit BS²G aus zwei verschiedenen p53-Peptiden (Peptid 1: KKPL; Peptid 2: DAQAGKEPPGSSR). Es enthält Signale für eine reine ^{14}N -Spezies (m/z 584,980) und eine reine ^{15}N -Spezies (m/z 592,624). Die Massendifferenz zwischen beiden Spezies beträgt 7,64 Th ($z = 3$, 23 u), was mit der Anzahl von 23 Stickstoffatomen des Cross-Linking-Produktes korreliert. Das Fehlen von Signalen für eine gemischte Spezies zeigt, dass es sich hierbei um ein intramolekulares Produkt handeln muss. In Abb.4.15 b ist ein intermolekulares Cross-Linking-Produkt dargestellt. Die Massendifferenz zwischen reiner ^{14}N -Spezies (m/z 683,004) und ^{15}N -Spezies (m/z 692,642) beträgt 9,64 Th ($z = 3$, 29 u) was der Gesamtanzahl von 29 N-Atomen des Cross-Linking-Produktes entspricht. Die beiden Mischspezies $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (m/z 686,992) und $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ (m/z 688,654) weisen eine Massendifferenz von 3,988 Th ($z = 3$; 12 u) bzw. 5,65Th ($z = 3$; 17 u) zur reinen ^{14}N -Spezies auf, entsprechend der Anzahl an Stickstoffatomen der miteinander verknüpften Peptide (N_{17} für das α -Peptid, N_{12} für das β -Peptid). Statistisch sollten die Intensitäten der Signale für die Mischspezies die gleichen Intensitäten wie die der reinen ^{14}N - bzw. ^{15}N -Spezies aufweisen. Im abgebildeten Spektrum (Abb. 4.15 b) sind die Intensitäten der Mischspezies jedoch deutlich vermindert, was bedeutet, dass der entsprechende Cross-Link auch intramolekular, oder im Fall von p53, auch intermolekular zwischen zwei Monomeren

eines initialen, reinen p53-Dimers gebildet wurde. Handelt es sich um Cross-Linking-Produkte von Peptiden mit identischer Anzahl an Stickstoffatomen oder gar identischen Sequenzen wie in Abb. 4.15 c, sind die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ - und $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Mischspezies (m/z 615,030) isobar. Die Massendifferenz zwischen ^{14}N - und Mischspezies sowie zwischen ^{15}N - und Mischspezies beträgt 4,24 Th ($z = 4$, 17 u), was der Anzahl an N-Atomen des Peptides mit der Aminosäuresequenz DAQAGKEPGGSR entspricht. Auch für dieses Cross-Linking-Produkt weicht die experimentell ermittelte Intensitätsverteilung (1:1:1) von der theoretischen (1:2:1) ab.

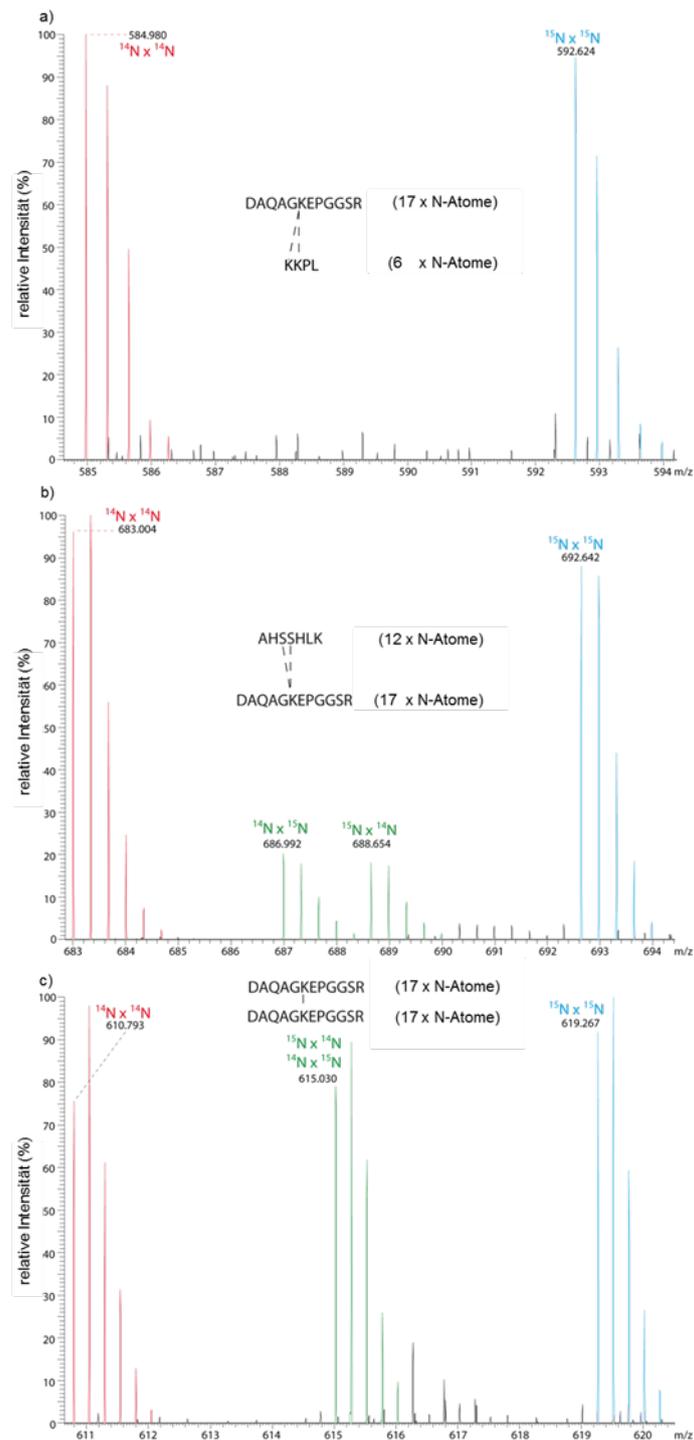


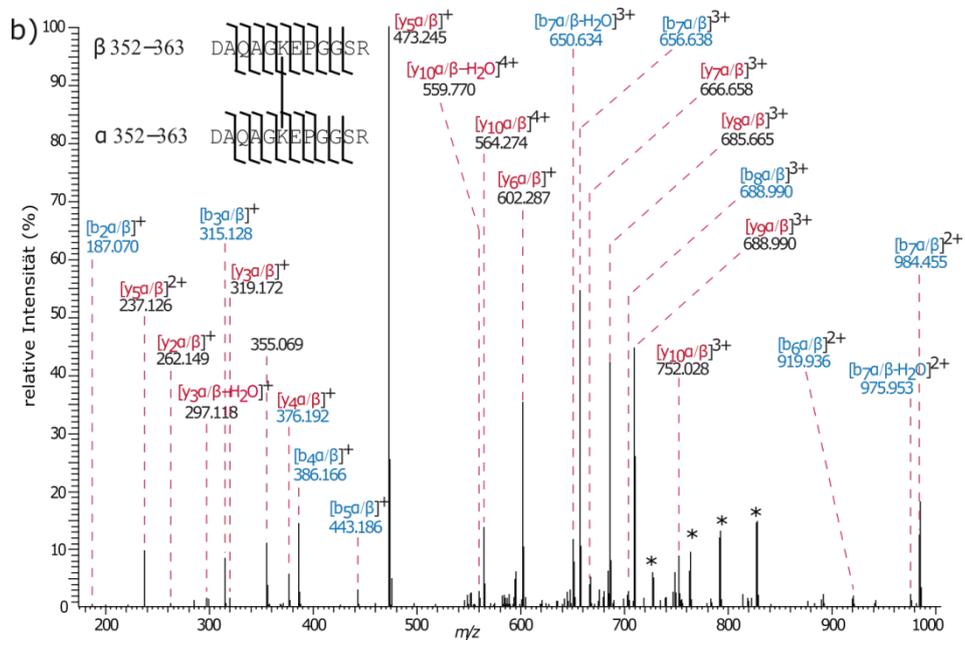
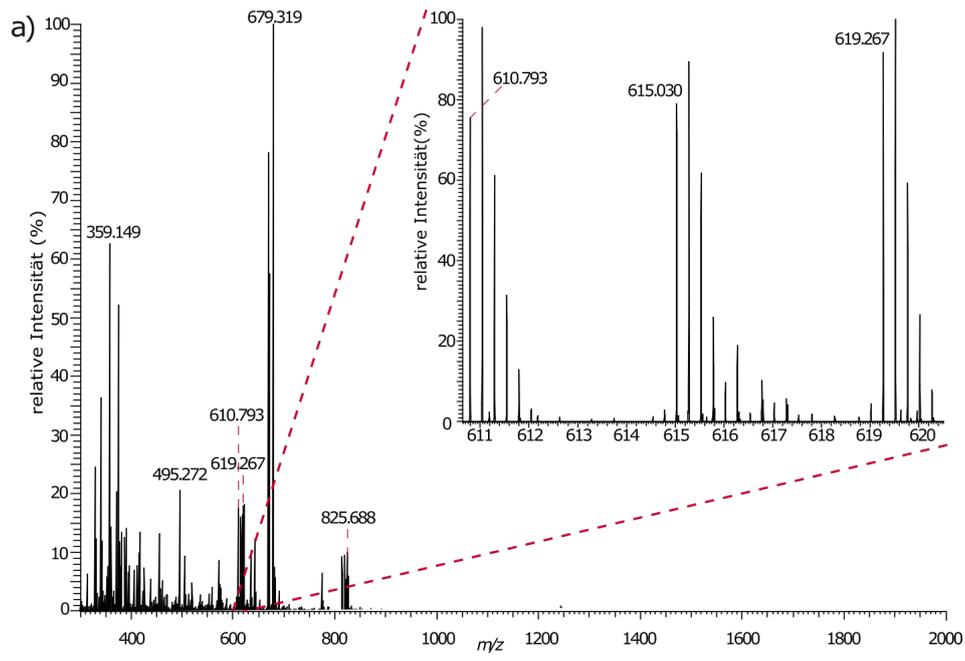
Abb. 4.15: Massenspektren ausgewählter BS^2G Cross-Linking-Produkte mit charakteristischen Isotopenmustern. Die charakteristischen Isotopenmuster aufgrund der Verwendung von ^{14}N - und ^{15}N -markiertem p53 auftreten, hängen von der Anzahl der vorhandenen Stickstoffatome ab. Massenspektren sind gezeigt für Cross-Links zwischen **a)** zwei verschiedenen Peptiden eines Monomers (intramolekular, dreifach positiv geladene Ionen); **b)** zwei verschiedenen Peptiden mit unterschiedlicher Anzahl an Stickstoffatomen (dreifach positiv geladene Ionen) und **c)** zwei identischen Peptiden mit gleicher Anzahl an Stickstoffatomen (vierfach positiv geladene Ionen).

Die Verwendung von BuUrBu als Cross-Linking-Reagenz führte zu äquivalenten Ergebnissen hinsichtlich der beobachteten Isotopenmuster. Eine Auswahl an Massenspektren, welche für die BuUrBu-Cross-Linking-Experimente erhalten wurden, ist im Anhang in Abb. A8 dargestellt.

4.3.1.1 Auswertung der BS²G-Cross-Linking-Daten

Die Cross-Linking-Produkte wurden anhand ihrer Fragmentionenspektren mit Hilfe der Software StavroX identifiziert [160]. Idealerweise wurden im Verlauf der LC/MS/MS-Analyse die Fragmentionenspektren der reinen ¹⁴N- und ¹⁵N-Spezies als auch der ¹⁴N/¹⁵N- Mischspezies sequenziell aufgezeichnet, wodurch eine eindeutige Identifizierung möglich war. Ein charakteristisches Beispiel stellt das intermolekulare Cross-Linking-Produkt dar, bei dem K-357 des α -Peptides mit der Aminosäuresequenz DAQAGKEPGGSR mit K-357 eines β -Peptides mit identischer Sequenz aus einem anderen p53-Monomer verknüpft wurde. Dieses Produkt wurde anhand des charakteristischen Isotopenmusters im Vorläuferionenmassenspektrum der vierfach positiv geladenen Spezies, anhand der Signalen bei m/z 610,793 (¹⁴N/¹⁴N), m/z 615,030 (¹⁴N/¹⁵N und ¹⁵N/¹⁴N) und m/z 619,267 (¹⁵N/¹⁵N) identifiziert (Abb. 4.16 a). Die Fragmentierung der Vorläuferionen bei m/z 610,793 (¹⁴N/¹⁴N) und m/z 619,267 (¹⁵N/¹⁵N) führte jeweils zu identischen Fragmentierungsmustern und charakteristischen Massendifferenzen identischer Fragmentionen, entsprechend der Anzahl der in den Fragmenten vorhandenen Stickstoffatome (Abb. 4.16 b und c). Beispielsweise weist das $[y_5\alpha/\beta]^+$ -Fragmention der ¹⁴N-Spezies (m/z 473,245) und ¹⁵N-Spezies (m/z 481,221) eine Massendifferenz von 8 u auf. Dies ist auf die Beteiligung von insgesamt 8 Stickstoffatomen aus den jeweiligen Aminosäuresequenzen (PGGSR) zurückzuführen. Die Fragmentierung des Vorläuferions der gemischten Spezies bei m/z 615,030 (¹⁴N/¹⁵N und ¹⁵N/¹⁴N) beweist, dass es sich um eine intermolekulare Verknüpfung handelt (Abb. 4.16 d).

4 Ergebnisse



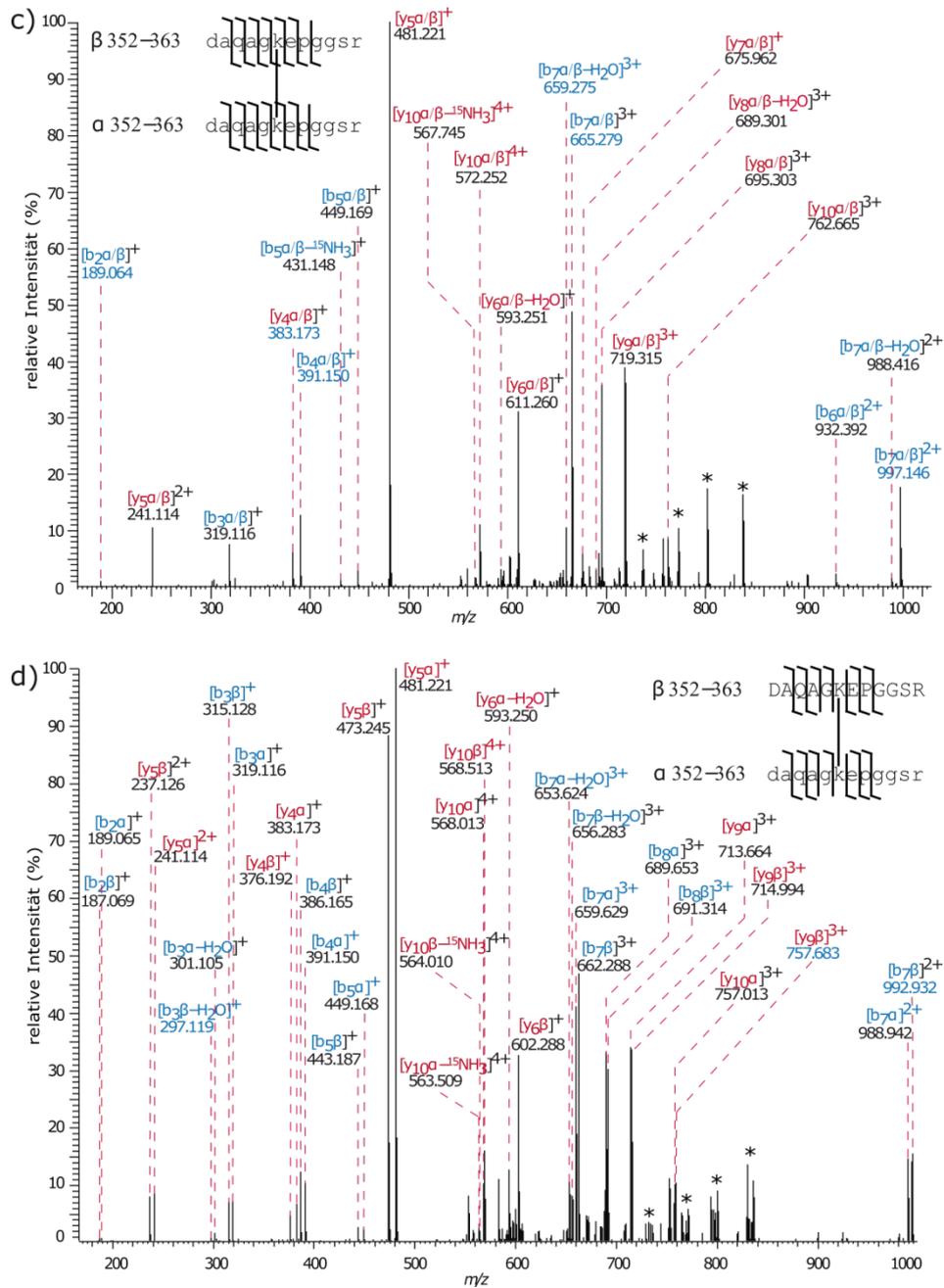


Abb. 4.16: Identifizierung eines intermolekularen BS²G-Cross-Links zwischen K-357 und K-357 im p53-Tetramers. **a)** Übersichtsmassenspektrum bei einer Retentionszeit von 37,19 min: In der Vergrößerung ist das charakteristische Isotopenmuster aufgrund ¹⁵N-Markierung zu erkennen. **b)** Fragmentationenspektrum des vierfach positiv geladenen Vorläuferions bei m/z 610,793 (¹⁴N-Spezies); **c)** Fragmentationenspektrum des vierfach positiv geladenen Vorläuferions bei m/z 619,267 (¹⁵N-Spezies); **d)** Fragmentationenspektrum des vierfach positiv geladenen Vorläuferions bei m/z 615,030 (¹⁴N/¹⁵N-Spezies und ¹⁵N/¹⁴N-Spezies); ¹⁴N-Aminosäuren sind durch Großbuchstaben und ¹⁵N-Aminosäuren durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Die Fragmentationen des b-Typs sind in blau und die des y-Typs in rot dargestellt. Fragmentationen, die durch eine Umordnung der Aminosäuresequenz („sequence scrambling“) entstanden sind, sind mit einem * versehen.

Durch die datenabhängige Fragmentierung wurden gering abundante Vorläuferionen, wie die der Mischspezies in Abb. 4.15 b teilweise nicht fragmentiert. In diesem Fall wurde das Isotopenmuster des Vorläuferions manuell geprüft und der experimentelle m/z -Wert des Vorläuferions mit dem theoretischen abgeglichen.

Auf diese Weise konnten mit Hilfe von BS²G vier intramolekulare (innerhalb der p53-Monomere oder initialen Dimere) und sieben intermolekulare Cross-Links bei der Analyse des Tetramersignals der SDS-PAGE (Abb. 4.14 Signal D) identifiziert werden. Diese sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die kovalente Verknüpfungsstelle kann nur eindeutig identifiziert werden, wenn entsprechende Fragmentationen detektiert werden. Andernfalls müssen, wie in Tabelle 4.1, mehrfache Angaben bezüglich der möglichen Verknüpfungsstelle gemacht werden. Zusätzlich wurden die möglichen vernetzten Aminosäuren bei Angabe der Sequenzen von α - und β -Peptid hervorgehoben. Bei den in Tabelle 4.1 dargestellten Produkten handelt es sich um einzigartige Cross-Links. Das heißt, es wurden nicht alle Fragmentationenspektren, die einem Cross-Linking-Produkt zugeordnet werden konnten, als individuelle Cross-Links gezählt, sondern die Ergebnisse wurden kombiniert. Hierdurch wurden Redundanzen vermieden, die sich durch die Identifizierung von Cross-Linking-Produkten in verschiedenen Ladungszuständen (z.B. 3+,4+,5+,6+) und/oder mit unterschiedlichen Modifikationen, wie z. B. oxidiertem Methionin, ergäben. Eine komplette Liste der Fragmentationenspektren für die Ergebnisse der Cross-Linking-Experimente mit BS²G ist im Anhang aufgeführt (Tabelle A2). Für die ebenfalls analysierten SDS-PAGE-Proben des p53-Dimers und Trimers wurden identische Produkte identifiziert. Da diese jedoch auch aus dem nicht vollständig kovalent verknüpften Tetramer durch den denaturierenden Charakter der SDS-PAGE-Analyse entstanden sein könnten, lieferten die erhaltenen Ergebnisse keinen verlässlichen Informationsgehalt hinsichtlich der Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularen Cross-Links. Durch die Analyse des p53-Monomers konnten die vier in der Tetramerbande detektierten intramolekularen Cross-Links bestätigt werden. Dies bedeutet, dass die identifizierten Produkte tatsächlich auf intramolekulare Cross-Links zurückzuführen sind und es sich nicht um intermolekulare Verknüpfungen innerhalb eines initialen p53-Dimers handelt.

Tabelle 4.1: Intra- und intermolekulare BS²G-Cross-Links im p53-Tetramer. In einigen Fällen konnte die genaue Verknüpfungsstelle („Cross-Link-Position“) nicht bestimmt werden.

Cross-Link-Position	Intermolekular/ Intramolekular	Aminosäuresequenzen von α - und β -Peptid
K-357 x K-357	Inter	α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³ β ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³
K-357 x K-372/K-373	Inter	α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³ β ³⁷¹ SK <u>K</u> ³⁷³
K-357 x S-366/S-367	Inter	α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³ β ³⁶⁴ AHSS <u>H</u> LK ³⁷⁰
K-357 x K-381	Inter	α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³ β ³⁸⁰ H <u>K</u> K ³⁸²
K-357/S-362 x K-373/S-376/S-378/T-377	Inter	α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGG <u>S</u> R ³⁶³ β ³⁷³ <u>K</u> GQSTSR ³⁷⁹
K-357 x K-373	Inter	α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³ β ³⁸² <u>K</u> LMFK ³⁸⁶
K-372/S-371 x K-370/S366/S-367	Inter	α ³⁶⁴ AHSS <u>H</u> LK <u>S</u> K ³⁷² β ³⁶⁴ AHSS <u>H</u> LK ³⁷⁰
K-357 x K-351	Intra	α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³ β ³⁴⁹ EL <u>K</u> ³⁵¹
S-367/K-370 x K-381	Intra	α ³⁶⁴ AHSS <u>H</u> LK <u>S</u> K ³⁷⁰ β ³⁸⁰ H <u>K</u> K ³⁸²
K-357 x K-320/K-321	Intra	α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³ β ³²⁰ <u>K</u> KPL ³²³
K-386 x S-371/K-372/K-373	Intra	α ³⁸³ LMF <u>K</u> TEGPDSD ³⁹⁴ β ³⁷¹ SK <u>K</u> ³⁷³

4.3.1.2 Auswertung der BuUrBu-Cross-Linking-Daten

Durch die kollisionsinduzierte Spaltbarkeit des neben BS²G verwendeten Cross-Linkers BuUrBu konnten Cross-Linking-Produkte anhand charakteristischer Dublett-Signale in den Fragmentationenspektren unter Verwendung der Software MeroX identifiziert werden (3.2.6) [137]. Die Zuordnung von ¹⁴N-, ¹⁵N- und, im Falle intermolekularer Cross-Links, ¹⁴N/¹⁵N- und ¹⁵N/¹⁴N-Spezies in den entsprechenden Massenspektren wurde (wie im Falle der BS²G-Daten) manuell durchgeführt (4.3.1.1). Als charakteristisches Beispiel wurde wiederum das intermolekulare Cross-Linking-Produkt zwischen den Lysinresten K-357 der Peptide DAQAGKEPPGSR aus zwei unterschiedlichen p53-Monomeren ausgewählt. Dies unterstreicht die Reproduzierbarkeit der Cross-Linking-Experimente mit verschiedenen homobifunktionellen, aminreaktiven Reagenzien für p53. Dieses Cross-Linking-Produkt wurde anhand des charakteristischen Isotopenmusters der dreifach positiv geladenen Spezies, bestehend aus den Signalen bei m/z 847,409 (¹⁴N/¹⁴N), m/z 853,058 (¹⁴N/¹⁵N und ¹⁵N/¹⁴N) und m/z 858,708 (¹⁵N/¹⁵N) identifiziert (Anhang Abb. A8 c). Die Fragmentierung der reinen ¹⁴N- und ¹⁵N-Spezies (m/z 847,409 respektive 858,708) führte zu identischen Fragmentierungsmustern und charakteristischen Massendifferenzen identischer Fragmentionen, entsprechend ihrer Anzahl, an Stickstoffatomen (Anhang Abb. A9 a und b). Die Fragmentierung der gemischten Spezies bei m/z 853,058 (¹⁴N/¹⁵N und ¹⁵N/¹⁴N) bewies, dass es sich um einen intermolekularen Cross-Link handelt (Anhang Abb. A9 c). Zusätzlich wird das Auftreten charakteristischer Fragmentionen-Dubletts beobachtet, die auf eine Spaltung des Cross-Linkers an der zentralen Harnstofffunktion zurückzuführen sind (Abb. 1.11). Dabei entstehen idealerweise zwei Dubletts, eines für das α -Peptid und ein analoges für das β -Peptid. Zusätzlich können diese Dupletts ebenfalls für Fragmentionen des Proteinrückgrates auftreten, wie im Falle von $[y_8\alpha/\beta\text{Bu}]^+$ und $[y_8\alpha/\beta\text{BuUr}]^+$ (Anhang Abb. A9 c). Diese Fragmentionenspezies entstehen, wenn neben dem Bruch des Cross-Linkers eine Fragmentierung des Proteinrückgrates auftritt.

So konnten mit Hilfe von BuUrBu 13 intramolekulare und neun intermolekulare Cross-Linking-Produkte für die Analyse der Tetramerbande aus der SDS-PAGE (Abb. 4.14 Signal D) identifiziert werden. Diese sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die Ergebnisse wurden, wie bereits für die Experimente mit BS²G beschrieben (4.3.1.1; Tabelle 4.1), zu einzigartigen Cross-Links zusammengefasst. Eine vollständige Liste der Ergebnisse der Cross-Linking-Experimente mit BuUrBu, welche ebenfalls die Analysen des Monomers, Dimers und Trimers enthalten, sind im Anhang aufgeführt (Tabelle A3 und DVD-

ROM). Die intramolekularen Cross-Linking-Produkte der Experimente mit BS²G konnten zu einem großen Teil reproduziert werden.

Die intermolekularen Cross-Links, die mit BS²G identifiziert wurden, konnten ebenfalls fast vollständig reproduziert werden. Eine Ausnahme stellte das in 4.3.1.1 identifizierte Produkt zwischen dem α -Peptid AHSSHLKSK und dem β -Peptid AHS-SHLK mit partiell identischer Sequenz dar. Hier konnte keine eindeutige Identifizierung der Reaktionsstellen erhalten werden (Tabelle 4.1). Da bei der Analyse der BuUrBu-Daten Hydroxylfunktion-enthaltende Aminosäuren (Ser, Thr, und Tyr) als Reaktionsstellen ausgeschlossen wurden, ist es wahrscheinlich, dass in diesem Fall mindestens ein Serin an der Ausbildung des Cross-Links beteiligt war (4.3.1.1). Im Vergleich zu den BS²G-Experimenten konnten unter Verwendung von BuUrBu drei zusätzliche einzigartige Cross-Links identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Cross-Links zwischen K-373 und K-370, K-374 und K-382 oder K-386 sowie zwischen K-373 und K-319 bzw. K-320 (Tab. 4.2)

Tabelle 4.2: Intra- und intermolekulare einzigartige BuUrBu-Cross-Links im p53-Tetramer. In einigen Fällen konnte die genaue Verknüpfungsstelle („Cross-Link-Position“) nicht bestimmt werden. **Identische Cross-Links wurden ebenfalls in Anwesenheit von RE-DNA erhalten.**

Cross-Link-Position	Intermolekular/ Intramolekular	Aminosäuresequenzen von α - und β -Peptid
K-291/K-292 x K-374	intra	β ²⁹¹ KKGEPHH ²⁹⁷ α ³⁷⁴ KGQSTSR ³⁷⁹
K-320/K-321 x K-357	intra	β ³²⁰ KKPL ³²³ α ³⁵² DAQAGKEPGGSR ³⁶³
K-357 x K-319/K-320	intra	β ³⁵² DAQAGKEPGGSR ³⁶³ α ³⁰⁶ (R)ALPNNTSSSPQPKK ³²⁰
K-372/K-373 x K-319/K-320	intra	β ³⁷¹ SKK ³⁷³ α ³⁰⁶ RALPNNTSSSPQPKK ³²⁰
K-370K-372 x K-357	intra	β ³⁶⁴ AHSSHLK(SK) ³⁷² α ³⁵² DAQAGKEPGGSR ³⁶³
K-382/K-386 x K-357	intra	β ³⁸² KLMFK ³⁸⁶ α ³⁵² DAQAGKEPGGSR ³⁶³
K-372/K-373 x K-370	intra	β ³⁷¹ SKK ³⁷³ α ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰
K-381/K-382 x K-370/K-372	intra	β ³⁸⁰ HKK ³⁸² α ³⁶⁴ AHSSHLKSK ³⁷²

Cross-Link-Position	Intermolekular/ Intramolekular	Aminosäuresequenzen von α - und β -Peptid
K-374 x K-370/K-372	intra	β ³⁷⁴ <u>K</u> GQSTSR ³⁷⁹ α ³⁶⁴ AHSSHL <u>KSK</u> ³⁷²
K-381/K-382 x K-372/K-373	intra	β ³⁸⁰ <u>HKK</u> ³⁸² α ³⁷¹ <u>SKK</u> GQSTSR ³⁷⁹
K-372/K-373 K-382/K-386	intra	β ³⁷¹ <u>SKK</u> ³⁷³ α ³⁸² <u>KLMFK</u> ³⁸⁶
K-372/K-373 x K-386	intra	β ³⁷¹ <u>SKK</u> ³⁷³ α ³⁸³ <u>LMFK</u> TEGPDS ³⁹⁴
K-373 x K-386	intra	β ³⁷³ <u>K</u> GQSTSR ³⁷⁹ α ³⁸³ <u>LMFK</u> TEGPDS ³⁹⁴
K-381/K-382 x K-386	inter	β ³⁸⁰ <u>HKK</u> ³⁸² α ³⁸³ <u>LMFK</u> TEGPDS ³⁹⁴
K-357 x K-357	inter	β ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³ α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³
K-373 x K-319/K-320	inter	β ³⁷³ <u>K</u> GQSTSR ³⁷⁹ α ³⁰⁷ ALPNNTSSSPQ <u>PKK</u> ³²⁰
K-372/K-373 x K-357	inter	β ³⁷¹ <u>SKK</u> ³⁷³ α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³
K-381/K-382 x K-357	inter	β ³⁸⁰ <u>HKK</u> ³⁸² α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³
K-373 x K-357	inter	β ³⁷³ <u>K</u> GQSTSR ³⁷⁹ α ³⁵² DAQAG <u>K</u> EPGGSR ³⁶³
K-372/K-373 x K-370 K-372	inter	β ³⁷¹ <u>SKK</u> ³⁷³ α ³⁶⁴ AHSSHL <u>KSK</u> ³⁷²
K-373 x K-370	inter	β ³⁷³ <u>K</u> GQSTSR ³⁷⁹ α ³⁶⁴ AHSSHL <u>K</u> ³⁷⁰
K-382/K-386 x K-374	inter	β ³⁸² <u>KLMFK</u> ³⁸⁶ α ³⁷⁴ <u>K</u> GQSTSR ³⁷⁹

4.3.1.3 Struktur des p53-Tetramers im DNA-freien Zustand

Da bisher lediglich zwei wesentliche Modelle des Volllängen-p53-Tetramers existieren (1.4), tragen alle hier erhaltenen Strukturdaten zur Verfeinerung dieser Modelle bei. Eines dieser Modelle beruht auf Kryo-EM Daten, das andere wurde durch die Kombination verschiedener Methoden, wie SAXS, Kryo-EM und Molekulare Modellierung mit Hilfe etablierter NMR- und Röntgenkristall-Strukturen einzelner p53-Domänen (DBD, Tet.) [98, 99] erhalten. Bei ersterem Modell sind die postulierten Strukturen für DNA-

freies- und des DNA-gebundenen-p53-Tetramer sehr ähnlich, bei dem zweiten Modell unterscheiden sie sich stark voneinander. In dieser Arbeit wird hauptsächlich auf das von Tidow *et al.* postulierte Modell eingegangen [98]. Die Koordinaten dieses Struktur-Modelles wurden von Prof. Dr. Henning Tidow (Fachbereich Chemie, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt. Das Modell des p53-Homotetramers zeichnet sich im DNA-freien-Zustand durch eine ausgedehnte kreuzähnliche Struktur aus (Abb. 4.17).

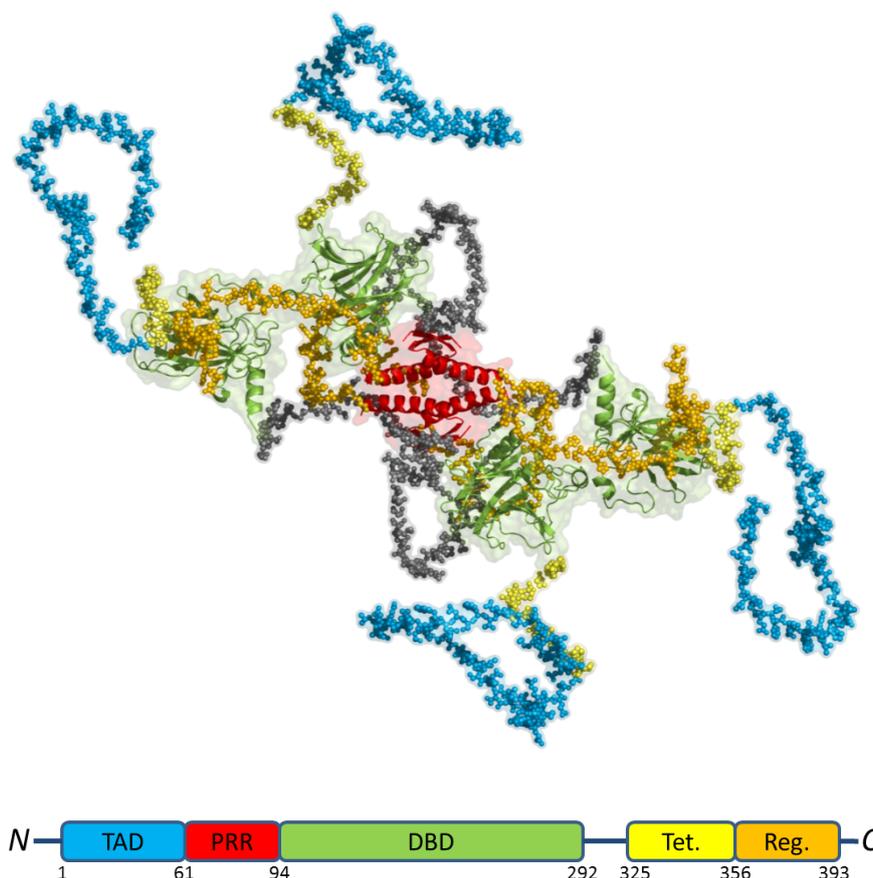


Abb. 4.17: Strukturmodell des p53-Tetramers im DNA-freien Zustand, basierend auf den Daten von Tidow *et al.* [98] Oben: Darstellung der kreuzartigen Struktur des p53-Tetramer-Modelles. Die bereits strukturell aufgeklärten Domänen sind in „Cartoon-Darstellung“, die ungeordneten, modellierten Domänen in „Sphere-Darstellung“ abgebildet. Die Farbgebung von Transaktivierungsdomäne (TAD), Prolin-reiche-Region (PRR), DNA-Bindedomäne (DBD), ungeordnetem Linker (L), Tetramerisierungsdomäne (Tet.) und regulatorischer Domäne (Reg.) entspricht der schematischen Darstellung des p53-Monomers (unten).

Die in den Tabellen 4.1 und 4.2 aufgeführten Cross-Linking-Ergebnisse wurden verwendet, um mit Hilfe des von Tidow *et al.* publizierten p53-Tetramermodelles im DNA-freien Zustand Distanzbestimmungen durchzuführen (Abb. 4.19, Anhang Abb. A10 und A11). Dabei wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die wahrschein-

lichsten Verknüpfungsstellen eingezeichnet, die die Lysine der verknüpften Peptide darstellen. Mögliche Serin- oder Threonin-Verknüpfungsstellen wurden vernachlässigt. Die verwendete Cross-Linker BS²G und BuUrBu können unter Berücksichtigung der *Spacer*-Länge (BS²G = 7,7 Å; BuUrBu = 12,5 Å) und der Länge der Seitenketten von Lysinen (6-6,5 Å) einen maximalen C_α-C_α-Abstand von ~ 25 Å für BS²G respektive 32 Å für BuUrBu überbrücken. Durch Beachtung der Flexibilität der Tertiärstruktur von p53 und der Annahme einer beweglichen Assoziation zweier p53-Dimere im Tetramer kann dieser Abstand auf ca. 30 Å für BS²G bzw. 40 Å für BuUrBu erhöht werden.

Intramolekulare Verknüpfungen wurden nur für BS²G-Cross-Links und nur für zwei monomere Untereinheiten des p53-Tetramers eingezeichnet (Anhang Abb. A10 und A11). Die erhaltenen Distanzen für intramolekulare BS²G-Cross-Links liegen bis auf eine Ausnahme (Anhang Abb. A10; 37,9 Å) in diesem Bereich. Demzufolge würden die erhaltenen Cross-Linking-Daten gut mit dem bereits bestehenden Modell übereinstimmen. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass aufgrund des Tetramerisierungsverhaltens von p53 (4.2) auch mithilfe der Isotopenmarkierung nicht eindeutig zwischen intramolekularen Cross-Links innerhalb eines Monomers und intermolekularen Verknüpfungen zwischen zwei Monomeren eines initialen Dimers diskriminiert werden kann. Hierdurch kann möglicherweise auch der Cross-Link erklärt werden, der im Monomer einer Distanz von 37,9 Å entspräche. Auf Distanzbestimmungen der intramolekularen BuUrBu-Cross-Links wurde aufgrund der nicht eindeutigen Differenzierbarkeit verzichtet.

Die intermolekularen Distanzen (C_α-C_α) wurden der Übersichtlichkeit halber nur zwischen zwei Monomeren bestimmt (Abb. 4.18, 4.19 und Anhang Abb. A11). Diese wurden so gewählt, dass sie in Bezug auf das verwendete Modell nicht zu einem initialen p53-Dimer gehörten, da andernfalls keine Mischspezies detektierbar gewesen wären (4.2). Die Auswahl dieser Monomere erfolgte unter Beachtung des in der Literatur beschriebenen Tetramerisierungsverhaltens des p53 anhand der NMR-Struktur der Tetramerisierungsdomäne [78]. Ein als intermolekular identifizierter Cross-Link zwischen zwei Lysinen K-357 wies im Struktur-Modell von Tidow *et al.* [98] eine C_α-C_α-Distanz auf, welche mit 23,3 Å im überbrückbaren Abstand für BS²G und BuUrBu liegt (Tabelle 4.1 und 4.2). Das Vorläuferionenspektrum und die entsprechenden Fragmentionenspektren dieses Cross-Links sind in Abb. 4.16 und im Anhang Abbildung A9 dargestellt. Durch die Verknüpfung identischer Sequenzen konnte dieser Cross-Link als ausschließlich intermolekular charakterisiert werden. Der Cross-Link ist in der Tetrameri-

sierungsdomäne lokalisiert und bestätigt, in Kombination mit zwei intramolekularen BS²G-Cross-Links (K-320/K321 x K357 und K-351 x K-357, Tabelle 4.1), die NMR-Struktur des Tetramers der p53-Tetramerisierungsdomäne von Clore *et al.* (Abb. 4.18) [78]. Hier weisen die gemessenen C_α-C_α-Abstände geringe Abweichungen im Vergleich zum Modell von Tidow *et al.* auf, für dessen Erstellung eine höher aufgelöste Röntgenkristallstruktur verwendet wurde [77].

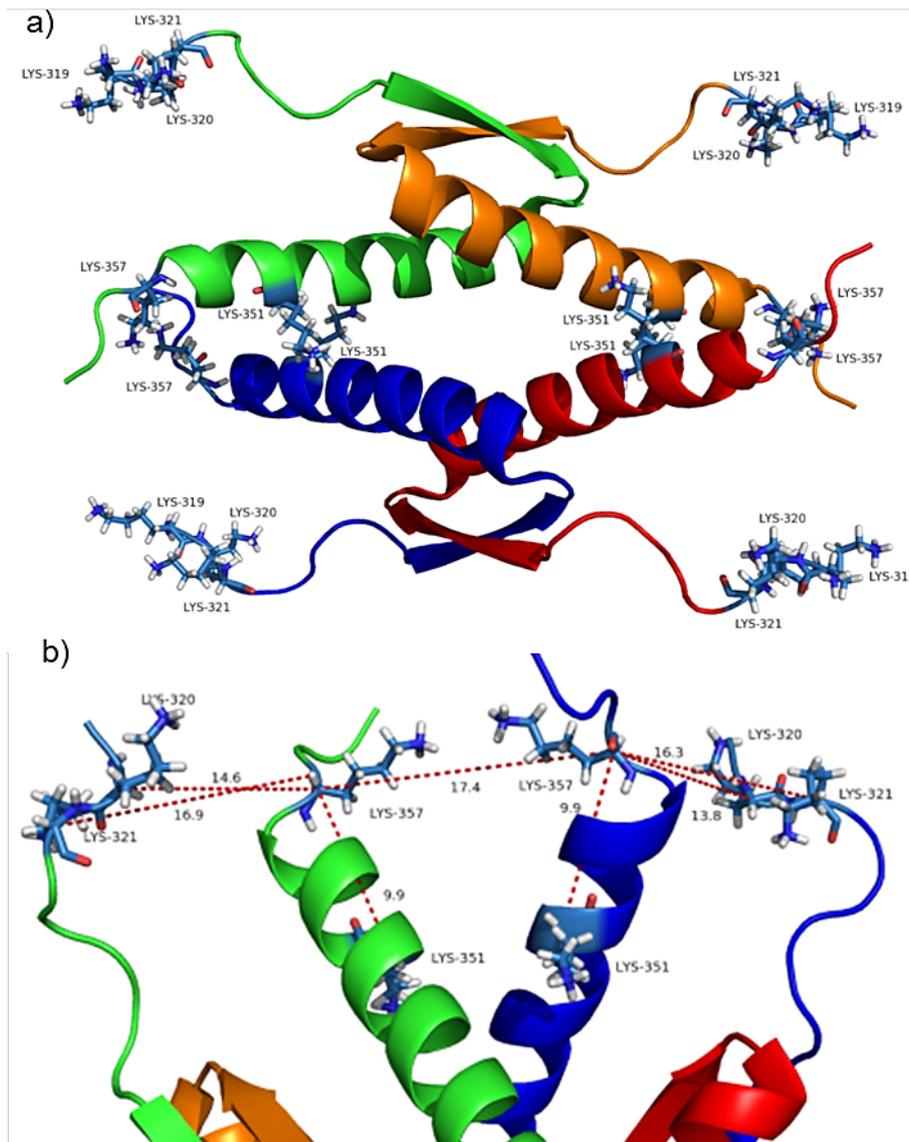


Abb. 4.18: Kennzeichnung von BS²G-Cross-Links innerhalb der NMR-Struktur der tetrameren p53-Tetramerisierungsdomäne (PDB: 1OLG). **a)** Tetramer der Tetramerisierungsdomäne in „Cartoon-Darstellung“. Die Färbung variiert je nach Monomer. **b)** Distanzbestimmung des intermolekularen (K-357 x K357) und intramolekularen (K-320/K-321 x K-357; K-351 x K-357) Cross-Links (Tabelle 4.1). Lysine sind in „Stick-Darstellung“ hervorgehoben, Cross-Links sind als Linien (rot) eingezeichnet und die entsprechenden C_α-C_α-Distanzen sind in Å angegeben.

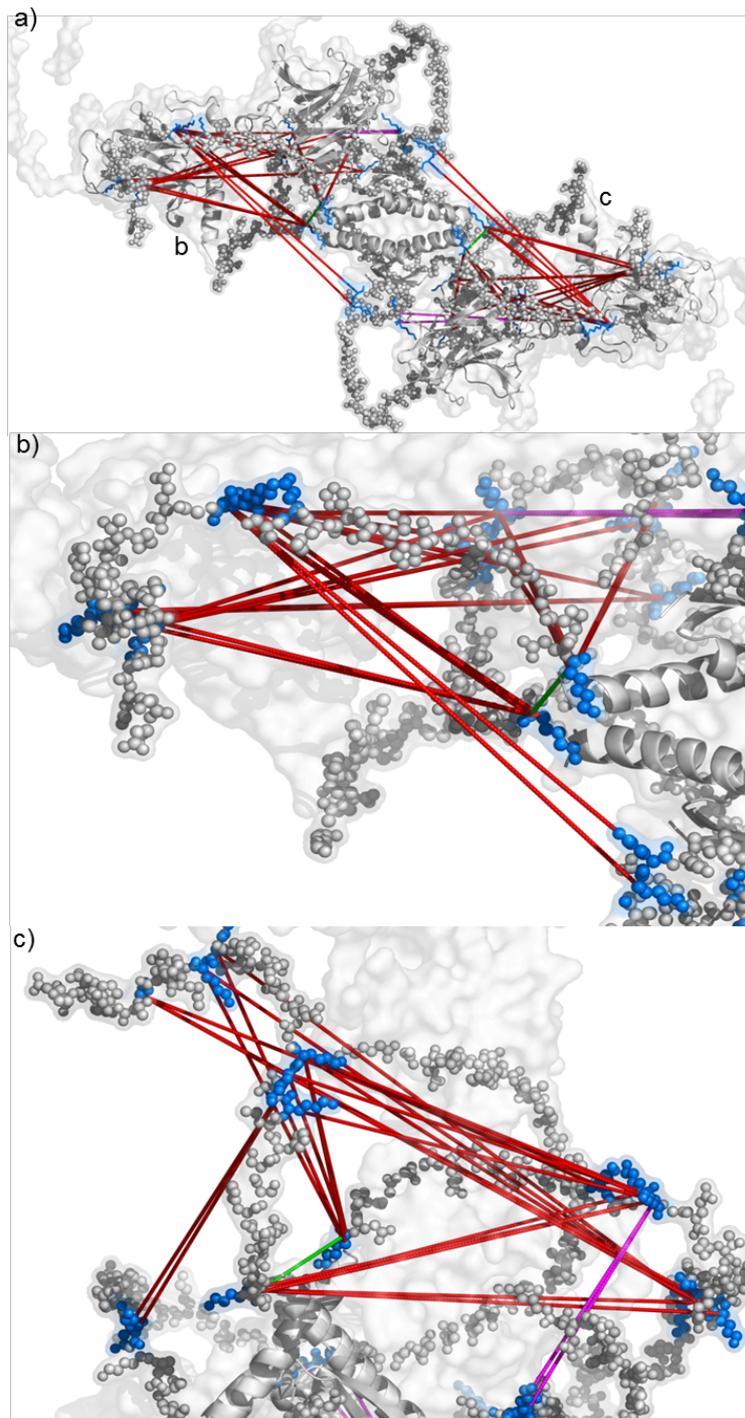


Abb. 4.19: Darstellung der BuUrBu-Cross-Links anhand des Strukturmodells des p53-Tetramers im DNA-freien Zustand von Tidow et al.[98]. b) und c) zeigen die in a) markierten Bereiche als vergrößerte Darstellung. Die jeweiligen Cross-Links sind als Linien dargestellt und je nach Maximaldistanz eingefärbt: bis 32 Å in grün; bis 40 Å in magenta und über 40 Å in rot. Tetramerisierungsdomänen und DNA-Bindedomänen sind in „Cartoon-Darstellung“ IDR sind in „Sphere-Darstellung“ abgebildet; Reaktionsstellen sind blau eingefärbt.

Alle weiteren intermolekularen Cross-Links weisen im Modell von Tidow *et al.* C_{α} - C_{α} Distanzen von bis zu 100 Å auf (Abb 4.19 und Anhang Abb. A11). Diese befinden sich fast ausschließlich in der regulatorischen Domäne. Demzufolge ist die räumliche Anordnung der C-terminalen, regulatorischen Domäne (Abb. 4.17 orange, „Sphere-Darstellung“) im verwendeten Modell nicht mit dem Ergebnis der Cross-Linking-Experimente vereinbar. Diese deuten auf eine kompaktere Struktur als die im Modell postulierte hin.

4.3.2 Cross-Linking-Experimente in Anwesenheit von Response Element-DNA

Die Cross-Linking-Experimente mit p53 in Anwesenheit von RE-DNA wurden mit Hilfe des homobifunktionellen, aminreaktiven BuUrBu zur Analyse der C-terminalen Region (Tet. und reg. Domäne) durchgeführt (3.2.4.1). Durch die gewonnen Erkenntnisse in Abwesenheit von DNA wurde auf die Verwendung von BS²G verzichtet, da mit diesem Reagenz in Abwesenheit von DNA im Vergleich zu BuUrBu keine zusätzlichen Erkenntnisse erhalten wurden. Um strukturelle Informationen bezüglich der N-terminalen Region (TAD, PRR), die viele saure Aminosäuren (Glu und Asp) enthält, zu erhalten, sollte der carboxylreaktive Cross-Linker Suberinsäure-1,8-dihydrazid (SDH; Anhang Abb. A12) eingesetzt werden. Dafür war eine Aktivierung der Carboxylgruppen von sauren Aminosäureresten, wie Glutamat und Aspartat, notwendig. Die Aktivierung sollte mit Hilfe des Kopplungsreagenzes DMTMM durchgeführt werden, welches Carboxyl- und Amingruppen kovalent miteinander verknüpft. Aus diesem Grunde wurden Vorversuche mit DMTMM durchgeführt. Die Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularen Cross-Links im p53-Tetramer erfolgte wiederum mittels Isotopenmarkierung (4.3.1.). Nach erfolgter Reaktion wurden die Reaktionsansätze mittels eindimensionaler SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.20). Die SDS-PAGE-Analysen der Cross-Linking-Reaktionen von p53 mit BuUrBu und DMTMM in Anwesenheit von RE-DNA lieferten identische Ergebnisse wie in Abwesenheit von RE-DNA (Abb. 4.14 und 4.20). Die mittels SDS-PAGE detektierten Signale konnten den monomeren, dimeren, trimeren und tetrameren p53-Spezies zugeordnet werden (Abb. 4.20). Für die Bildung eines mittels Coomassie-Färbung detektierbaren Cross-Linking-Produktes musste ein 8000-facher molarer Überschuss des Kopplungsreagenzes DMTMM verwendet werden (80 mM; Abb. 4.20 b). Der verwendete molare Überschuss an BuUrBu (50- und 100-fach) entsprach dem, der für die Reaktionen in Abwesenheit von RE-DNA eingesetzt wurde.

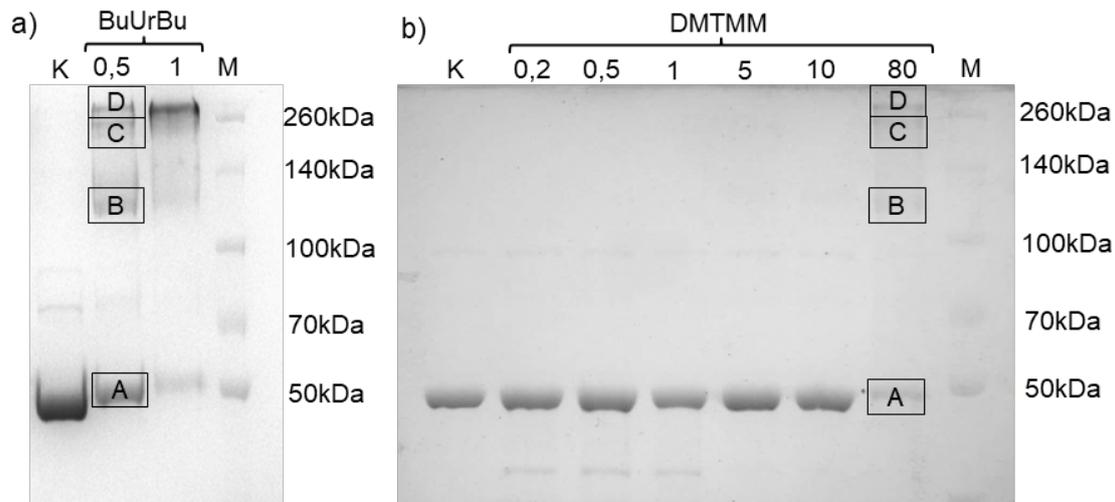


Abb. 4.20: Eindimensionale SDS-PAGE der p53 Cross-Linking-Reaktionsansätze in Anwesenheit von RE-DNA: Ergebnisse der Gelelektrophorese der Cross-Linking-Reaktionen mit a) BuUrBu und b) DMTMM. Es wurden 10%ige SDS-Gele verwendet. Die Spuren sind mit den Konzentrationen an verwendeten Cross-Linker in mM gekennzeichnet. Zusätzlich wurde jeweils eine Kontrolle für $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -p53 ohne Cross-Linker aufgetragen. Die Reaktionszeit betrug jeweils 30 min bei 4 °C. M = Proteinstandard, Monomer (A), Dimer (B), Trimer (C), Tetramer (D)

4.3.2.1 „Native“ Cross-Linking-Massenspektrometrie

Da die Analyse mittels SDS-PAGE keine Aussage über den DNA-Bindungszustand nach erfolgter Cross-Linking-Reaktion zuließ, wurde eine Abwandlung der nativen MS entwickelt. Hierbei wurden den Cross-Linking-Reaktionsansätzen nach Abstoppen der Reaktion Proben entnommen und diese für die native MS vorbereitet (3.2.5.2). Anschließend wurden Massenspektren an einem High-Mass Q-TOF II-Massenspektrometer aufgezeichnet. Diese Methode kann als „**native**“ **Cross-Linking-Massenspektrometrie (native XL-MS)** bezeichnet werden und wurde im Zuge dieser Arbeit erstmalig verwendet. Cross-Linking-Reaktionen mit variierenden molaren Überschüssen an DMTMM und BuUrBu wurden durchgeführt und analysiert, um die Methode zu validieren. Reaktionszeit und -temperatur wurden konstant gehalten (30 min, 4 °C) und nur nicht-markiertes p53 wurde verwendet. Für den Cross-Linker BuUrBu wurden 5-, 10-, 20-, 50- und 100-fache molare Überschüsse verwendet für DMTMM 20-, 50-, 100-, 500-, 1000- und 8000-fache molare Überschüsse. Diese Werte wurden anhand von Vorversuchen etabliert. Eine Auswahl von „nativen“ Cross-Linking-Massenspektren unter Verwendung von BuUrBu ist in Abbildung 4.21 a dargestellt.

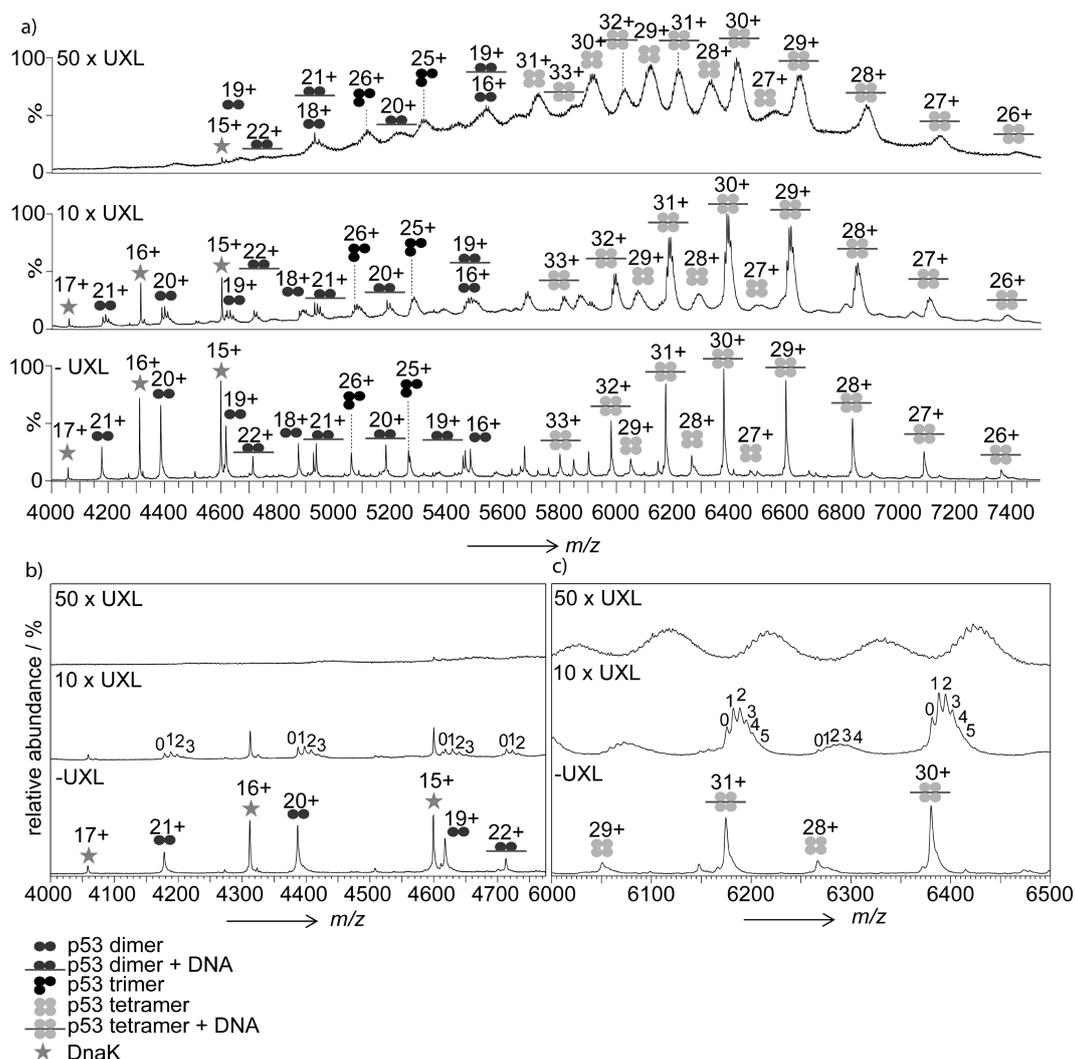


Abb. 4.21: „Native“ XL-MS-Analyse von p53 in Anwesenheit von RE-DNA. **a)** Verwendung eines ansteigenden molaren Überschusses von BuUrBu (UXL). **b)** Vergrößerung des m/z -Bereiches von 4000-4800, in dem Signale für das p53-Dimer und DnaK zu finden sind; **c)** Vergrößerung des m/z -Bereiches von 6000-6500 mit Signalen für das p53-Tetramer (\pm DNA). Als Lösungsmittel wurde 500 mM Ammoniumacetat (pH 6,8) verwendet. Alle Spektren wurden an einem High-Mass Q-TOF II-Gerät unter identischen Bedingungen aufgenommen. Abbildung entnommen aus [146].

Hier konnte im Vergleich zu unmodifiziertem p53 eine deutliche Signalverbreiterung und -verschiebung zu höheren m/z -Werten beobachtet werden, was auf die Anwesenheit gleicher p53-Spezies in verschiedenen Modifikationsstufen hindeutet. Beispielsweise konnte die 31-fach positiv geladene, DNA-gebundene, tetramere p53-Ionenspezies bei 10-fachen molaren Überschusses an BuUrBu in sechs verschiedenen Modifikationsstufen von nicht-modifiziert (m/z 6180) bis zu fünfmal-modifiziert (m/z 6212) detektiert werden (Abb. 4.21 c). Die Signalbasisbreite änderte sich von 15 u in Abwesenheit des Cross-Linking-Reagenzes zu 45 u nach der Reaktion mit einem 10-

fachen molaren Überschuss an BuUrBu. Bei einem 50-fachen molaren Überschuss war keine Unterscheidung der einzelnen Modifikationsstufen von p53 mehr möglich. Es wurden lediglich stark verbreiterte Signale (110 u, Basisbreite) der jeweiligen Ladungszustände beobachtet (Abb. 4.21 c). Nach Reaktion mit 100-fachem molaren Überschuss an BuUrBu konnte mittels „nativer“ XL-MS weder zwischen den tetrameren Spezies von p53 (\pm DNA), noch zwischen ihren Ladungszuständen, unterschieden werden.

Wie aus Abbildung 4.21 ersichtlich, bleibt die Fähigkeit zur DNA-Bindung des vorliegenden p53-Tetramers (26 bis 33 fach positiv geladen, m/z 5800-7400) sowie des p53-Dimers (19 bis 22 fach positiv geladen, m/z 4710-5450) bei 10- und 50-fachem molarem Überschuss an BuUrBu nahezu unbeeinflusst. Demzufolge waren die Cross-Linking-Experimente mit BuUrBu geeignet, um in Strukturinformationen des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand zu liefern.

Die „native“ XL-MS-Analyse der Reaktionsansätze mit DMTMM erbrachte analoge Ergebnisse hinsichtlich der Signalverbreiterung und Verschiebung der Signale zu höheren m/z -Werten (Abb. 4.22 a). Dabei wurde bei einem 50-fachem molarem Überschuss von DMTMM 0- bis 5-fach modifiziertes 20-fach positiv geladenes p53-Dimer (m/z 4390-4445) und bei einem 500-fachem Überschuss 2- bis 6-fach modifiziertes 20-fach positiv geladenes p53-Dimer detektiert (Abb. 4.22 b, m/z 4400-4450). Die Anzahl an Modifikationen des p53-Tetramers konnte aufgrund unzureichender Auflösung der entsprechenden Signale nicht bestimmt werden (Abb. 4.22 c). Zusätzlich wurde durch die Reaktion mit DMTMM eine deutliche Verringerung der relativen Signalintensitäten des DNA-gebundenen p53-Tetramers beobachtet, welche für unmodifiziertes p53 die abundanteste Spezies im nativen Massenspektrum darstellt (Abb. 4.22 a). So konnte das Signal des 31-fach positiv geladenen DNA-gebundenen p53-Tetramers (m/z 6180) bei einem 50-fachen Überschuss an DMTMM gerade noch detektiert werden, während bei einem 500-fachen Überschuss DNA-gebundenes p53-Tetramer nicht mehr detektierbar war (Abb. 4.22 c). Das 20-fach positive geladene DNA-gebundene p53-Dimer (Abb. 4.22 a, m/z 5190) konnte allerdings weiterhin detektiert werden. Für das DNA-gebundene p53-Dimer wurde eine Verschiebung der Ladungsverteilung von 19- bis 22-fach positiv geladen (m/z 4710-5450) ohne Cross-Linker zu 18- bis 20-fach positiv geladen (m/z 5200-5625) bei einem 500-fachen Überschuss an DMTMM beobachtet (Abb. 4.22 a).

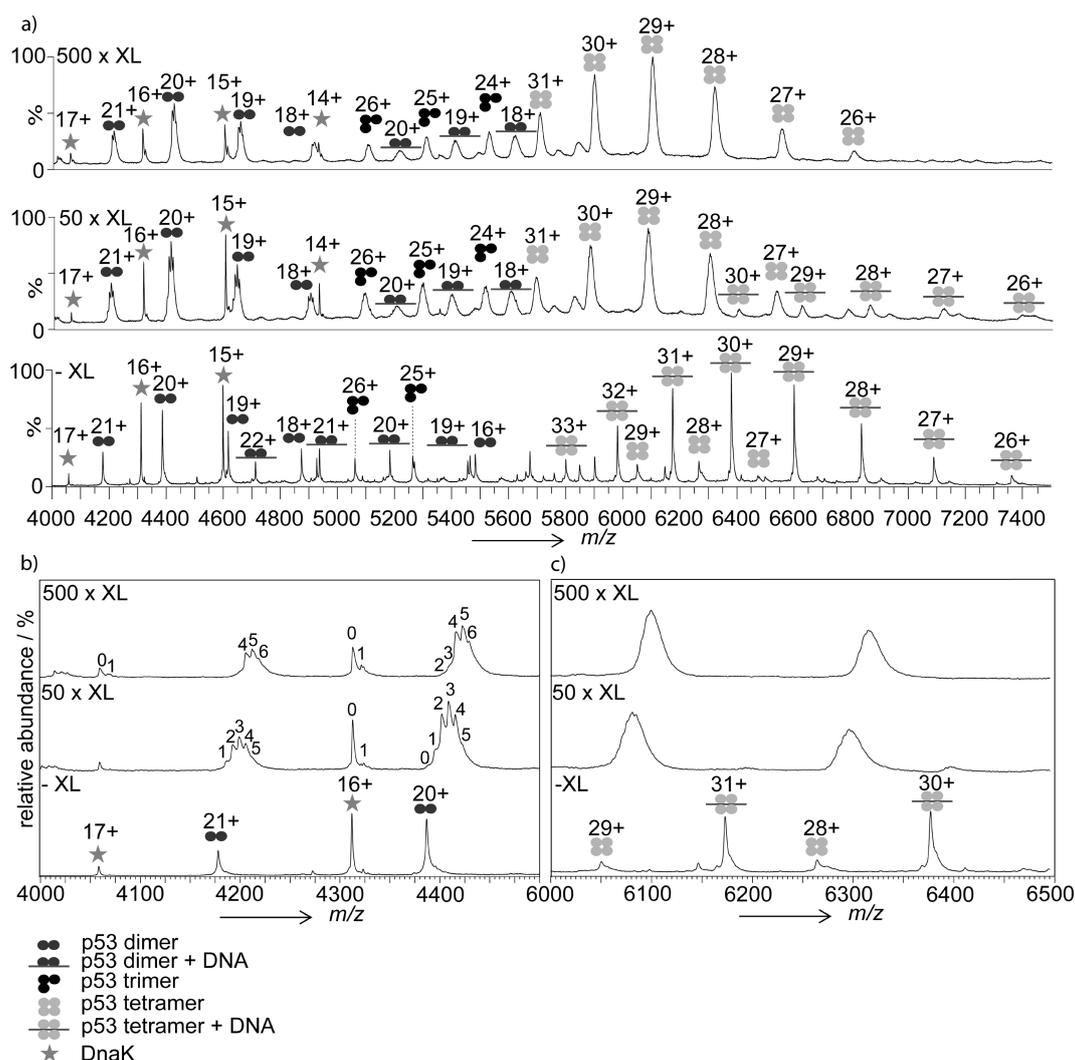


Abb. 4.22: „Native“ XL-MS von p53 in Anwesenheit von RE-DNA. Verwendung eines ansteigenden molaren Überschusses des Cross-Linkers DMTMM (XL). **b)** Vergrößerung des m/z -Bereiches von 4000-4800, in dem Signale für das p53-Dimer und DnaK zu finden sind; **c)** Vergrößerung des m/z -Bereiches von 6000-6500 mit Signalen für das p53-Tetramer (\pm DNA). Als Lösungsmittel wurde 500 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 6,8) verwendet. Die Spektren wurden an einem High-Mass Q-TOF II-Gerät unter identischen Bedingungen aufgenommen. Abbildung entnommen aus [146].

Beim Vergleich der „nativen“ XL-MS-Analysen zeigen sich für die Cross-Linker BuUrBu und DMTMM zusätzliche Unterschiede. So wurde mit ansteigendem molarem Überschuss an BuUrBu zunehmend DNA-freies p53-Tetramer angereichert (Abb. 4.21 a), während mit DMTMM die relativen Signalintensitäten der p53-Dimer- und -Tetramersignale für die verschiedenen Linkerüberschüsse nahezu konstant sind (Abb. 4.22 a). Diese Beobachtung korreliert ebenfalls mit den SDS-PAGE-Analysen der entsprechenden Cross-Linking-Experimente (Abb. 4.20). Die Fähigkeit zur DNA-Bindung des p53-Tetramers ging augenscheinlich durch die Modifikation mit DMTMM

verloren. Demzufolge wurde auf eine Auswertung der Cross-Linking-Daten mit DMTMM und aufweiterführende Experimente mit SDH verzichtet. Eine Abbildung der Spektren für diese Versuchsreihen sind im Anhang zu finden (Abb. A13 und A14).

4.3.2.2 Struktur des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand

Die Analyse der Cross-Linking-Experimente von DNA-gebundenem p53 mit BuUrBu erfolgte wie bereits in 4.3.1.3 für DNA-freies p53 beschrieben. Interessanterweise wurden für das DNA-gebundene p53-Tetramer identische Cross-Linking-Produkte wie für das DNA-freie identifiziert (Tabelle 4.2 und Anhang Tabelle A3). Diese wurden verwendet, um Distanzbestimmungen im Modell des DNA-gebundenen p53-Tetramer Modelles durchzuführen, welches in der gleichen Studie von Tidow *et al.* postuliert wurde (Abb. 4.23) [98].

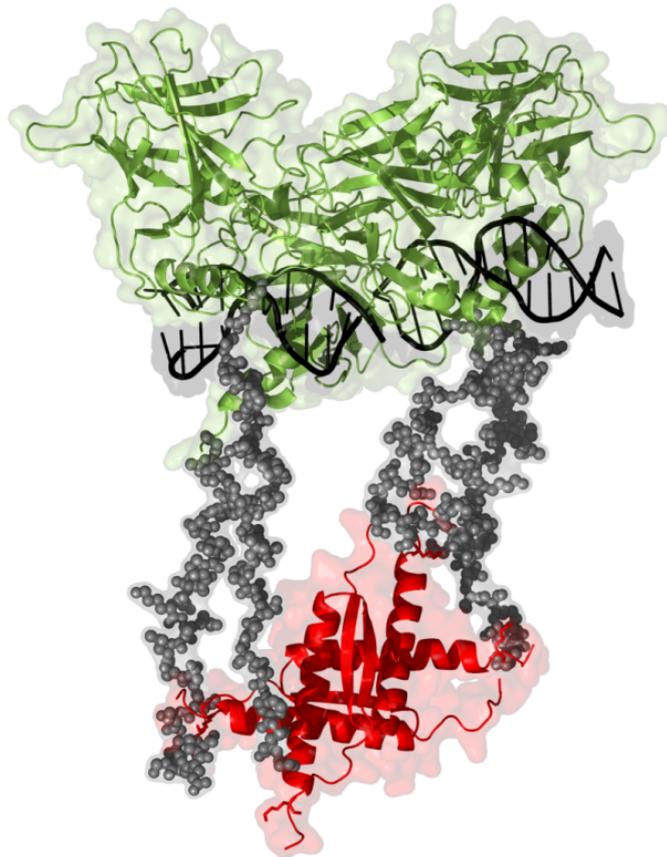


Abb. 4.23: Strukturmodell des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand von Tidow *et al* [98]. Die bereits strukturell aufgeklärten Domänen sind in „Cartoon-Darstellung“ und die ungeordneten, modellierten Domänen in „Sphere-Darstellung“ abgebildet. DNA-Bindedomäne (grün), ungeordneter Linker (grau), Tetramerisierungsdomäne (rot). Transaktivierungsdomäne, Prolin-reiche Region und regulatorische Domäne fehlen.

Durch das Fehlen der regulatorischen Domäne im Strukturmodell des p53-Tetrameres im DNA-gebundenen Zustand, konnte nur für einen Teil der ermittelten intramolekularen und intermolekularen Cross-Links Distanzbestimmungen durchgeführt werden (Abb. 4.24). Die intramolekularen Distanzen (orange) liegen mit einer maximalen Länge (C_{α} - C_{α}) von 20,8 Å ebenso wie die intermolekularen Verknüpfungen (magenta, 20,7 Å) deutlich unterhalb der von BuUrBu überbrückbaren Distanz von bis zu 40 Å. Somit stimmt das Strukturmodell [98] gut mit den experimentellen Daten überein. Alle weiteren Cross-Links der regulatorischen Domäne sind in Abb. 4.24 schematisch dargestellt.

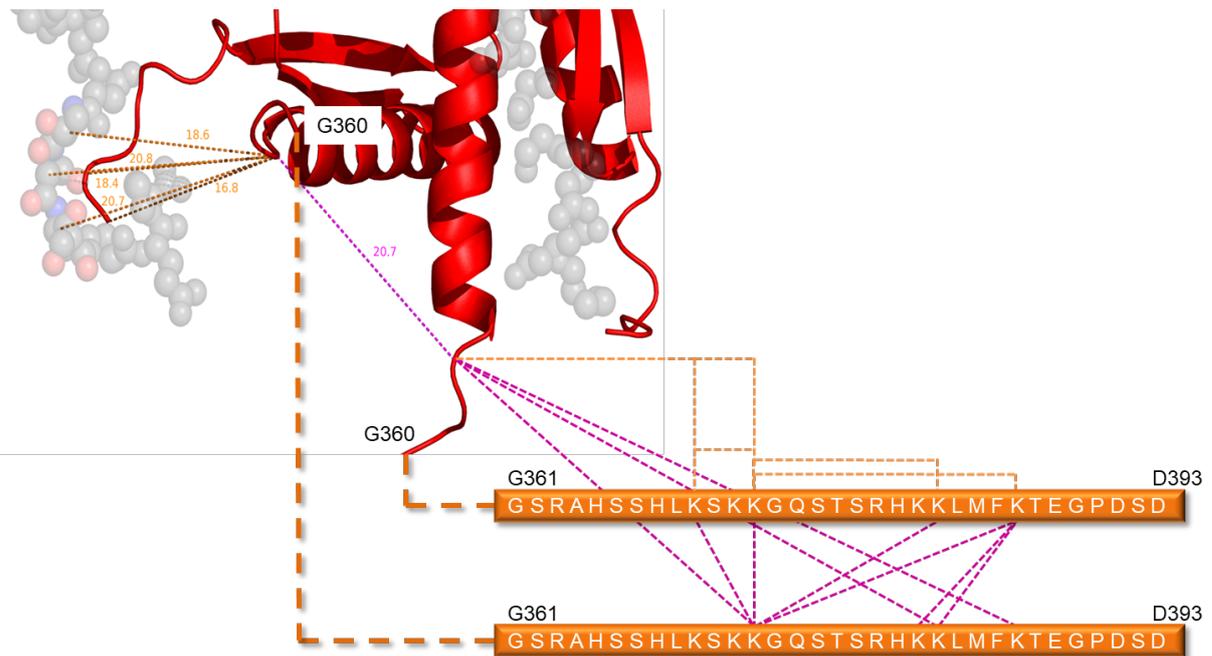


Abb. 4.24: *Erweiterte schematische Darstellung der Cross-Linking-Ergebnisse mit BuUrBu für das p53-Tetramer im DNA-gebundenen Zustand von Tidow et al.[98]* Ein Bereich des Strukturmodells (Abb 4.23), in der der ungeordneter Linker (grau) und die Tetramerisierungsdomäne (rot) enthalten sind, wurde vergrößert dargestellt und die regulatorischen Domänen zweier p53-Monomere wurden schematisch weitergeführt. Die jeweiligen intramolekularen (orange) und intermolekularen (magenta) Cross-Links sind als Linien dargestellt. Gemessene Distanzen sind in Å angegeben.

Die erhaltenen Distanzbeschränkungen für das p53-Tetramer im DNA-gebundenen Zustand können für weiterführende computerbasierte Modellierungen Verwendung finden, um Strukturdaten für die fehlende regulatorische Domäne zu erhalten.

4.4 Entwicklung eines automatisierten Arbeitsablaufes für strukturelle Proteinanalytik unter Verwendung des MS/MS spaltbaren Cross-Linkers BuUrBu

Um die Strukturaufklärung von Proteinen und Proteinkomplexen mittels Cross-Linking/MS leichter zugänglich zu gestalten, sollte ein kompletter Arbeitsablauf, ausgehend von der Cross-Linking-Reaktion bis hin zur Auswertung der Daten erstellt werden, welcher weitestgehend automatisiert abläuft. Dies war nur durch die Verwendung des homobifunktionellen, aminreaktiven, MS/MS-spaltbaren Cross-Linkers BuUrBu in Kombination mit der Datenauswertungssoftware MeroX möglich, welche von Dr. Michael Götze (Institut für Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg) in Zusammenarbeit mit unserer Gruppe entwickelt wurde. Diese Software wurde speziell für die Analyse von MS/MS-spaltbaren Cross-Linkern entwickelt [137]. Die automatisierte Auswertung der Daten wurde durch einen Kernalgorithmus von MeroX, den sogenannten RISE-Modus (*Reporter Ion Scan Event*), ermöglicht. Hierbei werden Fragmentationenspektren nach charakteristischen Reporterionen-Mustern durchsucht, welche durch die charakteristische Spaltung des Cross-Linkers entstehen. Im Fall von BuUrBu sind dies zwei Dubletts, die eine Massendifferenz von ca. 26 u aufweisen (1.5.5, Abb. 1.11). Die Identifizierung der Reporterionen anhand ihrer charakteristischen Massendifferenz ermöglicht auch die direkte Berechnung der Massen der verknüpften Peptide. Diese werden verwendet, um eine *in silico*-Spaltung von Proteinen nach Cross-Linking-Kandidaten zu durchsuchen. Anschließend erfolgt eine Überprüfung der Übereinstimmung der experimentellen Fragmentationenspektren mit theoretischen Fragmentationenspektren der ermittelten Kandidaten. Je besser diese Übereinstimmung ist, desto sicherer wird der jeweilige Kandidat identifiziert (*Scoring*). Um eine sichere Basis für die automatisierte Analyse zu gewährleisten, wurden Cross-Linking-Reaktionen mit vier verschiedenen Modellsystemen mit möglichst identischen Bedingungen durchgeführt (3.2.4.2). Hierfür wurden die beiden globulären Modellproteine *bovines* Serumalbumin (BSA) und β -Lactoglobulin, das Tumorsuppressorprotein p53 als Vertreter intrinsisch ungeordneter Proteine und zusätzlich die lösliche Fraktion eines *E.coli*-Zelllysates als hoch komplexe Probe verwendet. Die enzymatische Spaltung nach erfolgter Cross-Linking-Reaktion wurde in Lösung durchgeführt (3.2.3.4), um homogene Mengen an Peptidgemisch für die Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie zur Verfügung zu stellen (3.2.5.1).

4.4.1 Vergleich verschiedener Fragmentierungsmethoden

Die Fragmentierung von Vorläuferionen liefert je nach verwendeter Fragmentierungsmethode variierende Fragmentationenspektren. Für eine effiziente Automatisierung der Arbeitsabläufe wurden verschiedene Fragmentierungsmethoden (CID, HCD, ETciD und EThcD; 1.5.4) eines kommerziellen Massenspektrometers (Orbitrap Fusion Tribrid, 1.5.3.1) hinsichtlich der generierten MS/MS-Datenqualität und der Anzahl identifizierter Cross-Linking-Produkte miteinander verglichen. Die Cross-Linking-Experimente wurden mit dem MS/MS-spaltbaren Cross-Linker BuUrBu durchgeführt. Vorversuche mit p53 favorisierten EThcD und „stepped“ HCD (NCE 26%, 29%, 32%), als die am besten geeigneten Fragmentierungsmethoden, wobei EThcD eine leicht verbesserte Sequenzabdeckung für die verknüpften Peptide zeigte (Abb. A12). Aus diesem Grund beschränkten sich weiterführende Experimente auf diese beiden Fragmentierungstechniken. Zusätzlich wurden zwei verschiedenen Methoden zur Selektion von Vorläuferionen getestet. Einerseits wurden die Signale mit den höchsten Intensitäten (MI, *most intense*), andererseits diejenigen mit den höchsten Ladungszuständen (HC, *highest charge*) im Verlauf eines Messzyklus bevorzugt ausgewählt (3.2.5.1).

Zum Vergleich der Effizienz der Fragmentierungsmethoden HCD und EThcD wurde die durchschnittliche Anzahl an aufgenommenen Fragmentationenspektren im Verlauf eines standardisierten 90 minütigen Gradienten einer Umkehrphasenchromatographie untersucht (Abb. 4.25). EThcD lieferte hierbei eine geringere Anzahl an MS/MS-Spektren im Vergleich zu HCD (EThcD: 9006 Spektren; „stepped“ HCD: 13 482 Spektren), da ETD-Kombinationsmethoden aus technischen Gründen generell zeitaufwendiger sind als HCD-basierte Methoden. Dies resultierte in einer niedrigeren Anzahl an potenziellen Cross-Linking-Kandidaten pro Nano-LC/MS/MS-Analyse mittels EThcD-Fragmentierung.

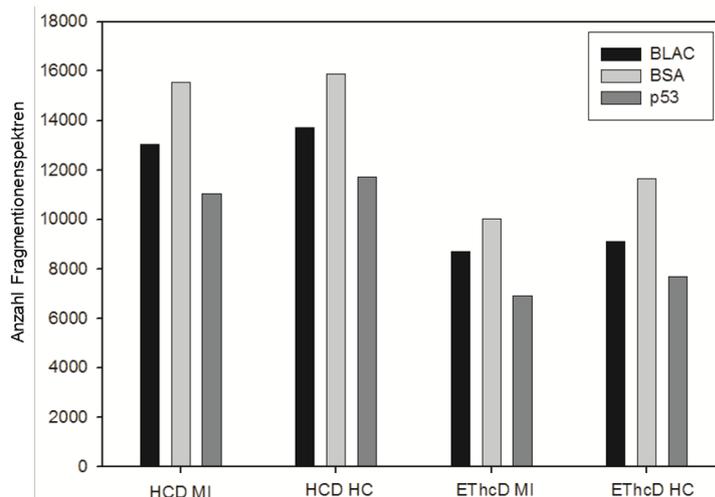


Abb. 4.25: Anzahl an Fragmentationenspektren im Verlauf eines 90-minütigen LC-Gradienten. Die Spektren wurden durch Gruppierung von Fragmentationenspektren identischer Vorläuferionen ($\pm 3\text{ppm}$, Elution innerhalb eines 1,5-minütigen Retentionsfensters) ohne weitere Bearbeitung aus den Rohdaten erzeugt. MI: höchste Signalintensität; HC: höchste Ladung.

4.4.2 Identifizierung von Cross-Linking-Produkten

Im nächsten Schritt sollte die Qualität der Identifizierung von Cross-Linking-Produkten mit den verwendeten Fragmentierungsmethoden geprüft werden. Dabei spielte die sogenannte Falschidentifizierungsrate (FDR, *false discovery rate*) für die Automatisierung eine entscheidende Rolle. Da für eine Datenauswertung bei sehr großen Datensätzen nicht jedes Kandidatenspektrum ausführlich manuell evaluiert werden kann, ist es wichtig, die Anzahl der falsch-positiven Zuordnungen für eine gewählte Grenze (*threshold score*) abschätzen zu können. Hierfür wird sich bei Datenbanksuchen in der Proteomik üblicherweise sogenannten „Lockvogel“-Analysen (*Decoy-Analysen*) bedient, welche auch bei MeroX eingesetzt werden. Dabei wird neben der Zieldatenbank eine *Decoy*-Datenbank derselben Größe durchsucht, die entweder inverse oder zufällige Sequenzen enthält [137]. Durch einen Vergleich der Anzahl an Kandidaten, welche aus der Zieldatenbank identifiziert wurden, mit der Anzahl an Kandidaten aus der *Decoy*-Datenbank kann die FDR für den gewählten *Score* abgeschätzt werden. In der Praxis kann für die Suche mit MeroX eine Obergrenze für die FDR frei gewählt werden. Alle Kandidaten, die das *Score*-Minimum für diese FDR unterschreiten, werden von der Software aussortiert. In Abbildung 4.26 ist eine *Decoy*-Analyse für einen p53-Datensatz dargestellt. Die blauen Balken stellen die Anzahl der Kandidaten dar, welche in der Zieldatenbank identifiziert wurden. Die roten Balken die Anzahl an *Decoy*-Kandidaten (also definitiv

falsche Zuordnungen aus der *Decoy*-Datenbank) in Korrelation zum ermittelten *Score* an. So beinhaltet die Kandidatenliste bei einem *Score* ≥ 85 insgesamt 208 potenzielle Cross-Linking-Produkte aus der Zieldatenbank und 22 falsch-positive Zuordnungen aus der *Decoy*-Datenbank. Die FDR lässt sich in diesem Fall aus dem Quotienten 22/208 zu ca. 10% abschätzen (Abb. 4.26). Da für die hier dargestellten Ergebnisse ein FDR-Filter von $\leq 5\%$ verwendet wurde, wurden Cross-Linking-Kandidaten mit einem *Score* ≥ 87 von MeroX ausgewählt.

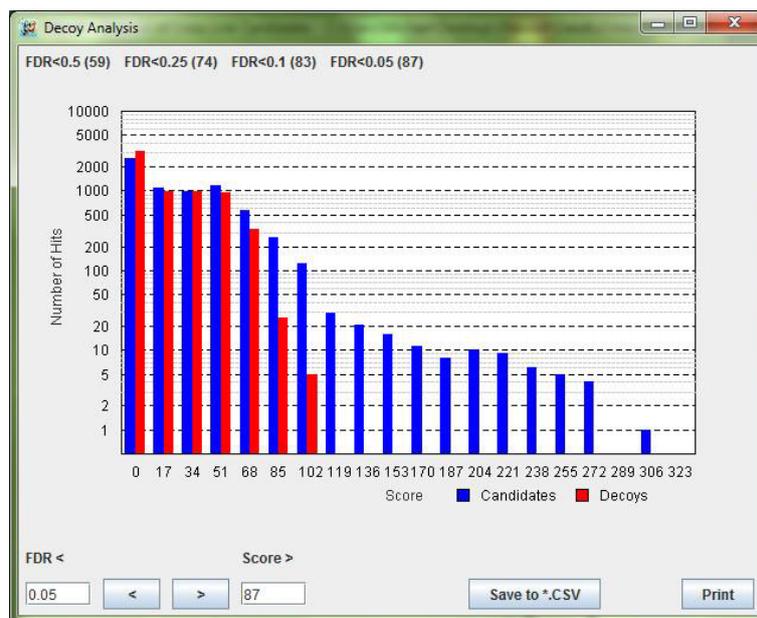


Abb. 4.26: Darstellung einer Decoy-Analyse der Software MeroX. Die Analyse wurde mit Hilfe eines p53-Cross-Linking-Datensatzes („stepped“ HCD; Selektionsmethode des Vorläuferions MI) angefertigt. Die verwendete Datenbank enthielt neben der p53-Sequenz 200 zufällig ausgewählte *E.coli*-Proteine.

In Abbildung 4.27 ist ein Beispielspektrum dargestellt, welches im Zuge der Analyse von Cross-Linking-Produkten von p53 identifiziert wurde. Hierbei handelt es sich um ein vierfach positiv geladenes Cross-Linking-Produkt bei m/z 569,561 das selektiert und mittels „stepped“ HCD fragmentiert wurde. Diesem Fragmentationenspektrum wurde ein *Score* von 132 zugeordnet, welcher eine FDR von unter 5% gewährleistet (Abb. 4.26 und 4.27). Informationen, wie die Sequenzen des α - und β -Peptides, Massengenauigkeit für Fragmentionen (ppm) und Annotationen der Fragmentionen werden von MeroX dargestellt (Abb. 4.27).

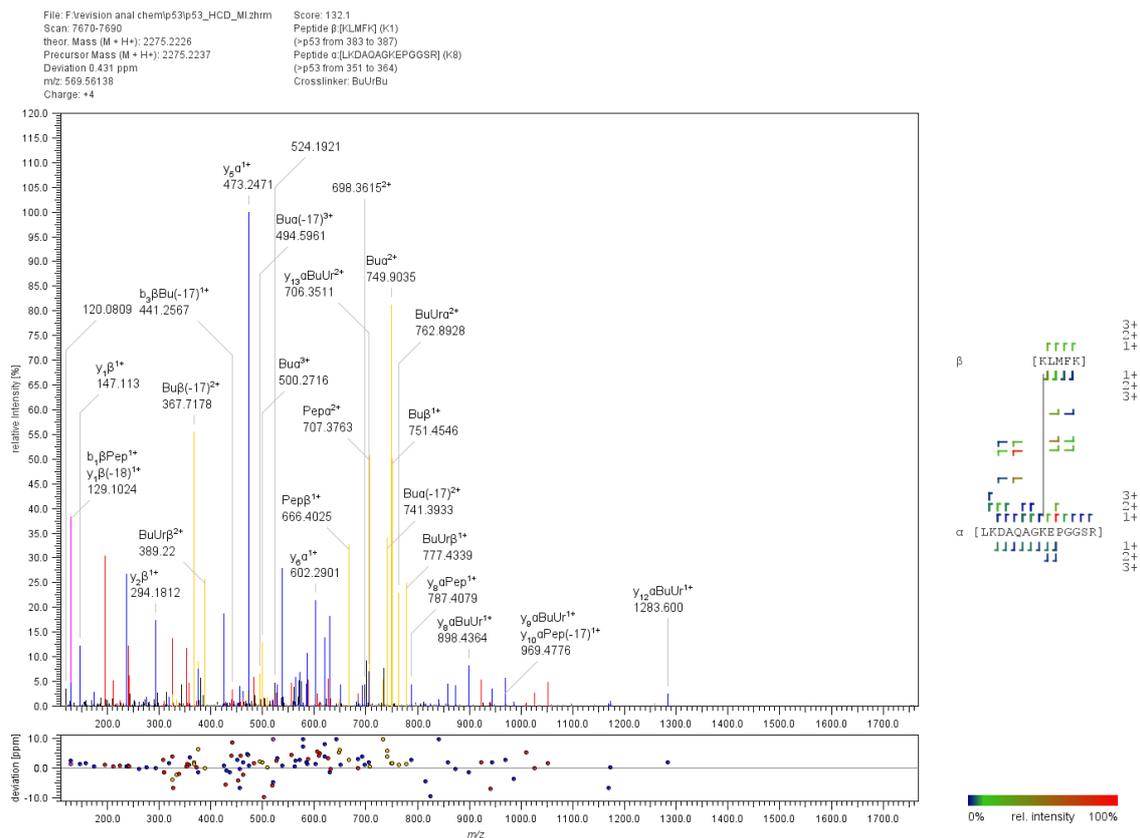


Abb. 4.27: HCD-Fragmentationenspektrum eines Cross-Linking-Produktes, dargestellt in MeroX. Das Spektrum wurde der Analyse eines p53-Cross-Linking-Datensatzes entnommen. Die verwendete Datenbank enthielt neben der p53-Sequenz 200 zufällig ausgewählte *E.coli*-Proteine.

Die von MeroX ausgegebenen Cross-Linking-Ergebnisse wiesen jedoch Redundanzen auf. Hierbei handelt es sich um Identifizierungen einzelner Cross-Linking-Produkte, die sich anhand ihrer Fragmentationenspektren unterscheiden, jedoch keinen Zugewinn bezüglich der Cross-Link-Position und der daraus abgeleiteten Distanzinformation liefern. So wurden identische Cross-Linking-Produkte, welche in verschiedenen Ladungszuständen und/oder verschiedenen Oxidationsstufen der Aminosäure Methionin identifiziert wurden, zu einem einzigartigen Cross-Link zusammengefasst (Abb. 4.28). Auf diese Weise wurden für p53 folgende Ergebnisse erhalten: „stepped“ HCD; MI: 107/80 (identifiziert/einzigartig), „stepped“ HCD; HC 106/86, EThcD; MI 51/23 und EThcD; HC 45/23 (Abb. 4.28 c). Die kompletten Datensätze aller identifizierten Cross-Linking-Produkte stehen digital im Anhang zur Verfügung (DVD-ROM).

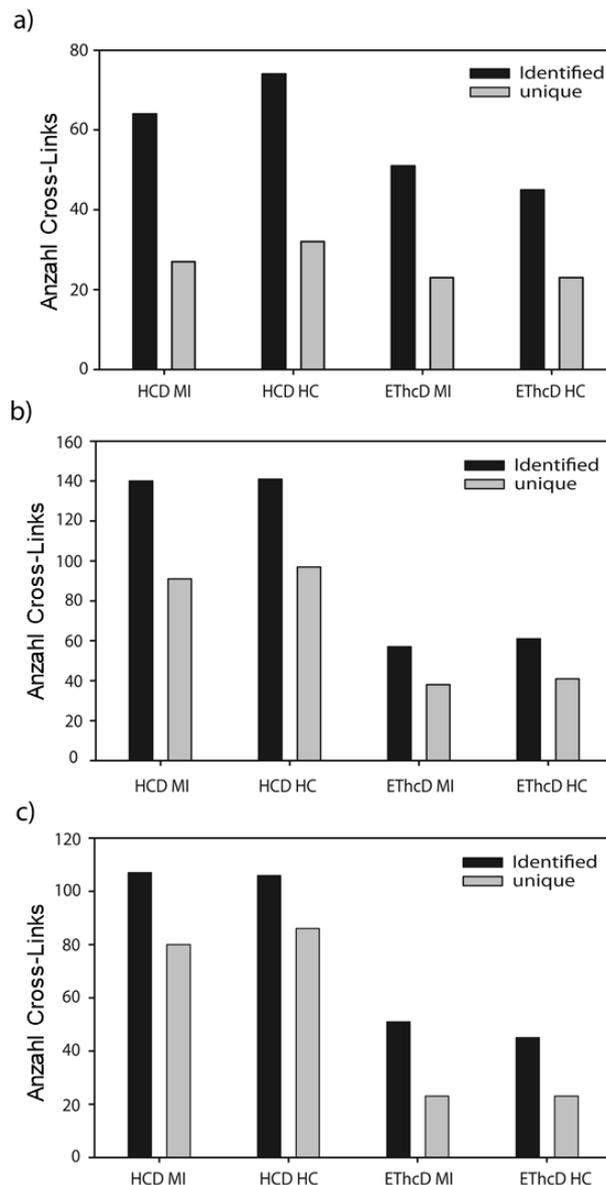


Abb. 4.28: Vergleich von identifizierten („identified“) und einzigartigen („unique“) Cross-Links für die Analyse verschiedener Proteine. a) β -Lactoglobulin, b) BSA, und c) p53; „identified“ Cross-Links: Cross-Links identifiziert von MeroX; „unique“ Cross-Links: nicht-redundante Cross-Links, bei denen verschiedene Ladungszustände und Oxidationsstufen von Methionin zusammengefasst wurden. Methoden zur Selektion der Vorläuferionen: MI: höchste Signalintensität; HC: höchste Ladung.

Die für die Modellproteine BSA und β -Lactoglobulin identifizierten, einzigartigen Cross-Links wurden mit Hilfe etablierter 3D-Strukturdaten dieser Proteine hinsichtlich der jeweils überbrückten Distanzen überprüft. Hierbei konnte ermittelt werden, dass keiner der automatisch identifizierten Cross-Links die max. C_{α} - C_{α} Distanz von 32 Å (für globuläre, rigide Proteine) für BuUrBu überschritten hat (BSA, pdb 3V03; β -Lactoglobulin, pdb 3NQ9). Für p53 wurden sowohl Cross-Links bestätigt, die schon bei den vorangegangenen Strukturanalysen in Abwesenheit von RE-DNA (4.3.1) identifi-

ziert worden waren, als auch zusätzliche Verknüpfungen identifiziert. Sowohl das Vorkommen bestimmter Cross-Linking-Produkte im p53-Monomer, Dimer, Trimer, Tetramer, als auch intra- bzw. intermolekularer Charakter der Cross-Links konnten aufgrund der enzymatischen Spaltung in Lösung und einer fehlenden Isotopenmarkierung nicht geklärt werden (4.3). Stattdessen wurde die in MeroX integrierte Exportfunktion genutzt, um die detektierten Cross-Links mit Hilfe der Software xVis darzustellen [167]. Dabei wurde eine entsprechende schematische Abbildung der Cross-Linking-Ergebnisse automatisch erstellt (Abb. 4.29).

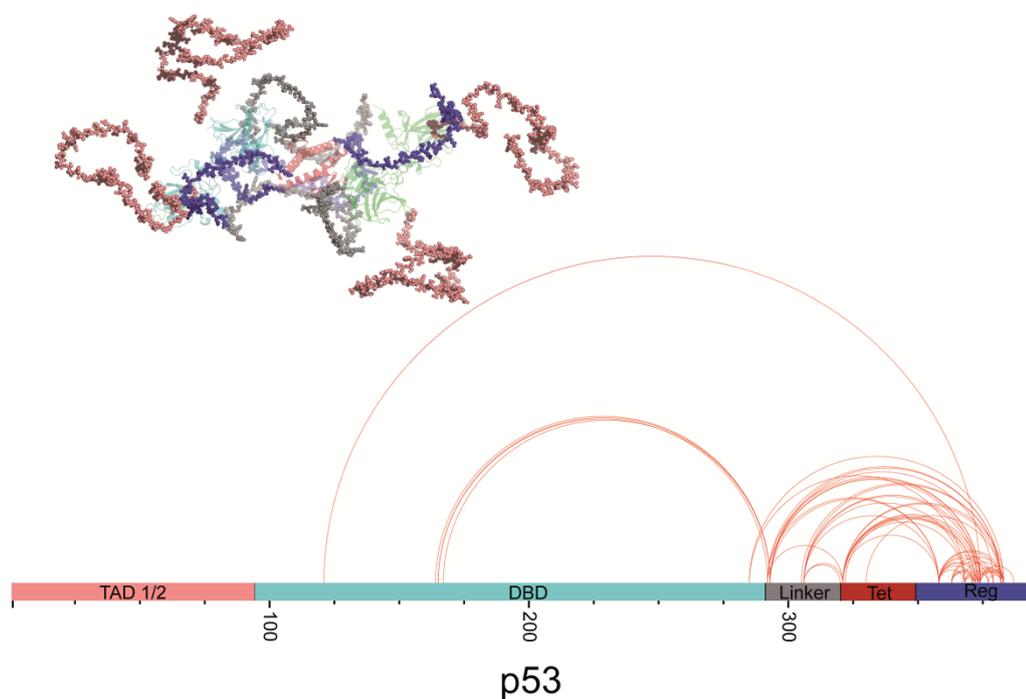


Abb. 4.29: Schematische Darstellung von automatisch detektierten BuUrBu-Cross-Links eines mit Hilfe von MeroX erstellten p53-Datensatzes. (Oben) Strukturmodell des p53-Tetramers im DNA-freien Zustand von Tidow et al. [98](Unten) Schematische Darstellung identifizierter Cross-Links. Cross-Links sind als Kreisbögen (rot) dargestellt. Die Domänen sind farblich kodiert. TAD: Transaktivierungsdomäne (lachsfarben); DBD: DNA-Bindedomäne (azur); Linker (grau); Tet: Tetramerisierungsdomäne (red); Reg: regulatorische Domäne (blau).

Für alle untersuchten Einzelproteine war die Anzahl an identifizierten Cross-Linking-Produkten bei der Anwendung der Fragmentierungstechnik „stepped“ HCD höher als für EThcD, unabhängig von der Methode zu Selektion der Vorläuferionen. Für die Analyse von weniger komplexen Systemen ist „stepped“ HCD aufgrund ihrer Schnelligkeit hinsichtlich der Anzahl an Identifizierungen von Cross-Linking-Produkten gegenüber ETD-basierten Methoden überlegen. Für „stepped“ HCD wurden ~20-30 scan events

und für EThcD ~ 12 -16 *scan events* bei einer maximalen Akkumulationszeit von 200 ms durchgeführt.

Abschließend wurde eine Analyse der Cross-Linking-Datensätze bezüglich der Identifizierung einzigartiger Cross-Links für jede Fragmentierungsmethode („stepped“ HCD und EThcD) durchgeführt. Hierbei wurde die Anzahl mit einer bestimmten Fragmentierungsmethode in Kombination mit der verwendeten Selektionsmethode der Vorläuferionen als Venn-Diagramme dargestellt (Abb. 4.30).

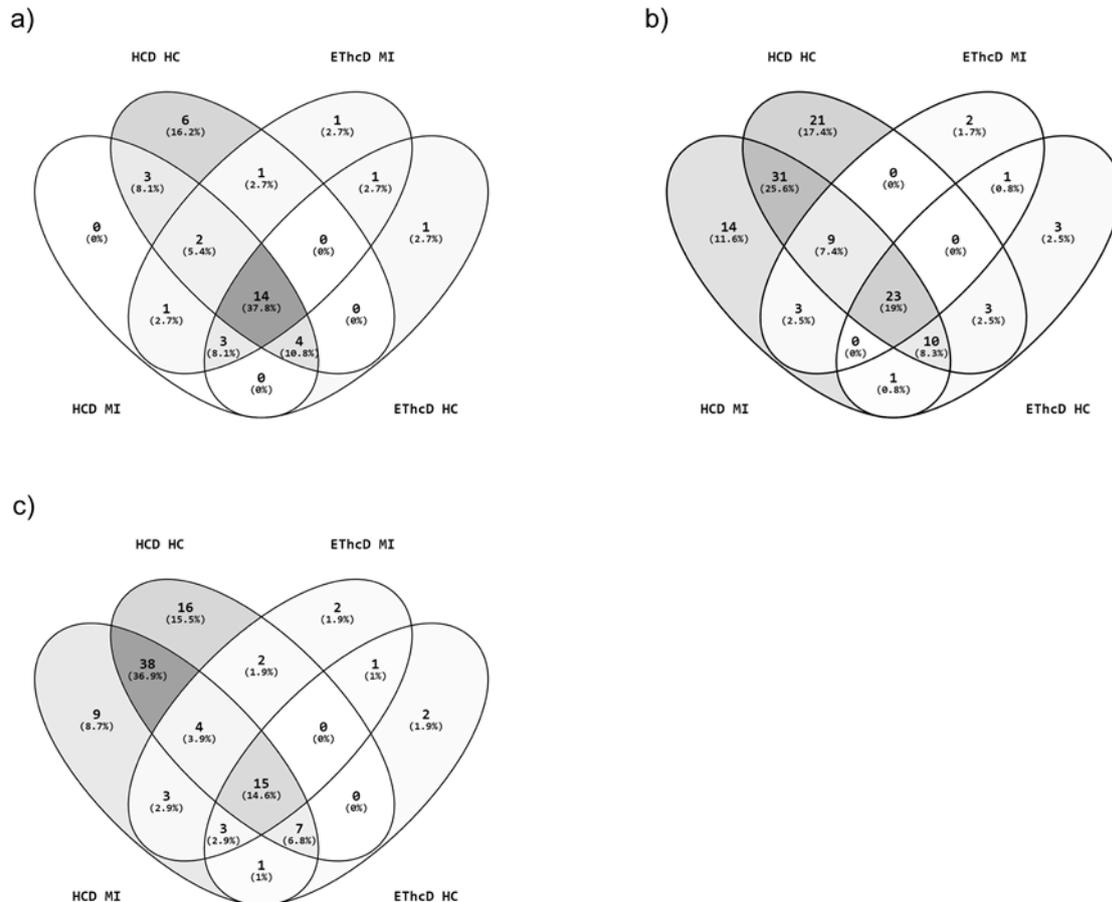


Abb. 4.30: Vergleich der Identifizierung von einzigartigen Cross-Linking-Produkten mittels stepped HCD und EThcD mit Hilfe von Venn-Diagrammen. MI: höchste Signalintensität; HC: höchste Ladung. Die Anzahl sowie die prozentualen Angaben für identifizierte Cross-Links für a) β -Lactoglobulin, b) BSA und c) p53 sind angegeben. Die Grauschattierung spiegelt die prozentuale Verteilung wieder. Abbildung entnommen aus [168]

Für p53 wurden insgesamt 103 einzigartige Cross-Linking-Produkte identifiziert (Abb. 4.30 c). Nur 15 (14,6%) davon wurden mit allen verwendeten Methoden identifiziert. Mit HCD wurden unabhängig von der Selektionsmethode der Vorläuferionen 98 (95,1%) einzigartige Cross-Links gefunden, 63 (61%) hiervon wurden mittels EThcD

nicht identifiziert. Der Vergleich der Selektionsmethoden der Vorläuferionen ergab, dass für die HCD-Experimente 64 Cross-Links (65%) reproduzierbar mit beiden Selektionsmethoden (MI und HC) identifiziert werden konnten, während 16 Cross-Links ausschließlich mit der MI-Methode und 18 ausschließlich mit der HC-Methode zugänglich waren. Demzufolge hat die Selektionsmethode der Vorläuferionen einen starken Einfluss auf die Identifizierungsrate der Cross-Linking-Produkte unter den gegebenen Bedingungen. Mittels EThcD konnten lediglich fünf einzigartige Cross-Links zusätzlich zu den mit HCD gefundenen identifiziert werden.

Für die globulären Proteine (β -Lactoglobulin und BSA; Abb. 4.30 a und b) variierte die Anzahl der identifizierten Cross-Links, aber die Tendenzen waren mit denen der p53-Analyse vergleichbar (Abb. 4.30 c). Auch für diese Proteine führte der detaillierte Vergleich der Methoden zu dem Ergebnis, dass der Einsatz der EThcD-Fragmentierung keinen Zugewinn von Distanzinformationen im Vergleich zu HCD-Methoden lieferte.

4.4.3 Die Analyse komplexer Proteingemische am Beispiel eines *E. coli*-Zelllysates

Um den Arbeitsablauf an einem komplexen Gemisch zu testen, wurde die lösliche Fraktion eines *E.coli*-Zelllysates verwendet. Diese wurde unter den in 3.2.4.2 beschriebenen Bedingungen mit BuUrBu zur Reaktion gebracht und analog der Einzelproteine analysiert. Als Fragmentierungsmethoden wurden „stepped“ HCD und EThcD verwendet. Grundlage für die Identifizierung stellte eine *E.coli*-Datenbank (Swiss Prot-Datenbank <http://www.expasy.org/>; Version 05.05.2016) mit 4306 Einträgen dar. Zusätzlich wurde neben dem 90-minütigen LC-Gradienten ein 300-minütiger LC-Gradient zur verbesserten Trennung des getestet. Mit dem gleichen Ziel, d.h. die Anzahl fragmentierter Vorläuferionen zu erhöhen, wurde außerdem die Zeitspanne des dynamischen Ausschlusses bereits fragmentierter Vorläuferionen von 60 auf 120 s (EDE, *extended dynamic exclusion*) erhöht (3.2.5.1). Eine Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse ist in Tabelle 4.3 dargestellt. Mit Hilfe dieser Optimierungen konnten mit „stepped“ HCD (MI) 12.634 (300 min mit EDE) respektive 2.965 (90 min, ohne EDE) potenzielle Cross-Linking-Produkte identifiziert werden. Unter Verwendung von EThcD (MI) konnten lediglich 591 potenzielle Cross-Linking-Produkte ermittelt werden. Diese Ergebnisse geben allerdings keine FDR-Beschränkung wieder. Wurde die FDR, wie bei der Analyse der Einzelproteine, auf eine Grenze von 5% gesetzt, konnten lediglich 27 („stepped“ HCD; MI) und 19 (EThcD; MI) Cross-Links sicher identifiziert werden. Eine Erhöhung der Zeitspanne des dynamischen Ausschlusses führte, wie beabsichtigt, zu einer höheren

Zahl an Fragmentationsspektren (19.708 gegenüber 28.122 für „stepped“ HCD) bei sonst identischen Bedingungen, jedoch wurden insgesamt kaum mehr Cross-Linking-Produkte (ohne EDE: 25, mit EDE 26) identifiziert. Eine Verlängerung des Gradienten auf 300 Minuten verringerte, trotz einer höheren Anzahl an aufgenommenen Fragmentationsspektren, interessanterweise sogar die Anzahl an sicher identifizierten Cross-Linking-Produkten (14 gegenüber 26 für „stepped“ HCD) Demzufolge war die eindeutige Identifizierung einer hohen Anzahl an Cross-Linking-Produkten in einer komplexen Peptidmischung mit dem verwendeten Ansatz nicht möglich.

Tabelle 4.3 Vergleich verschiedener Datenaufnahme-Bedingungen für die Analyse von Cross-Linking-Produkten eines komplexen Peptidgemisches (*E.coli*-Zelllysats). Die Datensätze wurden mit Hilfe der Fragmentierungsmethoden (stHCD: „stepped“ HCD und EThcD) in Kombination mit verschiedenen Selektionsmethoden für Vorläuferionen (MI: höchste Signalintensität; HC: höchste Ladung) generiert, Gradientenzeiten in Minuten (90 oder 300), und erweiterte dynamische Ausschlusszeiten (EDE, extended dynamic exclusion) sind angegeben.

Datensatz	Spektren	FDR	Cross-Links	niedrigster Score
stHCD_MI_90	19708	5%	25	95
stHCD_MI_90	19708	-	2965	0
stHCD_HC_90	17350	5%	27	88
stHCD_HC_90	17350	-	4547	0
stHCD_MI_90_EDE	28122	5%	26	96
stHCD_MI_90_EDE	28122	-	3626	0
EThcD_MI_90	13129	5%	19	71
EThcD_MI_90	13129	-	591	0
EThcD_HC_90	12248	5%	16	74
EThcD_HC_90	12248	-	524	0
stHCD_MI_300_EDE	51516	5%	14	113
stHCD_MI_300_EDE	51516	-	12634	0

5 Diskussion

5.1 Expression und Reinigung von humanem Vollängen-Wildtyp-p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 stellt als IDP ein instabiles Protein dar (1.2.2). Der IDP-Charakter bietet für p53 *in-vivo* die Möglichkeit des schnellen Übergangs zwischen aktiven und inaktiven Zuständen, jedoch stellt dies für die rekombinante Herstellung in einem Wirtsorganismus, wie *E.coli*, eine große Herausforderung dar (1.2.2). Die Stabilität des Vollängen-Proteins wird durch die Stabilität der zentralen DNA-Bindedomäne definiert (DBD), welche bei 25 °C bei 25 kJ/mol und bei 10 °C bei 41 kJ/mol liegt [72]. Erschwerend ist zudem die starke Tendenz des Vollängen-Proteins zur Aggregation [169]. Die Expression von p53 erfolgte deshalb als HLT-Fusionsprotein (4.1), was die Herstellung von löslichem Protein erlaubte. Der HLT-Tag setzt sich aus einem Octahistidin-Tag, gefolgt von der ersten Lipoyl-Domäne der Dihydrolipoyl-Transacetylase des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes von *B. stearothermophilus* und einer TEV-Schnittstelle zusammen [170]. Dieser Tag wurde bereits erfolgreich zur Reinigung von IDPs verwendet und eignet sich ebenfalls zur Expression von Proteinen, die zur Aggregation neigen [161, 171-173]. Auf diese Weise konnten im Rahmen dieser Arbeit ausreichende Mengen an ¹⁵N-markierten und nicht-markierten, humanem Vollängen-Wildtyp-p53 erhalten werden.

Mehrere Publikationen beschreiben den Einsatz einer Variation des HLT-Tags mit p53-Varianten [98, 174]. Diese p53-Varianten weisen vier Punktmutationen innerhalb der DBD auf (M133L; V203A; N239Y; N268D), welche die Stabilität der DBD und somit die des gesamten Proteins, um 2.65 kcal mol⁻¹ und die Denaturierungstemperatur (T_m) um 5.6 °C erhöhen (1.2.2). Diese ultrastabile „Vierfachmutante“ (*Quadruple-Mutant*) bindet RE-DNA mit gleicher Affinität wie die Wildtyp-DBD und zeichnet sich durch eine vergleichbare Röntgenkristallstruktur der DBD aus [175]. Bei der Verwendung dieser ultrastabilen p53-Mutante könnte die Expressionstemperatur von 18 auf 22 °C angehoben werden [174], was verbesserte Kultivierungsbedingungen für *E.coli* darstellt und somit zu höheren Zelldichten und einer damit verbundenen verbesserten p53-Produktion führen sollte. Dadurch könnten vor allem bei der Herstellung von ¹⁵N-markierten p53 Kosten eingespart werden. Expressionstests des Vollängen-Wildtyp-p53 bei 22 °C führten zu unlöslichem Protein. Bisher wurden keine strukturellen Ver-

gleiche zwischen humanem Vollängen-Wildtyp-p53 und dem ultrastabilen Vollängen-p53 durchgeführt. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die veränderte DBD eventuell einen Einfluss auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen im aktiven p53-Tetramer hat. Dies unterstreicht die Bedeutung, Strukturuntersuchungen mit humanem Vollängen-Wildtyp-p53 vorzunehmen, um mögliche Quellen der Artefaktbildung aufgrund der eingeführten Mutationen von Beginn an ausschließen zu können.

Für die rekombinante Herstellung von Wildtyp-p53 ist ein vielversprechenderer Ansatz, die Reinigungs- anstatt der Expressionseffizienz von p53 zu verbessern. Für die Reinigung des HLT-p53-Fusionsproteins ist der erste affinitätschromatographische Schritt essentiell. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der erste Gelfiltrationsschritt durch einen Pufferaustausch mittels Dialyse oder Zentrifugenfiltrationseinheiten (3.2.3.1) ersetzt werden kann. Erste Versuche ergaben neben einer enormen Zeitersparnis auch eine um ca. 30 % gesteigerte Ausbeute von maximal 2 mg Zielprotein pro Liter Expressionsmedium [156]. Eine Spaltung des auf der Ni-NTA-Matrix fixierten Proteins mittels TEV-Protease wurde ebenfalls in Betracht gezogen, resultierte jedoch in aggregiertem p53.

Im Verlauf der Reinigung von p53 wurde zudem ein ungewöhnliches Migrationsverhalten bei den Größenausschlusschromatographischen Trennschritten (Abb. 4.5 und 4.6; 4.1.2) beobachtet, was durch eine Tetramerisierung des p53 und einen somit stark vergrößerten hydrodynamischen Radius erklärt werden kann. Ähnliche Beobachtungen wurden in der Literatur beschrieben, bei denen das Molekulargewicht des Vollängen-p53-Tetramers mittels Größenausschlusschromatographie mit 400-450 kDa bestimmt wurde [176]. Anhand der erhaltenen Ergebnisse zur Funktionalitätskontrolle des p53 mittels nativer MS (4.1.3) wurde auf eine zusätzliche Methode zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades in Lösung, wie z.B. der analytischen Ultrazentrifugation, verzichtet.

5.2 Tetramerisierung des Volllängen-Wildtyp-p53 und DNA-Bindung

Die Tetramerisierung von p53 ist seit einigen Jahren ein viel diskutiertes Thema, bei dem es mehrere Gesichtspunkte zu betrachten gibt. Die isolierte Tetramerisierungsdomäne bildet ein Dimer aus Dimeren mit D₂-Symmetrie, was durch NMR-Studien und Röntgenkristallographie bereits seit 1995 bekannt ist [77, 78]. Hierbei bilden zwei Monomere der Tetramerisierungsdomäne durch Ausbildung eines intermolekularen, antiparallelen β -Faltblattes und eines antiparallelen α -Helix-Stapels ein initiales Dimer. Zwei diese Dimere assoziieren zu einem Tetramer über die Ausbildung eines α -Helix-Bündels. Weiterhin ist zu bedenken, dass diese Schlussfolgerungen auf der Analyse der isolierten Tetramerisierungsdomäne basieren, die im Modell für p53 von Tidow *et al.* Verwendung fand [98]. Für das würfelförmige Modell des p53-Tetramers von Okorokov *et al.* [99] wird ebenfalls die Bildung des p53-Tetramers aus initialen Dimeren angenommen, allerdings wird hier ein abweichender Assoziationsmechanismus postuliert [100]. So soll die Interaktion zweier Tetramerisierungsdomänen im aktiven Tetramer auf der Bildung eines antiparallelen β -Faltblattes beruhen. Die Untersuchungen zur Tetramerisierung des Volllängen-Proteins mittels nativer MS ergaben ebenfalls eine Dimerisierung aus initialen Dimeren (Abb. 4.11, 4.2). Diese Beobachtung favorisiert keines der beiden Modelle, da sie mit beiden vereinbar ist. Die durch Isotopenmarkierungsexperimente (4.2) ermittelten Verhältnisse der Signalintensitäten der Isotopenmuster des p53-Tetramers (1:2:1) und des p53-Dimers (1:1) nach mindestens 16-stündiger Inkubation bei 4 °C zeigten, dass sich ein Gleichgewicht zwischen Dimeren und Tetrameren einstellt, ohne dass Dimere in signifikantem Maße zu Monomeren dissoziieren und als Isotopenmischspezies reassoziieren (Abb. 4.11 und 4.12). Diese Beobachtung kann mit den sehr niedrigen Dissoziationskonstanten der Tetramere zu Dimeren (50 nM bei 37 °C) und der Dimere zu Monomeren (0,55 nM) erklärt werden. Somit sollte unter nativen Bedingungen p53 fast ausschließlich als Dimer oder Tetramer vorliegen [177]. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in einer Studie zur Untersuchung der heterogenen Oligomerisation von Wildtyp-p53 mit p53-Strukturmutanten gezeigt [178]. Hier wurde jedoch nicht Volllängen-p53 sondern eine sogenannte „Core-Tet-Variante“ (Variante bestehend aus DBD, Linker und Tetramerisierungsdomäne, Abb. 4.23) verwendet, welche außerdem die bereits beschriebene ultrastabile Variante der DNA-Bindedomäne enthält [175]. Aufgrund dessen konnten die Tetramerisierungs-Experimente in diesem Fall bei 20 °C durchgeführt werden, was im Vergleich zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experi-

menten bei 4 °C, höhere Austauschraten der p53-Monomere innerhalb des Tetramers erlauben sollte, resultierten jedoch ebenfalls in einem 1:2:1 Verhältnis [178].

Ebenso konnte in der nativen MS ein p53-Trimersignal mit einem Isotopenverhältnis von 1:1:1:1 detektiert werden, welches zwar der statistischen Verteilung der Assoziation eines initialen Dimers mit einem freien Monomer entspricht. Jedoch wird ein nativ vorkommendes Trimer in der Literatur nicht beschrieben (Abb. 4.11; 4.12). Demzufolge könnte es sich hierbei um ein Konzentrations-bedingtes Gasphasenartefakt handeln. Messungen mit geringerer Proteinkonzentration verringerten zwar die Signalintensität des p53-Trimers, allerdings konnte es weiterhin detektiert werden. Ebenfalls konnte die Anwesenheit der detektierten trimeren p53-Spezies als Resultat eines Dissoziationserignisses im Massenspektrometer ausgeschlossen werden. Die aus der Dissoziation eines p53-Tetramers resultierenden Trimere wiesen wesentlich geringere Ladungszustände auf und wurden erst bei höheren Kollisionsenergien erzeugt (Abb. 4.7 und 4.8). Die Stärke der Interaktion zwischen initialen p53-Dimer und einem zusätzlichen Monomer in der Gasphase könnte mit Dissoziationsexperimenten bei nativen MS-Messungen abgeschätzt werden. Durch die geringen Signalintensitäten der einzelnen trimeren p53-Spezies konnten bisher jedoch keine Daten erzeugt werden. Da in der Literatur kaum native MS-Daten zum Volllängen-p53 existieren bzw. diese z. T. von niedriger Qualität sind, ist nicht klar, ob ein p53-Trimer bereits detektiert wurde [179]. Weiterhin stellt sich die Frage, warum die hier beobachteten Trimere ebenfalls als DNA-gebundene Spezies detektiert wurden (Abb. 4.9; 4.1.3). Eine weit verbreitete Annahme ist, dass ein p53-Dimer konsequente Viertelseiten, oder alternierende Viertelseiten pro enthaltener DBD bindet [76, 80, 101]. Demzufolge würde ein p53-Dimer stabil an RE-DNA binden. An dieses Dimer könnte ein freies Monomer assoziieren, was in einem DNA-gebundenen p53-Trimer resultieren würde. DNA-gebundene p53-Dimere konnten in dieser Arbeit ebenfalls detektiert werden (Abb. 4.9 und 4.11). Diese zeigten jedoch schwächere Signalintensitäten als DNA-freie p53-Dimere. Ein spezifisches, DNA-gebundenes p53-Dimer ist nur mit dem Strukturmodell von Tidow *et al.* [98] vereinbar, da im Modell von Okorokov *et al.* [99] jeweils eine DBD pro initialem Dimer in die DNA-Bindung involviert ist. Da DNA-gebundene Monomere in keinem Fall detektiert wurden (4.1.3; 4.2), ist eine spezifische Bindung der RE-DNA durch Dimere wahrscheinlich und ein Indiz für eine ähnliche Struktur wie in dem von Tidow *et al.* postulierten Modell. Allerdings kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die in dieser Arbeit beobachteten DNA-gebundenen p53-Dimere und -Trimere auf eine unspezifische

DNA-Bindung, induziert durch die additive Anwesenheit der basischen, regulatorischen Domäne zurückzuführen sind. Dies sollte in einer weiterführenden Studie durch die Verwendung eines nicht spezifisch bindenden DNA-Moleküls verifiziert werden. Sollte weiterhin DNA-gebundenes p53-Dimer und -Trimer erhalten werden, würde es sich um eine unspezifische DNA-Bindung handeln. Ebenfalls könnte dies mit einer Mutante des Volllängen-p53 untersucht werden, die keine spezifische DNA-Bindung mehr aufweist. In vergleichbaren nativen massenspektrometrischen Analysen unter Verwendung der „Core-Tet-Variante“ konnte in Anwesenheit der identischen RE-DNA kein DNA-gebundenes Dimer detektiert werden, im Gegensatz zur isolierten DBD [179]. Demzufolge könnte es sich bei den detektierten DNA-gebundenen p53-Dimeren und -Trimeren tatsächlich um unspezifische, elektrostatische Interaktionen des DNA-Phosphatrückgrates mit den regulatorischen Domänen handeln. In weiterführenden Experimenten sollte daher die Lokalisation der DNA-Interaktionsfläche im p53-Dimer und Trimer überprüft werden. Dafür könnten Cross-Linking-Experimente zwischen DNA und p53 durchgeführt werden [180]. Das konträre Modell von Okorokov *et al.*, schließt die Anwesenheit eines spezifischen DNA-gebundenen p53-Dimers aus, da nach diesem Modell die Assoziation zu Tetrameren eine Voraussetzung für die DNA-Bindung darstellt [100, 181]. Anhand der hier durchgeführten Untersuchungen mittels nativer MS können momentan keine abschließenden Aussagen über die tatsächliche räumliche Anordnung des p53-Tetramers vorgenommen werden.

5.3 Strukturaufklärung von IDPs mit Hilfe von Cross-Linking/MS

Die Vorteile des chemischen Cross-Linking-Ansatzes liegen nicht nur in der benötigten geringen Probenmenge, sondern in der theoretisch unbeschränkten Größe des Analyten. So war es bereits möglich, die Strukturen von hochmolekularen Proteinkomplexen, wie die der 670-kDa RNA-Polymerase II-TFIIF und des 1-MDa TRiC/CCT Chaperonin [182-184] zu bestimmen. Auch konnte sogar die Struktur der 1,6-MDa 39S-Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms mit einer Kombination aus Kryo-EM und Cross-Linking aufgeklärt werden [185].

Durch Verwendung von Cross-Linkern unterschiedlicher Länge (Abstand der reaktiven Kopfgruppen zueinander) und Reaktivität lassen sich komplementäre Resultate gewinnen, welche zur Prüfung von 3D-Strukturmodellen oder zur Erstellung neuer 3D-Strukturmodelle genutzt werden können. Sollten bisher keine 3D-Strukturmodelle existieren, können die erhaltenen Cross-Links als Distanzbeschränkungen verwendet wer-

den, um einen Überblick über die räumliche Anordnung einzelner Proteine und Proteinkomplexe zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde erstmalig der Volllängen-Wildtyp des humanen Tumorsuppressorproteins p53 mit Hilfe von chemischen Cross-Linking in Kombination mit hochauflösender MS untersucht. Es wurden Daten erhalten, die zur Überprüfung vorhandener Strukturmodelle des p53-Tetramers verwendet werden können [98, 99]. Dabei mussten die Bedingungen der durchgeführten Experimente stets an die Gegebenheiten angepasst werden. Aufgrund des IDP-Charakters von p53 und der damit verbundenen sehr guten Zugänglichkeit bzw. Modifizierbarkeit einzelner Proteinbereiche mit Cross-Linking-Reagenzien, mussten sowohl die Menge an eingesetztem Cross-Linker, als auch Reaktionszeit und Reaktionstemperatur angepasst werden (3.2.3, 4.3.2). Da die Reaktionstemperatur durch die Thermolabilität von p53 mit 4 °C vorgegeben war, konnten nur der molare Überschuss an Cross-Linking-Reagenz und eine Reduktion der Reaktionszeit die Cross-Linking-Reaktion beeinflussen (4.3.2). Bei einem exzessiven Cross-Linking besteht die Gefahr, artifizielle Strukturen zu induzieren und zu fixieren. Dabei ist es schwierig die fixierten nativen Strukturen von artifiziellen zu unterscheiden, was ein besonders großes Problem bei flexiblen Proteinen bzw. Proteinkomplexen darstellt. Proteine die nur leichte konformationelle Änderungen durch Liganden-Bindung eingehen oder globuläre, wohldefinierte Strukturen aufweisen, sind weniger anfällig für diese Art der Artefaktbildung. Dabei kann ein Funktionstest oder die Prüfung der Ligandenbindung nach erfolgtem Cross-Linking Aufschluss über die Qualität der erhaltenen Daten geben. Im Zuge dieser Arbeit konnte eine Methodenkombination aus chemischen Cross-Linking und nativer MS, die „native“ Cross-Linking MS, vorgestellt werden, welche sich zur Optimierung der Bedingungen von Cross-Linking-Experimenten, speziell im Hinblick auf IDPs, eignet und im Falle von p53 einen gleichzeitigen Funktionstest lieferte (4.3.2). So konnte nicht nur die Modifikationsrate von p53 mit verschiedenen Cross-Linking-Reagenzien sondern auch deren Einfluss auf die Fähigkeit der spezifischen DNA-Bindung überprüft werden (4.3.2). Hierbei wurde bereits DNA-gebundenes p53-Tetramer der Cross-Linking-Reaktion unterzogen und anschließend überprüft, ob die DNA-Bindung bestehen blieb. Dies schließt jedoch nicht aus, dass die RE-DNA eventuell durch die Cross-Linking-Reaktion mit BuUrBu fixiert wurde und so die Dissoziation der DNA vom p53-Tetramer verhindert wurde. In weiterführenden Experimenten muss geklärt werden, ob ein bereits kovalent fixiertes p53-Tetramer noch in der Lage ist, RE-DNA zu binden.

5.4 Strukturuntersuchung des p53-Tetramers mittels Cross-Linking-MS

Die Strukturaufklärung von p53 gestaltet sich seit Jahrzehnten als Herausforderung. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit dem humanem Vollängen-Wildtyp-p53 in Lösung liegen nahe an den physiologischen Bedingungen, was pH-Wert und Ionenstärke betrifft. Typischerweise existieren vorwiegend Strukturen von p53-Einzeldomänen oder Konstrukten aus strukturierten Domänen mit verkürzten Verbindungssequenzen. Als Alternative werden stabilisierte Mutanten verwendet [77, 147, 175, 186]. Zusätzlich wurden bisher zwei wesentliche Modelle von p53 veröffentlicht, die unterschiedlicher nicht sein könnten (1.4). Das Strukturmodell des p53-Tetramers von Tidow *et al.* diente als Hauptreferenz für diese Arbeit [98]. Ein kürzlich veröffentlichtes Modell das auf bestehenden Strukturdaten und ergänzenden Modellierungsstrategien basierte lieferte Aussagen über die Struktur des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand [187]. Werden diese Strukturmodelle mit in Lösung generierten Daten, wie den Cross-Linking-Daten aus der vorliegenden Arbeit verglichen, muss dies unter dem Vorbehalt geschehen, dass sich das Vollängen-Wildtyp-p53 in Lösung durchaus von den Modellen, die auf Einzelstrukturen und Strukturfragmenten basieren unterscheiden kann. In dieser Arbeit wurden mittels Cross-Linking/MS Ergebnisse erhalten werden, die einen Einblick in die Orientierung des Vollängen-Wildtyp-p53 innerhalb des biologisch aktiven Homotetramers ermöglichten. Diese Ergebnisse werden in folgenden Abschnitten diskutiert.

5.4.1 Strukturuntersuchungen der C-terminalen Region von p53 (Tetramerisierungsdomäne und regulatorische Domäne)

Die Analyse mittels Cross-Linking/MS sollte topologische Informationen über das p53-Tetramer im DNA-freien und -gebundenen Zustand liefern. Die Anwendbarkeit verschiedener Cross-Linking-Reagenzien zur Ermittlung von Strukturinformationen aller p53-Domänen und vor allem der intrinsisch ungeordneten Termini wurden erfolgreich gezeigt. Ein p53-Monomer besitzt 20 Lysine, von denen 14 in der C-terminalen Region (AS 292-393) lokalisiert sind (Anhang Abb. A5 b). Demzufolge sollten die verwendeten homobifunktionellen, aminreaktiven Cross-Linking-Reagenzien BS²G und BuUrBu gut geeignet sein, um umfassende Strukturinformationen über die C-terminale Region zu erhalten. Um eine klare Differenzierung zwischen intra- und intermolekularen Cross-Linking-Produkten zu gewährleisten, wurde ein Isotopenmarkierungsansatz gewählt

(4.3), welcher aufgrund des Tetramerisierungsverhaltens von p53 (5.2) nicht immer eine eindeutige Differenzierung zuließ. Die mit Hilfe der Cross-Linking-Reagenzien BS²G und BuUrBu identifizierten intramolekularen Cross-Linking-Produkte können nicht zweifelsfrei als intramolekular angesehen werden, da es sich ebenfalls um intermolekulare Cross-Links zwischen zwei p53-Monomeren innerhalb eines initialen p53-Dimers handeln kann. Sie besitzen demzufolge für die Strukturaufklärung eine verminderte Aussagekraft, sofern sie bei der Analyse der dimeren, trimeren oder tetrameren p53-Spezies detektiert wurden. Obwohl es möglich war, alle intramolekularen Cross-Links ebenfalls in der SDS-PAGE-Bande des p53-Monomers (Abb. 4.14 und 4.20; Anhang Tabelle A3) zu detektieren, konnte nicht differenziert werden, ob diese Monomere in Lösung vorlagen (Abb. 4.7, 4.9, 4.11), oder ein Artefakt der denaturierenden SDS-PAGE-Analyse darstellen. Mit einer Wiederholung der Cross-Linking-Experimente und einer anschließenden Trennung der Produkte mittels nativer PAGE oder analytischer Größenausschlusschromatographie könnten genauere Aussagen getroffen werden. Hier bleiben nicht-kovalente Interaktionen bestehen, sodass die oligomeren p53-Spezies vor der Analyse voneinander getrennt werden könnten. Die ebenfalls mit BuUrBu gebildeten neun intermolekularen Cross-Links hingegen liefern unmissverständliche Aussagen über die Kontaktflächen der initialen p53-Dimere innerhalb des aktiven Tetramerkomplexes. So konnte der Cross-Link zwischen den Lysinresten K-357 eines initialen p53-Dimers, welcher in An- und Abwesenheit von RE-DNA detektiert wurde (Abb. 4.16), die Tetramerisierung von p53 aus initialen Dimeren bestätigen. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb der separaten Tetramerisierungsdomäne (1.2.2), wird klar, dass die Bildung der initialen Dimere und deren Assoziation zum Tetramer nur mit der NMR-Struktur von Clore *et al.* vereinbar sind (Abb. 4.18; Anhang Abb. A16 a) [78]. So kann die Orientierung der vier Monomere im p53-Tetramer eingeschränkt werden (Anhang Abb. A17). Es widerlegt jedoch nicht das p53-Strukturmodell nach Okorokov *et al.*, da dieser Cross-Link hier ebenfalls nur als intermolekulare Verknüpfung zwischen initialen Dimeren möglich wäre [100]. Im Zuge dieser Arbeit wurde jedoch nicht geprüft, ob die zu überbrückende Distanz zwischen den beiden Lysinresten in diesem Modell mit BS²G oder BuUrBu möglich wäre (4.3.1.1). Die Intensitätsverteilungen der Isotopenmuster aller weiteren, in Tabelle 4.2 aufgeführten, intermolekularen Cross-Linking-Produkte entsprechen denen des Cross-Links zwischen K-357 x S-366/S-367, welcher in Abb. 4.15 b dargestellt ist. Sie weichen somit von der theoretischen Verteilung (1:1:1:1) für intermolekulare Verknüpf-

fungen zwischen zwei initialen Dimeren ab. Das heißt, die Mehrzahl aller identifizierten intermolekularen Cross-Linking-Produkte existierte ebenfalls als intramolekulare Cross-Links innerhalb eines p53-Monomers bzw. intermolekulare Cross-Links zwischen Monomeren innerhalb eines initialen p53-Dimers. Dennoch lieferten sie Distanzinformationen über die räumliche Anordnung der initialen Dimere im p53-Tetramer und können zur Überprüfung der Qualität eines Strukturmodelles dienen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für das von Tidow *et al.* veröffentlichte p53-Strukturmodell im DNA-freien Zustand durchgeführt. Hierbei traten starke Diskrepanzen zwischen den experimentellen Daten und diesem 3D-Strukturmodell auf. Alle intermolekularen Cross-Links (ausgenommen K-357 x K-357) müssten viel zu große Distanzen ($> 40 \text{ \AA}$) überbrücken, als dem verwendeten Cross-Linkern möglich wäre (4.3.1). Die erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine weitaus kompaktere Struktur hin, wie es das würfelartige Strukturmodell von Okorokov *et al.* postuliert [99]. Veröffentlichte Ionenmobilitätsdaten stützen die hier präsentierten Daten, da diese ebenfalls eine kompaktere Anordnung der p53-Monomere im Tetramer postulieren [179]. In dieser Studie wurden geringere experimentelle Werte für die Kollisionsquerschnitte (CCS, *Collisional Cross Sections*) bestimmt als die für das Modell von Tidow *et al.* berechneten. Dieser Sachverhalt wurde anhand eines Kollapses der DNA-freien p53-Tetramerstruktur beim Eintritt in die Gasphase erklärt. Es konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass nicht schon in Lösung ein wesentlich kompakteres p53-Tetramer vorliegt. Vergleicht man die Modelle der DNA-gebundenen und -freien Zustände des p53-Tetramers nach Tidow *et al.* so fällt auf, dass sowohl eine große Konformationsänderung der beteiligten Monomere, als auch eine Umorientierung der Monomere im p53-Tetramer nötig ist. Die experimentell in dieser Arbeit erhaltenen Cross-Linking-Daten in An- und Abwesenheit von RE-DNA (REP, 4.3.2) waren jedoch identisch, was einer stark unterschiedlichen Konformation der beiden Zustände widerspricht. Obwohl die entsprechenden Regionen im Strukturmodell des DNA-gebundenen p53-Tetramer-Modell fehlen, und somit die durch intermolekulare Cross-Links überbrückten Distanzen in diesem Modell nicht bestimmt werden können, erscheint eine identische Anordnung der regulatorischen Domänen nach einer so drastischen Umorientierung eher unwahrscheinlich [101, 188]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie des ausschließlich aus bestehenden Strukturen modellierten Voll-längen-p53 im Komplex mit RE-DNA bestätigte ebenfalls die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse [187]. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Tetramerisierungsdomäne, als auch regulatorische Domäne stark an die DBD annähern und es zu elektro-

statischen Interaktionen zwischen K-372, K-373, K-381 und K-382 und der gebundenen RE-DNA kommt. Diese Reste befinden sich zum Großteil in der regulatorischen C-terminalen Domäne und müssen sich demnach in räumlicher Nähe zur Tetramerisierungsdomäne und zur DBD befinden. Während einer fast 1 μ s-andauernden Simulation des konstruierten Modelles verdichtete sich das komplette p53-Tetramer mit Ausnahme der TAD, welche weiterhin von der DBD abgewandt blieb. Im Falle des von Okorokov *et al.* postulierten Modelles wurde ebenfalls gezeigt, dass DNA-freies und DNA-gebundenes p53-Tetramer eine nahezu identische, sehr kompakte Anordnung aufweisen. Nach diesem Modell ist lediglich eine leichte Rotation der Dimere gegeneinander notwendig um RE-DNA zu binden [100].

Andererseits muss berücksichtigt werden, dass auch die ermittelten Cross-Linking-Daten auf heterogene Strukturen zurückzuführen sein könnten. So konnte für entsprechende Cross-Linking-Experimente trotz vorhandener RE-DNA noch DNA-freies Tetramer mittels nativer MS detektiert werden (Abb. 4.11 b). Die Ergebnisse der „nativen“ XL-MS zeigen außerdem, dass die Cross-Linking-Reaktion mit BuUrBu unter den gegebenen Bedingungen zur Abnahme der relativen Signalintensitäten des DNA-gebundenen gegenüber des DNA-freien Tetramers führte (Abb. 4.21, 4.3.2). Dabei ist nicht eindeutig nachvollziehbar, ob die Fähigkeit zur DNA-Bindung durch das Cross-Linking vermindert wurde und so freies Tetramer entstand oder ob im Verlauf der Reaktion noch freies p53-Dimer und Monomer zu freiem p53-Tetramer assoziierten. Dies könnte mit einer Gleichgewichtsverschiebung auf die Seite des p53-Tetramers erklärt werden, da dieses durch die Cross-Linking Reaktion aus dem dynamischen Gleichgewicht entfernt wird und nachgebildet werden muss. Bei der Untersuchung des DNA-gebundenen p53-Tetramers könnte es aufgrund identischen Migrationsverhaltens während der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 4.14 und 4.20) zur Vermischung von DNA-gebundenen und -ungebundenen Cross-Linking-Spezies gekommen sein. Um dies zu verhindern, könnte die Reaktion wiederholt und nach Abstoppen der Reaktion mit Hilfe eines EMSA-Assays (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) entsprechende DNA-gebundene p53-Spezies für die enzymatische In-Gel-Proteolyse (3.2.3.5) erhalten werden.

Aufgrund der potenziellen Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem 3D-Strukturmodell des p53-Tetramers nach Okorokov *et al.* wurden die BuUrBu-Datensätze, welche in Abwesenheit von RE-DNA erhalten wurden, erneut untersucht. Hierbei wurde auf die Verwendung des RISE-Modus in MeroX zur Datenanalyse ver-

zichtet (3.2.6). Dabei wurden zwei zusätzliche Cross-Linking-Produkte identifiziert, deren Fragmentationsspektren keinen kompletten Satz der Reporterionen-Signale für BuUrBu enthielten und daher mit aktivem RISE-Modus nicht identifiziert wurden. Hierbei handelt es sich um die Cross-Links zwischen S-1 x K-357 und S-1 x S-372 (Anhang Abb. A18 und A19), bei denen jeweils die *N*-terminale primäre Amingruppe von p53 verknüpft wurde. Somit wurden zwei intramolekulare Cross-Linking-Produkte zwischen dem *N*-Terminus und eines Aminosäurerestes der *C*-terminalen regulatorischen Domäne (S-372) sowie K-357 in der Tetramerisierungsdomäne von p53 detektiert (Datensatz auf DVD-ROM enthalten). Das spezifische Fragmentierungsverhalten von BuUrBu (Abb. 1.11) beruht auch auf sequenzspezifischen Effekten, wodurch eine bevorzugte Fragmentierung des Proteinrückgrates beobachtet wurde, wenn es sich um höher geladene Vorläuferionen handelte und die verknüpften Peptide einen geringen Anteil basischer Aminosäuren enthielten [189]. Diese zusätzlich gefundenen Verknüpfungen deuten auf eine *Head-to-Tail*-Orientierung der Monomere innerhalb eines initialen Dimers hin, wie es im Modell von Okorokov *et al.* beschrieben wurde. Um weitere Aussagen treffen zu können, müssten die erzeugten Datensätze erneut mit dem entsprechenden 3D-Strukturmodell verglichen werden [99, 100].

5.4.2 Strukturuntersuchungen der *N*-terminalen Region von p53 (Transaktivierungsdomäne und Prolin-reiche Region)

Neben der regulatorischen Domäne stellte die *N*-terminale TAD als weitere IDR ein geeignetes Ziel für die Anwendung von Cross-Linking/MS zur Analyse der p53-Struktur dar. Eine hohe Anzahl an sauren Aminosäureresten (Abb. A5 c) ließ die Anwendung von SDH als optimal geeignet erscheinen (Anhang Abb. A12). SDH stellt ein homobifunktionelles, carboxylreaktives Cross-Linking-Reagenz dar [190]. Für die Anwendung dieses Cross-Linkers müssen saure Aminosäuren (Glu, Asp) zuerst mit dem Reagenz DMTMM (oder EDC) modifiziert und somit aktiviert werden, bevor die Reaktion mit SDH durchgeführt werden kann. Dabei kann DMTMM als Kopplungsreagenz fungieren (1.5.5), indem es nach Aktivierung der Carboxylgruppe mit einem primären Amin, wie z.B. in Lysin, unter Ausbildung einer Peptidbindung reagiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Cross-Linking-Experimente zeigten, dass eine Modifikation des p53-Tetramers mit DMTMM zu einem kompletten Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit führt. Die Modifikation mit BuUrBu hingegen erhielt die spezifische DNA-Bindung des p53-Tetramers (Abb. 4.21). Die erhaltenen Massenspektren legen die Vermutung nahe,

dass es einen Einfluss auf die Fähigkeit zur spezifischen DNA-Bindung des p53-Tetramers geben muss, da die DNA-Bindung des Dimers erhalten bleibt (Abb. 4.21). Eine weiterführende Studie, bei der DMTMM und Glycinethylester (GEE), welche mit Carboxylgruppen reagieren, als Reagenzien zur Oberflächenkartierung verwendet wurden (Anhang Abb. A1 c und A20), ergaben konträre Ergebnisse.

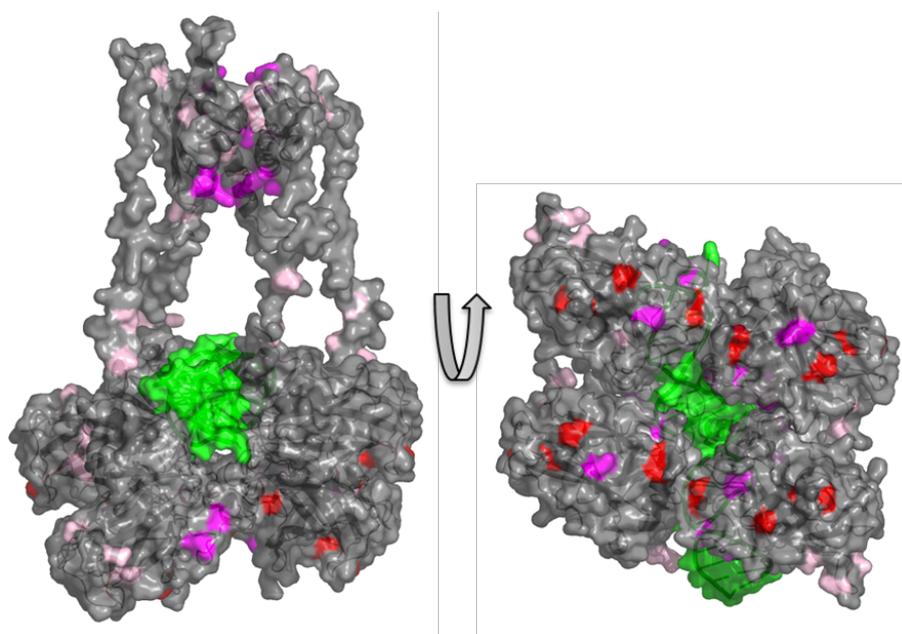


Abb. 5.1: Oberflächenkartierung saurer Aminosäurereste des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand anhand des Modelles von Tidow *et al.* Mit Glycinethylester modifizierte Aminosäurereste sind rot, mit DMTMM modifizierte magenta und mit beiden Reagenzien modifizierte sind rosa gefärbt. Das p53-Tetramer (grau) und die gebundenen DNA (grün) sind als Oberflächenansicht dargestellt.

Diese Studien wurden in Abwesenheit von RE-DNA durchgeführt, zeigen aber, dass die Kontaktflächen der DBD bzw. des Linkers und der RE-DNA mit keinem der beiden Reagenzien modifiziert wurde; vorausgesetzt, man legt das p53-Tetramer-Modell von Tidow *et al.* zugrunde. Diese Fläche enthält ebenfalls nur einen kleinen Anteil an sauren Aminosäureresten (Abb. 5.1 und Anhang A21). Die Tetramerisierungsdomäne hingegen wurde sowohl mit DMTMM als auch GEE modifiziert (Abb. 5.1 und Anhang A21 und A22). Dementsprechend könnte erwartet werden, dass das p53-Tetramer durch Modifikation saurer Aminosäurereste nicht nur seine Fähigkeit zur DNA-Bindung einzubüßen würde. Weiterhin konnte in diesen Studien keine Modifikation der *N*-terminalen TAD mit DMTMM gefunden werden, trotz der hohen Anzahl an Asp- und Glu-Resten (Abb. A22). Für das kleinere Reagenz GEE konnten hingegen Modifikationen detektiert werden (Abb. A21). Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zum p53-Tetramer-Modell von Tidow *et al.*, da im DNA-freien Zustand die TAD jedes p53-Monomers durch die

kreuzartige Anordnung der p53-Monomere im Tetramer gut zugänglich sein müsste [98]. Ebenfalls müsste die TAD im DNA-gebundenen Zustand gut zugänglich sein, wie ein kürzlich veröffentlichtes Modell zeigte (Abb. 5.2) [187].

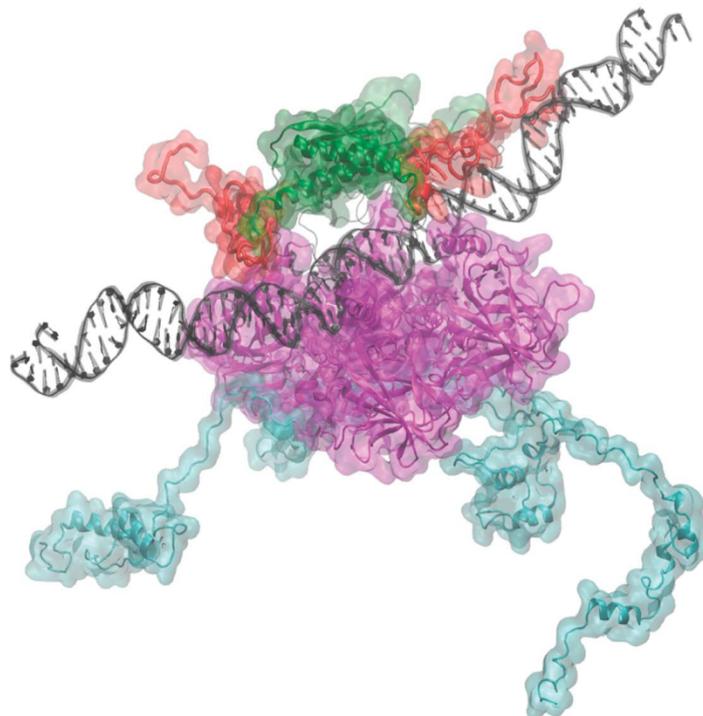


Abb. 5.2: Modell des p53-Tetramers im DNA-gebundenen Zustand von Demir et al. Das Modell wurde auf der Grundlage bekannter Kristallstrukturen modelliert und mit Hilfe von Moleküldynamik-Simulationen verfeinert. Die TAD (cyan), DBD (magenta), Tetramerisierungsdomäne (grün) und regulatorische Domäne (rot) sind in „Cartoon-Darstellung“ abgebildet. Entnommen aus [187]

Bei diesem Modell sind die TADs der einzelnen p53-Monomere im DNA-gebundenen Tetramer lösungsmittelzugänglich und vom kompakten, DNA-umklammernden Rest des p53-Tetramers weg gerichtet. Das einzige Modell, bei dem die *N*-terminale Domäne beschränkt zugänglich ist, wäre das von Okorokov *et al.* postulierte (Abb. 1.3 c und d).

5.4.3 Strukturuntersuchungen der Zentralen Region von p53 (DNA-Bindedomäne)

Da die 3D-Struktur der DBD von p53 bereits seit 1995 aufgeklärt ist, stand diese nicht im Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit (1.2.2.). Trotz der sieben vorhandenen Lysinreste in der DBD konnten weder im DNA-freien noch -gebundenen Zustand Cross-Linking-Produkte mit einem der verwendeten Reagenzien identifiziert werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die moderaten molaren Überschüsse der Cross-

Linker BS²G und BuUrBu sein. Für die Reaktionen mussten geringe Cross-Linker-Überschüsse eingesetzt werden, um keine artifiziellen Ergebnisse für die flexiblen Bereiche von p53 zu erhalten (4.3.2). Während hohe Modifikationsraten der IDR selbst bei geringen Überschüssen an Cross-Linking-Reagenz erzielt wurden, könnte für die globuläre DBD die Konzentration der jeweiligen Reagenzien für eine effiziente Vernetzung zu gering gewesen sein. Ein Indikator hierfür ist die Modifikationsrate des globulären Proteins DnaK unter den gewählten Bedingungen. Diese Verunreinigung in der verwendeten p53-Präparation zeigte im Verlauf der „nativen“ XL-MS-Analysen eine im Vergleich zu p53 stark verminderte Modifikationsrate, sowohl für BuUrBu als auch für DMTMM (3-6-fach weniger als das p53-Dimer), trotz vergleichbarer Anzahl an Lysin (50 gegenüber 40) und sauren Aminosäuren (50 Glu; 55 Asp) gegenüber dem p53-Dimer (60 Glu; 40 Asp).

Da p53 ebenfalls zehn Cysteine besitzt, welche ausschließlich in der DBD lokalisiert sind, wurden zudem Cross-Linking-Reaktionen mittels Sulfo-GMBS durchgeführt (3.2.4.1). Es konnten trotz erfolgreich modifizierter Cysteine (Anhang, Tabelle A1) keine Cross-Linking-Produkte identifiziert werden. C-176, C-238 und C-242 sind an der tetrahedralen Koordination des Zentralen Zn²⁺-Ions beteiligt und wurden in keinem Fall als modifiziert detektiert. Interessanterweise wurde C-229, welches im DNA-freien Zustand des p53-Tetramers zugänglich sein müsste, ebenfalls in keinem Fall modifiziert (Anhang, Tabelle A1). Alle weiteren Cysteine der DBD wurden modifiziert (Anhang, Tabelle A1), jedoch wurden keine Cross-Links zu Lysin in einem maximal von Sulfo-GMBS überbrückbaren Ca-Ca-Abstand von 27 Å detektiert. Lysine mit entsprechendem Abstand, die zu intramolekularen Cross-Linking-Produkten führen würden, konnten wahrscheinlich durch sekundärstrukturbedingte Behinderungen nicht ausgebildet werden. Jedoch sind nicht alle potenziell möglichen Cross-Links derart unzugänglich (Anhang, Abb. A7).

5.5 Automatisierung der Cross-Linking-Analysen

Eine der größten Herausforderungen bei der Analyse von Reaktionsgemischen, die durch chemisches Cross-Linking und eine anschließende enzymatische Proteolyse erzeugt werden, ist die Komplexität dieser Peptidmischungen. und die oft niedere Abundanz der gebildeten Cross-Linking-Produkte. Dies macht es unerlässlich, effektive Identifizierungsstrategien für Cross-Linking-Produkte zu etablieren. Die am häufigsten verwendete Strategie hierfür ist die Verwendung von Gemischen aus stabil isotopen-

markierten „leichten“ und „schweren“ Cross-Linkern, die z.B. Deuterium enthalten statt Wasserstoff. So können Cross-Linking-Produkte anhand ihrer charakteristischen Isotopenmuster identifiziert werden [96]. Die Verwendung MS/MS-spaltbarer Cross-Linker, wie z.B. Disuccinimidylsulfoxid (DSSO), Bis(succinimidyl)succinamylaspartylprolin (SuDP) oder des hier verwendeten Harnstoff-basierten Cross-Linkers BuUrBu stellen vielversprechende Alternativen dar [135, 191, 192]. Mit Hilfe dieser Reagenzien kann die Auswertung von Cross-Linking-Datensätzen stark vereinfacht und automatisiert werden.

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie war es, einen kompletten Arbeitsablauf zur (nahezu) automatischen Analyse strukturbasierter Cross-Linking-Experimente von Proteinen und Proteinkomplexen, basierend auf dem MS/MS-spaltbaren Cross-Linker BuUrBu, zu etablieren. MS/MS-spaltbare Cross-Linker besitzen mehrere entscheidende Vorteile, welche sie für automatische Arbeitsabläufe prädestinieren. Am wichtigsten ist die durch die Cross-Linker-Spaltung erzeugten Reporterionen zuverlässige Unterscheidung zwischen verschiedenen Cross-Linking-Produkten (sogenannte „dead ends“ oder Typ 0, intra- und interpeptidal oder Typ 1 und 2, 1.5.5).

Neben der Identifizierung von Cross-Links mit Hilfe von MeroX sollten hierbei verschiedene Fragmentierungsmethoden genutzt und hinsichtlich ihrer Effektivität für die Analyse von Cross-Linking-Ansätzen mit BuUrBu untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit HCD und EThcD die qualitativ besten Fragmentationenspektren für Cross-Linking-Produkte erhalten wurden. In Bezug auf die Identifikationsrate erwies sich HCD für die Analyse von Einzelproteinen gegenüber EThcD als überlegen (Abb. 4.28). Der Geschwindigkeitsvorteil einer ausschließlich HCD-basierten Fragmentierung resultierte für die der Proteine (BSA, β -Lactoglobulin und p53) in einer deutlich höheren Anzahl an identifizierten einzigartigen Cross-Links als mit ETD-basierten Methoden. Dieses Ergebnis spiegelt die intrinsischen Eigenschaften des verwendeten spaltbaren Cross-Linkers BuUrBu wieder. Unter MS/MS-Bedingungen liegen ähnliche Stabilitäten für die CO-N-Bindungen der zentralen Harnstoff-Gruppe des Cross-Linkers und der Amidbindungen der Peptidrückgrate vor. So treten bei der Fragmentierung mittels CID oder HCD neben den Reporterionen des Cross-Linkers ebenfalls Peptidfragmentationen auf, welche die eindeutige Zuordnung der entsprechenden Peptide und in vielen Fällen auch die exakte Bestimmung der jeweils verknüpften Aminosäure in den Fragmentationenspektren ermöglichen. Andere spaltbare Cross-Linker, wie zum Beispiel DSSO, sind durch eine schwächere zentrale Bindung der Sulfoxid-Gruppe gekenn-

zeichnet. Diese fragmentiert bei geringerer Kollisionsenergie als die Amidbindung des Peptidrückgrates [193]. Dies resultiert in Fragmentationenspektren, welche ausschließlich Linker-fragmente enthalten und macht eine MS³-Strategie zur Sequenzierung der verknüpften Peptide unerlässlich. Die MS³-Daten sind meist von geringer Qualität, wenn Vorläuferionen mit niedriger Intensität fragmentiert werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, ETD und HCD sequenziell einzusetzen, um einmal durch HCD mit niedriger Kollisionsenergie nur Reporterionen zu erzeugen und zudem mittels ETD komplementäre Peptidrückgratinformationen zu erhalten [193]. Somit ist die Anwendung von DSSO auf eine Analyse mit MSⁿ-fähigen Massenspektrometern bzw. ETD- oder ECD-fähigen Geräten beschränkt. Für Cross-Linking-Analysen mit BuUrBu sind hingegen CID- oder HCD-MS/MS Experiment ausreichend, um Cross-Linking-Produkte eindeutig zu identifizieren. Daher kann jedes Massenspektrometer, das in der Lage ist, CID-basierte MS/MS-Daten zu generieren, verwendet werden, um den hier vorgestellten Arbeitsablauf zu nutzen.

Für die Analyse eines deutlich komplexeren Proteingemisches war der vorgestellte Arbeitsablauf weniger erfolgreich, was sich in der vergleichsweise geringen Zahl an eindeutig identifizierten Cross-Linking-Produkten ausdrückte. Eine Beschränkung der Ergebnisse durch eine FDR von 5% reduzierte die hohe Anzahl an identifizierten Kandidaten drastisch. Vergleicht man die Anzahl an eindeutig identifizierten Cross-Linking-Produkten im *E.coli*-Lysat mit denen der Einzelproteine, werden die Schwierigkeiten deutlich. Einerseits resultiert die häufige Koisolation von mehreren Vorläuferionen in komplexen Proben oft in gemischten Fragmentationenspektren. Dies macht eine eindeutige Zuordnung dieser Cross-Linking-Produkte für MeroX nahezu unmöglich. Weiterhin steigt mit zunehmender Komplexität die Anzahl an isobaren proteolytischen Peptiden. Für das *E.coli*-Lysat wurden einzelnen Fragmentationenspektren durchschnittlich fünf theoretisch passende, isobare Cross-Linking-Produkte zugeordnet. Eine eindeutige Zuordnung wäre nur durch eine vollständige Fragmentierung und einer damit verbundenen kompletten Sequenzabdeckung beider Peptide möglich. Eine geeignete Vorfraktionierung, wie mit einem starken Kationenaustauscher (SCX), könnte diese Probleme verringern. Ein automatisierter Arbeitsablauf basierend auf dem Cross-Linker DSSO und der Software XlinkX, beruhte auf der Vorfraktionierung eines HeLa-Zelllysates mit Hilfe von SCX. Anschließend wurden 28 dieser Fraktionen nochmals mittels Umkehrphasenchromatographie getrennt und massenspektrometrisch erfasst [193]. Verwendet wurden 60-minütige Gradienten, woraus sich mit Äquilibration und

Nachspülen des Systems bei gegebenen Flussraten von 200 nl/min ca. 80 Minuten pro LC-MS/MS-Analyse ergeben. Die Analyse eines HeLa-Zelllysates benötigt demnach mehrere Tage Messzeit. Unter diesem Aspekt stellt sich momentan das Ergebnis solcher Analysen, d.h. die Identifizierung von hauptsächlich intramolekularen Cross-Links von hochabundanten Proteinen aus Zelllysaten, noch als ungünstig im Verhältnis zum betriebenen Aufwand dar. Weitere Optimierungen, sowohl gerätetechnisch als auch hinsichtlich der spezifischen Anreicherung von Cross-Linking-Produkten, wird zukünftig die Identifizierung intermolekularer Cross-Linking-Produkte aus komplexen Proben erleichtern.

Zusammenfassend kann der hier beschriebene Arbeitsablauf als sehr zuverlässig in Hinsicht auf die strukturbasierte Cross-Linking/MS-Analytik gereinigter Proteinsysteme beschrieben werden. Durch die parallele Identifizierung von BuUrBu-spezifischen Reporterionen und Fragmentationen des Peptidrückgrates in den Fragmentationenspektren können alle hochauflösenden Massenspektrometer mit Tandem-MS-Funktion, wie z.B. Q-TOF oder Orbitrap Q-Exactive Massenspektrometer, für entsprechende Analysen verwendet werden.

5.6 Vergleichbarkeit von Cross-Linking-Daten

Ein Vergleich von Cross-Linking-Daten, die von unterschiedlichen Arbeitsgruppen erzeugt wurden, ist keinesfalls trivial. So gibt es derzeit keine klaren Richtlinien zur Darstellung der Ergebnisse von Cross-Linking-Analysen. Zudem werden viele verschiedene Softwarelösungen für die Analyse von Cross-Linking-Produkten angeboten. Neben MeroX existieren XiSearch, XlinkX, Kojak, pLink und viele andere [96, 194-196]. Dabei variieren sowohl Eingabe- und Ausgabeformate der Daten, Benutzeroberflächen, Algorithmen und allgemeine Suchkriterien, die einen Vergleich der mit den verschiedenen Programmen erhaltenen Ergebnisse erschwert. Da es keine klaren Regeln zur Darstellung der Cross-Linking-Ergebnisse gibt, kommt es zu einer stark variierenden Anzahl an identifizierten Cross-Links. In dieser Arbeit wurden Redundanzen weitestgehend eliminiert. In anderen Studien wurden alle Fragmentationenspektren, die einem Cross-Linking-Produkt zugeordnet werden können, als einzigartig gezählt. Zudem werden Cross-Linking-Produkte, die in mehreren Modifikationsstufen (z.B. Methioninoxidation) identifiziert werden, oftmals als einzigartig eingestuft, obwohl der strukturelle Informationsgewinn identisch ist. So kann ein einziges Cross-Linking-Produkt, welches in vier verschiedenen Ladungszuständen, mit und ohne Methioninoxidation, sowie zu-

sätzlich mit einem zusätzlichen hydrolysierten Cross-Linker-Molekül modifiziert, identifiziert werden. Das ergäbe 16 individuelle Cross-Links, die jedoch nur eine Distanzinformation liefern. In dieser Arbeit stellt dies genau einen einzigartigen Cross-Link dar.

Eine weitere Herausforderung stellt die Differenzierung verschiedener Cross-Linking-Produkte dar. Dabei ist ein Cross-Link anhand der Masse des Vorläuferions nicht von der entsprechenden Aminosäuresequenz mit einer Trypsin-Fehlschnittstelle und einer Modifikation mit hydrolysiertem Cross-Linker („*dead-end*“) zu diskriminieren (Anhang Abb. A22). Um dennoch zwischen diesen beiden Spezies anhand der Fragmentationsspektren unterscheiden zu können, bedarf es einer kompletten Fragmentierung des Peptidrückrates beider verknüpfter Peptide. Da dies nicht immer gewährleistet ist, kann auf die Verwendung MS/MS-spaltbarer Cross-Linker zurückgegriffen werden. Lineare Peptide, die mit partiell hydrolysiertem Cross-Linker modifiziert sind, würden bei Verwendung von BuUrBu kein komplettes Dublett-Muster der Reporterionen liefern und sind klar von „wahren“ Cross-Linking-Produkten unterscheidbar. Spaltbare Cross-Linking-Reagenzien, wie BuUrBu, haben demzufolge das Potenzial mit Hilfe einer geeigneten Software die eindeutige Identifizierung von Cross-Linking-Produkten zu revolutionieren und die Technik einer breiten Masse an Anwendern zugänglich zu machen.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen für die Strukturaufklärung von IDPs im Allgemeinen und von p53 im Speziellen mittels Cross-Linking in Kombination mit hochaufgelöster MS gelegt. Die hier erhaltenen Daten widersprechen dem 3D-Strukturmodell von Tidow *et al.* [98], und sollen erneut zur Überprüfung des 3D-Modells von Okorokov *et al.* [99, 100] verwendet werden. Weiterhin sind IM-MS-Messungen mit dem gereinigten p53-Tetramer im DNA-gebundenen und -freien Zustand geplant. Die Berechnung der theoretischen CCS-Werte des 3D-Strukturmodells von Okorokov *et al.*, um eine mögliche Korrelation zu untersuchen.

Da die Anwendung von externen Cross-Linking-Reagenzien nur in bestimmten Maße erfolgreich war, besteht der nächste Schritt im Einbau unnatürlicher, Diazirin-haltiger Photo-Aminosäuren, wie Photo-Leucin und Photo-Methionin, um auch Cross-Linking-Informationen über die bisher strukturell ungeklärten Bereiche von p53 zu erhalten.

Die im Zuge dieser Arbeit erstmalig verwendete Kombinationsmethode aus Cross-Linking und nativer MS soll weiterentwickelt werden. Dabei soll die Anwendung weiterer Cross-Linking-Reagenzien für die Strukturaufklärung von p53 und die Übertragung der Methode auf weitere Proteinkomplexe geprüft werden. Eine Weiterentwicklung dieser Methode soll in der dissoziierbaren Fixierung von transienten Komplexen bestehen. Hierbei könnte durch die Verwendung von geringen Mengen DSSO ein Komplex kovalent verknüpft werden und dann mittels CID-Spaltung der zentralen Sulfoxid-Gruppe von DSSO aus dem Komplex entfernt werden. So können sowohl schwache Proteininteraktionen als auch transiente Komplexe identifiziert und deren Stöchiometrien bestimmt werden.

Literaturverzeichnis

1. Taniuchi, H. and C.B. Anfinsen, *An experimental approach to the study of the folding of staphylococcal nuclease*. J Biol Chem, 1969. **244**(14): p. 3864-75.
2. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973. **181**(4096): p. 223-30.
3. Wright, P.E. and H.J. Dyson, *Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm*. J Mol Biol, 1999. **293**(2): p. 321-31.
4. Uversky, V.N., J.R. Gillespie, and A.L. Fink, *Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?* Proteins, 2000. **41**(3): p. 415-27.
5. Dunker, A.K., et al., *Intrinsically disordered protein*. J Mol Graph Model, 2001. **19**(1): p. 26-59.
6. Tompa, P., *Intrinsically unstructured proteins*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(10): p. 527-33.
7. Tompa, P., *Unstructural biology coming of age*. Curr Opin Struct Biol, 2011. **21**(3): p. 419-25.
8. Sickmeier, M., et al., *DisProt: the Database of Disordered Proteins*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Database issue): p. D786-93.
9. *DisProt Database of protein disorder*. 2017; Available from: <http://www.disprot.org/>.
10. Garner, E., et al., *Predicting Disordered Regions from Amino Acid Sequence: Common Themes Despite Differing Structural Characterization*. Genome Inform Ser Workshop Genome Inform, 1998. **9**: p. 201-213.
11. He, B., et al., *Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview*. Cell Res, 2009. **19**(8): p. 929-49.
12. Monastyrskyy, B., et al., *Evaluation of residue-residue contact predictions in CASP9*. Proteins, 2011. **79 Suppl 10**: p. 119-25.
13. Tompa, P., *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*. 2009: CRC Press.
14. Pancsa, R. and P. Tompa, *Structural disorder in eukaryotes*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34687.
15. Pancsa, R. and P. Tompa, *Essential functions linked with structural disorder in organisms of minimal genome*. Biol Direct, 2016. **11**: p. 45.
16. Wright, P.E. and H.J. Dyson, *Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(1): p. 18-29.
17. Berger, S.B., J. Bertin, and P.J. Gough, *Life after death: RIP1 and RIP3 move beyond necroptosis*. Cell Death Discov, 2016. **2**: p. 16056.
18. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches*. Annu Rev Biochem, 2016. **85**: p. 375-404.
19. Lane, D.P. and L.V. Crawford, *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature, 1979. **278**(5701): p. 261-3.
20. Linzer, D.I. and A.J. Levine, *Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells*. Cell, 1979. **17**(1): p. 43-52.
21. Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley, *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53*. Science, 1990. **248**(4951): p. 76-9.
22. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1129-36.
23. Sarnow, P., et al., *Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells*. Cell, 1982. **28**(2): p. 387-94.

24. Eliyahu, D., et al., *Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 646-9.
25. Parada, L.F., et al., *Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 649-51.
26. Eliyahu, D., D. Michalovitz, and M. Oren, *Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic*. Nature, 1985. **316**(6024): p. 158-60.
27. Finlay, C.A., P.W. Hinds, and A.J. Levine, *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation*. Cell, 1989. **57**(7): p. 1083-93.
28. Hinds, P., C. Finlay, and A.J. Levine, *Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation*. J Virol, 1989. **63**(2): p. 739-46.
29. Rotter, V. and D. Wolf, *Biological and molecular analysis of p53 cellular-encoded tumor antigen*. Adv Cancer Res, 1985. **43**: p. 113-41.
30. Wolf, D., et al., *Isolation of a full-length mouse cDNA clone coding for an immunologically distinct p53 molecule*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(1): p. 127-32.
31. Nigro, J.M., et al., *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*. Nature, 1989. **342**(6250): p. 705-8.
32. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1233-8.
33. Donehower, L.A., et al., *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. Nature, 1992. **356**(6366): p. 215-21.
34. Palmero, E.I., et al., *Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome*. Curr Opin Oncol, 2010. **22**(1): p. 64-9.
35. Bartek, J., et al., *Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro*. Int J Cancer, 1990. **46**(5): p. 839-44.
36. Iggo, R., et al., *Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer*. Lancet, 1990. **335**(8691): p. 675-9.
37. el-Deiry, W.S., et al., *Definition of a consensus binding site for p53*. Nat Genet, 1992. **1**(1): p. 45-9.
38. Funk, W.D., et al., *A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(6): p. 2866-71.
39. Farmer, G., et al., *Wild-type p53 activates transcription in vitro*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 83-6.
40. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *Structural biology of the tumor suppressor p53*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 557-82.
41. Flatt, P.M., et al., *p53-dependent expression of PIG3 during proliferation, genotoxic stress, and reversible growth arrest*. Cancer Lett, 2000. **156**(1): p. 63-72.
42. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
43. Levine, A.J., W. Hu, and Z. Feng, *The P53 pathway: what questions remain to be explored?* Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 1027-36.
44. Williams, A.B. and B. Schumacher, *p53 in the DNA-Damage-Repair Process*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(5).
45. Brooks, C.L. and W. Gu, *p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond*. Mol Cell, 2006. **21**(3): p. 307-15.
46. Toledo, F. and G.M. Wahl, *Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(12): p. 909-23.
47. Meek, D.W. and C.W. Anderson, *Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a000950.

48. Thut, C.J., et al., *p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60*. Science, 1995. **267**(5194): p. 100-4.
49. DeHart, C.J., et al., *Extensive post-translational modification of active and inactivated forms of endogenous p53*. Mol Cell Proteomics, 2014. **13**(1): p. 1-17.
50. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): p. a000919.
51. Sun, P.D., C.E. Foster, and J.C. Boyington, *Overview of protein structural and functional folds*. Curr Protoc Protein Sci, 2004. **Chapter 17**: p. Unit 17 1.
52. Oldfield, C.J., V.N. Uversky, and A.K. Dunker, *Analysis of the Role of Intrinsic Disorder in Multiple Specificity*. J Biomol Struct Dyn, 2009. **26**(6): p. 807-807.
53. Kussie, P.H., et al., *Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain*. Science, 1996. **274**(5289): p. 948-53.
54. Gu, W., X.L. Shi, and R.G. Roeder, *Synergistic activation of transcription by CBP and p53*. Nature, 1997. **387**(6635): p. 819-23.
55. Dunker, A.K., et al., *Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks*. FEBS J, 2005. **272**(20): p. 5129-48.
56. Li, D.W., et al., *Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities*. Oncogene, 2006. **25**(21): p. 3006-22.
57. Mohan, A., et al., *Analysis of molecular recognition features (MoRFs)*. J Mol Biol, 2006. **362**(5): p. 1043-59.
58. Vacic, V., et al., *Characterization of molecular recognition features, MoRFs, and their binding partners*. J Proteome Res, 2007. **6**(6): p. 2351-66.
59. Popowicz, G.M., et al., *Molecular basis for the inhibition of p53 by Mdmx*. Cell Cycle, 2007. **6**(19): p. 2386-92.
60. Di Lello, P., et al., *Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIID and the activation domain of p53*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 731-40.
61. Teufel, D.P., et al., *Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7009-14.
62. Polley, S., et al., *Differential recognition of phosphorylated transactivation domains of p53 by different p300 domains*. J Mol Biol, 2008. **376**(1): p. 8-12.
63. Lambert, P.F., et al., *Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 33048-53.
64. Walker, K.K. and A.J. Levine, *Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15335-40.
65. Kay, B.K., M.P. Williamson, and M. Sudol, *The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains*. FASEB J, 2000. **14**(2): p. 231-41.
66. Toledo, F., et al., *Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(4): p. 1425-32.
67. Cho, Y., et al., *Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations*. Science, 1994. **265**(5170): p. 346-55.
68. Canadillas, J.M., et al., *Solution structure of p53 core domain: structural basis for its instability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2109-14.
69. Wang, Y., A. Rosengarth, and H. Luecke, *Structure of the human p53 core domain in the absence of DNA*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2007. **63**(Pt 3): p. 276-81.

70. Butler, J.S. and S.N. Loh, *Structure, function, and aggregation of the zinc-free form of the p53 DNA binding domain*. Biochemistry, 2003. **42**(8): p. 2396-403.
71. Duan, J. and L. Nilsson, *Effect of Zn²⁺ on DNA recognition and stability of the p53 DNA-binding domain*. Biochemistry, 2006. **45**(24): p. 7483-92.
72. Bullock, A.N., et al., *Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14338-42.
73. Kaghad, M., et al., *Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers*. Cell, 1997. **90**(4): p. 809-19.
74. Yang, A., et al., *p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 305-16.
75. Kitayner, M., et al., *Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 741-53.
76. McLure, K.G. and P.W. Lee, *How p53 binds DNA as a tetramer*. EMBO J, 1998. **17**(12): p. 3342-50.
77. Jeffrey, P.D., S. Gorina, and N.P. Pavletich, *Crystal-Structure of the Tetramerization Domain of the P53 Tumor-Suppressor at 1.7 Angstroms*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1498-1502.
78. Clore, G.M., et al., *Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(4): p. 321-33.
79. Mateu, M.G. and A.R. Fersht, *Mutually compensatory mutations during evolution of the tetramerization domain of tumor suppressor p53 lead to impaired hetero-oligomerization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(7): p. 3595-3599.
80. Nicholls, C.D., et al., *Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12937-45.
81. Mujtaba, S., et al., *Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation*. Mol Cell, 2004. **13**(2): p. 251-63.
82. Friedler, A., et al., *Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation*. Structure, 2005. **13**(4): p. 629-36.
83. Weinberg, R.L., et al., *Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain*. J Mol Biol, 2004. **342**(3): p. 801-811.
84. Jensen, M.R., R.W. Ruigrok, and M. Blackledge, *Describing intrinsically disordered proteins at atomic resolution by NMR*. Curr Opin Struct Biol, 2013. **23**(3): p. 426-35.
85. Oldfield, C.J. and A.K. Dunker, *Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions*. Annu Rev Biochem, 2014. **83**: p. 553-84.
86. Turoverov, K.K., I.M. Kuznetsova, and V.N. Uversky, *The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation*. Prog Biophys Mol Biol, 2010. **102**(2-3): p. 73-84.
87. Dosztanyi, Z., et al., *IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content*. Bioinformatics, 2005. **21**(16): p. 3433-4.
88. Dosztanyi, Z., et al., *The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins*. J Mol Biol, 2005. **347**(4): p. 827-39.
89. Xue, B., A.K. Dunker, and V.N. Uversky, *Orderly order in protein intrinsic disorder distribution: disorder in 3500 proteomes from viruses and the three domains of life*. J Biomol Struct Dyn, 2012. **30**(2): p. 137-49.
90. Bai, X.C., G. McMullan, and S.H. Scheres, *How cryo-EM is revolutionizing structural biology*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**(1): p. 49-57.

91. Callaway, E., *The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology*. Nature, 2015. **525**(7568): p. 172-4.
92. Heck, A.J., *Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology*. Nat Methods, 2008. **5**(11): p. 927-33.
93. Uetrecht, C., et al., *Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies*. Chem Soc Rev, 2010. **39**(5): p. 1633-55.
94. Hoffmann, W., G. von Helden, and K. Pagel, *Ion mobility-mass spectrometry and orthogonal gas-phase techniques to study amyloid formation and inhibition*. Curr Opin Struct Biol, 2017. **46**: p. 7-15.
95. Sinz, A., *Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions*. Mass Spectrom Rev, 2006. **25**(4): p. 663-82.
96. Sinz, A., *The advancement of chemical cross-linking and mass spectrometry for structural proteomics: from single proteins to protein interaction networks*. Expert Rev Proteomics, 2014. **11**(6): p. 733-43.
97. Sinz, A., et al., *Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology*. Protein Sci, 2015. **24**(8): p. 1193-209.
98. Tidow, H., et al., *Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12324-9.
99. Okorokov, A.L., et al., *The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity*. EMBO J, 2006. **25**(21): p. 5191-200.
100. Aramayo, R., et al., *Quaternary structure of the specific p53-DNA complex reveals the mechanism of p53 mutant dominance*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(20): p. 8960-71.
101. Shakked, Z., *Quaternary structure of p53: the light at the end of the tunnel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12231-2.
102. Gross, J.A., *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*. ISBN978-3-8274-2980-3. 2013: Springer, Berlin Heidelberg.
103. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
104. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
105. Baldwin, M.A., *Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(1): p. 1-9.
106. Aebersold, R. and D.R. Goodlett, *Mass spectrometry in proteomics*. Chem Rev, 2001. **101**(2): p. 269-95.
107. Yates, J.R., C.I. Ruse, and A. Nakorchevsky, *Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications*. Annu Rev Biomed Eng, 2009. **11**: p. 49-79.
108. Dole, M., L.L. Mack, and R.L. Hines, *Molecular Beams of Macroions*. J Chem Phys, 1968. **49**(5): p. 2240-&.
109. Taylor, G., *Disintegration of Water Drops in Electric Field*. Proc R Soc Lon Ser-A, 1964. **280**(1380): p. 383-+.
110. Rayleigh, L., *On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses Charged With Electricity*. London, Edinburgh, Dublin Phil Mag J Sci 1882. **14**: p. 184-186.
111. Kebarle, P. and L. Tang, *From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry*. Anal Chem, 1993. **65**(22): p. A972-A986.
112. Konermann, L., *A simple model for the disintegration of highly charged solvent droplets during electrospray ionization*. J Am Soc Mass Spectrom, 2009. **20**(3): p. 496-506.

113. Mack, L.L., et al., *Molecular Beams of Macroions* .2. J Chem Phys, 1970. **52**(10): p. 4977-&.
114. Iribarne, J.V. and B.A. Thomson, *On the evaporation of small ions from charged droplets*. J Chem Phys, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.
115. Thomson, B.A. and J.V. Iribarne, *Field-Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric-Pressure*. J Chem Phys, 1979. **71**(11): p. 4451-4463.
116. Stephens, W.E., *A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion*. Phys Rev, 1946. **69**(11-1): p. 691-691.
117. Mamyrin, B.A., *Laser-Assisted Reflectron Time-of-Flight Mass-Spectrometry*. Int J Mass Spectrom, 1994. **131**: p. 1-19.
118. Kingdon, K.H., *A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures*. Phys. Rev., 1923. **21**: p. 408-418.
119. Knight, R.D., *Storage of Ions from Laser-Produced Plasmas*. Appl Phys Lett, 1981. **38**(4): p. 221-223.
120. Makarov, A., et al., *Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer*. Anal Chem, 2006. **78**(7): p. 2113-20.
121. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
122. Eliuk, S. and A. Makarov, *Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2015. **8**: p. 61-80.
123. Mathieu, É., *Mémoire sur le mouvement vibratoire d'une membrane de forme elliptique*. Journal de Mathématiques Pures et Appliquées, 1868: p. 137-203.
124. Senko, M.W., et al., *Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates*. Anal Chem, 2013. **85**(24): p. 11710-4.
125. Sobott, F., et al., *A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies*. Anal Chem, 2002. **74**(6): p. 1402-7.
126. Morris, H.R., et al., *High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1996. **10**(8): p. 889-96.
127. McLafferty, F.W., et al., *Application of Collisional Activation Spectra to Elucidation of Organic Ion Structures*. J Am Chem Soc, 1973. **95**(12): p. 3886-3892.
128. Olsen, J.V., et al., *Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis*. Nat Methods, 2007. **4**(9): p. 709-12.
129. Syka, J.E., et al., *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9528-33.
130. Biemann, K., *Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure*. Biomed Environ Mass Spectrom, 1988. **16**(1-12): p. 99-111.
131. Roepstorff, P. and J. Fohlman, *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biomed Mass Spectrom, 1984. **11**(11): p. 601.
132. Sinz, A., *Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes*. J Mass Spectrom, 2003. **38**(12): p. 1225-37.
133. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. 2013, Elsevier LTD: Oxford.
134. Piotrowski, C., C.H. Ihling, and A. Sinz, *Extending the cross-linking/mass spectrometry strategy: Facile incorporation of photo-activatable amino acids into the model protein calmodulin in Escherichia coli cells*. Methods, 2015. **89**: p. 121-7.
135. Muller, M.Q., et al., *Cleavable cross-linker for protein structure analysis: reliable identification of cross-linking products by tandem MS*. Anal Chem, 2010. **82**(16): p. 6958-68.

136. Kalkhof, S. and A. Sinz, *Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters*. Anal Bioanal Chem, 2008. **392**(1-2): p. 305-12.
137. Gotze, M., et al., *Automated assignment of MS/MS cleavable cross-links in protein 3D-structure analysis*. J Am Soc Mass Spectrom, 2015. **26**(1): p. 83-97.
138. Hernandez, H. and C.V. Robinson, *Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 715-26.
139. Benesch, J.L. and B.T. Ruotolo, *Mass spectrometry: come of age for structural and dynamical biology*. Curr Opin Struct Biol, 2011. **21**(5): p. 641-9.
140. Boeri Erba, E., et al., *Quantifying protein-protein interactions within noncovalent complexes using electrospray ionization mass spectrometry*. Anal Chem, 2011. **83**(24): p. 9251-9.
141. Morgner, N. and C.V. Robinson, *Massign: an assignment strategy for maximizing information from the mass spectra of heterogeneous protein assemblies*. Anal Chem, 2012. **84**(6): p. 2939-48.
142. Laganowsky, A., et al., *Mass spectrometry of intact membrane protein complexes*. Nat Protoc, 2013. **8**(4): p. 639-51.
143. Sharon, M., *Biochemistry. Structural MS pulls its weight*. Science, 2013. **340**(6136): p. 1059-60.
144. Sharon, M., *How far can we go with structural mass spectrometry of protein complexes?* J Am Soc Mass Spectrom, 2010. **21**(4): p. 487-500.
145. Dyachenko, A., et al., *Tandem Native Mass-Spectrometry on Antibody-Drug Conjugates and Submillion Da Antibody-Antigen Protein Assemblies on an Orbitrap EMR Equipped with a High-Mass Quadrupole Mass Selector*. Anal Chem, 2015. **87**(12): p. 6095-102.
146. Arlt, C., et al., *An Integrated Mass Spectrometry Based Approach to Probe the Structure of the Full-Length Wild-Type Tetrameric p53 Tumor Suppressor*. Angew Chem Int Ed Engl, 2017. **56**(1): p. 275-279.
147. Emamzadah, S., L. Tropia, and T.D. Halazonetis, *Crystal structure of a multidomain human p53 tetramer bound to the natural CDKN1A (p21) p53-response element*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(11): p. 1493-9.
148. Bich, C., et al., *Probing the hydrophobic effect of noncovalent complexes by mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2010. **21**(2): p. 286-9.
149. Meyer, T., X. de la Cruz, and M. Orozco, *An atomistic view to the gas phase proteome*. Structure, 2009. **17**(1): p. 88-95.
150. Ruotolo, B.T., et al., *Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes*. Nat Protoc, 2008. **3**(7): p. 1139-52.
151. Wyttenbach, T., et al., *Ion mobility analysis of molecular dynamics*. Annu Rev Phys Chem, 2014. **65**: p. 175-96.
152. Bleiholder, C. and M.T. Bowers, *The Solution Assembly of Biological Molecules Using Ion Mobility Methods: From Amino Acids to Amyloid beta-Protein*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2017. **10**(1): p. 365-386.
153. Chen, S.H. and D.H. Russell, *How Closely Related Are Conformations of Protein Ions Sampled by IM-MS to Native Solution Structures?* J Am Soc Mass Spectrom, 2015. **26**(9): p. 1433-43.
154. Sambrook, J.R., D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition*. Vol. 3rd Edition. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory.
155. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
156. Flegler, V., *Native Massenspektrometrie und chemische Quervernetzung zur Strukturuntersuchung des Tumorsuppressorproteins p53*, in *Pharmaceutical Chemistry and Bioanalytics*. 2016, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg: Halle (Saale).

157. Neuhoff, V., et al., *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. Electrophoresis, 1988. **9**(6): p. 255-62.
158. Simpson, R.J., *Rapid coomassie blue staining of protein gels*. Cold Spring Harb Protoc, 2010. **2010**(4): p. pdb prot5413.
159. Zhang, H., et al., *Carboxyl-group footprinting maps the dimerization interface and phosphorylation-induced conformational changes of a membrane-associated tyrosine kinase*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(6): p. M110 005678.
160. Gotze, M., et al., *StavroX--a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies*. J Am Soc Mass Spectrom, 2012. **23**(1): p. 76-87.
161. Lebendiker, M. and T. Danieli, *Production of prone-to-aggregate proteins*. FEBS Lett, 2014. **588**(2): p. 236-46.
162. Veprintsev, D.B. and A.R. Fersht, *Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(5): p. 1589-98.
163. Tanaka, H., et al., *A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage*. Nature, 2000. **404**(6773): p. 42-9.
164. Taverner, T., et al., *Characterization of an antagonist interleukin-6 dimer by stable isotope labeling, cross-linking, and mass spectrometry*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46487-92.
165. Merkle, E.D., et al., *Mixed-isotope labeling with LC-IMS-MS for characterization of protein-protein interactions by chemical cross-linking*. J Am Soc Mass Spectrom, 2013. **24**(3): p. 444-9.
166. Pettelkau, J., et al., *Structural analysis of guanylyl cyclase-activating protein-2 (GCAP-2) homodimer by stable isotope-labeling, chemical cross-linking, and mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2013. **24**(12): p. 1969-79.
167. Grimm, M., et al., *xVis: a web server for the schematic visualization and interpretation of crosslink-derived spatial restraints*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(W1): p. W362-9.
168. Arlt, C., et al., *Integrated Workflow for Structural Proteomics Studies Based on Cross-Linking/Mass Spectrometry with an MS/MS Cleavable Cross-Linker*. Anal Chem, 2016. **88**(16): p. 7930-7.
169. Cino, E.A., et al., *Aggregation tendencies in the p53 family are modulated by backbone hydrogen bonds*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32535.
170. Allen, M.D. and R.N. Perham, *The catalytic domain of dihydrolipoyl acetyltransferase from the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of Bacillus stearothermophilus. Expression, purification and reversible denaturation*. FEBS Lett, 1997. **413**(2): p. 339-43.
171. Katz, C., et al., *Molecular basis of the interaction between the antiapoptotic Bcl-2 family proteins and the proapoptotic protein ASPP2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12277-82.
172. Rotem, S., et al., *The structure and interactions of the proline-rich domain of ASPP2*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18990-9.
173. Amartely, H., et al., *The STIL protein contains intrinsically disordered regions that mediate its protein-protein interactions*. Chem Commun (Camb), 2014. **50**(40): p. 5245-7.
174. Arbely, E., et al., *Acetylation of lysine 120 of p53 endows DNA-binding specificity at effective physiological salt concentration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(20): p. 8251-6.
175. Nikolova, P.V., et al., *Semirational design of active tumor suppressor p53 DNA binding domain with enhanced stability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14675-80.
176. Friedman, P.N., et al., *The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3319-23.
177. Rajagopalan, S., F. Huang, and A.R. Fersht, *Single-Molecule characterization of oligomerization kinetics and equilibria of the tumor suppressor p53*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(6): p. 2294-303.

178. Natan, E., et al., *Ultraslow oligomerization equilibria of p53 and its implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(34): p. 14327-32.
179. Pagel, K., et al., *Intrinsically disordered p53 and its complexes populate compact conformations in the gas phase*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(1): p. 361-5.
180. Winkelman, J.T., et al., *Multiplexed protein-DNA cross-linking: Scrunching in transcription start site selection*. Science, 2016. **351**(6277): p. 1090-3.
181. Kearns, S., et al., *Two p53 tetramers bind one consensus DNA response element*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(13): p. 6185-99.
182. Leitner, A., et al., *The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT*. Structure, 2012. **20**(5): p. 814-25.
183. Kalisman, N., C.M. Adams, and M. Levitt, *Subunit order of eukaryotic TRiC/CCT chaperonin by cross-linking, mass spectrometry, and combinatorial homology modeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(8): p. 2884-9.
184. Chen, Z.A., et al., *Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry*. EMBO J, 2010. **29**(4): p. 717-26.
185. Greber, B.J., et al., *Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome*. Nature, 2014. **505**(7484): p. 515-9.
186. Chen, Y., R. Dey, and L. Chen, *Crystal structure of the p53 core domain bound to a full consensus site as a self-assembled tetramer*. Structure, 2010. **18**(2): p. 246-56.
187. Demir, O., P.U. Jeong, and R.E. Amaro, *Full-length p53 tetramer bound to DNA and its quaternary dynamics*. Oncogene, 2017. **36**(10): p. 1451-1460.
188. Okorokov, A.L. and E.V. Orlova, *Structural biology of the p53 tumour suppressor*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(2): p. 197-202.
189. Pettelkau, J., *Massenspektrometrische Untersuchungen an Guanylatcyclase-aktivierenden Protein-2*, in *Pharmaceutical Chemistry and Bioanalytics*. 2015, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg: Halle (Saale).
190. Leitner, A., et al., *Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and protein complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(26): p. 9455-60.
191. Kao, A., et al., *Mapping the structural topology of the yeast 19S proteasomal regulatory particle using chemical cross-linking and probabilistic modeling*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(12): p. 1566-77.
192. Soderblom, E.J. and M.B. Goshe, *Collision-induced dissociative chemical cross-linking reagents and methodology: Applications to protein structural characterization using tandem mass spectrometry analysis*. Anal Chem, 2006. **78**(23): p. 8059-68.
193. Liu, F., et al., *Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry*. Nat Methods, 2015. **12**(12): p. 1179-84.
194. Fischer, L. and J. Rappsilber, *Quirks of Error Estimation in Cross-Linking/Mass Spectrometry*. Anal Chem, 2017. **89**(7): p. 3829-3833.
195. Liu, F., et al., *Optimized fragmentation schemes and data analysis strategies for proteome-wide cross-link identification*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15473.
196. Hoopmann, M.R., et al., *Kojak: efficient analysis of chemically cross-linked protein complexes*. J Proteome Res, 2015. **14**(5): p. 2190-8.
197. Schilling, B., et al., *MS2Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides*. J Am Soc Mass Spectrom, 2003. **14**(8): p. 834-50.

Anhang

Anhang Abbildungen

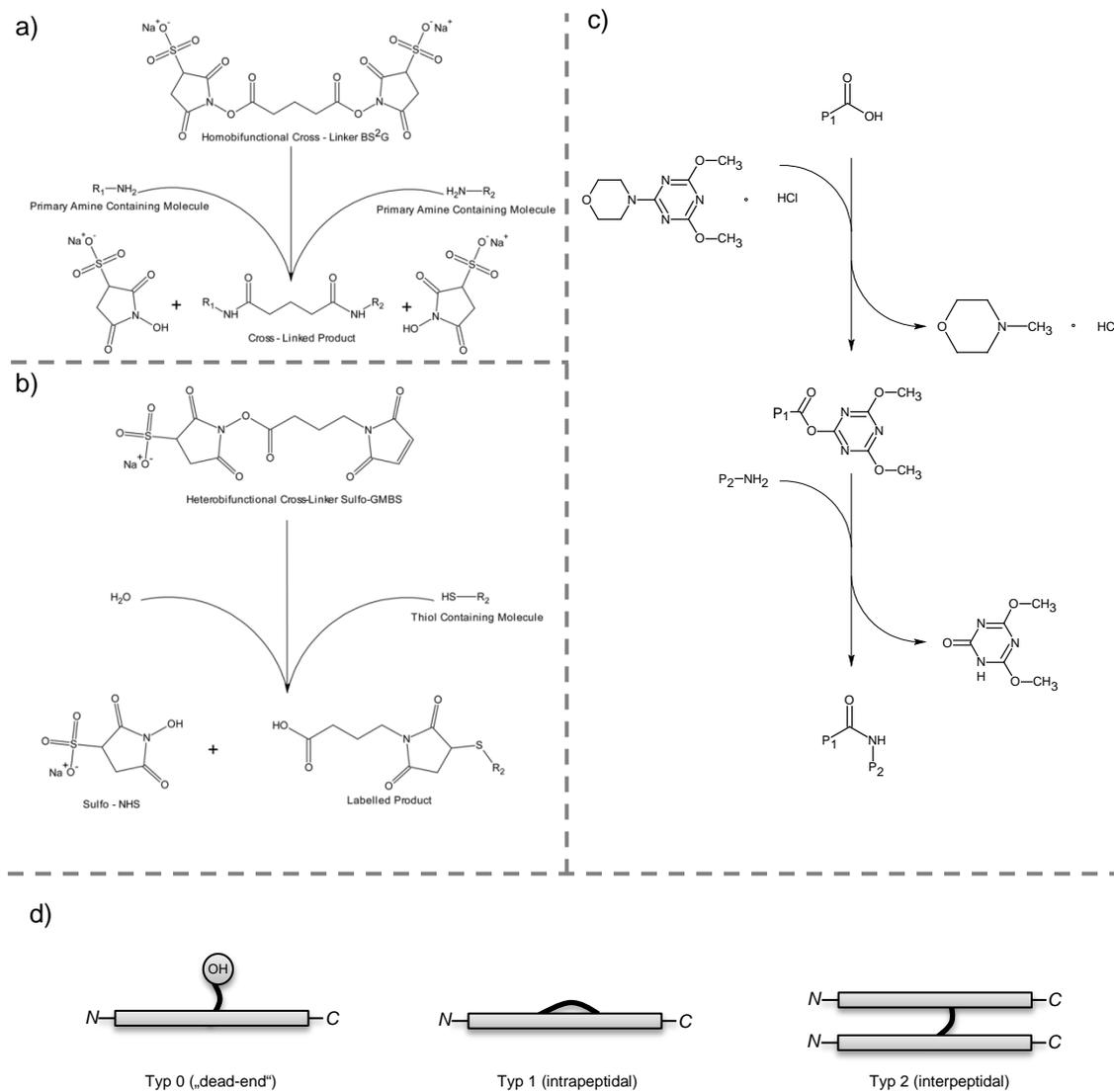
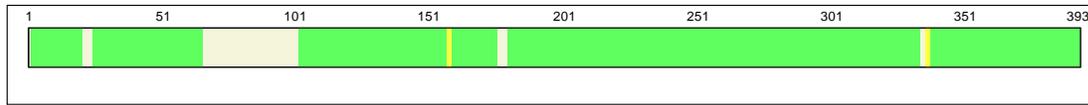


Abb. A1: Reaktionsschemata der verwendeten Cross-Linking-Reagenzien. Es sind die Reaktionen von **a)** Reaktion eines homobifunktionellen aminreaktiven Cross-Linkers am Beispiel von BS²G (BuUrBu analog), **b)** Sulfo-GMBS und **c)** DMTMM dargestellt; **d)** Die Nomenklatur der Cross-Linking-Produkte ist nach Schilling et al. angegeben [197].



ME**E**P**Q**S**D**P**S**V **E**P**P**L**S**Q**E**T**F**S DLWK**L**L**P**E**N**N V**L**S**P**L**S**P**S**Q**A**M **D**D**L**M**L**S**P**D**D**I **E**Q**W**F**T**E**D**P**G**P **D**E**A**P**R**M**P**E**A**A
PP**V**A**P**A**P**A**P** **T**P**A**A**P**A**P**A**P**S **W**P**L**S**S**S**V**P**S**Q **K**T**Y**Q**S**Y**G**F**R** **L**G**F**L**H**S**G**T**A**K **S**V**T**C**T**Y**S**P**A**L **N**K**M**F**C**Q**L**A**K**T
CP**V**Q**L**W**V**D**S**T **P**P**P**G**T**R**V**R**A**M **A**I**Y**Q**S**Q**H**M**T** **E**V**V**R**R**C**P**H**H**E **R**C**S**D**S**D**G**L**A**P **P**Q**H**L**I**R**V**E**G**N **L**R**V**E**Y**L**D**D**R**N
TF**R**H**S**V**V**V**P**Y **E**P**P**E**V**G**S**D**C**T **T**I**H**Y**N**M**C**N**S** **S**C**M**G**M**N**R**R**P** **I**L**T**I**T**L**E**D**S** **S**G**N**L**L**G**R**N**S**F **E**V**R**V**C**A**C**P**G**R
DR**R**T**E**E**N**L**R** **K**K**G**E**P**H**H**E**L**P **P**G**S**T**K**R**A**L**P**N **N**T**S**S**S**P**Q**P**K** **K**P**L**D**G**E**Y**F**T**L **Q**I**R**G**R**E**R**F**E**M **F**R**E**L**N**E**A**L**E**L
KD**A**Q**A**G**K**E**P**G **G**S**R**A**H**S**S**H**L**K **S**K**K**Q**S**T**S**R**H** **K**K**L**M**F**K**T**E**G**P **D**S**D**

Abb. A2: Identifizierung des humanen Vollängen-Wildtyp-p53 anhand der Aminosäuresequenz. Oben: Identifizierte Bereiche des Proteins sind grün hervorgehoben. Unten: Korrespondierende Aminosäuresequenz.

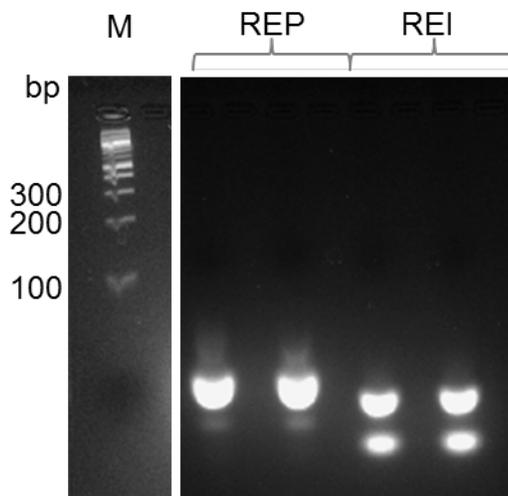


Abb. A3: Hybridisierung der verwendeten Response-Element DNA. Die Trennung erfolgte mit Hilfe eines 4,5%igen LE-Agarosegels.

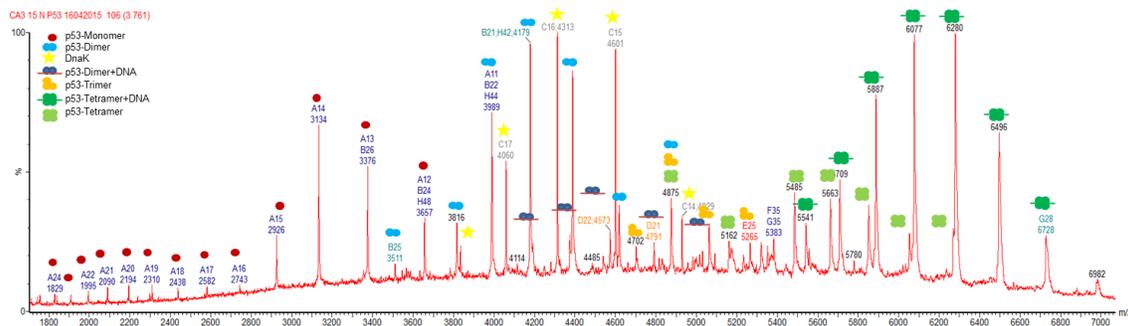


Abb. A4: Natives Massenspektrum von p53 in Anwesenheit von RE-DNA (REI): p53-Monomer (rot), p53-Dimer mit RE-DNA (dunkelblau) und ohne RE-DNA (hellblau), p53-Trimer (orange) und p53-Tetramer im Komplex mit RE-DNA (dunkelgrün) und ohne (hellgrün) sind detektierbar. Neben den p53 zugeordneten Signalen wurde DnaK (gelb) gefunden. Kollisionsenergie: 60 V.

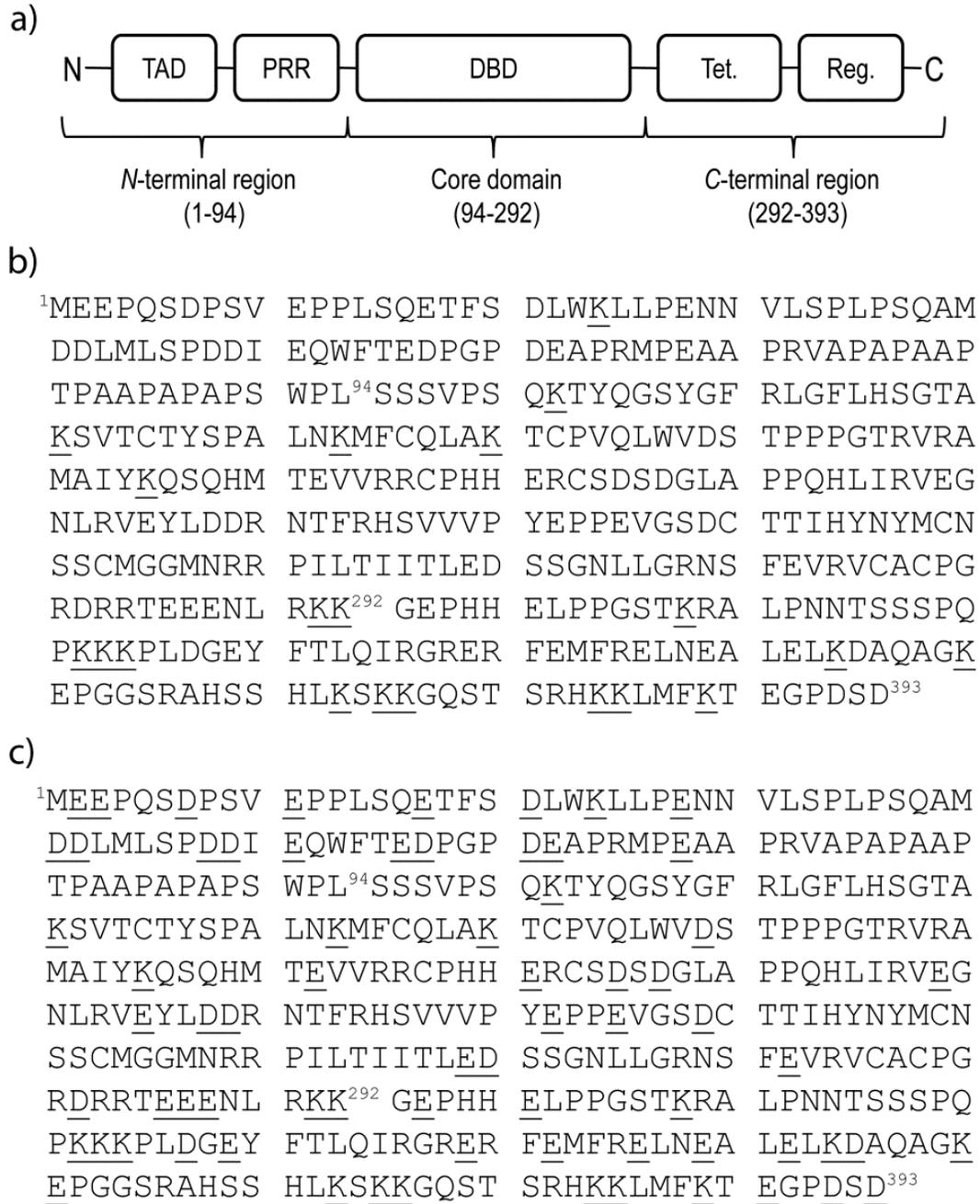


Abb. A5: Potenzielle Cross-Linking-Reaktionsstellen innerhalb der p53-Aminosäuresequenz. a) Schematische Darstellung der p53-Domänenstruktur b) Aminosäuresequenz mit hervorgehobenen Lysin c) Aminosäuresequenz mit hervorgehobenen Asparaginsäure-, Glutaminsäure- und Lysinresten.

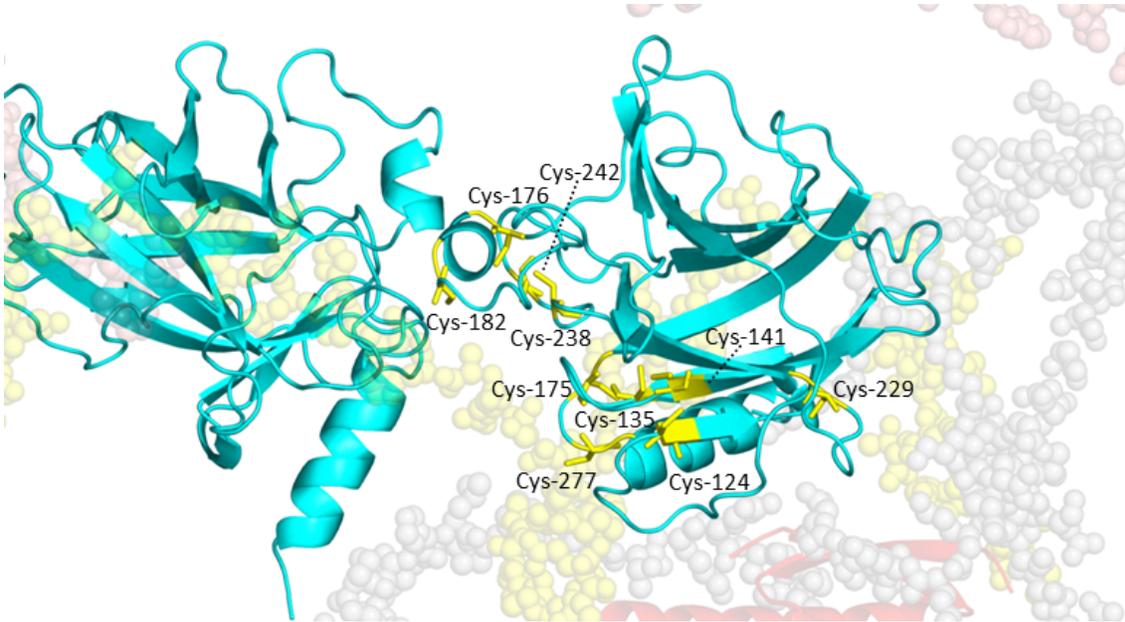


Abb. A6: Lokalisation der Cysteine in der DBD von p53. Die Darstellung wurde mit Hilfe des Strukturmodells von Tidow et al. (im DNA-freien, tetrameren Zustand) angefertigt. Die DBDs sind in „Cartoon-Darstellung“ (azur) abgebildet, Cysteine sind mittels „Stick-Darstellung“ (gelb) hervorgehoben.

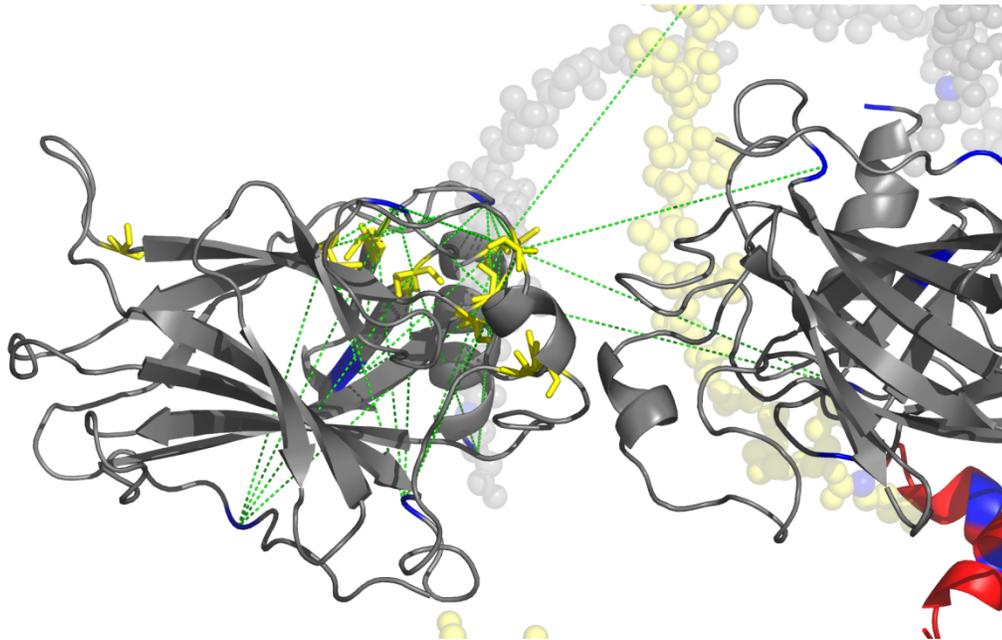
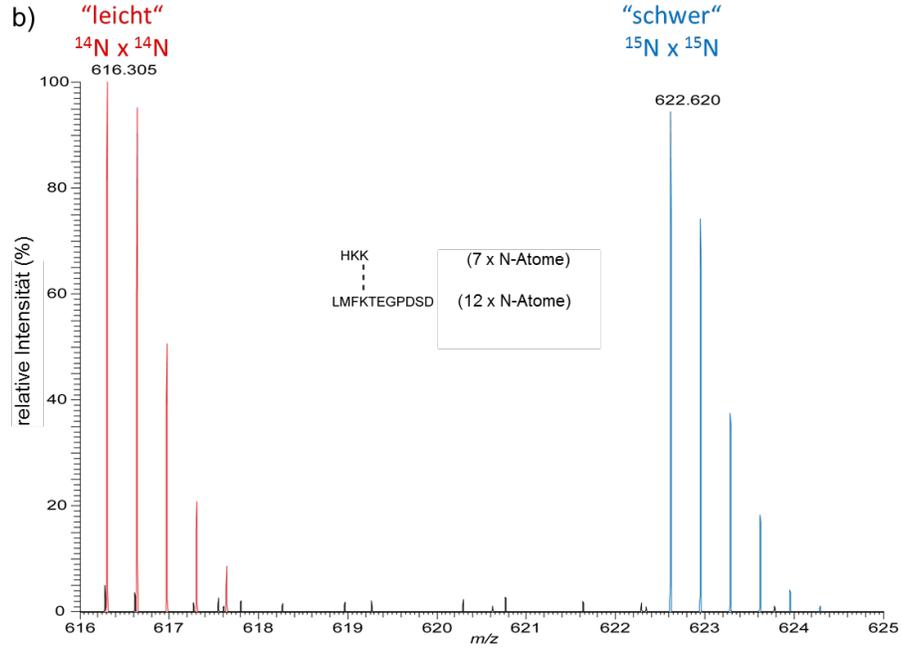
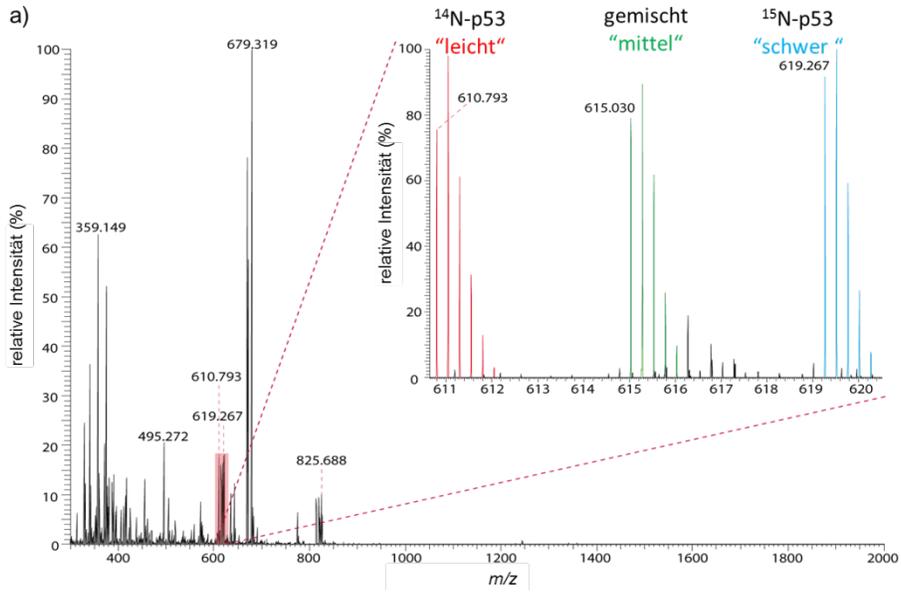


Abb. A7: Theoretisch mögliche Cross-Links mit Sulfo-GMBS anhand des p53-Tetramer Modells im DNA-freien Zustand. von Tidow et al. Die C_{α} - C_{α} -Distanzen, die von Sulfo-GMBS überbrückt werden können sind als grüne, gestrichelte Linien dargestellt. Cysteine sind gelb („Stick-Darstellung“) dargestellt; Lysine, deren C_{α} -Atom sich in einem maximalen Radius von 27 Å Entfernung befindet, sind blau hervorgehoben.



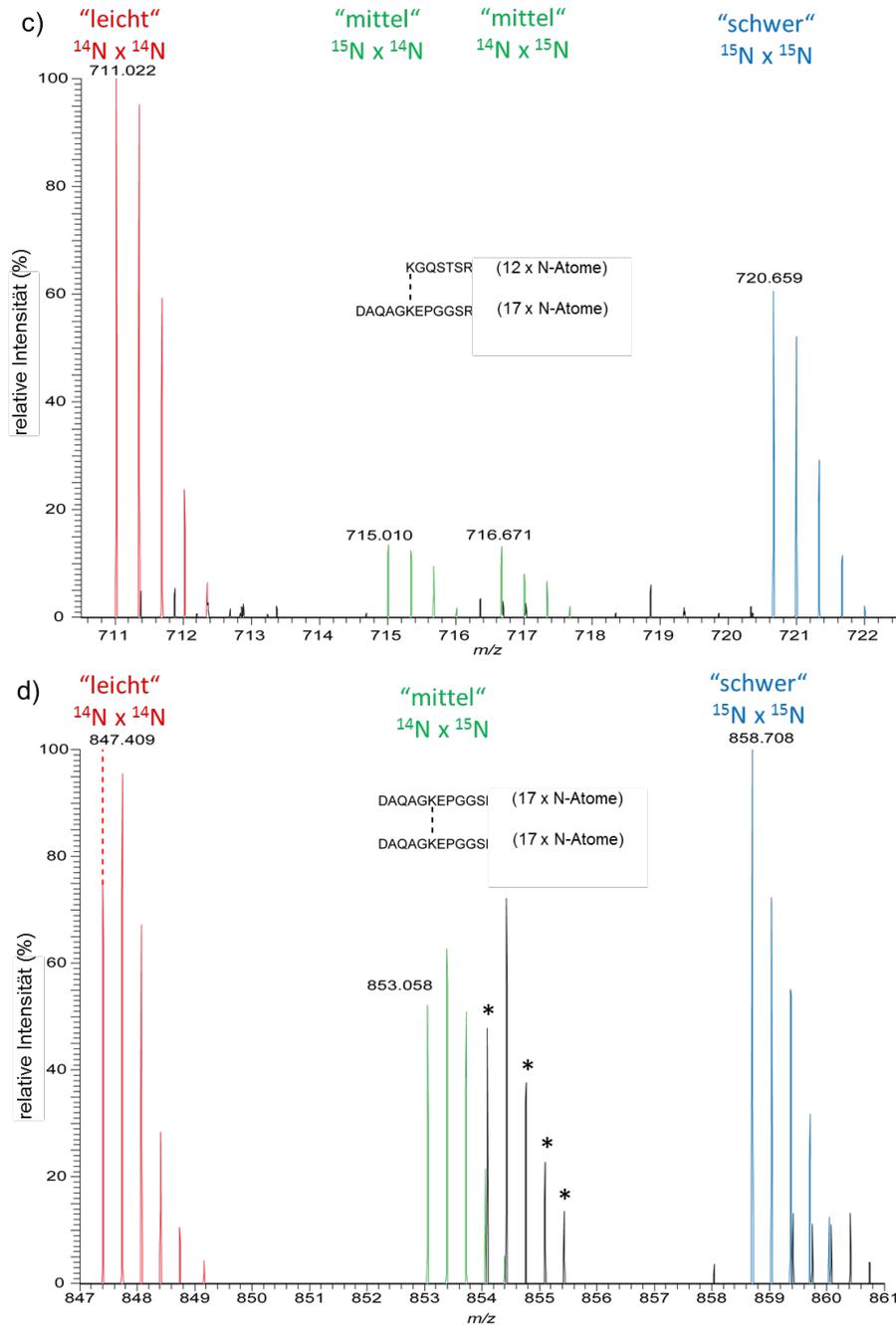


Abb. A8: Massenspektren ausgewählter BuUrBu-Cross-Linking-Produkte mit charakteristischen Isotopenmustern. Die charakteristischen Isotopenmuster aufgrund der Verwendung von ^{14}N - und ^{15}N -markiertem p53 hängen von der Anzahl der vorhandenen Stickstoffatome ab. **a)** Massenspektrum mit hervorgehobener Isotopenverteilung für einen intermolekularen Cross-Link im p53-Tetramer. **b)** Cross-Link zwischen zwei verschiedenen Peptiden eines Monomers (intramolekular). **c)** Massenspektrum eines Cross-Linking-Produkts zwischen zwei verschiedenen Peptiden mit unterschiedlicher Anzahl an Stickstoffatomen (intermolekular). **d)** Massenspektrum eines Cross-Linking-Produktes zwischen zwei identischen Peptiden mit gleicher Anzahl an Stickstoffatomen (intermolekular). * = Überlagerndes Isotopenmuster einer nicht identifizierten Ionenspezies.

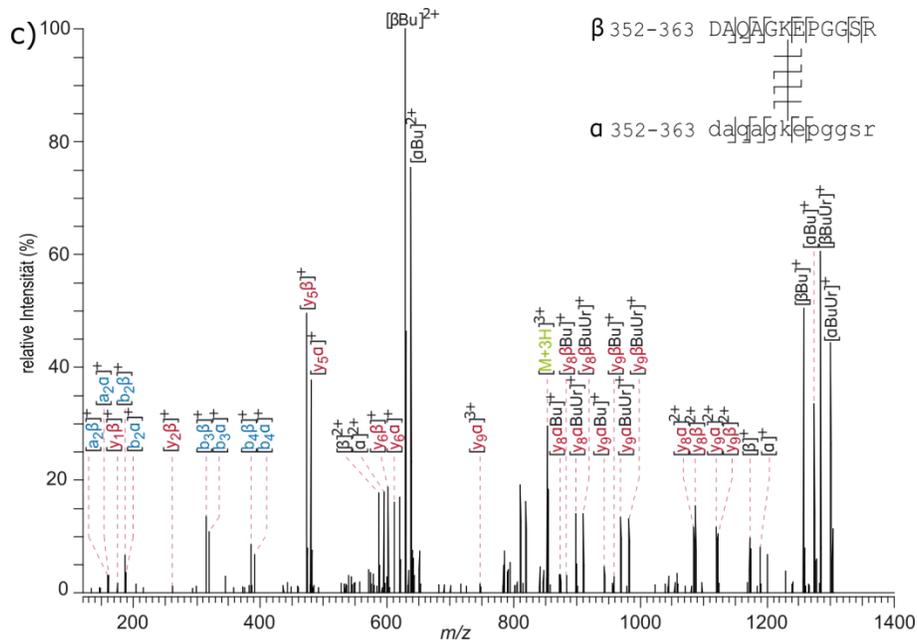


Abb. A9: Fragmentationsspektren eines intermolekularen BuUrBu-Cross-Links zwischen K-357 und K-357 im p53-Tetramers: HCD-MS/MS des a) dreifach positiv geladenen Vorläuferions bei m/z 847,409 (^{14}N -Spezies); b) dreifach positiv geladenen Vorläuferions bei m/z 858,708 (^{15}N -Spezies); c) dreifach positiv geladenen Vorläuferions bei m/z 853,058 ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Spezies und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Spezies); ^{14}N -Aminosäuren sind durch Großbuchstaben und ^{15}N -Aminosäuren durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Die Fragmentationen des b-Typs sind in blau und die des γ -Typs in rot dargestellt. Ionen, die das gesamte α - bzw. β -Peptid enthalten, sind schwarz, das Vorläuferion ist grün markiert.

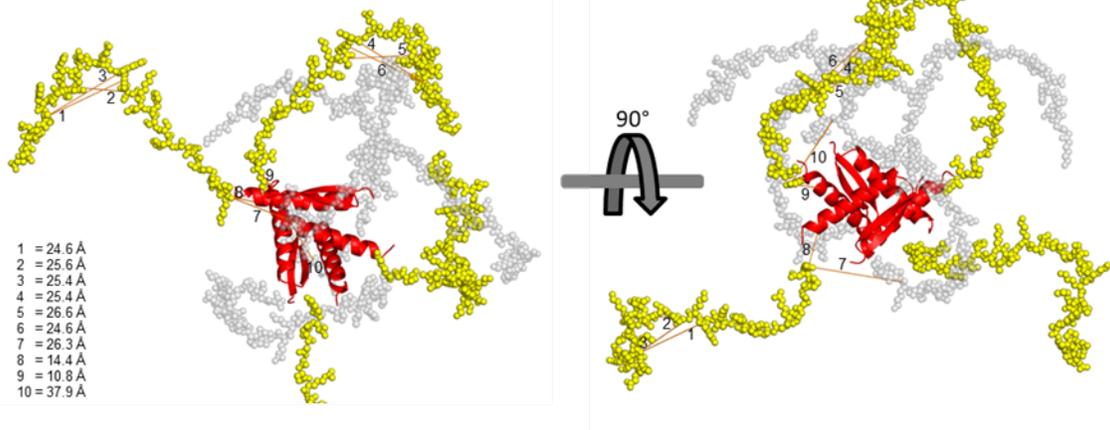


Abb. A10: Distanzen der mit BS²G erhaltenen intramolekularen Cross-Links anhand des Strukturmodells des p53-Tetramers im DNA-freien Zustand von Tidow et al. [98] Cross-Links sind als Linien (orange) dargestellt und nummeriert. Die entsprechenden Distanzen sind in der Legende angegeben. Der Übersichtlichkeit halber sind unbeteiligte Domänen ausgeblendet. Tetramerisierungsdomänen (rot) sind in „Cartoon-Darstellung“, Linker (grau) sowie regulatorische Domänen (gelb) sind in „Sphere-Darstellung“ abgebildet.

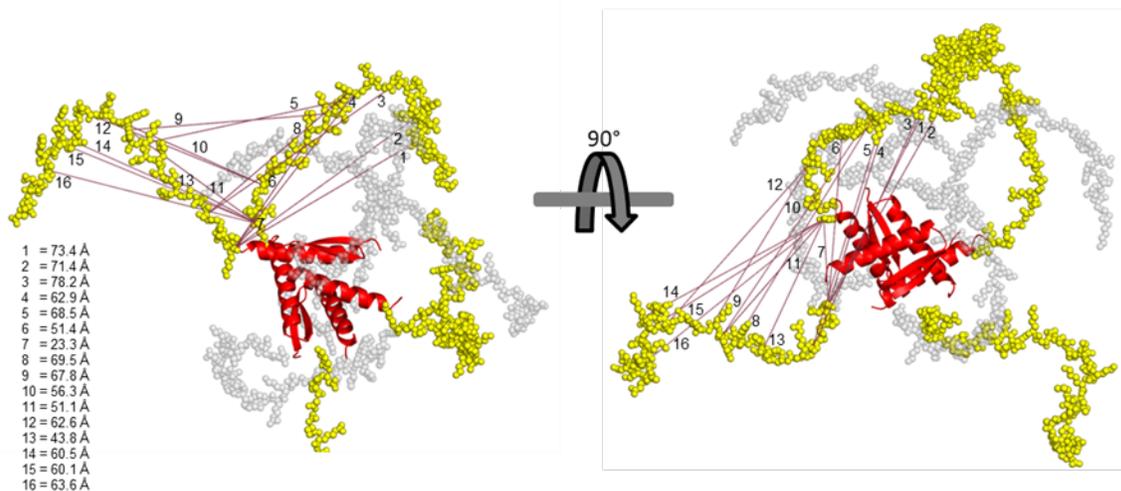


Abb. A11: Distanzen der mit BS²G erhaltenen intermolekularen Cross-Links anhand des Strukturmodells eines p53-Tetramers im DNA-freien Zustand. Cross-Links sind als Linien (rot) dargestellt und nummeriert. Die entsprechenden Distanzen sind in der Legende angegeben. Nicht involvierte Domänen wurden ausgeblendet. Tetramerisierungsdomänen (rot) sind in „Cartoon-Darstellung“, Linker (grau) sowie regulatorische Domänen (gelb) sind in „Sphere-Darstellung“ abgebildet.

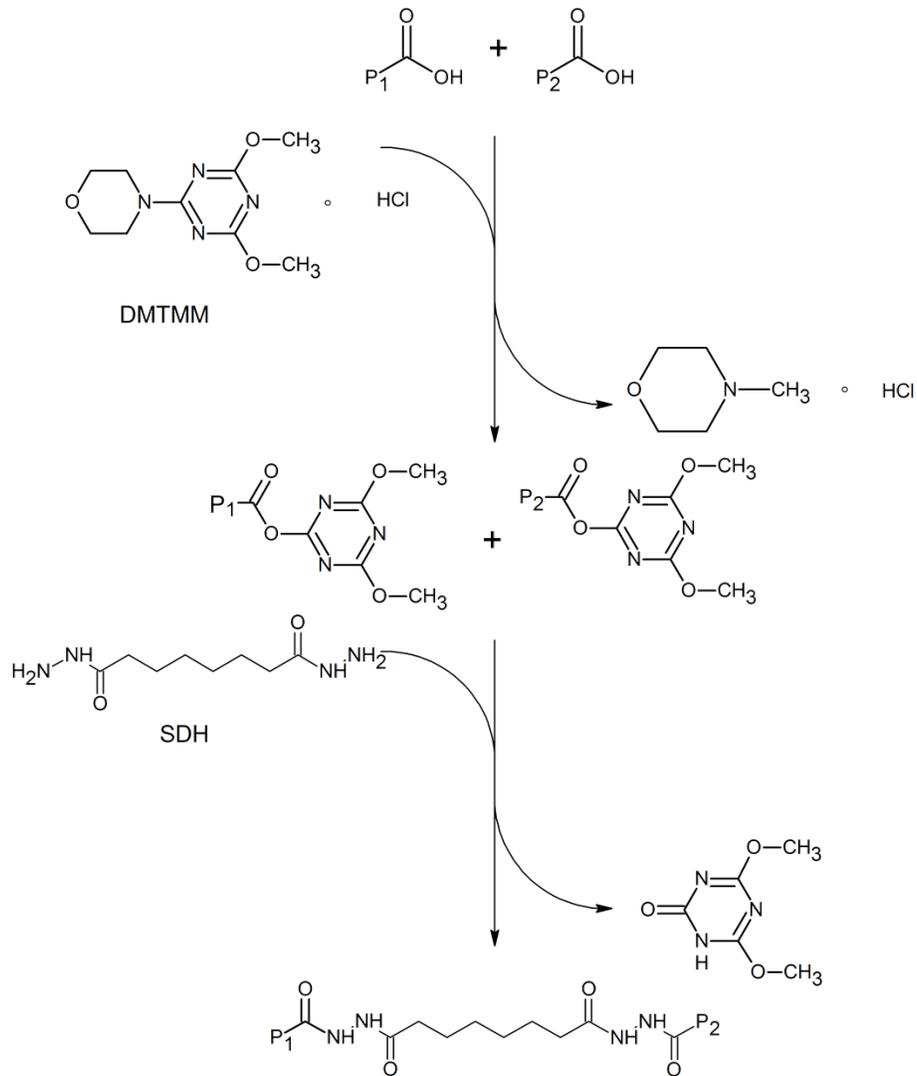


Abb. A12: Schematische Darstellung der Cross-Linking-Reaktion mit SDH. Carboxylgruppen von Asparaginsäure- und Glutaminsäureresten werden mit DMTMM aktiviert und reagieren anschließend weiter mit dem Dihydrazid SDH unter Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung.

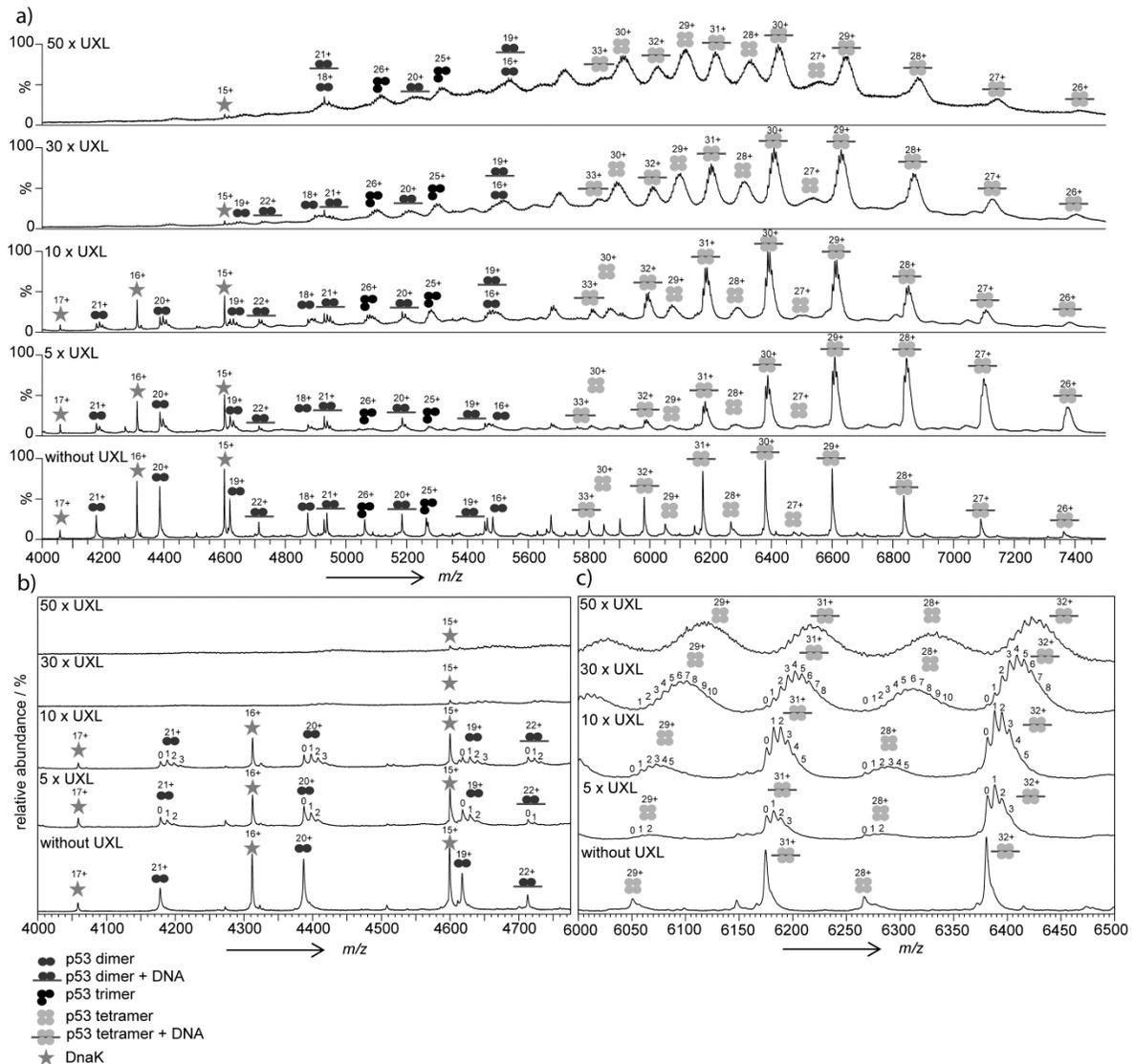


Abb. A13: „Native“ XL-MS von p53 in Anwesenheit von RE-DNA. **a)** Verwendung eines ansteigenden molaren Überschusses von BuUrBu (UXL) **b)** Vergrößerung des m/z-Bereiches von 4000-4800, in dem Signale für das p53-Dimer und DnaK zu finden sind; **c)** Vergrößerung des m/z-Bereiches 6000-6500 zeigt Signale für das p53-Tetramer (\pm DNA). Als Lösungsmittel wurde 500 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 6,8) verwendet. Die Spektren wurden an einem High-Mass Q-TOF II-Gerät unter identischen Bedingungen aufgenommen.

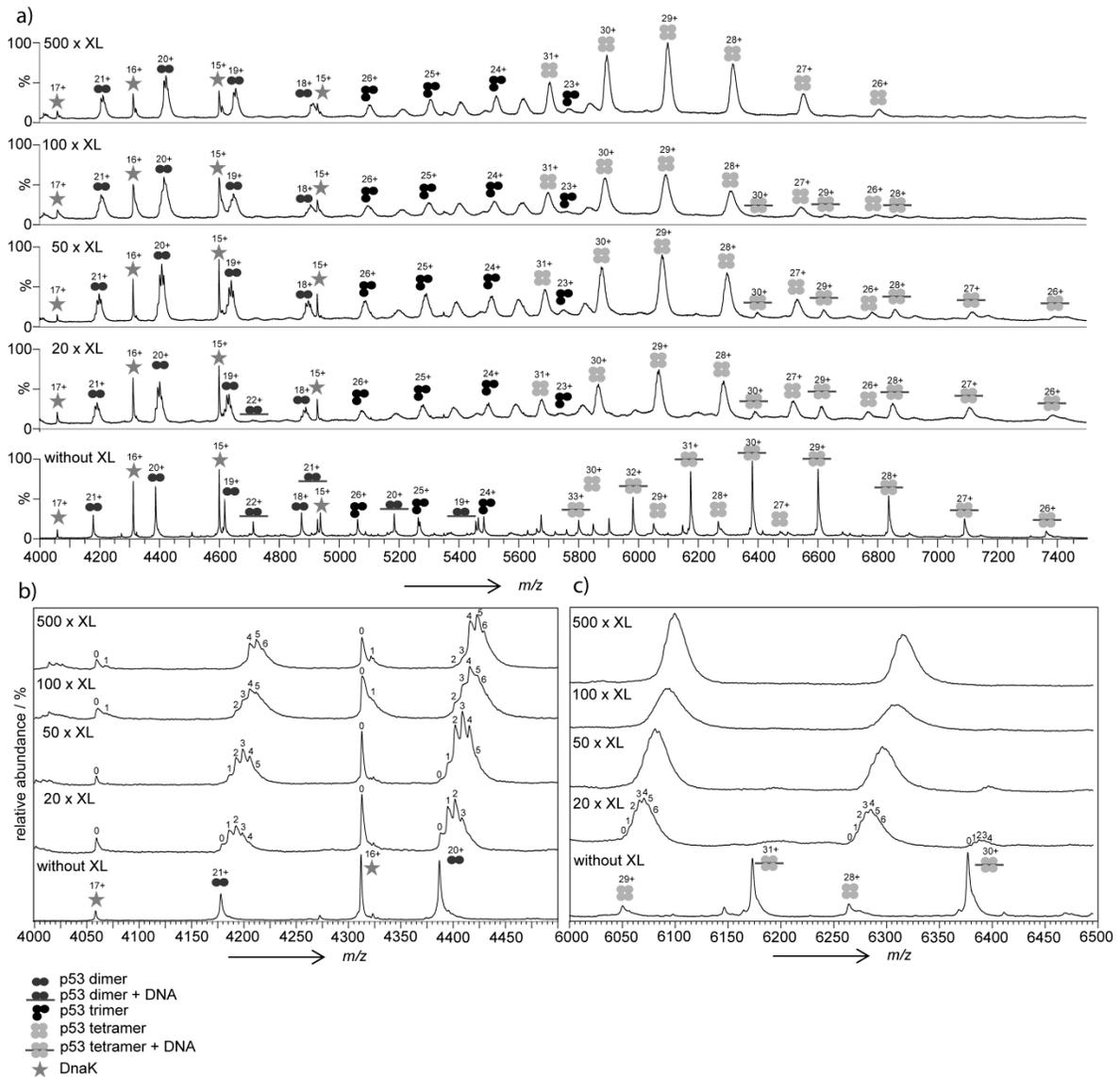
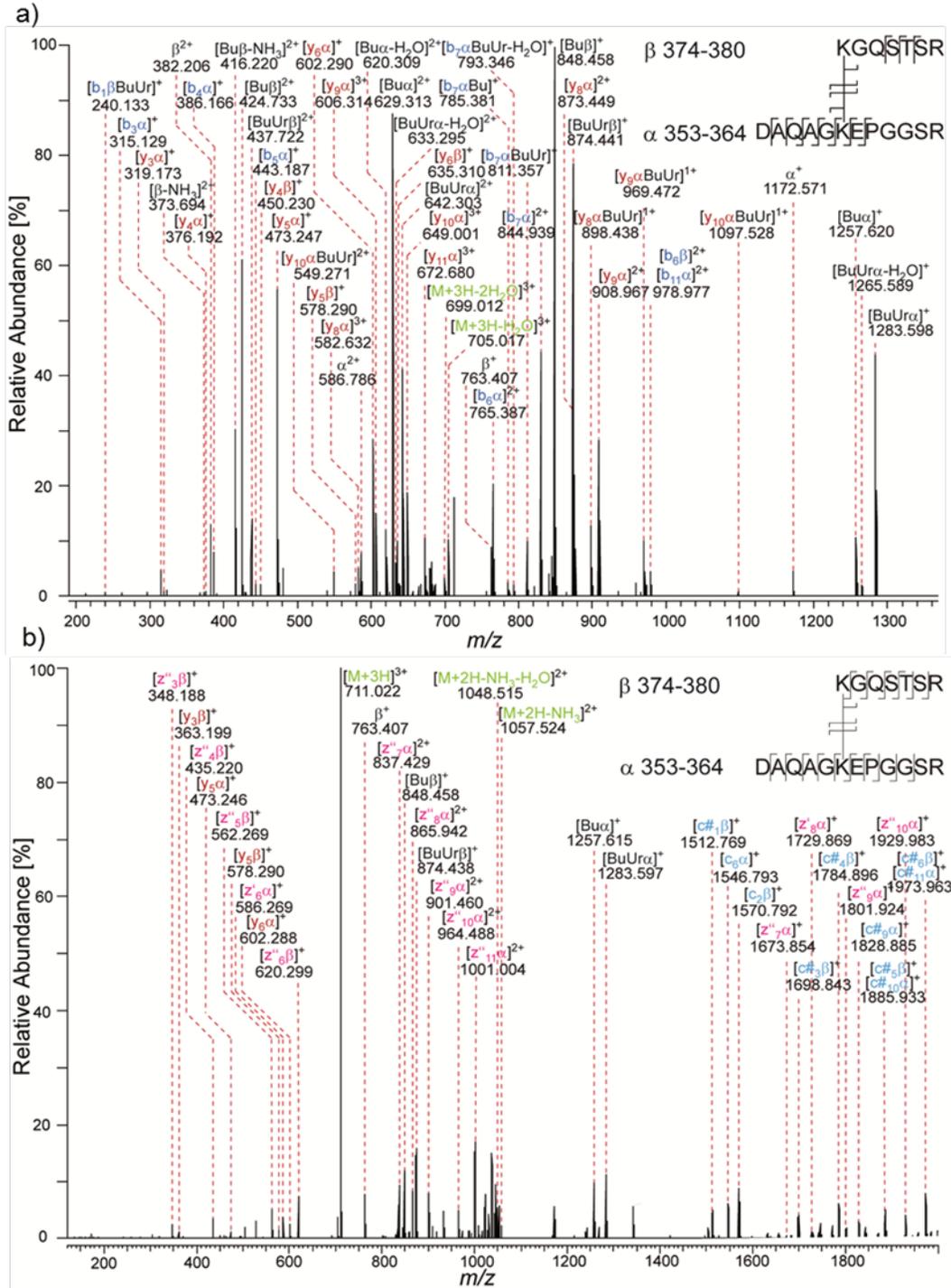


Abb. A14: „Native“ XL-MS von p53 in Anwesenheit von DNA. **a)** Verwendung eines ansteigenden molaren Überschusses des Cross-Linkers DMTMM (XL). **b)** Vergrößerung des m/z -Bereiches von 4000-4800, in dem Signale für das p53-Dimer und DnaK zu finden sind **c)** Vergrößerung des m/z -Bereiches 6000-6500 zeigt Signale für das p53-Tetramer (\pm DNA). Als Lösungsmittel wurde 500 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 6,8) verwendet. Die Spektren wurden an einem High-Mass Q-TOF II-Gerät unter identischen Bedingungen aufgenommen.



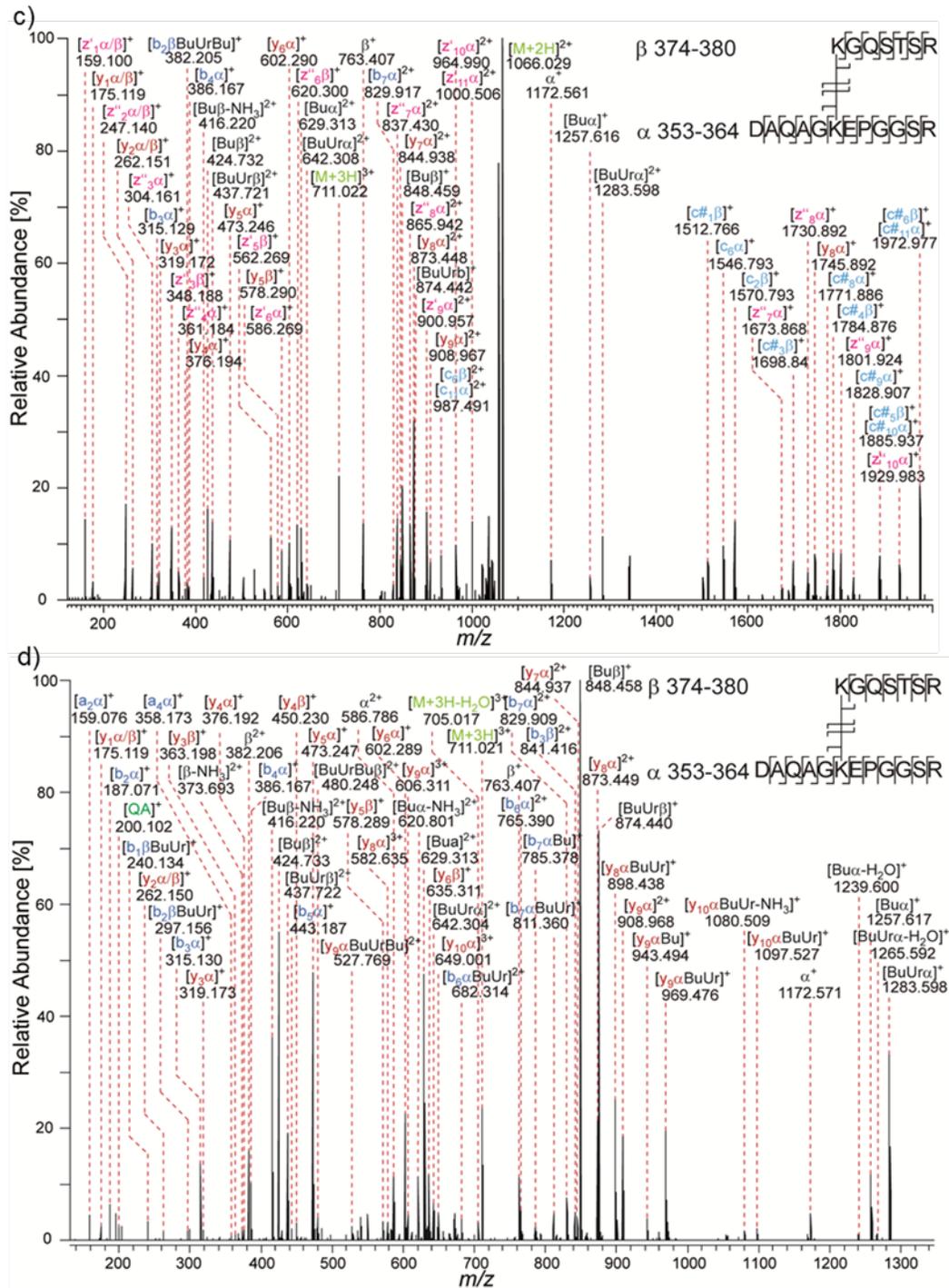


Abb. A15: Vergleich verschiedener Fragmentierungsmethoden anhand eines BuUrBu-Cross-Linking-Produktes von p53: Fragmentionenmassenspektrum des dreifach positiv geladenen Vorläuferions bei m/z 711.022 erzeugt mittels **a)** CID (NCE=30), **b)** ETciD(SA=30), **c)** EThcD (SA=29) und **d)** stepped HCD (NCE=29±3 %). Die Fragmentionen des b-Typs sind in blau und die des y-Typs in rot dargestellt. Ionen die das gesamte α/β -Peptid enthalten sind schwarz, das Vorläuferion grün und interne Fragmente ist dunkelgrün markiert.

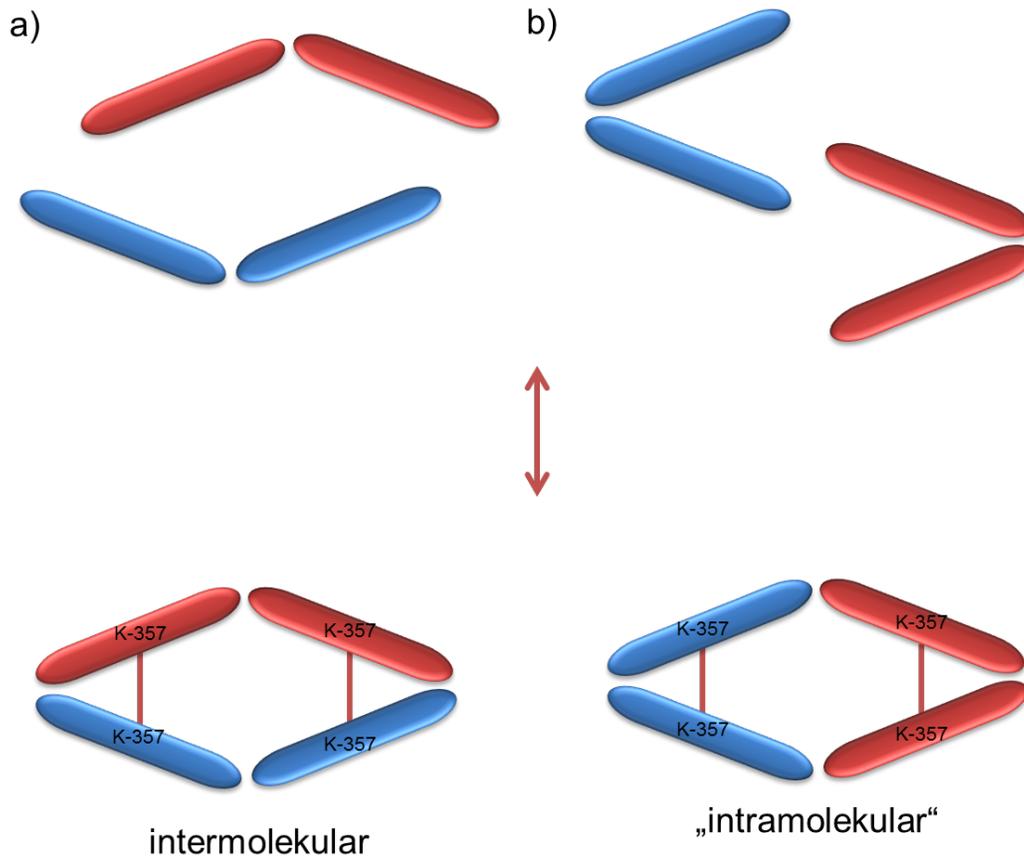


Abb. A16: Schematische Darstellung der Bildung des p53-Tetramers aus initialen ^{15}N -markierten (blau) und nicht-markierten (rot) p53-Dimeren. a) Assoziation unter Berücksichtigung des von Clore et al. beschriebenen Tetramerisierungsverhaltens der isolierten Tetramerisierungsdomäne [78]. b) Assoziation aus alternativen initialen Dimeren. Die Ausbildung eines intermolekularen Cross-Links zwischen den Lysinresten K-357 zweier p53-Monomere ist schematisch (roter Strich) dargestellt.

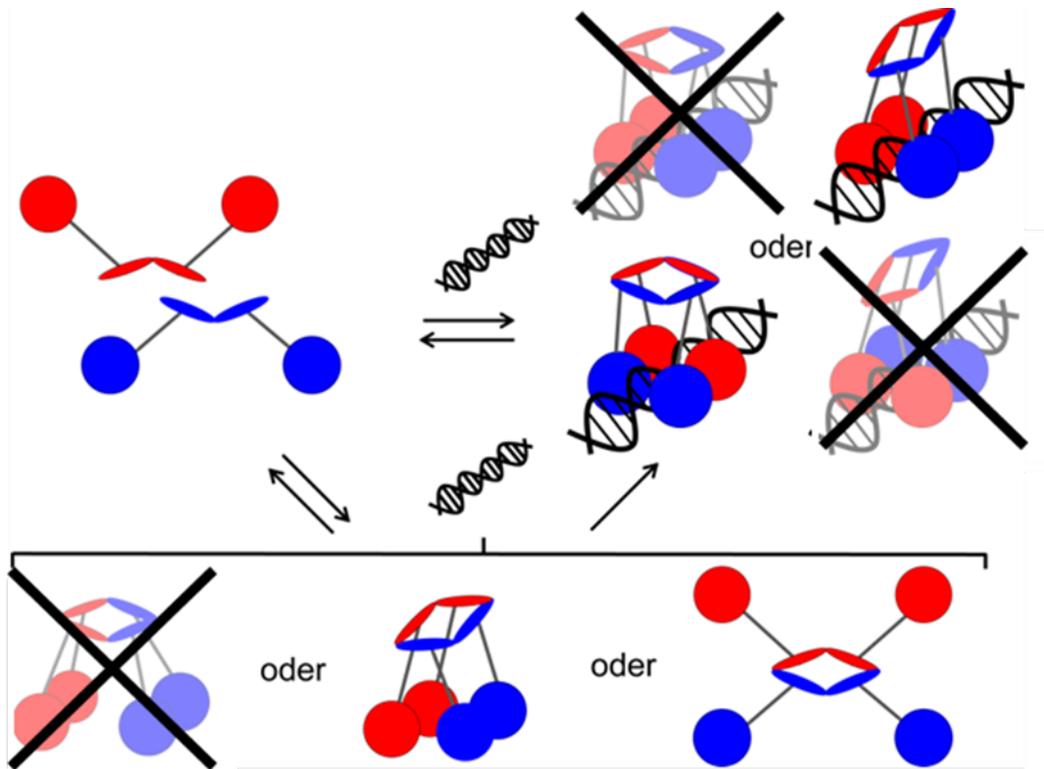


Abb. A17: Schematische Darstellung zur p53-Tetramerisation. Drei der Modelle könnten durch die Identifizierung eines intermolekularen Cross-Links zwischen den Lysinresten K-357 initialer Dimere ausgeschlossen werden. Es assoziieren initiale Dimere aus ^{15}N -markiertem- (blau) und nicht-markiertem p53 und bilden die tetramere Mischspezies.

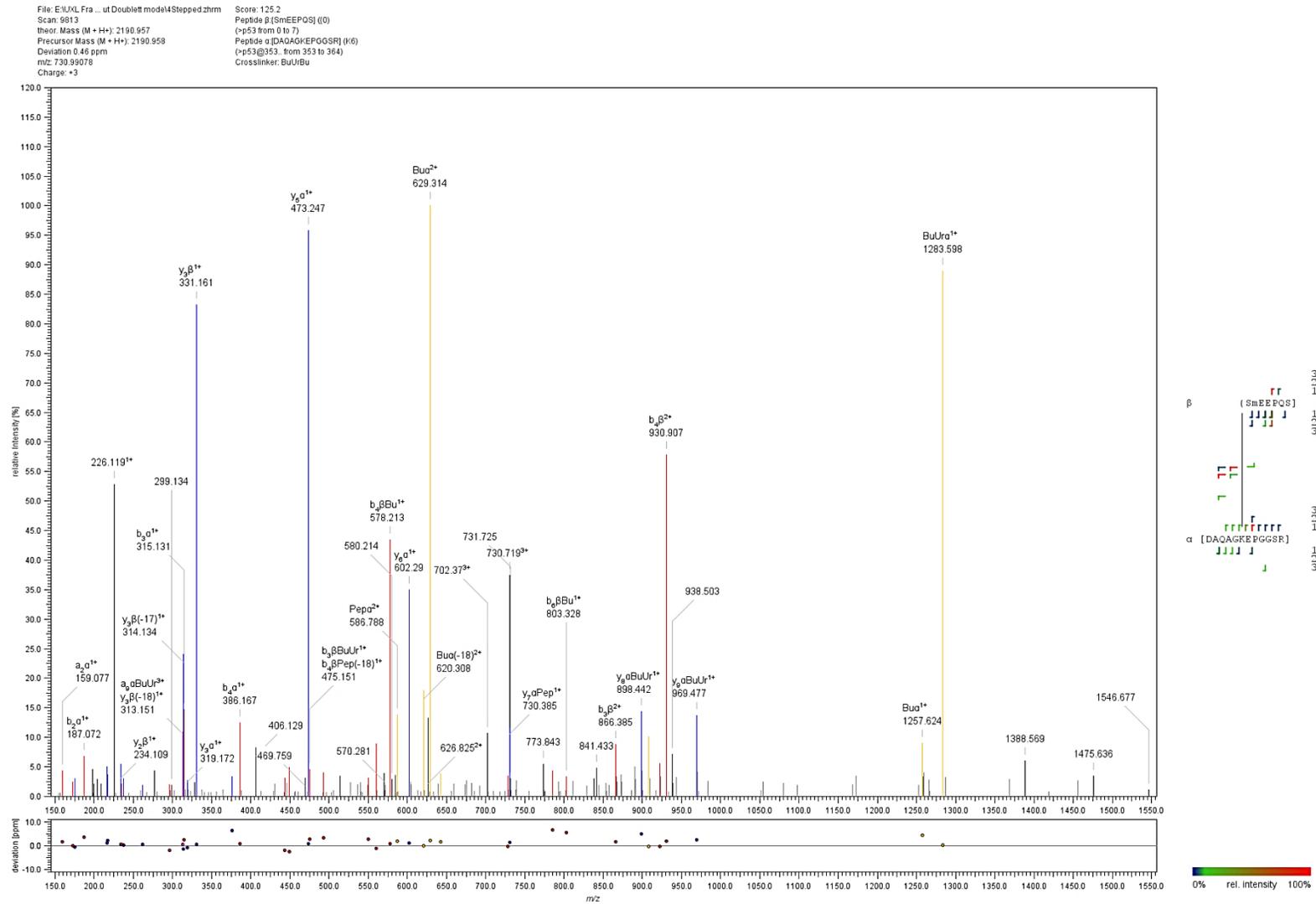


Abb. A18: Fragmentationenspektrum eines intramolekularer Cross-Link zwischen dem N-terminalen S-1 und K-357. Das Spektrum stellt die Ansicht der MeroX-Software dar.. Fragmentationen des α -Peptides (blau), des β -Peptides (rot) und Signale des Dublett-Musters von BuUrBu (gelb) sind farblich markiert.

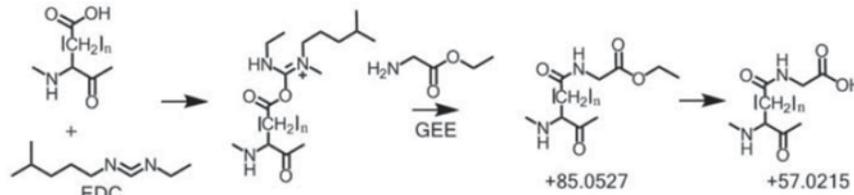


Abb. A20: Schematische Darstellung der Reaktion von Glycinethylester (GEE) zur Oberflächenkartierung von sauren Aminosäureresten. Die sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat werden mittels EDC aktiviert und mit GEE modifiziert. Abb. entnommen aus [156].

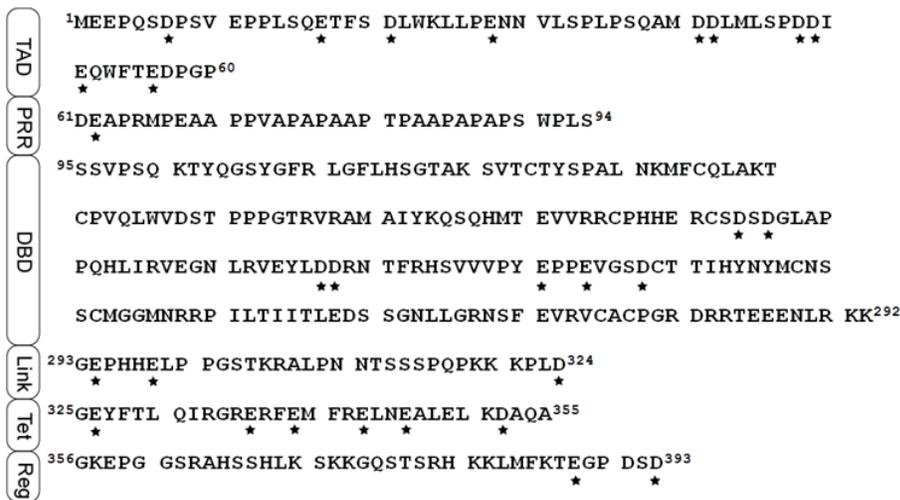


Abb. A21: Mit Glycinethylester (GEE) modifizierte Aminosäurereste in p53. Die modifiziert detektierten Aminosäuren sind durch einen Stern gekennzeichnet. Abb. entnommen aus [156].

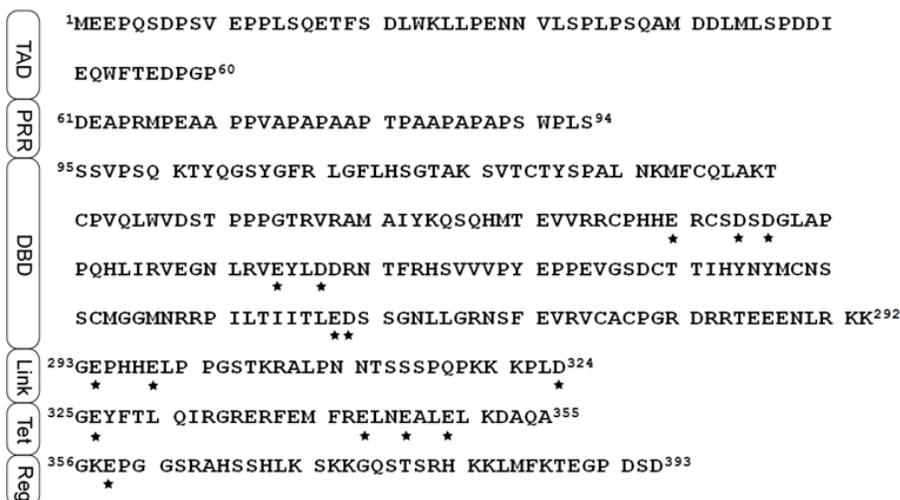


Abb. A22: Mit DMTMM modifizierte Aminosäurereste in p53. Die modifiziert detektierten Aminosäuren sind durch einen Stern gekennzeichnet. Abb. entnommen aus [156].

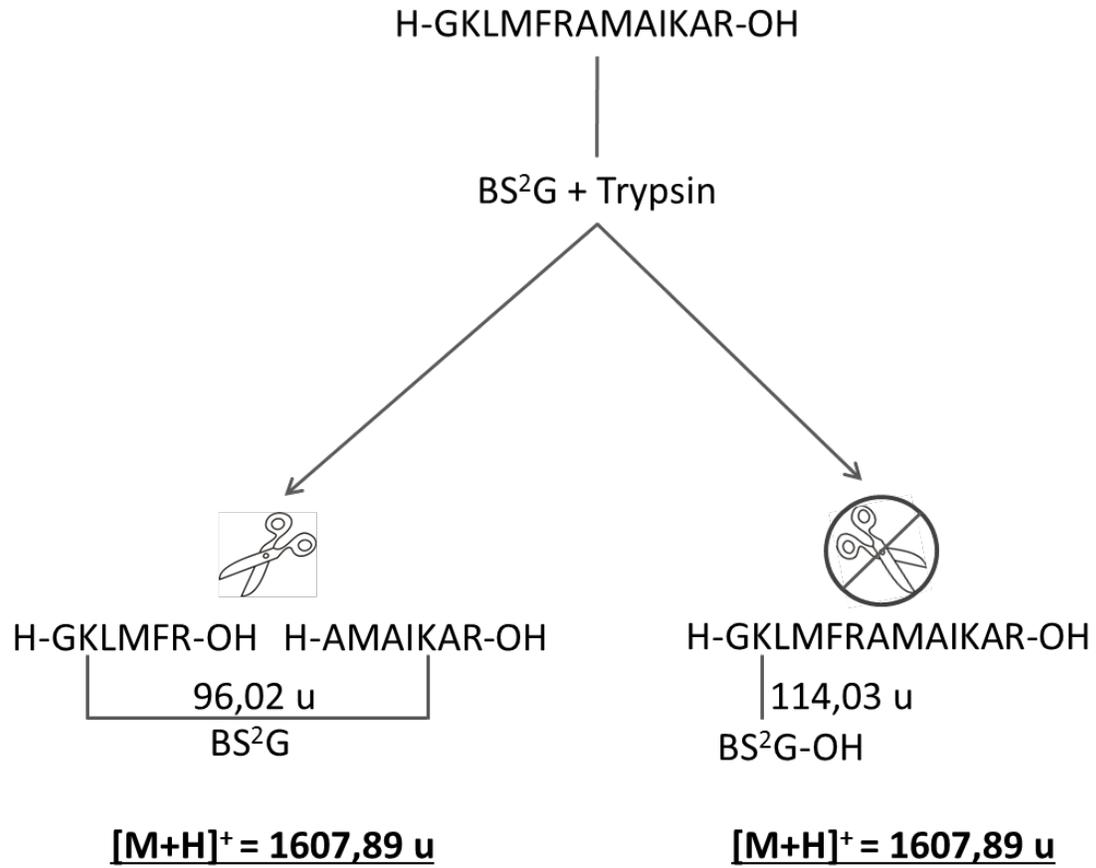


Abb. A22: Isobare Vorläuferionen eines Typ 0 und Typ 2 Cross-Links. Interpeptidaler (Typ 2) Cross-Link von Folgesequenzen und einem korrespondierendem linearen Peptid, das mit einem hydrolysiertem Cross-Linker modifiziert ist (Typ-0-Cross-Link).

Anhang Tabellen

Tabelle:A1: Modifizierung von Cysteinen der DBD von p53 in Abwesenheit von RE-DNA mit Sulfo-GMBS.

Aminosäure	Modifiziert	Lokalisation
Cys-124	+	β -sheet Sandwich, antiparallel
Cys-135	+	β -sheet Sandwich, antiparallel
Cys-141	+	β -sheet Sandwich, antiparallel
Cys-176	-	Zn ²⁺ -Bindestelle
Cys-182	+	DNA-Interaktionsfläche
Cys-229	-	β -sheet Sandwich, antiparallel
Cys-238	-	Zn ²⁺ -Bindestelle
Cys-242	-	Zn ²⁺ -Bindestelle
Cys-275	+	DNA-Interaktionsfläche
Cys-277	+	DNA-Interaktionsfläche

Anhang

Tabelle A2: Intra- und Intermolekulare BS²G-Cross-Linking-Produkte im p53-Tetramer im DNA-freien Zustand.

m/z exp.	[M+H] ⁺ theor.	z	Δm (ppm)	Cross-Linking-Position	Aminosäuresequenzen
819,703	2457,094	3	0,2	K-357 x K-357	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N)
814,054	2440,145	3	1,4	K-357 x K-357	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N)
825,354	2474,044	3	1,6	K-357 x K-357	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N)
615,029	2457,094	4	0,6	K-357 x K-357	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N)
610,792	2440,145	4	1,1	K-357 x K-357	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N)
619,267	2474,044	4	1,0	K-357 x K-357	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N)
619,630	1856,875	3	1,0	K-357 x K-357	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁵² DAQAGK ³⁵⁷ (¹⁴ N)
627,939	1881,801	3	1,0	K-357 x K-357	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁵² DAQAGK ³⁵⁷ (¹⁵ N)
625,280	1873,825	3	1,1	K-357 x K-357	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁵² DAQAGK ³⁵⁷ (¹⁴ N)
543,945	1629,819	3	1,0	K-357 x K-372 oder K-373	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁷¹ SKK ³⁷³ (¹⁴ N)
551,256	1651,754	3	0,6	K-357 x K-372 oder K-373	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁷¹ SKK ³⁷³ (¹⁵ N)
408,210	1629,819	4	-0.2	K-357 x K-372 oder K-373	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁷¹ SKK ³⁷³ (¹⁴ N)
413,694	1651,754	4	0.3	K-357 x K-372 oder K-373	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁷¹ SKK ³⁷³ (¹⁵ N)
688,654	2063,945	3	0.7	K-357 x S-366or S-367 oder K-370	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁴ N)
686,992	2058,960	3	1.0	K-357 x S-366 oder S-367 oder K-370	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁵ N)
683,004	2046,995	3	0.5	K-357 x S-366 oder S-367 oder K-370	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁴ N)

Anhang

<i>m/z</i> exp.	[M+H] ⁺ theor.	<i>z</i>	Δm (ppm)	Cross-Linking-Position	Aminosäuresequenzen
692,642	2075,909	3	0.4	K-357 x S-366 oder S-367 oder K-370	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁵ N)
516,741	2063,945	4	0.1	K-357 x K-370	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁴ N)
515,496	2058,960	4	1.1	K-357 x S-366 oder S-367 oder K-370	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁵ N)
512,505	2046,995	4	1.2	K-357 x S-366 oder S-367 oder K-370	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁴ N)
519,732	2075,909	4	0.3	K-357 x S-366 oder 367 oder K-370	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) B ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁵ N)
562,947	1686,825	3	-0.1	K-357 x K-381	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁸⁰ HKK ³⁸² (¹⁵ N)
560,620	1679,846	3	0.2	K-357 x K-381	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁸⁰ HKK ³⁸² (¹⁴ N)
568,596	1703,775	3	-0.2	K-357 x K-381	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁸⁰ HKK ³⁸² (¹⁵ N)
420,716	1679,846	4	-1.3	K-357 x K-381	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁸⁰ HKK ³⁸² (¹⁴ N)
426,699	1703,775	4	-1.0	K-357 x K-381	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁸⁰ HKK ³⁸² (¹⁵ N)
677,667	2030,985	3	0.6	S-362 x K-373 oder S-376 oder S-378 oder T-377	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁷³ KGQSTSR ³⁷⁹ (¹⁴ N)
687,305	2059,899	3	0.7	S-362 x K-373 oder S-376 oder S-378 oder T-377	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁷³ KGQSTSR ³⁷⁹ (¹⁵ N)
508,502	2030,985	4	0.8	S-362 x K-373	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁷³ KGQSTSR ³⁷⁹ (¹⁴ N)
515,731	2059,899	4	0.6	K-357 x K-373	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁷³ KGQSTSR ³⁷⁹ (¹⁵ N)
677,666	2030,985	3	-0.2	K-357 x K-373	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁷³ KGQSTSR ³⁷⁹ (¹⁴ N)
687,305	2059,899	3	0.2	K-357 x K-373	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁷³ KGQSTSR ³⁷⁹ (¹⁵ N)
645,332	1933,980	3	0.4	K-357 x K-373	α ³⁵² DAQAGKEP <u>GGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁸² KLMFK ³⁸⁶ (¹⁴ N)

Anhang

<i>m/z</i> exp.	[M+H] ⁺ theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	Cross-Linking-Position	Aminosäuresequenzen
653,308	1975,910	3	0.4	K-357 x K-373	α ³⁵² DAQAGK <u>EPGGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁸² KLMFK ³⁸⁶ (¹⁵ N)
484,250	1933,980	4	-1.1	K-357 x K-382 oder K-386	α ³⁵² DAQAGK <u>EPGGSR</u> ³⁶³ (¹⁴ N) β ³⁸² KLMFK ³⁸⁶ (¹⁴ N)
490,232	1957,907	4	-0.7	K-357 x K-382 oder K-386	α ³⁵² DAQAGK <u>EPGGSR</u> ³⁶³ (¹⁵ N) β ³⁸² KLMFK ³⁸⁶ (¹⁵ N)
623,663	1868,973	3	1.0	K-372 oder S-371 x K-370 oder S366 oder S-367	α ³⁶⁴ AHSSHLK <u>SK</u> ³⁷² (¹⁴ N) β ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁴ N)
632,636	1895,893	3	0.7	K-372 oder S-371 x K-370 oder S366 oder S-367	α ³⁶⁴ AHSSHLK <u>SK</u> ³⁷² (¹⁵ N) β ³⁶⁴ AHSSHLK ³⁷⁰ (¹⁵ N)

Anhang

Tabelle A3: Zusammenfassung BuUrBu-Cross-Linking-Produkte für p53 in An- und Abwesenheit von RE-DNA. RE- = in Abwesenheit von RE-DNA; REP und REI in Anwesenheit von RE-DNA (3.1.4).

β-Peptid	Sequenz	α-Peptid	Sequenz	Monomer			Dimer			Trimer			Tetramer			Intra/inter
				RE-	REI	REP	RE-	REI	REP	RE-	REI	REP	RE-	REI	REP	
[SKK]	372-374	[KLMFK]	383-387	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra
[SKK]	372-374	[AHSSHLKSK]	365-373	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	inter
[SKK]	372-374	[AHSSHLK]	365-371	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra
[HKK]	381-383	[AHSSHLKSK]	365-373	x	x	x	x	-	x	x	x	x	x	x	x	intra
[KL _M FK]	383-387	[(K)GQSTSR]	374-380	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra/inter
[KGQSTSR]	374-380	[LMFKTEGPDSD}	384-395	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra
[SKK]	372-374	[DAQAGKEPGGSR]	353-364	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra/inter
[HKK]	381-383	[DAQAGKEPGGSR]	353-364	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra/inter
[KKPL]	321-324	[DAQAGKEPGGSR]	353-364	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	"-"	intra
[KG _Q STSR]	374-380	[AHSSHLK]	365-371	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra/inter
[(K)G _Q STSR]	374-380	[AHSSHLKSK]	365-373	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra
[KGQSTSR]	374-380	[DAQAGKEPGGSR]	353-364	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra/inter
[AHSSHLK(SK)]	365373	[DAQAGKEPGGSR]	353-364	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra
[DAQAGKEPGGSR]	353-364	[(R)ALPNNTSSSPQPKK]	307-321	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra
[SKK]	372-374	[LMFKTEGPDSD}	384-395	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra/inter
[SKK]	372-374	[RALPNNTSSSPQPKK]	307-321	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	intra
[KLMFK]	383-387	[DAQAGKEPGGSR]	353-364	x	x	x	x	-	x	x	x	x	x	x	x	intra

Anhang

β -Peptid	Sequenz	α -Peptid	Sequenz	Monomer			Dimer			Trimer			Tetramer			Intra/inter
				RE-	REI	REP	RE-	REI	REP	RE-	REI	REP	RE-	REI	REP	
[HKK]	381-383	[LMFKTEGPDS}	384-395	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	inter
[KGQSTSR]	374-380	[KKGEPHH]	292-298	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	intra
[KGQSTSR]	374-380	[ALPNNTSSSPQPKK]	308-321	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	Intra/inter
[HKK]	381-383	[SKKGQSTSR]	372-380	x	x	x	-	-	x	x	x	x	x	-	x	intra/Inter

Danksagung

Für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die Vergabe des fordernden Themas, die Einführung in die Welt der Massenspektrometrie, danke ich von ganzem Herzen Frau Prof. Dr. Andrea Sinz. Vor allem möchte ich mich für das große Vertrauen, die stetige Diskussionsbereitschaft und stundenlange Anstarren gezeichneter Kügelchen mit den Aufschriften „L“ und „S“ bedanken. Herrn PD Dr. Ralph Golbik und Prof. Dr. Kevin Pagel danke ich recht herzlich für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Ein ganz besonderer Dank gilt ebenfalls allen früheren und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die die Zeit in- und außerhalb des Labors so angenehm gemacht haben. Ein besonderer Dank gebührt Christian I., für die Einführung in die Bedienung der HPLC- und Massenspektrometriesysteme, die stets ruhigen Antworten und Hilfe, wenn mal wieder etwas „komisch aussah“ oder „nicht ganz funktionierte“. Ebenfalls danke ich für die stets anregenden Diskussionen und nicht zuletzt die Geduld, die beim Korrekturlesen dieser Arbeit nötig war. Weiterhin danke ich Dirk, Konny, Romy, Jens P., Rico Schwarz, Rico Schmidt, Christine, Jana, Christoph, Björn und Anne für die tolle Zeit im Labor. Ein besonderer Dank gilt Vanessa, die durch ihre schnelle Auffassungsgabe und Eigeninitiative während ihrer Masterarbeit zu einer Publikation beitrug und mir Spaß an der Lehre brachte. So steuerten ihre Experimente wichtige Erkenntnisse bei, die bei der Entstehung dieser Arbeit halfen. Weiterhin danke ich Frau Nishnik, Frau Peters und Frau Mand für ihre stetige Unterstützung und die wunderbare Zeit. Michael G. danke ich für die exzellente Zusammenarbeit und Weiterentwicklung der StavroX- und MeroX-Software. Anregungen und Verbesserungsvorschläge wurden von Ihm immer danken angenommen und schnellstmöglich umgesetzt.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Albert J. Heck, Joost Snijder und Arjan Barendregt für den unvergesslichen Forschungsaufenthalt am Proteome Center Utrecht, Niederlande.

Weiterhin geht ein besonderer Dank an meine Freundin Anke, ohne die diese Arbeit vielleicht nie entstanden wäre. Sie hielt mir stets den Rücken frei und fand immer Zeit für aufmunternde Worte. Ebenso wie meine Eltern mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Natürlich danke ich auch meinen Freunden für tolle Spieleabende und auch mal eine Ablenkung vom Laboralltag. Ebenso danke ich auch allen hier nicht namentlich genannten Personen, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben.

Publikationen

Originalarbeiten

Arlt, C., Flegler, V., Ihling, C. H., Schäfer, M., Thondorf, I., and Sinz, A. (2017) An Integrated Mass Spectrometry Based Approach to Probe the Structure of the Full-Length Wild-Type Tetrameric p53 Tumor Suppressor. *Angew. Chemie Int. Ed.* **56**, 275-279

Bosse, K., Haneder, S., **Arlt, C.**, Ihling, C. H., Seufferlein, T., and Sinz, A. (2016) Mass spectrometry-based secretome analysis of non-small cell lung cancer cell lines. *Proteomics* **16**, 2801-2814

Arlt, C., Götze, M., Ihling, C. H., Hage, C., Schäfer, M., and Sinz, A. (2016) Integrated Workflow for Structural Proteomics Studies Based on Cross-Linking/Mass Spectrometry with an MS/MS Cleavable Cross-Linker. *Anal. Chem.* **88**, 7930-7937

Sinz, A., **Arlt, C.**, Chorev, D., and Sharon, M. (2015) Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology. *Protein Sci.* **24**, 1193-1209

Arlt, C., Ihling, C. H., and Sinz, A. (2015) Structure of full-length p53 tumor suppressor probed by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* **15**, 2746-2755

Pettelkau, J., Thondorf, I., Theisgen, S., Lilie, H., Schröder, T., **Arlt, C.**, Ihling, C. H., and Sinz, A. (2013) Structural analysis of guanylyl cyclase-activating protein-2 (GCAP-2) homodimer by stable isotope-labeling, chemical cross-linking, and mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **24**, 1969-1979

Vorträge

An Integrated Mass Spectrometry Based Approach to Probe the Structure of the Full-Length Wild-Type Tetrameric p53 Tumor Suppressor 50. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Kiel, 06.–08. Februar 2017*

Structural Investigation of the C-terminal Domain of Tumor suppressor p53 within the Homotetramer. *6th Symposium on Structural Proteomics, Dortmund, 17.–18. November 2016*

Structure of Full-Length p53 Tumor Suppressor Probed by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry. *49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Hamburg, 28. Februar – 02. März 2016*

Structure of Full-Length p53 Tumor Suppressor Probed by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry. *48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Wuppertal, 01.–03. März 2015*

Structural Investigation of the C-terminal Domain of Tumor suppressor p53 within the Homotetramer. *4th Symposium on Structural Proteomics, Antwerpen (Belgien), 27.–28. November 2014*

Posterpräsentationen

3D-Structural Characterization of the N- and C-terminal Regions of p53 by Combining Cross-Linking/MS and Native MS. *5th Symposium on Structural Proteomics, Halle (Saale), 19.–20. November 2015*

3D-Structural Characterization of the N- and C-Terminal Regions of p53. *47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Frankfurt (Main), 02.–05. März 2014*

Purification and 3D-Structural Characterization of the N-terminal Region of p53. *46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Berlin-Adlershof, 10.–13. März 2013*

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum, -ort: 28.11.1986, Wippra

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1999 – 2006 **Gymnasium am Markt, Hettstedt**

Hochschulausbildung

10/2006 – 11/2011 **Studium im Fach Biochemie (Diplom)**

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

02/2011 – 11/2011 **Diplomarbeit**

„NWG – Künstliche Bindeproteine“ (Dr. Sven Pfeifer),
Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg. „Herstellung und Charakterisierung künstlicher Bindeproteine auf Basis eines bekannten Bindemotives“

03/2012 – 05/2012 **Wissenschaftliche Hilfskraft**

Abteilung Technische Biochemie (PD Dr. Hauke Lilie),
Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg. Forschungsthema: „VP1 –
Virusprotein des murinen Polyomavirus“

Promotion

seit 05/2012 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**

Abteilung für Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik,
Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg (Prof. Dr. Andrea Sinz)

05/2013 **Forschungsaufenthalt**

Netherlands Proteomics Centre, Prof. Dr. A.J.R. Heck,
Universität Utrecht, Niederlande, Schwerpunkt: Native
Massenspektrometrie

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen genutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, bei der Herstellung des Manuskripts, sowie bei der geistigen Herstellung der vorgelegten Arbeit waren keine anderen Personen beteiligt. Insbesondere wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die vorgelegte Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Halle (Saale),

Christian Arlt