

Isolierung und Identifikation von G-Quadruplex-DNA-bindenden Proteinen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Valerie Christine Rauser (M. Sc. RWTH)

aus Düren

Berichter: Univ.-Prof. Dr. sc. nat. Elmar Weinhold
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Markus Albrecht

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 2019

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu Beginn möchte ich Prof. Dr. Elmar Weinhold für die Ermöglichung dieser Promotion und die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis danken. Darüber hinaus bedanke ich mich für seine geduldige und schnelle Beantwortung unzähliger Fragen und eine Themenstellung, die mich sehr begeistert hat.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Markus Albrecht für seine freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Marie-Paule Teulade-Fichou danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre vielen fachlichen Ratschläge und die Betreuung am Institut Curie in Orsay. Ihrem Arbeitskreis, insbesondere Dr. Daniela Verga und Dr. Abhijit Saha, danke ich darüber hinaus für die herzliche Aufnahme und die schöne Zeit in Paris und Prag. Mein Dank gilt außerdem Dr. Alain Nicolas für seine vielen Ideen und die gute Kooperation.

Bei Dr. Damarys Loew und Guillaume Arras möchte ich mich für die geduldige Einarbeitung am Institut Curie in Paris und die Messung zahlreicher Proben bedanken.

Patricia Duchambon vom Institut Curie in Orsay danke ich für die Bereitstellung des Plasmids zur Expression von Nucleolin und Prof. Dr. Bernhard Lüscher vom Uniklinikum der RWTH Aachen für das Protein PARP1.

Ein großes Dankeschön gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern unseres Arbeitskreises für die angenehme und lustige Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft innerhalb des Teams. Ganz besonders danke ich Andreas Dankers, Miriam Rauser, Sabrina Otto und Sascha Peters für die vielen Aktivitäten außerhalb des Labors.

Ebenso möchte ich mich bei den von mir betreuten Bachelor-, Master- und Forschungsstudenten Moritz Stappert, Sophia Villwock, Moritz Lafendt, Barbara Zingsheim und Wolfgang Rath für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt außerdem den anderen Mitgliedern des IOC für die vielen Aktivitäten und die gemeinsamen Grillabende, und insbesondere danke ich Dr. Christoph Ascheberg für seine zu jeder Situation passenden Musikvorschläge.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und den Rückhalt während meines Studiums und der Promotion. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei Miriam Rauser für die letzten acht überaus unterhaltsamen Jahre und für viele, die noch folgen werden.

Minkels und Lilly danke ich für ihr tatkräftiges Entertainment während der Schreibzeit meiner Dissertation.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Dr. Marian Rauser für die wundervollen Jahre und seine Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion bedanken. Außerdem danke ich ihm dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hat und mich immer zum Weitermachen ermutigt hat.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalente
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
Da (kDa)	Dalton (kilo Dalton, kg/mol)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ds	Doppelstrang (<i>double-strand</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanosin
G4	G-Quadruplex
h	Stunde (<i>hour</i>)
HeLa	Henrietta Lacks
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
Im	Imidazol
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KPP	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	<i>lysogeny broth</i>
mdeg	<i>millidegree</i>

min	Minute
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
ONC	Übernachtkultur (<i>overnight culture</i>)
p.a.	zur Analyse (<i>pro analysi</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	<i>pulldown capture</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecyl sulfate</i>)
ss	Einzelstrang (<i>single strand</i>)
RT	Raumtemperatur
TB	<i>terrific broth</i>
TEG	Tetraethylenglykol
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UV	Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	G-Quadruplex-DNA	1
1.2	Vorkommen von G4-DNA	3
1.2.1	G4-DNA in Telomeren	3
1.2.2	G4-DNA in Promotor-Regionen	4
1.3	Strukturen von G4-DNA	5
1.4	G4-DNA-bindende Proteine und Liganden	8
2	Zielsetzung	10
3	Ergebnisse	12
3.1	Strukturelle Eigenschaften von G4-DNA	12
3.1.1	Größenausschlusschromatographie	12
3.1.1.1	Untersuchung von Pu27 nach verschiedenen Behandlungsmethoden	13
3.1.1.2	Untersuchung verschiedener ODN	22
3.1.1.3	Untersuchung von Monomeren	31
3.1.2	Gelelektrophorese	36
3.1.3	UV-Schmelzkurven	39
3.1.4	CD-Spektroskopie	47
3.1.5	UV/Vis-Spektroskopie	50
3.1.6	Zusammenfassung	51
3.2	Erprobung des <i>Pulldown</i> -Systems anhand von Nucleolin	53
3.2.1	Expression von Nucleolin	53
3.2.2	Isolierung von Nucleolin	56
3.2.3	Untersuchung der Beladungsdichte der Magnetpartikel	60
3.3	Isolierung und Identifikation von G4-DNA-bindenden Proteinen	62
3.3.1	Isolierung von Proteinen aus Zelllysate mittels Pu27	62
3.3.2	Verdrängung von Pu27-bindenden Proteinen aus Zelllysate durch PhenDC3	63
3.3.3	Isolierung und Verdrängung von Proteinen aus Zelllysate mittels Myc22	65
3.3.4	Identifikation der mittels Pu27 isolierten Proteine	67
3.3.5	Identifikation der mittels Myc22 isolierten Proteine	77
3.3.6	Zusammenfassung	85
3.4	Untersuchung der Bindung von Zielproteinen an G4-DNA	87
3.4.1	Bindung von Nucleolin an G4 DNA	87

3.4.2	Bindung von PARP1 an G4 DNA	90
3.4.3	Bindung von YBX1 an G4-DNA	92
3.4.4	Bindung von hnRNP U an G4-DNA	94
4	Zusammenfassung und Ausblick	96
5	Experimenteller Teil	99
5.1	Material	99
5.1.1	Chemikalien.....	99
5.1.2	Puffer und Medien	101
5.1.3	Proteine	103
5.1.4	DNA und Plasmide	103
5.1.5	Marker	104
5.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	104
5.1.7	Geräte.....	105
5.2	Methoden	106
5.2.1	Faltung G-Quadruplex Strukturen	106
5.2.1.1	Faltung von monomerer G4-DNA nach NaOH-Methode.....	106
5.2.1.2	Faltung von G4-DNA nach Temperatur-Methode	106
5.2.1.3	Bildung von Doppelhelix-DNA	106
5.2.2	CD-Spektren	106
5.2.3	Schmelzkurven von G4-DNA	107
5.2.4	UV/Vis-Spektroskopie	107
5.2.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford.....	108
5.2.6	HPLC	108
5.2.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	109
5.2.7.1	Denaturierende Gelelektrophorese	109
5.2.8	Färbung von Polyacrylamid-Gelen.....	110
5.2.8.1	Coomassie R.....	110
5.2.8.2	Kolloidale Coomassie G.....	110
5.2.8.3	Silberfärbung.....	111
5.2.9	Herstellung von Zelllysate aus ganzen Zellen.....	112
5.2.10	Beladung von Magnetpartikeln mit Oligodesoxyribonucleotiden.....	112
5.2.11	Isolierung von Proteinen nach <i>Pulldown</i> -Verfahren	114
5.2.12	Isolierung von Proteinen nach <i>Pulldown</i> -Verfahren zur Proteomanalyse...	115
5.2.13	Bindungsassay mit Zielproteinen	115

5.2.14	Auswertung von Proteomanalysen	116
5.2.15	Molekularbiologische Methoden zur Expression von Proteinen.....	117
5.2.15.1	Allgemeine Arbeitsweise	117
5.2.15.2	Anzucht von Bakterien.....	117
5.2.15.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für die CaCl ₂ -Methode	118
5.2.15.4	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen nach der CaCl ₂ - Methode.....	118
5.2.15.5	Expression und Aufreinigung von 6His SUMO Nucleolin.....	118
6	Literaturverzeichnis.....	120
7	Anhang	126

1 Einleitung

1.1 G-Quadruplex-DNA

Im Jahr 1953 beschrieben Watson und Crick erstmals den Aufbau der DNA als Doppelhelix-Struktur, in der sich Ketten aus Phosphodiestern und 2'-Desoxyribose helixförmig um eine Achse winden.^[1] Für ihre bahnbrechende Vorhersage wurden sie 1962 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Im gleichen Jahr publizierten der Wissenschaftler Gellert und seine Mitarbeiter ihre Forschungsergebnisse zur Helixbildung von Guanylsäure, die später zu einem Meilenstein für die Entdeckung einer neuen DNA-Struktur werden sollten.^[2] Sie fanden heraus, dass Guanosinmonophosphat (GMP, **1**) planare Schichten aus Tetrameren, die über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden, bildet. Dabei gehen in ihrem Modell die N1-H und N2-H Donoratome der Watson-Crick-Seite Wasserstoffbrücken mit der Hoogsteen-Seite des benachbarten Guaninmoleküls ein. Das resultierende G-Quartett (**2**) ist ein Macrozyklus, der durch acht Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten wird (siehe Abbildung 1).

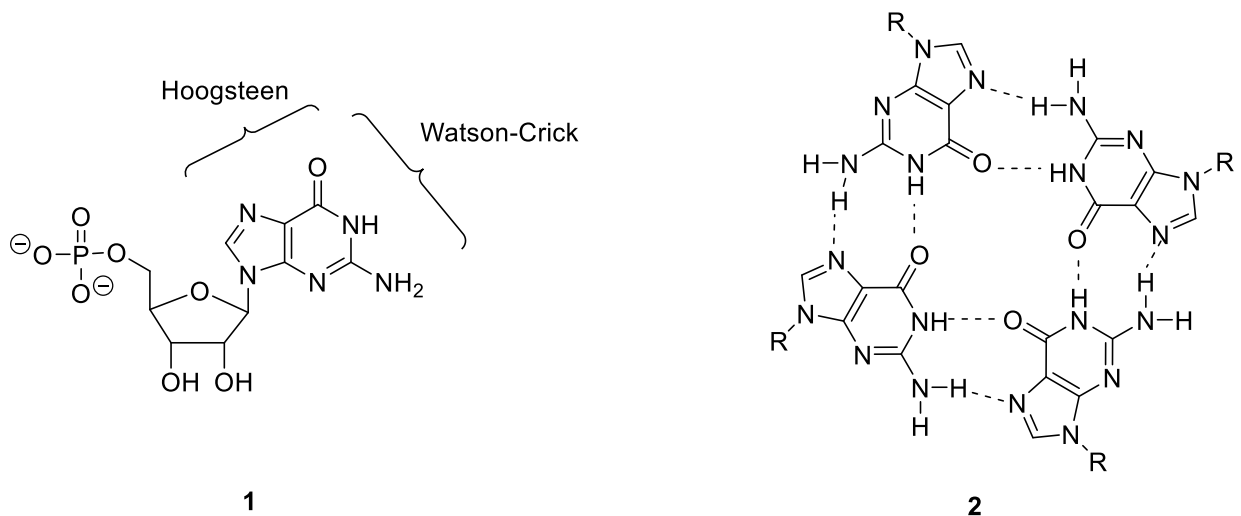


Abbildung 1: Anordnung von GMP in einem planaren Makrozyklus.^[2a]

Erst in den späten 1980ern wurden Hinweise auf eine biologische Funktion der G-Quartetts (**2**) gefunden. Die Wissenschaftler Sen und Gilbert stellten fest, dass eine Stapelung von G-Quartetts (**2**) an der Chromosomenassoziation während der Meiose beteiligt ist.^[3] Nur wenig später zeigten Sundquist und Klug, dass der G-Quadruplex eine wichtige Sekundärstruktur der DNA ist und biochemische Prozesse in den Telomerregionen von Chromosomen reguliert.^[4]

Eine Stapelung von zwei oder mehr G-Quartetts (2) wird als G-Quadruplex (G4) bezeichnet.^[5] In dieser vertikalen Schichtung sind die einzelnen G-Quartetts (2) etwa 3,3 Å voneinander entfernt.^[6] Monovalente Kationen können in den zentralen Kern eines G-Quartetts (2) oder zwischen zwei G-Quartetts (2) interkalieren und durch eine Koordination der O6-Sauerstoffe die Struktur stabilisieren.^[7] Da dieser Zwischenraum eine definierte Geometrie und Größe besitzt, können nur Kationen bestimmter Größe und Ladung G4-Strukturen stabilisieren.^[8] Physiologisch relevante Kationen wie K^+ , Na^+ und NH_4^+ spielen eine wichtige Rolle in der Stabilisierung von G4-DNA. Das verhältnismäßig kleine Na^+ -Kation passt in die Mitte eines G-Quartetts (2) hinein, während größere Kationen wie NH_4^+ und K^+ in den Zwischenraum zwischen zwei G-Quartetts (2) eingebettet werden können. Daraus folgt für die größeren Kationen eine Koordination von acht O6-Sauerstoffen im G4, während kleinere Kationen nur vier Sauerstoffatome koordinieren und somit bei diesen eine niedrigere Stabilität resultiert. Kationen mit sehr kleinem Ionenradius, wie beispielsweise Li^+ , führen zu einer geringeren Stabilität des G4, während K^+ -Kationen die Stabilität begünstigen.^[8b] *In vitro* können G4 aus Einzelstrang-DNA-Sequenzen gebildet werden. In Abbildung 2 ist die Struktur eines G4 dargestellt, dessen Bildung aus Einzelstrang-DNA mit vier Wiederholungen von jeweils drei G erfolgen kann.^[9] Diese intramolekularen G4 können nicht nur aus DNA, sondern ebenfalls aus RNA gebildet werden. Allgemein besitzt G4-RNA dabei eine höhere Stabilität als G4-DNA.^[10]

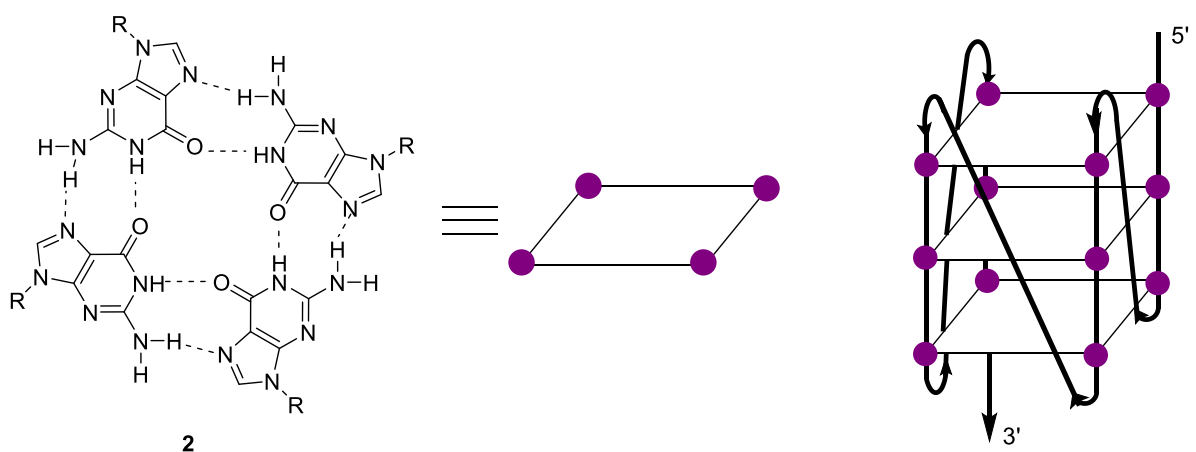


Abbildung 2: Anordnung einer G-reichen DNA-Sequenz im G-Quadruplex.

1.2 Vorkommen von G4-DNA

Genomweite Sequenzanalysen lieferten wichtige Informationen zum Auffinden von Sequenzen, die potenziell einen stabilen G4 ausbilden können. Dabei wurden nicht nur im Genom von Eukaryoten, sondern auch bei Prokaryoten eine Vielzahl von potentiell G4-bildenden Sequenzen gefunden.^[11] Im menschlichen Genom sind über 350.000 verschiedene dieser Sequenzen vorhanden.^[12] Dabei ist ihr Auftreten nicht zufällig, sondern scheint mit funktionellen Domänen des Genoms zu korrelieren. Die höchste Dichte an potentiell G4-bildende Sequenzen ist in Chromosomenenden zu finden.^[11b, 11c, 13] Zudem wird eine starke Anreicherung in den Promotor-Regionen von eukaryotischen Genen beobachtet, wobei mehr als 40% der Promotoren von menschlichen Genen mindestens eine potentiell G4-bildende Sequenz enthalten.^[12c, 14]

1.2.1 G4-DNA in Telomeren

Für die Funktion von eukaryotischen Zellen ist es wichtig, zwischen unerwarteten Brüchen in der DNA und dem regulären Ende von Chromosomen unterscheiden zu können. Um dies zu ermöglichen, besitzen Chromosomen repetitive Sequenzen an ihren Enden, die Telomere genannt werden.^[15] Bei Wirbeltieren bestehen diese Wiederholungen aus (GGGTTA)_n, von denen beim Menschen etwa 1000 Wiederholungen als doppelsträngige DNA vorkommen. Anschließend folgt ein Überhang des G-reichen Strangs als einzelsträngige DNA mit 1-200 Basen. Die Länge der Doppelstrang-Region verkürzt sich mit jeder Zellteilung, was zur Alterung der Zelle und schließlich zum programmierten Zelltod führt. Stammzellen hingegen können unsterblich sein und besitzen das Enzym Telomerase, welches die Telomere nach der Zellteilung verlängert.^[16] In etwa 85% aller Krebsarten überschreiten die Zellen das Limit der Zellteilungen, indem sie Telomerasen exprimieren. Für therapeutische Zwecke ist es deshalb von Interesse, Methoden zur Aktivitätskontrolle von Telomerasen zu entwickeln.^[17] Die Wiederholungen in der menschliche Telomersequenz bilden unter physiologischen Bedingungen G4-Strukturen.^[18] Es wird davon ausgegangen, dass die physiologisch relevante Struktur des Telomer-Überhangs eine Serie aus G4 ist, ähnlich wie Perlen auf einer Kette.^[19]

1.2.2 G4-DNA in Promotor-Regionen

Analysen zum Auffinden von potentiell G4-bildenden Sequenzen haben gezeigt, dass Nuklease-hypersensitive Elemente in Promotor-Regionen eine 230-fache Anreicherung von potentiell G4-bildenden Sequenzen aufweisen im Vergleich zum restlichen Genom.^[12c, 20] Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass diese Sequenzen evolutionär begünstigt sind und somit eine funktionelle Rolle bei der Kontrolle der Transkription besitzen.^[21] Eine Ansatz zur Regulation der Genexpression basiert dabei auf der Ausbildung von G4-Strukturen in der Promotor-Region von Genen.^[17a] Hierzu wurde von Hurley und seinen Mitarbeitern ein Modell für das Onkogen c-myc entwickelt.^[22] Die Expression von c-myc liefert ein Protein, das an der Regulation von etwa 15% aller menschlichen Gene beteiligt und ein zentraler Regulator von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose ist.^[23] Eine Überexpression von c-myc wird mit verschiedenen Krebsarten wie Brust-, Dickdarm- und Gebärmutterhalskrebs in Verbindung gebracht.^[23b, 24] Die Expression von c-myc wird durch das Nuklease-hypersensitive Element (NHE) III₁ kontrolliert, das sich -142 bis -115 Basenpaare vor dem P1-Promotor befindet.^[25] Der Templatstrang von NHE III₁ enthält eine G-reiche Sequenz namens Pu27, die einen stabilen G4 bilden kann. Es wurde gezeigt, dass zwischen transkriptionsaktiven Formen, bei denen kein G4 vorliegt, und einer *silencer*-Struktur, bei der ein G4 ausgebildet wird, ein Gleichgewicht besteht. Die G4-Struktur innerhalb des Promotors wirkt somit als Transkriptions-Repressor Element.^[22, 26] Aus diesem Grund ist die Bildung eines G4 im c-myc Promotor von großem therapeutischen Interesse. Darüber hinaus wurden ähnliche Mechanismen ebenfalls in Promotor-Regionen von weiteren Onkogenen wie c-kit^[27], VEGF^[28] und bcl-2^[29] gefunden.

1.3 Strukturen von G4-DNA

G4-DNA kommt mit verschiedenen Topologien vor. Diese topologischen Unterschiede resultieren aus verschiedenen Kombinationen von Ausrichtungen der Stränge und den Variationen in den Sequenzen. Generell besteht ein G4 aus einem Kern von mindestens zwei G-Quartetts (2), die zusammengehalten werden von Schleifen aus den Nukleotiden, die nicht an der G4-Bildung beteiligt sind. Die Variationen aus Anzahl der G-Quartetts (2), Position der Schleifen und Polarität der Stränge ermöglicht eine Vielzahl von verschiedenen G4-Strukturen, die bereits experimentell nachgewiesen werden konnten.^[30]

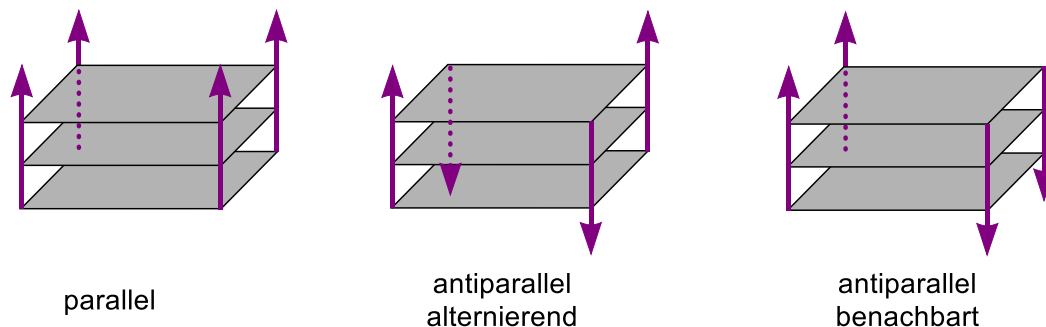


Abbildung 3: Parallele, antiparallel alternierende und antiparallel benachbarte Ausrichtung eines G4.

G4 können anhand der Polarität ihrer Stränge klassifiziert werden (siehe Abbildung 3). Bei der parallelen Ausrichtung weisen alle Stränge von 5' nach 3' die gleiche Orientierung auf.^[30] Für einen monomeren G4 bedeutet dies bei einer benachbarten Verlinkung der Stränge, dass die Schleifen aus nicht am G4 beteiligten Basen vom oberen G-Quartett zum benachbarten G des unteren G-Quartetts führen. Eine solche Anordnung liefert den parallelen Propeller-Typ-G4 (siehe Abbildung 4). Ein Beispiel für diesen Aufbau ist der biologisch relevante G4 innerhalb des c-myc Promotors.^[9a]

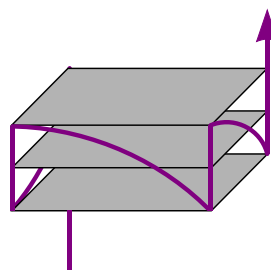


Abbildung 4: Paralleler Propeller-Typ G4.

In einem antiparallel alternierenden G4 sind im Gegensatz zum parallelen G4 die benachbarten Stränge jeweils entgegengesetzt orientiert. In der antiparallel benachbarten

Orientierung besitzt jeder Strang einen benachbarten Strang in entgegengesetzter und einen in gleicher Orientierung. Im Gegensatz zu G4-DNA, die in allen diesen Orientierungen vorkommt, bildet RNA nur parallele G4.^[31]

Bei der Bildung von G4 DNA-Strukturen *in vitro* können eine Vielzahl von verschiedenen intra- und intermolekularen Strukturen entstehen.^[8b, 32] G-reiche DNA-Stränge können dabei nicht nur monomere G4, sondern auch bi- und tetramolekulare G4 und andere multimeren Strukturen, wie beispielsweise G-Kabel, ausbilden.^[4, 33] Dies kann zu Problemen führen, wenn Untersuchungen mit definierten monomeren G4 beabsichtigt sind. Einige mögliche Strukturen für die Sequenz Pu27 aus dem c-myc Promotor sind in Abbildung 5 illustriert.

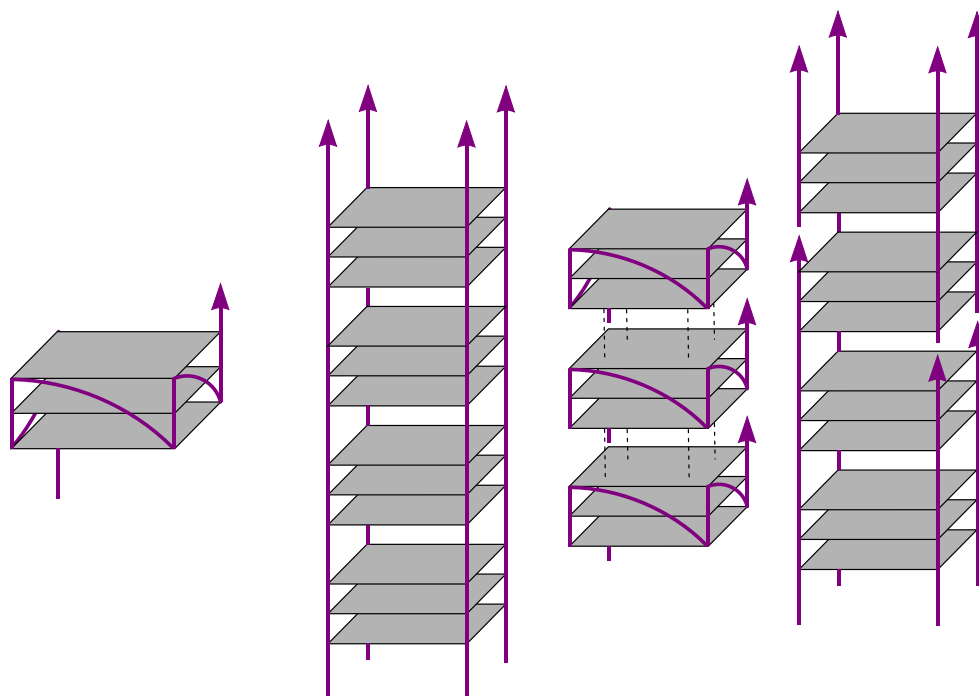


Abbildung 5: Verschiedene G4-Strukturen.

Eine weit verbreitete Methode zur Generierung von definierten Strukturen ist eine Modifikation der Sequenz, wobei einzelne Guanin-Reste innerhalb der Sequenz entfernt oder gegen andere Nukleotide ausgetauscht werden.^[34] Diese Methode ist allerdings problematisch, da der modifizierte G4 seine biologische Relevanz verlieren könnte. Die native, G-reiche Sequenz Pu27 aus dem c-myc Promotor ist für die Ausbildung einer Vielzahl von multimeren Strukturen bekannt.^[32] Die native Sequenz Pu27 enthält fünf G-Trakte mit jeweils drei bis vier Guanin-Resten (siehe Abbildung 6).

Pu27	TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG
Pu18	AGGGTGGGGAGGGTGGGG
Myc2345	TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA
Myc22-G14T/G23T	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA

Abbildung 6: Sequenz des G4-bildenden Abschnitts aus dem c-myc Promotor (Pu27) und ausgewählte modifizierte Sequenzen.

Wenn der erste dieser fünf G-Trakte entfernt und der überstehende Rest gekürzt wird, dann resultieren die modifizierten Sequenzen Pu18^[35] und Myc2345^[34b], die in Abbildung 6 gezeigt sind. Innerhalb der G-Trakte, die aus vier G-Resten bestehen, kann außerdem jeweils ein G durch eine andere Base ersetzt werden. Diese Veränderung führt zu einer geringeren Flexibilität der G4-Bildung und liefert die Sequenz Myc22-G14T/G23T.^[36]

Weitere Sequenz-Modifikationen zur Reduzierung des Polymorphismus basieren auf dem Einbau von O6-Methylguanin^[37], Inosin^[38] und 6-Thioguanin^[39], die eine destabilisierende Wirkung auf den G4 haben. Zusätzlich zu Sequenz-Modifikationen kann der Polymorphismus ebenfalls durch eine Veränderung der Lösungsbedingungen beeinflusst werden. Das Hinzufügen von Co-Lösungsmitteln wie Acetonitril oder PEG^[40] oder ein Austausch von monovalenten gegen divalente Kationen^[41] und auch die Kationenkonzentration^[42] spielen eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der G4-Struktur und deren Stabilität. In früheren Studien konnten selbst assoziierte, G-reiche DNA-Strukturen durch den Zusatz von 10 mM NaOH denaturiert werden.^[43] Im Jahr 2012 untersuchten Trent und seine Mitarbeiter den Einfluss von Strang-Konzentration, Erwärmung und Pufferzusammensetzung auf die Verteilung zwischen Monomer und multimeren Strukturen von Pu27. Dabei fanden sie heraus, dass die höchste Ausbeute an Monomer bei niedrigen K⁺-Konzentrationen und mit niedrigen DNA-Konzentrationen erreicht wird.^[44] Bis heute ist allerdings keine Methode bekannt, die *in vitro* die biologisch relevante Pu27 Sequenz als reinen monomeren G4 liefert.

1.4 G4-DNA-bindende Proteine und Liganden

Die biologische Funktion von G4-DNA steht in maßgeblichem Zusammenhang mit Proteinen, die an G4 binden. G4 können sich spontan bilden, wenn DNA-Einzelstränge während der Replikation oder Transkription freigelegt werden. Diese Strukturen sind eine Herausforderung für die Replikation und müssen von G4 Helicasen erkannt und aufgelöst werden, um die genetische Stabilität zu erhalten. Bekannte G4-Helicasen in menschlichen Zellen sind die Proteine WRN^[45], BLM^[46], ChlR1^[47], FANCI^[48], Pif1^[49] und RTEL1^[50]. Die G4-Helicasen WRN, BLM und RTEL1 sind notwendig, um Telomer-G4 aufzulösen. Ein Mangel an WRN-Helicase beispielsweise führt zu der Krankheit Werner-Syndrom, was mit einem auffälligen verfrühten Alterungsprozess einhergeht, der durch den Abbau von Telomer-Sequenzen hervorgerufen wird.^[51] Ein Mangel an BLM-Helicase ist verantwortlich für das Bloom-Syndrom. Dieses geht mit einer Immunschwäche einher, die durch eine Behinderung der Rekombination der Immunoglobulin S Regionen ausgelöst wird und auch zu einer genomischen Instabilität und einer Prädisposition für Krebs führt.^[46] Die Helicase Pif1 bindet an den menschlichen Subtelomer-Minisatelliten CEB25 und kann diesen auflösen, wodurch eine chromosomale Umlagerung verhindert wird.^[52] Das Phosphoprotein Nucleolin bindet *in vitro* mit hoher Affinität an den c-myc Promotor. Zudem ermöglicht Nucleolin die Bildung des c-myc G4 und erhöht dessen Stabilität. Desweiteren gibt es Hinweise darauf, dass eine Überexpression von Nucleolin die Aktivität des c-myc Promotors reduziert, indem es die G4-Bildung induziert. Außerdem bindet Nucleolin in HeLa-Zellen an den c-myc Promotor, was dafür spricht, dass Nucleolin auch *in vivo* die G4-Bildung induzieren kann.^[53]

Neben Proteinen können auch verschiedene kleinere Liganden wie der Bisquinolin-Ligand PhenDC3 **3** (Abbildung 7), an G4-Strukturen mit einer aus dem c-myc Promotor abgeleiteten Sequenz binden.^[54] Außerdem zeigt PhenDC3 **3** auch *in vivo* eine hohe Affinität zu G4-DNA.^[55]

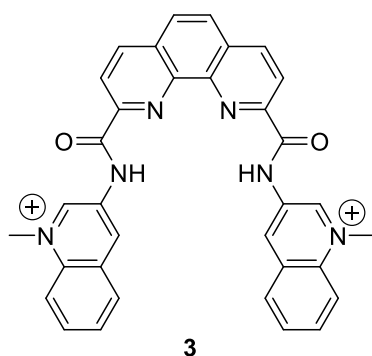


Abbildung 7: Struktur des Bisquinolin-Liganden PhenDC3 **3**.

Die aufgeführten Beispiele von G4-DNA-bindenden Proteinen verdeutlichen die enorme Bedeutung dieser Proteine *in vivo* und das Potenzial zur Erkennung und Behandlung von Krankheiten. Daher ist es wichtig, mehr über G4-bindende Proteine und deren Funktion herauszufinden. Im menschlichen Proteom sind mehr als 18000 verschiedene Proteine bekannt.^[56] Es ist zu erwarten, dass es sich bei einigen dieser Proteine um G4-bindende Proteine handelt und diese aus Zellen isoliert werden können. Einen affinitätsbasierten Ansatz zur Isolierung von DNA-bindenden Proteinen stellt der sogenannte Affinitätschromatographie-*Pulldown* dar. Dabei werden biotinylierte DNA-Stränge auf Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln immobilisiert und zur Isolierung von Proteinen aus Zelllysaten genutzt.^[57] Biotin bildet eine sehr starke, nicht-kovalente Bindung zu Streptavidin aus^[58] und hält die DNA somit auf den Magnetpartikeln gebunden. Dieser Ansatz kann ebenfalls für G4-DNA nutzbar gemacht werden.^[59]

2 Zielsetzung

Innerhalb dieser Arbeit sollen neue Proteine, die an die G-Quadruplex (G4) -bildende DNA-Sequenz Pu27 aus dem c-myc Promotor binden, identifiziert und hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an DNA näher untersucht werden. Die Erforschung von Proteinen, die an den Promotor des c-myc Onkogens binden, ist von besonderem Interesse, da hierdurch eine G4-Bildung induziert und möglicherweise das Wachstum von Krebszellen gehemmt werden kann.^[53] Im ersten Schritt soll eine biologisch relevante, monomere G4-Struktur aus dieser c-myc Sequenz gebildet werden. Dies ist eine besondere Herausforderung, da diese Sequenz *in vitro* eine hohe Tendenz zur Ausbildung undefinierter, multimerer Strukturen zeigt.^[32] Zunächst sollen daher geeignete Bedingungen zur Bildung eines definierten, monomeren G4 aus dieser Promotorsequenz gefunden und anhand von Analytik-Methoden wie Größenausschlusschromatographie (SEC), Gelelektrophorese, CD-Spektroskopie und UV-Schmelzkurven charakterisiert werden. Anschließend soll diese G4-Struktur in einer affinitätsbasierten Anwendung genutzt werden, um G4-bindende Proteine aus Krebszellen zu isolieren (Abbildung 8).

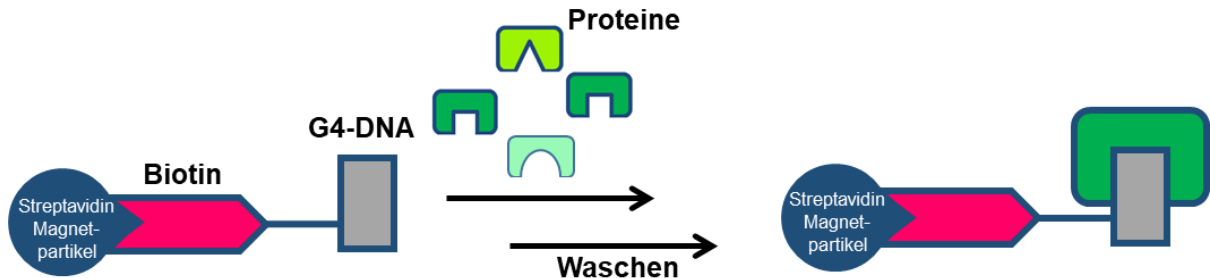


Abbildung 8: Affinitätsbasiertes System zur Isolierung von G4-DNA-bindenden Proteinen.

Für die Isolierung der Proteine sollen G4-DNA Sequenzen genutzt werden, die mit Biotin modifiziert sind, damit die DNA nach der Faltung zum G4 auf Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln immobilisiert werden kann. Diese werden in Proteinlösungen gegeben, um eine Bindung der Proteine an die G4-DNA zu ermöglichen. Anschließend die Magnetpartikel mit gebundenem Protein mit einem Magneten isoliert werden. Durch mehrfaches Waschen der Partikel mit verschiedenen Puffern sollen unspezifisch gebundene Proteine entfernt werden. Anschließend können sowohl das Protein als auch die DNA von den Magnetpartikeln gelöst und mittels SDS-PAGE analysiert werden. Dieses System soll zunächst anhand des bekannten G4-bindenden Proteins Nucleolin erprobt und optimiert werden. Dazu wird Nucleolin zuerst von einem Plasmid in *E. coli* Zellen exprimiert und

aufgereinigt. Für die Erprobung des Systems soll zusätzlich zu der G4-DNA zur Kontrolle auch Einzelstrang-DNA eingesetzt. Zudem wird untersucht, welchen Einfluss der G4-bindende Bisquinolin-Ligand PhenDC3 **3** auf die Bindung von Proteinen an die G4-DNA besitzt. Einige Beispiele von DNA-Strukturen auf Magnetpartikeln, die in dieser Arbeit eingesetzt werden sollen, sind in Abbildung 9 aufgeführt.

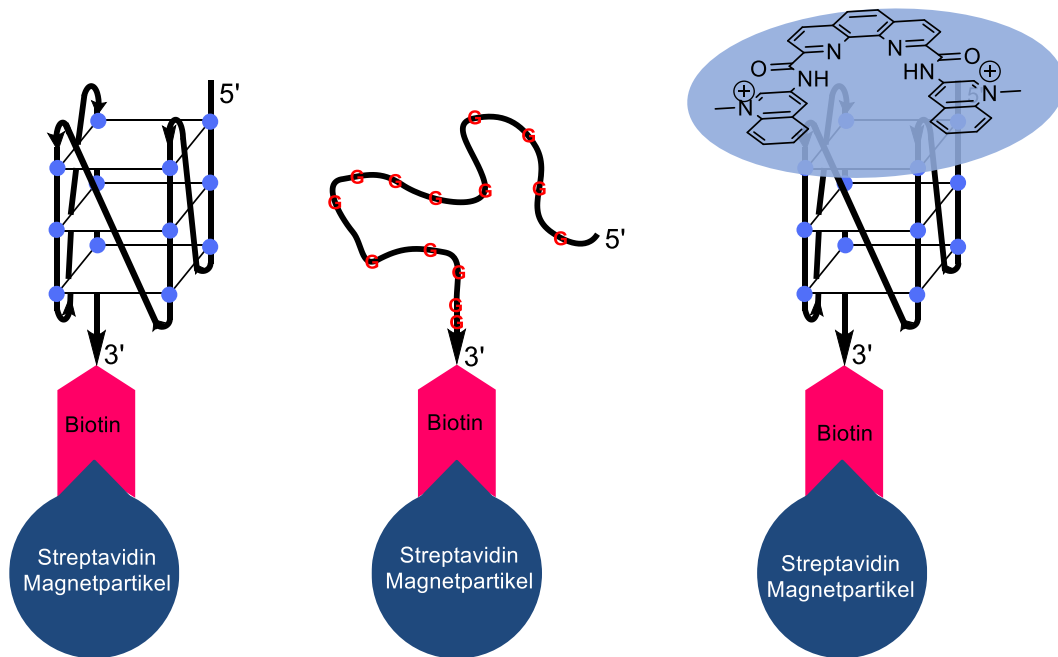


Abbildung 9: Verschiedene DNA-Strukturen auf Magnetpartikeln.

Nachdem am Beispiel von Nucleolin geeignete Bedingungen zur Isolierung von Proteinen gefunden wurden, sollen die mit DNA beladenen Partikel genutzt werden, um bindende Proteine aus Lysat von Krebszellen zu isolieren. Mittels HPLC-MS können die isolierten Proteine analysiert und anhand von humanen Proteindatenbanken identifiziert werden. Durch eine Quantifizierung sollen insbesondere solche Proteine als Zielproteine selektiert werden, die eine hohe Affinität zur G4-DNA besitzen, aber keine oder nur eine geringe Bindungsaffinität zu Einzelstrang-DNA zeigen und sich zudem durch den Zusatz von PhenDC3 von dem G4 verdrängen lassen. Nach dieser Proteomanalyse soll die G4-Bindung von gereinigten Kandidaten-Proteinen in Bindungsexperimenten verifiziert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Strukturelle Eigenschaften von G4-DNA

Um G4-DNA bindende Proteine zu isolieren und deren Bindungsverhalten zu untersuchen, ist im ersten Schritt die Herstellung einer definierten G4-Struktur und deren Charakterisierung essentiell. Aus diesem Grund wurden innerhalb dieser Arbeit zunächst verschiedene Behandlungsmethoden der eingesetzten DNA-Stränge untersucht, mit dem Ziel, die in Kapitel 1.3 beschriebenen multimeren Strukturen in monomere Strukturen zu überführen. Anschließend wurde analysiert, ob bei den untersuchten DNA-Strängen tatsächlich eine G4-Struktur vorliegt und ob die verwendete Pu27-Sequenz aus dem c-myc Promotor unter den hier angewandten Bedingungen den gewünschten parallelen G4 bildet. Zu diesem Zweck wurden Analytikmethoden, wie Größenausschlusschromatographie (SEC), Gelelektrophorese, sowie UV/Vis- und CD-Spektroskopie, eingesetzt. Diese Methoden werden im Folgenden näher beschrieben.

3.1.1 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie handelt es sich um eine Methode, bei der die untersuchten Moleküle anhand ihres sterischen Anspruchs getrennt werden. Größere Moleküle eluieren früher als kleinere.^[32, 44] Als Puffersystem wurde hierbei unter Verwendung eines isokratischen Flusses ein Kaliumdihydrogenphosphatpuffer gewählt, dessen Zusammensetzung dem Puffer entspricht, der zur Faltung der G4-DNA genutzt wurde. Aus diesem Grund handelt es sich um eine Analytikmethode unter nativen Bedingungen. Da minimale Abweichungen der Parameter, wie beispielsweise der Umgebungstemperatur, zu leichten Veränderungen in den Retentionszeit führen können, wurden Experimente innerhalb des gleichen Plots zum Vergleich immer am gleichen Tag durchgeführt. Zudem wiesen die verschiedenen Synthesechargen der gleichen DNA-Sequenzen leichte Unterschiede in der strukturellen Verteilung der einzelnen Spezies auf, weshalb zudem für den Vergleich verschiedener Behandlungsmethoden immer die gleiche Charge benutzt wurde.

3.1.1.1 Untersuchung von Pu27 nach verschiedenen Behandlungsmethoden

Thermische Behandlung

Zu Beginn wurde untersucht, wie viele multimeren Strukturen das G4-Oligodesoxynukleotid (ODN) Pu27^[22] zeigt und ob sich diese durch eine Wärmebehandlung schmelzen lassen. Dazu sind in

Abbildung 10 die Ergebnisse der SEC-Analyse von unbehandeltem und thermisch behandeltem Pu27 dargestellt.

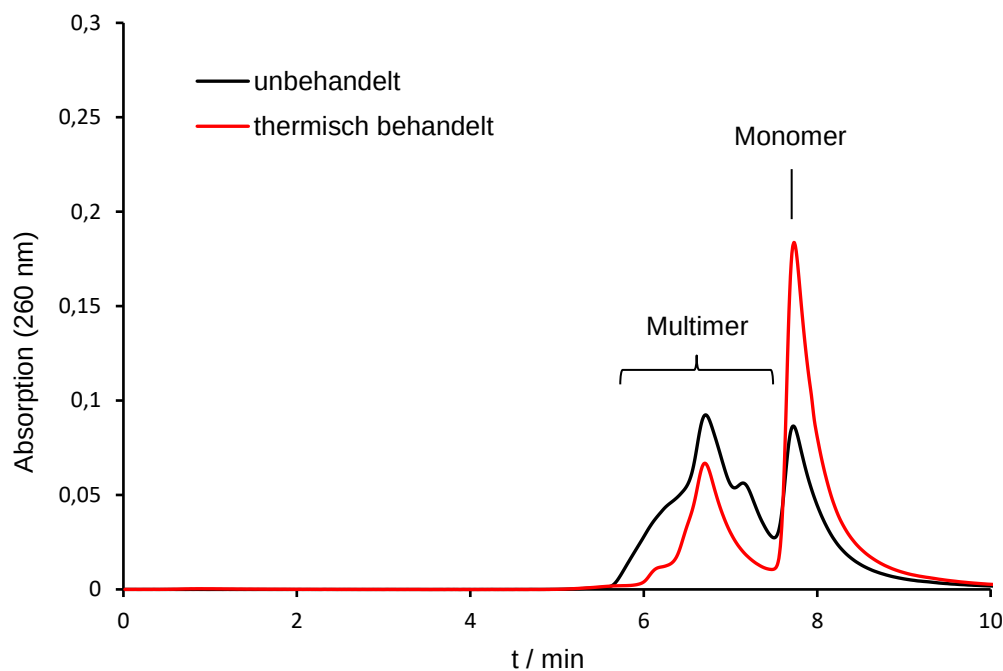


Abbildung 10: SEC-Analyse des G4-ODN Pu27 ohne Vorbehandlung (schwarz) und nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C (rot).

In den Chromatogrammen der SEC-Analyse ist zu erkennen, dass Pu27 ohne Vorbehandlung mehrere Signale bei verschiedenen Retentionszeiten im Bereich von 5,5 - 9 min zeigt. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der zuletzt eluierenden Spezies bei 8 min um das gewünschte Monomer und bei den Signalen mit kleinerer Retentionszeit von etwa 5,5 - 7,5 min um multimeren Strukturen, denn für diese wird aufgrund ihres größeren sterischen Anspruchs ein früheres Eluieren erwartet. Die genaue Struktur und Zusammensetzung dieser Multimeren wurde innerhalb dieser Arbeit nicht untersucht, da für die Anwendung in der Proteomanalyse der monomere G4 im Vordergrund steht. Nach thermischer Behandlung des ODN für 10 min bei 95°C und langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) in K⁺-haltigem Puffer ist ein Anstieg des Monomeranteils im Chromatogramm zu verzeichnen,

während der Anteil an multimeren Strukturen abnimmt. Dies zeigt, dass ein Teil der multimeren Strukturen von Pu27 durch diese Behandlungsmethode aufgeschmolzen werden kann.

Theoretisch wäre es ebenfalls möglich, dass diese Strukturen während des Erwärmens zwar vollständig aufgeschmolzen werden, sich aber während des Abkühlvorgangs neu bilden. Um dies zu überprüfen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Gegebenenfalls kann die Ausbeute an Monomer durch schnelleres Abkühlen erhöht werden. Dazu wurde das ODN ebenfalls für 10 min auf 95°C erwärmt und anschließend auf Eis abgekühlt, sodass die Temperatur der Lösung (70 µL) sehr schnell gesenkt wurde. Die Analyse erfolgte sofort im Anschluss. Der Vergleich der beiden Abkühlungsmethoden ist in Abbildung 11 dargestellt.

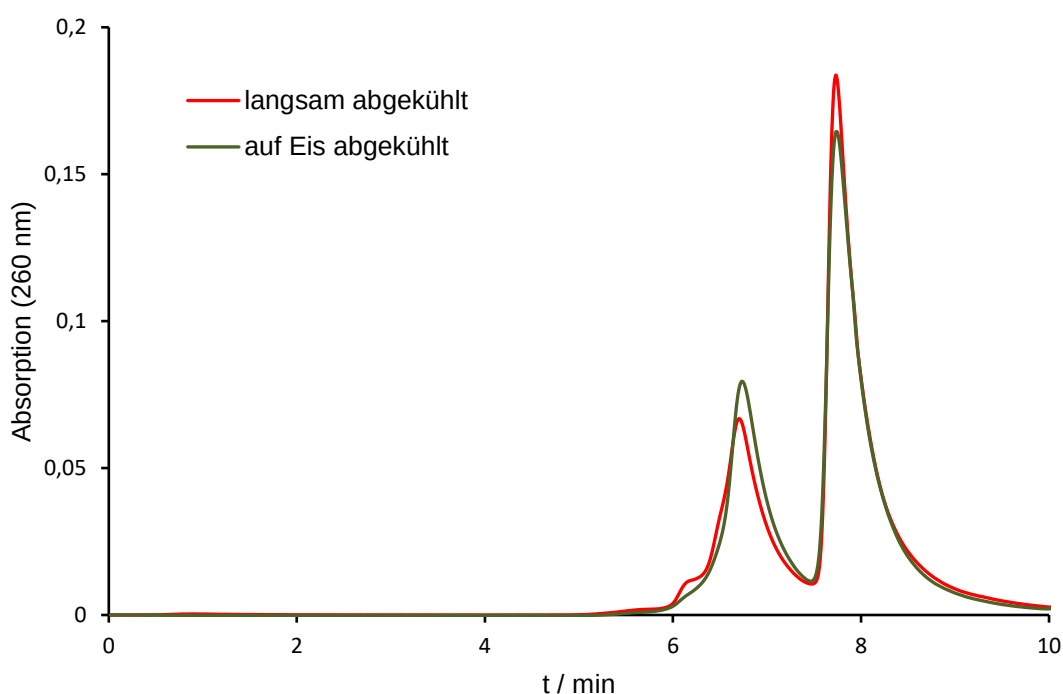


Abbildung 11: SEC-Analyse von Pu27 nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und langsamem Abkühlen auf RT (rot) und schnellem Abkühlen auf Eis (grün).

In den zugehörigen Chromatogrammen der SEC-Analysen ist zu erkennen, dass das Verhältnis zwischen Monomer und multimeren Strukturen nach den verschiedenen Abkühlungsmethoden annähernd gleich ist. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass dieser Schritt einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Verteilung zwischen Monomer und Multimeren hat. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Multimere nicht beim Abkühlen aus den Monomeren geformt werden, sondern ein Teil der Multimere nicht zu Monomeren aufschmilzt und somit bei diesem pH-Wert einen Schmelzpunkt oberhalb der untersuchten 95°C besitzt.

Basische Behandlung mit NaOH

Da für die spätere Anwendung in der Proteomanalyse reines Monomer benötigt wird, wurden weitere Methoden untersucht, um die multimeren Strukturen zu schmelzen. Die Proben wurden dazu mit verschiedenen konzentrierter NaOH-Lösung für 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit einem großen Überschuss an K^+ -haltigem KPP-Puffer versetzt, um einen neutralen pH-Wert zu erreichen.

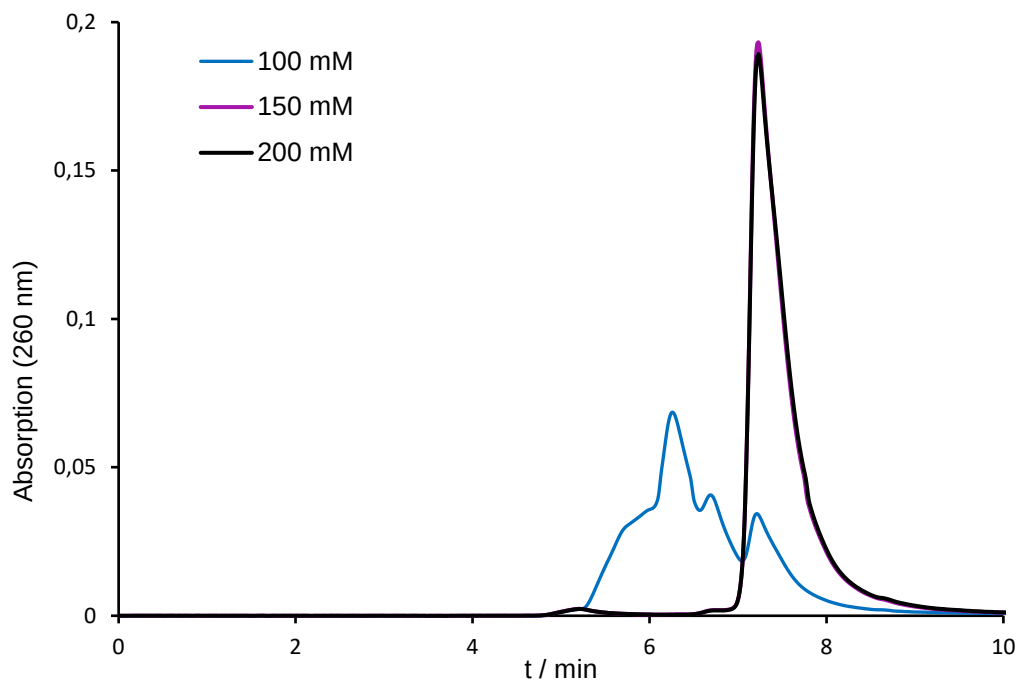


Abbildung 12: SEC-Analyse von Pu27 nach Inkubation in 100 (blau), 150 (violett) und 200 mM NaOH (schwarz) und anschließender Neutralisation mit einem Überschuss an KPP-Puffer.

In der Analyse mittels SEC wird deutlich, dass durch eine basische Behandlung mit NaOH und anschließendem neutralisieren reines Monomer erhalten wird und die multimeren Strukturen vollständig gelöst werden können (siehe Abbildung 12). Nach der Behandlung mit 100 mM NaOH (pH = 13,0) und Rückfaltung in KPP-Puffer ist noch ein großer Anteil der multimeren Strukturen vorhanden, während der Anteil an Monomer gering ausfällt. Nach einer Inkubation in 150 bzw. 200 mM NaOH (pH = 13,2 bzw. 13,3) wird ausschließlich Monomer gebildet, woraus deutlich wird, dass alle multimeren Strukturen durch eine Behandlung mit hohen Konzentrationen von NaOH denaturiert werden können, während eine niedrigere Konzentration von 100 mM NaOH nicht ausreichend ist. Die Ergebnisse zeigen, dass 150 mM für Pu27 die niedrigste untersuchte Konzentration an NaOH ist, die bei RT zum Auflösen von multimeren Strukturen ausreichend ist.

Das Auflösen der höheren Strukturen durch NaOH kann mit einer Deprotonierung der *N*1-Positionen der Guanin-Reste der G4-DNA erklärt werden. Fehlt an dieser Stelle ein Proton, so ist die Ausbildung der essentiellen Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen zu den O6-Sauerstoffen nicht mehr möglich und das G-Quartett (**2**) zerfällt (siehe Abbildung 13). Die Deprotonierung wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit noch näher untersucht (siehe Kapitel 3.1.5).

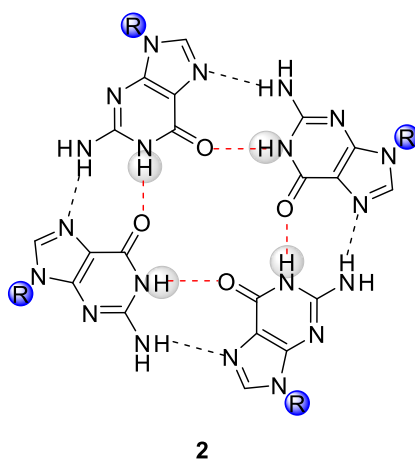


Abbildung 13: G-Quartett (**2**) mit Wasserstoffbrückenbindungen zwischen *N*1 und O6 der Guaninreste in rot. Durch Deprotonierung (grau) gehen diese Wasserstoffbrückenbindungen verloren.

Im Anschluss wurde getestet, ob die zur Monomerbildung erforderliche Konzentration an NaOH gesenkt werden kann, wenn die basische Behandlung mit einer Temperaturbehandlung kombiniert wird. Dazu wurde eine Probe bei 55°C inkubiert und mit einer bei RT inkubierten Probe verglichen, wobei in beiden Fällen eine NaOH-Konzentration von 100 mM gewählt wurde. Die Ergebnisse der SEC-Analyse sind in Abbildung 14 dargestellt.

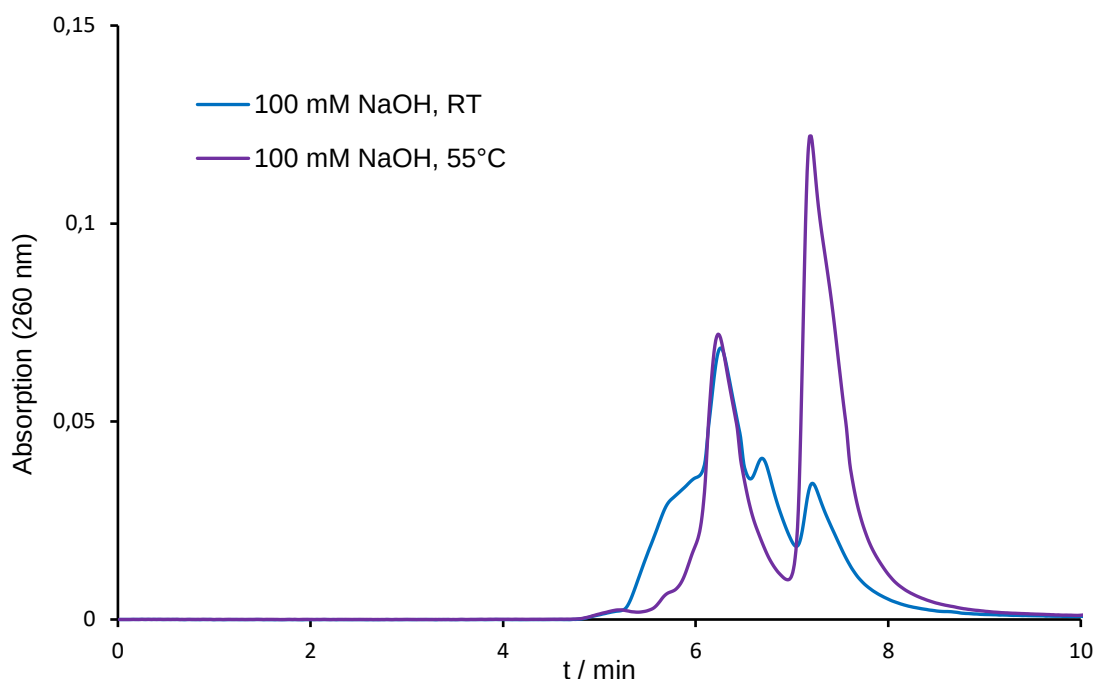


Abbildung 14: SEC-Analyse von Pu27 nach Behandlung mit 100 mM NaOH für 5 min bei RT (blau) und für 10 min bei 55°C (violett).

In den Chromatogrammen ist zu erkennen, dass in der bei 55°C behandelten Probe ein signifikant höherer Anteil an Monomer vorhanden ist verglichen mit der bei RT inkubierten Probe. Im Bereich der multimeren Strukturen eluiert nach ca. 6,2 min eine Spezies, die durch diese Behandlungsmethode offenbar nicht beeinflusst wird, wohingegen die anderen Spezies zu Monomer aufgelöst werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass unter Verwendung von 100 mM NaOH und zusätzlicher milder Wärmezufuhr bestimmte Multimere deprotoniert und somit aufgelöst werden können, während der Schmelzpunkt anderer Multimere unter diesen Bedingungen oberhalb von 55°C liegt. Da eine Bildung von reinem Monomer unter den getesteten Parametern mit 100 mM NaOH nicht möglich ist, wurde als Standard-Methode die Behandlung mit 150 mM NaOH bei RT gewählt, da hiermit in vorherigen Experimenten ein zuverlässiges Auflösen der multimeren Strukturen zu Monomeren gezeigt wurde.

Basische Behandlung mit Ammoniak

In weiteren Experimenten wurde getestet, ob auch eine Behandlung mit der schwächeren Base Ammoniak ausreicht, um reines Monomer zu bilden und wie sich diese Base insgesamt auf die Verteilung zwischen Multimeren und Monomeren auswirkt. Dies ist von Bedeutung, da konzentrierte Ammoniaklösung in der Phosphoramidit-Synthese genutzt wird, um das ODN nach der Synthese von der Festphase abzuspalten und sowohl die Schutzgruppen der Nukleobasen als auch die Cyanoethylschutzgruppen zu entfernen.^[60]

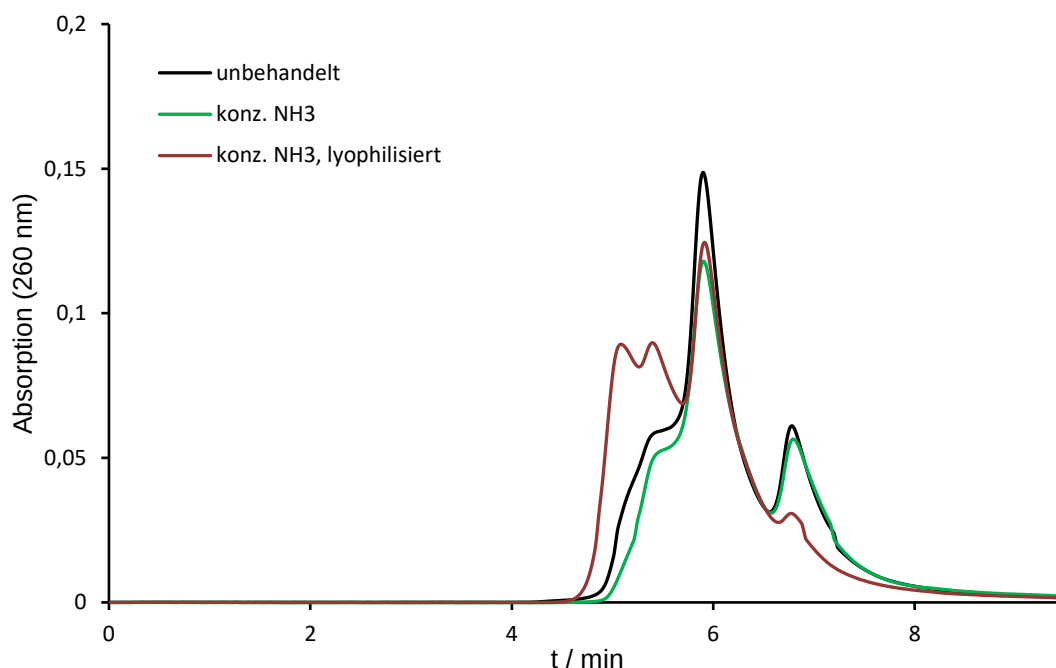


Abbildung 15: SEC-Analyse von Pu27 ohne Behandlung (schwarz), nach Behandlung mit konzentrierter NH_3 -Lösung (grün) und nach Behandlung mit konzentrierter NH_3 -Lösung und anschließendem Lyophilisieren (braun). Zur Herstellung der Proben mit Ammoniak wurde in H_2O gelöstes Pu27 ($1\ \mu\text{L}$, $1\ \text{nmol}$) mit dem dreifachen Volumen Ammoniak versetzt ($3\ \mu\text{L}$, 25%) und für 5 min bei RT inkubiert.

Die Herstellung von Monomer durch die Behandlung mit Ammoniak würde gegenüber der Behandlung mit NaOH den Vorteil bieten, dass die Base durch Lyophilisieren entfernt werden kann und somit die Salzkonzentration nicht beeinflusst wird.

Im Chromatogramm der SEC-Analyse von unbehandeltem Pu27 steht erneut ein hoher Anteil an multimeren Strukturen einem geringen Anteil an Monomer gegenüber (siehe Abbildung 15). Für die SEC-Analyse wurde ein Teil der NH_3 -behandelten Probe (Bedingungen während der Inkubation: 18,75% NH_3 , 11,0 M, $\text{pH} = 12,1$) mit einem Überschuss an KPP Puffer neutralisiert. Im Chromatogramm wird deutlich, dass das Verhältnis zwischen Monomer und Multimeren durch diese Behandlungsmethode kaum beeinflusst wird. Dies zeigt, dass eine Behandlung mit Ammoniak im Gegensatz zur Behandlung mit NaOH nicht in der Lage ist, die vorhandenen Multimere zu denaturieren. In vorangegangenen Experimenten mit NaOH konnte gezeigt werden, dass dort ein pH-Wert von 13,2 erforderlich ist, um reines Monomer zu bilden. Aufgrund der Basenstärke wird im Experiment mit NH_3 trotz der hohen Konzentration nur ein pH-Wert von 12,1 erreicht und dieser reicht nicht zum Aufbrechen der Multimere aus.

Ein anderer Teil der NH_3 -behandelten Probe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und anschließend in KPP-Puffer gelöst, da die

Inkubation in wässriger Ammoniaklösung mit anschließendem Lyophilisieren Bestandteil der DNA-Festphasensynthese ist.^[60] Hiermit sollen Erkenntnisse gewonnen werden, an welcher Stelle der Synthese die multimeren Strukturen entstehen.

In der Analyse mittels SEC ist zu erkennen, dass in dieser Probe nur noch ein äußerst geringer Anteil an Monomer vorhanden ist, während ein signifikanter Zuwachs bei den multimeren Strukturen zu verzeichnen ist (siehe Abbildung 15). Desweiteren scheint sich durch die Behandlungsmethode sogar verschiedene neue Spezies dieser Multimere zu bilden, die vor den ursprünglich vorhandenen Multimeren eluieren und somit ein noch größeres Molekulargewicht aufweisen.

Dieses Experiment liefert wertvolle Informationen zur initialen Entstehung der multimeren Strukturen. Demzufolge ist davon auszugehen, dass dieser Schritt in der Synthese der G4-DNA die Assoziation von Monomeren zu Multimeren fördert.

Aufgrund der starken Strukturveränderung bei einem Lyophilisieren in Gegenwart von NH_3 wurde in einem weiteren Experiment getestet, wie sich die Pu27-Sequenz verhält, wenn reines Monomer ohne NH_3 durch Lyophilisieren eingeengt wird. Somit kann untersucht werden, ob die verstärkte Bildung von Multimeren auf die Konzentrationserhöhung während des Lyophilisierungsprozesses zurückzuführen ist, oder ob NH_3 ursächlich für diese Beobachtung ist.

Dazu wurde zuerst reines Monomer gebildet, indem das ODN mit 150 mM NaOH nach der zuvor etablierten Methode behandelt und durch einen Überschuss an KPP Puffer neutralisiert wurde. Anschließend wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in H_2O gelöst und mittels SEC analysiert (siehe Abbildung 16).

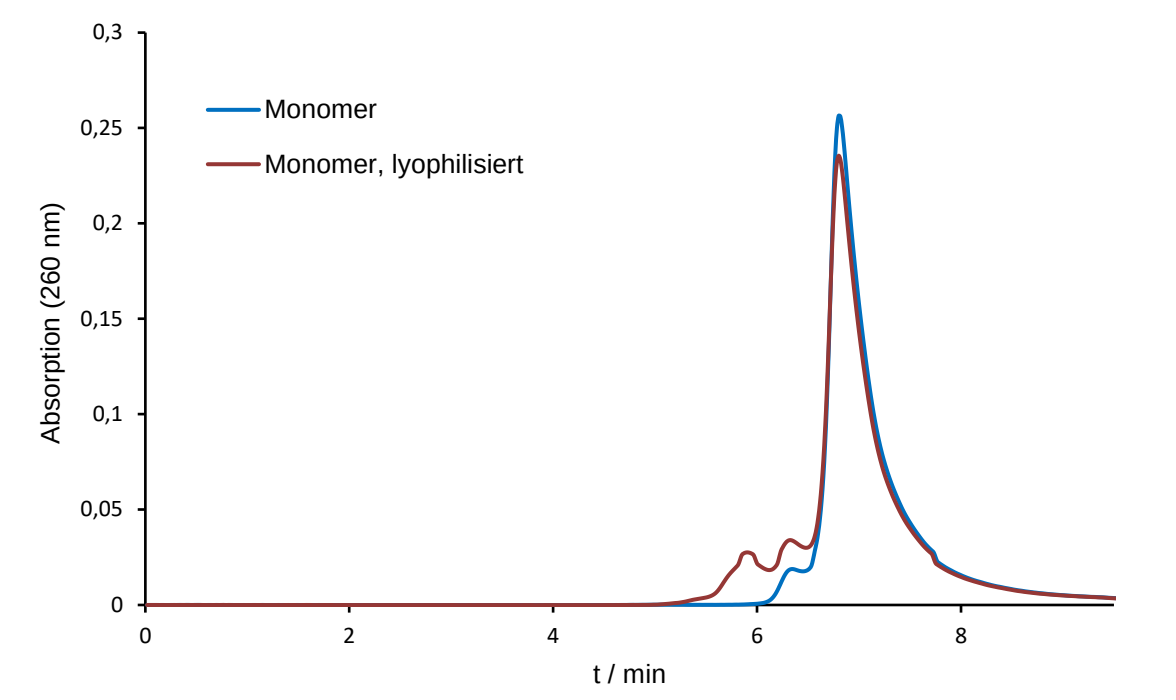


Abbildung 16: SEC- Analyse von Pu27 als Monomer und von Monomer nach Lyophilisieren in KPP-Puffer.

In den Chromatogrammen der SEC-Analyse wird deutlich, dass durch das Lyophilisieren ein kleiner Teil des zuvor durch NaOH-Behandlung gebildeten Monomers erneut Multimere bildet. Interessanterweise fällt dieser Anteil beim Lyophilisieren in KPP-Puffer sehr gering aus, obwohl während dem Sublimieren des Wassers die Konzentration des verbleibenden ODN und der Kaliumionen immer weiter ansteigt. Wird die Probe des in KPP-Puffer lyophilisierten Monomers mit der Probe verglichen, die in Ammoniak gelöst und lyophilisiert wurde, so wird deutlich, dass eine Behandlung mit Ammoniak eine signifikant stärkere Bildung von Multimeren zur Folge hat. Daraus kann geschlossen werden, dass die Entstehung der multimeren Strukturen zu einem sehr großen Teil nicht auf das Lyophilisieren zurück geführt werden kann, sondern erst die Behandlung mit Ammoniak und das Lyophilisieren einer solchen Lösung die drastische Bildung von Multimeren auslöst. Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass die Bildung von reinem Monomer aus einer Mischung von Strukturen für die Pu27-Sequenz durch die Behandlung mit 150 mM NaOH möglich ist. Eine niedrigere Konzentration von 100 mM in Kombination mit einer thermischen Behandlung führte hingegen nicht zur gewünschten exklusiven Bildung von Monomer. Eine stärkere Erwärmung gefolgt von verschiedenen Abkühlungsmethoden konnte ebenfalls nicht alle multimeren Strukturen auflösen. Zusätzlich wurden starke Hinweise gefunden, dass die Multimere durch die Zugabe von Ammoniak während der DNA-Synthese entstehen. Ein Auflösen der multimeren Strukturen konnte durch Zugabe der

3 Ergebnisse

schwächeren Base Ammoniak nicht erreicht werden. Die Ergebnisse der untersuchten Behandlungsmethoden sind zusammengefasst in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über Behandlungsmethoden für Pu27, optimierte Bedingungen sind in blau markiert.

Base	Konzentration	Temperatur	Sonstiges	Bildung von reinem Monomer
-	-	-	-	nein
-	-	95°C	langsam abgekühlt	nein
-	-	95°C	auf Eis abgekühlt	nein
NaOH	100 mM	RT	-	nein
NaOH	150 mM	RT	-	ja
NaOH	200 mM	RT	-	ja
NaOH	100 mM	55°C	-	nein
NH ₃	11 M	RT	-	nein

3.1.1.2 Untersuchung verschiedener ODN

Wie bereits in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, bildet die native Pu27-Sequenz aus dem c-myc Promotor eine Vielzahl von multimeren Strukturen aus, die durch eine basische Behandlung mit NaOH erfolgreich in reines Monomer überführt werden können. Für die Analyse von weiteren DNA-Sequenzen wurde diese basische Behandlung daher als Standardmethode gewählt. Zum Vergleich wurde zudem eine thermische Behandlung durchgeführt, da Erwärmen und Abkühlen gewöhnlich genutzt wird, um G4-DNA zu falten. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse für Pu27 zusammenfassend dargestellt.

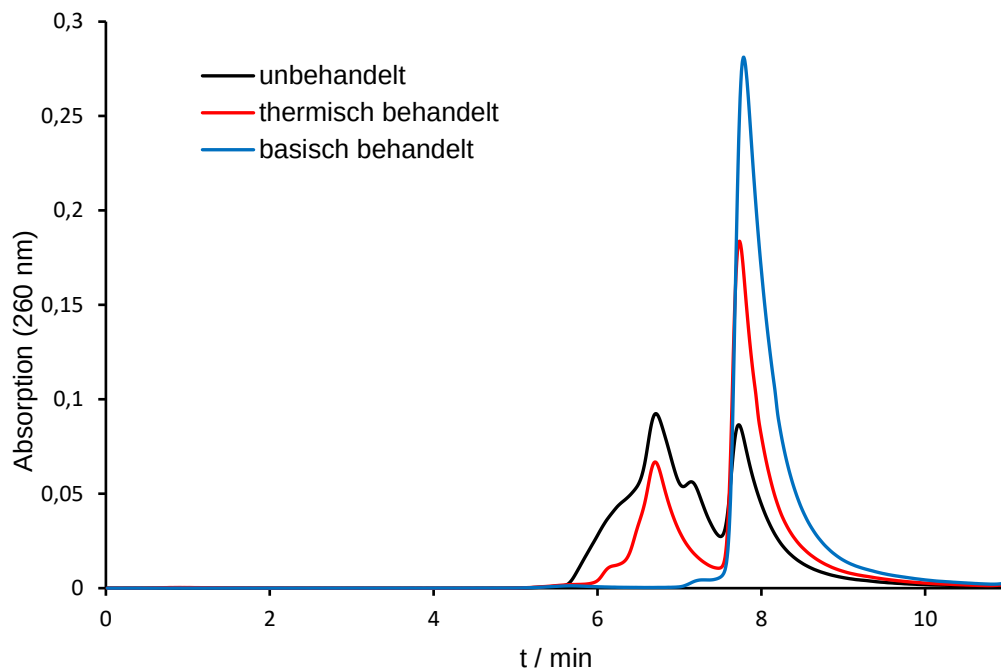


Abbildung 17: SEC-Analyse von Pu27 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGGAAGG) ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf RT (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

Es ist zu erkennen, dass nur ein Teil der multimeren Strukturen durch die thermische Behandlung in Monomer umgewandelt werden kann, während die Behandlung mit NaOH reines Monomer liefert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine thermische Behandlung, wie sie oft genutzt wird, zur Bildung von Pu27 Monomer nicht ausreichend ist. Dies kann zu Problemen führen, wenn genaue Konzentrationen benötigt werden wie beispielsweise bei Bindungsstudien. Diese Methode ist daher ungeeignet für solche Anwendungen und dient hier als Kontrolle.

Da diese Sequenz in späteren Experimenten im *Pulldown*-Verfahren zur Isolierung von Proteinen genutzt werden soll, wurde an das ODN eine Biotinfunktionalität angebracht, über

die eine Bindung an Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel möglich ist. Dazu wurde Biotin-TEG-genutzt, wobei Biotin durch einen Tetraethylenglykol-Linker (TEG-Linker) mit dem 3'-Ende des ODN verknüpft ist (siehe Abbildung 18).

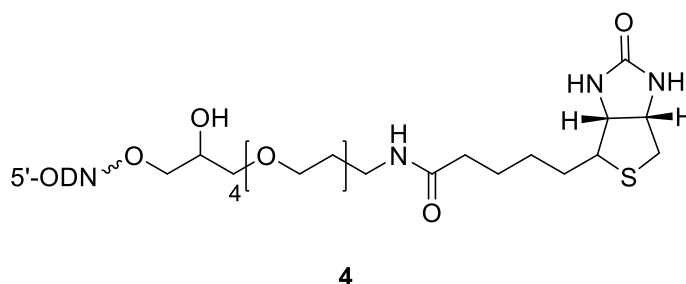


Abbildung 18: Struktur der Biotin-TEG Einheit (**4**) am 3'-Ende eines ODN.

Das biotinylierte ODN wurde ebenfalls mittels SEC untersucht, um beurteilen zu können, welchen Einfluss der Linker mit Biotin auf die Verteilung der Strukturen besitzt.

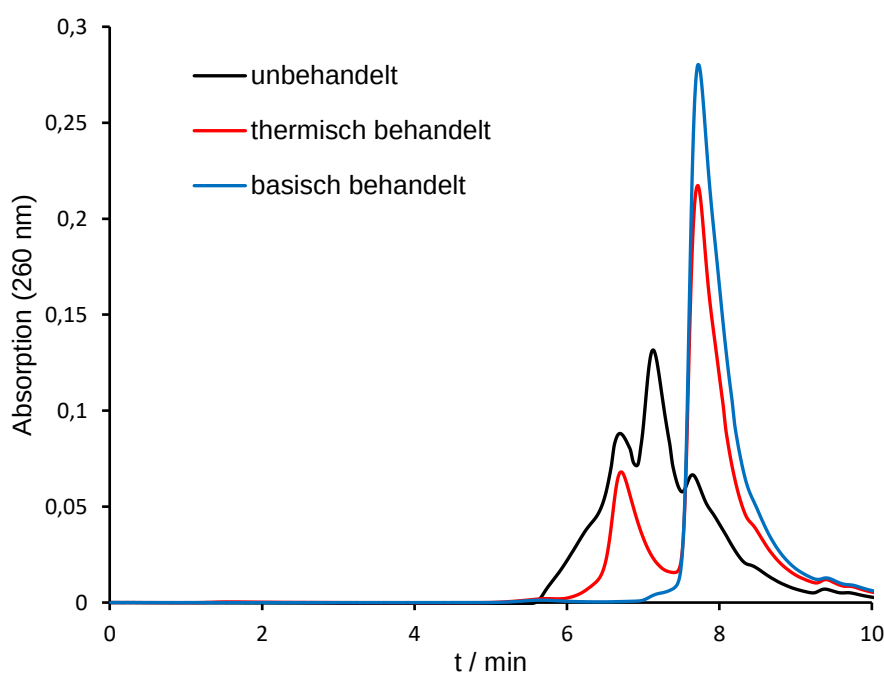


Abbildung 19: SEC-Analyse von Pu27-Biotin (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGG AAGG-Biotin-TEG) ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

In den Chromatogrammen der SEC-Analyse wird deutlich, dass Pu27-Biotin ebenfalls eine sehr hohe Tendenz zur Ausbildung multimerer Strukturen besitzt (Abbildung 19). Das unbehandelte ODN weist nur einen sehr geringen Anteil an Monomer auf. Durch eine thermische Behandlung lassen sich diese jedoch zu einem großen Teil in Monomer überführen. Verglichen mit dem nativen Pu27 ODN ohne Biotin zeigt die biotinylierte

Sequenz einen geringeren Anteil an Monomer. Eine basische Behandlung mit NaOH führt auch bei dieser Sequenz zur Bildung des gewünschten Monomers.

In weiteren Experimenten wurden die Strukturellen Eigenschaften von Derivaten der Pu27-Sequenz untersucht. Zur Untersuchung der Bildung von multimeren G4-Strukturen werden häufig die Sequenzen der verwendeten ODN verändert. Im Folgenden wurde Pu22, eine modifizierte Pu27 Sequenz, getestet. Bei dieser Sequenz wurde zunächst der G-Trakt, der nicht an der Bildung des monomeren Pu27-G4 beteiligt ist,^[61] entfernt. Der zweite und vierte G-Trakt enthalten ebenso wie die native Sequenz 4 G-Reste, wodurch der geformte G4 eine gewisse Dynamik besitzen sollte.^[34b] Die Sequenz ist in Abbildung 20 dargestellt.

Pu27	T	TGGG	GAGGG	TGGG	GAGGG	TGGG	GAA	GG
Pu22		TG	AGGG	TGGG	AGGG	TGGG	GAA	

Abbildung 20: Sequenzen von Pu27^[22] und Pu22^[34b]. Basen, die für Pu22 entfernt wurden, sind grau hinterlegt.

Diese Sequenz wurde ebenfalls mit den verschiedenen Methoden behandelt und durch SEC analysiert (siehe Abbildung 21).

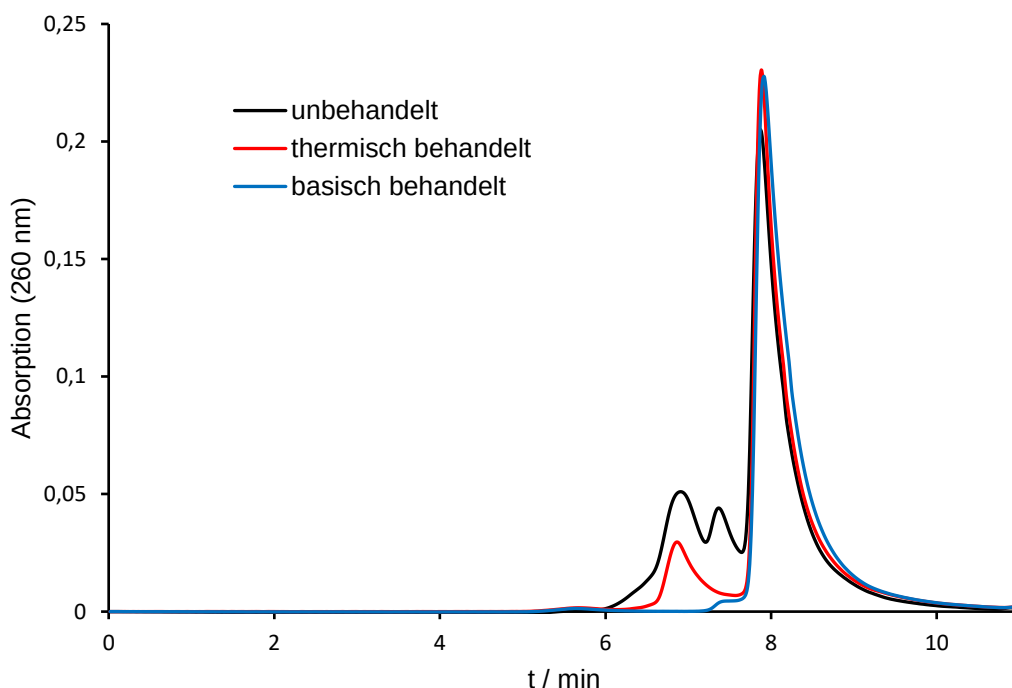


Abbildung 21: SEC-Analyse von Pu22 (TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA) ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

In den Chromatogrammen wird deutlich, dass auch diese modifizierte Sequenz ohne Vorbehandlung multimeren Strukturen ausbildet, wenngleich der Anteil dieser Multimere im

Vergleich zu Pu27 und Pu27-Biotin deutlich geringer ausfällt. Gleichzeitig fällt der Anteil an Monomer signifikant höher aus. Durch eine thermische Behandlung kann auch hier ein Teil der Multimere in Monomer umgewandelt werden, allerdings wird eine vollständige Konvertierung zu Monomer auch hier ausschließlich durch die Behandlung mit NaOH erzielt. Dies zeigt, dass sich eine Entfernung des fünften G-Trakts in der Pu27-Sequenz zwar positiv auf das Verhältnis zwischen Monomer und Multimeren auswirkt, allerdings selbst diese Modifikation nur mit der hier entwickelten Methode einer basischen Behandlung reines Monomer liefert.

Für weitere Untersuchungen wurde die zuvor beschriebene Sequenz Pu22 verändert, indem die Basen innerhalb des ODN neu angeordnet wurden. Ziel war es eine Sequenz mit gleicher Anzahl und Zusammensetzung der Basen, wie sie bei Pu22 vorliegt, zu erhalten. Die Basen wurden dabei so angeordnet, dass keine intramolekulare G4-Bildung mehr möglich ist. Aufgrund des hohen Anteils an G-Resten im ODN wäre eine intermolekulare Bildung von Strukturen höherer Ordnung über die Ausbildung von G-Quartetts (2) dennoch möglich. Die Sequenz Pu22-Kontrolle wurde analog zu Pu22 behandelt und durch SEC untersucht (siehe Abbildung 22).

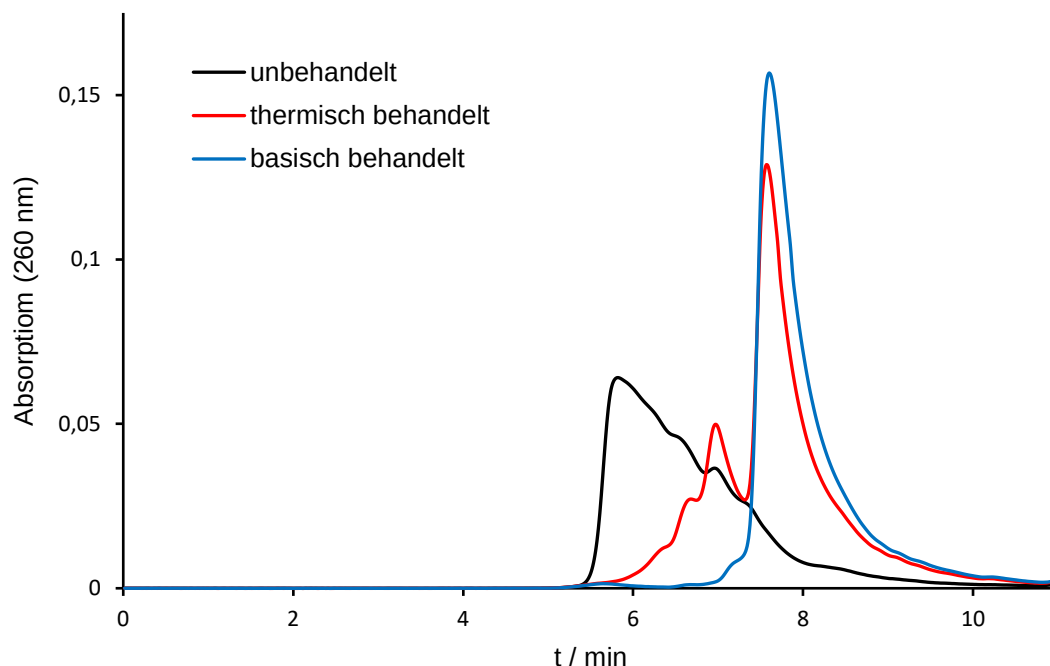


Abbildung 22: SEC-Analyse von Pu22-Kontrolle (GTGAGGGGGGAGAGTGTGAGGG) ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

Die Ergebnisse der SEC-Analyse zeigen, dass Pu22-Kontrolle ohne Vorbehandlung fast ausschließlich aus multimeren Strukturen besteht. Der überwiegende Teil dieser Strukturen lässt sich durch die thermische Behandlung in Monomer überführen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich bei den gebildeten Monomeren nicht um gefaltete G4-DNA handelt, da die Anordnung der G-Reste innerhalb der Sequenz keine Ausbildung stabiler intramolekularer G-Quartetts (2) erlaubt. Dies wird durch eine leicht verzögerte Retentionszeit von Pu22-Kontrolle gegenüber Pu22 unterstützt und lässt auf eine kompaktere Struktur des Pu22 Monomers schließen (siehe Kapitel 3.1.1.3, Abbildung 31). Eine Behandlung mit NaOH führt auch bei diesem ODN zu einer Bildung von reinem Monomer.

Um die Auswirkung einer Derivatisierung der nativen Pu27-Sequenz weiter zu untersuchen, wurde die Sequenz Myc22 gewählt. In dieser Sequenz ist, analog zu Pu22, der nicht an der Monomerbildung beteiligte G-Trakt entfernt worden. Es sind also auch hier nur noch die vier G-Trakte vorhanden, die an der Bildung des biologisch relevanten G4 im c-myc Promotor beteiligt sind.^[61] Zusätzlich bestehen der zweite und vierte G-Trakt lediglich aus drei G-Resten anstelle von vier in der nativen Sequenz, um die Dynamik des G4 einzuschränken (siehe Abbildung 23).^[36] Diese Sequenz wurde zum Vergleich ebenfalls nach den Standardmethoden behandelt und anschließend durch SEC untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

Pu27	TGGGGA	GGGT	GGGG	AGGG	TGGG	GAAGG
Pu22	TGA	GGGT	GGGG	AGGG	TGGG	GAA
Myc22	TGA	GGGT	GGG	TAGGG	TGGG	<u>TGTGAGTG</u>

Abbildung 23: Sequenzen von Pu27, Pu22 und Myc22.^[36] Basen, die verändert wurden, sind grau hinterlegt. Ausgetauschte Basen sind grün markiert.

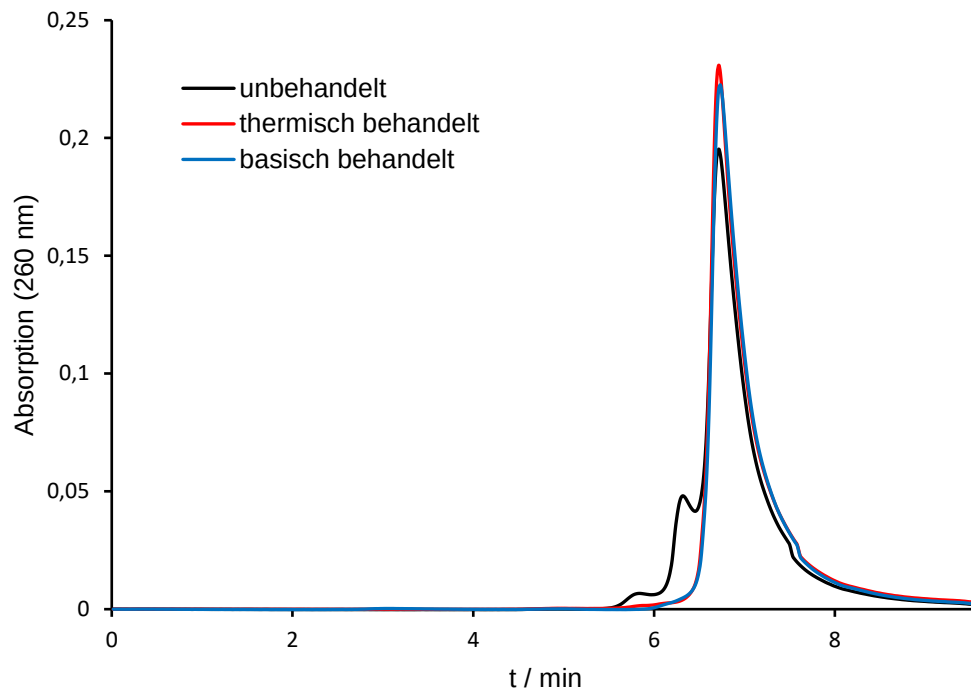


Abbildung 24: SEC-Analyse von Myc22 (TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTGTGAGTG) ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

In den Chromatogrammen der SEC-Analyse von Myc22 nach den drei Behandlungsmethoden ist zu erkennen, dass sich bei dieser Sequenz ohne Vorbehandlung nur ein äußerst geringer Anteil an multimeren Strukturen bildet. Im Gegensatz zu den Multimeren der anderen Sequenzen lassen sich diese durch die thermische Behandlung vollständig in Monomer überführen. Nach basischer Behandlung ist ebenfalls ausschließlich Monomer zu erkennen. Die Ergebnisse zeigen, dass die drastischen Veränderungen an der nativen Sequenz in der Tat zu einer Reduzierung der Tendenz zum Ausbilden von multimeren Strukturen führen. Durch eine Entfernung der vierten G-Reste im zweiten und vierten G-Trakt kann nur ein definierter G4 gebildet werden. Diese Reduktion intramolekularer Faltungsmöglichkeiten geht entsprechend der Ergebnisse mit einer verminderten Bildung von Multimeren nach der DNA-Synthese einher. Um die Myc22 Sequenz für spätere Experimente zur Isolierung von Proteinen nutzbar zu machen, wurde dieses ODN ebenfalls mit einer Biotin-TEG Modifikation versehen. Zum Überprüfen der Auswirkungen dieser Modifikation auf die strukturellen Eigenschaften wurden mit Myc22-Biotin ebenfalls Untersuchungen mittels SEC durchgeführt (siehe Abbildung 25).

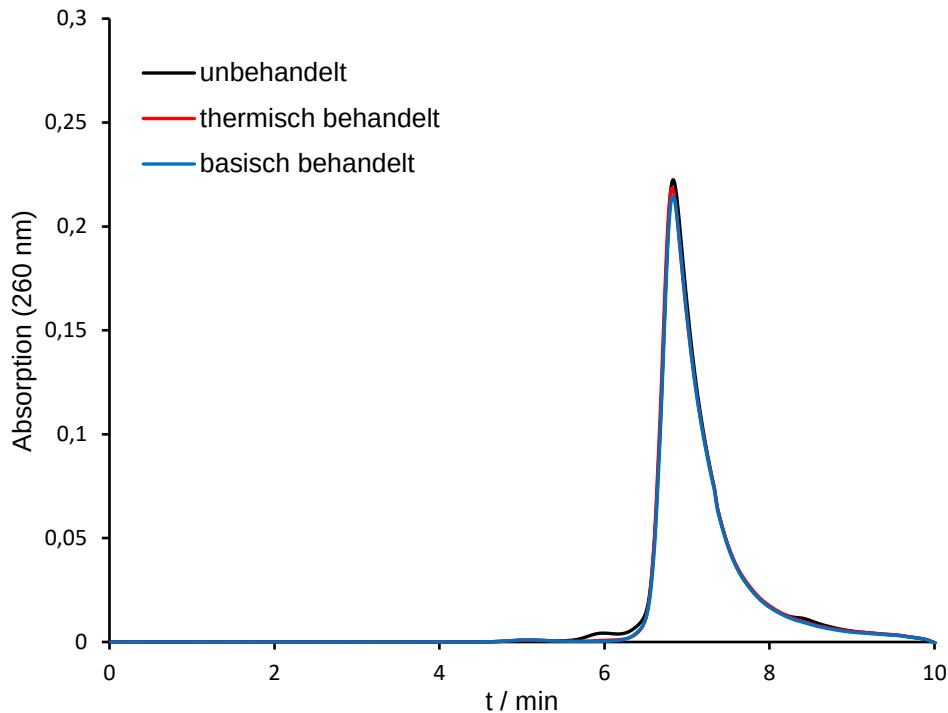


Abbildung 25: SEC-Analyse von Myc22-Biotin (TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTGTGA GTG-Biotin-TEG) ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

Durch die Analyse mittels SEC wird deutlich, dass bei dieser modifizierten Sequenz selbst ohne Vorbehandlung praktisch keine multimeren Strukturen vorhanden sind. Entsprechend wird sowohl nach thermischer Behandlung als auch nach der Behandlung mit Base reines Monomer erhalten.

Die Resultate dieser Experimente machen deutlich, dass die Problematik der Ausbildung von Multimeren, die bei der native Sequenz Pu27 sehr stark vertreten sind, durch Modifikationen in der Sequenz deutlich gemindert werden kann. Je stärker die Sequenz von der nativen abweicht, desto stärker scheint dieser Effekt zu sein. Um diese Problematik zu kontrollieren, können Sequenzmodifikationen jedoch umgangen werden, indem die hier entwickelte Methode einer Behandlung mit 150 mM NaOH genutzt wird. Dank dieser Methode ist es möglich, die native Sequenz durch ein einfaches Verfahren als Monomer nutzbar zu machen, ohne Modifikationen einzusetzen, die möglicherweise ebenfalls die biologische Funktion verändern.

Um in späteren Bindungsstudien einen Vergleich zwischen Pu27 und anderen G4 ziehen zu können, wurde der G4 aus dem humanen Minisatellit CEB25 herangezogen.^[62] Dazu wurde zum einen die Wildtyp-Sequenz CEB25-L191-Biotin genutzt, die in der ersten und dritten Schleife je eine Base und in der zweiten Schleife 9 Basen besitzt. Zum anderen wurde die

modifizierte Sequenz CEB25-L111-Biotin genutzt, die in jeder Schleife nur eine Base besitzt. In Abbildung 26 ist die SEC-Analyse von CEB25-L191-Biotin dargestellt.

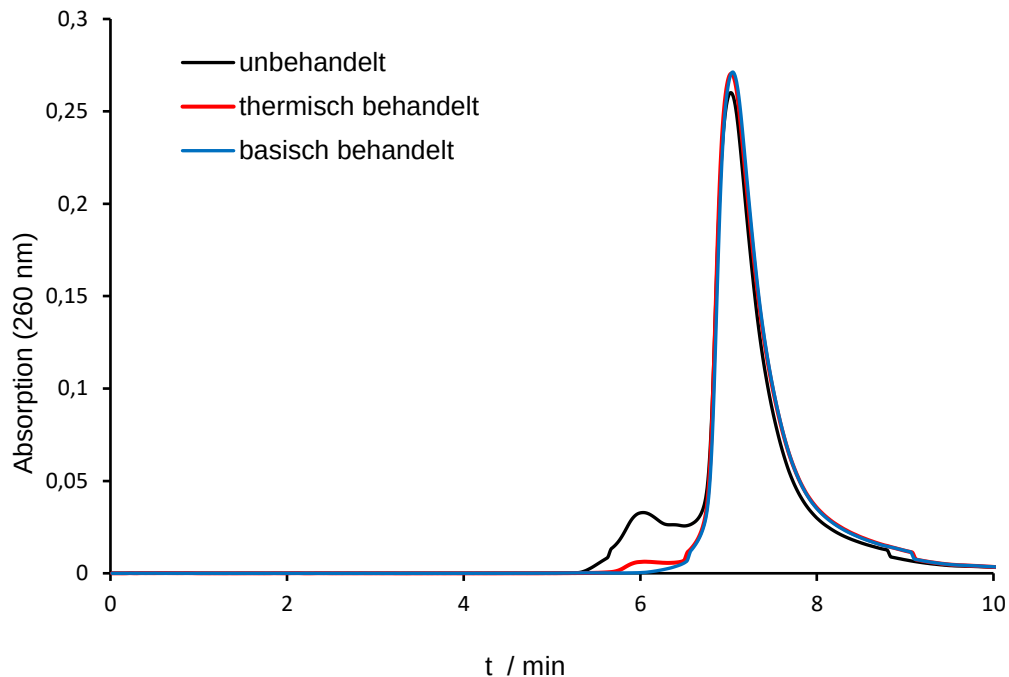


Abbildung 26: SEC-Analyse von CEB25-L191-Biotin (AAGGGTGGGTGTAAGTGTGGGT GGGTGTGAGTGTG-Biotin-TEG ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

In den Chromatogrammen ist zu erkennen, dass die native Sequenz CEB25-L191-Biotin ohne Vorbehandlung zum überwiegenden Teil als Monomer vorliegt. Im Bereich der multimeren Strukturen ist allerdings zu erkennen, dass die vorhandenen Multimere relative breit eluieren, was darauf hinweist, dass es sich um eine Vielzahl verschiedener Strukturen handelt. Diese können zu einem großen Teil durch thermische Behandlung in Monomer überführt werden, allerdings gelingt auch hier eine vollständige Umwandlung in Monomer analog zum native Pu27 nur mit einer basischen Behandlung. Die modifizierte Sequenz CEB25-L111-Biotin wurde ebenfalls mit den verschiedenen Methoden behandelt und hinsichtlich ihrer Strukturen untersucht (siehe Abbildung 27).

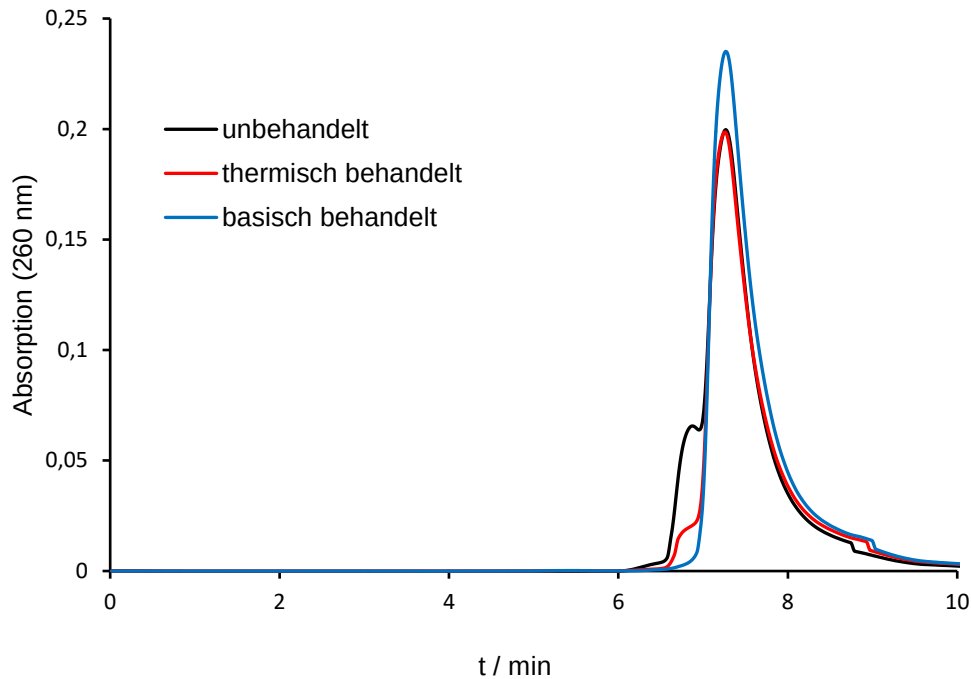


Abbildung 27: SEC-Analyse von CEB25-L111-Biotin (AAGGGTGGGTGGGTGGGTG TGAGTGTG-Biotin-TEG) ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

In der SEC-Analyse wird deutlich, dass die modifizierte Sequenz ein ähnliches Verhältnis zwischen Multimeren und Monomeren aufweist wie das native CEB25-L191-Biotin. Ohne Behandlung zeigt sich innerhalb der multimeren Strukturen jedoch keine diverse Verteilung, sondern nur ein einzelnes Signal. Hieraus kann geschlossen werden, dass eine Verkürzung der zweiten Schleife in der CEB25-Sequenz zwar nicht mit einer Reduktion der Menge an multimeren Strukturen einhergeht, dafür allerdings die Komplexität der Multimere abnimmt. Durch eine thermische Behandlung kann ebenfalls ein Teil dieser Strukturen in Monomer überführt werden. Eine vollständige Monomerbildung kann allerdings auch hier nur durch eine basische Behandlung erzielt werden.

3.1.1.3 Untersuchung von Monomeren

In weiteren Experimenten wurden die Retentionszeiten der verschiedenen ODN näher betrachtet, um daraus gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Struktur ziehen zu können. Für diese Experimente wurden, sofern nicht anders beschrieben, ausschließlich Monomere verwendet, die durch die Methode der basischen Behandlung mittels NaOH hergestellt wurden. Durch die vorangegangenen Experimente konnten erfolgreich Monomere hergestellt werden, allerdings kann durch diese Analytik nicht gesagt werden, ob die gebildeten unmodifizierten und modifizierten Monomeren als gefaltete G4-DNA oder ungefaltet vorliegen. Innerhalb dieses Kapitels werden für diese Fragestellung die Retentionszeiten der Monomere während der SEC herangezogen.

Im ersten Schritt wurde untersucht, wie sich die Modifikation mit Biotin-TEG (**4**) auf die Retentionszeit in der SEC-Analyse auswirkt. Die Chromatogramme der Analysen von Monomeren mit und ohne Modifikation sind in Abbildung 28 dargestellt.

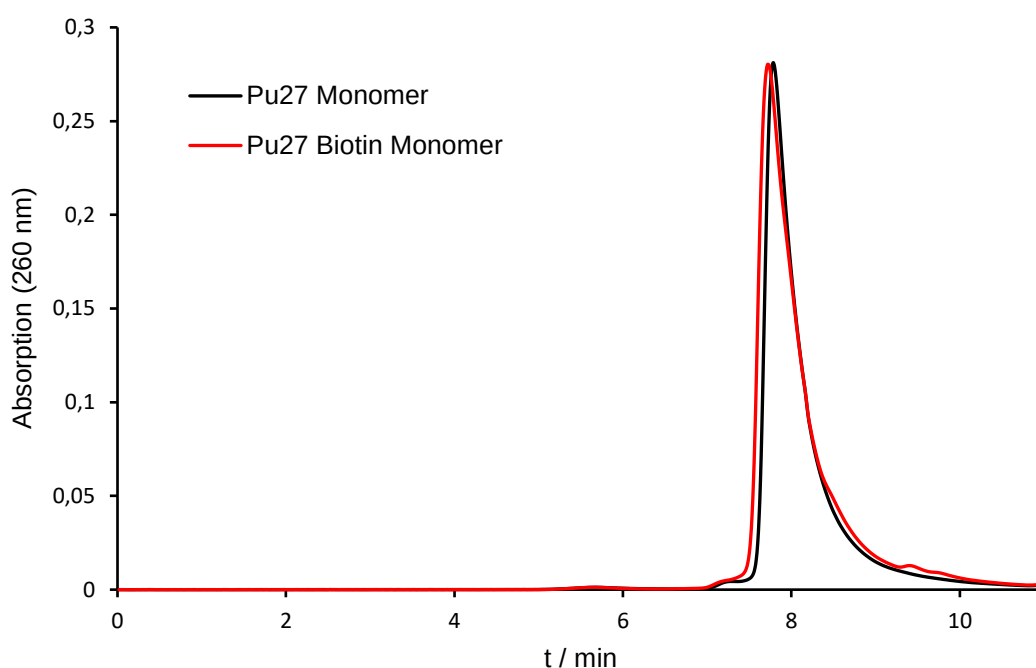


Abbildung 28: SEC-Analyse von Pu27 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG) (schwarz) und Pu27-Biotin (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-Biotin-TEG) (rot) nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer.

In der SEC-Analyse ist zu erkennen, dass Pu27-Biotin unmittelbar vor Pu27 eluiert und eine Retentionszeit besitzt, die geringfügig kleiner ist als die von Pu27. Dieser Unterschied lässt sich durch die zusätzliche Biotin-Funktionalität am 3'-Ende des ODN erklären. Durch die Modifikation wird das Molekulargewicht erhöht, wodurch in der Analyse mittels SEC ein früheres Eluieren erwartet wird. Die beobachteten Unterschiede in den Retentionszeiten

stimmen somit mit den theoretischen Erwartungen aufgrund der Molekulargewichtsdifferenz überein.

Für spätere Pulldown-Experimente wurde eine Kontrollsequenz für Pu27-Biotin entworfen, die nicht in der Lage ist, stabile G4-Strukturen zu bilden. Dazu wurden, basierend auf der Sequenz von Pu27, 6 G-Reste gegen T-Reste ausgetauscht. Dieser Austausch hat zur Folge, dass dieses Einzelstrang-ODN als *random coil* bzw. lineare Sequenz vorliegt und keinen kompakten G4 ausbilden kann. Um zwischen den beiden biotinylierten Sequenzen einen Vergleich ziehen zu können, sind deren SEC-Chromatogramme in Abbildung 29 dargestellt.

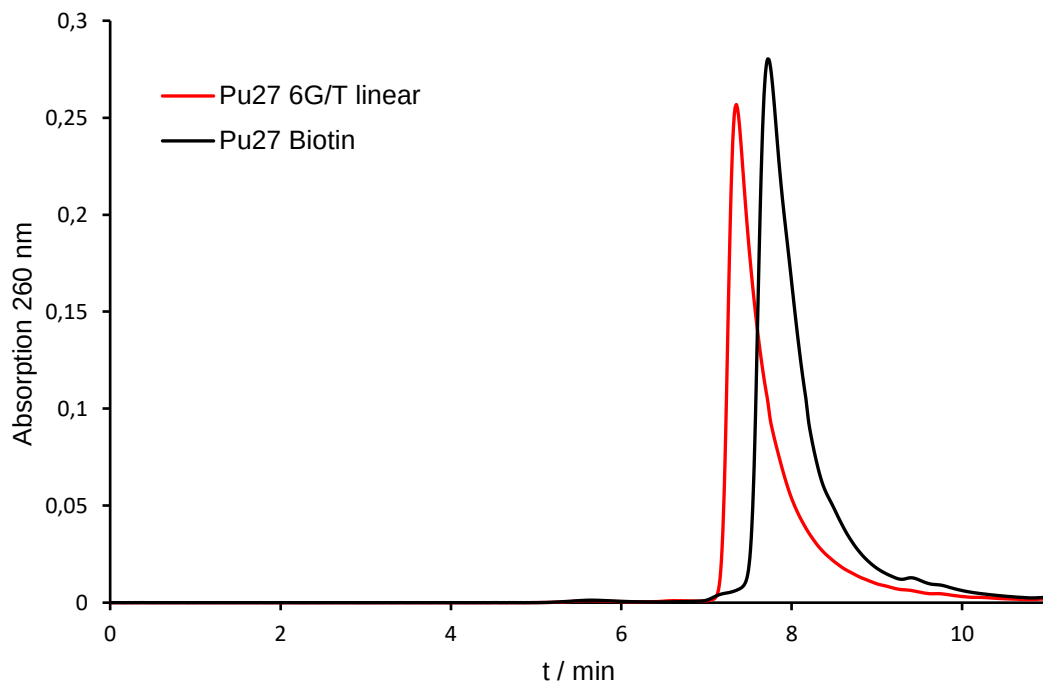


Abbildung 29: SEC-Analyse von Pu27 6G/T linear-Biotin (TGTGTAGTGTG TGGAGTGTGTGGAAGG-Biotin-TEG) ohne Vorbehandlung (rot) und Pu27-Biotin (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-Biotin-TEG) (schwarz) nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (schwarz).

In den Chromatogrammen ist zu erkennen, dass Pu27 6G/T linear-Biotin signifikant früher eluiert als Pu27-Biotin. Da beide ODN mit 27 Nukleotiden die gleiche Länge aufweisen, kann anhand des Unterschieds in der Retentionszeit festgestellt werden, dass sich die beiden ODN in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden. Pu27-Biotin besitzt der Retentionszeit im Chromatogramm zufolge eine kompaktere, räumlich weniger anspruchsvolle Struktur und eluiert aus diesem Grund später. Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass Pu27-Biotin als G4 vorliegt.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei dem Signal von Pu27 6G/T linear-Biotin um Multimere handelt und dies der Grund für das frühere Eluieren des ODN ist, wurde Pu27

6G/T linear-Biotin ebenfalls nach der Standardmethode mit 150 mM NaOH behandelt und mit dem ODN ohne Vorbehandlung verglichen (siehe Abbildung 30).

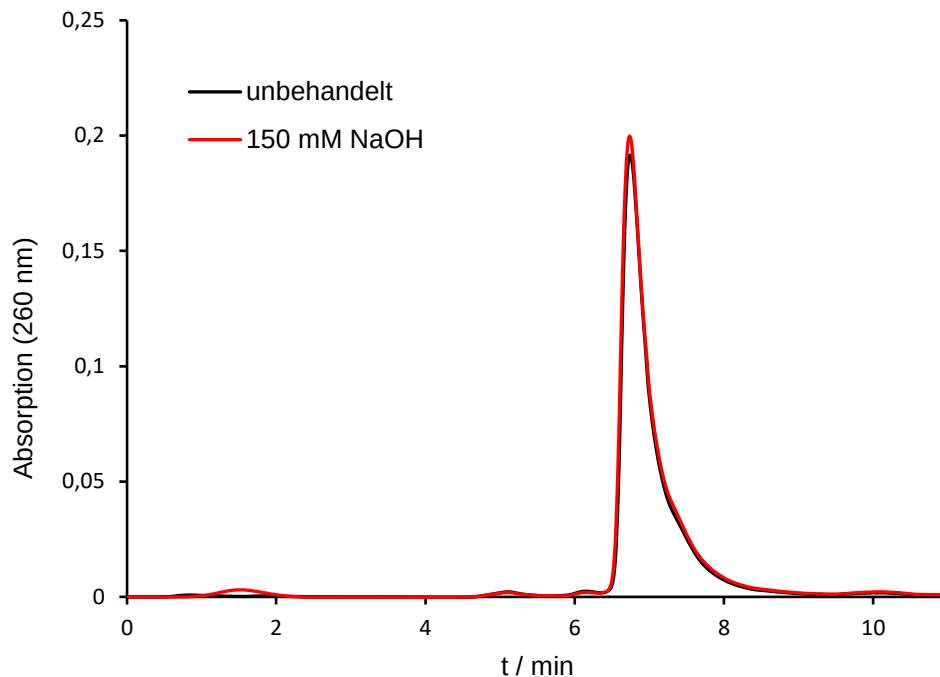


Abbildung 30: SEC-Analyse von Pu27 6G/T linear-Biotin (TGTGTAGTGTGTGGAGT GTGTGGAAGG-Biotin-TEG) ohne Vorbehandlung (schwarz) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (rot).

Anhand der SEC-Chromatogramme wird deutlich, dass Pu27 6G/T linear-Biotin ohne Vorbehandlung und nach basischer Behandlung identische Retentionszeiten zeigt. Somit kann mit Sicherheit gesagt werden, dass es sich bei der eluierenden Spezies sowohl mit als auch ohne Vorbehandlung um Monomere handelt. Aus diesem Grund wurde dieses linear vorliegende ODN in späteren Experimenten ohne Vorbehandlung eingesetzt.

Wie zuvor bereits gezeigt wurde, besitzen Pu27 6G/T linear-Biotin und Pu27-Biotin unterschiedliche Retentionszeiten. Aus diesen kann aufgrund der gleichen Anzahl an Nukleotiden in den beiden ODN auf einen Unterschied in der räumlichen Struktur geschlossen werden. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob dieser Unterschied ebenfalls auf die beiden ODN Pu22 und Pu22-Kontrolle zutrifft. Diese ODN weisen mit 22 Nukleotiden ebenfalls die gleiche Länge auf, haben aber im Gegensatz zu den zuvor betrachteten Sequenzen den entscheidenden Vorteil, dass ihr Gehalt an A, G und T identisch und lediglich die Abfolge der Basen unterschiedlich ist. Dieses Merkmal ermöglicht deshalb auch einen Vergleich des Absorptionsverhaltens beider ODN. G-reiche ODN besitzen die Eigenschaft, dass sich ihre Absorption bei einer Wellenlänge von 295 nm erhöht, sobald die Bildung einer G4-Struktur erfolgt.^[63] Aus diesem Grund wurde bei diesen Sequenzen

zusätzlich die Absorption bei 295 nm gemessen, da bei den Monomeren dieser beiden ODN ein direkter Vergleich möglich ist. Die Ergebnisse der SEC-Analysen sind in Abbildung 31 dargestellt.

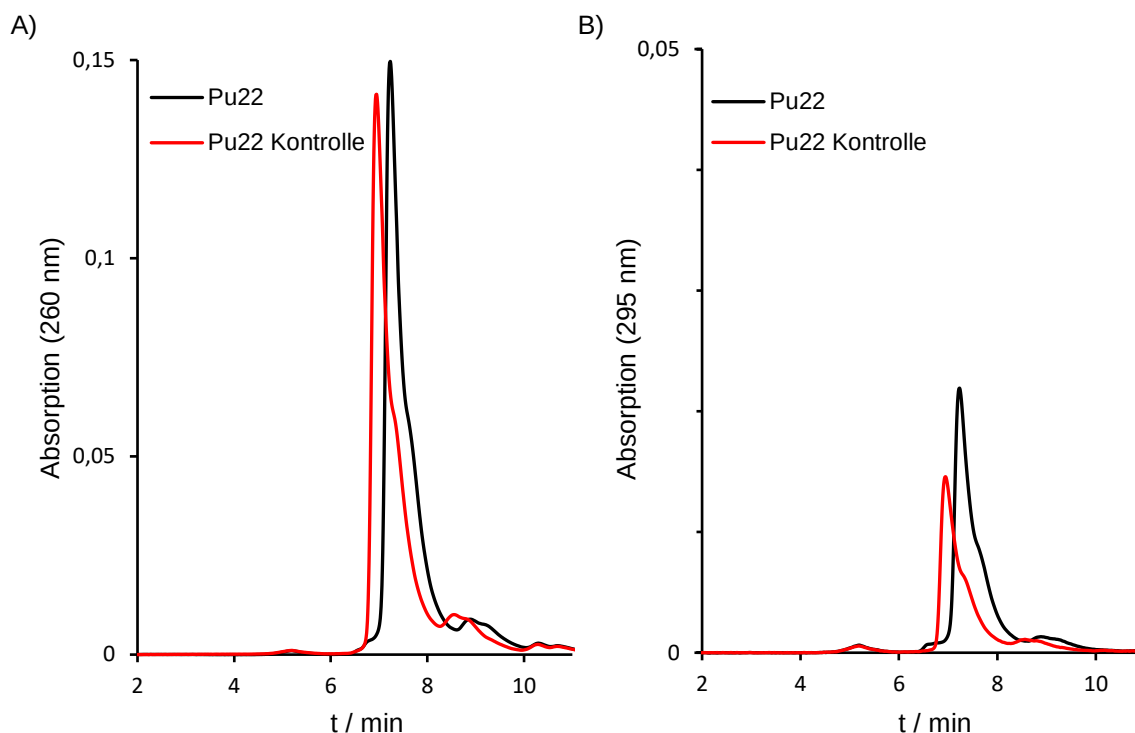


Abbildung 31: SEC-Analyse von 350 pmol Pu22 (TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA) (schwarz) und 350 pmol Pu22-Kontrolle (GTGAGGGGGGAGAGTGTGAGGG) (rot) nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K^+ -haltigem Puffer. A) Absorption bei 260 nm, B) Absorption bei 295 nm. Die in diesen Experimenten verwendeten ODN wurden nicht HPLC-gereinigt vom Hersteller bezogen.

In den Chromatogrammen der Analyse mittels SEC ist zu erkennen, dass Pu22-Kontrolle früher eluiert als Pu22. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass Pu22 eine kompaktere räumliche Struktur aufweist als Pu22-Kontrolle, was wiederum ein späteres Eluieren zur Folge hat und ein Hinweis auf eine G4-Bildung ist. Die Ergebnisse für die Retentionszeit sind konsistent mit den Messungen der 27er ODN Pu27-Biotin und Pu27 6G/T Linear-Biotin (siehe Abbildung 29), wo dieser Effekt ebenfalls beobachtet wurde. Die Absorption bei 260 nm ist bei beiden ODN annähernd identisch (siehe Abbildung 31 A)). Werden jedoch die Absorptionen bei 295 nm betrachtet, so wird deutlich, dass Pu22 hier signifikant stärker absorbiert als Pu22-Kontrolle. Der Unterschied der Wellenlängenverhältnisse lässt somit auf eine erfolgreiche Bildung einer G4-Struktur bei Pu22 schließen.^[63] Die Eigenschaft des unterschiedlichen Absorptionsverhaltens zwischen ungefaltetem Einzelstrang und G4 bei 295 nm wurde in späteren Experimenten zudem zur Bestimmung des Schmelzpunktes von G4 genutzt (siehe Kapitel 3.1.3). Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem durch die

NaOH-Behandlung mit anschließender Neutralisation gebildeten Monomer tatsächlich um G4-Strukturen handelt.

Um für spätere *Pulldown*-Experimente als Vergleich zu G4 und Einzelstrang eine zusätzliche DNA-Struktur nutzen zu können, wurde die Hybridisierung von Pu27 6G/T linear-Biotin und dessen Komplementärstrang zu dem entsprechenden Doppelstrang untersucht. Die Analyse der Hybridisierung ist in Abbildung 32 dargestellt.

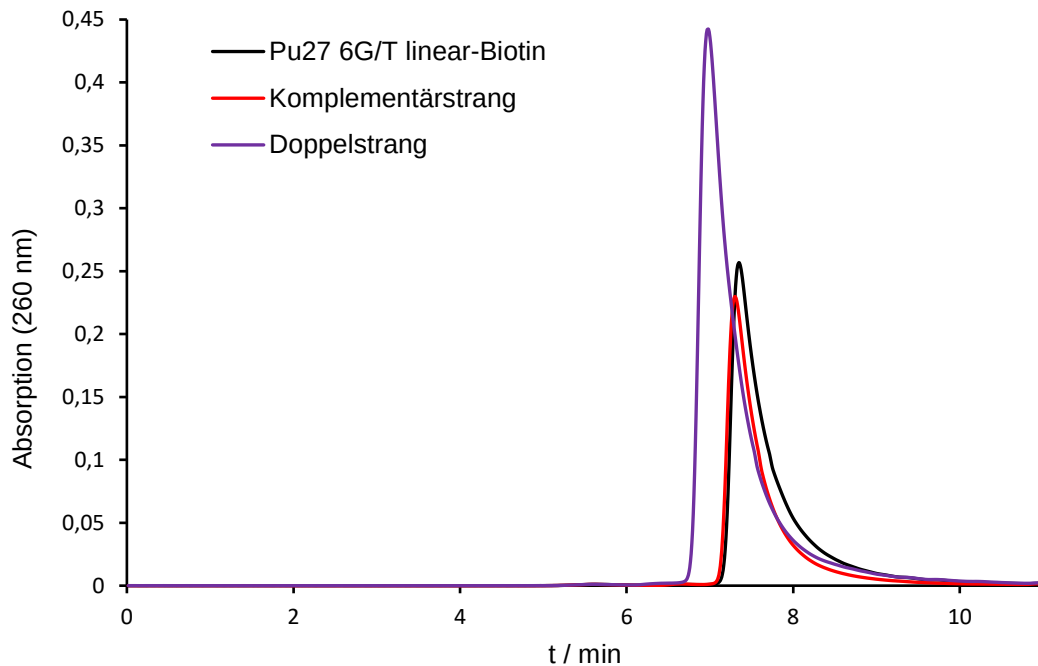


Abbildung 32: SEC-Analyse von Pu27 6G/T linear-Biotin (TGTGTTAGTGTGTGGAGT GTGTGGAAGG-Biotin-TEG) (schwarz), Pu27 6G/T linear Komplementärstrang (CCTTCCACACACTCCACACACTACACA) und nach Hybridisierung für 3 min bei 95°C und Abkühlen auf RT (1,0 Äq. Pu27 6G/T linear-Biotin, 1,2 Äq. Komplementärstrang) (violett).

Die Chromatogramme der SEC-Analyse zeigen, dass Pu27 6G/T linear-Biotin und dessen Komplementärstrang bei gleichen Retentionszeiten eluieren. Nach der Hybridisierung ist ein neues Signal bei einer geringeren Retentionszeit zu erkennen, woraus geschlossen werden kann, dass es sich um eine Struktur mit größerem sterischen Anspruch handelt. Hieraus wird ersichtlich, dass unter den getesteten Bedingungen eine Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang stattgefunden hat.

3.1.2 Gelelektrophorese

Die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Behandlungsmethoden für verschiedene ODN wurden nach der Analyse durch SEC ebenfalls durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersucht. Die Proben wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert, die auch für die Proben der SEC-Analyse genutzt wurden und anschließend mit SDS-Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde die DNA durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Das Gel ist in Abbildung 33 dargestellt.

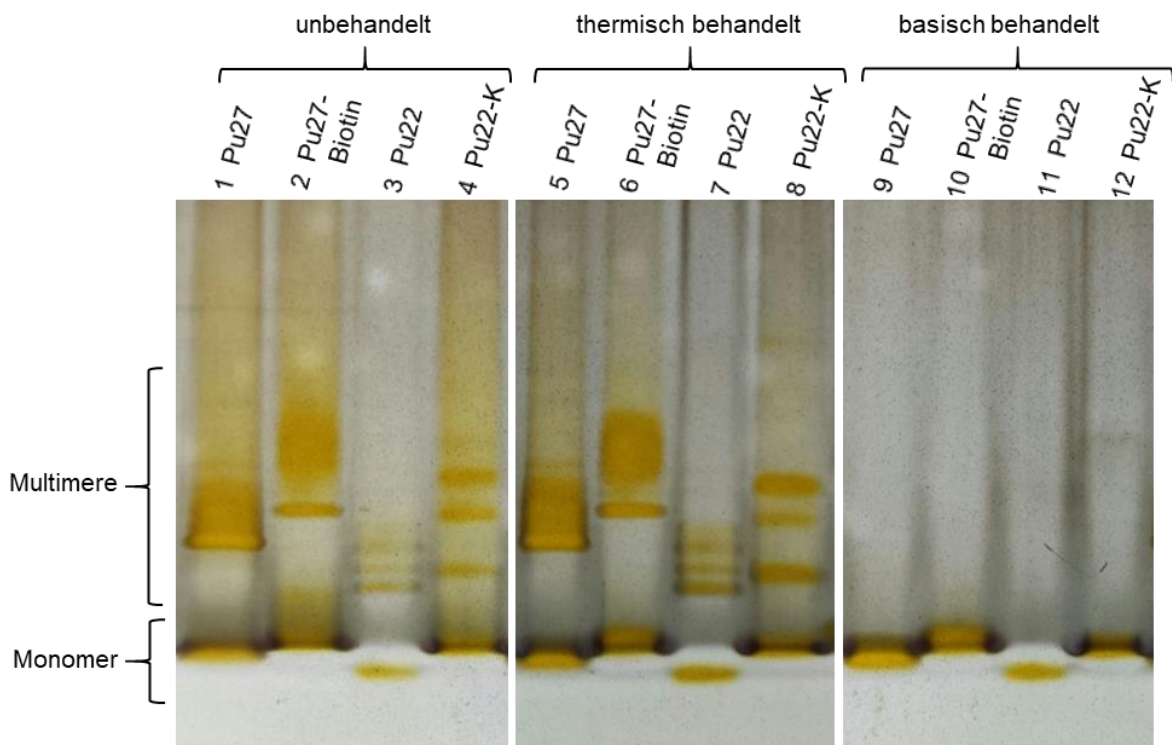


Abbildung 33: SDS-PAGE Gel (12%) von Pu27 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGG AAGG), Pu27-Biotin (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-Biotin-TEG), Pu22 (TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA) und Pu22-Kontrolle (GTGAGGGGGGAGAGTGT GAGGG) ohne Behandlung, nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer.

Auf dem SDS-PAGE-Gel zeigen alle unbehandelten Stränge sowohl eine Bande, die eine große Mobilität aufweist, als auch mehrere Banden mit kleinerer Mobilität, die den multimeren Strukturen entsprechen. Nach der thermischen Behandlung sind die multimeren Strukturen immer noch vorhanden, hingegen ist nach der Denaturierung unter basischen Bedingungen und anschließender Neutralisation ausschließlich eine Monomerbande zu erkennen. Dies zeigt in Übereinstimmung zu den Ergebnissen aus den SEC-Analysen, dass eine thermische Behandlung nicht ausreichend ist, um die multimeren Strukturen in Monomer umzuwandeln und die Multimere in diesem Fall nur durch eine Behandlung mit

NaOH denaturiert werden können. Die Monomerbanden von Pu27 und Pu27-Biotin zeigen eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität (siehe Spur 9 und 10), die durch das höhere Molekulargewicht von Pu27-Biotin bedingt durch die Biotin-Modifikation zu erklären ist. Die ODN Pu22 und Pu22-Kontrolle besitzen zwar das gleiche Molekulargewicht, allerdings wandert Pu22 im Gel weiter als Pu22-Kontrolle (siehe Spur 11 und 12). Dies zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den SEC-Analysen wiederum, dass Pu22 eine kompaktere Struktur besitzt. Dieses Ergebnis spricht somit ebenfalls für eine G4 Struktur, während Pu22-Kontrolle vermutlich als linearer Einzelstrang im Gel läuft.

In einem weiteren SDS-PAGE Gel wurden zusätzlich die ODN Myc22 und Myc22-Biotin untersucht. Zum Vergleich wurden dort ebenfalls die ODN Pu27 und Pu22 aufgetragen.

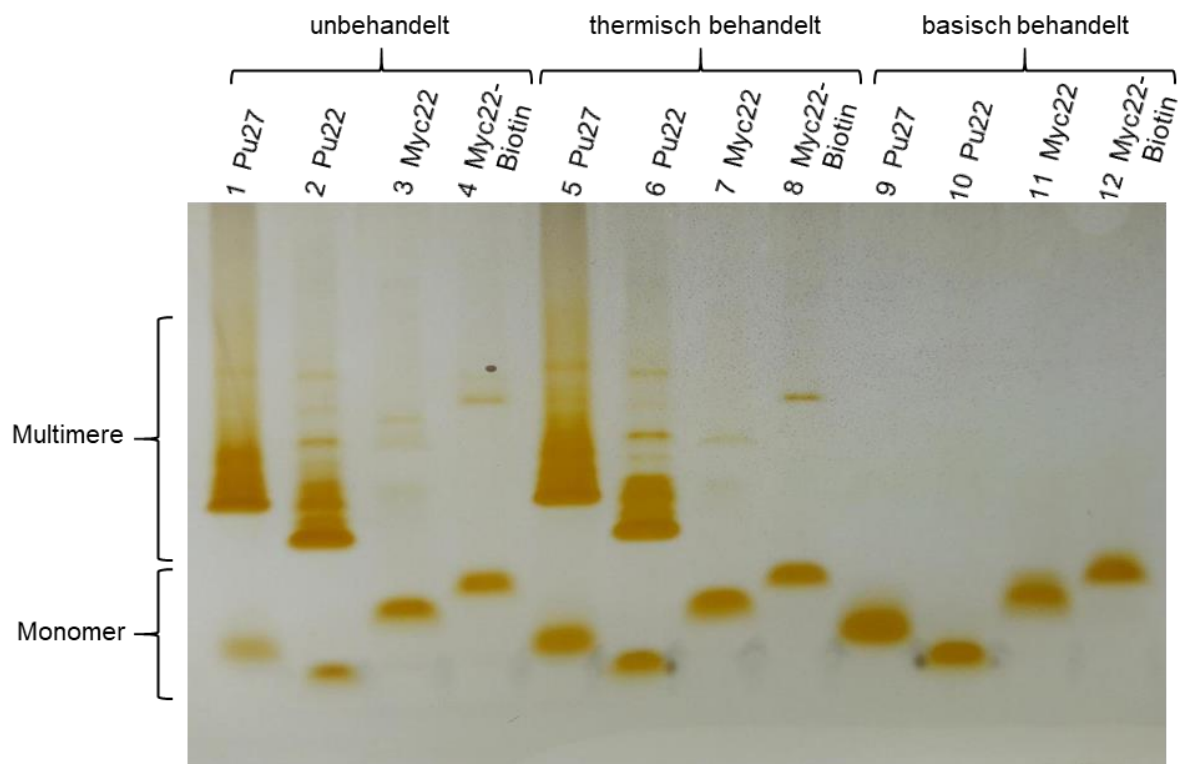


Abbildung 34: SDS-PAGE-Gel (15%) von Pu27 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGG AAGG), Pu22 (TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA), Myc22 (TGAGGGTGGGTAGGGT GGGTGTGAGTG) und Myc22-Biotin (TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTGTGAGTG-Biotin-TEG) ohne Behandlung, nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer.

Auf dem SDS-PAGE-Gel wird deutlich, dass Myc22 ohne Vorbehandlung signifikant weniger Multimeren aufweist als Pu27 und Pu22 (siehe Spur 1-3). In der Probe von Myc22-Biotin (Spur 4) sind nur Spuren von Strukturen Multimeren zu erkennen. Die Ergebnisse

stehen in Übereinstimmung zu den Ergebnissen der SEC-Analytik, wo diese Verteilung der Strukturen ebenfalls beobachtet wurde. Durch thermische Behandlung können bei Myc22 die multimeren Strukturen annähernd vollständig gelöst werden (Spur 7). Durch die basische Behandlung mit 150 mM NaOH werden auch hier alle multimeren Strukturen in Monomer umgewandelt. Myc22-Biotin zeigt aufgrund der Biotin-Modifikation analog zu den Pu27-Sequenzen (siehe Abbildung 33, Spur 9 und 10) eine geringere elektrophoretische Mobilität (siehe Abbildung 34, Spur 11 und 12). Wird der Anteil an Monomer in den Proben betrachtet, so kann insgesamt gesagt werden, dass dieser in den Proben ohne Vorbehandlung am geringsten ist, nach thermischer Behandlung zunimmt und nach basischer Behandlung am größten ist, wie am Beispiel von Spur 1, 5 und 9 deutlich wird.

3.1.3 UV-Schmelzkurven

G4-DNA besitzt die besondere Eigenschaft, dass ihre Absorption bei einer Wellenlänge von 295 nm sinkt, sobald die Struktur zum Einzelstrang denaturiert.^[63] Innerhalb dieses Kapitels wird dieser Effekt genutzt, um das Vorliegen von G4-Strukturen zu bestätigen und deren Schmelzpunkte zu bestimmen.

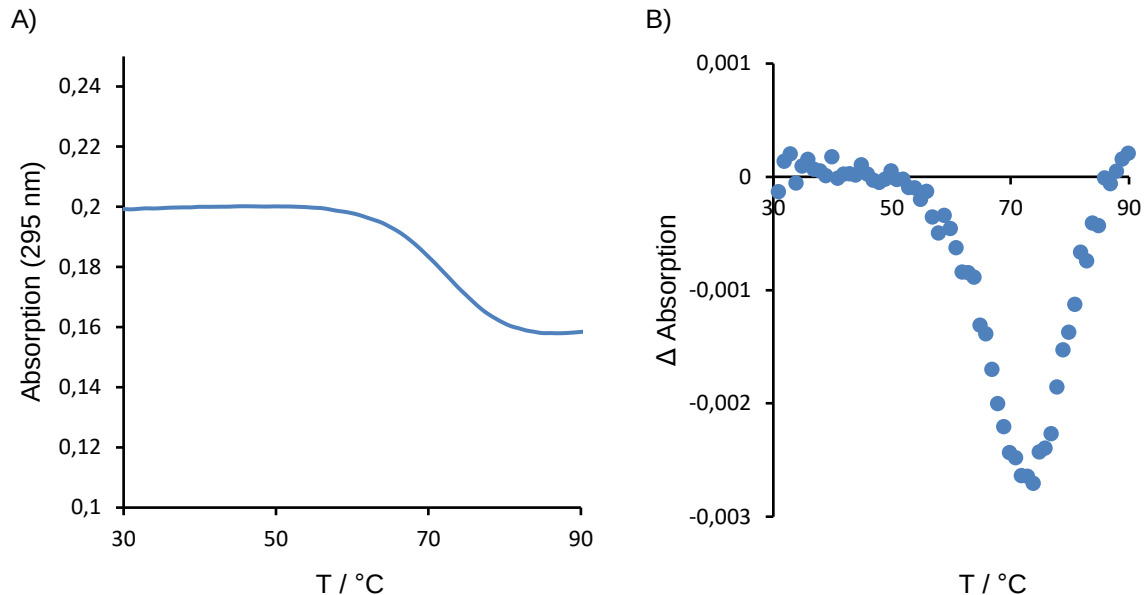


Abbildung 35: A) UV-Schmelzkurve von Pu27 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGG AAGG) bei 295 nm nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K^+ -haltigem Puffer, B) Ableitung der Schmelzkurve.

In Abbildung 35 A) ist die Schmelzkurve von monomerem Pu27 dargestellt. Die Kurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf, wobei der Wendepunkt der Kurve den Schmelzpunkt der DNA definiert. Um diesen zu bestimmen, wurde der Punkt ermittelt, an dem die Steigung und somit die Änderung der Absorption maximal ist. In Abbildung 35 B) ist die Auftragung der Absorptionsänderung gegen die Temperatur dargestellt. Aus dieser ergibt sich für basisch vorbehandeltes Pu27 eine Schmelztemperatur von 74°C.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Vorbehandlung auf die Schmelzkurven hat, wurden diese nacheinander untersucht. Dazu wurde zum einen das unbehandelte ODN, welches einen hohen Anteil an Multimeren und nur einen geringen Teil Monomer aufweist, in K^+ -haltigem Puffer gemessen. Zum anderen wurde, analog zu den Analysen mittels SEC, eine Probe in K^+ -haltigem Puffer thermisch behandelt und mit der basischen Behandlungsmethode verglichen. Zum besseren Vergleich wurden die Absorptionen normiert. Die Schmelzkurven nach den beiden Behandlungsmethoden sind der unbehandelten Probe in Abbildung 36 gegenübergestellt.

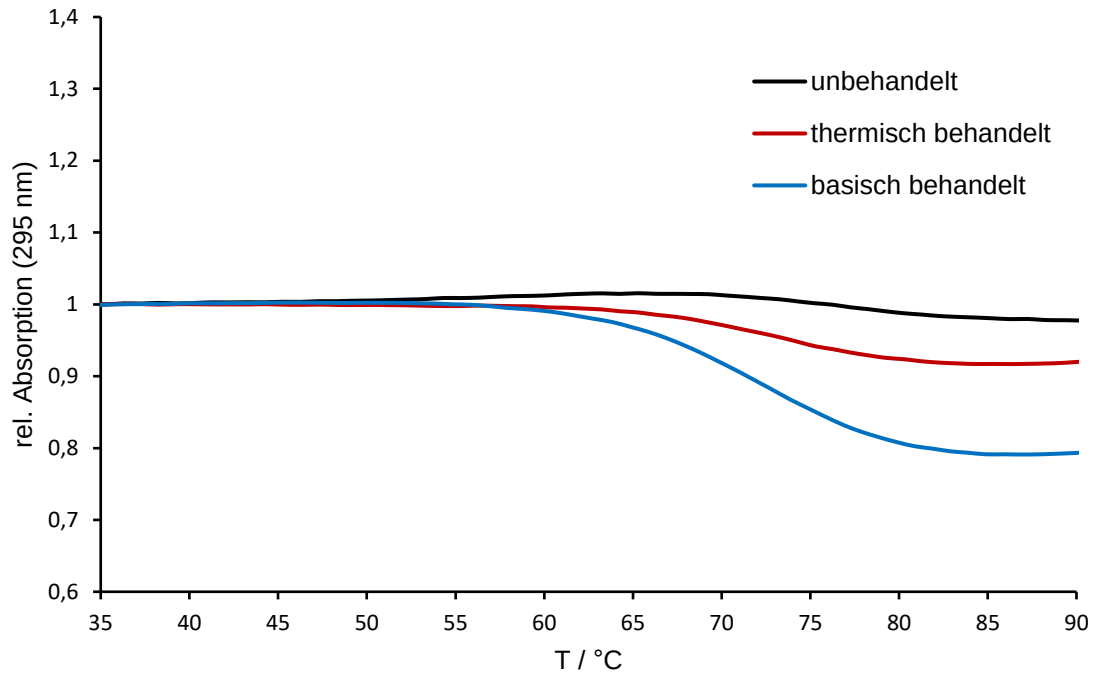


Abbildung 36: UV-Schmelzkurve von Pu27 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGG AAGG) bei 295 nm ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

Beim Vergleich der Schmelzkurven wird deutlich, dass ein großer Unterschied in der Amplitude der Absorptionsänderung besteht. Diese fällt bei der basisch behandelten Probe am größten und bei der unbehandelten Probe am geringsten aus. Dies deutet darauf hin, dass die Absorptionsänderung durch ein Schmelzen des monomeren G4 hervorgerufen wird und multimeren Strukturen erst oberhalb der untersuchten 90°C schmelzen. Die unbehandelten und thermisch behandelten ODN enthalten einen viel geringeren Anteil an monomerem G4 und aus diesem Grund fällt die Absorptionsänderung dort beim Erwärmen kleiner aus. Die Beobachtung, dass die multimeren Strukturen von Pu27 erst oberhalb der hier untersuchten Temperatur schmelzen, erklärt zudem, warum durch eine thermische Behandlung in vorangegangenen Experimenten keine vollständige Monomerbildung erzielt werden konnte. Die aus den Wendepunkten der Kurven ermittelten Schmelzpunkte sind u.a. in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Schmelztemperaturen von Pu27 nach Variation der Behandlungsmethode sowie der Konzentration und Art des Kations.

Methode	Konzentration	Kation	Schmelztemperatur / °C
unbehandelt	25 mM	K ⁺	77
thermisch behandelt	25 mM	K ⁺	75
basisch behandelt	25 mM	K ⁺	74

Die Schmelztemperaturen von Pu27 aus den UV-Schmelzkurven in gleichem Puffer in Abbildung 36 kaum. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu begründen, dass bei dieser Temperatur das Schmelzen des monomeren G4 beobachtet wird und da es sich um die gleiche Struktur unter den gleichen Pufferbedingungen handelt, fällt auch der Schmelzpunkt sehr ähnlich aus.

Das Schmelzverhalten des kürzeren ODN Pu22 wurde ebenfalls nach den drei verschiedenen Behandlungsmethoden untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

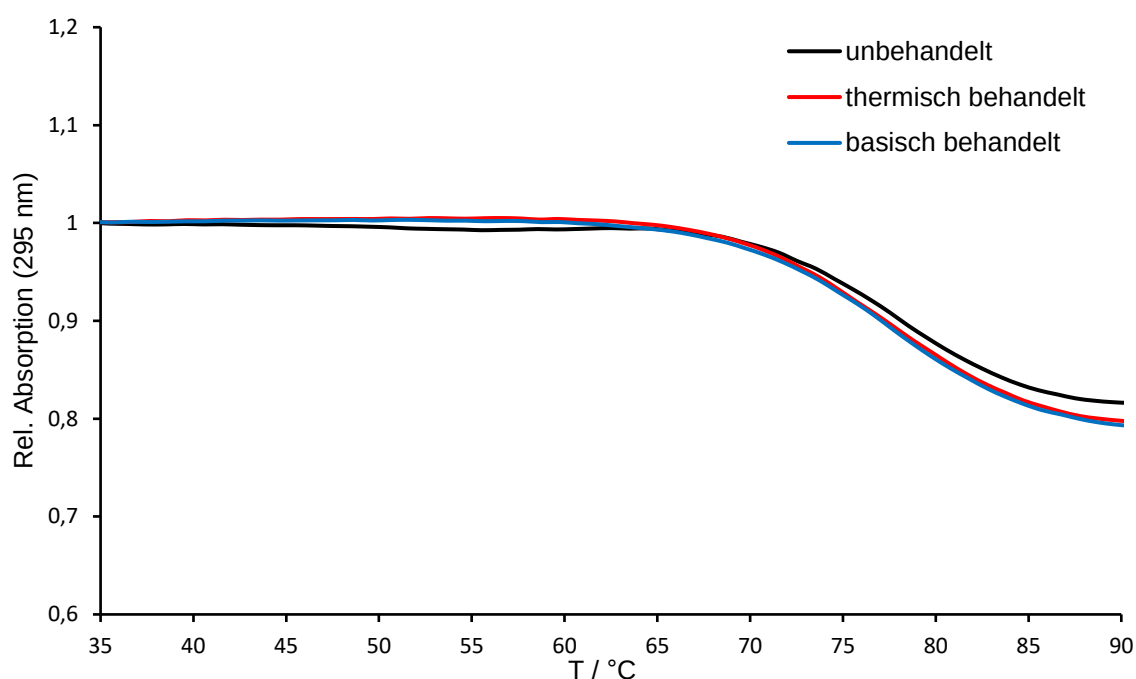


Abbildung 37: Schmelzkurven von Pu22 (TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA) ohne Behandlung (schwarz, $T_m = 79^\circ\text{C}$), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot, $T_m = 79^\circ\text{C}$) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau, $T_m = 78^\circ\text{C}$).

Die Schmelzkurven von Pu22 zeigen ebenfalls das für G4 typische Schmelzverhalten. Die Schmelztemperaturen liegen ähnlich wie bei Pu27 sehr dicht beieinander, allerdings fällt die Schmelztemperatur von Pu22 insgesamt höher aus. Die Amplituden der Kurven fallen sehr ähnlich aus, lediglich die Kurve des unbehandelten ODN zeigt eine minimal geringere

Amplitude. Dies ist dadurch zu erklären, dass Pu22 auch ohne Vorbehandlung zum überwiegenden Teil als monomeres G4 vorliegt, was bereits in der SEC- und SDS-PAGE Analyse deutlich wurde. Insgesamt besitzen die drei Schmelzkurven, bedingt durch die ähnlichen Anteile an Monomer, eine größere Ähnlichkeit zueinander als die drei Schmelzkurven von Pu27.

Da für spätere *Pulldown*-Experimente die Pu27-Sequenz mit einer Biotin-Funktionalität benötigt wird, wurde diese ebenfalls auf ihr Schmelzverhalten nach basischer Behandlung untersucht. Durch dieses Experiment soll sichergestellt werden, dass sowohl das Vorliegen des G4 trotz Biotin-Funktionalität gewährleistet ist, als auch die Eigenschaften des gebildeten G4 hinsichtlich der Schmelztemperatur ähnlich zu der nativen Pu27-Sequenz ohne Biotin sind. Die Schmelzkurve von Pu27-Biotin ist in Abbildung 38 dargestellt.

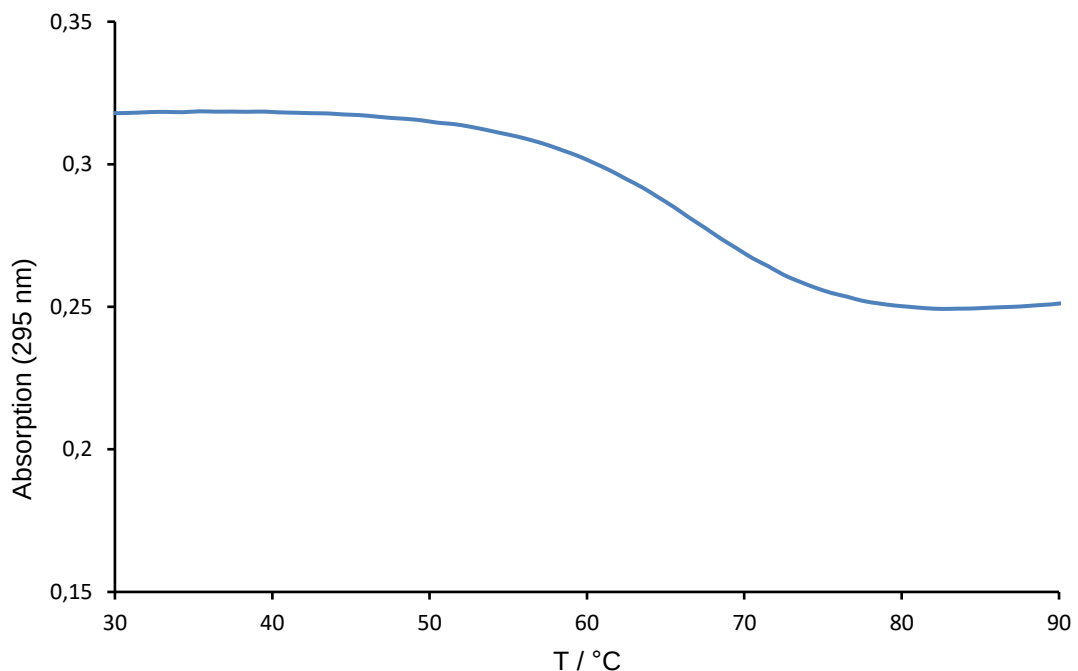


Abbildung 38: Pu27-Biotin (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-Biotin-TEG) (rot) nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer, T_m = 67°C.

Die Schmelzkurve des untersuchten ODN zeigt auch mit der Biotin-Funktionalität den klassischen sigmoidalen Verlauf, der für einen G4 bei einer Wellenlänge von 295 nm erwartet wird. Die ermittelte Schmelztemperatur für Pu27 Biotin beträgt 67°C und liegt somit lediglich 7°C niedriger als die des nativen Pu27. Die Ergebnisse zeigen, dass auch das biotinylierte ODN einen stabilen G4 bildet und die Stabilität nur geringfügig durch die Modifikation beeinflusst wird. Somit ist dieses ODN für spätere *Pulldown*-Experimente geeignet.

In weiteren Experimenten wurden zudem zur Überprüfung die Kontroll-ODN Pu27 6G/T linear-Biotin und Pu22-Kontrolle auf ihre Absorption in Abhängigkeit der Temperatur untersucht. Diese ODN sollten nicht in der Lage sein, intramolekulare G4 zu bilden. Im Gegensatz zu Pu27 6G/T linear-Biotin kann Pu22-Kontrolle allerdings intermolekulare Strukturen bilden (siehe Kapitel 3.1.1.2) und wurde aus diesem Grund vor der Messung mit 150 mM NaOH behandelt und neutralisiert. Pu27 6G/T linear-Biotin wurde entsprechend der Ergebnisse in Kapitel 3.1.1.3 ohne Vorbehandlung eingesetzt. Durch diese Versuchsdurchführung kann untersucht werden, ob intramolekulare G4 vorliegen oder nicht. In Abbildung 39 ist die Absorption in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt.

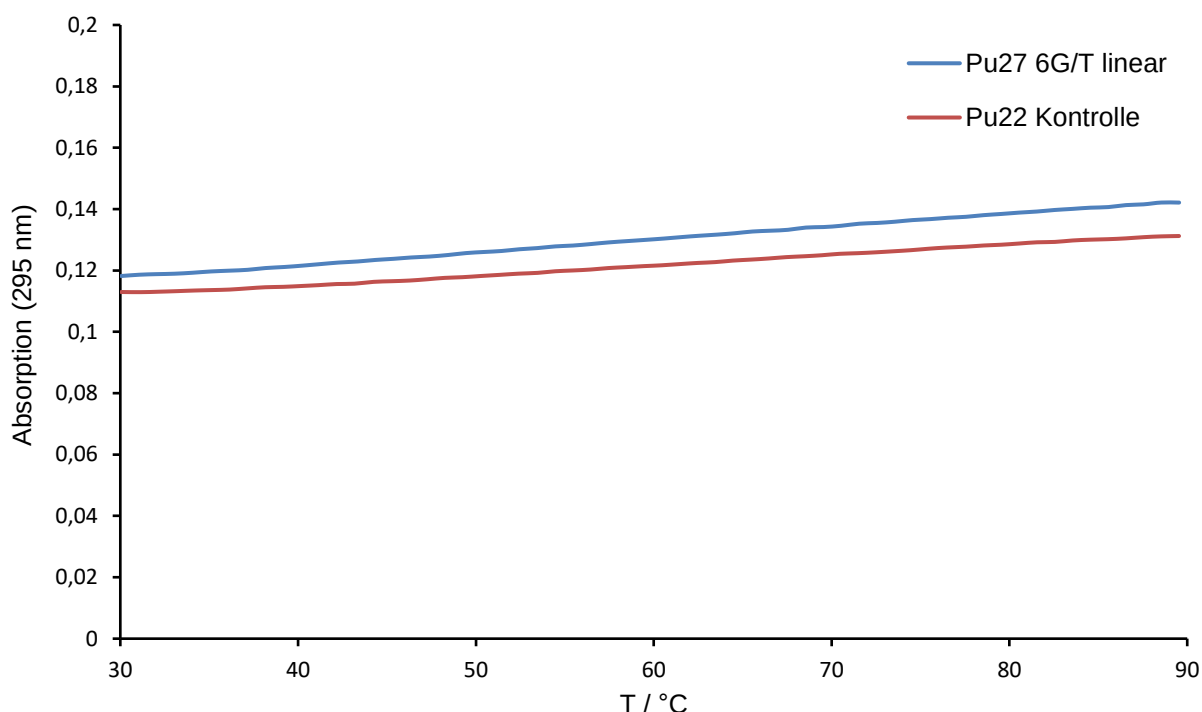


Abbildung 39: Pu27 6G/T linear-Biotin (TGTGTAGTGTGTGGAGTGTGTGGAAGG-Biotin-TEG) (blau) ohne Vorbehandlung und Pu22-Kontrolle (GTGAGGGGGGAGAGTGTGAGGG) (rot) nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer.

In der Auftragung der Absorption bei 295 nm gegen die Temperatur ist bei beiden ODN zu erkennen, dass ein linearer Verlauf anstelle eines sigmoidalen Verlaufs vorliegt. Der Verlauf zeigt bei beiden ODN einen leichten Drift hingehend zu höherer Absorption mit steigender Temperatur.

Aus dem linearen Verlauf kann gefolgert werden, dass unter diesen Bedingungen bei beiden ODN kein G4 vorliegt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Annahmen, dass für beiden

Sequenzen kein intramolekularer G4 erwartet wird und im Fall von Pu22-Kontrolle mögliche intermolekulare durch vorherige Behandlung mit NaOH denaturiert wurden. Neben den Sequenzen Pu27 und Pu22 wurde auch die Sequenz Myc22 bezüglich ihres Schmelzverhaltens untersucht. Dieses ODN ist besonders interessant, da es laut den Ergebnissen der SEC- und SDS-PAGE-Analyse im Vergleich mit Pu27 und Pu22 nur sehr wenige multimere Strukturen ausbildet. Die normalisierten Schmelzkurven sind in Abbildung 40 dargestellt.

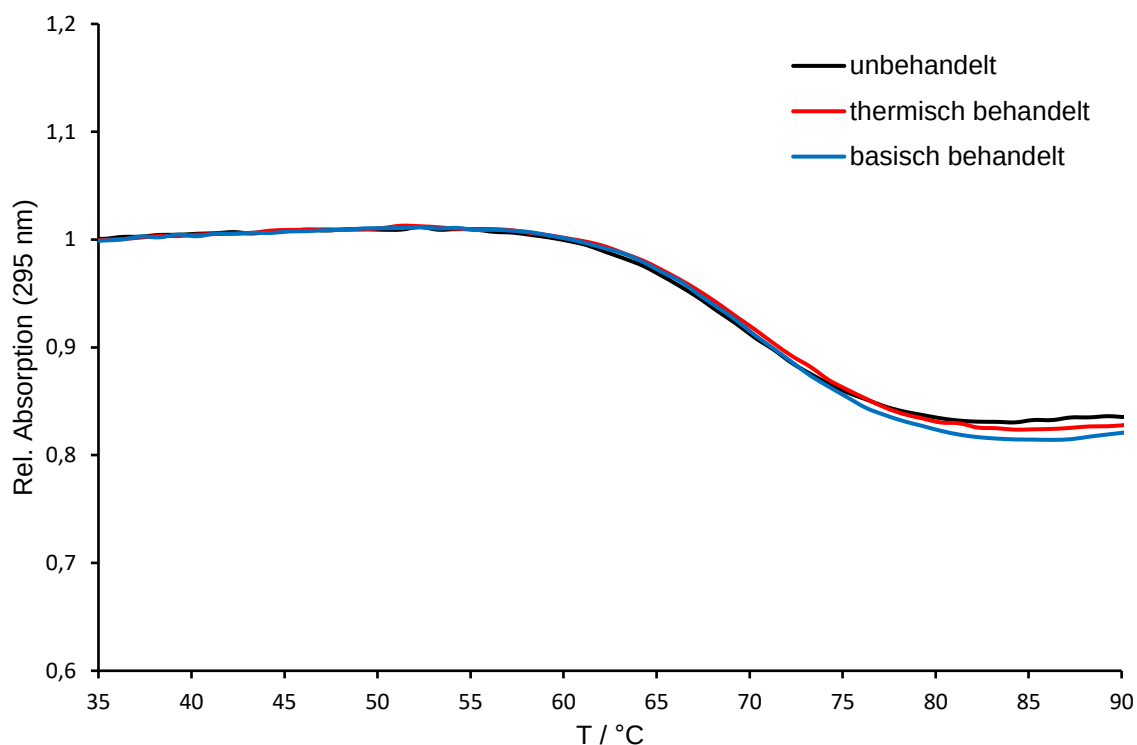


Abbildung 40: Schmelzkurven von Myc22 (TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTGTGAGTG) ohne Behandlung (schwarz, $T_m = 70^\circ\text{C}$), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot, $T_m = 71^\circ\text{C}$) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K^+ -haltigem Puffer (blau, $T_m = 70^\circ\text{C}$).

Die normalisierten Schmelzkurven von Myc22 nach verschiedenen Behandlungsmethoden zeigen annähernd identische Amplituden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der SEC-Chromatogramme und SDS-PAGE-Gele, wo für Myc22 fast ausschließlich Monomer detektiert wurde.

Sowohl das unbehandelte ODN als auch das Monomer nach basischer Behandlung besitzen einen Schmelzpunkt von 70°C und für die thermisch behandelte Probe wurde ein Schmelzpunkt von 71°C ermittelt. Somit liegen die Schmelzpunkte analog zu Pu27 und Pu22 unabhängig von der Behandlungsmethode sehr dicht beieinander. Dies bekräftigt wiederum, dass nach allen Methoden die gleiche G4-Struktur erhalten wird.

Da die Myc22-Sequenz für spätere *Pulldown*-Experimente genutzt werden soll, wurde Myc22-Biotin bezüglich seines Schmelzverhaltens untersucht. Somit soll sichergestellt werden, dass die Biotin-Modifikation, die wie bei Pu27-Biotin zur Anwendung benötigt wird, die Stabilität des G4 nicht negativ beeinflusst. Die UV-Schmelzkurve von Myc22-Biotin ist in Abbildung 41 dargestellt.

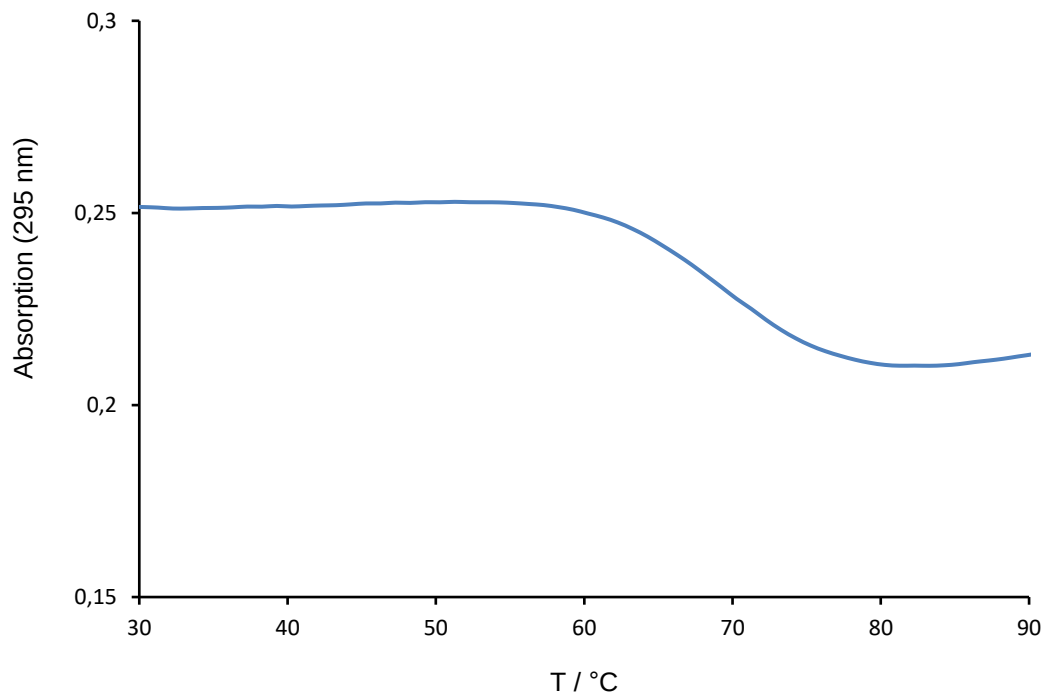


Abbildung 41: UV-Schmelzkurve von Myc22-Biotin (TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTGT GAGTG-Biotin-TEG) nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer ($T_m = 69^\circ\text{C}$).

In der Auftragung der Absorption bei 295 nm gegen die Temperatur ist für Myc22-Biotin nach basischer Behandlung und Renaturierung in K⁺-haltigem Puffer ein sigmoidaler Verlauf zu erkennen, der mit einer Abnahme der Absorption einhergeht. Der Verlauf der UV-Schmelzkurve entspricht somit den Erwartungen für eine G4-Struktur. Für diese Sequenz wurde eine Schmelztemperatur von 69°C ermittelt. Diese liegt nur 1°C unter der Schmelztemperatur von Myc22 ohne Biotin-Modifikation. Dies zeigt, dass sich diese Modifikation am 3'-Ende nicht negativ auf die Stabilität des gebildeten G4 auswirkt. Bei Myc22 ist der Unterschied zwischen der biotinylierten und unmodifizierten Sequenz mit 1°C sogar noch geringer als bei Pu27, wo die Temperaturdifferenz bei 7°C liegt.

Im Anschluss an diese Messungen wurden die beiden biotinylierten Minisatelliten CEB25-L191-Biotin und CEB25-L111-Biotin bezüglich ihres Schmelzverhaltens untersucht. Dazu wurden ausschließlich Monomere verwendet, die durch die Methode der basischen

Behandlung mit NaOH erhalten wurden. Die UV-Schmelzkurven der beiden ODN sind in Abbildung 42 dargestellt.

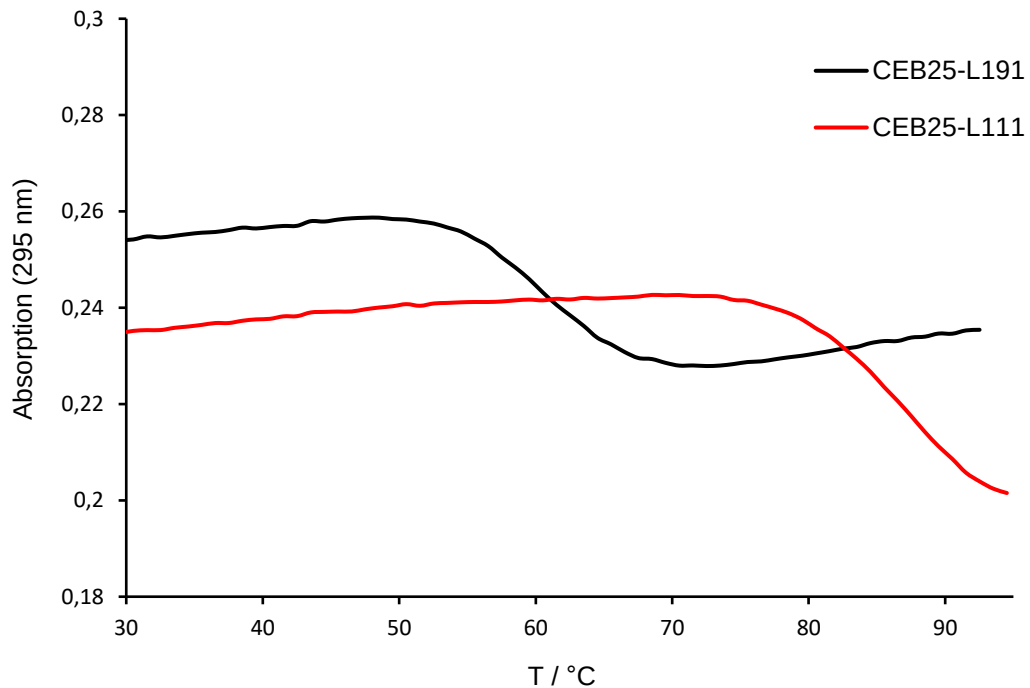


Abbildung 42: Schmelzkurve von CEB25-L191-Biotin (AAGGGTGGGTGTAAGTGT GGGTGGGTGTGAGTGTG-Biotin-TEG) (schwarz, $T_m = 61^\circ\text{C}$) und CEB25-L111-Biotin (AAGGGTGGGTGGGTGGGTGTGAGTGTG-Biotin-TEG) (rot, $T_m = 88^\circ\text{C}$) nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K^+ -haltigem Puffer.

Die UV-Schmelzkurve der nativen CEB25-L191-Biotin-Sequenz mit 9 Nukleotiden in der zweiten Schleife zeigt einen Wendepunkt bei 61°C und damit eine relativ niedrige Schmelztemperatur. Wird die Sequenz CEB25-L111-Biotin mit nur einem Nukleotid in der zweiten Schleife betrachtet, so wird eine drastische Erhöhung der Schmelztemperatur auf 88°C erkennbar. Dies zeigt, dass eine Verkürzung der zweiten Schleife im Fall von CEB25 mit einer deutlichen Erhöhung der Stabilität einhergeht.^[62] Für CEB25-L191-Biotin wird insgesamt eine höhere Absorption detektiert als bei CEB25-L111-Biotin, was durch den höheren Extinktionskoeffizienten von CEB25-L191-Biotin bedingt durch die höhere Anzahl von Nukleotiden in der Sequenz zu erklären ist.

3.1.4 CD-Spektroskopie

Zur weiteren Überprüfung des Vorliegens einer G4-Struktur wurde eine Analyse mittels CD-Spektroskopie herangezogen. Dazu wurde die Pu27-Sequenz wie zuvor nach den etablierten Methoden behandelt und mit dem unbehandelten ODN verglichen. Die zugehörigen Spektren sind in Abbildung 43 dargestellt.

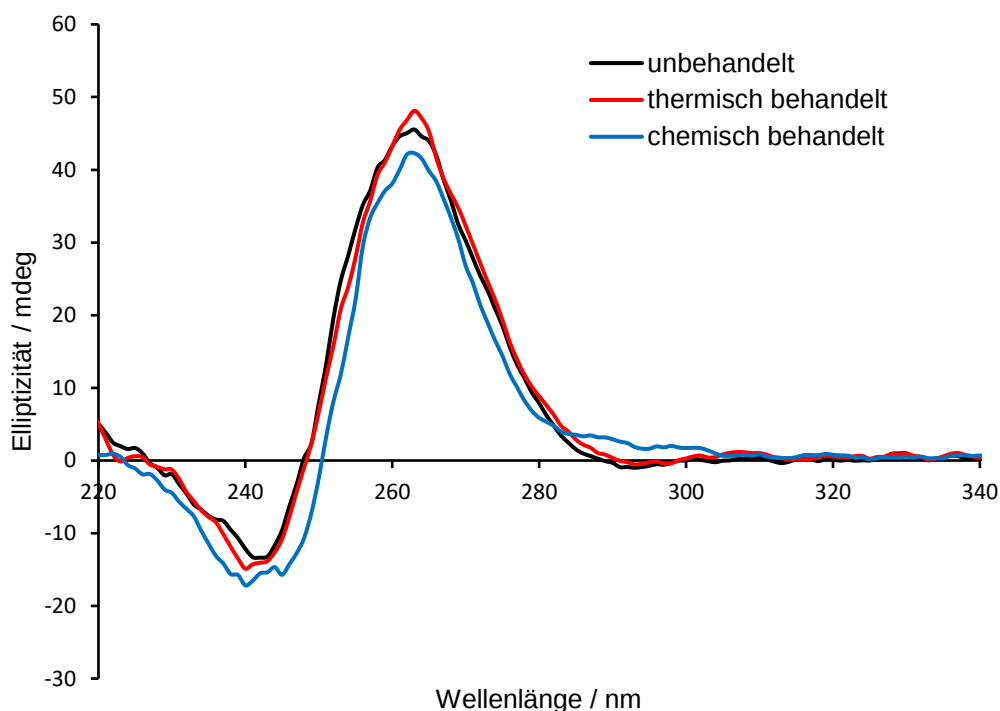


Abbildung 43: CD-Spektren von Pu27 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGGAAGG) ohne Behandlung (schwarz), nach thermischer Behandlung für 10 min bei 95°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (rot) und nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer (blau).

Alle drei CD-Spektren weisen ein Minimum bei etwa 240 nm und ein Maximum um 260 nm auf. Dies entspricht den Erwartungen für Pu27, da dieses ODN einen parallelen Propeller-Typ-G4 bildet.^[9a] Die Ergebnisse zeigen somit die erfolgreiche Bildung eines parallelen G4. Die CD-Spektren zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsmethoden, obwohl bereits in der SEC-Analyse und anhand der SDS-PAGE-Gele deutlich wurde, dass viele verschiedene Strukturen vorliegen. Dies weist darauf hin, dass durch die Signatur des CD-Spektrums im Fall von Pu27 nicht zwischen dem Monomer und multimeren Strukturen unterschieden werden kann.^[33b] Es kann zudem darauf geschlossen werden, dass die Multimere G4-Strukturen mit einer parallelen Orientierung ausbilden.

Die CD-Spektroskopie wird häufig zur Verifizierung der erfolgreichen Faltung von G4 herangezogen und zusammen mit UV-Schmelzkurven zur Charakterisierung genutzt. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen jedoch die Problematik bei dieser Analytik, da diese Methoden nicht zwischen Monomer und Multimeren differenzieren können. Werden nur diese Analytikmethoden eingesetzt, können die multimeren Strukturen entsprechend leicht übersehen werden und bei der Verwendung von G4, beispielsweise für Bindungsstudien, gegebenenfalls die Ergebnisse beeinflussen. Daher sollten weitere Analytikmethoden wie beispielsweise SEC und Gelelektrophorese herangezogen werden. Sollten multimeren Strukturen detektiert werden, so können diese durch die innerhalb dieser Arbeit entwickelte Methode der basischen Behandlung auf eine einfache Weise in das gewünschte Monomer überführt werden.

In weiteren Experimenten wurde das biotinylierte ODN Pu27-Biotin untersucht, um zu überprüfen, ob dieses ebenfalls einen parallelen G4 bildet. Zudem wurde zur Kontrolle das lineare ODN Pu27 6G/T-Biotin herangezogen, das keinen G4 ausbilden kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 dargestellt.

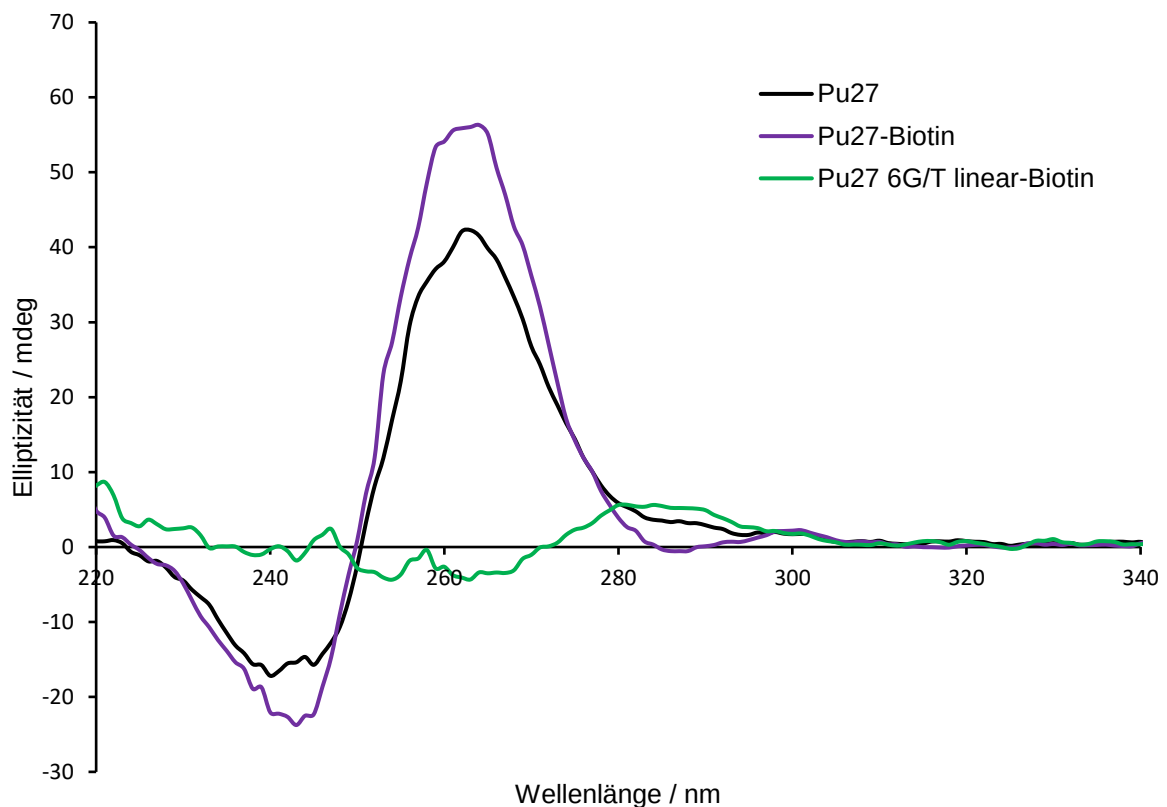


Abbildung 44: CD-Spektren von Pu27 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG) (schwarz) und Pu27-Biotin (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-Biotin-TEG) (violett) nach basischer Behandlung mit 150 mM NaOH und anschließender Zugabe eines Überschusses an K⁺-haltigem Puffer und Pu27 6G/T linear-Biotin (TGTGTAGTGTGTGG AGTGTGTGGAAGG-Biotin-TEG) ohne Vorbehandlung (grün).

Die CD-Spektren von Pu27 und Pu27-Biotin zeigen übereinstimmend jeweils ein Minimum bei etwa 240 nm und ein Maximum bei etwa 260 nm. Dies zeigt, dass in beiden Proben ein G4 mit paralleler Orientierung vorliegt und sich die Biotin-Modifikation somit nicht auf die Orientierung des G4 auswirkt. Das ODN Pu27 6G/T linear-Biotin zeigt im Gegensatz zu den anderen Proben keine charakteristischen Signale, womit eine G4-Bildung bei dieser Sequenz unter den getesteten Bedingungen wie zuvor ausgeschlossen werden kann.

3.1.5 UV/Vis-Spektroskopie

Wie bereits in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben wurde, kann die vollständige Denaturierung der multimeren Strukturen durch die Behandlung mit 150 mM NaOH durch eine Deprotonierung der *N1*-Positionen der G-Reste erklärt werden. Nach Deprotonierung ist keine Wasserstoffbrückenbindung zum *O6*-Sauerstoff im G-Quartett (2) mehr möglich (siehe Abbildung 13). Ein Hinweis für eine Deprotonierung wurde erhalten, indem sowohl die UV-Spektren von 2'-Desoxyguanosin (dG) als auch Pu27 bei neutralem pH-Wert und in 150 mM NaOH aufgenommen wurden.

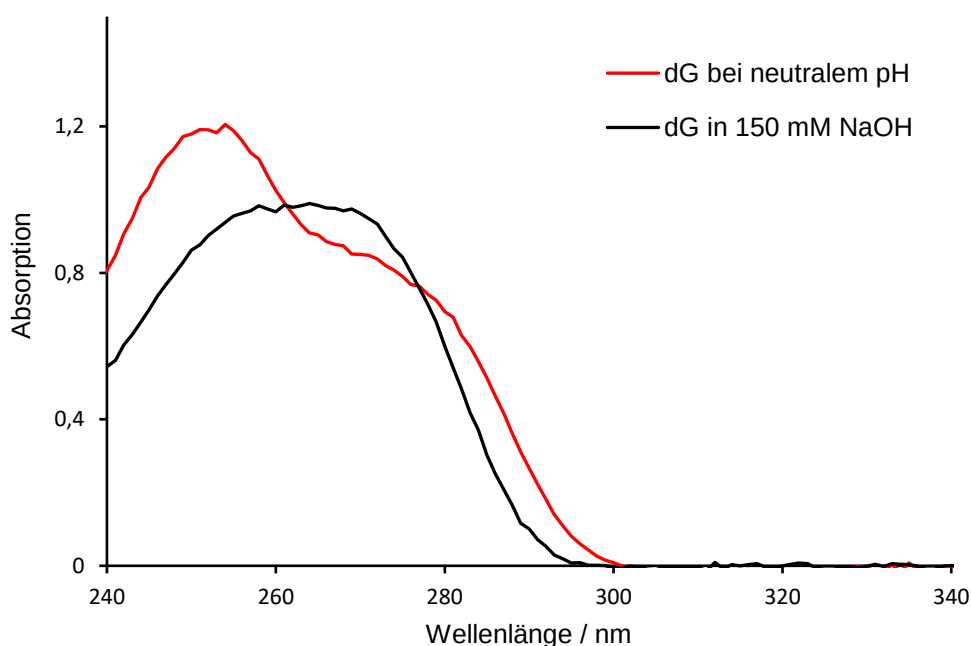


Abbildung 45: UV-Spektrum von dG (100 µM) in K⁺-haltigem Puffer (rot) und in 150 mM NaOH (schwarz).

Bei Betrachtung der UV-Spektren von dG bei neutralem pH-Wert und in 150 mM NaOH (siehe Abbildung 45) wird deutlich, dass bei neutralem pH-Wert ein Absorptionsmaximum bei 254 nm und eine Absorptionsschulter bei etwa 280 nm erhalten wird. In 150 mM NaOH wandert das Absorptionsmaximum hingehend zu höheren Wellenlängen, während die Absorption über 280 nm stark abnimmt. Der pH-Wert einer Lösung von 150 mM NaOH liegt bei 13,2 und unter diesen Bedingungen liegt die *N1*-Position von dG deprotoniert vor.^[64] Die Veränderung im UV-Spektrum kann demnach durch eine Deprotonierung erklärt werden.

Zum Vergleich wurde das ODN Pu27 ebenfalls unter den gleichen Bedingungen gemessen (siehe Abbildung 46).

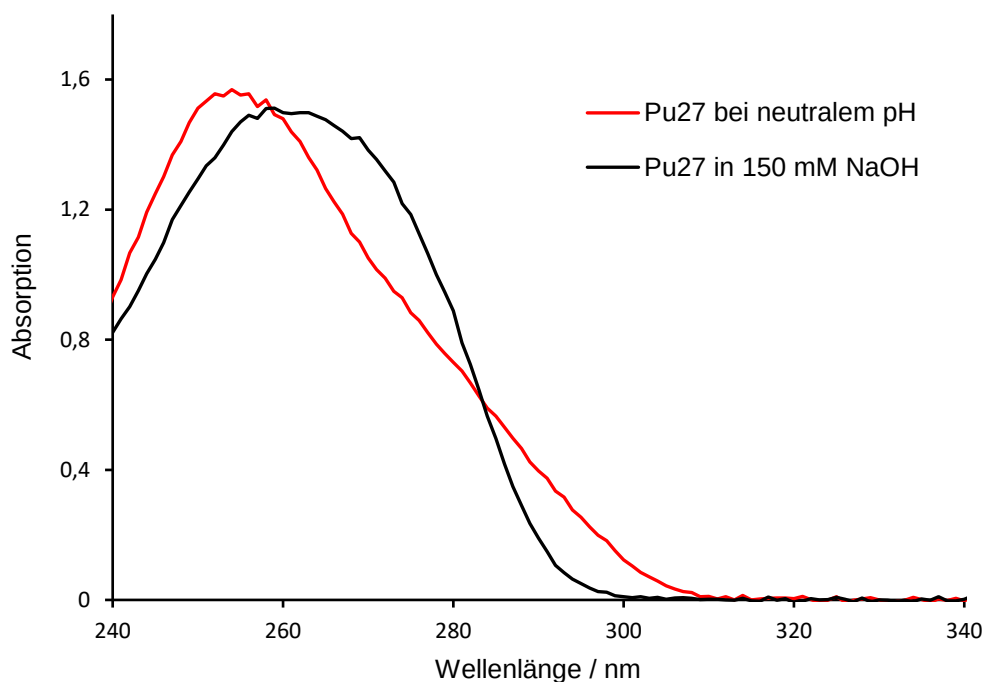


Abbildung 46: UV Spektrum von Pu27 (5 µM) in K⁺-haltigem Puffer (rot) und in 150 mM NaOH (schwarz).

Das UV-Spektrum von Pu27 bei neutralem pH-Wert zeigt analog zu dem Spektrum von dG ein Absorptionsmaximum bei etwa 254 nm. In 150 mM NaOH verändert sich die Absorption hingehend zu höheren Wellenlängen und besitzt große Ähnlichkeit mit dem UV Spektrum von dG bei basischem pH-Wert. Dies deutet darauf hin, dass G-Reste von Pu27 unter diesen Bedingungen ebenfalls deprotoniert vorliegen. Hierdurch ist kein N1-Proton mehr vorhanden, das als Wasserstoffbrückenbindungs-Donor fungieren kann und das G-Quartett (2) verliert an Stabilität. Aus diesem Grund sind die multimeren Strukturen unter der basischen Behandlung ebenfalls nicht mehr stabil und lösen sich zu Einzelsträngen auf. Bei der anschließenden Neutralisierung mit einem großen Überschuss an K⁺-haltigem Puffer kommt es nicht zur erneuten Bildung von multimeren Strukturen. Diese entstehen den Ergebnissen zufolge eher unter den Bedingungen des Lyophilisierens nach der ODN-Synthese (siehe Kapitel 3.1.1.1, Abbildung 15).

3.1.6 Zusammenfassung

Innerhalb dieses Kapitels wurde festgestellt, dass die meisten untersuchten G4-bildenden ODN eine Vielzahl von multimeren Strukturen bilden. Mithilfe einer thermischen Behandlung, die oft zur Denaturierung und Faltung von G4-DNA genutzt wird, konnte nur ein Teil dieser Multimere in Monomere überführt werden. Dabei besaß der

Abkühlungsprozess keinen nennenswerten Einfluss auf die Verteilung. Anhand von Lyophilisierungsexperimenten, unter anderem in Ammoniak-Lösung, wurde deutlich, dass die multimeren Strukturen schon während der DNA-Festphasensynthese entstehen. Zur Denaturierung der multimeren Strukturen wurde eine Methode entwickelt und optimiert, die mit Hilfe von 150 mM NaOH bei RT alle Multimere zuverlässig auflöst und bei der Renaturierung in K^+ -haltigem Puffer keine neuen multimeren Strukturen ausbildet. Anhand von UV/Vis-Messungen konnte gezeigt werden, dass das Denaturieren der Multimere wahrscheinlich durch eine Deprotonierung der N1-Position der G-Reste ausgelöst wird, die einen Zerfall des G-Quartetts (2) zur Folge hat. Die Verteilung zwischen Monomeren und Multimeren ohne Vorbehandlung, nach thermischer Behandlung und nach der hier optimierten basischen Behandlung wurde für verschiedene ODN durch SEC und Gelelektrophorese untersucht. Durch UV-Schmelzkurven wurde die G4-Struktur der gebildeten Monomere bestätigt und anhand von CD-Spektroskopie wurde deutlich, dass die Pu27-Sequenz einen parallelen G4 ausbildet. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese beiden letzteren Methoden nicht zuverlässig zwischen Monomeren und Multimeren unterscheiden können und es daher wichtig ist, Methoden wie SEC und Gelelektrophorese in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

3.2 Erprobung des *Pulldown*-Systems anhand von Nucleolin

Für die Isolierung von G4-bindenden Proteinen wurde im ersten Schritt ein System entwickelt, in dem biotinylierte G4-DNA und deren Kontrollsequenzen auf Streptavidin-beschichteten, magnetischen Partikeln immobilisiert werden, damit DNA-gebundene Proteine mit Hilfe eines Magneten herausgezogen werden können. Um dieses *Pulldown*-System zu testen, wurden die so konzipierten molekularen Angeln anhand von dem bekannten G4-bindenden Protein Nucleolin optimiert. Dieses Phosphoprotein ist ideal für die Erprobung geeignet, da Nucleolin *in vitro* mit hoher Affinität an die Pu27-Sequenz bindet.^[53] Aus diesem Grund wurde im ersten Schritt Nucleolin in *E. coli* Bakterien exprimiert.

3.2.1 Expression von Nucleolin

Für die Expression von Nucleolin wurde der Bakterienstamm *E. coli* BL21 DE3 Codon Plus RIL und das Plasmid pET28 6His SUMO Nucleolin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Patricia Duchambon, Institut Curie, Orsay) genutzt, das über einen T7-Promotor und einen Lac-Repressor verfügt. Deshalb kann die Expression von Nucleolin durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden.

Das exprimierte Protein ist ein Fusionsprotein aus Nucleolin mit den Aminosäuren 284-709 und einem SUMO-Protein mit N-terminalem His-Tag, durch den die Aufreinigung erleichtert wird. Bei den Aminosäuren 284-709 handelt es sich um die C-terminale Domäne von Nucleolin, die sowohl alle vier RNA-bindenden Domänen als auch die G4-bindende Domäne beinhaltet.^[53, 65] Bedingt durch die Modifikationen SUMO und His-Tag beträgt der isoelektrische Punkt (pI) des Fusionsproteins 6,88, während der theoretische pI der Nucleolin-Domäne bei 8,84 liegt.

Im ersten Schritt wurde das Plasmid durch die CaCl₂-Methode in die Bakterienzellen gebracht. Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen hergestellt, indem eine Suspension der Zellen mehrfach zentrifugiert, abdekantiert und das entstandene Pellet in CaCl₂-Lösung resuspendiert wurde. Anschließend wurde das Plasmid hinzugegeben, die Mischung auf Eis gekühlt, kurz auf 42°C erwärmt und wieder auf Eis abgekühlt, was zu einer Aufnahme des Plasmids in die Zellen führt (siehe Kapitel 5.2.15.4).

Anschließend wurde ein Expressionstest durchgeführt, wobei die Expression in TB- und LB-Medium jeweils vor und nach der Induktion mit IPTG untersucht wurde. Die SDS-PAGE-Analyse der Proben ist in Abbildung 47 dargestellt.

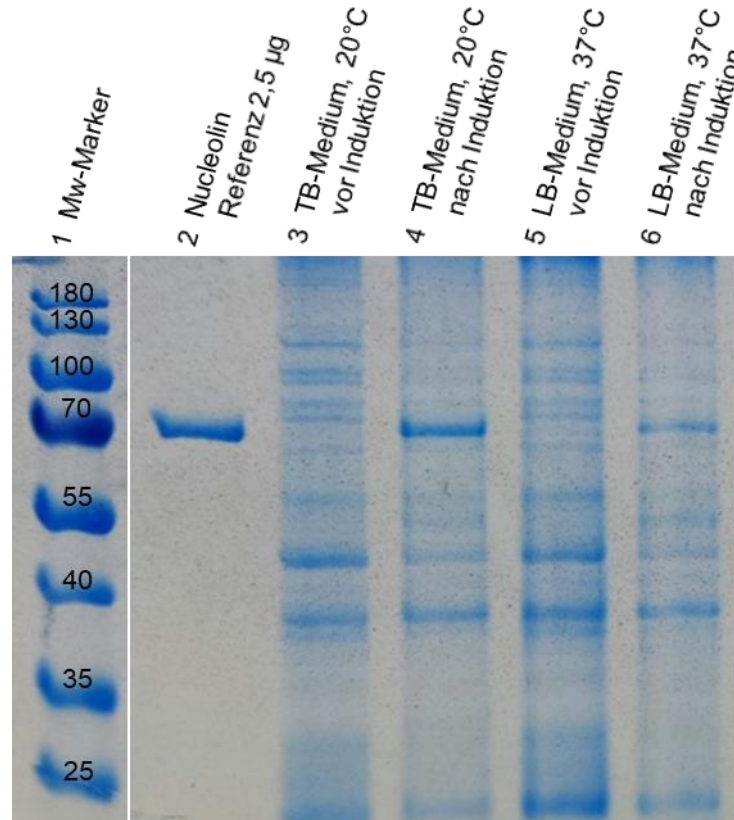


Abbildung 47: SDS-PAGE-Analyse des Expressionstests von Nucleolin in TB-Medium bei 20°C und LB-Medium bei 37°C. Jeweils 1 mL der Hauptkultur wurde zentrifugiert und die Pellets in je 100 µL 1 x SDS-Probenpuffer erhitzt; entsprechend der OD₆₀₀ der Hauptkulturen wurden vor der Induktion 5 µL und nach Induktion 2,5 µL der Proben aufgetragen.

In dem SDS-PAGE Gel ist zu erkennen, dass die Referenz von aufgereinigtem Nucleolin eine Bande unterhalb von 70 kDa zeigt (siehe Spur 2). Sowohl in TB Medium bei 20°C als auch in LB Medium bei 37°C sind vor der Induktion eine Vielzahl von Proteinbanden zu sehen, wobei keine Bande auf Höhe von Nucleolin detektiert wird (siehe Spur 3 und 5). Nach der Induktion wird in TB-Medium eine deutliche Bande auf Höhe von Nucleolin sichtbar, während in LB-Medium nur eine sehr schwache Bande detektiert wird (siehe Spure 4 und 6). Dies zeigt, dass unter beiden Bedingungen eine Expression von Nucleolin stattfindet und in TB-Medium eine deutlich höhere Ausbeute erzielt wird. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Expressionsansätze TB-Medium mit einer Temperatur von 20°C genutzt.

Im nächsten Schritt wurde Nucleolin in einem größeren Ansatz exprimiert und das nach dem Zentrifugieren erhaltene Zellpellet durch Ultraschall aufgeschlossen. Das so erhaltene Lysat

wurde auf eine Nickel-NTA-Agarose-Säule gegeben, um Nucleolin über den His-Tag zu binden. Anschließend wurde mit einem Waschpuffer mit niedriger Imidazol-Konzentration gewaschen und Nucleolin anschließend durch Steigerung der Imidazol-Konzentration eluiert. Die Eluatfraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihren Gehalt an Nucleolin und ihre Reinheit geprüft (siehe Abbildung 48).

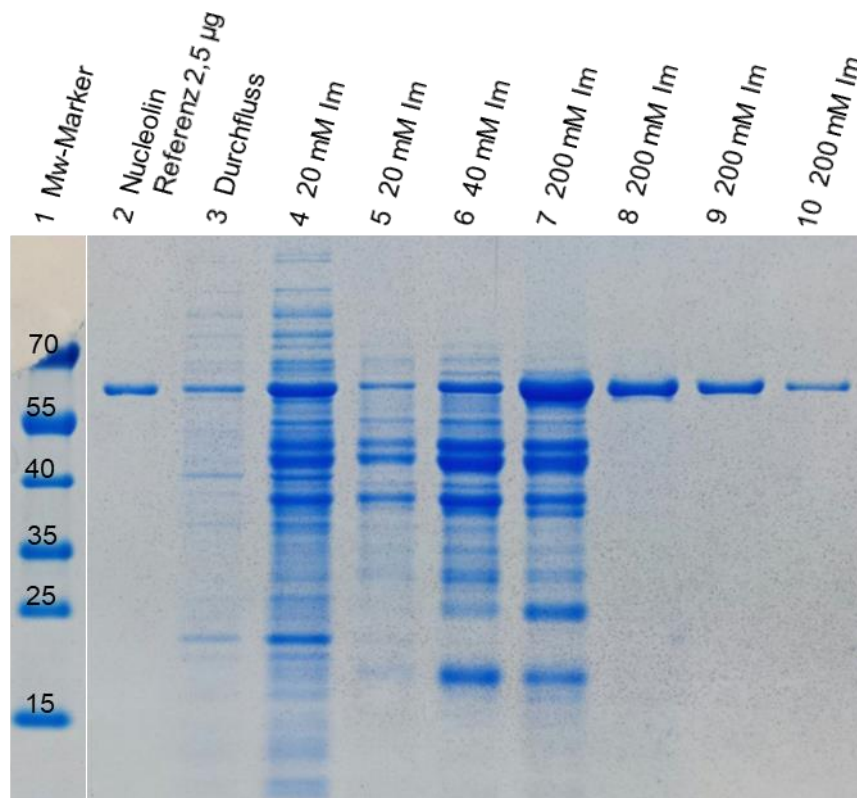


Abbildung 48: SDS-PAGE-Analyse der Eluatfraktionen aus der Nickel-NTA-Affinitätschromatographie mit steigender Imidazol-Konzentration (Im), gefärbt mit Coomassie R 250.

Auf dem SDS-PAGE Gel zeigt sich für den Durchlauf nach Beladung der Säule (Spur 3) nur ein geringer Anteil an Protein. Dies spricht dafür, dass ein großer Teil der Proteine an das Säulenmaterial gebunden wurde. In den Waschfraktionen mit 20 bzw 40 mM Imidazol (Im) werden neben einem Anteil an Nucleolin sehr viele andere Proteine von der Säule gewaschen (siehe Spur 4-6). In der ersten Eluatfraktion mit 200 mM Im (Spur 7) wurde ein großer Teil des Nucleolins von der Säule eluiert, allerdings ist dieser noch mit anderen Proteinen verunreinigt. Erst in den weiteren Eluatfraktionen mit 200 mM Im wurde reines Protein erhalten (siehe Spur 8-10). Die Fraktionen 8-10 wurden aufkonzentriert und umgepuffert, um Nucleolin zu lagern und in *Pulldown*-Experimenten einsetzen zu können.

Anhand verschiedener Färbemethoden für dieses SDS-Gels wurde festgestellt, dass sich Nucleolin kaum mit Silberfärbung anfärben lässt (siehe Anhang, Abbildung 78). Deshalb

wurde für *Pulldown*-Experimente die äußerst sensitive Färbemethode des kolloidalen Coomassie G 250 eingesetzt.

3.2.2 Isolierung von Nucleolin

Für die *Pulldown*-Experimente mit Nucleolin wurden verschiedene DNA-Strukturen auf Streptavidin-beschichteten Partikeln immobilisiert. Zum einen wurden die biotinylierten G4-Strukturen von Pu27 und Myc22 genutzt, um die G4-Bindung untersuchen zu können. Diese wurden entsprechend der zuvor entwickelten Methode der basischen Behandlung mit 150 mM NaOH inkubiert und in K^+ -haltigem Puffer renaturiert, um reines Monomer zu gewährleisten. Um sicherzustellen, dass bei den folgenden Experimenten die G4-Struktur erhalten bleibt, wurden alle in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 gezeigten Experimente in KPP-Puffer durchgeführt und die Beladung der Magnetpartikel mit ODN darüber hinaus grundsätzlich in diesem Puffer durchgeführt. Die verwendeten ODN sind in Abbildung 49 dargestellt.

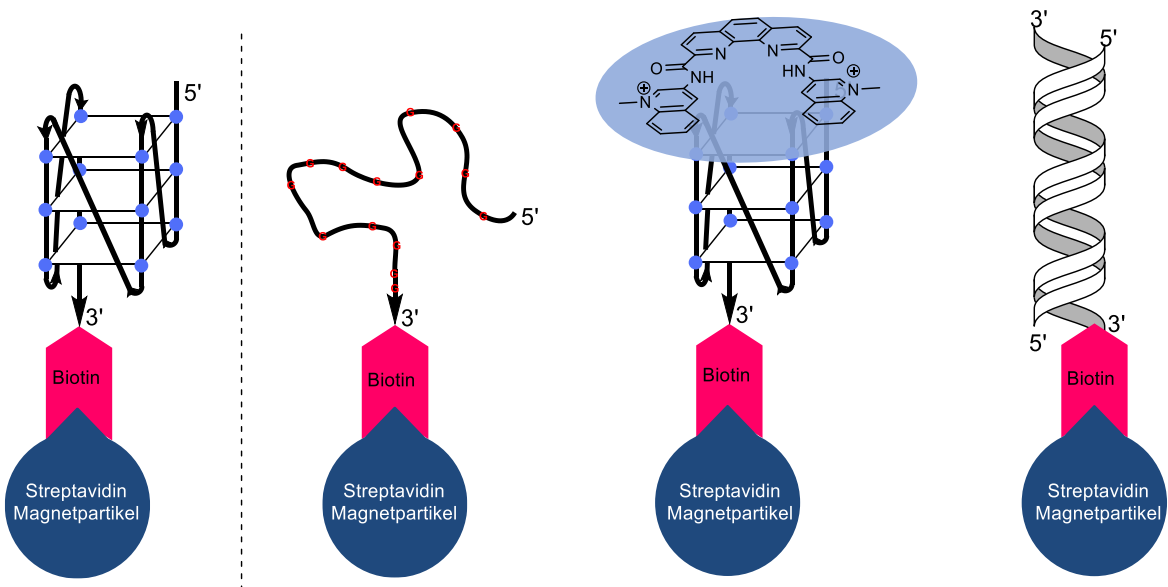


Abbildung 49: Übersicht über die molekularen Angeln, bestehend aus Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln beladen mit verschiedenen ODN. Von links nach rechts: G4, Linear, G4 mit PhenDC3 und Doppelstrang.

Zum Vergleich der Bindungseigenschaften wurde das Einzelstrang-ODN Pu27 6G/T linear-Biotin (siehe Kapitel 3.1.1.3) genutzt, das zur Vereinfachung in den folgenden Kapiteln mit „Linear“ abgekürzt wird. Zusätzlich wurde dieses ODN mit dem entsprechenden Komplementärstrang zu einem Doppelstrang hybridisiert und ebenfalls auf Magnetpartikel

aufgebracht. Als weiterer Vergleich wurde ein Teil der G4-Magnetpartikel mit dem G4-bindenden Liganden PhenDC3 (siehe Kapitel 1.4) versetzt. Mithilfe des Vergleichs der Proteinbindung zwischen G4 und G4 mit PhenDC3 soll getestet werden, ob der Ligand und das Protein um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Der Vergleich von G4 mit den ODN Duplex und ODN Linear ermöglicht eine Aussage darüber, ob ein Protein spezifisch an eine bestimmte DNA-Struktur bindet oder generell eine hohe Affinität zu DNA besitzt.

Die in Abbildung 49 gezeigten molekularen Angeln wurden in *Pulldown*-Experimenten mit Nucleolin getestet, indem diese für 1 h mit dem Protein inkubiert wurden. Anschließend wurde mehrfach im Wechsel mit verschiedenen Waschpuffern mit neutralen und basischen pH-Werten gewaschen, um unspezifisch an die DNA gebundenes Protein zu entfernen. Das an der molekularen Angel verbliebene Protein wurde anschließend gelöst, indem die Magnetpartikel in SDS-Probenpuffer erhitzt wurden. Der Überstand wurde mit SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 50).

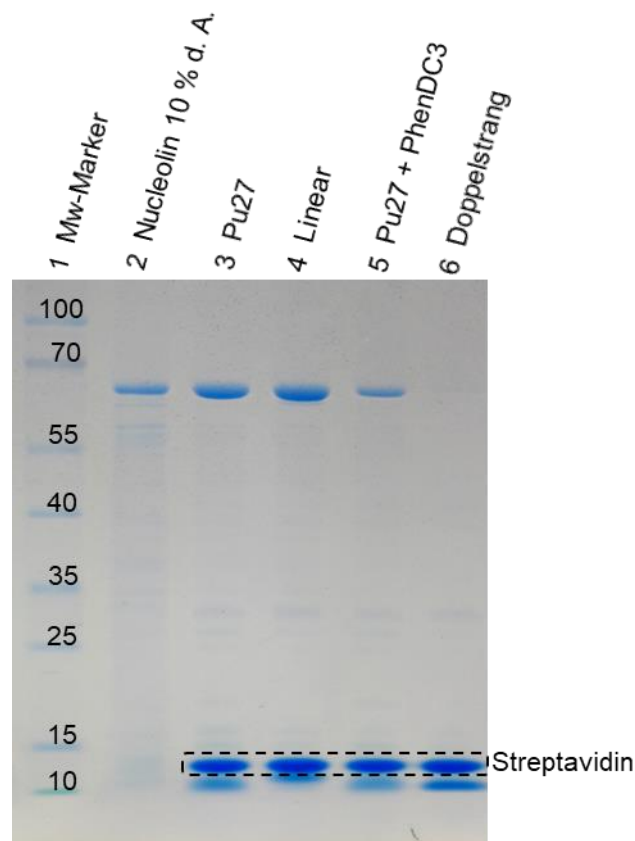
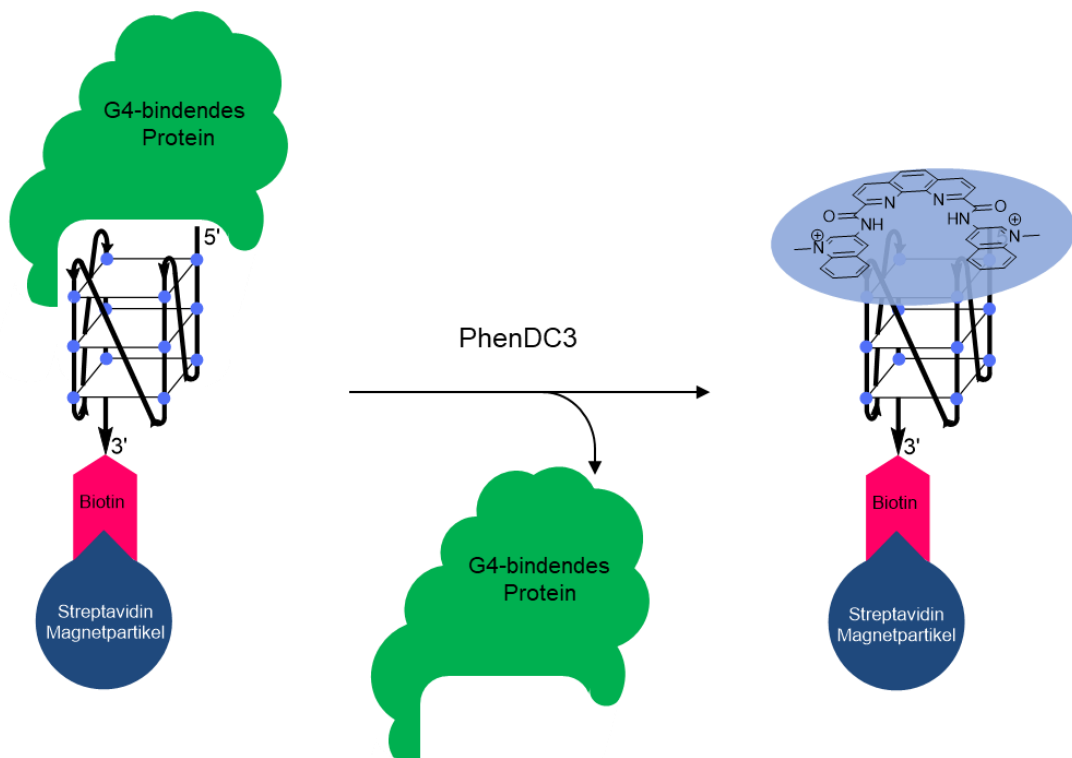


Abbildung 50: SDS-PAGE-Analyse von *Pulldown*-Experimenten mit Pu27 und Nucleolin in KPP-Puffer.

Anhand des SDS-PAGE-Gels wird deutlich, dass mit den verschiedenen molekularen Angeln unterschiedliche Mengen Nucleolin isoliert wurden. Zudem ist zwischen 10 und 15 kDa eine weitere Bande sichtbar, bei der es sich um Streptavidin-Monomer handelt, das

während dem Erhitzen in SDS-Probenpuffer ebenfalls von den Magnetpartikeln abgelöst wird. Insgesamt wurden in jeder Probe 100 pmol (5,8 µg) des Proteins eingesetzt und zum Vergleich eine Referenz mit 10% der Ansatzmenge auf das Gel aufgetragen (siehe Spur 2). Mit Pu27 und dem ODN Linear wurde ein sehr großer Teil des zugegebenen Nucleolins isoliert (siehe Spur 3 und 4). Dies zeigt, dass Nucleolin unter diesen Pufferbedingungen ähnlich stark an den G4 Pu27 und die untersuchte Einzelstrang-DNA bindet. Für die Doppelstrang-DNA wurde hingegen keine Bindung beobachtet (siehe Spur 6). Unter Zugabe des G4-bindenden Liganden PhenDC3 ist ein starker Rückgang der Menge an gebundenem Nucleolin zu erkennen. Dies spricht dafür, dass PhenDC3 und Nucleolin um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. In Schema 1 ist die Verdrängung eines G4-bindenden Proteins, wie beispielsweise Nucleolin, dargestellt.



Schema 1: Verdrängung eines G4-bindenden Proteins durch PhenDC3.

Die Verdrängung mit PhenDC3 dient ebenfalls als Kontrolle der Spezifität der Bindung von Proteinen an die G4-DNA. Es ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl von Proteinen ausschließlich aufgrund ihrer Ladung oder ihrer generellen Affinität zu DNA an den G4 bindet. Wenn sich ein Protein allerdings durch Zugabe des selektiv bindenden PhenDC3 verdrängen lässt, zeigt dies eine Spezifität des Proteins für G4-DNA an. Aus diesen Experimenten wird deutlich, dass Nucleolin nicht nur eine Spezifität für G4-DNA sondern

auch für Einzelstrang-DNA besitzt. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Eigenschaften, die bereits in der Literatur beschrieben wurden.^[66]

Nach den *Pulldown*-Experimenten mit Pu27 wurde Nucleolin ebenfalls mit der abgeleiteten G4-Sequenz Myc22 untersucht. Dazu wurden die Experimente analog zu denen mit Pu27 inklusive Verdrängung mit PhenDC3 durchgeführt und durch Gelelektrophorese analysiert (siehe Abbildung 51).

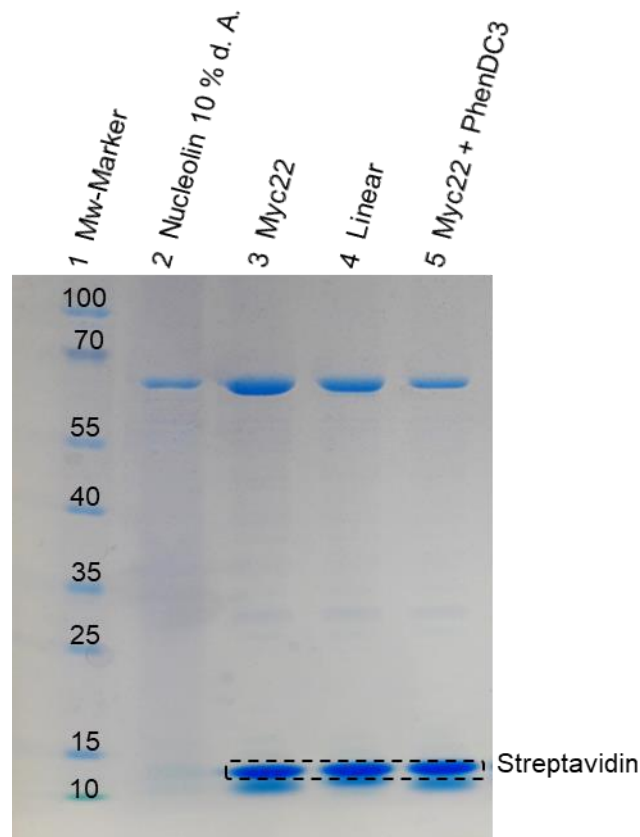


Abbildung 51: SDS-PAGE von *Pulldown*-Experimenten mit Myc22 und Nucleolin in KPP-Puffer.

Auf dem SDS-PAGE-Gel ist zu erkennen, dass Nucleolin in allen drei Proben an die Magnetpartikel gebunden hat, wobei die stärkste Bindung bei Myc22 erhalten wird, während beim ODN Linear eine schwächere und bei Myc22 mit Zusatz von PhenDC3 nur eine äußerst schwache Bande zu verzeichnen ist (siehe Spur 3-5). Dies zeigt, dass Nucleolin deutlich stärker an Myc22 bindet als an das lineare Kontroll-ODN. Da im Fall von Pu27 die Bindung von Nucleolin an den G4 etwa gleich stark ist verglichen mit dem linearen ODN, kann geschlossen werden, dass Nucleolin eine stärkere Affinität zu Myc22 besitzt als zu Pu27. Dies kann möglicherweise in dem unterschiedlichen Aufbau der ODN Pu27 und Myc22 begründet sein, denn im Fall von Pu27 befindet sich der G4 in einem Abstand von 4 Basen zu dem Biotin, wohingegen die Entfernung zu Biotin bei Myc22 8 Basen beträgt. Durch die

weitere räumliche Entfernung des G4 von den Magnetpartikeln könnte die Zugänglichkeit für das Protein und somit die Bindung erleichtert werden.

Durch den Liganden PhenDC3 wird von Myc22 mehr Protein verdrängt als von Pu27, was für eine stärkere Bindung des Liganden an Myc22 spricht. Bedingt durch die Unterschiede in der Sequenz kann Pu27 vier verschiedenen Konformationen annehmen.^[61] Myc22 hingegen bildet einen starren G4, was gegebenenfalls die Bindung von Liganden und Proteinen beeinflussen kann.

3.2.3 Untersuchung der Beladungsdichte der Magnetpartikel

Um die Stärke der Bindung eines Proteins an die verschiedenen molekularen Angeln vergleichen zu können, ist es wichtig, dass diese eine ähnliche Beladungsdichte aufweisen. Dies bedeutet, dass an die Magnetpartikel eine ähnliche Stoffmenge an DNA gebunden sein sollte, die sich räumlich über die Oberfläche des Partikels anordnen kann (siehe Abbildung 52).

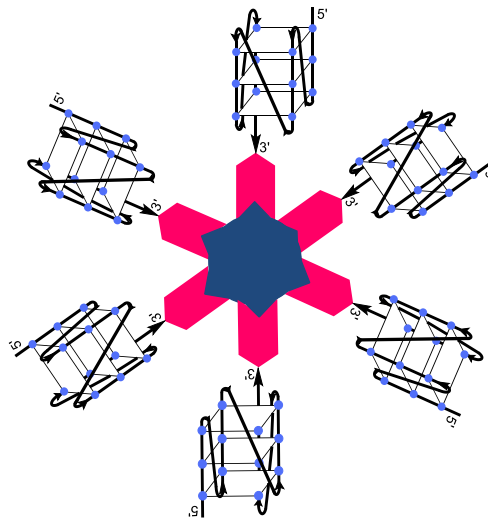


Abbildung 52: Schematische Darstellung eines beladenen Magnetpartikels.

Zur Untersuchung der Beladungsdichte wurden Differenzmessungen mittels SEC bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Dafür wurde zuerst das jeweiligen biotinylierten ODN mit der Magnetpartikel-Suspension entsprechend der Standard-Bedingungen für die Bindung (siehe Kapitel 5.2.10) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit dem verbliebenen, nicht-gebundenen ODN mittels SEC analysiert und das Integral des Signals bestimmt. Zusätzlich wurden das gleichen ODN ohne Inkubation mit Magnetpartikeln analysiert und aus der Differenz bestimmt, wieviel ODN auf den Partikeln gebunden wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Beladungsdichte der verschiedenen molekularen Angeln.

ODN auf Partikeln	Beladungsdichte pro 10 μ L Partikel-Suspension
Pu27	47,1 pmol
Myc22	48,1 pmol
Linear	46,4 pmol
Doppelstrang	32,4 pmol
CEB25-L111	52,6 pmol
CEB25-L191	40,2 pmol

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die molekularen Angeln mit den ODN Pu27, Myc22 und Linear eine ähnliche Beladungsdichte aufweisen. Diese drei besitzen eine Länge von jeweils 27 Nukleotiden. Im Gegensatz dazu ist die Beladungsdichte des Doppelstrang-ODN, bei dem durch den Komplementärstrang insgesamt 54 Nukleotide vorhanden sind, deutlich kleiner. Zusätzlich zu diesen DNA-Sequenzen wurden ebenfalls die beiden CEB25-Sequenzen hinsichtlich ihrer Beladungsdichte auf den Magnetpartikeln untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass CEB25-L111 ähnlich stark an die Magnetpartikel bindet wie Pu27 und Myc22. Für die deutlich längere Sequenz CEB25-L191 wurde mit 40,2 pmol allerdings eine um etwa 1/5 geringere Beladungsdichte auf den Magnetpartikeln festgestellt, was durch die Länge der Sequenz und die damit einhergehende größere negative Ladung erklärt werden kann. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die maximale Beladungsdichte von der räumlichen Struktur der DNA und von der Gesamtladung abhängig sein kann.

3.3 Isolierung und Identifikation von G4-DNA-bindenden Proteinen

3.3.1 Isolierung von Proteinen aus Zelllysats mittels Pu27

Das anhand von Nucleolin erprobte System wurde in weiteren Experimenten genutzt, um G4-bindende Proteine aus Zelllysats zu isolieren. Dazu wurden Krebszellen der Eierstockkrebs-Zelllinie A2780 in RIPA-Puffer mit Zusatz von Protease Inhibitor suspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand aliquotiert und für *Pulldown*-Experimente genutzt.

Der Bindungspuffer für diese Experimente wurde angepasst, indem Tween-20 als Detergenz und 250 mM NaCl zur Erhöhung der Ionenstärke hinzugefügt wurden, um ein Denaturieren der Proteine zu vermeiden. Anschließend wurde untersucht, ob unter diesen Bedingungen Proteine an den G4 Pu27 binden und zum Vergleich der Einzelstrang „Linear“ und dessen Doppelstrang genutzt. Die Analyse mittels SDS-PAGE ist in Abbildung 53 dargestellt.

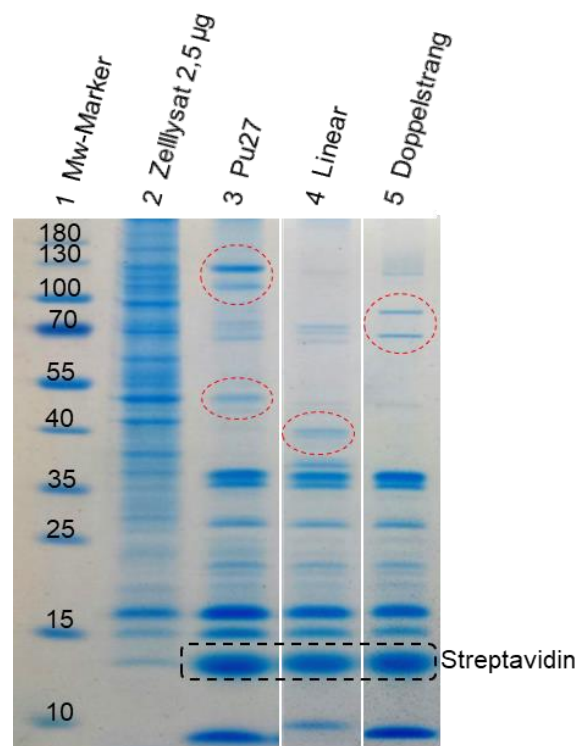


Abbildung 53: SDS-PAGE-Analyse von *Pulldown*-Experimenten mit Pu27 und zur Kontrolle das ODN Linear sowie sein Doppelstrang in Zelllysats.

Auf dem SDS-PAGE-Gel ist zu erkennen, dass eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen an die verschiedenen DNA-Strukturen bindet. Dabei wird deutlich, dass manche Proteine eine Affinität zu allen drei Strukturen gleichermaßen besitzen, während andere Proteine spezifisch an eine bestimmte DNA-Struktur binden. Ein Teil dieser Proteine mit

spezifischer Bindung ist mit roten Kreisen markiert. Im Fall von Pu27 (siehe Spur 3) wird eine Bande zwischen 40 und 55 kDa und zwei Banden oberhalb von 100 kDa sichtbar, die in den anderen Proben nicht detektiert werden. Hierbei handelt es sich offenbar um Proteine, die sehr spezifisch an den G4 Pu27 binden. In den Proben von Linear und Doppelstrang binden wiederum jeweils andere Proteine spezifisch an die DNA, was wiederum das Vorliegen von verschiedenen DNA-Strukturen auf den Magnetpartikeln bestätigt. Diese Proteine sind jedoch hier von geringerem Interesse, da innerhalb dieser Arbeit vorrangig die spezifisch G4-bindenden Proteine untersucht werden.

3.3.2 Verdrängung von Pu27-bindenden Proteinen aus Zelllysats durch PhenDC3

Zur Untersuchung der Bindungsspezifität der Proteine an Pu27 wurde das Experiment von Kapitel 3.3.1 wiederholt und in weiteren Proben zusätzlich der G4-bindende Ligand PhenDC3 hinzugefügt. Dazu wurde im ersten Schritt überprüft, mit welcher Ligandenkonzentration eine effiziente Verdrängung der Proteine erfolgt. Die Analyse mittels SDS-PAGE ist in Abbildung 54 dargestellt.

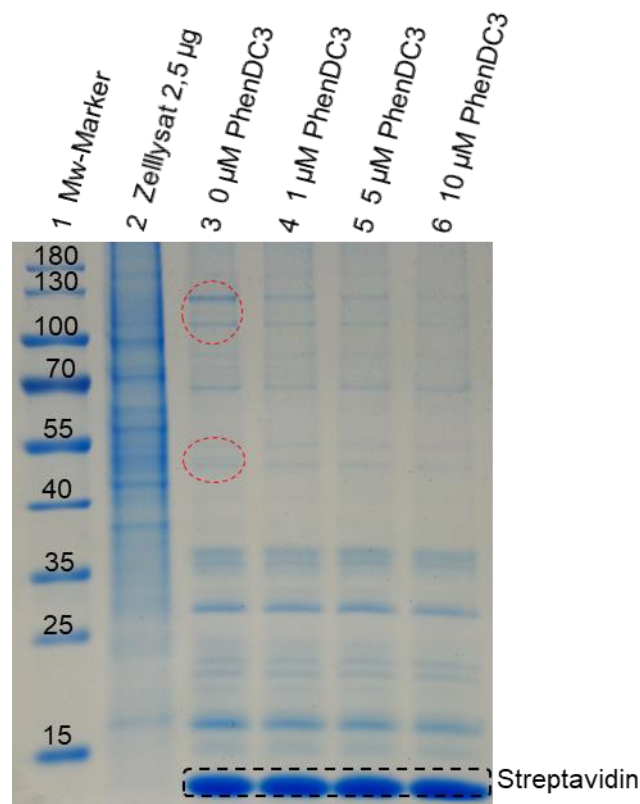


Abbildung 54: SDS-PAGE-Analyse von *Pulldown*-Experimenten mit Pu27 und Pu27 mit PhenDC3 in Zelllysats.

In der SDS-PAGE-Analyse wird deutlich, dass mit Hilfe von Pu27 ohne Zugabe von PhenDC3 erneut eine Vielzahl von Proteinen mit den gleichen Positionen der Banden wie zuvor isoliert wird (siehe Spur 3, rote Markierung). Somit kann das Ergebnis als reproduzierbar betrachtet werden. Unter Zugabe von 1 μ M PhenDC3 werden die für Pu27 charakteristischen Proteinbanden schwächer (siehe Spur 4). Mit einer Konzentration von 5 μ M PhenDC3 nimmt die Intensität weiter ab und mit 10 μ M PhenDC3 sind die Proteinbanden kaum noch erkennbar (siehe Spur 5 und 6). Somit ist davon auszugehen, dass eine Erhöhung der Konzentration an PhenDC3 eine stärkere Verdrängung der G4-bindenden Proteine zur Folge hat. Da mit einer Konzentration von 10 μ M eine annähernd vollständige Verdrängung erreicht wird, wurde diese für weitere Folgeexperimente als Standard-Konzentration gewählt. Das Verdrängungsexperiment wurde mit 10 μ M PhenDC3 wiederholt und die Ergebnisse in Abbildung 55 dargestellt.

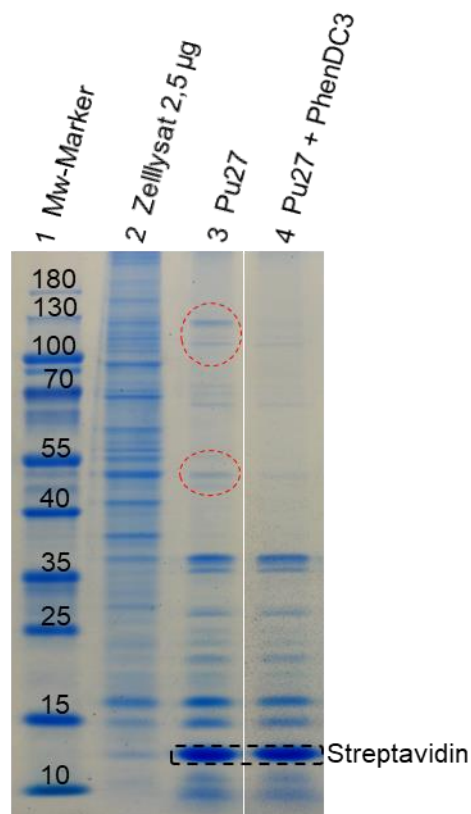


Abbildung 55: SDS-PAGE-Analyse von *Pulldown*-Experimenten mit Pu27 und Pu27 mit PhenDC3 in Zelllysat.

Auf dem SDS-PAGE Gel ist zu erkennen, dass mit Pu27 erneut verschiedene Proteinbanden detektiert werden (rote Markierung), die mit Zusatz von PhenDC3 nicht zu erkennen sind (siehe Spur 3 und 4). Unter Zugabe von PhenDC3 werden zahlreiche Proteine mit einem Molekulargewicht oberhalb von 35 kDa von dem G4 verdrängt (siehe Spur 4). Dies zeigt,

dass die betrachteten Proteine an die gleiche Stelle des G4 binden wie der Ligand. Somit kann die Bindung dieser Proteine als spezifisch für G4 betrachtet werden.

3.3.3 Isolierung und Verdrängung von Proteinen aus Zelllysats mittels Myc22

Analog zu den Experimenten mit Pu27 wurde der *Pulldown* in Zelllysats ebenfalls mit dem G4 Myc22 durchgeführt. Zum Vergleich wurde auch hier der Kontrollstrang Linear genutzt und zudem die verdrängende Wirkung von PhenDC3 untersucht.

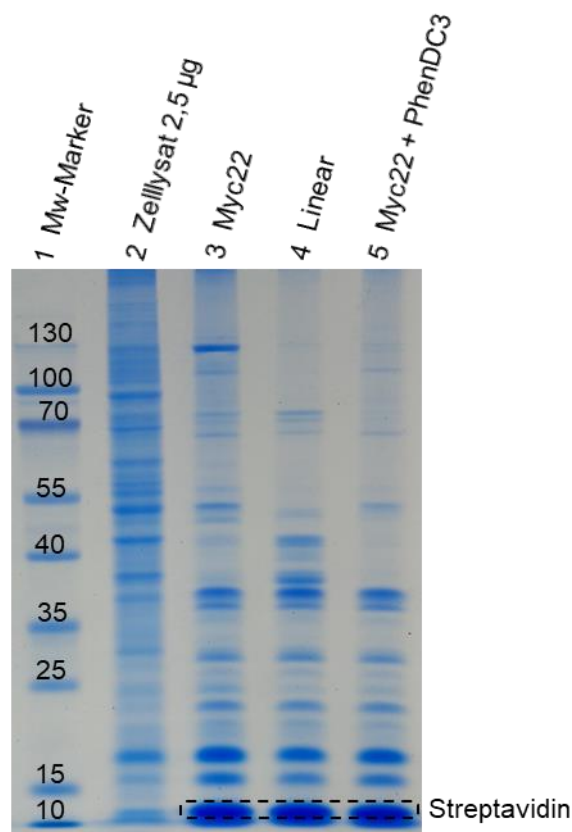


Abbildung 56: SDS-PAGE-Analyse von *Pulldown*-Experimenten mit Myc22, dem Kontroll-ODN Linear und Myc22 mit PhenDC3 in Zelllysats.

Auf dem SDS-PAGE-Gel ist im *Pulldown*-Experiment mit dem G4 Myc22 eine Vielzahl von isolierten Proteinen zu erkennen (siehe Spur 3), wobei das Muster der Proteine starke Ähnlichkeit zu dem von Pu27 besitzt. Insgesamt erscheinen die Banden im Fall von Myc22 stärker, was auf eine größere Menge an isoliertem Protein hinweist. Dieses Phänomen wurde schon in den Experimenten mit Nucleolin beobachtet und mit dem größeren Abstand vom G4 zu den Magnetpartikeln im Fall von Myc22 erklärt (siehe Kapitel 3.2.2). Mit dem Einzelstrang-ODN Linear werden analog zu den Experimenten zuvor zumeist andere Proteine isoliert als mit Myc22 (siehe Spur 4). Unter Zusatz von PhenDC3 können viele der

G4-bindenden Proteine von Myc22 verdrängt werden, was auch hier auf eine spezifische Bindung an den G4 hinweist.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass mit den G4-Strukturen Pu27 und Myc22 andere Proteine isoliert werden als mit der zur Kontrolle verwendeten Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA. Dies zeigt eindrucksvoll, dass eine Vielzahl von Proteinen eine unterschiedliche Affinität und damit Spezifität zu bestimmten DNA-Strukturen besitzt. Unter Zusatz von PhenDC3 können sowohl von Pu27 als auch von Myc22 viele Proteine verdrängt werden, wodurch eine spezifische Bindung der Proteine an G4 demonstriert wird.

3.3.4 Identifikation der mittels Pu27 isolierten Proteine

Im nächsten Schritt wurden die Pulldown-Experimente mit Pu27, dem Kontrollstrang Linear und Pu27 mit Zusatz von PhenDC3 wiederholt und zur Identifikation der isolierten Proteine an die Abteilung *du Laboratoire de spectrométrie de masse protéomique* des Instituts Curie in Paris gesendet und dort freundlicherweise von Dr. Damays Leow und Guillaume Arras analysiert. Für diese Analysen wurden die isolierten Proteine vor Ort mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide mittels Massenspektrometrie untersucht.

Die detektierten Massen der Peptide wurden auf den Servern des Instituts Curie zur Verfügung gestellt und durch das Programm MyProMS^[67] eine Auswertung im Arbeitskreis Weinhold ermöglicht. Bei dieser Auswertung wurden die Massen der gefundenen Peptide mit einer humanen Proteindatenbank abgeglichen und somit eine Zuordnung der isolierten Proteine ermöglicht.

Das Ziel dieser Analysen besteht darin, dass G4-bindende Zielproteine gefunden werden, die entweder ausschließlich an Pu27 binden, oder aber signifikant stärker an Pu27 als an den Kontrollstrang binden (Kriterium 1). Zudem wird in einem weiteren Vergleich untersucht, ob sich diese Zielproteine durch Zugabe von PhenDC3 verdrängen lassen und es sich somit um eine spezifische Bindung handelt. Dabei sind entsprechend solche Proteine von Interesse, die ausschließlich oder stark angereichert in den Proben von Pu27 enthalten sind im Vergleich zu den Proben mit Zusatz von PhenDC3 (Kriterium 2). Durch die kombinierte Anwendung dieser beiden Kriterien sollen selektiv an G4 bindende Zielproteine identifiziert werden.

Zunächst wurde Kriterium 1 betrachtet und untersucht, wie viele Proteine mit dem G4 Pu27 isoliert und identifiziert werden können und dies mit den durch das ODN Linear isolierten Proteinen verglichen. Dabei wurden alle Proteine betrachtet, die mit mindestens einem Peptid in den Proben nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 57 dargestellt.

Im Venn-Diagramm wird deutlich, dass mit insgesamt 1662 Proteinen eine sehr hohe Anzahl an Proteinen an die untersuchten DNA-Stränge gebunden hat und erfolgreich durch die Pulldown-Experimente aus dem Zelllysate isoliert werden konnte. Mit Pu27 wurden dabei insgesamt 1481 verschiedene Proteine isoliert, wobei 810 davon ebenfalls in den Proben von Linear nachgewiesen werden konnten.

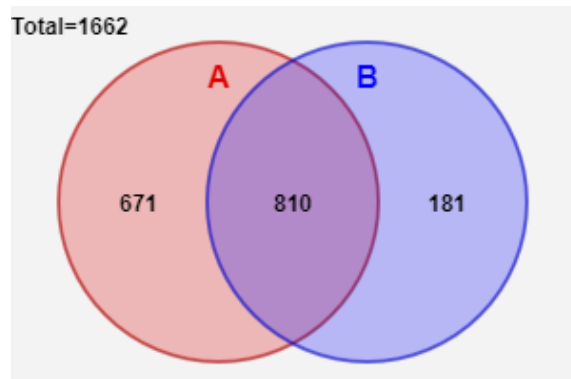


Abbildung 57: Venn-Diagramm der mit mindestens einem Peptid nachgewiesen Proteine. A: Pu27, B: Linear.

Somit wurden 671 Proteine ausschließlich in den G4-Proben detektiert und diese sind entsprechend vielversprechende Kandidaten für G4-bindene Proteine. Bei dieser Darstellung wird allerdings nicht berücksichtigt, in welchen Mengen die Proteine nachgewiesen wurden, sondern lediglich ob ein Protein detektiert wurde oder nicht. Aus diesem Grund können ebenfalls solche Proteine von Interesse sein, die an beide ODN binden, sofern diese in den G4 Proben stark angereichert sind im Vergleich zu den Proben von Linear.

Die *Pulldown*-Experimente mit HPLC-MS Analysen wurden immer als Triplikate durchgeführt, damit geprüft werden kann, wie reproduzierbar die Anreicherung eines bestimmten Proteins an der untersuchten DNA ist.

Um eine bessere Aussage über die Mengen der identifizierten Proteine in den Proben treffen zu können, wurde der Volcanoplots als Darstellungsmethode gewählt. Dort ist jedes Protein als einzelner Punkt dargestellt, wobei die Größe des Punktes mit der Anzahl an Peptiden korreliert, die von diesem Protein nachgewiesen wurden. Es wird davon ausgegangen, dass von Proteinen, die in großer Menge isoliert werden, mehr Peptide detektiert werden können. Deshalb weist die Größe des Punktes darauf hin, in welcher Menge das Protein im Durchschnitt gefunden wurde.

Auf der x-Achse eines Volcanoplots ist der Log₂-Wert des *fold change* aufgetragen. Dieser gibt wieder, wie stark ein Protein in dem Proben-triplikat des einen ODN angereichert ist im Vergleich zu dem Triplikat der Proben eines anderen ODN. Dabei bedeutet beispielsweise der Wert 2 auf der x-Achse, dass ein Protein mit diesem Wert 4-mal so stark an das untersuchte ODN bindet gegenüber einem Vergleichs-ODN.

Auf der y-Achse ist der negative dekadische Logarithmus des p-Wertes aufgetragen. Dabei handelt es sich um eine statistische Kennzahl, die in diesem Zusammenhang angibt, wie ähnlich die Anzahlen der gefundenen Peptide für ein bestimmtes Protein innerhalb der drei Proben eines Triplikates zueinander sind. Ein hoher Wert für den negativen dekadischen

Logarithmus des p-Wertes steht dabei für eine hohe Ähnlichkeit und somit Reproduzierbarkeit in der detektierten Anzahl von Peptiden für das gleiche Protein. In Abbildung 58 ist der Vulkanoplot von Pu27 gegen Linear dargestellt.

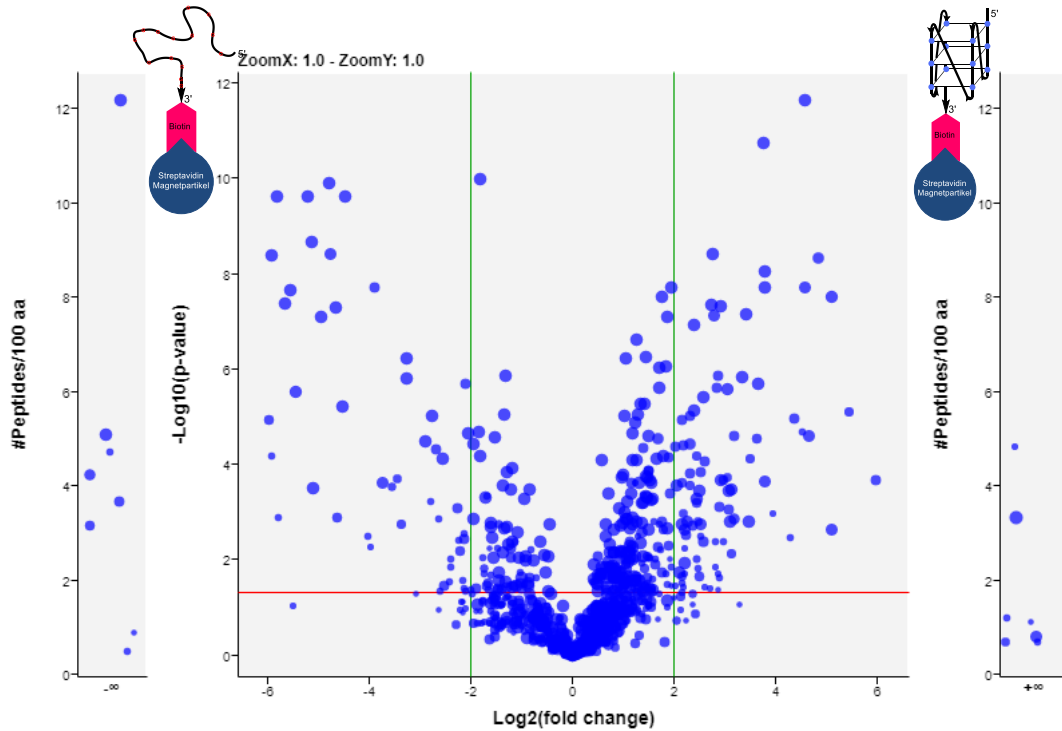


Abbildung 58: Vulkanoplot von Pu27 (rechts) gegen Linear (links) mit Proteinen, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden. Gesamtanzahl der dargestellten Proteine: 959.

Im Vulkanoplot sind alle Proteine dargestellt, die an beiden ODN nachgewiesen werden konnten. Die Anreicherung in Pu27 ist hierbei auf der rechten Seite, und eine Anreicherung in Linear zur linken Seite hin aufgetragen. Am Rand der rechten Seite sind die Proteine dargestellt, die ausschließlich in den Proben von Pu27 nachgewiesen wurden. Da für diese kein p-Wert ermittelt werden kann, ist auf der y-Achse die Anzahl gefundener Peptide pro 100 Aminosäuren aufgetragen. Am linken Rand sind entsprechend die Proteine dargestellt, die ausschließlich mit dem ODN Linear isoliert wurden.

Bei der Erstellung der Vulkanplots wurde ein Minimum von 4 identifizierten Peptiden je Protein gewählt, um eine zuverlässige Zuordnung der Proteine sicherzustellen. Dabei wird deutlich, dass von den ursprünglich 1622 Proteinen, die mit mindestens einem Peptid gefunden wurden, eine Anzahl von 959 Proteinen mit 4 Peptiden oder mehr gefunden wurde und somit sicher zugeordnet werden können. Im Vulkanoplot von Pu27 gegen Linear ist zu erkennen, dass eine Vielzahl an Proteinen mit dem G4 Pu27 angereichert wird und somit deutlich stärker an den G4 bindet als an den Einzelstrang Linear. Im Gegenzug gibt es

ebenfalls viele Proteine, die mit dem ODN Linear angereichert werden und entsprechend deutlich besser an die untersuchte Einzelstrang-DNA binden als an G4.

Von besonderem Interesse sind alle Proteine, die einen *fold change* von mindestens 4 an Pu27 aufweisen und zudem einen p-Wert von höchstens 0,05 besitzen. Zudem kommen auch solche Proteine in die engere Wahl für potentielle G4-Binder, die ausschließlich in den Proben von Pu27 gefunden wurden.

Um die Liste an Kandidaten-Proteinen weiter einzugrenzen, werden zudem nur Proteine betrachtet, die im Zellkern zu finden sind. Dies liegt darin begründet, dass es sich bei Pu27 um eine Sequenz aus dem c-myc Promotor handelt und dieser im Zellkern lokalisiert ist.^[9a] Somit ist davon auszugehen, dass die an der Regulation beteiligten Proteine ebenfalls im Zellkern zu finden sind. Um diese Proteine im Vulkanoplot sichtbar zu machen, wurde eine *Gene Ontology* Analyse durchgeführt, bei der durch Abgleich mit Datenbanken alle Proteine markiert werden, die in humanen Zellkernen nachgewiesen wurden. In Abbildung 59 ist der Vulkanoplot von Pu27 gegen Linear dargestellt und alle im Zellkern lokalisierten Proteine in hellbraun dargestellt.

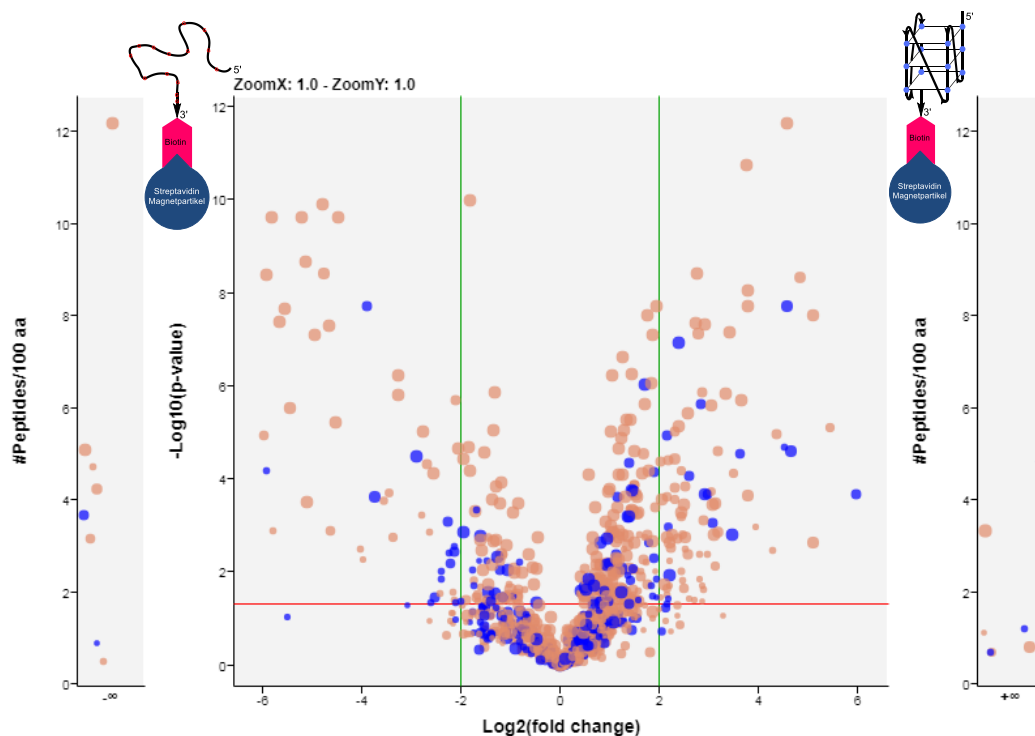


Abbildung 59: Vulkanoplot von Pu27 (rechts) gegen Linear (links) mit Proteinen, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden. Zellkern-Proteine sind in hellbraun dargestellt. Gesamtanzahl der dargestellten Proteine: 959, davon 686 (71,5%) im Zellkern lokalisiert.

Anhand der Analyse wird deutlich, dass mit 71,5% ein sehr großer Anteil der isolierten G4-bindenden Proteine aus dem Zellkern stammt. In der Farbe blau sind alle Proteine dargestellt, die nicht im Zellkern nachgewiesen wurden. Da diese für die weitere Auswertung nicht von Interesse sind, wurde eine Darstellungsweise gewählt, in der diese Proteine ausgeblendet wurden und ausschließlich im Zellkern lokalisierte Proteine angezeigt werden (siehe Abbildung 60).

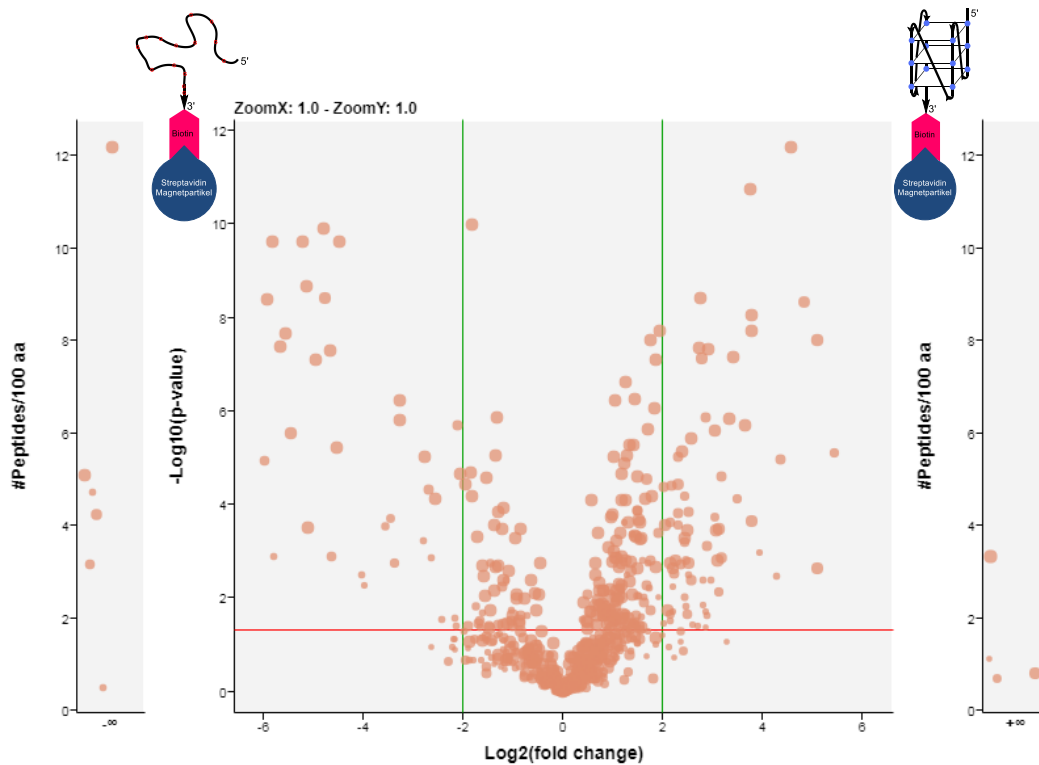


Abbildung 60: Vulcanoplot von Pu27 (rechts) gegen Linear (links) mit Zellkern-Proteinen, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden. Gesamtanzahl der im Zellkern lokalisierten Proteine: 686.

Um aus dieser Vielzahl von verbleibenden Proteinen solche herauszufiltern, die gemäß Kriterium 1 viel stärker an Pu27 binden als an Linear, wurde im Vulcanoplot eine Grenze bei einem Log2-Wert des *fold change* von 2 gezogen, was einer mindestens 4-fachen Anreicherung am G4 entspricht (siehe grüne Linie). Alle Proteine rechts von dieser Linie sind somit von weiterem Interesse. Eine weitere Grenze wird bei einem p-Wert von 0,05 gezogen (rote Linie), damit eine Reproduzierbarkeit für die gefundenen Proteine innerhalb der Triplikate sichergestellt ist. Demnach gelten solche als potentielle Zielproteine, die sowohl rechts von der grünen *fold change* Linie, als auch oberhalb der roten p-Wert Linie lokalisiert sind. Desweiteren kommen alle Proteine als weitere potentielle Zielproteine infrage, die an der äußeren Seite des rechten Randes zu finden sind, da diese ausschließlich

in den Proben von Pu27 gefunden wurden und in den Proben von Linear nicht detektiert wurden. Insgesamt wurden mit Kriterium 1 75 Kernproteine identifiziert.

All diese Proteine zusammen wurden im Vulkanoplot markiert und als Liste gespeichert, damit deren Verdrängbarkeit mit dem G4-bindenden Liganden PhenDC3 überprüft werden kann. In Abbildung 61 sind diese potentiellen Zielproteine in der Farbe rot markiert.

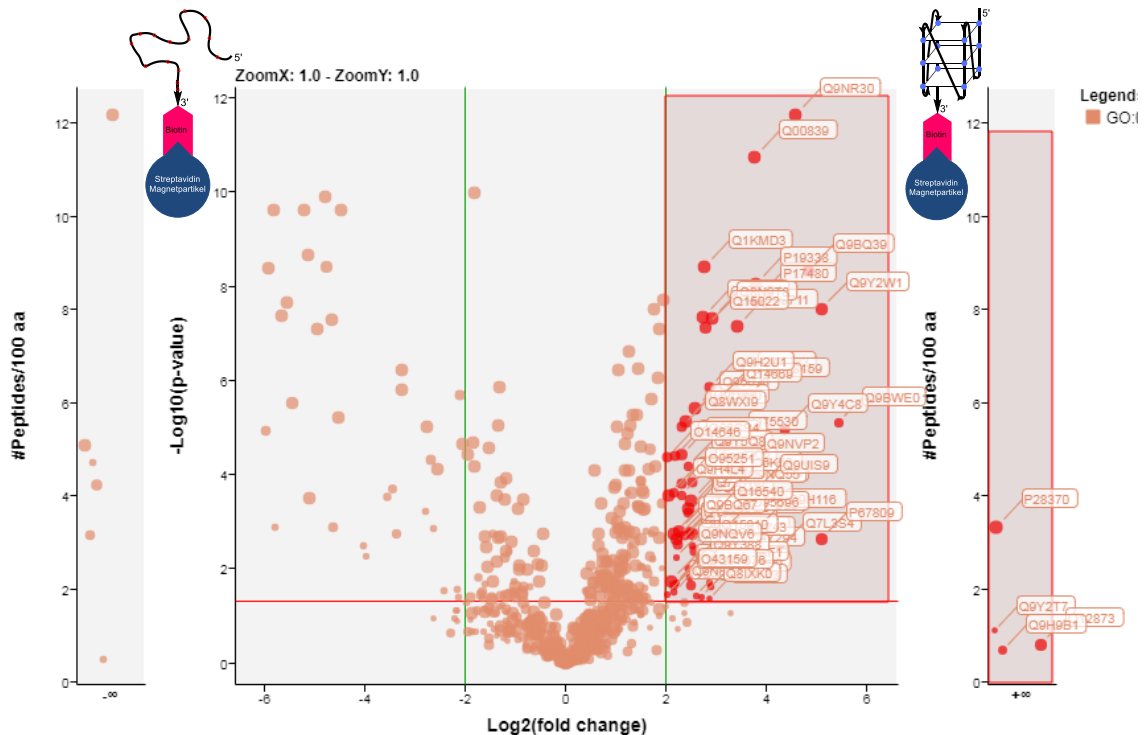


Abbildung 61: Vulkanoplot von Pu27 (rechts) gegen Linear (links) mit Zellkern-Proteinen, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden. Gesamtanzahl der im Zellkern lokalisierten Proteine: 686, davon 75 (10,9%) potentielle Zielproteine (rot).

Diese potentiellen Zielproteine wurden anschließend auf ihre Verdrängbarkeit mit dem G4-bindenden Liganden PhenDC3 untersucht (Kriterium 2). Zu diesem Zweck wurden in neuen *Pulldown*-Experimenten weitere Triplikate mit Pu27 und außerdem Pu27 mit Zusatz von PhenDC3 hergestellt und diese mittels Massenspektrometrie untersucht.

Aus den erhaltenen Daten wurde ein Vulkanoplot erstellt und dabei ebenfalls eine Grenze bei einem p-Wert von 0,05 gezogen. Die Grenze für den absoluten *fold change* wurde bei einem Wert von vier gesetzt. Dies bedeutet, dass Proteine von Interesse mindestens viermal so stark in den Triplikaten von Pu27 angereichert sein müssen im Vergleich zu den Triplikaten von Pu27 mit PhenDC3. Zu einem späteren Zeitpunkt kann dieser Vulkanoplot genutzt werden, um dort die Lage der potentiellen Zielproteine zu überprüfen, die zuvor nach Kriterium 1 ermittelt wurden.

In Abbildung 62 ist der Vulkanoplot von Pu27 gegen Pu27 mit Zusatz von PhenDC3 dargestellt. In diesen Analysen konnten insgesamt 927 Proteine nach der Detektion von mindestens 4 Peptiden sicher identifiziert werden. Zur rechten Seite hin ist die Anreicherung mit Pu27, zur linken Seite die Anreicherung mit Zusatz von PhenDC3 aufgetragen. Auf der rechten Seite sind insgesamt deutlich mehr Proteine zu erkennen als links. Dies zeigt, dass deutlich mehr Proteine durch den Zusatz von PhenDC3 verdrängt werden als angereichert und steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus den SDS-PAGE Analysen.

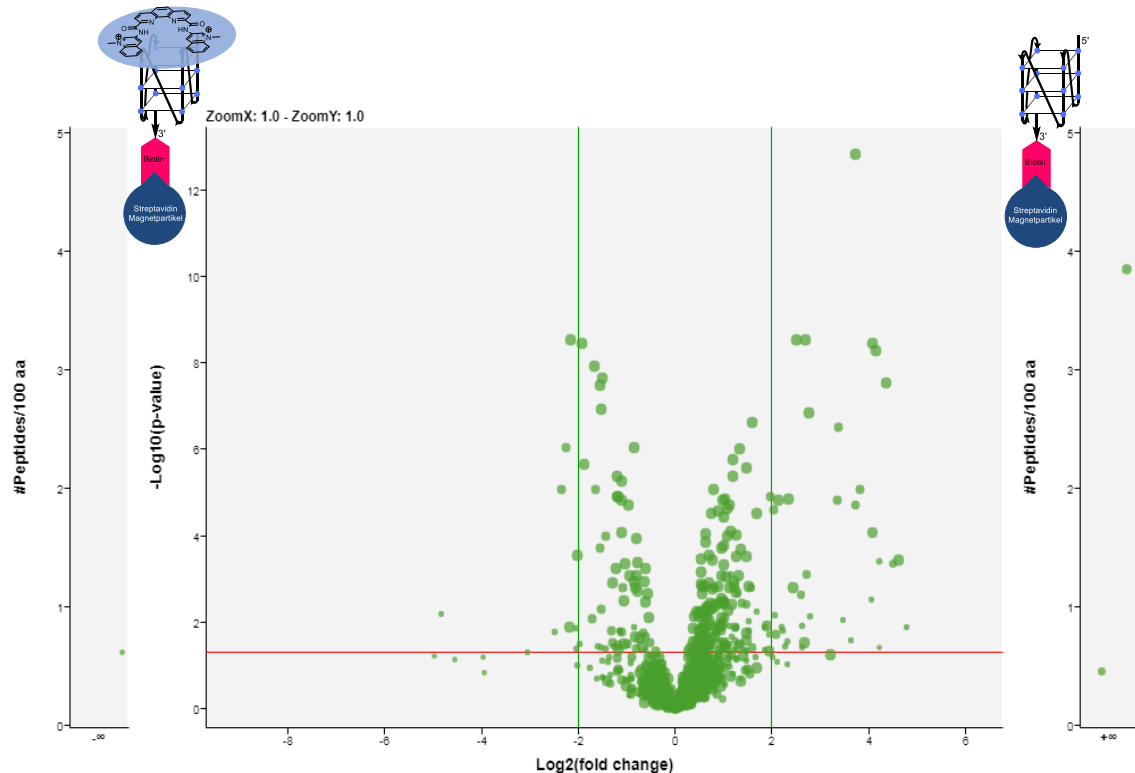


Abbildung 62: Vulkanoplot von Pu27(rechts) gegen Pu27 mit Zusatz von PhenDC3 (links). Dargestellt sind Proteine, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden. Gesamtanzahl der dargestellten Proteine: 927.

Proteine, die in den Proben von Pu27 angereichert sind im Vergleich zu den Proben mit Zusatz von PhenDC3 (positiver *fold change*) werden als verdrängbare Proteine definiert, wobei ab einem absoluten *fold change* von 4 von einer guten Verdrängbarkeit ausgegangen wird. Ebenso gelten solche Proteine als gut verdrängbar, die ausschließlich in den Proben von Pu27 gefunden werden.

Oberhalb von einem absoluten *fold change* von 4 (grüne Linie, rechts) ist eine Vielzahl von Proteinen zu erkennen, die eine gute Verdrängbarkeit durch PhenDC3 besitzen. Im Gegensatz dazu werden nur sehr wenige Proteine mit einem absoluten *fold change* von -4 (grüne Linie, links) detektiert, die durch Zugabe von PhenDC3 angereichert werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Erwartungen, da unter Zugabe eines G4-

bindenden Liganden eher die Verdrängung von G4-bindenden Proteinen statt deren Anreicherung erwartet wird.

Im nächsten Schritt soll herausgefunden werden, welche der nach Kriterium 1 (Anreicherung an Pu27 im Vergleich zu dem Kontroll-ODN Linear) identifizierten Proteine in dem Vulkanoplot von Pu27 gegen Pu27 mit PhenDC3 mit mindestens 4 Peptiden zugeordnet werden und an welcher Stelle sich diese befinden. Dazu wurden im Programm alle nach Kriterium 1 gespeicherten Proteine im Vulkanoplot Pu27 gegen Pu27 mit PhenDC3 sichtbar gemacht und alle anderen Proteine ausgeblendet. Dieser Vulkanoplot, in dem ausschließlich die nach Kriterium 1 verbleibenden Proteine angezeigt sind, ist in Abbildung 63 dargestellt.

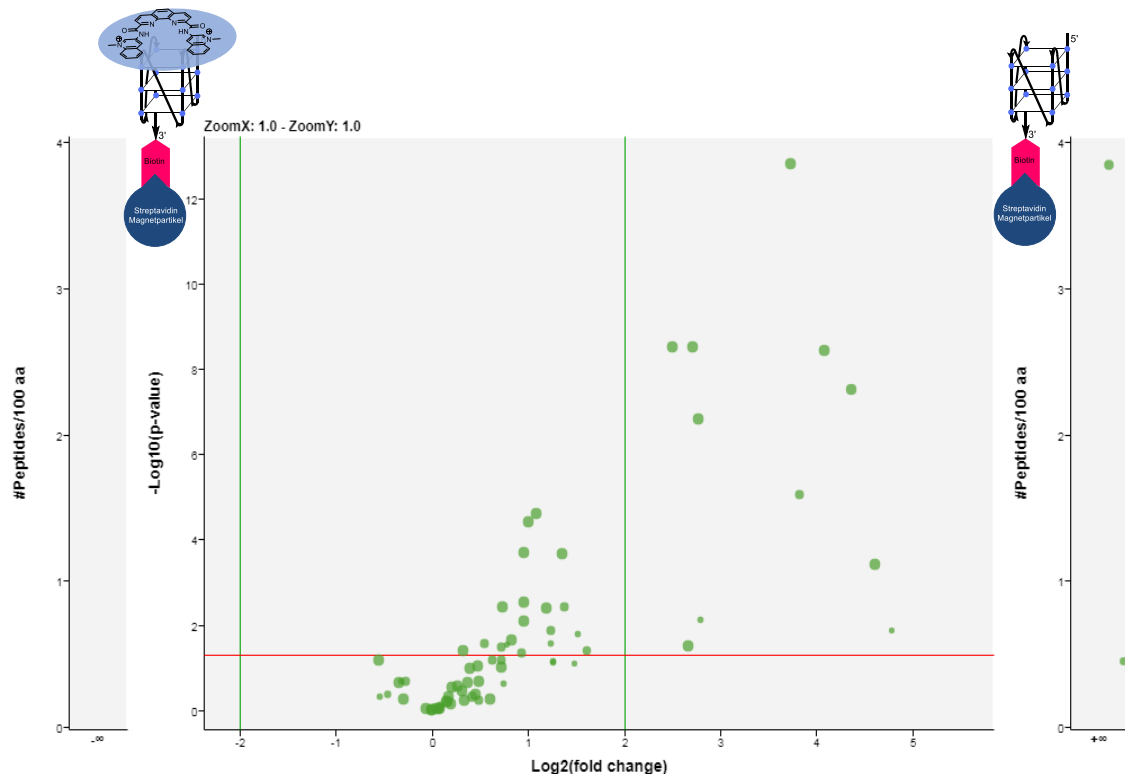


Abbildung 63: Vulkanoplot von Pu27 (rechts) gegen Pu27 mit Zusatz von PhenDC3 (links). Dargestellt sind Proteine, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden und die entsprechend Kriterium 1 deutlich stärker an Pu27 binden als an den Kontrollstrang. Gesamtanzahl der dargestellten Proteine: 69.

Im Vulkanoplot von Pu27 gegen Pu27 mit PhenDC3 wird deutlich, dass 69 der 75 potentiellen Zielproteine von Kriterium 1 auch in diesen Messungen mit mindestens vier Peptiden identifiziert werden konnten. Annähernd alle der mit Kriterium 1 gefundenen Proteine weisen in diesem Vulkanoplot positive Werte für den *fold change* auf, was zeigt, dass diese Proteine entsprechend den Werten durch Zugabe von PhenDC3 von der G4-DNA verdrängt werden können.

3 Ergebnisse

Bei der Verdrängung sind insbesondere solche Proteine von Interesse, die einen absoluten *fold change* von mindestens vier besitzen und somit eine gute Verdrängbarkeit aufweisen (Kriterium 2). Zu den Proteinen gemäß Kriterium 2 zählen ebenfalls alle Proteine, die in Pu27 gefunden wurden und in der Verdrängung mit PhenDC3 nicht mehr nachweisbar sind.

Die Verdrängbarkeit spricht dafür, dass es sich um eine spezifische Bindung handelt.

Alle Proteine, die sowohl Kriterium 1 als auch Kriterium 2 erfüllen, sind Zielproteine und kommen somit als potentielle G4-bindende Proteine für weitere Untersuchungen infrage, da diese eine starke Bindung an den untersuchten G4 zeigen im Vergleich zu Kontroll-DNA und sich zudem durch einen G4-bindenden Liganden verdrängen lassen.

Diese Zielproteine sind in Abbildung 64 dargestellt. Von den 69 Proteinen, die dort abgebildet sind und Kriterium 1 erfüllen, genügen 13 Proteine und somit 18,8% ebenfalls dem Kriterium 2. Diese wurden in rot markiert und die identifizierten Proteine als Liste exportiert (siehe Tabelle 4).

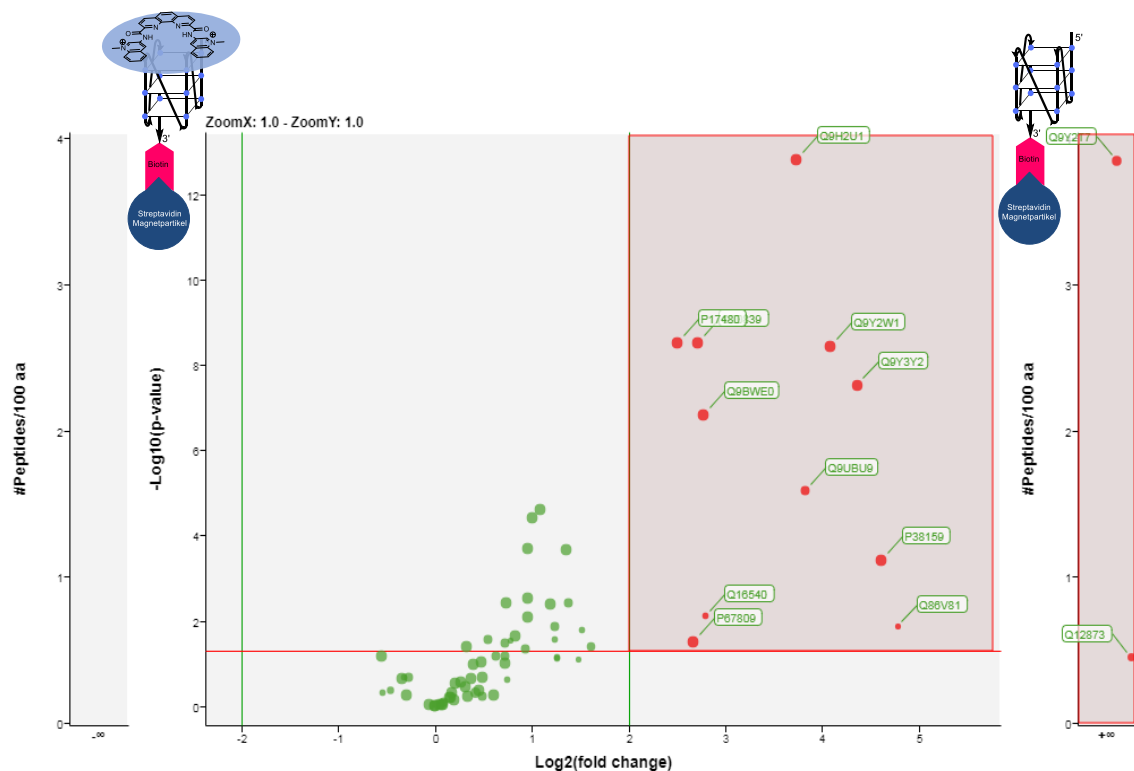


Abbildung 64: Vulcanoplot von Pu27 (rechts) gegen Pu27 mit Zusatz von PhenDC3 (links). Dargestellt sind Proteine, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden und die entsprechend Kriterium 1 deutlich stärker an Pu27 binden als an den Kontrollstrang. Gesamtanzahl der dargestellten Proteine: 69, davon 13 (18,8%) Zielproteine.

Tabelle 4: Zielproteine, die an Pu27 binden.

Protein	Synonyme	M _w	Beschreibung
P17480	UBTF, UBF	89,4	<i>Nucleolar transcription factor 1</i>
P38159	RBMX, HNRPG	42,3	<i>RNA-binding motif protein, X chromosome</i>
P67809	YBX1, NSEP1	35,9	<i>Nuclease-sensitive element-binding protein 1</i>
Q00839	HNRNPU	90,6	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>
Q12873	CHD3	226,6	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3</i>
Q16540	MRPL23	17,8	<i>39S ribosomal protein L23, mitochondrial</i>
Q86V81	ALYREF, THOC4	26,9	<i>THO complex subunit 4</i>
Q9BWE0	REPIN1, ZNF464	63,6	<i>Replication initiator 1</i>
Q9H2U1	DHX36, RHAU	114,8	<i>ATP-dependent RNA helicase DHX36</i>
Q9UBU9	NXF1, TAP	70,2	<i>Nuclear RNA export factor 1</i>
Q9Y2T7	YBX2, CSDA3	38,5	<i>Y-box-binding protein 2</i>
Q9Y2W1	THRAP3, TRAP150	108,7	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein 3</i>
Q9Y3Y2	CHTOP, PP7704	26,4	<i>Chromatin target of PRMT1 protein</i>

Die in Tabelle 4 aufgeführten Proteine sind potentielle G4-bindende Proteine, die für eine nähere Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften an G4-DNA im Rahmen von Bindungsstudien infrage kommen (siehe Kapitel 3.4).

3.3.5 Identifikation der mittels Myc22 isolierten Proteine

Die zuvor mit Pu27 durchgeführten Pulldown-Experimente und Auswertungen wurden im Zuge dieser Arbeit ebenfalls mit dem strukturell mehr eingeschränkten G4 Myc22 durchgeführt. Dadurch sollte untersucht werden, ob das Spektrum an Zielproteinen ähnlich zu der nativen Sequenz Pu27 ist oder ob durch den weniger flexiblen G4 Myc22 mehr, weniger oder andere Proteine aus dem Zelllysats isoliert werden. Dazu wurden analog zu Pu27 Triplikaten-Experimente mit Myc22 durchgeführt und zum Vergleich gemäß Kriterium 1 (siehe Kapitel 3.3.4) zusätzlich Triplikate des Kontroll-ODN Linear angefertigt. Das Venn-Diagramm aller mit mindestens einem Peptid nachgewiesenen Proteine ist in Abbildung 65 dargestellt.

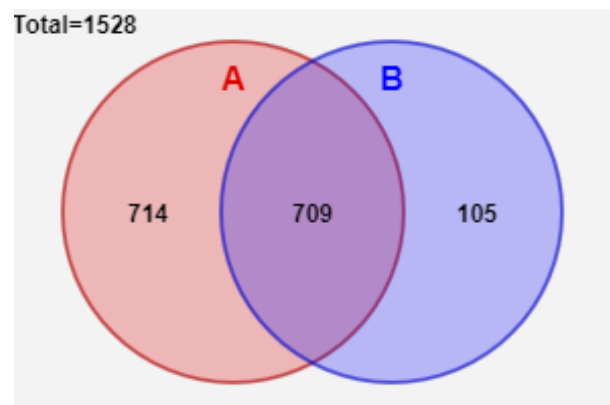


Abbildung 65: Venn-Diagramm der mit mindestens einem Peptid nachgewiesenen Proteine. A: Myc22, B: Linear.

Es wird deutlich, dass in den Messungen von Myc22 mit insgesamt 1528 Proteinen ähnlich viele Proteine wie mit Pu27 aus Zelllysats isoliert und identifiziert werden konnten. Dabei fällt auf, dass mit 1423 Proteinen ein sehr großer Teil an Myc22 bindet. Von diesen Proteinen wiederum konnten 709 sowohl in den Proben von Myc22 als auch in Linear detektiert werden. In den Triplikaten von Linear wurden insgesamt 814 Proteine mit mindestens einem Peptid identifiziert, wobei von diesen Proteinen 105 ausschließlich an dem Kontroll-ODN Linear gefunden wurden.

Um eine bessere Aussage über die Verteilung und Anreicherung der Proteine in Myc22 gegenüber Linear treffen zu können, wurde auch hier ein Vulkanplot als Darstellungsmethode gewählt. Dabei wurde analog zu Pu27 als Grenze festgelegt, dass ein Protein zur sicheren Identifikation mit mindestens 4 Peptiden nachweisbar sein muss. Der Vulkanplot von Myc22 gegen Linear ist in Abbildung 66 dargestellt.

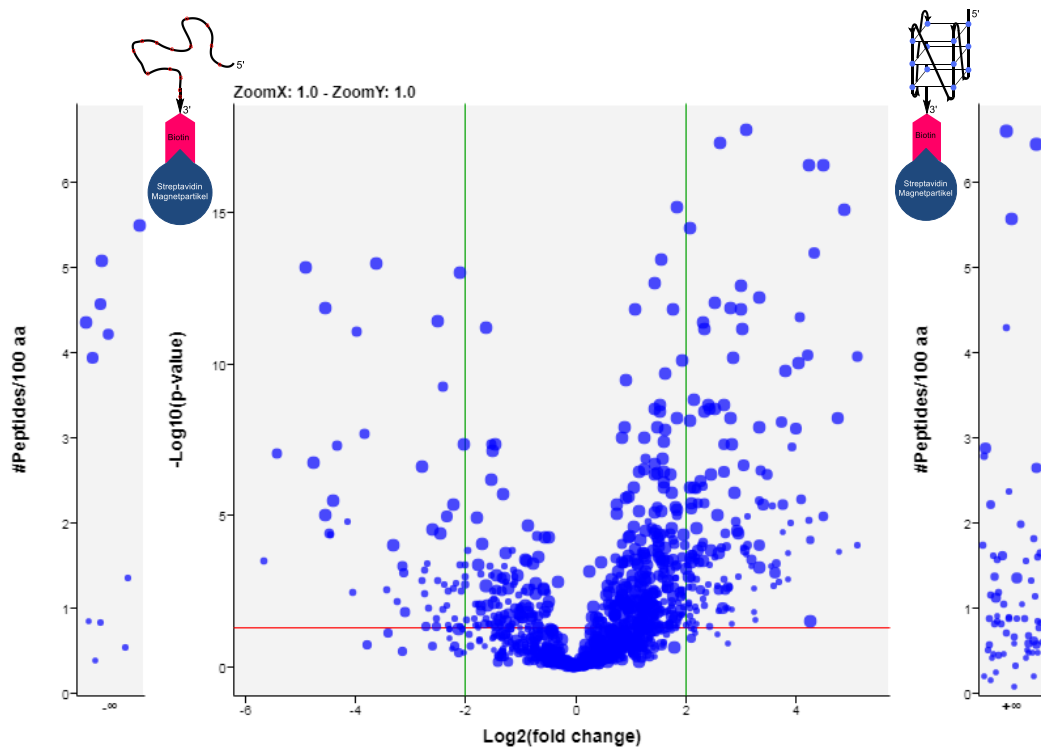


Abbildung 66: Vulcanoplot von Myc22 (rechts) gegen Linear (links) mit Proteinen, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden. Gesamtanzahl der dargestellten Proteine: 1302.

Im Vulcanoplot von Myc22 gegen Linear wird deutlich, dass hier mit insgesamt 1302 Proteinen mehr Proteine mit mindestens 4 Peptiden detektiert wurden als bei Pu27. Auf der rechten Seite ist eine Vielzahl an Proteinen zu erkennen, die ausschließlich an Myc22 binden. Dem gegenüber steht auf der linken Seite nur eine geringe Anzahl an Proteinen, die einzig mit dem Kontrollstrang Linear identifiziert wurden. Auf der rechten Seite des Vulcanoplots sind ebenfalls wesentlich mehr Proteine vorhanden als auf der linken Seite. Dies entspricht dem Ergebnis, wenn alle detektierten Proteine berücksichtigt werden. Die insgesamt höhere Anzahl an Proteinen im Vergleich zu den Analysen mit Pu27 kann darin begründet liegen, dass sich der G4 Myc22 in einem geringfügig größeren Abstand zu den Magnetpartikeln befindet und somit eine Proteinbindung erleichtert wird. Eine entsprechende Beobachtung wurde bereits in Experimenten mit dem Protein Nucleolin gemacht (siehe Kapitel 3.2).

Für die Selektion potentieller Zielproteine wurden im nächsten Schritt analog zu Pu27 alle Proteine markiert, die im Zellkern nachgewiesen werden können. Zu diesem Zweck wurde mit allen Proteinen eine *Gene Ontology* Analyse durchgeführt und alle Zellkern-Proteine markiert. In Abbildung 67 ist der Vulcanoplot von Myc22 gegen Linear dargestellt, wobei alle im Zellkern detektierten Proteine in der Farbe braun gefärbt sind.

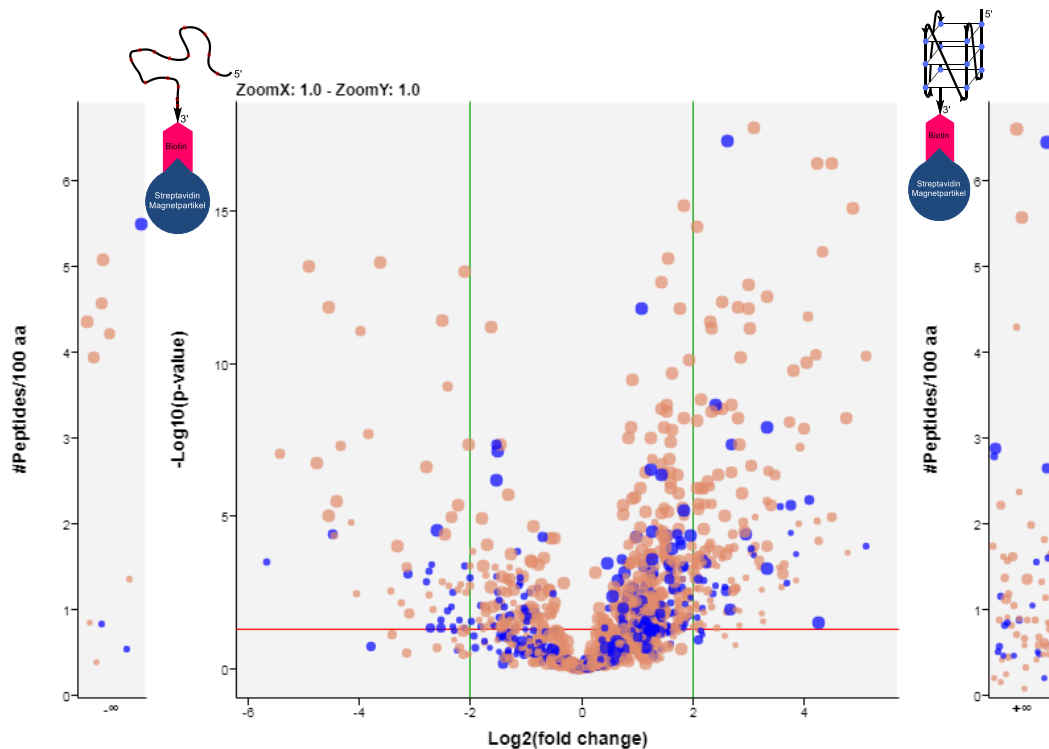


Abbildung 67: Vulcanoplot von Myc22 (rechts) gegen Linear (links) mit Proteinen, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden. Zellkern-Proteine sind in hellbraun dargestellt. Gesamtanzahl der dargestellten Proteine: 1302, davon 892 (68,5%) im Zellkern lokalisiert.

Anhand des Vulcanoplots wird erkennbar, dass es sich bei einer Vielzahl der isolierten Proteine um Proteine aus dem Zellkern handelt. Von den 1302 insgesamt mit mindestens vier Peptiden identifizierten Proteinen wurden 892 und damit 68,5% im Zellkern gefunden. Dieser Prozentsatz liegt damit ähnlich hoch wie in den Analysen von Pu27.

Im nächsten Schritt wurden alle Proteine, die nicht im Zellkern lokalisiert sind (blau) ausgeblendet, da diese für die weitere Auswertung zunächst nicht relevant sind. Im Anschluss wurde geprüft, welche der verbleibenden Proteine gemäß Kriterium 1 eine große Anreicherung an Myc22 im Vergleich zu dem Kontrollstrang Linear besitzen, oder einzig in den Proben von Myc22 detektiert wurden. Dazu wurden innerhalb des Vulcanoplots alle Zellkern-Proteine markiert, die einen absoluten *fold change* von mindestens 4 (rechts der rechten, grünen Linie, Abbildung 67) und einen p-Wert geringer als 0,05 (oberhalb der roten Linie, Abbildung 67) besitzen. Als weitere Proteine, die Kriterium 1 erfüllen, gelten alle Zellkern-Proteine, die ausschließlich in den Triplikaten mit Myc22 nachgewiesen wurden und somit ausschließlich an diese G4-Sequenz binden. Diese wurden zusätzlich markiert und als Liste gespeichert, um für die weitere Auswertung nach Kriterium 2 genutzt werden zu können.

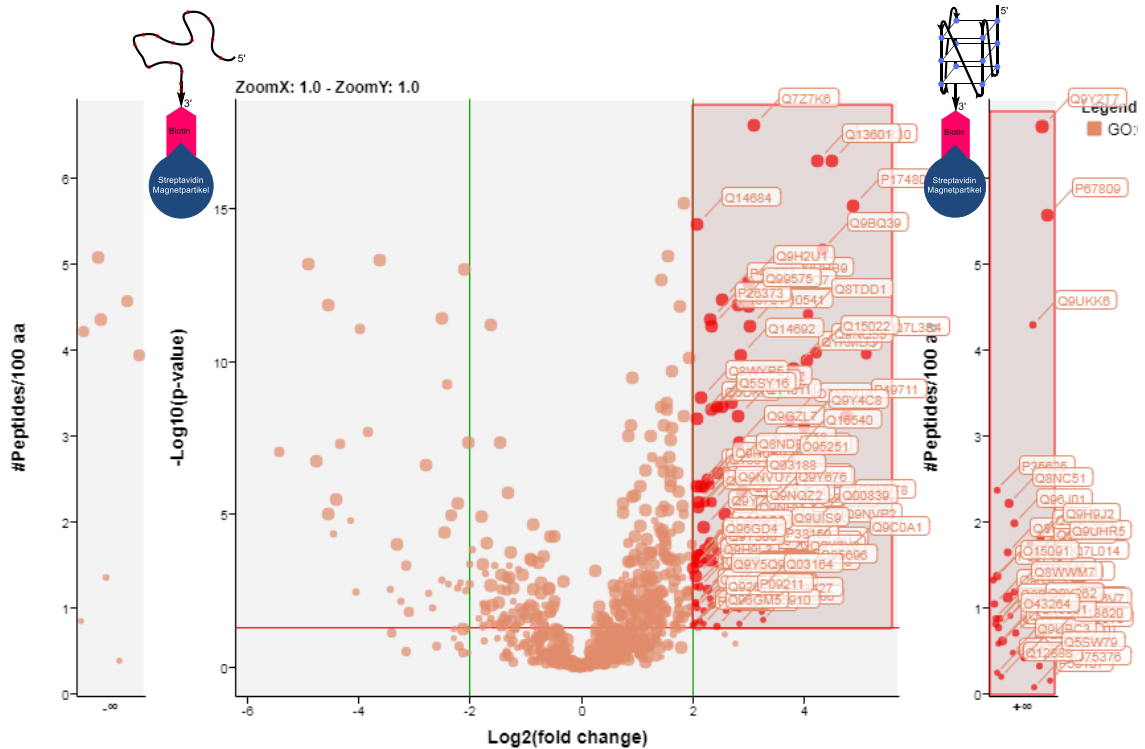


Abbildung 68: Vulcanoplot von Myc22 (rechts) gegen Linear (links) mit Zellkern-Proteinen, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden. Gesamtanzahl der im Zellkern lokalisierten Proteine: 892, davon 160 (17,9%) potentielle Zielproteine (rot).

In Abbildung 68 ist der Vulkanoplot von Myc22 gegen Linear dargestellt mit allen Zellkern-Proteinen, die mit mindestens 4 Peptiden identifiziert wurden. Von den 892 Proteinen, die dem Zellkern zugeordnet werden können, kommen 160 und damit 17,9% als potentielle Zielproteine infrage. Damit wurden im Vergleich zu Pu27 mit der weniger flexiblen Sequenz Myc22 nicht nur insgesamt mehr Zellkern-Proteine gefunden, sondern es erfüllt auch ein höherer Prozentsatz dieser Proteine Kriterium 1. Diese sind in rot markiert und eignen sich für eine weitere Überprüfung gemäß Kriterium 2.

Bei Kriterium 2 wird die Verdrängbarkeit durch den G4-bindenden Liganden PhenDC3 überprüft, indem die Position der potentiellen Zielproteine nach Kriterium 1 in einem Vulcanoplot von Myc22 gegen Myc22 mit Zusatz von PhenDC3 betrachtet wird. Sofern ein Protein reproduzierbar in den Proben ohne PhenDC3 4-fach so stark angereichert ist verglichen mit den Proben mit Zusatz von PhenDC3, oder in den Proben mit PhenDC3 nicht mehr nachweisbar ist, gilt es analog zu der Auswertung von Pu27 als gut verdrängbar und erfüllt somit Kriterium 2.

Um dies überprüfen zu können, wurden zunächst Triplikate mit Zusatz von PhenDC3 mittels Massenspektrometrie untersucht. Anschließend wurde ein Vulcanoplot von Myc22 gegen Myc22 mit PhenDC3-Zusatz erstellt (siehe Abbildung 69).

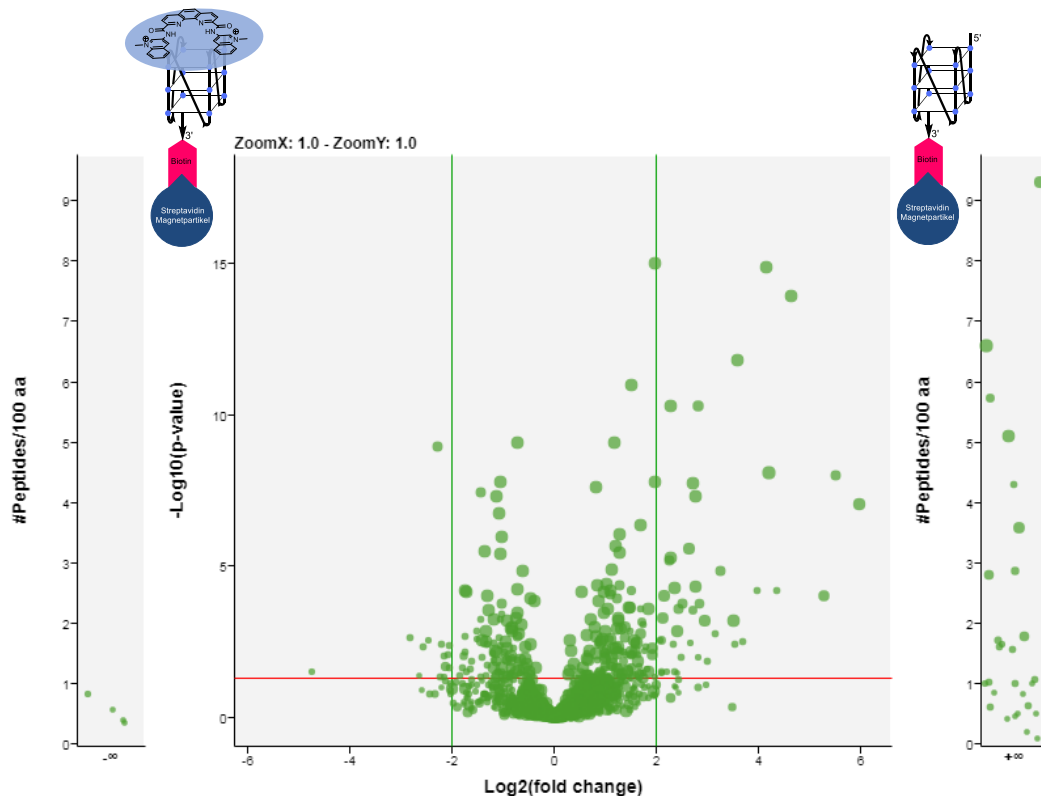
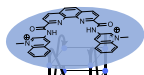


Abbildung 69: Vulcanoplot von Myc22 (rechts) gegen Myc22 mit Zusatz von PhenDC3 (links). Dargestellt sind Proteine, die mit mindestens 4 Peptiden nachgewiesen wurden. Gesamtanzahl der dargestellten Proteine: 1368.

Im Vulcanoplot von Myc22 gegen Myc22 mit Zusatz von PhenDC3 wurden insgesamt 1368 Proteine mit mindestens 4 Peptiden zugeordnet. Zur rechten Seite hin sind dabei signifikant mehr Proteine vorhanden als auf der linken Seite. Anhand der Verteilung wird deutlich, dass sich sehr viele der G4-Binder durch den Zusatz von PhenDC3 verdrängen lassen, während kaum Anreicherung durch den Liganden stattfindet. Dieses Phänomen wird insbesondere deutlich bei Betrachtung der absoluten *fold change* Werte oberhalb und unterhalb von 4 (rechts und links außerhalb der grünen Linien, Abbildung 69).

Um Kriterium 2 anwenden zu können, wurden im Folgenden im Vulcanoplot Myc22 gegen Myc22 mit Zusatz von PhenDC3 nur Proteine angezeigt, die zuvor Kriterium 1 erfüllt haben und als Liste gespeichert wurden. Dieser Vulcanoplot ist in Abbildung 70 dargestellt.

Die Verteilung der 160 Proteine ist stark zur rechten Seite und damit zu positiven *fold change* Werten hin orientiert und zeigt damit eine ähnliche Verteilung wie in den Analysen mit dem G4 Pu27. Von den 160 Proteinen, die Kriterium 1 erfüllen und mit mindestens 4 Peptiden identifiziert werden konnten, erfüllen 25 und damit 15,6% zusätzlich Kriterium 2 (markiert in rot). Diese zeigen somit nicht nur eine Anreicherung am G4 im Vergleich zum Kontrollstrang, sondern auch eine gute Verdrängbarkeit mit PhenDC3.



A diagram showing a 5x5 grid of dots. A path of blue dots is highlighted, starting from the top-left dot and ending at the top-right dot. The path consists of 5 dots and 4 arrows. The arrows indicate a sequence of moves: right, down, right, down, right. The number 5 is written to the right of the grid.

Tabelle 5: Übersicht über die Ergebnisse aus den Vulcanoplots für Pu27 und Myc22.

	Pu27	Myc22
identifizierte Proteine (mindestens 4 Peptide)	959	1302
davon Zellkern-Proteine	686 (71,5%)	892 (68,5%)
Kriterium 1 erfüllt	75 (10,9%)	160 (17,9%)
Kriterium 1 und 2 erfüllt	13 (18,8%)	25 (15,6%)

82

wurde festgestellt, dass es sich bei 10 der identifizierten Proteine um gemeinsame Zielproteine handelt, die sowohl gute Bindungs- und Verdrängbarkeitseigenschaften an Pu27 als auch an Myc22 aufweisen (siehe Abbildung 71).

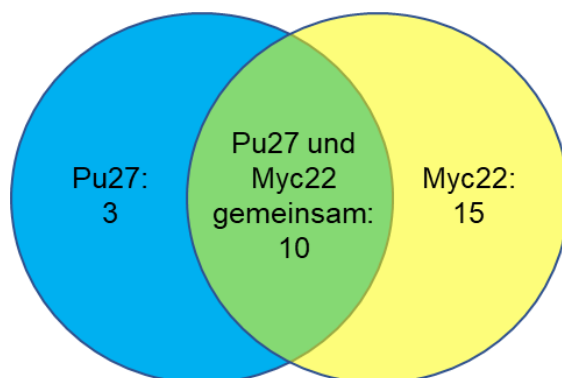


Abbildung 71: Venn-Diagramm der Zielproteine von Pu27 und Myc22.

Somit wird deutlich, dass der überwiegende Teil der Zielproteine von Pu27 ebenfalls gute Bindungseigenschaften an der modifizierten, weniger flexiblen Sequenz Myc22 besitzt. Lediglich drei identifizierten Proteine sind ausschließlich Zielproteine an der nativen Sequenz Pu27 und weisen dort deutlich bessere Bindungseigenschaften auf als an Myc22. Insgesamt wurden mit Myc22 mehr Zielproteine mit guten Bindungseigenschaften identifiziert als mit Pu27. Die bessere Bindung von Proteinen an Myc22 kann durch den sequenzbedingten größeren Abstand zwischen G4 und Magnetpartikel erklärt werden, woraus eine geringere sterische Hinderung des G4 resultiert (siehe Kapitel 3.1.1.2). Die 10 gemeinsamen Zielproteine sind in Tabelle 6 aufgelistet und eine Gesamtübersicht der Zielproteine ist im Anhang in Tabelle 29 zu finden.

Tabelle 6: Gemeinsame Zielproteine von Pu27 und Myc22.

Protein	Synonyme	M _w	Beschreibung
P17480	UBTF, UBF	89,4	<i>Nucleolar transcription factor 1</i>
P38159	RBMX, HNRPG	42,3	<i>RNA-binding motif protein, X chromosome</i>
Q00839	HNRNPU	90,6	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>
Q16540	MRPL23	17,8	<i>39S ribosomal protein L23, mitochondrial</i>
Q9BWE0	REPIN1, ZNF464	63,6	<i>Replication initiator 1</i>
Q9H2U1	DHX36, RHAU	114,8	<i>ATP-dependent RNA helicase DHX36</i>
Q9UBU9	NXF1, TAP	70,2	<i>Nuclear RNA export factor 1</i>
Q9Y2T7	YBX2, CSDA3	38,5	<i>Y-box-binding protein 2</i>
Q9Y2W1	THRAP3, TRAP150	108,7	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein 3</i>
Q9Y3Y2	CHTOP, PP7704	26,4	<i>Chromatin target of PRMT1 protein</i>

Desweiteren wurde die in den Kapiteln 3.3.4 und 3.3.5 gezeigte Auswertung mittels Vulkanoplot nicht nur mit der oben beschriebenen Grenze bei einem *fold change* von 4 durchgeführt, sondern die gesamte Auswertung ebenfalls für einen *fold change* von 2 sowohl bei der Betrachtung von G4 gegen Linear als auch von G4 gegen G4 mit PhenDC3 wiederholt. Durch die Herabsenkung der Grenze beider Kriterien sollten auch solche Proteine erfasst werden, die die zuvor gewählten strengen Kriterien nicht erfüllen. Mit einem *fold change* von mindestens 2 wurden für Pu27 34 statt zuvor 13 Zielproteine ermittelt und im Fall von Myc22 stieg die Anzahl von 25 auf 67 (siehe Anhang, Tabelle 22 und Tabelle 26).

Bei den dargestellten Proteinen handelt es sich wie zuvor beschrieben ausschließlich um Proteine, die im Zellkern nachgewiesen werden können. Um zusätzliche Proteine zu finden, die nicht im Zellkern lokalisiert sind, wurde die Auswertung für Pu27 und Myc22 jeweils mit einem *fold change* von 4 (siehe Anhang, Tabelle 15 und Tabelle 16) und anschließend einem Wert von 2 (siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20) wiederholt. Die Hinzunahme von Proteinen außerhalb des Zellkerns führte nur zu einer geringen Erhöhung der Anzahl von G4-bindenden Zielproteinen. Dies bestärkt die Annahme, dass es sich bei den meisten relevanten G4-Bindern um Zellkern-Proteine handelt.

In den hier durchgeführten Analysen wurden mehrere Proteine als Zielproteine identifiziert, für die bereits G4-bindende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Die ATP-abhängige RNA-Helicase DHX36 ist ein gut bekannter G4-Binder, der G4-Strukturen auflösen kann.^[68] Zudem ist bekannt, mit welcher Struktur dieses Protein an parallele G4-DNA bindet.^[69]

Die ATP-abhängige RNA-Helicase DHX36 wurde ebenfalls im Jahr 2016 nachgewiesen, als Byrd *et al.* mit einer c-myc-basierten Sequenz Proteine aus Zelllysat isolierten.^[70] Bei der verwendeten DNA handelte es sich jedoch nicht um die native c-myc-Sequenz, sondern um eine stark veränderte. Zudem wurde nicht überprüft, ob die eingesetzte DNA als Monomer vorlag oder es sich um multimeren Strukturen handelte. In den dort durchgeführten Analysen konnte neben DHX36 auch das Nuclease-sensitive-Element-bindende Protein 1 (YBX1) gefunden werden, das in dieser Arbeit als Zielprotein für Pu27 identifiziert wurde. In diesen Experimenten wurde allerdings nicht nur eine andere DNA-Sequenz zur Isolierung genutzt, sondern statt Eierstock-Krebszellen wurden dort Melanomzellen der Zelllinie WM266-4 verwendet. Dies könnte erklären, warum sich die übrigen der dort gefundenen Proteine von den hier identifizierten Zielproteinen unterscheiden.

Zur Isolierung von G4-bindenden Proteinen wurden ein ähnliches zu dem hier verwendeten System auch von anderen Arbeitsgruppen genutzt. So gelang es Raney und seinen Mitarbeitern im Jahr 2015, die Bindung des Transkriptions-Co-Aktivators Sub1 aus Zelllysat von *Saccharomyces cerevisiae* an G4-DNA zu demonstrieren.^[59a] Desweiteren konnten Pagano *et al.* Proteine aus HTC116-Zellen identifizieren, die an humane Telomer-G4-DNA binden.^[59b]

3.3.6 Zusammenfassung

Zur Isolierung von G4-bindenden Proteinen wurde ein System entwickelt bestehend aus den monomeren, biotinylierten G4 Pu27 und Myc22 auf Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln. Dieses wurde zunächst anhand des bekannten G4-bindenden Proteins Nucleolin untersucht und zur Kontrolle mit verschiedenen DNA-Sequenzen verglichen. In Verdrängungsexperimenten wurde deutlich, dass signifikant weniger Nucleolin an die G4-DNA bindet, wenn der G4-bindende Ligand PhenDC3 hinzugegeben wird und der Ligand und Nucleolin somit um die gleiche Bindungsstelle am G4 konkurrieren. Für die verschiedenen monomeren DNA-Sequenzen wurde die Beladungsdichte untersucht und festgestellt, dass die für die untersuchten ungefalteten Einzelstrang- bzw. G4-Sequenzen etwa gleich viel DNA auf dem Magnetpartikeln bindet, allerdings für Doppelstrang-DNA eine geringere Konzentration auf Partikeln erreicht wird. Anschließend wurden die mit verschiedener DNA beladenen Magnetpartikel genutzt, um Proteine aus Zelllysat zu isolieren. Dabei wurde in der Analyse mittels SDS-PAGE deutlich, dass an Pu27 sehr viele Proteine binden, die in den Kontrollen mit ungefalteter Einzelstrang-DNA und auch Doppelstrang-DNA nicht zu finden sind. Umgekehrt konnten mit diesen DNA-Strukturen Proteine isoliert werden, die nicht an G4-DNA binden und wiederum andere Proteine waren in allen Proben zu finden. Der G4 Myc22 zeigte ein annähernd identisches Muster von Proteinbanden wie Pu27, lieferte jedoch insgesamt mehr Proteine. Durch PhenDC3 konnten viele der G4-bindenden Proteine verdrängt werden.

Zur Identifikation der isolierten Proteine wurden diese mittels Massenspektrometrie analysiert, durch Vergleich mit einer humanen Datenbank zugeordnet und entsprechend der Anzahl an gefundenen Peptiden sortiert. Um die relevanten Zielproteine herauszufiltern, wurde im ersten Schritt analysiert, welche Proteine eine hohe Affinität zu den G4-Sequenzen haben im Vergleich zu der Kontroll-DNA Linear und im Zellkern vorkommen. Im zweiten Schritt wurden die Proteine, die dort gute Werte erzielten, auf ihre Verdrängbarkeit mit

PhenDC3 untersucht. Als Zielproteine gelten alle Proteine, die zum einen gute Bindungseigenschaften zu den untersuchten G4-Sequenzen besitzen und sich zum anderen gut mit PhenDC3 verdrängen lassen. Auf diese Weise wurden für Pu27 13 Zielproteine gefunden und für Myc22 konnten 25 Proteine ermittelt werden, wobei 10 dieser Zielproteine für beiden G4-Sequenzen identisch sind.

3.4 Untersuchung der Bindung von Zielproteinen an G4-DNA

Zur genaueren Untersuchung der Bindungseigenschaften wurden die zuvor identifizierten Zielproteine innerhalb dieses Kapitels in aufgereinigter Form auf ihre Affinität gegenüber verschiedenen DNA-Strukturen getestet. Dazu wurden neben den bereits für die Isolierung und Identifikation genutzten G4 Pu27 und Myc22 auch die G4-Minisatelliten CEB25-L111 und CEB25-L191 untersucht. Zudem wurden die ss- und ds-DNA Kontrollsequenzen Linear und Linear-ds hinzugezogen. In den Bindungsexperimenten wurde eine jeweils gleichbleibende Menge des zu untersuchenden aufgereinigten Proteins von 5 pmol eingesetzt, womit das Protein im Überschuss gegenüber der DNA auf den Magnetpartikeln vorlag. Alle anderen Bedingungen, wie beispielsweise der Bindungspuffer, wurden analog zu den Pulldown-Experimenten gleich belassen. Die Bindungsexperimente mit gereinigten Proteinen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und Menge an isoliertem Protein durch Messung der Bandenintensität mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

3.4.1 Bindung von Nucleolin an G4 DNA

Das erste Bindungsexperiment wurde mit dem bekannten G4-bindenden Protein Nucleolin durchgeführt, das auch innerhalb der Analysen mit myProMS in hoher Anreicherung sowohl an Pu27 als auch an Myc22 mit einem $\log_2$ -(*fold change*) von mindestens 1 zu finden ist. In der Verdrängung mit PhenDC3 an Pu27 wurde ein $\log_2$ -(*fold change*) Wert von 0,998 erzielt (siehe Tabelle 7), allerdings wurde Nucleolin dennoch in diese Liste von Pu27 mit aufgenommen und hier näher untersucht. Die Ergebnisse der Bindungsexperimente sind in Abbildung 72 dargestellt.

Tabelle 7: $\log_2$ -(*fold change*) Werte für Nucleolin in den verschiedenen Analysen.

Analyse	$\log_2$ -(<i>fold change</i>)
Pu27 / Linear	3,7795638
Pu27 / PhenDC3	0,99778231
Myc22 / Linear	1,60344991
Myc22 / PhenDC3	4,64125237

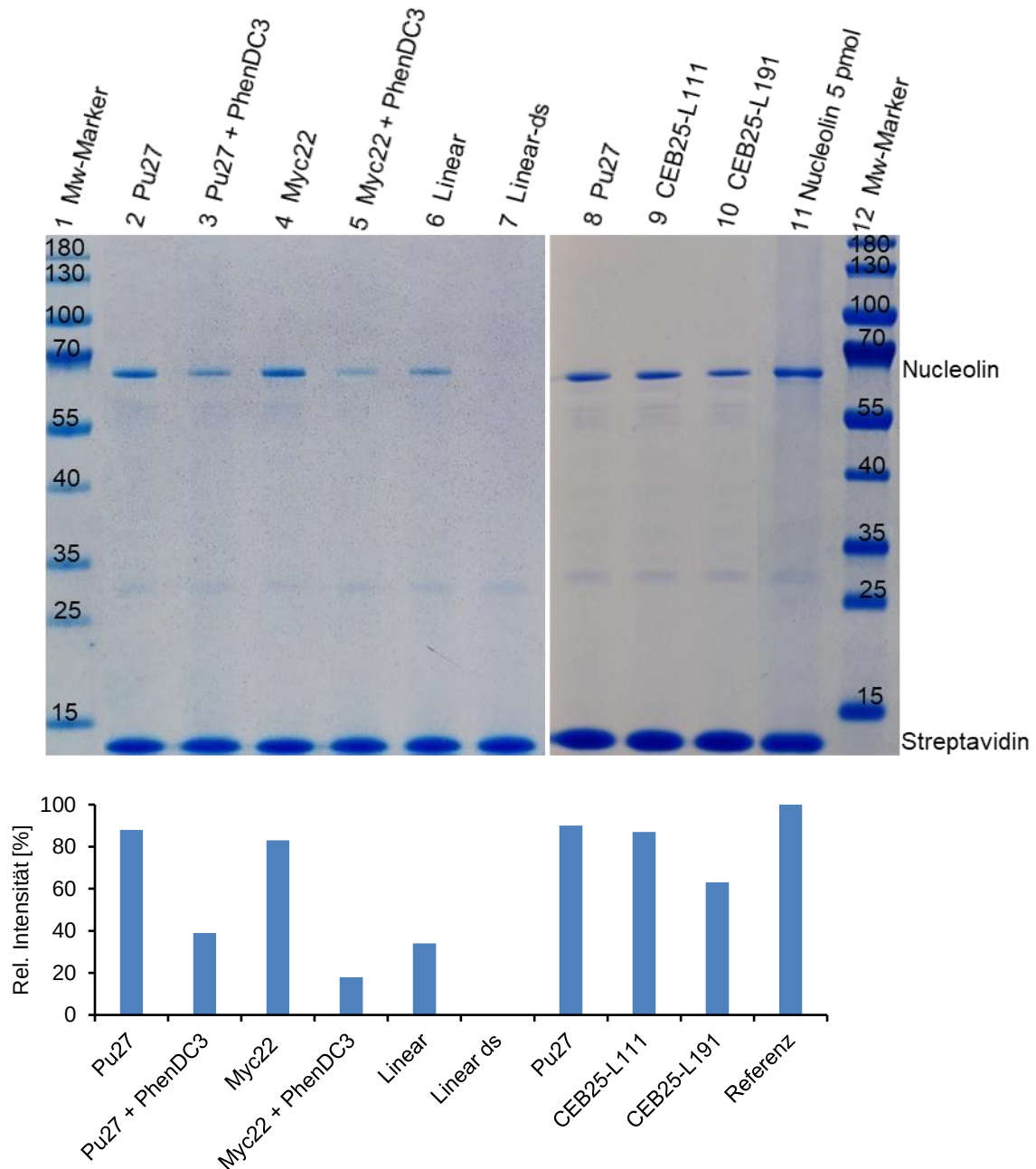


Abbildung 72: SDS-PAGE Analyse der Bindungsexperimente mit Nucleolin und Auftragung der Bandenintensität nach Auswertung mit ImageJ. Die Experimente auf dem linken Teil des Gels wurde im Rahmen eines Forschungspraktikums von Wolfgang Rath durchgeführt.

Anhand der Analyse wird deutlich, dass mit Pu27 mit etwa 90% des zugegebenen Nucleolins isoliert werden können und das Protein somit trotz der vielen Waschschrte annähernd vollständig an dem untersuchten G4 gebunden bleibt (siehe Spur 2). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Proteomanalyse, wo Nucleolin mit 3,78 einen sehr hohen $\log_2$ -(fold change) Wert in den Proben von Pu27 gegenüber dem Kontrollstrang

aufweist (siehe Tabelle 7). Unter Zusatz von PhenDC3 wurde mehr als die Hälfte des Proteins Verdrängt (siehe Spur 3). Wie in Spur 4 und 5 deutlich wird, bindet an Myc22 nur geringfügig weniger Protein als an Pu27, allerdings lässt sich dieses durch den Zusatz von PhenDC3 wesentlich besser verdrängen. Die bessere Verdrängbarkeit spiegelt sich mit einem $\log_2$ -(*fold change*) Wert von 4,64 auch in den Proteomanalysen wieder, allerdings wird anhand der Zahlen deutlich, dass diese nicht rein quantitativ betrachtet werden können. Zudem ist zu beachten, dass es sich bei dem in den Bindungsstudien eingesetzten Nucleolin um rekombinantes Nucleolin handelt, an das zur besseren Aufreinigung ein SUMO-Protein mit N-terminalem His-Tag fusioniert wurde, was möglicherweise die Bindungseigenschaften beeinflusst. Die bessere Verdrängbarkeit des Proteins von Myc22 durch PhenDC3 wird möglicherweise durch eine bessere Bindung des Liganden an Myc22 hervorgerufen, da diese DNA-Sequenz einen im Vergleich zu Pu27 weniger flexibel ist. Mit dem Kontrollstrang Linear konnte in den Bindungsexperimenten etwa 1/3 des eingesetzten Nucleolins isoliert werden, während an der Doppelstrang-DNA keine Bindung festgestellt wurde (siehe Spur 6 und 7). In Spur 9 ist zu erkennen, dass an den Minisatelliten CEB25-L111 mit 87% eine sehr große Menge Nucleolin gebunden wurde und Nucleolin somit auch zu dieser Sequenz eine hohe Affinität besitzt. An CEB25-L191 bindet mit 63% weniger Nucleolin (siehe Spur 10), allerdings wurde für diese Sequenz zuvor eine geringere Beladungsdichte auf den Magnetpartikeln ermittelt. Da das Protein mit einer Stoffmenge von 5 pmol jedoch im Überschuss eingesetzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass Nucleolin besser an den modifizierten CEB25-L111 bindet im Vergleich zu dem nativen CEB25-L191, der eine längere Schleife besitzt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der bekannten Bindung von Nucleolin an G4-DNA (siehe Kapitel 1.4).

Die in diesem Kapitel durchgeführten Bindungsstudien führen zudem zu ähnlichen Ergebnissen wie die zuvor in Kapitel 3.2.2 mit anderen Versuchsbedingungen durchgeführten Experimente. Ein Unterschied besteht allerdings darin, dass in dem in Abbildung 50 gezeigten *Pulldown* Nucleolin stärker an den Kontrollstrang bindet als in der hier gezeigten Bindungsstudie. Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklären. Während für die in Abbildung 50 gezeigten Experimente äquimolare Menge an Protein bezogen auf die Bindungsstellen und der sehr salzarme KPP-Puffer verwendet wurden, kamen in den in diesem Kapitel gezeigten Bindungsstudien sowohl ein signifikanter Überschuss an Protein, als auch der für die Proteomanalysen genutzte PC-Puffer zum Einsatz, der unter anderem zusätzlich 250 mM NaCl enthält und somit eine höhere Ionenstärke aufweist. Die geringere Proteinkonzentration und die höhere

Ionenstärke in den in Abbildung 72 aufgeführten Experimenten können dazu führen, dass die Proteinbindung spezifischer wird und die hier gezeigten Ergebnisse erklären.

3.4.2 Bindung von PARP1 an G4 DNA

Die Poly-(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1) ist ein intrazellulärer Sensor für DNA-Strangbrüche und besitzt zwei DNA-bindende Zinkfinger-Domänen.^[71] Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass PARP1 *in vitro* an eine G4-Sequenz aus dem c-kit Promotor bindet und durch diese Bindung an den G4 die katalytische Aktivität von PARP1 induziert wird.^[72] In den hier durchgeführten Proteomanalysen wurde PARP1 in den Proben von Pu27 log2-(*fold change*) Wert von 0,996 gegenüber dem Kontrollstrang nachgewiesen (siehe Tabelle 8) und daher im Folgenden näher untersucht.

Tabelle 8: Log2-(*fold change*) Werte für PARP1 in den verschiedenen Analysen.

Analyse	log2-(<i>fold change</i>)
Pu27 / Linear	0,99618109
Pu27 / PhenDC3	1,34470166
Myc22 / Linear	-1,45903458
Myc22 / PhenDC3	-0,53692692

In den Proben von Pu27 und Myc22 konnte mit 25 bzw. 20% nur ein mäßiger Anteil des eingesetzten Proteins isoliert werden (siehe Abbildung 73, Spur 3 und 5). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass PARP1 eine geringere Bindungsaffinität besitzt oder während der Waschstritte zu einem großen Teil von der DNA entfernt wird. Nach Zugabe von PhenDC3 wird sowohl mit Pu27 als auch mit Myc22 signifikant weniger Protein isoliert (siehe Spur 4 und 6). Dies zeigt, dass sich PARP1 von beiden G4 durch Zugabe von PhenDC3 leicht verdrängen lässt. Im Experiment mit dem Kontrollstrang Linear ist annähernd kein Protein nachweisbar, während mit Doppelstrang-DNA 19% der eingesetzten Menge an PARP1 isoliert wurden (siehe Spur 7 und 8), was im Fall der verwendeten Sequenzen für eine stärkere Bindung an Doppelstrang- gegenüber Einzelstrang-DNA spricht. Mithilfe der Sequenz CEB25-L111 wurden 52% des eingesetzten Proteins isoliert, während mit dem nativen CEB25-L191 29% erhalten werden (siehe Spur 9 und 10). Damit bindet PARP1 nicht nur stärker an die modifizierte CEB25-L111 Sequenz mit kürzerem *loop* als an den nativen G4 CEB25-L191, sondern zeigt auch eine stärkere Bindung verglichen mit den G4 Pu27 und Myc22.

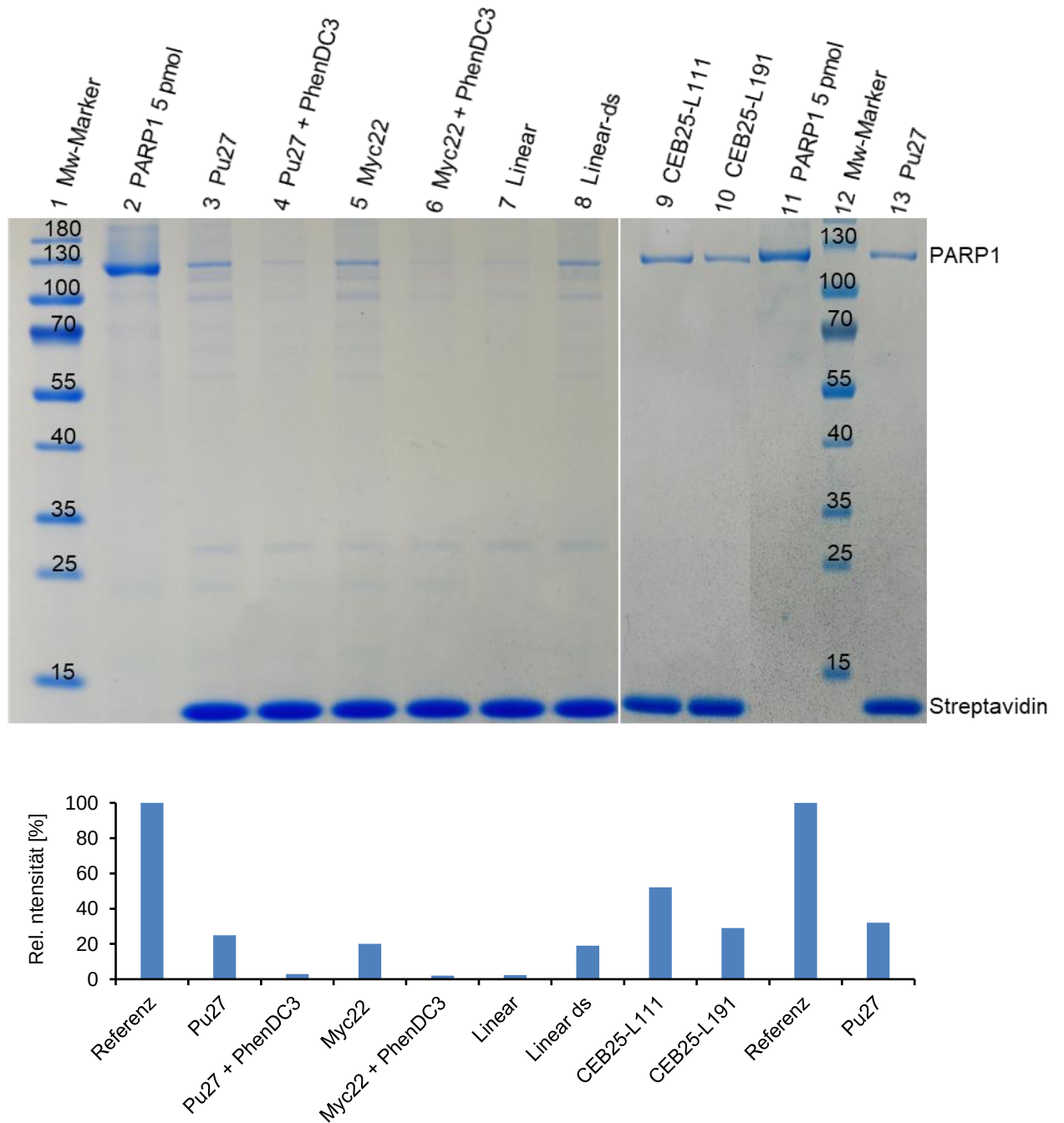


Abbildung 73: SDS-PAGE Analyse der Bindungsexperimente mit PARP1 und Auftragung der Bandenintensität nach Auswertung mit ImageJ.

3.4.3 Bindung von YBX1 an G4-DNA

Das Nuclease-sensitive Element-bindende Protein 1 (YBX1) gehört zu den Y-Box Proteinen. Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die DNA und RNA binden können.^[73] Eine primäre Funktion ist die Regulation von Genen, die mit Zellwachstum in Verbindung gebracht werden.^[74] Es konnte nachgewiesen werden, dass das Protein YBX1 an den Tumorrepressor p53 bindet und somit von Interesse für die Krebsforschung ist.^[75] Zudem sind G4-DNA- und G4-RNA-bindende Eigenschaften bekannt und auch eine Bindung an den c-myc-Promotor konnte demonstriert werden.^[70, 76] In den hier durchgeführten Proteomanalysen wurde YBX1 als Zielprotein für Pu27 mit einem $\log_2$ -(*fold change*) Wert gegenüber dem Kontrollstrang von 5,11 nachgewiesen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: $\log_2$ -(*fold change*) Werte für YBX1 in den verschiedenen Analysen.

Analyse	$\log_2$ -(<i>fold change</i>)
Pu27 / Linear	5,10730126
Pu27 / PhenDC3	2,66460993
Myc22 / Linear	6,01425339
Myc22 / PhenDC3	0,16695568

In den Bindungsexperimenten zur näheren Untersuchung der Bindungsaffinität von YBX1 ist zu erkennen, dass das Protein mit den G4-Strukturen Pu27 und Myc22 mit einer Ausbeute von 96 bzw. 93% annähernd vollständig aus den *Pulldown*-Ansätzen isoliert wurde (siehe Abbildung 74, Spur 3 und 5). Daraus lässt sich schließen, dass YBX1 sehr gut an diese G4 bindet und auch durch die zahlreichen Waschschrte nicht entfernt wird. Interessanterweise lässt es sich von beiden G4 durch Zugabe von PhenDC3 nur in geringem Maße verdrängen (siehe Spur 4 und 6). Dies spricht ebenfalls für eine sehr hohe Bindungsaffinität des Proteins zu den beiden G4, da die Bindung des Proteins in diesem Fall stärker zu sein scheint als die des Liganden. In den zuvor durchgeführten Proteomanalysen wurde für die Verdrängung von Pu27 ein $\log_2$ -(*fold change*) Wert von 2,66 und für Myc22 ein Wert von 0,17 ermittelt. In den Bindungsstudien mit aufgereinigtem, konzentriertem Protein konnte eine Verdrängung in diesem Maße nicht bestätigt werden. Möglicherweise kommt YBX1 in den untersuchten Zellen jedoch in einer anderen Konzentration vor, was die Verdrängbarkeit ebenfalls beeinflussen kann. Die geringe Verdrängbarkeit in der graphischen Auswertung steht für Myc22 in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Proteomanalyse. Mithilfe der ss-DNA wurde die Hälfte des zugegebenen YBX1 isoliert, während mit der ds-DNA kaum Protein detektiert wurde (siehe Spur 7 und 8). In der Literatur wird YBX1 als Protein

beschrieben, das CT-reiche ds-DNA in Promotorsequenzen binden kann.^[77] Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde ein CA-reicher Doppelstrang verwendet und möglicherweise kann der Unterschied in der Sequenz der Grund sein, warum hier kaum Bindung an die ds-DNA beobachtet wird. Mit den G4-Minisatelliten CEB25-L111 und CEB25-L191 wurden 80 bzw 81% des Proteins erhalten (siehe Spur 9 und 10). Dieses Ergebnis spricht für eine sehr gute Bindung von YBX1 auch an diese beiden G4, wobei es bei diesen Sequenzen offenbar für die Bindung keinen Unterschied macht, ob die native CEB25-L191-Sequenz oder eine mit verkürzter Schleife genutzt wird.

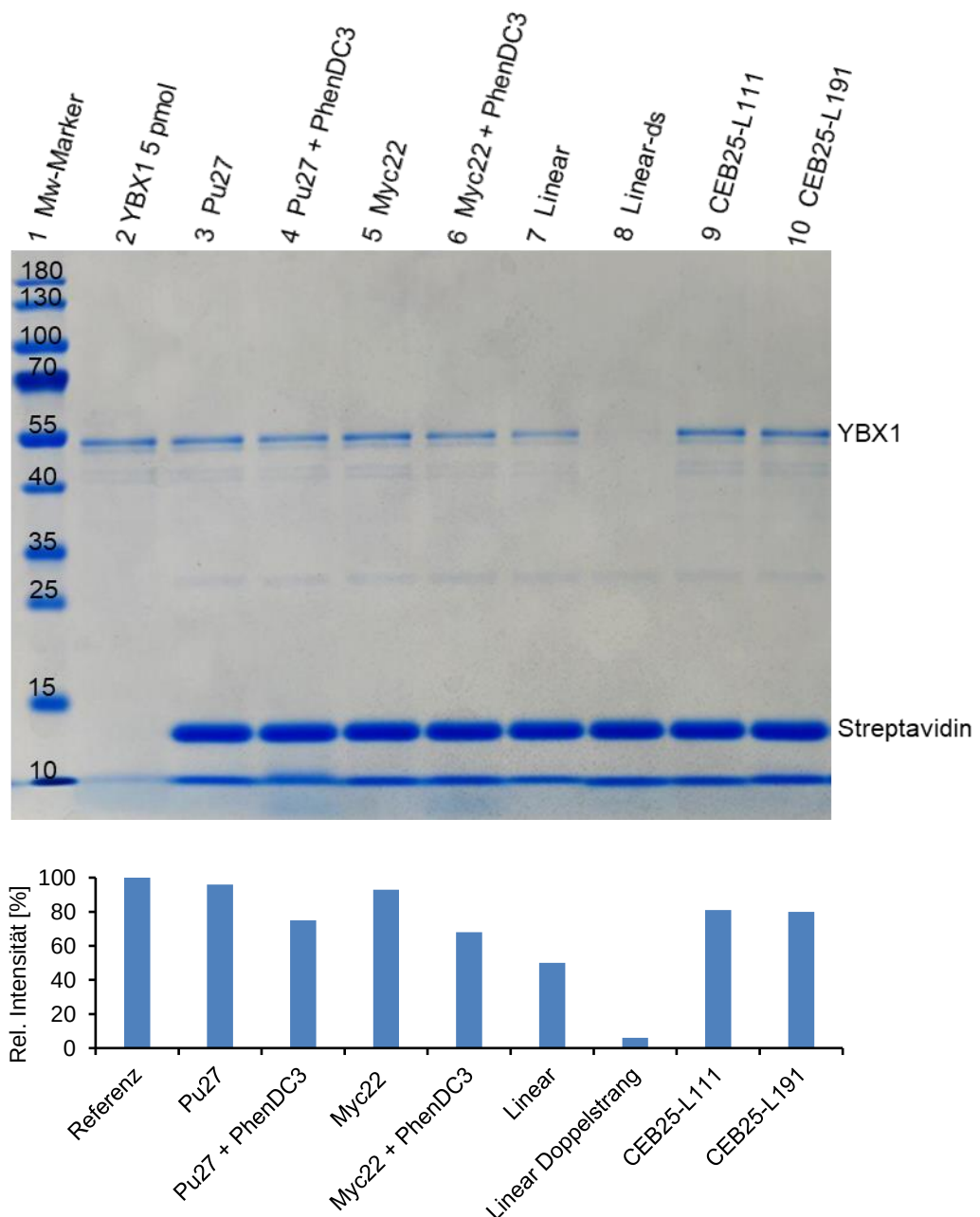


Abbildung 74: SDS-PAGE Analyse der Bindungsexperimente mit YBX1 und Auftragung der Bandenintensität nach Auswertung mit ImageJ.

3.4.4 Bindung von hnRNP U an G4-DNA

Das heterogene nucleare Ribonucleoprotein U (hnRNP U) gehört zur Familie der hnRNP-Proteine. Diese sind definiert als Proteine, die Komplexe mit heterogener nuclearer RNA (hnRNA) bilden.^[78] HnRNP U besitzt neben der Fähigkeit zur RNA-Bindung auch DNA-bindende Eigenschaften.^[79] Zudem ist bekannt, dass es an Poly(G)-ODN binden kann.^[80] HnRNP U kann zudem in *E. coli* BL21 DE3 Zellen exprimiert werden.^[81] In den durchgeführten Proteomanalysen wurde es innerhalb dieser Arbeit sowohl als Zielprotein für Pu27 als auch für Myc22 identifiziert und in Bindungsexperimenten untersucht (siehe Abbildung 75).

Tabelle 10: Log2-(fold change) Werte für hnRNP U in den verschiedenen Analysen.

Vergleich	log2-(fold change)
Pu27 / Linear	3,75117915
Pu27 / PhenDC3	2,70443455
Myc22 / Linear	4,22987617
Myc22 / PhenDC3	3,9888054

Anhand der Intensitätsauswertung der Banden auf dem SDS-PAGE Gel mittels ImageJ wird deutlich, dass mit c-myc-basierten G4-Sequenzen Pu27 und Myc22 eine große Menge des Proteins isoliert wird, während mit dem Kontrollstrang Linear nur Spuren von hnRNP U detektiert werden (siehe Abbildung 75, Spur 3, 5 und 7). Diese Resultate korrelieren mit den Ergebnissen der Proteomanalysen, wo für Myc22 ein log2-(fold change) Wert von 4,23 und für Pu27 ein Wert von 3,75 ermittelt wurde (siehe Tabelle 10). Analog zu diesen Werten wurde in der Bindungsstudie eine minimal stärkere Bindung an den weniger flexiblen Myc22 festgestellt. Von beiden G4 kann hnRNP U durch die Zugabe von PhenDC3 leicht verdrängt werden (siehe Spur 4 und 6). Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten der berechneten log2-(fold change) Werte, da hier für die Verdrängung ebenfalls sehr hohe Werte erzielt wurden. An der untersuchten ds-DNA konnte nur eine sehr geringe Bindung des Proteins festgestellt werden (Spur 8). An die G4-Sequenzen CEB25-L111 und CEB25-L191 erfolgte eine mäßige bis schwache Bindung, wobei die Bindung an den modifizierten G4 stärker ausfiel als an den nativen CEB25-L191. Dieses Ergebnis zeigt, dass hnRNP U eine hohe Spezifität für Pu27 und Myc22 aufweist, während sowohl die Bindung an ss- und ds-DNA, als auch an die anderen untersuchten G4 gering ausfällt. Zudem scheint dieses Protein an die gleiche räumliche Position zu binden wie PhenDC3, da es sich durch die Zugabe des Liganden einfach verdrängen lässt. Somit konnte die in den Proteomanalysen

festgestellte hohe Spezifität des Proteins an die beiden c-myc-basierten G4 durch diese Bindungsstudie bestätigt werden.

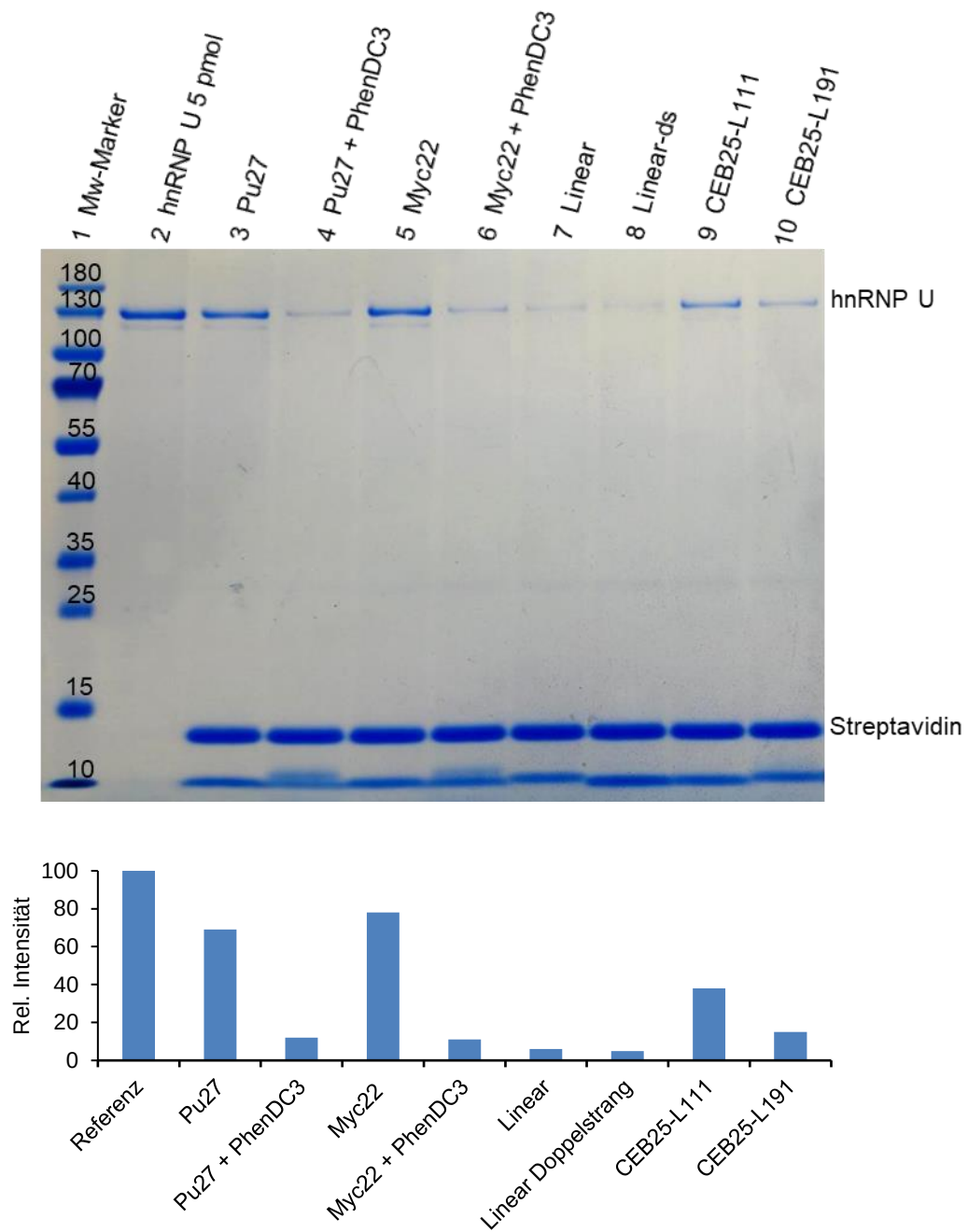
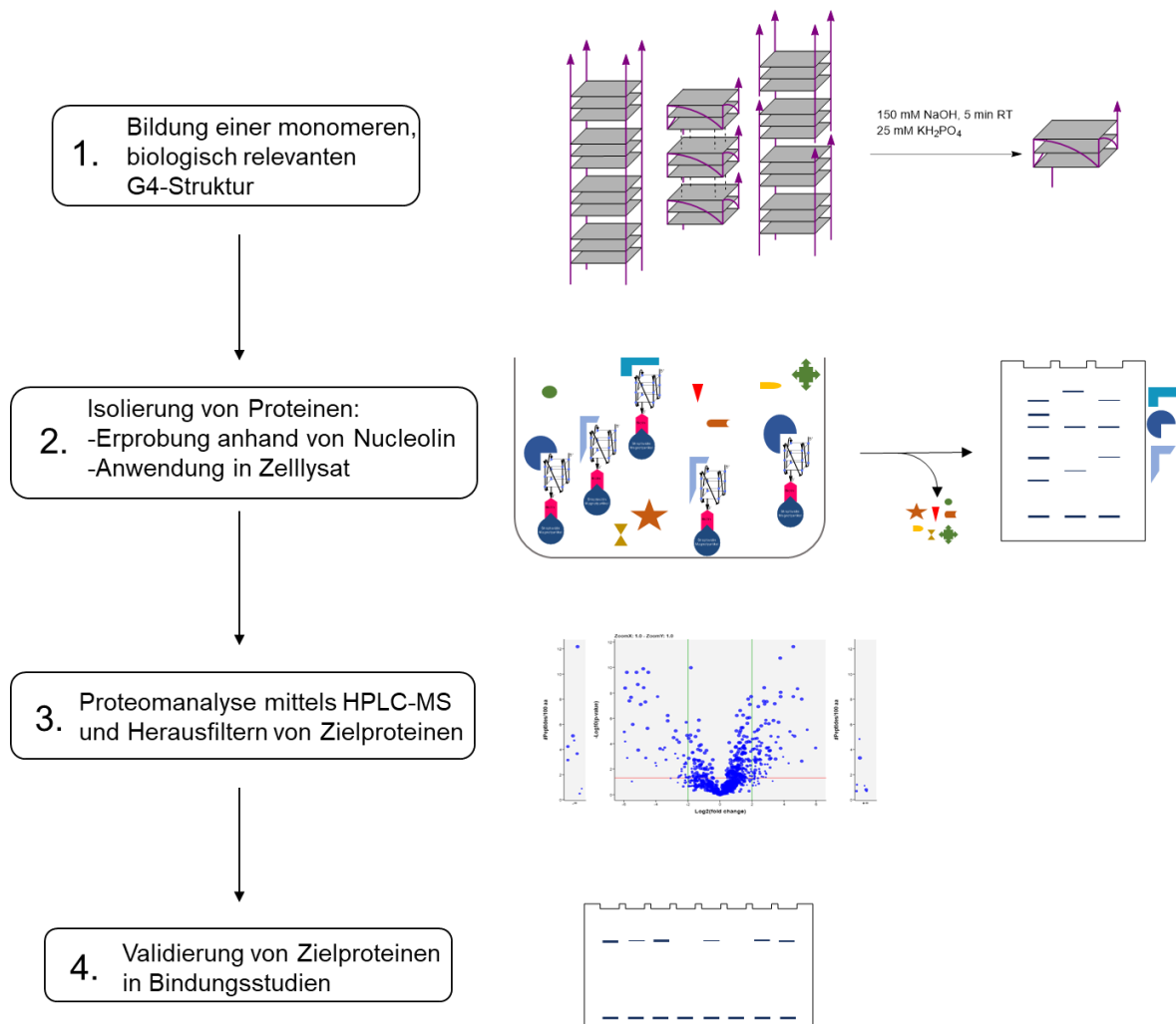


Abbildung 75: SDS-PAGE Analyse der Bindungsexperimente mit hnRNP U und Auftragung der Bandenintensität nach Auswertung mit ImageJ.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit wurde im ersten Schritt eine Methode entwickelt, um aus der polymorphen, Guanin-reichen Sequenz Pu27 aus dem Promotor des c-myc Onkogens eine definierte, monomere G4-Struktur zu bilden. Diese wurde anschließend auf Magnetpartikeln immobilisiert und zur Isolierung von Proteinen aus Krebszellen genutzt. Die G4-DNA-bindenden Proteine wurden anschließend mittels HPLC-MS identifiziert und die identifizierte Zielproteine in Bindungsstudien untersucht (Schema 2).



Schema 2: Isolierung, Identifikation und Validierung von G4-DNA-bindenden Proteinen.

Zunächst wurden neben Pu27 verwandte G4-bildende DNA-Sequenzen untersucht und dabei festgestellt, dass die meisten Sequenzen eine Vielzahl von verschiedenen, multimeren Strukturen bilden können. Anhand von SEC-Analysen wurde deutlich, dass unter Verwendung einer thermischen Behandlungsmethode, die häufig zur Faltung von G4-DNA genutzt wird, nur ein Teil der Multimere in Monomere überführt werden kann. Je stärker die

Sequenz des nativen Pu27 verändert wurde, desto geringer fiel der Anteil an multimeren Strukturen aus. Zur vollständigen Umwandlung der Multimere wurde eine Methode entwickelt und optimiert, die mit 150 mM NaOH bei RT alle Multimere zuverlässig denaturiert und bei Renaturierung mit einem Überschuss von K⁺-haltigem Puffer ausschließlich das gewünschte G4-Monomer mit paralleler Orientierung liefert. Der Erfolg dieser Methode konnte anhand von SEC-Analysen, Gelelektrophorese, CD-Spektroskopie und UV-Schmelzkurven nicht nur für Pu27, sondern auch für verwandte DNA-Sequenzen bestätigt werden.

Für die Isolierung von G4-DNA-bindenden Proteinen wurde die zuvor geformte, biotinylierte G4-DNA auf Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln immobilisiert und das System anhand des bekannten G4-bindenden Proteins Nucleolin untersucht. Dazu wurde im ersten Schritt das Protein Nucleolin in *E. coli* Zellen exprimiert und anschließend durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. In den Experimenten zur Isolierung von aufgereinigtem Nucleolin mit Magnetpartikeln wurde deutlich, dass das Protein stark an die untersuchten G4-Sequenzen bindet und trotz der vielen Waschschrte an der DNA verbleibt. In Verdrängungsexperimenten war erkennbar, dass signifikant weniger Nucleolin an die G4-DNA bindet, wenn der G4-bindende Ligand PhenDC3 hinzugegeben wird und der Ligand und Nucleolin somit um die gleiche Bindungsstelle am G4 konkurrieren. Anschließend wurden die mit DNA beladenen Magnetpartikel genutzt, um Proteine aus Zelllysatz zu isolieren. Neben der G4-Sequenz Pu27 und deren Derivat Myc22 wurden als Kontrolle Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA genutzt und die Verdrängbarkeit mit PhenDC3 untersucht. Dabei wurde in der Analyse mittels SDS-PAGE deutlich, dass an Pu27 und Myc22 sehr viele Proteine binden, die in den Kontrollen mit Einzelstrang- und Doppelstrang DNA nicht zu finden sind. Umgekehrt konnten mit diesen DNA-Strukturen wiederum Proteine isoliert werden, die nicht an G4-DNA binden und wiederum andere Proteine waren in allen Proben zu finden. Durch PhenDC3 konnten viele der G4-bindenden Proteine verdrängt werden. Zur Identifikation der isolierten Proteine wurden die Proben mittels Massenspektrometrie in Zusammenarbeit mit dem Institut Curie in Paris, Frankreich, analysiert und anhand einer humanen Datenbank zugeordnet. Zum Herausfiltern der relevanten Zielproteine wurde zuerst analysiert, welche Proteine eine hohe Affinität zu den G4-Sequenzen haben im Vergleich zu der Kontroll-DNA. Im zweiten Schritt wurden die Proteine, die dort gute Werte erzielten, auf ihre Verdrängbarkeit mit PhenDC3 untersucht. Als Zielproteine gelten alle Proteine, die zum einen gute Bindungseigenschaften zu den

untersuchten G4-Sequenzen besitzen und sich zum anderen gut mit PhenDC3 verdrängen lassen. Auf diese Weise konnten insgesamt 28 Zielproteine ermittelt werden.

Anschließend wurde eine Methode entwickelt, mit der die Affinität von aufgereinigten Proteinen an verschiedene DNA-Strukturen auch in geringen Konzentrationen untersucht werden kann. Dabei gelang es, die Bindung von ersten Kandidatenproteinen an die G4-DNA zu verifizieren und YBX1 und hnRNP U wurden als besonders vielversprechende Zielproteine identifiziert. Beide zeigen eine sehr starke Bindung an die untersuchte Promotorsequenz, wobei sich hnRNP U durch den Liganden PhenDC3 besser von der G4-DNA verdrängen lässt.

In zukünftigen Experimenten sollten weitere der identifizierten Kandidatenproteine aus den proteomischen Analysen exprimiert und mit dem hier entwickelten Bindungsassay hinsichtlich ihrer Affinität zu verschiedenen DNA-Strukturen untersucht werden, wobei zusätzlich auch die Bindung der Proteine an G4-RNA untersucht werden könnte.

Zudem könnten mit dem hier vorgestellten G4 aus dem c-myc Promotor auch aus Lysaten von anderen Zelllinien G4-bindende Proteine isoliert werden. Darüber hinaus ist das im Zuge dieser Arbeit entwickelte System zur Isolierung G4-bindender Proteine aus Zelllysaten auch auf andere G4-Sequenzen mit biologischer Relevanz anwendbar.

Die hier für Pu27 verifizierten Zielproteine können in weiteren Experimenten bezüglich ihrer Bindungskonstanten untersucht und die G4-bindende Domäne bestimmt werden. Außerdem sind weitere molekularbiologische Untersuchungen denkbar, in denen eines dieser Proteine in einer Zelllinie überexprimiert wird, um die Auswirkungen auf die Aktivität des c-myc Promotors zu beurteilen. Dies könnte das Verständnis über die biologische Funktion von Nukleinsäure-bindenden Proteinen erweitern und helfen, die Rolle von G4-bildenden Sequenzen im menschlichen Genom aufzuklären.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Die hier aufgelisteten Chemikalien werden, sofern nicht anders angegeben, wie vom Hersteller bezogen ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Gerbu
Acetonitril (HPLC-Grade)	Thermo Fisher
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) 30% (w/v)	Merck
Agar	Applichem
Aluminiumsulfat-(14-18)-hydrat	Fluka
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Gerbu
Bis-(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris)	Gerbu
Bradford Reagenz	Thermo Fisher
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Fluka
Chloramphenicol	Gerbu
Coomassie G 250	Gerbu
Coomassie Brilliant Blau R 250	Serva
Dimethylsulfoxid p.a.	Acros
Dinatriummethylenediamintetraessigsäure (EDTA)	Gerbu
Dynabeads MyOne Straptavidin C1	Thermo Fisher
Essigsäure p.a.	Merck
Ethanol p.a.	Merck
Glycerin	Gerbu

Hefeextrakt	BD Biosciences
Imidazol	Gerbu
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu
Kaliumdihydrogenphosphat	J. T. Baker
Kanamycinsulfat	Gerbu
β -Mercaptoethanol	Thermo Fisher
Natriumchlorid	Acros
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen
Octyl- β -D-glucopyranosid	Fluka
PhenDC3	*Kooperationspartner
Phosphorsäure	Fluka
RIPA-Standardpuffer	NEB
Salzsäure (37%)	Grüssing
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Triethylammoniumacetat-Lösung 1 M (TEAAc)	Fluka
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Gerbu
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base)	Gerbu
Trypton	BD Biosciences
Tween-20	Gerbu

* Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Marie-Paule Teulade-Fichou, Institut Curie, Orsay, Frankreich

5.1.2 Puffer und Medien

Alle hier aufgeführten Puffer und Medien werden aus Reinstwasser hergestellt, das zuvor durch eine Milli-Q-Academic Anlage mit vorgeschalteter Elix 3 Anlage der Firma Millipore aufgearbeitet wird.

Basicwash-Puffer	50 mM NH_4OAc , 0,05% (w/v) Octyl- β -D-glucopyranosid, pH = 9,0 Filtriert über 0,22 μm Filter
Ethanolwaschlösung	70% H_2O , 30% (v/v) Ethanol p.a.
hnRNP U-Lagerpuffer	25 mM Tris-HCl, 100 mM Glycin, 10% Glycerin (v/v), pH = 7,3
Fixierlösung	50% H_2O , 40% Ethanol p.a., 10% Essigsäure p.a. (v/v/v)
1 x KPP-Puffer	25 mM KH_2PO_4 , pH = 7,0 Filtriert über 0,22 μm Filter
5 x KPP-Puffer	125 mM KH_2PO_4 , pH = 7,0 Filtriert über 0,22 μm Filter
10 x KPP-Puffer	250 mM KH_2PO_4 , pH = 7,0 Filtriert über 0,22 μm Filter
Laufpuffer SDS-PAGE	50 mM MOPS, 50 mM Tris-Base, 5 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS, keine pH-Einstellung
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl
LB-Medium für Platten	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar

Nucleolin Puffer 1	20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoethanol, 10% Glycerin (v/v), pH = 8,0, Protease Inhibitor Cocktail (Roche) 1 Tab/50 mL
Nucleolin Lagerpuffer	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin, pH = 8,0.
3,5 x NuPAGE Gel Puffer	1250 mM Bis-Tris, pH 6,5-6,8
5 x PC-Puffer	125 mM KH_2PO_4 , 50 mM Tris-HCl, 1,25 M NaCl, 0,5% (v/v) Tween-20, pH = 7,5 Filtriert über 0,22 μm Filter
<i>Pulldown</i> -Waschpuffer low salt	250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,05% (w/v) Octyl- β -D-glucopyranosid, pH = 7,0 Filtriert über 0,22 μm Filter
RIPA-Auflösungspuffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% Natriumdesoxycholat, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 20% Glycerin, pH = 7,5, Protease Inhibitor Cocktail (Roche) 1 Tab/10 mL
RIPA-Standardpuffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% Natriumdesoxycholat, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, pH = 7,5
1,25 x SDS-Probenpuffer	62,5 mM Tris-HCl, 3,1% (w/v) SDS, 12,5% (v/v) Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 400 mM β -Mercaptoethanol, pH = 6,8

5 x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris-HCl, 12,5% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0,013% (w/v) Bromphenolblau, 1,6 M β -Mercaptoethanol, pH = 6,8
SEC-A	H ₂ O, 5 mM NaN ₃ Filtriert über 0,22 μ m Filter
SEC-B	25 mM KH ₂ PO ₄ , 1 mM NaN ₃ , pH = 7,0 Filtriert über 0,22 μ m Filter
TB-Medium	12 g/L Trypton, 24 g Hefeextrakt, 0,4% Glycerin, 13 mM KH ₂ PO ₄ , 66 mM K ₂ HPO ₄
YBX1-Lagerpuffer	15 mM KH ₂ PO ₄ , 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH = 7,4

5.1.3 Proteine

6His SUMO Nucleolin (284 – 709)	Exprimiert von dem Plasmid pET28 6His SUMO Nucleolin
His-PARP1 aus baculo/SF9	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bernhard Lüscher, Uniklinik RWTH Aachen
HNRNPU	Origene
XBX1	Prospec Bio

5.1.4 DNA und Plasmide

Die verwendete DNA wird vom Hersteller Integrated DNA Technologies nach HPLC-Aufreinigung bezogen. Zur Verwendung wird eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mM hergestellt und bei -20°C gelagert.

Pu27 nativ	5' - TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG - 3'
------------	---------------------------------------

Pu27-Biotin	5' - TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG Biotin-TEG - 3'
Myc22	5' - TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTGTGAGTG - 3'
Myc22-Biotin	5' - TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTGTGAGTG Biotin- TEG - 3'
Pu22 G4	5' - TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA - 3'
Pu22-Kontrolle	5' - GTGAGGGGGGAGAGTGTGAGGG - 3'
Pu27 6G/T linear-Biotin	5' - TGTGTAGTGTGTGGAGTGTGTGGAAGG Biotin- TEG - 3'
Pu27 6G/T linear Komplementärstrang	5' - CCTTCCACACACTCCACACACTACACA - 3'
CEB25-L191-Biotin	5' - AAGGGTGGGTGTAAGTGTGGGTGGGTGTGAG TGTG Biotin-TEG - 3'
CEB25-L111-Biotin	5' - AAGGGTGGGTGGGTGGGTGTGAGTGTG Biotin- TEG - 3'
pET28 6His SUMO Nucleolin	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Patricia Duchambon, Institut Curie, Orsay, Frankreich

5.1.5 Marker

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
FastRuler™ Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific
FastRuler™ Middle Range DNA Ladder	Thermo Scientific

5.1.6 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra-4, 10K	Th. Geyer
Labortücher, fusselfrei	Kimberley-Clark
Kryoröhrchen	Nalgene
Mikroreaktionsgefäße Standard	Eppendorf
Mikroreaktionsgefäße Protein LoBind	Eppendorf
Petrischalen	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	Gilson

Whatman Membranfilter

Schleicher & Schuell

Whatman Puradisc FP 30 Spritzenfilter, 0.2 µm

GE Healthcare

5.1.7 Geräte

Cary 3E UV/Vis-Spektrometer

Varian

Dampfsterilisator Varioklav

H+P Labortechnik

Gelelektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3 Cell

Bio-Rad

GFL-3031 Schüttler

GFL

Heizblock HBT 130

HCL

Heraeus B6 Function Line

Kendro Laborator Products

HPLC-System Breeze

Waters

Inkubator Function line

Heraeus

Innova 4330 Schüttler

New Brunswick Scientific

pH-Meter 766 Calimatic mit IJ44C-pH-Elektrode

Knick

Pipetten Pipetman

Gilson

Spectropolarimeter J-710

JASCO

Ultraschalldesintegrator Sonifier II W-250

Branson

Vortexmischer Vortex-Genie 2

Scientific Industries

Zentrifuge (<2mL) Centrifuge 5415D

Eppendorf

Zentrifuge (>2mL) Avanti J-20 Zentrifuge

Beckman Coulter

5.2 Methoden

5.2.1 Faltung G-Quadruplex Strukturen

5.2.1.1 Faltung von monomerer G4-DNA nach NaOH-Methode

Zu einer wässrigen Lösung des ODN (5 nmol, 5 μ L) wird NaOH-Lösung (15 μ L, 200 mM) hinzugefügt, sodass eine Endkonzentration von 150 mM NaOH entsteht. Die Lösung wird bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wird 1 x KPP-Puffer (980 μ L) hinzugefügt um einen neutralen pH-Wert zu erreichen. CD-Messungen wenige Minuten danach zeigen die erfolgreiche Bildung der G4 -Struktur.

5.2.1.2 Faltung von G4-DNA nach Temperatur-Methode

Eine Lösung aus ODN in 1 x KPP-Puffer (5 nmol, 1000 μ L) wird in einem Eppendorf-Gefäß in einen Heizblock gestellt und für 10 min auf eine Temperatur von 95°C erhitzt. Anschließend wird das Eppendorf-Gefäß aus dem Heizblock entfernt und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

5.2.1.3 Bildung von Doppelhelix-DNA

Eine Lösung aus biotinyliertem ODN Pu27 6G/T linear Biotin (1,0 nmol, 200 μ L, 5 μ M, 1,0 μ g) und einem Überschuss aus unbiotinyliertem Komplementärstrang (1,2 nmol, 6 μ M, 1,2 μ g) in 1 x KPP-Puffer wird für 3 min auf 95°C im Heizblock erhitzt. Anschließend wird das Eppendorf-Gefäß aus dem Heizblock entfernt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

5.2.2 CD-Spektren

CD-Experimente werden bei 20°C an einem Spectropolarimeter durchgeführt. Dieses verfügt über einen Peltier Temperaturregler (JASCO PTC-348WI) und wird durch einen Computer gesteuert. Es werden rechteckige Quarzglasküvetten mit einer Dicke von 1 cm und einem Volumen von 1 mL verwendet. Die Messungen werden von 220 bis 500 nm mit einer Sensitivität von 100 mdeg aufgezeichnet. Der Abstand zwischen zwei Messpunkten beträgt 1 nm und die Messgeschwindigkeit 200 nm/min. Bei einer Bandweite von 1 nm werden je 4 Messungen für jede Probe durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Das

vorbehandelte ODN wird in einer Konzentration von 5 μM in KPP-Puffer gemessen und anschließend die Werte der Messung von reinem Puffer subtrahiert.

5.2.3 Schmelzkurven von G4-DNA

Zur Untersuchung des Schmelzverhaltens von DNA wird die Änderung des Absorptionsverhaltens bei einer bestimmten Wellenlänge in Abhängigkeit der Temperatur mit einem UV/Vis-Spektrometer unter Verwendung des Programms *Thermal* bestimmt. Zur Aufnahme von DNA-Schmelzkurven wird eine ODN-Lösung (500 μL , 2,5 nmol, 5 μM) in KPP-Puffer eingesetzt und in verschließbaren Quarzglasküvetten der Firma Hellma mit einer Dicke von 1 cm und einem Volumen von 1 mL gemessen. Die Messung der Schmelzkurven von G4-DNA erfolgt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 295 \text{ nm}$ in einem Temperaturbereich von 30 - 95°C. Vor dem Start wird zunächst die Absorption von reinem Puffer gemessen und auf null gesetzt. Das Datenintervall beträgt 0,1°C bei einer Heizrate von 0,3°C/min. Nach der Messung wird über jeweils 10 Punkte der Mittelwert gebildet, um das Rauschen der Messung zu minimieren und aus diesen Werten die Ableitungen ermittelt. Als Schmelztemperatur wird der niedrigste Punkt der Ableitungen angegeben.

5.2.4 UV/Vis-Spektroskopie

UV-Spektren von Pu27 und dG werden mit einem UV/Vis-Spektrometer unter Verwendung des Programms *Scan* aufgenommen. Dazu werden Quarzglasküvetten des Herstellers Hellma mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 1 mL eingesetzt und die Spektren bei 25°C von 200-350 nm mit einem Datenintervall von 1 nm gemessen. Zu Beginn der Messung wird die Basislinie von purem KPP-Puffer oder NaOH-Lösung aufgezeichnet. Anschließend werden dG (50 nmol, 100 μM Endkonzentration) und Pu27 (2,5 nmol, 5 μM Endkonzentration) in 1 x KPP-Puffer (500 μL) oder NaOH (150 mM, 500 μL) gelöst und das UV-Spektrum gemessen, wobei die zuvor gemessene Basislinie automatisch abgezogen wird.

UV/Vis Messungen bei einer festgelegten Wellenlänge werden bei 25°C mit dem Programm *Advanced Reads* durchgeführt, indem zuerst die Absorption des Puffers auf null gesetzt wird. Anschließend erfolgt eine dreifache Messung der Absorption der in Puffer gelösten Probe und der Mittelwert aus diesen Messungen wird für die Berechnung der Konzentration der Probe nach Lambert-Beer genutzt.

5.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgt nach der Bradford-Methode^[82] mit dem Coomassie Plus Bradford Assay Kit der Firma Thermo Scientific. Dazu wird Bradford-Lösung (900 μL) in vier Polystyrol-Einwegküvetten (Brand) vorgelegt und verdünnte Proteinlösung (100 μL) in die drei zu messenden Proben und H_2O (100 μL) in die Referenzprobe hinzugefügt. Nach dem Vermischen wird für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ gemessen, wobei die Referenzprobe als Nullwert genutzt wird. Aus dem Mittelwert der drei Proben wird mithilfe einer mit BSA erstellten Kalibriergeraden die Konzentration der Proteine bestimmt.

5.2.6 HPLC

Zur Analyse wird das HPLC-System Breeze der Firma Waters verwendet, das aus dem binären Pumpensystem Waters 1525 und einem Waters 248 Dual λ Absorbance Detector besteht. Die Detektion erfolgt mit einem UV/Vis-Detektor bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 260 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 295 \text{ nm}$. Die Steuerung erfolgt durch die Software Empower des Herstellers.

Die Proben werden vor der Analyse in einem Puffer vorgelöst, der den Startbedingungen der verwendeten Methode entspricht. Die Bedingungen der Größenausschluss-Chromatographie (SEC, Methode 1) sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: HPLC- Bedingungen für SEC, Methode 1. $\lambda_1 = 260 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 295 \text{ nm}$, Fluss = 1,0 mL/min. Säule: Phenomenex Yarra SEC-2000, 3 μm (300 x 7,8 mm).

t [min]	SEC-A [%]	SEC-B [%]
0	0	100
22	0	100

5.2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

5.2.7.1 Denaturierende Gelelektrophorese

Die Analyse und Auftrennung von Proteinen und auch von G4-DNA-Strukturen erfolgt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter Verwendung von NuPage-Gelen (Invitrogen). Diese bestehen aus einem weitporigen Sammelgel mit 5% Acrylamid und einem engporigen Trenngel mit 12 bzw. 15% Acrylamid. Im ersten Schritt der Herstellung wird das Trenngel (5 mL) zwischen zwei Glasplatten gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation (ca. 15 min) wird das Isopropanol mit einem Papiertuch entfernt. Über das Trenngel wird das Sammelgel (1,5 mL) gegossen und ein Kamm zur Erzeugung der Geltaschen eingesetzt. Im Folgenden ist das Pipettierschema für jeweils zwei Gele angegeben.

12% Trenngel:

H ₂ O	3040 µL
3,5 x NuPAGE Gel Puffer	2856 µL
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 30% (w/v)	4000 µL
APS (10 %)	100 µL
TEMED	<u>4 µL</u>
	10 mL

15% Trenngel:

H ₂ O	2040 µL
3,5 x NuPAGE Gel Puffer	2856 µL
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 30% (w/v)	5000 µL
APS (10 %)	100 µL
TEMED	<u>4 µL</u>
	10 mL

5% Sammelgel:

H ₂ O	1610 µL
3,5 x NuPAGE Gel Puffer	857 µL
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 30% (w/v)	500 µL
APS (10 %)	30 µL
TEMED	<u>3 µL</u>
	5 mL

Zur Analyse der Proben werden zwei Gele gleichzeitig in die Apparatur eingespannt und die Kammern mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Taschen des Gels werden mehrfach mit Laufpuffer ausgespült und das Gel anschließend mit den Proben beladen. Proteinproben werden zuvor entsprechend ihres Volumens mit 1,25 x oder 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt. DNA-Proben werden ebenfalls mit 5 x SDS-Probenpuffer vermischt, sodass der Puffer in einfacher Verdünnung vorliegt. Im Gegensatz zu den Proteinproben werden DNA-Proben bei RT direkt auf das Gel aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wird für ca. 60 min bei einer Spannung von 130 V betrieben. Anschließend wird das Gel mit Wasser abgespült und die Glasscheiben werden entfernt. Die Färbung erfolgt nach den in Kapitel 5.2.8 beschriebenen Methoden.

5.2.8 Färbung von Polyacrylamid-Gelen

5.2.8.1 Coomassie R

Die Färbung von Proteinbanden mittels Coomassie R wird für Proteinmengen von über 1 µg pro Spur genutzt, wenn keine besonders hohe Sensitivität benötigt wird. Dazu wird das Gel nach der Gelelektrophorese in einen Kunststoffbehälter mit Coomassie R Färbelösung (Fixierlösung, Coomassie Brilliant Blue R 250 0,05% (w/v)) gelegt und über Nacht auf einer Schüttelplatte inkubiert. Am nächsten Tag wird das Gel für 1 h in einem neuen Kunststoffbehälter mit Fixierlösung gewaschen. Diese wird anschließend abdekantiert und das Gefäß mit H₂O aufgefüllt. Unter Zugabe von einem Kimtech-Tuch zum Aufsaugen des überschüssigen Farbstoffs wird erneut für 1 h inkubiert und das Gel anschließend auf einer Kaltlichtplatte fotografiert.

5.2.8.2 Kolloidale Coomassie G

Die Färbung mittels kolloidaler Coomassie erfolgt nach Kang *et al.*^[83] mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250. Zur Herstellung von 1 L Färbelösung wird Aluminiumsulfat-(14-18)-hydrat (50 g, 5% (w/v)) in H₂O (300 mL) gelöst und Ethanol p.a. (100 mL, 10% (v/v)) hinzugegeben. Anschließend wird der Farbstoff Coomassie G 250 (0,2 g, 0,02% (w/v)) zur Lösung gegeben und gerührt, bis der Farbstoff gelöst ist und eine homogene blaue Färbung entsteht. Im nächsten Schritt wird Phosphorsäure 85% (23,5 mL, 2,35% (v/v)) hinzugefügt und durch eine Grünfärbung und Trübung wird die Bildung von

Kolloiden erkennbar. Es wird auf ein Gesamtvolumen von 1 L mit H₂O aufgefüllt und die fertige Färbelösung bis zur Verwendung bei 4°C vor Licht geschützt gelagert.

Zur Färbung werden die Gele nach der Gelelektrophorese für 10 min in einem Kunststoffgefäß in Fixierlösung inkubiert und anschließend für 5 min mit Ethanolwaschlösung gewaschen. Das Gel wird für weitere 10 min in Wasser inkubiert und anschließend in einen Glasbehälter mit kolloidaler Coomassie G Färbelösung gegeben. Die Färbelösung wird vor dem Einfüllen in den Glasbehälter stark geschüttelt, um eine homogene Verteilung der Kolloide zu erzielen. Das Gel wird über Nacht auf einem Schüttelinkubator in der Färbelösung inkubiert, am nächsten Tag für 1 min mit Fixierlösung abgespült und in H₂O gelagert. Für eine höhere Färbungsintensität, beispielsweise zur Färbung von *Pulldown*-Gelen, wird das Gel erneut über Nacht in frischer Färbelösung gefärbt und daraufhin für 1 min mit Fixierlösung gewaschen. Für jeden Färbevorgang wird stets frische Färbelösung verwendet.

5.2.8.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen wird mit dem SilverStain Kit ProteoSilver™ der Firma Sigma-Aldrich nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und kann zur Detektion von geringen Proteinmengen und DNA genutzt werden, wobei sowohl Doppelstrang- als auch Einzelstrang- und G4-DNA sichtbar gemacht werden können. Zur Färbung von Proteingelen wird das Gel über Nacht in einem Kunststoffbehälter in Fixierlösung gelagert und am nächsten Tag das Färbeprotokoll angewendet. Für die Detektion von DNA mittels Silberfärbung wird das Gel 30 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend für 20 min mit Ethanolwaschlösung gewaschen. Daraufhin wird die Ethanolwaschlösung durch H₂O ersetzt und das Gel über Nacht in frischem H₂O gelagert, da hiermit später ein klarer Hintergrund erzielt werden kann. Am nächsten Tag wird das Färbeprotokoll nach Anleitung des Herstellers angewendet, wobei die Waschschrte von 10 min auf 15 min verlängert werden.

5.2.9 Herstellung von Zelllysats aus ganzen Zellen

Ein Zellpellet von Eierstock-Krebszellen der Zelllinie A2780 mit etwa 10×10^7 Zellen wird auf Eis aufgetaut und in 4 mL eiskaltem RIPA-Auflösungspuffer resuspendiert. Die Zellen werden durch Ultraschall aufgeschlossen (10 x 10 Pulse mit je 30 s Pause, Output 20%, Outputcontrol: 2) und die Suspension anschließend bei 4°C für 10 min mit 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wird in Aliquots mit jeweils 65 µL mit flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert. Diese Methode ergibt etwa 3,5 mL Zelllysats mit einer Proteinkonzentration von 5,4 mg/mL. Für Pulldown-Experimente werden einzelne Aliquots entnommen und auf Eis aufgetaut. Vor der Verwendung wird die Lösung auf Eis erneut mit einer Pipette durchmischt um eine gleichmäßige Verteilung der gelösten Proteine zu gewährleisten. Einmal angebrochene Aliquots werden nach der Verwendung entsorgt.

5.2.10 Beladung von Magnetpartikeln mit Oligodesoxyribonucleotiden

Zur Beladung der magnetischen Partikel werden die gefalteten DNA-Strukturen durch die Biotinfunktion am 3'-Ende auf den Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln immobilisiert, indem Biotin durch eine sehr starke, nicht-kovalente Wechselwirkung an Streptavidin bindet (siehe Abbildung 76).

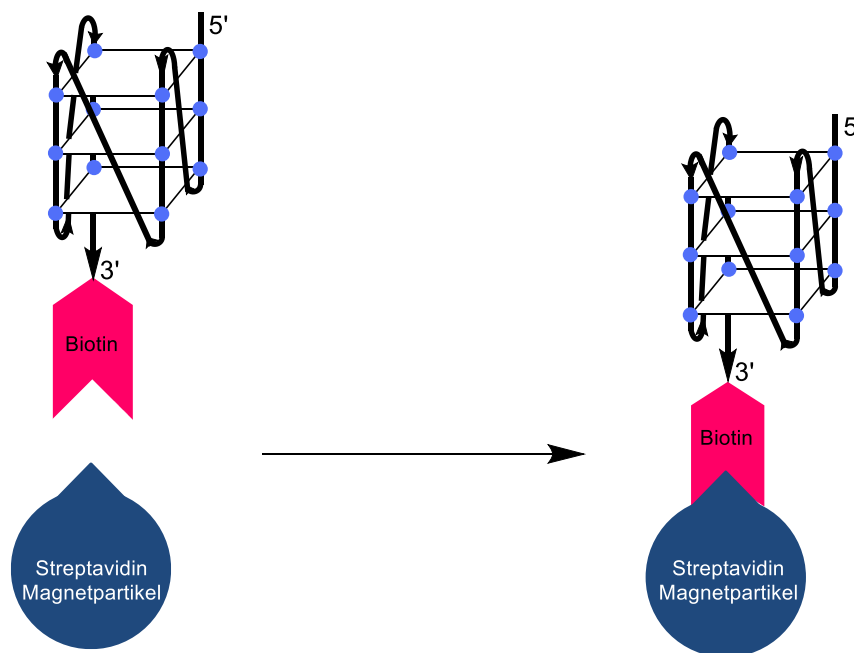


Abbildung 76: Beladung von Magnetpartikeln mit Biotin-ODN.

Die Vorbereitung von ODN, die für Pulldown-Experimente verwendet werden, erfolgt ausschließlich in Protein *LoBind tubes* der Firma Eppendorf. Diese beschichteten Gefäße werden ebenfalls für alle weiteren Experimente genutzt, in denen Magnetpartikel verwendet werden, um ein Anhaften an der Oberfläche zu vermeiden. Zudem werden während aller Arbeitsschritte in der Vorbereitung und bei *Pulldown*-Experimenten Handschuhe getragen, um Kontamination mit Eigenproteinen zu vermeiden. Zur Beladung von 100 μL Magnetpartikeln wird 1 nmol ODN oder Duplex-ODN eingesetzt. Das ODN wird nach der entsprechenden, in Kapitel 5.2.1 beschriebenen Methode gefaltet und liegt in KPP-Puffer (200 μL , 5 μM) vor. Die Magnetpartikel werden vor der Verwendung gründlich resuspendiert und das benötigte Volumen (100 μL) entnommen. Die Partikel werden an einem selbstgebauten Magnetrack mit Neodym-Stabmagneten an der Innenseite des Eppendorf-Gefäßes sedimentiert und der überstehende Puffer mit einer Pipette abgezogen. Anschließend werden die Magnetpartikel zwei Mal mit KPP-Puffer (100 μL) gewaschen. In jedem Waschschrift wird dazu das Eppendorf-Gefäß aus dem Magnetrack entnommen und die Partikel in dem neuen Puffer resuspendiert. Das Gefäß wird wieder in das Magnetrack zurückgestellt und dann gewartet, bis sich die Magnetpartikel an der Gefäßwand gesammelt haben. Im Anschluss erfolgt erneut ein Abziehen des überstehenden Puffers. Im letzten Schritt werden die Partikel mit der Lösung des jeweils eingesetzten ODN (200 μL , 5 μM) resuspendiert und 1 h bei RT in Abwesenheit von Magneten inkubiert. Im Anschluss wird die Suspension erneut mit einer Pipette durchmischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Magnetpartikel zwei Mal mit KPP-Puffer (100 μL) gewaschen und anschließend resuspendiert. Die Lagerung erfolgt im Puffer bei 4°C.

Für Experimente zur Untersuchung der Beladungsdichte wird das jeweilige ODN (100 pmol) gemäß den Standard-Bedingungen gefaltet und mit der Magnetpartikel-Suspension (10 μL) analog zu der zuvor beschriebenen Beladungsmethode inkubiert.

5.2.11 Isolierung von Proteinen nach *Pulldown*-Verfahren

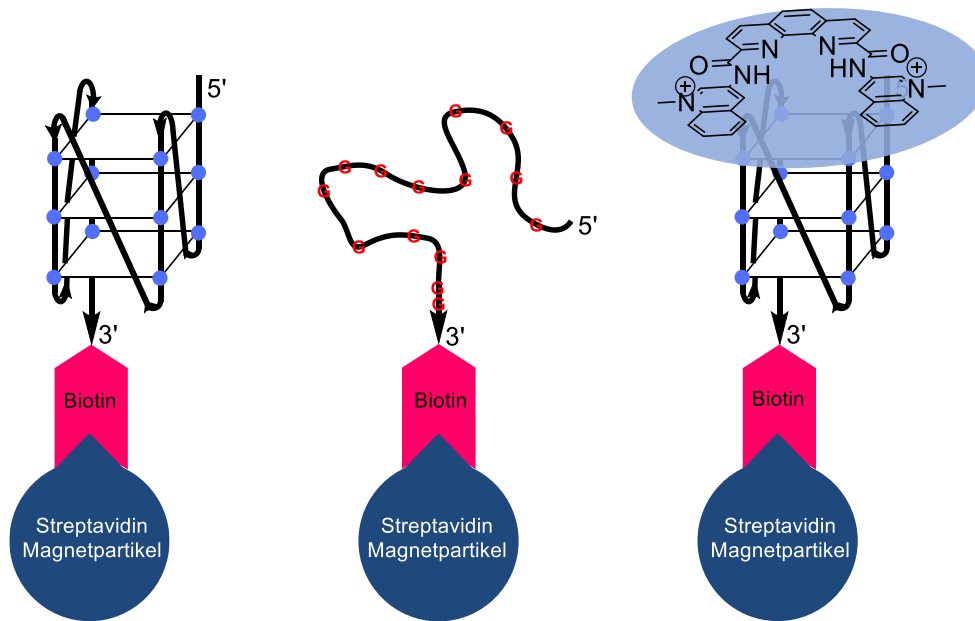


Abbildung 77: Beispiele der zum *Pulldown* verwendeten, beladenen Magnetpartikel.

Für jeden Ansatz werden, sofern nicht anders angegeben, 20 μL der beladenen Magnetpartikel (siehe Abbildung 77) auf 100 μL Gesamtvolumen verwendet. Die Magnetpartikel werden vorgelegt, am Magnettrack sedimentiert und der Überstand abgezogen. Anschließend werden unter Kühlung auf Eis H_2O , 5 x KPP-Puffer für Nucleolin (20 μL) oder 5 x PC-Puffer (20 μL) für Zelllysate-Ansätze sowie gegebenenfalls PhenDC3-Lösung (200 μM , 5 μL , 10 μM Endkonzentration) hinzugefügt. Die für den Ansatz benötigte Menge H_2O wird so berechnet, dass nach Zugabe aller Stoffe einschließlich der Proteine ein Gesamtvolumen von 100 μL erreicht ist. Die Ansätze werden durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt und bei Zugabe von PhenDC3 zusätzlich 3 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von Nucleolin (5,8 μg , 100 pmol, 1 μM) oder Zelllysate (50 μg) und die Ansätze werden erneut durch vorsichtiges auf- und abpipettieren durchgemischt. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei 4°C. Danach werden die Eppendorf-Gefäße in ein Magnettrack eingesetzt, die Partikel am Magneten sedimentiert und der Überstand abgezogen. Die Magnetpartikel werden zwei Mal mit *Pulldown*-Waschpuffer (180 μL), ein Mal mit *basic wash* Waschpuffer (180 μL), erneut ein Mal mit *Pulldown*-Waschpuffer (180 μL) und anschließend zwei Mal mit H_2O (180 μL) gewaschen. Zum Abziehen der Lösungen wird die Pipette auf ein geringfügig größeres Volumen eingestellt, um sicherzustellen, dass keine Flüssigkeitsreste in den Gefäßen verbleiben. Sowohl während dem zweiten Waschschrift mit *Pulldown*-Waschpuffer als auch im zweiten Waschschrift mit H_2O erfolgt

ein Wechsel des Eppendorf-Gefäßes, indem die Partikel in der frischen Lösung suspendiert und in das neue Gefäß pipettiert werden. Im letzten Schritt wird das H₂O abpipettiert und die Magnetpartikel in 8 µL 1,25 x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Gefäße werden kurz zentrifugiert und im Anschluss für 10 min auf 95°C erhitzt. Die Analyse der isolierten Proteine erfolgt durch SDS-PAGE, wobei Partikel am Magnettrack sedimentiert und ausschließlich der Überstand auf das Gel aufgetragen wird.

5.2.12 Isolierung von Proteinen nach *Pulldown*-Verfahren zur Proteomanalyse

Die Isolierung von Proteinen aus Zelllysats zur Proteomanalyse erfolgt nach dem gleichen Verfahren wie in 5.2.11, allerdings muss ein besonderes Augenmerk auf die Vermeidung von Verunreinigungen gelegt werden. Dazu werden vor Beginn der eigentlichen Arbeit alle verwendeten Pipetten mit staubfreien Tüchern und Ethanol abgewaschen, um Fingerabdrücke zu entfernen, ebenso wie alle Pufferflaschen und Oberflächen. Insgesamt wird bei der Arbeitsweise besonders darauf geachtet, dass eine Kontamination mit Staub, Hautschuppen oder Fingerabdrücken vermieden wird. Die Herstellung der Proben unterscheidet sich vom regulären *Pulldown*-Experiment lediglich im letzten Waschschriff. Die Proben zur Proteomanalyse werden analog zu den regulären Proben im letzten Waschschriff in 180 µL Wasser redispersiert. Dieses wird allerdings nicht direkt abgezogen, sondern der Ansatz an dieser Stelle in 2 x 90 µL auf zwei neue Eppendorf-Gefäße aufgeteilt. Der Überstand wird wiederum abgezogen und die Magnetpartikel in 1,25 x SDS-Probenpuffer (8 µL) resuspendiert und für 10 min auf 95°C erhitzt. Anschließend werden die Partikel entfernt und die eine Hälfte wird zur Proteomanalyse genutzt, während die andere Hälfte zur Kontrolle im eigenen Labor mittels SDS-PAGE analysiert wird.

5.2.13 Bindungsassay mit Zielproteinen

Die Durchführung der Bindungsassays erfolgt analog zu 5.2.11, allerdings werden pro Ansatz 10 µL beladene Magnetpartikel auf ein Gesamtvolumen von 50 µL verwendet. Als Bindungspuffer wird 5 x PC-Puffer (10 µL) genutzt und die PhenDC3-Lösung (200 µM, 2,5 µL, 10 µM Endkonzentration) wird ebenfalls 3 min im Ansatz inkubiert. Zusätzlich wird Protease Inhibitor Cocktail (5 µL, 1 Tab/2 mL) zugegeben. Nach dem Durchmischen wird das zu untersuchende Protein (5 pmol, 100 nM) hinzugegeben und das Experiment entsprechend des *Pulldown*-Protokolls durchgeführt.

5.2.14 Auswertung von Proteomanalysen

Nach der Isolierung der Proteine mit den verschiedenen DNA-Strukturen werden die in SDS-Probenpuffer gelösten, denaturierten Proteine zur Analyse an die *plateforme de protéomique* am Institut Curie, Paris geschickt, dort mit Trypsin fragmentiert und mittels Massenspektrometrie analysiert. Die durch ihre Masse identifizierten Peptide werden anhand einer humanen Datenbank Proteinen zugeordnet.

Alle Analysen der aus Zelllysaten isolierten Proteine werden mit der Software myProMS durchgeführt.^[67] Zur Erstellung von Venn-Diagrammen wird die Funktion *Compare Project Item* genutzt und alle Proteine gezeigt, die mit mindestens einem Peptid in der besten Analyse gefunden wurden. Proteine, die im Zellkern vorkommen, werden durch eine *Gene Ontology* Analyse ermittelt. Dazu wird unter der Option *Functional Analysis GO* mit *Start GO Analysis* die *Slim Gene Ontology* mit der *Annotation Uniprot* für die Gattung *Homo Sapiens* ausgewählt. Zudem wird *Reactome* als *Pathway Analysis* genutzt.

Die Quantifizierungen für Vulkanoplots und die als .xls-Datei exportierten Listen werden erstellt, indem als erlaubte Peptide *proteotypic peptides only* und der Algorithmus *Simple Ratio* gewählt werden. Als Bias Korrektur wird *Global MAD** genutzt und als erlaubte Modifikation Carbamidomethyl angegeben.

Zur späteren graphischen Darstellung von Vulkanoplots werden nur Proteine gewählt, die mit mindestens 4 Peptiden in der Analyse gefunden wurden. Zudem wird ein p-Wert von 0,05 und eine absolute Anreicherung von 2-fach bzw. 4-fach als Grenze gewählt.

5.2.15 Molekularbiologische Methoden zur Expression von Proteinen

5.2.15.1 Allgemeine Arbeitsweise

Alle zur Bakterienanzucht verwendeten Glasgeräte, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen werden vor der Verwendung in einem Dampfsterilisator für mindestens 20 min bei einer Temperatur von 121°C sterilisiert. Für alle Arbeitsschritte wird Reinstwasser verwendet, das ebenfalls für 20 min bei 121°C autoklaviert wird.

5.2.15.2 Anzucht von Bakterien

Die zur Bakterienanzucht verwendeten Medien werden vor der Verwendung für 20 min bei 121°C autoklaviert und nach dem Abkühlen auf etwa 60°C die entsprechenden Antibiotika Kanamycin (40 mg/L) und Chloramphenicol (34 mg/L) hinzugegeben. Den Medien zum Gießen von Agar-Platten wird vor dem Autoklavieren zusätzlich 15 g/L Agar hinzugefügt. Die Agar-Medien werden in Kunststoffpetrischalen mit Deckel gegossen, wobei etwa 25 mL des Nährmediums pro Agar-Platte verwendet werden. Nach dem Aushärten werden die Agar-Platten verschlossen und bei 4°C gelagert. Die Beimpfung der Agar-Platten erfolgt entweder als Verdünnungsausstrich einer einzelnen Bakterienkolonie mit einer ausgeglühten Platinöse oder bei Bakteriensuspensionen mit größeren Volumina durch gleichmäßige Verteilung mit einem Drigalskispatel. Die beimpften Agar-Platten werden über Nacht in einem Inkubator bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Flüssigmedien werden durch eine ausgeglühte Platinöse mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht in einem Schüttelinkubator des Typs 3031 der Firma Gesellschaft für Labortechnik bei 37°C und 130 - 160 rpm inkubiert. Die Anzucht erfolgt in autoklavierten Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläsern.

5.2.15.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen für die CaCl₂-Methode

Mit einer Einzelkolonie des Bakterienstamms BL21 DE3 Codon Plus RIL wird LB-Medium (20 mL) beimpft und bei 37°C und 160 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur (ONC) wird am nächsten Tag LB-Medium (200 mL) auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 130 rpm inkubiert. In Abständen von 20-30 min werden Proben entnommen und die OD₆₀₀ in einer Polystyrol-Einwegküvette (Brand) gemessen. Nachdem eine OD₆₀₀ von 0,7-1,0 erreicht ist, wird die Bakteriensuspension in einen vorgekühlten Zentrifugenbecher gegeben und für 10 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss wird die Suspension bei 4°C und 3656 g im Rotor JS 4.3 für 7 min zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wird in eiskalter CaCl₂-Lösung (40 mL, 100 mM) resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wird im Rotor JA 17 bei 2799 g und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand erneut abdekantiert. Das Pellet wird in eiskalter CaCl₂-Lösung (40 mL, 100 mM) resuspendiert und für 30 min auf Eis gekühlt. Der Überstand wird vollständig abdekantiert und das Pellet in eiskalter CaCl₂-Glycerinlösung (4 mL, 100 mM mit 15 % Glycerin (v:v)) resuspendiert. Die Suspension wird in Aliquots mit jeweils 100 µL portioniert, mit flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.15.4 Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Zellen nach der CaCl₂-Methode

Chemisch kompetente Zellen (100 µL, siehe Kapitel 5.2.15.3) werden auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA pET28 6His SUMO Nucleolin (120 ng, 2 µL) versetzt. Das Gemisch wird für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 90 s bei 42°C in einem Heizblock inkubiert. Die Suspension wird für 60 s auf Eis gekühlt, anschließend mit 1000 µL LB-Medium ohne Antibiotika versetzt und bei 37°C für 45 min inkubiert. Mit einem Drigalskispatel werden die Zellen auf Agar-Platten mit Kanamycin (40 mg/L) und Chloramphenicol (37 mg/L) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Agar-Platten mit den transformierten Zellen werden bei 4°C gelagert.

5.2.15.5 Expression und Aufreinigung von 6His SUMO Nucleolin

In einem Erlenmeyerkolben wird LB-Medium (100 mL) mit Kanamycin (40mg/L) und Chloramphenicol (37 mg/L) versetzt und mit einer Einzelkolonie der Zellen aus 5.2.15.4 angeimpft. Die Kultur wird bei 37°C und 160 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser ONC

wird am nächsten Tag TB-Medium (1 L) mit den entsprechenden Antibiotika auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 160 rpm inkubiert. In Abständen von 20 - 30 min werden Proben entnommen und die OD₆₀₀ gemessen. Nachdem eine OD₆₀₀ von 0,7 erreicht ist, wird die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (0,5 mM) induziert und die Suspension über Nacht bei 20°C und 160 rpm inkubiert. Der Ansatz wird für 15 min bei 4°C mit 6000 rpm im Rotor JS 4.3 zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wird auf Eis in kaltem Nucleolin Puffer 1 (50 mL) mit Imidazol (10 mM) resuspendiert und mit einem Ultraschalldesintegrator aufgeschlossen (10 x 10 Pulse mit je 30 s Pause, Output 20 %, Outputcontrol: 2). Anschließend wird für 30 min mit 38000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand durch Affinitätschromatographie an Nickel-NTA gereinigt. Durch das Nickel-NTA-Superflow Säulenmaterial (Qiagen) werden Proteine, die einen His-Tag besitzen, zurückgehalten und können anschließend mit Imidazol eluiert werden. Dazu werden 4,5 mL Säulenmaterial mit 4 Säulenvolumen (CV) Nucleolin Puffer 1 equilibriert und anschließend das Proteingemisch aufgetragen. Im Anschluss wird die Säule mit Nucleolin Puffer 1 (10 CV) mit Imidazol (20 mM) gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Nucleolin Puffer 1 (4 CV) mit Imidazol (40 mM) wird das Protein mit Nucleolin Puffer 1 mit Imidazol (200 mM) eluiert. Die Fraktionen werden einzeln und gekühlt aufgefangen und mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit untersucht. Fraktionen 8, 9 und 10 (siehe Abbildung 48) werden in einer Amicon Ultra-4 Zentrifugeneinheit aufkonzentriert und 6His SUMO Nucleolin in Nucleolin-Lagerpuffer umgepuffert. 6His SUMO Nucleolin wird bei -20°C gelagert.

6 Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [2] a) M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, 48, 2013-2018; b) J. T. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 668-698.
- [3] D. Sen, W. Gilbert, *Nature* **1988**, 334, 364-366.
- [4] W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature* **1989**, 342, 825-829.
- [5] J. R. Williamson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, 23, 703-730.
- [6] S. L. Forman, J. C. Fetting, S. Pieraccini, G. Gottarelli, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4060-4067.
- [7] a) T. J. Pinnavaia, C. L. Marshall, C. M. Mettler, C. L. Fisk, H. T. Miles, E. D. Becker, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 3625-3627; b) T. J. Pinnavaia, H. T. Miles, E. D. Becker, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 7198-7200.
- [8] a) H. Guiset Miserachs, D. Donghi, R. Börner, S. Johannsen, R. K. O. Sigel, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 975-986; b) A. N. Lane, J. B. Chaires, R. D. Gray, J. O. Trent, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, 5482-5515.
- [9] a) A. T. Phan, Y. S. Modi, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8710-8716; b) R. H. Shafer, I. Smirnov, *Biopolymers* **2000**, 56, 209-227; c) T. Simonsson, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 621-628; d) M. M. Fay, S. M. Lyons, P. Ivanov, *J. Mol. Biol.* **2017**, 429, 2127-2147.
- [10] D.-H. Zhang, T. Fujimoto, S. Saxena, H.-Q. Yu, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Biochemistry* **2010**, 49, 4554-4563.
- [11] a) P. Rawal, V. B. R. Kummarasetti, J. Ravindran, N. Kumar, K. Halder, R. Sharma, M. Mukerji, S. K. Das, S. Chowdhury, *Genome Res.* **2006**, 16, 644-655; b) J. E. Johnson, J. S. Smith, M. L. Kozak, F. B. Johnson, *Biochimie* **2008**, 90, 1250-1263; c) J. L. Huppert, *Biochimie* **2008**, 90, 1140-1148.
- [12] a) A. K. Todd, M. Johnston, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 2901-2907; b) J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 2908-2916; c) J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 406-413.
- [13] N. Maizels, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, 13, 1055-1059.
- [14] A. K. Todd, S. M. Haider, G. N. Parkinson, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 5799-5808.
- [15] E. H. Blackburn, *Nature* **1991**, 350, 569-573.
- [16] M. O'Reilly, S. A. Teichmann, D. Rhodes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 56-65.

- [17] a) D. J. Patel, A. T. Phan, V. Kuryavyi, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 7429-7455; b) L. Oganessian, T. M. Bryan, *Bioessays* **2007**, 29, 155-165; c) S. Neidle, G. Parkinson, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 383-393; d) J.-L. Mergny, J.-F. Riou, P. Mailliet, M.-P. Teulade-Fichou, E. Gilson, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 839-865.
- [18] S. Neidle, G. N. Parkinson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 275-283.
- [19] J. L. Huppert, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1375-1384.
- [20] G. E. Crawford, I. E. Holt, J. Whittle, B. D. Webb, D. Tai, S. Davis, E. H. Margulies, Y. Chen, J. A. Bernat, D. Ginsburg, D. Zhou, S. Luo, T. J. Vasicek, M. J. Daly, T. G. Wolfsberg, F. S. Collins, *Genome Res.* **2006**, 16, 123-131.
- [21] J. Eddy, N. Maizels, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 3887-3896.
- [22] A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 11593-11598.
- [23] a) T. A. Brooks, L. H. Hurley, *Genes Cancer* **2010**, 1, 641-649; b) S. Pelengaris, B. Rudolph, T. Littlewood, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, 10, 100-105.
- [24] a) L. M. Facchini, L. Z. Penn, *FASEB J.* **1998**, 12, 633-651; b) S. Nass, R. B. Dickson, *Breast Cancer Res. Treat.* **1997**, 44, 1-22; c) K. B. Marcu, S. A. Bossone, A. J. Patel, *Annu. Rev. Biochem* **1992**, 61, 809-858; d) C. A. Spencer, M. Groudine, *Adv. Cancer Res.* **1991**, 56, 1-48.
- [25] a) U. Siebenlist, L. Hennighausen, J. Battey, P. Leder, *Cell* **1984**, 37, 381-391; b) M. Cooney, G. Czernuszewicz, E. H. Postel, S. J. Flint, M. E. Hogan, *Science* **1988**, 241, 456; c) T. L. Davis, A. B. Firulli, A. J. Kinniburgh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 86, 9682-9686; d) I. Wierstra, J. Alves, *Adv. Cancer Res.* **2008**, 99, 113-133.
- [26] V. González, L. H. Hurley, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, 50, 111-129.
- [27] a) A. T. Phan, V. Kuryavyi, S. Burge, S. Neidle, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 4386-4392; b) S.-T. D. Hsu, P. Varnai, A. Bugaut, A. P. Reszka, S. Neidle, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13399-13409.
- [28] D. Sun, K. Guo, J. J. Rusche, L. H. Hurley, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 6070-6080.
- [29] J. Dai, D. Chen, R. A. Jones, L. H. Hurley, D. Yang, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5133-5144.
- [30] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5402-5415.
- [31] A. Joachimi, A. Benz, J. S. Hartig, *Biorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6811-6815.
- [32] M. C. Miller, H. T. Le, W. L. Dean, P. A. Holt, J. B. Chaires, J. O. Trent, *Org. Biomol. Chem* **2011**, 9, 7633-7637.

- [33] a) N. Smargiasso, F. Rosu, W. Hsia, P. Colson, E. S. Baker, M. T. Bowers, E. De Pauw, V. Gabelica, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10208-10216; b) P. Tóthová, P. Krafčíková, V. Víglaský, *Biochemistry* **2014**, *53*, 7013-7027; c) E. Henderson, J. Vesenska, T. C. Marsh, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 696-700.
- [34] a) D. Yang, K. Okamoto, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 619-646; b) R. I. Mathad, E. Hatzakis, J. Dai, D. Yang, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 9023-9033.
- [35] J. Seenisamy, E. M. Rezler, T. J. Powell, D. Tye, V. Gokhale, C. S. Joshi, A. Siddiqui-Jain, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8702-8709.
- [36] A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, R. A. Jones, D. Yang, *Biochemistry* **2005**, *44*, 2048-2058.
- [37] C. S. Mekmaysy, L. Petraccone, N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, R. Gray, J. O. Trent, J. B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6710-6711.
- [38] A. G. Petrovic, P. L. Polavarapu, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2255-2260.
- [39] V. M. Marathias, M. J. Sawicki, P. H. Bolton, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2860-2867.
- [40] a) Y. Xue, Z.-y. Kan, Q. Wang, Y. Yao, J. Liu, Y.-h. Hao, Z. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11185-11191; b) M. C. Miller, R. Buscaglia, J. B. Chaires, A. N. Lane, J. O. Trent, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17105-17107.
- [41] a) S. W. Blume, V. Guarcello, D. M. Miller, W. Zacharias, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 617-625; b) A. Nakao, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2001**, *1*, 259-260.
- [42] a) R. D. Gray, J. Li, J. B. Chaires, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 2676-2683; b) R. D. Gray, L. Petraccone, J. O. Trent, J. B. Chaires, *Biochemistry* **2010**, *49*, 179-194.
- [43] P. B. Arimondo, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, J. Tazi, J.-S. Sun, T. Garestier, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4832-4838.
- [44] H. T. Le, M. C. Miller, R. Buscaglia, W. L. Dean, P. A. Holt, J. B. Chaires, J. O. Trent, *Org. Biomol. Chem* **2012**, *10*, 9393-9404.
- [45] M. Fry, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12797-12802.
- [46] H. Sun, J. K. Karow, I. D. Hickson, N. Maizels, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27587-27592.
- [47] Y. Wu, J. A. Sommers, I. Khan, J. P. de Winter, R. M. Brosh, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1007-1021.

- [48] a) T. B. C. London, L. J. Barber, G. Mosedale, G. P. Kelly, S. Balasubramanian, I. D. Hickson, S. J. Boulton, K. Hiom, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36132-36139; b) Y. Wu, K. Shin-ya, R. M. Brosh, *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 4116-4128.
- [49] C. M. Sanders, *Biochem. J.* **2010**, *430*, 119-128.
- [50] a) A. Sfeir, S. T. Kosiyatrakul, D. Hockemeyer, S. L. MacRae, J. Karlseder, C. L. Schildkraut, T. de Lange, *Cell* **2009**, *138*, 90-103; b) H. Ding, M. Schertzer, X. Wu, M. Gertsenstein, S. Selig, M. Kammori, R. Pourvali, S. Poon, I. Vulto, E. Chavez, P. P. L. Tam, A. Nagy, P. M. Lansdorp, *Cell* **2004**, *117*, 873-886.
- [51] M. D. Gray, J.-C. Shen, A. S. Kamath-Loeb, A. Blank, B. L. Sopher, G. M. Martin, J. Oshima, L. A. Loeb, *Nature Gen.* **1997**, *17*, 100-103.
- [52] A. Piazza, A. Serero, J.-B. Boulé, P. Legoix-Né, J. Lopes, A. Nicolas, *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1003033.
- [53] V. González, K. Guo, L. Hurley, D. Sun, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23622-23635.
- [54] W. J. Chung, B. Heddi, F. Hamon, M.-P. Teulade-Fichou, A. T. Phan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 999-1002.
- [55] A. Piazza, J.-B. Boulé, J. Lopes, K. Mingo, E. Largy, M.-P. Teulade-Fichou, A. Nicolas, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 4337-4348.
- [56] M. Wilhelm, J. Schlegl, H. Hahne, A. M. Gholami, M. Lieberenz, M. M. Savitski, E. Ziegler, L. Butzmann, S. Gessulat, H. Marx, T. Mathieson, S. Lemeer, K. Schnatbaum, U. Reimer, H. Wenschuh, M. Mollenhauer, J. Slotta-Huspenina, J.-H. Boese, M. Bantscheff, A. Gerstmair, F. Faerber, B. Kuster, *Nature* **2014**, *509*, 582.
- [57] B. L. Jutras, A. Verma, B. Stevenson, *Curr. Protoc. Microbiol.* **2012**, *1*, Unit1F.1.
- [58] a) L. Chaiet, F. J. Wolf, *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *106*, 1-5; b) N. M. Green, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85-133.
- [59] a) J. Gao, B. L. Zybaylov, A. K. Byrd, W. C. Griffin, S. Chib, S. G. Mackintosh, A. J. Tackett, K. D. Raney, *Chem. Comm.* **2015**, *51*, 7242-7244; b) B. Pagano, L. Margarucci, P. Zizza, J. Amato, N. Iaccarino, C. Cassiano, E. Salvati, E. Novellino, A. Biroccio, A. Casapullo, A. Randazzo, *Chem. Comm.* **2015**, *51*, 2964-2967.
- [60] N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 4539-4557.
- [61] D. Yang, L. H. Hurley, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, *25*, 951-968.
- [62] S. Amrane, M. Adrian, B. Heddi, A. Serero, A. Nicolas, J.-L. Mergny, A. T. Phan, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5807-5816.

- [63] J.-L. Mergny, J. Li, L. Lacroix, S. Amrane, J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, e138-e138.
- [64] R. L. Lundblad, F. M. Macdonald, *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition*, CRC Press **2010**.
- [65] B. Bugler, H. Bourbon, B. Lapeyre, M. O. Wallace, J. H. Chang, F. Amalric, M. O. Olson, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 10922-10925.
- [66] H. Ginisty, H. Sicard, B. Roger, P. Bouvet, *J. Cell Sci.* **1999**, 112, 761.
- [67] P. Pouillet, S. Carpentier, E. Barillot, *Proteomics* **2007**, 7, 2553-2556.
- [68] J. P. Vaughn, S. D. Creacy, E. D. Routh, C. Joyner-Butt, G. S. Jenkins, S. Pauli, Y. Nagamine, S. A. Akman, **2005**, 280, 38117-38120.
- [69] B. Heddi, V. V. Cheong, H. Martadinata, A. T. Phan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, 112, 9608-9613.
- [70] A. K. Byrd, B. L. Zybaylov, L. Maddukuri, J. Gao, J. C. Marecki, M. Jaiswal, M. R. Bell, W. C. Griffin, M. R. Reed, S. Chib, S. G. Mackintosh, A. M. MacNicol, G. Baldini, R. L. Eoff, K. D. Raney, *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 18041-18057.
- [71] a) F. Dantzer, J. C. Amé, V. Schreiber, J. Nakamura, J. Ménissier-de Murcia, G. de Murcia, *Methods Enzymol.* **2006**, 409, 493-510; b) G. Gradwohl, J. M. Ménissier de Murcia, M. Molinete, F. Simonin, M. Koken, J. H. Hoeijmakers, G. de Murcia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 2990.
- [72] V. A. Soldatenkov, A. A. Vetcher, T. Duka, S. Ladame, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 214-219.
- [73] a) A. P. Wolffe, **1994**, 16, 245-251; b) M. Lodomery, J. Sommerville, **1995**, 17, 9-11; c) K. Matsumoto, A. P. Wolffe, *Trends in Cell Biology* **1998**, 8, 318-323.
- [74] a) M. Lodomery, J. Sommerville, *Bioessays* **1995**, 17, 9-11; b) K. Ito, K. Tsutsumi, T. Kuzumaki, P. F. Gomez, K. Otsu, K. Ishikawa, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 2036-2041.
- [75] T. Okamoto, H. Izumi, T. Imamura, H. Takano, T. Ise, T. Uchiumi, M. Kuwano, K. Kohno, *Oncogene* **2000**, 19, 6194-6202.
- [76] P. Ivanov, E. O'Day, M. M. Emara, G. Wagner, J. Lieberman, P. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, 111, 18201-18206.
- [77] R. Kolluri, T. A. Torrey, A. J. Kinniburgh, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 111-116.
- [78] a) G. Dreyfuss, M. J. Matunis, S. Pinol-Roma, C. G. Burd, *Annu. Rev. Biochem* **1993**, 62, 289-321; b) G. Dreyfuss, M. S. Swanson, S. Piñol-Roma, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 86-91.

- [79] F. O. Fackelmayer, A. Richter, *Biochemistry* **1994**, 33, 10416-10422.
- [80] F. O. Fackelmayer, K. Dahm, A. Renz, U. Ramsperger, A. Richter, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 221, 749-757.
- [81] R.-S. Nozawa, L. Boteva, D. C. Soares, C. Naughton, A. R. Dun, A. Buckle, B. Ramsahoye, P. C. Bruton, R. S. Saleeb, M. Arnedo, B. Hill, R. R. Duncan, S. K. Maciver, N. Gilbert, *Cell* **2017**, 169, 1214-1227.e1218.
- [82] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- [83] D. Kang, Y. Gho, M. Suh, C. Kang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, 23, 1511-1512.

7 Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Valerie Christine Rauser erklärt hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargelegten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung, generiert wurden.

Hiermit erkläre ich an Eides statt

1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;
2. Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt;
3. Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;
4. Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;
5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt;
6. Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde;
7. Ein Teil oder Teile dieser Arbeit wurden zuvor veröffentlicht und zwar in:

Posterpublikationen:

“Isolation of Proteins That Bind to G-Quadruplex DNA” Valerie Zens, Damarys Leow, Marie-Paule Teulade-Fichou and Elmar Weinhold, presented at the 9th New Years Symposium, 13. Jan. **2017**, Aachen.

“Quantitative formation of monomeric G-quadruplex DNA from higher order structures” Valerie Zens, Elmar Weinhold, presented at the 6th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids, 31. Mai - 3. Jun **2017**, Prague, Czech Republic.

“Isolation of Proteins That Bind to G-Quadruplex DNA” Valerie Rauser, Sophia Villwock, Marie-Paule Teulade-Fichou, Alain Nicolas, Damarys Loew, Guillaume Arras, Elmar Weinhold, präsentiert am VIII. Nucleinsäurechemietreffen der DNG, 21. - 22. Sep. **2017**, Mainz.

“Isolation and Identification of Proteins from Human Cell Lines that Bind G-Quadruplex DNA” Valerie Rauser, Sophia Villwock, Marie-Paule Teulade-Fichou, Alain Nicolas, Damarys Loew, Guillaume Arras, Elmar Weinhold, presented at the *10th New Years Symposium*, 12. Jan. **2018**, Aachen.

Vorträge:

“Development of probes to isolate proteins that bind to G-quadruplex DNA” Valerie Zens, *CAP-G4-Meeting*, 16. Nov. **2016**, Institut Curie, Orsay, France.

“Isolation and Identification of proteins that bind to G-quadruplex DNA” Valerie Rauser, *CAP-G4-Meeting*, 24. Nov. **2017**, Aachen.

Datum, Unterschrift

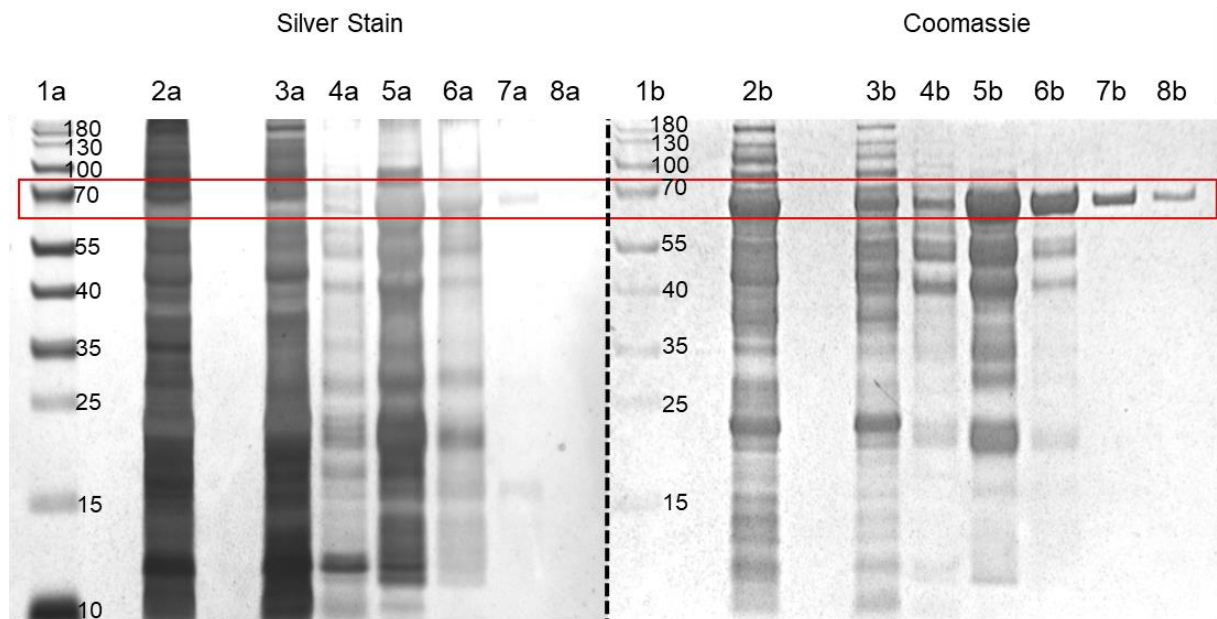


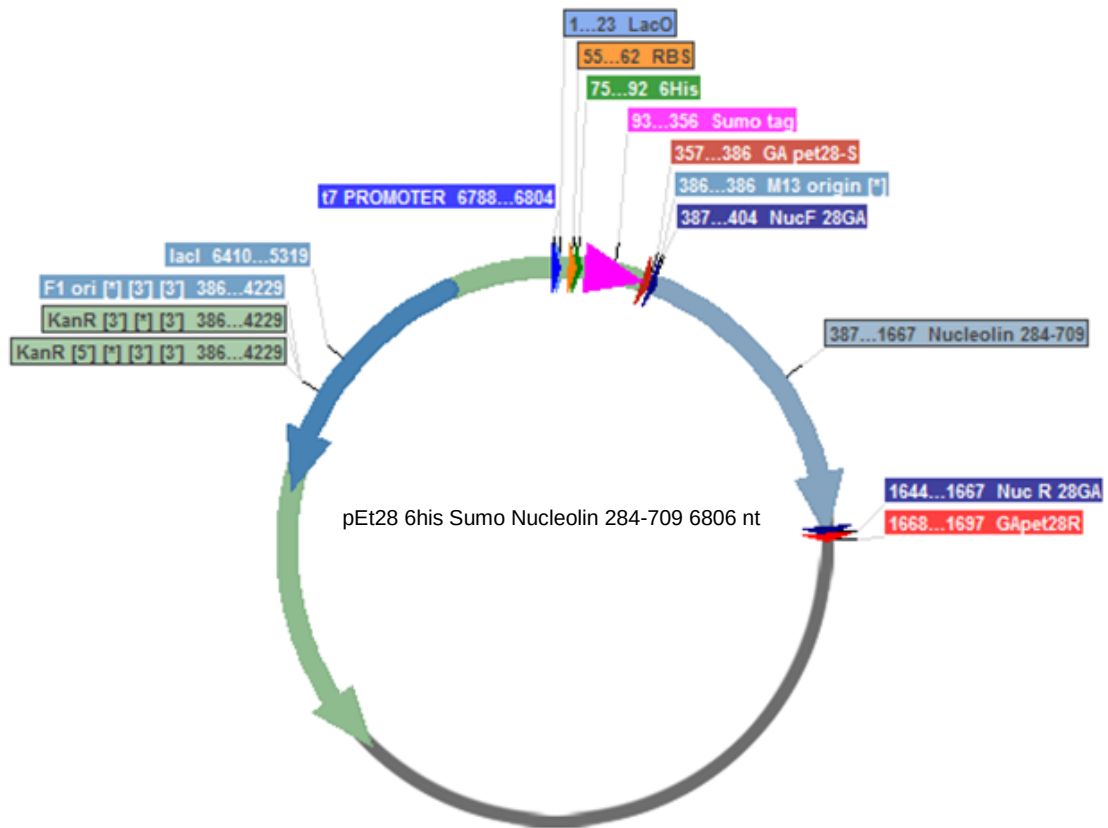
Abbildung 78: SDS-PAGE Gel der Eluatfraktionen aus der Nickel-NTA Affinitätschromatographie mit steigender Imidazolkonzentration, gefärbt mit silver Stain (links) und Coomassie R250 (rechts). 1 a/b = Marker, 2 a/b = Durchfluss, 3 a/b = 20 mM Imidazol, 4 a/b = 40 mM Imidazol, 5 a/b = 200 mM Imidazol, 6 a/b = 200 mM Imidazol, 7 a/b = 200 mM Imidazol, 8 a/b = 200 mM Imidazol,

6His SUMO Nucleolin (284 - 709)

$M_w = 58103 \text{ g/mol}$

H H H H H G S D S E V N Q E A K P E V K P E V K P E T H I N L
 K V S D G S S E I F F K I K K T T P L R R L M E A F A K R Q G K
 E M D S L R F L Y D G I R I Q A D Q A P E D L D M E D N D I I E
 A H R E Q I G G A K Q K A A P E A K K Q K V E G T E P T T A F N
 L F V G N L N F N K S A P E L K T G I S D V F A K N D L A V V D
 V R I G M T R K F G Y V D F E S A E D L E K A L E L T G L K V F
 G N E I K L E K P K G K D S K K E R D A R T L L A K N L P Y K V
 T Q D E L K E V F E D A A E I R L V S K D G K S K G I A Y I E F
 K T E A D A E K T F E E K Q G T E I D G R S I S L Y Y T G E K G
 Q N Q D Y R G G K N S T W S G E S K T L V L S N L S Y S A T E E
 T L Q E V F E K A T F I K V P Q N Q N G K S K G Y A F I E F A S
 F E D A K E A L N S C N K R E I E G R A I R L E L Q G P R G S P
 N A R S Q P S K T L F V K G L S E D T T E E T L K E S F D G S V
 R A R I V T D R E T G S S K G F G F V D F N S E E D A K A A K E
 A M E D G E I D G N K V T L D W A K P K G E G G F G G R G G G
 R G G F G G R G G G R G G R G G F G G R G R G G F G G R G G F
 R G G R G G G G D H K P Q G K K T K F E

PI = 6,88



Sequenz Plasmid

GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGTCATCAC
CATCATCATCACGGGTTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCA
CATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTCAAGATCAAAAAGACCCTCCTTTAAGAAGGCTGATGG
AAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGACGACGGTATTAGAATTCAGCTGATCAG
GCCCCGTAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACCGCGAACAGATTGGTGGCGCCAAACAGAAAGC
AGCTCCTGAAGCCAAGAAAACAGAAAGTGGAAAGGCACAGAACCAGTACGGCTTTCAATCTCTTTGTTGGAAACCTAAACT
TTAACAAATCTGCTCCTGAATTAATAAAGTGGTATCAGCGATGTTTTTGTCTAAAAATGATCTTGCTGTTGTGGATGTCAGA
ATTGGTATGACTAGGAAATTTGGTTATGTGGATTTTGAATCTGCTGAAGACCTGGAGAAAGCGTTGGAACCTACTGGTTT
GAAAGTCTTTGGCAATGAAATTAAGCTAGAGAAACCAAAAGGAAAAGACAGTAAGAAAAGAGCAGATGCGAGAACACTTT
TGGCTAAAAATCTCCCTTACAAAGTCACTCAGGATGAATTGAAAGAAGTGTGTAAGATGCTGCGGAGATCAGATTAGTC
AGCAAGGATGGGAAAAGTAAAGGGATTGCTTATTTGAATTTAAGACAGAAGCTGATGCAGAGAAAACCTTTAAGAAAA
GCAGGAACAGAGATCGATGGGCGATCTATTTCCCTGTACTATACGATGGAGAGAAAGGTCAAATCAAGACTATAGAGGTG
GAAAGAATAGCACTTGGAGTGGTGAATCAAAAACCTCTGGTTTAAAGCAACCTCTCCTACAGTGCAACAGAAAGAACTCTT
CAGGAAGTATTTGAGAAAGCAACTTTTATCAAAGTACCCAGAACCAAAATGGCAAATCTAAAGGGTATGCATTTATAGA
GTTTGCTTCATTCGAAGACGCTAAAGAAGCTTTAAATTCCTGTAATAAAAGGGAAATTGAGGCGAGAGCAATCAGGCTGG
AGTTGCAAGGACCCAGGGGATCACCTAATGCCAGAAGCCAGCCATCCAAAACCTCTGTTTGTCAAAGGCCTGTCTGAGGAT
ACCACTGAAGAGACATTAAGGAGTCAATTTGACGGCTCCGTTTCGGGCAAGGATAGTTACTGACCGGGAAACTGGGTCCCTC
CAAAGGGTTTGGTTTTGTAGACTTCAACAGTGAGGAGGATGCCAAAGCTGCCAAGGAGGCCATGGAAGACGGTGAAATTG
ATGAAAATAAAGTTACCTTGGACTGGGCCAAACCTAAGGGTGAAGGTGGCTTCGGGGGTCTGTTGGAGGCAGAGCGGC
TTTGAGGACGAGGTGGTGGTAGAGGAGGCCGAGGAGGATTTGGTGGCAGAGGCCGGGAGGCTTTGGAGGGCAGGAGG
CTTCCGAGGAGGCAGAGGAGGAGGAGGTGACCACAAGCCACAAGGAAAGAAGACGAAGTTTGAATAGAGATCCGGCTGCT
AACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACG
GGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAG
CGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCC
CTTCCTTTTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCT
TTACGGCACTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCG
CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAATCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCT
ATTCTTTTGATTTATAAGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCG
AATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATT

TTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAAT
TTATTATATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCAGGCGAGTT
CCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGT
CAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCT
TTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTTCATTCGTGA
TTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGA
ACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATC
GCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCGGTCAGCCA
GTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGG
GCTTCCCATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCGACATTATCGCGAGCCCATTATATCCCATATAAATCAGCA
TCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTTACTGTT
TATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACACCGCTACC
AGCGGTGGTTGTTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAA
ATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGTCTGCTA
ATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
GGCGACGGTTCGGGCTGACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAAGACCTACACCGAAGTGAATACCT
TACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGA
ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACT
TGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAACAGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCC
TGGCCTTTTGTCTGCGCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTT
GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCTGAT
GCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATATGGTGACTCTCAGTACAATCTGCTGATGC
CGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCTGCTGCGCCCGACACCCGCCAACACCCGC
TGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTC
AGAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGAAGCGATTACAG
ATGTCTGCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTTCTCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCAT
GTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTTCATGGGGGTAATGATACCGA
TGAAACGAGAGAGGATGCTCAGGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAA
CTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGT
TCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGACGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGAC
TTTACGAAACACGGAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTGCGCAGACGTTTTGTCAGCAGCAGTCGCTTACGTT
CGCTCGCGTATCGGTGATTTCATTCTGCTAACAGTAAGGCAACCCCGCCAGCTAGCCGGGTCTCAACGACAGGAGCAC
GATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGCGGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACAGTGA
CGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGG
TCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGGCGG
GACGATAGTCATGCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTTCGAGATCCCGGTG
CCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGTCGCCAGCTG
CATTAAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGA
CGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCGAGCAGG
CGAAAATCTGTTTATGTTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGAT
ATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCG
CAGTGGGAACGATGCCCTCATTTCAGCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCC
GCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCGAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGG
GCCGCTAACAGCGCGATTGCTGGTGACCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGA
AAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGACGGCAGCTTCCACAGCA
ATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTT
ACAGGCTTCGACGCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCG
CGACAATTTGCGACGGCGCTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGT
TGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCGCTTCCACTTTTTCCCGCTTTTCGAGAAACGTGGCT
GGCCTGGTTACACGCGGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCA
CATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGGAAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGGTGTCC
GGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCG
CCGCAAGGAATGGTGATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAA
CAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACC
TGTGGCGCCGTTGATGCCGCGCACGATGCGTCCGGCTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCAC
TATAGG

Tabelle 12: Übersicht über die Proteomanalysen.

G4	Fold change	Ort der Proteine	Zielproteine	Abkürzung der Tabelle
Pu27	4	Zellkern	13	A
Pu27	2	Zellkern	34	B
Pu27	4	ganze Zelle	15	C
Pu27	2	ganze Zelle	42	D
Myc22	4	Zellkern	25	E
Myc22	2	Zellkern	67	F
Myc22	4	ganze Zelle	34	G
Myc22	2	ganze Zelle	87	H

Tabelle 13: Zielproteine von Pu27 mit FC 4 im Zellkern (A).

13 Proteine	Gene & Synonyme	MW (kDa)	Beschreibung
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P67809	YBX1,NSEP1,YB1	35,9	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Q12873	CHD3	226,6	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
Q86V81	ALYREF,ALY,BEF,THOC4	26,9	THO complex subunit 4
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1
Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2
Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein

Tabelle 14: Zielproteine von Pu27 mit FC 2 im Zellkern (B).

34 Proteine	Gene & Synonyme	MW (kDa)	Beschreibung
P09874	PARP1,ADPRT,PPOL	113,1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
P15880	RPS2,RPS4	31,3	40S ribosomal protein S2
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P19338	NCL	76,6	Nucleolin
P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P46781	RPS9	22,6	40S ribosomal protein S9
P67809	YBX1,NSEP1,YB1	35,9	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Q12873	CHD3	226,6	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
Q14157	UBAP2L,KIAA0144,NICE4	114,5	Ubiquitin-associated protein 2-like
Q14669	TRIP12,KIAA0045,ULF	220,4	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
Q3ZCQ8	TIMM50,TIM50,PRO1512	39,6	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50
Q5JTH9	RRP12,KIAA0690	143,7	RRP12-like protein
Q68E01	INTS3,C1orf193,C1orf60	118,1	Integrator complex subunit 3
Q6UN15	FIP1L1,FIP1,RHE	66,5	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1
Q7L3S4	ZNF771	35,7	Zinc finger protein 771
Q86U42	PABPN1,PAB2,PABP2	32,7	Polyadenylate-binding protein 2
Q86V81	ALYREF,ALY,BEF,THOC4	26,9	THO complex subunit 4
Q86YP4	GATAD2A	68,1	Transcriptional repressor p66-alpha
Q8N7H5	PAF1,PD2	60,0	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog
Q8N9T8	KRI1	82,6	Protein KRI1 homolog
Q8WXI9	GATAD2B,KIAA1150	65,3	Transcriptional repressor p66-beta
Q92621	NUP205,C7orf14,KIAA0225	227,9	Nuclear pore complex protein Nup205
Q96QD9	FYT1D1,UIF	35,8	UAP56-interacting factor
Q99590	SCAF11,CASP11,SFRS2IP,SIP1,SRSF2IP	164,7	Protein SCAF11
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1
Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9Y252	RNF6,SPG2	78,1	E3 ubiquitin-protein ligase RNF6
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2

Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein
Q9Y483	MTF2,PCL2	67,1	Metal-response element-binding transcription factor 2

Tabelle 15: Zielproteine von Pu27 mit FC4 in der gesamten Zelle (C).

15 Proteine	Gene & Synonyme	MW (kDa)	Beschreibung
P16989	CSDA,DBPA	40,1	Y-box-binding protein 3
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P67809	YBX1,NSEP1,YB1	35,9	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Q12873	CHD3	226,6	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
Q86V81	ALYREF,ALY,BEF,THOC4	26,9	THO complex subunit 4
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1
Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9HD33	MRPL47,NCM1,CGI-204	29,5	39S ribosomal protein L47, mitochondrial
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2
Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein

Tabelle 16: Zielproteine von Pu27 mit FC 2 in der gesamten Zelle (D).

42 Proteine	Gene & Synonyme	MW (kDa)	Beschreibung
P09874	PARP1,ADPRT,PPOL	113,1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
P15880	RPS2,RPS4	31,3	40S ribosomal protein S2
P16989	CSDA,DBPA	40,1	Y-box-binding protein 3
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P19338	NCL	76,6	Nucleolin
P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P46781	RPS9	22,6	40S ribosomal protein S9
P67809	YBX1,NSEP1,YB1	35,9	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Q12873	CHD3	226,6	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
Q14157	UBAP2L,KIAA0144,NICE4	114,5	Ubiquitin-associated protein 2-like
Q14669	TRIP12,KIAA0045,ULF	220,4	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
Q3ZCQ8	TIMM50,TIM50,PRO1512	39,6	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50
Q5JTH9	RRP12,KIAA0690	143,7	RRP12-like protein
Q68E01	INTS3,C1orf193,C1orf60	118,1	Integrator complex subunit 3
Q6UN15	FIP1L1,FIP1,RHE	66,5	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1
Q7L3S4	ZNF771	35,7	Zinc finger protein 771
Q86U42	PABPN1,PAB2,PABP2	32,7	Polyadenylate-binding protein 2
Q86V81	ALYREF,ALY,BEF,THOC4	26,9	THO complex subunit 4
Q86YP4	GATAD2A	68,1	Transcriptional repressor p66-alpha
Q8IXM3	MRPL41,BMRP,MRPL27,RPML27,PIG3	15,4	39S ribosomal protein L41, mitochondrial
Q8N7H5	PAF1,PD2	60,0	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog
Q8N9T8	KRI1	82,6	Protein KRI1 homolog
Q8WXI9	GATAD2B,KIAA1150	65,3	Transcriptional repressor p66-beta
Q92616	GCN1L1,KIAA0219	292,8	Translational activator GCN1
Q92621	NUP205,C7orf14,KIAA0225	227,9	Nuclear pore complex protein Nup205
Q96L58	B3GALT6	37,1	Beta-1,3-galactosyltransferase 6
Q96QD9	FYTTD1,UIF	35,8	UAP56-interacting factor
Q99590	SCAF11,CASP11,SFRS2IP,SIP1,SRSF2IP	164,7	Protein SCAF11
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1

7 Anhang

Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9H6W3	NO66,C14orf169,MAPJD	71,1	Bifunctional lysine-specific demethylase and histidyl-hydroxylase NO66
Q9H7H0	METTL17,METT11D1	50,7	Methyltransferase-like protein 17, mitochondrial
Q9HD33	MRPL47,NCM1,CGI-204	29,5	39S ribosomal protein L47, mitochondrial
Q9P015	MRPL15,HSPC145	33,4	39S ribosomal protein L15, mitochondrial
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9Y252	RNF6,SPG2	78,1	E3 ubiquitin-protein ligase RNF6
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2
Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein
Q9Y483	MTF2,PCL2	67,1	Metal-response element-binding transcription factor 2

Tabelle 17: Zielproteine von Myc22 mit FC 4 im Zellkern (E).

25 Proteine	Gene & Synonyme	MW (kDa)	Beschreibung
O00257	CBX4	61,4	E3 SUMO-protein ligase CBX4
O95453	PARN,DAN	73,5	Poly(A)-specific ribonuclease PARN
P09211	GSTP1,FAEES3,GST3	23,4	Glutathione S-transferase P
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P36873	PPP1CC	37,0	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit
P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P58107	EPPK1,EPIPL	555,6	Epiplakin
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Q02241	KIF23,KNSL5,MKLP1	110,1	Kinesin-like protein KIF23
Q10570	CPSF1,CPSF160	160,9	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1
Q13427	PPIG	88,6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G
Q14011	CIRBP,A18HNRNP,CIRP	18,6	Cold-inducible RNA-binding protein
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
Q6DD87	ZNF787	40,5	Zinc finger protein 787
Q86U42	PABPN1,PAB2,PABP2	32,7	Polyadenylate-binding protein 2
Q8NEY8	PPHLN1,HSPC206,HSPC232	52,7	Periphilin-1
Q96T88	UHRF1,ICBP90,NP95,RNF106	89,8	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1
Q99590	SCAF11,CASP11,SFRS2IP,SIP1,SRSF2IP	164,7	Protein SCAF11
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1
Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9UKK6	NXT1	15,8	NTF2-related export protein 1
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2
Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein

Tabelle 18: Zielproteine von Myc22 mit FC 2 im Zellkern (F).

67 Proteine	Gene & Synonyme	MW (kDa)	Beschreibung
O00257	CBX4	61,4	E3 SUMO-protein ligase CBX4
O43390	HNRNPR,HNRPR	70,9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
O60293	ZFC3H1,CCDC131,KIAA0546,PSRC2	226,4	Zinc finger C3H1 domain-containing protein
O60506	SYNCRIP,HNRPQ,NSAP1	69,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
O60716	CTNND1,KIAA0384	108,2	Catenin delta-1
O75530	EED	50,2	Polycomb protein EED
O75643	SNRNP200,ASCC3L1,HELIC2,KIAA0788	244,5	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase
O95453	PARN,DAN	73,5	Poly(A)-specific ribonuclease PARN
O95639	CPSF4,CPSF30,NAR,NEB1	30,3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4
P09211	GSTP1,FAEES3,GST3	23,4	Glutathione S-transferase P
P11021	HSPA5,GRP78	72,3	78 kDa glucose-regulated protein
P14866	HNRNPL,HNRPL,P/OKcl.14	64,1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P19338	NCL	76,6	Nucleolin
P26373	RPL13,BBC1,OK/SW-cl.46	24,3	60S ribosomal protein L13
P36873	PPP1CC	37,0	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit
P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P46781	RPS9	22,6	40S ribosomal protein S9
P58107	EPPK1,EPIPL	555,6	Epiplakin
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Q02241	KIF23,KNSL5,MKLP1	110,1	Kinesin-like protein KIF23
Q10570	CPSF1,CPSF160	160,9	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1
Q13045	FLII,FLIL	144,8	Protein flightless-1 homolog
Q13427	PPIG	88,6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G
Q13601	KRR1,HRB2	43,7	KRR1 small subunit processome component homolog
Q14011	CIRBP,A18HNRNP,CIRP	18,6	Cold-inducible RNA-binding protein
Q14669	TRIP12,KIAA0045,ULF	220,4	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
Q14684	RRP1B,KIAA0179	84,4	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B
Q14692	BMS1,BMS1L,KIAA0187	145,8	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog
Q15022	SUZ12,CHET9,JJAZ1,KIAA0160	83,1	Polycomb protein SUZ12
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial

Q6DD87	ZNF787	40,5	Zinc finger protein 787
Q6P2Q9	PRPF8,PRPC8	273,6	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8
Q7L3S4	ZNF771	35,7	Zinc finger protein 771
Q7Z5J4	RAI1,KIAA1820	203,4	Retinoic acid-induced protein 1
Q86U42	PABPN1,PAB2,PABP2	32,7	Polyadenylate-binding protein 2
Q86V81	ALYREF,ALY,BEF,THOC4	26,9	THO complex subunit 4
Q86VP6	CAND1,KIAA0829,TIP120,TIP120A	136,4	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
Q8IX01	SUGP2,KIAA0365,SFRS14	120,2	SURP and G-patch domain-containing protein 2
Q8N8A6	DDX51	72,5	ATP-dependent RNA helicase DDX51
Q8N9T8	KRI1	82,6	Protein KRI1 homolog
Q8NEY8	PPHLN1,HSPC206,HSPC232	52,7	Periphilin-1
Q8TDD1	DDX54	98,6	ATP-dependent RNA helicase DDX54
Q8WXI9	GATAD2B,KIAA1150	65,3	Transcriptional repressor p66-beta
Q8WYP5	AHCTF1,ELYS,TMBS62,MSTP108	252,5	Protein ELYS
Q92621	NUP205,C7orf14,KIAA0225	227,9	Nuclear pore complex protein Nup205
Q96CS4	ZNF689	56,9	Zinc finger protein 689
Q96K58	ZNF668	67,9	Zinc finger protein 668
Q96QD9	FYTDD1,UIF	35,8	UAP56-interacting factor
Q96T88	UHRF1,ICBP90,NP95,RNF106	89,8	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1
Q99590	SCAF11,CASP11,SFRS2IP,SIP1,SRSF2IP	164,7	Protein SCAF11
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1
Q9H0H5	RACGAP1,KIAA1478,MGCRACGAP	71,0	Rac GTPase-activating protein 1
Q9H223	EHD4,HCA10,HCA11,PAST4,FKSG7	61,2	EH domain-containing protein 4
Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9NP66	HMG20A,HMGX1,HMGXB1	40,1	High mobility group protein 20A
Q9NQZ2	UTP3,CRLZ1,SAS10	54,6	Something about silencing protein 10
Q9NVN8	GNL3L	65,6	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9UGU0	TCF20,KIAA0292,SPBP	211,8	Transcription factor 20
Q9UKK6	NXT1	15,8	NTF2-related export protein 1
Q9Y252	RNF6,SPG2	78,1	E3 ubiquitin-protein ligase RNF6
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2
Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein

Q9Y483	MTF2,PCL2	67,1	Metal-response element-binding transcription factor 2
Q9Y4C8	RBM19,KIAA0682	107,3	Probable RNA-binding protein 19

Tabelle 19: Zielproteine von Myc22 mit FC 4 aus der gesamten Zelle (G).

34/34 Proteins	Gene & Synonyms	MW (kDa)	Beschreibung
O00257	CBX4	61,4	E3 SUMO-protein ligase CBX4
O60293	ZFC3H1,CCDC131,KIAA0546,PSRC2	226,4	Zinc finger C3H1 domain-containing protein
O95453	PARN,DAN	73,5	Poly(A)-specific ribonuclease PARN
P09211	GSTP1,FAEES3,GST3	23,4	Glutathione S-transferase P
P16989	CSDA,DBPA	40,1	Y-box-binding protein 3
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P36873	PPP1CC	37,0	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit
P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P58107	EPPK1,EPIPL	555,6	Epiplakin
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Q02241	KIF23,KNLS5,MKLP1	110,1	Kinesin-like protein KIF23
Q10570	CPSF1,CPSF160	160,9	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1
Q13427	PPIG	88,6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G
Q14011	CIRBP,A18HNRNP,CIRP	18,6	Cold-inducible RNA-binding protein
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
Q4KMP7	TBC1D10B,FP2461	87,2	TBC1 domain family member 10B
Q6DD87	ZNF787	40,5	Zinc finger protein 787
Q6ZRV2	FAM83H	127,1	Protein FAM83H
Q86U42	PABPN1,PAB2,PABP2	32,7	Polyadenylate-binding protein 2
Q8IXM3	MRPL41,BMRP,MRPL27,RPML27,PIG3	15,4	39S ribosomal protein L41, mitochondrial
Q8NEY8	PPHLN1,HSPC206,HSPC232	52,7	Periphrin-1
Q96A35	MRPL24	24,9	39S ribosomal protein L24, mitochondrial
Q96T88	UHRF1,ICBP90,NP95,RNF106	89,8	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1
Q99590	SCAF11,CASP11,SFRS2IP,SIP1,SRSF2IP	164,7	Protein SCAF11
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1
Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9HD33	MRPL47,NCM1,CGI-204	29,5	39S ribosomal protein L47, mitochondrial

Q9P015	MRPL15,HSPC145	33,4	39S ribosomal protein L15, mitochondrial
Q9UBF2	COPG2	97,6	Coatomer subunit gamma-2
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9UKK6	NXT1	15,8	NTF2-related export protein 1
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2
Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein

Tabelle 20: Zielproteine von Myc22 mit FC 2 aus der gesamten Zelle (H).

87 Proteine	Gene & Synonyme	MW (kDa)	Beschreibung
O00257	CBX4	61,4	E3 SUMO-protein ligase CBX4
O43390	HNRNPR,HNRPR	70,9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
O60293	ZFC3H1,CCDC131,KIAA0546,PSRC2	226,4	Zinc finger C3H1 domain-containing protein
O60506	SYNCRIP,HNRPQ,NSAP1	69,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
O60716	CTNND1,KIAA0384	108,2	Catenin delta-1
O75122	CLASP2,KIAA0627	141,1	CLIP-associating protein 2
O75530	EED	50,2	Polycomb protein EED
O75643	SNRNP200,ASCC3L1,HELIC2,KIAA0788	244,5	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase
O95453	PARN,DAN	73,5	Poly(A)-specific ribonuclease PARN
O95639	CPSF4,CPSF30,NAR,NEB1	30,3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4
P09211	GSTP1,FAEES3,GST3	23,4	Glutathione S-transferase P
P11021	HSPA5,GRP78	72,3	78 kDa glucose-regulated protein
P11532	DMD	426,8	Dystrophin
P14866	HNRNPL,HNRPL,P/OKcl.14	64,1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
P16989	CSDA,DBPA	40,1	Y-box-binding protein 3
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P17858	PFKL	85,0	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type
P19338	NCL	76,6	Nucleolin
P26373	RPL13,BBC1,OK/SW-cl.46	24,3	60S ribosomal protein L13
P36873	PPP1CC	37,0	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit

P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P46779	RPL28	15,7	60S ribosomal protein L28
P46781	RPS9	22,6	40S ribosomal protein S9
P52292	KPNA2,RCH1,SRP1	57,9	Importin subunit alpha-1
P58107	EPPK1,EPIPL	555,6	Epiplakin
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Q02241	KIF23,KNSL5,MKLP1	110,1	Kinesin-like protein KIF23
Q10570	CPSF1,CPSF160	160,9	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1
Q13045	FLII,FLIL	144,8	Protein flightless-1 homolog
Q13427	PPIG	88,6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G
Q13601	KRR1,HRB2	43,7	KRR1 small subunit processome component homolog
Q14011	CIRBP,A18HNRNP,CIRP	18,6	Cold-inducible RNA-binding protein
Q14669	TRIP12,KIAA0045,ULF	220,4	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
Q14684	RRP1B,KIAA0179	84,4	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B
Q14692	BMS1,BMS1L,KIAA0187	145,8	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog
Q15022	SUZ12,CHET9,JJAZ1,KIAA0160	83,1	Polycomb protein SUZ12
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
Q16822	PCK2,PEPCK2	70,7	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial
Q4KMP7	TBC1D10B,FP2461	87,2	TBC1 domain family member 10B
Q5JTW2	CEP78,C9orf81	76,4	Centrosomal protein of 78 kDa
Q6DD87	ZNF787	40,5	Zinc finger protein 787
Q6P158	DHX57	155,6	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57
Q6P2Q9	PRPF8,PRPC8	273,6	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8
Q6ZRV2	FAM83H	127,1	Protein FAM83H
Q7L3S4	ZNF771	35,7	Zinc finger protein 771
Q7Z5J4	RAI1,KIAA1820	203,4	Retinoic acid-induced protein 1
Q86U42	PABPN1,PAB2,PABP2	32,7	Polyadenylate-binding protein 2
Q86V81	ALYREF,ALY,BEF,THOC4	26,9	THO complex subunit 4
Q86VP6	CAND1,KIAA0829,TIP120,TIP120A	136,4	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
Q8IX01	SUGP2,KIAA0365,SFRS14	120,2	SURP and G-patch domain-containing protein 2
Q8IXM3	MRPL41,BMRP,MRPL27,RPML27,PIG3	15,4	39S ribosomal protein L41, mitochondrial
Q8N8A6	DDX51	72,5	ATP-dependent RNA helicase DDX51
Q8N9T8	KRI1	82,6	Protein KRI1 homolog
Q8NEY8	PPHLN1,HSPC206,HSPC232	52,7	Periplin-1

Q8TDD1	DDX54	98,6	ATP-dependent RNA helicase DDX54
Q8WXI9	GATAD2B,KIAA1150	65,3	Transcriptional repressor p66-beta
Q8WYP5	AHCTF1,ELYS,TMBS62,MSTP108	252,5	Protein ELYS
Q92621	NUP205,C7orf14,KIAA0225	227,9	Nuclear pore complex protein Nup205
Q96A35	MRPL24	24,9	39S ribosomal protein L24, mitochondrial
Q96CS4	ZNF689	56,9	Zinc finger protein 689
Q96K58	ZNF668	67,9	Zinc finger protein 668
Q96PV6	LENG8,KIAA1932	86,1	Leukocyte receptor cluster member 8
Q96QD9	FYTDD1,UIF	35,8	UAP56-interacting factor
Q96T88	UHRF1,ICBP90,NP95,RNF106	89,8	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1
Q99590	SCAF11,CASP11,SFRS2IP,SIP1,SRSF2IP	164,7	Protein SCAF11
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1
Q9BX40	LSM14B,C20orf40,FAM61B,RAP55B	42,1	Protein LSM14 homolog B
Q9H0H5	RACGAP1,KIAA1478,MGCRACGAP	71,0	Rac GTPase-activating protein 1
Q9H223	EHD4,HCA10,HCA11,PAST4,FKSG7	61,2	EH domain-containing protein 4
Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9HC36	RNMTL1,MRM3,HC90	47,0	rRNA methyltransferase 3, mitochondrial
Q9HD33	MRPL47,NCM1,CGI-204	29,5	39S ribosomal protein L47, mitochondrial
Q9NP66	HMG20A,HMGX1,HMGXB1	40,1	High mobility group protein 20A
Q9NQZ2	UTP3,CRLZ1,SAS10	54,6	Something about silencing protein 10
Q9NVN8	GNL3L	65,6	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein
Q9P015	MRPL15,HSPC145	33,4	39S ribosomal protein L15, mitochondrial
Q9UBF2	COPG2	97,6	Coatomer subunit gamma-2
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9UGU0	TCF20,KIAA0292,SPBP	211,8	Transcription factor 20
Q9UKK6	NXT1	15,8	NTF2-related export protein 1
Q9UN86	G3BP2,KIAA0660	54,1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2
Q9Y252	RNF6,SPG2	78,1	E3 ubiquitin-protein ligase RNF6
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2
Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein
Q9Y483	MTF2,PCL2	67,1	Metal-response element-binding transcription factor 2
Q9Y4C8	RBM19,KIAA0682	107,3	Probable RNA-binding protein 19

Tabelle 21: FC(log2)- und p-Werte der Zielproteine von Pu27 mit FC 4 im Zellkern (A).

	Pu27 / Linear		Pu27 / PhenDC3		Myc22 / Linear		Myc22 / PhenDC3	
13 Proteine	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value
P17480	3,78626414	2,0016E-08	2,49451617	2,856E-09	4,88174552	7,7401E-16	3,59141724	1,3787E-12
P38159	3,6454297	2,005E-06	4,60942431	0,00037813	3,19059643	0,00027169	6,71777446	7,3855E-07
P67809	5,10730126	0,00230848	2,66460993	0,0306972	6,01425339	1,5619E-07	0,16695568	0,90904453
Q00839	3,75117915	1,7772E-11	2,70443455	2,9735E-09	4,22987617	1,4423E-05	3,9888054	5,9056E-05
Q12873	9,96578428		9,96578428		1,67024114	0,04329102	1,02982628	0,2499427
Q16540	2,88457497	0,00079648	2,79002204	0,00743951	3,93653553	5,3516E-08	2,26298517	5,8865E-06
Q86V81	2,16187253	0,02256286	4,77527567	0,01344131	1,80649063	0,00116704	2,0889264	0,00256479
Q9BWE0	5,44916883	7,8908E-06	2,76910978	1,4488E-07	6,18652493	6,1205E-05	3,14594861	0,00161344
Q9H2U1	2,85508452	1,3676E-06	3,72270493	1,4534E-13	3,01428759	2,372E-13	4,16539975	1,2703E-15
Q9UBU9	3,13348129	0,00033488	3,8212968	8,4081E-06	8,46502116	0,00180696	7,55671037	0,00578101
Q9Y2T7	9,96578428		9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q9Y2W1	5,10719551	3,0813E-08	4,07289816	3,4777E-09	8,12975373	0,00060979	6,97718553	0,00085689
Q9Y3Y2	2,11322927	0,01884088	4,36258812	2,952E-08	3,62870186	0,00072323	5,2872221	9,3068E-05

Tabelle 22: FC(log2)- und p-Werte der Zielproteine von Pu27 mit FC 2 im Zellkern (B).

	Pu27 / Linear		Pu27 / PhenDC3		Myc22 / Linear		Myc22 / PhenDC3	
34 Proteine	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value
P09874	0,99618109	0,00016803	1,34470166	9,457E-07	-1,45903458	4,4035E-08	-0,53692692	0,01579231
P15880	1,32970661	5,526E-06	1,27176009	0,00030893	1,72988466	4,4056E-07	0,94627118	0,00239365
P17480	3,78626414	2,0016E-08	2,49451617	2,856E-09	4,88174552	7,7401E-16	3,59141724	1,3787E-12
P19338	3,7795638	9,0981E-09	0,99778231	3,7053E-05	1,60344991	1,1854E-06	4,64125237	1,0765E-14
P38159	3,6454297	2,005E-06	4,60942431	0,00037813	3,19059643	0,00027169	6,71777446	7,3855E-07
P46781	1,87037343	8,1526E-08	1,1238714	1,9805E-05	2,34815686	6,8579E-12	1,02932578	3,7561E-05
P67809	5,10730126	0,00230848	2,66460993	0,0306972	6,01425339	1,5619E-07	0,16695568	0,90904453
Q00839	3,75117915	1,7772E-11	2,70443455	2,9735E-09	4,22987617	1,4423E-05	3,9888054	5,9056E-05
Q12873	9,96578428		9,96578428		1,67024114	0,04329102	1,02982628	0,2499427

7 Anhang

Q14157	1,12379842	0,04011299	0,99363281	0,00017497	0,93352259	0,01067172	1,16646345	0,00472495
Q14669	3,05181101	2,7026E-06	1,35452887	0,00021439	1,48937435	0,01689165	1,34548679	0,03470045
Q16540	2,88457497	0,00079648	2,79002204	0,00743951	3,93653553	5,3516E-08	2,26298517	5,8865E-06
Q3ZCQ8	1,56813202	0,02640717	1,3249841	0,03191408	0,57960599	0,39726121	0,26520325	0,7750655
Q5JTH9	1,35287308	0,00170381	1,32102519	0,03608752	1,42165237	0,0195082	0,36384999	0,65908334
Q68E01	1,42185862	0,03610703	1,45060471	0,04482571				
Q6UN15	1,7727471	3,0813E-08	1,06071031	0,00090453	2,46699247	0,00014211	0,92867633	0,17546543
Q7L3S4	4,30069361	0,00335688	1,36932404	0,00375315	5,11280868	5,2197E-11	1,45409451	0,00023308
Q86U42	1,06400714	0,02701567	1,83939037	0,01344131	2,34182543	0,00916489	3,53212761	0,00357019
Q86V81	2,16187253	0,02256286	4,77527567	0,01344131	1,80649063	0,00116704	2,0889264	0,00256479
Q86YP4	2,24698476	0,00299757	1,23237018	0,01316356	2,20811096	1,2228E-06	0,98529425	0,00671352
Q8N7H5	1,73151325	0,00619253	1,00318509	0,03924751	1,47688122	4,9186E-06	0,68630153	0,0059212
Q8N9T8	2,91974755	4,7421E-08	1,08519374	2,3813E-05	4,49574997	1,0219E-05	1,67425224	0,03452997
Q8WXI9	2,31994442	9,6712E-06	1,60195428	0,04051853	2,21479734	0,00013662	1,22429851	0,02512944
Q92621	1,65856418	7,4251E-05	1,01088134	0,00046411	1,60622825	0,0002508	1,38459168	0,00102813
Q96QD9	1,61978691	0,01271093	1,03376634	0,00787486	1,83756726	9,5834E-06	1,03480367	0,00515529
Q99590	2,90154691	0,02376327	1,51239692	0,01633434	2,13723385	0,00228008	2,50972456	0,00015787
Q9BWE0	5,44916883	7,8908E-06	2,76910978	1,4488E-07	6,18652493	6,1205E-05	3,14594861	0,00161344
Q9H2U1	2,85508452	1,3676E-06	3,72270493	1,4534E-13	3,01428759	2,372E-13	4,16539975	1,2703E-15
Q9UBU9	3,13348129	0,00033488	3,8212968	8,4081E-06	8,46502116	0,00180696	7,55671037	0,00578101
Q9Y252	2,60130977	0,03677195	1,2330587	0,02610959	9,96578428		1,51279671	5,8718E-05
Q9Y2T7	9,96578428		9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q9Y2W1	5,10719551	3,0813E-08	4,07289816	3,4777E-09	8,12975373	0,00060979	6,97718553	0,00085689
Q9Y3Y2	2,11322927	0,01884088	4,36258812	2,952E-08	3,62870186	0,00072323	5,2872221	9,3068E-05
Q9Y483	3,34025553	1,4453E-06	1,18089622	0,00387961	3,90123118	1,7125E-05	1,74774198	0,00084758

Tabelle 23: FC(log2)- und p-Werte der Zielproteine von Pu27 mit FC 4 aus der gesamten Zelle (C).

	Pu27 / Linear		Pu27 / PhenDC3		Myc22 / Linear		Myc22 / PhenDC3	
15 Proteine	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value
P16989	5,98013932	0,00021714	3,37640598	3,0953E-07	9,96578428		4,22088823	7,6002E-09
P17480	3,78626414	2,0016E-08	2,49451617	2,856E-09	4,88174552	7,7401E-16	3,59141724	1,3787E-12
P38159	3,6454297	2,005E-06	4,60942431	0,00037813	3,19059643	0,00027169	6,71777446	7,3855E-07
P67809	5,10730126	0,00230848	2,66460993	0,0306972	6,01425339	1,5619E-07	0,16695568	0,90904453
Q00839	3,75117915	1,7772E-11	2,70443455	2,9735E-09	4,22987617	1,4423E-05	3,9888054	5,9056E-05
Q12873	9,96578428		9,96578428		1,67024114	0,04329102	1,02982628	0,2499427
Q16540	2,88457497	0,00079648	2,79002204	0,00743951	3,93653553	5,3516E-08	2,26298517	5,8865E-06
Q86V81	2,16187253	0,02256286	4,77527567	0,01344131	1,80649063	0,00116704	2,0889264	0,00256479
Q9BWE0	5,44916883	7,8908E-06	2,76910978	1,4488E-07	6,18652493	6,1205E-05	3,14594861	0,00161344
Q9H2U1	2,85508452	1,3676E-06	3,72270493	1,4534E-13	3,01428759	2,372E-13	4,16539975	1,2703E-15
Q9HD33	3,62159084	2,8752E-05	2,04112723	2,5121E-05	5,12790135	9,7227E-05	2,34546597	0,00351372
Q9UBU9	3,13348129	0,00033488	3,8212968	8,4081E-06	8,46502116	0,00180696	7,55671037	0,00578101
Q9Y2T7	9,96578428		9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q9Y2W1	5,10719551	3,0813E-08	4,07289816	3,4777E-09	8,12975373	0,00060979	6,97718553	0,00085689
Q9Y3Y2	2,11322927	0,01884088	4,36258812	2,952E-08	3,62870186	0,00072323	5,2872221	9,3068E-05

Tabelle 24: FC(log2)- und p-Werte der Zielproteine von Pu27 mit FC 2 aus der gesamten Zelle (D).

	Pu27 / Linear		Pu27 / PhenDC3		Myc22 / Linear		Myc22 / PhenDC3	
42 Proteine	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value
P09874	0,996181088	0,000168026	1,344701657	9,45697E-07	-1,45903458	4,4035E-08	-0,53692692	0,015792311
P15880	1,329706607	5,526E-06	1,271760088	0,000308929	1,729884657	4,40561E-07	0,946271176	0,002393647
P16989	5,980139325	0,000217136	3,376405976	3,09531E-07	9,965784285		4,220888231	7,60018E-09
P17480	3,786264139	2,00156E-08	2,494516172	2,85604E-09	4,881745515	7,74005E-16	3,591417239	1,37866E-12
P19338	3,779563802	9,09812E-09	0,997782313	3,70525E-05	1,603449909	1,18536E-06	4,64125237	1,07653E-14
P38159	3,645429698	2,00503E-06	4,609424305	0,000378135	3,190596432	0,000271688	6,717774459	7,38555E-07
P46781	1,870373426	8,15259E-08	1,1238714	1,98047E-05	2,348156861	6,85787E-12	1,029325782	3,75612E-05

7 Anhang

P67809	5,107301264	0,002308481	2,664609927	0,030697198	6,01425339	1,56186E-07	0,166955684	0,909044533
Q00839	3,75117915	1,77717E-11	2,704434546	2,97354E-09	4,229876167	1,44225E-05	3,988805396	5,9056E-05
Q12873	9,965784285		9,965784285		1,670241135	0,043291021	1,029826283	0,249942704
Q14157	1,123798418	0,04011299	0,993632808	0,000174971	0,933522585	0,010671723	1,166463452	0,004724953
Q14669	3,051811007	2,70255E-06	1,354528866	0,000214391	1,489374349	0,016891652	1,34548679	0,03470045
Q16540	2,884574968	0,000796479	2,790022035	0,007439513	3,936535531	5,35157E-08	2,262985165	5,88647E-06
Q3ZCQ8	1,568132024	0,026407166	1,324984105	0,031914085	0,579605985	0,397261214	0,265203248	0,775065505
Q5JTH9	1,352873083	0,001703808	1,321025186	0,036087523	1,421652374	0,019508203	0,363849992	0,659083337
Q68E01	1,421858619	0,036107035	1,450604705	0,044825706				
Q6UN15	1,772747095	3,08128E-08	1,060710305	0,000904534	2,466992473	0,000142113	0,928676325	0,175465431
Q7L3S4	4,300693612	0,003356883	1,369324037	0,003753146	5,112808679	5,2197E-11	1,45409451	0,000233085
Q86U42	1,064007139	0,027015675	1,839390366	0,013441307	2,341825427	0,009164886	3,532127606	0,003570192
Q86V81	2,161872528	0,022562864	4,775275667	0,013441307	1,806490627	0,00116704	2,088926399	0,002564791
Q86YP4	2,246984759	0,00299757	1,232370176	0,013163563	2,208110957	1,22278E-06	0,98529425	0,006713524
Q8IXM3	2,964883729	0,000217136	1,954288295	0,019288454	3,687580565	0,001554596	2,485770429	0,010061312
Q8N7H5	1,731513248	0,006192534	1,003185089	0,039247506	1,476881217	4,91863E-06	0,686301533	0,005921196
Q8N9T8	2,919747548	4,74215E-08	1,08519374	2,3813E-05	4,495749967	1,02189E-05	1,674252242	0,03452997
Q8WXI9	2,319944417	9,67121E-06	1,601954284	0,040518531	2,214797335	0,000136619	1,224298506	0,025129437
Q92616	2,170788548	0,001081169	1,012562572	0,003879605				
Q92621	1,658564184	7,42514E-05	1,01088134	0,00046411	1,60622825	0,000250798	1,384591683	0,001028127
Q96L58	2,213910047	0,011829389	1,218385114	0,001526512	2,097088667	0,114642287	0,83197011	0,620967505
Q96QD9	1,619786906	0,01271093	1,033766336	0,007874857	1,837567261	9,58339E-06	1,034803667	0,005155292
Q99590	2,901546911	0,023763267	1,51239692	0,016334345	2,137233849	0,002280077	2,509724562	0,000157869
Q9BWE0	5,449168825	7,89082E-06	2,769109776	1,44883E-07	6,186524935	6,12054E-05	3,145948607	0,001613439
Q9H2U1	2,855084515	1,36763E-06	3,722704928	1,45337E-13	3,014287587	2,37202E-13	4,165399751	1,27035E-15
Q9H6W3	3,477177468	0,001614554	1,695309878	3,11257E-05	4,255968837	0,03010432	1,400936857	0,606983785
Q9H7H0	4,666662337	2,47654E-05	1,937285745	0,048078352	1,670680957	0,013474751	1,304002355	0,065169094
Q9HD33	3,621590836	2,87516E-05	2,041127233	2,51212E-05	5,127901346	9,72271E-05	2,345465974	0,003513715
Q9P015	1,880066361	7,2451E-05	1,470647182	0,017913546	2,067485979	0,020747604	2,11600093	0,028442909
Q9UBU9	3,133481286	0,000334875	3,8212968	8,40806E-06	8,465021159	0,001806965	7,556710369	0,005781013
Q9Y252	2,60130977	0,036771946	1,2330587	0,026109592	9,965784285		1,512796713	5,87181E-05
Q9Y2T7	9,965784285		9,965784285		9,965784285		9,965784285	
Q9Y2W1	5,107195515	3,08128E-08	4,072898162	3,47768E-09	8,129753726	0,000609787	6,97718553	0,000856893

Q9Y3Y2	2,113229275	0,018840876	4,362588116	2,95199E-08	3,628701862	0,000723228	5,287222095	9,30685E-05
Q9Y483	3,34025553	1,44531E-06	1,18089622	0,003879605	3,901231183	1,71253E-05	1,747741977	0,00084758

Tabelle 25: FC(log2)- und p-Werte der Zielproteine von Myc22 mit FC 4 im Zellkern (E).

	Pu27 / Linear		Pu27 / PhenDC3		Myc22 / Linear		Myc22 / PhenDC3	
25 Proteine	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value
O00257					2,94903435	0,00098234	2,66343791	0,00331269
O95453					2,07367594	0,00024392	2,13229783	0,00050841
P09211	-1,66883083	0,03007015			2,77087134	0,01067172	2,40925615	0,03144606
P17480	3,78626414	2,0016E-08	2,49451617	2,856E-09	4,88174552	7,7401E-16	3,59141724	1,3787E-12
P36873	2,86046767	0,04366553	1,25794694	0,06788288	3,60752286	0,00199728	3,68713433	0,00285351
P38159	3,6454297	2,005E-06	4,60942431	0,00037813	3,19059643	0,00027169	6,71777446	7,3855E-07
P58107			-9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q00839	3,75117915	1,7772E-11	2,70443455	2,9735E-09	4,22987617	1,4423E-05	3,9888054	5,9056E-05
Q02241					9,96578428		9,96578428	
Q10570	2,48065832	0,01505975			2,73247995	0,00010561	2,73156106	0,00028293
Q13427					3,23994218	0,01442289	2,99564932	0,01349399
Q14011	1,56139782	0,07458187	4,48705379	0,00044868	2,81600921	5,7076E-09	6,58171938	1,0765E-14
Q16540	2,88457497	0,00079648	2,79002204	0,00743951	3,93653553	5,3516E-08	2,26298517	5,8865E-06
Q6DD87					9,96578428		9,96578428	
Q86U42	1,06400714	0,02701567	1,83939037	0,01344131	2,34182543	0,00916489	3,53212761	0,00357019
Q8NEY8	0,47878859	0,36177477			2,60132465	0,00017621	2,40183719	0,00139574
Q96T88	2,37564827	0,00196197	0,95128511	0,0080782	3,12865014	9,2711E-05	2,8422268	0,00015892
Q99590	2,90154691	0,02376327	1,51239692	0,01633434	2,13723385	0,00228008	2,50972456	0,00015787
Q9BWE0	5,44916883	7,8908E-06	2,76910978	1,4488E-07	6,18652493	6,1205E-05	3,14594861	0,00161344
Q9H2U1	2,85508452	1,3676E-06	3,72270493	1,4534E-13	3,01428759	2,372E-13	4,16539975	1,2703E-15
Q9UBU9	3,13348129	0,00033488	3,8212968	8,4081E-06	8,46502116	0,00180696	7,55671037	0,00578101
Q9UKK6	9,96578428				9,96578428		9,96578428	
Q9Y2T7	9,96578428		9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q9Y2W1	5,10719551	3,0813E-08	4,07289816	3,4777E-09	8,12975373	0,00060979	6,97718553	0,00085689
Q9Y3Y2	2,11322927	0,01884088	4,36258812	2,952E-08	3,62870186	0,00072323	5,2872221	9,3068E-05

Tabelle 26: FC(log2)- und p-Werte der Zielproteine von Myc22 mit FC 2 im Zellkern (F).

	Pu27 / Linear		Pu27 / PhenDC3		Myc22 / Linear		Myc22 / PhenDC3	
68 Proteine	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value
O00257					2,94903435	0,00098234	2,66343791	0,00331269
O43390	1,27374063	0,07333687	1,46990728	0,00031154	1,60511185	0,00031814	2,65179081	2,528E-06
O60293					9,96578428		9,96578428	
O60506	1,38990385	0,00842655	1,45830011	0,13300627	1,64385671	0,00249316	2,45001143	0,00023981
O60716					1,71462168	0,00063897	1,0312872	0,04391058
O75530	3,18291827	2,54E-05	0,72156178	0,09396182	3,74382354	7,7992E-09	1,12517515	0,00964234
O75643	0,5524641	0,25656983	0,23666907	0,62766248	1,18249312	0,01510308	1,50328014	0,00807703
O95453					2,07367594	0,00024392	2,13229783	0,00050841
O95639	1,51929757	0,03931908	1,39978044	0,06226567	2,10928322	0,00019916	1,60898444	0,00337179
P09211	-1,66883083	0,03007015			2,77087134	0,01067172	2,40925615	0,03144606
P11021	0,48929033	0,0325378	0,54228859	0,00069971	1,84546479	6,4447E-16	1,98449663	8,8688E-16
P14866	0,48040256	0,22780898	0,36220583	0,27845098	1,91845597	0,01390958	1,86028465	0,02998128
P17480	3,78626414	2,0016E-08	2,49451617	2,856E-09	4,88174552	7,7401E-16	3,59141724	1,3787E-12
P19338	3,7795638	9,0981E-09	0,99778231	3,7053E-05	1,60344991	1,1854E-06	4,64125237	1,0765E-14
P26373	0,59679835	0,15001641	1,03680676	1,3816E-05	2,3087374	4,1764E-12	1,19662597	2,1064E-06
P36873	2,86046767	0,04366553	1,25794694	0,06788288	3,60752286	0,00199728	3,68713433	0,00285351
P38159	3,6454297	2,005E-06	4,60942431	0,00037813	3,19059643	0,00027169	6,71777446	7,3855E-07
P46781	1,87037343	8,1526E-08	1,1238714	1,9805E-05	2,34815686	6,8579E-12	1,02932578	3,7561E-05
P58107			-9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q00839	3,75117915	1,7772E-11	2,70443455	2,9735E-09	4,22987617	1,4423E-05	3,9888054	5,9056E-05
Q02241					9,96578428		9,96578428	
Q10570	2,48065832	0,01505975			2,73247995	0,00010561	2,73156106	0,00028293
Q13045					1,69226593	0,03460691	1,98554449	0,04391058
Q13427					3,23994218	0,01442289	2,99564932	0,01349399
Q13601	1,75665262	0,00161455	0,80568733	0,04041211	4,25180849	2,6674E-17	1,28548881	8,0361E-07
Q14011	1,56139782	0,07458187	4,48705379	0,00044868	2,81600921	5,7076E-09	6,58171938	1,0765E-14
Q14669	3,05181101	2,7026E-06	1,35452887	0,00021439	1,48937435	0,01689165	1,34548679	0,03470045
Q14684	1,85290909	8,9381E-07	0,98527786	0,03200957	2,08439853	2,9474E-15	1,17888379	8,0278E-10
Q14692	1,45457209	5,5661E-07	0,51418935	0,02410648	2,86111674	5,7318E-11	1,00274722	0,00135142
Q15022	2,79343047	7,4251E-08	0,82734371	0,02146328	4,22614825	5,071E-11	1,24289825	0,00108391

7 Anhang

Q16540	2,88457497	0,00079648	2,79002204	0,00743951	3,93653553	5,3516E-08	2,26298517	5,8865E-06
Q6DD87					9,96578428		9,96578428	
Q6P2Q9	-0,18820879	0,55994254			1,22345869	0,00087134	1,49594766	0,00022481
Q7L3S4	4,30069361	0,00335688	1,36932404	0,00375315	5,11280868	5,2197E-11	1,45409451	0,00023308
Q7Z5J4	9,96578428		2,30805927	0,02874752	3,12842183	1,0074E-05	1,70052674	0,00023981
Q86U42	1,06400714	0,02701567	1,83939037	0,01344131	2,34182543	0,00916489	3,53212761	0,00357019
Q86V81	2,16187253	0,02256286	4,77527567	0,01344131	1,80649063	0,00116704	2,0889264	0,00256479
Q86VP6	1,04749296	0,01239591	0,5588686	0,00151084	1,48156869	5,0912E-05	1,26597511	0,00057423
Q8IX01	1,49426066	0,09107374			2,31195479	0,00552275	1,83098167	0,02402722
Q8N8A6	1,07603634	0,07871779	0,96461627	0,00085096	3,33623277	3,0617E-06	1,39844828	0,00230244
Q8N9T8	2,91974755	4,7421E-08	1,08519374	2,3813E-05	4,49574997	1,0219E-05	1,67425224	0,03452997
Q8NEY8	0,47878859	0,36177477			2,60132465	0,00017621	2,40183719	0,00139574
Q8TDD1	2,73004295	4,4678E-08	0,60462817	0,54382329	4,07490117	2,7121E-12	1,10425512	7,8873E-05
Q8WXI9	2,31994442	9,6712E-06	1,60195428	0,04051853	2,21479734	0,00013662	1,22429851	0,02512944
Q8WYP5	1,45176308	0,00047294	0,80772032	0,00445173	2,14212628	1,45E-09	1,04234161	0,00024449
Q92621	1,65856418	7,4251E-05	1,01088134	0,00046411	1,60622825	0,0002508	1,38459168	0,00102813
Q96CS4	2,31712732	3,6972E-05	0,73116288	0,00371805	3,63811233	0,00038281	1,54345527	0,04664128
Q96K58	3,05761821	0,00019289	0,95648481	0,00290229	3,0455689	2,0441E-07	1,11634402	0,01579231
Q96QD9	1,61978691	0,01271093	1,03376634	0,00787486	1,83756726	9,5834E-06	1,03480367	0,00515529
Q96T88	2,37564827	0,00196197	0,95128511	0,0080782	3,12865014	9,2711E-05	2,8422268	0,00015892
Q99590	2,90154691	0,02376327	1,51239692	0,01633434	2,13723385	0,00228008	2,50972456	0,00015787
Q9BWE0	5,44916883	7,8908E-06	2,76910978	1,4488E-07	6,18652493	6,1205E-05	3,14594861	0,00161344
Q9H0H5	9,96578428				1,49560752	0,00369436	1,51293829	0,0076983
Q9H223			0,95852126	0,12267536	2,43793766	0,00043223	1,35412552	0,00666731
Q9H2U1	2,85508452	1,3676E-06	3,72270493	1,4534E-13	3,01428759	2,372E-13	4,16539975	1,2703E-15
Q9NP66	9,96578428		1,47047979	0,00407068	9,96578428		1,52355584	0,02198369
Q9NQZ2	1,46198548	0,02337732	0,61727932	0,18983228	2,91979428	1,521E-05	1,2441549	0,02116197
Q9NVN8	2,52421809	0,00323135	0,48167096	0,59430754	1,5959132	0,0007844	1,20033907	0,00488563
Q9UBU9	3,13348129	0,00033488	3,8212968	8,4081E-06	8,46502116	0,00180696	7,55671037	0,00578101
Q9UGU0			0,74636214	0,28903107	2,73160384	0,01134051	1,75500554	0,03205852
Q9UKK6	9,96578428				9,96578428		9,96578428	
Q9Y252	2,60130977	0,03677195	1,2330587	0,02610959	9,96578428		1,51279671	5,8718E-05
Q9Y2T7	9,96578428		9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q9Y2W1	5,10719551	3,0813E-08	4,07289816	3,4777E-09	8,12975373	0,00060979	6,97718553	0,00085689

Q9Y3Y2	2,11322927	0,01884088	4,36258812	2,952E-08	3,62870186	0,00072323	5,2872221	9,3068E-05
Q9Y483	3,34025553	1,4453E-06	1,18089622	0,00387961	3,90123118	1,7125E-05	1,74774198	0,00084758
Q9Y4C8	4,36060909	1,0824E-05	0,94804326	0,00019085	3,99408397	1,2608E-08	1,56579555	0,00276423

Tabelle 27: FC(log2)- und p-Werte der Zielproteine von Myc22 mit FC 4 aus der gesamten Zelle (G).

34 Proteine	Pu27 / Linear		Pu27 / PhenDC3		Myc22 / Linear		Myc22 / PhenDC3	
	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value
O00257					2,94903435	0,00098234	2,66343791	0,00331269
O60293					9,96578428		9,96578428	
O95453					2,07367594	0,00024392	2,13229783	0,00050841
P09211	-1,66883083	0,03007015			2,77087134	0,01067172	2,40925615	0,03144606
P16989	5,98013932	0,00021714	3,37640598	3,0953E-07	9,96578428		4,22088823	7,6002E-09
P17480	3,78626414	2,0016E-08	2,49451617	2,856E-09	4,88174552	7,7401E-16	3,59141724	1,3787E-12
P36873	2,86046767	0,04366553	1,25794694	0,06788288	3,60752286	0,00199728	3,68713433	0,00285351
P38159	3,6454297	2,005E-06	4,60942431	0,00037813	3,19059643	0,00027169	6,71777446	7,3855E-07
P58107			-9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q00839	3,75117915	1,7772E-11	2,70443455	2,9735E-09	4,22987617	1,4423E-05	3,9888054	5,9056E-05
Q02241					9,96578428		9,96578428	
Q10570	2,48065832	0,01505975			2,73247995	0,00010561	2,73156106	0,00028293
Q13427					3,23994218	0,01442289	2,99564932	0,01349399
Q14011	1,56139782	0,07458187	4,48705379	0,00044868	2,81600921	5,7076E-09	6,58171938	1,0765E-14
Q16540	2,88457497	0,00079648	2,79002204	0,00743951	3,93653553	5,3516E-08	2,26298517	5,8865E-06
Q4KMP7					9,96578428		9,96578428	
Q6DD87					9,96578428		9,96578428	
Q6ZRV2					3,06280289	0,00010802	4,35150837	5,8645E-05
Q86U42	1,06400714	0,02701567	1,83939037	0,01344131	2,34182543	0,00916489	3,53212761	0,00357019
Q8IXM3	2,96488373	0,00021714	1,95428829	0,01928845	3,68758056	0,0015546	2,48577043	0,01006131
Q8NEY8	0,47878859	0,36177477			2,60132465	0,00017621	2,40183719	0,00139574
Q96A35	2,12041077	0,06021981	2,43330184	0,00157273	3,77277588	4,1397E-06	2,75915105	4,7047E-05
Q96T88	2,37564827	0,00196197	0,95128511	0,0080782	3,12865014	9,2711E-05	2,8422268	0,00015892

Q99590	2,90154691	0,02376327	1,51239692	0,01633434	2,13723385	0,00228008	2,50972456	0,00015787
Q9BWE0	5,44916883	7,8908E-06	2,76910978	1,4488E-07	6,18652493	6,1205E-05	3,14594861	0,00161344
Q9H2U1	2,85508452	1,3676E-06	3,72270493	1,4534E-13	3,01428759	2,372E-13	4,16539975	1,2703E-15
Q9HD33	3,62159084	2,8752E-05	2,04112723	2,5121E-05	5,12790135	9,7227E-05	2,34546597	0,00351372
Q9P015	1,88006636	7,2451E-05	1,47064718	0,01791355	2,06748598	0,0207476	2,11600093	0,02844291
Q9UBF2	9,96578428				9,96578428		9,96578428	
Q9UBU9	3,13348129	0,00033488	3,8212968	8,4081E-06	8,46502116	0,00180696	7,55671037	0,00578101
Q9UKK6	9,96578428				9,96578428		9,96578428	
Q9Y2T7	9,96578428		9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q9Y2W1	5,10719551	3,0813E-08	4,07289816	3,4777E-09	8,12975373	0,00060979	6,97718553	0,00085689
Q9Y3Y2	2,11322927	0,01884088	4,36258812	2,952E-08	3,62870186	0,00072323	5,2872221	9,3068E-05

Tabelle 28: FC(log2)- und p-Werte der Zielproteine von Myc22 mit FC 2 aus der gesamten Zelle (H).

	Pu27 / Linear		Pu27 / PhenDC3		Myc22 / Linear		Myc22 / PhenDC3	
87 Proteine	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value	Log2	p-value
O00257					2,94903435	0,00098234	2,66343791	0,00331269
O43390	1,27374063	0,07333687	1,46990728	0,00031154	1,60511185	0,00031814	2,65179081	2,528E-06
O60293					9,96578428		9,96578428	
O60506	1,38990385	0,00842655	1,45830011	0,13300627	1,64385671	0,00249316	2,45001143	0,00023981
O60716					1,71462168	0,00063897	1,0312872	0,04391058
O75122					1,34692801	0,04298524	1,57835919	0,03529091
O75530	3,18291827	2,54E-05	0,72156178	0,09396182	3,74382354	7,7992E-09	1,12517515	0,00964234
O75643	0,5524641	0,25656983	0,23666907	0,62766248	1,18249312	0,01510308	1,50328014	0,00807703
O95453					2,07367594	0,00024392	2,13229783	0,00050841
O95639	1,51929757	0,03931908	1,39978044	0,06226567	2,10928322	0,00019916	1,60898444	0,00337179
P09211	-1,66883083	0,03007015			2,77087134	0,01067172	2,40925615	0,03144606
P11021	0,48929033	0,0325378	0,54228859	0,00069971	1,84546479	6,4447E-16	1,98449663	8,8688E-16
P11532					1,89207819	0,0218051	2,10397664	0,03354668
P14866	0,48040256	0,22780898	0,36220583	0,27845098	1,91845597	0,01390958	1,86028465	0,02998128
P16989	5,98013932	0,00021714	3,37640598	3,0953E-07	9,96578428		4,22088823	7,6002E-09
P17480	3,78626414	2,0016E-08	2,49451617	2,856E-09	4,88174552	7,7401E-16	3,59141724	1,3787E-12
P17858	0,73151249	0,17794324	0,54757947	0,51423862	1,86145336	0,03352693	1,68109164	0,03417583

7 Anhang

P19338	3,7795638	9,0981E-09	0,99778231	3,7053E-05	1,60344991	1,1854E-06	4,64125237	1,0765E-14
P26373	0,59679835	0,15001641	1,03680676	1,3816E-05	2,3087374	4,1764E-12	1,19662597	2,1064E-06
P36873	2,86046767	0,04366553	1,25794694	0,06788288	3,60752286	0,00199728	3,68713433	0,00285351
P38159	3,6454297	2,005E-06	4,60942431	0,00037813	3,19059643	0,00027169	6,71777446	7,3855E-07
P46779	-0,28553003	0,71206821	1,30198725	0,0008689	2,20324463	0,00023717	1,30746005	0,00615471
P46781	1,87037343	8,1526E-08	1,1238714	1,9805E-05	2,34815686	6,8579E-12	1,02932578	3,7561E-05
P52292	1,39492138	0,0006299	0,63289313	0,00517253	1,71564455	3,6111E-05	1,0013038	0,00763752
P58107			-9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q00839	3,75117915	1,7772E-11	2,70443455	2,9735E-09	4,22987617	1,4423E-05	3,9888054	5,9056E-05
Q02241					9,96578428		9,96578428	
Q10570	2,48065832	0,01505975			2,73247995	0,00010561	2,73156106	0,00028293
Q13045					1,69226593	0,03460691	1,98554449	0,04391058
Q13427					3,23994218	0,01442289	2,99564932	0,01349399
Q13601	1,75665262	0,00161455	0,80568733	0,04041211	4,25180849	2,6674E-17	1,28548881	8,0361E-07
Q14011	1,56139782	0,07458187	4,48705379	0,00044868	2,81600921	5,7076E-09	6,58171938	1,0765E-14
Q14669	3,05181101	2,7026E-06	1,35452887	0,00021439	1,48937435	0,01689165	1,34548679	0,03470045
Q14684	1,85290909	8,9381E-07	0,98527786	0,03200957	2,08439853	2,9474E-15	1,17888379	8,0278E-10
Q14692	1,45457209	5,5661E-07	0,51418935	0,02410648	2,86111674	5,7318E-11	1,00274722	0,00135142
Q15022	2,79343047	7,4251E-08	0,82734371	0,02146328	4,22614825	5,071E-11	1,24289825	0,00108391
Q16540	2,88457497	0,00079648	2,79002204	0,00743951	3,93653553	5,3516E-08	2,26298517	5,8865E-06
Q16822	1,93826579	0,0360232	0,15254995	0,73733005	1,2992373	0,01253789	1,37251866	0,01333893
Q4KMP7					9,96578428		9,96578428	
Q5JTW2					9,96578428		1,10058026	0,04350907
Q6DD87					9,96578428		9,96578428	
Q6P158	2,04728859	0,19436493	-0,23451997	0,35314899	2,59098608	0,00280349	1,9154469	0,0076983
Q6P2Q9	-0,18820879	0,55994254			1,22345869	0,00087134	1,49594766	0,00022481
Q6ZRV2					3,06280289	0,00010802	4,35150837	5,8645E-05
Q7L3S4	4,30069361	0,00335688	1,36932404	0,00375315	5,11280868	5,2197E-11	1,45409451	0,00023308
Q7Z5J4	9,96578428		2,30805927	0,02874752	3,12842183	1,0074E-05	1,70052674	0,00023981
Q86U42	1,06400714	0,02701567	1,83939037	0,01344131	2,34182543	0,00916489	3,53212761	0,00357019
Q86V81	2,16187253	0,02256286	4,77527567	0,01344131	1,80649063	0,00116704	2,0889264	0,00256479
Q86VP6	1,04749296	0,01239591	0,5588686	0,00151084	1,48156869	5,0912E-05	1,26597511	0,00057423
Q8IX01	1,49426066	0,09107374			2,31195479	0,00552275	1,83098167	0,02402722
Q8IXM3	2,96488373	0,00021714	1,95428829	0,01928845	3,68758056	0,0015546	2,48577043	0,01006131

7 Anhang

Q8N8A6	1,07603634	0,07871779	0,96461627	0,00085096	3,33623277	3,0617E-06	1,39844828	0,00230244
Q8N9T8	2,91974755	4,7421E-08	1,08519374	2,3813E-05	4,49574997	1,0219E-05	1,67425224	0,03452997
Q8NEY8	0,47878859	0,36177477			2,60132465	0,00017621	2,40183719	0,00139574
Q8TDD1	2,73004295	4,4678E-08	0,60462817	0,54382329	4,07490117	2,7121E-12	1,10425512	7,8873E-05
Q8WXI9	2,31994442	9,6712E-06	1,60195428	0,04051853	2,21479734	0,00013662	1,22429851	0,02512944
Q8WYP5	1,45176308	0,00047294	0,80772032	0,00445173	2,14212628	1,45E-09	1,04234161	0,00024449
Q92621	1,65856418	7,4251E-05	1,01088134	0,00046411	1,60622825	0,0002508	1,38459168	0,00102813
Q96A35	2,12041077	0,06021981	2,43330184	0,00157273	3,77277588	4,1397E-06	2,75915105	4,7047E-05
Q96CS4	2,31712732	3,6972E-05	0,73116288	0,00371805	3,63811233	0,00038281	1,54345527	0,04664128
Q96K58	3,05761821	0,00019289	0,95648481	0,00290229	3,0455689	2,0441E-07	1,11634402	0,01579231
Q96PV6	9,96578428				1,61525513	0,002437	1,75868729	0,00616755
Q96QD9	1,61978691	0,01271093	1,03376634	0,00787486	1,83756726	9,5834E-06	1,03480367	0,00515529
Q96T88	2,37564827	0,00196197	0,95128511	0,0080782	3,12865014	9,2711E-05	2,8422268	0,00015892
Q99590	2,90154691	0,02376327	1,51239692	0,01633434	2,13723385	0,00228008	2,50972456	0,00015787
Q9BWE0	5,44916883	7,8908E-06	2,76910978	1,4488E-07	6,18652493	6,1205E-05	3,14594861	0,00161344
Q9BX40			1,85510917	0,04368464	1,9633465	0,00443693	1,79929291	0,00454829
Q9H0H5	9,96578428				1,49560752	0,00369436	1,51293829	0,0076983
Q9H223			0,95852126	0,12267536	2,43793766	0,00043223	1,35412552	0,00666731
Q9H2U1	2,85508452	1,3676E-06	3,72270493	1,4534E-13	3,01428759	2,372E-13	4,16539975	1,2703E-15
Q9HC36	4,58093774	2,0016E-08	-2,00966569	0,00027931	3,85771049	0,00017621	1,24523293	0,00538266
Q9HD33	3,62159084	2,8752E-05	2,04112723	2,5121E-05	5,12790135	9,7227E-05	2,34546597	0,00351372
Q9NP66	9,96578428		1,47047979	0,00407068	9,96578428		1,52355584	0,02198369
Q9NQZ2	1,46198548	0,02337732	0,61727932	0,18983228	2,91979428	1,521E-05	1,2441549	0,02116197
Q9NVN8	2,52421809	0,00323135	0,48167096	0,59430754	1,5959132	0,0007844	1,20033907	0,00488563
Q9P015	1,88006636	7,2451E-05	1,47064718	0,01791355	2,06748598	0,0207476	2,11600093	0,02844291
Q9UBF2	9,96578428				9,96578428		9,96578428	
Q9UBU9	3,13348129	0,00033488	3,8212968	8,4081E-06	8,46502116	0,00180696	7,55671037	0,00578101
Q9UGU0			0,74636214	0,28903107	2,73160384	0,01134051	1,75500554	0,03205852
Q9UKK6	9,96578428				9,96578428		9,96578428	
Q9UN86	0,8490899	0,25575906	1,55474009	0,16108584	1,13586681	0,04251663	1,63521895	0,0130262
Q9Y252	2,60130977	0,03677195	1,2330587	0,02610959	9,96578428		1,51279671	5,8718E-05
Q9Y2T7	9,96578428		9,96578428		9,96578428		9,96578428	
Q9Y2W1	5,10719551	3,0813E-08	4,07289816	3,4777E-09	8,12975373	0,00060979	6,97718553	0,00085689
Q9Y3Y2	2,11322927	0,01884088	4,36258812	2,952E-08	3,62870186	0,00072323	5,2872221	9,3068E-05

Q9Y483	3,34025553	1,4453E-06	1,18089622	0,00387961	3,90123118	1,7125E-05	1,74774198	0,00084758
Q9Y4C8	4,36060909	1,0824E-05	0,94804326	0,00019085	3,99408397	1,2608E-08	1,56579555	0,00276423

Tabelle 29: Zielproteine von Myc22 (gelb), Pu27 (blau) und gemeinsame Zielproteine (grün) mit FC 4.

Proteine	Gene & Synonyme	MW (kDa)	Beschreibung
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein
Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2
Q9UUK6	NXT1	15,8	NTF2-related export protein 1
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1
Q99590	SCAF11,CASP11,SFRS2IP,SIP1,SRSF2IP	164,7	Protein SCAF11
Q96T88	UHRF1,ICBP90,NP95,RNF106	89,8	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1
Q8NEY8	PPHLN1,HSPC206,HSPC232	52,7	Periphilin-1
Q86V81	ALYREF,ALY,BEF,THOC4	26,9	THO complex subunit 4
Q86U42	PABPN1,PAB2,PABP2	32,7	Polyadenylate-binding protein 2
Q6DD87	ZNF787	40,5	Zinc finger protein 787
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
Q14011	CIRBP,A18HNRNP,CIRP	18,6	Cold-inducible RNA-binding protein
Q13427	PPIG	88,6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G
Q12873	CHD3	226,6	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
Q10570	CPSF1,CPSF160	160,9	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1
Q02241	KIF23,KNSL5,MKLP1	110,1	Kinesin-like protein KIF23
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U

P67809	YBX1,NSEP1,YB1	35,9	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
P58107	EPPK1,EPIPL	555,6	Epiplakin
P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P36873	PPP1CC	37,0	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P09211	GSTP1,FAEES3,GST3	23,4	Glutathione S-transferase P
O95453	PARN,DAN	73,5	Poly(A)-specific ribonuclease PARN
O00257	CBX4	61,4	E3 SUMO-protein ligase CBX4

Tabelle 30: Zielproteine von Myc22 (gelb), Pu27 (blau) und gemeinsame Zielproteine (grün) mit FC 2.

Proteine	Gene & Synonyme	MW (kDa)	Beschreibung
Q9Y4C8	RBM19,KIAA0682	107,3	Probable RNA-binding protein 19
Q9Y483	MTF2,PCL2	67,1	Metal-response element-binding transcription factor 2
Q9Y3Y2	CHTOP,C1orf77,FOP,HT031,PP7704	26,4	Chromatin target of PRMT1 protein
Q9Y2W1	THRAP3,TRAP150	108,7	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
Q9Y2T7	YBX2,CSDA3,MSY2	38,5	Y-box-binding protein 2
Q9Y252	RNF6,SPG2	78,1	E3 ubiquitin-protein ligase RNF6
Q9UKK6	NXT1	15,8	NTF2-related export protein 1
Q9UGU0	TCF20,KIAA0292,SPBP	211,8	Transcription factor 20
Q9UBU9	NXF1,TAP	70,2	Nuclear RNA export factor 1
Q9NVN8	GNL3L	65,6	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein
Q9NQZ2	UTP3,CRLZ1,SAS10	54,6	Something about silencing protein 10
Q9NP66	HMG20A,HMGX1,HMGXB1	40,1	High mobility group protein 20A
Q9H2U1	DHX36,DDX36,KIAA1488,MLEL1,RHAU	114,8	ATP-dependent RNA helicase DHX36
Q9H223	EHD4,HCA10,HCA11,PAST4,FKSG7	61,2	EH domain-containing protein 4

Q9H0H5	RACGAP1,KIAA1478,MGCRACGAP	71,0	Rac GTPase-activating protein 1
Q9BWE0	REPIN1,RIP60,ZNF464	63,6	Replication initiator 1
Q99590	SCAF11,CASP11,SFRS2IP,SIP1,SRSF2IP	164,7	Protein SCAF11
Q96T88	UHRF1,ICBP90,NP95,RNF106	89,8	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1
Q96QD9	FYTTD1,UIF	35,8	UAP56-interacting factor
Q96K58	ZNF668	67,9	Zinc finger protein 668
Q96CS4	ZNF689	56,9	Zinc finger protein 689
Q92621	NUP205,C7orf14,KIAA0225	227,9	Nuclear pore complex protein Nup205
Q8WYP5	AHCTF1,ELYS,TMBS62,MSTP108	252,5	Protein ELYS
Q8WXI9	GATAD2B,KIAA1150	65,3	Transcriptional repressor p66-beta
Q8TDD1	DDX54	98,6	ATP-dependent RNA helicase DDX54
Q8NEY8	PPHLN1,HSPC206,HSPC232	52,7	Periphrin-1
Q8N9T8	KRI1	82,6	Protein KRI1 homolog
Q8N8A6	DDX51	72,5	ATP-dependent RNA helicase DDX51
Q8N7H5	PAF1,PD2	60,0	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog
Q8IX01	SUGP2,KIAA0365,SFRS14	120,2	SURP and G-patch domain-containing protein 2
Q86YP4	GATAD2A	68,1	Transcriptional repressor p66-alpha
Q86VP6	CAND1,KIAA0829,TIP120,TIP120A	136,4	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
Q86V81	ALYREF,ALY,BEF,THOC4	26,9	THO complex subunit 4
Q86U42	PABPN1,PAB2,PABP2	32,7	Polyadenylate-binding protein 2
Q7Z5J4	RAI1,KIAA1820	203,4	Retinoic acid-induced protein 1
Q7L3S4	ZNF771	35,7	Zinc finger protein 771
Q6UN15	FIP1L1,FIP1,RHE	66,5	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1
Q6P2Q9	PRPF8,PRPC8	273,6	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8
Q6DD87	ZNF787	40,5	Zinc finger protein 787
Q68E01	INTS3,C1orf193,C1orf60	118,1	Integrator complex subunit 3
Q5JTH9	RRP12,KIAA0690	143,7	RRP12-like protein
Q3ZCQ8	TIMM50,TIM50,PRO1512	39,6	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50
Q16540	MRPL23,L23MRP,RPL23L	17,8	39S ribosomal protein L23, mitochondrial

Q15022	SUZ12,CHET9,JJAZ1,KIAA0160	83,1	Polycomb protein SUZ12
Q14692	BMS1,BMS1L,KIAA0187	145,8	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog
Q14684	RRP1B,KIAA0179	84,4	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B
Q14669	TRIP12,KIAA0045,ULF	220,4	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
Q14157	UBAP2L,KIAA0144,NICE4	114,5	Ubiquitin-associated protein 2-like
Q14011	CIRBP,A18HNRNP,CIRP	18,6	Cold-inducible RNA-binding protein
Q13601	KRR1,HRB2	43,7	KRR1 small subunit processome component homolog
Q13427	PIIG	88,6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G
Q13045	FLII,FLIL	144,8	Protein flightless-1 homolog
Q12873	CHD3	226,6	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
Q10570	CPSF1,CPSF160	160,9	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1
Q02241	KIF23,KNSL5,MKLP1	110,1	Kinesin-like protein KIF23
Q00839	HNRNPU,HNRPU,SAFA,U21.1	90,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
P67809	YBX1,NSE1,YB1	35,9	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
P58107	EPPK1,EPIPL	555,6	Epiplakin
P46781	RPS9	22,6	40S ribosomal protein S9
P38159	RBMX,HNRPG,RBMXP1	42,3	RNA-binding motif protein, X chromosome
P36873	PPP1CC	37,0	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit
P26373	RPL13,BBC1,OK/SW-cl.46	24,3	60S ribosomal protein L13
P19338	NCL	76,6	Nucleolin
P17480	UBTF,UBF,UBF1	89,4	Nucleolar transcription factor 1
P15880	RPS2,RPS4	31,3	40S ribosomal protein S2
P14866	HNRNPL,HNRPL,P/OKcl.14	64,1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
P11021	HSPA5,GRP78	72,3	78 kDa glucose-regulated protein
P09874	PARP1,ADPRT,PPOL	113,1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
P09211	GSTP1,FAEES3,GST3	23,4	Glutathione S-transferase P
O95639	CPSF4,CPSF30,NAR,NEB1	30,3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4
O95453	PARN,DAN	73,5	Poly(A)-specific ribonuclease PARN
O75643	SNRNP200,ASCC3L1,HELIC2,KIAA0788	244,5	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase

O75530	EED	50,2	Polycomb protein EED
O60716	CTNND1,KIAA0384	108,2	Catenin delta-1
O60506	SYNCRIP,HNRPQ,NSAP1	69,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
O60293	ZFC3H1,CCDC131,KIAA0546,PSRC2	226,4	Zinc finger C3H1 domain-containing protein
O43390	HNRNPR,HNRPR	70,9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
O00257	CBX4	61,4	E3 SUMO-protein ligase CBX4