

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung	1
II Abstract	4
III Theorie	6
1 Apoptose	6
1.1 Grundlagen.....	6
1.2 Morphologie.....	7
1.3 Mechanismus.....	8
1.4 Regulation.....	10
1.5 Apoptose-induzierende Agenzien.....	12
2 Phosphoproteomics	12
3 Massenspektrometrie	14
3.1 Grundlagen der Massenspektrometrie.....	14
3.2 Ionenerzeugung.....	14
3.2.1 Elektrospray-Ionisation (ESI).....	14
3.2.2 Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation (MALDI).....	15
3.3 Massenanalysatoren.....	16
3.3.1 Time-Of-Flight (TOF).....	16
3.3.2 Ion Trap (IT).....	17
3.3.3 Quadrupol (Q).....	19
3.3.4 Orbitrap.....	19
3.4 Fragmentierungstechniken.....	20
3.4.1 Roepstorff-Fohlmann-Biemann-Nomenklatur.....	20
3.4.2 Collision-induced dissociation (CID).....	21
3.4.3 Electron transfer dissociation (ETD).....	23
3.4.4 Higher-energy collisional dissociation (HCD).....	24
4 MS-basierte, differentielle Proteomanalyse	25
4.1 Proteinidentifikation.....	25
4.2 Proteinquantifizierung.....	28
4.2.1 SILAC.....	29
4.2.2 Limitierungen der Peptidquantifizierung.....	31
5 Ziel der Arbeit	33
IV Material und Methoden	34
1 Zellkultur	34
1.1 Zelllinie und verwendete Kulturmedien.....	34
1.2 Suspensionskultivierung.....	34
1.3 Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung.....	35
1.4 Kryokonservierung.....	35

1.4.1 Einfrieren.....	35
1.4.2 Auftauen.....	35
1.5 Apoptoseinduktion und Zellernte	36
1.5.1 Etablierung der Apoptoseinduktion in chemisch-definiertem Medium	36
1.5.2 Apoptoseinduktion für Phosphoproteomanalyse	37
2 Apoptosedetektion	37
2.1 Caspase 3/7 Assay	37
2.2 Western Blot Detektion von PARP-1.....	38
2.2.1 Zellaufschluss	39
2.2.2 Proteinbestimmung mit BCA-Assay	39
2.2.3 Acetonfällung	40
2.2.4 SDS-PAGE	40
2.2.5 Western Blot	41
2.3 DNA-Leiter-Nachweis	42
3 Probenaufarbeitung der Phosphopeptidanalysen	43
3.1 Gesamtprotein-Extraktion	43
3.1.1 Zellaufschluss mit Glasbeads	44
3.1.2 Zellaufschluss mit Lysispuffer	45
3.2 Proteinbestimmung	45
3.2.1 Bradford-Assay	45
3.2.2 BCA-Assay.....	45
3.3 Acetonfällung	45
3.4 SDS-PAGE	46
3.5 Tryptischer In-Gel-Verdau.....	46
3.6 Phosphopeptidanreicherung	48
3.6.1 TiO ₂	48
3.6.2 IMAC.....	49
4 Massenspektrometrische Analyse	50
4.1 ESI-Q-TOF	51
4.2 ESI-IT.....	51
4.3 ESI-Q-Orbitrap.....	52
5 Bioinformatische Auswertung.....	53
5.1 Proteinidentifikation	53
5.1.1 Mascot.....	53
5.1.2 Andromeda	55
5.2 Peptidquantifizierung.....	57
5.2.1 ProteinScape	57
5.2.2 MaxQuant	58
V Ergebnisse und Diskussion	60
1 Apoptoseinduktion von Jurkat-Zellen	60
1.1 Kultivierung	60
1.2 Caspase 3/7-Aktivität	61
1.3 Spaltung von PARP-1.....	62
1.4 DNA-Leiter-Nachweis	63
1.5 Zusammenfassung	65
2 Differentielle Analyse des Phosphoproteoms apoptotischer Jurkat-Zellen	66
2.1 Kultivierung	66

2.2	Identifizierte Phosphoproteine	68
2.3	Übersicht der regulierten Proteinphosphorylierungen.....	72
2.3.1	Apoptose.....	75
2.3.2	Zellzyklus und -wachstum.....	80
2.3.3	DNA-Replikation und -Reparatur.....	86
2.3.4	Transkription und Chromatin-Remodellierung	92
2.3.5	Translation	97
2.3.6	RNA-Metabolismus.....	99
2.3.7	Proteintransport	100
2.3.8	Zellstruktur	102
2.4	Regulierte Kinasen und Phosphatasen	105
2.5	DNA Damage Response (DDR).....	107
2.6	Zellzyklus.....	110
2.7	Induktion der Apoptose.....	112
2.7.1	Bcl-2-Proteine	112
2.7.2	Tumor suppressor p53 (TP53)	114
2.7.3	MAPKs.....	115
2.7.4	AKT1, DNA-PK, PKA und PKC- ϵ	119
2.7.5	Caspasen-assoziierte Regulationen	121
3	Zusammenfassung	123
VI	Fazit und Ausblick	126
VII	Literaturverzeichnis.....	128
VIII	Anhang.....	148
1	Sonstige regulierte Proteinphosphorylierungen.....	148
2	Übersicht der identifizierten Phosphoproteine und -peptide	149
3	Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren	150
4	Abkürzungsverzeichnis	150
5	Veröffentlichungen	154
5.1	Fachzeitschriften	154
5.2	Konferenzen.....	154
6	Lebenslauf	155
IX	Danksagungen	156