

Thema: Proteomanalyse des Ribosoms und von Komponenten der Apoptose in T-Zellen

Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Biochemie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. rer. nat. Bernd Thiede

geboren am 1. Mai 1966 in Hamburg

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: 2. August 2002

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. h.c. M. Przybylski

2. Prof. Dr. med. P. H. Kramer

Zusammenfassung

Die Identifizierung von Apoptose-modifizierten Proteinen erfolgte durch Proteomanalyse per 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie. Zunächst wurde eine 2DE-Datenbank errichtet, die im Internet zugänglich ist. Die Identifikation von Proteinen durch Peptidmassenfingeringdruck konnte durch Verwendung einer zweiten Matrix verbessert werden. Die Analyse ausgelassener tryptischer Spaltstellen, N-terminaler Pyroglutamatbildung und Oxidation von Tryptophan konnte die Identifikation von Proteinen mittels Peptidmassenfingeringdruck verbessern. Die Apoptose wurde über den Fas-Rezeptor-Signalweg oder durch DNA-Schädigung mittels Cis-Platin eingeleitet und das Totallysate oder die Kompartimente von Jurkat T-Zellen der Proteomanalyse unterworfen. Große Übereinstimmungen der beiden Prozesse wurden festgestellt. 95 Apoptose-modifizierte Proteine wurden identifiziert, wovon 78 Proteine bisher unbekannt für den Apoptoseprozess waren. Auffällig war, dass 40 % der Proteine RNA-Bindungsmotive enthielten und das 21 Onkoprotein oder Onkoprotein-interagierende Proteine identifiziert wurden. Für 39 Proteine konnten bisher proteolytische Spaltungen vorausgesagt werden. Eine Fülle von Informationen wurde über putative Translokationen der Proteine erhalten. Für das Protein p54^{nrb} wurden drei Caspase-3 Spaltstellen durch die Einführung von Mutationen und die Abhängigkeit der Caspase-3 Spaltung von RNA bewiesen.

Mitochondriale ribosomale Proteine von Mensch, Maus und Ratte wurden durch Abgleichung von EST-Datenbanken mit partiellen Aminosäuresequenzen aus dem Rind bestimmt. Die Konservierung der Sequenzen der Säugetierproteine der mitochondrialen ribosomalen Proteinen war geringer als von den bekannten cytosolischen ribosomalen Proteinen. Weiterhin wurden unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der mitochondrialen Signalsequenzen der Proteine gefunden.

RNA-Protein-Wechselwirkungen im Ribosom wurden nach Quervernetzung auf einzelne Aminosäuren bzw. Nukleotide bestimmt. Die Daten wurden zur Verbesserung von ribosomalen Modellen verwendet. Die mittlerweile erhaltenen Kristallstrukturen des Ribosoms zeigten, dass die Ergebnisse der Quervernetzungsexperimente mit den tatsächlichen RNA-Protein-Wechselwirkungen weitgehend übereinstimmen.

Die Affinität von verschiedenen Komponenten zu einem Zielmolekül zur Bildung von nicht-kovalenten RNA-Peptid-Wechselwirkungen wurde mit Hilfe von MALDI-MS ermittelt. Die Interaktionen sind stark abhängig von der Anzahl der Arginine.

Abstract

Apoptosis-modified proteins were identified by proteome analysis via 2D gel electrophoresis and mass spectrometry. First, a internet-accessible 2DE database was rendered. The identification of the proteins by peptide mass fingerprinting was improved using a second matrix. The analysis of missed tryptic cleavage sites, the formation of N-terminal pyroglutamine and oxidation of tryptophan could improve the identification of proteins by peptide mass fingerprinting.

Apoptosis was induced via the Fas-receptor signaling pathway or by means of DNA damage by cis-platin. The total lysate and the compartments of Jurkat T cells were analyzed by proteome analysis. High similarities between both processes were observed. 95 apoptosis-modified proteins were identified, 78 of these were until now unknown to be involved in apoptosis. Noticeable, 40% of the proteins include a RNA-binding motif and 21 oncogene or oncogene-interacting proteins were identified. A proteolytic cleavage could be predicted for 39 proteins. Some information was received about the putative translocation of the proteins. Three caspase-3 cleavage sites were shown for the protein p54^{nrb} with the incorporation of mutations. Furthermore, the caspase-3 cleavage was dependent on the occurrence of RNA.

Mitochondrial ribosomal proteins of human, mouse and rat were determined by screening of EST-databases with partial amino acid sequences from bovine. The conservation of sequences of mammalian proteins of the mitochondrial ribosomal proteins was less than for known cytosolic ribosomal proteins. Furthermore, different results were obtained considering mitochondrial signal sequences.

RNA-protein interaction within the ribosome were determined on single amino acids and nucleotides, respectively, after cross-linking. These data were used to improve models of the ribosome. The in the meantime obtained 3D-structures of the ribosome showed high consistency with the revealed RNA-protein interaction sites after cross-linking.

The affinity of different components to a target molecule to form RNA-peptide interactions was determined by MALDI-MS. The interactions were strongly dependent on the number of arginines.

Schlagwörter:

Apoptose, Cis-Platin, Fas (CD95/Apo-1), Massenspektrometrie, Proteome, Proteomics, Ribosom, RNA-Protein-Wechselwirkungen

Keywords:

Apoptosis, Cis-Platin, Fas (CD95/Apo-1), Mass spektrometry, Proteome, Proteomics, Ribosome, RNA-Protein-Interactions

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 6 |
| 1. Einleitung..... | 7 |
| 1.1. Die Definition von Proteom und Proteomics..... | 7 |
| 1.2. Die Proteomanalyse..... | 8 |
| 1.3. Die Apoptose..... | 11 |
| 1.3.1. Das Fas-Rezeptor/Fas-Ligand-System..... | 16 |
| 1.3.2. Die DNA-Schädigung und Apoptose durch Cis-Platin..... | 17 |
| 1.3.3. Die Proteomanalyse von Apoptose..... | 19 |
| 1.4. RNA-Protein-Wechselwirkungen..... | 20 |
| 1.4.1. Das Ribosom..... | 20 |
| 1.5. Die Massenspektrometrie in der Biochemie..... | 23 |
| 1.5.1. ESI-Massenspektrometrie..... | 23 |
| 1.5.2. MALDI-Massenspektrometrie..... | 25 |
| 1.5.3. Die Proteinidentifizierung mit Massenspektrometrie..... | 26 |
| 2. Ergebnisse..... | 28 |
| 2.1. Die Proteomanalyse von Apoptose in T-Zellen..... | 28 |
| 2.1.1. Die 2DE-Datenbank von Jurkat-T-Zellen..... | 28 |
| 2.1.2. Die Proteomanalyse der Apoptose über den Fas-Rezeptor-Signalweg und durch DNA-Schädigung mittels Cis-Platin..... | 31 |
| 2.2. Die Proteomanalyse von Ribosomen..... | 34 |
| 2.2.1. Die Proteomanalyse mitochondrialer Ribosomen..... | 35 |
| 2.2.2. Kovalente RNA-Protein-Wechselwirkungen im Ribosom von <i>E. coli</i> | 37 |
| 2.2.3. Nicht-kovalente RNA-Peptid Wechselwirkungen..... | 39 |
| 3. Ausblick..... | 40 |
| Literaturverzeichnis..... | 42 |
| Publikationsverzeichnis..... | 56 |
| Danksagung..... | 60 |

| | |
|--|-----------|
| Lebenslauf..... | 61 |
| Eidesstattliche Versicherung..... | 62 |
| Sonderdrucke..... | 63 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| 2DE | Zweidimensionale Gelelektrophorese |
| Cis-Platin | Cis-Diammin-dichloro-platin (II) |
| DcR | Decoy receptor |
| DISC | Death-inducing signal complex |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| EST | Expressed sequence tag |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| KH | K-homologe |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure |
| MALDI | Matrix-assisted laser desorption/ionisation |
| MRP | Mitochondriales ribosomales Protein |
| MS | Massenspektrometrie |
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometrie |
| Mw | Molekulargewicht |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| PSD | Post source decay |
| RNP | Ribonukleoprotein |
| rRNA | Ribosomale-Ribonukleinsäure |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SRP | Signal recognition particle |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure |

1. Einleitung

1.1. Die Definition von Proteom und Proteomics

Das Proteom wurde definiert als die Gesamtheit der Proteine, die durch das Genom einer Zelle oder eines Organismus kodiert werden [Wasinger et al., 1995; Wilkins et al., 1996]. Im Gegensatz zum statischen System des Genoms, welches in jeder Zelle und in jedem Entwicklungszustand des Organismus unverändert vorliegt, ist das Proteom ein dynamisches, sich ständig veränderndes Gebilde. Einerseits ist die Proteinbiosynthese zell- und gewebespezifisch und andererseits haben die äusseren Bedingungen einen Einfluss auf die Quantität der exprimierten Proteine. Unter Proteomics versteht man die Untersuchung ganzer Proteome oder Subproteome in großem Umfang.

Den immensen Daten, die durch die Genomsequenzierungsprojekte erzeugt wurden, müssen nun biologische Informationen der einzelnen Gene zugeordnet werden. Leider gibt es jedoch keine einfachen Rückschlüsse vom Gen zum erzeugten Protein, da ein Gen durch die hohe kombinatorische Vielfalt wie z.B. durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen zu einer Vielzahl verschiedener Proteinprodukte führen kann. Außerdem läßt auch die mRNA-Menge keinen Rückschluss auf die Quantität eines Proteins zu [Gygi et al., 1999a]. Proteine enthalten im Unterschied zu den Genen mehrere Dimensionen an Informationen welche vielmehr die tatsächlichen als die potentiellen Funktionen darstellen. Diese Informationen enthalten u.a. die Menge, den Status der Modifikation, die subzelluläre Lokalisierung, die dreidimensionale Struktur und Interaktionen mit anderen Molekülen. Daher ist es erforderlich die Proteine auf Proteinebene zu untersuchen.

Ursprünglich ist das Feld der Proteomics aus der Technik der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) entstanden [O`Farrell, 1975; Klose, 1975]. Dabei wird versucht, die in den erzeugten Proteinmustern enthaltenen Informationen zur Lösung biologischer und medizinischer Fragestellungen zu nutzen. Die subtraktive Analyse durch den Vergleich von Proteinmustern aus verschiedenen definierten Zuständen ermöglicht die Charakterisierung der Zustände durch Veränderungen im Proteinmuster. Die rasante Entwicklung der biologischen Massenspektrometrie und der Sequenzdaten ermöglicht inzwischen die schnelle Identifizierung der Proteine vieler Organismen. Die Verwendung des Begriffs Proteomics wurde mittlerweile erweitert. Man spricht z.B. von funktioneller Proteomics [Godovac-Zimmermann und Brown, 2001] oder struktureller Proteomics [Norin und Sundstöm, 2002].

Unter funktioneller Proteomics versteht man u.a. die globale Analyse von Interaktionen, posttranslationalen Modifikationen und molekularen Netzwerken. Dazu können andere Techniken als die 2DE eingesetzt werden, wie z.B. das Two-Hybrid-System [Uetz et al., 2000], die Tandemaffinitätsaufreinigung (Tandem affinity purification; TAP) [Gavin et al., 2002], die Immunopräzipitation in großem Maßstab [Ho et al., 2002], die Oberflächenplasmonresonanz [Nedelkov und Nelson, 2001] für Interaktionsproteomics oder die Kombination von chemischer Modifikation der Proteine und immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) [Ficarro et al., 2002], die Immunopräzipitation mit Anti-Phosphotyrosin [Kaufmann et al., 2001; Stancato und Petricoin, 2001] oder die Phosphoprotein-Isotopenkodierte Affinitätsmarkierung [Goshe et al., 2001] für Phosphoproteomics.

Als strukturelle Proteomics bezeichnet man die Erzeugung von dreidimensionalen Strukturen in großem Maßstab. Die Proteinproduktion erfolgt dabei im Hochdurchsatzverfahren, zur Analyse werden Röntgenstrukturanalysen und multidimensionale Kernresonanzspektroskopie verwendet [Norin und Sundstöm, 2002]. Darüberhinaus werden die gewonnenen Strukturen und die Sequenzinformationen genutzt, um mit bioinformatischen Methoden die dreidimensionalen Strukturen *in silico* vorherzusagen. Mit Hilfe dieser Daten wird dann versucht Aussagen über die Funktionen der Proteine anhand der Strukturdaten zu erhalten.

1.2. Die Proteomanalyse

Die klassische Proteomanalyse beinhaltet folgende Schritte: Die Probenvorbereitung, die Trennung der Proteine mit 2DE, die Analyse der Gele, die Proteinidentifizierung und der Aufbau von 2DE-Datenbanken.

Das Ziel der Probenvorbereitung ist, möglichst viele Proteine reproduzierbar in Lösung zu bringen. Um Proteinverluste zu vermeiden, sollte die Probenvorbereitung aus wenigen Schritten bestehen. Üblicherweise werden die Proben mit denaturierenden Stoffen wie Harnstoff oder Thioharnstoff und nicht-ionischen- oder zwitterionischen Detergenzien wie Triton X-100 oder CHAPS und Ampholyten gelöst. Spezielle Probenvorbereitungsprotokolle müssen für schwierige Proben ausgearbeitet werden.

Die 2DE ist die Technik mit der höchsten Auflösung zur Trennung von Proteinen [Klose und Kobalz, 1995] und daher seit 1975 immer noch die wichtigste Separationstechnik zur Trennung komplexer Proteingemische [Rabilloud, 2002]. In

der ersten Dimension erfolgt dabei die isoelektrische Fokussierung (IEF), in der zweiten Dimension werden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese getrennt. Nach der 2DE können die Proteine direkt aus dem Gel oder nach dem Blotten auf Blotmembranen durch Färbung quantifiziert und identifiziert werden.

Um eine globale Analyse der Proteine durchzuführen, ist die 2DE für komplexe Organismen gewöhnlich nicht ausreichend. Eine Möglichkeit zur Steigerung der Auflösung besteht in der Vorfraktionierung. Die Proben können z.B. durch differentielle Zentrifugation in die Zellkompartimente und Organellen getrennt werden, durch Anwendung von chromatographischen Trennmethoden [Fountoulakis et al. 1999a, Fountoulakis et al., 1999b, Butt et al., 2001] oder mittels Multikompartiment-Elektrolyse [Herbert und Righetti, 2000]. Mit Hilfe von begrenzten pH-Gradienten für die isoelektrische Fokussierung kann die Auflösung weiter erhöht werden [Görg et al., 2000]. Die Begrenzung der pH-Gradienten hat jedoch den Nachteil, dass der Großteil der Proteine einen pI außerhalb dieses Bereiches hat und diese Proteine präzipitieren, wodurch die isoelektrische Fokussierung gestört wird. Eine Vorfraktionierung über diskrete isoelektrische Fraktionen ist deswegen empfehlenswert.

Für die Analyse der Gele werden diese normalerweise mit Coomassie Blau oder Silber gefärbt und anschließend densitometrisch ausgewertet. Die Gele können nach der Färbung entweder visuell oder mit Softwareprogrammen ausgewertet werden. Moderne Softwareprogramme ermöglichen Spoterkennung, Quantifizierung und Gelvergleiche. Jedoch ist die Leistungsfähigkeit dieser Programme stark abhängig von der Gelqualität und beträchtliche Eingriffe des Nutzers sind erforderlich.

Kürzlich wurden fluoreszierende Proteinfärbereagenzien entwickelt, wie z.B. der Farbstoff SYPRO Ruby [Patton, 2000; Berggren et al., 2002] bzw. Ruthenium(II)-tris-(bathophenanthrolindisulfonat) [Rabilloud et al., 2001]. Der größere lineare dynamische Bereich der Intensitäten, die höhere Sensitivität und die Kompatibilität mit der Massenspektrometrie sind die wichtigsten Vorteile gegenüber den konventionellen Färbetechniken [Lopez et al., 2000].

Zur Identifizierung der Proteine können verschiedene Techniken verwendet werden wie z.B. massenspektrometrische Methoden, N-terminale Sequenzierung, Aminosäureanalyse und Immunoblotting [Jungblut und Thiede, 1997].

Peptidmassenfingerabdruck und MS/MS-Fragmentierungen mit MALDI-MS oder ESI-MS von proteolytisch erzeugten Peptiden sind dabei die Methoden der Wahl

aufgrund der Sensitivität im Femtomol-Bereich, der Schnelligkeit der Analysen und der möglichen Automatisierbarkeit.

Die automatische N-terminale Sequenzanalyse hat eine Sensitivität im Bereich von 0.5 bis 1 Picomol mit modernen Geräten. Die Proteine können komplett nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran sequenziert werden. Jedoch dürfen die Proteine nicht N-terminal blockiert sein, was insbesondere bei eukaryotischen Proteinen häufig auftritt. Daher werden die Proteine in der Regel proteolytisch gespalten und die erzeugten Peptide über HPLC getrennt und anschließend sequenziert. Dieser gesamte Prozess ist arbeitsaufwendig und die Sequenzierung ist relativ langsam (~ 45 Minuten pro Aminosäure).

Die Aminosäureanalyse kann mit Mengen > 100 ng durchgeführt werden und ermöglicht eine quantitative Analyse. Aufgrund der kompletten oder partiellen Zerstörung während der Hydrolyse können einige Aminosäuren nicht bestimmt werden, so dass diese Methode nicht zur Proteinidentifizierung als alleinige Methode zuverlässig ist.

Immunoblotting ist eine sehr sensitive Methode, jedoch bedarf es einer Vermutung über das jeweilige zu identifizierende Protein und ein geeigneter Antikörper muss verfügbar sein.

Bei der Proteomanalyse fallen eine große Menge an Daten an, die in 2DE-Datenbanken gespeichert werden sollten. Gewöhnlich werden die 2DE-Gelbilder mit den theoretischen und praktischen Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten, den Proteinnamen und den Zugangsnummern (e.g. NCBI, Swiss-Prot) und der Identifizierungsmethode der identifizierten Proteine versehen.

Bisher ermöglichte die klassische Proteomanalyse über die Kombination von 2DE und Massenspektrometrie die größte Menge an biologisch relevanten Informationen über die Diversität von Proteomen. Obwohl die 2DE immer noch mit Abstand die wichtigste Separationstechnik zur Proteomanalyse ist, hat sie folgende Einschränkungen: die fehlende Automatisierung, die begrenzte Reproduzierbarkeit, die relativ langsame und schwierige technische Durchführung, der Transfer von der ersten auf die zweite Dimension birgt die Gefahr von Proteinverlusten, Proteine mit extremen Eigenschaften (Membranproteine, sehr große-, sehr kleine-, stark saure-, und stark basische Proteine) sind unterrepräsentiert, die Quantifizierung ist unvollkommen und es besteht keine ausreichende Dynamik d.h. sehr selten

vorkommende Proteine können nicht gleichzeitig neben sehr häufigen Proteinen dargestellt werden [Gygi et al., 2000].

Die wichtigsten Entwicklungen zur Proteomanalyse mit 2D-Gelelektrophorese in den letzten Jahren waren der molekulare Scanner [Bienvenut et al., 1999; Binz et al., 1999; Müller et al., 2002], die differentielle Gelelektrophorese (DIGE) [Unlu et al., 1997; Tonge et al., 2001], die metabolische Markierung [Oda et al., 1999], die Kombination der Isotopenkodierte Affinitätsmarkierung (Isotope coded affinity tag; ICAT) mit 2-DE [Smolka et al., 2002] und die Kombination der trägerfreien Elektrophorese (free flow electrophoresis, FFE) für die isoelektrische Fokussierung und anschließende SDS-PAGE der Fraktionen [Hoffmann et al., 2001].

Die wichtigsten Entwicklungen zur Proteomanalyse ohne 2D-Gelelektrophorese sind zur Zeit die Multidimensionale-Flüssigkeitschromatographie (Multidimensional liquid chromatography; MDLC) [Washburn et al., 2001] und die Isotopenkodierte Affinitätsmarkierung [Gygi et al., 1999b; Zhou et al., 2002] in Kombination mit der direkten Identifizierung und Quantifizierung der Proteine mit MS/MS. Damit wurden auch Proteine, die in geringen Mengen vorkommen, sowie Proteine mit extremen Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt identifiziert. Von Proteinchips erhofft man sich ebenfalls Verbesserungen gegenüber der klassischen Proteomanalyse bezüglich der Automatisierung, der Kosten, der Reproduzierbarkeit und des Durchsatzes [Figeys und Pinto, 2001; Zhu et al., 2001].

1.3. Die Apoptose

Die Apoptose ist ein Selbstmordprogramm der Zelle, das innerhalb weniger Stunden die Zelle vollständig eliminiert. Durch die detaillierte Beschreibung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose im Jahre 1972 [Kerr et al., 1972] wurde die physiologische Zellelimination als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods erkannt und der Begriff Apoptose geprägt.

Im Gegensatz zur Nekrose läuft bei der Apoptose ein genetisch gesteuertes Programm ab. In der Regel sind nur einzelne Zellen betroffen und diese reagieren auf Signale von innen, auch wenn sich die Auslöser des Signals außerhalb der Zelle befinden. In der Anfangsphase schrumpfen Zellkern, Cytoplasma und Mitochondrien. Die Zellmembran bleibt unbeschädigt, so dass keine Entzündungsreaktion eintritt. Infolge des sinkenden Zellvolumens verliert die Zelle ihren Kontakt zu den Nachbarzellen, anschließend verdichtet sich das Chromatin und wird zerstückelt.

Schließlich zerfällt die Zelle in membranumschlossene apoptotische Körperchen, die von Nachbar- oder Fresszellen eliminiert werden. Die resorbierten Vesikel werden durch Lysozyme biochemisch aufgeschlossen und auf diese Weise werden die Reste der abgestorbenen Zelle vollständig wiedergewonnen [Häcker, 2000].

Bereits während der Embryonalentwicklung spielt der gezielte apoptotische Tod bestimmter Zellen eine wichtige Rolle. So erfolgt während der Entwicklung des Embryos die Formgebung von Körper und Organen durch Apoptose, beispielsweise werden die Häute zwischen Zehen und Fingern in der menschlichen Embryonalentwicklung apoptotisch entfernt. Im Verlauf des Lebens entfernt Apoptose nicht mehr funktionsfähige, unnötig gewordene und kranke Zellen aus dem Organismus. Zelluläre Eliminationsvorgänge treten meist in Geweben mit hohem Zellumsatz auf wie z.B. die Haut, die Zellen des Magen-Darm-Traktes und die kernhaltigen Zellen des Blutes. Auch veränderte Zellen müssen beseitigt werden. Krankheiten können daraus resultieren, dass Zellen, die sterben sollen, überleben und solche, die überleben sollen, sterben, weil Störungen in der Regulation der Apoptose vorliegen. Die Störung des fein ausbalancierten Gleichgewichtes zwischen Zellproliferation und -elimination verursacht zwangsläufig pathologische Zustände. Diese Störungen werden mit einer Reihe von Krankheitsbildern beim Menschen in Verbindung gebracht. Eine zu niedrige Apoptoserate kann z.B. zu Autoimmunstörungen, Diabetes und zur Proliferation entarteter Zellen führen. Übermäßige Apoptose charakterisiert die Krankheitsbilder von Herzinfarkt, AIDS und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Huntington [Mattson, 2000; Yuan und Yankner, 2000; Evan und Vousden, 2001]. Ein genaues Verständnis der apoptotischen Prozesse und der möglichen Veränderungen birgt daher ein großes Potential für die Entwicklung geeigneter Medikamente bzw. für die Therapie [Nicholson, 2000; Huang und Olf, 2001; Johnstone et al., 2002]

Die Durchführung der Apoptose ist ein komplizierter biochemischer Prozess und benötigt die koordinierte Aktivierung und Exekution vieler Unterprogramme. Die wichtigsten Komponenten des Todesprogrammes sind die Caspasen und deren Inhibitoren und Substrate, die Todesrezeptoren, das Mitochondrium unter der Kontrolle von Proteinen der Bcl-2 Familie und andere Organellen [Hengartner, 2000; Ferri und Kroemer, 2001].

Caspasen spielen eine essentielle Rolle bei der Initiation und Exekution der Apoptose. Diese Proteasen schneiden Proteinsubstrate C-terminal von

Asparaginsäuren und aktivieren, inaktivieren oder zerstören diese [Earnshaw et al., 1999]. Die Substratspezifität wird durch vier Aminosäuren vor der Schnittstelle bestimmt [Thornberry et al., 1997].

Die Umwandlung der inaktiven Procaspasen in die aktive Form kann durch drei Mechanismen erfolgen: Die proteolytische Spaltung von Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3, -6 und -7) durch eine vorgeschaltete Caspase, die Induktion durch eine hohe Konzentration (z.B. Caspase-8) von Initiatorcaspasen [Salvesen und Dixit, 1999] oder die Holoenzymbildung durch Bildung großer Komplexe von Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-9).

Die Caspaseaktivierung wird durch drei Mechanismen reguliert: die Regulation der Transkription der Zymogene, die Blockierung der Induktion durch eine hohe Konzentration einer Caspase durch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie bzw. andere Proteine (z.B. Smac/Diablo, c-FLIP) oder durch Bindung von zellulären Apoptose-Inhibitorproteinen (inhibitor of apoptosis, IAP) an Caspasen.

Zur Zeit sind etwa 100 Caspasesubstrate bekannt. Diese Substrate lassen sich in folgende Klassen einordnen: häufig vorkommende cytoplasmatische Proteine (z.B. Actin, Gelsolin, α -Fodrin), häufig vorkommende Kernproteine (z.B. Lamin A und B, hnRNP C, U1 snRNP), Proteine des DNA-Metabolismus und der DNA-Reparatur (z.B. PARP, RAD51, Topoisomerase I), Kinasen (z.B. Protein Kinase C, p12-aktivierte Kinase, Raf1), andere Proteine der Signalübertragungswege (z.B. Prointerleukine, STAT1, NF κ B), Proteine der Regulation des Zellzyklusses und der Proliferation (z.B. p21Cip/Waf1, pRB, CDC27), Proteine, die mit humanen Krankheiten assoziiert sind (z.B. Huntingtin, Preseniline, amyloides Precursorprotein) und Proteine des Apoptoseprozesses (z.B. Procaspasen, Bcl-2, Bid, ICAD/DFF45) [Earnshaw et al., 1999].

Die Todesrezeptoren sind Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie. Sechs Todesrezeptoren sind bisher bekannt: TNF-R1 (CD120a), Fas (CD95, Apo1), TRAMP (DR3, Apo3), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5, Apo2) und DR6. Die Apoptose wird durch Rezeptor-Oligomerisierung mittels folgender Todesrezeptorliganden vermittelt: TNF für TNF-R1, FasL für Fas, Apo3L für TRAMP, TRAIL für TRAIL-R1 und -R2. Anschließend wird ein Adaptorprotein (FADD, TRADD, RIP, TRAF-2) durch Interaktion von Todesdomänen rekrutiert. Die Adaptorproteine interagieren dann ihrerseits mit einer Procaspase, diese wird autoproteolytisch in die aktive Caspase umgewandelt und leitet die Caspase-Kaskade ein.

Köderrezeptoren (decoy receptors; DcR), die entweder keinen intrazellulären Teil haben oder keine funktionelle Todesdomäne besitzen, konkurrieren mit den Todesrezeptoren um die Todesrezeptorliganden (TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R3 (DcR2) mit TRAIL; DcR3 mit Fas) und inhibieren den apoptotischen Prozess [Ashkenazi und Dixit, 1999].

Proteine der Bcl-2 Familie werden in drei Untergruppen eingeteilt: Die Inhibitoren der Apoptose beeinhaltten die vier Domänen BH1-BH4 (z.B. Bcl-2, Bcl-X_L), die Promotoren der Apoptose enthalten entweder die drei Domänen BH1-BH3 (z.B. Bax, Bak) oder nur die BH3-Domäne (z.B. Bad, Bid, Noxa, PUMA). Bcl-2-Proteine können Homo- und Heterokomplexe bilden und sich somit gegenseitig regulieren. Die Bcl-2-Proteine können mit Membranen assoziiert sein und/oder sich im Cytosol befinden. Die Interaktion mit intrazellulären Membranen wird bei den meisten Bcl-2-Proteinen durch ein hydrophobes C-terminales Segment erreicht. An den Mitochondrien assoziierte antiapoptotische Bcl-2-Proteine verhindern die Apoptose. Proapoptotische Bcl-2-Proteine können das Todessignal vom Cytosol auf die Mitochondrien übertragen. Diese Translokation kann z.B. durch Dephosphorylierung (z.B. Bad) oder Caspase-Spaltung (z.B. Bid) ausgelöst werden. Das apoptotische Signal führt zur Freilassung von Caspasen [Susin et al., 1999a], Caspase-Aktivatoren (z.B. Cytochrom c, Hsp10) [Liu et al., 1996; Samali et al., 1999] und Caspase-unabhängigen Todeseffektoren (z.B. AIF) [Susin et al., 1999b]. Über die Art und Weise wie diese Proteine freigesetzt werden, existieren verschiedene Modelle, die kontrovers diskutiert werden [Desagher und Martinou, 2000]. Zum einen wird das Zerreißen der äußeren mitochondrialen Membran durch Anschwellen der mitochondrialen Matrix angenommen, entweder durch das Ansteigen des mitochondrialen Transmembranpotentials oder durch Öffnung der Permeabilitätstransitionspore. Zum anderen wird die Bildung von großen Kanälen durch Bax allein oder mit VDAC oder durch Bildung lipidischer Poren postuliert. Neben den Mitochondrien sind auch andere Organellen wie das endoplasmatische Retikulum, Lysosomen und der Golgi-Apparat an der Apoptose beteiligt (Ferri und Kroemer, 2001).

Der Prozess der Apoptose wird generell in zwei Kategorien eingeteilt werden: Der intrinsische (oder mitochondriale)- und der extrinsische (oder Todesrezeptor)-Signalweg [Hengartner, 2000] (Abbildung 1).

Der extrinsische Signalweg wird über Todesrezeptoren vermittelt und wird anhand des Fas-Rezeptor/Fas-Ligand (CD95/CD95L)-System unter 1.3.1. beschrieben. Der intrinsische Signalweg wird durch extrazelluläre Signale oder intrazelluläre Ereignisse wie DNA-Schädigung eingeleitet und wird anhand der DNA-Schädigung und Apoptose durch Cis-Platin exemplarisch unter 1.3.2. beschrieben. Beide Signalwege

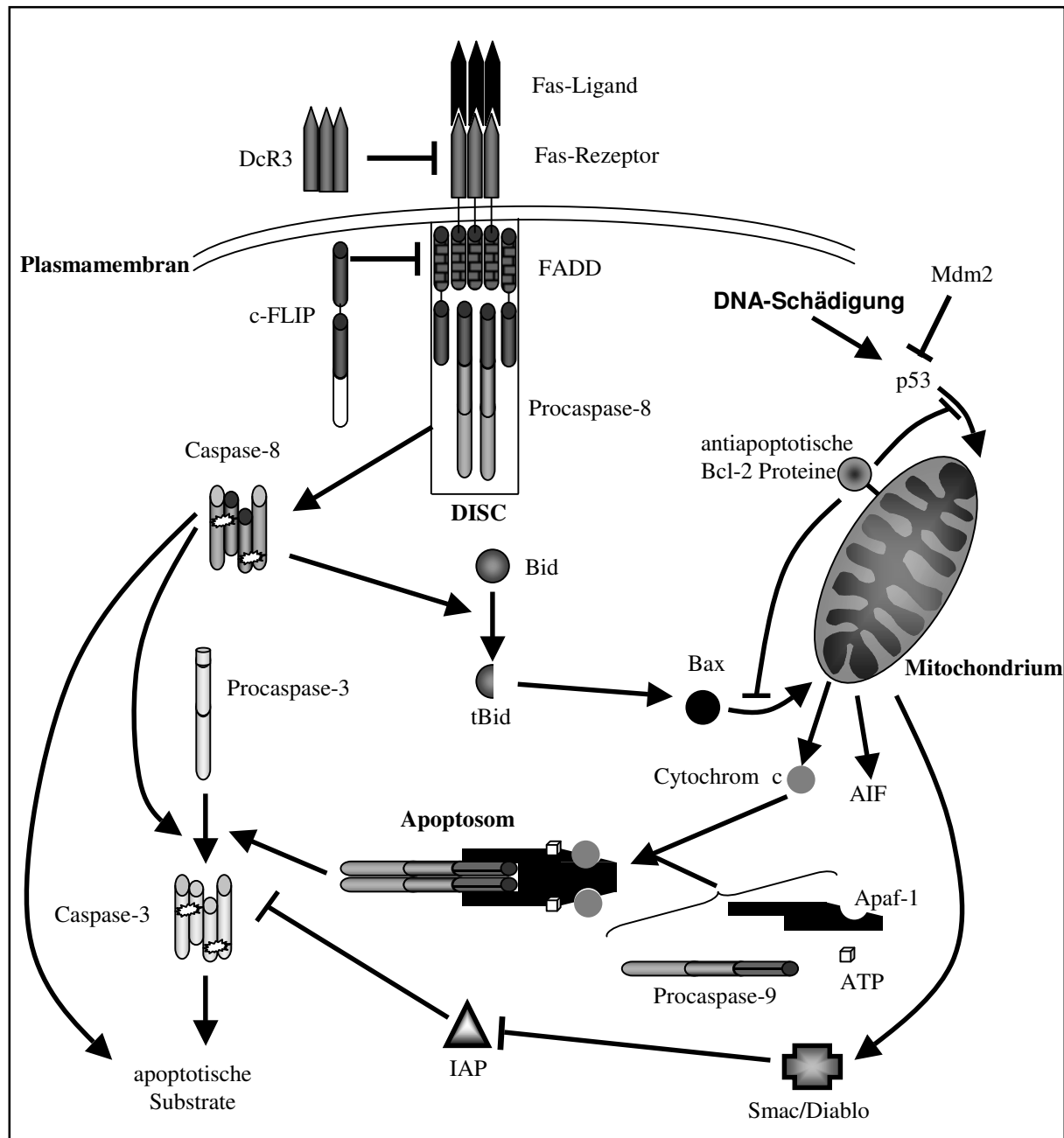


Abbildung 1: Die schematische Darstellung der apoptotischen Signalwege.

(Modifiziert aus: N. Machuy, Dissertation, Universität Potsdam, 2001).

können über das Protein Bid, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, verbunden werden. Nach Aktivierung des extrinsischen Signalweges wird Bid durch

Caspase-8 geschnitten, der C-terminale Teil von Bid (tBid) transloziert anschließend nach posttranslationaler N-Myristylierung zum Mitochondrium, wo es den intrinsischen Signalweg fördert [Zha et al., 2000]. Diese Verbindung der zwei Signalwege ist unter normalen Bedingungen jedoch gering [Gross et al., 1999].

1.3.1. Das Fas-Rezeptor/Fas-Ligand (CD95/CD95L)-System

Der Fas-Rezeptor (bzw. CD95 oder Apo-1) ist ein Mitglied der Todesrezeptor-Superfamilie. Die Wechselwirkung mit dem Fas-Liganden (bzw. CD95L oder Apo-1L) (oder Fas-Antikörper) führt zur Auslösung der Apoptose. Das Fas-Rezeptor/Fas-Ligand-System wird mit verschiedenen Krankheiten wie Erkrankungen des Immunsystems und die Pathogenese von Tumoren in Zusammenhang gebracht [O'Connell et al., 1999; Krammer, 2000; Siegel et al., 2000a].

Für die Bindung des Fas-Rezeptors und des Fas-Liganden existieren zwei Modelle. Das Modell der Post-Liganden-Trimerisierung beschreibt die Bindung durch ein Homotrimer des Fas-Liganden, welcher drei monomere Fas-Rezeptoren bindet; dieses führt schließlich zum Zusammenbau des trimeren Rezeptors. Das neue Modell der Pre-Liganden-Trimerisierung beschreibt zunächst die Trimerisierung des Fas-Rezeptors vor der Bindung des Fas-Liganden [Siegel et al., 2000b].

Das Todessignal führt anschließend zur Bildung eines Tod-induzierenden Signalkomplexes (Death-inducing signal complex, DISC) im Cytoplasma [Kischkel et al., 1995]. Der DISC besteht aus dem trimerisierten Fas-Rezeptor, dem Adaptorprotein FADD, und der Procaspase-8 oder -10. FADD interagiert über eine Todesdomäne mit dem Fas-Rezeptor und über eine Todeseffektordomäne mit der Procaspase. Dadurch wird die Procaspase autoproteolytisch prozessiert und es entsteht die aktive, freigesetzte Caspase. In Typ I-Zellen kann Caspase-8 direkt andere Caspasen aktivieren, während in Typ II-Zellen, über die Spaltung von Bid, der intrinsische Apoptoseweg eingeleitet wird [Scaffidi et al., 1998] (Abbildung 1).

Das Protein Daxx interagiert ebenfalls mit der Todesdomäne von des Fas-Rezeptors, obwohl es selbst keine derartige Domäne enthält. Daxx und FADD binden unabhängig voneinander an den Fas-Rezeptor und aktivieren verschiedene Signalwege. Durch Daxx wird der Apoptose-stimulierende Kinase 1 (ASK1)-Signalweg und anschließend der c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalweg aktiviert und vermittelt Caspase-unabhängigen Zelltod [Yang et al., 1997; Chang et al., 1998; Charette et al., 2001].

Der Fas-induzierte Zelltod kann durch verschiedene Proteine wie DcR3, c-FLIP oder durch Regulatoren des mitochondrialen Signalweges (z.B. Bcl-2-Proteine, Smac/Diablo) kontrolliert werden. Der lösliche Rezeptor DcR3 wurde in Lungen- und Dickdarmkarzinomen amplifiziert und kann ebenfalls an den Fas-Liganden binden und damit die Bindung an den Fas-Rezeptor verhindern [Pitti et al., 1998]. C-FLIP ist strukturell der Caspase-8 ähnlich, jedoch ohne enzymatische Aktivität. C-FLIP kann in den DISC-Komplex eingebaut werden und verhindert dadurch die Aktivierung von Caspase-8 [Scaffidi et al., 1999].

1.3.2. Die DNA-Schädigung und Apoptose durch Cis-Platin

Das Antitumormittel Cis-Diammin-dichloro-Platin (II) (Cis-Platin) wird als Chemotherapeutikum bei Bronchialkarzinomen und bei Tumoren des Urogenitaltraktes eingesetzt. Cis-Platin bindet über das Platin (II) an das N-7 oder O-6 von Guanin-Basen doppelsträngiger DNA, wobei vorwiegend 1,2-Intrastrang-Quervernetzungen entstehen [Jamieson und Lippard, 1999]. Durch diese DNA-Schädigung wird die DNA-Replikation und die Transkription inhibiert.

Der bedeutendste Nachteil von Cis-Platin zur Behandlung von Patienten besteht in den starken Nebenwirkungen, insbesondere bei der Behandlung über längere Zeiträume. Somit ist auch eine Anwendung in hohen Dosen nicht möglich. Intrazellulär wird Cis-Platin rasch hydrolysiert und daher liegen hauptsächlich Aquakomplexe vor, die kinetisch relativ labil sind. Antitumor-Platin-Komplexe der zweiten Generation wie z.B. Cis-Diammin(1,1-cyclobutandicarboxylato)-Platin (II) (Carboplatin) oder Aquo-1,1-bis(aminomethyl)cyclo-hexansulfato-Platin (II) (Spiroplatin) sind stabiler als Cis-Platin. Dieses führt vermutlich zu einem reduzierten Abbau von schädlichen Derivaten, wodurch diese Verbindungen besser verträglich sind und weniger toxische Nebenwirkungen aufweisen.

Die Zelle reagiert auf eine DNA-Schädigung entweder durch Zellzyklusstop, um die DNA-Reparatur zu ermöglichen oder durch Apoptose. Diese Prozesse werden über ein Netzwerk von interagierenden Signaltransduktionswegen eingeleitet [Zhou, Elledge, 2000]. Eine bedeutende Rolle für die zelluläre Antwort auf eine DNA-Schädigung hat der Tumorsuppressor p53 [Bennett, 1999; Bates und Vousden, 1999; Coultas und Strasser, 2000]. Zellen mit Wildtyp-p53 antworten auf DNA-Schädigungen mit Erhöhung von p53. Die Menge an p53 wird im Normalzustand auf einem geringen Level durch einen negativen Feedback-Loop zwischen p53 und dem

Oncoprotein MDM2 gehalten [Momand et al., 2000]. Dabei wird die Ubiquitin-vermittelte Degradation von p53 über die Ubiquitin-Ligase Aktivität von MDM2 gesteuert. Ausgelöst durch Stressbedingungen, wie z.B. eine DNA-Schädigung, wird p53 durch posttranslationale Modifikationen, insbesondere Phosphorylierungen, verändert. Dadurch wird die Interaktion mit MDM2 verringert und die Transkriptionsaktivität erhöht [Vogelstein et al., 2000; Alarcon-Vargas und Ronai, 2002].

Die Tumorsuppressorfunktion von p53 ist abhängig von der DNA-Bindungsaktivität. Wildtyp-p53 bindet kooperativ als Tetramer über die DNA-Bindungsdomäne im Mittelteil des Proteins an eine DNA-Consensus-Sequenz. Durch die Quervernetzung der DNA mit Cis-Platin wird einerseits die Bindungsaffinität von p53 zu der DNA-Bindungsdomäne durch konformative Veränderungen verringert, andererseits zu der modifizierten DNA erhöht [Kasparkova et al., 2001]. Damit könnte die Antitumoraktivität von Cis-Platin auf die Bindungsfähigkeit von p53 zu Platin-modifizierter DNA erklärt werden. Neben der DNA-Bindungsdomäne scheint aber auch die C-terminale Domäne einen Einfluss auf die Interaktion mit platinierter DNA zu haben [Wetzel und Berberich, 2001]. Eine andere Erklärung für den Antitumoreffekt von Cis-Platin im Zusammenhang mit p53 bietet das High-mobility group 1- (HMG-1) Protein. HMG-Proteine binden spezifisch an 1,2-Intrastrang-Quervernetzungen von Cis-Platin und vermitteln dadurch Antitumoreffekte von Cis-Platin [Jamieson und Lippard, 1999]. Diese Bindung wird verstärkt durch die Interaktion von p53 mit HMG-1 [Imamura et al., 2001].

Bei der Vermittlung der Apoptose durch DNA-Schädigung über p53 spielt der Bcl-2-regulierte apoptotische Signalweg eine essentielle Rolle; die Beobachtungen der Bedeutung des Todesrezeptors Fas für diesen Prozess sind hingegen unterschiedlich [Coultas und Strasser, 2000].

Die kontroversen Ergebnisse für das Fas/Fas-Ligand-System bei der p53-vermittelten Apoptose wurden mit Hilfe von transformierten Zelllinien erhalten. Einerseits wurde gezeigt, dass Apoptose durch Cis-Platin und andere DNA schädigende Agentien über das Fas-System vermittelt wird [Fulda et al., 1997; Friesen et al., 1996; Kasibhatla et al., 1998; Müller et al., 1998], andererseits wurden keine Effekte des Fas-Systems gefunden [Gamen et al., 1997; McGahon et al., 1998; Ruiz-Ruiz und Lopez-Rivas, 1999]. Aufgrund der Verwendung transformierter Zelllinien sind unbekannt Mutationen von Genen nicht auszuschließen, die einen

Einfluss auf die Regulation der Apoptose haben können. Experimente mit nicht-transformierten Zelllinien wie Thymozyten von Fas-defizienten Mäusen bzw. Lymphozyten von Mäusen mit mutierten Fas-Ligand, welcher nicht fähig ist an den Fas-Rezeptor zu binden, zeigten eine normale Sensitivität des Fas-System gegenüber Cis-Platin, Etoposid und Doxyrubicin [Newton und Strasser, 2000; O'Connor et al., 2000].

Die p53-vermittelte Apoptose mit Proteinen der Bcl-2-Familie kann durch Inhibierung von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 [Miyashita et al., 1994] oder durch Aktivierung von proapoptotischen Proteinen wie Bax [Miyashita et al., 1995], Noxa [Oda et al., 2000a], PUMA [Yu et al., 2001; Nakano und Vousden, 2001] und das mitochondriale Protein p53AIP1 [Oda et al., 2000b] stattfinden. Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird durch die Translokation von Bax, Noxa und PUMA vom Cytosol zur äußeren Membran des Mitochondriums induziert. Anschließend erfolgt die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen wie z.B. Cytochrom c [Liu et al., 1996] und Smac/Diablo [Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000] [Desagher und Martinou, 2000]. Die Freisetzung von Smac/Diablo führt zur Inhibierung von IAPs. Cytochrom c hingegen bildet mit Apaf-1 und dATP bzw. ATP einen oligomeren Komplex, das Apoptosom, und bindet und prozessiert Procaspase-9, was wiederum zur Aktivierung von weiteren Caspasen führt [Acehan et al., 2002] (Abbildung 1).

Kürzlich wurde die Translokation von p53 an die Mitochondrien durch ein Todessignal festgestellt [Marchenko et al., 2000]. Dabei wurde die Freisetzung von Cytochrom c und ein Feedback-Loop zwischen den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-X_L und p53 beobachtet. Aus diesen Ergebnissen ist auf einen direkten Signalweg von p53 über die Mitochondrien bei der Apoptose zu schließen.

1.3.3. Die Proteomanalyse von Apoptose

Globale Proteomanalysen durch 2DE und anschließende Identifikation der Proteine durch proteinanalytische Methoden von Apoptose wurden in verschiedenen Zellsystemen und mit unterschiedlichen Auslösern des Zelltods durchgeführt: in Jurkat T-Zellen mit anti-Fas-Antikörper [Gerner et al., 2000; Thiede et al., 2001; Thiede et al., 2002] bzw. mit EGTA und Lovastatin [Patterson et al., 1995], in der Burkitt-Lymphomzelllinie BL60 [Brockstedt et al., 1998] mit anti-IgM-Antikörper, in der SV40-immortalisierten humanen Epithelzelllinie 267B1-XR durch Ionisierungsstrahlung [Prasad et al., 1999] und in der humanen akuten

promyelocytischen Leukämiezelllinie HL-60 durch Entzug von all-trans Retinoesäure [Wan et al., 2001]. Dabei wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der veränderten Proteinspots und der identifizierten Proteine erhalten.

1.4. RNA-Protein-Wechselwirkungen

RNA-Protein-Wechselwirkungen haben wesentliche Funktionen bei der Transkriptionskontrolle, der RNA-Prozessierung und der Translationskontrolle [Siomi und Dreyfuss, 1997]. Die Identifizierung und Charakterisierung von RNA-Protein-Wechselwirkungen ist bedeutend für das Verständnis der Regulation dieser wichtigen Prozesse. Verschiedene Bindungsmotive wurden sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene aufgeklärt.

Auf RNA-Ebene unterscheidet man zwischen globalen-, gruppenspezifischen- und typenspezifischen Proteinbindungsmotiven [Keene, 2001]. Globale Motive binden fast alle RNAs. Gruppenspezifische Motive wie z.B. das AU-reiche-Element (ARE) assoziieren mit strukturell bzw. funktionell verwandten Proteinen. Typenspezifische Motive wie z.B. das Eisenreaktionselement (iron response element, IRE) [Rouault und Klausner, 1997] bzw. das Histon-mRNA-Stielschleife-Bindungsprotein [Wang et al., 1999] erkennen einzigartige RNA-Sequenzen.

Ein Anteil der Gene kodiert für RNA-Bindungsmotive z.B. in *S. cerevisiae* (5-8 %), in *C. elegans* (2-3%), in *D. melanogaster* (2-3%) und in *H. sapiens* (2-8 %). Die bekanntesten Proteinsequenzmotive für die RNA-Bindung sind das Ribonukleoprotein (RNP)-Motiv, die Doppelstrang-RNA-Bindungsdomäne (dsRBD) und die K-homologe Domäne (KH-Motiv). Von diesen Motiven sind dreidimensionale Strukturen sowohl separat als auch im Komplex mit RNA bekannt [Perez-Canadillas und Varani, 2001]. Meistens sind mehrere Domänen zur Erkennung der RNA erforderlich. Vom RNP-Motiv sind mehrere 3D-Strukturen bekannt. Diese Strukturen unterscheiden sich am deutlichsten in der RNA-Bindungsoberfläche, wodurch wahrscheinlich unterschiedliche RNA-Sequenzen differenziert werden können.

1.4.1. Das Ribosom

Das Ribosom ist eine molekulare Maschine und der Ort der Proteinbiosynthese (Translation) der Zellen [Spirin, 2002; Ramakrishnan, 2002]. Die Proteinbiosynthese an Ribosomen verläuft in drei Schritten: Die Initiation, die Elongation und die Termination. Bei der Initiation bindet sich eine Boten-RNA (mRNA) an die kleine

Untereinheit eines Ribosoms. Beginnend am Starttriplett oder Startcodon lagern sich Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) mit spezifisch gebundenen Aminosäuren entsprechend des kopierten genetischen Codes auf der mRNA während der Elongation nacheinander an das Ribosom an. Mit Hilfe der Peptidyltransferase werden die Aminosäuren aneinander geknüpft. Dabei lösen sich die tRNAs wieder vom Ribosom, nachdem sie ihre Aminosäuren abgegeben haben. Die Termination erfolgt, sobald das Stopcodon der mRNA erreicht ist. Dann zerfällt das Ribosom in seine Untereinheiten unter GTP-Verbrauch und das fertige Protein löst sich von der letzten tRNA. Da an einem mRNA-Faden sehr viele Ribosomen hintereinander sitzen, können synchron mehrere Proteine gebildet werden.

Das Ribosom besteht aus einer großen und einer kleinen Untereinheit. Jedes ist in etwa zu zwei Dritteln ihres Gewichts aus RNA und zu einem Drittel aus Protein zusammengesetzt. Im prokaryotischen Darmbakterium *E. coli* besteht das 70S Ribosom aus einer 50S- und einer 30S-Untereinheit. Die 50S-Untereinheit enthält die 23S-rRNA, die 5S-rRNA und 34 verschiedene Proteine, während die 30S-Untereinheit aus der 16S-rRNA und 21 verschiedenen Proteinen zusammengesetzt ist. Eukaryotische Ribosomen bestehen aus einer 60S- und einer 40S-Untereinheit und besitzen zusätzlich eine rRNA und 20-30 Proteine im Vergleich zu prokaryotischen Ribosomen. Rekonstitutionsexperimente von prokaryotischen Ribosomen führten zur Annahme, dass die notwendigen Informationen für funktionelle Ribosomen in der rRNA und den ribosomalen Proteinen enthalten sind. Mittlerweile wurden jedoch einige 100 zusätzliche Proteine und snRNAs entdeckt, die am Zusammenbau des Ribosoms in der Hefe beteiligt sind [Warner, 2001].

Das Ribosom ist schon seit mehr als 40 Jahren Gegenstand biochemischer Forschung. Ein herausragendes Ziel dieser Forschung war die Bestimmung der räumlichen Anordnung der Komponenten, um die Funktionsweise auf molekularer Ebene zu verstehen. Zunächst wurden mit Hilfe einer Fülle von biochemischen Daten grobe 3D-Modelle konstruiert [Brimacombe et al., 1988; Walleczek et al. 1988]. Die 3D-Strukturen einzelner Proteinfaktoren und ribosomaler Proteine ohne und mit rRNA-Fragmenten führten zur Verfeinerung der Modelle [Ramakrishnan und White, 1998]. Einen großen Fortschritt für die Strukturaufklärung ganzer Ribosomen erfolgte durch die Kryoelektronenmikroskopie von 70S *E. coli*-Ribosomen mit einer Auflösung von 23-25 Å [Stark et al., 1995; Frank et al., 1995]. Die Kombination der biochemischen Daten und der Strukturen aus der Kryoelektronenmikroskopie

lieferten wiederum exaktere Modelle des Ribosoms [Mueller und Brimacombe, 1997a,b; Mueller et al., 1997]. Weiterhin konnten mit Hilfe der kryoelektronenmikroskopischen Daten die ersten zufriedenstellenden Elektronendichtekarten von ribosomalen Kristallen erzeugt werden [Ban et al., 1998]. Anschließend wurden dreidimensionale Strukturen der beiden Untereinheiten und kompletter Ribosomen mit atomarer Auflösung erhalten [Yonath, 2002]. Diese Kristallstrukturen lieferten eine riesige Menge an Informationen über die Gesamtstruktur und Detailstrukturen von RNA-Protein-Wechselwirkungen. Des Weiteren wurden auch 3D-Strukturen der ribosomalen Untereinheiten mit wichtigen Liganden wie Initiationsfaktoren, mRNA, tRNA und Antibiotika erzeugt [Carter et al., 2000; Brodersen et al. 2000; Carter et al., 2001; Ogle et al., 2001; Pioletti et al., 2001; Schlünzen et al. 2001]. Insgesamt wurde eine große Übereinstimmung der biochemischen- und der strukturellen Daten gefunden. Die Gestalt der ribosomalen Untereinheiten wird größtenteils von der Struktur der rRNA bestimmt, während sich die Proteine an der Peripherie befinden. An der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten, der Peptidyltransferase-Region der 23S rRNA und der Dekodierungsregion der 16S rRNA sind keine Proteine vorhanden. Die rRNA scheint daher verantwortlich für die meisten enzymatischen Aktivitäten zu sein und fungiert als Ribozym [Nissen et al., 2000]. Die ribosomalen Proteine dienen anscheinend überwiegend zur Stabilisierung der rRNA-Strukturen, indem sie sich mit der RNA verflechten.

Die Ribosomen sind außer für die Translation auch verantwortlich für die Lenkung der Proteine an ihre zellulären Orte. Das Signalerkennungspartikel (Signal recognition particle, SRP) bindet an Ribosomen, die eine neuentstehende Proteinkette mit einer aminoterminalen Signalsequenz enthalten und diffundiert zum endoplasmatischen Retikulum (ER). Dort bindet sich der SRP an den SRP-Rezeptor und somit passiert die neuentstehende Kette die ER-Membran und kann vollständig im ER hergestellt werden.

Eine weitere wichtige Rolle haben Ribosomen bei der Antibiotika-Entwicklung. Einige Antibiotika nutzen die kleinen Unterschiede zwischen Ribosomen von Bakterien und höheren Zellen, um gezielt die Krankheitserreger zu vernichten, indem sie nur die bakterielle Proteinsynthese inhibieren. Jedoch sind einige Bakterien durch Mutationen resistent gegen Antibiotika geworden. Dreidimensionale Strukturen können bei der Entwicklung von Arzneistoffen äußerst hilfreich sein. Kokristallisationen der 30S-Untereinheit mit verschiedenen Antibiotika zeigten die

direkte Bindung an die 16S rRNA nahe der mRNA- und tRNA-Bindungsstellen [Brodersen et al., 2000; Carter et al., 2000; Pioletti et al., 2001; Schlünzen et al., 2001].

1.5. Die Massenspektrometrie in der Biochemie

Die Entwicklung der schonenden Ionisierungstechniken Matrixunterstützte Laser-desorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS) und Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) ermöglichten die Bestimmung der molekularen Masse von großen Molekülen und sind die Techniken der Wahl für die Peptid- und Proteinanalytik [Aebersold und Goodlett, 2001; Mann et al., 2001]. Andererseits können mit diesen Methoden auch andere biologisch wichtige Moleküle wie DNA, RNA, Kohlenhydrate und Lipide analysiert werden. Daher können unterschiedlichste biologische Fragestellungen mit diesen Techniken untersucht werden [e.g. Winston und Fitzgerald, 1997; Siuzdak, 1998; Griffin und Smith, 2000; Li et al., 2000; Fenselau und Demirev, 2001].

1.5.1. ESI-Massenspektrometrie

Ein ESI-Massenspektrometer besteht generell aus der Elektrospray-Ionenquelle, dort werden die Ionen erzeugt, dem Massenanalysator, wo die Ionentrennung erfolgt und dem Detektor zum Ionennachweis. Die Probe wird in das ESI-MS entweder im Offline- oder im Online-Betrieb flüssig eingeführt. Zum Offline-Betrieb werden mit Gold beschichtete Kapillaren verwendet. Im Online-Betrieb erfolgt eine direkte Kopplung mit Trenntechniken wie Flüssigkeitschromatographie oder Kapillarelektrophorese. Im Offline- bzw. Online-Betrieb können Flußraten von etwa 10-20 nl/min erreicht werden, was die Sequenzierung von enzymatisch verdauten Proteinen im Femtomolbereich ermöglicht.

Zur Ionenerzeugung beim ESI-MS werden die solvatisierten Probenmoleküle zunächst an der Oberfläche im starken elektrischen Feld geladen, wobei Tröpfchen mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern entstehen. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels kommt es zur Coulomb-Explosion, wenn das Verhältnis von Ladung zur Oberfläche zu groß wird. Dabei entstehen viele Tröpfchen mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern. Zur Erzeugung der freien Gasphasenionen gibt es zwei Modelle. Das Modell des geladenen Rückstands (charged-residue model, CRM) geht davon aus, dass durch eine Serie von Coulomb-

Explosionen, hervorgerufen durch die große Oberflächenladung, sehr kleine geladene Tröpfchen entstehen, die nur noch ein Analytmolekül enthalten. Aus diesen entstehen dann durch Desolvatisierung gasförmige Ionen [Dole et al., 1968]. Das Modell der Ionenemission (Ion evaporation model, IEM) beschreibt die Erzeugung der Gasphasenionen durch Emittierung aus hochgeladenen Tröpfchen mit einem Radius von etwa 8 nm und etwa 70 Ladungen [Iribarne und Thomson, 1976].

Drei verschiedene Typen von Massenanalysatoren werden gewöhnlich für ESI-MS in Proteomanalysen verwendet: Das Triple-Quadrupole (QqQ), die Ionenfalle (ion trap, IT) und das Quadrupole-Flugzeitmassenspektrometer (QqTOF). Diese Geräte können sowohl im MS-Modus zur Bestimmung der Komplettmassen als auch im MS/MS-Modus nach Kollision mit einem Gas zur Erzeugung von Fragmentmassen verwendet werden. Quadrupole bestehen aus vier parallelen Metallstäben, die Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis zum Detektor durchlassen. Das Scannen des Massenbereichs wird durch gleichzeitiges Erhöhen der Gleichspannung und der Amplitude des Wechselfeldes erreicht. Eine Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen, an die Wechselfeldspannungen angelegt werden. Die Funktion der Ionenfalle basiert im wesentlichen auf dem Prinzip der Quadrupole, jedoch können die Ionen für variable Zeiten eingefangen werden. Beim Flugzeitmassenspektrometer wird die Flugzeit der Ionen zwischen Quelle und Detektor vermessen, welche proportional zu $(m/z)^{0.5}$ ist.

Im Vergleich der drei verschiedenen Massenanalysatoren zeigt das Quadrupole-Flugzeitmassenspektrometer eine deutlich höhere Auflösung und höhere Transmission im MS/MS-Modus. Multiple Fragmentierungen und der verhältnismäßig geringe Preis sind die wichtigsten Vorteile der Quadrupole-Ionenfalle. Das Triple-Quadrupole scheint vorteilhaft für das Scannen von Bezugionen, wobei gewöhnliche Fragmentierungsprodukte wie z.B. Immoniumionen zur Massenbestimmung und Fragmentierung der korrespondierenden Massen genutzt werden können, auch wenn diese Massen ein geringes Signal zu Rauschen-Verhältnis haben.

Ein alternatives ESI-MS Gerät zu den drei genannten Techniken in der Proteinanalyse ist das Fourier-Transformations Ionencyclotronresonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS) aufgrund seiner hohen Auflösung und Massengenauigkeit [Shen et al., 2001]. Dieser Gerätetyp ist wegen des hohen technischen Aufwandes und des hohen Preises bisher wenig verbreitet.

1.5.2. MALDI-Massenspektrometrie

Die schonende Ionisierung bei der MALDI-MS wird erreicht, indem die Probe mit einem etwa 1000-10000 fachen molaren Überschuss einer, bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbierenden, Matrix vermischt wird. Nach der Verdampfung des Lösungsmittels können die Kokristalle in das Massenspektrometer eingeführt werden. Die Matrix absorbiert die Energie aus dem Laserpuls und schützt die Analytmoleküle vor der Photolyse, was bei direkten Laserbeschuss geschehen würde. Außerdem überträgt die Matrix die zur Desorption notwendige Energie, stellt die für die Ionisierung notwendigen Protonen zur Verfügung und reduziert die Wechselwirkung der Analytmoleküle untereinander. Die molekulare Masse wird in der Regel durch Messung der Flugzeit bestimmt, welche proportional zu $(m/z)^{0.5}$ ist. Bei den gängigen MALDI-Massenspektrometern wird ein Flugzeitanalysator (time-of-flight, TOF) verwendet. Als Flugzeitanalysatoren werden gewöhnlich Geräte verwendet, bei denen die Messungen wahlweise im Linear- oder Reflektron-Modus erfolgen. Im linearen Modus durchlaufen die Ionen auf einer geraden Flugbahn eine feldfreie Driftstrecke von der Quelle zum Detektor während im Reflektron-Modus die Ionen auf ihrem Flug durch das Anlegen eines elektrischen Gegenfeldes nach der freien Driftstrecke reflektiert werden. Im Reflektron wird durch die längere Flugstrecke und die Richtungsumkehr eine höhere Auflösung und Massengenauigkeit im Vergleich zum linearen Modus erreicht. Andererseits ist der lineare Modus aufgrund der kürzeren Flugstrecke geeigneter zur Detektion größerer Moleküle.

Die Entwicklung der zeitverzögerten Ionenextraktion (delayed extraction, DE) führte zur deutlichen Verbesserung der Auflösung bzw. Massengenauigkeit der MALDI-Massenspektrometrie [Brown und Lennon, 1995]. Dabei wird das elektrische Feld zeitversetzt zum Laserimpuls eingeschaltet, wodurch der Einfluss der Startgeschwindigkeitsverteilung kompensiert wird.

Im MALDI-Flugzeitmassenspektrometer werden auch metastabile Fragmente erzeugt. Die Ionen dieser Fragmente können zur Sequenzanalyse genutzt werden. Der metastabile Zerfall erfolgt durch spontanen Zerfall in der feldfreien Driftstrecke. Dieser Prozess wird als Postquellenzerfall (post source decay, PSD) bezeichnet [Chaurand et al., 1999].

Neben dem üblichen Flugzeitanalysator werden mittlerweile für MALDI-MS auch Quadrupole-Flugzeitanalysatoren [QqTOF] [Loboda et al., 2000], Flugzeit-Flugzeit-Analysatoren [TOF-TOF] [Medzihradszky et al., 2000], Ionenfallen [IT] [Qin et al., 1996] und Fourier-Transformations Ionencyclotronresonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS) [Solouki et al., 1995] kommerziell angeboten. Diese Geräte ermöglichen neben dem MS-Modus zur Bestimmung der Komplettmassen auch die Fragmentierung ausgewählter Ionen im MS/MS-Modus nach Kollision mit einem Gas.

1.5.3. Die Proteinidentifizierung mit Massenspektrometrie

Die Entwicklung der Massenspektrometrie und die drastische Vergrößerung der Sequenzinformationen durch die Genom-Projekte hat die Proteinidentifizierung revolutioniert. Der Peptidmassenfingerabdruck (Peptide mass fingerprinting, PMF) und uninterpretierte MS/MS-Spektren enthalten die Daten zur Proteinidentifikation.

Der Peptidmassenfingerabdruck wird durch enzymatische Spaltung des Proteins und anschließende Messung der Peptide erhalten. Gewöhnlich wird dazu MALDI-MS verwendet, da nur einfach geladene molekulare Massen erzeugt werden und somit die Interpretation der Spektren sehr einfach ist. Außerdem erhält man in der Regel eine bessere Sequenzabdeckung als mit ESI-MS. Die beobachteten Massen werden dann mit den theoretisch erzeugten enzymatischen Peptidmassen von kompletten Proteinsequenzdatenbanken verglichen [Fenyő, 2000]. Im Prinzip erfolgt die analoge Vorgehensweise bei der Identifikation über MS/MS-Spektren. Dazu werden jedoch einige Peptide der Peptidmischung fragmentiert und diese Massen zur Identifikation herangezogen, indem hier die theoretischen MS/MS-Massen mit den erhaltenen Massen verglichen werden [Eng et al., 1994]. Zur Erzeugung von MS/MS-Spektren wird in der Regel ESI-MS/MS verwendet. Die Spektren können einfacher generiert werden und in der Regel erhält man vollständigeren Ionenserien im Vergleich zu PSD-MALDI-MS. Das kürzlich entwickelte MALDI-MS mit TOF/TOF-Analysator scheint diese Nachteile offenbar nicht mehr zu haben.

Eine alternative Vorgehensweise zur Proteinidentifizierung ist die Methode der Sequenzmarkierung (sequence tag) [Mann und Wilm, 1994]. Dazu werden manuell zwei bis drei aufeinander folgende Aminosäuren in den MS/MS-Spektren aufgeklärt. Mit Hilfe der Information der Start- und Endmasse dieser Aminosäuren inklusive Sequenz können die Proteine ebenfalls durch Korrelation mit Proteinsequenzdaten identifiziert werden.

Die beschriebenen Methoden zur massenspektrometrischen Proteinsequenzierung sind beschränkt auf bekannte DNA- oder Proteinsequenzen. Außerdem können EST-Sequenzen nur mit MS/MS-Spektren korreliert werden. Die DNA-Segmente von ESTs sind nicht ausreichend, um eine ausreichende Anzahl von Peptiden aus einem Peptidmassenfingerabdruck zu korrelieren. Eine andere Möglichkeit zur Identifikation unbekannter Proteine besteht in der massenspektrometrischen *de novo* Sequenzierung. Das Problem bei dieser Vorgehensweise ist die äußerst komplexe Interpretation der Massenspektren. In der Regel ist es schwierig, Sequenzen ausreichender Länge zu erhalten. Diese sind zur Konstruktion von Oligonukleotid-Primern notwendig, um über PCR-Techniken die Sequenz zu erhalten oder um Sequenzvergleiche über Homologie-Suchen durchzuführen. Die sukzessive Suche in Sequenzdatenbanken mit Peptidmassenfingerabdruck, uninterpretierten MS/MS-Spektren und automatisch interpretierten MS/MS-Spektren wurde zur Verbesserung von Homologiesuchen entwickelt [Shevchenko et al., 2001].

2. Ergebnisse

2.1. Die Proteomanalyse von Apoptose in T-Zellen

Jurkat T-Zellen dienen als Modellsystem für den Vergleich von unbehandelten Kontrollzellen mit apoptotischen Zellen durch klassische Proteomanalyse. Zunächst wurde eine 2DE-Datenbank vom Totallysat der unbehandelten Zellen erstellt [2.1.1.]. Anschließend wurde die Apoptose über den Fas-Rezeptor-Signalweg eingeleitet und mit den Kontrollzellen verglichen. Um eine Anreicherung der Proteine und Informationen über Translokationen zu erhalten wurden die Jurkat T-Zellen außerdem in die Kompartimente Mitochondrien, Kern, Membran und Cytosol getrennt. Die analoge Vorgehensweise erfolgte durch Induktion der Apoptose mittels Cis-Platin, um die Proteomanalysen der Apoptose vermittelt über einen Todesrezeptor und durch DNA-Schädigung zu vergleichen [2.1.2.].

2.1.1. Die 2DE-Datenbank von Jurkat-T-Zellen

Die Proteine der humanen Jurkat T-Zelllinie E6 wurden durch hochauflösender 2DE getrennt. Nach der Silberfärbung wurden etwa 2.000 Proteinspots detektiert. Von diesen wurden 95 Proteinspots von 83 verschiedenen Proteinen nach Coomassie Blau-Färbung durch Peptidmassenfingerabdruck mit MALDI-MS identifiziert. Die theoretischen Werte für die Molekulargewichte und die isoelektrischen Punkte wurden zur Kalibrierung der Gele verwendet. Damit wurde aus den gewonnenen Daten eine 2DE-Datenbank erstellt, die im Internet zugänglich ist (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/>) [Thiede et al., 2000a]. In dieser Datenbank können sowohl das 2DE-Gesamtbild sowie auch sechs vergrößerte Sektionen betrachtet werden. Die Informationen über die theoretischen- und praktischen molekularen Massen (Mw) und isoelektrischen Punkte (pI), die Identifizierungsmethode und die Sequenzabdeckung durch den Peptidmassenfingerabdruck der identifizierten Proteinspots ist angegeben. Weiterhin besteht eine Verbindung zu den NCBI- und Swiss-Prot-Datenbanken über die Zugangsnummern der Proteine.

Die 2DE-Datenbanken sind allgemein nützlich für die grundlegende biochemische Erforschung von Proteomen. Aus diesem Grund wurde das Konzept der föderativen 2DE-Datenbanken entwickelt [Appel et al., 1996], in denen auch die Jurkat T-Zelllinie integriert ist (<http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html>). Die leukämischen Jurkat T-Zellen werden in vielen Projekten zur Untersuchung der T-Zellrezeptor-vermittelten

Signalgebung und für viele andere Studien verwendet, darüber hinaus sind sie für die Krebsforschung von Interesse [Simpson und Dorow, 2001].

Die 2DE-Datenbank der Jurkat T-Zellen war für die folgenden Proteomanalysen der Apoptose essentiell. Die relativ genaue Kalibrierung anhand der identifizierten Proteine wurde eingesetzt, um die Resultate der Peptidmassenfingerabdrücke durch Datenbanksuchen abzuschätzen. Da die massenspektrometrische Identifizierung über Peptidmassenfingerabdrücke auf Wahrscheinlichkeiten beruht, ist trotz der resultierenden Qualitätskennzahl ein Vergleich mit den theoretischen molekularen Massen und den isoelektrischen Punkten der identifizierten Proteine eine wichtige Kontrolle. In den Kontrollgelen sollten die Werte der identifizierten Proteinspots mit den theoretischen Werten übereinstimmen. Nach der Induktion der Apoptose wurden hingegen auch proteolytische Spaltungen von Caspasesubstraten erwartet. Diese Proteinfragmente ergeben eine geringere Sequenzabdeckung bei der Identifizierung, dennoch konnten die zugeordneten Peptide in der Regel einem Teil des Proteins zugeordnet werden. Die theoretischen Werte bzgl. Mw und pl der Proteinfragmente konnten berechnet werden (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) und folglich mit den praktischen Werten verglichen werden. Weiterhin konnten damit die putativen Caspase-Schnittstellen vorhergesagt werden. Die Genauigkeit dieser Vorhersage war abhängig von der Anzahl der Asparaginsäuren in dem berechneten Proteinbereich.

Die identifizierten Proteine dienen außerdem der Beurteilung der Aufreinigung der Kompartimente. Die Lokalisation zu einem Kompartiment wurde bei der überwiegenden Anzahl der Proteine in der Swiss-Prot-Datenbank spezifiziert. Theoretische Berechnungen der Zuordnung der Proteine zu den Kompartimenten basierend auf die Primärsequenz sind zwar möglich (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>), lieferten aber z.T. falsche Ergebnisse. Eine Anreicherung von mehr als 90% konnte anhand der 2DE-Gele mit den bekannten Lokalisationen der Proteine von den Kompartimenten Cytosol, Kern und Mitochondrien festgestellt werden. Die sogenannte Membranfraktion hingegen zeigte zwar auch ein anderes 2DE-Spotmuster als die anderen Kompartimente, aber es wurden nicht nur Membranproteine angereichert.

Ein entscheidendes Kriterium für die Identifizierung von Proteinen per Peptidmassenfingerabdruck ist die Sequenzabdeckung. Unter der Sequenzabdeckung versteht man das prozentuale Verhältnis der Anzahl der durch

die detektierten Massen zugeordneten Aminosäuren zu der Gesamtanzahl der Aminosäuren des jeweiligen Proteins. Mit Hilfe eines Teils der identifizierten Spots wurde gezeigt, dass die Sequenzabdeckung in 18 von 23 Fällen durch die Verwendung einer zweiten Matrix für die massenspektrometrische Messung gesteigert werden konnte, da z.T. unterschiedliche Massen mit den verschiedenen Matrices detektiert wurden. Aufgrund ihrer Einfachheit ist diese Vorgehensweise empfehlenswert, wenn das Ergebnis der Identifikation mit einer Matrix nicht eindeutig ist. Bei der zweiten Messung kann außerdem auf einen internen Standard verzichtet werden, was zur Überdeckung von Massen der Probe führen kann. Andererseits wird die doppelte Materialmenge und Zeit für die Messung benötigt [Thiede et al., 2000a]. Die Peptidmassenfingerabdrücke von 69 Proteinen der Jurkat T-Zelllinie und 50 Proteinen aus *M. tuberculosis* wurden hinsichtlich der ausgelassenen tryptischen Spaltstellungen, der Oxidation von Tryptophan und der N-terminalen Pyroglutamatbildung analysiert [Thiede et al., 2000b].

Fast 90% der ausgelassenen tryptischen Spaltstellen konnten drei Sequenzmotiven zugeordnet werden: (I) ein C-terminales Prolin zu Lysin bzw. Arginin, (II) benachbarte Lysine/Arginine und (III) Asparaginsäure oder/und Glutaminsäure N- oder C-terminal zu Lysin bzw. Arginin. Die Erhöhung von ausgelassenen Spaltstellen bei der Proteinidentifizierung führt zu einer verringerten Präzision bei der Suche. Die Berücksichtigung der Sequenzmotive für die ausgelassenen Spaltstellen kann diesen Effekt deutlich minimieren. In vielen Fällen wird der Abstand zu zufällig zugeordneten Proteinen größer.

Tryptophan wurde in der unoxidierten-, monooxidierten- und dioxidierten Form beobachtet. Die Intensität der Peaks war immer in der geringer oxidierten Form höher. Peptide mit N-terminalen Glutamin wurden stets als Paar mit der Pyroglutamatform detektiert. Unnatürliche Modifikationen durch die Probenbehandlung entstehen hauptsächlich durch die Oxidation von Methionin und durch die Umsetzung von Cystein mit Acrylamid zum β -Propionamid. Weitere Modifikationen können bei der Datenbanksuche eingegeben werden. Je mehr Modifikationen bei der Suche berücksichtigt werden, desto mehr theoretische Massen sind möglich und desto ungenauer wird die Identifikation. Die Berücksichtigung, dass Peptide mit N-terminalen Glutamin immer paarweise mit der Pyroglutamatform vorkommen und die Feststellung, dass die Intensität der Tryptophan enthaltenen Peptide geringer wird, je höher die Oxidation ist, kann somit

die Proteinidentifizierung verbessern. Bei den unnatürlichen Modifikationen sollte auf jeden Fall der Effekt des jeweiligen Experimentators verifiziert werden.

Die Ergebnisse der Analyse der Peptidmassenfingerabdrücke können zur Verfeinerung und damit zur Verbesserung von Programmen zur Identifikation von Proteinen verwendet werden.

Diese Daten wurden z.B. in das Programm ChemApplex integriert [Parker, 2002].

2.1.2. Die Proteomanalyse der Apoptose über den Fas-Rezeptor-Signalweg und durch DNA-Schädigung mittels Cis-Platin

Das Vorgehen zur Proteomanalyse der Apoptose ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Die Apoptose wurde entweder durch den Anti-Fas-Antikörper oder durch

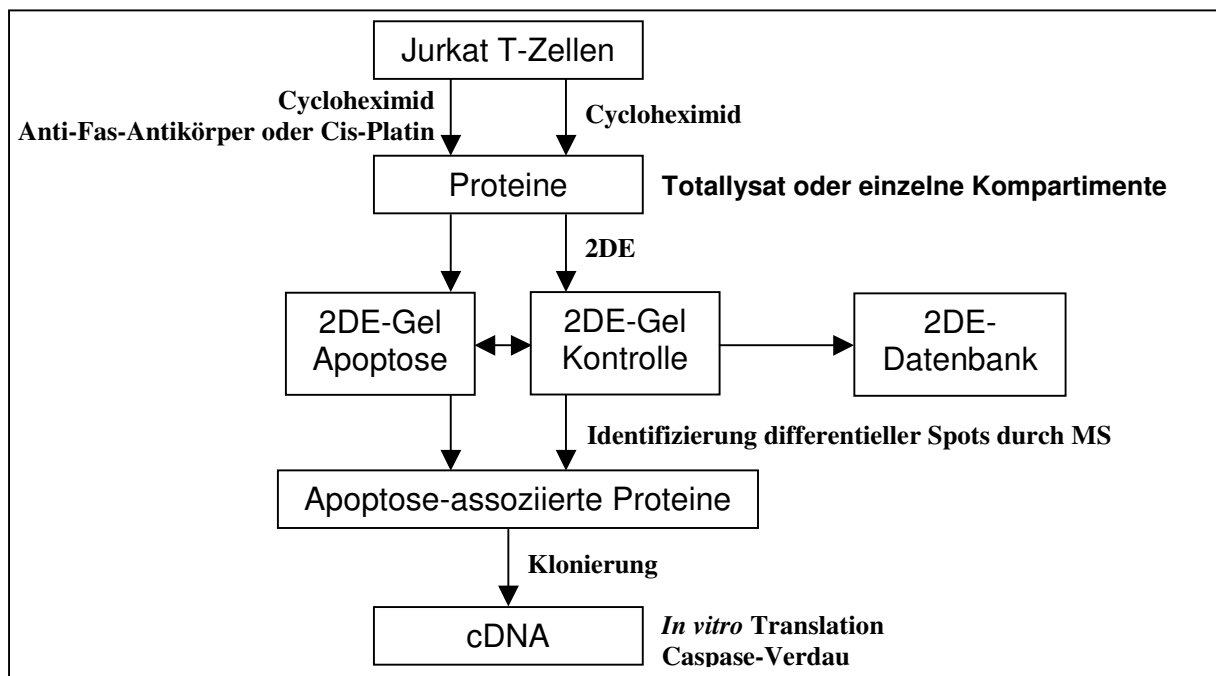


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteomanalyse der Apoptose und anschließende Experimente.

Cis-Platin eingeleitet. Um sekundäre Effekte zu vermeiden wurden die Zellen zusätzlich mit einer geringen Menge des Translationshemmers Cycloheximid behandelt,. Die Kontrollzellen und die apoptotischen Zellen wurden anschließend als Totallysat oder nach Separation in die einzelnen Kompartimente mittels 2DE aufgetrennt. Die Kontrollzellen des Totallysates wurden zum Aufbau einer 2DE-Datenbank verwendet. Veränderte Proteinspots wurden durch den Vergleich der 2DE-Gele aufgeklärt. Diese Apoptose-assoziierten Proteinspots wurden anschließend überwiegend durch Peptidmassenfingerabdruck identifiziert.

Interessante Proteine wurden dann kloniert. Der Caspase-3 Verdau nach *in vitro* Translation verifizierte, ob es sich um Caspase-3 Substrate handelte.

Die subtraktive Analyse der 2DE-Gele von unbehandelten- und von apoptotischen Jurkat T-Zellen nach Induktion der Apoptose über den Fas-Rezeptor zeigte Unterschiede in 45 Proteinspots. Von diesen konnten zunächst 20 Spots von 11 verschiedenen Proteinen identifiziert werden. Nach der Trennung der Kompartimente wurden zusätzlich 165 differentielle Proteinspots von 73 Proteinen aufgeklärt. Die analoge Vorgehensweise nach Induktion der Apoptose durch Cis-Platin erbrachte 85 differentielle Spots. 61 Proteinspots waren bereits aus der Fas-induzierten Apoptose bekannt. Die zusätzlichen 24 Proteinspots konnten 11 Proteinen zugeordnet werden. Diese Ergebnisse zeigten eine relativ hohe Übereinstimmung der Proteomanalyse von Todesrezeptor- und über DNA-Schädigung-vermittelte Apoptose.

Den 209 identifizierten Proteinspots konnten 95 Proteine zugeordnet werden. 78 Proteine waren bisher im Apoptoseprozess unbekannt. Die restlichen Proteine waren überwiegend als Caspase-Substrate geläufig.

39 Proteine (= 40%) enthalten ein oder mehrere RNA-Bindungsmotive (RNP- bzw. KH-Motiv). Diese Tatsache ist signifikant, da in der Spezies *H. sapiens* nur 464 von 38002 (= 1.2%) Proteinen (<http://www.ebi.ac.uk/proteome/index.html>) mit diesen Motiven bzw. in der 2DE-Datenbank der Jurkat T-Zellen nur 7 von 83 Proteinen (= 8.4 %) gefunden wurden. Auffällig war außerdem die Identifikation von 21 Onkoprotein oder Onkoprotein-interagierenden Proteinen.

Die identifizierten Proteine lassen sich in folgende Klassen einteilen (Anzahl ≥ 5): 17 hnRNPs, 8 Spleissfaktoren, 8 Proteine aus dem Translationsprozess, 5 Proteine aus Signalübertragungswegen, 5 Proteine des Chromatins und 5 proteasomale Proteine.

34 Proteine wurden bisher *in vitro* translatiert. Anschließend erfolgte der Caspase-3-Assay, wobei die translatierten Proteine einerseits mit Caspase-3 und andererseits mit Caspase-3 und den Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk behandelt wurden. 24 Proteine wurden damit als Caspase-3-Substrate nachgewiesen.

20 Proteine wurden sowohl in den Kontroll- als auch in den apoptotischen Zellen identifiziert. 12 dieser Proteine zeigten im Vergleich der Proteinspots eine Verringerung im Molekulargewicht. Neun weitere Proteine, die nur in apoptotischen Zellen identifiziert wurden, hatten einen signifikanten Unterschied im Molekulargewicht größer 10 % zwischen der beobachteten Masse im 2DE-Gel und der theoretischen Masse. Zusammenfassend konnte für 39 der Proteine eine

proteolytische Spaltung vorausgesagt werden. 25 Proteine werden nicht geschnitten bzw. nur nahe am N- oder C-Terminus.

Die möglichen Spaltstellen der putativen Caspase-Substrate konnten mehr oder weniger genau mit Hilfe der gewonnenen Daten wie Mw, pI, Peptidmassenfingerabdruck und Caspase-3-Assay vorhergesagt werden. Es wurde keine einheitliche Regel für die RNP-Motive beobachtet. Nur teilweise erfolgten die Spaltungen innerhalb des Sequenzmotivs. Die vielen neuen Caspasesubstrate lassen vermuten, dass es deutlich mehr als die etwa 100 bisher identifizierten Proteine gibt [Earnshaw, 1999]. Die funktionellen Rollen der Spaltprodukte muß in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden [Thiede et al., 2001].

Eindeutige Hinweise auf Translokationen während der Apoptose wurde für 14 der 20 Proteine gefunden, die sowohl in Kontroll- als auch apoptotischen Zellen identifiziert wurden, da die Spots in unterschiedlichen Kompartimenten auftraten. Dabei wurde zur einen Hälfte die gleichen, zur anderen Hälfte unterschiedliche Spotpositionen der Proteine gefunden [Thiede et al., 2002]. Relativ wenige Unterschiede wurden in den Mitochondrien gefunden, obwohl dieses Kompartiment eine bedeutende Rolle im Apoptoseprozess spielt. In den anderen Kompartimenten wurden deutlich mehr Unterschiede entdeckt.

Das Protein p54^{nrb} besitzt ein RNA-Bindungsmotiv und wurde als mögliches Caspase-Substrat im 2DE-Gel identifiziert. Der Caspase-3-Assay zeigte mehrere Spaltprodukte. Mutationen von drei Asparaginsäuren zu Asparagin bewiesen drei Caspase-Schnittstellen in p54^{nrb}. Weiterhin wurde gezeigt, dass die RNA einen Einfluss auf die Spaltung durch Caspase-3 hat. Bei Zugabe von RNase A zum Caspase-3-Assay wurde nur das Spaltfragment beobachtet, welches in der 2DE-Analyse identifiziert wurde, während die anderen Spaltprodukte nicht auftraten. Bei Zugabe des RNase-Inhibitors RNAsin, RNase A und Caspase-3 zu p54^{nrb} hingegen wurde das ursprüngliche Spaltungsmuster von p54^{nrb} erzeugt.

Globale Proteomanalysen von Apoptose mittels 2DE und anschließender Identifikation der Proteine wurden in unterschiedlichen Zellsystemen und verschiedenen Auslösern des Zelltods durchgeführt [Patterson et al., 1995; Brockstedt et al., 1998; Prasad et al., 1999; Wan et al., 2001]. Diese Analysen beschränkten sich auf Totallysate.

Eine vergleichbare Studie der Fas-induzierten Apoptose in Jurkat T-Zellen erbrachte überwiegend andere Ergebnisse als die hier beschriebenen. 57 Apoptose-assoziierte

Spots wurden detektiert. Proteine des Zytoskeletts und Chaperone wurden überwiegend identifiziert. Bei diesen Experimenten wurde kein Translationsinhibitor zugegeben, so dass die unterschiedlichen Bedingungen vermutlich zu anderen Ergebnissen führten [Gerner et al., 2000]. Die Einleitung der Apoptose durch Ionisierungsstrahlung führte ebenfalls überwiegend zur Veränderung von vielen Chaperonen [Prasad et al., 1999]. Bei der durch EGTA bzw. Lovastatin-induzierten Apoptose in Jurkat T-Zellen wurden nur geringe Unterschiede festgestellt und nur ein Protein identifiziert [Patterson et al., 1995]. Bei der Proteomanalyse durch Vermittlung der Apoptose durch Entzug von all-trans Retinoesäure wurden 19 differentielle Proteine mit sehr verschiedenen Funktionen identifiziert [Wan et al., 2001]. Die Proteomanalyse der Burkitt Lymphomzelllinie BL60 durch Induktion der Apoptose mit anti-IgM-Antikörper erbrachte ähnliche Ergebnisse wie die in dieser Arbeit beschriebene Fas-induzierte Apoptose. Dabei wurde die gleiche 2DE-Technik verwendet. Etwa die Hälfte der identifizierten Proteine wurde auch bei der Fas- bzw. Cis-Platin induzierten Proteomanalyse gefunden [Brockstedt et al., 1998].

Aus den verschiedenen Proteomanalysen der Apoptose ließ sich eine starke Abhängigkeit bzgl. der experimentellen Bedingungen erkennen. Die Verhinderung der Translation vermeidet die Identifikation von Stressproteinen. Die Analyse der Kompartimente ergab eine deutlich höhere Anzahl von modifizierten Proteinen und Informationen über Translokationen.

2.2. Die Proteomanalyse von Ribosomen

Zwei verschiedene Projekte wurden für die Proteomanalyse des Ribosoms durchgeführt. Zum einen wurden unbekannte mitochondriale ribosomale Proteine über die klassische Proteomanalyse mit Hilfe von EST-Datenbanken aufgeklärt [2.2.1]. Zum anderen wurden strukturelle Proteomanalysen zur Aufklärung von RNA-Protein-Wechselwirkungen von Untereinheiten des Ribosoms von *E. coli* nach Quervernetzung durchgeführt [2.2.2]. Der Vergleich von durch Quervernetzung ermittelten RNA-Peptid-Wechselwirkungen mit nicht-kovalenten Komplexen diente zur Bestätigung der Strukturabhängigkeit der RNA-Protein-Wechselwirkungen im Ribosom und zeigte, dass diese nicht-kovalenten Komplexe mit MALDI-MS qualitativ und quantitativ analysiert werden können [2.2.3].

2.2.1. Die Proteomanalyse mitochondrialer Ribosomen

Mitochondriale ribosomale Proteine (MRPs) sind Teil des mitochondrialen Proteinbiosynthesystems. Die Anzahl der MRPs ist im Vergleich zu bakteriellen Ribosomen vergrößert. Trotz der Annahme, dass bis zu 100 MRPs in mitochondrialen Ribosomen enthalten sind, wurde bislang nur ein Teil auf molekularer Ebene vollständig charakterisiert [Graack und Wittmann-Liebold, 1998]. Durch die Genomsequenzierungsprojekte sind mittlerweile eine Fülle von DNA-Sequenzen verfügbar, doch den meisten Sequenzen fehlt eine funktionelle Zuordnung. Partielle Aminosäuresequenzen von MRPs aus dem Rind wurden durch Screening von EST-Datenbanken verwendet, um die homologen Proteine aus Mensch, Maus und Ratte zu bestimmen [O'Brien et al., 1999; O'Brien et al., 2000]. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Die MRPs einer ribosomalen Untereinheit wurden zunächst durch 2DE getrennt. Dann erfolgte der Trypsin-Verdau einzelner Spots und schließlich wurden die erzeugten Peptide durch RP-HPLC getrennt. Die Sequenzierung erfolgte bei Peptidfraktionen ausreichender Menge (≥ 1 Picomol) durch N-terminale Sequenzanalyse, bei geringeren Mengen per ESI-MS/MS. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da durch die N-terminale Sequenzanalyse in der Regel eindeutigere und längere Sequenzen erhalten werden als über MS/MS, jedoch ist letztere Methode sensitiver. Die gewonnenen Sequenzen wurden mit EST-Datenbanken der Spezies Mensch, Maus und Ratte durch Verwendung von BLAST verglichen. Dabei wurden in der Regel ein oder mehrere cDNA-Sequenzabschnitte erhalten. Diese wurden wiederum verwendet, um überlappende und erweiternde cDNA-Sequenzabschnitte zu finden bis ein putativer offener Leserahmen aufgeklärt wurde. Auf dieser Ebene konnten in einigen Fällen auch Aussagen über die Exon/Intron-Struktur gemacht werden. Der putative offene Leserahmen konnte wieder in die Proteinsequenz umgewandelt werden. Daraus wurde das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt berechnet und mit der Herkunft des jeweiligen Proteinspots aus dem 2DE-Gel verglichen. Die Verwandtschaft zu anderen ribosomalen Proteinen und mitochondrialen Signalsequenzen konnte ebenfalls mit Hilfe der Primärsequenz ermittelt werden. Insgesamt wurden 14 N-terminale und fünf *de novo* MS/MS-Sequenzen von neun Rinder-MRPs erhalten. Zwei ribosomale Säugetierproteine waren bereits bekannt. Die homologen cDNA-Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte der restlichen sieben Proteine konnten in allen Fällen zugeordnet werden. Die Sequenzkonservierung der

Säugetierproteine von den MRPs (70-90 %) im Vergleich zu den cytosolischen ribosomalen Proteinen (> 95%) war geringer.

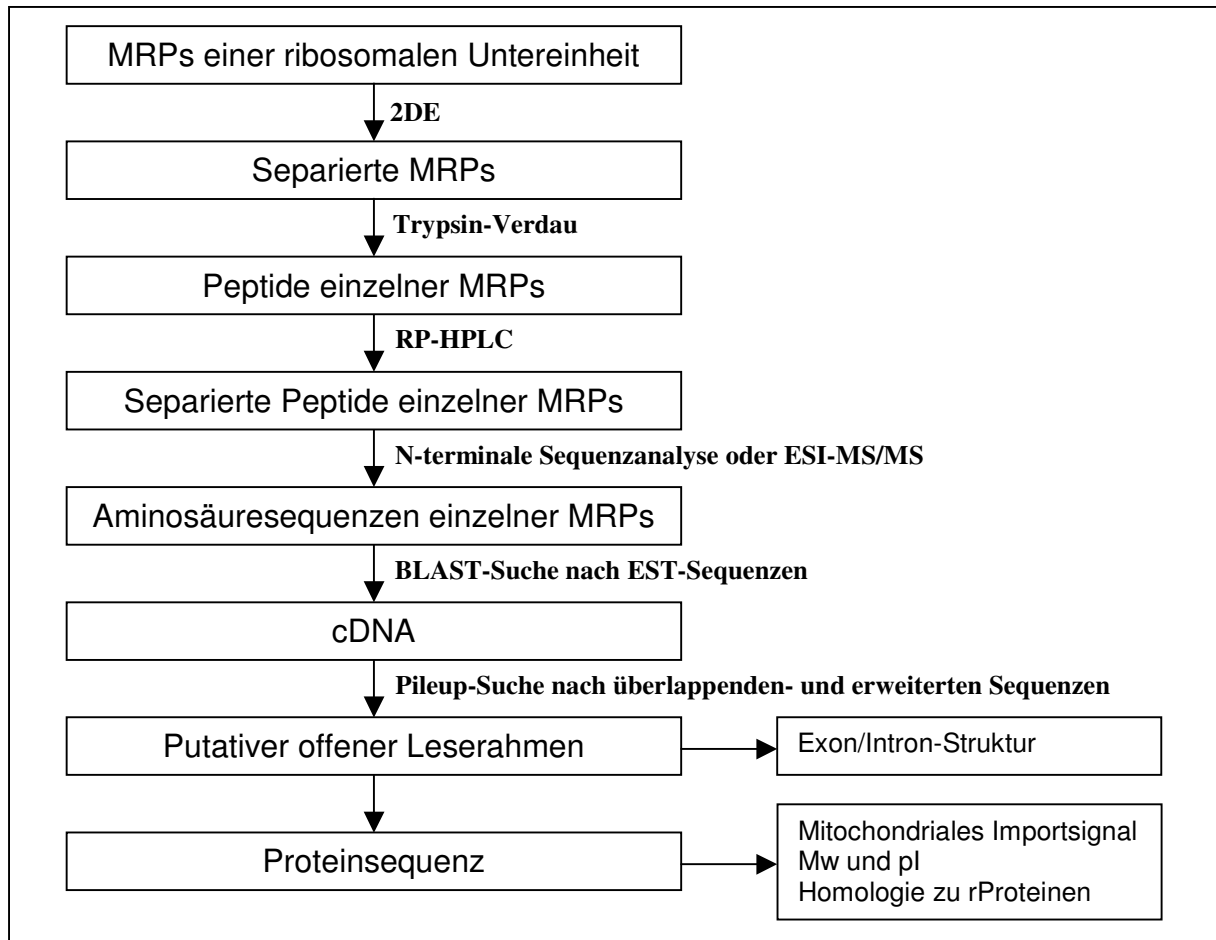


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Identifikation von mitochondrialen ribosomalen Proteinen aus EST-Datenbanken.

Von den sieben Proteinen wurden in vier Fällen Sequenzähnlichkeiten zu cytosolischen ribosomalen Proteinen aus *E.coli* und in drei Fällen zu MRPs aus Hefe gefunden. Die cytosolischen ribosomalen Proteine und die MRPs derselben Spezies zeigten eine nähere Verwandtschaft als die MRPs von Säugetier und Hefe. Außerdem konnten allen Proteinen korrespondierende Sequenzen aus *C. elegans* zugeordnet werden.

Die Ergebnisse der identifizierten MRPs bzgl. der mitochondrialen Signalsequenzen waren sehr variabel. Einerseits wurden typische, spaltbare Signalsequenzen gefunden, andererseits fehlten diese völlig [O'Brien et al., 1999; O'Brien et al., 2000].

2.2.2. Kovalente RNA-Protein-Wechselwirkungen im Ribosom von *E. coli*

Zum Verständnis von RNA-Protein-Wechselwirkungen ist die Aufklärung der in Kontakt stehenden Moleküle erforderlich. In Abwesenheit von hochauflösenden Strukturdaten sind Quervernetzungstechniken für diese Fragestellung nützlich [Haynes, 1999]. Zur Aufklärung der beteiligten Molekülabschnitte nach Quervernetzung wurde eine Vorgehensweise entwickelt, die ausschließlich auf proteinanalytischen Methoden beruhte (Abbildung 4).

Als Modellsystem wurden ribosomale Untereinheiten verwendet. Nach der Quervernetzung mit 2-Iminoethanol oder durch UV-Bestrahlung wurden die rRNA-enthaltenden Fraktionen durch Gelfiltration von den nicht quervernetzten Proteinen getrennt. Der anschließende Endoprotease-Verdau und die darauf folgende Gelfiltration wurden verwendet, um die rRNA-enthaltenden Fraktionen von den nicht quervernetzten Peptiden zu trennen. Danach wurde zur Erzeugung von Oligoribonukleotid-Peptid-Komplexen ein Verdau mit Ribonuklease T₁ durchgeführt. Da die Struktur der rRNA den vollständigen Verdau bei der ersten Endoprotease-Behandlung behindert, war ein zweiter Endoprotease-Verdau erforderlich. Die Oligoribonukleotid-Peptid-Komplexe wurden schließlich durch RP-HPLC isoliert. Die Fraktionen mit einer Absorption bei 220 nm (Peptid) und 260 nm (RNA) wurden anschließend analysiert. Die Aminosäuresequenz wurde durch N-terminale Sequenzanalyse bestimmt. Die Sequenz bestimmte das beteiligte ribosomale Protein und eine Lücke innerhalb der Sequenzanalyse lokalisierte die quervernetzte Aminosäure. Die RNA-Sequenz wurde mit MALDI-MS oder ESI-MS/MS bestimmt. Der Vergleich der MALDI-MS Messungen vor, nach alkalischer Hydrolyse und nach 5'→3'-Phosphodiesterase-Verdau führten zu RNA-Sequenzleitern, wodurch in der Regel die RNA-Sequenz und das quervernetzte Nukleotid bestimmt werden konnten. Die RNA-Sequenz konnte dann der rRNA zugeordnet werden. Die Fragmentierung der Oligoribonukleotid-Peptid-Komplexe mit ESI-MS/MS hingegen zeigte die RNA-Sequenz in einem Experiment. Die Dominanz der RNA-Fragmentierungen verhinderte jedoch den Erhalt von Sequenzinformationen des korrespondierenden Peptides.

Die beschriebenen Experimente wurden am 30S-Ribosom und am 50S-Ribosom von *E. coli* angewendet. Insgesamt wurden zehn RNA-Protein-Kontaktstellen von neun ribosomalen Proteinen mit der dargestellten Methodik identifiziert [Urlaub et al., 1997; Thiede et al., 1998]. Zu diesem Zeitpunkt gab es noch keine Kristallstrukturen des

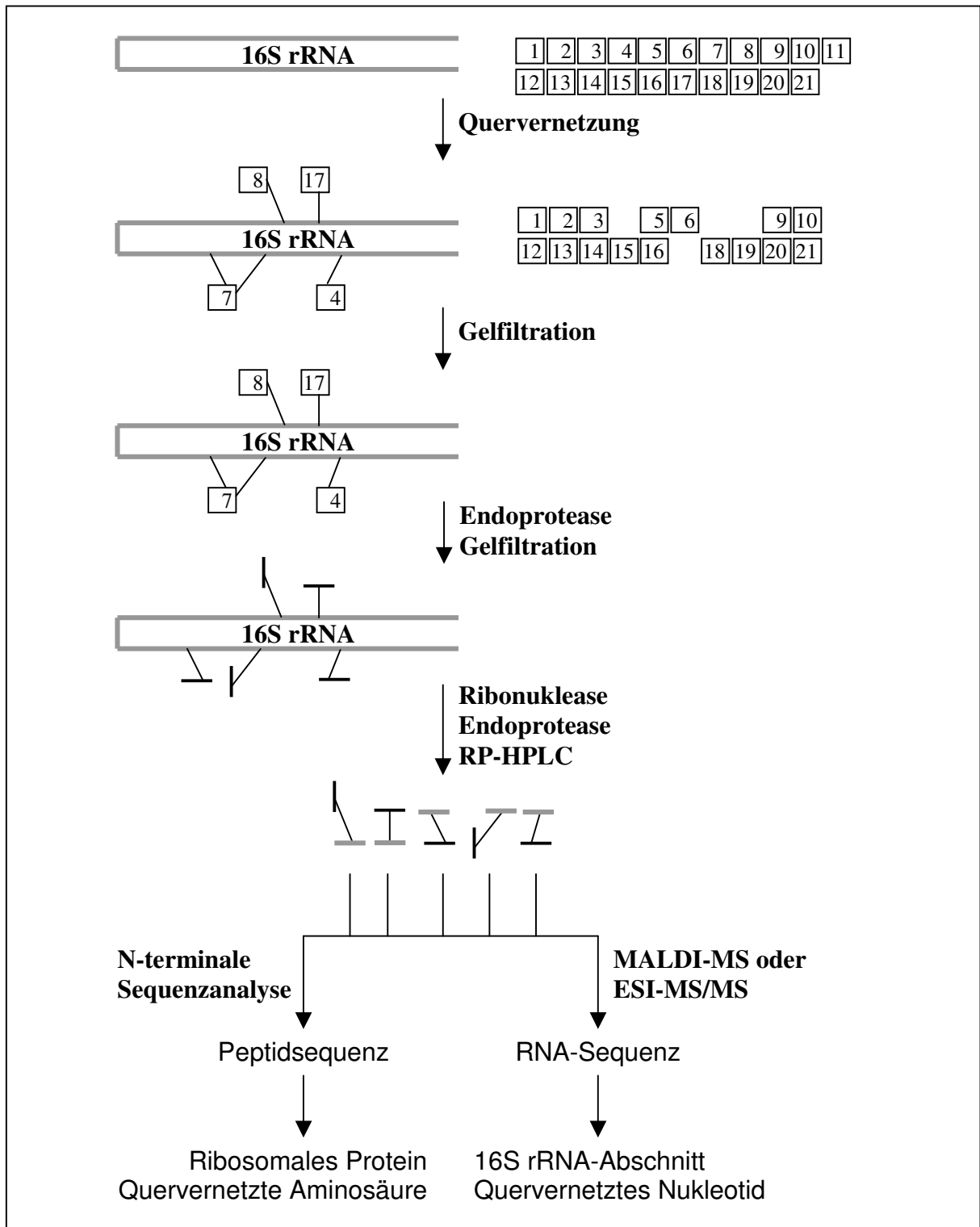


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Identifizierung der RNA-Protein-Quervernetzungsstellen am Beispiel der Ergebnisse des 30S-Ribosoms von *E. coli*.

Die Kästchen mit den Zahlen symbolisieren die 21 ribosomalen Proteine.

Ribosoms und somit dienen diese Daten zur Verfeinerung von ribosomalen Modellen. Die dreidimensionale Struktur von vier (S4, S7, S8, S17) der neun ribosomalen Proteine war vor Lösung der Kristallstrukturen ganzer ribosomaler Untereinheiten bekannt [Ramakrishnan und White, 1998]. Dadurch konnten diese Proteine an festen Punkten in rRNA-Modelle eingepasst und mit kryoelektronenmikroskopischen Bildern korreliert werden [Mueller und Brimacombe, 1997b; Tanaka et al., 1998]. Anhand der Kristallstrukturen der vier ribosomalen Proteine konnten die RNA-Protein-Kontaktstellen sekundären Strukturmotiven zugeordnet werden. Vier der quervernetzten Aminosäuren (S4, S7, S8, S17) befanden sich in Schleifen und eine innerhalb (S7) eines β -Faltblattes. Auf rRNA-Ebene wurden fünf interne Schleifen (zu S7(2x), S17, L2, L27), drei Haarnadelschleifen (zu L4, L21, L23), ein Dreistammknotenpunkt (zu S8) und das 3'-Ende (zu S4) als Kontaktpunkte festgestellt. Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, dass Schleife-Schleife-Strukturen begünstigte RNA-Protein-Interaktionsstrukturen sind.

Die Korrelation der Kristallstrukturdaten der kleinen ribosomalen Untereinheit mit den Quervernetzungsdaten zeigte gute Übereinstimmungen. Die Quervernetzungsstellen von den ribosomalen Proteinen S7 (2x) und S8 zur 16S rRNA wurden exakt als Kontaktstellen bestimmt. Bei S17 wurde eine Interaktionsstelle drei Nukleotide entfernt zur Quervernetzungsstelle gefunden, was mit der Länge des Quervernetzers 2-Iminoethanol (7 Å) erklärt werden kann. Nur die Quervernetzungsstelle von S4 am 3'-Ende der 16S rRNA konnte nicht verifiziert werden [Brodersen et al., 2002]. Die Quervernetzungsstelle von L2 zur 23S rRNA wurde ebenfalls in unmittelbarer Nähe der dreidimensionalen Struktur der Komponenten gefunden [Sergiev et al., 2001], von L4, L21, L23 und L27 existieren bisher keine veröffentlichten Daten.

2.2.3. Nicht-kovalente RNA-Peptid Wechselwirkungen

Massenspektrometrische Methoden können zur Untersuchung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen verwendet werden [Hofstadler und Griffey, 2001]. Für diese Analysen wird gewöhnlich ESI-MS bevorzugt verwendet, da nahezu unter physiologischen Bedingungen gearbeitet werden kann. Die Probenpräparation bei MALDI-MS hingegen verläuft unter denaturierenden Bedingungen. Aus diesem Grund wurden bisher nur wenige nicht-kovalente Komplexe mit dieser Technik untersucht.

Synthetische Peptide und Oligoribonukleotide wurden zur Untersuchung von RNA-Peptid-Wechselwirkungen herangezogen. Dabei wurden u.a. Peptide und Oligoribonukleotide aus den Quervernetzungsstudien des Ribosoms verwendet [2.2.2].

Zunächst wurde eine geeignete Matrix für die MALDI-MS-Analyse gesucht. 2,4,6-Trihydroxyacetophenon erwies sich als günstig, da Oligoribonukleotide und Peptide mit etwa gleicher Intensität detektiert werden konnten und die Komplexe sichtbar waren. Die Intensität der RNA-Peptid-Komplexe war stark abhängig von basischen Aminosäuren, wobei Arginin den eindeutig stärksten Einfluss hatte. Das Arginin-reiche- und RGG-Motiv sind für die RNA-Erkennung bekannt [Burd und Dreyfuss, 1994]. Auf Nukleotidebene wurde keine Präferenz von bestimmten Basen bzw. Purinen/Pyrimidinen und keinen Einfluss der Sekundärstruktur festgestellt.

Diese Daten zeigten, dass die RNA-Protein-Wechselwirkungen im Ribosom von der komplexen Struktur des Ribonukleoproteinpartikels abhängig sind und nicht mit einfachen Peptiden und Oligoribonukleotiden gebildet werden. Andererseits konnte die prinzipielle Verwendbarkeit von MALDI-MS für nicht-kovalente Wechselwirkungen dargestellt werden. Außerdem können die Affinitäten von verschiedenen Molekülen zu einem Zielmolekül durch den Vergleich der Peakintensitäten ermittelt werden [Thiede und von Janta-Lipinski, 1998].

3. Ausblick

Komplexe Prozesse wie die Apoptose können mit klassischer Proteomanalyse untersucht werden. Die Ergebnisse erbrachten eine Fülle von Proteinen, deren Funktionen im Apoptoseprozess unbekannt sind. Diese Proteine können nun im Detail untersucht werden, wobei Informationen aus den Analysen wie Caspase-Spaltung oder Translokationen genutzt werden können. Da viele Caspase-Spaltprodukte identifiziert wurden, ist ein erster Ansatz zu bestimmen, ob die Spaltung nur zur Deaktivierung eines Proteins führt oder ob aktive Fragmente erzeugt wurden. Die überwiegende Identifikation von RNA-bindenden Proteinen und den Effekt auf Caspase-Spaltung bei p54^{nrb} gibt auch Hinweise auf einen möglichen neuen Mechanismus im Apoptoseprozess.

Die Zuordnung von Funktionen zu Sequenzen ist ein wichtiger nächster Schritt nach der Sequenzierung ganzer Genome. Das gezeigte Vorgehen bei den MRPs kann mit allgemein zugänglichen Programmen durchgeführt werden.

Die Aufklärung von RNA-Protein-Wechselwirkungen ist ein schwieriges analytisches Unterfangen. Die verwendete Vorgehensweise zur Aufklärung von RNA-Protein-Wechselwirkungen in ribosomalen Untereinheiten ermöglichte die Identifikation der Kontakte auf einzelne Aminosäuren und Nukleotide. Damit könnten auch andere bekannte Ribonukleoproteinkomplexe mit dieser Methodik untersucht werden. Dadurch würde das bisher eingeschränkte Wissen über RNA-Protein-Wechselwirkungen vergrößert werden.

Bisher erschien die Benutzung von MALDI-MS zur Untersuchung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen ungeeignet. Für RNA-Peptid Wechselwirkungen konnten jedoch relative Affinitäten von verschiedenen Molekülen zu einem Zielmolekül ermittelt werden. Insbesondere die Tatsache, dass Arginin als Aminosäure mit stärksten Einfluss auf die Komplexbildung gefunden wurde, bestätigt die Vertrauenswürdigkeit der Ergebnisse. Da Peptide und RNAs als potentielle Pharmazeutika bzw. als Ziele von Medikamenten gelten, könnte aufgrund der Sensitivität von MALDI-MS diese Technik eine interessante Alternative zu gewöhnlichen Techniken als Screening-Methode sein.

Literaturverzeichnis

- Aebersold R und Goodlett DR, Mass spectrometry in proteomics, *Chem Rev*, 2001, 101, 269-295.
- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW, Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation, *Mol Cell*, 2002, 9, 423-432.
- Alarcon-Vargas D und Ronai Z, p53-Mdm2-the affair that never ends, *Carcinogenesis*, 2002, 23, 541-547.
- Appel RD, Bairoch A, Sanchez JC, Vargas JR, Golaz O, Pasquali C, Hochstrasser DF, Federated two-dimensional electrophoresis database: a simple means of publishing two-dimensional electrophoresis data, *Electrophoresis*, 1996, 17, 540-546.
- Ashkenazi A und Dixit VM, Apoptosis control by death and decoy receptors, *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11, 255-260.
- Ban N, Freeborn B, Nissen P, Penczek P, Grassucci RA, Sweet R, Frank J, Moore PB, Steitz TA, A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit, *Cell*, 1998, 93, 1105-1115.
- Bates S und Vousden KH, Mechanisms of p53-mediated apoptosis, *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55, 28-37.
- Bennett MR, Mechanisms of p53-induced apoptosis, *Biochem Pharmacol*, 1999, 58, 1089-1095.
- Berggren KN, Schulenberg B, Lopez MF, Steinberg TH, Bogdanova A, Smejkal G, Wang A, Patton WF, An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: Comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation, *Proteomics*, 2002, 2, 486-498.
- Bienvenut WV, Sanchez JC, Karmime A, Rouge V, Rose K, Binz PA, Hochstrasser DF, Toward a clinical molecular scanner for proteome research: parallel protein chemical processing before and during western blot, *Anal Chem*, 1999, 71, 4800-4807.
- Binz PA, Muller M, Walther D, Bienvenut WV, Gras R, Hoogland C, Bouchet G, Gasteiger E, Fabbretti R, Gay S, Palagi P, Wilkins MR, Rouge V, Tonella L, Paesano S, Rossellat G, Karmime A, Bairoch A, Sanchez JC, Appel RD, Hochstrasser DF, A molecular scanner to automate proteomic research and to display proteome images, *Anal Chem*, 1999, 71, 4981-4988.
- Brimacombe R, Atmadja J, Stiege W, Schuler D, A detailed model of the three-dimensional structure of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA in situ in the 30 S subunit, *J Mol Biol*, 1988, 199, 115-136.

- Brockstedt E, Rickers A, Kostka S, Laubersheimer A, Dorken B, Wittmann-Liebold B, Bommert K, Otto A, Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3, *J Biol Chem*, 1998, 273, 28057-28064.
- Brodersen DE, Clemons WM Jr, Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V, The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit, *Cell*, 2000, 103, 1143-1154.
- Brodersen DE, Clemons WM Jr, Carter AP, Wimberly BT, Ramakrishnan V, Crystal Structure of the 30 S Ribosomal Subunit from *Thermus thermophilus*: Structure of the Proteins and their Interactions with 16 S RNA, *J Mol Biol*, 2002, 316, 725-768.
- Brown RS, Lennon JJ, Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer, *Anal Chem*, 1995, 67, 1998-2003.
- Burd CG und Dreyfuss G, Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins, *Science*, 1994, 265, 615-621.
- Butt A, Davison MD, Smith GJ, Young JA, Gaskell SJ, Oliver SG, Beynon RJ, Chromatographic separations as a prelude to two-dimensional electrophoresis in proteomics analysis, *Proteomics*, 2001, 1, 42-53.
- Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V, Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, *Nature*, 2000, 407, 340-348.
- Carter AP, Clemons WM Jr, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Hartsch T, Wimberly BT, Ramakrishnan V, Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit, *Science*, 2001, 291, 498-501.
- Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D, Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx, *Science*, 1998, 281, 1860-1863.
- Charette SJ, Lambert H, Landry J, A kinase-independent function of Ask1 in caspase-independent cell death, *J Biol Chem*, 2001, 276, 36071-36074.
- Chaurand P, Luetzenkirchen F, Spengler B, Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999, 10, 91-103.
- Coultas L, Strasser A, The molecular control of DNA damage-induced cell death, *Apoptosis*, 2000, 5, 491-507.

- Desagher S und Martinou JC, Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell Biol*, 2000, 10, 369-377.
- Dole M, Mack, LL, Hines, RL, Mobley, RC, Ferguson, LP, Alice MB, Molecular beams of macroions, *J Phys Chem*, 1968, 49, 2240-2249.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X, Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition, *Cell*, 2000, 102, 33-42.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annu Rev Biochem*, 1999, 68, 383-424.
- Eng JK, McCormack, AL, Yates, JR, An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database, *J Am Soc Mass Spectrom*, 1994, 5, 976-989.
- Evan GI und Vousden KH, Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, *Nature*, 2001, 411, 342-348.
- Fenselau C und Demirev PA, Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrom Rev*, 2001, 20, 157-171.
- Fenyő D, Identifying the proteome: software tools, *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11, 391-395.
- Ferri KF und Kroemer G, Organelle-specific initiation of cell death pathways, *Nat Cell Biol*, 2001, 3, E255-63.
- Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM, Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*, *Nat Biotechnol*, 2002, 20, 301-305.
- Fountoulakis M, Takacs MF, Takacs B, Enrichment of low-copy-number gene products by hydrophobic interaction chromatography, *J Chromatogr A*, 1999a, 833, 157-168.
- Fountoulakis M, Takacs MF, Berndt P, Langen H, Takacs B, Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography, *Electrophoresis*, 1999b, 20, 2181-2195.
- Figey D und Pinto D, Proteomics on a chip: promising developments, *Electrophoresis*, 2001, 22, 208-216.
- Frank J, Zhu J, Penczek P, Li Y, Srivastava S, Verschoor A, Radermacher M, Grassucci R, Lata RK, Agrawal RK, A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the *E. coli* ribosome, *Nature*, 1995, 376, 441-444.

- Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM, Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells, *Nat Med*, 1996, 2, 574-577.
- Fulda S, Sieverts H, Friesen C, Herr I, Debatin KM, The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells, *Cancer Res*, 1997, 57, 3823-3829.
- Gamen S, Anel A, Lasierra P, Alava MA, Martinez-Lorenzo MJ, Pineiro A, Naval J, Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way, *FEBS Lett*, 1997, 417, 360-364.
- Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelman A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G, Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes, *Nature*, 2002, 415, 141-147.
- Gerner C, Frohwein U, Gotzmann J, Bayer E, Gelbmann D, Bursch W, Schulte-Hermann R, The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis, *J Biol Chem*, 2000, 275, 39018-39026.
- Godovac-Zimmermann, J und Brown, LR, Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics, *Mass Spectrom Rev*, 2001, 20, 1-57.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W, The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis*, 2000, 21, 1037-1053.
- Goshe MB, Conrads TP, Panisko EA, Angell NH, Veenstra TD, Smith RD, Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses, *Anal Chem*, 2001, 73, 2578-2586.
- Graack HR und Wittmann-Liebold B, Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast, *Biochem J*, 1998, 329, 433-448.
- Griffin TJ, Smith LM, Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry, *Trends Biotechnol*, 2000, 18, 77-84.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ, Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death, *J Biol Chem*, 1999, 274, 1156-1163.
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R, Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, *Mol Cell Biol*, 1999a, 19, 1720-1730.

- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R, Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat Biotechnol*, 1999b, 17, 994-999.
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R, Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology, *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97, 9390-9395.
- Häcker G, The morphology of apoptosis, *Cell Tissue Res*, 2000, 301, 5-17.
- Hengartner MO, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 2000, 407, 770-776.
- Herbert B und Righetti PG, A turning point in proteome analysis: sample prefractionation via multicompartment electrolyzers with isoelectric membranes, *Electrophoresis*, 2000, 21, 3639-3648.
- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sorensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M, Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry, *Nature*, 2002, 415, 180-183.
- Hoffmann P, Ji H, Moritz RL, Connolly LM, Frecklington DF, Layton MJ, Eddes JS, Simpson RJ, Continuous free-flow electrophoresis separation of cytosolic proteins from the human colon carcinoma cell line LIM 1215: a non two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis strategy, *Proteomics*, 2001, 1, 807-818.
- Hofstadler SA und Griffey RH, Analysis of noncovalent complexes of DNA and RNA by mass spectrometry, *Chem Rev*, 2001, 101, 377-390.
- Huang P und Oliff A, Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy, *Trends Cell Biol*, 2001, 11, 343-348.
- Imamura T, Izumi H, Nagatani G, Ise T, Nomoto M, Iwamoto Y, Kohno K, Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein, *J Biol Chem*, 2001, 276, 7534-7540.
- Iribarne JV und Thomson BA, On the evaporation of small ions from charged droplets, *J Chem Phys*, 1976, 64, 2287-2294.
- Jamieson ER und Lippard SJ, Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts, *Chem Rev*, 1999, 99, 2467-2469.

- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW, Apoptosis: A link between Cancer Genetics and Chemotherapy, *Cell*, 2002, 108, 153-164.
- Jungblut P und Thiede B, Protein identification from 2-DE gels by MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrom Rev*, 1997, 16, 145-162.
- Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR, DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1, *Mol Cell*, 1998, 1, 543-551.
- Kasparkova J, Pospisilova S, Brabec V, Different recognition of DNA modified by antitumor cisplatin and its clinically ineffective trans isomer by tumor suppressor protein p53, *J Biol Chem*, 2001, 276, 16064-16069.
- Kaufmann H, Bailey JE, Fussenegger M, Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis, *Proteomics*, 2001, 1, 194-199.
- Keene JD, Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome, *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98, 7018-7024.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 1972, 26, 239-257.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME, Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor, *EMBO J*, 1995, 14, 5579-5588.
- Klose J, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, *Humangenetik*, 1975, 26, 231-243.
- Klose J und Kobalz U, Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis*, 1995, 16, 1034-1059.
- Krammer PH, CD95's deadly mission in the immune system, *Nature*, 2000, 407, 789-795.
- Li L, Garden RW, Sweedler JV, Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling, *Trends Biotechnol*, 2000, 18, 151-160.
- Loboda AV, Krutchinsky AN, Bromirski M, Ens W, Standing KG, A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer with a matrix-assisted laser desorption/ionization source: design and performance, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14, 1047-1057.

- Lopez MF, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton WF, A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling, *Electrophoresis*, 2000, 21, 3673-3683.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X, Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c, *Cell*, 1996, 86, 147-157.
- Mann M und Wilm M, Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags, *Anal Chem*, 1994, 66, 4390-4399.
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A, Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry, *Annu Rev Biochem*, 2001, 70, 437-473.
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM, Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling, *J Biol Chem*, 2000, 275, 16202-16212.
- Mattson MP, Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1, 120-129.
- McGahon AJ, Costa Pereira AP, Daly L, Cotter TG, Chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human leukaemic cells is independent of the Fas (APO-1/CD95) receptor/ligand system, *Br J Haematol* 1998, 101, 539-547.
- Medzihradzky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL, The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer, *Anal Chem*, 2000, 72, 552-558.
- Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC, Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene, *Cancer Res*, 1994, 54, 3131-3135.
- Miyashita T, Reed JC, Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell*, 1995, 80, 293-299.
- Momand J, Wu HH, Dasgupta G, MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein, *Gene*, 2000, 242, 15-29.
- Mueller F und Brimacombe R, A new model for the three-dimensional folding of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA. I. Fitting the RNA to a 3D electron microscopic map at 20 A, *J Mol Biol*, 1997a, 271, 524-544.
- Mueller F und Brimacombe R, A new model for the three-dimensional folding of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA. II. The RNA-protein interaction data, *J Mol Biol*, 1997b, 271, 545-565.

- Mueller F, Stark H, van Heel M, Rinke-Appel J, Brimacombe R, A new model for the three-dimensional folding of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA. III. The topography of the functional centre. *J Mol Biol*, 1997, 271, 566-587.
- Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH, p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs, *J Exp Med*, 1998, 188, 2033-2045.
- Müller M, Gras R, Appel RD, Bienvenut WV, Hochstrasser DF, Visualization and analysis of molecular scanner peptide mass spectra, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002, 13, 221-231.
- Nakano K und Vousden KH, PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol Cell*, 2001, 7, 683-694.
- Nedelkov D und Nelson RW, Delineation of in vivo assembled multiprotein complexes via biomolecular interaction analysis mass spectrometry, *Proteomics*, 2001, 1, 1441-1446.
- Newton K und Strasser A, Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy, *J Exp Med*, 2000, 191, 195-200.
- Nicholson DW, From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents, *Nature*, 2000, 407, 810-816.
- Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA, The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis, *Science*, 2000, 289, 920-930.
- Norin M und Sundstöm M, Structural proteomics: developments in structure-to-function predictions, *Trends Biotechnol*, 2002, 20, 79-84.
- O'Brien TW, Liu J, Sylvester JE, Mougey EB, Fischel-Ghodsian N, Thiede B, Wittmann-Liebold B, Graack HR, Mammalian mitochondrial ribosomal proteins (4), *J Biol Chem*, 2000, 275, 18153-18159.
- O'Brien TW, Fiesler SE, Denslow ND, Thiede B, Wittmann-Liebold B, Mougey EB, Sylvester JE, Graack, HR, Mammalian mitochondrial ribosomal proteins, *J Biol Chem*, 1999, 274, 36043-36051.
- O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F, Fas counter-attack--the best form of tumor defense?, *Nat Med*, 1999, 5, 267-268.
- O'Connor L, Harris AW, Strasser A, CD95 (Fas/APO-1) and p53 signal apoptosis independently in diverse cell types, *Cancer Res*, 2000, 60, 1217-1220.

- Oda Y, Huang K, Cross FR, Cowburn D, Chait BT, Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation, *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96, 6591-6596.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N, Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science*, 2000a, 288, 1053-1058.
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y, p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53, *Cell*, 2000b, 102, 849-862.
- O'Farrell PH, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem*, 1975, 250, 4007-4021.
- Ogle JM, Brodersen DE, Clemons WM Jr, Tarry MJ, Carter AP, Ramakrishnan V, Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, 2001, 292, 897-902.
- Parker KC, Scoring methods in MALDI peptide mass fingerprinting: ChemScore, and the ChemApplex program, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002, 13, 22-39.
- Patterson SD, Grossman JS, D'Andrea P, Latter GI, Reduced numatrin/B23/nucleophosmin labeling in apoptotic Jurkat T-lymphoblasts, *J Biol Chem*, 1995, 270, 9429-9436.
- Patton WF, A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics, *Electrophoresis*, 2000, 21, 1123-1144.
- Perez-Canadillas JM und Varani G, Recent advances in RNA-protein recognition, *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11, 53-58.
- Pioletti M, Schlunzen F, Harms J, Zarivach R, Gluhmann M, Avila H, Bashan A, Bartels H, Auerbach T, Jacobi C, Hartsch T, Yonath A, Franceschi F, Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3, *EMBO J*, 2001, 20, 1829-1839.
- Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A, Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer, *Nature*, 1998, 396, 699-703.
- Prasad SC, Soldatenkov VA, Kuettel MR, Thraves PJ, Zou X, Dritschilo A, Protein changes associated with ionizing radiation-induced apoptosis in human prostate epithelial tumor cells, *Electrophoresis*, 1999, 20, 1065-1074.
- Qin J, Ruud J, Chait BT, A practical ion trap mass spectrometer for the analysis of peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization, *Anal Chem*, 1996, 68, 1784-1791.

- Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A, Lunardi J, A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris(bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels, *Proteomics*, 2001, 1, 699-704.
- Rabilloud T, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountain, *Proteomics*, 2002, 2, 3-10.
- Ramakrishnan V und White SW, Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome, *Trends Biochem Sci*, 1998, 23, 208-212.
- Ramakrishnan V, Ribosome structure and the mechanism of translation, *Cell*, 2002, 108, 557-572.
- Rouault T und Klausner R, Regulation of iron metabolism in eukaryotes, *Curr Top Cell Regul*, 1997, 35, 1-19.
- Ruiz-Ruiz MC und Lopez-Rivas A, p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells, *Cell Death Differ*, 1999, 6, 271-280.
- Salvesen GS und Dixit VM, Caspase activation: the induced-proximity model, *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96, 10964-10967.
- Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S, Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells, *EMBO J*, 1999, 18, 2040-2048.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways, *EMBO J*, 1998, 17, 1675-1678.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME, The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis, *J Biol Chem*, 1999, 274, 1541-1548.
- Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, Yonath A, Franceschi F, Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria, *Nature*, 2001, 413, 814-821.
- Sergiev P, Leonov A, Dokudovskaya O, Shpanchenko O, Dontsova O, Bogdanov A, Rinke-Appel J, Mueller F, Osswas M, von Knoblauch K, Brimacombe R, Correlating the X-Ray Structures for Halo- and Thermophilic Ribosomal Subunits with Biochemical Data for the Escherichia coli Ribosome, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2001, 66, 87-100.

Shen Y, Tolic N, Zhao R, Pasa-Tolic L, Li L, Berger SJ, Harkewicz R, Anderson GA, Belov ME, Smith RD, High-throughput proteomics using high-efficiency multiple-capillary liquid chromatography with on-line high-performance ESI FTICR mass spectrometry, *Anal Chem*, 2001, 73, 3011-3021.

Shevchenko A, Sunyaev S, Loboda A, Shevchenko A, Bork P, Ens W, Standing KG, Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching, *Anal Chem*, 2001, 73, 1917-1926.

Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ, The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity, *Nat Immunol*, 2000a, 1, 469-474.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ, Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations, *Science*, 2000b, 288, 2354-2357.

Simpson RJ und Dorow DS, Cancer proteomics: from signaling networks to tumor markers, *Trends Biotechnol*, 2001, 19 (10 Suppl), S40-S48.

Siomi H und Dreyfuss G, RNA-binding proteins as regulators of gene expression, *Curr Opin Genet Dev*, 1997, 7, 345-353.

Siuzdak G, Probing viruses with mass spectrometry, *J Mass Spectrom*, 1998, 33, 203-211.

Smolka MB, Zhou H, Aebersold R, Quantitative Protein Profiling Using Two-dimensional Gel Elektrophoresis, Isotope-coded Afinity Tag Labeling, and Mass Spectrometry, *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1, 19-29.

Solouki T, Marto JA, White FM, Guan S, Marshall AG, Attomole biomolecule mass analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance, *Anal Chem*, 1995, 67, 4139-4144.

Spirin AS, Ribosome as a molecular machine, *FEBS Lett*, 2002, 514, 2-10.

Stancato LF und Petricoin EF, Fingerprinting of signal transduction pathways using a combination of anti-phosphotyrosine immunoprecipitations and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, *Electrophoresis*, 2001, 22, 2120-2124.

Stark H, Mueller F, Orlova EV, Schatz M, Dube P, Erdemir T, Zemlin F, Brimacombe R, van Heel M, The 70S Escherichia coli ribosome at 23 A resolution: fitting the ribosomal RNA, *Structure*, 1995, 3, 815-821.

Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S, Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis, *EMBO J*, 1995, 14, 6136-6147.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G, Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process, *J Exp Med*, 1999a, 189, 381-394.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, 1999b, 397, 441-446.

Tanaka I, Nakagawa A, Hosaka H, Wakatsuki S, Mueller F, Brimacombe R, Matching the crystallographic structure of ribosomal protein S7 to a three-dimensional model of the 16S ribosomal RNA, *RNA*, 1998, 4, 542-550.

Thiede, B, Siejak, F, Dimmler, C, Rudel, T, Prediction of translocation and cleavage of hnRNPs and Rho GDI 2 during apoptosis by subcellular proteome analysis, *Proteomics*, 2002, im Druck.

Thiede B, Dimmler C, Siejak F, Rudel T, Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis. *J Biol Chem*, 2001, 276, 26044-26050.

Thiede, B, Siejak, F, Dimmler, C, Jungblut, PR, Rudel, T, A two dimensional database of a human Jurkat T-cell line, *Electrophoresis*, 2000a, 21, 2713-2720.

Thiede, B, Lamer, S, Mattow, J, Siejak, F, Dimmler, C, Rudel, T, Jungblut, PR, Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000b, 14, 496-502.

Thiede, B, Urlaub, H, Neubauer, H, Grelle, G, Wittmann-Liebold, B, Precise determination of RNA-protein contact sites in the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*, *Biochem J*, 1998, 334, 39-42.

Thiede, B und von Janta-Lipinski, M, Noncovalent RNA-peptide complexes detected by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1998, 12, 1889-1894.

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW, A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis, *J Biol Chem*, 1997, 272, 17907-17911.

Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M, Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology, *Proteomics*, 2001, 1, 377-396.

- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM, A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature*, 2000, 403, 623-627.
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS, Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extract, *Electrophoresis*, 1997, 18, 2071-2077.
- Urlaub, H, Thiede, B, Müller, EC, Brimacombe, R, Wittmann-Liebold, B, Identification and sequence analysis of contact sites between ribosomal proteins and rRNA in *Escherichia coli* 30 S subunits by a new approach using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry combined with N-terminal microsequencing, *J Biol Chem*, 1997, 272, 14547-14555.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL, Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins, *Cell*, 2000, 102, 43-53.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ, Surfing the p53 network, *Nature*, 2000, 408, 307-310.
- Walleczek J, Schuler D, Stoffler-Meilicke M, Brimacombe R, Stoffler G, A model for the spatial arrangement of the proteins in the large subunit of the *Escherichia coli* ribosome, *EMBO J*, 1988, 7, 3571-3576.
- Wan J, Wang J, Cheng H, Yu Y, Xing G, Oiu Z, Qian X, He F, Proteomic analysis of apoptosis initiation induced by all-trans retinoic acid in human acute promyelocytic leukemia cells, *Electrophoresis*, 2001, 22, 3026-3037.
- Wang ZF, Ingledue TC, Dominski Z, Sanchez R, Marzluff WF, Two *Xenopus* proteins that bind the 3' end of histone mRNA: implications for translational control of histone synthesis during oogenesis, *Mol Cell Biol*, 1999, 19, 835-845.
- Warner JR, Nascent ribosomes, *Cell*, 2001, 107, 133-136.
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd, Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology, *Nat Biotechnol*, 2001, 19, 242-247.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I, Progress with gene-product mapping of the *Mollicutes*: *Mycoplasma genitalium*, *Electrophoresis*, 1995, 16, 1090-1094.
- Wetzel CC und Berberich SJ, p53 binds to cisplatin-damaged DNA, *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1517, 392-397.

- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF, From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis, *Biotechnology*, 1996, 14, 61-65.
- Winston RL und Fitzgerald MC, Mass spectrometry as a readout of protein structure and function, *Mass Spectrom Rev*, 1997, 16, 165-179.
- Worbs M, Huber R, Wahl MC, Crystal structure of ribosomal protein L4 shows RNA-binding sites for ribosome incorporation and feedback control of the S10 operon, *EMBO J*, 2000, 19, 807-818.
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D, Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis, *Cell*, 1997, 89, 1067-1076.
- Yonath A, THE SEARCH AND ITS OUTCOME: High-Resolution Structures of Ribosomal Particles from Mesophilic, Thermophilic, and Halophilic Bacteria at Various Functional States, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002, 31, 257-273.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B, PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells, *Mol Cell*, 2001, 7, 673-682.
- Yuan J und Yankner BA, Apoptosis in the nervous system, *Nature*, 2000, 407, 802-809.
- Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ, Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis, *Science*, 2000, 290, 1761-1765.
- Zhou BB und Elledge SJ, The DNA damage response: putting checkpoints in perspective, *Nature*, 2000, 408, 433-439.
- Zhou H, Ranish JA, Watts JD, Aebersold R, Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry, *Nat Biotechnol*, 2002, 20, 512-515.
- Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M, Global analysis of protein activities using proteome chips, *Science*, 2001, 293, 2101-2105.

Publikationsverzeichnis

Originalpublikationen:

1. Ghadimi MP, Sanzenbacher R, Thiede B, Wenzel J, Jing Q, Plomann M, Borkhardt A, Kabelitz D, Janssen O, Identification of the interaction partners of the cytosolic polyproline region of CD95 ligand (CD178), *FEBS Lett.*, 2002, 519, 50-58. (Impact 2000: 3.440).
2. Thiede B, Siejak F, Dimmler C, Rudel T, Prediction of translocation and cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleolar proteins and Rho guanine dissociation inhibitor 2 during apoptosis by subcellular proteome analysis, *Proteomics*, 2002, 1, 996-1006. (Impact 2000: 3.385).
3. Thiede B, Dimmler C, Siejak F, Rudel T, Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 26044-26050. (Impact 2000: 7.368).
4. Ketudat-Cairns JR, Champattanachai V, Srisomsap C, Wittmann-Liebold B, Thiede B, Svasti J, Sequence and expression of Thai Rosewood beta-glucosidase/beta-fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein, *J. Biochem. (Tokyo)*, 2000, 128, 999-1008. (Impact 2000: 2.116).
5. O'Brien TW, Liu J, Sylvester JE, Mougey EB, Fischel-Ghodsian N, Thiede B, Wittmann-Liebold B, Graack HR Mammalian mitochondrial ribosomal proteins (4), *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 18153-18159. (Impact 2000: 7.368).
6. Thiede B, Lamer S, Mattow J, Siejak F, Dimmler C, Rudel T, Jungblut PR Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000, 14, 496-502. (Impact 2000: 2.184).
7. Thiede B und Wittmann-Liebold B, Analysis of RNA-protein cross-link sites by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and N-terminal microsequencing. *Methods Enzymol.*, 2000, 318, 438-446. (Impact 2000: 2.340).
8. Thiede B, Siejak F, Dimmler C, Jungblut PR, Rudel T, A two dimensional database of a human Jurkat T-cell line, *Electrophoresis*, 2000, 21, 2713-2720. (Impact 2000: 3.385).
9. Greuer B., Thiede B., Brimacombe R, The cross-link from the upstream region of mRNA to ribosomal protein S7 is located in the C-terminal peptide: Experimental verification of a prediction from modeling studies, *RNA*, 1999, 5, 1521-1525. (Impact 2000: 5.046).
10. O'Brien TW, Fiesler SE, Denslow ND, Thiede B, Wittmann-Liebold B, Mougey EB, Sylvester JE, Graack HR, Mammalian mitochondrial ribosomal proteins, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 36043-36051. (Impact 2000: 7.368).

11. Thiede B, Urlaub H, Neubauer H, Grelle G, Wittmann-Liebold B, Precise determination of RNA-protein contact sites in the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*, *Biochem. J.*, 1998, 334, 39-42. (Impact 2000: 4.280).
12. Thiede B und von Janta-Lipinski M, Noncovalent RNA-peptide complexes detected by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, 12, 1889-1894. (Impact 2000: 2.184).
13. Goletz S, Thiede B, Hanisch FG, Schultz M, Peter-Katalinic J, Müller S, Seitz O, Karsten U, A sequencing strategy for the localization of O-glycosylation sites of MUC1 tandem repeats by PSD-MALDI mass spectrometry, *Glycobiology*, 1997, 7, 881-896. (Impact 2000: 3.419).
14. Stulik J, Kovarova H, Macela A, Bures J, Jandik P, Langr F, Otto A, Thiede B, Jungblut P, Overexpression of calcium-binding protein calgranulin B in colonic mucosal diseases, *Clin. Chim. Acta*, 1997, 265, 41-55. (Impact 2000: 1.041).
15. Thiede B, Salnikow J, Wittmann-Liebold B, C-terminal ladder sequencing by an approach combining chemical degradation with analysis by matrix-assisted-laser-desorption ionization mass spectrometry, *Eur. J. Biochem.*, 1997, 244, 750-754. (Impact 2000: 2.852).
16. Urlaub H, Thiede B, Müller EC, Brimacombe R, Wittmann-Liebold B, Identification and sequence analysis of contact sites between ribosomal proteins and rRNA in *Escherichia coli* 30 S subunits by a new approach using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry combined with N-terminal microsequencing, *J. Biol. Chem*, 1997, 272, 14547-14555. (Impact 2000: 7.368).
17. Urlaub H, Thiede B, Müller EC, Wittmann-Liebold B, Contact sites of peptide-oligoribonucleotide cross-links identified by a combination of peptide and nucleotide sequencing with MALDI-MS, *J. Prot. Chem.*, 1997, 16, 375-383. (Impact 2000: 0.745).
18. Mirgorodskaya, O, Kazanina G, Mirgorodskaya E, Matveyev V, Thiede B, Khaitlin S, Proteolytic cleavage of melittin with the actin-digesting protease, *Prot. Pep. Lett.*, 1996, 3, 81-88. (Impact 2000: 0.468).
19. Müller EC, Thiede B, Zimny-Arndt U, Scheler C, Prehm J, Müller-Werdan U, Wittmann-Liebold B, Otto, A, Jungblut, P. High-performance human myocardial two-dimensional electrophoresis database: Edition 1996, *Electrophoresis*, 1996, 17, 1700-1712. (Impact 2000: 3.385).
20. Otto A, Thiede B, Müller EC, Scheler C, Wittmann-Liebold B, Jungblut P, Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry, *Electrophoresis*, 1996, 17, 1643-1650. (Impact 2000: 3.385).
21. Thiede, B, Otto, A, Zimny-Arndt U, Müller EC, Jungblut P, Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Electrophoresis*, 1996, 17, 588-599. (Impact 2000: 3.385).

22. Vater J, Heinze K, Friedrich B, Kablitz B, Blokesch A, Irrgang KD, Thiede B, Salnikow J, Novel methodology for topological studies of photosynthetic membrane protein complexes. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 1996, 100, 2107-2111. (Impact 2000: 1.531).
23. Vladimirov SN, Ivanov AV, Karpova GG, Musolyamov AK, Egorov TA, Thiede B, Wittmann-Liebold B, Otto A, Characterization of the human small ribosomal subunit proteins by N-terminal and internal sequencing and mass spectrometry, *Eur. J. Biochem.*, 1996, 239, 144-149. (Impact 2000: 2.852).
24. Wagner D, Salnikow J, Otto A, Thiede B, Vater J, A protein chemical analysis of the heterogeneity of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase from zea mays, *Plant Sci.*, 1996, 113, 13-20. (Impact 2000: 1.259).
25. Thiede B, Wittmann-Liebold B, Bienert M, Krause E, MALDI-MS for C-terminal sequence determination of peptides and proteins degraded by carboxypeptidase Y and P, *FEBS Lett.*, 1995, 357, 65-69. (Impact 2000: 3.440).

Übersichtsartikel

1. Jungblut P und Thiede B, Protein identification from 2-DE gels by MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, 1997, 16, 145-162. (Impact 2000: 7.600).
2. Jungblut P, Thiede B, Zimny-Arndt U, Müller EC, Scheler C, Wittmann-Liebold B, Otto A, Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels, *Electrophoresis*, 1996, 17, 839-847. (Impact 2000: 3.385).

Buchartikel

1. Thiede B, Urlaub H, Neubauer H, Wittmann-Liebold B, Identification and sequence analysis of RNA-protein contact sites by N-terminal sequencing and MALDI-MS, in: *RNA-protein interaction protocols*, Eds. Haynes, S., Humana Press, Totowa, NJ, USA. *Methods Mol. Biol.*, 1999, 118, 63-72.
2. Thiede B, Mass spectrometry in peptide and protein sequence analysis, in: *Protein Structure Analysis: Preparation, Characterization, and Microsequencing*, Eds. Kamp, RM, Choli-Papadopoulou, D and Wittmann-Liebold, B., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1997, 279-293.
3. Thiede B, Carboxy-terminal sequencing by combining carboxypeptidase Y and P digestion with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, in: *Protein Structure Analysis: Preparation, Characterization, and Microsequencing*, Eds. Kamp, RM, Choli-Papadopoulou, D and Wittmann-Liebold, B., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1997, 295-302.

Abstract

1. Wittmann-Liebold B, Seidemann B, Wittmann B, Thiede B, Proteome research: Identification of disease-associated proteins by sophisticated techniques, Eur. J. Cell Biol., 1999, 78 (Suppl. 49), 92.
2. Bischof O, Hechenberger M, Thiede B, Kruft V, Wittmann-Liebold B, Investigations of protein-antibiotic cross-links in prokaryotic ribosomes by sequence analysis and mass spectrometry. J. Prot. Chem., 1994, 13, 477-478.

Wissenschaftliche Vorträge

DGMS 2002, Heidelberg, Proteomics of apoptosis in T cell.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Brigitte Wittmann-Liebold für die langjährige Zusammenarbeit und die wissenschaftliche Förderung.

Herrn PD Dr. Rudel danke ich ebenfalls ganz besonders für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die wissenschaftliche Förderung.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern, die aufgrund ihres Engagements an den in dieser Arbeit erwähnten Publikationen mitgewirkt haben: Chris Dimmler, Hanns-Rüdiger Graack, Gerlinde Grelle, Martin von Janta-Lipinski, Peter Jungblut, Helga Neubauer, Frank Siejak, Jana Söhlke und Henning Urlaub.

Lebenslauf

01.05.66 Geburtsdatum
08/72 – 06/76 Grundschule Struenseestraße, Hamburg
08/76 - 06/85 Gymnasium Allee-Altona, Hamburg
04/87 – 03/93 Studium der Chemie, Universität Hamburg
09/92 – 03/93 Diplomarbeit am ZMNH, Hamburg
 Thema: „Klonierung und Expression von I_k-Kaliumkanälen der Fliege *Drosophila melanogaster*“

09/93 – 02/97 Dissertation am MDC für Molekulare Medizin, Berlin
 Thema: „Proteinanalytische Untersuchungen mittels MALDI-Massenspektrometrie“

03/97 – 12/98 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am MDC für Molekulare Medizin, Berlin
01/99 – 03/99 Wissenschaftlicher Leiter, WITA GmbH, Teltow
04/99 – 06/02 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am MPI für Infektionsbiologie, Berlin

Eidstattliche Erklärung

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
-
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde, bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
-
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
-
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den

Bernd Thiede

Sonderdrucke