

Aus dem Proteom-Zentrum Rostock

Hauptuntersuchungsleiter: Prof. Dr. rer. nat. Michael O. Glocker

**Massenspektrometrische Präzisionsanalyse eines  
Antikörper-Bindemotivs in der Linker-Region von  
C2H2-Zinkfinger-Proteinen: Von der Charakterisierung der  
Epitop-Feinstruktur zur Antikörper-basierten  
Tumordiagnostik am Beispiel des Endometriumkarzinoms**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Maximilian Scherf | geboren am 02.02.1995 in Zwenkau

Rostock | 21.03.2023

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00004466](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004466)



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

**Gutachter:**

1. Gutachter:

Professor Dr. Michael O. Glocker

Hauptuntersuchungsleiter Proteomzentrum Rostock, Abteilung für Proteomforschung,  
Universitätsmedizin und Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock, Schillingallee  
69, 18059 Rostock (themenvergebender Hochschullehrer).

2. Gutachter:

Professor Dr. Toralf Reimer

Stellvertretender Direktor und Leitender Oberarzt Gynäkologie, Klinikum Südstadt Rostock,  
Südtring 81, 18059 Rostock.

3. Gutachter:

Professor Dr. Christoph H. Borchers

Centre for Translational Research in Cancer, McGill University, Lady Davis Institute for  
Medical Research, Jewish General Hospital, 3755 Chemin de la Côte Ste-Catherine Road,  
Montréal, Québec H3T 1E2, Kanada.

**Jahr der Einreichung:** 2023

**Jahr der Verteidigung:** 2023

Gewidmet meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Endometriumkarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Einteilung der Endometriumkarzinome .....	1
1.1.3 Pathogenese und hereditäre Endometriumkarzinome .....	2
1.1.4 Ätiologie .....	4
1.1.5 Diagnostik.....	5
1.1.6 Therapie .....	7
1.2 Antikörper.....	11
1.2.1 Antikörperstruktur .....	11
1.2.2 Diversität der Antikörper .....	12
1.2.3 Epitop-Paratop-Interaktionen .....	13
1.2.4 Anwendungen und Bedeutung von Antikörpern.....	14
1.3 Die Massenspektrometrie von Biomolekülen .....	15
1.3.1 Elektrospray Massenspektrometrie.....	15
1.3.2 Peptid-Fragment-Analyse .....	18
1.3.3 ITEM-TWO .....	19
1.4 Zielsetzung.....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1 Zellkultur und Herstellung von Proteinextrakten.....	22
2.1.1 Zellkultur und Zellbehandlung.....	22
2.1.2 Herstellung von Proteinextrakten aus geernteten Zellen.....	22
2.2 SDS-PAGE und Western Blot der unterschiedlich behandelten Zelllinien.....	23
2.2.1 SDS-PAGE.....	23
2.2.2 Western Blot.....	24
2.3 Auswahl der Hexapeptide 01 bis 10.....	26
2.4 Herstellung der Kapillarnadeln.....	28
2.5 Präparation nano-ESI-MS-kompatibler anti-HpTGEKP-Antikörperlösungen .....	28
2.6 Präparation nano-ESI-MS kompatibler Hexapeptidlösungen .....	29

2.7	Herstellung von nano-ESI-MS-kompatibler Antikörper-Peptid-Lösungen .....	29
2.8	Nano-ESI-Massenspektrometrische Geräteeinstellung und Datenerfassung .....	30
2.9	Analysen der massenspektrometrischen Daten .....	31
2.10	Kompetitives Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay .....	34
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	Zellbiologische und genomische Voruntersuchen zur ZNF-Linkerphosphorylierung ....	36
3.1.1	Wirkung von Okadasäure auf ZNF-Linkerphosphorylierung .....	36
3.1.2	Auswahl der untersuchten ZNF-Linkersequenzen .....	38
3.2	Charakterisierung der Ausgangsmaterialien .....	40
3.2.1	Bestimmung der Atomanzahlen des anti-HpTGEKP-Antikörpers und aller Hexapeptide .....	40
3.2.2	Charakterisierung des anti-HpTGEKP-Antikörpers .....	40
3.2.3	Massenspektrometrische Charakterisierung der ZNF-Linkerpeptide .....	43
3.3	Analyse des anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotivs mittels ITEM-TWO .....	46
3.3.1	Erste grundlegende Ergebnisse des ITEM-TWO-Verfahrens .....	46
3.3.2	Orthodoxe Antikörperbindung .....	53
3.3.3	Unorthodoxe Antikörperbindung .....	60
3.3.4	Ausbleibende Antikörperbindung .....	64
3.3.5	Bestätigung des Bindungsverhaltens im kompetitiven Antikörper-Peptid- Immunkomplex-Substitutionsassay .....	69
3.4	Charakterisierung von in Endometriumkarzinomen mutierten ZNF-Linkersequenzen mittels ITEM-TWO-Analysen .....	71
3.4.1	Ausbleibende Antikörperbindung .....	71
3.4.2	Unorthodoxe Antikörperbindung .....	75
3.4.3	3D-Strukturanalysen ausgewählter in Endometriumkarzinomen gehäuft mutierter ZNF-Linker .....	78
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1	Bedeutungen und Einschränkungen der Anwendung von ITEM-TWO zur Epitop- Feincharakterisierung von Antikörpern .....	83
4.2.	Bedeutung von Missense-Mutationen für die Epitopstruktur und eine assoziierte Tumor- Diagnostik .....	88

4.3	Ausblick .....	91
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>i</b>
6.1	Anhang Material und Methoden .....	i
6.1.1	Ergänzungsinformation zu „2.1 Zellkultur und Herstellung von Proteinextrakten“ .....	i
6.1.2	Ergänzungsinformation zu „2.5 Präparation nano-ESI-MS-kompatibler anti-HpTGEKP-Antikörperlösungen“ .....	vii
6.1.3	Ergänzungsinformation zu „2.6 Präparation nano-ESI-MS kompatibler Hexapeptidlösungen“ .....	viii
6.1.4	Ergänzungsinformation zu „2.8 Nano-ESI-Massenspektrometrische Geräteeinstellung und Datenerfassung“ .....	viii
6.1.5	Ergänzungsinformation zu „2.9 Analysen der massenspektrometrischen Daten“ .....	ix
6.2	Anhang Ergebnisteil .....	xi
6.2.1	Ergänzungsmaterialien zu „3.2 Charakterisierung der Ausgangsmaterialien“ .....	xi
6.2.2	Ergänzungsmaterialien zu „3.3 Analyse des anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotivs mittels ITEM-TWO“ .....	xxii
6.2.3	Ergänzungsmaterialien zu „3.4 Charakterisierung von in Endometriumkarzinomen mutierten ZNF-Linkersequenzen mittels ITEM-TWO-Analysen“ .....	xliv
6.3	Literaturverzeichnis .....	I
6.4	Abkürzungsverzeichnis .....	Ixix
6.5	Abbildungsverzeichnis .....	Ixxi
6.7	Tabellenverzeichnis .....	Ixxv
6.8	Thesen .....	Ixxvi
6.9	Publikationen .....	Ixxx
6.9.1	Liste der Publikationen .....	Ixxx
6.9.2	Beiträge zu den Publikationen .....	Ixxxi
6.10	Eidesstattliche Versicherung .....	Ixxxiii
6.11	Danksagung .....	Ixxxiv

# **1. Einleitung**

## **1.1 Das Endometriumkarzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das Endometriumkarzinom, welches auch als Korpuskarzinom bezeichnet wird, stellt bei Frauen die am sechsthäufigsten diagnostizierte Krebserkrankung dar<sup>(1)</sup>. Es weist weltweit eine jährlich konstant steigende Inzidenz auf, insbesondere in Ländern mit niedrigen und mittleren Einkommensverhältnissen<sup>(2, 3)</sup>. Dabei zeigen sich in verschiedenen Studien breite Schwankungen. So wird die jährliche Inzidenz weltweit mit etwa 142 000 Neuerkrankungen<sup>(4)</sup> bis, geltend für das Jahr 2020, schätzungsweise 417 000 Neuerkrankungen<sup>(1)</sup> angegeben. Während in Süd- und Zentralasien sowie in afrikanischen Regionen die niedrigsten Inzidenzraten mit etwa 3 Fällen auf 100 000 Einwohnern vorliegen, weisen osteuropäische und nordamerikanische Regionen mit etwa 20 Fällen auf 100 000 Einwohnern die höchsten Inzidenzraten auf<sup>(1)</sup>. In Deutschland sind etwa 11 000 Neuerkrankungen jährlich zu verzeichnen<sup>(5, 6)</sup>.

Das Endometriumkarzinom tritt hauptsächlich bei postmenopausalen Frauen auf<sup>(4, 7)</sup>. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt etwa 69 Jahre<sup>(2)</sup>. Auch die Zahl der weltweit jährlich an einem Endometriumkarzinom versterbenden Frauen schwankt zwischen 42 000<sup>(4)</sup> und für das Jahr 2020 schätzungsweise 97 000<sup>(1)</sup>. Damit ist laut WHO die weltweite Mortalitätsrate mit 1,8 auf 100 000 Frauen signifikant geringer als die entsprechenden Inzidenzraten<sup>(8)</sup>.

### **1.1.2 Einteilung der Endometriumkarzinome**

Endometriumkarzinome werden in Tumore vom Typ I und Typ II mittels herkömmlicher pathologischer Methoden klassifiziert, wobei zu ca. 85 % der Fälle ein dem Typ I zugeordnetes endometrioides Endometriumkarzinom vorliegt<sup>(9)</sup>. Auf diese Weise kann unter anderem eine Bewertung des Risikos für Metastasen und Rezidive erfolgen<sup>(10)</sup>, die jeweils im Folgenden nicht explizit abgehandelt werden. Seröse und klarzellige Endometriumkarzinome werden zum Typ II gezählt, wobei sich die serösen Endometriumkarzinome bei 3 % bis 10 % und die klarzelligen Endometriumkarzinome bei unter 5 % aller Endometriumkarzinome finden<sup>(9)</sup>. Auf hereditäre Endometriumkarzinome wird im folgenden Kapitel näher eingegangen (s. Abschnitt 1.1.3). Vorstufen der Endometriumkarzinome wie Endometriumhyperplasien und atypische Endometriumhyperplasien werden ebenso wie Karzinomsarkome des Uterus, neuroendokrine und undifferenzierte Endometriumkarzinome nicht explizit betrachtet.

Zunehmend gewinnt eine neuere, molekulare Klassifikation des Endometriumkarzinoms an praktischer Relevanz in Diagnostik und Therapie<sup>(11-13)</sup> (s. Abschnitte 1.1.3 sowie 1.1.6, Unterabschnitte „Strahlen- und Chemotherapie“ sowie „Studien zu Antikörper-basierten Therapieansätzen“). Da zur molekularen Klassifikation des Endometriumkarzinoms in ersten Veröffentlichungen der aktuell größten klinischen Studie PORTEC-4 noch Optimierungen der molekularen Untersuchungstechniken angeregt werden<sup>(14)</sup>, werden als Beispiel molekularer Untersuchungstechniken nur die immunhistochemischen Nachweismethoden der mismatch-repair (MMR)-Proteine erläutert (s. Abschnitt 1.1.5).

Die FIGO-Einteilungen nach Staging und Grading der Endometriumkarzinome, welche für die Therapie von Bedeutung sind (s. Abschnitt 1.1.6, Unterabschnitte „Chirurgische Therapie“ sowie „Strahlen- und Chemotherapie“), werden im Folgenden kurz resümiert.

Beim Staging werden vier Stadien des Endometriumkarzinoms unterschieden, wobei von Stadium I bis IV die Ausbreitung des Endometriumkarzinoms zunimmt<sup>(15)</sup>. Das Staging der Endometriumkarzinome erfolgt primär nach histologischen und operativen Gesichtspunkten. Eine Ausnahme stellen Fernmetastasen außerhalb des Operationsgebiets dar, deren Anwesenheit bzw. Abwesenheit mittels Bildgebungen besser beurteilt werden können.

Das Grading der Endometriumkarzinome nach der FIGO erfolgt nach histopathologischen Kriterien in die Grade G1 bis G3. Dabei fließen der prozentuale Anteil nicht-plattenepithelialer Areale, aber auch der histologische Typ und zelluläre Atypien ein<sup>(16)</sup>. Dabei werden G1 und G2 als geringgradig (*low-grade*) und der G3 als hochgradig (*high-grade*) eingeordnet<sup>(16, 17)</sup>.

Auf eine genaue Definition einzelner Stadien und Grade wird verzichtet.

Weiterhin wird von einer präzisen Darlegung der klinischen Symptomatik und Prognose, welche sich auch mit zunehmenden bzw. abnehmenden Staging oder Grading unterscheiden können, abgesehen.

### 1.1.3 Pathogenese und hereditäre Endometriumkarzinome

Im Zuge der an praktischer Bedeutung gewinnenden molekularen Klassifikation des Endometriumkarzinoms führten integrierte genomische, transkriptomische und proteomische Analysen von Endometriumkarzinomen zu einer Einteilung in vier Kategorien<sup>(18)</sup>. Dabei ist zunächst die Einteilung in erniedrigte und erhöhte somatische Kopienzahlvariationen (*copy number variation*, CNV) zu nennen, das heißt in unspezifisches und spezifisches molekulares Profil<sup>(19)</sup>. Die weiteren beiden Kategorien stellen eine durch Hypermutation von DNA-MMR-Genen hervorgerufene Mikrosatelliteninstabilität sowie eine ultramutierte

POLE-Exonuklease-Domäne dar<sup>(19)</sup>. POLE ist eine katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase Epsilon, die an der Replikation und Reparatur der Kern-DNA beteiligt ist.

Die Kategorien der erniedrigten bzw. erhöhten CNV sind ebenso wie Diploidie und KRAS-Genmutationen häufiger bei Endometriumkarzinomen vom Typ I zu finden<sup>(18, 20)</sup>. POLE-Genmutationen, durch übermäßige G : C > T : A-Basentransversionen gekennzeichnet, treten mit einem Vorkommen von 20 % häufiger bei Patientinnen mit endometrioiden Endometriumkarzinomen im G3-Grading auf<sup>(21)</sup>. Die POLE-Genmutationen finden sich weiterhin oft gemeinsam mit PTEN-Genmutationen<sup>(22)</sup>. Bei endometrioiden Endometriumkarzinomen der Gradings G1 bis G3 stellt die PTEN-Genmutation, welche zur Inaktivierung der Phosphatase PTEN führt, mit ca. 64 % bis 80 % die häufigste Treibermutation (*driver mutation*) dar<sup>(21)</sup>. Diese tritt dabei weiterhin oft gemeinsam mit den Genmutationen PIK3CA (22 % bis 59 %) und PIK3R1 (9 % bis 43 %) auf<sup>(18, 21, 23, 24)</sup>. Im Tiermodell führte erst das gemeinsame Auftreten von biallelischer PTEN-Genmutation sowie PIK3CA-Genmutation zu endometrioiden Endometriumkarzinomen<sup>(25)</sup>. Bei endometrioiden Endometriumkarzinomen wird zu ca. 45 % eine durch Mutation bedingte Inaktivierung des Tumorsuppressorgens ARID1A festgestellt<sup>(21)</sup>. Diese Inaktivierung allein hat in Mausmodellen allerdings nicht zur Entstehung von Endometriumkarzinomen geführt<sup>(26, 27)</sup>, aber in Kombination mit beschriebener PTEN-Inaktivierung zu höheren Proliferationsindizes. Daher wird diese Mutationskonstellation als relevanter Punkt beim Übergang einer komplexen atypische Endometriumhyperplasie zum Endometriumkarzinom angesehen<sup>(28)</sup>.

Eine Mutation im PTEN-Gen liegt ebenfalls beim hereditären Cowden-Syndrom vor, welches auch als PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom bezeichnet wird. Das Risiko für die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms beginnt dabei im Alter von ca. 25 Jahren und steigt in den kommenden 35 Jahren bis zu 30 % an<sup>(29)</sup>. Ein weiterer Risikofaktor für hereditäre Endometriumkarzinome ist, das mit weiteren Karzinomen einhergehende hereditäre, nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC), bei dem eine Keimbahnmutation von DNA-MMR-Genen wie beispielsweise MSH2, MSH6, MLH1 oder PMS2 zugrunde liegend sein kann<sup>(30)</sup>. Auf den Antikörper-basierten Nachweis der genannten Gene wird im Kapitel Diagnostik eingegangen (s. Abschnitt 1.1.5). Durch eine Mutation im Exon 3 des CTNNB1-Gens wird eine Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin hervorgerufen, die zu einer epigenetischen Genstilllegung (*gene silencing*) von erwähntem MLH1-Gen führt<sup>(21)</sup>. Eine solche CTNNB1-Genmutation findet sich bei ca. 19 % bis 37 % der endometrioiden Endometriumkarzinome der Gradings G1 bis G3<sup>(21)</sup>. Bei eindeutigem Nachweis dieser autosomal-dominant vererbten Keimbahnmutation der genannten Gene lautet die korrekte Bezeichnung dann Lynch-Syndrom. Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms bei vorliegendem Lynch-Syndrom wird zwischen 40 % und 60 % angegeben<sup>(31)</sup>.

Endometriumkarzinome vom Typ II sind häufiger aneuploid und weisen beispielsweise Veränderungen in den Genen PIK3CA, FBXW7, PPP2R1A, CDKN2A, ERBB2 sowie dem TP53-Tumorsupressorgen auf<sup>(18)</sup>. TP53-Genmutationen treten mit 59 % bis 93 % häufiger bei serösen als bei klarzelligen Endometriumkarzinomen auf, wo diese nur zu 28 % bis 46 % nachgewiesen werden konnten<sup>(21)</sup>. TP53-Genmutationen spielen ebenso wie die Genmutationen PIK3CA, FBXW7 und PPP2R1A eine Rolle in der frühen Tumorgenese seröser Endometriumkarzinome<sup>(21, 32-35)</sup>. PPP2R1A-Genmutationen kommen dabei mit 19 % bis 43 % häufiger als die jeweils mit ca. 15 % bis 30 % nachweisbaren PIK3CA- und FBXW7-Genmutationen vor<sup>(18, 21)</sup>. ERBB2-Genmutationen lassen sich ebenfalls mit ca. 26 % bis 44 % häufiger bei serösen, und nur bei ca. 11 % der klarzelligen Endometriumkarzinome auffinden<sup>(21)</sup>.

Auch Mutationen in Genen, die ZNF-Proteine exprimieren, können zu einem Progress eines Karzinoms führen<sup>(36-38)</sup>. So wurde festgestellt, dass zwei Punktmutationen des Gens für das ZNF-Protein 331, die zu einem Austausch einzelner Aminosäuren (R9I bzw. H11Y) führen, in Endometriumkarzinomen signifikant angereichert sind<sup>(39)</sup>. Die Expression des betreffenden ZNF-Proteins 331 wurde in anderen humanen Tumorzellen wie den HeLa-Zellen<sup>(40)</sup> und denen der follikulären Schilddrüsenadenome<sup>(41)</sup> bestätigt.

### 1.1.4 Ätiologie

Im Folgenden wird vorrangig die Ätiologie der Endometriumkarzinome vom Typ I beschrieben. Im Gegensatz zu Typ II-Endometriumkarzinomen sind Endometriumkarzinome vom Typ I eher östrogenabhängig. Hyperöstrogenismus konnte als Risikofaktor identifiziert werden, da Endometriumkarzinome vom Typ I vergleichsweise häufiger Östrogen- und Progesteronrezeptoren exprimieren<sup>(20, 42)</sup>. Endometriumkarzinome vom Typ II sind anscheinend aber nicht komplett östrogenunabhängig, wodurch einige der folgenden östrogenabhängigen Risikofaktoren der Endometriumkarzinome vom Typ I auch für Endometriumkarzinome vom Typ II gelten könnten<sup>(43)</sup>. Verstärkte östrogenbedingte Proliferation und Differenzierung stellt auch bei Patientinnen mit Polyzystischen Ovarialsyndrom<sup>(44)</sup> ein nahezu dreifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines aus einer Endometriumhyperplasie hervorgehenden Endometriumkarzinoms dar<sup>(45)</sup>. Eine frühe Menarche und späte Menopause sind aufgrund des langen hormonell aktiven Zeitraums auch als Risikofaktoren zu werten<sup>(46)</sup>.

Im Zusammenhang der Evaluation hormoneller Risikofaktoren, ist die iatrogene Verabreichung des am Endometrium als Östrogen-Agonist wirkenden Tamoxifens anzuführen, das mit einem zwei- bis achtfachen Anstieg von Endometriumkarzinomen

assoziiert ist<sup>(47,48)</sup>. Tamoxifen wird therapeutisch bei prämenopausalen Brustkrebspatientinnen eingesetzt. Es wird davon ausgegangen, dass eine über zwei Jahre dauernde Einnahme von Tamoxifen wahrscheinlich einen Wachstumsvorteil für Endometriumzellen mit bereits vorhandenen Mutationen bietet<sup>(48)</sup>.

Mit sinkender Paritätszahl oder bei Nulliparität steigt das Risiko für Endometriumkarzinome an<sup>(49)</sup>, ebenso wie bei zunehmendem BMI<sup>(50)</sup>. Bei erhöhtem BMI ( $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) besteht ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko für Endometriumkarzinome vom Typ I<sup>(51)</sup>. Bei vorliegender Adipositas permagna ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) konnte insbesondere für das endometrioides Endometriumkarzinom ein erhöhtes alterskorrigiertes relatives Risiko nachgewiesen werden<sup>(52)</sup>. Auch Diabetes ist als weiterer Risikofaktor zu nennen<sup>(50)</sup>. Weiterhin besteht eine Assoziation zu einem niedrigeren Alter zum Diagnosezeitpunkt als bei Endometriumkarzinomen vom Typ II<sup>(18, 20)</sup>.

Endometriumkarzinome vom Typ II sind mit einem atrophem Endometrium, einem höheren Alter<sup>(20)</sup> und niedrigerem BMI assoziiert<sup>(18)</sup>.

Von einer Darlegung protektiver Faktoren wird abgesehen.

### 1.1.5 Diagnostik

Als Basisdiagnostik kann zunächst eine transvaginale Sonografieuntersuchung zur Abklärung intrakavitärer Raumforderungen dienen. Bei einer als suspekt geltenden Endometriumdicke ab ca. 5 mm, die bei ca. 96 % der Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom vorliegt<sup>(53)</sup>, wird für die transvaginale Sonografieuntersuchung eine Sensitivität mit 80 % und eine Spezifität mit 86 % bezüglich atypischer Endometriumhyperplasien und Endometriumkarzinome angegeben<sup>(54)</sup>. Eine Metaanalyse von Breijer et al.<sup>(55)</sup> beziffern dabei die Sensitivität mit 83 % und die Spezifität mit 72 % einzig bezogen auf Endometriumkarzinome. Wird folglich eine suspekt geltende Endometriumdicke ab ca. 5 mm zugrunde gelegt, können bis zu 20 % der Endometriumkarzinome in der transvaginalen Sonografie übersehen werden<sup>(54)</sup>. Wird die als suspekt geltende Endometriumdicke allerdings auf mindestens 10 mm angehoben, wird suggeriert, dass die transvaginale Sonografieuntersuchung als Früherkennungsmaßnahme die Mortalität des Endometriumkarzinoms senken kann<sup>(56)</sup>. Eine mögliche Senkung der Mortalität eines Endometriumkarzinoms durch transvaginale Sonografie wird jedoch in Jacobs et al.<sup>(54)</sup> als nicht nachgewiesen betrachtet und es wird von einem Screening der Bevölkerung auf ein Endometriumkarzinom abgeraten. Bei unzureichenden Ergebnissen der transvaginalen Sonografie kann eine Hysterosonografie mit vorheriger Applikation von Kochsalzlösung in den Corpus uteri in Betracht gezogen werden. Insbesondere als

Karzinomvorstufen geltende fokale Endometriumanomalien können so weiterführend visualisiert werden <sup>(57, 58)</sup>.

Bei fortbestehenden vaginalen Blutungen und damit verbundenem Karzinomverdacht, sollte die Diagnosesicherung histologisch aus einer Endometriumbiopsie erfolgen <sup>(46, 59)</sup>. Die Gewebeentnahme kann standardmäßig über eine Kürettage <sup>(59)</sup> oder alternativ mittels Tao-Brush-Biopsie oder als fokale Pipelle-Biopsie erfolgen <sup>(60)</sup>. Bei Letzterer wird allerdings vergleichsweise am häufigsten eine inadäquate Probe entnommen <sup>(61)</sup>. Die Sensitivität der fokalen Pipelle-Biopsie wird zwischen 83 % <sup>(62)</sup> und 86 % <sup>(60)</sup> angegeben. Del Priore et al. <sup>(60)</sup> geben die Sensitivität der Tao-Brush-Biopsie mit ca. 96 % an. Auch die Hysteroskopie, als weitere diagnostische Säule, die häufig zur Beurteilung abnormer Uterusblutungen eingesetzt wird <sup>(59)</sup>, kann zur Diagnosesicherung mit einer Biopsie oder Kürettage verbunden werden <sup>(63)</sup>. Die Wahrscheinlichkeit ein bestehendes Endometriumkarzinom dabei zu diagnostizieren, wird mit ca. 99 % angegeben <sup>(64)</sup>.

Im Folgenden soll im Rahmen der molekularen Klassifikation (s. Abschnitte 1.1.2 und 1.1.3) auf immunhistochemische Nachweismethoden der Mikrosatelliteninstabilität, welche beispielweise beim Lynch-Syndrom auftritt, eingegangen werden. Als dafür verwendetes Tumorgewebe kann aufgrund einer besseren Gewebefixierung das Abradat dem Hysterektomiepräparat vorgezogen werden <sup>(65, 66)</sup>. Die, aufgrund der Keimbahnmutationen der zugehörigen Gene, fehlende Expression der MMR-Proteine MSH2, MSH6, MLH1 oder PMS2 kann durch Antikörper-basierte Färberesultate nachgewiesen werden <sup>(67)</sup>. Dabei können Antikörper gegen jedes einzelne der vier genannten MMR-Proteine verwendet werden <sup>(67)</sup>. Es wird diskutiert, ob zum Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität die Verwendung aller vier Antikörper nötig ist, oder die alleinige Verwendung der PMS-2-Antikörper und MSH-6-Antikörper als ausreichend betrachtet werden kann. Dabei gibt es Hinweise, dass die alleinige Verwendung der PMS-2-Antikörper und MSH-6-Antikörper als äquivalent eingestuft werden kann <sup>(68-70)</sup>. Sofern der Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität nur mit diesen beiden Antikörpern praktiziert wird, sollte jedoch für alle vier genannten Antikörper eine vorherige Sicherstellung der Färberesultate sowie deren klare Interpretation gewährleistet worden sein <sup>(71)</sup>. Der immunhistochemische Nachweis der Mikrosatelliteninstabilität kann durch molekularpathologische Diagnostikmethoden wie DNA-basierte Gewebetestungen (z. B. *Next-Generation Sequencing* <sup>(72, 73)</sup>) <sup>(74)</sup> sowie den Nachweis einer Methylierung des MLH1-Promotors ergänzt werden <sup>(75)</sup>. Die Methylierung des MLH1-Promotors kann bei sporadischem Endometriumkarzinom auftreten und zu unterschiedlicher Expression der Gene MLH-1 und PMS-2 führen <sup>(76)</sup>. Eine fehlende Expression des MMR-Proteins MLH1 muss folglich nicht zwingend auf ein Lynch-Syndrom zurückzuführen sein.

Wie auch bei der unter Abschnitt 1.1.6 dargestellten Therapie, werden auf Komplikationen, Nachsorge und besondere Gruppen von Patientinnen, wie beispielsweise Patientinnen mit Kinderwunsch, nicht explizit eingegangen.

### 1.1.6 Therapie

#### Chirurgische Therapie

Bei einer bioptisch gesicherten atypischen Endometriumhyperplasie sollte eine Dilatation und Kürettage erfolgen, da die Gefahr eines simultan vorliegenden Endometriumkarzinoms ca. 40 % beträgt<sup>(59)</sup>. Dagegen wird ein frühes endometrioides Endometriumkarzinom (Stadium I, Grading G1) primär operativ mittels totaler Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie versorgt, was zu einem krankheitsspezifischen 5-Jahres-Überleben von ca. 99 % führt<sup>(77)</sup>. Bei histologisch gesicherten endometrioiden Endometriumkarzinomen vom Typ I (Stadien I und II) ist dabei die minimalinvasive Hysterektomie der Laparotomie anscheinend überlegen<sup>(78)</sup>. Während dabei Komplikationsrate und Operationsdauer signifikant vermindert sind, unterscheidet sich bei beiden Verfahren das krankheitsfreie Überleben nicht signifikant<sup>(78)</sup>. Eine vaginale Hysterektomie wird meist nicht mehr durchgeführt, da dabei eine abdominale Untersuchung und Lymphadenektomie ausgeschlossen wird<sup>(79)</sup>. Ausnahmen stellen Komorbiditäten der Patientinnen dar, die ein abdominales oder laparoskopisches Verfahren nicht zulassen<sup>(59)</sup>. Bei prämenopausalen Frauen können bei Hysterektomie mit beidseitiger Salpingektomie die Ovarien erhalten werden, da Metaanalysen auf keine signifikanten Abweichungen bezüglich des Gesamtüberlebens<sup>(80, 81)</sup> und des krankheitsfreien Überlebens hinweisen<sup>(81)</sup>. Die Patientinnen sollten dabei allerdings darüber aufgeklärt werden, dass der Erhalt der Ovarien mit einem erhöhten Risiko, potenzielle maligne ovarielle Erkrankungen intraoperativ zu übersehen, einhergeht<sup>(82)</sup>. Auf eine Darstellung synchroner Ovarialkarzinome und ovarieller Metastasen sowie deren Therapie wird verzichtet.

Für Endometriumkarzinome mit Infiltration des Zervixstomas im Stadium II soll eine einfache Hysterektomie einer radikalen Hysterektomie vorgezogen werden, da bei letzterer sich weder das progressionsfreie Überleben noch das Gesamtüberleben signifikant verbessert darstellte<sup>(83)</sup>. Weiterhin wird die Rate intraoperativer Komplikationen und postoperative Miktionsstörungen durch einfache Hysterektomie reduziert<sup>(84)</sup>.

Die Rolle der paraaortalen und pelvinen Lymphonodektomie wird kontrovers diskutiert<sup>(85, 86)</sup>. Anders als bei Hochrisiko-Patientinnen prognostiziert man bei systematischer Lymphonodektomie keinen Überlebensvorteil bei Niedrigrisiko-Patientinnen<sup>(87)</sup>. In Zukunft könnte allerdings die Sentinel-Lymphadenektomie an Bedeutung gewinnen<sup>(88)</sup>.

Von Darstellungen bezüglich der Rehabilitation, psychoonkologischer Aspekte und einer palliativen Versorgung des Endometriumkarzinoms wird abgesehen.

### Strahlen- und Chemotherapie

Die Strahlentherapie des Endometriumkarzinoms kann als vaginale Brachytherapie oder als perkutane Strahlentherapie des Beckens durchgeführt werden<sup>(89, 90)</sup>. In der Regel erfolgt dies postoperativ, kann bei Inoperabilität aber auch als primäre alleinige Strahlentherapie in kurativer Intention durchgeführt werden<sup>(91)</sup>. Dabei wird lediglich im Stadium I bei Grading G1 die alleinige bildgesteuerte Brachytherapie präferiert, bei einem höheren Grading sowie in den Stadien II bis IV wird eine kombinierte bildgesteuerte Brachytherapie und perkutane Strahlentherapie priorisiert<sup>(92)</sup>. Während hierbei das krankheitsspezifische 5-Jahres-Überleben jeweils mit ca. 79 % angegeben wird, beträgt das jeweilige Gesamtüberleben ca. 53 %<sup>(92)</sup>.

Im Folgenden soll bei vorausgesetzter Operabilität die bevorzugte Auswahl des postoperativen strahlentherapeutischen Verfahrens erörtert werden. Beim Endometriumkarzinom vom Typ I wird in den früheren Stadien I und II mit hohem bis mittlerem Risiko bzw. Grading eher eine bildgesteuerte vaginale Brachytherapie empfohlen<sup>(89)</sup>, während in den fortgeschrittenen Stadien III und IV die perkutane Strahlentherapie mit einer Gesamtdosis von ca. 44 - 50 Gy wegen einer besseren Datenlage bevorzugt werden kann<sup>(93, 94)</sup>. Die bildgesteuerte vaginale Brachytherapie ist nebenwirkungsärmer und weist eine höhere lokale Kontrolle auf<sup>(89)</sup>. Die Auswahl des bestmöglichen Brachytherapie-Applikators richtet sich nicht nur nach der Ausbreitung des Endometriumkarzinoms, sondern auch nach anatomischen Gegebenheiten wie den Uterusmaßen<sup>(91)</sup>. Als Behandlungsschema kann dabei das der PORTEC-2-Studie<sup>(95)</sup> mit einer Applikation von 21 Gy in drei Fraktionen in 5 mm Tiefe angewandt werden<sup>(89)</sup>. Retrospektiven Datenanalysen unter Berücksichtigung einer Extrapolation der zu erwartenden Toxizität der Strahlung folgend, kann die vaginale Brachytherapie als Boost bei perkutaner Beckenbestrahlung beispielsweise bei Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom der Stadien II oder III mit verbundenem Nachweis von Tumorgewebe nahe dem bzw. im Resektionsrand, verabreicht werden<sup>(96)</sup>. Damit können in diesen Stadien lokale Rezidive anscheinend verringert werden<sup>(96)</sup>. Außerhalb dessen bestehen aber keine Empfehlungen für einen solchen Boost<sup>(96)</sup>, da sich bei postoperativer perkutaner Strahlentherapie mit 2 % nach 5 Jahren und 3 % nach 15 Jahren ohnehin nur wenige vaginale Rezidive finden lassen<sup>(95, 97)</sup>.

Obwohl die Datenlage der strahlentherapeutischen Verfahren zu Endometriumkarzinomen vom Typ II noch gering ist, gibt es Hinweise, dass hier eher die perkutane Strahlentherapie priorisiert werden könnte<sup>(98)</sup>.

Für die Subgruppe der serösen Endometriumkarzinome erhöht das Hinzunehmen einer simultanen Chemotherapie zur perkutanen Strahlentherapie das 5-Jahres-Gesamtüberleben um ca. 12 % auf ca. 60 %<sup>(99)</sup>. Unabhängig vom vorliegenden Stadium der serösen Endometriumkarzinome zeigten sich auch in der Metaanalyse von Lin et al.<sup>(98)</sup> Überlebensvorteile einer kombinierten Radiochemotherapie.

Viele der bekannten Schemata für Chemotherapien des Endometriumkarzinoms basieren auf Paclitaxel oder Cisplatin<sup>(98)</sup>. Die PORTEC-3-Studie<sup>(99)</sup> zeigte, dass die Hinzunahme einer simultanen Chemotherapie mit Cisplatin 50 mg/m<sup>2</sup> in Woche 1 und 4 sowie sequentiell vier Zyklen Paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup>/ Carboplatin AUC 5 insbesondere zur perkutanen Strahlentherapie das 5-Jahres-Gesamtüberleben im Stadium III um ca. 10 % auf ca. 79 % steigern konnte. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der PORTEC-3-Studie bei Patientinnen der Stadien I und II keine signifikante Verbesserung des 5-Jahres-Gesamtüberlebens. Weiterhin belegten die Autoren, dass durch die Hinzunahme der simultanen Chemotherapie die Häufigkeit von Rezidiven außerhalb des Beckens gesenkt werden kann<sup>(99)</sup>. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben in der molekularen Subgruppe der TP53-Genmutationen steigt durch die simultane Chemotherapie um ca. 23 % auf ca. 70 %, während sich bei Patientinnen mit POLE-Mutationen kein Vorteil zeigte<sup>(99)</sup>. Eine kombinierte Radiochemotherapie macht sich den Vorteil geringerer lokaler Rezidivraten durch die Strahlentherapie und geringerer Raten systemischer Rezidive außerhalb des Beckens durch die Chemotherapie zunutze<sup>(93)</sup>.

Eine Chemotherapie wird, wie oben beschrieben, in der Regel nicht alleine verabreicht, da dies zunächst zum vermehrten Auftreten lokaler Rezidive führen würde<sup>(93, 100)</sup>. Ausnahmen von einer Kombination der Chemotherapie mit einer Radiotherapie werden nach aktueller, aber noch unzureichender Datenlage z. B. bei Endometriumkarzinome im Stadium III oder IV diskutiert<sup>(101)</sup>: In einer randomisierte Phase-3-Studie von Matei et al.<sup>(101)</sup> zeigten sich systemische Rezidive bei applizierter alleiniger Chemotherapie, verglichen mit kombinierter Radiochemotherapie, um 6 % verringert. Bei Patientinnen mit Endometriumkarzinomen in diesen Stadien kann eine alleinige adjuvante Chemotherapie mit sechs Zyklen Carboplatin AUC 6/Paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> alle drei Wochen eine Alternative zur kombinierten Radiochemotherapie darstellen<sup>(101)</sup>. Bei einer durchgeführten Chemotherapie nach einer perkutanen Strahlentherapie sollte eine Dosisreduktion der Chemotherapeutika erwogen werden, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens febriler Neutropenie zu verringern<sup>(102)</sup>. Miller et al.<sup>(102)</sup> konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine Dosisreduktion auf

Paclitaxel 135 mg/m<sup>2</sup> und Carboplatin AUC 5 die Hospitalisierungsrate von 35 % auf 17 % verringerte.

Bei Endometriumkarzinomen mit POLE-Mutation in den Stadien I oder II kann bei histopathologisch fehlenden Nachweisen von Tumorgewebe in den Resektionsrändern von einer adjuvanten Therapie abgesehen werden <sup>(22)</sup>.

### Studien zu Antikörper-basierten Therapieansätzen

Es gibt Studien über ein Ansprechen einer Antikörper-basierten Therapie des Endometriumkarzinoms mit beispielsweise Avelumab <sup>(103)</sup>, Dostarlimab <sup>(104)</sup>, Pembrolizumab <sup>(105)</sup> oder Trastuzumab <sup>(106, 107)</sup>.

Im Folgenden wird auf ausgewählte Studien zu Therapieansätzen mit den Antikörpern Trastuzumab und Pembrolizumab näher eingegangen. Eine Studie von Patientinnen mit serösen Endometriumkarzinom und überexprimiertem ERBB2, die, zusätzlich zur Chemotherapie der Kontrollgruppe mit Paclitaxel und Carboplatin, den Antikörper Trastuzumab erhielten, zeigte ein geringeres Progressionsrisiko <sup>(106)</sup> und auch ein um 5 Monate auf 29 Monate verlängertes Gesamtüberleben <sup>(107)</sup>.

Bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Endometriumkarzinom und Krankheitsprogression nach vorheriger systemischer Therapie konnten der Antikörper Pembrolizumab in Kombination mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Lenvatinib eine vielversprechende Antitumoraktivität aufweisen <sup>(105)</sup>. Nach einer weiteren klinischen Studie von Makker et al. <sup>(108)</sup> führt diese Kombinationstherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Endometriumkarzinom, verglichen mit einer Chemotherapie, zu signifikant längerem Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben.

In der KEYNOTE-158-Studie <sup>(109)</sup> erhielten 49 Patientinnen mit einem rezidivierenden Endometriumkarzinoms sowie Mikrosatelliteninstabilität oder Mutationen in den DNA-MMR-Genen Pembrolizumab (200 mg) als Monotherapie einmal im Abstand von drei Wochen für zwei Jahre oder bis zum Fortschreiten der Erkrankung, inakzeptabler Toxizität, oder Abbruch der Therapie. Diese Monotherapie mit dem humanisierten, monoklonalen Antikörper Pembrolizumab wies dabei eine Ansprechrate von ca. 57 % auf, wobei 16 % sogar komplett darauf ansprachen <sup>(109)</sup>. Dies alles zeigt, dass abhängig von der genauen Klassifizierung des Endometriumkarzinoms gezielte Antikörper-Therapien bei gewissen Patientenkollektiven ansprechen können. Drei Patientinnen zeigten allerdings unerwünschte Ereignisse wie Neutropenie, Guillain-Barré-Syndrom und Leberfunktionsstörung <sup>(109)</sup>. Ergebnisse der KEYNOTE-158-Studie von 2022 <sup>(110)</sup> beschrieben, dass bei ca. 28 % der Patientinnen immunvermittelte unerwünschte Ereignisse oder Infusionsreaktionen auf Pembrolizumab-Monotherapie auftraten.

## 1.2 Antikörper

### 1.2.1 Antikörperstruktur

In den folgenden Kapiteln wird nur ein kurzer Überblick über ausgewählte Aspekte der Antikörper, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden, gegeben. Antikörper sind Ypsilon-förmige neutrale Glykoproteine (s. Abbildung 1), die von Plasmazellen im Knochenmark und in der Milz als Antwort auf das Eindringen immunogener Antigene bzw. Pathogene, beispielsweise Mikroorganismen, vermehrt produziert und sezerniert werden <sup>(111-113)</sup>.

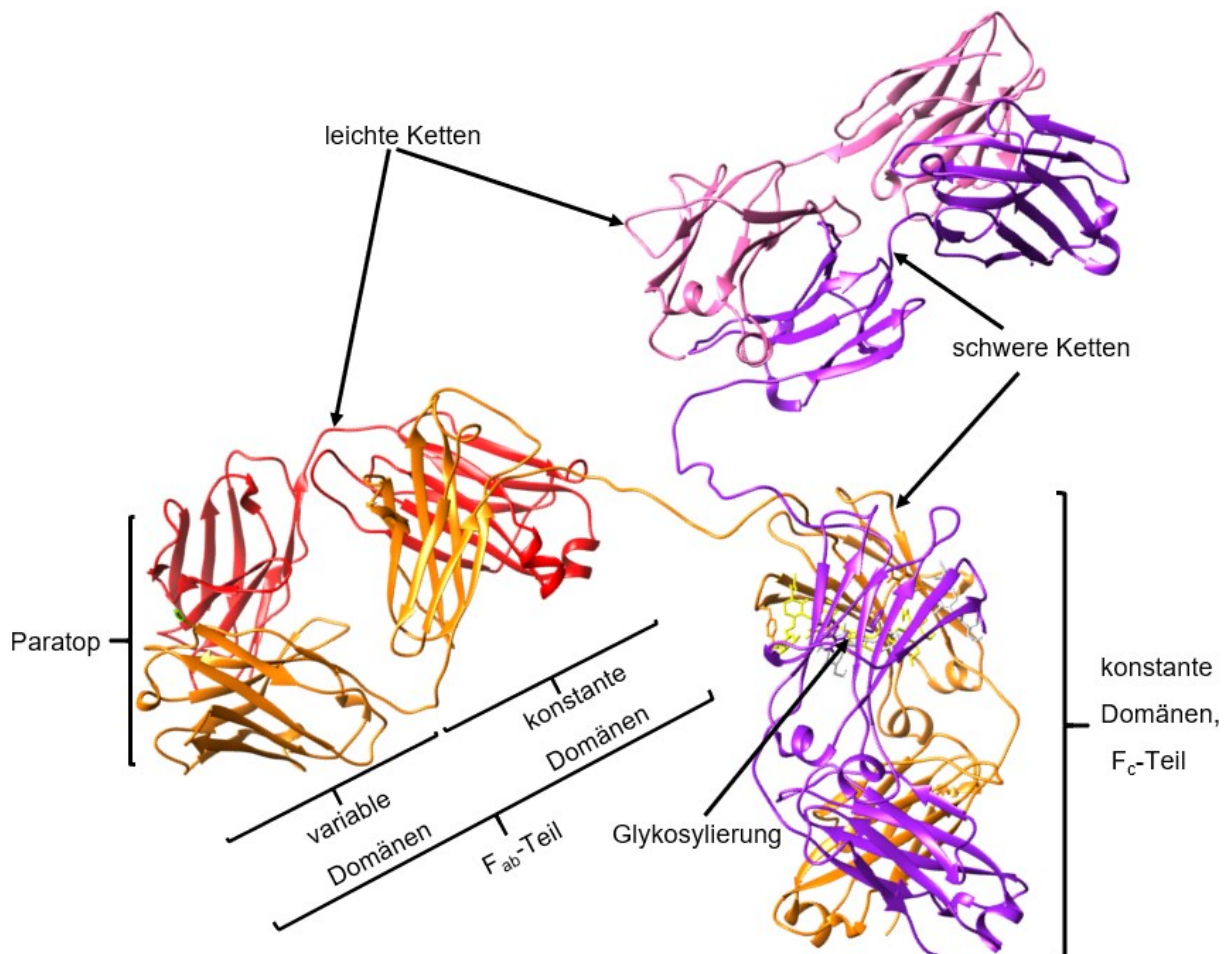


Abbildung 1: Schematische Strukturdarstellung (Bänderstrukturmodell) eines Antikörpers

Die Strukturdarstellung wurde selbst mithilfe der Software Chimera (Version 1.14) basierend auf den Atomkoordinaten der Röntgenstruktur (1igt.pdb) erstellt <sup>(114)</sup>.

Ein Antikörpermolekül besteht aus zwei identischen leichten Ketten (*light chains*) und zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*), die aus konstanten und variablen Domänen zusammengesetzt sind. Diese Domänen ordnen sich in zwei Ebenen antiparalleler Faltblattstrukturen um einen hydrophoben Bereich an. Während die variablen Domänen zusammen die Antigen-Bindestelle eines Antikörpers ausbilden, setzt sich die konstante

Region aus den konstanten Domänen zusammen (s. Abbildung 1). Die Ketten sind über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden<sup>(115)</sup>. Porter publizierte 1959<sup>(116)</sup>, dass Antikörper mit dem Enzym Papain in drei Fragmente geteilt werden können. Während sich dabei die beiden Fragmente I und II als Antigen-bindende Fragmente (*fragments antigen binding*, F<sub>ab</sub>-Fragmente, F<sub>ab</sub>-Teile) zeigten, stellte sich das übrige Fragment III als leichter kristallisierbar heraus (*fragment crystallizable*, F<sub>c</sub>-Teil). Der F<sub>c</sub>-Teil, bestehend aus jeweils zwei konstanten Domänen beider schweren Ketten (s. Abbildung 1), ist für die Effektorfunktion verantwortlich, indem dieser mit Zelloberflächenrezeptoren von Immunzellen interagiert. Im Gegensatz dazu besteht ein F<sub>ab</sub>-Teil aus zwei variablen und zwei konstanten Domänen, wobei stets jeweils eine Domäne auf der schweren und eine auf der leichten Kette liegt (s. Abbildung 1). Innerhalb dieser variablen Domänen formen jeweils drei Schleifen (*loops*) der leichten und schweren Kette die für die Antigenbindung maßgeblichen hypervariablen Regionen (*complementary determining regions*, CDR) CDR 1, CDR 2 und CDR 3<sup>(117)</sup>. Die hypervariablen Regionen wurden zuerst an den leichten Ketten entdeckt<sup>(118, 119)</sup>. Im Zuge dessen publizierte Milstein 1967 die Entdeckung von CDR 1 und CDR 3<sup>(118)</sup>, Franěk zwei Jahre später die von CDR 2<sup>(119)</sup>. Wu und Kabat konnten 1970 deren Rolle in der Bindung zwischen Antigen und Antikörper anhand der Untersuchung von 37 Leichtkettensequenzen bekräftigen<sup>(117, 120)</sup>. Die hypervariablen Regionen stellen jeweils lediglich sechs bis acht Aminosäuren um die Positionen 32, 55 und 98 der schweren Kette sowie 30, 50 und 93 der leichten Kette dar<sup>(115)</sup>. Sie werden bei der Antikörperfaltung an die Oberfläche des Moleküls gebracht und bilden dort die beiden, als Bindungsstellen für Antigene fungierenden, Paratope (s. Abbildung 1)<sup>(115)</sup>. Daher kann ein Antikörper auch bis zu zwei Antigene gleichzeitig binden. Die Stelle auf einem Antigen, an das ein Paratop bindet, wird als Epitop oder antigene Determinante bezeichnet.

Aufgrund struktureller Unterschiede in der konstanten Region der schweren Ketten werden beim Menschen mit IgG, IgM, IgA, IgE und IgD fünf unterschiedliche Isotypen von Antikörpern unterschieden<sup>(121)</sup>. Diese unterscheiden sich auch in ihren molekularen Massen. Bei IgG beträgt diese ca. 150 kDa, da die beiden schweren Ketten jeweils ca. 50 kDa und die beiden leichten Ketten jeweils ca. 25 kDa schwer sind. IgG wird außerdem funktionell in die Unterklassen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub> unterteilt<sup>(122)</sup>, wobei IgG<sub>1</sub> mit ca. 60 % den höchsten relativen Anteil im menschlichen Blutserum besitzt<sup>(123)</sup>.

### 1.2.2 Diversität der Antikörper

Für die Diversität der Antikörper, nötig um verschiedene Pathogene zu erkennen, gibt es viele molekulare Ursachen. Im Folgenden sollen davon exemplarisch nur die somatische Hypermutation und die somatische Rekombination resümiert werden.

Die somatische Rekombination findet im Knochenmark statt. Für die Entdeckung der zugrunde liegenden genetischen Prinzipien zur Kreation der Diversität der Antikörper <sup>(124-127)</sup>, wurde Susumu Tonegawa im Jahr 1987 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen. Die endgültigen Antikörper-kodierenden Gene werden im Laufe der Antikörperreifung aus einzelnen Gensegmenten auf DNA-Ebene neu angeordnet (*gene rearrangement*). Da dies während des Prozesses der Differenzierung der B-Lymphozyten stattfindet, an deren Ende Antikörper-produzierende Plasmazellen entstehen können, kann aus wenigen Genen eine Vielzahl verschiedener Antikörper gebildet werden.

Die somatische Hypermutation, welche in Keimzentren während der Proliferation der B-Lymphozyten stattfindet, verändert die variable Region der Antikörper. Sie wird hierbei durch die aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase initiiert, die ein Cytidin zu Uracil desaminiert <sup>(128)</sup>. Dadurch kommt es durch zelluläre Reparaturmechanismen zum Einbau neuer Basen. Da diese Reparaturmechanismen einer hohen Fehlerrate unterliegen, wird eine Hypermutation bedingt. Durch zufällige Punktmutationen bei der Replikation der DNA werden dabei die hypervariablen Regionen der leichten und schweren Ketten moduliert <sup>(115)</sup>. Somit verändern sich die Antigen-Bindungseigenschaften der Antikörper, was auch als Prozess der natürlichen Affinitätsreifung in B-Lymphozyten bezeichnet wird <sup>(128)</sup>.

Im Kontext der hier zusammengefassten Diversität der Antikörper steht auch die klonale Selektion als Prinzip der erworbenen Immunität, die 1955 von Burnet postuliert wurde <sup>(129)</sup>. Dieses besagt, dass die Spezifität eines Antikörpers, unter Abschnitt 1.2.3 genauer erläutert, bereits vor Kontakt mit dem entsprechenden immunogen wirkenden Antigen gegeben ist <sup>(129)</sup>. Hierbei muss sich vor Augen geführt werden, dass während der Entwicklung der B-Lymphozyten im Knochenmark die Antikörpermoleküle zunächst als Rezeptoren in die B-Zellmembran eingebettet sind. Die Antigene selektieren dann durch Bindung an den jeweiligen B-Zell-Rezeptor diejenigen B-Lymphozyten mit der passenden Spezifität der Antikörper. Nur diese B-Lymphozyten werden aktiviert, proliferieren und differenzieren zu Effektorzellen <sup>(115, 130)</sup>.

### 1.2.3 Epitop-Paratop-Interaktionen

Bei der herkömmlichen Definition der Spezifität, wonach ein Antikörper nur ein bestimmtes Epitop erkennen könne <sup>(131)</sup>, muss bedacht werden, dass ein Atom des Epitops mit mehreren Atomen eines Paratops interagieren kann und umgekehrt <sup>(132)</sup>. Genauer, für eine Bindung zwischen dem Paratop eines Antikörpers und dem Epitop eines Antigens werden nicht-kovalente Kräfte wie Wasserstoffbrückenbindungen, van-der Waals-Kräfte, Ionenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet <sup>(133)</sup>. Diese nicht-kovalenten Kräfte kommen

zustande, wenn einzelne Atome auf Molekülteilflächen mit den richtigen physikalisch-chemischen Eigenschaften an genau passenden Positionen auf definierten Molekülflächen einander gegenüberliegend angeordnet sind<sup>(132, 134)</sup>. Die Summe der dabei formierten atomaren Kräfte zwischen den passend angeordneten Aminosäureresten wird als molekularer Erkennungscode beschrieben<sup>(114, 132)</sup>. Einerseits wird der Austausch bestimmter, am Epitop passiv beteiligter Aminosäurereste toleriert, was als Promiskuität des Bindemotivs eines Antikörpers bezeichnet wird<sup>(114)</sup>. Andererseits kann der submolekulare Austausch von Aminosäureresten, die sich an spezifitätsbestimmenden Positionen<sup>(135, 136)</sup> innerhalb des Epitops befinden, nicht nur zu einer Aufhebung, sondern auch zu einer reduzierten Antikörperbindung führen<sup>(114)</sup>. Letztere, als unorthodox bezeichnete Bindung präzisiert ebenso wie die vergleichsweise stärkere orthodoxe Bindung das Bindungsverhalten von Antikörpern auf der Sub-Epitopebene, d.h. auf der Ebene der einzelnen Aminosäurereste<sup>(114, 132, 137)</sup>. Die aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertationsschrift neu eingeführten Epitop-Paratop-Bindungstypen<sup>(132)</sup> werden in den Abschnitten 3.3.2, 3.3.3 und 4.1 (s. v. a. Abbildung 26) weiterführend erläutert. Ihre Epitop-spezifischen Unterschiede werden nicht von der Bezeichnung spezifisch bzw. unspezifisch für eine zustande gekommene Antigenbindung abgedeckt<sup>(132)</sup>. Während eine spezifische Bindung die Bindung eines Antikörpers an nur sein definiertes Antigen bezeichnet, ist mit der unspezifischen Bindung definitionsgemäß auch die Bindung an andere Antigene gemeint<sup>(138)</sup>.

### 1.2.4 Anwendungen und Bedeutung von Antikörpern

Antikörper vermitteln, beispielweise unter Ausschaltung des Zielantigens, eine Immunantwort, die der humoralen Immunantwort zugeschrieben wird. Das humorale Immunsystem kann unter Anderem auf diese Weise verhindern, dass sich Pathogene in den Extrazellularräumen verbreiten<sup>(113)</sup>.

Der in dieser Arbeit experimentell untersuchte anti-HpTGEKP-Antikörper (s. Abbildung 1) vom Isotyp IgG<sub>1</sub>, der später (s. Abschnitt 1.4) genauer vorgestellt wird, zählt zu den monoklonalen Antikörpern. Diese entstammen einem einzelnen B-Lymphozyten bzw. deren Zellklonen und werden spezifisch zur Erkennung eines bestimmten Epitops hergestellt.

Monoklonale Antikörper und ihre genau Komplexierung mit Antigenen spielen für Forschungszwecke, diagnostisch (s. Abschnitt 1.1.5) und therapeutisch (s. Abschnitt 1.1.6 unter dem Unterabschnitt „Studien zu Antikörper-basierten Therapieansätzen“) eine entscheidende Rolle<sup>(134)</sup>. Daher besteht ein großer Bedarf darin, Antikörper strukturell und funktionell zu charakterisieren. Neben einer Abschätzung der Bindungsaffinität zu Antigenen gehört dazu auch eine Identifizierung und Charakterisierung der entsprechenden

Antigen-Epitope<sup>(139)</sup>, um zu wissen, ob und inwieweit ein z. B. humanisierter Antikörper ein Antigen über ein definiertes Epitop binden kann. Dies trägt dazu bei, antikörperbasierte Experimente gezielt anzupassen und damit verbundene Forschungsergebnisse besser zu interpretieren<sup>(134)</sup>. Neben dem später vorgestellten ITEM-TWO-Verfahren<sup>(140)</sup> (s. Abschnitt 1.3.3) können Epitope auch mittels Phagen-Display<sup>(141)</sup>, Alanin-Scan<sup>(142-144)</sup> oder in silico Mutagenese<sup>(141)</sup> untersucht und bestimmt werden.

Einsatzgebiete für Antikörper, auch in der Forschung, stellen beispielsweise passive Immunisierungen, Point-of-Care-Testing<sup>(137)</sup>, Western Blots (s. Abschnitte 2.2, 3.2.2 und 3.3.5), generalisierte zellbiologische Proliferationsprozesse<sup>(145, 146)</sup> und krankheitsspezifische Immuntherapien dar. Mit Antikörper-basierten Untersuchungen kann auch zum Verständnis von Mechanismen der Tumorentwicklung beigetragen werden<sup>(147)</sup>.

### 1.3 Die Massenspektrometrie von Biomolekülen

#### 1.3.1 Elektrospray Massenspektrometrie

Die Elektrospray Massenspektrometrie ist ein schonendes Verfahren mithilfe dessen Biomoleküle, z. B. Antikörper und als Antigene fungierende Peptide in einem Antikörper-Peptidgemisch in die Gasphase überführt, ionisiert und identifiziert werden können<sup>(148)</sup>. Durch Mischen von Proteinen und / oder Peptiden in volatilen Pufferlösungen werden die zu analysierenden Proben erzeugt. Anschließend wird die Peptid- bzw. Protein-Lösung in eine Gold-beschichtete Glaskapillare gefüllt, mittels konstant gehaltener Elektrospray-Ionisierung (ESI) ionisiert und schonend in die Gasphase überführt<sup>(149, 150)</sup> (Details s. Abschnitt 1.3.3).

Zwischen der Gold-beschichteten Glaskapillare und der direkt gegenüber angebrachten Gegenelektrode wird ein elektrisches Feld angelegt. Durch die angelegte Spannung (zwischen 1,2 kV und 2 kV<sup>(40)</sup>) sammeln sich aus der Glaskapillare austretende, gleichartig geladene Analytionen zusammen mit den Lösungsmolekülen an der Kapillarspitze und bilden einen Flüssigkeitskonus (Taylor-Kegel)<sup>(151)</sup> aus dem ein dünner Flüssigkeitsstrahl (*jet*) emittiert. Dieser zerfällt durch die anliegende Spannung in Tröpfchen, die durch Verdampfen des Lösungsmittels zunehmend an Volumen abnehmen (Desolvatisierung)<sup>(152)</sup>. Die vorliegende Oberflächenspannung führt zur weiteren Volumenreduktion, wodurch die Ladungsdichte der Tröpfchen zunimmt bis es zur „Coulomb-Explosion“ kommt<sup>(40)</sup>. Ein Tropfen zerfällt so in immer kleinere Tröpfchen, bis es schließlich zur Ionenfreisetzung kommt.

Um die Freisetzung der Ionen aus den kleineren Tröpfchen zu erklären, werden nach derzeitigem Stand der Wissenschaft zwei Modelle diskutiert<sup>(153-155)</sup>: Das Modell des geladenen Rückstands (*charged residue model*) und das Modell der Ionenemission (*ion evaporation model*). Das vergleichsweise ältere Modell des geladenen Rückstands postuliert, dass die Volumenreduktion der Tröpfchen und der damit verbundene verringerte Abstand der darin enthaltenen, gleichartig geladenen Analytationen schließlich dazu führt, dass die Analytationen frei vom Lösungsmittel in der Gasphase vorliegen<sup>(152, 154-157)</sup>. Nach dem Modell der Ionenemission erfolgt die Ionenfreisetzung auf der einen Seite durch das entgegengesetzt geladene elektrische Feld außerhalb der Tröpfchen, andererseits durch hohe Ladungsdichten an deren Oberflächen, wodurch es zu Abstoßungsvorgängen und damit der Freisetzung der Analytationen kommt<sup>(153, 158)</sup>.

Für das Verfahren der Elektrospray-Ionisierung von biologischen Makromolekülen wurde John Bennett Fenn im Jahr 2002 der Nobelpreis für Chemie verliehen<sup>(159)</sup>. Den Nobelpreis teilt er sich mit Koichi Tanaka, der für die Entwicklung der Laserdesorptions-Massenspektrometrie (LD-MS) von Biopolymeren ausgezeichnet wurde<sup>(160-162)</sup>.

Am verwendeten Synapt G2S-Massenspektrometer passieren die Analyt-Ionen nach deren Erzeugung im ESI-Prozess eingangs die Ionenoptik (StepWave, s. Abbildung 2), wodurch nicht ionisierte, störende Neutralteilchen entfernt und die Ionen durch Anlegen eines elektrischen Felds effizient zum Quadrupol-Massenfilter transmittiert werden.

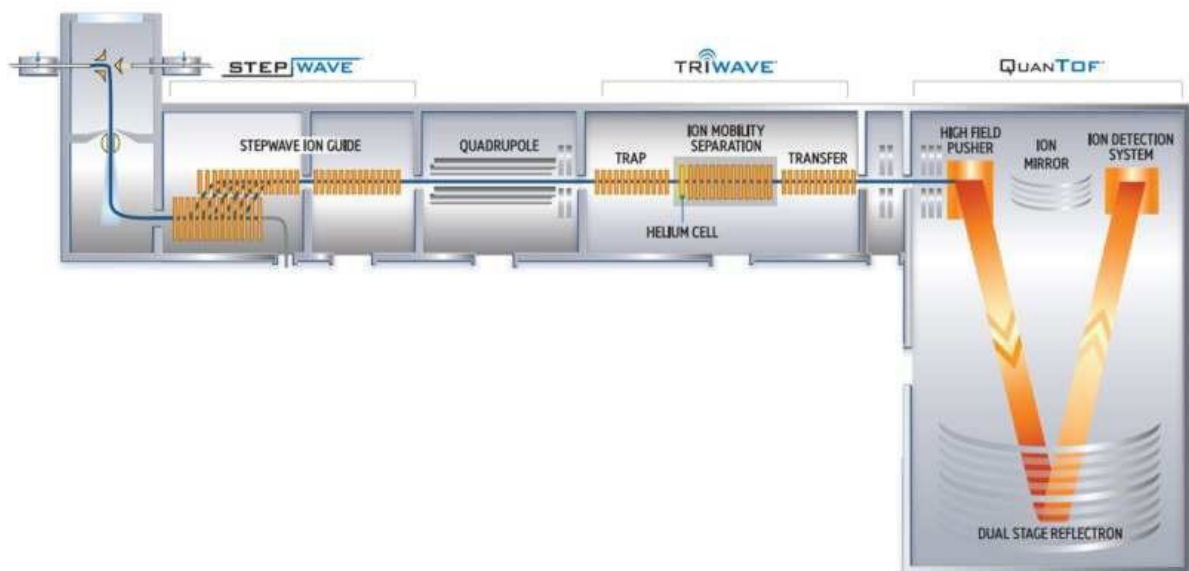


Abbildung 2: Schematische Darstellung des verwendeten SynaptG2S-Massenspektrometers (© Waters Corporation)

Der Quadrupol-Massenanalysator besteht aus vier Metallstäben, die als paarweise Elektroden fungieren. Diese sind jeweils parallel und folglich im Querschnitt quadratisch zueinander angeordnet. An den Metallstäben wird eine Gleichspannung angelegt, die mit einer Wechselspannung überlagert wird. Die Wechselspannungsfrequenz führt dazu, dass nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ -Verhältnis) den Quadrupol-Massenfilter passieren und andere nicht, wodurch eine Ionentrennung stattfindet<sup>(152)</sup>. Durchstimmen der Frequenz (*scan*) ermöglicht, dass nacheinander Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Verhältnissen den Quadrupol passieren. Anschließend werden die Ionen, die den Quadrupol durchquert haben, z. B. die der Immunkomplexe in eine erste Kollisionszelle (TRAP, s. Abbildung 2) überführt. Dort kann durch Anlegen einer weiteren elektrischen Spannung und nachdem die TRAP-Zelle mit Stoßgas (z. B. Argon) gefüllt wurde, durch Kollisions-induzierte Dissoziation (CID) beispielsweise ein Immunkomplex dissoziiert werden<sup>(132, 140)</sup>. Wenn die Ionenmobilitätszelle des Synapt G2S-Massenspektrometers nicht als zweiter Massenanalysator genutzt wird, passieren die Ionen diese direkt und erreichen die TRANSFER-Zelle (s. Abbildung 2). Die TRANSFER-Zelle ist eine zweite Kollisionszelle, in der wie in der TRAP-Zelle stoßinduzierte Fragmentierungen bzw. Dissoziationen durchgeführt werden können. Anschließend gelangen die Ionen zum dritten Massenanalysator des Synapt G2S-Massenspektrometers, dem Flugzeitmassenanalysator (*Time-of-flight*, ToF, s. Abbildung 2). Beim Eintritt der Ionen in den Flugzeitmassenanalysator wird ihnen zunächst die gleiche Energie übertragen<sup>(40)</sup>, indem die Ionen in einem konstanten, elektrischen Feld entlang einer definierten Beschleunigungsstrecke beschleunigt werden (*PUSHER*). Dieses Beschleunigungsfeld ist orthogonal zur Eintrittsflugrichtung der Ionen angeordnet. Die mit gleicher Energie aber unterschiedlicher Masse ausgestatteten Ionen erlangen unterschiedliche Geschwindigkeiten<sup>(40)</sup>. Aus der jeweiligen Geschwindigkeit resultiert eine unterschiedliche Flugzeit der Ionen welche umgekehrt proportional zu ihrer Ladung und direkt proportional zu ihrer Masse ist<sup>(40, 163)</sup>. Die letztlich basierend auf ihrem jeweiligen Masse/Ladungsverhältnis separierten Ionenpakete erfahren bei Durchlauf des Flugrohres eine leichte Energiedispersion, die durch den am Ende des Flugrohres angeordneten Reflektor (s. Abbildung 2) ausgeglichen wird. Im Reflektor werden die Ionen in ihrer Flugrichtung reflektiert, wobei schnellere Ionen eine vergleichsweise größere Flugkurve nehmen und letztlich alle Ionen des gleichen Ionenpakets (gleiches  $m/z$ -Verhältnis) gleichzeitig am Detektor (s. Abbildung 2) antreffen. Am Detektor, typischerweise einem Multikanal-Plattendetektor (*multi channel plate detector*, *MCP detector*; *ion detection system*) werden die Ionen letztendlich detektiert, d. h. es wird beim Aufschlag der Ionen ein elektrischer Strom erzeugt. Die Messung der jeweiligen Flugzeiten bis zum Auftreffen auf den Detektor führt so zu einem Spektrum, in dem die jeweiligen Masse/Ladungsverhältnisse der Ionensignale sowie deren Intensitäten abgebildet werden<sup>(152, 164)</sup>.

### 1.3.2 Peptid-Fragment-Analyse

Zur Differenzierung von Peptidisomeren kann sich der Fragmentierung und Analyse von Peptidionen mittels Tandemmassenspektrometrie, z. B. einem Q-ToF 2-Massenspektrometer, bedient werden<sup>(165)</sup>. Für den als Massenanalysator fungierenden Quadrupol wird eine dem Analyt-Ion (Precursor-Ion) entsprechende Masse eingestellt, sodass nur Ionen mit einem entsprechenden m/z-Verhältnis herausgefiltert werden. Diese werden in der Kollisionszelle fragmentiert und die entstandenen Fragmentionen in einem weiteren Massenanalysator, dem Flugzeitmassenanalysator, aufgetrennt (Prinzip s. Abschnitt 1.3.1). Peptidionen fragmentieren mehrheitlich nach einem gleichartigen Muster<sup>(40)</sup>. Auf die in den Massenspektren ausgegebenen Fragmentionen kann daher die Nomenklatur nach Roepstorff (s. Abbildung 3<sup>(166)</sup>) angewandt werden<sup>(166)</sup>. Mittels massenspektrometrischer Fragmentierung können Rückschlüsse auf die in den Precursor-Ionen enthalten Aminosäuresequenzen unter Einbeziehung posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierungen gezogen werden. Eine detaillierte Analyse und Zuordnung sowohl der Precursor-Ionen als auch der Fragment-Ionen dient zur präzisen Strukturaufklärung der zugrunde liegenden Proteine.

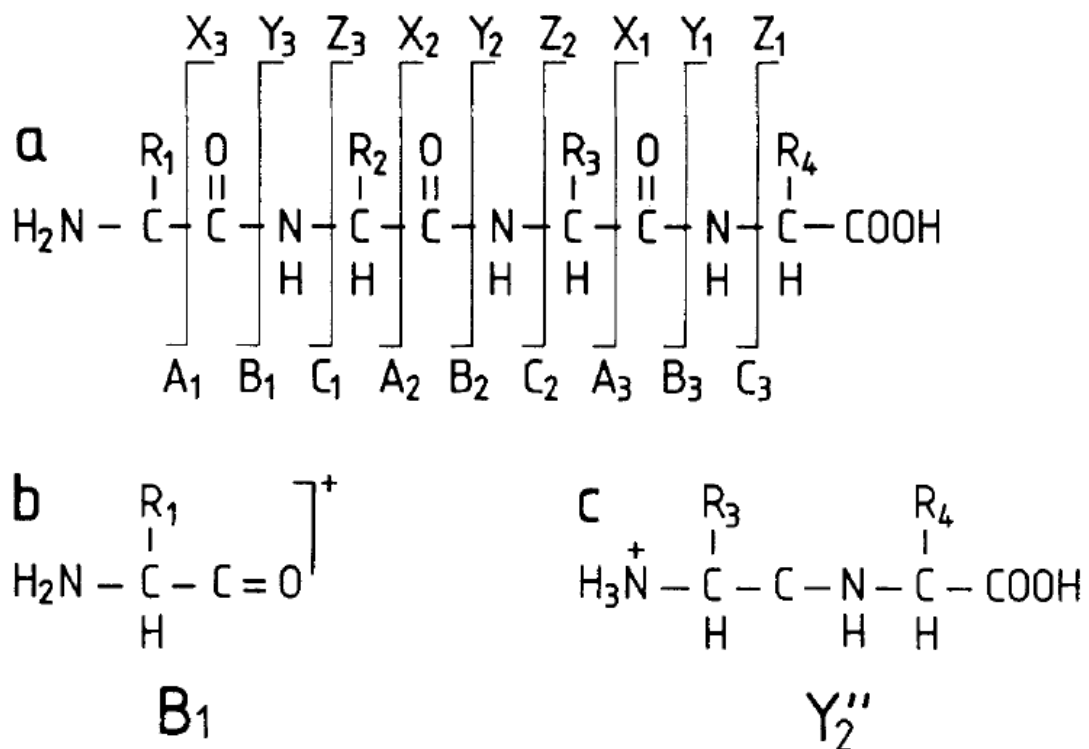


Abbildung 3: Nomenklatur der, bei der Q-ToFCID-Analyse aus den Precursor-Molekülen/Peptiden (a) erzeugten Fragment-Ionen (b und c) nach Roepstorff<sup>(166)</sup>

### 1.3.3 ITEM-TWO

Durch ein neu entwickeltes, Massenspektrometrie-basiertes Verfahren können Antikörper und als Antigene fungierende Peptide in einem Antikörper-Peptidgemisch in der Gasphase identifiziert, und das Antikörper-Peptid-Bindungsverhalten quantifiziert werden<sup>(140, 167)</sup>. ITEM-TWO (*Intact Transition Epitope Mapping - Thermodynamic Weak-force Order*) ist die Bezeichnung für dieses moderne Verfahren zur Epitop-Feincharakterisierung von Antikörpern, das vom Proteom-Zentrum Rostock entwickelt wurde<sup>(140)</sup>. Durch Mischen von Antikörper- und Antigen-Peptid-Lösungen wird die Bildung von Immunkomplexen in Lösung initiiert<sup>(140, 167)</sup>. ITEM-TWO ermöglicht die Bestimmung von Epitop-Paratop-Wechselwirkungen über apparente kinetische und apparente thermodynamische Gasphasenkomplexeigenschaften<sup>(132, 167)</sup>. Die genannten physikalischen Größen sind sowohl unabhängig von der Ionenquelle als auch vom verwendeten Massenspektrometer<sup>(140)</sup>.

Eingangs können massenspektrometrisch die Ionensignale von Antikörpern und Peptiden aufgezeichnet und getrennt voneinander charakterisiert werden. Die anschließende Blockierung der Transmission von Ionen mit niedriger Masse durch den Quadrupol des Massenspektrometers verhindert die Aufzeichnung von Ionensignalen im niedrigen Massenbereich<sup>(132)</sup>. Gleichzeitig können mehrfach geladene Ionensignale im hohen Massenbereich noch nachgewiesen werden. Peptid-Antikörper-Verhältnisse von 1:1 und 2:1 werden in der Regel durch die Satellitenionensignale auf den hohen Massenseiten der mehrfach protonierten Antikörpersignale angezeigt<sup>(132)</sup>. Die schrittweise Erhöhung der Spannungsdifferenz in der Kollisionszelle führt zu einer Kollisions-induzierte Dissoziation des Immunkomplexes, wodurch vom Antikörper zuvor gebundene Peptide als Ionen freigesetzt und anschließend detektiert werden<sup>(140)</sup>. Da zuvor die Transmission von in Lösung vorhandenen überschüssigen und ungebundenen Peptidionen blockiert wurde, beweisen die im ITEM-TWO auftretenden Peptidionensignale die Bindung und Freisetzung aus dem Antikörper-Antigen-Immunkomplex<sup>(132)</sup>. Gleichzeitig verändert sich das Intensitätsverhältnis der detektierten Ionensignalintensitäten von sowohl Peptidionen als auch Antikörperionen sowie Immunkomplexionen<sup>(140)</sup>. Diese Ionenintensitäten werden zu jeder gewählten Dissoziationsenergie zugehörend ermittelt, normalisiert und daraus die Quasi-Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Dissoziation von Immunkomplexen in der Gasphase berechnet<sup>(167)</sup>. Anschließend können die apparenten Dissoziationsaktivierungsenergien für neutrale und ruhende Immunkomplexe in Gasphase rechnerisch extrapoliert werden<sup>(167)</sup> und letztlich die Berechnung der Bindungsstärken des Antikörper-Epitops zum jeweiligen Peptid abgeleitet werden<sup>(132, 167)</sup>. Die Stabilitäten der Immunkomplexionen ähnlicher Zusammensetzung, also vergleichbarer Epitop-Sequenz, können nachfolgend nach thermodynamischen Eigenschaften geordnet werden<sup>(132, 167)</sup>.

Da die Reihenfolge der Bindungsstärken von Immunkomplexen ähnlicher Zusammensetzung und Struktur in der Gasphase jener in Lösung weitgehend entspricht, kongruiert die Immunkomplexdissoziation in Gasphase unter konstant gehaltenen ESI-MS-Bedingungen mit den Merkmalen der Epitop-Paratop-Wechselwirkungen in Lösung<sup>(132, 139, 140)</sup>. Dies wird verständlich, wenn man sich vor Augen führt, dass das Auflösen der Hydrathülle eines Antikörper-Peptid-Komplexes im ESI-Prozess sich nicht auf die zwischen Paratop und Epitop bestehenden Wechselwirkungen auswirkt. Die letzten im Rahmen der Desolvatisierung bei der ESI-MS verdampfenden Wassermoleküle lagern sich um den gesamten Komplex herum an, ehe sie im Folgenden komplett verdampfen. Dadurch kann angenommen werden, dass die in Lösung ursprünglich vorliegende Struktur eines nicht-kovalent gebundenen Immunkomplexes bis zum Abschluss der binnen einigen hundert Microsekunden stattfindenden Desolvatisierung erhalten bleibt<sup>(139)</sup>. Nuancierten Strukturveränderungen der Aminosäurereste an der Oberfläche der Immunkomplexionen unterscheiden sich nur unwesentlich von der Immunkomplexstruktur in Lösung<sup>(139)</sup>. Insgesamt kann also insbesondere in Bezug zur molekularen Interaktion zwischen Antikörper und Epitopeptid vom Vorliegen lösungsähnlicher Immunkomplexstrukturen in Gasphase ausgegangen werden<sup>(139, 168)</sup>. Somit ist eine Übertragung der Ergebnisse zu Komplexbindungsstärken in der Gasphase auf in Lösung vorliegende Immunkomplexe, wie sie optimalerweise bei diagnostisch und therapeutisch angewandten Antikörpern und ihren Zielantigenen in vivo vorliegen, mit nur wenigen Ausnahmen möglich.

Resümierend lassen sich mittels ITEM-TWO Affinität und Spezifität eines Antikörpers quantitativ und qualitativ präzisieren, wodurch zur Entschlüsselung des molekularen Erkennungsmotivs von Antikörper-Paratopen beigetragen werden kann (s. Abschnitte 1.2.3 und 1.2.4)<sup>(132, 140)</sup>.

### 1.4 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation besteht darin, mittels massenspektrometrischer Präzisionsanalyse und insbesondere unter Einsatz des Epitop-Feincharakterisierungsverfahrens ITEM-TWO die Bindungsstärken des anti-HpTGEKP-Antikörpers mit sich ähnelnden Zinkfinger-Protein-Epitopeptidsequenzen sowohl qualitativ als auch quantitativ zu beschreiben. Im Mittelpunkt des Interesses steht, inwieweit das für die Antikörperbindung erforderliche Bindemotiv des anti-HpTGEKP-Antikörpers bei einzelnen Aminosäureaustauschen sowie verändertem Phosphorylierungsstatus im Linker-Sequenzmotiv HTGEKP von C2H2-Zinkfinger-Proteinen, das als Epitop fungiert, ausgebildet bleibt. Aufgrund der Diversität von über 750 menschlichen C2H2-Zinkfinger-Protein-Genen sowie der z. B. beim Endometriumkarzinom beschriebenen Punktmutationen im

C2H2-Zinkfinger-Protein-Gen ZNF 331, die zu dezidierten Aminosäureaustauschen im Epitop des anti-HpTGEKP-Antikörpers führen, liegen sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch tatsächlich existierende Sequenzvariationen vor. Zu deren zellbiologischer Bedeutung werden in der modernen biomedizinischen Forschung monoklonale Antikörper als Analysewerkzeug ausgewählt und eingesetzt. Somit eignen sich die gewählten Komplexpartner zur Untersuchung des molekularen Erkennungs-codes (s. Abschnitt 1.2.3) des anti-HpTGEKP-Antikörpers, anhand dessen somit die Tauglichkeit des anti-HpTGEKP-Antikörpers für biomedizinisch erforderliche Untersuchungen abgeschätzt werden kann. Im Zuge dessen werden nicht nur zu Kreuzreaktivitäten des anti-HpTGEKP-Antikörpers, sondern auch zu Mutations-bedingten Strukturänderungen mit Auswirkungen auf die Erkennungsstruktur Kenntnisse auf submolekularer Ebene gewonnen und ein Weg zur funktionellen Charakterisierung von Antikörpern beschrieben, die für die moderne Präzisionsmedizin (*precision medicine*) von eminenter Bedeutung sind.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur und Herstellung von Proteinextrakten**

#### **2.1.1 Zellkultur und Zellbehandlung**

Adhärenz wachsende HAP1-Zellen der Zelllinien PBK-16 (PBK Knockout Zellen, Passagezahl 6/3, Identifikationsnummer: HZGHC000098c016, Horizon Genomics, Wien, Österreich) und C631 (HAP1-Wildtyp, Passagezahl 5/3, Horizon Genomics, Wien, Österreich) wurden kultiviert<sup>(169, 170)</sup>, anschließend mit in Ethanol gelöster Okadasäure bzw. Ethanol allein (jeweils Versuchszellkulturen) versetzt und schließlich geerntet<sup>(132)</sup>. Für Details s. Abschnitt 6.1.1.

#### **2.1.2 Herstellung von Proteinextrakten aus geernteten Zellen**

##### Lösungen:

SDS-Puffer: 50 % Glycerin (Artikelnummer: 2032220, Merck, Darmstadt, Deutschland), 2 % SDS-Lyse-Reagenz (PlusOne SDS, Artikelnummer: 17-1313-01, Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden), 62,5 mM TRIS (Artikelnummer: 5429.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl pH 6,8, 6,5 mM Dithiothreitol (Artikelnummer: 20710.04, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), 0,016 g Bromphenolblau (Artikelnummer: B0126, Sigma, Sankt Louis, Missouri, USA)

Die geernteten Zellen wurden gewaschen, pelletiert und abhängig von der geschätzten Größe des Zellpellets in 500 µl bzw. 600 µl SDS-Puffer aufgenommen. Für Details s. Abschnitt 6.1.1 (Absatz zur Zellpelletierung und Behandlung mit SDS-Puffer).

Anschließend wurden die Zellextrakte separat in einem Durchlauf in einer Zellextrakt-Homogenisators QIAshredder (Artikelnummer: 79656, Qiagen, Venlo, Niederlande) für 5 Minuten bei 13 000 rpm bei Raumtemperatur (22,5 °C) homogenisiert (BioFuge Fresco)<sup>(169)</sup>. Der Einsatz des Zellextrakt-Homogenisators QIAshredder wurde entfernt und das homogenisierte Proteinextrakt des Durchlaufs in ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinkonzentrationen in den gesammelten Überständen (jeweils ca. 0,3 ml) wurden mit BSA als Standard bestimmt (BioRad RC DC Protein Assay; Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Für Details s. Abschnitt 6.1.1 (Absatz zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels RC DC Proteinassay).

Die Proteinextrakte wurden eingefroren bei -20 °C gelagert oder direkt für weitere Analysen verwendet.

Die Herstellung der Proteinextrakte aus kultivierten Zellen ist bereits in Scherf et al. <sup>(132)</sup> kurz beschrieben worden. Jeder dargestellte Schritt wurde für den zweiten Experimentdurchlauf analog zum ersten Durchlauf wiederholt, um im späteren Western Blot biologische Replikate aus den hergestellten Proteinextrakten zu erzeugen.

## **2.2 SDS-PAGE und Western Blot der unterschiedlich behandelten Zelllinien**

### **2.2.1 SDS-PAGE**

#### Lösungen:

MOPS-Puffer: 50 mM MOPS (Artikelnummer: 29836.04, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), 50 mM TRIS, 3,5 mM SDS, 1,0 mM EDTA (Artikelnummer: 108418, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Die SDS-PAGE-Analyse der Proteinextrakte wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt <sup>(132, 171, 172)</sup>. Die Proteinextrakte enthalten ZNF-Proteine aus C631- bzw. PBK-16-Zellen, die entweder mit in Ethanol gelöster Okadasäure (biologischer Wirkstoff) oder nur mit Ethanol (Kontrolle) behandelt wurden. Eingangs wurde ein Teil der jeweiligen Proteinextrakte (je 40 µg Protein; 1,6 µl - 8,7 µl Volumen; Proteinkonzentrationen 4,6 µg/µl - 7,4 µg/µl) mit vier Teilen SDS-Puffer (1,26 µl - 8,37 µl) verdünnt, um ein Gesamtvolumen von jeweils 10 µl zu erreichen. Die Lösungen wurden für 5 Minuten im thermischen Elektroschüttler <sup>TM</sup> 130-6 (Seriennummer: 1360043, HLC Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland) bei 95 °C erhitzt. 10 µl der Proteinlösungen, die jeweils 40 µg Gesamtprotein enthalten, wurden in separate Taschen des NuPAGE Novex 10 % Bis-TRIS-Gel (1,0 mm Dicke, Artikelnummer: NP030, Lotnummer: 21041970, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) geladen. In eine weitere benachbarte Tasche wurden 3 µl des Proteingrößenmarkers PageRuler Prestained Protein Ladder (Artikelnummer: 26616, Lotnummer: 00924042, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen) gefüllt. Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer XCell SureLock Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) montiert. Der als Laufpuffer verwendete 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Puffer wurde in die dafür vorgesehenen beiden Pufferkammern gefüllt. Anschließend wurde die Proteintrennung bei einer konstanten Spannung von 200 V für 45 - 50 Minuten durchgeführt, abhängig vom Zeitpunkt, an dem die Proben fast das Gelende erreicht hatten (Stromstärke zu Beginn 166 mA - 188 mA, Stromstärke am Ende 116 mA - 136 mA).

## 2.2.2 Western Blot

### Lösungen:

Kathodenpuffer: 0,04 M 6-Aminocaprinsäure (Artikelnummer: A2504, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), 0,025 M TRIS, 20 % (v/v) Methanol (Artikelnummer: 7342.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 9,4

Anodenpuffer I: 0,3 M TRIS, 20 % Methanol (v/v), pH 10,4

Anodenpuffer II: 0,025 M TRIS, 20 % Methanol (v/v), pH 10,4

Ponceau S-Färbelösung: 0,5 % (w/v) Ponceau S (Artikelnummer: P3504, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) in 1 % (v/v) Essigsäure (Artikelnummer: 6052, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Coomassiefärbelösung: Coomassie Brilliantblau G250 (Artikelnummer: 17524, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) 0,02 % (w/v), Ethanol (Artikelnummer: 1.11727, Merck, Darmstadt, Deutschland) 10 % (v/v), Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat 98 % (Artikelnummer: 368458, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) 5 % (w/v), ortho-Phosphorsäure 85 % (Artikelnummer: 100573, Merck, Darmstadt, Deutschland) 2,3 % (v/v)

PBS-Puffer: 137 mM NaCl (Artikelnummer: 0278, Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA); 2,7 mM KCl (Artikelnummer: 4936, Merck, Darmstadt, Deutschland); 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Artikelnummer: K14687680, Merck, Darmstadt, Deutschland); 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Artikelnummer: 4873, Merck, Darmstadt, Deutschland); pH 7,96

Waschpuffer: PBS-Puffer, 0,1 % (v/v) Tween-20

Der Western Blot der Proteine wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt<sup>(132, 171, 172)</sup>. Die nach abgeschlossener SDS-PAGE vorliegenden getrennten Proteine wurden mittels der Methodik des Semidry Blotting nach Jan Kyhse-Andersen auf die PVDF-Membran (Porenweite: 0,45 nm, Artikelnummer: IPFL00010, Lotnummer: K8PN6324A, Immobilon, MilliporeSigma, Bedford, Massachusetts, USA) geblottet<sup>(173, 174)</sup>. Dazu wurde nach der SDS-PAGE das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel für 15 Minuten in 10 ml Kathodenpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran und 18 Lagen Blotpapier GB 002 (Artikelnummer: 10426694, Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire, USA) wurden auf 8 cm · 6,5 cm zurechtgeschnitten. Die Membran wurde für 5 Sekunden in 10 ml Isopropanol (Artikelnummer: 7343.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) benetzt und dann in 10 ml Reinstwasser geschüttelt. Nachfolgend wurde sie für 5 Minuten in 10 ml Anodenpuffer II bis zum Blotaufbau equilibriert. Die Filterpapiere wurden für 30 Sekunden in

separaten Behältnissen mit 10 ml ihrer jeweiligen Lösungen durchtränkt: Neun Filterpapiere mit Kathodenpuffer, sechs mit Anodenpuffer I und drei mit Anodenpuffer II. Die Blotting-Transfervorrichtung Semi Dry Blotter Pegasus (PHASE Gesellschaft für Phorese, Analytik und Separation, Lübeck, Deutschland) wurde wie folgt luftblasenfrei aufgebaut<sup>(40)</sup>. Auf die Kathode, welche für 10 Sekunden mit, in 10 ml Kathodenpuffer getränkten Präzisionstüchern angefeuchtet wurde, folgten die neun Lagen der mit Kathodenpuffer befeuchteten Blottpapiere. Darauf wurde das Gel gelegt, darauf die PVDF-Membran, anschließend die drei Lagen mit Anodenpuffer II befeuchtete Filterpapiere. Zuletzt folgen sechs Lagen der mit Anodenpuffer I durchtränkten Blottpapiere und darauf der Deckel der Blotting-Transfervorrichtung (Anode), der ebenfalls für 10 Sekunden mit 10 ml Anodenpuffer I befeuchtet wurde. Das Elektrophoresenetzteil (Modell: EPS 3501 XL, Seriennummer: 56307484 KN 001607, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, England) wurde an die Blotting-Transfervorrichtung angeschlossen. Anschließend wurde mit einer durchschnittlichen Stromstärke von 1,2 mA pro Quadratcentimeter Flächeninhalt des Gels für 2 Stunden geblottet (Stromstärke zu Beginn 16 - 18 mA, Stromstärke am Ende 27 - 32 mA). Die eingangs vorliegende Spannung betrug 16 V, nach 2 Stunden waren es 32 V. Nach dem Ausschalten der Blotting-Transfervorrichtung, wurden alle Blottpapiere entfernt. Anschließend wurde die PVDF-Membran in einer Petrischale, die vorsichtig rotierend bewegt wurde, komplett mit ca. 50 ml Ponceau S-Färbelösung bedeckt. Folgend wurde die PVDF-Membran viermal mit jeweils 100 ml Reinstwasser für jeweils eine Minute gespült, um die überschüssige Ponceau S-Färbelösung zu entfernen. Zur ungefähren Kalkulation der Proteinmenge, die während des Blottens nicht vom Gel auf die PVDF-Membran übertragen wurde, wurde das Gel in 150 ml Coomassiefärbelösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt<sup>(175)</sup>. Der Plattformschüttler Promax 2020 (Modellnummer: 542-20020-00-1, Seriennummer: 010001060, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) wurde dabei, wie bei allen späteren Schritten auch, auf ca. 0,77 Hz eingestellt. Die PVDF-Membran wurde 3 Minuten in 100 ml PBS-Puffer gewaschen und die Membranoberfläche über Nacht bei 4 °C in einer 1:1 verdünnten Lösung aus 10 ml Intercept Blocking Puffer (Artikelnummer: 927-70001, Lotnummer: 210218, LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) und 10 ml PBS-Puffer inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des primären monoklonalen anti-HpTGEKP-Antikörpers aus der Maus (gelöst in PBS, pH 7,4; Klon: 18E9.D9, Isotyp: IgG1; Artikelnummer: 685702, Lotnummer: B216382, Konzentration: 0,5 mg/ml, BioLegend, London, England) nach Herstellerangaben mit 10 ml Intercept Blocking Puffer/PBS-Puffer (50:50 v/v) 1:1000 verdünnt. Der Lösung wurden 10 µl Tween-20 (Artikelnummer: P1379, Lotnummer: SLBT8195, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) beigegeben, sodass diese ca. 0,1% (v/v) Tween-20 enthielt. Damit wurde nun die PVDF-Membran in einem Gefäß auf dem Plattformschüttler für 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Diese Lösung wurde

abgegossen und im Anschluss die PVDF-Membran bei Raumtemperatur viermal für jeweils 5 Minuten in 10 ml Waschpuffer unter vorsichtigem Schütteln inkubiert<sup>(169)</sup>. Folgend wurde 1 µl des fluoreszenzmarkierten polyklonalen sekundären anti-Maus-Antikörper aus der Ziege IRDye 800CW (1 mg/ml in PBS, pH 7,4; Isotyp: IgG; Artikelnummer: 926-32210, Lotnummer: C60726-02, LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) mit 15 ml Intercept Blocking Puffer/PBS-Puffer (50:50 v/v) plus 0,1% (v/v) Tween-20 1:15000 verdünnt. Der Waschpuffer wurde entfernt, die Sekundärantikörper-haltige Lösung zugegeben und die PVDF-Membran darin für 60 Minuten vor Licht geschützt inkubiert. Dieses Gefäß wurde dabei auf dem Plattformschüttler leicht geschüttelt. Nachfolgend wurde die PVDF-Membran wie bereits beschrieben viermal für jeweils 5 Minuten gewaschen. Der Waschpuffer wurde dann verworfen und die PVDF-Membran abschließend mit 10 ml PBS-Puffer gespült, um Tween-20 zu entfernen. Die PVDF-Membran wurde luftblasenfrei am Odyssey Fluoreszenz-Imager (Seriennummer: Cix 1283, LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) eingescannt, um die dekorierten Antigene bei Wellenlängen von 800 nm bzw. 680 nm fluoreszenzbasiert zu detektieren. Dies erfolgte im roten und grünen Kanal<sup>(169)</sup>. Kontrast und Helligkeit der Bilder wurden mit der Image Studio Light Software Version 5.2 (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) und Corel Draw 2017 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) auf vergleichbare Hintergrundintensitäten angepasst<sup>(170)</sup>.

Zur Ladungskontrolle wurde ein monoklonaler anti-β-Actin-Antikörper aus der Maus verwendet (gelöst in 0,01 M PBS, pH 7,4; Klon: AC-15, Isotyp: IgG1, Konzentration: ca. 2 mg/ml, Artikelnummer: A1978, Lotnummer: 088M48004V, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Dazu wurden 10 µl des Antikörpers mit 10 ml Intercept Blocking Puffer/PBS-Puffer (50:50 v/v) gemischt und die PVDF-Membran für 12 Stunden analog dem zuvor beschriebenen Verfahren inkubiert und schließlich gescannt. Die Bilder wurden als TIFF-Dateien gespeichert und oberhalb einer molekularen Masse von ca. 200 kDa und unterhalb einer molekularen Masse von ca. 35 kDa zurechtgeschnitten<sup>(170)</sup>.

Für die, wie zuvor unter Abschnitt 2.1.2 beschriebenen, hergestellten Proteinextrakte der Zellreplikate wurden SDS-PAGE und Western Blot auf die gleiche Weise wiederholt.

### 2.3 Auswahl der Hexapeptide 01 bis 10

Aus dem humanen Referenzgenom „Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 13“ (GRCh38.p13; Uniform Resource Locator: [https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/001/405/GCF\\_000001405.39\\_GRCh38.p13/GCF\\_000001405.39\\_GRCh38.p13\\_genomic.fna.gz](https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/001/405/GCF_000001405.39_GRCh38.p13/GCF_000001405.39_GRCh38.p13_genomic.fna.gz); Zugriff: 28. Oktober 2019 15:00 Uhr bis 17:00 Uhr) wurden alle potentiellen C2H2-ZNF-Proteinsequenzen extrahiert<sup>(132)</sup>. Es wurden alle passenden Codons durchsucht,

auch im reversen Strang. Ob der Bereich codierend ist, wurde dabei nicht berücksichtigt, da auch potentiell versteckte bzw. noch nicht bekannte C2H2-ZNF-Proteinsequenzen berücksichtigt werden sollten. Dabei wurde sich der in Tab. 1 dargestellten Suchsequenz bedient.

Tab. 1: Präzisierung der Aminosäure-Suchsequenz

<b>Position innerhalb der Suchsequenz</b>	<b>Aminosäure <sup>a)</sup></b>
1	X
2	X
3	C
4	X
5	X
6	C
7	X
8	X
9	X
10	X
11	X
12	X
13	X
14	X
15	X
16	X
17	X
18	X
19	H
20	X
21	X
22	X
23	H
24	X
25	X
26	X
27	X
28	X

<sup>a)</sup> Einbuchstabencode zur Darstellung der Aminosäuren verwendet. X steht für eine arbiträre Aminosäure.

Im Anschluss erfolgte die Translation des passenden Codons, wobei diejenigen Aminosäuresequenzen mit Stopcodonen entfernt wurden. Abschließend erfolgte die Zählung der vorliegenden Anzahl der jeweiligen C2H2-ZNF-Linkersequenzen, die für die 10 häufigsten C2H2-ZNF-Linkersequenzen in Tab. 2 (s. Abschnitt 3.1.2) dargestellt ist.

Die Aminosäuresequenzen der zehn häufigsten C2H2-ZNF-Linkersequenzen wurden als chemisch synthetisierte, lyophilisierte Hexapeptide 01 bis 10 erworben (s. Tab. 6).

### 2.4 Herstellung der Kapillarnadeln

Nano-ESI-Kapillarnadeln für massenspektrometrische off-line-Messungen wurden hausintern hergestellt: Aus jedem Borosilikatglasröhrchen (Artikelnummer: BF100-50-10, Lotnummer: 179623, Sutter Instrument Company, Novato, Kalifornien, USA) mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einem Außendurchmesser von 1,0 mm wurden mit dem P-1000/M-1496 Flaming/Brown Mikropipettenzieher (Sutter Instrument Company, Novato, Kalifornien, USA) zwei Kapillarnadeln mit jeweils ausgezogenen Spitzen hergestellt<sup>(176)</sup>. Im Anschluss daran wurden diese an ihren, den Spitzen gegenüberliegenden Enden auf ca. 5 cm eingekürzt und goldbeschichtet. Für Letzteres wurde die Sputterbeschichtungsanlage SCD 005 (Gerätenummer: BUG05750/451, BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein) verwendet: Bei einem Abstand der Kapillarnadeln von 5 cm zum Gold-Target, unter Argon-Gasdruck von ca. 0,5 mbar, erfolgte die Goldbeschichtung für 150 Sekunden bei einer Stromstärke von 20 mA<sup>(114, 132, 139, 167)</sup>.

### 2.5 Präparation nano-ESI-MS-kompatibler anti-HpTGEKP-Antikörperlösungen

Zur Herstellung nano-ESI-MS kompatibler Antikörperlösungen wurde der in PBS gelöste monoklonale anti-HpTGEKP-Antikörper aus der Maus in 200 mM Ammoniumacetatlösung, pH 6,7 (Artikelnummer: 09690, Reinheit: 98 %, Fluka Chemika, Buchs, Sankt Gallen, Schweiz; gelöst in Reinstwasser) umgepuffert. Das Verfahren wurde bereits in der Literatur beschrieben<sup>(139, 140)</sup>. Für Details s. Abschnitt 6.1.2 (Unterabschnitt „Umpuffern des anti-HpTGEKP-Antikörpers“).

Auf diese Weise hergestellte Aliquots der Antikörper-Stammlösungen wurden zur weiteren Verwendung bei 5 °C gelagert. Deren Proteinkonzentrationen wurde mit dem Qubit™ 2.0 Fluorometer-Assay wie in der Literatur beschrieben<sup>(167, 177)</sup> bestimmt und lag je nach Replikatvariation zwischen 0,52 µg/µl und 0,63 µg/µl. Für Details s. Abschnitt 6.1.2 (Unterabschnitt „Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Antikörper-Stammlösungen“).

Die Antikörper-Stammlösung wurde mit 200 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,7) verdünnt, um Antikörper-Arbeitslösungen mit einer Proteinkonzentration von etwa 0,2 µg/µl zu erhalten. Aliquote der Antikörper-Arbeitslösungen wurden entweder direkt zur Herstellung von

anti-HpTGEKP-Antikörper-Peptidlösungen bzw. Immunkomplexlösungen verwendet oder bei 5 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

## 2.6 Präparation nano-ESI-MS kompatibler Hexapeptidlösungen

Eine Spatelspitze der als lyophilisiertes Pulver erworbenen Hexapeptide (peptids & elephants, Artikelnummern: A19-621EP\_2 (Peptide 00 bis 10) und A20-583EP\_2 (Peptide 100 bis 103), Lotnummern s. Tab. 6, Hennigsdorf, Deutschland) wurde mithilfe der zuvor kalibrierten Sartorius Mikrowaage ME36S (Seriennummer: 19306328, Ablesbarkeit: 0,001 µg, Sartorius, Göttingen, Deutschland) eingewogen. Die abgewogene Probenmenge betrug zwischen ca. 0,3 mg und 0,9 mg. Die auf eine angenommene Proteinkonzentration von 2 mg/ml verdünnte Hexapeptid-Stammlösung wurde anschließend hergestellt, indem gemäß den abgelesenen eingewogenen Mengen eine errechnetes Volumen 200 mM Ammoniumacetatlösung (pH 6,7) hinzugegeben wurde. Da die Massen der mitgewogenen Gegenionen der Trifluoressigsäure bei den Phospho-Hexapeptiden zu falsch-hohen Einwaage-Ergebnissen führen können, wurden von den nach Einwaage erwarteten Peptidkonzentrationen von 2 mg/ml 20 % abgezogen. Die damit neu angenommenen Peptidkonzentrationen der Hexapeptid-Stammlösungen von 1,6 mg/ml sollte somit die mitgewogenen Massen der Gegenionen kompensieren, um sich den tatsächlich vorliegenden Peptidkonzentrationen am ehesten zu nähern. Die Hexapeptid-Stammlösungen wurden jeweils mit 200 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,7, verdünnt, um Hexapeptid-Arbeitslösungen zu erhalten. Deren Hexapeptid-Konzentrationen lagen ca. zwischen 31,49 pmol/µl und 35,71 pmol/µl. Das hier dargestellte Verfahren wurde bereits in der Literatur beschrieben <sup>(114, 132)</sup>.

## 2.7 Herstellung von nano-ESI-MS-kompatibler Antikörper-Peptid-Lösungen

Ca. 9 µl Antikörper-Arbeitslösung wurde mit ca. 1 µl Hexapeptid-Arbeitslösung gemischt, um ein molares Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid von ca. 1 : 3 zu erhalten. Für Details zur experimentellen Festlegung dieses molaren Verhältnisses s. Abschnitt 3.3.1. Für ternäre Gemische mit Antikörper und zwei Hexapeptiden wurde ein molares Verhältnis von 1 : 3 : 3 gewählt. Die Antikörper-Peptid-Mischungen wurden für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die nano-ESI-Kapillarnadeln wurden für jede massenspektrometrische Einzelmessung mittels Microloader-Pipettenspitzen (Artikelnummer: 5242956.003, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit ca. 3 µl der Antikörper-Peptid-Mischung beladen und die Protein-Peptid-Mischungen durch

ITEM-TWO-Messungen untersucht. Das hier dargestellte Verfahren ist bereits in der Literatur beschrieben wurden <sup>(114, 132, 140)</sup>.

## 2.8 Nano-ESI-Massenspektrometrische Geräteeinstellung und Datenerfassung

Die nano-ESI-Massenspektren wurden am Q-ToF 2-Massenspektrometer (Seriennummer: UD475, Micromass UK, Manchester, England) und am Synapt G2S-Massenspektrometer (Seriennummer: UEB215, Waters MS-Technologies, Manchester, England) off-line im Positiv-Ionen-Modus aufgenommen. Das Q-ToF 2-Massenspektrometer wurde zunächst mit einprozentiger Phosphorsäure-Lösung (hergestellt aus ortho-Phosphorsäure 85 %) in 2,2,2-Trifluorethanol (Artikelnummer: 101055731, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) /Reinstwasser (50 : 50 v/v) kalibriert <sup>(167)</sup>. Am Synapt G2S-Massenspektrometer erfolgte die Kalibrierung der m/z-Achse mit 1 mg/ml Natriumiodid (Artikelnummer: 71710, Fluka Chemika, Buchs, Sankt Gallen, Schweiz) gelöst in Isopropanol (Artikelnummer: 7343.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) /Reinstwasser (50 : 50 v/v) <sup>(167)</sup>.

Für Messeinstellungen zur folgenden Charakterisierung sowohl der Peptide als auch der Antikörper (der Ausgangsprodukte für die nachfolgenden ITEM-TWO-Analysen) s. Abschnitt 6.1.4. Zur Differenzierung der Konstitutionsisomere Hexapeptid 101 und 102 wurden diese zusätzlich mittels Tandemmassenspektrometrie am Q-ToF 2-Massenspektrometer fragmentiert.

Die Geräteeinstellungen für die am Synapt G2S-Massenspektrometer durchgeführten ITEM-TWO-Messungen <sup>(140)</sup> waren: Kapillarspannung 1,8 kV, Quelltemperatur 50 °C, Konusspannung 130 V, Offset-Spannung der Ionenquelle 130 V, Nano-Flow-Gas 0,05 bar, Heliumgasfluss 0 bar, Druck in der Heliumzelle  $1.24 \cdot 10^{-4}$  mbar, TRAP-Kollisionszellenspannungsdifferenz ( $\Delta CV$ ) [V] erhöht in den Schritten 0, 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 145, 165, 180, 200 V, TRAP-Gasfluss (Argon) 8 ml/min sowie Transfer-Kollisionszellen-Spannungsdifferenz 2 V. Die Ionenmobilitätszelle wurde nicht genutzt. Der Quadrupol-Massenfilter wurde für die ITEM-TWO-Messungen wie folgt eingestellt, um die Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ) zu blockieren (M1 = 4800 mit Verweilzeit und Rampenzeit von jeweils 25 %, M2 = 5000 mit Verweilzeit und Rampenzeit von jeweils 25 %, M3 = 5200; Gesamtzeit eines Scans ist eine Sekunde). Die jeweiligen Immunkomplexe wurden in der ersten Kollisionszelle (TRAP) mittels CID dissoziiert, also durch die Erhöhung der Kollisionszellenspannungsdifferenz. Alle Massenspektren wurden im Massenbereich von  $m/z$  300 - 8000 oder  $m/z$  400 - 8000 aufgenommen. Vor und nach den jeweiligen ITEM-TWO-Messungen wurde der

Quadrupol-Massenfilter auf volle Transmission aller Ionen eingestellt und die Ionen wurden für 1,52 Minuten (87 Scans) aufgenommen. Für die anti-HpTGEKP-Antikörper-Peptidgemisch-Lösungen bzw. Immunkomplexlösungen, die Antikörper-Arbeitslösungen und alle Hexapeptid-Arbeitslösungen wurden jeweils zwei Einzelmessreihen aufgenommen, mit Ausnahme der ITEM-TWO-Messung der Immunkomplexlösungen mit den Hexapeptiden 02 und 04, für die jeweils nur eine Messreihe aufgenommen wurde. Die nano-ESI-Massenspektrometrische Geräteeinstellung und Datenerfassung wurde bereits in der Literatur beschrieben <sup>(114, 132)</sup>.

## 2.9 Analysen der massenspektrometrischen Daten

Die Analysen der massenspektrometrischen Daten wurden bereits in der Literatur <sup>(114, 132, 167)</sup> beschrieben. Für die Datenerfassung und -verarbeitung wurde die Mass Lynx Software in der Version 4.1 (Waters MS-Technologies, Manchester, England) verwendet. Für die massenspektrometrischen Abbildungen zur Charakterisierung der Hexapeptid-Arbeitslösungen, der anti-HpTGEKP-Antikörper-Arbeitslösung sowie an jeder  $\Delta CV$  der ITEM-TWO-Messungen der Immunkomplexlösungen wurden mindestens 87 Scans aufgenommen und aufsummiert. Eine Ausnahme stellte lediglich der Messpunkt  $\Delta CV$  60 V bei der zweiten Messung der Immunkomplexlösung mit Hexapeptid 09 dar (hier wurden lediglich 82 Scans aufgenommen und aufsummiert). Die Massenspektren der Hexapeptid-Arbeitslösungen wurden nicht geglättet. Im Gegensatz dazu, wurden die generierten Massenspektren der anti-HpTGEKP-Antikörper-Arbeitslösungen und der Immunkomplexlösungen für jede  $\Delta CV$  auf den hohen Massenseiten mit 20 Zyklen und einem Fenster von 10 Masseneinheiten nach der Savitzky-Golay-Methode geglättet und abgebildet. Peptidionen im niedrigen Massenbereich derselben Massenspektren wurde analog mit 5 Zyklen und einem Fenster von 3 Masseneinheiten geglättet. Erst danach wurden die Intensitäten der Ionensignale aller molekularen Spezies (Peptid, Antikörper, Immunkomplex aus Antikörper und einem gebundenen Peptid, Immunkomplex aus Antikörper und zwei gebundenen Peptiden; in arbiträren Einheiten) bei deren jeweiligen  $m/z$ -Werten und ihrer entsprechenden Ladungszustände extrahiert, individuell für alle angelegten Spannungsdifferenzen der Kollisionszellen bis einschließlich 80 V <sup>(167)</sup>. Für Details s. Abschnitt 6.1.5. Eine Ausnahme stellt der Messpunkt  $\Delta CV$  80 V bei der Immunkomplexlösung mit Hexapeptid 02 dar, an dem keine Auswertung des Massenspektrums möglich war. Mittels Origin Pro 2016G (32 bit, OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) wurden bei jeder  $\Delta CV$  die ermittelten Intensitäten der Ionensignale aller molekularen Spezies gegen ihre jeweiligen Ladungszustände grafisch aufgetragen und eine Gauß-Kurve an die Werte angepasst. Zur Erstellung einer Gauß-Kurve werden mindestens fünf Datenwerte benötigt. Da von den

Peptidionensignalen diese Anzahl nicht erreicht wird, wurden weitere Werte rechnerisch festgelegt (*imputing*): Als Abszissenwerte wurden 0,33, 0,5 sowie die Ladungszustände der ein-, zwei- und dreifach geladenen Peptidionen festgelegt. Für das einfach geladene Peptidionensignal und – sofern zu detektieren – auch für das zweifach geladene Peptidionensignal wurden die zugehörigen experimentell ermittelten Intensitäten als Ordinatenwerte angegeben. Für die Abszissenwerte von 0,33, 0,5, des dreifach geladenen Peptidions sowie – sofern nicht zu detektieren – des zweifach geladenen Peptidions wurden die durchschnittlichen Intensitäten der Basislinie des entsprechenden Massenbereichs als Intensitätswert festgelegt. Sofern neben dem einfach geladenen auch die Intensität der Ionensignale des zweifach geladene Peptidions detektiert werden konnte, wurde beim Erstellen der Gauß-Kurve für die Produktkomponente des dissoziierten Peptidions die Parameter Breite auf 0,67 und  $y_0$  auf die Intensität der Basislinie der jeweiligen Messung festgesetzt, um eine geeignete Gauß-Kurve zu erhalten. Für die imputierten Werte der nächsthöheren bzw. niedrigeren Ladungszustände des anti-HpTGEKP-Antikörpers und Immunkomplexes, bei denen erstmal keine Ionenintensitäten mehr detektierbar sind, wurde ebenfalls die Intensität der Basislinie in ihrem entsprechenden Massenbereich detektiert und für die Anpassung an die Gauß-Kurve verwendet. Sofern dabei eine Differenz der Intensitäten der Basislinien zwischen höherem und niedrigerem Ladungszustand bestand, wurde individuell bei jeder  $\Delta CV$  unter Aufrunden das arithmetische Mittel der Intensitäten der Basislinie bestimmt, um mit ein und derselben Basislinien-Intensität rechnen zu können. Die Höhen der Scheitelpunkte der Gauß-Kurven wurden für jede molekulare oder supramolekulare Spezies ermittelt, die auch ihre jeweiligen durchschnittlichen Ladungszustände markierten. Der mittlere Ladungszustand der einzelnen Produkte wurde bestimmt, indem die exakten Abszissenwerte  $x_c$  aller ausgewerteten  $\Delta CV$  für das jeweilige Produkt gemittelt und addiert wurden. Die Werte aus beiden Einzelmessungen wurden erneut gemittelt (Ausnahme: Auswertung des Immunkomplexes zu Hexapeptid 02) und für spätere Berechnungen auf zwei Nachkommastellen gerundet. Die Anteile der Produkte und Edukte wurden aus den Höhen der Gauß-Kurven des Komplexes (Edukt-Ionensignale) und seiner dissoziierten Bestandteile (Produkt-Ionensignale) für jede angelegte  $\Delta CV$  abgeleitet. Die relativen Mengen der Edukte,  $f(\text{Edukte})$ , und die relativen Mengen der Produkte,  $f(\text{Produkte})$ , wurden bei allen angelegten  $\Delta CV$  bestimmt und normalisiert<sup>(167)</sup>. Normalisierte Intensitäten der Ionensignale wurden aus zwei Einzelmessungen gemittelt (außer bei Immunkomplex mit Hexapeptid 02) und die zugehörigen Standardabweichungen wurden berechnet. Die Diagramme der normalisierten und gemittelten Produktintensitäten der Ionensignale und Standardabweichungen gegen  $\Delta CV$  wurden ermittelt und daran eine der Boltzmann-Gleichung unterliegende, sigmoidale Kurve (Boltzmann-Kurve) angepasst. Diese Boltzmann-Gleichung ist nachfolgend dargestellt<sup>(167)</sup>.

$$y = \frac{A2 + (A1 - A2)}{1 + \frac{e^{(x-x_0)}}{dx}}$$

y - Normalisierte Produktintensität der Ionensignale

A1 - Anfangswert

A2 - Endwert

x - Experimentell festgelegter  $\Delta CV$ -Wert

$x_0$  - Zentraler Wendepunkt

dx - Bereich des exponentiellen Kurvenanstiegs

Dabei wurde für die Anpassung der Kurve auch die Eingabe der Fehlerbalken als Standardabweichung der normalisierten Produktintensitäten der Ionensignale bei gleicher  $\Delta CV$  der Einzelmessungen berücksichtigt. Für die Anpassung der Kurve wurde mittels Imputation jeweils ein weiterer Wert hinzugefügt: Dem theoretischen Abszissenwert von -20 V wurde der Ordinatenwert zugeordnet, welcher dem Abszissenwert bei  $\Delta CV$  0 V und damit immer dem kleinsten Wert der normalisierten Intensität der Ionensignale der Produkte entspricht. Somit wurde neben dem, sich aus den Messpunkten ergebenden Plateau (endet bei  $\Delta CV$  80 V), ein zweites generiert, welches eine Sigmoidalfunktion definiert. Für diesen imputierten Wert wurde einheitlich ein Fehlerbalken von  $\pm 2,00\%$  festgelegt. Für Erläuterungen zu dieser Festlegung s. Abschnitt 3.3.2 (Unterabschnitt „Quantitative Analysen der Immunkomplexdissoziationen in Gasphase nach dem ITEM-TWO-Verfahren“). Passende Boltzmann-Kurven mit einem Regressionskoeffizienten  $R^2 \geq 0,98$  wurden akzeptiert (s. Abschnitt 3.3.2 Unterabschnitt „Quantitative Analysen der Immunkomplexdissoziationen in Gasphase nach dem ITEM-TWO-Verfahren“, Tab. 3). Die von Origin Pro 2016G ausgegebenen Parameter (A1, A2,  $x_0$ , dx) der angepassten Boltzmann-Kurven wurden für die Berechnung der Gleichungen der Tangente entlang der jeweiligen steilen, zwischen den beiden Plateaus liegenden Teile, verwendet<sup>(167)</sup>. Der Auszug aus den von Origin Pro 2016G berechneten Geradenpunkten der Tangente diente zur Berechnung der scheinbaren thermodynamischen und scheinbaren kinetischen Gasphasenkomplexeigenschaften<sup>(167)</sup>. Dabei angewandte Gleichungen der Thermodynamik und Kinetik sind in früheren Veröffentlichungen des Proteom-Zentrums Rostock zu diesem Thema zu finden<sup>(139, 167)</sup>.

Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden an das ProteomeXchange Consortium weitergeleitet und im Proteomics identifications database (PRIDE) partner repository mit den Datensatzkennungen PXD031150 und PXD035818 hinterlegt<sup>(178)</sup>. Für PRIDE wurden die

obligatorischen Identifikationsergebnisse jedes Hexapeptids erzielt. Für Details s. Abschnitt 6.1.5 (Unterabschnitt „Erstellen von Datenbank-Identifikationsergebnissen der Peptide für PRIDE“).

## **2.10 Kompetitives Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay**

Nach der Auswertung der ITEM-TWO-Experimente wurden mit den Hexapeptiden 00, 01, 04, 08, 09 und 10 sechs, sich hinsichtlich des erwarteten Bindungsverhaltens zum anti-HpTGEKP-Antikörper unterscheidende Vertreter der Hexapeptide ausgewählt (s. Tab. 2 sowie Abschnitte 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4). Für das kompetitive in-vitro Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay wurde ein modifiziertes Western-Blot-Verfahren unter Verwendung dieser sechs Hexapeptide wie in der Literatur<sup>(132)</sup> beschrieben angewandt, um die Schlussfolgerungen aus den ITEM-TWO-Experimenten zu validieren. Sofern einzelne experimentelle Schritte nicht anders dargestellt sind, wurde dabei analog wie unter Abschnitt 2.2 beschrieben, verfahren.

Um in separaten, 5 ml fassenden Reaktionsgefäßen (Artikelnummer: 0030119401, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ein Volumen von 5 µl zu generieren, wurde der erworbene primäre anti-HpTGEKP-Antikörper (gelöst in PBS, pH 7,4) mit jeweils einer Hexapeptid-Lösung vorinkubiert, in der wiederum eines der Peptide 00, 01, 04, 08, 09 und 10 1 : 60 in 200 mM Ammoniumacetat (pH 6,7) gelöst war. Ein Volumen von 5 µl 200 mM Ammoniumacetat-Puffer diente als Negativkontrolle und 5 µl anti-HpTGEKP-Antikörper (gelöst in PBS mit 0,09 % Natriumazid, pH 7,2) ohne Kontakt mit einem Peptid diente als Positivkontrolle. In alle acht wie beschrieben mit vorinkubierter anti-HpTGEKP-Antikörperlösung gefüllten 5 ml fassenden Reaktionsgefäße wurde nun jeweils 1 ml Intercept Blocking Puffer und 1 ml PBS-Puffer hinzugegeben. Diesen Lösungen wurde nun jeweils 2 µl Tween-20 hinzugefügt, sodass die entstehenden Lösungen ca. 0,1 % (v/v) Tween-20 enthielten. Anders als beim Inkubieren des anti-HpTGEKP-Antikörpers mit einem Peptid vor den ITEM-TWO-Experimenten wurde einerseits der experimentelle Schritt des Umpufferns des erworbenen anti-HpTGEKP-Antikörpers ausgelassen, andererseits betrug das molare Verhältnis von Antikörper zu Peptid ca. 1 : 20. Ein weiterer Unterschied zum Inkubieren vor den ITEM-TWO-Experimenten besteht in der verlängerten Inkubationszeit von mindestens 14 Stunden bei Raumtemperatur (vgl. Abschnitt 2.7). Wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben, wurde eine Analyse der SDS-PAGE mit Proteinextrakten aus C631-Zellen, die mit Okadasäure behandelt wurden, durchgeführt, und die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet. Dabei wurden in die außen liegenden Taschen des SDS-Gels 3 µl des Proteingrößenmarkers PageRuler Prestained Protein Ladder gefüllt.

Nachfolgend wurde die PVDF-Membran mit einem Skalpell in zehn Streifen, welche alle ca. 4 cm · 0,6 cm maßen, zurechtgeschnitten, sodass jeder Streifen die Proteine von einer SDS-Gel-Spur enthielt. Orientierend an den Banden des Proteingrößenmarkers wurden dabei unterhalb einer molekularen Masse von ca. 25 kDa etwa 1,2 cm vom unteren Rand der PVDF-Membran abgeschnitten und oberhalb einer molekularen Masse von ca. 200 kDa etwa 0,3 cm unterhalb des oberen Rands. Dabei wurde auf möglichst wenig Kontakt mit der PVDF-Membranoberfläche geachtet, um eventuelle Verunreinigungen zu vermeiden. Die Membranzuschnitte wurden nun auf die, wie beschrieben mit vorinkubierter anti-HpTGEKP-Antikörperlösung gefüllten 5 ml fassenden Reaktionsgefäße verteilt und darin horizontal fixiert auf dem Plattformschüttler für 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. So wurden ausreichende Benetzungen der Membranzuschnitte gewährleistet. Anschließend wurden die folgenden Waschschrte mit jeweils 5 ml Waschpuffer auf sechs erhöht, um alle überschüssigen Antikörper bzw. Immunkomplexe abzuspuhlen. Der Sekundärantikörper IRDye 800 CW wurde anschließend 1 : 20000 in der unter Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Lösung (Intercept Blocking Puffer / PBS-Puffer (50 : 50 v/v) plus 0,1 % (v/v) Tween-20) verdünnt, um Hintergrundsignale auf der PVDF-Membran noch weiter zu restringieren. In der Sekundärantikörper-haltigen Lösung wurden die PVDF-Membranzuschnitte vor Licht geschützt bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Nach erneut sechs Waschschrten mit jeweils 5 ml Waschpuffer und dem Spülen mit 10 ml PBS-Puffer erfolgte die fluoreszenzbasierte Detektion der dekorierten Antigene wie zuvor beschrieben. Die Bilder wurden als TIFF-Dateien gespeichert und oberhalb einer molekularen Masse von ca. 200 kDa und unterhalb einer molekularen Masse von ca. 25 kDa zurechtgeschnitten. Auf eine Ladungskontrolle mit dem anti- $\beta$ -Actin-Antikörper wurde hierbei verzichtet.

### 3. Ergebnisse

#### **3.1 Zellbiologische und genomische Voruntersuchen zur ZNF-Linkerphosphorylierung**

##### 3.1.1 Wirkung von Okadasäure auf ZNF-Linkerphosphorylierung

HAP1-Zellen (Zelllinien C631 und PBK-16) wuchsen in Kultur adhärent und lanzettlich (s. Abbildung 4 und 5). Die PBK-16-Zellen stammen als HAP1-Zellen von den C631-Zellen ab, allerdings ist hier die Kinase PBK-16 deaktiviert. Daher dienen die PBK-16-Zellen als Negativkontrolle. Die Zellkerne der HAP1-Zellen der Zelllinien C631 und PBK-16 sind im Lichtmikroskop gut sichtbar. Da im Folgenden die Zellkulturen mit Okadasäure (gelöst in Ethanol) versetzt werden mussten, wurde eingangs eine Betrachtung der Morphologie bzw. des Phänotyps vorgenommen. Für HAP1-Zellen der Zelllinien C631 und PBK-16, die mit in Ethanol gelöster Okadasäure sowie lediglich Ethanol versetzt waren, zeigte sich eine geringfügige, aber qualitativ erfassbare Änderung der Morphologie (s. Abbildung 4 und 5).

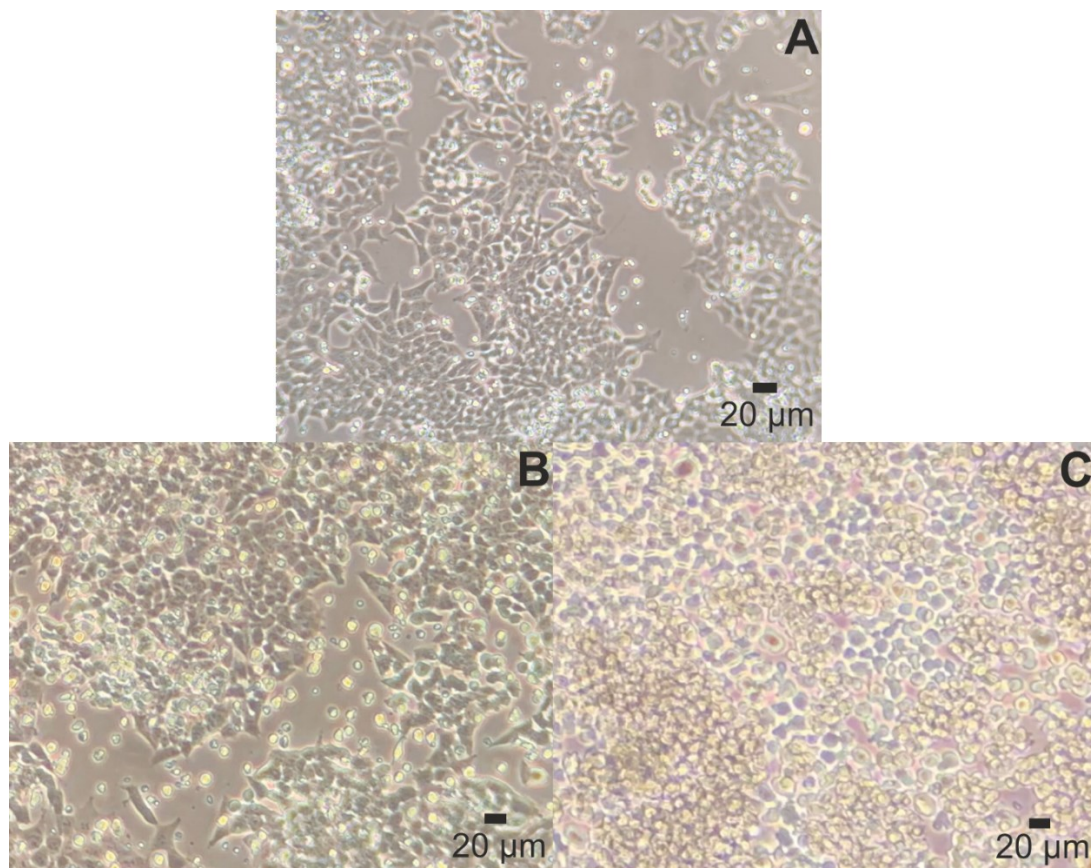


Abbildung 4: Fotografien von HAP1-Zellen der C631-Zelllinie unbehandelt (A), nach Exposition der Versuchszellkultur mit Ethanol (B) und mit in Ethanol gelöster Okadasäure (C)

Der Maßstab der in den Abbildungen 4 und 5 dargestellten Fotografien wurde anhand der durchschnittlichen Größe kugelig mitotischer Zellen in Metaphase ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ) und der durchschnittlichen Längendurchmesser der sichtbaren Zellkerne der C631-Zelllinie ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ) abgeschätzt.

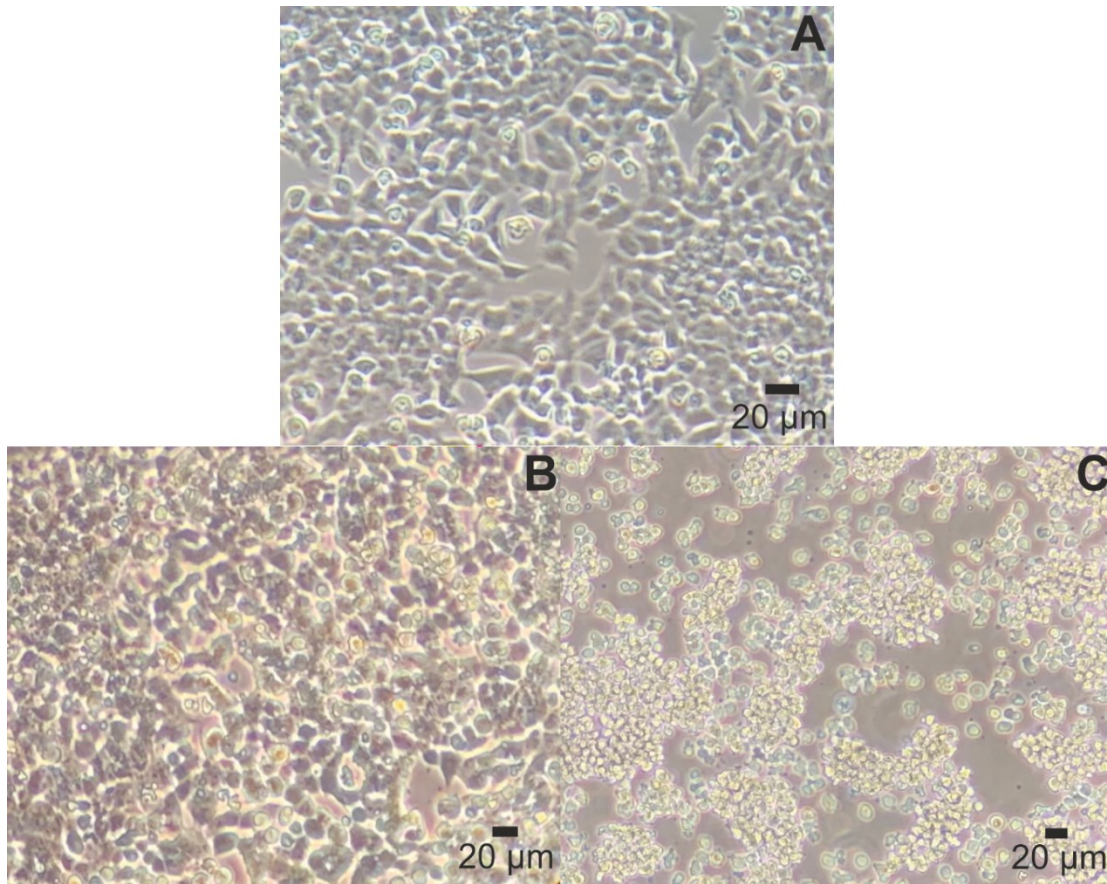


Abbildung 5: Fotografien von HAP1-Zellen der PBK-16-Zelllinie unbehandelt (A), nach Exposition der Versuchszellkultur mit Ethanol (B) und mit in Ethanol gelöster Okadasäure (C)

Der Maßstab der in den Abbildungen 4 und 5 dargestellten Fotografien wurde anhand der durchschnittlichen Größe kugeliger mitotischer Zellen in Metaphase ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ) und der durchschnittlichen Längendurchmesser der sichtbaren Zellkerne der C631-Zellen ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ) abgeschätzt.

Die morphologischen Betrachtungen der Versuchszellkulturen der Zelllinien PBK-16 und C631 veranschaulichen, dass die Exposition gegenüber zum Zellkulturmedium IMDM zugesetzten Ethanol zu keinem vermehrten Abrunden der Zellen führt (vgl. A mit B in den Abbildungen 4 und 5). Weiterhin konnte für Zellen beider Zelllinien visualisiert werden, dass im Vergleich zu mit Ethanol exponierten Zellkulturen die Behandlung mit zum Zellkulturmedium IMDM zugesetzter Okadasäure zur Akkumulation abgerundeter Zellen führt (vgl. A zu C sowie B zu C in den Abbildungen 4 und 5). Quantifizierungen hierzu lassen die Fotografien allerdings nicht zu.

Als Grund für die Akkumulation abgerundeter Zellen liegt die Vermutung nahe, dass der vergleichsweise größere Anteil abgerundeter Zellen in den Bildausschnitten C der Abbildungen 4 und 5 auf die Arretierung der Zellen in Mitose durch Okadasäure zurückzuführen ist. Diese lebenden, mitotischen Zellen können dann abgerundet visualisiert

werden (s. Abbildungen 4 und 5, jeweils C). Grundsätzlich kann jedoch eine gewisse Toxizität, beispielsweise der Okadasäure, nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass die Zugabe von sowohl Ethanol als auch von in Ethanol gelöster Okadasäure von den Zellen toleriert wird und die Aufarbeitung der so behandelten Zellkulturen zu auswertbaren Proteinextrakten führt.

#### 3.1.2 Auswahl der untersuchten ZNF-Linkersequenzen

Dem unter Abschnitt 2.3 beschriebenen Suchalgorithmus folgend, konnten für alle C2H2-ZNF-Linkersequenzen im humanen Referenzgenom „Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 13“ (GRCh38.p13) 7465 passende Datenbankeinträge ermittelt werden (bereits in Scherf et. al.<sup>(132)</sup> kurz dargelegt). Von diesen 7465 Datenbankeinträgen entfielen 2587 auf die zehn am häufigsten vorkommenden Aminosäuresequenzen der C2H2-ZNF-Linker-Hexapeptide. Diese zehn häufigsten Aminosäuresequenzen wurden in absteigender Reihenfolge nach der Gesamtanzahl ihres Auftretens unter den erwähnten 2587 Datenbankeinträgen für C2H2-ZNF-Linker-Hexapeptide geordnet, und entsprechend als Peptide 01 (bzw. 00) bis 10 nummeriert (s. Tab. 2). Diese Hexapeptide 00 bis 10 haben einen Histidinyrest an erster Position gemeinsam, unterscheiden sich aber durch die Aminosäurereste auf den nachfolgenden Positionen (bzw. durch die Abwesenheit der Phosphorylierung an zweiter Position bei Hexapeptid 00) (s. Tab. 2). Die Hexapeptide 00 bis 10 wurden ausgewählt, um unter den häufigsten vorkommenden C2H2-ZNF-Linkersequenzen zu untersuchen, ob sich die Rolle einzelner Aminosäurereste (bzw. die Abwesenheit der Phosphorylierung an zweiter Position bei Hexapeptid 00) innerhalb des Bindemotivs für die Ausprägung der Bindung des anti-HpTGEKP-Antikörpers präzisieren lässt. Die vielfältigen ZNF-Protein-Linker bilden aufgrund der Variabilität ihrer Aminosäurereste ein hervorragendes natürliches Testsystem für die Untersuchung der wichtigsten Aminosäurereste des zum anti-HpTGEKP-Antikörper passenden Epitops.

Tab. 2: Zählung untersuchter Hexapeptide nach unter 2.3 beschriebenem Suchalgorithmus sowie Atomanzahl, Massen (rechnerisch und experimentell) und Bindungsverhalten zum anti-HpTGEKP-Antikörper<sup>(114, 132)</sup>

Nummer Peptid	Aminosäuresequenz <sup>a)</sup>	Zählung (Frequenz) <sup>b)</sup>	Atomanzahl <sup>c)</sup>	[M+H] <sup>+</sup> rech. <sup>c, d)</sup>	m/z exp. <sup>e)</sup>	Bindungsverhalten <sup>f)</sup>
00	HTGEKP	1692 (0,227)	92	668,33	668,37	nicht-b.
01	HpTGEKP	1692 (0,227)	97	748,30	748,31	orthodox
02	HpTGERP	314 (0,042)	99	776,30	776,39	orthodox
03	HpSGEKP	217 (0,029)	94	734,28	734,31	unorthodox
04	HpTHTHT	65 (0,009)	101	813,30	813,29	unorthodox
05	HpTGKKP	58 (0,008)	102	747,35	747,43	orthodox
06	HpSGERP	56 (0,007)	96	762,29	762,34	orthodox
07	HpTGEKL	49 (0,006)	102	764,33	764,42	orthodox
08	HpTGEKS	48 (0,006)	94	738,27	738,35	unorthodox
09	HpTEEKP	45 (0,006)	106	820,32	820,39	orthodox
10	HpTREKP	43 (0,006)	113	847,37	847,45	orthodox
100	YTGEKP	n.a.	96	694,33	694,37	nicht-b.
101	YpTGEKP	n.a.	101	774,30	774,34	nicht-b.
102	pYTGEKP	n.a.	101	774,30	774,34	unorthodox
103	pYpTGEKP	n.a.	106	854,27	854,31	nicht-b.
			$\bar{x} \approx 100$			

a) Schreibweise für Aminosäuren im Einbuchstabencode; kleines „p“ gibt Phosphorylierung der nachfolgenden Aminosäure an.

b) Gesamtzahl der auftretenden Sequenzen nach unter Abschnitt 2.3 beschriebenem Suchalgorithmus. Die Gesamtzahl der C2H2-ZNF-Linker-Sequenzen, die aus der Datenbank des humanen Referenzgenoms „Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 13“ (GRCh38.p13) extrahiert wurden, beträgt 7465. In diese Die Anzahl der Datenbankeinträge für C2H2-ZNF-Linkersequenzen im humanen Referenzgenom beträgt bei den Hexapeptiden HTGEKP (Hexapeptid 00) und HpTGEKP (Hexapeptid 01) jeweils 1692 und geht in die Gesamtanzahl der 7465 ermittelten Datenbankeinträge für alle C2H2-ZNF-Linkersequenzen nur einmal ein, da posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierungen, im unter Abschnitt 2.3 beschriebenen Suchalgorithmus keine Berücksichtigung fanden.

c) errechnet mit GPMW Version 10.30.

d) rech.: rechnerisch; monoisotopische Masse.

e) exp.: experimentell; aus den Massenspektren zur Charakterisierung der Ausgangsstoffe (s. Abbildungen 8 sowie 28-41) bzw. nach Kollisions-induzierter Dissoziation (Peptide 101 und 102, s. Abbildung 42).

f) nicht-b.: nicht-bindend

Die Hexapeptide 100 bis 103 haben einen Austausch des Histidylrestes gegen einen Tyrosinylrest (H-zu-Y-Austausch) gemeinsam. Da die im Endometriumkarzinom signifikant angereicherte Punktmutation des Gens für das ZNF-Protein 331 zu einem solchen

H-zu-Y-Austausch (H11Y-Austausch) führt<sup>(39)</sup>, wurden die Hexapeptide 100 bis 103 zur weiteren Untersuchung mittels ITEM-TWO in der Gasphase (s. Abschnitt 3.4) ausgewählt. Der Einfluss des H-zu-Y-Austauschs auf das Bindemotiv des anti-HpTGEKP-Antikörpers soll dabei in Anwesenheit (YpTGEKP, Hexapeptid 101) bzw. Abwesenheit eines angrenzenden phosphorylierten Threoninylrestes (YTGEKP, Hexapeptid 101) untersucht werden. Ebenso soll analysiert werden, ob und inwieweit der Austausch eines Histidinylrestes (H) durch einen phosphorylierten Threoninylrest (pT) in Anwesenheit (pYpTGEKP, Hexapeptid 103) bzw. Abwesenheit eines angrenzenden phosphorylierten Threoninylrestes (pYTGEKP, Hexapeptid 102) bezüglich der Erkennung des anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotivs toleriert wird (s. Abschnitt 3.4).

## 3.2 Charakterisierung der Ausgangsmaterialien

### 3.2.1 Bestimmung der Atomanzahlen des anti-HpTGEKP-Antikörpers und aller Hexapeptide

Für die folgenden Berechnungen zur quantitativen Analyse der Dissoziation von Immunkomplexen in Gasphase (s. Abschnitt 3.3.2, Unterabschnitt „Quantitative Analysen der Immunkomplexdissoziationen in Gasphase nach dem ITEM-TWO-Verfahren“) wird die Atomanzahl ( $N_{at}$ ) des anti-HpTGEKP-Antikörpers benötigt.

Da jedoch die Aminosäuresequenz und damit auch die benötigte Atomanzahl ( $N_{at}$ ) des anti-HpTGEKP-Antikörpers zum Zeitpunkt der Auswertung (Stand 12. März 2023) unbekannt ist, wurde sich der Atomanzahl mithilfe der des vollständig sequenzierten Antikörpers Rituximab ( $N_{at}$ : 20 009), der eine ähnliche molekularer Masse hat, angenähert<sup>(132)</sup>. Die in der DrugBank Online (University of Alberta, Kanada, Zugriff: 13. November 2021, 08:00 Uhr)<sup>(179)</sup> für Rituximab hinterlegte chemische Formel  $C_{6416}H_{9874}N_{1688}O_{1987}S_{44}$  gibt die Atomanzahl von Rituximab ( $N_{at}$ : 20 009) an. Mit dem errechneten arithmetischen Mittel der Atomanzahl aller 15 untersuchten Hexapeptide (ca. 100, vgl. Tab. 2) wurde die, für die weitere Berechnung verwendete Atomanzahl ( $N_{at}$ ) jedes Immunkomplexes mit einem mittleren molaren Antikörper-Peptid-Verhältnis von ca. 1 : 1 auf 20 109 festgelegt.

### 3.2.2 Charakterisierung des anti-HpTGEKP-Antikörpers

#### Immunanalytische Charakterisierung

Um eine erste Übersicht über das Bindungsverhalten des monoklonalen anti-HpTGEK-Antikörpers zu erhalten, wurde eine Western Blot Analyse mit Proteinextrakten aus kultivierten Zellen der Zelllinien C631<sup>(132)</sup> und PBK-16 durchgeführt (s. Abbildung 6;

Reproduktion der Ergebnisse s. Abbildung 27). Teilergebnisse sind bereits in Scherf et al. <sup>(132)</sup> kurz dargelegt wurden.

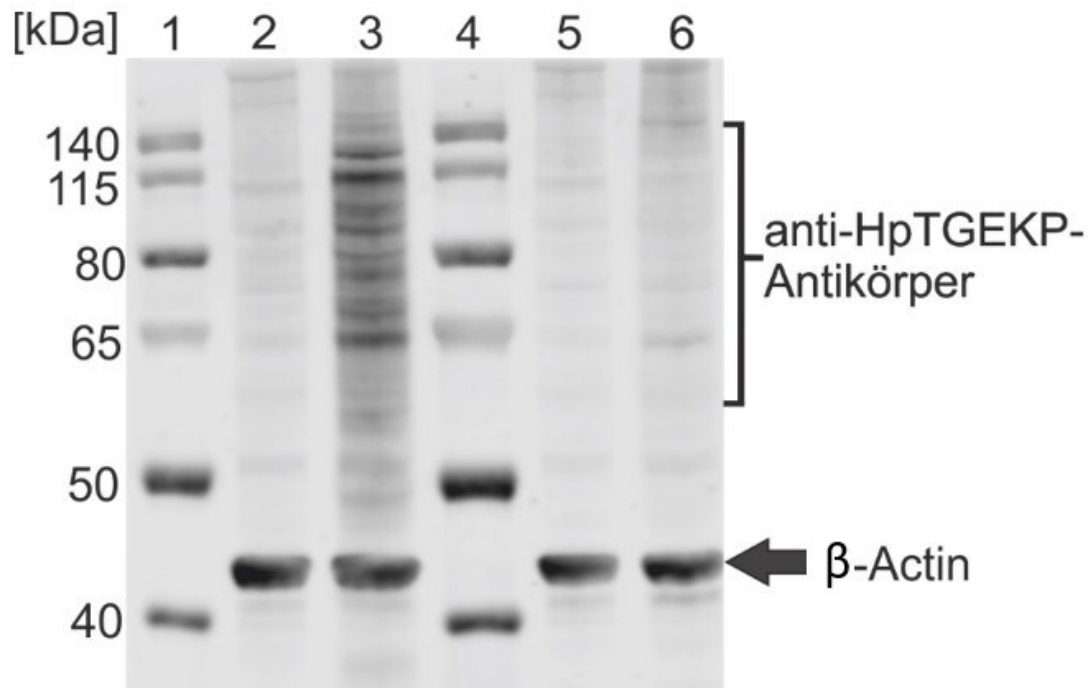


Abbildung 6: Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus C631-Zellen und PBK-16-Zellen

Die Proteinextrakte aus den C631-Zellen und PBK-16-Zellen lieferten die Antigene. Spuren 1 und 4: Proteingrößenmarker. Spur 2: Proteinextrakte aus C631-Zellen, die nur mit Ethanol ( $C_2H_5OH$ ) behandelt wurden. Spur 3: Proteinextrakte aus C631-Zellen, die mit Okadasäure ( $C_{44}H_{68}O_{13}$ ) als Phosphataseinhibitor behandelt wurden. Spur 5: Proteinextrakte aus PBK-16-Zellen, die nur mit Ethanol ( $C_2H_5OH$ ) behandelt wurden. Spur 6: Proteinextrakte aus PBK-16-Zellen, die mit Okadasäure ( $C_{44}H_{68}O_{13}$ ) als Phosphataseinhibitor behandelt wurden. Die Proteine wurden anschließend mit den primären Antikörpern anti-HpTGEKP-Antikörper und anti- $\beta$ -Actin-Antikörper markiert. IRDye 800 CW anti-Maus-Antikörper aus der Ziege wurde als sekundärer Antikörper verwendet. Die Bilder des Western-Blots wurden oberhalb einer molekularen Masse von ca. 200 kDa und unterhalb einer molekularen Masse von ca. 35 kDa zurechtgeschnitten <sup>(132)</sup>.

Die Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus den HAP1-Zellkulturen der C631-Zellen (Wildtyp) konnte bestätigen, dass der anti-HpTGEKP-Antikörper phosphorylierte ZNF-Proteine aus eukaryotischen Zellextrakten markiert, die bei der SDS-PAGE im apparenten Massenbereich zwischen ca. 60 kDa und 140 kDa aufgetrennt wurden (s. Abbildungen 6 und 27, jeweils Spur 3). Okadasäure ( $C_{44}H_{68}O_{13}$ ), die als Phosphataseinhibitor fungiert, wurde den Zellkulturen in Verdünnung mit einer ethanolischen Lösung zusätzlich zum Zellkulturmedium IMDM zugesetzt. Damit konnte sowohl während der Zelllyse als auch bei der Herstellung der Proteinextrakte der in-vivo-Phosphorylierungsstatus der ZNF-Proteine erhalten und nachgewiesen werden. In Abwesenheit des Phosphataseinhibitors Okadasäure im Zellkulturmedium IMDM bzw. in alleiniger

Anwesenheit von Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) im Zellkulturmedium waren die Proteinbanden nur schwach gefärbt. Dies deutet darauf hin, dass nicht-inhibierte Phosphatasen die ZNF-Proteine effizient dephosphoryliert hatten (s. Abbildungen 6 und 27, jeweils Spur 2). An dieser Stelle ist anzuführen, dass bei Bindung eines Antigens durch seinen Antikörper in einem Western Blot, der Antikörper wahrscheinlich an ein Antigen-Epitop mit denaturierter Proteinstruktur bindet. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass selbiger Antikörper ein Peptid mit der Aminosäuresequenz des entsprechenden Antigen-Epitops auf vergleichbare Weise bindet.

Die Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus den PBK-16-Zellen ergab sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Okadasäure keine bzw. nur eine marginale Markierung der ZNF-Proteine aus eukaryotischen Zellextrakten durch den anti-HpTGEKP-Antikörper (s. Abbildungen 6 und 27, jeweils Spuren 5 und 6). Vergleicht man dies mit den oben dargestellten Western-Blot-Ergebnissen, die mit Proteinextrakten der C631-Zellen erzielt wurden, fällt auf, dass anscheinend der in-vivo-Phosphorylierungsstatus der ZNF-Proteine in den PBK-16-Zellen nicht mehr erhalten ist. Anscheinend ist die in den PBK-16-Zellen deaktivierte Kinase PBK-16 somit maßgeblich direkt oder indirekt am in-vivo-Phosphorylierungsstatus der ZNF-Proteine beteiligt.

Für jede einzelne Spur in den Western Blots wurde die Beladung mit Proteinextrakten überprüft. Der monoklonale anti-β-Actin-Antikörper markiert β-Actin, das von humanen Zellen exprimiert wird<sup>(180)</sup>. Da es sich bei C631-Zellen und PBK-16-Zellen um humane Zelllinien handelt, konnte der anti-β-Actin-Antikörper, wie im Western Blot erwartet, β-Actin als Proteinbande markieren (s. Abbildungen 6 und 27, jeweils Spuren 2, 3, 5 und 6).

Da eine Quantifizierung des Bindungsverhaltens des anti-HpTGEK-Antikörpers aus Western-Blot-Analysen nicht abgeleitet werden kann, wurden massenspektrometrische ITEM-TWO-Analysen angeschlossen (s. Abschnitte 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4, 3.4.1 und 3.4.2).

#### Massenspektrometrische Charakterisierung

Vor der Durchführung eines ITEM-TWO-Experiments ist es ratsam, die dafür notwendigen Ausgangsmaterialien massenspektrometrisch zu charakterisieren. Der in 200 mM Ammoniumacetatlösungen gelöste anti-HpTGEKP-Antikörper und alle 15 Hexapeptide (s. Tab. 2), wurden einzeln nacheinander mittels nano-ESI-MS auf ihre Reinheit überprüft<sup>(114, 132)</sup>. Teilergebnisse sind bereits in Scherf et al.<sup>(114, 132)</sup> dargelegt wurden.

Die nano-ESI-Massenspektren des anti-HpTGEKP-Antikörpers zeigen eine symmetrische Verteilung der Ladungszustände von mehrfach protonierten Ionensignalen, welche die Form einer Gauß-Verteilung aufweisen (s. Abbildung 7).

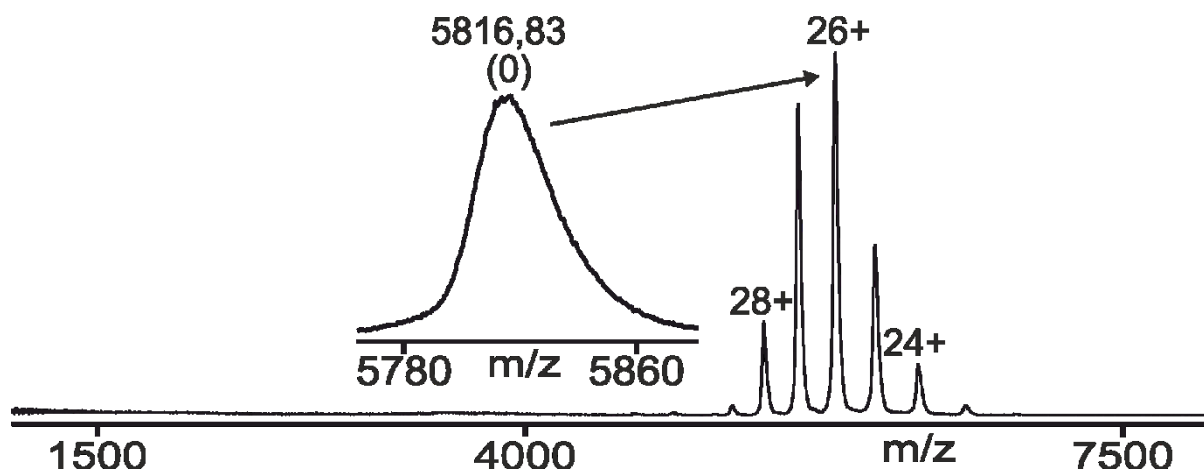


Abbildung 7: Nano-ESI-Massenspektrum des anti-HpTGEKP-Antikörpers  
Die Ladungszustände für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Für  $m/z$ -Werte s. Tab. 7. Der Einschub zeigt eine Vergrößerung des 26-fach geladenen Antikörperionensignals. Die Antikörperkonzentration war ca.  $1,32 \mu\text{M}$ . Das Volumen der Probe betrug  $3 \mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war  $200 \text{ mM}$  Ammoniumacetat,  $\text{pH } 6,7$  <sup>(132)</sup>.

Alle Ionensignale wurden dem Antikörper zugeordnet. Dies zeigt das Vorliegen einer kontaminationsfreien und homogenen Antikörperpräparation. Signale vom 23-fach geladenen Ion bis zum 29-fach geladenen Ion des anti-HpTGEKP-Antikörpers wurden detektiert (s. Abbildung 7). Da die Signale der 23-fach und 29-fach geladenen Ionen eine vergleichsweise geringere Intensität als die 24-fach bis 28-fach geladenen Ionensignale aufwiesen, wurden die Ionensignale der 23-fach und 29-fach geladenen Ionen für die Berechnung der molekularen Masse des anti-HpTGEKP-Antikörpers (für Details s. Abschnitt 6.1.5) nicht beachtet. Demzufolge wurden aus vier Einzelmessungen als durchschnittliche molekulare Masse des anti-HpTGEKP-Antikörpers  $151\,167 (\pm 62)$  Da errechnet (s. Tab. 7).

Da die Glykosylierung eines Antikörpers in allen Schritten der Aufarbeitung des gelösten Antikörpers und unter allen massenspektrometrischen Messbedingungen als stabil gilt, wurde ein möglicherweise bestehender Einfluss der Glykosylierung auf die Epitop-Bindung als vernachlässigbar betrachtet.

### 3.2.3 Massenspektrometrische Charakterisierung der ZNF-Linkerpeptide

Die am häufigsten vorkommende, phosphorylierte Linker-Aminosäuresequenz HpTGEKP (Hexapeptid 01) von ZNF-Proteinen ist diejenige, gegen die der monoklonale anti-HpTGEKP-Antikörper aus der Maus gerichtet ist. Die Aminosäuresequenz des

nicht-phosphorylierten Hexapeptids HTGEKP (Hexapeptid 00) diente in unseren Untersuchungen als Negativkontrolle (s. Tab. 2).

Von allen 15 chemisch synthetisierten Hexapeptiden wurden mittels nano-ESI-Massenspektrometrie Massenspektren aufgenommen (s. Abbildungen 8 sowie 28 - 41). Teilergebnisse sind bereits in Scherf et al. <sup>(114, 132)</sup> dargelegt wurden.

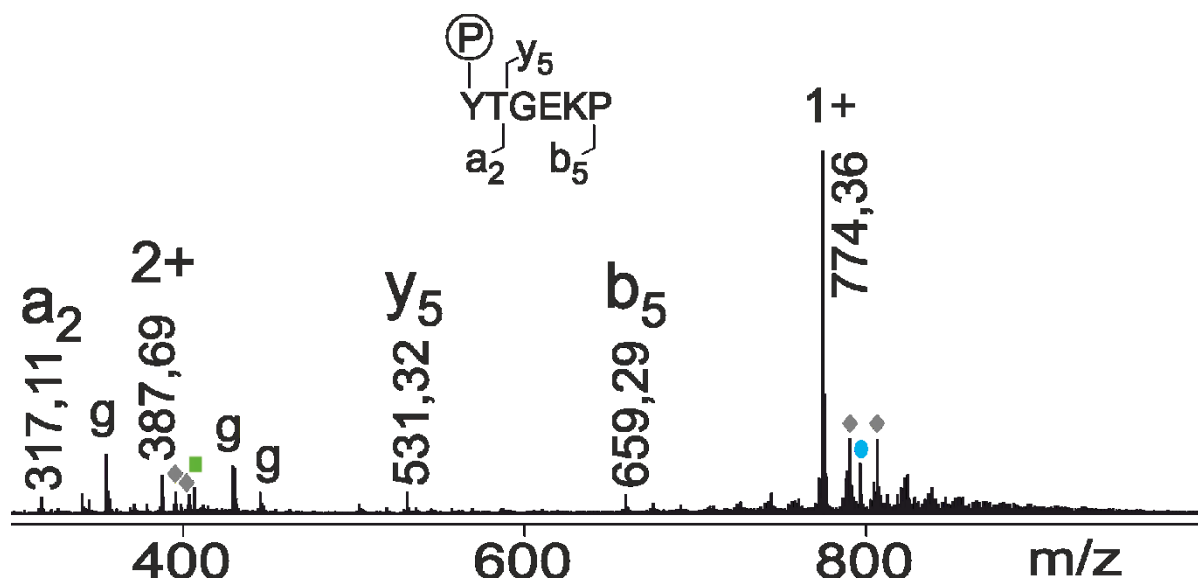


Abbildung 8: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 102 (pYTGEKP) Ladungszustände und  $m/z$ -Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $H_3PO_4$  und die Hintergrundionensignale (*ground signals* g bei  $m/z$  355,10,  $m/z$  429,10 und  $m/z$  445,15) sind angegeben. Kaliumaddukte (grüne Quadrate), Natriumaddukte (hellblaue Ellipse) und gemischte Alkalisalzdaddukte (orangefarbene Dreiecke) sind gekennzeichnet. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,07 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

Die in 200 mM Ammoniumacetat gelösten Peptide zeigten Ionensignale von einfach protonierten Hexapeptiden  $[M+H]^+$  (in allen Massenspektren als 1+ abgebildet) und zweifach protonierten Hexapeptiden  $[M+2H]^{2+}$  (in allen Massenspektren als 2+ abgebildet) mit hoher Reinheit (s. Abbildungen 8 sowie 28 - 41). Die aus den nano-ESI-Massenspektren bei entsprechendem  $m/z$ -Wert abgelesenen monoisotopischen Massen ( $m/z_{exp.}$ ) der einfach protonierten Ionensignale wurden mit den aus der Aminosäuresequenz berechneten monoisotopischen Massen der Hexapeptide verglichen, wobei kaum Abweichungen festgestellt werden konnten (s. Tab. 2). Lediglich das Peptid 00 zeigt keine hohe Reinheit, denn das einfach geladene Hintergrundionensignal bei  $m/z$  371,12 zeigt die höchste Intensität im nano-ESI-Massenspektrum (s. Abbildung 28). Die Massenspektren aller Peptidionen zeigen in sehr geringen Mengen vorliegende Alkalisalzdaddukte ( $Na^+$ ,  $K^+$  und gemischte Alkalisalzdaddukte  $-2H^+ + Na^+ + K^+$ ) und teilweise auch Oxidationsprodukte ( $O^2$ ; s. Abbildungen 8, 29, 39 und 41) sowohl des einfach protonierten als auch des zweifach

protonierten Peptidionensignals (s. Abbildungen 8 sowie 28 - 41). Die Massenspektrometrie aller untersuchten Hexapeptide bestätigte deren korrekte Zusammensetzungen und Aminosäuresequenzen durch entsprechende Fragmentationen mit schwachen Intensitäten, die in zehn der 15 aufgenommenen Massenspektren gefunden wurden (s. Abbildungen 8, 29 - 34, 37 und 41). Die Fragmentationen können unter den gegebenen Messbedingungen als ein Zeichen leichter Peptidfragmentierung interpretiert werden, was für Phosphopeptide charakteristisch ist.

Neutralverlust von Phosphorsäure, wie z. B. in den Massenspektren der Hexapeptide 01, 02, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 101 und 103 gekennzeichnet (s. Abbildungen 29, 30, 32 - 38, 40 und 41), ist typisch für die Ionen der Phospho-Hexapeptide. Es zeigte sich dabei eine Massendifferenz von 98 Thomson ausgehend von der Masse des einfach protonierten Peptidions (s. Abbildungen 30, 34 - 36, 38 und 40) bzw. von 49 Thomson ausgehend von der Masse des zweifach protonierten Peptidions (s. Abbildungen 29, 30, 32 - 38 und 41). Dieser Neutralverlust von Phosphorsäure wurde nur in den Massenspektren der Phospho-Hexapeptide 03 und 102 (s. Abbildungen 8 und 31) sowie der nicht-phosphorylierten Peptide 00 und 100 (s. Abbildungen 28 und 39) nicht gefunden. Während bei einem Peptid mit phosphoryliertem Serinylrest (pS) ein Dehydroalaninylrest entsteht (vgl. Peptid 06; Abbildung 34) führt der Neutralverlust von Phosphorsäure bei einem Peptid mit phosphoryliertem Threoninylrest (pT) zur Entstehung eines Dehydrobuttersäurerestes<sup>(181, 182)</sup> (vgl. z. B. Peptide 01, 02, 04, 05, 07 - 10, 101 und 103; Abbildungen 29, 30, 32, 33, 35 - 38, 40 und 41).

Da die Phospho-Hexapeptide 101 (YpTGEKP) und 102 (pYTGEKP) als Konstitutionsisomere gleiche monoisotopische molaren Massen aufweisen, ist eine Differenzierung anhand der Molekülmassenbestimmung nicht möglich. Daher wurden die Peptidionen der Phospho-Hexapeptide 101 (YpTGEKP) und 102 (pYTGEKP) mittels Tandemmassenspektrometrie fragmentiert und analysiert (s. Abschnitt 1.3.2). Anhand gebildeter Fragmentationen, die in den entsprechenden nano-ESI-Massenspektren mittels Tandemmassenspektrometrie beobachtet wurden, konnten die Phospho-Hexapeptide 101 (YpTGEKP) und 102 (pYTGEKP) differenziert werden. Konkret erfolgte dies erstens durch die unterschiedlichen Massen des beobachteten Peptidfragments  $a_1$  (s. Abbildung 42). Zweitens gelang die Differenzierung der Phospho-Hexapeptide 101 (YpTGEKP) und 102 (pYTGEKP) auf nachfolgend beschriebene Weise. Beim Phospho-Hexapeptid 101 (YpTGEKP) konnte aufgrund der Phosphorylierung des Threoninylrestes eine  $\beta$ -Eliminierung und Neutralverlust von Phosphorsäure des einfach geladenen Peptidions (Verlust von 98 Da) (s. Abbildung 42 A, eingeschobene Vergrößerung, rot markiert und roter Pfeil) beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte das einfach geladene Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP) einen Verlust von 97 Da, der auf die Entfernung eines Dihydrogenphosphations  $H_2PO_4^-$  eines phosphorylierten Tyrosinylrestes

zurückzuführen ist (s. Abbildung 42 B, eingeschobene Vergrößerung, rot markiert und roter Pfeil).

Alle dargestellten Ergebnisse konnten in wiederholten massenspektrometrischen Messungen bestätigt werden. Von Abbildungen dieser Wiederholungsexperimente zur Bestätigung der Ergebnisse wird abgesehen.

Da die Massenspektren aller Ausgangsmaterialien gut interpretiert werden konnten, wurden sowohl die anti-HpTGEKP-Antikörper-Lösung als auch die jeweiligen Hexapeptid-Lösungen mit 200 mM Ammoniumacetat als Lösungsmittel als geeignet für die sich anschließenden ITEM-TWO-Analysen erachtet.

## **3.3 Analyse des anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotivs mittels ITEM-TWO**

### **3.3.1 Erste grundlegende Ergebnisse des ITEM-TWO-Verfahrens**

Teile der nachfolgenden Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse des Bindungsverhaltens des anti-HpTGEKP-Antikörpers mittels ITEM-TWO (s. Abschnitte 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4, 3.4.1, 3.4.2) sind bereits publiziert wurden <sup>(114, 132)</sup>.

Das Vorgehen einer ITEM-TWO-Analyse wird exemplarisch an Gemischen aus anti-HpTGEKP-Antikörper-Arbeitslösung und Hexapeptid 01-Arbeitslösung (d. h. mit dem Peptid mit der Aminosäuresequenz HpTGEKP, gegen die der Antikörper hergestellt wurde) sowie mit Hexapeptid 02 (HpTGERP)-Arbeitslösung gezeigt. Dabei wird ein für alle nachfolgenden ITEM-TWO-Analysen optimales molares Verhältnis von Antikörper zu Peptid in experimentellen Versuchsreihen ermittelt.

Die Gemische aus im Überschuss zugegebenen Peptiden, freien Antikörpern und Immunkomplexen wurden per Elektrospray desolvatisiert und ionisiert. In den aufgenommenen Massenspektren wurden Signale aller Ionen nach deren Detektion und Ionensortierung aufgezeichnet. In den Massenspektren konnten Ionensignale der einfach und zweifach protonierten Peptidionen und des mehrfach protonierten anti-HpTGEKP-Antikörpers nachgewiesen werden. Sofern ein Immunkomplex gebildet wurde, konnten zusätzlich Signale der mehrfach protonierten Immunkomplexionen aufgezeichnet werden. Dies wird am Gemisch aus anti-HpTGEKP-Antikörper mit Hexapeptid 02 (HpTGERP) illustriert (s. Abbildung 9 A).

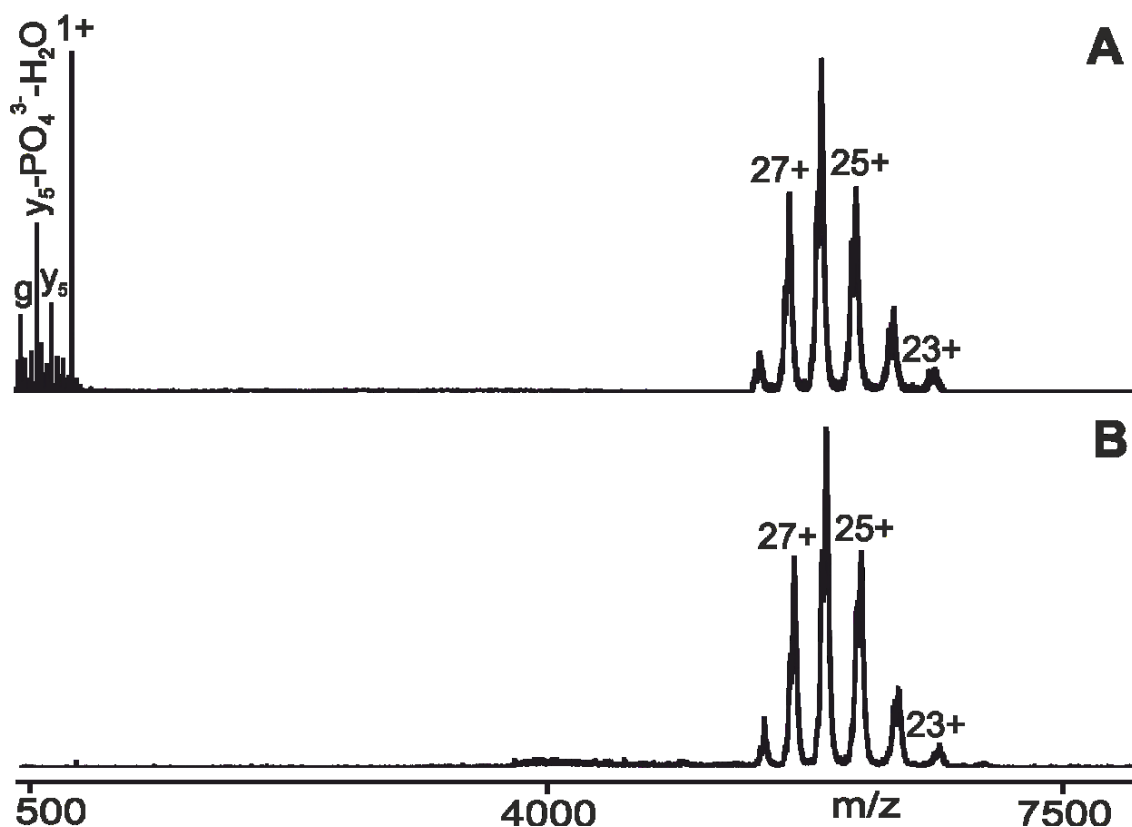


Abbildung 9: Nano-ESI-Massenspektren des Gemischs aus Phospho-Hexapeptid 02 (HpTGERP) und anti-HpTGEKP-Antikörper (nicht-blockierte vs. blockierte Ionentransmissionen niedriger Massen)

Dargestellt ist das Gemisch aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 02 im molaren Verhältnis 1 : 3. Während die Antikörperkonzentration  $1\ \mu\text{M}$  betrug, war die Peptidkonzentration  $3\ \mu\text{M}$ . (A) Die Transmission von Ionen niedriger Massen ist nicht blockiert. Von  $m/z$  5400 bis  $m/z$  6700 wurde der Vergrößerungsfaktor 8,9 angewandt. (B) Die Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ) ist blockiert. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Die Ionensignale des einfach geladenen Hexapeptids 02, der Fragment-Ionen ( $y_5$  bei  $m/z$  639,29;  $y_5\text{-PO}_4^{3-}\text{-H}_2\text{O}$  bei  $m/z$  541,31) und der Hintergrundionensignale (*ground signals*  $g$  bei  $m/z$  429,12) sind auf der linken Seite markiert. Das Probenvolumen betrug  $3\ \mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war  $200\ \text{mM}$  Ammoniumacetat,  $\text{pH}$  6,7<sup>(132)</sup>.

Die anschließend durchgeführte Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse durch Einschalten der Quadrupol-Filterfunktion des Massenspektrometers verhinderte die Aufzeichnung von Ionensignalen auf den niedrigen Massenseiten ( $m/z$  500 -  $m/z$  3900). Mehrfach geladene Ionensignale auf den hohen Massenseiten ( $m/z$  3900 -  $m/z$  8000) werden noch aufgezeichnet (vgl. Abbildung 9 B mit A).

Bei einer gleichzeitig vorliegenden Spannungsdifferenz in der Kollisionszelle von  $0\ \text{V}$  zeigte das Gemisch aus Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper ebenfalls die erwartete Mischung aus mehrfach geladenen Antikörper- und Immunkomplexionen (s. Abbildungen 10 und 43).

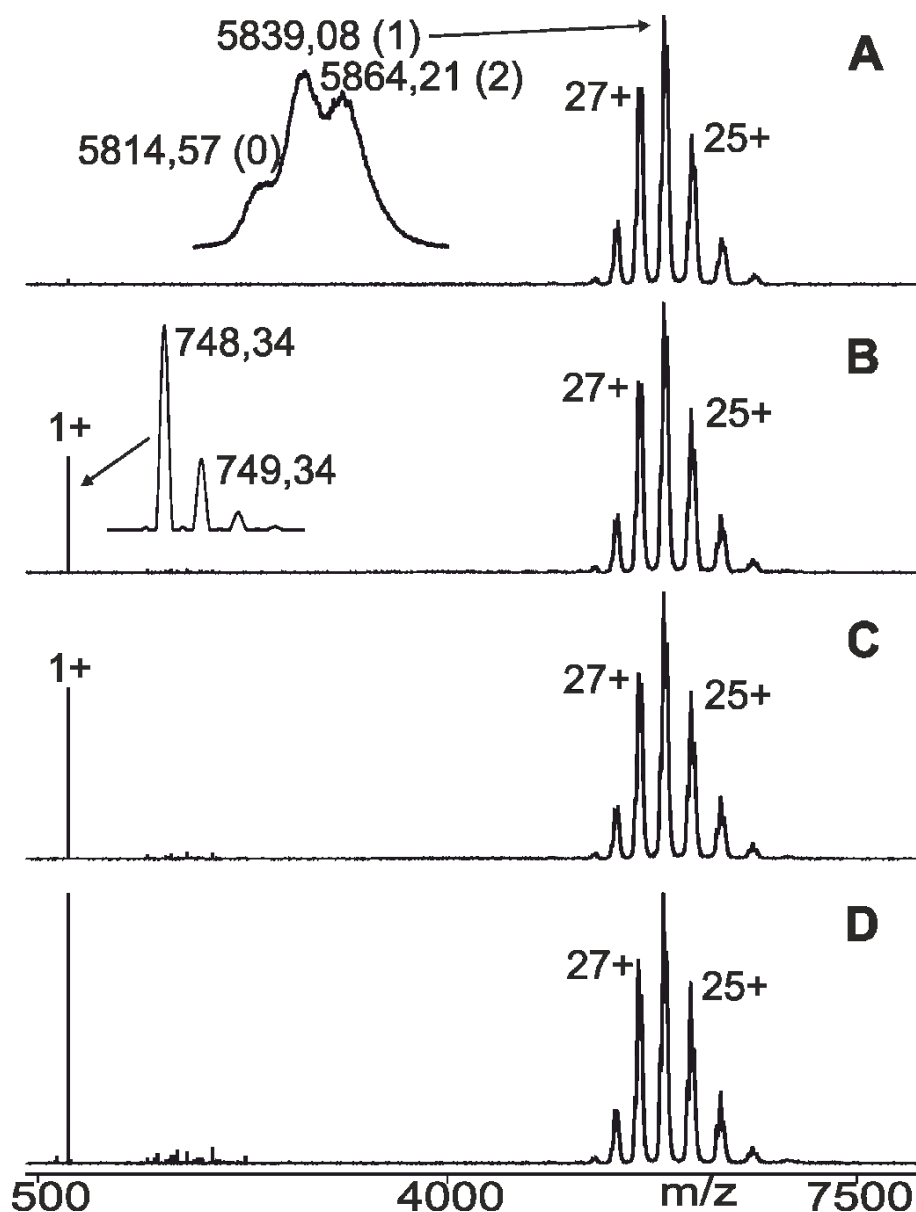


Abbildung 10: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP). Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die erste Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V; (B) 30 V; (C) 40 V; (D) 70 V, von  $m/z$  5190 bis  $m/z$  7000 wurde der Vergrößerungsfaktor 1,3 angewandt. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (A) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 01 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

Verhältnisse von Peptid zu Antikörper von 1:1 und 2:1 werden durch die Satellitenionensignale der mehrfach protonierten Antikörperionen auf den hohen Massenseiten vorgefunden (s. Abbildung 10 A). Daraus ergibt sich, dass die Immunkomplexionen eine Bindung von sowohl einem als auch von zwei Epitopeptiden aufzeigen. Die in der Lösung befindlichen Peptide wurden folglich als Teil des Immunkomplexes durch den Quadrupol-Massenfilter transportiert. Währenddessen war die Transmission von Ionen geringer Massen ( $m/z < 3900$ ), also die Ionentransmission der nicht-komplexierten Peptide, blockiert.

Bei anschließender Erhöhung der Spannungsdifferenz in der Kollisionszelle bzw. Erhöhung der Kollisionsenergie in den Schritten 0 V, 2 V, 10 V, 20 V, 30 V, 40 V, 50 V, 60 V, 70 V, 80 V, 90 V, 100 V, 110 V, 120 V, 145 V, 165 V, 180 V und 200 V konnte im Gemisch aus anti-HpTGEKP-Antikörper mit Hexapeptid 01 bei erhöhten Kollisionsenergien im niedrigen Massenbereich Ionensignale des Hexapeptids 01 gezeigt werden (s. Abbildung 10 B-D). Diese Ionensignale sind auf eine Dissoziation der Immunkomplexionen bei hohen Spannungsdifferenzen in der Kollisionszelle zurückzuführen. Die meist einfach geladenen Ionensignale der zuvor gebundenen Peptide sind mit Isotopenauflösung bei niedrigen  $m/z$ -Werten im Massenspektrum zu finden (s. z. B. Abbildung 10 B). Da die Transmission von überschüssigen ungebundenen Peptid-Ionen unabhängig von den angelegten Spannungsdifferenzen in der Kollisionszelle durch die Quadrupole-Filterfunktion blockiert blieb, bewies das Auftreten dieser einfach protonierten Peptidionensignale bei hohen Spannungsdifferenzen in der Kollisionszelle die Bindung in Lösung und Freisetzung des spezifisch gebundenen Phospho-Hexapeptids HpTGEKP (01) aus dem Immunkomplex in der Gasphase (s. Abbildungen 10 und 43, jeweils B bis D).

Der Nachweis der Peptidionensignale unter ITEM-TWO-Messbedingungen unterstreicht neben den erwähnten Satellitenionensignalen der mehrfach protonierten Antikörperionensignale auf den hohen Massenseiten eine Dissoziation des Hexapeptids 01 aus einem gebildeten Immunkomplex mit dem anti-HpTGEKP-Antikörper. Dies zeigte, dass der anti-HpTGEKP-Antikörper funktionell intakt war und sein entsprechendes Antigen (Hexapeptid 01) detektieren konnte. Dieses Ergebnis war wiederholt am deutlichsten bei Gemischen aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Hexapeptid 01 (Referenzimmunkomplex) in molaren Verhältnissen von 1:3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M) (s. Abbildungen 10 und 43). Dementsprechend wurden die Arbeitslösungen aller Hexapeptide nacheinander mit den anti-HpTGEKP-Antikörper-Arbeitslösungen in molaren Verhältnissen von 1:3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M) gemischt, um die weiteren ITEM-TWO-Analysen durchzuführen.

Die bei allen Peptid-Antikörper-Gemischen durchgeführte Erhöhung der Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle auf bis zu 200 V, zeigte ab ca. 70 V Ionensignale von anti-HpTGEKP-Antikörperfragmenten im mittleren Massenbereich ( $m/z$  2000 bis  $m/z$  4000) (s. Abbildung 11 B bis D). Darüber hinaus traten bei hohen Kollisionsenergien von 90 V und mehr außerdem auch Signale von Peptidfragmentationen auf, die hauptsächlich auf den Neutralverlust von Phosphorsäure des einfach geladenen Peptidions zurückzuführen waren (s. Abbildung 11 D bei  $m/z$  650,36).

Um zu zeigen, dass nach dem Messpunkt  $\Delta CV$  200 V der sich in Lösung gebildete Immunkomplex noch intakt ist, folgte erneut eine Messung bei  $\Delta CV$  2 V, an dem gezeigt wurde, dass der Immunkomplex weiterhin intakt nachweisbar ist. Anschließend wurde der Quadrupol-Filter des Massenspektrometers erneut auf volle Ionentransmission eingestellt, um zu zeigen, dass das Hexapeptid sich nach wie vor in Lösung befand und in der Gasphase als Peptidionensignal nachweisen lässt. Neben Hintergrundionensignalen konnten dabei auch Ionensignale von Fragmentationen (z. B.  $y_5$ -Fragmentationen) beobachtet werden (s. Abbildung 12 D).

Die Hexapeptide konnten bezüglich ihres Bindungsverhaltens zum anti-HpTGEKP-Antikörper mittels ITEM-TWO-Untersuchungen in drei Gruppen eingeteilt werden. Für diese Einteilung wurden, wie in den nachfolgenden Abschnitten (s. Abschnitte 3.3.2, 3.3.3 und 3.3.4) dargestellt, zu jeder Einzelmessung die Abbildungen, welche eine Spannungszunahme in der Kollisionszelle in vier Stufen zeigen, vergleichend beurteilt.

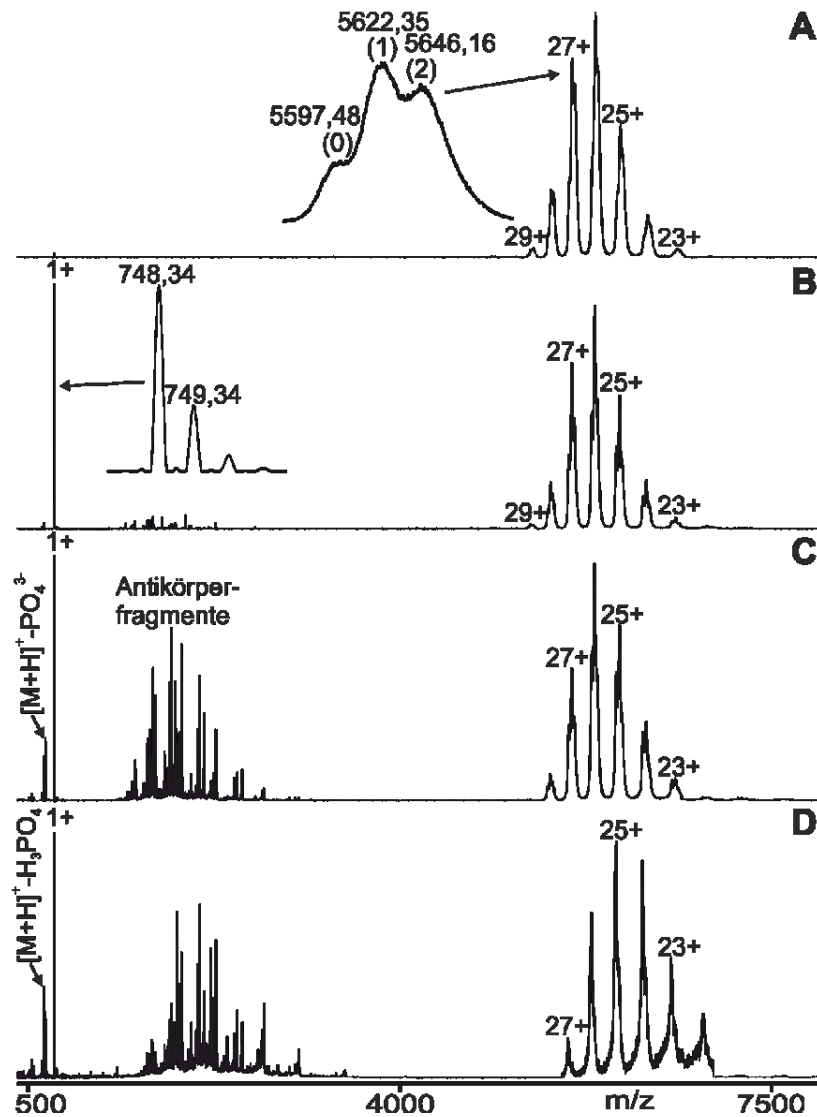


Abbildung 11: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP) bis zum Messpunkt  $\Delta CV$  200V

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu M$ , Peptidkonzentration: 3  $\mu M$ ). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V; (B) 70 V; (C) 145 V, von  $m/z$  5350 bis  $m/z$  6650 wurde der Vergrößerungsfaktor 2,2 angewandt; (D) 200 V, von  $m/z$  5525 bis  $m/z$  6950 wurde der Vergrößerungsfaktor 20 angewandt. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (A) zeigt eine Vergrößerung des 27+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Komplex freigesetzten, einfach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 01 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Die Peptid- und Antikörperfragmentationen sind in (C) und (D) markiert. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu l$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

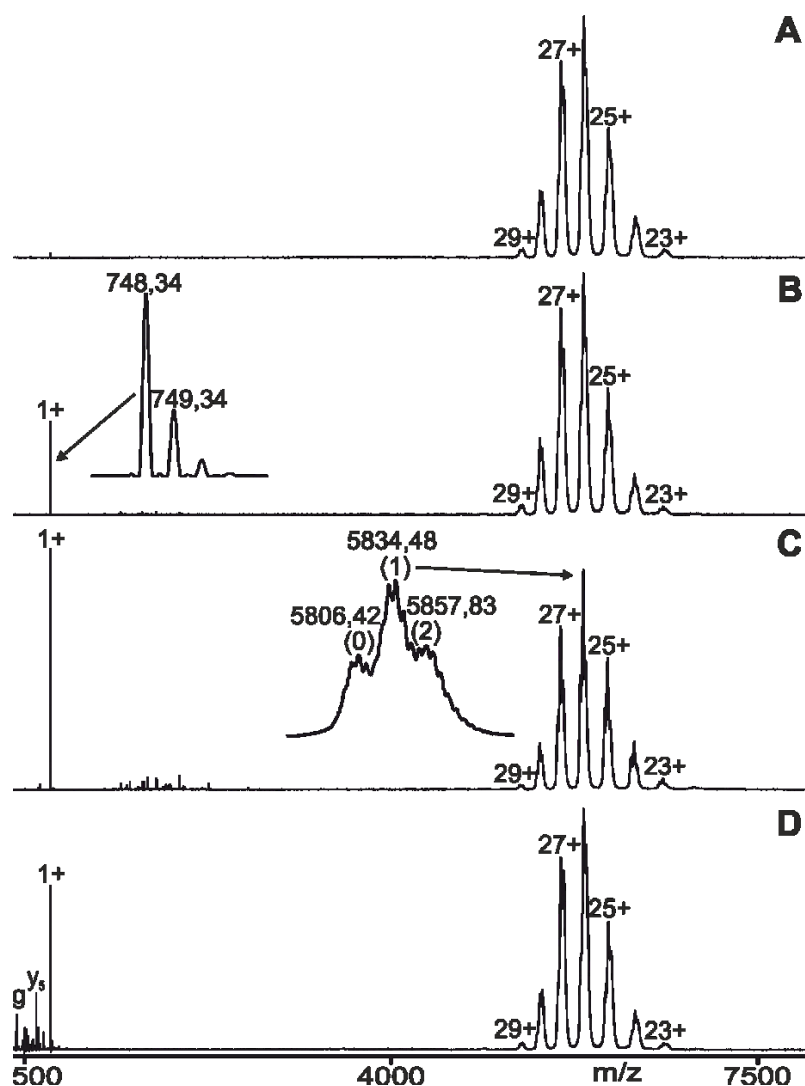


Abbildung 12: Nano-ESI-Massenspektren (blockierte/nicht-blockierte Ionentransmissionen niedriger Massen) der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP). Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration:  $1 \mu\text{M}$ , Peptidkonzentration:  $3 \mu\text{M}$ ). Dargestellt ist die zweite Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta\text{CV}$ ): (A) 0 V, (B) 30 V, (C) 40 V. (A-C) Die Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) ist dabei blockiert. (D) Die Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) ist anschließend nicht mehr blockiert. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Die Signale der vom Komplex freigesetzten, einfach geladenen Phospho-Hexapeptid 01-Ionen, der Fragment-Ionen ( $y_5$  bei  $m/z$  611,26) und der Hintergrundionensignale (*ground signals*  $g$  bei  $m/z$  429,11) sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Der Einschub in (C) zeigt eine Vergrößerung des  $26+$ -Ionensignals des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Das Probenvolumen betrug  $3 \mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

### 3.3.2 Orthodoxe Antikörperbindung

Im Gemisch aus Phospho-Hexapeptid HpTGEKP (01) und anti-HpTGEKP-Antikörper wurde neben den dreigipfligen Satellitenionensignalen der mehrfach geladenen Antikörperionensignale (s. Abbildungen 10 A und 43 D) auch deutlich, dass in vollständigen Dissoziationsanalysen die Intensität der Ionensignale der vom Immunkomplex freigesetzten Peptide proportional mit zunehmender Kollisionsenergie in sigmoidalem Verlauf anstieg (s. Abbildungen 10 und 43, jeweils B bis D). Aufgrund beider vorgestellten Kriterien wird die, im Rahmen der Immunkomplexbildung stattfindende Bindung des Phospho-Hexapeptids 01 (HpTGEKP) an den Antikörper somit als orthodoxe Bindung klassifiziert. Demzufolge konnten die Phospho-Hexapeptide 02 (HpTGERP; s. Abbildung 44), 05 (HpTGKKP; s. Abbildungen 45 und 46), 06 (HpSGERP; s. Abbildungen 47 und 48), 07 (HpTGEKL; s. Abbildungen 49 und 50), 09 (HpTEEKP; s. Abbildungen 51 und 52), und 10 (HpTREKP; s. Abbildungen 53 und 54) als ebenfalls spezifisch in einer orthodoxen Weise an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindend, identifiziert werden (s. Tab.2). Das, bei einer Spannungsdifferenz in der Kollisionszelle von 0 V auftretende Ionensignal mit sehr niedriger Intensität bei  $m/z$  748,34 (s. Abbildungen 10 und 43, jeweils A) kann nicht als Kriterium für eine orthodoxe Peptid-Antikörperbindung herangezogen werden. Dieses Ionensignal ist dem Energieüberschuss geschuldet, der in einem mehrfach geladenen und beschleunigten Immunkomplex in der Gasphase enthalten ist.

#### Quantitative Analysen der Immunkomplexdissoziationen in Gasphase nach dem ITEM-TWO-Verfahren

Eingangs wurde festgestellt, bis zu welcher Spannungsdifferenz der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) eine Durchführung der ITEM-TWO-Analyse der Immunkomplexe aus Phospho-Hexapeptiden und anti-HpTGEKP-Antikörper als zielführend erachtet werden konnte. Voraussetzung einer solchen zielführenden ITEM-TWO-Analyse ist, dass keine weiteren, parallel ablaufenden Reaktionswege, wie z. B. Fragmentierungsreaktionen, den Dissoziationsprozess überlagern. Folglich wurde erneut als Standard der Immunkomplex aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und dem Phospho-Hexapeptid 01 (Referenzimmunkomplex) in einer Dissoziationsanalyse der Immunkomplexe untersucht: Die Verläufe der normalisierten Ionenintensitäten der Immunkomplexe (Norm (Produkte): Antikörper plus ein Peptid, Antikörper plus zwei Peptide) wurden in Abhängigkeit von allen gemessenen Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) von 0 V bis 200 V grafisch dargestellt (s. Abbildung 55). Daraus ergab sich bis zu einer Kollisionsenergie von ca. 80 V eine sigmoidale Kurve, die mit einer Boltzmann-Gleichung beschrieben werden kann (Boltzmann-Kurve), und bei einer Kollisionsenergie um ca. 80 V ein Plateau zeigte (s. Abbildungen 55 und 56 A). Da für die quantitativen Analysen der

Immunkomplexdissoziation in Gasphase nach ITEM-TWO nur der steil ansteigende Verlauf der Abhängigkeit der Dissoziationsreaktion aus den beschriebenen sigmoidalen Kurvenverläufen zur weiteren Berechnung verwendet werden kann (später in diesem Abschnitt erläutert), erfolgte die Auswertung aller Einzelmessungen der Immunkomplexe mit orthodox bindenden Peptiden für die Intensitäten der Ionensignale der Produkte der Immunkomplexdissoziation (Antikörper plus 1 Peptid sowie Antikörper plus 2 Peptide) bis einschließlich Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle von 80 V.

Die Mischungen der sieben orthodox bindenden Phospho-Hexapeptide (s. Tab. 2) mit dem anti-HpTGEKP-Antikörper wurden einzeln in doppelten Messreihen in ITEM-TWO-Analysen untersucht. Eine Ausnahme stellte die Mischung aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 02 (HpTGERP) dar, bei der nur eine Messreihe aufgezeichnet und ausgewertet wurde. Aus den jeweiligen doppelten Messreihen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen für die normalisierten Produktintensitäten für jede gemessene Spannungsdifferenz der Kollisionszelle bis 80 V ermittelt. Für die Anpassung der Kurve der normalisierten Ionenintensitäten der Immunkomplexe (Norm (Produkte)) in Abhängigkeit von  $\Delta CV$  wurde ein theoretischer Abszissenwert von -20 V hinzugefügt und für diesen einheitlich eine Abweichung von  $\pm 2,00$  festgelegt (s. Abschnitt 2.9). Dabei wurde sich als Standard die Standardabweichung der normalisierten Produktintensitäten des Referenzimmunkomplexes bei  $\Delta CV$  0 V ( $\pm 1,97$ ) festgelegt und diese auf zwei Nachkommastellen gerundet. Der Bereich zwischen -20 V und 0 V wird nachfolgend nicht abgebildet.

Mittlere Ladungszustände aus den Ionenserien der jeweiligen Immunkomplexe (s. Tab. 3) wurden zwischen 25,5+ (Immunkomplex mit dem Phospho-Hexapeptid 02) und 27,8+ (Immunkomplexe mit den Phospho-Hexapeptiden 06 bzw. 09) bestimmt (s. Abschnitte 2.9 und 6.1.5).

Tab. 3: Charakteristiken der Boltzmann-Kurven der Dissoziationsreaktionen der Immunkomplexe aus orthodox bindenden Phospho-Hexapeptiden und anti-HpTGEKP-Antikörper in der Gasphase<sup>(132)</sup>

Komplex a,f)	Sequenz Peptid	mittlere Ladung	Anfangs- wert	End- wert	$\Delta CV_{50}$	dx	Anstieg	$R^2$ b,c)
		$\pm$ Std.-Abw. b,c)	[%] b,c,d)	[%] b,c,e)	[V] b,c,d)	[V] b)	[%/V] b)	
5	HpTGKKP	27,1 $\pm$ 0,65	18,8	90,6	14,1	+3,8	4,7	0,987
10	HpTREKP	27,3 $\pm$ 0,21	7,1	88,4	18,9	+6,8	3,0	0,989
7	HpTGEKL	26,7 $\pm$ 0,18	24,7	76,9	21,4	+11,7	1,1	0,991
6	HpSGERP	27,8 $\pm$ 0,04	41,3	78,4	22,9	+10,3	0,9	0,989
2	HpTGERP	25,5	6,5	71,1	25,5	+11,9	1,4	0,989
9	HpTEEKP	27,7 $\pm$ 0,11	39,5	75,9	26,2	+14,3	0,6	0,990
1	HpTGEKP	27,1 $\pm$ 0,09	17,5	74,2	27,2	+11,3	1,3	0,993

a) mehrfach geladener und beschleunigter Komplex.

b) gemittelt aus zwei Messreihen außer Komplex mit Hexapeptid 02 (nur eine Messreihe).

c) einheitenlose Zahl.

d) Produktmenge am niedrigsten angewandten  $\Delta CV_{50}$ -Wert.

e) Produktmenge am höchsten angewandten  $\Delta CV_{50}$ -Wert.

f) Tab. sortiert nach Größe der experimentell ermittelten  $\Delta CV_{50}$ -Werte in absteigender Reihenfolge.

Bei den, für die Immunkomplexe mit orthodoxer Peptid-Antikörperbindung nachfolgend durchgeführten quantitativen Analysen der Immunkomplexdissoziation in Gasphase nach ITEM-TWO, wurde sich an vorherig veröffentlichten Vorgehensweisen orientiert<sup>(139, 167)</sup>. Die Kurven der quantitativen Analysen der Immunkomplexdissoziation in Gasphase nach ITEM-TWO werden nachfolgend exemplarisch am Referenzimmunkomplex dargestellt (s. Abbildung 56). Aus der wie oben beschrieben angepassten Boltzmann-Kurve wird die Gleichung der Tangente entlang des „steilen Teils“ der Abhängigkeit der Dissoziationsreaktion des Referenzimmunkomplexes von  $\Delta CV$  (Intervall  $2 \cdot dx$  um dessen Mittelpunkt  $\Delta CV_{50}$ ) abgeleitet (s. Abbildung 56 A). In beschriebenem „steilen Teil“ der Boltzmann-Kurve ändern sich die Ionenintensitäten der Produkte in Abhängigkeit von  $\Delta CV$  am meisten. Alle Ordinatenwerte der Tangente entlang des „steilen Teils“ der Abhängigkeit der Dissoziationsreaktion des Referenzimmunkomplexes innerhalb des Intervalls  $2 \cdot dx$  werden zur Kalkulation der natürlichen Logarithmen der apparenten Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion des mittleren Ladungszustands von mehrfach geladenen und beschleunigten Immunkomplexionen in der Gasphase ( $\ln k_{mg}^{\#}$ ) verwendet. Die Werte für  $\ln k_{mg}^{\#}$  wurden als Funktion des reziproken Werts der Temperatur der Immunkomplexe während der CID in der Kollisionszelle ( $\frac{1}{T_{coll}}$ ) in einem

Arrhenius-Diagramm dargestellt (s. Abbildung 56 B). Die Arrhenius-Gerade gibt somit die Temperaturabhängigkeit der Dissoziationsreaktionen des Referenzimmunkomplexes wider. Beim reziproken Wert der absoluten Umgebungstemperatur von 298 K ( $\frac{1}{T_{\text{amb}}}$ ) wurde der Wert für  $\ln k_{\text{m0g}}^{\#}$  ermittelt (s. Abbildung 56 B).

In einem Gibbs-Helmholtz-Diagramm wurde anschließend die scheinbare thermodynamische Gleichgewichtsdissoziationskonstante von Immunkomplexen in der Gasphase ( $\ln K_{\text{D mg}}^{\#}$ ) in Abhängigkeit von  $\frac{1}{T_{\text{coll}}}$  dargestellt (Gibbs-Helmholtz-Kurve) (s. Abbildung 56 C). Bei  $\frac{1}{T_{\text{amb}}}$  wurde der natürliche Logarithmus der scheinbaren thermodynamischen Gleichgewichtsdissoziationskonstante von „neutralen und ruhenden“ Immunkomplexen in der Gasphase ( $\ln K_{\text{D m0g}}^{\#}$ ) ermittelt (s. Abbildung 56 C).

Anschließend wurde mittels der Van-'t-Hoff-Gleichung die scheinbare Gibbs-Aktivierungsenergie von „neutralen und ruhenden“ Immunkomplexen ( $\Delta G_{\text{m0g}}^{\#}$ ) ermittelt. Weiterhin wurde sowohl die scheinbare Reaktionsenthalpie der Dissoziation des „neutralen und ruhenden“ Immunkomplexes in der Gasphase ( $\Delta H_{\text{m0g}}^{\#}$ ) als auch das Produkt aus der absoluten Umgebungstemperatur und der scheinbaren Entropie der Dissoziation des „neutralen und ruhenden“ Immunkomplexes in der Gasphase ( $T_{\text{amb}} \cdot \Delta S_{\text{m0g}}^{\#}$ ) berechnet.

Analog wurde für die Immunkomplexe mit den sechs weiteren orthodox bindenden Phospho-Hexapeptiden, wie nachfolgend dargestellt, verfahren (s. Abbildungen 13 und 57).

Sowohl die Regressionskoeffizienten  $R^2$  der Boltzmann-Kurven von jeweils ca. 0,99 als auch weitere Werte der Boltzmann-Kurven der normalisierten Ionenintensitäten der Immunkomplexe (Norm (Produkte)) in Abhängigkeit von den Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle sind in Tab. 3 dargestellt.

Die Boltzmann-Kurven zeigten, dass die sieben orthodox bindenden Phospho-Hexapeptide (s. Tab. 2) in zwei Untergruppen unterteilt werden konnten.

Die erste Untergruppe besteht aus Immunkomplexen, deren Dissoziationsreaktionen in der Gasphase ähnlich wie die des Referenzimmunkomplexes verliefen, darunter die Phospho-Hexapeptide 01 (HpTGEKP), 02 (HpTGERP), 06 (HpSGERP) und 07 (HpTGEKL) (s. Abbildung 13 A).

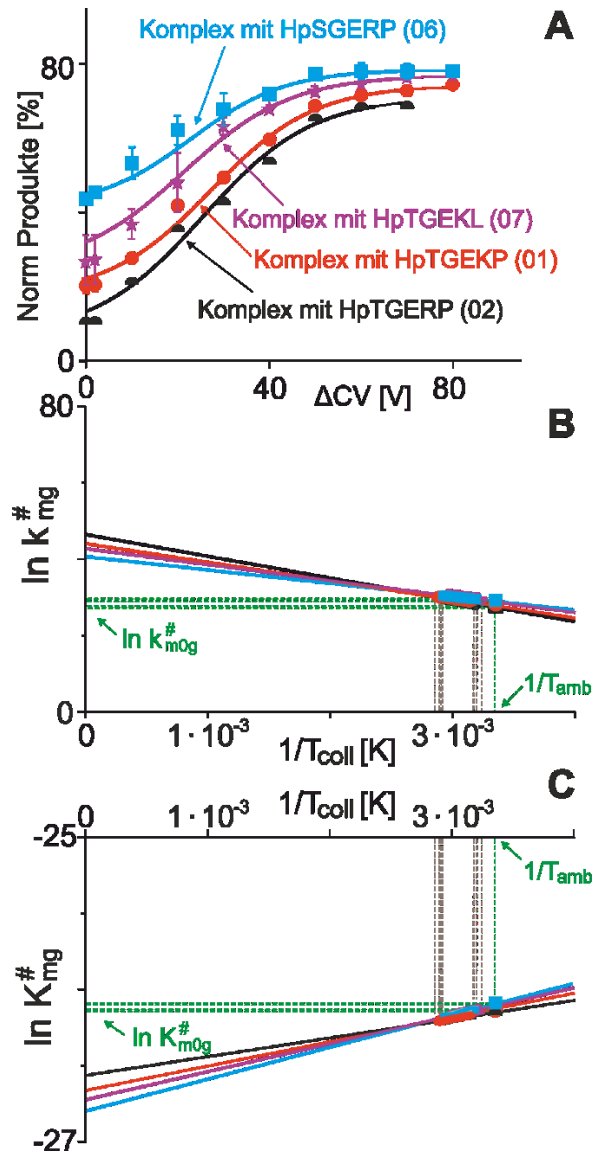


Abbildung 13: ITEM-TWO-Analysen der Dissoziation der Immunkomplexe aus anti-HpTGEKP-Antikörper und entweder Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP), 02 (HpTGERP), 06 (HpSGERP) oder 07 (HpTGEKL)

(A) Die Kurven der normalisierten Ionenintensitäten der Immunkomplexionen (Norm (Produkte)) sind in Abhängigkeit von den Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) dargestellt. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Messreihen. Vertikale Balken geben die Standardabweichungen an. Die sigmoidalen Kurven wurden mit einer Boltzmann-Gleichungsfunktion angepasst. Die für die Berechnungen verwendeten Kurvenparameter sind in Tab. 3 aufgeführt. Die Phospho-Hexapeptide sind farblich gekennzeichnet. (B) Arrhenius-Diagramm für die Geraden der Dissoziationen der Immunkomplexionen in der Gasphase. Linienfarben wie in (A). Bei  $\frac{1}{T_{amb}}$  wurden die Werte für  $\ln k^{\#}_{m0g}$  ermittelt. (C) Gibbs-Helmholtz-Diagramm für die Verläufe der Dissoziationen der Immunkomplexionen in der Gasphase. Linienfarben wie in (A). Bei  $\frac{1}{T_{amb}}$  wurden die Werte für  $\ln K^{\#}_{m0g}$  ermittelt. Die berechneten kinetischen und thermodynamischen Werte der Dissoziationen der Immunkomplexe in Gasphase sind in Tab. 4 aufgeführt. Jeder Datenpunkt (die verdickten Teile der der Linien in (B) und (C)) wurde experimentell ermittelt. Die Geraden wurden linear extrapoliert <sup>(132)</sup>.

Wie erwartet, zeigten die entsprechenden Arrhenius-Geraden fast überlappende Linien und vergleichbare Werte für die scheinbare Dissoziationskonstante von „neutralen und ruhenden“ (bei  $\Delta CV$  0 V) Immunkomplexen ( $k_{m0g}^{\#}$ ) bei der absoluten Umgebungstemperatur von 298 K ( $T_{amb}$ ) (s. Abbildung 13 B). Die Gibbs-Helmholtz-Geraden spiegelten diese Ähnlichkeiten wider und lieferten vergleichbare Werte für  $K_{D m0g}^{\#}$  bei  $T_{amb}$  für die Dissoziationsreaktionen dieser vier Immunkomplexe (s. Abbildung 13 C und Tab. 4).

Tab. 4: Scheinbare kinetische und scheinbare thermodynamische Werte für die Dissoziationsreaktionen der Immunkomplexe aus orthodox bindenden Phospho-Hexapeptiden und anti-HpTGEKP-Antikörper in der Gasphase<sup>(132)</sup>

Komplex <sup>a)</sup>	Sequenz Peptid	$k_{m0g}^{\#}$ <sup>b)</sup> [1/s]	$K_{D m0g}^{\#}$ <sup>b, c)</sup>	$\Delta G_{m0g}^{\#}$ <sup>b)</sup> [kJ/mol]	$\Delta H_{m0g}^{\#}$ <sup>b)</sup> [kJ/mol]	$T_{amb} \cdot \Delta S_{m0g}^{\#}$ <sup>b)</sup> [kJ/mol]
05	HpTGKKP	$4,1 \cdot 10^{11}$	$4,31 \cdot 10^{-12}$	+64,84	+1,81	-63,01
10	HpTREKP	$4,5 \cdot 10^{11}$	$4,32 \cdot 10^{-12}$	+64,83	+0,28	-64,54
07	HpTGEKL	$2,3 \cdot 10^{12}$	$4,58 \cdot 10^{-12}$	+64,69	-1,52	-66,20
06	HpSGERP	$3,6 \cdot 10^{12}$	$4,66 \cdot 10^{-12}$	+64,65	-1,75	-66,38
02	HpTGERP	$7,5 \cdot 10^{11}$	$4,40 \cdot 10^{-12}$	+64,79	-1,09	-65,86
09	HpTEEKP	$4,0 \cdot 10^{12}$	$4,67 \cdot 10^{-12}$	+64,64	-2,03	-66,65
01	HpTGEKP	$1,1 \cdot 10^{12}$	$4,47 \cdot 10^{-12}$	+64,75	-1,38	-66,11

<sup>a)</sup> neutraler und ruhender Komplex;  $T_{amb} = 298$  K; Peptide wie in Tab. 3 sortiert.

<sup>b)</sup> abgeleitet von zwei Messreihen außer Komplex mit Hexapeptid 2 (abgeleitet von nur einer Messreihe).

<sup>c)</sup> einheitenlose Zahl.

Die zweite Untergruppe der orthodox bindenden Phospho-Hexapeptide enthält Immunkomplexe, deren Dissoziationsreaktionen in der Gasphase erheblich vom Verlauf des Referenzimmunkomplexes abwich (s. Abbildung 57 A). Diese Untergruppe umfasst Immunkomplexe mit den Phospho-Hexapeptiden 05 (HpTGKKP), 09 (HpTEEKP) und 10 (HpTREKP). Verglichen mit der Dissoziationsreaktion des Referenzimmunkomplexes, zeigten folglich die jeweiligen Arrhenius-Diagramme unterschiedliche Anstiege der Arrhenius-Geraden, die die Temperaturabhängigkeiten der Dissoziationsreaktionen der Immunkomplexe widerspiegeln (s. Abbildung 57 B). Die Unterschiede in den Anstiegen der Geraden waren auch in den Gibbs-Helmholtz-Diagrammen (s. Abbildung 57 C) zu erkennen, was auf unterschiedliche thermodynamische und kinetische Eigenschaften der jeweiligen Dissoziationsreaktionen der Immunkomplexe hinweist. Allerdings lagen bei  $T_{amb}$  jeweils die Werte für  $k_{m0g}^{\#}$  und  $K_{D m0g}^{\#}$  für alle sieben Immunkomplexe mit orthodox bindenden Phospho-Hexapeptiden im selben Bereich (vgl. Tab. 4).

Die Werte für  $\Delta H_{m0g}^{\#}$  des Referenzimmunkomplexes und der Immunkomplexe mit den Phospho-Hexapeptiden 02 (HpTGERP), 06 (HpSGERP) und 07 (HpTGEKL), d. h. der vorgestellten ersten Untergruppe mit vergleichbaren Dissoziationsverläufen (vgl. Abbildung 13 A), lagen alle zwischen ca. -1,0 kJ/mol und -1,5 kJ/mol. Wenn hingegen die Dissoziation eines Immunkomplexes einen deutlich abgeflachteren Verlauf als die des Referenzimmunkomplexes nimmt (vgl. Abbildung 57 A), zeigte sich der Wert für  $\Delta H_{m0g}^{\#}$  mit ca. -2,0 kJ/mol deutlich niedriger. Dies konnte bei dem Immunkomplex mit dem Phospho-Hexapeptid 09 (HpTEEKP) beobachtet werden (vgl. Tab. 4). Im Gegensatz dazu, zeigte sich bei einem deutlich steileren Verlauf der Dissoziation des Immunkomplexes als dem des Referenzimmunkomplexes (vgl. Abbildung 57 A), die Werte für  $\Delta H_{m0g}^{\#}$  mit ca. +0,3 kJ/mol bzw. +1,8 kJ/mol deutlich erhöht (s. Tab. 4). Dies traf bei den Immunkomplexen mit den Phospho-Hexapeptiden 05 (HpTGKKP) und 10 (HpTREKP) jeweils zu (s. Tab. 4). Wenn die Werte für  $\Delta H_{m0g}^{\#}$  positiv sind, wird während der Dissoziation der Immunkomplexe Wärme aus der Umgebung aufgenommen. Dies wird als endotherme Reaktion bezeichnet. Wenn die Werte für  $\Delta H_{m0g}^{\#}$  allerdings negativ sind, wird bei der Dissoziation der Immunkomplexe Wärme an die Umgebung abgegeben und eine exotherme Reaktion liegt vor. Da die Werte für  $\Delta G_{m0g}^{\#}$  der Dissoziationsreaktionen der Immunkomplexe positiv sind, ist diese Reaktion als endergonisch einzustufen. Damit ist die Dissoziationsreaktion nicht spontan. Daraus ergibt sich, dass die umgekehrte Reaktion, also die der Bildung von Immunkomplexen exergonisch und damit spontan abläuft.

#### Schlussfolgerungen auf das Bindemotiv des anti-HpTGEKP-Antikörper unter besonderer Berücksichtigung der Ergebnisse quantitativer Analysen der Immunkomplexdissoziationen in Gasphase nach dem ITEM-TWO-Verfahren

Es kann zusammengefasst werden, dass eine orthodoxe Bindung an den anti-HpTGEKP-Antikörper bei Phospho-Hexapeptiden auftritt, die gleichzeitig einen phosphorylierten Serinylrest (pS) anstelle des phosphorylierten Threoninylrestes (pT) an zweiter Position und anstelle des Serinylrestes (K) an fünfter Position einen Argininyrest (R) aufweisen. Darauf deutet, vergleichend mit der, im Referenzimmunkomplex erhaltenen Aminosäuresequenz des Phospho-Hexapeptids 01 (HpTGEKP), die orthodoxe Bindung des Hexapeptids 06 (HpSGERP) an den anti-HpTGEKP-Antikörper hin.

Die ITEM-TWO-Analysen des anti-HpTGEKP-Antikörpers definieren ein bipolares Motiv für eine starke Antikörperbindung in orthodoxer Weise von Phospho-Hexapeptiden. Konkret zeigt sich dies, bei einem stark, auf orthodoxe Weise an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindenden Hexapeptid, durch eine N-terminal lokalisierte negative Ladung, dargestellt z. B. durch einen phosphorylierten Threoninylrest (pT), und eine C-terminal lokalisierte positiven

Ladung, d. h. dem Dipeptidyl-Rest (KP, RP oder KL). Die Dissoziationsreaktion der Immunkomplexe mit beschriebener Aminosäurezusammensetzung in der Gasphase unter ITEM-TWO-Bedingungen ist dann endotherm. Anscheinend bindet der anti-HpTGEKP-Antikörper Hexapeptide, die C-terminal statt Aminosäureresten mit positiven Ladungen saure Aminosäurereste (z. B. Phospho-Hexapeptid 09, HpTEEKP) enthalten, vergleichsweise schwächer. Die Dissoziationsreaktion in der Gasphase unter ITEM-TWO-Bedingungen ist dann exotherm. Bei den betreffenden anti-HpTGEKP-Antikörper-Peptid-Bindungen, z. B. mit Phospho-Hexapeptid 09 (HpTEEKP), handelt es sich allerdings nach wie vor um eine orthodoxe Antikörperbindung.

#### 3.3.3 Unorthodoxe Antikörperbindung

In ITEM-TWO-Untersuchungen konnte eine unorthodoxe Antikörper-Peptid-Bindung in einem Peptid-Antikörper-Gemisch wie nachfolgend, anhand beider Messreihen des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 08 (HpTGEKS) nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) beschrieben (s. Abbildungen 14 und 58), gezeigt werden.

Bei allen angelegten Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle waren die mehrfach geladenen Satellitenionensignale auf den hohen Massenseiten, wie sie z. B. bei Immunkomplexen mit orthodox bindenden Hexapeptiden auftraten (vgl. eingeschobene Vergrößerungen in Abbildungen 10 A, 11 A, 12 C und 43 D), nicht eindeutig zu erkennen. Stattdessen waren die Signale der mehrfach geladenen Antikörperionen auf den hohen Massenseiten asymmetrisch verbreitert (s. exemplarisch eingeschobene Vergrößerungen in Abbildungen 14 D und 58 D).

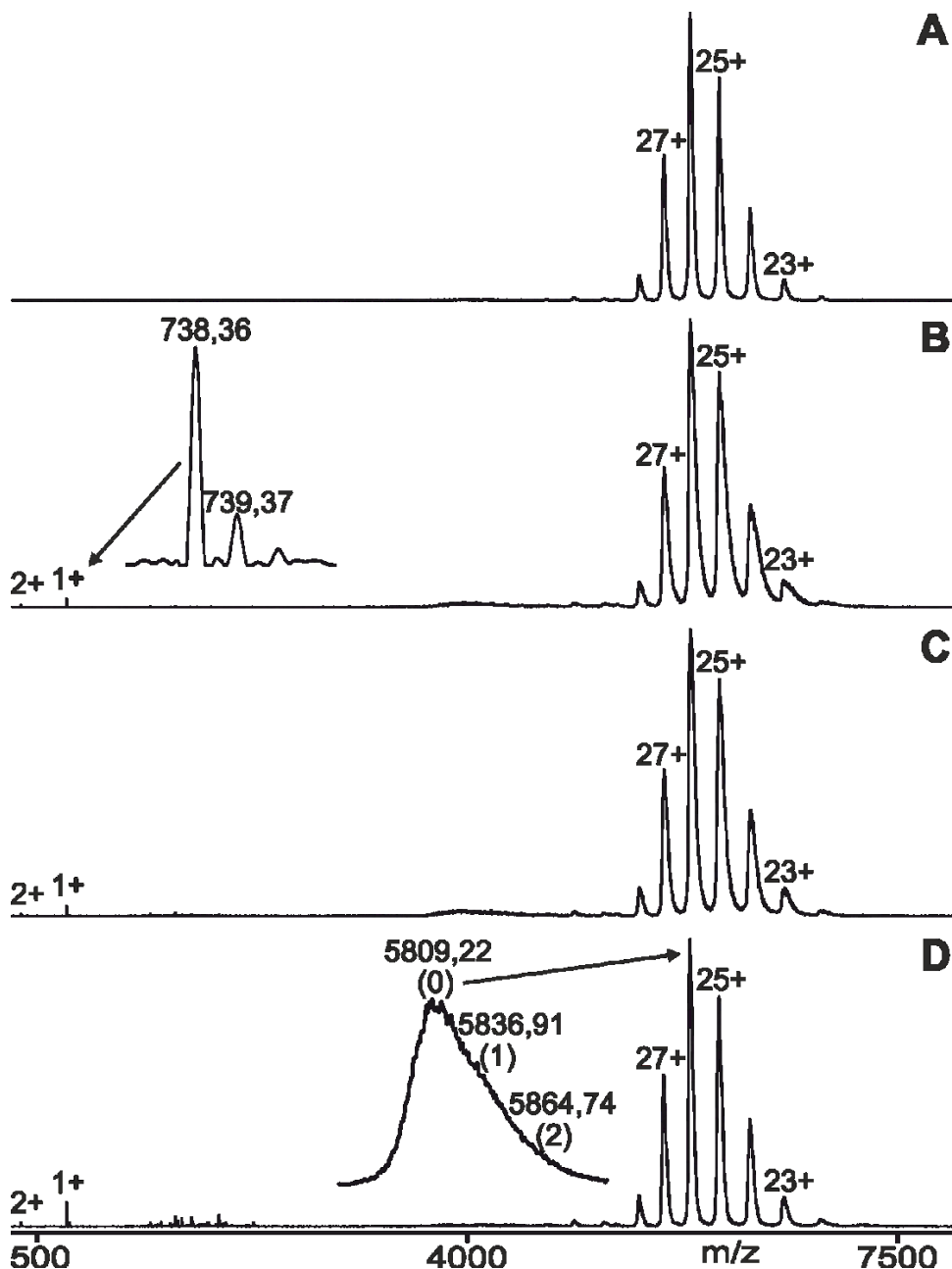


Abbildung 14: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 08 (HpTGEKS)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 20 V, (C) 30 V, (D) 70 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der mutmaßlichen Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Addukt freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 08 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

Als auffälligster Hinweis auf eine unorthodoxe Antikörper-Peptid-Bindung konnte allerdings Folgendes identifiziert werden: Trotz blockierter Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ), waren bei erhöhten Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle einfach oder zweifach geladene Ionensignale der Peptide mit nur geringen Intensitäten auf den niedrigen Massenseiten der Massenspektren zu sehen (s. Abbildungen 14 und 58, jeweils B - D). Die unter diesen Messbedingungen in den Massenspektren auftretenden Ionensignale der Phospho-Hexapeptide deuten auf deren Freisetzung aus einem gebildeten Immunkomplex hin. Im Unterschied zu orthodox an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindenden Hexapeptiden fiel allerdings auf, dass die Intensitäten der Ionensignale der Hexapeptide nicht proportional mit zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle anstiegen. Dies deutet zwar auf eine spezifische Antikörper-Peptid-Bindung, die jedoch in einer unorthodoxen Weise stattfindet, hin. Diese spezifische Antikörper-Peptid-Bindung in einer unorthodoxen Weise lag auch für Antikörper-Peptid-Gemische mit den Phospho-Hexapeptiden 03 (HpSGEKP; s. Abbildungen 59 und 60) oder 04 (HpTHTHT; s. Abbildung 61) vor. Der Graph der normalisierten Ionenintensitäten der Produkte (Norm (Produkte)) des Immunkomplexes mit dem unorthodox bindenden Phospho-Hexapeptids 08 (HpTGEKS) in Abhängigkeit von den Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle zeigt, dass eine Anpassung einer Boltzmann-Kurve an die Messpunkte, auch im Hinblick auf deren erhebliche Standardabweichungen, nicht sinnvoll ist (s. Abbildung 62). Von quantitativen Analysen der Immunkomplexdissoziationen in der Gasphase nach ITEM-TWO, wie sie bei den Immunkomplexen mit den orthodox an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindenden Phospho-Hexapeptiden durchgeführt wurde (s. Abschnitt 3.3.2, Unterabschnitt „Quantitative Analysen der Immunkomplexdissoziationen in Gasphase nach dem ITEM-TWO-Verfahren“), wird daher abgesehen.

Um zu zeigen, dass die unorthodoxen Antikörper-Peptid-Bindung tatsächlich eine Bindung des jeweiligen Phospho-Hexapeptids mit dem Antikörper-Paratop darstellt, wurde wie nachfolgend erläutert, eine experimentelle, kompetitive Messreihe durchgeführt. Das orthodox an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindende Hexapeptid 02 (HpTGERP), das unorthodox an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindende Hexapeptid 08 (HpTGEKS) und der anti-HpTGEKP-Antikörper wurden im molaren Verhältnis 3:3:1 gemischt. Das Vorhandensein der beiden überschüssig vorliegenden Hexapeptide und des anti-HpTGEKP-Antikörpers im ternären Gemisch wurde bei nicht blockierter Transmission von Ionen niedriger Massen und Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle von 0 V aufgezeigt (s. Abbildung 15 A).

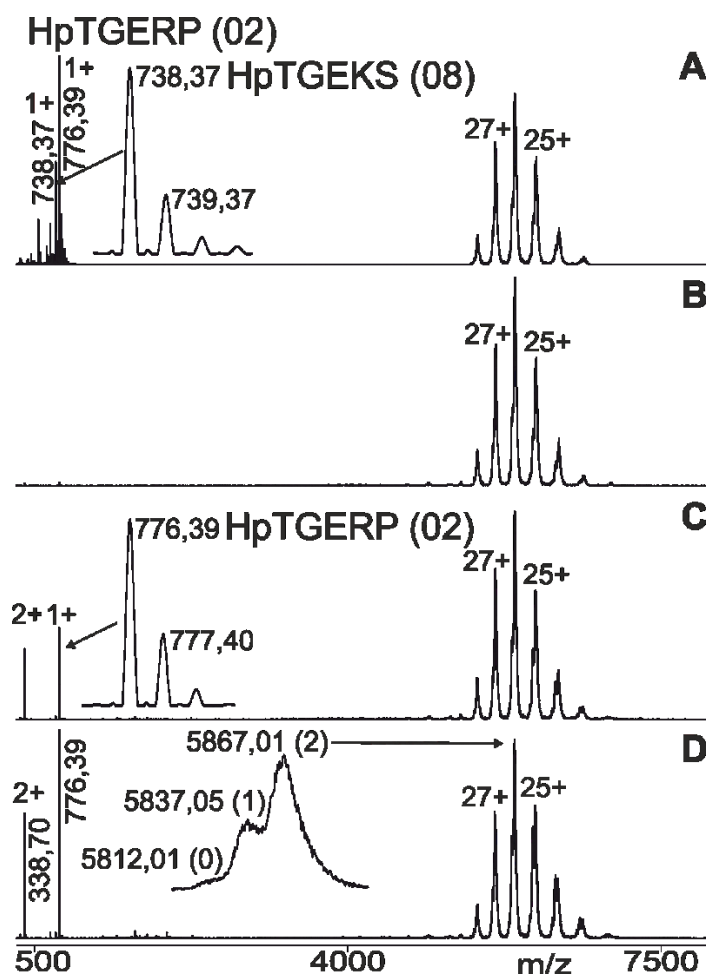


Abbildung 15: Nano-ESI-Massenspektren des ternären Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper sowie den beiden Phospho-Hexapeptiden 02 (HpTGERP) und 08 (HpTGEKS) im molaren Verhältnis 1:3:3

Die Antikörperkonzentration betrug  $1 \mu\text{M}$ , die jeweiligen Peptidkonzentrationen  $3 \mu\text{M}$ . (A) Die Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ) ist bei Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) von  $0$  V nicht blockiert. Von  $m/z$  5370 bis  $m/z$  6700 wurde der Vergrößerungsfaktor 40 angewandt. (B) Die Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ) bei Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) von  $0$  V ist blockiert. (C) Die Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ) bei Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) von  $30$  V ist blockiert. (D) Die Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ) bei Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) von  $60$  V ist blockiert; von  $m/z$  5370 bis  $m/z$  6700 wurde der Vergrößerungsfaktor 1,25 angewandt. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers bzw. der Immunkomplexe (rechte Ionenserien) sowie des vom Immunkomplex freigesetzten einfach und zweifach positiv geladenen Phospho-Hexapeptids 02 (linke Ionenserien) sind die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des  $27+$ -Ionensignals des anti-HpTGEKP-Antikörpers bzw. des Immunkomplexes. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Einschübe in (A) und (C) zeigen Vergrößerungen der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Die Aminosäuresequenzen der in der ternären Mischung enthaltenen Hexapeptide sind im Einbuchstabencode dargestellt. Der Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure. Das Probenvolumen betrug  $3 \mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war  $200 \text{ mM}$  Ammoniumacetat,  $\text{pH } 6,7$  <sup>(132)</sup>.

Bei erhöhten Spannungsdifferenzen der Kollisionszellen und nach Blockierung der Transmission ungebundener Peptidionen zeigten sich unter ITEM-TWO-Bedingungen, neben den vorliegenden Satellitenionensignalen der mehrfach geladenen Antikörperionen auf den hohen Massenseiten (s. exemplarische Abbildung 15 D, eingeschobene Vergrößerung), nur Ionensignale von Hexapeptid 02 (HpTGERP) auf den niedrigen Massenseiten des Massenspektrums (s. Abbildung 15 C und D). Dies deutet darauf hin, dass beide Peptide um die Bindung an das Antikörper-Paratop konkurriert hatten, allerdings nur das orthodox an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindende Hexapeptid 02 (HpTGERP) stark gebunden war und damit die Paratop-Tasche nahezu ausschließlich durch Hexapeptid 02 (HpTGERP) besetzt wurde.

Es kann zusammengefasst werden, dass eine schwache Bindung in unorthodoxer Weise an den anti-HpTGEKP-Antikörper bei Phospho-Hexapeptiden auftritt, die zusätzlich zum phosphorylierten Threoninylrest (pT) eine C-terminale hydroxylhaltige Aminosäure (T, S) (z. B. HpTGEKS, Hexapeptid 08) oder anstelle des N-terminalen phosphorylierten Threoninylrestes (pT) einen phosphorylierten Serinylrest (pS) aufweisen (vgl. HpSGEKP, Hexapeptid 03; s. Abbildungen 59 und 60). Werden die Aminosäuresequenzen der Phospho-Hexapeptide 06 (HpSGERP) und 03 (HpSGEKP) vergleichend mit dem im Referenzimmunkomplex enthaltenen Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP) dargestellt, so fällt neben dem gemeinsamen Serinylrest (pS; als Austausch zum pT des Phospho-Hexapeptids 01) an zweiter Position, ein nur bei Phospho-Hexapeptid 06 (HpSGEKP) vorliegender Austausch des Serinylrestes (S) gegen einen Argininylrest (R) an fünfter Position auf. Aufgrund des bei Phospho-Hexapeptid 03 (HpSGEKP) fehlenden letztgenannten Aminosäureaustauschs an fünfter Position liegt statt einer orthodoxen (vgl. HpSGERP, Hexapeptid 06; s. Abbildungen 47 und 48), bei Phospho-Hexapeptid 03 (HpSGEKP) eine unorthodoxe anti-HpTGEKP-Antikörperbindung vor. Außerdem findet sich eine schwache Bindung in unorthodoxer Weise an den anti-HpTGEKP-Antikörper bei Phospho-Hexapeptiden mit nicht-kanonischen Aminosäuresequenzen (vgl. HpTHTHT, Hexapeptid 04; s. Abbildung 61).

#### 3.3.4 Ausbleibende Antikörperbindung

Eine fehlende Bildung eines Immunkomplexes in einem Peptid-Antikörper-Gemisch in Lösung konnte in massenspektrometrischen Untersuchungen wie nachfolgend beschrieben gezeigt werden.

Zunächst fielen bei hohen bzw. erhöhten angelegten Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle auf den niedrigen Massenseiten keine Ionensignale von Hexapeptiden auf, die aus einem Immunkomplex freigesetzt wurden. Dies konnte im Gemisch aus

anti-HpTGEKP-Antikörper und Hexapeptid 00 (HTGEKP) gezeigt werden (s. Abbildung 16 C und D).

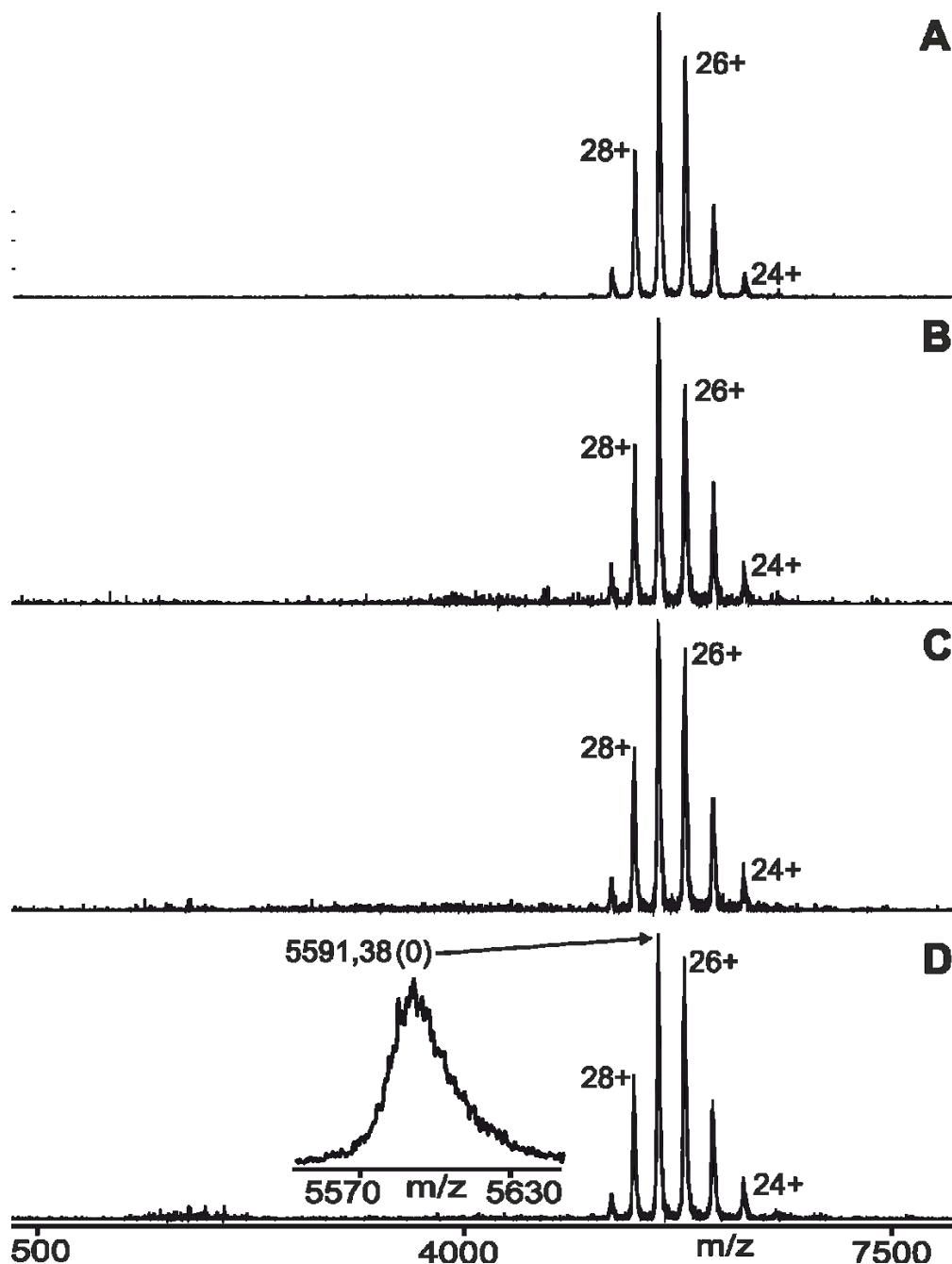


Abbildung 16: Nano-ESI-Massenspektren des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 00 (HTGEKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. In der Messreihe dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 10 V, (C) 30 V, (D) 60 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers sind in der rechten Ionenserie Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 27+-Antikörperionensignals. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der gebundenen Peptide an. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

Da, wie im Abschnitt 3.3.1 erläutert, bei dem anti-HpTGEKP-Antikörper/Peptid 01-Gemisch eine Antikörperbindung vorliegt, wurden unter ITEM-TWO-Bedingungen bei Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle von 60 V bzw. 70 V Massenspektren des anti-HpTGEKP-Antikörper/Peptid 01-Gemischs vergleichend herangezogen (s. Abbildung 17 A).

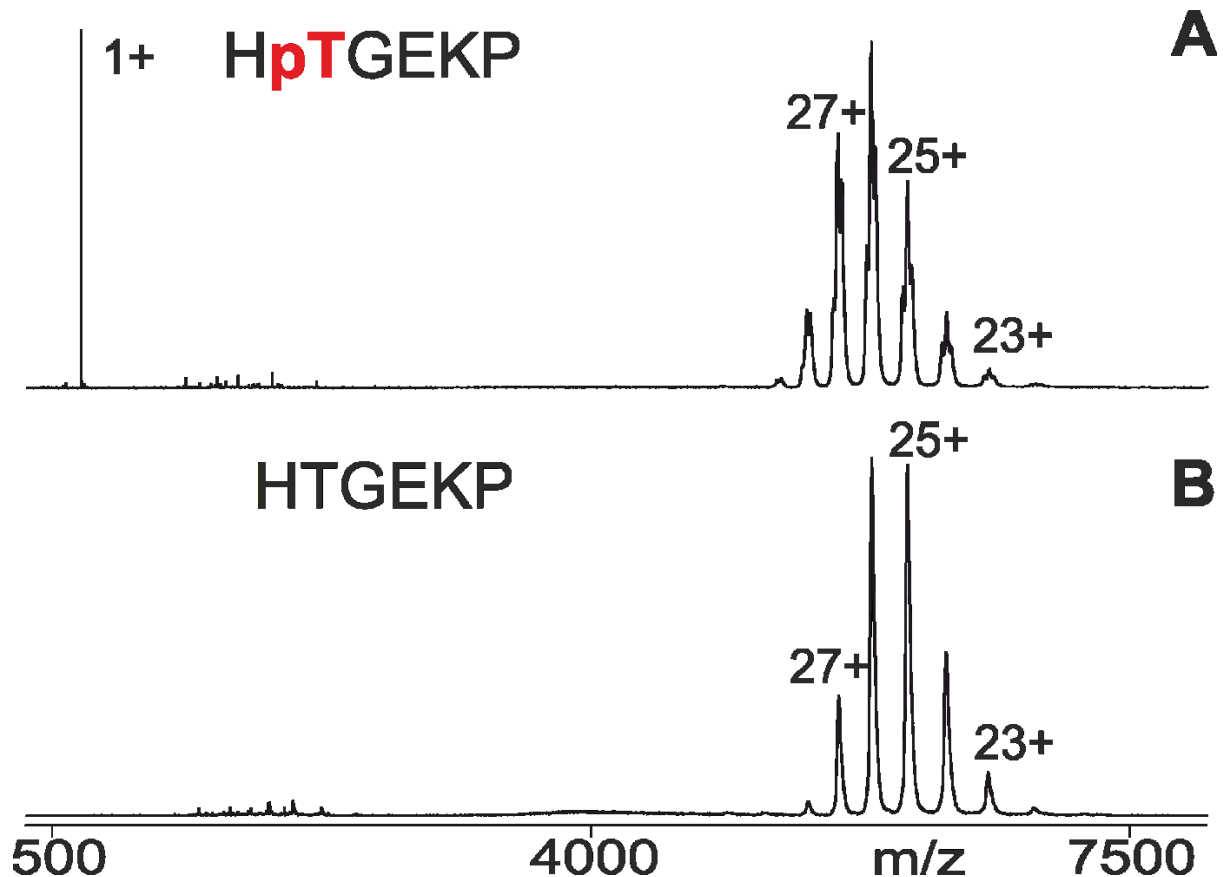


Abbildung 17: NanoESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Hexapeptid (Peptide 01 bzw. 00). Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind erhöhte Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ). (A) Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. (B) Hexapeptid 00 (HTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. Ladungszustände sind für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers, der Immunkomplexe (rechte Ionenreihe) und das aus dem Immunkomplex freigesetzte Peptid-Ionensignal (links) angegeben. Die Aminosäuresequenzen der in der jeweiligen Mischung enthaltenen Hexapeptide sind im Einbuchstabencode dargestellt. Der Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure. Das Probenvolumen betrug jeweils 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

Während beim Gemisch aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Peptid 01 (HpTGEKP) bei einer mit 60 V hohen Spannungsdifferenz in der Kollisionszelle auf den niedrigen Massenseiten des Spektrums eine Dissoziation des Hexapeptids aus einem gebildeten Immunkomplex gezeigt werden konnte (s. Abbildung 17 A), fehlten bei gleicher Spannungsdifferenz der Kollisionszelle in den Massenspektren des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Hexapeptid 00 auf den niedrigen Massenseiten entsprechende Ionensignale (s. Abbildung 16 D und 17 B).

Weiterhin wurde bei fehlenden Immunkomplexbildungen für alle angelegten Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle das Fehlen von Satellitenionensignalen der mehrfach geladenen Antikörperionen auf den hohen Massenseiten des Spektrums deutlich. Die entsprechend symmetrische Form des vergrößert dargestellten Ionensignals des 27-fach protonierten (s. Abbildung 16 D, eingeschobene Vergrößerung) bzw. 26-fach protonierten (s. Abbildung 18 A) Antikörperladungszustands wird im Hexapeptid 00/anti-HpTGEKP-Antikörper-Gemisch exemplarisch bei Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle von 60 V verdeutlicht. Um dies zu bestätigen, wurde auch hierbei ein Vergleich mit den Massenspektren des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Peptid 01 bei einer Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle von 70 V dargestellt (s. Abbildung 18 A). Die Antikörperionensignale der jeweils dargestellten 26-fach geladenen Ladungszustände zeigten sich nur im Hexapeptid 00/anti-HpTGEKP-Antikörper-Gemisch symmetrisch geformt (vgl. Abbildung 18 B mit A), was auf eine ausgebliebene Immunkomplexbildung mit Hexapeptid 00 hindeutet.

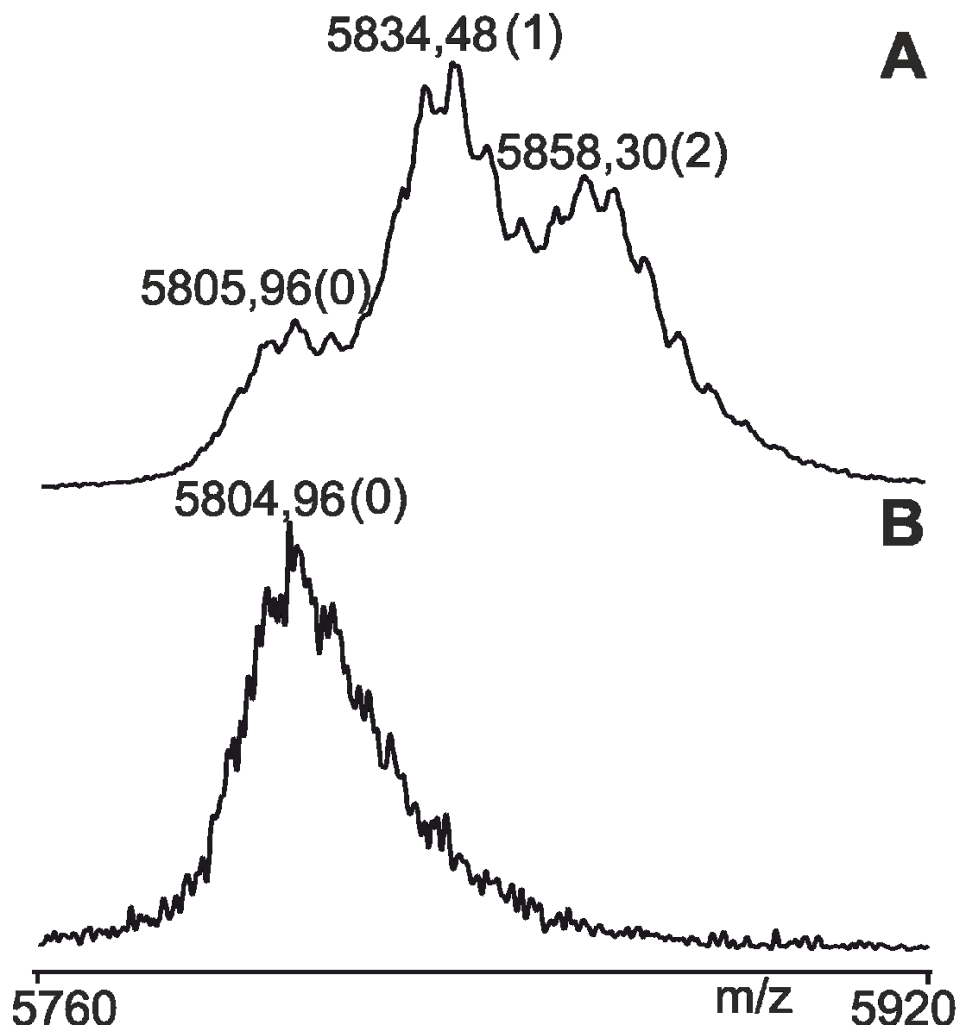


Abbildung 18: Vergrößerungen aus nano-ESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Hexapeptid (Peptide 01 bzw. 00). Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind erhöhte Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ). (A) Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP),  $\Delta CV$  70 V. (B) Hexapeptid 00 (HTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. Der Ladungszustand der ausgewählten Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers bzw. der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) ist 26+,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

Auf diese Weise konnte eine fehlende Bildung eines Immunkomplexes in dem Gemisch aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Hexapeptid 00 (HTGEKP) gezeigt werden. Die, im Gegensatz zu Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP), bei Hexapeptid 00 (HTGEKP) fehlende Bildung eines Immunkomplexes mit dem anti-HpTGEKP-Antikörper zeigte, dass eine ausbleibende Phosphorylierung des Threoninylrestes, welcher an den Histidinylrest angrenzt, vom Antikörper nicht toleriert wird. Das für die Bindung essentiell benötigte Bindemotiv ist nicht ausgebildet.

### 3.3.5 Bestätigung des Bindungsverhaltens im kompetitiven Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay

Die Ergebnisse des folgenden Abschnitts sind bereits in Scherf et al. <sup>(132)</sup> publiziert wurden. Ein kompetitiver Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay wurde durchgeführt, um zu validieren, inwieweit das Bindungsverhalten der Hexapeptide gegenüber dem anti-HpTGEKP-Antikörper in der Gasphase von jenem in Lösung widergespiegelt werden kann. Bei dem als Western-Blot-Analyse durchgeführten kompetitiven Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay wurden Proteine aus Zellextrakten der C631-Zellen, die mit Okadasäure als Phosphataseinhibitor behandelt wurden, als Antigene eingesetzt. Die aus den Zellen extrahierten Antigene wurden auf eine PVDF-Membran oberflächengebunden präpariert. Es wurden nur Proteinextrakte aus mit Okadasäure behandelten C631-Zellen als Antigene verwendet, da in Western-Blot-Analysen (s. Abschnitt 3.2.2, Unterabschnitt „Immunaalytische Charakterisierung“) nachgewiesen werden konnte, dass der anti-HpTGEKP-Antikörper hier phosphorylierte ZNF-Proteine markiert (s. Abbildungen 6 und 27, jeweils Spur 3). Im Unterschied zum Inkubieren des anti-HTpGEKP-Antikörpers mit einem Hexapeptid vor den ITEM-TWO-Experimenten wurde das molare Verhältnis von Antikörper zu Peptid auf ca. 1 : 20 erhöht und die Inkubationszeit auf mindestens 14 Stunden verlängert (vgl. Abschnitte 2.7 und 2.10). Beide Anpassungen sollten zu einem erhöhten Absättigen der Paratope des anti-HpTGEKP-Antikörpers durch das jeweilige Hexapeptid führen.

Im kompetitiven Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay konnte gezeigt werden, dass die Bindungsfähigkeit des anti-HpTGEKP-Antikörpers an seine Antigene durch die Vorinkubation des anti-HpTGEKP-Antikörpers mit einem orthodox bindenden Hexapeptid deutlich herabgesetzt wurde. Die drei orthodox bindenden Phospho-Hexapeptide 01 (HpTGEKP), 09 (HpTEEKp) und 10 (HpTREKP) waren in der Lage, die Markierung von ZNF-Proteinen durch den anti-HpTGEKP-Antikörper erheblich zu reduzieren oder sogar komplett zu verhindern (s. Abbildung 19, Spuren 2 bis 4).

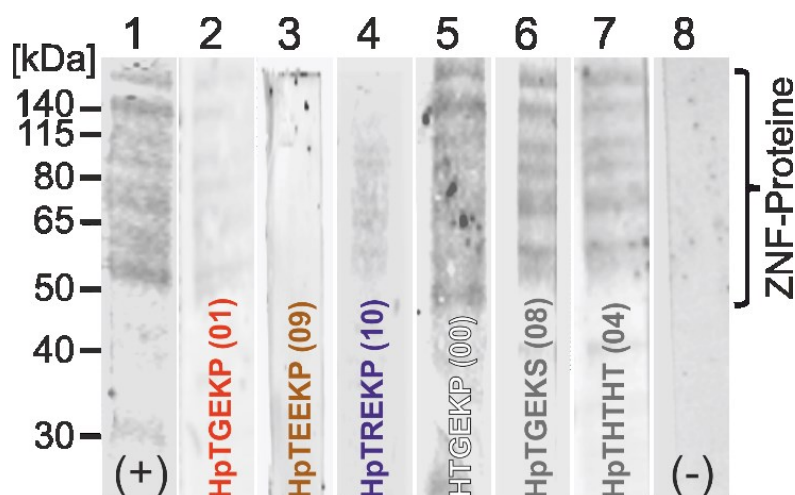


Abbildung 19: Kompetitives Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay. Proteinextrakte aus C631-Zellen, die mit Okadasäure als Phosphataseinhibitor behandelt wurden, lieferten die Antigene. Der primäre anti-HpTGEKP-Antikörper wurde mit entsprechendem Hexapeptid vorinkubiert und das Gemisch anschließend zur Markierung der Antigenproteine verwendet. IRDye 800 CW anti-Maus-Antikörper aus der Ziege diente als sekundärer Antikörper. Spur 1: keine Peptid-Vorinkubation (Positivkontrolle, (+)). Spur 2: Vorinkubation mit Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP). Spur 3: Vorinkubation mit Phospho-Hexapeptid 09 (HpTEEKP). Spur 4: Vorinkubation mit Phospho-Hexapeptid 10 (HpTREKP). Spur 5: Vorinkubation mit Hexapeptid 00 (HTGEKP). Spur 6: Vorinkubation mit Phospho-Hexapeptid 08 (HpTGEKS). Spur 7: Vorinkubation mit Phospho-Hexapeptid 04 (HpTHTHT). Spur 8: kein primärer anti-HpTGEKP-Antikörper (Negativkontrolle, (-)). Die Bilder des kompetitiven Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassays wurden oberhalb einer molekularen Masse von ca. 200 kDa und unterhalb einer molekularen Masse von ca. 25 kDa zurechtgeschnitten <sup>(132)</sup>.

Im Gegensatz dazu, konnten die unorthodox bindenden Phospho-Hexapeptide 04 (HpTHTHT) und 08 (HpTGEKS) die Markierung von ZNF-Proteinen durch den anti-HpTGEKP-Antikörper nicht in nachweisbarer Menge reduzieren (s. Abbildung 19, Spuren 6 und 7). In diesem Assay verhielten sich diese unorthodox bindenden Phospho-Hexapeptide wie das nicht-bindende Hexapeptid 00 (HTGEKP) (s. Abbildung 19, Spur 5).

Offensichtlich entspricht eine starke Gasphasenbindung einer effizienten Blockierung der Antikörper-Paratope in Lösung. Somit stimmen die ITEM-TWO-Ergebnisse mit den Daten des kompetitiven Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassays gut überein.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die ITEM-TWO-Methode sehr gut dafür geeignet ist, die Rolle einzelner Aminosäurereste innerhalb eines Bindemotivs (innerhalb eines Epitops) für die Ausprägung der Bindung eines Antikörpers zu bestimmen bzw. zu überprüfen. Je genauer ein Bindemotiv eines Antikörpers bestimmt ist, umso präziser lässt sich abschätzen, welche Veränderungen von definierten Erkennungsstrukturen welche Folgen nach sich ziehen. Zu den Veränderungen der Bindeeigenschaften zählen u.a. Kreuzreaktivitäten sowie der Verlust einer Bindung.

### 3.4 Charakterisierung von in Endometriumkarzinomen mutierten ZNF-Linkersequenzen mittels ITEM-TWO-Analysen

Nachfolgend der präzisen Charakterisierung des Bindemotivs des anti-HpTGEKP-Antikörpers, widmet sich der zweite Teil dieser Arbeit der Frage inwieweit der besagte Antikörper in der Lage wäre, ein mutiertes Bindemotiv zu erkennen. Als Testfall wurde das Motiv YTGEKP ausgewählt, da dieses bei Patienten mit Endometriumkarzinom aufgrund einer Punktmutation des ZNF 331-Gens signifikant erhöht vorliegt<sup>(39)</sup>.

Da die im Endometriumkarzinom signifikant angereicherte Punktmutation des Gens für das ZNF-Protein 331 zu einem solchen H-zu-Y-Austausch (H11Y) führt<sup>(39)</sup>, wurden die Hexapeptide 100 bis 103 im jeweiligen Antikörper-Peptid-Gemisch mittels ITEM-TWO in der Gasphase untersucht. Die Hexapeptide 100 bis 103 (s. Tab. 2) haben einen Austausch eines Histidinyrestes gegen einen Tyrosinyrest (H-zu-Y-Austausch) gemeinsam (s. Abschnitt 3.1.2).

#### 3.4.1 Ausbleibende Antikörperbindung

Die Gemische aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Hexapeptid 100 (YTGEKP), 101 (YpTGEKP) oder 103 (pYpTGEKP) zeigten analog zum Gemisch aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Hexapeptid 00 (HTGEKP) die vorgestellten Kriterien für eine ausbleibende Antikörperbindung (s. Abschnitt 3.3.4 und Tab. 2). Resümierend zeigten ITEM-TWO-Messreihen der Gemische aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Hexapeptide 100 (s. Abbildung 63), 101 (s. Abbildung 64) oder 103 (s. Abbildung 65) bei hohen Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle auf den niedrigen Massenseiten keine Ionensignale von Hexapeptiden, die aus einem Immunkomplex bzw. aus einer orthodoxen oder unorthodoxen Antikörperbindung freigesetzt wurden (s. Abbildungen 63, 64 und 65; jeweils D). Außerdem wurde bei fehlenden Immunkomplexbildungen bei hohen Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle das Fehlen von Satellitenionensignalen der mehrfach geladenen Antikörperionen auf den hohen Massenseiten deutlich (s. Abbildungen 63, 64 und 65; jeweils D). Die entsprechend symmetrische Form des vergrößert dargestellten Ionensignals des 26-fach protonierten Antikörperladungszustands wird im Gemisch aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Di-Phospho-Hexapeptid 103 (pYpTGEKP) exemplarisch bei einer Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle von 60 V verdeutlicht (s. Abbildung 65 D, eingeschobene Vergrößerung).

Auf diese Weise konnte eine fehlende Antikörper-Peptid-Bindung in den Gemischen aus anti-HpTGEKP-Antikörper mit den Hexapeptiden 100 (YTGEKP), 101 (YpTGEKP) oder 103 (pYpTGEKP) gezeigt werden.

Um beispielhaft zu verdeutlichen, dass die fehlende Antikörper-Peptid-Bindung nicht in Zusammenhang mit Phänomenen des Übergangs der Immunkomplexe aus der kondensierten Phase in die Gasphase steht, wurde ein kompetitives Substitutionsexperiment in Lösung, wie nachfolgend beschrieben, durchgeführt. Das nicht an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindende Di-Phospho-Hexapeptid 103 (pYpTGEKP), das orthodox an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindende Hexapeptid 05 (HpTGKKP) und der anti-HpTGEKP-Antikörper wurden im molaren Verhältnis 3:3:1 gemischt. Das Vorhandensein der beiden im Überschuss vorliegenden Hexapeptide und des anti-HpTGEKP-Antikörpers im ternären Gemisch wurde bei nicht blockierter Transmission von Ionen niedriger Massen und Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle von 0 V aufgezeigt (s. Abbildung 66 A). Die Hexapeptide 103 (pYpTGEKP) und 05 (HpTGKKP) zeigten sich dabei durch einfach geladene Ionensignale nahezu gleicher Intensität auf der niedrigen Massenseite des Massenspektrums. Auf den hohen Massenseiten wiesen die Satellitenionensignale der mehrfach geladenen Antikörperionen auf die Bildung eines Immunkomplexes hin (s. Abbildung 66 A). Diese Satellitenionensignale bleiben bestehen, wenn die Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) unterdrückt wird (s. Abbildung 66 B). Als anschließend die Spannungsdifferenzen in der Kollisionszelle erhöht wurde, erschienen ausschließlich einfach und zweifach geladene Ionensignale des Hexapeptids 05 (HpTGKKP) mit Isotopenauflösung auf der niedrigen Massenseite des Massenspektrums (s. Abbildung 66 C). Somit lieferte das kompetitive Substitutionsexperiment in Lösung eindeutige Hinweise dafür, dass das Bindemotiv des anti-HpTGEKP-Antikörpers zwar Austausch von Aminosäuren an Position 4 des Hexapeptids toleriert, aber Austausch von Aminosäuren an Position 1 des Hexapeptid zu einem Verlust der Antikörperbindung führen.

Daran anknüpfend, lässt das Identifizieren der Hexapeptide 100 (YTGEKP), 101 (YpTGEKP) und 103 (pYpTGEKP) als nicht-bindend folgende präzise Schlussfolgerungen auf das Bindemotiv des untersuchten anti-HpTGEKP-Antikörpers zu. Da nicht nur das, wie im Abschnitt 3.2.3 beschrieben, als Negativkontrolle eingesetzte Hexapeptid 00 (HTGEKP), sondern auch das Hexapeptid 100 (YTGEKP) nicht an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindet, zieht der Austausch eines Histidylrestes im Hexapeptid 00 (HTGEKP) gegen einen Tyrosinylrest (H-zu-Y-Austausch) im Hexapeptid 100 (YTGEKP) offensichtlich keine Veränderung auf das Bindemotiv des Antikörpers nach sich (vgl. Abbildung 20 C mit B). Im Gegensatz zum Hexapeptid 01 (HpTGEKP) bindet der anti-HpTGEKP-Antikörper die Hexapeptide 00 (HTGEKP) und 100 (YTGEKP) nicht (vgl. Abbildung 20 B und C mit A).

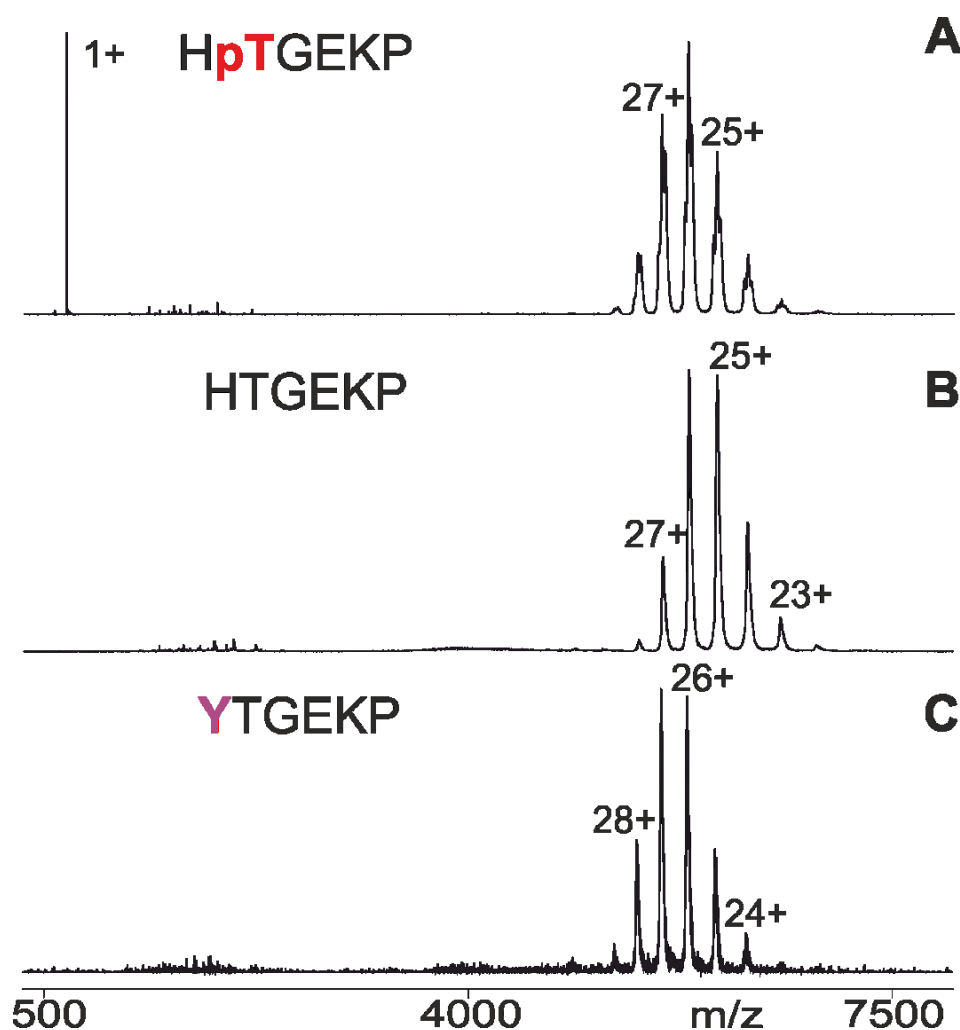


Abbildung 20: Vergleiche der nano-ESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Phospho-Hexapeptid

(Gemisch mit Peptid 01 vs. Gemisch mit Peptid 00 vs. Gemisch mit Peptid 100)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentrationen jeweils: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind erhöhte Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ). (A) Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. (B) Hexapeptid 00 (HTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. (C) Phospho-Hexapeptid 100 (YTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. Ladungszustände sind für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers, der Immunkomplexe (rechte Ionenreihe) und das aus dem Immunkomplex freigesetzte Peptid-Ionensignal (links) angegeben. Die Aminosäuresequenzen der in der jeweiligen Mischung enthaltenen Hexapeptide sind im Einbuchstabencode dargestellt. Der Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure. Das Proben-volumen betrug jeweils 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114, 132)</sup>.

Auch beim Vorliegen eines angrenzenden phosphorylierten Threoninylrestes (pT) führt der Austausch eines Histidinylrestes in Hexapeptid 01 (HpTGEKP) durch einen Tyrosinylrest in Hexapeptid 101 (YpTGEKP), der keine Polaritätsumkehr bewirkt, zu einer ausbleibenden Antikörperbindung (vgl. Abbildung 21 B zu A).

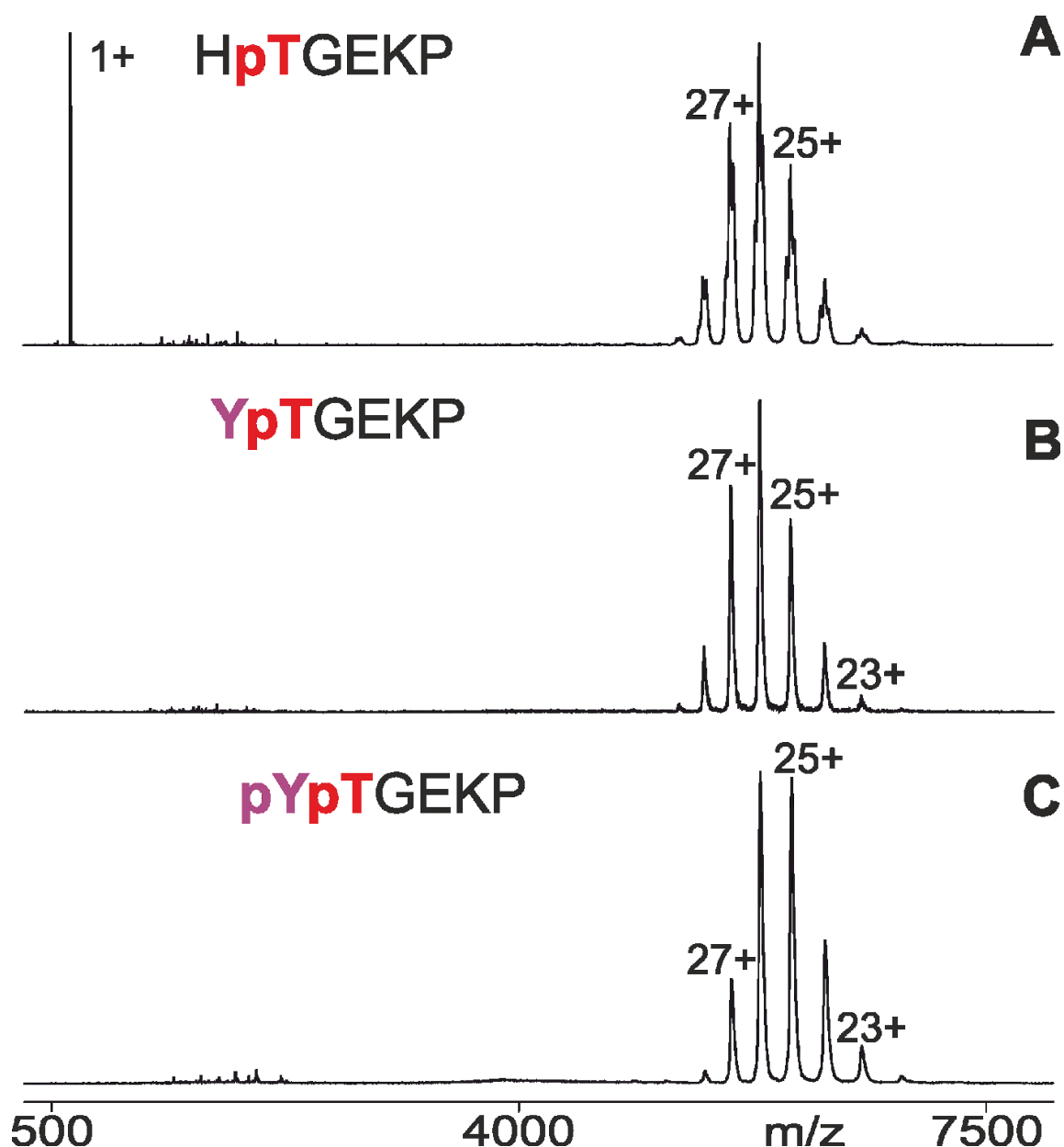


Abbildung 21: Vergleiche der nano-ESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Phospho-Hexapeptid (Gemisch mit Peptid 01 vs. Gemisch mit Peptid 101 vs. Gemisch mit Peptid 103). Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentrationen jeweils: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind erhöhte Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ). (A) Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. (B) Phospho-Hexapeptid 101 (YpTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. (C) Di-Phospho-Hexapeptid 103 (pYpTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. Ladungszustände sind für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers, der Immunkomplexe (rechte Ionenreihe) und das aus dem Immunkomplex freigesetzte Peptid-Ionensignal (links) angegeben. Die Aminosäuresequenzen der in der jeweiligen Mischung enthaltenen Hexapeptide sind im Einbuchstabencode dargestellt. Der Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure. Das Probenvolumen betrug jeweils 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

Weiterhin wird bezüglich der Erkennung des anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotivs der Austausch eines Histidinylrestes (H) durch einen phosphoryliertes Threoninylrest (pT), der die negative Polarität in der Nähe des phosphorylierten Threoninylrestes (pT) verstärkt, nicht toleriert (Hexapeptid 103; vgl. Abbildung 21 C mit A).

#### 3.4.2 Unorthodoxe Antikörperbindung

Das Gemisch aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP) zeigte analog zu den Gemischen aus anti-HpTGEKP-Antikörper und den Phospho-Hexapeptiden 03 (HpSGEKP), 04 (HpTHTHT) oder 08 (HpTGEKS) die vorgestellten Kriterien für eine spezifische Antikörperbindung in einer unorthodoxen Weise (s. Abschnitt 3.3.3. und Tab. 2). Resümierend zeigten sich in einer ITEM-TWO-Messreihe bei allen Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle die Signale der mehrfach geladenen Antikörperionen auf den hohen Massenseiten asymmetrisch verbreitert und wiesen nicht die Form eindeutig zu erkennender Satellitenionensignale auf (s. Abbildung 22 D, eingeschobene Vergrößerung). Darüber hinaus war bei erhöhten Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle, trotz blockierter Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ), ein einfach geladenes, Isotopen-aufgelöstes Ionensignal des aus dem Immunkomplex freigesetzten Phospho-Hexapeptids 102 (pYTGEKP) mit geringer Intensität bei  $m/z 774,34$  zu sehen (s. Abbildungen 22 B bis D und 23 B).

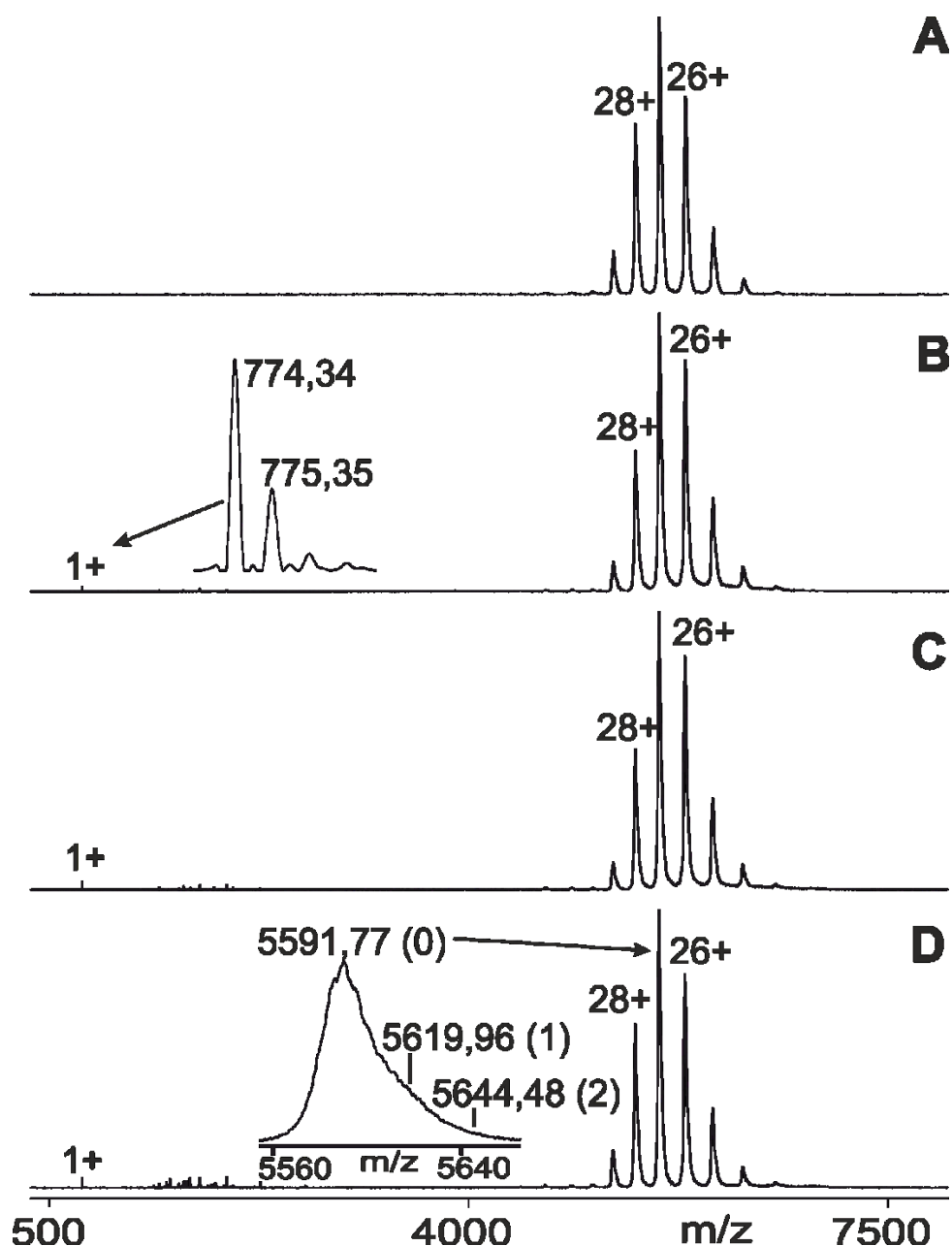


Abbildung 22: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP). Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 30 V, (C) 50 V, (D) 70 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der mutmaßlichen Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 27+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Addukt freigesetzten, einfach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 102 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

Im Gegensatz dazu zeigte bei gleichen Messbedingungen das Massenspektrum des nicht-bindenden Di-Phospho-Hexapeptids 103 (pYpTGEKP), was sich nur durch eine Phosphorylierung des Threoninylrestes (pT) an zweiter Position von dem Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP) unterscheidet und daher die zugehörige Negativkontrolle darstellt, keine Peptidionensignale auf den niedrigen Massenseiten (s. Abbildung 23 A).

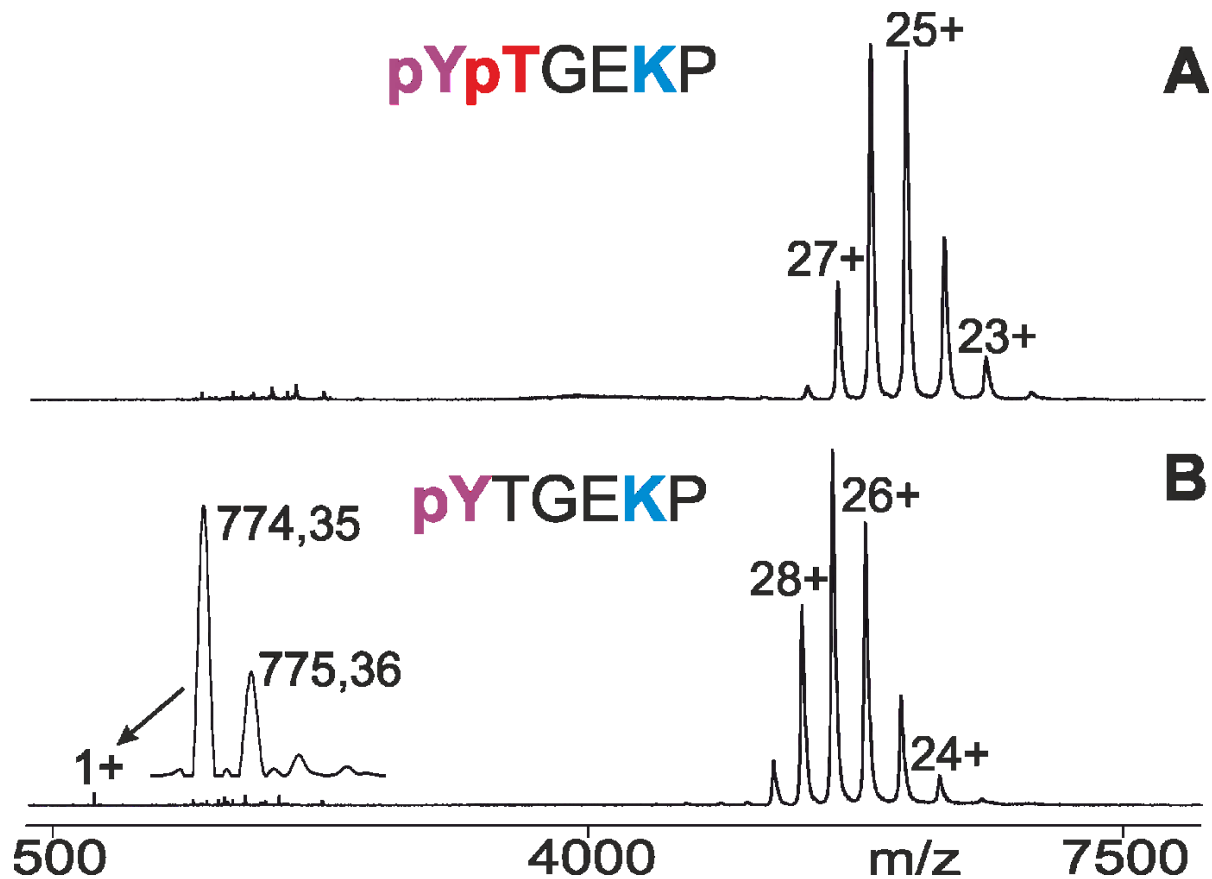


Abbildung 23: Vergleich der nano-ESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Phospho-Hexapeptid (Gemisch mit Peptid 103 vs. Gemisch mit Peptid 102)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentrationen jeweils: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind erhöhte Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ). (A) Di-Phospho-Hexapeptid 103 (pYpTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. (B) Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP),  $\Delta CV$  60 V. Ladungszustände sind für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers, der Immunkomplexe (rechte Ionenreihe) und das aus dem Immunkomplex freigesetzte Peptid-Ionensignal (links) angegeben. Die Aminosäuresequenzen der in der jeweiligen Mischung enthaltenen Hexapeptide sind im Einbuchstabencode dargestellt. Der Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

#### 3.4.3 3D-Strukturanalysen ausgewählter in Endometriumkarzinomen gehäuft mutierter ZNF-Linker

Die Ergebnisse des folgenden Abschnitts sind bereits in Scherf et al. <sup>(114)</sup> publiziert wurden. Da eine atomare Auflösung der Wechselwirkungen zwischen dem Epitop des Hexapeptids und dem Paratop des anti-HpTGEKP-Antikörpers mit ITEM-TWO nicht durch entsprechende Strukturanalysen (NMR bzw. Röntgenstrukturanalysen fehlen) unterlegt ist, wurde sich einem genaueren Verständnis der Epitop-Paratop-Interaktionen über modellierte 3D-Strukturanalysen ausgewählter Hexapeptide mit unterschiedlichem Antikörper-Bindungsverhalten auf molekularer Ebene genähert <sup>(114)</sup>. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Substantiierung struktureller Gründe dafür, dass das unorthodox bindende Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP; s. Abschnitt 3.4.2) bezüglich der Erkennung des anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotivs partiell toleriert wird, also das erforderliche Bindemotiv zumindest annähernd ausbildet ist. Die strukturellen Besonderheiten des Phospho-Hexapeptids 102 (pYTGEKP) werden dabei in Kontext zu denen der nicht-bindenden Phospho-Hexapeptide 101 (YpTGEKP) und 103 (pYpTGEKP) gesetzt (s. Abbildung 24), die wie Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP) einen in Endometriumkarzinomen gehäuft H-zu-Y-Austausch (H11Y) aufweisen <sup>(39)</sup>. Außerdem werden die strukturellen Besonderheiten mit denen der Kontrollpeptide HTGEKP (Hexapeptid 00; Negativkontrolle) und HpTGEKP (Hexapeptid 01; Positivkontrolle) verglichen (s. Abbildung 24).

Details zur, mittels Clusteranalyse aus ca. 2000 Konfirmationen durchgeführten Auswahl derjenigen Peptidstrukturen, die für die modellierten, vergleichenden 3D-Strukturanalysen verwendet wurden, sind im Abschnitt 6.2.3 sowie in Scherf et al. <sup>(114)</sup> beschrieben.

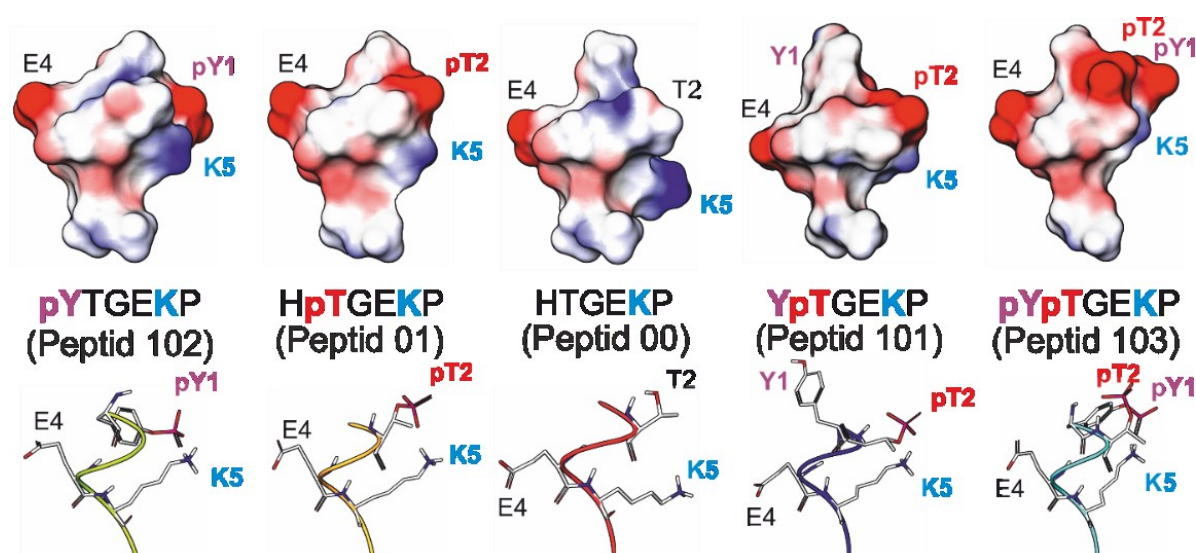


Abbildung 24: Oberflächenansichten (obere Reihe) und schematische Ansichten (untere Reihe) modellierter 3D-Strukturen von ausgewählten ZNF-Protein-Linker-Hexapeptiden.

Positionen von Teilflächen des phosphorylierten Threoninylrestes (rot markiert), des phosphorylierten Tyrosinylrestes (violett), des Lysinylrestes (blau) und des Glutaminylrestes (schwarz) des ZNF-Linker-Peptids sind im Einbuchstabencode gekennzeichnet. Ebenfalls im Einbuchstabencode dargestellte Aminosäuresequenzen ausgewählter ZNF-Linker-Peptide sind in beiden Reihen farblich gleich gekennzeichnet. Die Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure. Alle dargestellten Rückgrat-Konfigurationen sind vergleichbar. Die relativen Abstände und Ausrichtungen der Lysin-Aminogruppen und der Phosphatgruppen der ZNF-Linkerpeptide sind zwar ebenfalls ähnlich, unterscheiden sich allerdings entscheidend und begründen den Verlust der Antikörperbindung. Weitere Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen <sup>(114)</sup>.

Die Phospho-Hexapeptide 01 (HpTGEKP) und 102 (pYTGEKP) unterscheiden sich durch einen H-zu-Y-Austausch und die Lokalisation der Stelle ihrer Phosphorylierung. Allerdings heben sich diese beiden Unterschiede gegenseitig auf, sodass diese Phospho-Hexapeptide durch den anti-HpTGEKP-Antikörper gebunden werden können. Obwohl die Hexapeptide 101 (YpTGEKP) und 103 (pYpTGEKP), bezogen auf die Erkennung des Antikörperbindemotivs, ebenfalls eine gut platzierte Phosphatgruppe aufweisen, bindet der anti-HpTGEKP-Antikörper diese nicht. Begründend kann angeführt werden, dass das Di-Phospho-Hexapeptid 103 (pYpTGEKP) eine zweite Phosphatgruppe, und das Phospho-Hexapeptid 101 (YpTGEKP) einen sowohl eher hydrophoben als auch ziemlich sperrigen Tyrosinylrest in der Nähe der Phosphorylierungsstelle aufweist. Der anti-HpTGEKP-Antikörper bindet beide Hexapeptide nicht, da diese veränderten Aminosäureszusammensetzungen zum Verlust des Antikörperbindemotivs führen und die Peptide nicht erkannt werden können. Von besonderer Relevanz ist dabei, dass bei den Hexapeptiden 101 (YpTGEKP) und 103 (pYpTGEKP) das elektrostatische Erkennungs-

muster für die anti-HpTGEKP-Antikörper-Bindung, das vom „P“-Atom der Phosphatgruppe und dem „N“-Atom der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinyl-Aminosäurerestes gebildet wird, zu stark verändert ist. Im Gegensatz dazu, wird das unorthodox bindende Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP) aufgrund des phosphorylierten Tyrosinylrest (pY) vom anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotiv partiell toleriert, was nachfolgend erläutert wird. Der, verglichen mit dem Histidinylrest (H), größere phosphorylierte Tyrosinylrest (pY) ist in der Lage, die negative Ladung seiner Phosphatgruppe an eine Stelle zu platzieren, die vom anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotiv toleriert wird.

Weiterführend wurden Molekulardynamiksimulationen eines Linker-phosphorylierten ZNF-Dimers (abgeleitet von 1AAY: ZNF 268), bei dem der Histidinylrest (H) gegen einen phosphorylierten Tyrosinylrest (pY) ausgetauscht wurde, um einen pYTGQKP-ZNF-Linker zu erhalten, betrachtet. Die beiden Modellstrukturen zeigten in einer 20 ns dauernden Simulation, dass die Interaktionen zwischen phosphorylierten Tyrosinylrest (pY) und Lysinylrestes (K) stabil ist. Der Abstand zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinylrestes und dem „P“-Atom der Phosphatgruppe von 3,650 Å ermöglicht durch die Bildung einer Salzbrücke einen engen Kontakt, selbst wenn die ZNF-Domänen auf beiden Seiten des ZNF-Linkers vorhanden sind (s. Abbildung 25).

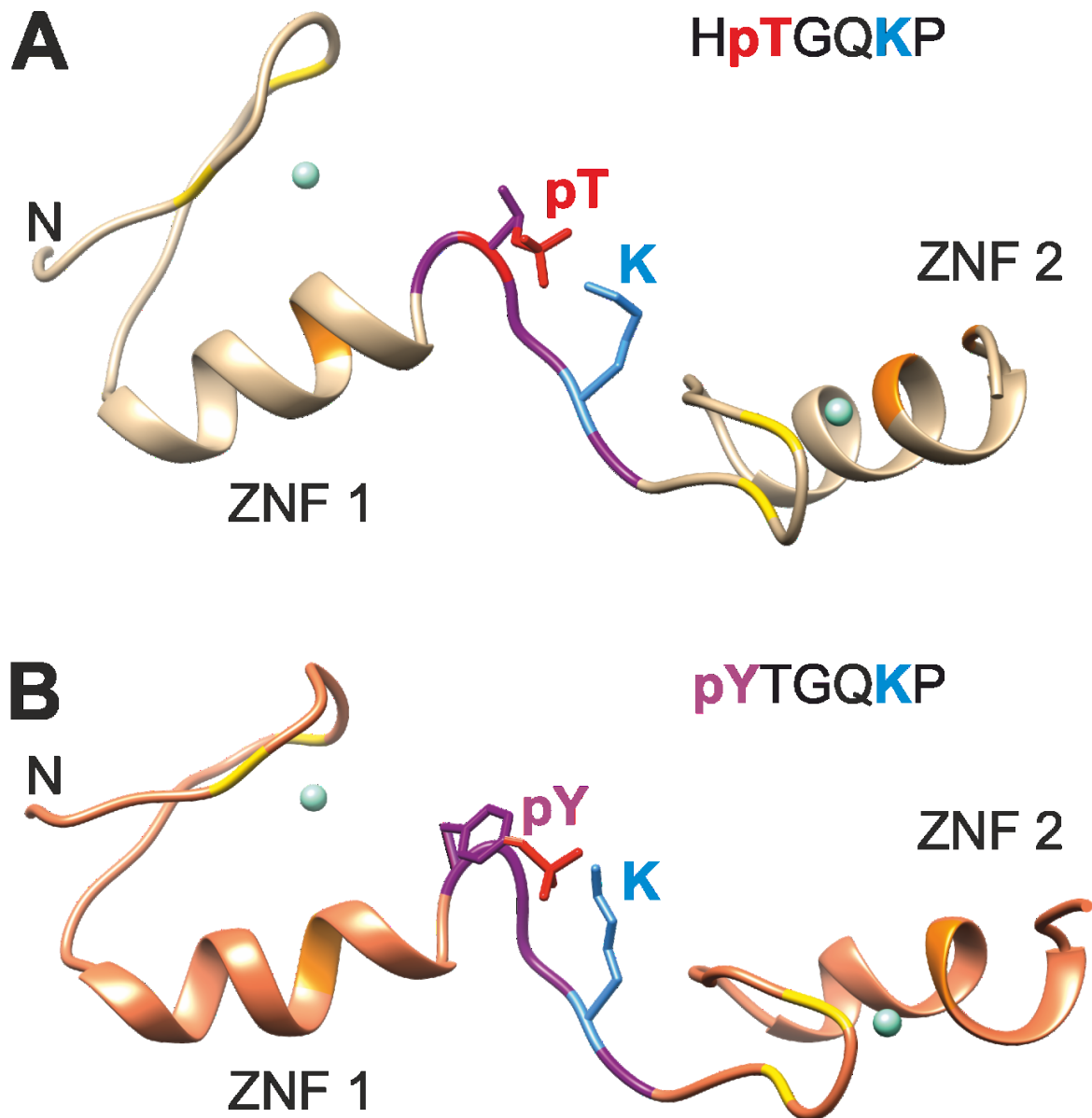


Abbildung 25: Modellerte Darstellungen der Konfigurationen der beiden ZNF-Domänen ZNF1 und ZNF2, die durch ein phosphoryliertes Linker-Hexapeptid verbunden sind

(A) Der HpTGQKP-Linker des modellierten ZNF-Dimers (ZNF 1 - ZNF 2) ist basierend auf der ZNF 268/DNA-Röntgenstruktur dargestellt. (B) Der dargestellte pYTGQKP-Linker wurde durch Einführung der entsprechenden Mutation und Phosphorylierung in die ZNF 268/DNA-Röntgenstruktur modelliert. Die Positionen des phosphorylierten Threoninylrestes (pT; rot), des phosphorylierten Tyrosinylrestes (pY; violett) und der Lysinylreste (K; blau) der ZNF-Linker-Peptide sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die N-Termini der Moleküle sind mit „N“ gekennzeichnet. Die Zinkatome sind als türkis gefärbte Kugeln dargestellt. Die Aminosäuresequenzen der Linker-Peptide sind oben rechts in den jeweiligen Abbildungsteilen farblich gleich gekennzeichnet. Beide Strukturen wurden energieoptimiert und die Simulationszeiten betragen jeweils 20 ns. Die Konfigurationen des Rückgrats (*backbone*) sind für beide modellierten Darstellungen vergleichbar. Die relativen Abstände und Ausrichtungen der Lysin-Aminogruppen und der Phosphogruppen der Linkerpeptide sind ebenfalls ähnlich. Weitere Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen<sup>(114)</sup>.

Solche Abstände unter 4 Å wurden in Konformationen auch für die alleinig am Tyrosinylrest phosphorylierten (pY) Linkerpeptide angenommen (vgl. Tab. 8).

Es kann zusammengefasst werden, dass alleinige Messungen des Atomabstands unter besonderer Berücksichtigung des „P“-Atoms der Phosphatgruppe und des „N“-Atoms der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinylrestes, nicht ausschließen können, dass eine der modellierten Peptidstrukturen den molekularen Erkennungscode trägt, der für eine spezifische anti-HpTGEKP-Antikörperbindung erforderlich ist. Allerdings konnten die Profile der Polaritätsoberflächen der mittels modellierter 3D-Strukturanalysen untersuchten Hexapeptide genügend Hinweise auf strukturelle Unterscheidungsmerkmale zwischen, einerseits den an den Antikörper bindenden Phospho-Hexapeptiden 01 (HpTGEKP) und 102 (pYTGEKP), und andererseits den nicht-bindenden Hexapeptiden 101 (YpTGEKP) und 103 (pYpTGEKP) liefern. Die deutlichen Unterschiede in den Profilen der Polaritätsoberflächen zwischen dem phosphorylierten, und an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindenden Hexapeptid 01 (HpTGEKP) sowie dem nicht-phosphorylierten, nicht-bindenden Hexapeptid 00 (HTGEKP), stehen in Übereinstimmung mit unseren experimentellen Ergebnissen (s. Abschnitte 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.4).

## **4. Diskussion**

### **4.1 Bedeutungen und Einschränkungen der Anwendung von ITEM-TWO zur Epitop-Feincharakterisierung von Antikörpern**

Massenspektrometrische Untersuchungen können erfolgreich eingesetzt werden, um Unterschiede in der Antikörperbindung von Peptiden mit einzelnen Aminosäureaustauschen zu differenzieren<sup>(183)</sup>. ITEM-TWO ist ein solches massenspektrometrisches Verfahren, das der Epitop-Feincharakterisierung von Antikörpern mit deutlicher Verringerung von Verbräuchen der Analysematerialien dient<sup>(114, 132, 140, 167)</sup>. Mit der Feincharakterisierung von Epitopen<sup>(143)</sup> können Aminosäurereste eines Epitops funktionell differenziert werden: Während bestimmte Aminosäurereste aktiv zur Immunkomplexbildung mit einem Antikörper beitragen, sind andere Aminosäurereste nur passiv an der Antikörperbindung beteiligt<sup>(114)</sup>. Solche passiv an der Antikörperbindung beteiligten Aminosäurereste sind nur aufgrund ihrer unmittelbaren Nähe zu den spezifitätsbestimmenden Positionen Teil des Epitops<sup>(114)</sup>. Ihr submolekularer Austausch kann vom, für die Antikörperbindung erforderlichen Bindemotiv toleriert werden, wie beispielsweise bei Untersuchungen des anti-HpTGEKP-Antikörpers der E-zu-K-Austausch, durch den das Hexapeptid 01 (HpTGEKP) in das Hexapeptid 05 (HpTGKKP) umgewandelt wurde, zeigen konnte<sup>(114)</sup> (s. Abschnitt 3.3.2). Demgegenüber steht allerdings der Austausch von Aminosäureresten, die aktiv zur Immunkomplexbildung mit einem Antikörper beitragen, durch den das für die Bindung essentiell benötigte Bindemotiv entweder nur noch partiell oder gar nicht mehr ausgebildet ist<sup>(114)</sup>. Die von diesem Austausch betroffenen Aminosäurereste befinden sich damit an spezifitätsbestimmenden Positionen innerhalb des Epitops<sup>(135, 136)</sup>.

Der Epitop-Paratop-Bindungstyp, bei dem alle essentiellen Wechselwirkungen zwischen den an der Bindung beteiligten Aminosäureresten ausgebildet sind (auf der Sub-Epitopebene), wird als orthodoxe Bindung bezeichnet<sup>(132)</sup> (orthodoxer Bindungstyp, s. Abbildung 26 A). Wenn das Bindemotiv nur noch partiell ausgebildet ist, wird der vorliegende Epitop-Paratop-Bindungstyp auf der Sub-Epitopebene als unorthodox bezeichnet (unorthodoxer Bindungstyp, s. Abbildung 26 B)<sup>(132)</sup>. D. h. die Epitop-Paratop-Interaktion ist, verglichen mit dem orthodoxen Bindungstyp schwächer<sup>(132)</sup> (vgl. Abbildung 26 B mit A). Dies zeigen z. B. die Untersuchungen des anti-HpTGEKP-Antikörpers zum H-zu-Y-Austausch, durch den das Hexapeptid 01 (HpTGEKP) in das Hexapeptid 102 (pYTGEKP) umgewandelt wurde<sup>(132)</sup> (s. Abschnitt 3.4.2). Beim Vorliegen einer spezifischen Antikörper-Peptid-Bindung, kann auf der Sub-Epitopebene ein orthodoxer von einem unorthodoxen Epitop-Paratop-Bindungstyp differenziert werden<sup>(132)</sup> (s. Abbildung 26 E).

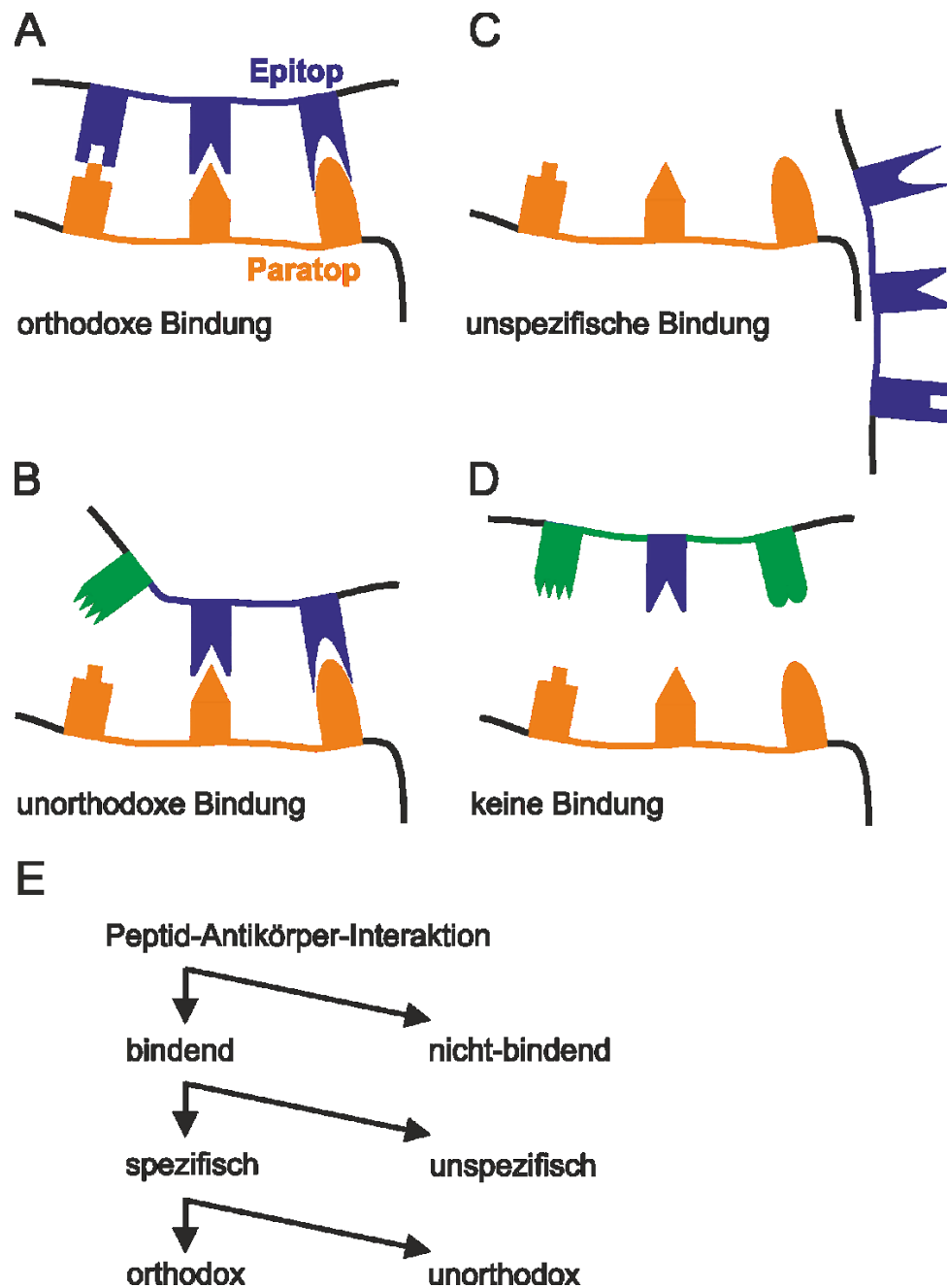


Abbildung 26: Schematische Darstellungen der genauen Differenzierung von Peptid-Antikörper-Interaktionen auf Sub-Epitopebene

Die genaue Differenzierung von Peptid-Antikörper-Interaktionen ist auf Sub-Epitopebene, d. h. auf der Ebene der einzelnen Aminosäurereste, dargestellt. (A) Beim orthodoxen Epitop-Paratop-Bindungstyp sind alle essentiellen Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Aminosäureresten ausgebildet. (B) Beim unorthodoxen Epitop-Paratop-Bindungstyp sind aufgrund von Aminosäureaustauschen nicht alle Wechselwirkungen vorhanden. (C) Beim unspezifischen Bindungstyp finden keine Epitop-Paratop-Interaktionen statt. Dabei bindet das Epitop, mit oftmals unklaren Wechselwirkungen, an eine außerhalb des Paratops gelegene Stelle auf der Oberfläche des Antikörpers. (D) Es liegt keine Antikörper-Peptid-Bindung vor. Das Bindemotiv des Epitoppeptids ist mit blauen bzw. grünen Symbolen gekennzeichnet, die in der Paratoptasche befindlichen und wechselwirkenden Aminosäurereste mit orangenen Symbolen. (E) Dargestellt ist ein Entscheidungsbaum, für die genaue Differenzierung einer Peptid-Antikörper-Interaktion.

Eine unorthodoxe Bindung eines Epitops an das zugehörige Paratop (s. Abbildung 26 B) darf also nicht mit einer unspezifischen Bindung (s. Abbildung 26 C und E) verwechselt werden. Letztere ist eine Bindung eines Epitops an eine ansonsten unbeteiligte Stelle auf der Oberfläche des Antikörpers mit oftmals unklaren Wechselwirkungen.

Der submolekulare Austausch von Aminosäureresten an spezifitätsbestimmenden Positionen innerhalb des Epitops<sup>(135, 136)</sup> kann allerdings auch dazu führen, dass das für die Bindung essentiell benötigte Bindemotiv komplett zerstört ist, d. h. es liegt keine Antikörper-Peptid-Bindung vor (s. Abbildung 26 D und E). Diesen Fall zeigen beispielsweise die Untersuchungen des anti-HpTGEKP-Antikörpers zum H-zu-Y-Austausch, durch den das Hexapeptid 01 (HpTGEKP) in das Hexapeptid 101 (YpTGEKP) umgewandelt wurde<sup>(114)</sup> (s. Abschnitt 3.4.1).

Der aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertationsschrift neu eingeführte unorthodoxe Epitop-Paratop-Bindungstyp<sup>(132)</sup> (s. Abbildung 26 B) sollte zukünftig mittels alternativer Epitop-Feincharakterisierungs-Verfahren (s. Abschnitt 1.2.4) analysiert werden, um die Unterscheidung zu unspezifischen Bindungen zu bestätigen.

Die Feincharakterisierung von Epitopen, z. B. mittels ITEM-TWO, ist bedeutend für die Interpretation experimenteller Daten von Antikörpern: Anwendungen für Untersuchungen spezifischer Proteine und ihrer Mutanten in biomedizinischer Forschung, Diagnostik und Therapie sind auf das unveränderte Vorhandensein des Erkennungsmotivs eines Antikörpers, d. h. seines Epitops, angewiesen<sup>(134)</sup> (s. Abschnitt 4.3).

Direkte ESI-MS-Messungen sind zur Untersuchung von Antikörper-Peptid-Bindungen nur geeignet, wenn die Bindung zu einer hohen Ausbeute an Immunkomplexen führt und deren Ionensignale als deutlich sichtbare Satellitenionensignale sichtbar sind, oder auf der m/z-Skala aufgrund der Massenzunahme deutlich verschoben sind. Dies konnte häufig beobachtet werden und ist auch in der Literatur dargestellt<sup>(184)</sup>. Allerdings kann dieser direkte Bindungsnachweis allein insbesondere dann nicht mehr ausreichend sein, wenn ein Antikörper (z. B. der anti-HpTGEKP-Antikörper) unter verschiedenen Epitoppeptiden mit nur geringfügig unterschiedlichen Massen (z. B. Hexapeptide 100 bis 103 der in Endometriumkarzinomen mutierten ZNF-Linkersequenzen) ein Epitoppeptid bindet (z. B. Hexapeptid 102)<sup>(114)</sup>. Die Massenauflösung ist dann nicht ausreichend hoch, um die geringen Massenunterschiede eindeutig differenzieren zu können<sup>(114)</sup>. Zusätzlich gilt es zu berücksichtigen, dass bei lediglich einer Verbreiterung der Antikörperionensignale auf ihrer Flanke mit höherer Masse anstelle von Satellitenionensignalen, dies lediglich als Hinweis und damit keinesfalls beweisend für eine Antikörper-Peptid-Bindung interpretiert werden kann<sup>(114)</sup>. Dieser Fall tritt z. B. ein, wenn nur wenig Komplex ausgebildet wird und die Komplexionensignale nicht intensiv in Erscheinung treten. Dieser Fall wird durch den Vergleich

der Antikörperionensignale in Antikörper-Peptid-Gemischen mit unorthodox bindenden (z. B. Phospho-Hexapeptid 102, s. Abschnitt 3.4.2) und nicht-bindenden Hexapeptiden (z. B. Hexapeptid 101, s. Abschnitt 3.4.1) verdeutlicht. Der qualitative Beweis des Vorhandenseins bzw. Fehlens einer Antikörper-Peptid-Bindung gelingt jedoch zweifelsfrei mittels ITEM-TWO. Unabhängig von den oben genannten Einschränkungen werden dabei aus einem Immunkomplex protonierte Epitopeptide freigesetzt und deren Ionensignale im niedrigen Massenbereich des Massenspektrums mit Isotopenauflösung nachgewiesen (orthodoxe oder unorthodoxe Antikörperbindung)<sup>(132)</sup>. Im Gegensatz dazu ist die Abwesenheit von Peptidionensignalen ein Beweis dafür, dass keine Antikörperbindung entstand, also kein Immunkomplex gebildet wurde<sup>(114)</sup>.

Al-Majdoub et al.<sup>(183)</sup> berichten, dass ein Verlust einer Antikörper-Peptid-Bindung durch einen Austausch des Argininylnrestes (R) gegen einen Prolinylnrest (P) höchstwahrscheinlich auf eine Unterbrechung der Sekundärstruktur eines  $\alpha$ -helicalen Peptids zurückzuführen sei. Die in dieser Dissertationsschrift vorgestellten Ergebnisse (s. Abschnitt 3.4) sind allesamt davon zu unterscheiden. Der Verlust der Antikörper-Peptid-Bindung fand durchweg durch einzelne Aminosäureaustausche statt und nicht aufgrund einer Strukturveränderung höherer Ordnung. Begründend ist anzuführen, dass die modellierten 3D-Strukturanalysen aller untersuchten Peptide trotz des H-zu-Y- oder H-zu-pY-Austauschs nahezu identische Rückgrat-Konfigurationen aufweisen und auffällige Strukturabweichungen hauptsächlich die Orientierungen der Seitenketten der Aminosäurereste im Verhältnis zueinander betreffen<sup>(114)</sup>. Obwohl diese, als ursächlich für den Verlust der Antikörper-Peptid-Bindung angenommene Strukturveränderung, im Gegensatz zu einer Sekundärstrukturveränderung eher subtil ist, beeinträchtigten sie erheblich den molekularen Erkennungscode für den anti-HpTGEKP-Antikörper, wie durch ITEM-TWO nachgewiesen wurde<sup>(114)</sup> (s. Abschnitt 3.4). Die partielle Wiederherstellung des anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotivs bei Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP) kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass nur die Phosphogruppe am Tyrosinylnrest die Position erreichen kann, die sonst von der Phosphogruppe des Threoninylnrestes in Hexapeptid 01 (HpTGEKP) besetzt ist, weil die Seitenkette des Tyrosinylnrestes im Vergleich zu der des Histidinylnrestes größer ist<sup>(114)</sup>.

Neben dem partiellen oder kompletten Verlust des molekularen Erkennungscode eines Antikörpers aufgrund umfassender struktureller Veränderungen (z. B. Änderung der Faltung des Rückgrats), müssen also lokal veränderte biochemische Eigenschaften an den direkten Positionen der jeweilig ausgetauschten und veränderten Aminosäurereste berücksichtigt werden. Diese können zu einem unterschiedlichen Antikörperbindungsverhalten von Epitopeptiden führen (z. B. Umkehr der Ladung polarer Reste, etwa bei E-zu-K-Austauschen)<sup>(137)</sup>.

Einschränkungen des ITEM-TWO-Verfahrens im Hinblick auf die Übertragbarkeit der gemessenen Immunkomplexdissoziationsenergien in der Gasphase auf das Verhalten von Immunkomplexstrukturen in Lösung ergeben sich daraus, dass in der Gasphase nuancierten Strukturveränderungen der Aminosäurereste an den äußeren Oberflächen der Immunkomplexionen vorliegen, da deren Wechselwirkungen mit Lösungsmolekülen nun fehlen (s. Abschnitt 1.3.3). Diese Veränderungen sind allerdings im Bereich der direkten Komplex-Oberflächen minimal<sup>(132, 139, 140)</sup>, sollten aber nicht komplett vernachlässigt werden. Die Ähnlichkeit der in der Gasphase bestimmten Bindungsstärken zu jenen in Lösung - bezogen auf die jeweilige Reihenfolge mehrerer Epitop-Paratop-Bindungspartner im Vergleich, also nicht auf die jeweiligen Absolutwerte - ist dann besonders hoch, wenn in Lösung bereits die Epitop-Konformation so existiert wie in der gebundenen Konformation. Mit anderen Worten: Wenn die im Komplex vorherrschende Konformation bereits in Lösung auf Seiten des Epitops - unabhängig davon, ob ein Antikörper in der Nähe ist - existiert, dann stimmen die, anhand der Bindungsenergien in Lösung ermittelten Reihenfolgen mit denen der Dissoziationsenergien in der Gasphase gut überein. Ist dies nicht der Fall und die Konformation des komplexierten Epitops bildet sich in Lösung erst während der Bindung an das Paratop des Antikörpers, dann sind in Lösung zusätzliche energetische Hürden zu überwinden, die sich bei der Dissoziation des Immunkomplexes in der Gasphase nicht nachvollziehen lassen. Somit kann es dann dazu kommen, dass eine Reihenfolge der Bindungsenergien in Lösung von der der Dissoziationsenergien in der Gasphase abweichen kann.

Die Klärung der Frage, welcher der beiden oben skizzierten Fälle (die gebundene Epitopkonformation ist in Lösung vorgebildet oder nicht) in einer gegebenen Epitopstruktur einer Untersuchungsreihe vorliegt, gelingt mit Hilfe des *molecular modelings*<sup>(137)</sup>. In der vorliegenden Dissertationsschrift wurden 3D-Strukturanalysen der Epitoppeptide in Zusammenhang mit dem ITEM-TWO-Verfahren vorgenommen, um den molekularen Erkennungscode eines Antikörpers zu entschlüsseln sowie abzuklären, dass die massenspektrometrisch erzielten Ergebnisse in der Gasphase mit denen in Lösung vergleichbar sind<sup>(114)</sup> (s. Abschnitt 3.4.3).

Mit der, auf die Epitop-Feincharakterisierung von Antikörpern angewandten, Visualisierung und Berechnung definierter struktureller Peptideigenschaften aus modellierten 3D-Strukturanalysen werden experimentelle Daten in einen 3D-Struktur-Kontext gestellt<sup>(185)</sup>. Die Verknüpfung experimenteller Daten mit computergestützten Ansätzen ermöglicht es, Schlussfolgerungen mit atomarer Auflösung zu ziehen<sup>(186)</sup>. Durch die Kombination von Massenspektrometrie und Molekulardynamiksimulationen lassen sich strukturelle Umlagerungen von nicht-kovalenten Proteinkomplexen im Hinblick auf ihren Übergang von

der kondensierten Phase in die Gasphase mit einer Auflösung bis zu einer einzigen Aminosäure untersuchen<sup>(139)</sup>.

## 4.2. Bedeutung von Missense-Mutationen für die Epitopstruktur und eine assoziierte Tumor-Diagnostik

ZNF-Proteine bilden die größte Klasse von Transkriptionsfaktoren beim Menschen und die Unterklasse der C2H2-ZNF-Proteine werden von über 750 bekannten Genen kodiert<sup>(187)</sup>. ZNF-Gene fungieren als Tumorsuppressoren in der Genregulation z.B. durch die Regulierung des Verknüpfens Heterochromatin-induzierender Faktoren<sup>(188)</sup>. ZNF-Proteine kommen also prinzipiell für die Tumordiagnostik in Frage und entsprechende diagnostische Antikörper können eine hohe Wertigkeit erlangen. Der Austausch einzelner Aminosäurereste, etwa von ZNF-Linkersequenzen, kann jedoch zu einem Verlust der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren über C2H2-ZNF-Domänen führen<sup>(189)</sup>, was bei einer Antikörper-basierten Diagnostik zu berücksichtigen ist. Die Gene der ZNF-Proteine können karzinomrelevante somatische Mutationen aufweisen<sup>(39)</sup>. Eine Missense-Mutation führt, durch den Austausch des Histidylrestes (H11Y-Austausch), welcher als einer von vier Aminosäureresten in der Koordination des Zinkatoms der ZNF eingebunden ist<sup>(114)</sup>, zu einem oben beschriebenen Verlust der DNA-Bindung. Für die optimierte DNA-Bindung ist auch der ausgetauschte Histidylrest (H) als Bestandteil der ZNF-Linkersequenzen zwischen den ZNF-Domänen verantwortlich<sup>(189, 190)</sup>. Im Gegensatz zu einem Austausch des Histidylrestes (H) durch einen Cysteinylrest (C), kann also davon ausgegangen werden, dass ein Austausch eines Histidylrestes (H) durch einen Tyrosinylrest (Y) die Zinkkoordination schwächt bzw. aufhebt<sup>(39, 191, 192)</sup>. Neben Histidylresten (H) spielen weiterhin anscheinend insbesondere Threoninylreste (T) und Serinylreste (S) der ZNF-Linkersequenzen eine Rolle für die DNA-Bindung<sup>(193)</sup>. Die DNA-Bindung bestimmter Proteine wird z. B. auch durch die Phosphorylierung von Aminosäureresten der ZNF-Linkersequenzen reduziert<sup>(194-196)</sup>, was auch maßgebend für die Steuerung von Prozessen der zellulären Differenzierung und Reifung angesehen wird<sup>(197)</sup>.

Der bei Munroe et al.<sup>(39)</sup> beim Endometriumkarzinom gehäufte H11Y-Austausch betrifft exakt die erste Position der als Hexapeptide untersuchten Linker-Regionen von ZNF-Proteinen. Dieser H-zu-Y-Austausch stellt eine Einzelaminosäure-Missense-Mutation dar<sup>(39)</sup>, die durch Veränderungen im Basentriplett CAU zu UAU bzw. CAC zu UAC auf DNA-Ebene ausgelöst wird und eine pathogene Veränderung zur Folge hat (Treibermutation). Mutationen sind nicht mit einem Einzelaminosäure-Polymorphismus (*single amino acid polymorphism*, SAP) zu verwechseln. Zwar ist ein SAP ebenfalls auf einen Einzelnukleotid-Austausch (*single*

*nucleotide polymorphism*, SNP) zurückzuführen, der jedoch als Polymorphismus nicht zwingend pathogene Folgen nach sich zieht<sup>(198)</sup>.

Das Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP) stellte in den Untersuchungen des, beim Endometriumkarzinom in ZNF-Linkersequenzen durch Punktmutation gehäuft auftretenden H11Y-Austauschs<sup>(39)</sup>, das einzige Bindemotiv dar, an das der anti-HpTGEKP-Antikörper binden konnte (s. Abschnitt 3.4.2). Damit scheidet der anti-HpTGEKP-Antikörper zur Diagnostik des H11Y-Austauschs bei ZNF-Linker-Hexapeptiden im Allgemeinen und damit beim Endometriumkarzinoms im Speziellen in der klinischen Praxis aus.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen dienen zur präzisen Bestimmung von Epitop-Strukturen und damit der genauen Bestimmung von spezifischen sowie orthodoxen Antikörper-Interaktionen, mit dem Ziel die Antikörper-basierte Tumordiagnostik noch verlässlicher zu gestalten.

Die Bedeutung von Antikörperanalysen in experimentellen Untersuchungen wird im Fall absichtlich eingeführter ZNF-Linkermutationen im ZNF-Protein 809 nachfolgend verdeutlicht. Die immunanalytischen Untersuchungen lieferten Hinweise auf mutationsbedingte Veränderung der Proteinlokalisierung, d. h. die Markierung entsprechender Proteine durch immunfluoreszenzmarkierte Antikörper wechselte vom Zellkern zum Nukleolus<sup>(199)</sup>. Diese Studie weist auf die Bedeutung spezifischer Antikörper als Hilfsmittel für zellbiologische Untersuchungen hin, welche nur dann gelingen, wenn die strukturelle Integrität des Epitops nicht beeinträchtigt wird<sup>(114)</sup>. Das in dieser Dissertationsschrift gezeigte Beispiel stellt heraus, dass die Annahme der strukturellen Integrität des Epitops nach Mutation nicht zwangsläufig eingehalten ist (s. Abschnitt 3.4).

Die Bedeutung jeglicher Missense-Mutationen an exakt Position 11 der ZNF-Protein-Gene (die z. B. zum untersuchten H11Y-Austausch führen können, s. Abschnitt 3.4) im Hinblick auf Tumorentwicklung und -progression im Allgemeinen wird nachfolgend hervorgehoben: Missense-Mutationen an Position 11 konnten in Genen, z. B. dem ZNF-Protein-331-Gen, nachgewiesen werden, die in einer Erhebung von kausal für Tumore verantwortlichen Genen (*Cancer Gene Causus*) gelistet sind<sup>(200)</sup>. Darüber hinaus gibt es noch weitere ZNF-Gene mit nachgewiesenen Missense-Mutationen an Position 11, die zwar im *Cancer Gene Causus* nicht aufgeführt sind, aber dennoch eine Rolle in der Tumorentwicklung und -progression spielen. Dazu gehören z. B. die Gene PEG 3, ZNF 382, ZNF 420, ZNF 273, ZNF 677 und ZFP 28<sup>(39)</sup>.

Den H-zu-Y-Austausch in ZNF-Linkersequenzen durch somatische Mutationen wiesen neben dem Endometriumkarzinom, bei dem funktionell bedeutende Positionen in ZNF-Domänen 18 % häufiger als zufällig erwartet mutiert sind, weitere Karzinome gehäuft

auf<sup>(39)</sup>. Dazu gehört neben dem Melanom auch das Kolorektalen Karzinom<sup>(39)</sup>. Die Bedeutung des H11Y-Austauschs wird verdeutlicht, wenn man bedenkt, dass sich beim Melanom ein Austausch auf Position 11 fast ausschließlich als H11Y-Austausch darstellt<sup>(39)</sup>.

Beim Kolorektalen Karzinom wurde das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen ZNF-Proteine hinsichtlich der Verwendung als möglicher Marker in der Frühdiagnostik untersucht<sup>(201)</sup>.

Das Gen für das ZNF-Protein 331, dessen Punktmutationen zum untersuchten H11Y-Austausch führt<sup>(39)</sup> (s. Abschnitte 1.1.4 und 3.4), wurde im Magenkarzinom zwar unmutiert, aber herunterreguliert nachgewiesen, was in engem Zusammenhang mit der Hypermethylierung des Promotors steht<sup>(202)</sup>. Wang et al.<sup>(203)</sup> wiesen in ca. 67 % der Kolorektalen Karzinome eine Methylierung nach, und da der Verlust bzw. die verringerte Expression von ZNF-Protein 331 mit der Methylierung der Promotorregion korreliert, wird auch hier der Zusammenhang eines herunterregulierten ZNF-Proteins 331 mit einem Karzinom deutlich. Vedeld et al.<sup>(204)</sup> sahen sogar in der veränderte Methylierung des Promotors für das ZNF-Protein 331 Potential für einen Biomarker mit hoher Sensitivität (ca. 71 %) und Spezifität (ca. 98 %) des Kolorektalen Karzinoms. Eine Promotor-Hypermethylierung für ZNF-Protein 331 konnte auch beim Ösophaguskarzinom gezeigt werden<sup>(205)</sup>.

Da zwei völlig unterschiedliche zelluläre Prozesse, einerseits die H11Y-Mutation und andererseits eine Promotor-Methylierung, dazu führen, dass wenig bis gar kein funktionelles ZNF-Protein 331 in der Zelle vorliegt, kann man Folgendes schlussfolgern: Der Verlust des funktionellen ZNF-Proteins steht in direktem Zusammenhang mit der Tumorentwicklung, es handelt sich also um eine Treibermutation (*driver mutation*). Eine genauere Untersuchung zum Auftreten dieser Mutation ist daher von großem Interesse, insbesondere wenn diese zu einer Therapie-Entscheidung herangezogen werden kann.

Im Hinblick auf die Entstehung und Progression von Tumoren im Allgemeinen können Genmutationen in Treibermutationen und Passenger-Mutationen (*passenger mutations*) unterteilt werden<sup>(206, 207)</sup>, für die jeweils Mutationen in ZNF-Proteinen beispielhaft angeführt werden können<sup>(36-38, 114)</sup>. Treibermutationen, wie z. B. die PTEN-Genmutation beim Endometriumkarzinom<sup>(21)</sup> (s. Abschnitt 1.1.3), verschaffen Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil und führen zu einer leicht schnelleren klonalen Expansionsrate eines Tumors<sup>(206)</sup>. Bozic et al.<sup>(206)</sup> gehen davon aus, dass Treibermutationen die Probabilität verringern, dass Zellen differenzieren, sterben oder altern und folglich die Anzahl der Tumorzellen erhöht wird. Im Gegensatz dazu, verändern Passenger-Mutationen die Lebensfähigkeit einer Zelle nicht und finden sich in Zellen, die gleichzeitig oder später eine Treibermutation aufweisen<sup>(206)</sup>. Da jeder nachfolgende Klon einer Tumormutante eine

schnellere Wachstumsrate als derjenige davor aufweist, wird angenommen, dass der Erwerb nachfolgender Treibermutationen mit zunehmender Tumorprogression zunimmt<sup>(206)</sup>. Auch eine Einteilung zu den Treiber- oder Passengermutationen trägt zum Verständnis der Rolle einer Antikörper-basiert untersuchten Mutation, z. B. einer ZNF-Linkermutation (s. Abschnitt 3.4), bei.

### 4.3 Ausblick

Im Hinblick auf Untersuchung veränderter Antikörperbindungen bei sowohl Einzelaminosäure-Missense-Mutation, als auch bei SAPs des Epitopeptids stellt sich die Frage, ob das für die Bindung essentiell benötigte Bindemotiv eines Antikörpers (hier des anti-HpTGEKP-Antikörpers) auch bei weiteren Aminosäureaustauschen, die in dieser Arbeit nicht getestet wurden, noch ausgebildet ist<sup>(114)</sup>. Um dieser Frage nachzugehen, könnte man die kodierende SNP-Datenbank konsultieren (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>; Zugriff: 23. Januar 2023, 10:23 Uhr) und anschließend mittels ITEM-TWO testen, ob der Antikörper ein Peptid binden kann, das einen SAP aufweist<sup>(114)</sup>. Um die Bedeutung eines untersuchten SAP im klinischen Kontext zu erläutern, müsste noch im Hinblick auf dessen Relevanz, die Häufigkeiten der, den Austausch zugrundeliegenden Mutationen erforscht werden. Mögliche, durch SAPs in den Epitopeptiden bedingte, diagnostische Verzerrungen in der Bindung eines Antikörpers mit nicht hinreichend bekanntem molekularen Erkennungscode können auch durch SNP-Analysen ausgeschlossen werden<sup>(208, 209)</sup>. Alternativ kann – sofern vorhanden – ein noch spezifischerer Antikörper diagnostisch eingesetzt werden, der möglichst viele der am häufigsten vorkommenden SAPs von klinischer Relevanz markiert, um den Anforderungen der individualisierten Medizin gerecht zu werden<sup>(210)</sup>. Folglich sollte bekannt sein, welches Bindemotiv der Antikörper toleriert und bei welchen Mutationen bzw. Aminosäureaustauschen ein Einsatz keine diagnostisch ausreichenden Informationen liefert. Nur mit den bestmöglich validierten Antikörpern können in der Diagnostik, aber auch in der Forschung und Therapie eindeutige und gesicherte Ergebnisse erzielt werden.

Eine Ursache der Reproduzierbarkeitskrise in der Medizin<sup>(211)</sup> stellen nicht umfänglich verstandene Epitop-Paratop-Interaktionen dar. Aus diesen nicht vollständig untersuchten Epitop-Paratop-Interaktionen können sich potentielle Kreuzreaktivitäten des betreffenden Antikörpers mit anderen Proteinen ergeben bzw. durch Mutationen leicht veränderte Epitopeptidsequenzen können Antikörper-Bindungsänderungen auslösen. Bei einer vorliegenden, aber unerkannten Kreuzreaktivität eines Antikörpers mit anderen Epitopeptiden, besteht also die Gefahr, fälschlicherweise von einer nachgewiesenen Bindung an dessen Epitop-Zielstruktur auszugehen. Umgekehrt kann eine Bindung ausbleiben, weil im Epitopbereich nur ein einziger Aminosäurerest in Folge einer Mutation

ausgetauscht wird, was als „falsch-negatives“ Ergebnis zu werten wäre. Folglich wird klar, dass eine präzise Validierung eines jeden Antikörpers eine Analyse aller potentiellen Kreuzreaktivitäten des Antikörpers umfassen sollte<sup>(212)</sup>. Dies gilt nicht nur für Antikörper mit unbekanntem Bindemotiv, sondern auch für Antikörper, die gegen ein exaktes Bindemotiv synthetisiert und getestet wurden, z. B. den in dieser Arbeit untersuchten monoklonalen anti-HpTGEKP-Antikörper.

Das ITEM-TWO-Verfahren ist für die präzise Charakterisierung von Antikörper-Bindemotiven auf Aminosäure-Ebene exzellent geeignet und damit auch bedeutend für die Aufklärung von Antikörper-Bindeeigenschaften<sup>(132)</sup>. Letzteres soll in der klinischen Diagnostik z. B. des Endometriumkarzinoms Verwendung finden. Ein vermehrter Einsatz in der klinischen Diagnostik im Allgemeinen bietet sich bei präzisen Ergebnissen zur Bindung einer Epitopeptidsequenz durch einen Antikörper und gleichzeitig geringem Materialverbrauch sowie Schnelligkeit der Analyse<sup>(114, 132, 140, 167)</sup> an. Die Prüfung von Peptid-Antikörper-Wechselwirkungen, d. h. die Epitop-Feincharakterisierung mittels ITEM-TWO, liefert wertvolle Informationen über die Bindungsfähigkeit eines Antikörpers an sein Antigen<sup>(140)</sup>. Dies ist insbesondere der Fall, wenn das eigentliche Wildtyp-Protein oder dessen mutiertes Proteinderivat weder kloniert, exprimiert, aufbereitet und gereinigt noch aus dem entsprechenden Gewebe bzw. Tumor isoliert wurde<sup>(114)</sup>. Somit können Antikörper-basierte experimentelle Ergebnisse im Hinblick auf die Variabilität des Antikörper-Bindemotivs genauer interpretiert werden. Dies gilt für in der medizinischen Diagnostik eingesetzte Antikörper, deren Bindungserkennungen mit ITEM-TWO präzise validiert werden können, da klar wird, ob der betreffende Antikörper Mutationen, die zu einer veränderten Epitopstruktur führen, toleriert. Der betreffende Antikörper kann nach einer ITEM-TWO-Analyse weiterhin hinsichtlich seines diagnostischen Einsatzes genau definiert werden, da nicht nur die Bindung an das Zielantigen bekannt ist, sondern auch die Bindung an veränderte Epitopstrukturen bzw. andere Proteine. Weiterhin liefert eine Feincharakterisierung der Epitopstruktur mittels ITEM-TWO bei therapeutisch eingesetzten Antikörpern Informationen zur Frage, bei Bindung an welchen Proteinen bzw. veränderten Epitopeptidsequenzen mit Effekten außerhalb der Epitop-Zielstruktur (Off-Target-Effekten = unspezifische Bindung) zu rechnen ist.

## **5. Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels des Epitop-Feincharakterisierungsverfahrens ITEM-TWO untersucht, inwieweit das für die Antikörperbindung erforderliche Bindemotiv des anti-HpTGEKP-Antikörpers, der gegen die häufigste vorkommende C2H2-ZNF-Linkersequenz HpTGEKP synthetisiert wurde, dezidierte Aminosäureaustausche bzw. einen veränderten Phosphorylierungsstatus toleriert. Da C2H2-ZNF-Linkersequenzen Aminosäureaustausche als Folge karzinomrelevanter somatischer Genmutationen aufweisen können<sup>(39)</sup>, wurde einerseits untersucht, inwieweit die 10 häufigsten vorkommenden C2H2-ZNF-Linkersequenzen als Epitop-spezifische Hexapeptide das Bindemotiv des anti-HpTGEKP-Antikörpers ausbildeten. Andererseits wurde ein besonderer Fokus auf den H11Y-Austausch (H-zu-Y-Austausch) in den Epitopeptidsequenzen gelegt, da dieser Aminosäureaustausch aus in einer in Endometriumkarzinomen signifikant angereicherten Punktmutation des Gens für das ZNF-Protein 331 resultiert<sup>(39)</sup>.

Dabei konnten Epitop-spezifischen Unterschiede für eine zustande gekommene Antigenbindung, die nicht von der Bezeichnung spezifisch bzw. unspezifisch abgedeckt wird, festgestellt werden. Die daher neu eingeführten Epitop-Paratop-Bindungstypen unorthodox bzw. orthodox präzisieren das Bindungsverhalten von Antikörpern auf der Sub-Epitopebene, d. h. auf der Ebene der einzelnen Aminosäurereste<sup>(114, 132, 137)</sup>.

Beim orthodoxen Epitop-Paratop-Bindungstyp konnte eine stärkere von einer schwächeren anti-HpTGEKP-Antikörperbindung differenziert werden. Anhand stärker in orthodoxer Weise an den anti-HpTGEKP-Antikörper bindenden Phospho-Hexapeptiden konnte ein bipolares Bindemotiv des Antikörpers definiert werden: Eine N-terminale negative Ladung, dargestellt z. B. durch einen phosphorylierten Threoninylrest (pT), wurde von einer C-terminalen positiven Ladung, d. h. dem Dipeptidyl-Rest (KP, RP oder KL) flankiert. Im Gegensatz dazu scheint der anti-HpTGEKP-Antikörper Phospho-Hexapeptide, die C-terminal statt Aminosäureresten mit positiven Ladungen saure Aminosäurereste enthalten, vergleichsweise schwächer und zwar in orthodoxer Weise zu binden.

Bei dem als Western-Blot-Analyse zur Bestätigung des Bindungsverhaltens durchgeführten kompetitiven Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay wurde bestätigt, dass eine starke Gasphasenbindung von Immunkomplexen mit orthodox-bindenden Phospho-Hexapeptiden in den ITEM-TWO-Experimenten mit einer effizienten Blockierung der Antikörper-Paratope in Lösung einhergeht.

Der unorthodoxe Epitop-Paratop-Bindungstyp, bei dem die anti-HpTGEKP-Antikörperbindung verglichen mit dem orthodoxen Bindungstyp reduziert ist,

trat bei Phospho-Hexapeptiden auf, die zusätzlich zum phosphorylierten Threoninylrest (pT) eine C-terminale hydroxylhaltige Aminosäure (T, S) oder anstelle des N-terminalen phosphorylierten Threoninylrestes (pT) einen phosphorylierten Serinylrest (pS) aufweisen<sup>(132)</sup>. Außerdem konnte der unorthodoxe Epitop-Paratop-Bindungstyp, bei dem das Bindemotiv des Antikörpers nur partiell ausgebildet ist, bei Phospho-Hexapeptiden mit nicht-kanonischen Aminosäuresequenzen (HpTHTHT) sowie beim H-zu-pY-Austausch an erster Position der Phospho-Hexapeptide in Kombination mit einer fehlenden Phosphorylierung des angrenzenden Threoninylrestes gezeigt werden (pYTGEKP). Dieses Epitop-spezifische Hexapeptid pYTGEKP enthielt die einzige Aminosäuresequenz bei der ein H-zu-Y-Austausch vom Bindemotiv des anti-HpTGEKP-Antikörpers zumindest partiell toleriert wurde. Bei allen davon abweichenden H-zu-Y-Austauschen an erster Position der untersuchten Hexapeptide (YTGEKP, YpTGEKP, pYpTGEKP) sowie bei komplett fehlender Phosphorylierung (HTGEKP, YTGEKP) zeigte sich, dass das für die anti-HpTGEKP-Antikörperbindung essentiell benötigte Bindemotiv nicht ausgebildet wird.

Ein am Beispiel der Untersuchungen zum molekularen Erkennungscode des anti-HpTGEKP-Antikörpers geleisteter Beitrag zur Epitop-Feincharakterisierung von Antikörpern hat eine nicht zu unterschätzende Bedeutung zur Validierung der Tauglichkeit eines Antikörpers für den Einsatz in Forschung sowie Diagnostik und Therapie von Krankheiten, da sowohl zu Kreuzreaktivitäten des Antikörpers als auch über Bindemotiv-verändernde Strukturänderungen Kenntnisse auf submolekularer Ebene gewonnen werden können. Diese Arbeit leistet damit einen Beitrag hin zu einer präziseren Medizin (*precision medicine*) der Zukunft.

## **6. Anhang**

### **6.1 Anhang Material und Methoden**

#### **6.1.1 Ergänzungsinformation zu „2.1 Zellkultur und Herstellung von Proteinextrakten“**

Zu „2.1.1 Zellkultur und Herstellung von Proteinextrakten“

##### Lösungen:

IMDM-Lösung: IMDM (mit L-Glutamin und 25 mM HEPES, Artikelnummer: 12440, Lotnummer: 2120769, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ergänzt mit 10 % standardisierten fetalen Rinderserum FBS Superior (hitzeinaktiviert, Artikelnummer: S 0615, Biochrom, Berlin, Deutschland), 45 Einheiten/ml Penicillin und 45 µg/ml Streptomycin (Artikelnummer: 15070063, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Trypsin-EDTA 0,05 % (Artikelnummer: 11580626, Lotnummer: 2071733, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

DPBS (Artikelnummer: 14190-094, Lotnummer: 1900013, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Das für die Lösungen der gesamten Experimente verwendete Reinstwasser stammt aus der hauseigenen Reinstwasseranlage (Modellnummer: 08.2204, Seriennummer 2495/05, TKA Genpure Wasseraufbereitungssysteme, Niederelbert, Deutschland). Zur Durchmischung von Lösungen wurde der Schüttler Vortex Genie 2 (Modellnummer: G560E, Seriennummer: 290553, Scientific Industries, Böhmen, New York, USA) genutzt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Artikelnummer: 51022515, Modellnummer: KS12, Seriennummer: 41842753, Thermo Electron LED, Langenselbold, Deutschland) unter sterilen Bedingungen vollzogen. Der Zellkulturinkubator (Binder, Crailsheim, Deutschland) war für Standardbedingungen (befeuchtet, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) eingestellt <sup>(170, 213)</sup>.

Es wurden adhärent wachsende HAP1-Zellen der Zelllinien PBK-16 und C631 unter regelmäßiger Kontrolle unter dem aufrechten Lichtmikroskop (Seriennummer: 310447, Modell: TMS-F, Okular: CFWE 10X/18, Nikon, Tokio, Japan) kultiviert. IMDM-Lösung wurde jeweils als Zellkulturmedium verwendet <sup>(170, 214)</sup>. Um Stammzellkulturen zu erzeugen, wurden die Zellen (≈600 000) aufgetaut und mit jeweils 6 ml IMDM-Lösung in 50 ml-fassenden Zellflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> (Artikelnummer: 690175, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) behandelt. Hierzu wurden pro Zelllinie zwei entsprechend

befüllte Zellkulturflaschen für drei Tage im Zellkulturinkubator wachsen gelassen. Danach wurde die Zellpassage eingeleitet, um die Dichte der Zellen wieder zu reduzieren. IMDM-Lösung wurde dazu vorsichtig mit der Absauganlage (C 261 Aspirator, Atmos Medizin Technik, Lenzkirch, Deutschland) entfernt. Dabei wurde eine Berührung der am Flaschenboden wachsenden Zellen vermieden. Anschließend wurde mit 5 ml DPBS gespült. Folgend wurden die Zellen für 8 Minuten mit 0,6 ml Trypsin-EDTA im Zellkulturinkubator behandelt, um die adhärenen Zellen zu lösen und in Suspension zu bringen<sup>(170)</sup>. Daraufhin folgte die erneute Zugabe von jeweils 5 ml IMDM-Lösung pro Zellkulturflasche. Damit sich die adhärenen Zellen durch die Scherkräfte voneinander lösen, wurde dabei resuspendiert. Die Reaktion wurde so gestoppt und die Zellpassage beendet<sup>(40)</sup>. Die Zellen wurden nun im Zellkulturinkubator bis zur erneuten Passage für drei Tage wachsen gelassen.

Für die folgende Zellzählung wurden jeweils 40 µl Zellsuspension mit 160 µl DPBS 1 : 5 verdünnt, durchmischt und die Zellzahl manuell in einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, 0,0025 mm<sup>2</sup>, 0,1 mm Tiefe, Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) bestimmt. Diese Zellsuspension wurde in die Neubauer-Zählkammer mit darauf liegendem Deckglas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) so pipettiert, dass die Zellsuspension von beiden Seiten unter das Deckglas gesaugt wurde. Unter dem Lichtmikroskop wurden im Anschluss die lebenden Zellen viermal in 16 Quadraten manuell ausgezählt, wobei zwei der vier Zählungen im oberen Zählfeld und die anderen beiden im unteren Zählfeld erfolgten<sup>(214)</sup>. Die lebenden Zellen zeigten sich lichtmikroskopisch glänzend rundlich, während die toten Zellen sich grau und sehr heterogen geformt zeigten.

Die vorliegenden Konzentrationen pro Milliliter wurden für jede der beiden Zellreihen nach folgender Formel berechnet<sup>(40)</sup>:

$$c [\text{ml}^{-1}] = F \cdot \bar{x} \cdot 10^4 [\text{ml}^{-1}]$$

c - Konzentration der Zellen pro ml

F - Verdünnungsfaktor (beträgt 5, da die Zellsuspensionen 1 : 5 mit DPBS verdünnt wurden)

$\bar{x}$  - arithmetisches Mittel der Zellzahl pro 16 Quadrate

Zur nachfolgenden Exposition der Zellkulturen gegenüber in Ethanol gelöster Okadasäure und Ethanol allein (jeweils Versuchszellkulturen), wurden 150 000 Zellen jeder Zelllinie in vier Vertiefungen einer 6-Well-Platte (Artikelnummer: 657160, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Um diese Zelldichten zu erreichen, wurden jeweils in Zellkulturflaschen die zuvor gezählten Zellsuspensionen mit IMDM-Lösung entsprechend verdünnt. Vier Versuchszellkulturen wurden parallel durchgeführt und 2 ml IMDM-Lösung

wurden je Vertiefung hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für drei Tage im Zellkulturinkubator wachsen gelassen.

Dann wurde das Zellaussehen aller Zellen mit Fotos durch das Okular des Lichtmikroskops dokumentiert (s. Abbildungen 4 und 5, jeweils A). Dazu wurde die Kamera (Auflösung: 12 Megapixel, Weitwinkelobjektiv, Blendenzahl 1,8) des iPhone XR (Foxconn, Taipeh, Taiwan) verwendet. Im Anschluss wurden zunächst IMDM-Lösungen mit in Ethanol gelöster Okadasäure bzw. lediglich mit Ethanol hergestellt. Diese wird im Folgenden als  $\text{IMDM}_{\text{OA}}$  (mit in Ethanol gelöster Okadasäure) und  $\text{IMDM}_{\text{Eth}}$  (lediglich mit Ethanol versetzt) bezeichnet. Unter Einberechnung eines Milliliters Reserve wurden 5 ml IMDM-Lösung mit ca. 40,3  $\mu\text{l}$  auf Eis gekühlter 124,2  $\mu\text{M}$  Okadasäure-Stammlösung (Artikelnummer: 10011490, Lotnummer: 0573550-6, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA), gelöst in Ethanol, in 1,5 ml fassenden Reaktionsgefäßen (Artikelnummer: 0030120.086, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermischt. In der erhaltenen Lösung lag somit 1  $\mu\text{M}$  Okadasäure vor. Analog dazu wurde in einem anderen Reaktionsgefäß 5 ml IMDM-Lösung mit ca. 40,3  $\mu\text{l}$  100 % unvergälltem Ethanol vermischt.

Die IMDM-Lösung der Versuchszellkulturen wurde aus allen genutzten Vertiefungen der Wellplatte abgesaugt und durch  $\text{IMDM}_{\text{OA}}$  bzw.  $\text{IMDM}_{\text{Eth}}$  ersetzt. Pro Zelllinie wurden in eine Vertiefung der 6-Wellplatte jeweils 2 ml  $\text{IMDM}_{\text{OA}}$ , welche 16  $\mu\text{l}$  124 mM Okadasäure, gelöst in Ethanol, enthielt, pipettiert. Die andere beiden Vertiefung der 6-Wellplatte wurden als Kontrolle analog mit jeweils 2 ml  $\text{IMDM}_{\text{Eth}}$ , das Ethanol 0,8 % (v/v) enthielt, befüllt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Zellkulturinkubator für 6 Stunden und die Zellen wurden erneut wie beschrieben fotografiert (s. Abbildungen 4 und 5, jeweils B und C).

Da die Behandlung mit Okadasäure zu rundlichen Zellen führte, die sich von der Oberfläche der Vertiefungen der Wellplatte ablösten, wurde die Suspension aus Zellen im Überstand und  $\text{IMDM}_{\text{OA}}$  in ein Zentrifugengefäß (1,5 ml Fassungsvermögen, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit einer zusätzlichen Spülung mit 1 ml DPBS überführt. Im Gegensatz dazu blieben die mit  $\text{IMDM}_{\text{Eth}}$  behandelten, heterogen geformten Zellen an den Plattenoberflächen haften. Diese Zellen wurden wie folgend beschrieben geerntet.  $\text{IMDM}_{\text{Eth}}$  wurde abgesaugt und es wurde mit 2 ml DPBS gespült. Um die Zellen voneinander und von der Oberfläche zu lösen, wurden 0,25 ml Accutase-Lösung (gelöst in DPBS, enthält 0,5 mM EDTA, Artikelnummer: L11-007, Lotnummer: L00711-1137, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) pro Vertiefung der Wellplatte hinzugegeben und diese im Zellkulturinkubator für 10 Minuten inkubiert<sup>(215)</sup>. Unter dem Lichtmikroskop wurde anschließend sichergestellt, dass die Zellen vereinzelt vorlagen. Sich gelöste Zellen wurden durch Resuspendieren in 1 ml DPBS gesammelt<sup>(169)</sup>.

### Zu „2.1.2 Herstellung von Proteinextrakten aus geernteten Zellen“ - Absatz zur Zellpelletierung und Behandlung mit SDS-Puffer

In den im Nachfolgenden dargestellten Zentrifugierungsschritten wurden mit einheitlich positionierten Reaktionsgefäßen gearbeitet. Diese wurden dabei in der Zentrifuge so positioniert, dass die mit dem Deckel befestigte Seite nach außen ausgerichtet ist. Dies stellt sicher, dass die enthaltenen Zellpellets nach dem Zentrifugieren an den gleichen Stellen zu erwarten waren. Zum Absaugen wurde im Folgenden der Vacomat 120 (Modellnummer: BZW3A0027, Bachofer, Reutlingen, Deutschland) verwendet.

Die vorliegende Suspension aller Versuchszellkulturen, bestehend aus DPBS und Zellen, wurden bei 2500 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert (504 RCF, Rotor 3325B, Biofuge Fresco, Artikelnummer: 75005510, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland). Direkt im Anschluss wurde die Zentrifugation jeweils für 10 Sekunden auf 13 000 rpm erhöht, um sicherzustellen, dass auch die Zellen an der Seitenwand des 1,5 ml fassenden Reaktionsgefäßes, dem am Boden befindlichen Zellpellet zugeführt wurden. Der Überstand in dem jeweiligen Reaktionsgefäß wurde auf der gegenüberliegenden Seite des resultierenden Zellpellets abgesaugt. Die Zellpellets (jeweils ca. 10 mg) der IMDM<sub>Eth</sub> exponierten Zellen wurden einmal mit 1 ml DPBS gewaschen und die mit IMDM<sub>OA</sub> exponierten Zellen wurden zweimal mit jeweils 11 ml DPBS (zuerst mit 10 ml, dann mit 1 ml) gewaschen. Letztere Suspension wurden für 2 Sekunden durchmischt. Eine längere Durchmischung wurde vermieden, um ein Aufbrechen der Zellen zu vermeiden. Nach jedem Waschschrift wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 250 g und bei 4 °C für jeweils 5 min pelletiert (für Volumina unter 2 ml mit der Biofuge Fresco und für Volumina über 2 ml mit der Megafuge 1.0R (Artikelnummer: 75003060/02, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) verwendet). Der Überstand wurde verworfen. Abhängig der geschätzten Größe des Zellpellets wurden die gewaschenen und pelletierten Zellen in 500 bzw. 600 µl SDS-Puffer aufgenommen. Dabei wurde beachtet, dass bei einem größeren Zellpellet auch eine höhere Menge SDS-Puffer benötigt wurde, um die Zellen zu lysieren. Die mit IMDM<sub>Eth</sub> behandelten Zellpellets wurden jeweils in 600 µl SDS-Puffer aufgenommen, die mit IMDM<sub>OA</sub> behandelten Zellpellets jeweils in 500 µl SDS-Puffer.

### Zu „2.1.2 Herstellung von Proteinextrakten aus geernteten Zellen“ - Absatz zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels RC DC Proteinassay

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der hergestellten Proteinextrakte erfolgte nach dem Protokoll des RC DC Proteinassays (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Die anschließende Proteinquantifizierung basiert auf dem Lowry-Assay<sup>(216, 217)</sup>.

Zur Herstellung einer Lösung mit 10 mg/ml BSA (Artikelnummer: 500-0122, Sigma, Sankt Louis, Missouri, USA) in SDS-Puffer, wurde BSA eingewogen und daraus die Menge des benötigten SDS-Puffers errechnet und hinzu pipettiert (s. Tab. 5). Diese BSA-Lösung wurde für das Anfertigen einer Kalibriergeraden in 0,5 ml fassenden Reaktionsgefäßen (Artikelnummer: 0030121.023, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit jeweils 15 µl Reinstwasser verdünnt. Demzufolge beinhaltet die zunächst als Doppelansatz erstellte Verdünnungsreihe fünf Verdünnungsstufen und einen Blindwert. Für die Proteinbestimmung wurden in Doppelbestimmungen 5 µl der Proben mit 15 µl Reinstwasser und 5 µl SDS-Puffer in 1,5 ml fassenden Reaktionsgefäßen durchmischt, sodass alle Mittelwerte der Extinktionswerte der Probenlösungen innerhalb des linearen Bereichs der Kalibriergeraden lagen. 125 µl RC DC Protein Assay RC Reagenz 1 (Artikelnummer: 500-0117, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) wurde jeweils allen Proben und Standards hinzu pipettiert und die Lösungen durchmischt. Nachdem die Lösungen 60 Sekunden bei Raumtemperatur standen, wurde selbiges Vorgehen mit 125 µl RC DC Protein Assay RC Reagenz 2 (Artikelnummer: 500-0118, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) wiederholt. Anschließend wurden die Proben und Standards für 5 Minuten bei 13 000 rpm mit der Zentrifuge MIKRO 22R (Rotor 1153, Typ 1110, Modellnummer: 0001161-03-00, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert und der Überstand sorgsam dekantiert. Hierbei wurde zunächst Überstand abgekippt und anschließend mit Präzisionstüchern (Kimtech Science, Artikelnummer: KC7552, Kimberly-Clark Europe Limited/Professional Sector, Reigate, England) entfernt. Zentrifugieren und Dekantieren wurden wiederholt, um möglichst viel Überstand zu eliminieren. Zu allen Zellpellets und Standards wurden jeweils 127 µl der Lösung A' (124,46 µl DC Protein Assay Reagenz A, Artikelnummer: 500 0113, gemischt mit 2,54 µl DC Protein Assay Reagenz S, Artikelnummer: 500-0115, jeweils Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) gegeben. Die Zellsuspensionen sowie die Standards wurden parallel durchmischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann erneut durchmischt, bis sich jedes einzelne Zellpellet gelöst hatte. Jeder Probe und jedem Standard wurde 1 ml DC Protein Assay Reagenz B (Artikelnummer: 500-0114, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) hinzugegeben, durchmischt und die Lösungen für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Proben und Standards wurden in Einwegmessküvetten (Artikelnummer: 67.742, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) umgefüllt und die Extinktion der Lösungen mit dem Spektralphotometer Ultrospec 2000 UV (Modellnummer: 80-2106-00, Seriennummer: 65578, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) bei 750 nm gemessen. Zunächst wurde die BSA-Kalibriergerade wie folgend beschrieben erstellt. Der Ansatz ohne BSA wurde als Referenzwert genutzt und das arithmetische Mittel jeder einzelnen Verdünnungsreihe bestimmt. Falls die beiden Extinktionsmesswerte einer Verdünnungsstufe eine Differenz größer als 0,04 aufwiesen,

wurden für diese zwei neue Verdünnungen erstellt und diese erneut gemessen. Dann wurde aus allen vier Messwerten das arithmetische Mittel gebildet. Mittels Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) wurde die Geradengleichung der BSA-Kalibriergerade bestimmt, nach der Variablen  $x$  umgestellt und der Verdünnungsfaktor  $F$  wie folgt einberechnet.

$$y = m \cdot x \pm n$$

$$x = \left[ \frac{(y+n)}{m} \right]$$

$$c = x : F$$

$y$  - Ordinatenwert

$m$  - Geradenanstieg

$x$  - Abszissenwert

$n$  - Schnittpunkt der Gerade mit der Ordinate

$F$  - Verdünnungsfaktor (hier 5)

$c$  - Proteinkonzentration der Proben in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Durch Einsetzen der Mittelwerte jeder Probenmessung wurden die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

Tab.5: Mengenangaben zur Erstellung der Kalibriergeraden durch Proteinbestimmungen unterschiedlich konzentrierter BSA-Standardproben

<b>Menge BSA</b>	<b>BSA-Lösung (10 mg/ml BSA in SDS-Puffer) in <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>SDS-Puffer in <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>Reinstwasser in <math>\mu\text{l}</math></b>
0 $\mu\text{g}$ BSA	0	10	15
5 $\mu\text{g}$ BSA	0,5	9,5	15
10 $\mu\text{g}$ BSA	1	9	15
20 $\mu\text{g}$ BSA	2	8	15
40 $\mu\text{g}$ BSA	4	6	15
60 $\mu\text{g}$ BSA	6	4	15

### 6.1.2 Ergänzungsinformation zu „2.5 Präparation nano-ESI-MS-kompatibler anti-HpTGEKP-Antikörperlösungen“

#### Zum Absatz Umpuffern des anti-HpTGEKP-Antikörpers

Beim Umpuffern wurden 80 µl (40 µg) des erworbenen anti-HpTGEKP-Antikörpers zusammen mit 400 µl 200 mM Ammoniumacetatlösung in einen bis zu einer Molekülgröße von 50 kDA filternde, 0,5 ml fassende Zentrifugenfiltereinheit (Artikelnummer: UFC505096, Amicon Ultra, Merck Millipore, Carrigtwohill, Irland) pipettiert. Diese Lösung wurde dann für 10 Minuten bei 22,5 °C und 13 000 rpm zentrifugiert (MIKRO 22R) und danach das Filtrat verworfen. Anschließend wurden 400 µl 200 mM Ammoniumacetat zum Retentat pipettiert und Zentrifugieren sowie Verwerfen des Filtrats auf gleiche Weise siebenmal wiederholt. Im Folgenden wurde der Zentrifugenfilter umgekehrt und in ein neues Auffanggefäß der Zentrifugenfiltereinheit eingesetzt. Die anschließende Zentrifugation mit der Zentrifuge MIKRO 22R bei 22,5 °C und 4500 rpm für 5 Minuten diente zum Sammeln des Retentats, welches ein Volumen von ca. 20 µl maß <sup>(139, 140)</sup>. Diese Lösung wird im Folgenden als Antikörper-Stammlösung bezeichnet.

#### Zum Absatz Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Antikörper-Stammlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Antikörper-Stammlösung erfolgte mit dem Fluoreszenz-basierten Qubit™ 2.0 Fluorometer-Assay (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA). Eingangs wurde sichergestellt, dass sich alle im Folgenden genutzten Qubit-Reagenzien für das Experiment auf Raumtemperatur befinden. 796 µl Qubit-Proteinpuffer (Artikelnummer: Q33212, Lotnummer: 2140289, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) wurden mit 4 µl Qubit Reagenz (Artikelnummer: Q33212 A, Lotnummer: 2397767, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) in ein 1,5 ml fassenden Reaktionsgefäß pipettiert und durchmischt. Von dieser Qubit-Arbeitslösung wurden jeweils 190 µl in drei verschiedene Qubit Assay-Reaktionsgefäße (Artikelnummer: Q32856, Lotnummer: FA46212196783, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) pipettiert. In jedes dieser drei Qubit Assay-Reaktionsgefäße wurden jeweils 10 µl einer der drei Qubit Proteinstandards 1, 2 und 3 (Artikelnummer: Q33212, Lotnummer: 2397767, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) hinzupipettiert, durchmischt und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen fluoreszenzbasiert in dem Qubit™ 2.0 Fluorometer (Katalognummer: Q32866, Seriennummer: 1012002291, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) bestimmt. Auf diese Weise wurde das Qubit™ 2.0 Fluorometer kalibriert. 198 µl der hergestellten Qubit-Arbeitslösung wurde mit 2 µl der Antikörper-Stammlösung in einem Qubit Assay-Reaktionsgefäß gemischt, für 15 Minuten inkubiert und die Proteinkonzentration fluoreszenzbasiert in dem Qubit™ 2.0 Fluorometer in Abhängigkeit der zuvor erstellten Standardreihe bestimmt.

### 6.1.3 Ergänzungsinformation zu „2.6 Präparation nano-ESI-MS kompatibler Hexapeptidlösungen“

Tab.6: Aminosäuresequenzen und Lotnummern erworbener Hexapeptide

<b>Nummer Peptid</b>	<b>Aminosäuresequenz<sup>a)</sup></b>	<b>Lotnummer</b>
00	HTGEKP	EP14310/2611S13
01	HpTGEKP	EP14300/2611S03
02	HpTGERP	EP14301/2611S04
03	HpSGEKP	EP14302/2611S05
04	HpTHTHT	EP14303/2611S06
05	HpTGKKP	EP14304/2611S07
06	HpSGERP	EP14305/2611S08
07	HpTGEKL	EP14306/2611S09
08	HpTGEKS	EP14307/2611S10
09	HpTEEKP	EP14308/2611S11
10	HpTREKP	EP14309/2611S12
100	YTGEKP	EP15240/0611T09
101	YpTGEKP	EP15241/0611T10
102	pYTGEKP	EP15242/0611T11
103	pYpTGEKP	EP15243/0611T12

<sup>a)</sup> Schreibweise für Aminosäuren im Einbuchstabencode; kleines „p“ gibt Phosphorylierung der folgenden Aminosäure an.

### 6.1.4 Ergänzungsinformation zu „2.8 Nano-ESI-Massenspektrometrische Geräteeinstellung und Datenerfassung“

Zum Absatz der nano-ESI-Massenspektrometrischen Messeinstellungen zur Charakterisierung der Ausgangsstoffe

Die Geräteeinstellungen für die Erstellung des nano-ESI-Massenspektrums der anti-HpTGEKP-Antikörper-Arbeitslösung am Synapt G2S-Massenspektrometer entsprachen denen der ITEM-TWO-Messungen (s. Abschnitt 2.8) mit Ausnahme der konstanten TRAP-Kollisionszellen-Spannungsdifferenz von 0 V, des gewählten Massenbereichs von m/z 1000 - 8000 und des auf volle Ionentransmission aller Ionen eingestellten Quadrupol-Massenfilters.

Von jeder Hexapeptid-Arbeitslösung wurden nano-ESI-Massenspektren einzeln sowohl am Q-ToF 2-Massenspektrometer als auch am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Einstellungen des Synapt G2S-Massenspektrometers waren dabei wie folgt: Kapillarspannung 1,9 kV; Quelltemperatur 50 °C; Konusspannung 30 V; Offset-Spannung

der Quelle 30 V; Nano-Flow-Gas 0,05 bar; TRAP-Kollisionszellen-Spannungsdifferenz 0 - 1 V; TRAP-Gasfluss (Argon) 0,5 ml/min; TRANSFER-Kollisionszellen-Spannungsdifferenz 2 V; Spülgas (*purge gas*) 20 l/h; Konusgas (*cone gas*) 20 l/h. Der Quadrupol-Analysator wurde auf volle Ionenmission aller Ionen eingestellt. Alle Massenspektren wurden im Massenbereich von m/z 200 - 2000 oder m/z 300 - 2000 erfasst.

Die Einstellungen des Q-ToF 2-Massenspektrometers waren wie folgt: Kapillarspannung 1 kV, Quelltemperatur 40 °C, Konusspannung 23 V, Extraktorspannung 3 V, Radiofrequenz-Linsenspannung 1,3 V, Detektorspannung 1950 V, Pusher-Cycle-Zeit 88 µs. Der Quadrupol-Analysator war eingeschaltet, um die Übertragung von Ionen auf den niedrigen Massenseiten (< m/z 160) zu blockieren (M1 = 200 mit Verweilzeit (*dwell time*) von 20 % der Scanzeit und Rampenzeit (*ramp time*) von 30 % der Scanzeit, M2 = 200 mit Verweilzeit von 20 % und Rampenzeit von 30 % der Scanzeit, M3 = 200; Gesamtzeit eines Scans ist eine Sekunde). Der Massenbereich für die Spektrenaufnahme betrug m/z 0 bis m/z 2000.

Zur zusätzlichen Peptid-Fragment-Analyse der Konstitutionsisomere Hexapeptid 101 und 102 wurden folgende Messeinstellungen am Q-ToF 2-Massenspektrometer verändert: Es wurde auf Tandem-Massenspektrometrie umgestellt, die Quelltemperatur auf 60 °C erhöht und die Konusspannung auf 20 V gesenkt.

### 6.1.5 Ergänzungsinformation zu „2.9 Analysen der massenspektrometrischen Daten“

Zunächst wurden die einzelnen Ladungszustände der anti-HpTGEKP-Antikörper-Ionensignale mit folgender Formel berechnet <sup>(218)</sup> :

$$z_1 = \frac{m_2 - 1}{m_2 - m_1}$$

$z_1$  – Ladung der jeweiligen molekularen Spezies

$m_1$  – Masse (hier m/z-Wert) des nächstniedrigeren Ladungszustands

$m_2$  – Masse (hier m/z-Wert) des nächsthöheren Ladungszustands

Die Zahl 1 im Zähler stellt die Masse der Ladungsträger (hier H<sup>+</sup> mit der Masse 1) dar. Die berechneten Ladungszustände des anti-HpTGEKP-Antikörpers wurden ganzzahlig gerundet. Es wurde darauf geachtet, dass innerhalb derselben Messung kein Ladungszustand doppelt errechnet wurde. Mit beschriebenen Rundungswerten wurde die durchschnittliche molare Masse M des anti-HpTGEKP-Antikörpers für jeden einzelnen Ladungszustand nach folgender Formel (Erklärungen zu  $z_1$  und  $m_1$  s. oben) errechnet:

$$M = z_1 \cdot (m_1 - 1)$$

Aus den berechneten molaren Massen der einzelnen Ladungszustände wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung aus vier Einzelmessungen berechnet, um die durchschnittliche molare Masse  $M$  des anti-HpTGEKP-Antikörpers zu erhalten (s. Tab. 7).

Für die analoge Vorgehensweise bei den folgenden ITEM-TWO-Messungen wurden die molaren Massen und Standardabweichungen auch als Orientierungswerte für die Zuordnung der Ladungszustände der detektierten Ionensignale innerhalb der molekularen Spezies des anti-HpTGEKP-Antikörpers ohne gebundenes Peptid bei jeder  $\Delta CV$  genutzt. Kamen dabei augenscheinlich mehrere Ionensignale für einen Ladungszustand gleichermaßen infrage, wurde sich für das Ionensignal entschieden, bei dem der Ladungszustand rechnerisch eher erwartet wurde. Dabei wurde einerseits der Vergleich mit dem nächsthöheren bzw. nächsttieferen Ladungszustand innerhalb derselben molekularen Spezies herangezogen. Andererseits wurde bei vorliegender Peptidbindung überprüft, dass die Differenz zwischen den mittleren molaren Massen des anti-HpTGEKP-Antikörpers und des anti-HpTGEKP-Antikörper plus ein Peptid ca. der experimentell bestimmten monoisotopischen Masse des gebundenen Peptids entsprach. Selbiges galt für die Differenz zwischen den supramolekularen Spezies anti-HpTGEKP-Antikörper plus ein Peptid und anti-HpTGEKP-Antikörper plus zwei Peptide.

#### Erstellen von Datenbank-Identifikationsergebnissen der Peptide für PRIDE

Die Identifikationsergebnisse jedes Hexapeptids für PRIDE wurden wie folgt erstellt. Die zugehörigen Tandemmassenspektrometrie-Spektren wurden am Q-ToF 2-Massenspektrometer mit der Mass Lynx Software geöffnet und mit dem MaxEnt3-Algorithmus das jeweilige deisotopisierte M3-Spektrum einfach geladener Peptidionensignale generiert und als DTA-Dateien abgespeichert. Mit diesen wurde mittels Mascot MS/MS Ions Search (Mascot Software, Matrix Science, [https://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS](https://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS); Zugriff: 20. Juni 2022 13:00 Uhr bis 18:00 Uhr) in der Datenbank SAPshodt die entsprechenden Hexapeptide identifiziert. Die Peptidtoleranzen wurden für diese Datenbanksuchen auf 80 ppm und die Tandemmassenspektrometrie-Toleranzen auf 0,6 Da eingestellt.

## 6.2 Anhang Ergebnisteil

### 6.2.1 Ergänzungsmaterialien zu „3.2 Charakterisierung der Ausgangsmaterialien“

Zu „3.2.2 Charakterisierung des anti-HpTGEKP-Antikörpers“ -  
Abschnitt „Immunanalytische Charakterisierung“

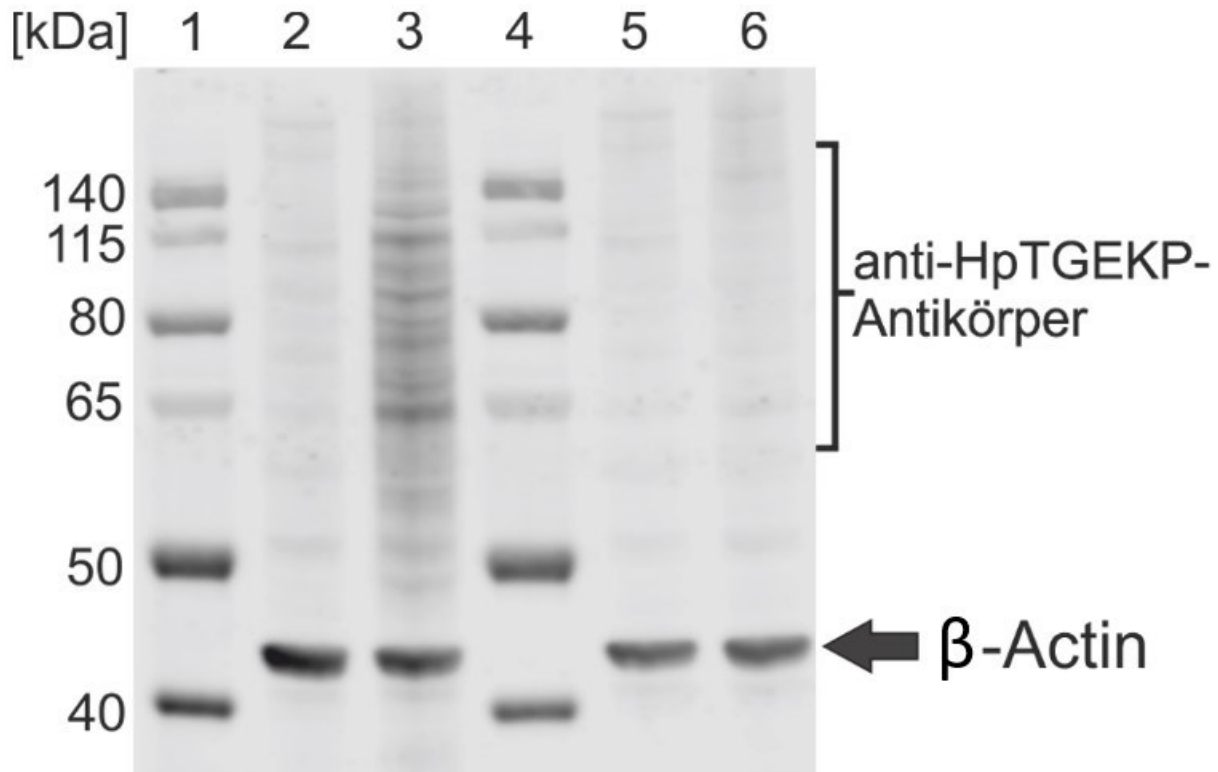


Abbildung 27: Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus C631-Zellen und PBK-16-Zellen

Die Proteinextrakte aus den C631-Zellen und PBK-16-Zellen lieferten die Antigene. Spuren 1 und 4: Proteingrößenmarker. Spur 2: Proteinextrakte aus C631-Zellen, die nur mit Ethanol ( $C_2H_5OH$ ) behandelt wurden. Spur 3: Proteinextrakte aus C631-Zellen, die mit Okadasäure ( $C_{44}H_{68}O_{13}$ ) als Phosphataseinhibitor behandelt wurden. Spur 5: Proteinextrakte aus PBK-16-Zellen, die nur mit Ethanol ( $C_2H_5OH$ ) behandelt wurden. Spur 6: Proteinextrakte aus PBK-16-Zellen, die mit Okadasäure ( $C_{44}H_{68}O_{13}$ ) als Phosphataseinhibitor behandelt wurden. Die Proteine wurden anschließend mit den primären Antikörpern anti-HpTGEKP-Antikörper und anti- $\beta$ -Actin-Antikörper markiert. IRDye 800 CW anti-Maus-Antikörper aus der Ziege wurde als sekundärer Antikörper verwendet. Die Bilder des Western-Blots wurden oberhalb einer molekularen Masse von ca. 200 kDa und unterhalb einer molekularen Masse von ca. 35 kDa zurechtgeschnitten.

Zu „3.2.2 Charakterisierung des anti-HpTGEKP-Antikörpers“ -  
Abschnitt „Massenspektrometrische Charakterisierung“

Tab.7: Ionenladungszustände, m/z-Werte und zugehörige molekulare Massen  
der anti-HpTGEKP-Antikörperionen<sup>(114)</sup>

z	Messung 1 <sup>a, b)</sup>		Messung 2 <sup>b)</sup>		Messung 3 <sup>b)</sup>		Messung 4 <sup>b)</sup>	
	m/z	molekul. Masse	m/z	molekul. Masse	m/z	molekul. Masse	m/z	molekul. Masse
28	5398,45	151 156,60	5398,48	151 157,44	5397,18	151 121,04	5400,51	151 214,28
27	5599,82	151 195,14	5598,91	151 170,57	5596,02	151 092,54	5598,27	151 153,29
26	5816,83	151 237,58	5815,47	151 202,22	5807,69	150 999,94	5813,91	151 161,66
25	6049,66	151 241,50	6047,90	151 197,50	6043,52	151 088,00	6046,47	151 161,75
24	6301,85	151 244,40	6302,33	151 255,92	6294,97	151 079,28	6300,03	151 200,72
$\bar{x}$		151 215,04		151 196,73		151 076,16		151 178,34
s		38,35		37,95		45,39		27,26

a) siehe Abbildung 5.

b) s: Standardabweichung; molekul. Masse: molekulare Masse.

Zu „3.2.3 Massenspektrometrische Charakterisierung der ZNF-Linkerpeptide“

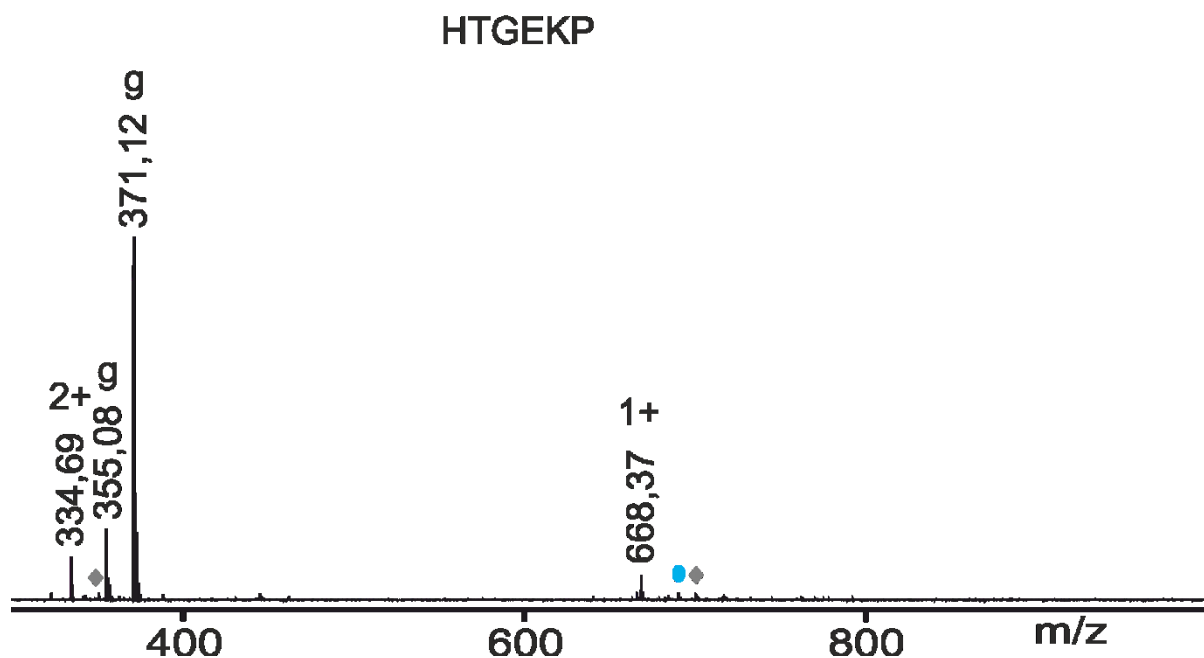


Abbildung 28: Nano-ESI-Massenspektrum des Hexapeptids 00 (HTGEKP). Ladungszustände und m/z-Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Natriumaddukte (hellblaue Ellipse) und Oxidationsprodukte (graue Rauten) sind gekennzeichnet. Einfach geladene Hintergrundionensignale (*ground signals* g) sind markiert. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,4 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

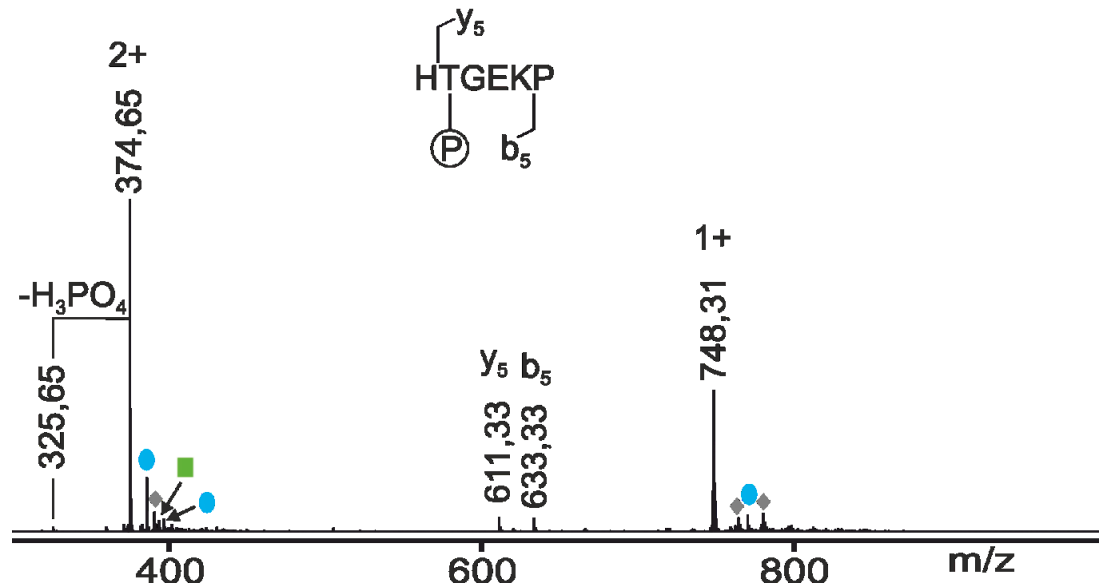


Abbildung 29: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 01 (HpTGEKP) Ladungszustände und  $m/z$ -Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und die Fragmentationen ( $y_5$ ,  $b_5$ ) sind angegeben. Kaliumaddukte (grünes Quadrat), Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen) und Oxidationsprodukte (graue Rauten) sind gekennzeichnet. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,14 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

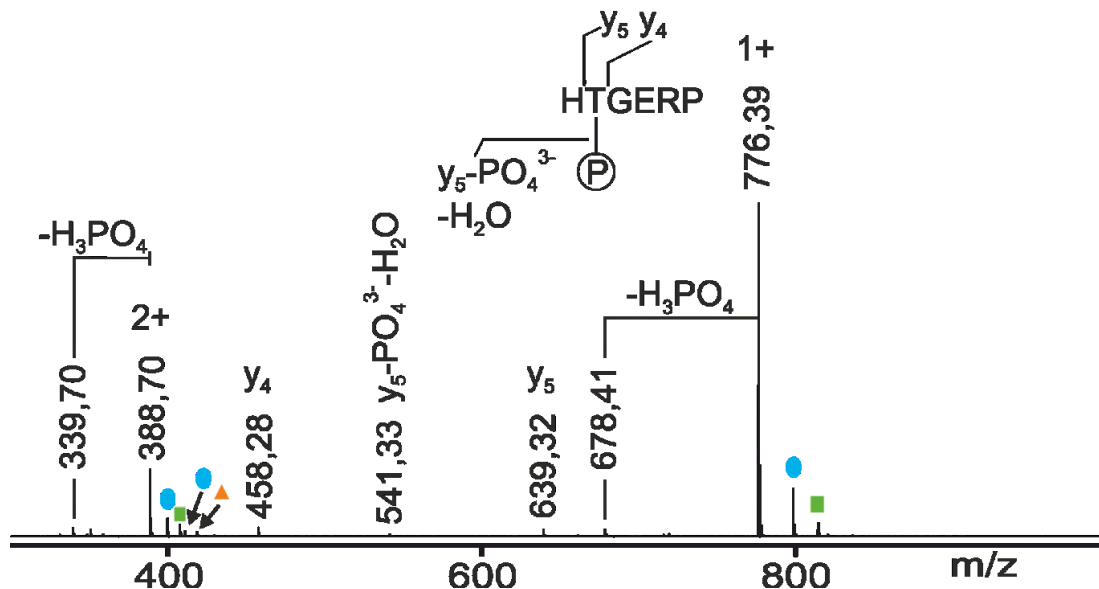


Abbildung 30: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 02 (HpTGERP) Ladungszustände und  $m/z$ -Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  sowie die Fragmentationen ( $y_4$ ,  $y_5$ ) sind angegeben. Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen), Kaliumaddukte (grüne Quadrate) und gemischte Alkalisalzaddukte (orange Dreieck) sind gekennzeichnet. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,06 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

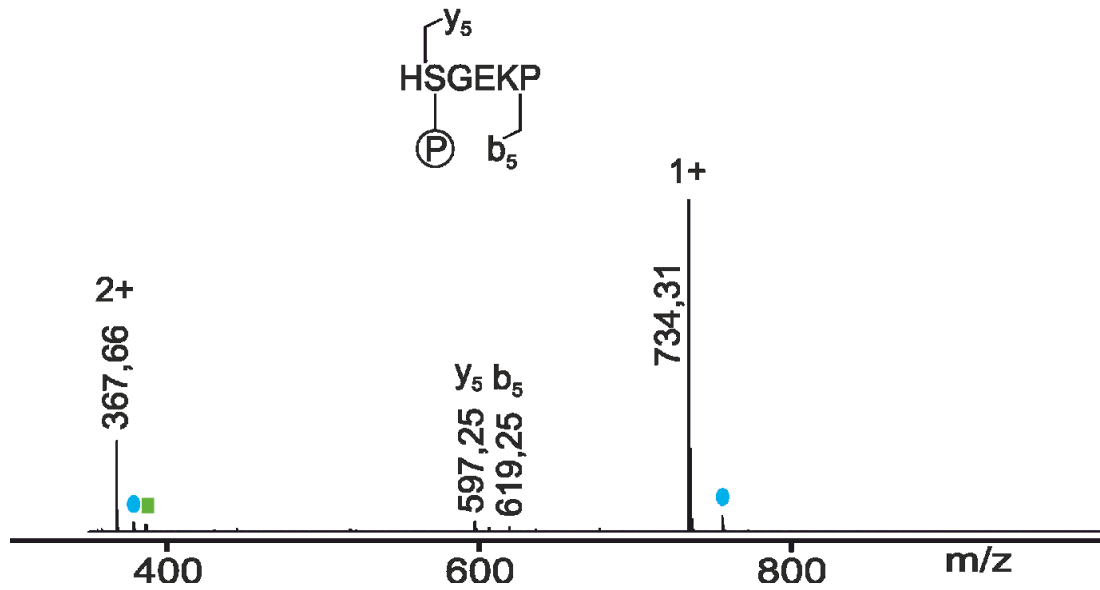


Abbildung31: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 03 (HpSGEKP) Ladungszustände und m/z-Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Fragmentationen ( $y_5$ ,  $b_5$ ), Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen) und Kaliumaddukte (grüne Quadrate) sind gekennzeichnet. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,18 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

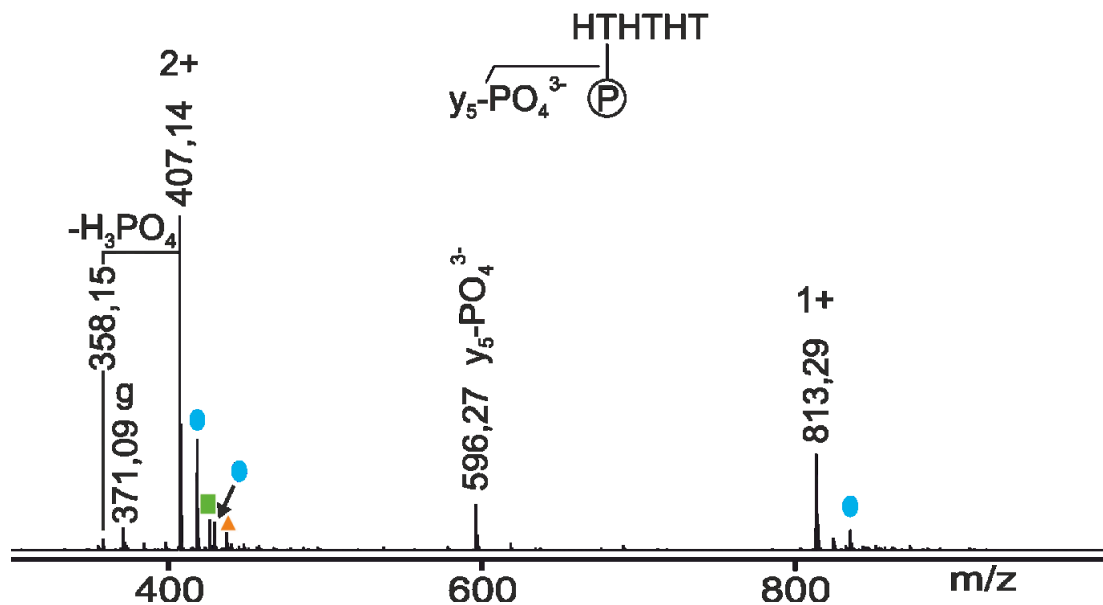


Abbildung32: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 04 (HpTHTHT) Ladungszustände und m/z-Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und die Fragmentationen sind angegeben. Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen), Kaliumaddukte (grünes Quadrat) und gemischte Alkalisalzdaddukte (orangenes Dreieck) sind gekennzeichnet. Ein einfach geladenes Hintergrundionensignal (*ground signal* g) ist markiert. Das Massenspektrum wurde am Q-ToF 2-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 1,97 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

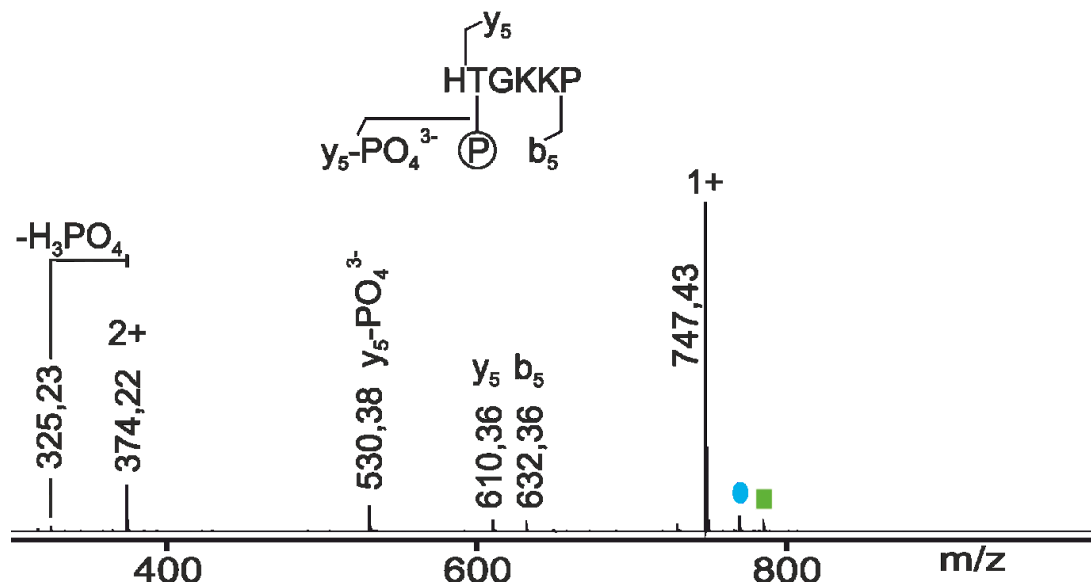


Abbildung 33: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 05 (HpTGKKP) Ladungszustände und m/z-Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $H_3PO_4$  und die Fragment-Ionen ( $b_5$ ,  $y_5$ ) sind angegeben. Natriumaddukte (hellblaue Ellipse) und Kaliumaddukte (grünes Quadrat) sind gekennzeichnet. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,14 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

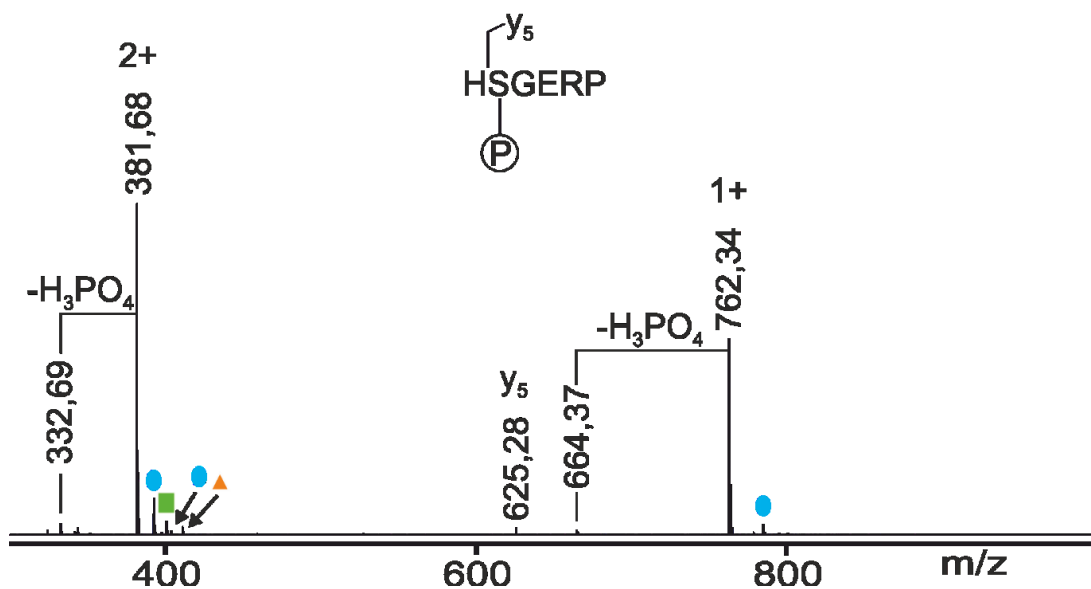


Abbildung 34: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 06 (HpSGERP) Ladungszustände und m/z-Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $H_3PO_4$  und die Fragment-Ionen ( $y_5$ ) sind angegeben. Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen), Kaliumaddukte (grünes Quadrat) und gemischte Alkalisalzaddukte (orange Dreieck) sind gekennzeichnet. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,1 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

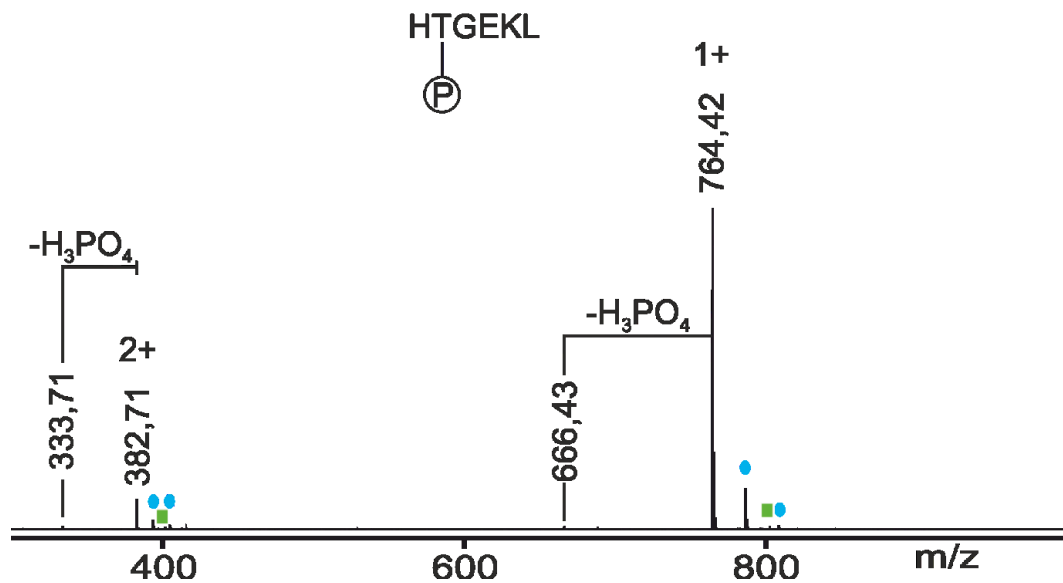


Abbildung 35: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 07 (HpTGEKL). Ladungszustände und  $m/z$ -Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ist angegeben. Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen) und Kaliumaddukte (grüne Quadrate) sind markiert. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,1 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

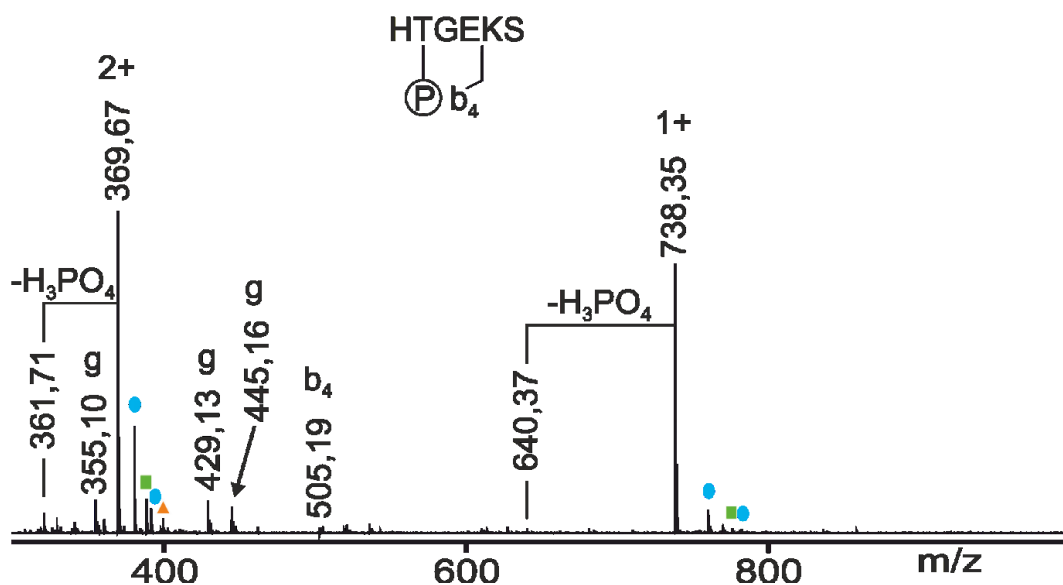


Abbildung 36: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 08 (HpTGEKS). Ladungszustände und  $m/z$ -Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und die Fragmentionen ( $b_4$ ) sind angegeben. Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen), Kaliumaddukte (grüne Quadrate) und gemischte Alkalisalzaddukte (orangefarbenes Dreieck) sind gekennzeichnet. Einfach geladene Hintergrundionensignale (*ground signals* g) sind markiert. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,17 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

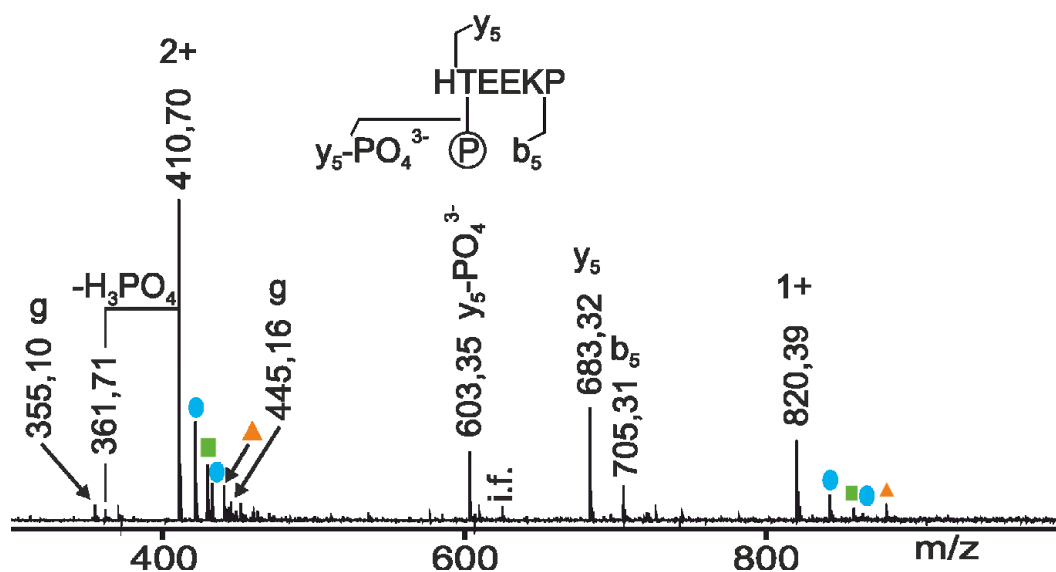


Abbildung 37: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 09 (HpTEEKP). Ladungszustände und  $m/z$ -Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und die Fragment-Ionen ( $b_5$ ,  $y_5$ ) sind angegeben. Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen), Kaliumaddukte (grüne Quadrate) und gemischte Alkalisalzaddukte (orangefarbene Dreiecke) sind gekennzeichnet. Ein einfach geladenes internes Fragment-Ion (i.f.: HTEEK) bei  $m/z$  625,33 und Hintergrundionensignale (*ground signals*  $g$ ) sind markiert. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 1,95 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

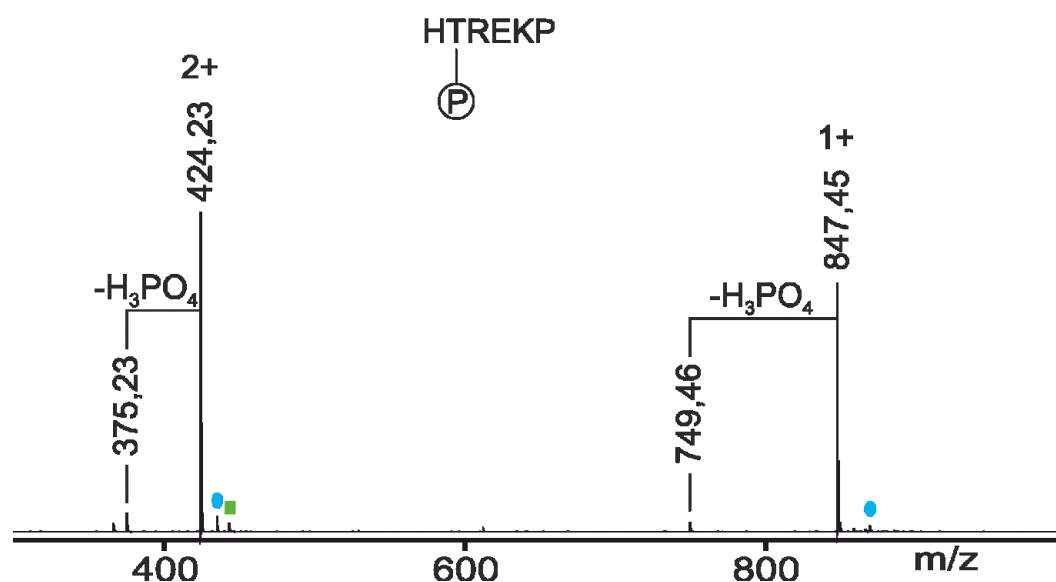


Abbildung 38: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 10 (HpTREKP). Ladungszustände und  $m/z$ -Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ist angegeben. Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen) und Kaliumaddukte (grünes Quadrat) sind markiert. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 1,89 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

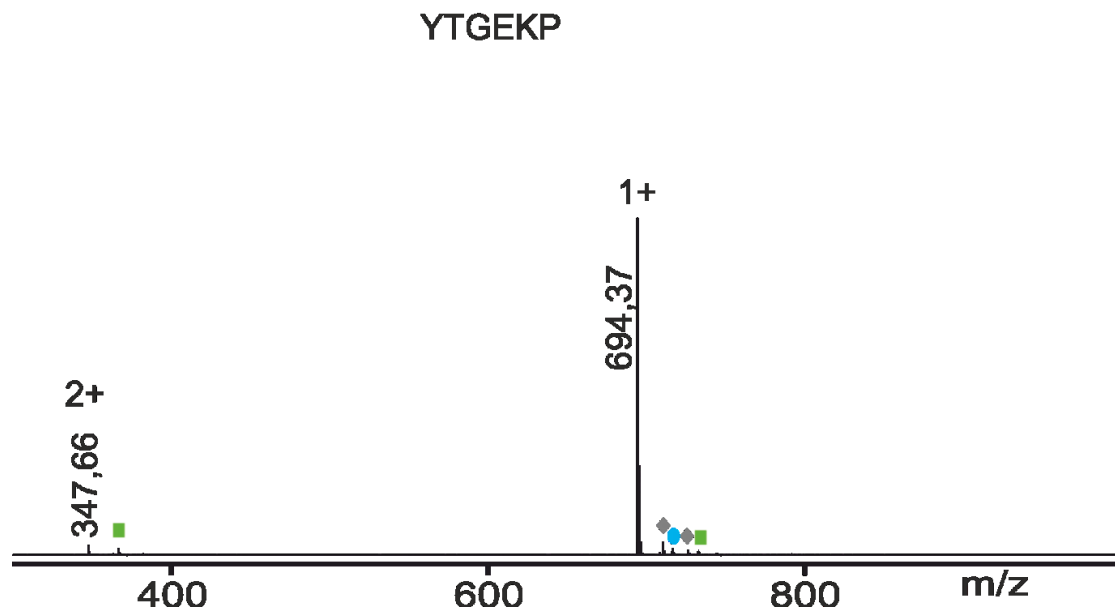


Abbildung 39: Nano-ESI-Massenspektrum des Hexapeptids 100 (YTGEKP). Ladungszustände und m/z-Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Kaliumaddukte (grüne Quadrate), Natriumaddukte (hellblaue Ellipse) und Oxidationsprodukte (graue Rauten) sind gekennzeichnet. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,31 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

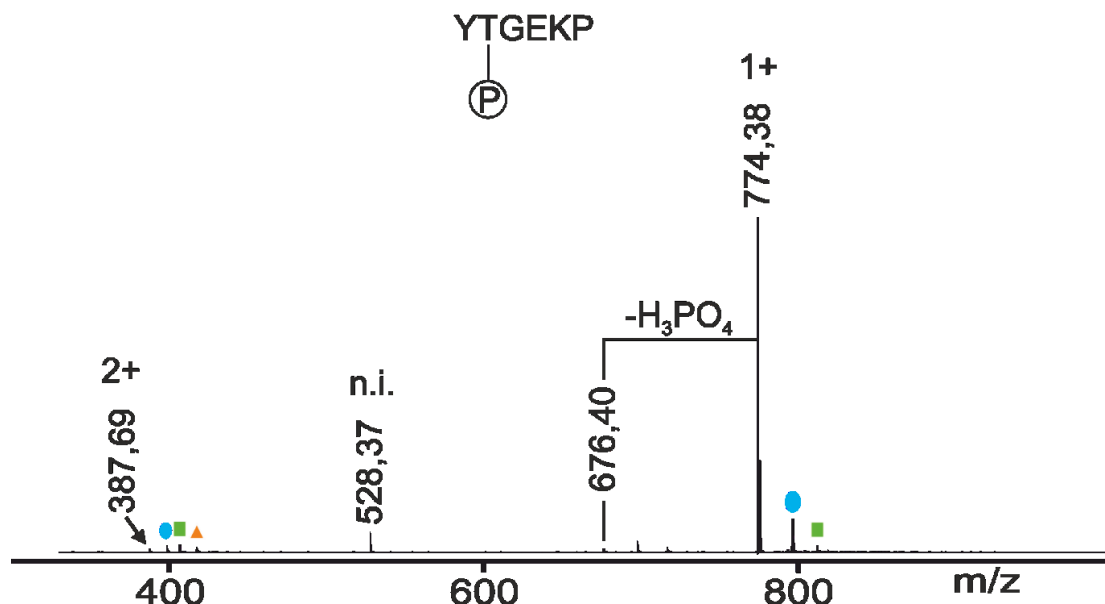


Abbildung 40: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 101 (YpTGEKP). Ladungszustände und m/z-Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und nicht identifizierbare Ionensignale (n.i.) sind angegeben. Kaliumaddukte (grüne Quadrate), Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen) und gemischte Alkalisalzaddukte (orangefarbene Dreiecke) sind gekennzeichnet. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 2,07 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

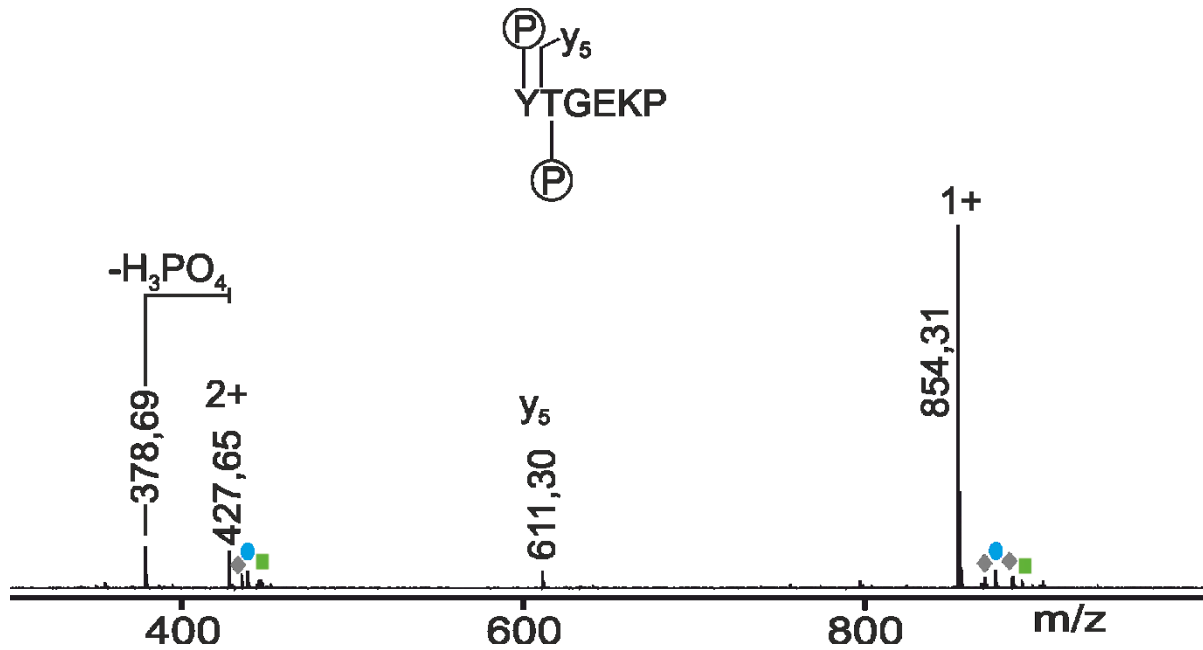


Abbildung 41: Nano-ESI-Massenspektrum des Di-Phospho-Hexapeptids 103 (pYpTGEKP)

Ladungszustände und  $m/z$ -Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Der Neutralverlust von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und die Fragment-Ionen ( $y_5$ ) sind angegeben. Oxidationsprodukte (graue Rauten), Kaliumaddukte (grüne Quadrate) und Natriumaddukte (hellblaue Ellipsen) sind gekennzeichnet. Das Massenspektrum wurde am Synapt G2S-Massenspektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration war ca. 1,88 mM. Das Volumen der Probe betrug 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

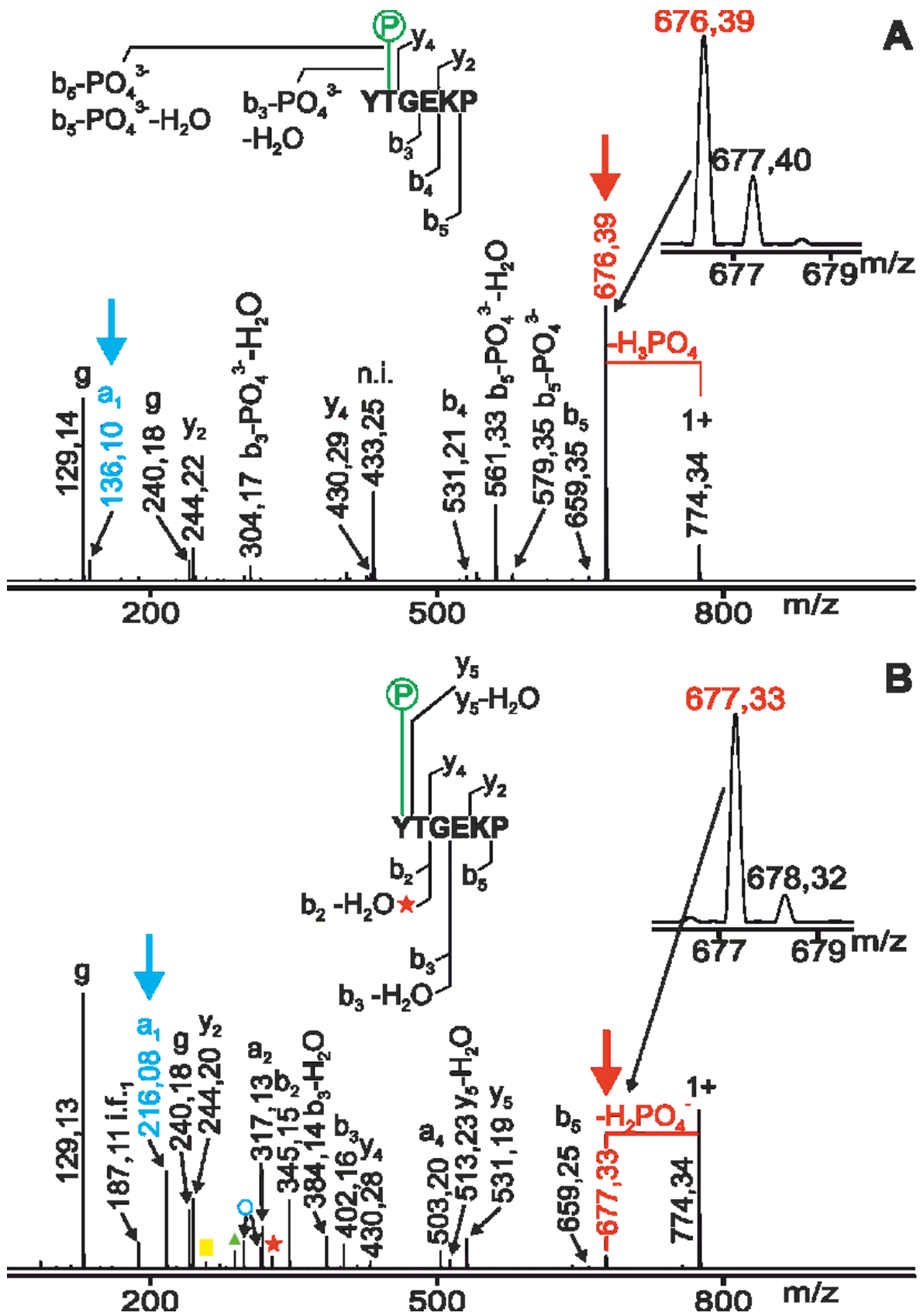


Abbildung 42: Nano-ESI-Massenspektren der Peptid-Fragment-Analyse der Phospho-Hexapeptide 101 (YpTGEKP) und 102 (pYTGEKP)  
 Abbildungsbeschreibung s. folgende Seite (Seite xxi)

Dargestellt sind die nano-ESI-Massenspektren der Peptid-Fragment-Analyse mittels Tandemmassenspektrometrie (nach CID-Fragmentierung) der Phospho-Hexapeptide 101 (YpTGEKP) (A) und 102 (pYTGEKP) (B). Ladungszustände und  $m/z$ -Werte für ausgewählte Ionensignale sind angegeben. Fragmentionen, z.B. symbolisiert durch einen roten Stern ( $b_2\text{-H}_2\text{O}$ ;  $m/z$  327,13), sowie einfach geladene interne Fragmente GE (i.f.<sub>1</sub>), EK (gelbes Quadrat;  $m/z$  258,17) und TGE (hellgrünes Dreieck;  $m/z$  288,17) sind angegeben. Einfach geladene Hintergrundionensignale (*ground signals* g) und nicht identifizierbare Ionensignale (n.i.), symbolisiert durch einen offenen blauen Kreis ( $m/z$  297,21 und 315,22), sind gekennzeichnet. Die Identifizierung der einzelnen Peptidisomere ist durch die verschiedenen Massen des Peptidfragments  $a_1$  gegeben (vgl. hellblau markierter Text und hellblaue Pfeile). Auch eine  $\beta$ -Eliminierung und der Neutralverlust von Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) des einfach geladenen Peptidions (Verlust von 98 Thomson) wird beim Phospho-Hexapeptid YpTGEKP (Peptid 101) (eingeschobene Vergrößerung, in (A) rot markiert und roter Pfeil) aufgrund der Phosphorylierung des Threoninylrestes (in (A) dunkelgrün markiert) beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigt das nano-ESI-Massenspektrum der Peptid-Fragment-Analyse mittels Tandemmassenspektrometrie des einfach geladenen Peptids YpTGEKP (Peptid 102) einen Verlust von  $m/z$  97 (Verlust von 97 Thomson), der auf die Entfernung eines Dihydrogenphosphations  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  eines phosphorylierten Tyrosinylrestes zurückzuführen ist (eingeschobene Vergrößerung, in (B) rot markiert und roter Pfeil). Die Peptidkonzentrationen waren jeweils ca. 2,07 mM. Das Volumen der Probe betrug jeweils 3  $\mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(114)</sup>.

## 6.2.2 Ergänzungsmaterialien zu „3.3 Analyse des anti-HpTGEKP-Antikörperbindemotivs mittels ITEM-TWO“

Zu „3.3.1 Erste grundlegende Ergebnisse des ITEM-TWO-Verfahrens“

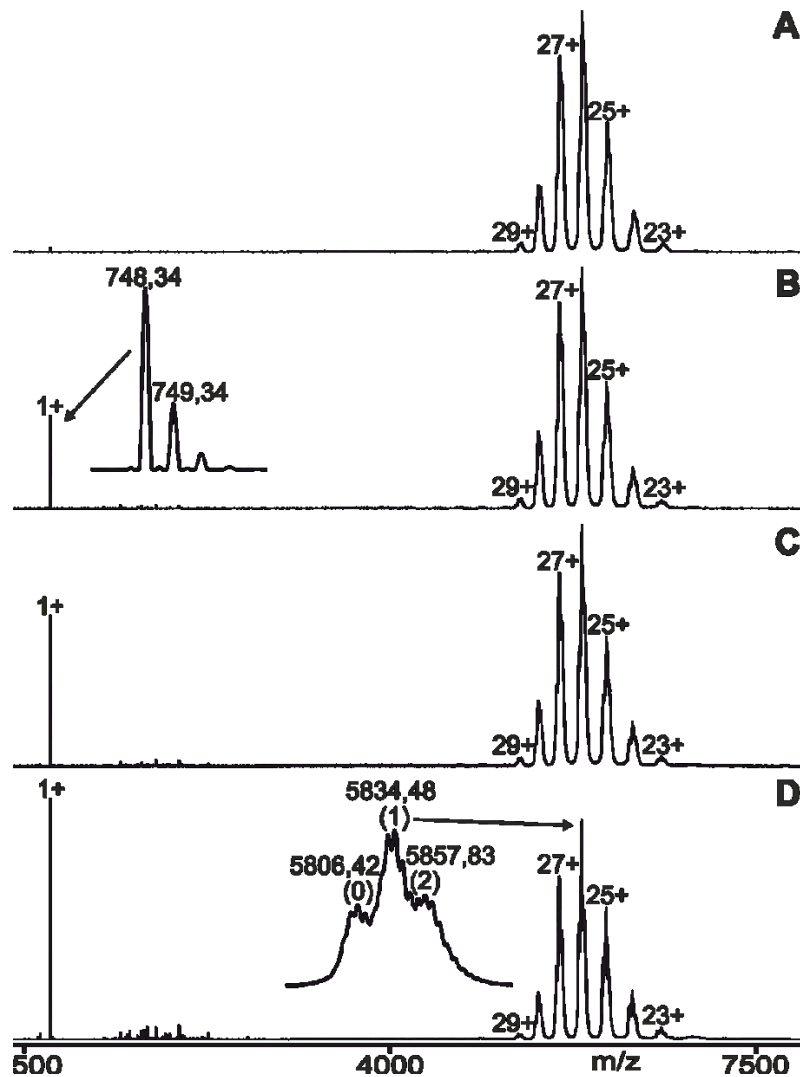


Abbildung 43: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 30 V, (C) 40 V, (D) 70 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Komplex freigesetzten, einfach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 01 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

## Zu „3.3.2 Orthodoxe Antikörperbindung“

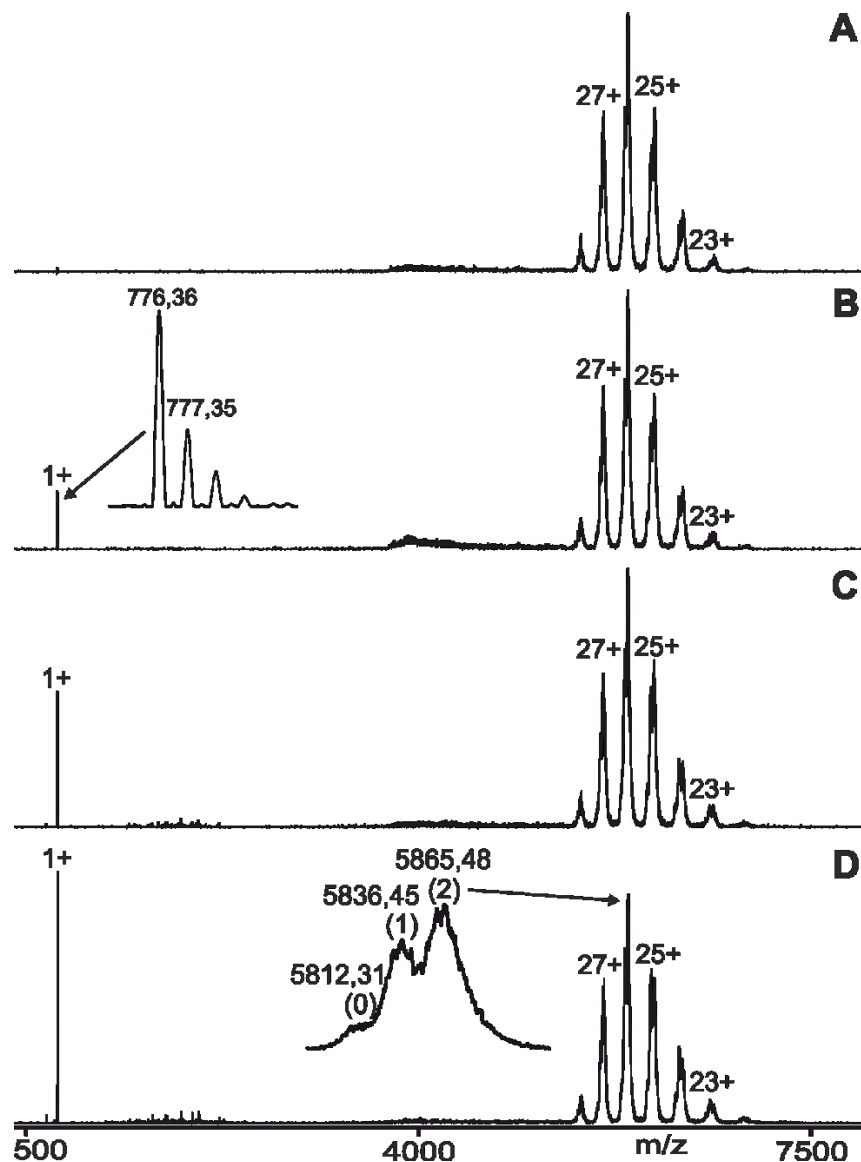


Abbildung 44: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 02 (HpTGERP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 02 (HpTGERP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 20 V, (C) 40 V, (D) 60 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 02 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

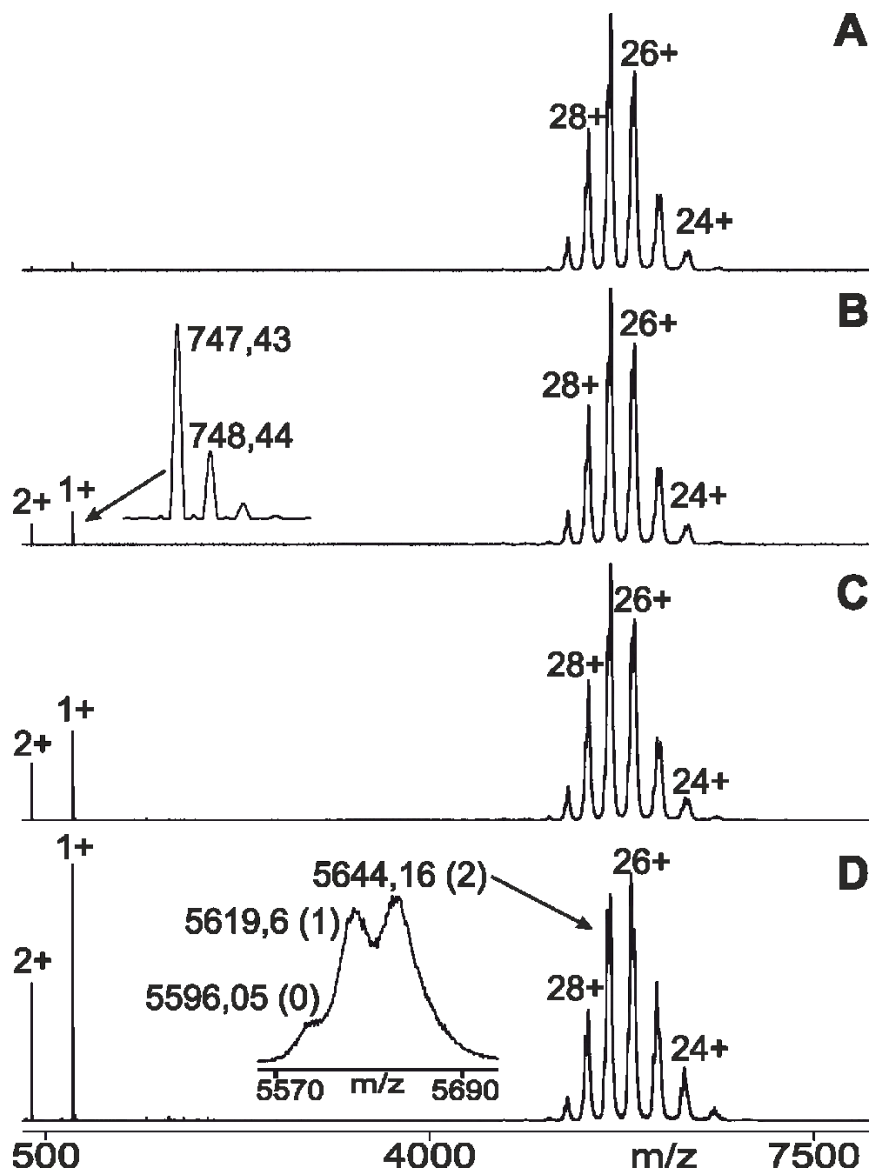


Abbildung 45: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 05 (HpTGKKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 05 (HpTGKKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V; (B) 10 V; (C) 20 V; (D) 60 V, von  $m/z$  5000 bis  $m/z$  6700 wurde der Vergrößerungsfaktor 2 angewandt. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 27+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 05 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

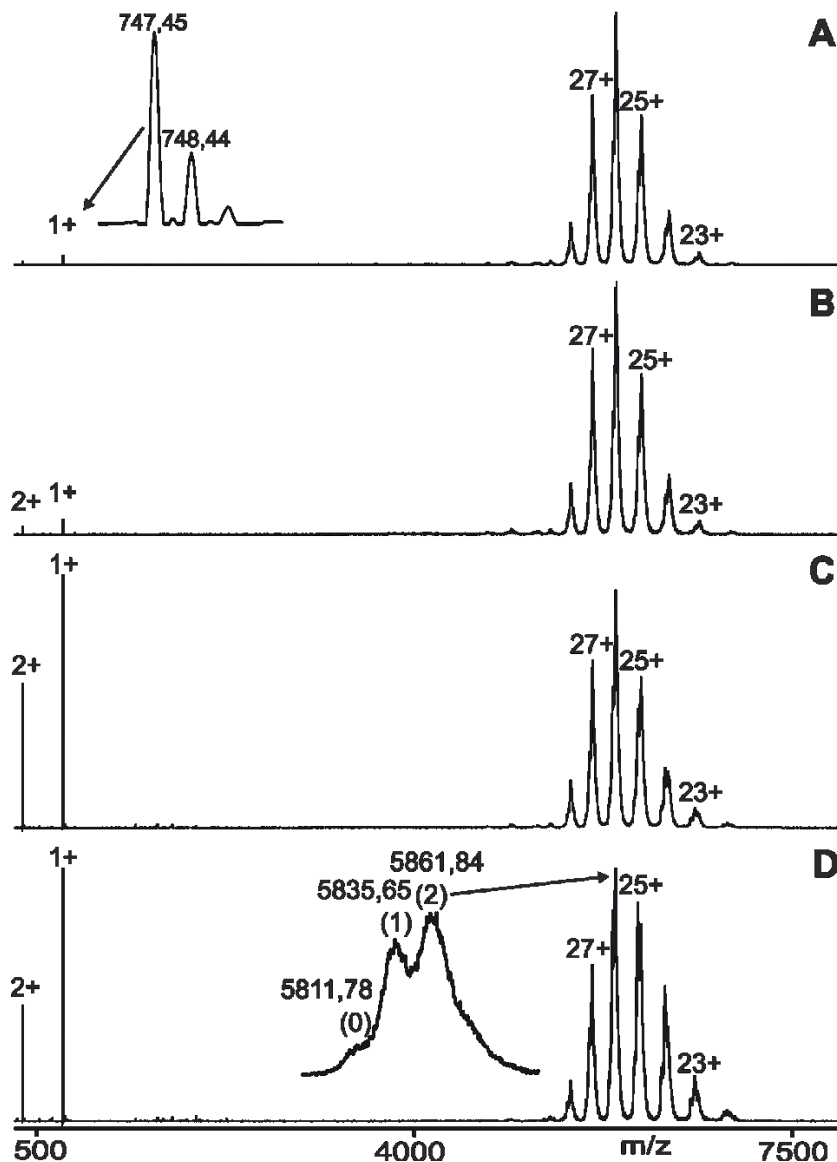


Abbildung 46: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 05 (HpTGKKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 05 (HpTGKKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V; (B) 2 V; (C) 30 V; (D) 60 V, von  $m/z$  5190 bis  $m/z$  7000 wurde der Vergrößerungsfaktor 3,3 angewandt. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 05 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

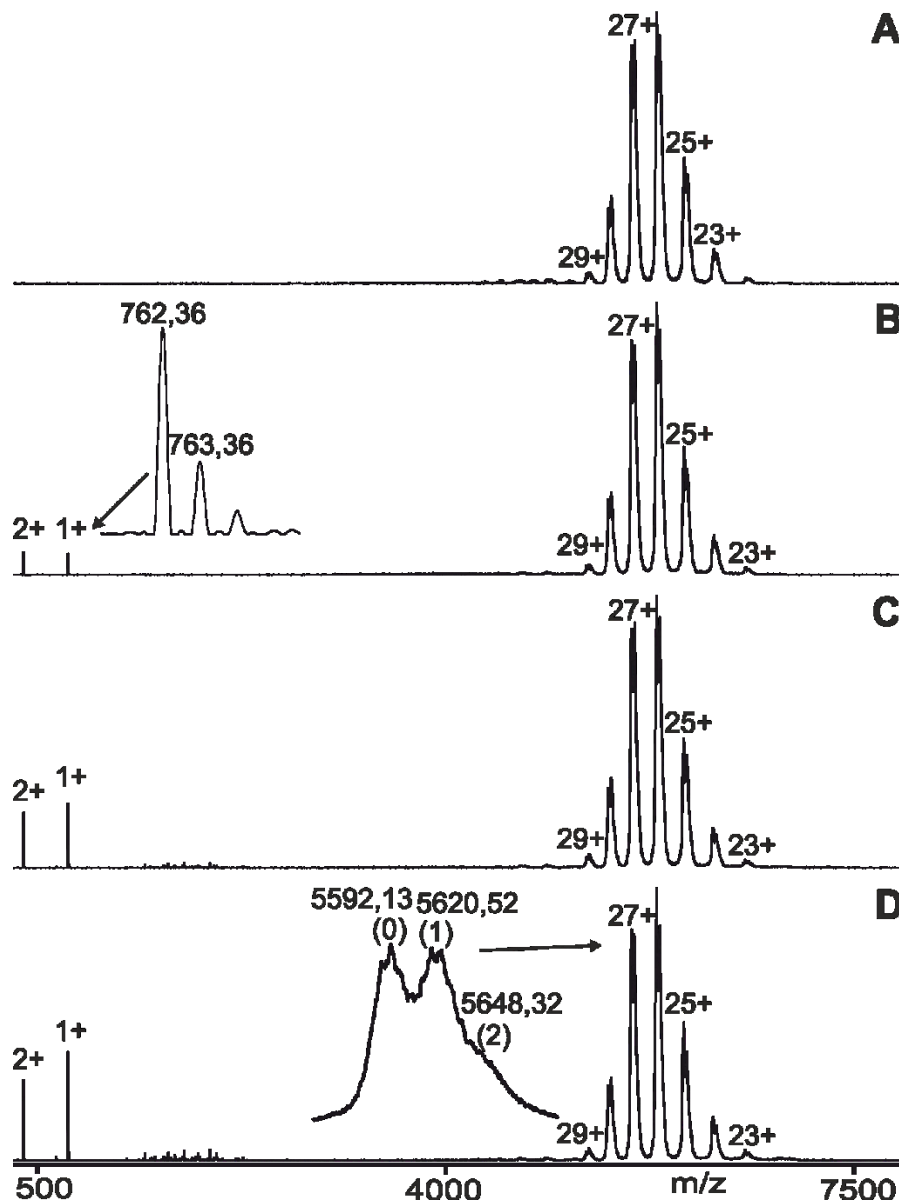


Abbildung 47: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 06 (HpSGERP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 06 (HpSGERP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 20 V, (C) 40 V, (D) 60 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 27+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 06 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

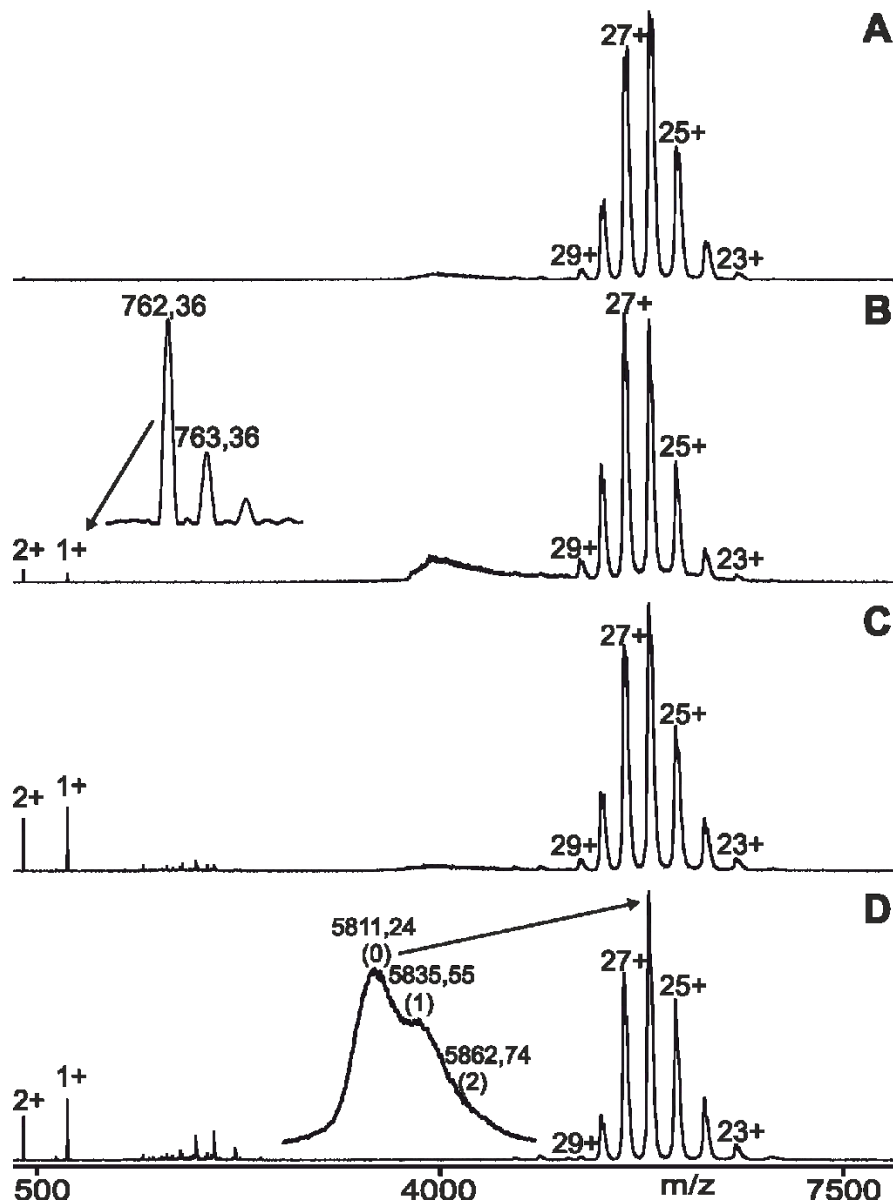


Abbildung 48: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 06 (HpSGERP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 06 (HpSGERP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 10 V, (C) 40 V, (D) 60 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 06 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

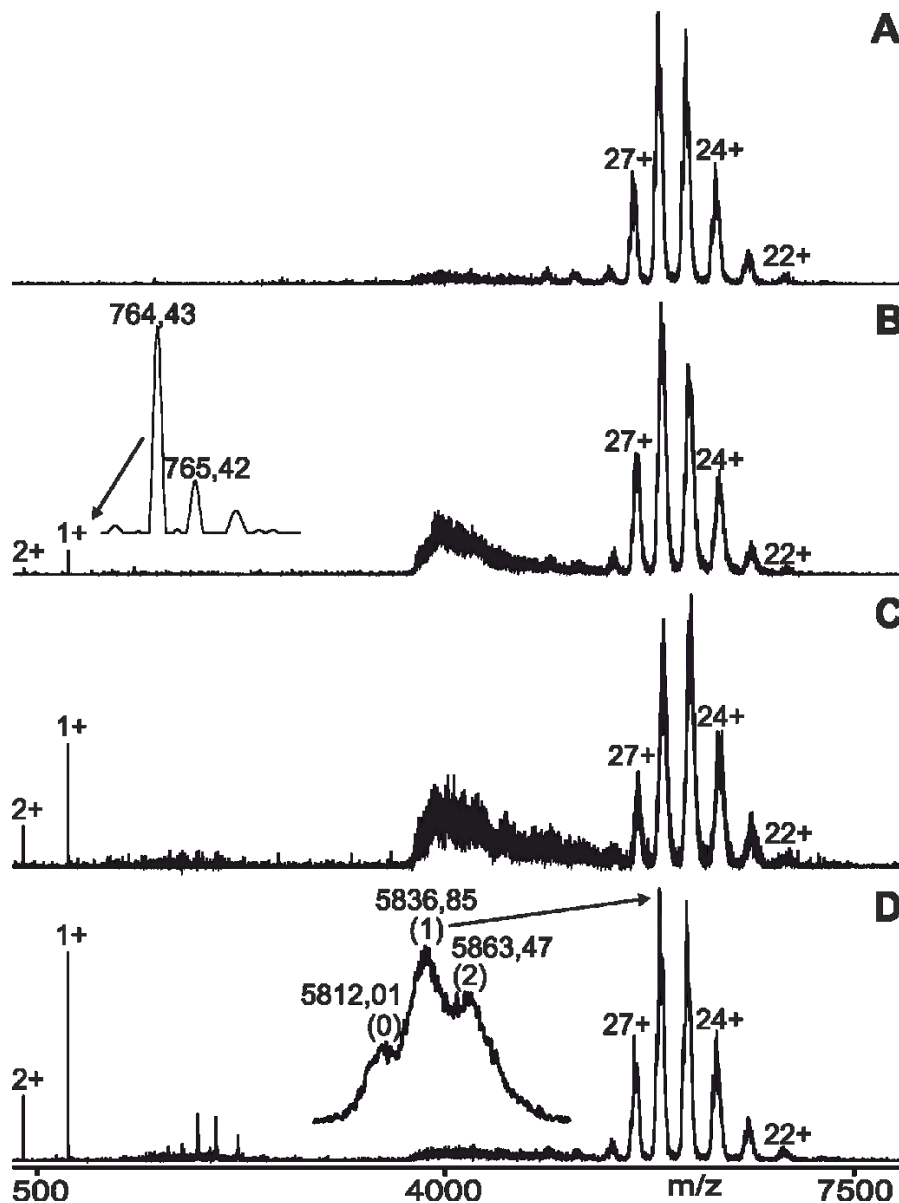


Abbildung 49: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 07 (HpTGEKL)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 07 (HpTGEKL) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 10 V, (C) 30 V, (D) 60 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 07 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

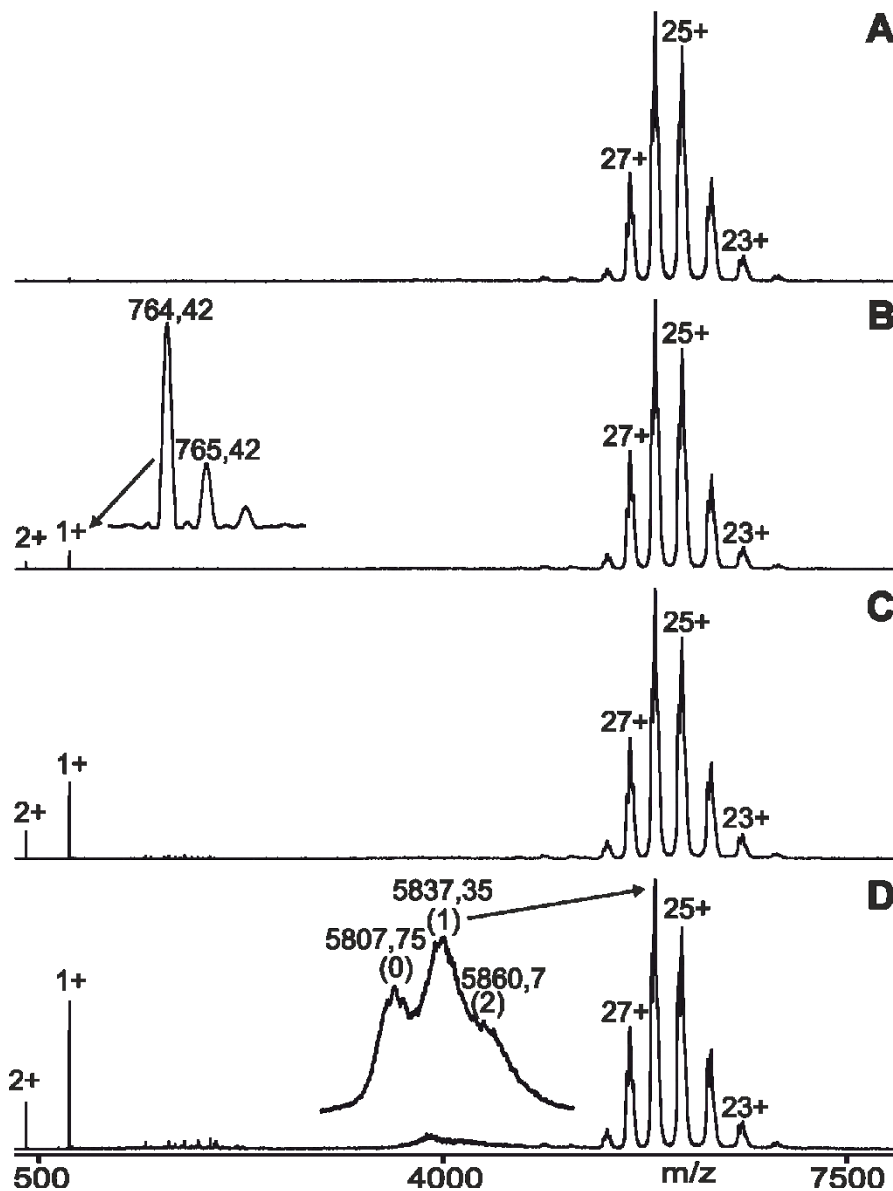


Abbildung 50: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 07 (HpTGEKL)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 07 (HpTGEKL) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 10 V, (C) 30 V, (D) 50 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 07 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

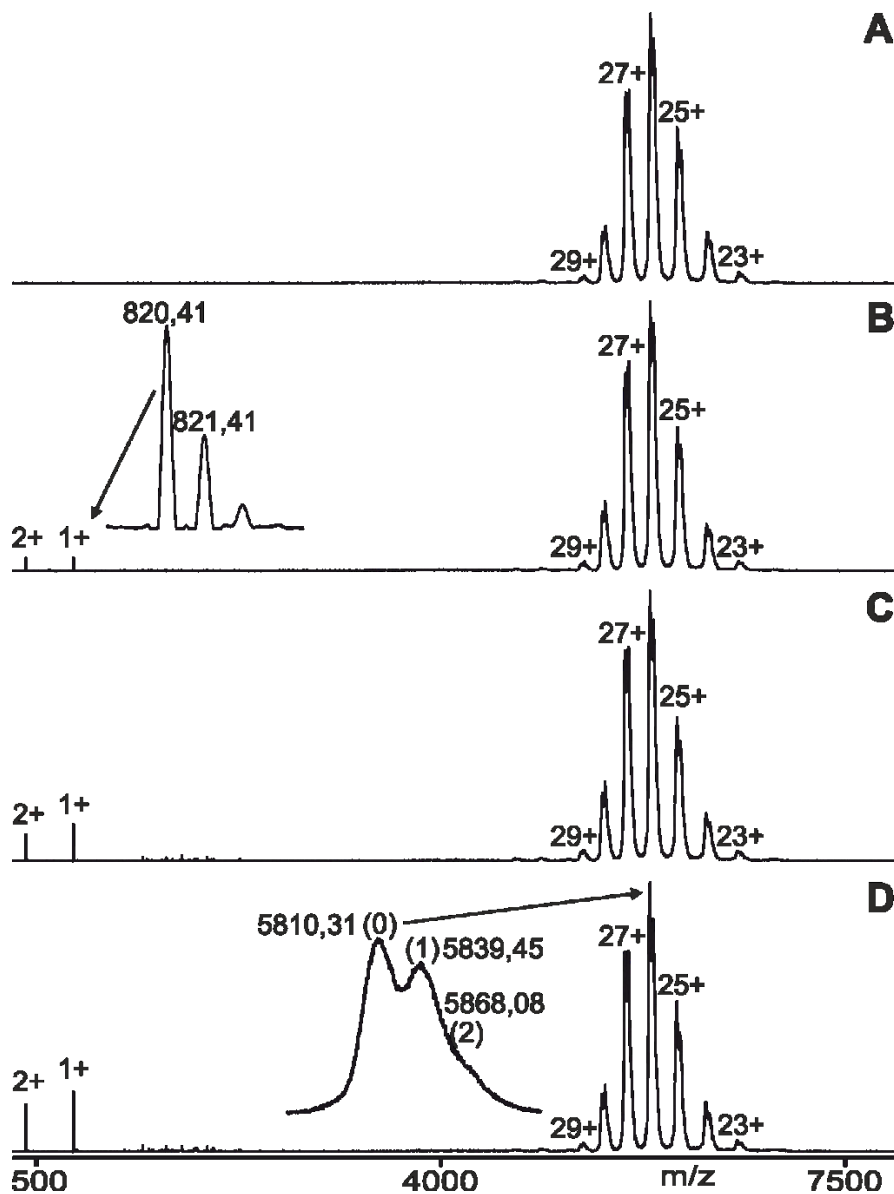


Abbildung 51: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 09 (HpTECKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 09 (HpTECKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 20 V, (C) 40 V, (D) 50 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 09 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

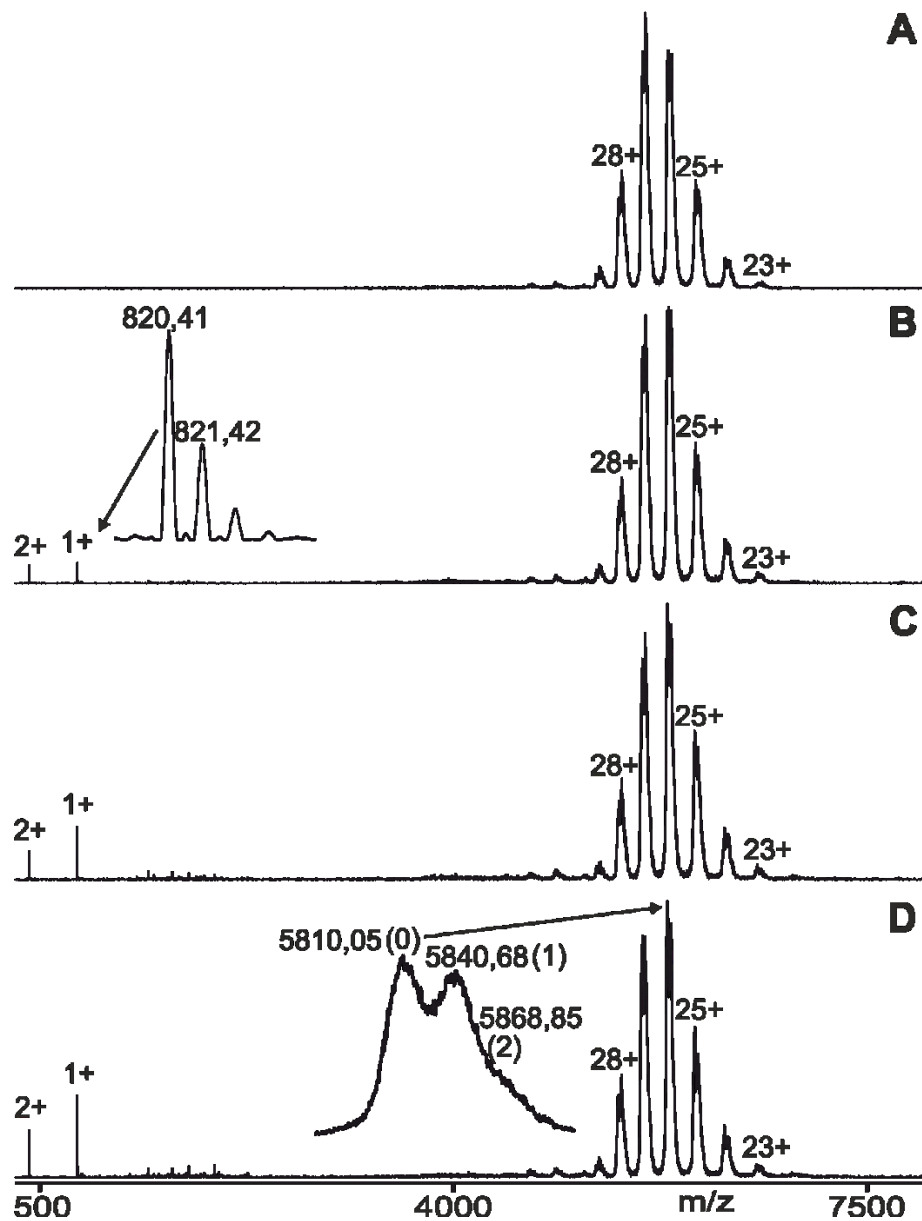


Abbildung 52: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 09 (HpTEEKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 09 (HpTEEKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 20 V, (C) 40 V, (D) 50 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 09 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

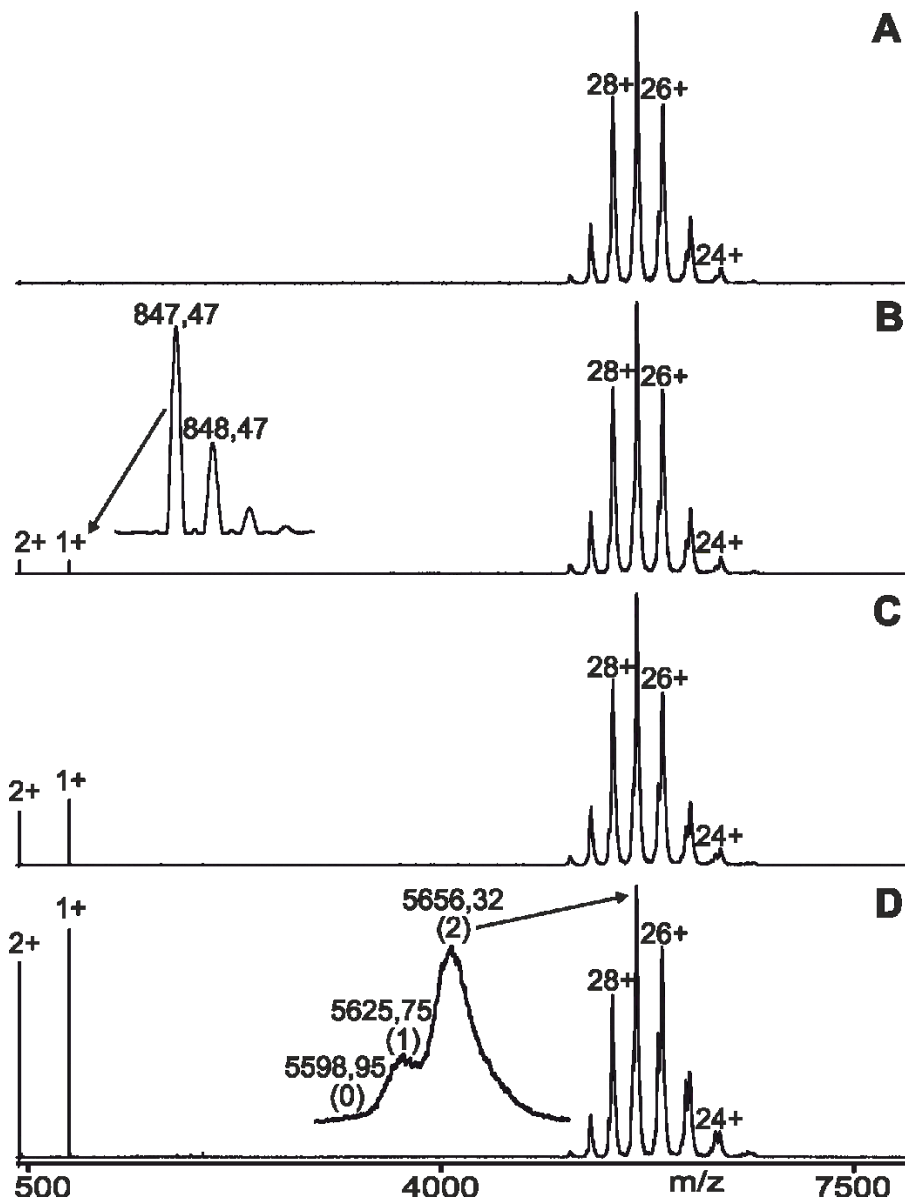


Abbildung 53: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 10 (HpTREKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 10 (HpTREKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 10 V, (C) 30 V, (D) 50 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 27+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 10 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

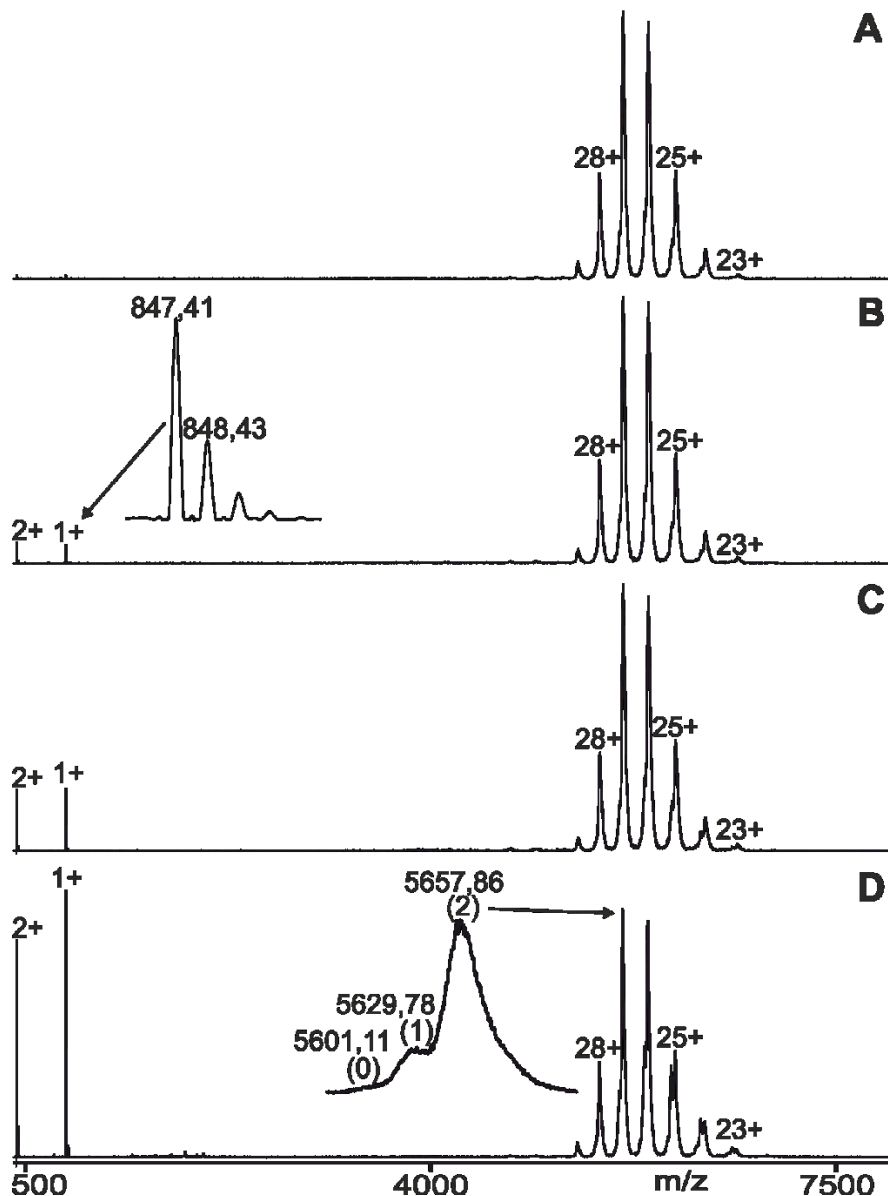


Abbildung 54: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemisches aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 10 (HpTREKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt ist die Messreihe der Dissoziationsanalyse des Immunkomplexes aus Phospho-Hexapeptid 10 (HpTREKP) und anti-HpTGEKP-Antikörper bei zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 10 V, (C) 20 V, (D) 50 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 27+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Immunkomplex freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 10 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7<sup>(132)</sup>.

Zu „3.3.2 Orthodoxe Antikörperbindung“ - Unterabschnitt „Quantitative Analysen der Immunkomplexdissoziationen in Gasphase nach dem ITEM-TWO-Verfahren“

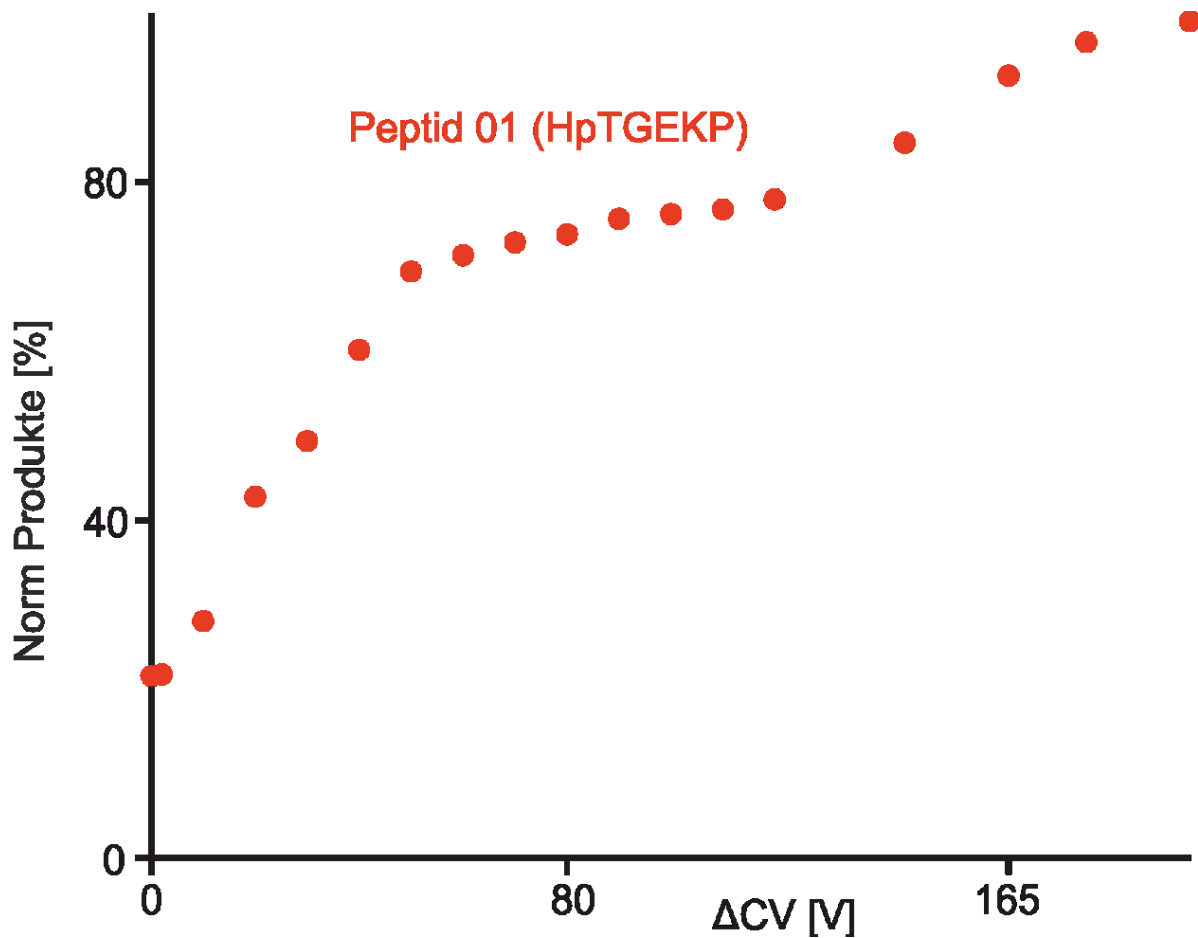


Abbildung 55: Messpunkte einer Messreihe der normalisierten Ionenintensitäten der Produkte des Referenzimmunkomplexes in Abhängigkeit von allen gemessenen Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle

Messpunkte einer Messreihe der normalisierten Ionenintensitäten der Produkte (Norm (Produkte)) des Referenzimmunkomplexes mit dem orthodox bindenden Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKT) in Abhängigkeit von allen gemessenen Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) von 0 V bis 200 V. Es wird ersichtlich, dass sich beim Anpassen der Messpunkte an eine sigmoide Funktion, die mit einer Boltzmann-Gleichung beschrieben werden kann (Boltzmann-Kurve), um eine Spannungsdifferenz der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) von ca. 80 V ein Plateau zeigen würde<sup>(132)</sup> (s. auch Abbildung 56 A).

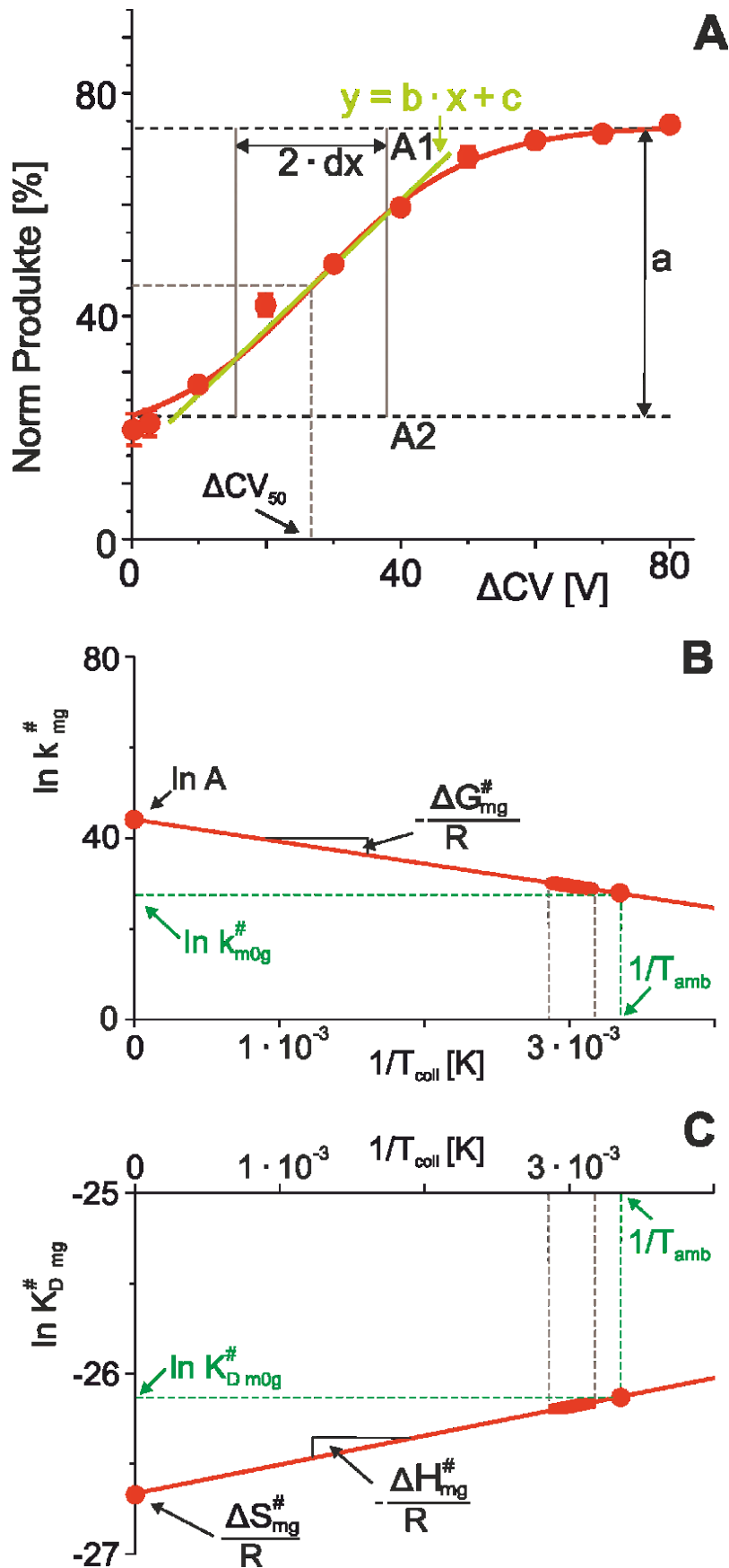


Abbildung 56: ITEM-TWO-Analysen der Dissoziation des Referenzimmunkomplexes aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP)  
Abbildungsbeschreibung s. folgende Seite (Seite xxxvi)

(A) Die Kurve der normalisierten Ionenintensitäten der Immunkomplexionen (Norm (Produkte)) ist in Abhängigkeit von den Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) dargestellt. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Messreihen. Vertikale Balken geben die Standardabweichungen an. Die sigmoidale Kurve wurden mit einer Boltzmann-Gleichungsfunktion angepasst. Die Tangente entlang des „steilen Teils“ der Abhängigkeit der Dissoziationsreaktion des Referenzimmunkomplexes von  $\Delta CV$  (Intervall  $2 \cdot dx$  um dessen Mittelpunkt  $\Delta CV_{50}$ ) ist ebenso wie ihre Gleichung hellgrün dargestellt. „a“ stellt die Differenz zwischen höchsten und niedrigsten experimentell ermittelten Datenpunkt der sigmoidalen Kurve dar. Die für die Berechnungen verwendeten Kurvenparameter sind in Tab. 3 aufgeführt. (B) Arrhenius-Diagramm für die Kurven der Dissoziationen der Immunkomplexionen in der Gasphase. Bei  $\frac{1}{T_{amb}}$  wurden die Werte für  $\ln k_{m0g}^{\#}$  grafisch ermittelt. (C) Gibbs-Helmholtz-Diagramm für die Verläufe der Dissoziationen der Immunkomplexionen in der Gasphase. Bei  $\frac{1}{T_{amb}}$  wurden die Werte für  $\ln K_{m0g}^{\#}$  grafisch ermittelt. Die berechneten kinetischen und thermodynamischen Werte der Dissoziationen der Immunkomplexe in Gasphase sind in Tab. 4 aufgeführt. Jeder Datenpunkt (die verdickten Teile der der Linien in (B) und (C)) wurde experimentell ermittelt. Die Kurven wurden linear extrapoliert<sup>(132)</sup>.

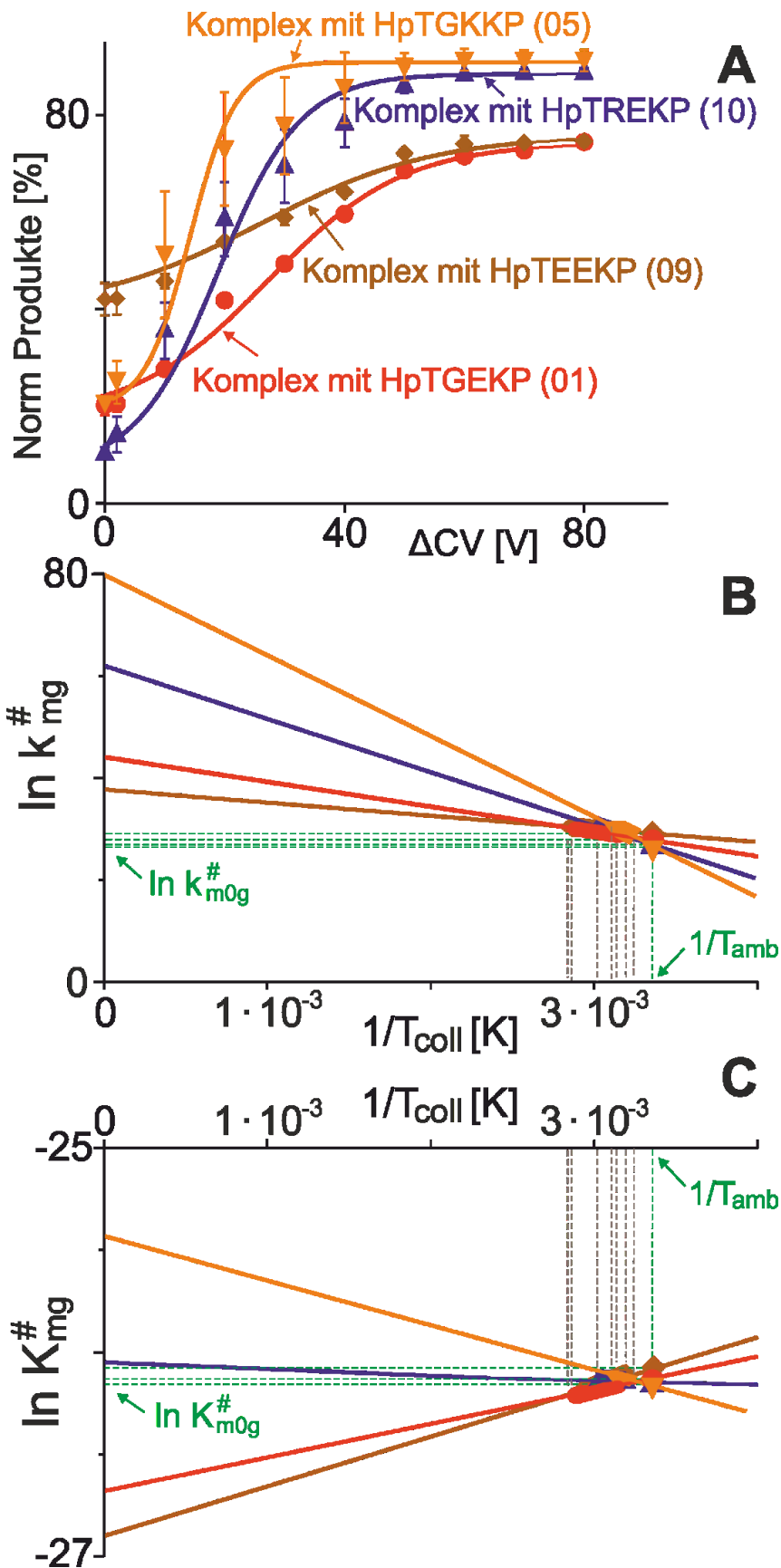


Abbildung 57: ITEM-TWO-Analysen der Dissoziation der Immunkomplexe aus anti-HpTGEKP-Antikörper und entweder Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP), 05 (HpTGKKP), 09 (HpTEEKP) oder 10 (HpTREKP).

Abbildungsbeschreibung s. folgende Seite (Seite xxxviii)

(A) Die Kurven der normalisierten Ionenintensitäten der Immunkomplexionen (Norm (Produkte)) sind in Abhängigkeit von den Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ) dargestellt. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Messreihen. Vertikale Balken geben die Standardabweichungen an. Die sigmoidalen Kurven wurden mit einer Boltzmann-Gleichungsfunktion angepasst. Die für die Berechnungen verwendeten Kurvenparameter sind in Tab. 3 aufgeführt. Die Phospho-Hexapeptide sind farblich gekennzeichnet. (B) Arrhenius-Diagramm für die Kurven der Dissoziationen der Immunkomplexionen in der Gasphase. Linienfarben wie in (A). Bei  $\frac{1}{T_{amb}}$  wurden die Werte für  $\ln k_{m0g}^{\#}$  grafisch ermittelt. (C) Gibbs-Helmholtz-Diagramm für die Verläufe der Dissoziationen der Immunkomplexionen in der Gasphase. Linienfarben wie in (A). Bei  $\frac{1}{T_{amb}}$  wurden die Werte für  $\ln K_{m0g}^{\#}$  grafisch ermittelt. Die berechneten kinetischen und thermodynamischen Werte der Dissoziationen der Immunkomplexe in Gasphase sind in Tab. 4 aufgeführt. Jeder Datenpunkt (die verdickten Teile der der Linien in (B) und (C)) wurde experimentell ermittelt. Die Kurven wurden linear extrapoliert <sup>(132)</sup>.

## Zu „3.3.3 Unorthodoxe Antikörperbindung“

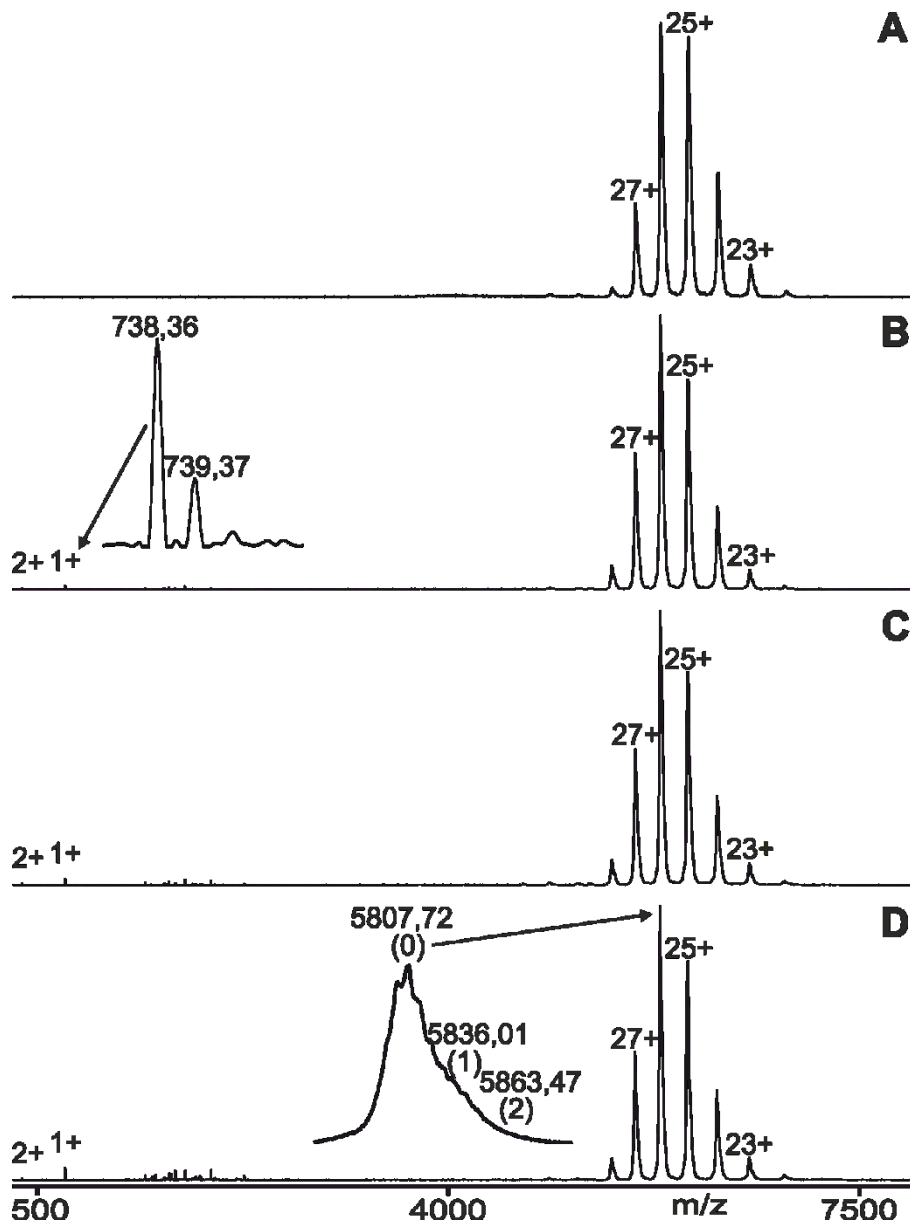


Abbildung 58: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 08 (HpTGEKS)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 30 V, (C) 40 V, (D) 70 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der mutmaßlichen Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Addukt freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 08 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

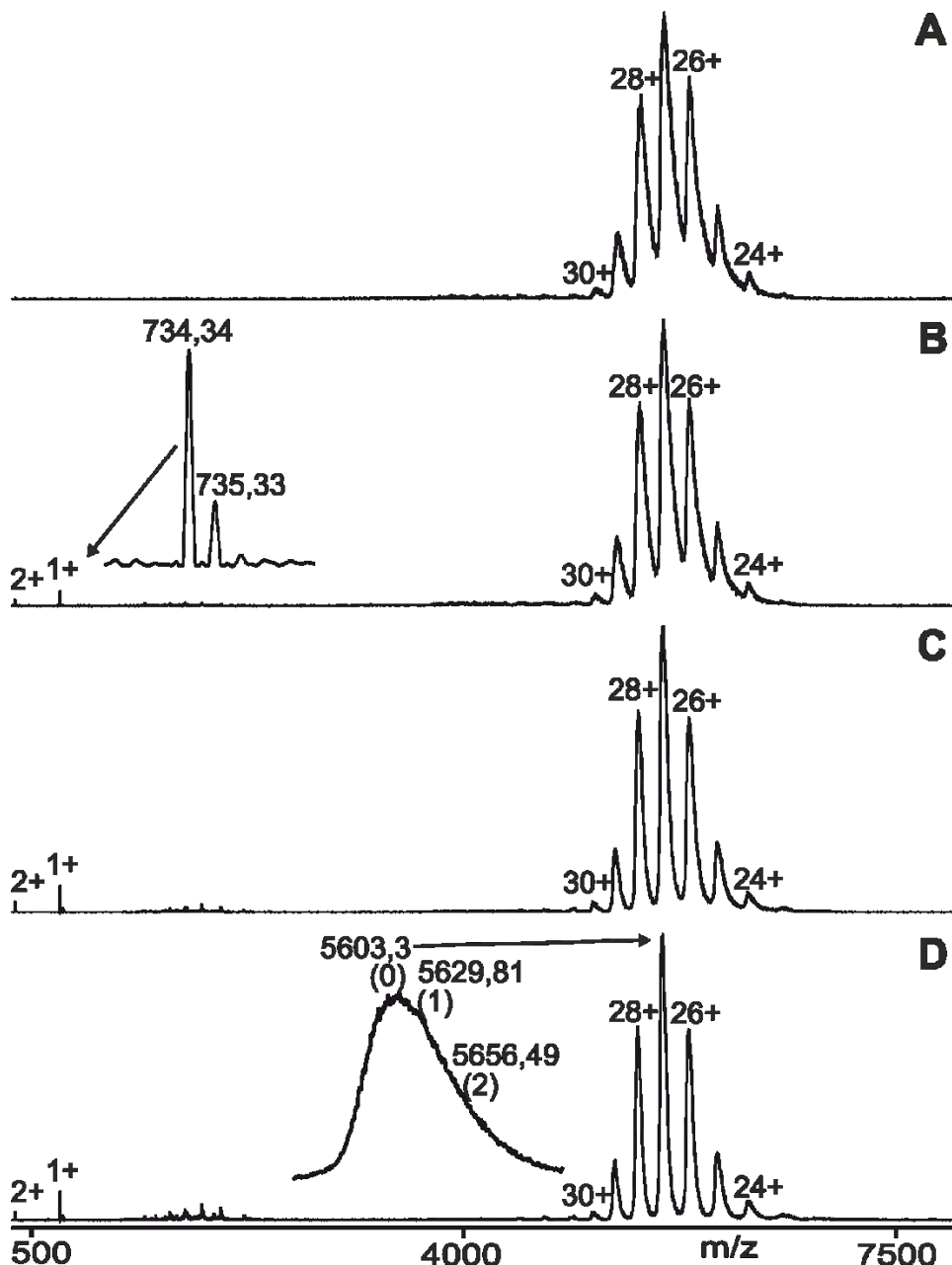


Abbildung 59: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 03 (HpSGEKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 30 V, (C) 50 V, (D) 70 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der mutmaßlichen Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 27+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Addukt freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 03 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

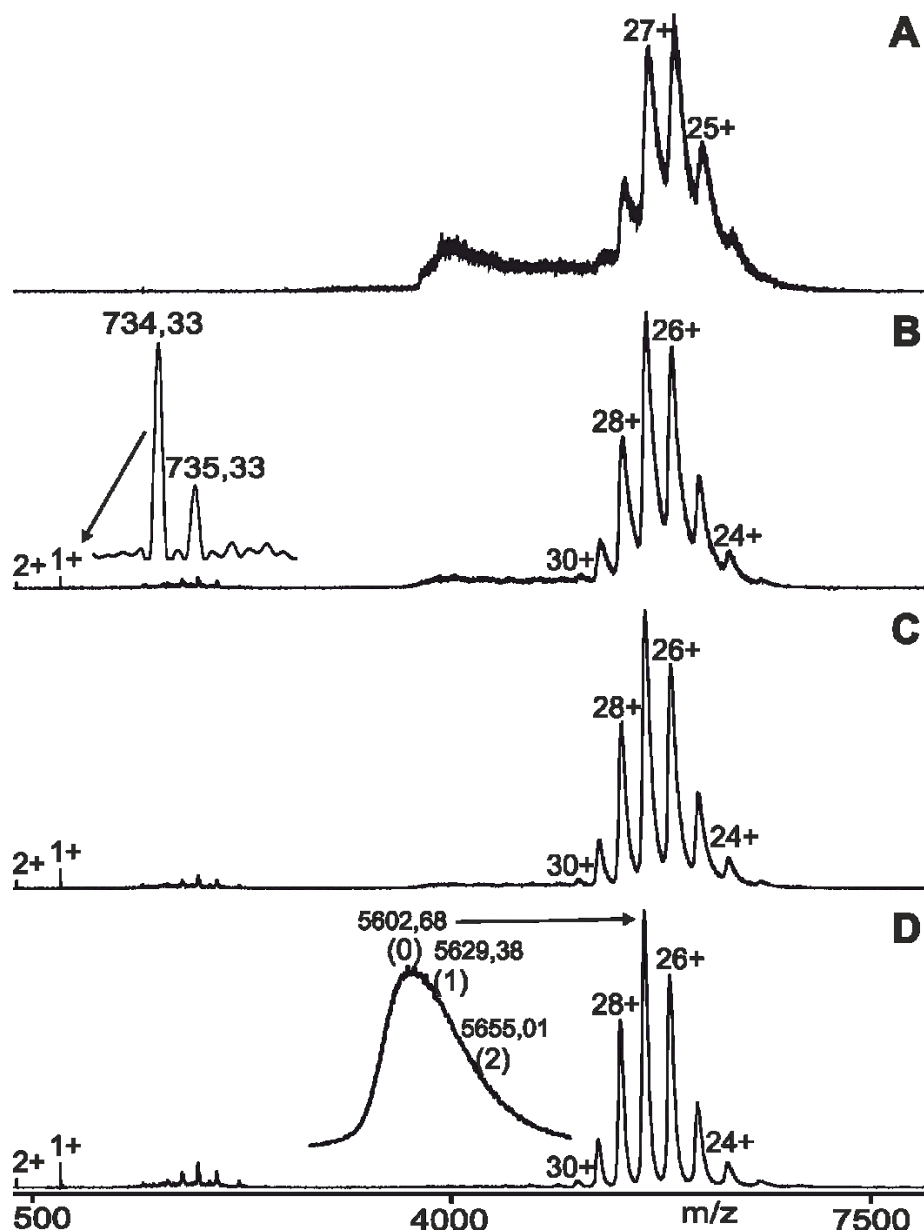


Abbildung 60: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 03 (HpSGEKP). Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 2 V, (B) 40 V, (C) 50 V, (D) 70 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der mutmaßlichen Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 27+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Addukt freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 03 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

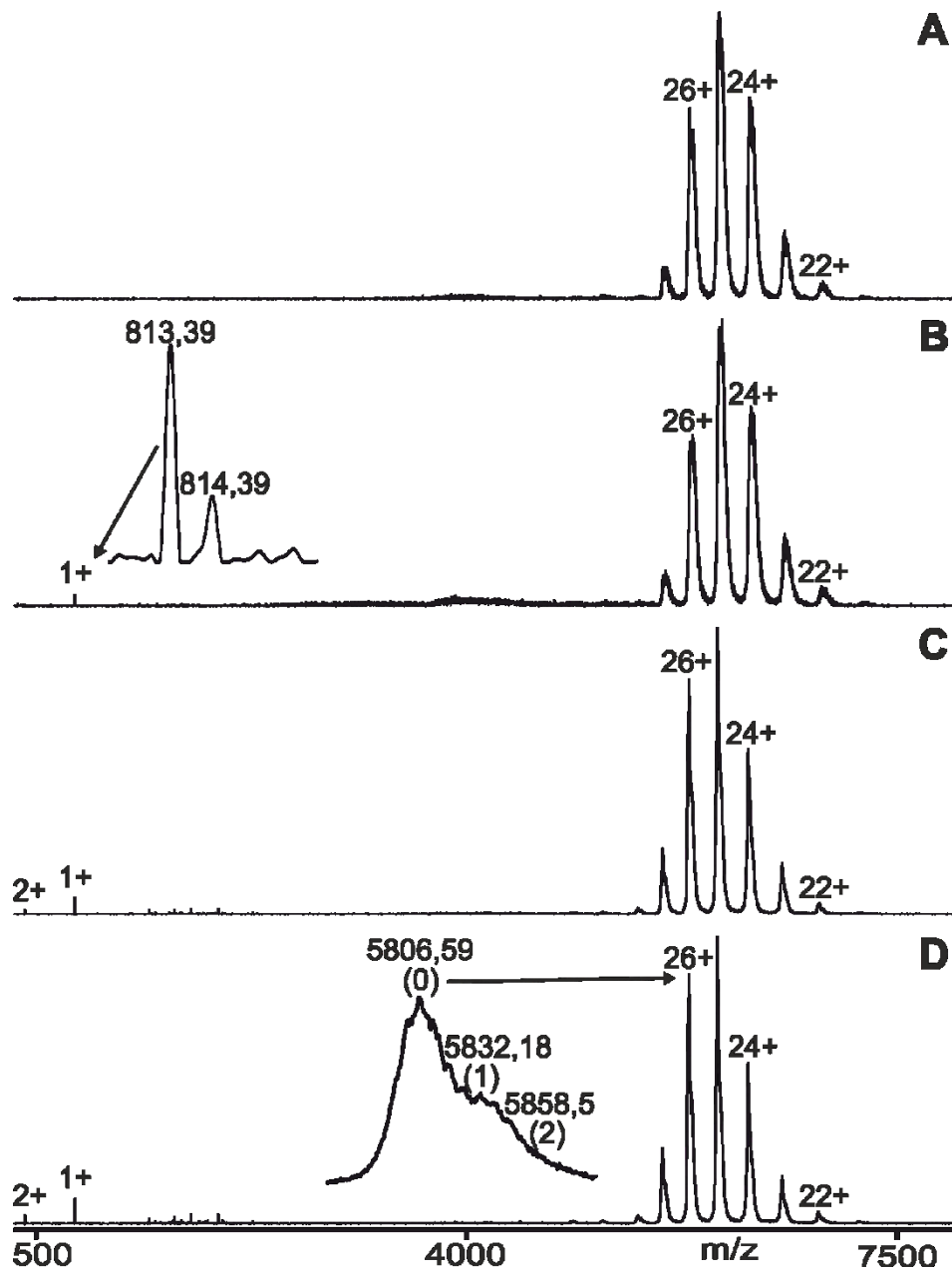


Abbildung 61: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 04 (HpTHTHT). Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. Dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 20 V, (C) 40 V, (D) 50 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers und der mutmaßlichen Immunkomplexe (Antikörper plus ein Peptid und Antikörper plus zwei Peptide) sind in der rechten Ionenserie die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Ionensignals. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Signale der vom Addukt freigesetzten, einfach und zweifach geladenen Ionen des Phospho-Hexapeptids 04 sind auf der linken Seite gekennzeichnet. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(132)</sup>.

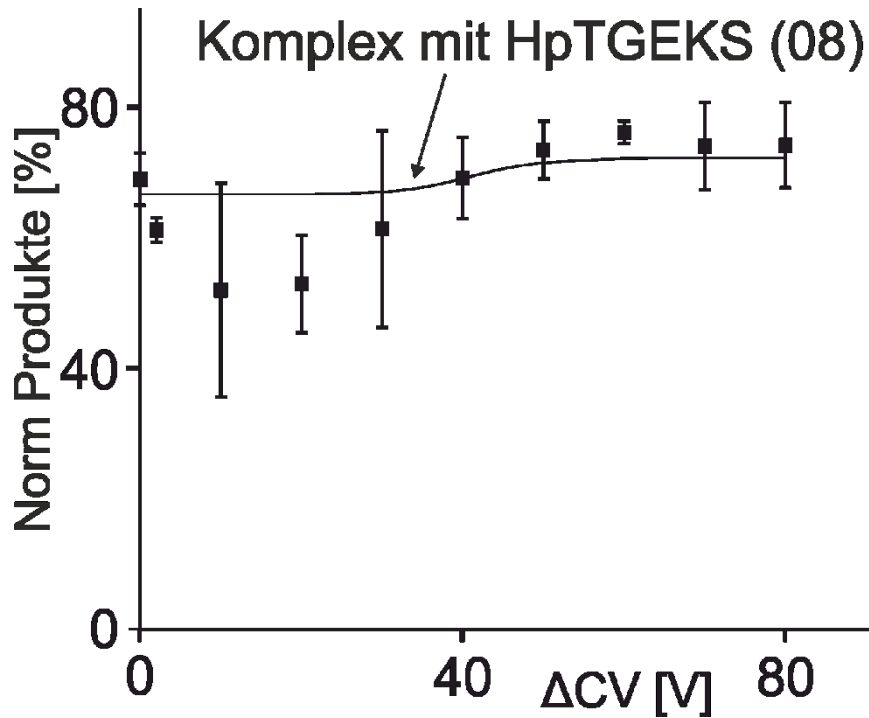


Abbildung62: Graph der normalisierten Ionenintensitäten der Produkte (Norm (Produkte)) des Immunkomplexes mit dem unorthodox bindenden Phospho-Hexapeptids 08 (HpTGEKS) in Abhängigkeit von  $\Delta CV$

Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Messreihen. Die vertikalen Balken geben die Standardabweichungen an. Zur Anpassung der Kurve wurde eine Boltzmann-Gleichungsfunktion angewandt, aber die Standardabweichungen der experimentell bestimmten Werte sind erheblich <sup>(132)</sup>.

### 6.2.3 Ergänzungsmaterialien zu „3.4 Charakterisierung von in Endometriumkarzinomen mutierten ZNF-Linkersequenzen mittels ITEM-TWO-Analysen“

Zu „3.4.1 Ausbleibende Antikörperbindung“

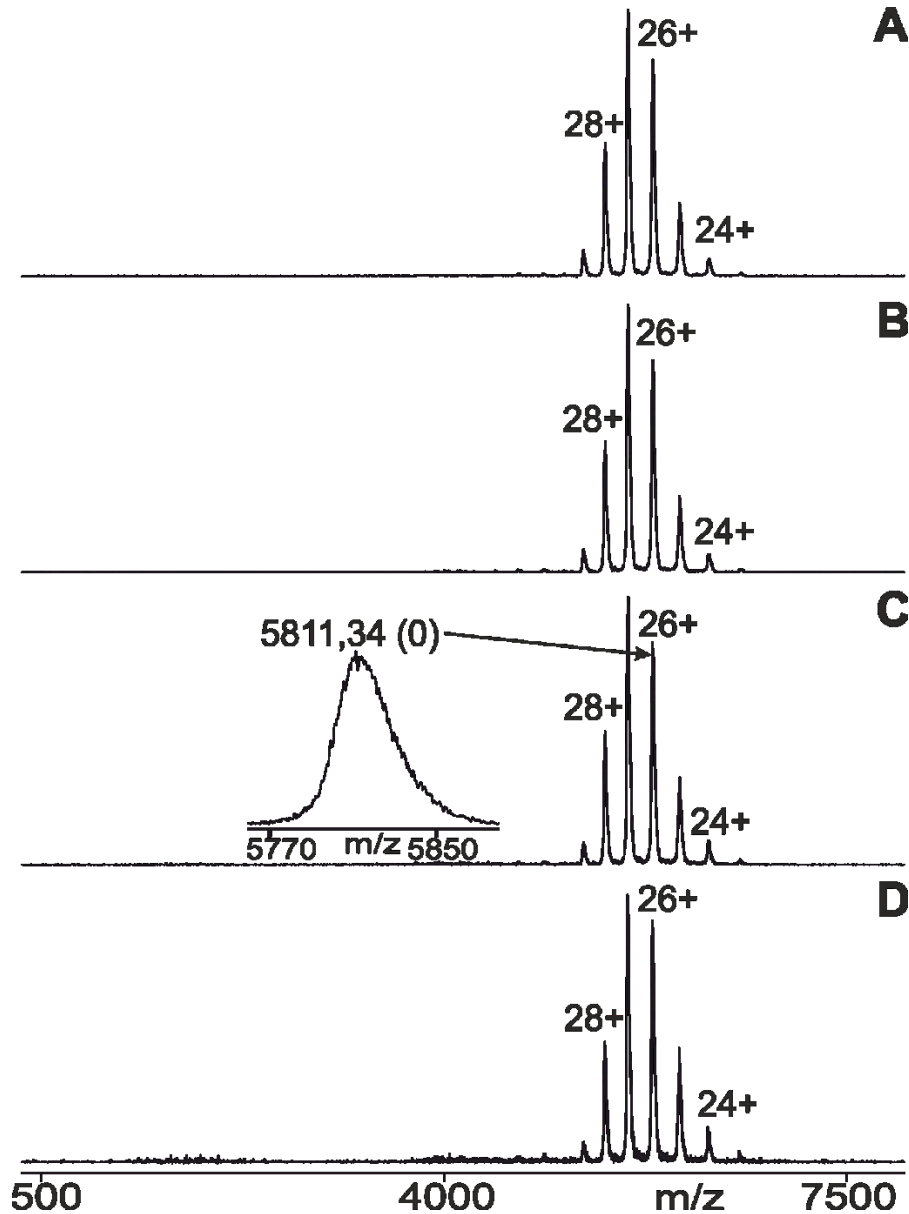


Abbildung 63: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Hexapeptid 100 (YTGEKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. In der Messreihe dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 10 V, (C) 30 V, (D) 50 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers sind in der rechten Ionenserie Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (C) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Antikörperperionensignals. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der gebundenen Peptide an. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

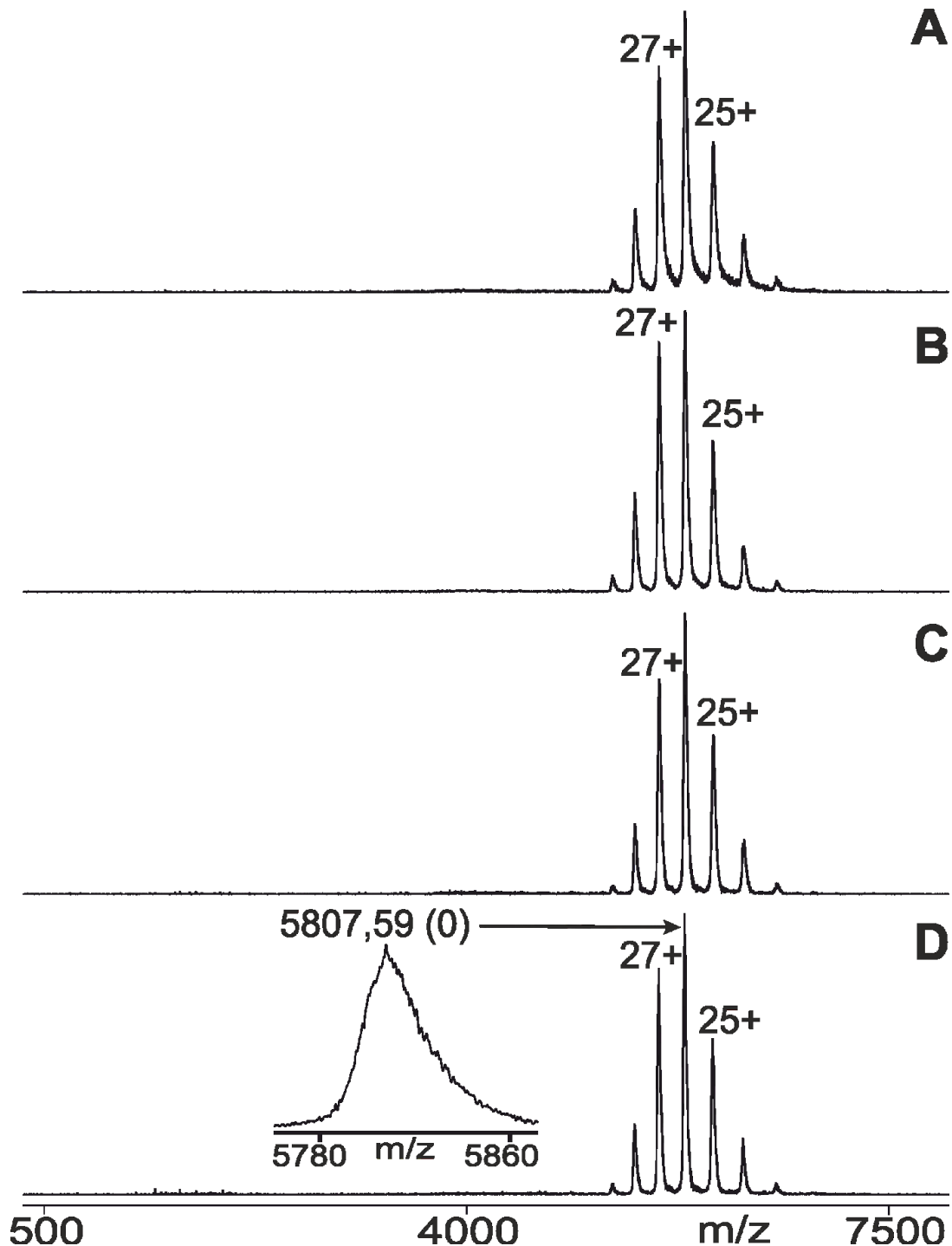


Abbildung 64: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 101 (YpTGEKP)

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. In der Messreihe dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 10 V, (C) 30 V, (D) 50 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers sind in der rechten Ionenserie Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Antikörperionensignals. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der gebundenen Peptide an. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

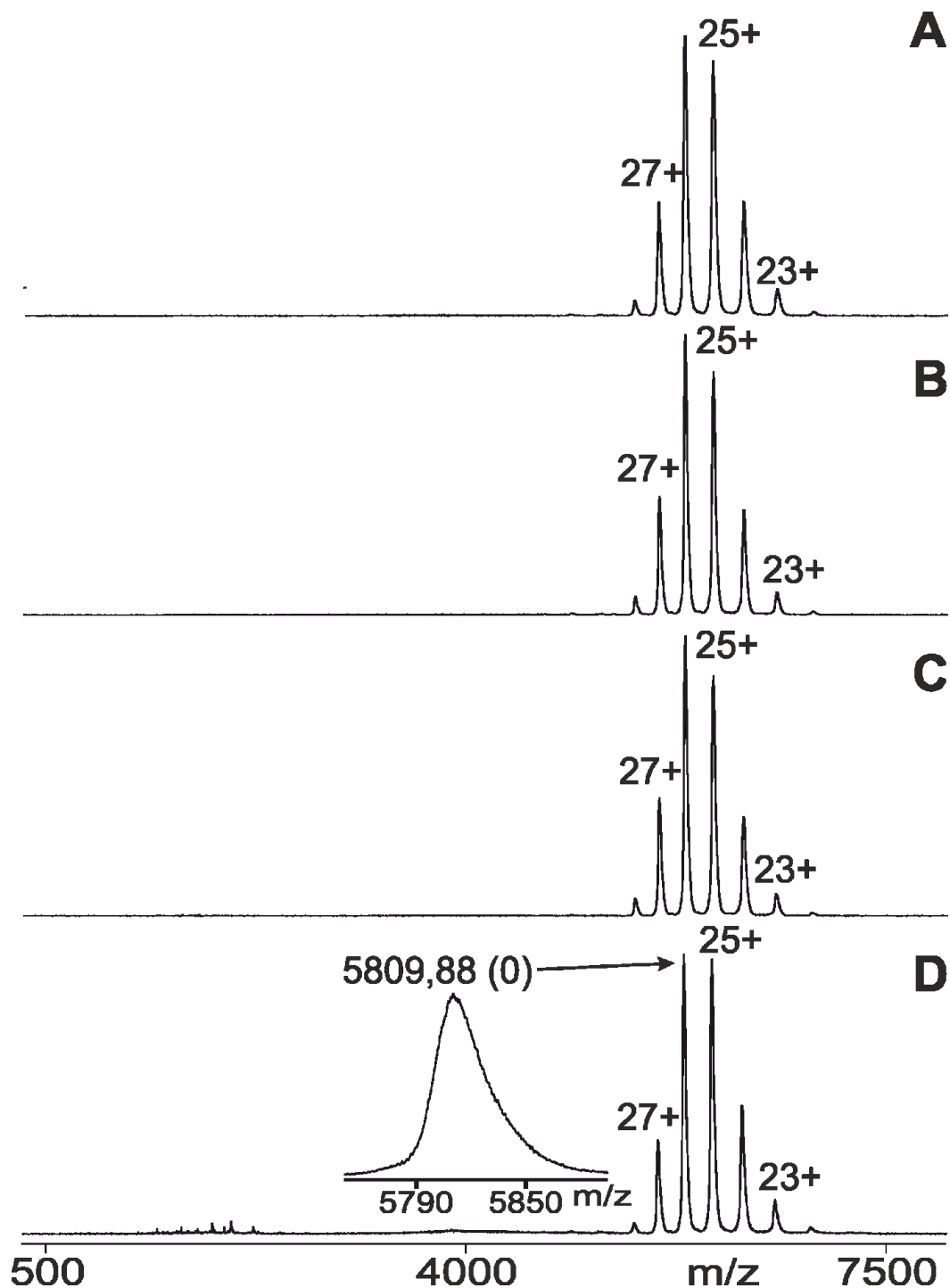


Abbildung 65: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Di-Phospho-Hexapeptid 103 (pYpTGEKP). Das molare Verhältnis von Antikörper zu Hexapeptid war ca. 1 : 3 (Antikörperkonzentration: 1  $\mu$ M, Peptidkonzentration: 3  $\mu$ M). Die Massenspektren wurden nach Blockierung der Transmission von Ionen mit geringer Masse ( $m/z < 3900$ ) aufgenommen. In der Messreihe dargestellt sind zunehmende Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta CV$ ): (A) 0 V, (B) 10 V, (C) 30 V, (D) 60 V. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers sind in der rechten Ionenserie Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (D) zeigt eine Vergrößerung des 26+-Antikörperionensignals. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der gebundenen Peptide an. Das Probenvolumen betrug 3  $\mu$ l. Das Lösungsmittel war 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,7 <sup>(114)</sup>.

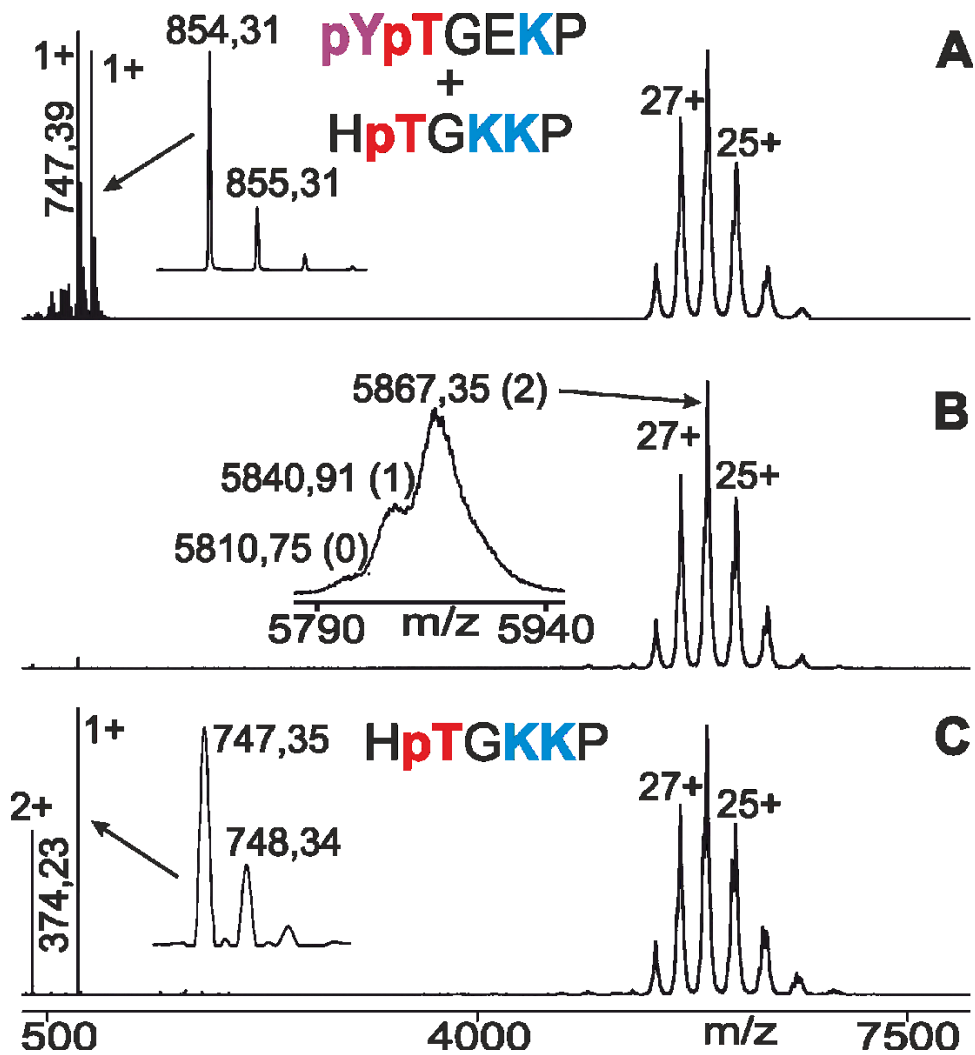


Abbildung 66: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des ternären Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper sowie den beiden Phospho-Hexapeptiden 05 (HpTGKKP) und 103 (pYpTGEKP) im molaren Verhältnis 1:3:3

Die Antikörperkonzentration betrug  $1 \mu\text{M}$ , die jeweiligen Peptidkonzentrationen  $3 \mu\text{M}$ . (A) Die Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ) ist bei Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta\text{CV}$ ) von  $0 \text{ V}$  nicht blockiert. Von  $m/z 5370$  bis  $m/z 6700$  wurde der Vergrößerungsfaktor 52 angewandt. (B) Die Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ) bei Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta\text{CV}$ ) von  $0 \text{ V}$  ist blockiert. (C) Die Transmission von Ionen niedriger Massen ( $m/z < 3900$ ) bei Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ( $\Delta\text{CV}$ ) von  $30 \text{ V}$  ist blockiert. Für ausgewählte Ionensignale des anti-HpTGEKP-Antikörpers bzw. der Immunkomplexe (rechte Ionenserien) sowie des vom Immunkomplex freigesetzten einfach und zweifach positiv geladenen Phospho-Hexapeptids 05 (linke Ionenserien) sind die Ladungszustände und  $m/z$ -Werte angegeben. Der Einschub in (B) zeigt eine Vergrößerung des  $26+$ -Ionensignals des anti-HpTGEKP-Antikörpers bzw. des Immunkomplexes. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gebundenen Peptide an. Die Einschübe in (A) und (C) zeigen Vergrößerungen der isotopisch aufgelösten Peptidionensignale,  $m/z$ -Werte sind angegeben. Die Aminosäuresequenzen der in der ternären Mischung enthaltenen Hexapeptide sind im Einbuchstabencode dargestellt. Der Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure. Das Probenvolumen betrug  $3 \mu\text{l}$ . Das Lösungsmittel war  $200 \text{ mM}$  Ammoniumacetat,  $\text{pH } 6,7$  <sup>(114)</sup>.

### Ergänzungsinformation zu „3.4.3 3D-Strukturanalysen ausgewählter in Endometriumkarzinomen gehäuft mutierter ZNF-Linker-

#### Absatz zur Auswahl der Peptidstrukturen für die modellierten 3D-Strukturanalysen

Jede für die modellierten, vergleichenden 3D-Strukturanalysen ausgewählte Peptidstruktur, wurde aus ca. 2000 Konformationen herausgefiltert<sup>(114)</sup>. Diese Konformationen wurden durch wiederholten Austausch von Molekulardynamiksimulationen (REMD) für jede der Aminosäuresequenzen der Hexapeptide erhalten. Für jedes Hexapeptid wurde mittels einer Clusteranalyse eine variable Anzahl von Clustern erzeugt, bei der die ca. 2000 Konformationen eines bestimmten Peptids gruppiert wurden (s. Abbildung 67). Insbesondere für die Phosphohexapeptide 01 (HpTGEKP), 101 (YpTGEKP), 102 (pYTGEKP) und 103 (pYpTGEKP) stammen die verwendeten, repräsentativen Peptidstrukturen aus Clustern, die jeweils ca. 600 bis 1000 Strukturvarianten umfassen. Für Details zur Auswahl der weiter verwendeten repräsentativen Peptidstrukturen ist auf die Abbildung S39 und die dazugehörige Abbildungsbeschreibung zu verweisen.

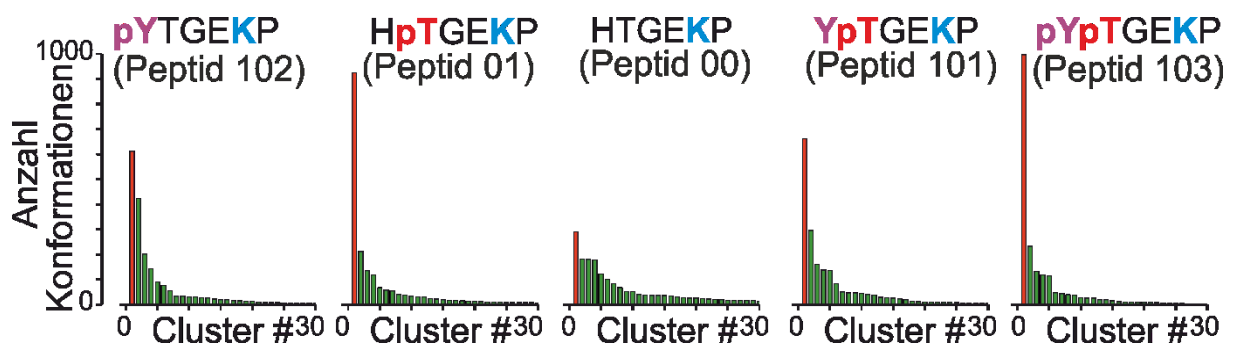


Abbildung 67: Clustergrößenverteilung ausgewählter Hexapeptide

Die Aminosäuresequenzen der Hexapeptide sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure. Angegeben sind die Cluster-Nummern und die Anzahl der Konformationen im jeweiligen Cluster. Die Gesamtzahl der aus den Trajektorien entnommenen Konformationen beträgt 2000. Es sind die 30 Cluster mit der höchsten Anzahl an Konfigurationen dargestellt. Unter den jeweiligen Clustern ist das dominierende Cluster, d. h. das mit der höchsten Anzahl an Konfigurationen durch einen roten Balken gekennzeichnet. Der Abstand der Quadratwurzel der Varianz zwischen den Konformationen des Rückgrats wird als Parameter für die Clusteranalyse verwendet. Der Algorithmus zählt die Anzahl aller benachbarten Konfigurationen in der MD-Trajektorie unter Verwendung eines vordefinierten Grenzwerts für den Abstand der Quadratwurzel der Varianz zwischen ihnen. Dann werden die Konformationen mit der größten Anzahl aller benachbarten Konfigurationen sowie diese benachbarten Konfigurationen selbst als Cluster zusammengefasst und aus dem Pool entfernt. Dieses Verfahren wird so lange wiederholt, bis alle Konformationen aus dem Pool entfernt und den jeweiligen Clustern zugeordnet sind. Für jedes Cluster wurde die zentrale Konformation, d. h. die Konformation mit der kleinsten Quadratwurzel der Varianz im Vergleich zu allen anderen Konformationen im Cluster, als repräsentative Peptidstruktur ausgewählt und weiter verwendet<sup>(114)</sup>.

Die Auswahl der Peptidstrukturen erfolgte, da diese zu den häufigsten Clustern gehörten und weiterhin, verglichen mit allen anderen Konformationen der jeweiligen dominierenden Cluster, die geringsten Quadratwurzeln der Varianzen aufwiesen. Es ist zu betonen, dass bei allen modellierten Peptidstrukturen die Rückgrat-Konfigurationen sämtlicher Strukturmodelle der dominierenden Cluster einander sehr ähnlich sind. Dies deutet darauf hin, dass die bevorzugten Konformationen der modellierten Peptidstrukturen existieren, was insbesondere für die phosphorylierten Peptide zuzutreffend erscheint. Die wahrscheinlichste treibende Kraft für die Annahme einer bevorzugten Konformation aller phosphorylierten Hexapeptide ist die polare Wechselwirkung durch die Salzbrücke. Diese Salzbrücke bildet die sich zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Aminosäurerests K5 und der Phosphatgruppe der Aminosäurereste T2 oder Y1. Beide Atomgruppen sind Teil der benachbarten Teilflächen der jeweiligen Hexapeptide und befinden sich in unmittelbarer Nähe zueinander. Diese Atomgruppen sind auf der gleichen Seite jedes Strukturmodells dargestellt (s. Tab. 8).

Tab. 8: Atom-Atom-Abstände untersuchter Phospho-Hexapeptide<sup>(114)</sup>

*Dargestellt sind die Abstände zwischen den Atomen der mittels modellierter 3D-Strukturanalysen untersuchten Hexapeptide 01, 101, 102 und 103.*

Nummer Peptid	Aminosäuresequenz <sup>a), b)</sup>	Atome	
		(Aminosäure- reste <sup>b)</sup> )	Abstand <sup>c)</sup>
01	HpTGEKP	$P_{(T2)} - N_{\epsilon(K5)}$	4,072
101	YpTGEKP	$P_{(T2)} - N_{\epsilon(K5)}$	3,642
102	pYTGEKP	$P_{(Y1)} - N_{\epsilon(K5)}$	3,877
103	pYpTGEKP	$P_{(T2)} - N_{\epsilon(K5)}$	6,323
		$P_{(Y1)} - N_{\epsilon(K5)}$	3,931

<sup>a)</sup> Schreibweise für Aminosäuren im Einbuchstabencode; Die Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure.

<sup>b)</sup> Die Stelle der Phosphorylierung ist mit einem „p“ in Kleinbuchstaben angegeben und bezieht sich auf die nachfolgende Aminosäure.

<sup>c)</sup> Standardabweichungen der Abstände sind betragen ca. 1 Å.

### 6.3 Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49. DOI: 10.3322/caac.21660.
2. Raglan O, Kalliala I, Markozannes G, Cividini S, Gunter MJ, Nautiyal J, et al. Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature. *Int J Cancer.* 2019;145(7):1719-30. DOI: 10.1002/ijc.31961
3. Lee YC, Lheureux S, Oza AM. Treatment strategies for endometrial cancer: current practice and perspective. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2017;29(1):47-58. DOI: 10.1097/gco.0000000000000338.
4. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet.* 2005;366(9484):491-505. DOI: 10.1016/s0140-6736(05)67063-8.
5. Waldmann A, Eisemann N, Katalinic A. Epidemiology of malignant cervical, corpus uteri and ovarian tumours—current data and epidemiological trends. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2013;73(02):123-9. DOI: 10.1055/s-0032-1328266.
6. Kiechle M, Schlag PM. Endometriumkarzinom. *Der Onkologe.* 2017;23(1):2-4. DOI: 10.1007/s00761-016-0173-7.
7. Liang X, Zeng H, Chen S, Jiang M, Liu S, Fan J. Ovarian metastasis risk factors in endometrial carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2021;267:245-55. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2021.11.016.
8. International Agency for Research on Cancer . World cancer report 2014. editors: Wild CP, Stewart BW. Lyon, WHO; 2014. ISBN: 9789283204435.
9. Bell DW, Ellenson LH. Molecular genetics of endometrial carcinoma. *Annu Rev Pathol.* 2019;14:339-67. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020117-043609.
10. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;15(1):10-7. DOI: 10.1016/0090-8258(83)90111-7.
11. Vermij L, Smit V, Nout R, Bosse T. Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. *Histopathology.* 2020;76(1):52-63. DOI: 10.1111/his.14015.
12. Dedes KJ, Wetterskog D, Ashworth A, Kaye SB, Reis-Filho JS. Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(5):261-71. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.216.
13. Urick ME, Bell DW. Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2019;19(9):510-21. DOI: 10.1038/s41568-019-0177-x.

14. Van Den Heerik ASV, Horeweg N, Nout RA, Lutgens LC, Van Der Steen-Banasik EM, Westerveld GH, et al. PORTEC-4a: international randomized trial of molecular profile-based adjuvant treatment for women with high-intermediate risk endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2020;30(12). DOI: 10.1136/ijgc-2020-001929.
15. Mutch DG. The new FIGO staging system for cancers of the vulva, cervix, endometrium and sarcomas. *Gynecol Oncol* 2009;3(115):325-8. DOI: 10.1016/j.ygyno.2009.10.050.
16. Mayr D, Schmoeckel E, Höhn A, Hiller G, Horn L. Aktuelle WHO-Klassifikation des weiblichen Genitale: Viel Neues, aber auch manch Altes. *Pathologe*. 2021;42(3):259-69. DOI: 10.1007/s00292-021-00933-w.
17. Lax SF, Kurman RJ, Pizer ES, Wu L, Ronnett BM. A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advance-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(9):1201-8. DOI: 10.1097/00000478-200009000-00002.
18. Levine DA, Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, Lander E, Sivachenko A, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497(7447):67-73. DOI: 10.1038/nature12113.
19. Marnitz S, Schömig-Markiefka B. Aktuelles zur molekularen Klassifizierung von Endometriumkarzinomen. *InFo Hämatol Onkol*. 2021;24:33-4. DOI: 10.1007/s15004-021-8783-7.
20. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch*. 2004;444(3):213-23. DOI: 10.1007/s00428-003-0947-3.
21. Urick ME, Bell DW. Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer. *Nat Rev Cancer* 2019;19(9):510-21. DOI: 10.1038/s41568-019-0177-x.
22. Stelloo E, Nout RA, Osse EM, Jürgenliemk-Schulz IJ, Jobsen JJ, Lutgens LC, et al. Improved risk assessment by integrating molecular and clinicopathological factors in early-stage endometrial cancer—combined analysis of the PORTEC cohorts. *Clin Cancer Res* 2016;22(16):4215-24. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2878.
23. Cheung LW, Hennessy BT, Li J, Yu S, Myers AP, Djordjevic B, et al. High Frequency of PIK3R1 and PIK3R2 Mutations in Endometrial Cancer Elucidates a Novel Mechanism for Regulation of PTEN Protein Stability PI3K Pathway Mutations in Endometrial Cancer. *Cancer Discov*. 2011;1(2):170-85. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0039.
24. Oda K, Okada J, Timmerman L, Rodriguez-Viciano P, Stokoe D, Shoji K, et al. PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation. *Cancer Res*. 2008;68(19):8127-36.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0755.

25. Joshi A, Miller C, Jr., Baker SJ, Ellenson LH. Activated mutant p110 $\alpha$  causes endometrial carcinoma in the setting of biallelic Pten deletion. *Am J Pathol.* 2015;185(4):1104-13. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.12.019.
26. Wang X, Khatri S, Broaddus R, Wang Z, Hawkins SM. Deletion of Arid1a in Reproductive Tract Mesenchymal Cells Reduces Fertility in Female Mice. *Biol Reprod.* 2016;94(4):93. DOI: 10.1095/biolreprod.115.133637.
27. Kim TH, Yoo JY, Wang Z, Lydon JP, Khatri S, Hawkins SM, et al. ARID1A Is Essential for Endometrial Function during Early Pregnancy. *PLoS Genet.* 2015;11(9):e1005537. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005537.
28. Ayhan A, Mao TL, Suryo Rahmanto Y, Zeppernick F, Ogawa H, Wu RC, et al. Increased proliferation in atypical hyperplasia/endometrioid intraepithelial neoplasia of the endometrium with concurrent inactivation of ARID1A and PTEN tumour suppressors. *J Pathol Clin Res.* 2015;1(3):186-93. DOI: 10.1002/cjp2.22.
29. Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res.* 2012;18(2):400-7. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-11-2283.
30. Moreira L, Balaguer F, Lindor N, de la Chapelle A, Hampel H, Aaltonen LA, et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA.* 2012;308(15):1555-65. DOI: 10.1001/jama.2012.13088.
31. Zhao S, Chen L, Zang Y, Liu W, Liu S, Teng F, et al. Endometrial cancer in Lynch syndrome. *Int J Cancer.* 2022;150(1):7-17. DOI: 10.1002/ijc.33763.
32. Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Hum Pathol.* 1995;26(11):1268-74. DOI: 10.1016/0046-8177(95)90204-x.
33. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer.* 2000;88(4):814-24. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(20000215)88:4<814::AID-CNCR12>3.0.CO;2-U.
34. Kuhn E, Wu RC, Guan B, Wu G, Zhang J, Wang Y, et al. Identification of molecular pathway aberrations in uterine serous carcinoma by genome-wide analyses. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(19):1503-13. DOI: 10.1093/jnci/djs345.
35. Kuhn E, Bahadiri-Talbott A, Shih Ie M. Frequent CCNE1 amplification in endometrial intraepithelial carcinoma and uterine serous carcinoma. *Mod Pathol.* 2014;27(7):1014-9. DOI: 10.1038/modpathol.2013.209.

36. Ashford P, Pang CS, Moya-García AA, Adeyelu T, Orengo CA. A CATH domain functional family based approach to identify putative cancer driver genes and driver mutations. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-15. DOI: 10.1038/s41598-018-36401-4.
37. Bailey CG, Gupta S, Metierre C, Amarasekera P, O'Young P, Kyaw W, et al. Structure–function relationships explain CTCF zinc finger mutation phenotypes in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(23):7519-36. DOI: 10.1007/s00018-021-03946-z.
38. Gillinder KR, Ilsley MD, Nébor D, Sachidanandam R, Lajoie M, Magor GW, et al. Promiscuous DNA-binding of a mutant zinc finger protein corrupts the transcriptome and diminishes cell viability. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(3):1130-43. DOI: 10.1093/nar/gkw1014.
39. Munro D, Gherzi D, Singh M. Two critical positions in zinc finger domains are heavily mutated in three human cancer types. *PLoS Comput Biol.* 2018;14(6):e1006290. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006290.
40. Eickner T. Anreicherung und Charakterisierung von TRIM28-Interaktionspartnern mit massenspektrometrischen Methoden 2012. Ph.D. Dissertation, Universität Rostock, Rostock. DOI: 10.18453/rosdok\_id00001130
41. Meiboom M, Escobar HM, Pentimalli F, Fusco A, Belge G, Bullerdiek J. A 3.4-kbp transcript of ZNF331 is solely expressed in follicular thyroid adenomas. *Cytogenet Genome Res.* 2003;101(2):113-7. DOI: 10.1159/000074165.
42. Salvesen HB, Carter SL, Mannelqvist M, Dutt A, Getz G, Stefansson IM, et al. Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(12):4834-9. DOI: 10.1073/pnas.0806514106.
43. Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, et al. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol.* 2013;31(20):2607-18. DOI: 10.1200/jco.2012.48.2596.
44. Ali AT. Reproductive factors and the risk of endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2014;24(3):384-93. DOI: 10.1097/igc.0000000000000075.
45. Murugappan G, Li S, Lathi RB, Baker VL, Eisenberg ML. Risk of cancer in infertile women: analysis of US claims data. *Hum Reprod.* 2019;34(5):894-902. DOI: 10.1093/humrep/dez018.
46. Saso S, Chatterjee J, Georgiou E, Ditri AM, Smith JR, Ghaem-Maghani S. Endometrial cancer. *Bmj.* 2011;343:d3954. DOI: 10.1136/bmj.d3954.
47. Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(7):527-37. DOI: 10.1093/jnci/86.7.527.

48. Hu R, Hilakivi-Clarke L, Clarke R. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncol Lett.* 2015;9(4):1495-501. DOI: 10.3892/ol.2015.2962.
49. Wu QJ, Li YY, Tu C, Zhu J, Qian KQ, Feng TB, et al. Parity and endometrial cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Sci Rep.* 2015;5:14243. DOI: 10.1038/srep14243.
50. Lindemann K, Vatten LJ, Ellstrøm-Engh M, Eskild A. Body mass, diabetes and smoking, and endometrial cancer risk: a follow-up study. *Br J Cancer.* 2008;98(9):1582-5. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604313.
51. Kokts-Porietis RL, Elmrayed S, Brenner DR, Friedenreich CM. Obesity and mortality among endometrial cancer survivors: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2021;22(12):e13337. DOI: 10.1111/obr.13337.
52. Lindemann K, Vatten LJ, Ellstrøm-Engh M, Eskild A. The impact of BMI on subgroups of uterine cancer. *Br J Cancer.* 2009;101(3):534-6. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605158.
53. Smith-Bindman R, Kerlikowske K, Feldstein VA, Subak L, Scheidler J, Segal M, et al. Endovaginal ultrasound to exclude endometrial cancer and other endometrial abnormalities. *Jama.* 1998;280(17):1510-7. DOI: 10.1001/jama.280.17.1510.
54. Jacobs I, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Manchanda R, Singh N, Sharma A, et al. Sensitivity of transvaginal ultrasound screening for endometrial cancer in postmenopausal women: a case-control study within the UKCTOCS cohort. *Lancet Oncol.* 2011;12(1):38-48. DOI: 10.1016/s1470-2045(10)70268-0.
55. Breijer MC, Peeters JA, Opmeer BC, Clark TJ, Verheijen RH, Mol BW, et al. Capacity of endometrial thickness measurement to diagnose endometrial carcinoma in asymptomatic postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;40(6):621-9. DOI: 10.1002/uog.12306.
56. Woolas R, Talaat A, Anderson M, Brinkmann D, Gardner F, Gentry-Maharaj A, et al. Significant endometrial pathology detected during a transvaginal ultrasound screening trial for ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2011;120:S39. DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.12.095.
57. Bhaduri M, Tomlinson G, Glanc P. Likelihood ratio of sonohysterographic findings for discriminating endometrial polyps from submucosal fibroids. *J Ultrasound Med.* 2014;33(1):149-54. DOI: 10.7863/ultra.33.1.149.
58. Bittencourt CA, Dos Santos Simões R, Bernardo WM, Fuchs LFP, Soares Júnior JM, Pastore AR, et al. Accuracy of saline contrast sonohysterography in detection of endometrial polyps and submucosal leiomyomas in women of reproductive age with abnormal uterine bleeding: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;50(1):32-9. DOI: 10.1002/uog.17352.
59. Sorosky JI. Endometrial cancer. *Obstet Gynecol.* 2012;120(2 Pt 1):383-97. DOI: 10.1097/AOG.0b013e3182605bf1.

60. Del Priore G, Williams R, Harbatkin CB, Wan LS, Mittal K, Yang GC. Endometrial brush biopsy for the diagnosis of endometrial cancer. *J Reprod Med*. 2001;46(5):439-43. URL: <https://europepmc.org/article/med/11396369> (Zugriff: 10. Juni 2022 16:00 Uhr).
61. Williams AR, Brechin S, Porter AJ, Warner P, Critchley HO. Factors affecting adequacy of Pipelle and Tao Brush endometrial sampling. *Bjog*. 2008;115(8):1028-36. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2008.01773.x.
62. Guido RS, Kanbour-Shakir A, Rulin MC, Christopherson WA. Pipelle endometrial sampling. Sensitivity in the detection of endometrial cancer. *J Reprod Med*. 1995;40(8):553-5. URL: <https://europepmc.org/article/med/7473450> (Zugriff: 10. Juli 2022 15:00 Uhr).
63. Braun MM, Overbeek-Wager EA, Grumbo RJ. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Am Fam Physician*. 2016;93(6):468-74. URL: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2016/0315/p468.html> (Zugriff: 11. Juni 2022).
64. Clark TJ, Voit D, Gupta JK, Hyde C, Song F, Khan KS. Accuracy of hysteroscopy in the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasia: a systematic quantitative review. *Jama*. 2002;288(13):1610-21. DOI: 10.1001/jama.288.13.1610.
65. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottage A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1232-43. DOI: 10.1093/annonc/mdz116.
66. Rüschoff J, Baretton G, Bläker H, Dietmaier W, Dietel M, Hartmann A, et al. MSI-Testung. *Pathologe*. 2021;42(4):414-23. DOI: 10.1007/s00292-021-00944-7.
67. Casey L, Singh N. POLE, MMR, and MSI Testing in Endometrial Cancer: Proceedings of the ISGyP Companion Society Session at the USCAP 2020 Annual Meeting. *Int J Gynecol Pathol*. 2021;40(1):5-16. DOI: 10.1097/pgp.0000000000000710.
68. Stelloo E, Jansen AML, Osse EM, Nout RA, Creutzberg CL, Ruano D, et al. Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(1):96-102. DOI: 10.1093/annonc/mdw542.
69. Mojtahed A, Schrijver I, Ford JM, Longacre TA, Pai RK. A two-antibody mismatch repair protein immunohistochemistry screening approach for colorectal carcinomas, skin sebaceous tumors, and gynecologic tract carcinomas. *Mod Pathol*. 2011;24(7):1004-14. DOI: 10.1038/modpathol.2011.55.
70. Raffone A, Travaglino A, Cerbone M, Gencarelli A, Mollo A, Insabato L, et al. Diagnostic Accuracy of Immunohistochemistry for Mismatch Repair Proteins as Surrogate of Microsatellite Instability Molecular Testing in Endometrial Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(3):1417-27. DOI: 10.1007/s12253-020-00811-5.

71. Niu BT, Hammond RFL, Leen SLS, Gilks CB, Singh N. Two versus four immunostains for Lynch syndrome screening in endometrial carcinoma. *Histopathology*. 2019;75(3):442-5. DOI: 10.1111/his.13898.
72. Bateman AC. DNA mismatch repair proteins: scientific update and practical guide. *J Clin Pathol*. 2021;74(4):264-8. DOI: 10.1136/jclinpath-2020-207281.
73. Middha S, Zhang L, Nafa K, Jayakumaran G, Wong D, Kim HR, et al. Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data. *JCO Precis Oncol*. 2017;2017. DOI: 10.1200/po.17.00084.
74. Yamamoto H, Imai K. An updated review of microsatellite instability in the era of next-generation sequencing and precision medicine. *Semin Oncol*. 2019;46(3):261-70. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2019.08.003.
75. Buchanan DD, Tan YY, Walsh MD, Clendenning M, Metcalf AM, Ferguson K, et al. Tumor mismatch repair immunohistochemistry and DNA MLH1 methylation testing of patients with endometrial cancer diagnosed at age younger than 60 years optimizes triage for population-level germline mismatch repair gene mutation testing. *J Clin Oncol*. 2014;32(2):90-100. DOI: 10.1200/jco.2013.51.2129.
76. Bruegl AS, Kernberg A, Broaddus RR. Importance of PCR-based Tumor Testing in the Evaluation of Lynch Syndrome-associated Endometrial Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(6):372-8. DOI: 10.1097/pap.000000000000169.
77. Chan JK, Wu H, Cheung MK, Shin JY, Osann K, Kapp DS. The outcomes of 27,063 women with unstaged endometrioid uterine cancer. *Gynecol Oncol*. 2007;106(2):282-8. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.05.033.
78. Dieterich M, Schröter V, Stubert J, Reimer T, Gerber B, Stachs A. Oncologic Outcome of Patients with (Low-Risk) Endometrial Carcinoma Undergoing Laparotomy versus Minimally Invasive Hysterectomy: A Retrospective Analysis. *Oncol Res Treat*. 2019;42(12):636-49. DOI: 10.1159/000502757.
79. Gynecologists ACoOa. Practice Bulletin No. 149: Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol* 2015;125(4):1006-26. DOI: 10.1097/01.AOG.0000462977.61229.de.
80. Sun C, Chen G, Yang Z, Jiang J, Yang X, Li N, et al. Safety of ovarian preservation in young patients with early-stage endometrial cancer: a retrospective study and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;100(3):782-7. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.05.032.
81. Gu Y, Zhou X, Zhang SL. Meta-analysis of an association of codon 72 polymorphisms of the p53 gene with increased endometrial cancer risk. *Genet Mol Res*. 2011;10(4):3609-19. DOI: 10.4238/2011.October.31.11.
82. Walsh C, Holschneider C, Hoang Y, Tieu K, Karlan B, Cass I. Coexisting ovarian malignancy in young women with endometrial cancer. *Obstet Gynecol*. 2005;106(4):693-9. DOI: 10.1097/01.AOG.0000172423.64995.6f.

83. Liu T, Tu H, Li Y, Liu Z, Liu G, Gu H. Impact of Radical Hysterectomy Versus Simple Hysterectomy on Survival of Patients with Stage 2 Endometrial Cancer: A Meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2019;26(9):2933-42. DOI: 10.1245/s10434-019-07472-y.
84. Takano M, Ochi H, Takei Y, Miyamoto M, Hasumi Y, Kaneta Y, et al. Surgery for endometrial cancers with suspected cervical involvement: is radical hysterectomy needed (a GOTIC study)? *Br J Cancer.* 2013;109(7):1760-5. DOI: 10.1038/bjc.2013.521.
85. Kitchener H, Swart AM, Qian Q, Amos C, Parmar MK. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet.* 2009;373(9658):125-36. DOI: 10.1016/s0140-6736(08)61766-3.
86. Benedetti Panici P, Basile S, Maneschi F, Alberto Lissoni A, Signorelli M, Scambia G, et al. Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(23):1707-16. DOI: 10.1093/jnci/djn397.
87. Todo Y, Kato H, Kaneuchi M, Watari H, Takeda M, Sakuragi N. Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis. *Lancet.* 2010;375(9721):1165-72. DOI: 10.1016/s0140-6736(09)62002-x.
88. Rossi EC, Kowalski LD, Scalici J, Cantrell L, Schuler K, Hanna RK, et al. A comparison of sentinel lymph node biopsy to lymphadenectomy for endometrial cancer staging (FIRES trial): a multicentre, prospective, cohort study. *Lancet Oncol.* 2017;18(3):384-92. DOI: 10.1016/s1470-2045(17)30068-2.
89. van den Heerik A, Horeweg N, Creutzberg CL, Nout RA. Vaginal brachytherapy management of stage I and II endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2022;32(3):304-10. DOI: 10.1136/ijgc-2021-002493.
90. Edwards DM, Jolly S. External beam management of stage I and II uterine cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2022;32(3):297-303. DOI: 10.1136/ijgc-2021-002472.
91. Chin C, Damast S. Radiation therapy in the definitive management of medically inoperable endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2022;32(3):323-31. DOI: 10.1136/ijgc-2021-002532.
92. van der Steen-Banasik E, Christiaens M, Shash E, Coens C, Casado A, Herrera FG, et al. Systemic review: Radiation therapy alone in medical non-operable endometrial carcinoma. *Eur J Cancer.* 2016;65:172-81. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.07.005.
93. Maggi R, Lissoni A, Spina F, Melpignano M, Zola P, Favalli G, et al. Adjuvant chemotherapy vs radiotherapy in high-risk endometrial carcinoma: results of a randomised trial. *Br J Cancer.* 2006;95(3):266-71. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603279.
94. Hogberg T, Signorelli M, de Oliveira CF, Fossati R, Lissoni AA, Sorbe B, et al. Sequential adjuvant chemotherapy and radiotherapy in endometrial cancer--results from two randomised studies. *Eur J Cancer.* 2010;46(13):2422-31. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.06.002.

95. Nout RA, Smit VT, Putter H, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Lutgens LC, et al. Vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2): an open-label, non-inferiority, randomised trial. *Lancet*. 2010;375(9717):816-23. DOI: 10.1016/s0140-6736(09)62163-2.
96. Mitra D, Klopp AH, Viswanathan AN. Pros and cons of vaginal brachytherapy after external beam radiation therapy in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2016;140(1):167-75. DOI: 10.1016/j.ygyno.2015.09.084.
97. Creutzberg CL, Nout RA, Lybeert ML, Wárlám-Rodenhuis CC, Jobsen JJ, Mens JW, et al. Fifteen-year radiotherapy outcomes of the randomized PORTEC-1 trial for endometrial carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;81(4):e631-8. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2011.04.013.
98. Lin Y, Zhou J, Cheng Y, Zhao L, Yang Y, Wang J. Comparison of Survival Benefits of Combined Chemotherapy and Radiotherapy Versus Chemotherapy Alone for Uterine Serous Carcinoma: A Meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27(1):93-101. DOI: 10.1097/igc.0000000000000856.
99. de Boer SM, Powell ME, Mileskin L, Katsaros D, Bessette P, Haie-Meder C, et al. Adjuvant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in women with high-risk endometrial cancer (PORTEC-3): patterns of recurrence and post-hoc survival analysis of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(9):1273-85. DOI: 10.1016/s1470-2045(19)30395-x.
100. Randall ME, Filiaci VL, Muss H, Spirtos NM, Mannel RS, Fowler J, et al. Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2006;24(1):36-44. DOI: 10.1200/jco.2004.00.7617.
101. Matei D, Filiaci V, Randall ME, Mutch D, Steinhoff MM, DiSilvestro PA, et al. Adjuvant Chemotherapy plus Radiation for Locally Advanced Endometrial Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(24):2317-26. DOI: 10.1056/NEJMoa1813181.
102. Miller DS, Filiaci VL, Mannel RS, Cohn DE, Matsumoto T, Tewari KS, et al. Carboplatin and Paclitaxel for Advanced Endometrial Cancer: Final Overall Survival and Adverse Event Analysis of a Phase III Trial (NRG Oncology/GOG0209). *J Clin Oncol*. 2020;38(33):3841-50. DOI: 10.1200/jco.20.01076.
103. Konstantinopoulos PA, Luo W, Liu JF, Gulhan DC, Krasner C, Ishizuka JJ, et al. Phase II Study of Avelumab in Patients With Mismatch Repair Deficient and Mismatch Repair Proficient Recurrent/Persistent Endometrial Cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37(30):2786-94. DOI: 10.1200/jco.19.01021.
104. Oaknin A, Tinker AV, Gilbert L, Samouëlian V, Mathews C, Brown J, et al. Clinical Activity and Safety of the Anti-Programmed Death 1 Monoclonal Antibody Dostarlimab for

Patients With Recurrent or Advanced Mismatch Repair-Deficient Endometrial Cancer: A Nonrandomized Phase 1 Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020;6(11):1766-72.

DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.4515.

105. Makker V, Taylor MH, Aghajanian C, Oaknin A, Mier J, Cohn AL, et al. Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced Endometrial Cancer. *J Clin Oncol.* 2020;38(26):2981-92. DOI: 10.1200/jco.19.02627.

106. Fader AN, Roque DM, Siegel E, Buza N, Hui P, Abdelghany O, et al. Randomized Phase II Trial of Carboplatin-Paclitaxel Versus Carboplatin-Paclitaxel-Trastuzumab in Uterine Serous Carcinomas That Overexpress Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/neu. *J Clin Oncol.* 2018;36(20):2044-51. DOI: 10.1200/jco.2017.76.5966.

107. Fader AN, Roque DM, Siegel E, Buza N, Hui P, Abdelghany O, et al. Randomized Phase II Trial of Carboplatin-Paclitaxel Compared with Carboplatin-Paclitaxel-Trastuzumab in Advanced (Stage III-IV) or Recurrent Uterine Serous Carcinomas that Overexpress Her2/Neu (NCT01367002): Updated Overall Survival Analysis. *Clin Cancer Res.* 2020;26(15):3928-35. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-20-0953.

108. Makker V, Colombo N, Casado Herráez A, Santin AD, Colomba E, Miller DS, et al. Lenvatinib plus Pembrolizumab for Advanced Endometrial Cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(5):437-48. DOI: 10.1056/NEJMoa2108330.

109. Marabelle A, Le DT, Ascierito PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol.* 2020;38(1):1-10. DOI: 10.1200/jco.19.02105.

110. O'Malley DM, Bariani GM, Cassier PA, Marabelle A, Hansen AR, De Jesus Acosta A, et al. Pembrolizumab in Patients With Microsatellite Instability-High Advanced Endometrial Cancer: Results From the KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol.* 2022;40(7):752-61. DOI: 10.1200/jco.21.01874.

111. Forthall DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr.* 2014;2(4):1-17.

URL: <https://europepmc.org/article/MED/25215264> (Zugriff: 13. Mai 2022).

112. Wootla B, Denic A, Rodriguez M. Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic. *Methods Mol Biol.* 2014;1060:79-110. DOI: 10.1007/978-1-62703-586-6\_5.

113. Murphy KM, Weaver C, Berg LJ. Janeway's immunobiology. 10<sup>th</sup> international student edition ed. New York, WW Norton & Co; 2022. ISBN: 9780393884913.

114. Scherf M, Koy C, Röwer C, Neamtu A, Glocker MO. Characterization of Phosphorylation-Dependent Antibody Binding to Cancer-Mutated Linkers of C2H2 Zinc Finger Proteins by Intact Transition Epitope Mapping-Thermodynamic Weak-Force Order Analysis. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2023;34(2):171-81. DOI: 10.1021/jasms.2c00244.

115. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G. (Hrsg.). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 10<sup>th</sup> ed. Berlin, Springer; 2022. DOI: 10.1007/978-3-662-60266-9.
116. Porter RR. The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J.* 1959;73(1):119-26. DOI: 10.1042/bj0730119.
117. Rüker F, Wozniak-Knopp G. (Hrsg.). Introduction to Antibody Engineering. Cham, Schweiz: Springer; 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-54630-4.
118. Milstein C. Linked groups of residues in immunoglobulin k chains. *Nature.* 1967;216(5113):330-2. DOI: 10.1038/216330a0.
119. Franěk F. Developmental aspects of antibody formation and structure. Proceedings of a symposium held in Slapy; 1969. 01. - 07. Juni 1969; Prag und Slapy, Tschechien: Czechoslovak Academy of Sciences Prague.
120. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med.* 1970;132(2):211-50. DOI: 10.1084/jem.132.2.211.
121. Spiegelberg HL. Biological role of different antibody classes. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1989;90 Suppl 1:22-7. DOI: 10.1159/000235071.
122. Irani V, Guy AJ, Andrew D, Beeson JG, Ramsland PA, Richards JS. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol.* 2015;67(2 Pt A):171-82. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.03.255.
123. Jefferis R. Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7(9):1401-13. DOI: 10.1517/14712598.7.9.1401.
124. Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73(10):3628-32. DOI: 10.1073/pnas.73.10.3628.
125. Tonegawa S, Steinberg C, Dube S, Bernardini A. Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(10):4027-31. DOI: 10.1073/pnas.71.10.4027.
126. Tonegawa S, Hozumi N, Matthysens G, Schuller R. Somatic changes in the content and context of immunoglobulin genes. *Proceedings from Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1977. Vol. 41 Pt. 2:877-89. DOI: 10.1101/sqb.1977.041.01.097.
127. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 1983;302(5909):575-81. DOI: 10.1038/302575a0.
128. Bowers PM, Horlick RA, Neben TY, Toobian RM, Tomlinson GL, Dalton JL, et al. Coupling mammalian cell surface display with somatic hypermutation for the discovery and maturation of human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(51):20455-60. DOI: 10.1073/pnas.1114010108.

129. Burnet SFM. The clonal selection theory of acquired immunity. Nashville, Tennessee, Vanderbilt University Press; 1959.
130. Wu L, Lemr K, Aggerholm T, Cooks RG. Recognition and quantification of binary and ternary mixtures of isomeric peptides by the kinetic method: metal ion and ligand effects on the dissociation of metal-bound complexes. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003;14(2):152-60. DOI: 10.1016/s1044-0305(02)00868-1.
131. Saper CB. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(1):1-5. DOI: 10.1369/jhc.2008.952770.
132. Scherf M, Danquah BD, Koy C, Lorenz P, Steinbeck F, Neamtu A, et al. Epitope fine mapping by mass spectrometry: Investigations of immune complexes consisting of monoclonal anti-HpTGEKP-antibody and zinc finger protein linker phospho-hexapeptides. *Chembiochem.* 2022;23(20):e202200390. DOI: 10.1002/cbic.202200390.
133. Punt J, Stranford S, Owen J, Jones P. *Kuby Immunology.* 7<sup>th</sup> ed. New York, W.H. Freeman and Company; 2013. ISBN: 9781429219198.
134. Opuni KF, Al-Majdoub M, Yefremova Y, El-Kased RF, Koy C, Glocker MO. Mass spectrometric epitope mapping. *Mass Spectrom Rev.* 2018;37(2):229-41. DOI: 10.1002/mas.21516.
135. Teppa E, Wilkins AD, Nielsen M, Buslje CM. Disentangling evolutionary signals: conservation, specificity determining positions and coevolution. Implication for catalytic residue prediction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:235. DOI: 10.1186/1471-2105-13-235.
136. Karakulak T, Rifaioglu AS, Rodrigues J, Karaca E. Predicting the Specificity-Determining Positions of Receptor Tyrosine Kinase Axl. *Front Mol Biosci.* 2021;8:658906. DOI: 10.3389/fmolb.2021.658906.
137. Röwer C, Ortmann C, Neamtu A, El-Kased RF, Glocker MO. Intact Transition Epitope Mapping-Force Differences between Original and Unusual Residues (ITEM-FOUR). *Biomolecules.* 2023;13(1). DOI: 10.3390/biom13010187.
138. Uhlen M, Bandrowski A, Carr S, Edwards A, Ellenberg J, Lundberg E, et al. A proposal for validation of antibodies. *Nat Methods.* 2016;13(10):823-7. DOI: 10.1038/nmeth.3995.
139. Koy C, Opuni KFM, Danquah BD, Neamtu A, Glocker MO. Mass Spectrometric and Bio-Computational Binding Strength Analysis of Multiply Charged RNase S Gas-Phase Complexes Obtained by Electrospray Ionization from Varying In-Solution Equilibrium Conditions. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10183. DOI: 10.3390/ijms221910183.
140. Danquah BD, Yefremova Y, Opuni KFM, Röwer C, Koy C, Glocker.MO. Intact Transition Epitope Mapping - Thermodynamic Weak-force Order (ITEM - TWO). *J Proteomics.* 2020;212:103572. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.103572.

141. Xin L, Yu H, Hong Q, Bi X, Zhang X, Zhang Z, et al. Identification of Strategic Residues at the Interface of Antigen–Antibody Interactions by In Silico Mutagenesis. *Interdiscip Sci.* 2018;10(2):438-48. DOI: 10.1007/s12539-017-0242-7.
142. Robin G, Sato Y, Desplancq D, Rochel N, Weiss E, Martineau P. Restricted Diversity of Antigen Binding Residues of Antibodies Revealed by Computational Alanine Scanning of 227 Antibody–Antigen Complexes. *J Mol Biol.* 2014;426(22):3729-43. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.08.013.
143. Abbott WM, Damschroder MM, Lowe DC. Current approaches to fine mapping of antigen–antibody interactions. *Immunology.* 2014;142(4):526-35. DOI: 10.1111/imm.12284.
144. Weiss GA, Watanabe CK, Zhong A, Goddard A, Sidhu SS. Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16):8950-4. DOI: 10.1073/pnas.160252097.
145. Alexander KE, Rizkallah R. Aurora A phosphorylation of YY1 during mitosis inactivates its DNA binding activity. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-13. DOI: 10.1038/s41598-017-10935-5.
146. Daniel JM, Reynolds AB. The catenin p120 ctn interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1999;19(5):3614-23. DOI: 10.1128/MCB.19.5.3614.
147. Li X, Han M, Zhang H, Liu F, Pan Y, Zhu J, et al. Structures and biological functions of zinc finger proteins and their roles in hepatocellular carcinoma. *Biomark Res.* 2022;10(1):2. DOI: 10.1186/s40364-021-00345-1.
148. Przybylski M, Glocker MO. Elektrospray-Massenspektrometrie von Biomakromoleülkomplexen mit nichtkovalenten Wechselwirkungen–neue analytische Perspektiven für supramolekulare Chemie und molekulare Erkennungsprozesse. *Angew Chem.* 1996;108(8):878-99. DOI: 10.1002/ange.19961080804.
149. Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov NV, Nikolaev VI, Pavlenko VA, Shkurov VA. Extraction of ions from solutions under atmospheric pressure as a method for mass spectrometric analysis of bioorganic compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;22(3):267-70. DOI: 10.1002/rcm.3113.
150. Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem.* 1984;88(20):4451-9. URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/j150664a002> (Zugriff: 15. Mai 2022).
151. Taylor GI. Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London Series A - Mathematical and Physical Sciences.* 1964;280(1380):383-97. DOI: 10.1098/rspa.1964.0151.
152. Jacobs MGH. Proteomanalysen von traumatisierten, ischämischen und unversehrten Muskelgeweben mittels UPLC-ESI-IMS-Massenspektrometrie zur Charakterisierung des

komplexen regionalen Schmerzsyndroms I im ETR-Tiermodell 2020. Ph.D. Dissertation, Universität Rostock, Rostock.

153. Thomson BA, Iribarne JV. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics*. 1979;71(11):4451-63.

DOI: 10.1063/1.438198.

154. Hoffmann V, Kasik M, Robinson PK, Venzago C. Glow discharge mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005;381(1):173-88.

DOI: 10.1007/s00216-004-2933-2.

155. Szpunar J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* 2004;378(1):54-6. DOI: 10.1007/s00216-003-2333-z.

156. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular beams of macroions. *J Chem Phys*. 1968;49(5):2240-9. DOI: 10.1063/1.1670391.

157. Standing KG, Chait BT, Ens W, McIntosh G, Beavis R. Time-of-flight measurements of secondary organic ions produced by 1 keV to 16 keV primary ions. *Nucl Instrum Methods Phys Res*. 1982;198(1):33-8. DOI: 10.1016/0167-5087(82)90048-5.

158. Iribarne JV, Thomson BA. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys*. 1976;64(6):2287-94. DOI: 10.1063/1.432536.

159. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.

DOI: 10.1126/science.2675315.

160. Tanaka K, Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. and Yoshida, T. eds. Matsuda, H. and Xiaotian, L. Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry 1987. 15.-18. September 1987, Osaka, Japan.

161. Yoshida T, Tanaka, K., Ido, Y., Akita, S. and Yoshida. Y. *Mass Spectroscopy Japan 1988*. v. 36 p. 59.

162. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1988;2(8):151-3. DOI: 10.1002/rcm.1290020802.

163. Wolff MM, Stephens WE. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Rev Sci Instrum*. 1953;24(8):616-7. DOI: 10.1063/1.1770801.

164. Bock A, Bantscheff M, Perraud A-L, Rippe K, Weiss V, Glocker MO, et al. Rational design and molecular characterization of a chimaeric response regulator protein<sup>11</sup> Edited by I. B. Holland. *J Mol Biol* 2001;310(2):283-90. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4773.

165. Aminin DL, Koy C, Dmitrenok PS, Müller-Hilke B, Koczan D, Arbogast B, et al. Immunomodulatory effects of holothurian triterpene glycosides on mammalian splenocytes determined by mass spectrometric proteome analysis. *J Proteomics*. 2009;72(5):886-906. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.04.004.

166. Roepstorff P, Fohlman J. Letter to the editors. *Biomed Mass Spectrom.* 1984;11(11):601. DOI: 10.1002/bms.1200111109.
167. Danquah BD, Opuni KFM, Roewer C, Koy C, Glocker MO. Mass Spectrometric Analysis of Antibody-Epitope Peptide Complex Dissociation: Theoretical Concept and Practical Procedure of Binding Strength Characterization. *Molecules.* 2020;25(20):4776. DOI: 10.3390/molecules25204776.
168. Breuker K, McLafferty FW. Stepwise evolution of protein native structure with electrospray into the gas phase,  $10^{-12}$  to  $10^2$  s. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(47):18145-52. DOI: 10.1073/pnas.0807005105.
169. Born N, Thiesen H-J, Lorenz P. The B-Subdomain of the *Xenopus laevis* XFIN KRAB-AB Domain Is Responsible for Its Weaker Transcriptional Repressor Activity Compared to Human ZNF10/Kox1. *PLoS One.* 2014;9(2):e87609. DOI: 10.1371/journal.pone.0087609.
170. Al Chiblak M, Steinbeck F, Thiesen H-J, Lorenz P. DUF3669, a “domain of unknown function” within ZNF746 and ZNF777, oligomerizes and contributes to transcriptional repression. *BMC Mol Cell Biol* 2019;20(1):1-23. DOI: 10.1186/s12860-019-0243-y.
171. Lorenz P, Koczan D, Thiesen H-J. Transcriptional Repression Mediated by the KRAB Domain of the Human C2H2 Zinc Finger Protein Kox1/ZNF10 Does Not Require Histone Deacetylation. *Biol Chem.* 2001;382(4):637-44. DOI: 10.1515/BC.2001.075.
172. Opuni K, Solomon S, Metzen F, Frommholz D, Koy C, Röwer C, et al. In silico epitope mapping of glucose-6-phosphate isomerase: A Rheumatoid arthritis autoantigen. *J Proteom Bioinform.* 2017;10(3):60-72. DOI: 10.4172/jpb.1000425.
173. Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984;10(3-4):203-9. DOI: 10.1016/0165-022x(84)90040-x.
174. Rower C, Vissers JP, Koy C, Kipping M, Hecker M, Reimer T, et al. Towards a proteome signature for invasive ductal breast carcinoma derived from label-free nanoscale LC-MS protein expression profiling of tumorous and glandular tissue. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395(8):2443-56. DOI: 10.1007/s00216-009-3187-9.
175. Kang D-H, Gho Y-S, Suh M-K, Kang C-H. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc.* 2002;23(11):1511-2. DOI: 10.5012/BKCS.2002.23.11.1511.
176. Yefremova Y, Opuni KF-M, Danquah BD, Thiesen H-J, Glocker MO. Intact Transition Epitope Mapping (ITEM). *J Am Soc Mass Spectrom.* 2017;28(8):1612-22. DOI: 10.1007/s13361-017-1654-7. .
177. Opuni KF, Koy C, Russ M, Reepmeyer M, Danquah BD, Weresow M, et al. ITEM-THREE analysis of a monoclonal anti-malaria antibody reveals its assembled epitope on the pfMSP119 antigen. *J Biol Chem.* 2020;295(44):14987-97. DOI: 10.1074/jbc.RA120.014802.

178. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D442-D50. DOI: 10.1093/nar/gky1106.
179. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1074-d82. DOI: 10.1093/nar/gkx1037.
180. Sawyer C, Sturge J, Bennett DC, O'Hare MJ, Allen WE, Bain J, et al. Regulation of breast cancer cell chemotaxis by the phosphoinositide 3-kinase p110delta. *Cancer Res.* 2003;63(7):1667-75. URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/63/7/1667/511072/Regulation-of-Breast-Cancer-Cell-Chemotaxis-by-the> (Zugriff: 17. Mai 2022).
181. Lehmann WD, Krüger R, Salek M, Hung C-W, Wolschin F, Weckwerth W. Neutral Loss-Based Phosphopeptide Recognition: A Collection of Caveats. *J Proteome Res.* 2007;6(7):2866-73. DOI: 10.1021/pr060573w.
182. Tholey A, Reed J, Lehmann WD. Electrospray tandem mass spectrometric studies of phosphopeptides and phosphopeptide analogues. *Journal of Mass Spectrometry.* 1999;34(2):117-23. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9888(199902)34:2<117::AID-JMS769>3.0.CO;2-V.
183. Al-Majdoub M, Opuni K, Koy C, Glocker M. Facile fabrication and instant application of miniaturized antibody-decorated affinity columns for higher-order structure and functional characterization of TRIM21 epitope peptides. *Anal Chem (Washington, DC, U S).* 2013;85(21):10479-87. DOI: 10.1021/ac402559m.
184. El-Hawiet A, Shoemaker GK, Daneshfar R, Kitova EN, Klassen JS. Applications of a catch and release electrospray ionization mass spectrometry assay for carbohydrate library screening. *Anal Chem (Washington, DC, U S).* 2012;84(1):50-8. DOI: 10.1021/ac202760e.
185. Kufareva I, Handel TM, Abagyan R. Experiment-guided molecular modeling of protein-protein complexes involving GPCRs. *Methods Mol Biol.* 2015;1335:295-311. DOI: 10.1007/978-1-4939-2914-6\_19
186. Cárdenas R, Martínez-Seoane J, Amero C. Combining Experimental Data and Computational Methods for the Non-Computer Specialist. *Molecules.* 2020;25(20):4783. DOI: 10.3390/molecules25204783.
187. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, et al. The Human Transcription Factors. *Cell.* 2018;172(4):650-65. DOI: 10.1016/j.cell.2018.01.029.
188. Groner AC, Meylan S, Ciuffi A, Zangger N, Ambrosini G, Dénervaud N, et al. KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet.* 2010;6(3):e1000869. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000869.

189. Hamed MY, Siam R, Zaid R. The role of zinc finger linkers in zinc finger protein binding to DNA. *J Comput Aided Mol Des.* 2021;35(9):973-86. DOI: 10.1007/s10822-021-00413-6.
190. Luo L, Ando S, Sakamoto Y, Suzuki T, Takahashi H, Ishibashi N, et al. The formation of perinucleolar bodies is important for normal leaf development and requires the zinc-finger DNA-binding motif in Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2. *Plant J.* 2020;101(5):1118-34. DOI: 10.1111/tpj.14579.
191. Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000;29:183-212. DOI: 10.1146/annurev.biophys.29.1.183.
192. Cook WJ, Mosley SP, Audino DC, Mullaney DL, Rovelli A, Stewart G, et al. Mutations in the zinc-finger region of the yeast regulatory protein ADR1 affect both DNA binding and transcriptional activation. *J Biol Chem.* 1994;269(12):9374-9. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)37118-1.
193. Dovat S, Ronni T, Russell D, Ferrini R, Cobb BS, Smale ST. A common mechanism for mitotic inactivation of C2H2 zinc finger DNA-binding domains. *Genes Dev.* 2002;16(23):2985-90. DOI: 10.1101/gad.1040502.
194. Jantz D, Berg JM. Reduction in DNA-binding affinity of Cys2His2 zinc finger proteins by linker phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(20):7589-93. DOI: 10.1073/pnas.0402191101.
195. Rizkallah R, Alexander KE, Hurt MM. Global mitotic phosphorylation of C2H2 zinc finger protein linker peptides. *Cell Cycle.* 2011;10(19):3327-36. DOI: 10.4161/cc.10.19.17619.
196. Sekiya T, Murano K, Kato K, Kawaguchi A, Nagata K. Mitotic phosphorylation of CCCTC-binding factor (CTCF) reduces its DNA binding activity. *FEBS Open Bio.* 2017;7(3):397-404. DOI: 10.1002/2211-5463.12189.
197. Elbaz B, Aaker JD, Isaac S, Kolarzyk A, Brugarolas P, Eden A, et al. Phosphorylation State of ZFP24 Controls Oligodendrocyte Differentiation. *Cell Rep.* 2018;23(8):2254-63. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.089.
198. Amos W. Even small SNP clusters are non-randomly distributed: is this evidence of mutational non-independence? *Proc Biol Sci.* 2010;277(1686):1443-9. DOI: 10.1098/rspb.2009.1757.
199. Ichida Y, Utsunomiya Y, Onodera M. Effect of the linkers between the zinc fingers in zinc finger protein 809 on gene silencing and nuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;471(4):533-8. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.02.040.
200. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(3):177-83. DOI: 10.1038/nrc1299.

201. O'Reilly J-A, Fitzgerald J, Fitzgerald S, Kenny D, Kay EW, O'Kennedy R, et al. Diagnostic potential of zinc finger protein-specific autoantibodies and associated linear B-cell epitopes in colorectal cancer. *PLoS One*. 2015;10(4):1-13. DOI: 10.1371/journal.pone.0123469.
202. Yu J, Liang QY, Wang J, Cheng Y, Wang S, Poon TC, et al. Zinc-finger protein 331, a novel putative tumor suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer. *Oncogene*. 2013;32(3):307-17. DOI: 10.1038/onc.2012.54.
203. Wang Y, He T, Herman JG, Linghu E, Yang Y, Fuks F, et al. Methylation of ZNF331 is an independent prognostic marker of colorectal cancer and promotes colorectal cancer growth. *Clin Epigenetics*. 2017;9:115. DOI: 10.1186/s13148-017-0417-4.
204. Vedeld HM, Nesbakken A, Lothe RA, Lind GE. Re-assessing ZNF331 as a DNA methylation biomarker for colorectal cancer. *Clin Epigenetics*. 2018;10:70. DOI: 10.1186/s13148-018-0503-2.
205. Jiang S, Linghu E, Zhan Q, Han W, Guo M. Methylation of ZNF331 Promotes Cell Invasion and Migration in Human Esophageal Cancer. *Curr Protein Pept Sci*. 2015;16(4):322-8. DOI: 10.2174/138920371604150429155255.
206. Bozic I, Antal T, Ohtsuki H, Carter H, Kim D, Chen S, et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18545-50. DOI: 10.1073/pnas.1010978107.
207. Morjaria S. Driver mutations in oncogenesis. *Int J Mol Immunol Oncol*. 2021;6(2):100-2. DOI: 10.25259/IJMIO\_26\_2020.
208. de Olazarra AS, Cortade DL, Wang SX. From saliva to SNP: non-invasive, point-of-care genotyping for precision medicine applications using recombinase polymerase amplification and giant magnetoresistive nanosensors. *Lab Chip*. 2022;22(11):2131-44. DOI: 10.1039/d2lc00233g.
209. Xu H, Xia A, Wang D, Zhang Y, Deng S, Lu W, et al. An ultraportable and versatile point-of-care DNA testing platform. *Sci Adv*. 2020;6(17):eaaz7445. DOI: 10.1126/sciadv.aaz7445.
210. Glocker MO, Guthke R, Kekow J, Thiesen HJ. Rheumatoid arthritis, a complex multifactorial disease: on the way toward individualized medicine. *Med Res Rev*. 2006;26(1):63-87. DOI: 10.1002/med.20045.
211. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*. 2016;533(7604):452-4. DOI: 10.1038/533452a.
212. Voskuil JL. The challenges with the validation of research antibodies. *F1000Res*. 2017;6:161. DOI: 10.12688/f1000research.10851.1.
213. Beigl TB, Kjosås I, Seljeseth E, Glomnes N, Aksnes H. Efficient and crucial quality control of HAP1 cell ploidy status. *Biol Open*. 2020;9(11):bio057174.

DOI: 10.1242/bio.057174.

214. Albony H. Phosphoproteome analysis of the near-haploid cell line HAP1 reveals phosphorylation events originating from PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase (PBK/TOPK) 2022. Ph.D. Dissertation, Universität Rostock, Rostock.

215. Bajpai R, Lesperance J, Kim M, Terskikh AV. Efficient propagation of single cells accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev.* 2008;75(5):818-27. DOI: 10.1002/mrd.20809.

216. Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.

217. Dawson JM, Heatlie PL. Lowry method of protein quantification: evidence for photosensitivity. *Anal Biochem.* 1984;140(2):391-3. DOI: 10.1016/0003-2697(84)90183-0.

218. Lottspeich F, Engels, JW (Hrsg.). *Bioanalytik*. 2<sup>nd</sup> ed. München, Spektrum Akademischer Verlag; 2006. ISBN: 9783827415202.

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

AUC	Fläche unter der Plasmakonzentration-Zeit-Kurve ( <i>area under curve</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CID	Kollisions-induzierte Dissoziation ( <i>collision-induced dissociation</i> )
CNV	somatische Kopienzahlvariationen ( <i>copy number variation</i> )
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung
DTA	Datenträgeraustausch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
FIGO	Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ITEM-TWO	<i>Intact Transition Epitope Mapping - Thermodynamic Weak-force Order</i>
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
MMR	<i>mismatch-repair</i>
mM	Millimolar
nano-ESI-MS	nano-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
POLE	DNA-Polymerase Epsilon
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ppm	Teile pro Million ( <i>parts per million</i> )
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )

SAP	Einzelaminosäure-Polymorphismus ( <i>single amino acid polymorphism</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	Einzelnukleotid-Austausch ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
Std.-Abw.	Standardabweichung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tab.	Tabelle
Q-ToF	<i>Quadrupole-Time of Flight</i>
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
ZNF	Zinkfinger
$\Delta CV$	Spannungsdifferenz der Kollisionszelle
$\mu M$	Mikromolar
$\mu l$	Mikroliter
pmol	Picomol
Å	Ångström

## 6.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Strukturdarstellung (Bänderstrukturmodell) eines Antikörpers...	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung des verwendeten Synapt G2S-Massenspektrometers .....	16
Abbildung 3: Nomenklatur der, bei der Q-ToF CID Analyse aus den Precursor- Molekülen/Peptiden erzeugten Fragment-Ionen nach Roepstorff .....	18
Abbildung 4: Fotografien von HAP1-Zellen der C631-Zelllinie unbehandelt, nach Exposition der Versuchszellkultur mit Ethanol und mit in Ethanol gelöster Okadasäure.....	36
Abbildung 5: Fotografien von HAP1-Zellen der PBK-16-Zelllinie unbehandelt, nach Exposition der Versuchszellkultur mit Ethanol und mit in Ethanol gelöster Okadasäure.....	37
Abbildung 6: Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus C631-Zellen und PBK-16-Zellen .....	41
Abbildung 7: Nano-ESI-Massenspektrum des anti-HpTGEKP-Antikörpers .....	43
Abbildung 8: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 102 (pYTGEKP) .....	44
Abbildung 9: Nano-ESI-Massenspektren des Gemischs aus Phospho-Hexapeptid 02 (HpTGERP) und anti-HpTGEKP-Antikörper (nicht-blockierte vs. blockierte Ionenströme niedriger Massen) .....	47
Abbildung 10: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP).....	48
Abbildung 11: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti- HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP) bis zum Messpunkt $\Delta CV$ 200 V .....	51
Abbildung 12: Nano-ESI-Massenspektren (blockierte/nicht-blockierte Ionenströme niedriger Massen) der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP) .....	52
Abbildung 13: ITEM-TWO-Analysen der Dissoziation der Immunkomplexe aus anti-HpTGEKP-Antikörper und entweder Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP), 02 (HpTGERP), 06 (HpSGERP) oder 07 (HpTGEKL).....	57
Abbildung 14: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 08 (HpTGEKS).....	61
Abbildung 15: Nano-ESI-Massenspektren des ternären Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper sowie den beiden Phospho-Hexapeptiden 02 (HpTGERP) und 08 (HpTREKP) im molaren Verhältnis 1 : 3 : 3.....	63
Abbildung 16: Nano-ESI-Massenspektren des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 00 (HTGEKP) .....	65
Abbildung 17: Nano-ESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Hexapeptid (Peptide 01 bzw. 00).....	66

Abbildung 18: Vergrößerungen aus nano-ESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Hexapeptid (Peptide 01 bzw. 00).....	68
Abbildung 19: Kompetitives Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay.....	70
Abbildung 20: Vergleiche der nano-ESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Phospho-Hexapeptid .....	73
Abbildung 21: Vergleiche der nano-ESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Phospho-Hexapeptid (Gemisch mit Peptid 01 vs. Gemisch mit Peptid 101 vs. Gemisch mit Peptid 103) .....	74
Abbildung 22: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 102 (pYTGEKP).....	76
Abbildung 23: Vergleich der nano-ESI-Massenspektren von Gemischen aus dem anti-HpTGEKP-Antikörper und einem ZNF-Linker-Phospho-Hexapeptid (Gemisch mit Peptid 103 vs. Gemisch mit Peptid 102) .....	77
Abbildung 24: Oberflächenansichten (obere Reihe) und schematische Ansichten (untere Reihe) modellierter 3D-Strukturen von ausgewählten ZNF-Protein-Linker-Hexapeptide.....	79
Abbildung 25: Modellerte Darstellungen der Konfigurationen der beiden ZNF-Domänen ZNF 1 und ZNF 2, die durch ein phosphoryliertes Linker-Hexapeptid verbunden sind .....	81
Abbildung 26: Schematische Darstellungen der genauen Differenzierung von Peptid-Antikörper-Interaktionen auf Sub-Epitopebene .....	84
Abbildung 27: Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus C631-Zellen und PBK-16-Zellen.....	xi
Abbildung 28: Nano-ESI-Massenspektrum des Hexapeptids 00 (HTGEKP) .....	xii
Abbildung 29: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 01 (HpTGEKP) .....	xiii
Abbildung 30: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 02 (HpTGERP) .....	xiii
Abbildung 31: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 03 (HpSGEKP) .....	xiv
Abbildung 32: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 04 (HpTHTHT).....	xiv
Abbildung 33: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 05 (HpTGKKP) .....	xv
Abbildung 34: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 06 (HpSGERP).....	xv
Abbildung 35: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 07 (HpTGEKL).....	xvi
Abbildung 36: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 08 (HpTGEKS) .....	xvi
Abbildung 37: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 09 (HpTEEKP).....	xvii
Abbildung 38: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 10 (HpTREKP) .....	xvii
Abbildung 39: Nano-ESI-Massenspektrum des Hexapeptids 100 (YTGEKP) .....	xviii
Abbildung 40: Nano-ESI-Massenspektrum des Phospho-Hexapeptids 101 (YpTGEKP) ....	xviii
Abbildung 41: Nano-ESI-Massenspektrum des Di-Phospho-Hexapeptids 103 (pYpTGEKP) .....	xix

Abbildung 42: Nano-ESI-Massenspektren der Peptid-Fragment-Analyse der Phospho-Hexapeptide 101 (YpTGEKP) und 102 (pYTGEKP) .....	xx
Abbildung 43: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP).....	xxii
Abbildung 44: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 02 (HpTGERP).....	xxiii
Abbildung 45: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 05 (HpTGKKP).....	xxiv
Abbildung 46: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 05 (HpTGKKP).....	xxv
Abbildung 47: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 06 (HpSGERP) .....	xxvi
Abbildung 48: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 06 (HpSGERP) .....	xxvii
Abbildung 49: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 07 (HpTGEKL) .....	xxviii
Abbildung 50: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 07 (HpTGEKL) .....	xxix
Abbildung 51: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 09 (HpTEEKP) .....	xxx
Abbildung 52: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 09 (HpTEEKP) .....	xxxi
Abbildung 53: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 10 (HpTREKP).....	xxxii
Abbildung 54: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 10 (HpTREKP).....	xxxiii
Abbildung 55: Messpunkte einer Messreihe der normalisierten Ionenintensitäten der Produkte des Referenzimmunkomplexes in Abhängigkeit von allen gemessenen Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle .....	xxxiv
Abbildung 56: ITEM-TWO-Analysen der Dissoziation des Referenzimmunkomplexes aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP).....	xxxv
Abbildung 57: ITEM-TWO-Analysen der Dissoziation der Immunkomplexe aus anti-HpTGEKP-Antikörper und entweder Phospho-Hexapeptid 01 (HpTGEKP), 05 (HpTGKKP), 09 (HpTEEKP) oder 10 (HpTREKP). .....	xxxvii
Abbildung 58: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 08 (HpTGEKS).....	xxxix

Abbildung 59: Nano-ESI-Massenspektren der ersten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 03 (HpSGEKP).....	xi
Abbildung 60: Nano-ESI-Massenspektren der zweiten Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 03 (HpSGEKP).....	xli
Abbildung 61: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 04 (HpTHTHT) .....	xlii
Abbildung 62: Graph der normalisierten Ionenintensitäten der Produkte (Norm (Produkte)) des Immunkomplexes mit dem unorthodox bindenden Phospho-Hexapeptids 08 (HpTGEKS) in Abhängigkeit von $\Delta CV$ .....	xliii
Abbildung 63: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Hexapeptid 100 (YTGEKP) .....	xliv
Abbildung 64: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Phospho-Hexapeptid 101 (YpTGEKP).....	xlv
Abbildung 65: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper und Di-Phospho-Hexapeptid 103 (pYpTGEKP).....	xlvi
Abbildung 66: Nano-ESI-Massenspektren der Messreihe des ternären Gemischs aus anti-HpTGEKP-Antikörper sowie den beiden Phospho-Hexapeptiden 05 (HpTGKKP) und 103 (pYpTGEKP) im molaren Verhältnis 1 : 3 : 3.....	xlvii
Abbildung 67: Clustergrößenverteilung ausgewählter Hexapeptide .....	xlviii

## 6.7 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Präzisierung der Aminosäure-Suchsequenz.....	27
<b>Tab. 2:</b>	Zählung untersuchter Hexapeptide nach unter 2.3 beschriebenem Suchalgorithmus sowie Atomanzahl, Massen (rechnerisch und experimentell) und Bindungsverhalten zum anti-HpTGEKP-Antikörper.....	39
<b>Tab. 3:</b>	Charakteristiken der Boltzmann-Kurven der Dissoziationsreaktionen der Immunkomplexe aus orthodox bindenden Phospho-Hexapeptiden und anti-HpTGEKP-Antikörper in der Gasphase.....	55
<b>Tab. 4:</b>	Scheinbare kinetische und scheinbare thermodynamische Werte für die Dissoziationsreaktionen der Immunkomplexe aus orthodox bindenden Phospho-Hexapeptiden und anti-HpTGEKP-Antikörper in der Gasphase.....	58
<b>Tab. 5:</b>	Mengenangaben zur Erstellung der Kalibriergeraden durch Proteinbestimmungen unterschiedlich konzentrierter BSA-Standardproben...vi	
<b>Tab. 6:</b>	Aminosäuresequenzen und Lotnummern erworbener Hexapeptide.....	viii
<b>Tab. 7:</b>	Ionenladungszustände, m/z-Werte und zugehörige molekulare Massen der anti-HpTGEKP-Antikörperionen.....	xii
<b>Tab. 8:</b>	Atom-Atom-Abstände untersuchter Phospho-Hexapeptide.....	cxlix

## 6.8 Thesen

1. Ziel der Arbeit war es, qualitativ und quantitativ zu beschreiben, inwieweit das für die Antikörperbindung erforderliche Bindemotiv des anti-HpTGEKP-Antikörpers bei einzelnen Aminosäureaustauschen sowie verändertem Phosphorylierungsstatus im Linker-Sequenzmotiv HTGEKP von C2H2-Zinkfinger-Proteinen, das als Epitop fungiert, ausgebildet bleibt. Dazu wurden unter den vielfältigen Zinkfinger-Linker-Sequenzmotiven physiologisch und pathophysiologisch tatsächlich existierende Sequenzvariationen untersucht, und zwar:

- die 10 häufigsten C2H2-Zinkfinger-Linkersequenzen,
- der H11Y-Aminosäureaustausch, der durch eine Punktmutation im Zinkfinger-Protein-Gen ZNF 331 beim Endometriumkarzinom gehäuft vorliegt.

2. In Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus kultivierten eukaryotischen C631-Zellen (Wildtyp), die Zinkfinger-Proteine (Antigene) exprimieren, kann der anti-HpTGEKP-Antikörper in Anwesenheit des Phosphataseinhibitors Okadasäure phosphorylierte Zinkfinger-Proteine in Zellextrakten markieren. In Abwesenheit von Okadasäure dephosphorylieren nicht-inhibierte Phosphatasen die Zinkfinger-Proteine und der anti-HpTGEKP-Antikörper kann die extrahierten Zinkfinger-Proteine nicht mehr markieren.

3. Mithilfe der ESI-MS-Analyse können alle Ausgangsstoffe, Peptide und Antikörper, molekular charakterisiert werden.

4. Die Konstitutionsisomere YpTGEKP und pYTGEKP können mittels Tandemmassenspektrometrie fragmentiert, analysiert und letztlich differenziert werden.

5. Die nano-ESI-Massenspektren des anti-HpTGEKP-Antikörpers zeigen eine symmetrische Verteilung der Ladungszustände von mehrfach protonierten Ionensignalen, welche die Form einer Gauß-Verteilung aufweisen. Als durchschnittliche molekulare Masse des anti-HpTGEKP-Antikörpers wurden 151 167 ( $\pm 62$ ) Da errechnet.

6. Mit dem Epitop-Feincharakterisierungsverfahren ITEM-TWO kann quantitativ und qualitativ untersucht werden, inwieweit das für die Antikörperbindung erforderliche Bindemotiv dezidierte Aminosäureaustausche bzw. einen veränderten Phosphorylierungsstatus toleriert, was entscheidend zur Entschlüsselung des molekularen Erkennungsmotivs von Antikörper-Paratopen beiträgt.

7. Gemische aus überschüssigen Peptiden, freien Antikörpern und – sofern gebildet – von Immunkomplexen wurden per Elektrospray desolvatisiert und ionisiert. Die aufgenommenen Massenspektren zeigen Ionensignale der Isotopen-aufgelösten einfach und zweifach protonierten Peptidionen, des mehrfach protonierten anti-HpTGEKP-Antikörpers und – sofern ein Immunkomplex gebildet wurde – Ionensignale der mehrfach protonierten Immunkomplexe.

8. In ITEM-TWO-Experimenten werden Ionen der in Lösung befindlichen, komplexierten Epitopeptide als Teil des Immunkomplexes durch den Quadrupol-Massenfilter transportiert. Die Satellitenionensignale der mehrfach protonierten anti-HpTGEKP-Antikörperionen zeigen eine Bindung von sowohl einem als auch von zwei Epitopeptiden an den Antikörper und sind damit ein direkter Beweis für eine vorliegende Antikörper-Peptid-Bindung. Im Gegensatz dazu sind mehrfach geladene Antikörperionensignale, die auf ihrer Flanke mit höherer Masse lediglich asymmetrisch verbreitert sind, nicht beweisend für eine Antikörper-Peptid-Bindung.

9. Kann mittels ITEM-TWO-Experimenten ein aus einem Immunkomplex in der Gasphase freigesetztes protoniertes Epitopeptid-Ionensignal im niedrigen Massenbereich des Massenspektrums gezeigt werden, gilt dies als Beweis für eine vorliegende Antikörper-Peptid-Bindung in Lösung.

10. Die mittels ITEM-TWO-Experimenten aufgestellten Reihenfolgen der Bindungsstärken von Immunkomplexen ähnlicher Zusammensetzung und Struktur in der Gasphase entsprechen weitgehend jenen der Epitop-Paratop-Wechselwirkungen in Lösung, wie sie optimalerweise bei diagnostisch und therapeutisch angewandten Antikörpern und ihren Zielantigenen in vivo vorliegen.

11. Die Epitop-Paratop-Bindungstypen orthodox bzw. unorthodox präzisieren das Bindungsverhalten von Antikörpern auf der Sub-Epitopebene, d.h. auf der Ebene der einzelnen Aminosäurereste innerhalb des Epitops. Diese Epitop-Paratop-Bindungstypen spiegeln Epitop-spezifischen Unterschiede für eine zustande gekommene Antigenbindung wider, die nicht von der Bezeichnung spezifisch bzw. unspezifisch abgedeckt wird. Verglichen mit dem unorthodoxen Bindungstyp ist beim orthodoxen Epitop-Paratop-Bindungstyp die spezifische Antikörper-Peptid-Bindung stärker, da alle essentiellen Wechselwirkungen zwischen den an der Bindung beteiligten Aminosäureresten ausgebildet sind.

12. Der orthodexe Epitop-Paratop-Bindungstyp kann mittels ITEM-TWO in den nano-ESI-Massenspektren aufgezeigt werden, und zwar direkt durch Satellitenionensignale der Antikörperionen sowie indirekt durch proportional mit den zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ansteigenden Intensitäten der freigesetzten Epitopeptidionensignale.

13. Zwischen orthodoxen Epitop-Paratop-Bindungstypen kann mittels ITEM-TWO eine stärkere von einer schwächeren anti-HpTGEKP-Antikörperbindung differenziert werden. Der stärkere orthodexe Epitop-Paratop-Bindungstyp wird durch endotherme Immunkomplexdissoziation in der Gasphase unter ITEM-TWO-Bedingungen angezeigt. Enthalten Phospho-Hexapeptide C-terminal saure Aminosäurereste, werden sie vom anti-HpTGEKP-Antikörper vergleichsweise schwächer aber dennoch auf orthodexe Weise gebunden, was durch eine unter ITEM-TWO-Bedingungen exothermere Dissoziationsreaktion in der Gasphase angezeigt wird.

14. Unter den 10 häufigsten vorkommenden C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Linkersequenzen finden sich 7, die einen orthodoxen anti-HpTGEKP-Antikörperbindungstyp aufweisen. Dabei läuft die Bildung der entsprechenden Immunkomplexe exergonisch/spontan ab, wie aufgrund der Dissoziationsreaktionen der jeweiligen Immunkomplexe, die endergonisch/nicht spontan sind, abgeleitet werden kann.

15. In Kombination mit bioinformatischen *molecular modeling*-Studien kann ITEM-TWO über das Bindemotiv des anti-HpTGEKP-Antikörpers aufklären: Es ist ein bipolares Bindemotiv, bei dem eine N-terminale negative Ladung von einer C-terminalen positiven Ladung des Epitopeptids flankiert wird. Dieses Bindemotiv wird als orthodoxes Bindemotiv bezeichnet.

16. Der unorthodoxe Epitop-Paratop-Bindungstyp kann mittels ITEM-TWO in den nano-ESI-Massenspektren durch nicht proportional mit den zunehmenden Spannungsdifferenzen der Kollisionszelle ansteigenden Intensitäten der freigesetzten Peptidionensignale angezeigt werden.

17. Der anti-HpTGEKP-Antikörper zeigt einen unorthodoxen Epitop-Paratop-Bindungstyp mit Phospho-Hexapeptiden, die zusätzlich zum phosphorylierten Threoninylrest (pT) eine C-terminale hydroxylhaltige Aminosäure (T, S) oder anstelle des N-terminalen phosphorylierten Threoninylrestes (pT) einen phosphorylierten Serinylrest (pS) aufweisen.

18. Bei dem als Western-Blot-Analyse zur Bestätigung des Bindungsverhaltens durchgeführten kompetitiven Antikörper-Peptid-Immunkomplex-Substitutionsassay entspricht eine starke Gasphasenbindung von Immunkomplexen mit orthodox-bindenden Phospho-Hexapeptiden einer effizienten Blockierung der Antikörper-Paratope in Lösung. Eine Unterscheidung von unorthodox bindenden und nicht-bindenden Phospho-Hexapeptiden zum anti-HpTGEKP-Antikörper kann das Assay nicht leisten.

19. Der H11Y-Austausch in Zinkfinger-Protein-Linkersequenzen, der einem H-zu-Y-Aminosäureaustausch auf der ersten Position der untersuchten Hexapeptide entspricht, kann vom anti-HpTGEKP-Antikörperbindung nur in Kombination mit einer Phosphorylierung am Tyrosinylrest bei gleichzeitiger fehlender Phosphorylierung des angrenzenden Threoninylrestes (pYTGEKP) zumindest partiell toleriert werden. Im beschriebenen Fall liegt ein unorthodoxer Epitop-Paratop-Bindungstyp vor. Bei allen anderen Phosphorylierungskombinationen nach H-zu-Y-Austausch (YTGEKP, YpTGEKP, pYpTGEKP) ist das für die anti-HpTGEKP-Antikörperbindung essentiell benötigte Bindemotiv nicht ausgebildet.

20. Bei komplett fehlender Phosphorylierung eines Hexapeptids (HTGEKP, YTGEKP) wird das für die anti-HpTGEKP-Antikörperbindung essentiell benötigte Bindemotiv nicht ausgebildet.

21. Das ITEM-TWO-Verfahren ist für die Aufklärung von Antikörper-Bindeeigenschaften gut geeignet.

22. Ein am Beispiel der Untersuchungen zum molekularen Erkennungscode des anti-HpTGEKP-Antikörpers geleisteter Beitrag zur Epitop-Feincharakterisierung von Antikörpern ist bedeutend zur Validierung der Tauglichkeit eines Antikörpers für den Einsatz in Forschung sowie Diagnostik und Therapie von Krankheiten, da sowohl zu Kreuzreaktivitäten des Antikörpers als auch über Bindemotiv-verändernde Strukturänderungen Kenntnisse auf submolekularer Ebene gewonnen werden können.

23. Der anti-HpTGEKP-Antikörper scheidet zur Diagnostik des H11Y-Austauschs bei Zinkfinger-Linker-Hexapeptiden im Allgemeinen und beim Endometriumkarzinoms im Speziellen in der klinischen Praxis aus.

24. Diese Arbeit leistet einen Beitrag hin zu einer präziseren Medizin (*precision medicine*) der Zukunft.

## 6.9 Publikationen

### 6.9.1 Liste der Publikationen

#### Publikation 1 (Artikel in Fachzeitschrift):

Epitope fine mapping by mass spectrometry: Investigations of immune complexes consisting of monoclonal anti-HpTGEKP antibody and zinc finger protein linker phospho-hexapeptides

Scherf M, Danquah BD, Koy C, Lorenz P, Steinbeck F, Neamtu A, Thiesen H-J, Glocker MO  
ChemBioChem. 2022;23(20). DOI: 10.1002/cbic.202200390.

#### Publikation 2 (Artikel in Fachzeitschrift):

Characterization of Phosphorylation-Dependent Antibody Binding to Cancer-Mutated Linkers of C2H2 Zinc Finger Proteins by Intact Transition Epitope Mapping-Thermodynamic Weak-Force Order Analysis

Scherf M, Koy C, Röwer C, Neamtu A, Glocker MO. J Am Soc Mass Spectrom. 2023;34(2):171-81. DOI: 10.1021/jasms.2c00244.

#### Publikation 3 (Konferenzbeitrag):

Mass Spectrometric Binding Strength Characterization of Paratope - Epitope Interactions with Amino Acid Residue Resolution: Towards Deciphering Molecular "Recognition Codes"

Scherf M, Danquah BD, Koy C, Lorenz P, Steinbeck, F Neamtu A, Thiesen H-J, Glocker MO

70. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Massenspektrometrie (ASMS) zum Thema Massenspektrometrie und verwandte Themen (*70<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*) 5. - 9. Juni 2022 in Minneapolis, Minnesota, USA.

#### Publikation 4 (Konferenzbeitrag, eingereicht):

Mass Spectrometric ITEM-TWO Investigations and Bio-Computational Analyses of Phosphorylation-Dependent Antibody Binding to Cancer-Mutated Linkers of C2H2 Zinc Finger Proteins

Koy C, Scherf M, Röwer C, Neamtu A, Glocker MO.

54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS) in Dortmund 14. - 17. Mai 2023. Beitrags-ID: 177

#### 6.9.2 Beiträge zu den Publikationen

##### Beitrag zu Publikation 1:

Als Erstautor habe ich den Hauptteil des Fachartikels verfasst. Die zugehörigen Experimente wurden von mir selbstständig durchgeführt und ausgewertet. Im Folgenden eine genaue Auflistung der jeweiligen Anteile aller Autoren am Fachartikel:

- Entwurf und Konzept: Prof. Dr. M. O. Glocker, Prof. Dr. A. Neamtu und Prof. Dr. H.-J. Thiesen
- Experimente, Datenanalyse und Auswertung der kinetischen und thermodynamischen Parameter: M. Scherf, Prof. Dr. M. O. Glocker, Dr. P. Lorenz, Dr. C. Koy und Dr. B. D. Danquah
- Visualisierung der molekularen Struktur und Biostatistik: Prof. Dr. M. O. Glocker, Prof. Dr. A. Neamtu, F. Steinbeck, Prof. Dr. H.-J. Thiesen
- Molekulardynamische Berechnungen und Simulationen: Prof. Dr. M. O. Glocker und Prof. Dr. A. Neamtu
- Schreiben: M. Scherf, Dr. C. Koy, Prof. Dr. A. Neamtu, und Prof. Dr. M. O. Glocker
- Hochladen der Rohdaten in die bioinformatische Datenbank *Proteomics Identification Database* (PRIDE): M. Kreutzer

### Beitrag zu Publikation 2:

Als Erstautor habe ich den Hauptteil des Fachartikels verfasst. Die zugehörigen Experimente wurden von mir selbstständig durchgeführt und ausgewertet. Im Folgenden eine genaue Auflistung der jeweiligen Anteile aller Autoren am Fachartikel:

- Entwurf und Konzept: Prof. Dr. M. O. Glocker und Prof. Dr. A. Neamtu
- Experimente, Datenanalyse und Auswertung der kinetischen und thermodynamischen Parameter: M. Scherf, Dr. C. Röwer und Dr. C. Koy
- Visualisierung und molekulare Strukturberechnungen/molekulardynamische Berechnungen und Simulationen: Prof. Dr. M. O. Glocker und Prof. Dr. A. Neamtu
- Schreiben: M. Scherf, Dr. C. Röwer und Dr. C. Koy, Prof. Dr. M. O. Glocker und Prof. Dr. A. Neamtu
- Hochladen der Rohdaten in die bioinformatische Datenbank *Proteomics Identification Database* (PRIDE): M. Kreuzer

### Beitrag zu Publikation 3:

- s. Beitrag zu Publikation 1

### Beitrag zu Publikation 4:

Erstautorin des Konferenzbeitrags ist Frau Dr. Koy, die den Hauptteil des Fachartikels verfasst hat. Die weiteren Beiträge zu dieser Publikation s. Beitrag zu Publikation 2.

Teilergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den aufgeführten Publikationen 1 bis 3 veröffentlicht. Dazu gehören, in vollem Umfang oder teilweise, auch alle verwendeten Abbildungen mit Ausnahme der Abbildungen 2-5, 26, und 27. Ebenso wurden die Tabellen 2, 3, 4 und 7, in vollem Umfang oder teilweise, bereits in den Publikationen 1 und 2 veröffentlicht.

## 6.10 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Maximilian Scherf, versichere hiermit eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Massenspektrometrische Präzisionsanalyse eines Antikörper-Bindemotivs in der Linker-Region von C2H2-Zinkfinger-Proteinen: Von der Charakterisierung der Epitop-Feinstruktur zur Antikörper-basierten Tumordiagnostik am Beispiel des Endometriumkarzinoms“ selbstständig verfasst zu haben. Ich habe keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt sowie die den genutzten Veröffentlichungen entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar in Zusammenhang mit Arbeiten an dem Inhalt der vorliegenden Dissertationsschrift Leistungen oder finanzielle Zuwendungen erhalten.

Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens an der Universität Rostock habe ich zur Kenntnis genommen und anerkannt.

Die Dissertationsschrift ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studien- oder Qualifikationsleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich bestätige die Richtigkeit der vorangestellten Erklärung.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Konsequenzen einer ganz oder teilweise unwahren eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Dissertationsschrift als nicht angenommen zu gelten hat.

Rostock

21.03.2023

---

(Abgabedatum)

---

(Vollständige Unterschrift)

## 6.11 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei den Personen bedanken, die die Promotion erst ermöglicht haben.

Eingangs möchte ich mich insbesondere bei meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. rer. nat. Michael O. Glocker** für die Vergabe des Themas der Promotion sowie die fortwährende, engagierte und exzellente Betreuung während des experimentellen Teils sowie beim Fertigstellen der Dissertationsschrift herzlich bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Frau **Dr. rer. nat. Claudia Röwer**, Frau **Dr. rer. nat. Cornelia Koy** und Frau **Manuela Ruß** - die mir während der Promotion mit Fachwissen zur Seite gestanden haben - für die freundliche Unterstützung und die stets geleisteten Hilfestellungen bei den Arbeiten im Labor und der Auswertung der experimentellen Ergebnisse.

Herrn **Dr. rer. nat. Peter Lorenz** möchte ich für die uneingeschränkte Hilfe und Expertise bei den zellbiologischen Voruntersuchungen zur ZNF-Linkerphosphorylierung meinen Dank aussprechen.

Herrn **Felix Steinbeck** möchte ich für die bioinformatischen Voruntersuchungen zur Auswahl der zehn am häufigsten vorkommenden Aminosäuresequenzen der C2H2-ZNF-Linker-Hexapeptide danken.

Herrn **Michael Kreutzer** danke ich für das Hochladen der Rohdaten in die bioinformatische Datenbank *Proteomics Identification Database* (PRIDE) sowie für Hilfestellungen bei Problemen mit dem genutzten Literaturverwaltungsprogramm.

Ich möchte mich auch bedanken, dass alle genannten Personen zu einem freundlichen Arbeitsklima beigetragen haben, dass - neben dem interessanten Thema - auch dafür gesorgt hat, dass die Arbeit an der Promotion mir Spaß bereitet hat und eine bereichernde Erfahrung für mich darstellte.

In besonderem Maße möchte ich mich bei meiner **Familie** - meiner **Mutter**, meinem **Vater**, meinen **Großeltern** und meinem **Bruder** - herzlich bedanken. Ich danke euch für die liebevolle Begleitung auf meinem Lebensweg, das ermöglichte Studium der Humanmedizin und die gegebene Gelegenheit, mich in vollem Umfang für 12 Monate auf den experimentellen Teil der Promotionsarbeit konzentrieren zu können. Besonders danken möchte ich Euch auch für das Ermutigen und die Motivation für das Zustandekommen dieser Promotionsarbeit.