

# **Untersuchung von Histon-Deacetylasen mittels chemischer Analysestrategien**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Dipl. Chem. Alexander Dose  
aus Leipzig

Tübingen  
2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation

10.06.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dirk Schwarzer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gabriele Dodt



## Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dirk Schwarzer für die Bereitstellung des interessanten und abwechslungsreichen Themas sowie die stetige und überaus freundliche Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich seine exzellente Betreuung sowie die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen. Darüber hinaus war er immer ein wertvoller Ansprechpartner nicht nur für alle wissenschaftlichen Sachverhalte, sondern auch für viele anderen Fragen und Probleme.

Frau Prof. Dr. Gabriele Dodt danke ich für ihre Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Meinen ehemaligen Kollegen vom Berliner Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) Rebecca Klingberg, Jan Oliver Jost, Bernhard Geltinger, Diana Lang und Till Teschke danke ich für die besonders herzliche und kollegiale Zusammenarbeit. Die gegenseitige Hilfestellung und ständige Diskussionsbereitschaft ermöglichten so eine besonders motivierende Arbeitsatmosphäre.

Den derzeitigen und ehemaligen Tübinger Kollegen Julia Sindlinger, Lena Schmohl, Katharina Rehn, Diego Aparicio Pelaz, Jan Oliver Jost sowie Jan Bierlmeier gilt mein besonderer Dank dafür, dass sie das Arbeiten in der Gruppe so angenehm gestalteten und immer für Diskussionen offen waren. Besonders danken möchte ich dabei Julia Sindlinger für die tolle Zusammenarbeit im Hydroxamat-Projekt.

Mein ausdrücklicher Dank geht an Dr. Eberhard Krause und die Mitglieder seiner Arbeitsgruppe Massenspektrometrie am FMP insbesondere Dr. Michael Schümann für die Messung meiner SILAC-Proben.

Danken möchte ich weiterhin Dr. Philipp Selenko und Dr. Stamatios Liokatis der Gruppe *In-Cell*-NMR am FMP für die gute Kooperation und die NMR-spektroskopischen Messungen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine lieben Eltern für ihre fortwährende Unterstützung.

## Zusammenfassung

Histon-Deacetylasen (HDACs) spalten die Acetylgruppen von modifizierten Lysinresten. Die Lysin-Acetylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die bei der Regulation der Funktion und Aktivität vieler Proteine eine wichtige Rolle spielt. Der damit verbundene Einfluss von HDACs auf zahlreiche zelluläre Prozesse machen sie daher zu vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkten für die Wirkstoffentwicklung. Für eine eingehende Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften, der Aktivität sowie der Spezifität von HDACs ist daher die Entwicklung von neuen, leistungsstarken Analysestrategien von besonderem Interesse. In dieser Arbeit wurden drei chemische Strategien entwickelt um die Spezifität, Aktivität und Interaktionspartner von HDACs zu analysieren. Die Synthese von isotopenmarkierten Reporterpeptiden ermöglichte die Etablierung eines NMR-spektroskopischen Assays, welcher eine Beobachtung von mehreren Deacetylierungen im gleichen Substrat erlaubt. Mit diesem Assay konnte die Selektivität der Deacetylasen Sir2.1 und HDAC8 *in vitro* sowie von endogenen HDACs aus HeLa-Kernextrakten am Histon-H4-*tail* analysiert werden. Ferner wurden kolorimetrische HDAC-Substrate entwickelt, die im Gegensatz zu vergleichbaren konventionellen Methoden eine größere Flexibilität in der Substratgestaltung erlaubten. Abschließend wurden Peptid-basierte Affinitätssonden entwickelt, mit denen die Substratselektivität und Zusammensetzung endogener HDAC-Komplexe analysiert werden kann. Mittels Kombination aus chemischer Synthese von Hydroxamat-Aminosäuren, die als HDAC-Inhibitoren fungieren, Festphasenpeptidsynthese und Affinitäts-Pulldown-Experimenten konnten Zink-abhängige HDACs aus humanen Zellextrakten isoliert werden. Der Einfluss auf die Interaktionsprofile der HDACs konnte durch Variation der Seitenkettenlänge der Hydroxamateinheit sowie des Sequenzkontexts der Acetylierungsstelle analysiert werden. Mithilfe dieser Methode konnten zudem die Präferenzen der HDACs aus HeLa-Zellextrakten für die Acetylierungsstelle K382 des Tumorsuppressorproteins p53 untersucht werden.

## Abstract

Histone deacetylases (HDACs) remove acetyl groups of modified lysine residues. Lysine acetylation is a post-translational modification which plays an important role in regulating function and activity of many proteins. The impact of HDACs on numerous cellular processes renders them promising targets for drug development. Detailed investigations on enzymatic properties, activity and specificity of HDACs require new and efficient analysis strategies. This thesis describes the establishment of three chemical strategies for the analysis of specificity, activity and interaction partners of HDACs. Synthesis of isotopically labeled reporter peptides enabled an HDAC assay based on NMR spectroscopy, which allows the observation of multiple deacetylation reactions within the same substrate. This assay was used for *in vitro* selectivity analysis of deacetylases Sir2.1 and HDAC8 as well as endogenous HDACs in HeLa nuclear extracts and histone H4 tail peptides as substrate. Furthermore, colorimetric HDAC substrates were developed. In contrast to conventional methods these peptides allow for greater flexibility in substrate design. Finally, peptide-based affinity probes were developed, which enabled investigation of substrate selectivity and composition of endogenous histone deacetylase complexes. Combination of chemical synthesis of hydroxamate amino acids, which operate as HDAC inhibitors, solid-phase peptide synthesis and affinity pulldown experiments were employed to isolate zinc-dependent HDACs from human cell extracts. The impact on HDAC interaction profiles were analyzed by varying the side chain length of the hydroxamate moiety as well as the sequence context of the acetylation site. The method was applied to investigate the preferences of HDACs in HeLa cell extracts for the acetylation site K382 on tumor suppressor protein p53.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Chromatin, Nukleosome und Histone	1
1.2	Histon-Deacetylasen (HDACs)	7
1.3	HDAC-Inhibitoren	10
1.4	Chemische und biochemische Werkzeuge	12
1.4.1	Assays für HDAC-Aktivität	13
1.4.2	Proteom-weite Analyse von Deacetylase-Aktivität	14
1.4.3	Aktivitätsbasiertes HDAC-Profilings	17
1.5	Aufgabenstellung	18
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>19</b>
2.1	Isotopenmarkierte Histon-H4-Reporterpeptide für NMR-basierte Deacetylierungsassays	19
2.1.1	Strategie	19
2.1.2	Einbau von <sup>15</sup> N-Isotopenmarkierungen in Nε-Lysin	22
2.1.3	Synthese von <sup>15</sup> N-isotopenmarkierten Lysin-Bausteinen	24
2.1.4	Synthese von <sup>15</sup> N-isotopenmarkierten Reporterpeptiden	25
2.2	Entwicklung von kolorimetrischen HDAC-Substraten	28
2.2.1	Strategie	28
2.2.2	Synthese von DNBS-geschützten Lysin-Bausteinen	30
2.2.3	Peptidsynthese mit <i>in situ</i> gebildeten Aminosäurechloriden	31
2.3	Hydroxamate als proteomische Sonden für Histon-Deacetylasen	34
2.3.1	Strategie	34
2.3.2	Design und Synthese der Hydroxamat-Bausteine und Sondenpeptide	35
2.3.3	Peptid-Pulldown-Experimente	41
2.3.4	SILAC-Pulldown-Experimente	48
2.3.5	Peptid-Pulldown-Experimente mit NTF2-Sonden	54
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
3.1	NMR-basierter HDAC-Assay	55
3.1.1	Deacetylierungen am Histon-H4- <i>tail</i>	57
3.2	Kolorimetrischer HDAC-Assay	61
3.2.1	Deacetylierung von p53-K382ac	61
3.3	Hydroxamat-basierte HDAC-Sonden	63
3.3.1	HDAC-Interaktion in humanen Zellextrakten	64
3.4	Methodenvergleich und Ausblick	68

<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeines .....</b>	<b>71</b>
4.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	71
4.1.2	Dünnschichtchromatographie .....	71
4.1.3	HPLC.....	71
4.1.4	Massenspektrometrie.....	72
4.1.5	NMR-Spektroskopie .....	72
<b>4.2</b>	<b>Synthese der <sup>15</sup>N-isotopenmarkierten Lysin-Bausteine.....</b>	<b>73</b>
4.2.1	Boc-Schützung der Lysinseitenkette .....	73
4.2.2	Acetylierung der Lysinseitenkette .....	74
4.2.3	Fmoc-Schützung der $\alpha$ -Aminogruppe.....	76
<b>4.3</b>	<b>Synthese der DNBS-geschützten Lysin-Bausteine .....</b>	<b>79</b>
4.3.1	Installation der N $\alpha$ -DNBS-Schutzgruppe.....	79
<b>4.4</b>	<b>Synthese der Hydroxamat-Bausteine .....</b>	<b>81</b>
4.4.1	Installation der N $\alpha$ -Alloc-Schutzgruppe.....	81
4.4.2	Oxazolidinon-Bildung.....	83
4.4.3	Hydroxamat-Bildung .....	85
4.4.4	Schützung von 2-Aminoadipinsäure .....	88
<b>4.5</b>	<b>Peptidsynthese.....</b>	<b>90</b>
4.5.1	Allgemeine Vorschrift zur manuellen und automatisierten Synthese.....	90
4.5.2	Synthese der <sup>15</sup> N-isotopenmarkierten Histon- <i>tail</i> -H4-Peptide.....	91
4.5.3	Synthese der kolorimetrischen HDAC-Substrate .....	94
4.5.4	Synthese der Hydroxamat-basierten Sondenpeptide .....	95
4.5.5	Immobilisierung der Peptide an Agarosematrices.....	99
<b>4.6</b>	<b>Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>100</b>
4.6.1	Proteinbestimmung .....	100
4.6.2	SDS-PAGE .....	100
4.6.3	Western Blotting.....	101
4.6.4	Pulldown-Experimente .....	102
4.6.5	Tryptischer In-Gel-Verdau.....	104
4.6.6	Nano-LC-ESI-MS/MS .....	104
4.6.7	Datenverarbeitung und Quantifizierung.....	105
4.6.8	Expression von HDAC8.....	105
4.6.9	Kultivierung von HeLa-S3 Zellen .....	105
4.6.10	Stabile Isotopenmarkierung in Zellkultur.....	106
4.6.11	Präparation von cytosolischen und nuklearen Zellextrakten .....	106
<b>5</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>108</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>i</b>

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>i</b>
<b>NMR-Spektren .....</b>	<b>iv</b>

# 1 Einleitung

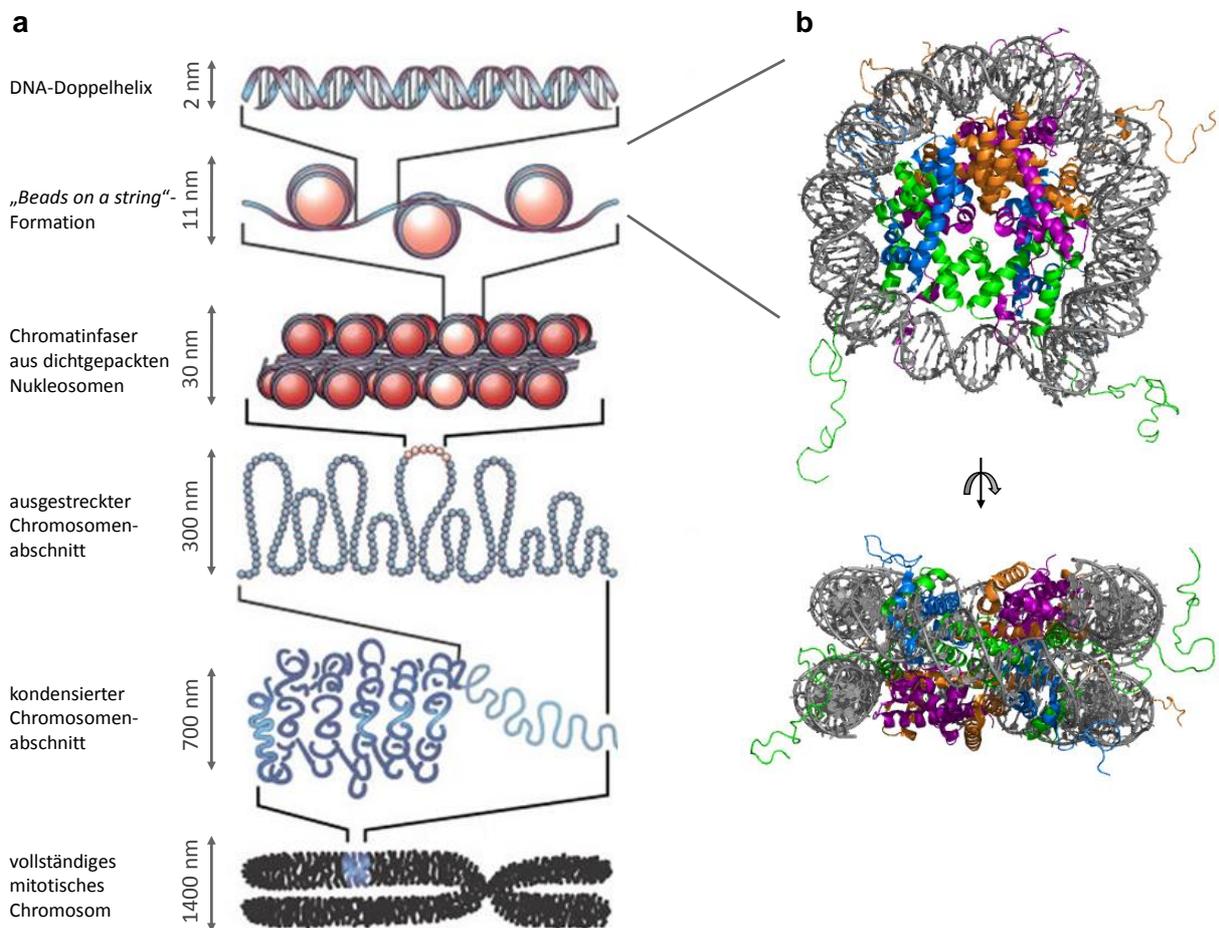
## 1.1 Chromatin, Nukleosome und Histone

Jede eukaryotische Zelle steht vor der Herausforderung der Verpackung ihres Erbguts in den begrenzten Raum des Zellkerns. Dies verlangt eine enorme Verdichtung der gesamten genomischen DNA in eine eng gepackte Struktur. Zusätzlich muss die DNA für Prozesse wie Transkription, Replikation und Reparatur für eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen zugänglich sein. Die Organisation der DNA in eine hochkompakte, gleichzeitig aber auch flexible Struktur wird hauptsächlich durch eine Gruppe von Proteinen, den Histonen, bewerkstelligt. Zusammen mit der DNA bilden sie den Komplex des Chromatins, in dem die DNA bis auf das Zehntausendfache ihrer freien Form komprimiert werden kann (Abb. 1.1).

Die grundlegende Einheit des Chromatins ist das Nukleosom. Der Nukleosomenkern besteht aus je einem Paar der Histonen H2A, H2B, H3 und H4 die sich zu einem Oktamer, mit einem H3-H4-Heterotetramer und jeweils zwei H2A-H2B-Heterodimeren, zusammenfügen [Kornberg 1974]. Jeder Kern ist dabei von ca. 146 bp DNA als linksgängig gedrehte Superhelix umwickelt [Luger *et al.* 1997]. Die einzelnen Nukleosomen sind mittels Linker-DNA miteinander verbunden, diese periodische Anordnung der Nukleosomen lässt sich vom Aussehen her als charakteristische „beads on a string“-Formation beschreiben und ermöglicht eine Reduzierung des Raumbedarfs der DNA um das Siebenfache. Diese Struktur der nukleosomalen DNA kann zu Chromatinfasern mit 30 nm Durchmesser weiter verdichtet werden. Hierbei wird das Histon H1 benötigt, was die Funktion eines Gerüsts für den Nukleosomenkern und die ein- bzw. austretende Linker-DNA erfüllt [Thoma *et al.* 1979]. Mithilfe von Nicht-Histonproteinen können die Chromatinfasern zu strukturell noch kompakteren mitotischen Chromosomen kondensieren, die sich sogar unter dem Lichtmikroskop beobachten lassen.

Zusätzlich unterscheidet man zwei Zustände von Chromatin. Die weniger stark kondensierten chromosomalen Regionen werden Euchromatin genannt und beherbergen aktiv transkribierte Gene. Im Gegensatz dazu findet man im dichter verpackten Heterochromatin hauptsächlich transkriptionell inaktive Gene [Hennig 1999]. Diese Einordnung des Chromatins ist jedoch nicht feststehend, vielmehr kann sich die Verdichtung aufgrund von zellulären Einflüssen ändern; euchromatische Regionen können kondensieren um Heterochromatin zu bilden und umgekehrt. Auf die Regulation der Genaktivität übt daher das Chromatin einen wichtigen Einfluss aus, wobei den Histonen eine besondere Funktion in diesem Prozess zuteilwird. Heutzutage weiß man, dass die Zuordnung eines

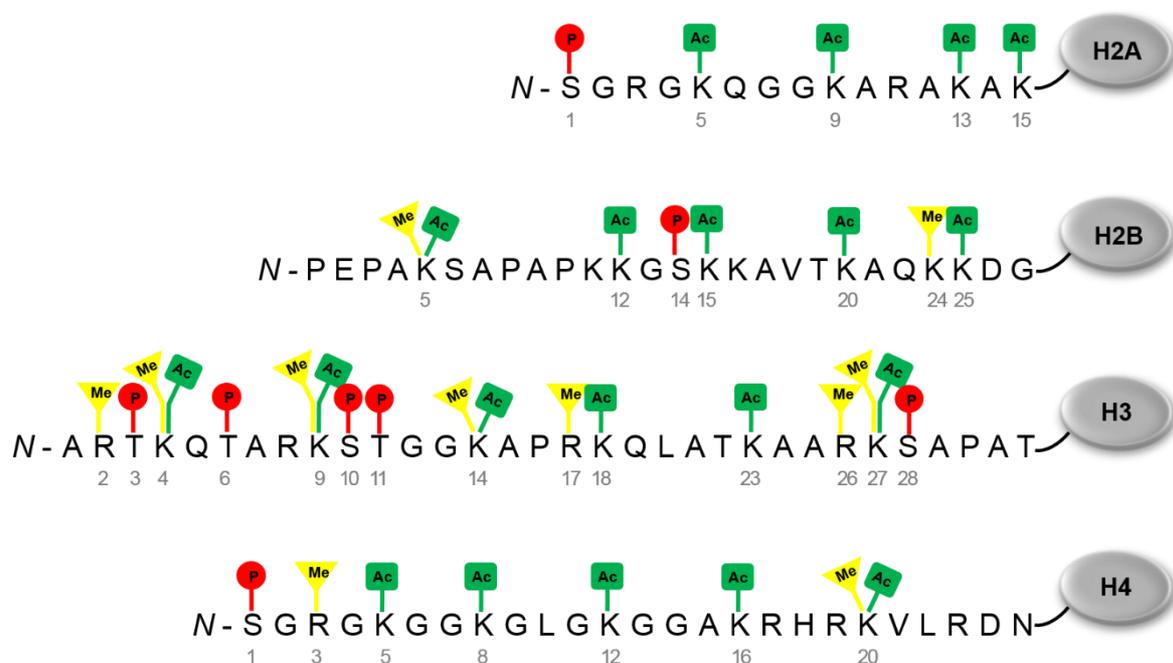
DNA-Abschnitts in Hetero- bzw. Euchromatin u. a. durch bestimmte posttranslationale Modifikationen (PTMs) der Histonproteine bestimmt wird [Bannister und Kouzarides 2011].



**Abbildung 1.1: Verpackung der DNA.** (a) Eukaryotische DNA ist im Zellkern in Form von Chromatin verpackt. Die DNA ist um ein Histonoktamer gewickelt, diese Formation wird Nucleosom bezeichnet und ist die kleinste sich wiederholende Einheit des Chromatins. (Abb. modifiziert nach [Felsenfeld und Groudine 2003]) (b) Kristallstruktur des Nucleosoms. Ein Histonoktamer bestehend aus den Kern-Histonen H2A (violett), H2B (orange), H3 (grün), H4 (blau) ist mit ca. 146 bp DNA (grau) umwickelt. (PDB ID: 1KX5 [Davey *et al.* 2002])

Die in allen Eukaryoten hoch konservierten Kern-Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 besitzen eine globuläre Domäne die das Proteingerüst bilden um die die DNA gewickelt ist (Abb. 1.1.b). Zusätzlich besitzen Histone unstrukturierte flexible *N*-terminale Sequenzen, die sogenannten *Histon-tails*, die aus dem Nucleosomenkern herausragen. Histone weisen insbesondere an diesen Enden einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren wie Lysin und Arginin auf, die bis zu 25 % aller Aminosäuren im Protein ausmachen. Die daraus resultierende positive Ladung sorgt für die Kompensation der hohen

negativen Ladung des Phosphodiesterückgrats der DNA. Ihre herausragende biologische Bedeutung erhalten Histonproteine dadurch, dass deren Aminosäurereste posttranslational modifiziert werden können und somit maßgeblichen Einfluss auf die Regulierung der Genaktivität haben [Kouzarides 2007]. Diese Modifikationen sind in der Mehrzahl, aber nicht ausschließlich, an den Histon-*tails* zu finden (Abb. 1.2). Zu den prominentesten Histonmodifikationen gehören die Acetylierung und (Mono-, Di-, Tri-)Methylierung von Lysin sowie die Phosphorylierung von Serin und Threonin die seit den 60er Jahren bekannt sind [Allfrey *et al.* 1964; Gutierrez und Hnilica 1967]. Intensive Forschung in der Folgezeit konnte noch weitere Modifikationen wie z. B. die Phosphorylierung von Histidin, die Methylierung von Arginin, die Ubiquitinierung bzw. SUMOylierung von Lysin und die poly-ADP-Ribosylierung zu Tage fördern. Zu den neu entdeckten Histon-PTMs der jüngsten Vergangenheit zählen diverse Acylierungen von Lysinresten wie z. B. die Crotonylierung und die 2-Hydroxyisobutyrylierung [Tan *et al.* 2011; Dai *et al.* 2014].



**Abbildung 1.2: Posttranslationale Modifikationen an Histon-*tails*.** Die N-terminalen Sequenzen der vier Kern-Histone enthalten mehrere Stellen für posttranslationale Modifizierungen, darunter die Acetylierung von Lysin (Ac, grün), die Methylierung von Lysin und Arginin (Me, gelb) und die Phosphorylierung von Serin und Threonin (P, rot).

Die Beziehungen zwischen posttranslationalen Modifikationen an Histon-*tails* und der Genregulation kann mithilfe von zwei Modellen interpretiert werden. Eine Theorie geht von einem direkten Einfluss

von Histonmodifikationen, insbesondere der Acetylierung, auf die Chromatinstruktur und die daraus erfolgende Genaktivierung aus. Hierbei wird vermutet, dass die positive Ladung der Histon-*tails* aufgrund des hohen Anteils von Arginin- und Lysinresten die negative Ladung der DNA kompensiert, was wiederum in elektrostatische Wechselwirkungen der beiden Komponenten im Nukleosom resultiert und die DNA unzugänglich für die Bindung von Chromatin-assoziierten Proteinen wie Transkriptionsfaktoren macht. Die Histon-Acetylierung führt zu einer Ladungsneutralisierung, welche die Bindung zur DNA verringert und eine Auflockerung der Chromatinstruktur bewirkt und somit die Zugänglichkeit von DNA-Abschnitten für Transkriptionsfaktoren erhöht [Wolffe und Hayes 1999]. Modifikationen wie Methylierungen lassen sich in die Hypothese jedoch nur eingeschränkt integrieren, da z. B. Methylierungen keinen Einfluss auf die Nettoladung haben und sowohl mit transkriptioneller Aktivierung als auch Repression in Verbindung stehen [Gupta *et al.* 2010]. Die Konsequenzen von Histonmethylierungen lassen sich besser mit einem zweiten Modell erklären. In der sogenannten „Histon-Code“-Theorie leiten spezifische Muster von bestimmten Histonmodifikationen die Rekrutierung von Proteinen und Komplexen ein, die diesen Code erkennen und im Zusammenwirken die Genaktivität regulieren [Strahl und Allis 2000; Jenuwein und Allis 2001]. Die Hypothese ist momentan Gegenstand intensiver Diskussion, da nicht alle Modifikationen in Zusammenhang mit der Bildung eines Musters stehen, welches in einer spezifischen Veränderung der Genaktivität resultiert. So konnte gezeigt werden, dass z. B. die Histon-Acetylierung an H4 von K16 entscheidenden Einfluss auf die Transkriptionsrate hat, während Acetylierungen an H4 von K5, K8 und K12 nur kumulativ auf die Genexpression wirken [Dion *et al.* 2005; Henikoff 2005].

Hingegen wird die „Histon-Code“-Theorie durch die Existenz von regulatorischen Proteinen unterstützt, die selektiv unterschiedliche modifizierte Aminosäuren erkennen und daran binden können und für die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Komplexen verantwortlich sind. Diese Proteine enthalten meist Effektor-domänen für die spezifische Interaktion mit den Histonmodifikationen [Jenuwein und Allis 2001]. Zu den bekanntesten Vertretern der Bindedomänen zählen die Bromodomänen, die acetylierte Lysinreste erkennen und binden können und Bestandteil in vielen Chromatin-assoziierten Proteinen sind [Filippakopoulos und Knapp 2012]. Für die Bindung von methylierten Lysin- oder Argininresten sind je nach Ausprägung des Methylierungsgrades die Chromo-, Tudor- und MBT-Domänen (*malignant brain tumor*) bekannt, während für die Erkennung von Phosphorylierungen 14-3-3- und BRCT-Proteindomänen identifiziert worden sind [Taverna *et al.* 2007]. Posttranslationale Histonmodifikationen sind keine feststehenden Veränderungen, vielmehr ergibt sich ihre unterschiedliche Lebensdauer aus einem dynamischen Prozess. Die Proteine die solche Modifikationen einführen bzw. wieder entfernen können werden als Histon-modifizierende Enzyme zusammengefasst. Verantwortlich für die Lysin-Acetylierung sind Histon-Acetyltransferasen (HATs), die den Transfer einer Acetylgruppe vom Cofaktor Acetyl-Coenzym A auf das primäre Amin der

Lysinseitenkette katalysieren [Roth *et al.* 2001]. Die Katalyse der Gegenreaktion, die Abspaltung der Acetylgruppe, wird von Histon-Deacetylasen (HDACs) übernommen, die im folgenden Abschnitt (Kap. 1.2) ausführlicher behandelt werden. Weitere wichtige Histon-modifizierende Enzyme sind Histon-Methyltransferasen und Histon-Demethylasen, zuständig für die Übertragung und Entfernung von Methylgruppen, sowie Kinasen und Phosphatasen, die die reversible Phosphorylierung von Histonen kontrollieren [Schwarzer 2010].

Insbesondere die Modifizierung der Histon-Acetylierung spielt, unabhängig von der Frage welche Hypothese den Einfluss auf die Genregulation am exaktesten beschreibt, eine bedeutende und vielfältige Rolle. Wie Abbildung 1.2 zeigt, können mehrere spezifische Lysinreste der vier Kernhistone acetyliert werden. Einzelne dieser Modifizierungen oder Kombinationen davon dienen dabei zur Steuerung von diversen Prozessen wie dem Aufbau von Nukleosomen, der Chromatinfaltung und der Gentranskription.

So dienen Acetylierungen am *Tail* von Histon H4 (K5, K8, K12) und den globulären Domänen von H3 (K56) und H4 (K91) als Marker für den Zusammenbau von Nukleosomen und neu replizierter DNA [Shahbazian und Grunstein 2007]. Dies geschieht unter der Vermittlung von Histon-Chaperonen wie z. B. CAF-1 (*chromatin assembly factor-1*), die wahrscheinlich spezifische Acetylierungen bzw. deren Muster erkennen, sie vor Deacetylierung durch HDACs schützen und somit für einen geordneten Einbau von Histonen an die DNA sorgen [Verreault *et al.* 1996; Winkler *et al.* 2012]. In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass die Acetyltransferase HAT1 eine essentielle Rolle für die genomische Stabilität und die Verarbeitung von neu synthetisierten Histonen H3 und H4 spielt [Nagarajan *et al.* 2013].

Die Histon-Acetylierung hat zudem Einfluss auf die Chromatinkondensation und Chromatinfaltung, eine Erklärung dafür liefert die oben erwähnte Ladungsneutralisierungstheorie. Die Acetylierung der Histon-*tails* führt zu einer Abnahme von Interaktionen zwischen den Nukleosomen und befördert so eine Destabilisierung der 30 nm Chromatinfasern was wiederum in einer offenen Chromatinstruktur resultiert. Bedeutsam ist dabei der Einfluss von K16 im Histon-*tail* H4. Wie in *in vitro*-Experimenten gezeigt wurde, reduziert eine alleinige Acetylierung an dieser Position die Fähigkeit der internukleosomalen Selbstassoziation zu den höher geordneten 30 nm Chromatinfasern und hat damit die gleiche Wirkung wie eine komplette Deletion des gesamten H4-*tails* [Shogren-Knaak *et al.* 2006].

Zusätzlich nimmt die Acetylierung von H4K16 eine Schlüsselrolle in der Regulierung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin ein, was durch die Rekrutierung von SIR-Proteinen (*silencing information regulation*) an diese Position vermittelt wird. Hervorzuheben ist hierbei die Vermittlung durch das Hefe-Enzym Sir2, ein SIR-Protein mit Deacetylase-Aktivität, welches durch die

Deacetylierung von H4K16 die transkriptionelle Repression einleitet und eine für Heterochromatin typische kondensierte Struktur befördert [Oppikofer *et al.* 2013].

Auch jenseits der Histonproteine zählt die Lysin-Acetylierung zu den häufigsten posttranslationalen Modifizierungen und beeinflusst die Regulation von zahlreichen physiologischen Prozessen darunter enzymatische Aktivitäten, Protein-Protein-Wechselwirkungen, Genexpression und die subzelluläre Lokalisation von Proteinen [Glozak *et al.* 2005; Kim *et al.* 2006; Spange *et al.* 2009]. Zu den bekanntesten Beispielen für Nicht-Histonproteine zählt der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53. Hier hat die Acetylierung Einfluss auf die Regulation der Proteinstabilität, DNA-Bindung und transkriptionellen Aktivität [Bode und Dong 2004; Reed und Quelle 2015]. Die Tabelle 1.1 zeigt eine Auswahl an weiteren Nicht-Histonproteinen mit der entsprechenden biologischen Bedeutung ihrer Acetylierung.

In den letzten Jahren konnten dank neuer technologischer und methodischer Errungenschaften in der Proteomik, z. B. mittels hochauflösender Nano-LC-MS/MS oder panspezifischer Antikörper, herausragende Erkenntnisse in der quantitativen Erfassung des Acetyloms, d. h. der Gesamtheit aller Protein-Acetylierungen eines Organismus, gewonnen werden. Als Meilenstein ist hier vor allem die Arbeit von Choudhary *et al.* aus dem Jahre 2009 zu nennen, in der 3600 Lysin-Acetylierungen auf insgesamt 1750 Proteinen des menschlichen Proteoms identifiziert werden konnten. Mittlerweile sind ca. 35500 Acetylierungsstellen bekannt (PhosphoSitePlus, Stand Mai 2015 [Hornbeck *et al.* 2015]).

**Tabelle 1.1: Auswahl an acetylierten Nicht-Histonproteinen.** Einfluss der Acetylierung auf die Regulation der Proteinfunktion [Glozak *et al.* 2005; Minucci und Pelicci 2006; Spange *et al.* 2009].

Protein	Rolle der Acetylierung
p53	Regulierung von Proteinstabilität, DNA-Bindung und transkriptioneller Aktivität
STAT3	Dimerisation und nukleäre Translokation
NF-κB	Transkriptionelle Aktivierung, DNA-Bindungsaffinität
HSP90	Regulierung der Chaperon-Funktion
α-Tubulin	Mikrotubuli-Funktion und Zellmotilität
Ku70	Disruption des Ku70-BAX-Komplexes, Apoptose-Regulation
c-Myc	Proteinstabilität
EKLF	Wechsel zwischen Bindung zu Coaktivator und Corepressor
HMGB1	Subzelluläre Lokalisation und Sekretion
α-Importin	Kernimport

## 1.2 Histon-Deacetylasen (HDACs)

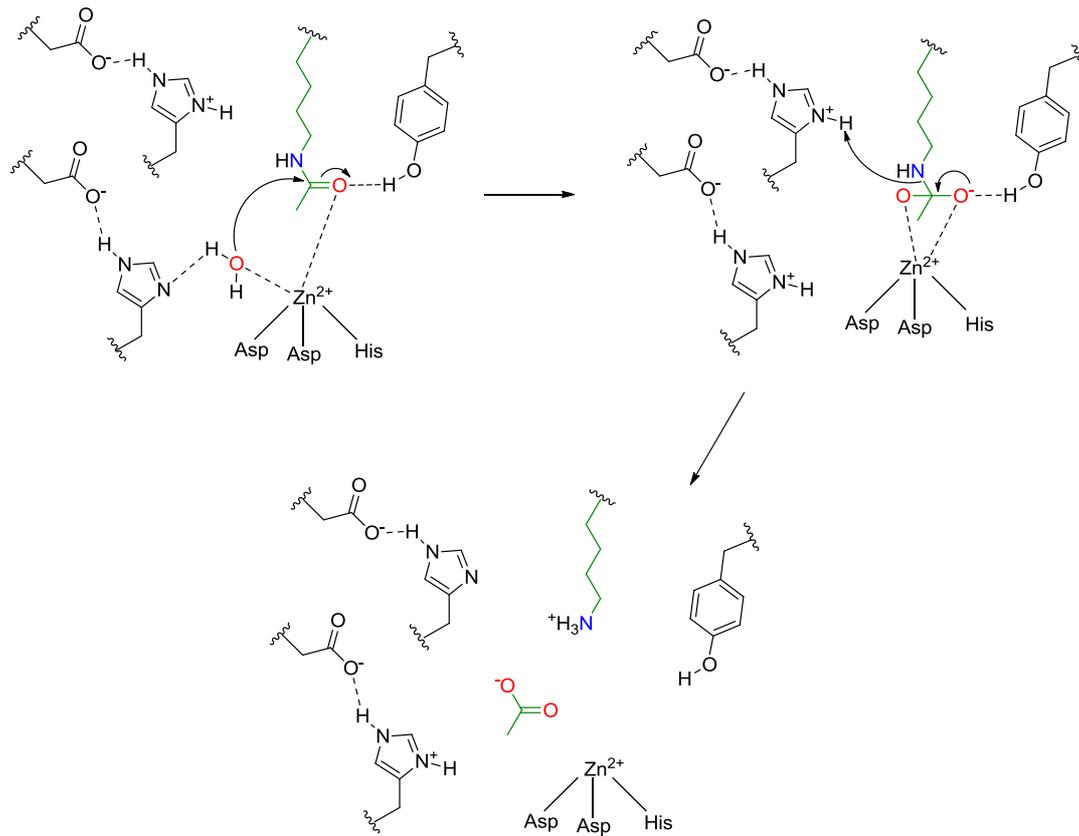
HDACs (oder Lysin-Deacetylasen, KDACs) entfernen die Acetylgruppen von acetylierten Lysinresten von Histonen und vielen weiteren Proteinen. Ihr Vorkommen erstreckt sich über alle Organismen, was die Bedeutsamkeit ihrer Funktion weiter hervorhebt [Yang und Seto 2009]. Allgemein lassen sich HDACs in zwei mechanistisch unterschiedliche Superfamilien einordnen: die „klassischen“ HDACs, die ein gebundenes  $Zn^{2+}$ -Ion enthalten und die Familie der Sirtuine, welche  $NAD^+$  als Cofaktor benötigen. Bis heute wurden 18 verschiedene humane HDACs identifiziert, die sich aufgrund ihrer Sequenzhomologien zu Deacetylasen der Hefe in vier verschiedene Klassen einteilen lassen. In jeder Klasse definiert sich die Homologie hauptsächlich über die hoch konservierte katalytische Deacetylierungsdomäne [Gregoretto *et al.* 2004]. Die Enzyme der Klasse I (HDAC1, 2, 3 und 8) sind verwandt mit dem aus der Hefe stammenden HDAC RPD3. Klasse II HDACs enthalten Domänen mit Ähnlichkeit zu dem Hefe-Enzym HDA1 und lassen sich in zwei Unterklassen kategorisieren, IIa mit den HDACs 4, 5, 7 und IIb mit den HDACs 6 und 10. HDAC6 besitzt zudem die Besonderheit, dass es im Gegensatz zu allen anderen HDACs über zwei Deacetylierungsdomänen verfügt. Die Klasse III beinhaltet sieben HDACs (SIRT1-7), die Sirtuine, deren Name sich von dem aus der Hefe stammenden Transkriptionsrepressor Sir2 ableitet. HDAC11 besitzt Gemeinsamkeiten mit den HDACs der Klassen I und II, bildet jedoch die eigene Klasse IV.

Allgemein sind HDACs ubiquitär in Hinblick auf ihre Verteilung in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen vertreten. Gleichwohl gibt es jedoch Unterschiede in den Expressionslevels der HDACs untereinander sowie zwischen gesunden und tumorösen Gewebe [de Ruijter *et al.* 2003; Ververis und Karagiannis 2012]. Während HDAC1 und 2 fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind, erstreckt sich die subzelluläre Verteilung der restlichen klassischen HDACs auch auf das Cytoplasma. Insbesondere HDACs der Klassen IIa sind dafür bekannt, infolge von reversiblen Interaktionen mit 14-3-3-Proteinen, zwischen den beiden Kompartimenten zu pendeln [Verdin *et al.* 2003]. Bei den Sirtuinen erstreckt sich die Lokalisation vom Zellkern (SIRT1, 6, 7) über das Cytosol (SIRT2) bis hin zum Mitochondrium (SIRT3, 4, 5).

Um ihre biologische Funktion zu erfüllen müssen HDACs in Interaktion mit ihren acetylierten Zielproteinen treten. In Hinblick auf die Deacetylierung von Histonen, die zu transkriptioneller Inaktivierung führt, binden HDACs selbst nicht direkt an Chromatin, sondern sind Teil von Proteinkomplexen, die spezifisch mit bestimmten Chromatinregionen interagieren. Während einige HDACs einfache Komplexe beispielsweise mit sequenzspezifischen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren bilden, fungieren andere HDACs primär als Teil von größeren Multiproteinkomplexen. Insbesondere HDACs der Klasse I, jedoch nicht HDAC8, sind für diese Komplexbildung bekannt. HDAC1 und 2 sind Teile der Multiproteinkomplexe Sin3, Mi-2/NuRD, CoREST

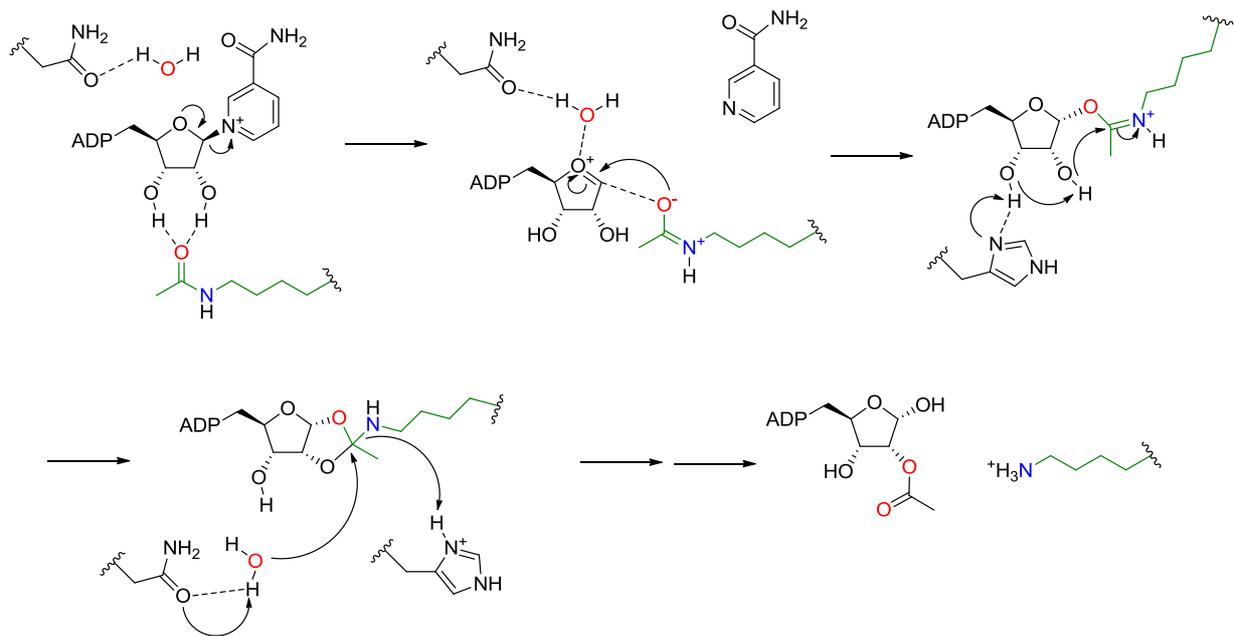
und MiDAC, wobei HDAC3 Teil des N-CoR/SMRT-Komplexes ist [Zhang *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1999; You *et al.* 2001; Li *et al.* 2000; Bantscheff *et al.* 2011]. Bestandteile dieser Komplexe sind u. a. Histon-bindende Proteine (RBBP4/7), Proteine für die Erkennung von methylierter DNA (MBD2/3) und modifizierten Histonen (ING1/2) sowie Histon-Demethylasen (KDM1A) und Corepressoren (SIN3A/B; p66A/B; N-CoR). Einige Komplexe enthalten mehrere HDACs, wie z. B. HDAC1 und 2 in den Sin3-, Mi-2/NuRD- oder MiDAC-Komplexen. Die Notwendigkeit für diese Redundanz ist noch nicht ganz geklärt; der Zweck von Komplexen die z. B. HDAC3 und HDACs der Klasse IIa enthalten, könnte jedoch darin begründet sein, dass so eine effektivere Gesamt-Deacetylase-Aktivität bereitgestellt wird, wenn man die schwache intrinsische katalytische Aktivität von HDACs der Klasse IIa bedenkt [Fischle *et al.* 2001; Fischle *et al.* 2002].

Einblicke in den katalytischen Mechanismus der Zink-abhängigen HDACs (HDAC1-11) konnten erstmals durch die Strukturaufklärung eines HDAC-Homologen aus *Aquifex aeolicus*, der Ähnlichkeit zum humanen HDAC1 aufweist [Finnin *et al.* 1999], sowie durch die gelösten Kristallstrukturen von HDAC8 [Somoza *et al.* 2004; Vannini *et al.* 2004], gewonnen werden. Diese Arbeiten gestatteten es einen Mechanismus der enzymatischen Aktivität vorzuschlagen. Das mit der Oberfläche über einen röhrenförmigen Kanal verbundene aktive Zentrum sitzt im Inneren des Enzyms und enthält ein  $Zn^{2+}$ -Ion an das ein Wassermolekül gebunden ist. Ähnlich wie bei anderen Metallo- und Serinproteasen erhöhen das Zinkion und *charge-relay*-Systeme mittels Aspartat und Histidin die Nukleophilie des Wassermoleküls, welches wiederum die Acetylgruppe angreift und die Amidbindung hydrolysiert (siehe Schema 1.1).



**Schema 1.1: Katalysemechanismus von Zink-abhängigen HDACs.** Das Zinkion und ein Histidin-Aspartat-Basensystem erhöhen die Nukleophilie des Wassermoleküls für die Hydrolyse des acetylierten Lysins. Die tetraedrische Zwischenstufe wird durch die Koordination zum Zinkion und mittels einer Wasserstoffbrücke zum Tyrosin stabilisiert, während ein zweites His-Asp-System das notwendige Proton zur Verfügung stellt [Finnin *et al.* 1999; Biel *et al.* 2005].

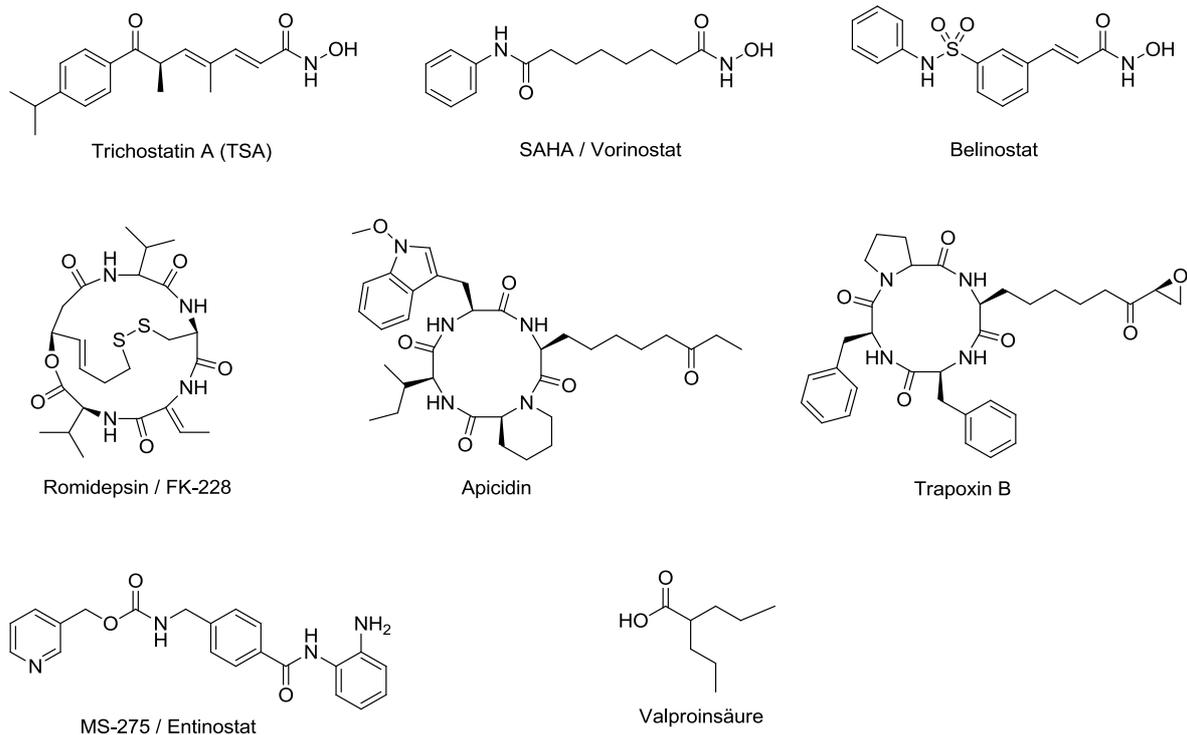
Im Gegensatz dazu verläuft die Deacetylierung durch Sirtuine nach einem anderen Mechanismus; diesbezügliche Einsichten konnten durch die Strukturaufklärung eines Sir2-Homologen ( $\gamma$ Hst2) gewonnen werden [Zhao *et al.* 2004]. Die Sirtuine katalysieren demnach die Bildung eines ADP-Ribose-Imidat-Zwischenprodukts zwischen einem chemisch reaktiven enzymgebundenen  $\text{NAD}^+$  und der  $N\epsilon$ -Aminogruppe von Acetyllysinen unter der Abspaltung von Nicotinamid, wobei Nicotinamid selbst ein Inhibitor der Sirtuinaktivität ist. Die anschließende Hydrolyse ergibt das deacetylierte Lysin und 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose (Schema 1.2).



**Schema 1.2: Katalysemechanismus von Sirtuinen.** Das Nicotinamid wird hydrolytisch abgespalten. Ein an ein Asparagin gebundenes Wassermolekül stabilisiert das entstehende Ribose-Oxocarbeniumion, welches anschließend vom Acetyllysine nukleophil angegriffen wird. Das Imin-artige Intermediat wird durch einen vom Histidin unterstützten Angriff der Ribose-2'-OH-Funktion abgefangen. Abschließend liefert eine Hydrolyse das freie Lysin und 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose [Zhao *et al.* 2004; Biel *et al.* 2005].

### 1.3 HDAC-Inhibitoren

HDAC-Aktivität spielt eine entscheidende Rolle in der Regulierung zellulärer Prozesse wie die Transkription oder der Verlauf des Zellzyklus wobei die HDACs selber streng reguliert sind. Ist diese Regulierung gestört, führt dies zu einer erhöhten HDAC-Aktivität wie sie in vielen Krankheiten wie Krebs und neurodegenerativen Leiden beobachtet wird [Gallinari *et al.* 2007]. Dieser Zusammenhang hat zu einer intensiven Erforschung von pharmakologischen Modulatoren der HDAC-Aktivität geführt. Im Falle der klassischen HDACs bezieht sich diese Suche fast ausschließlich auf Inhibitoren der Deacetylase-Aktivität [Minucci und Pelicci 2006; Dokmanovic *et al.* 2007; Hahnen *et al.* 2008]. Die Suche nach vielversprechenden HDAC-Inhibitoren für die Anwendung als chemotherapeutische Wirkstoffe birgt große Hoffnungen, so sind bislang zwei HDAC-Inhibitoren SAHA (Vorinostat) und Romidepsin (Abb. 1.3) von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphom zugelassen, während weitere Präparate sich in klinischen Prüfungen befinden [Gallinari *et al.* 2007].



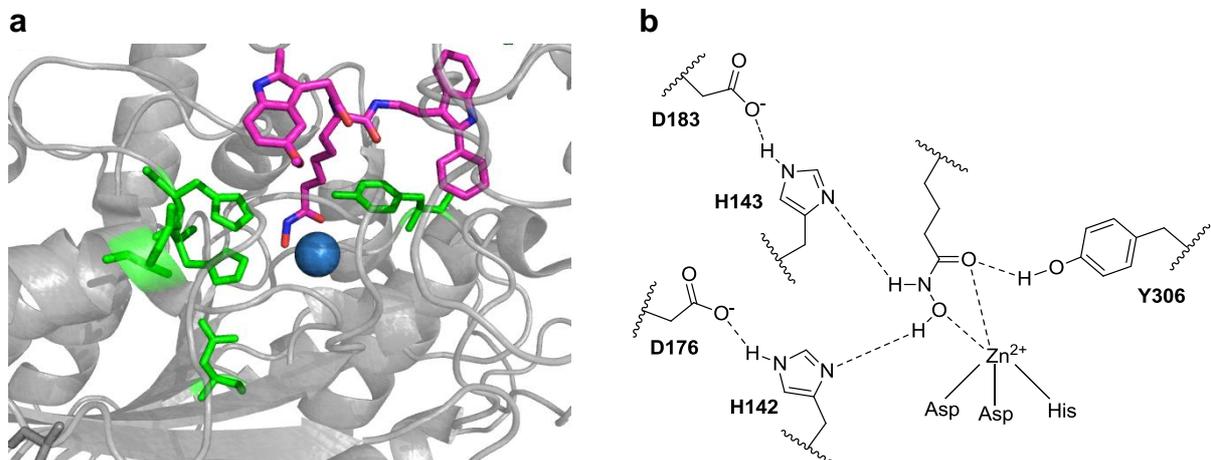
**Abbildung 1.3: Strukturen von repräsentativen HDAC-Inhibitoren.** Die Inhibitoren von Zink-abhängigen HDACs umfassen Klassen der Hydroxamsäuren (TSA, SAHA, Belinostat), cyclische Peptide und Depsipeptide (Romidepsin, Apicidin, Trapoxin B), Benzamide (MS-275) und Carboxylate (Valproinsäure).

Es gibt eine Reihe von Naturstoffen, die als HDAC-Inhibitoren fungieren. Die Verwendung solcher Naturstoffe datiert sogar vor der Erforschung der HDACs selber, so spielten sie als Hilfsmittel bei der Isolierung und Charakterisierung der HDACs, wie z. B. der Entdeckung von HDAC1 mithilfe von Trapoxin (Abb. 1.3), eine entscheidende Rolle [Taunton *et al.* 1996].

Das relativ weite Spektrum von bisher identifizierten HDAC-Inhibitoren umfasst Verbindungen sowohl aus natürlichen als auch künstlichen Quellen, welche sich bis auf wenige Ausnahmen in chemische Klassen wie Hydroxamate, Carboxylate, Benzamide, elektrophile Ketone und cyclische Peptide einordnen lassen [Miller *et al.* 2003]; prominente Beispiele für Inhibitoren dieser Hauptklassen sind in Abbildung 1.3 aufgeführt. Allen gemein ist die Art der Enzymhemmung: eine funktionelle Gruppe bindet kompetitiv an das Zinkion im aktiven Zentrum; die Bindung von Trapoxin zur Histon-Deacetylase erfolgt wahrscheinlich kovalent über das Epoxid. Zu den potentesten Inhibitoren zählen Hydroxamatderivate, die das Enzym mit  $IC_{50}$ -Werten in nanomolaren Konzentrationen inhibieren können. Analysen der Kristallstruktur von Komplexen aus HDAC8 und Hydroxamat-basierten Inhibitoren haben dabei geholfen den Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen besser zu

verstehen [Somoza *et al.* 2004; Vannini *et al.* 2004, Vannini *et al.* 2007]. Wie in Abbildung 1.4 gut zu sehen ist, koordiniert die Hydroxamatfunktion optimal an das Zinkion des aktiven Zentrums und ersetzt dabei das normalerweise an das Zink gebundene Wassermolekül.

Zu den weiteren strukturellen Eigenschaften der Inhibitoren gehört außerdem eine Linkerdomäne, die den röhrenförmigen Zugangskanal beansprucht. Zusätzlich interagieren Reste des Inhibitors mit dem Enzym am Eingang zum aktiven Zentrum und bilden so eine abschließende „Kappe“ des Kanals. Diese drei Strukturfunktionen (Zink-Chelator, Linker und Oberflächenelement) bilden die Grundlage für die Erforschung neuer Inhibitoren [Biel *et al.* 2005]. Ziel ist dabei u. a. die Entwicklung von selektiven HDAC-Inhibitoren, was über die strukturelle Variation der chelatisierenden Einheit, hauptsächlich jedoch der „Kappe“, die mit den Aminosäuren des Enzyms interagiert, erreicht wird.



**Abbildung 1.4: Aktives Zentrum von HDAC8.** Kristallstruktur (a) und schematische Darstellung (b) von HDAC8 im Komplex mit einem Hydroxamat-basierten Inhibitor (PDB ID: 2V5X [Vannini *et al.* 2007]). Hervorgehoben in (a) sind die beteiligten Aminosäuren des aktiven Zentrums (grün) und des Inhibitors (pink) in der Stäbe-Darstellung sowie das Zinkion (blau) in sphärischer Repräsentation.

## 1.4 Chemische und biochemische Werkzeuge

Schon seit den frühen Tagen der Chromatinbiologie und der Entdeckung der ersten posttranslationalen Modifikationen, insbesondere der Identifizierung der Histon-Acetylierung und deren vermuteter regulatorischer Einfluss auf die Transkription durch Allfrey *et al.* [Allfrey *et al.* 1964; Vidali *et al.* 1968], wird die Erforschung der Lysin-Acetylierung und deren modifizierende Enzyme durch ständige neue Entwicklungen der chemischen Biologie wie z. B. der Gestaltung und dem Einsatz von chemischen

Sonden begleitet. Die Evaluierung von Deacetylase-Aktivität mithilfe neuer Bioassays und Verbindungen ist daher essenziell für die Bestimmung der physiologischen Funktion von HDACs und dem Erlangen neuer mechanistischer Einblicke aber auch für die Entwicklung gezielter Wirkstoffe [Cole 2008; Bradner *et al.* 2010; Schutkowski *et al.* 2014; Minoshima und Kikuchi 2015].

#### 1.4.1 Assays für HDAC-Aktivität

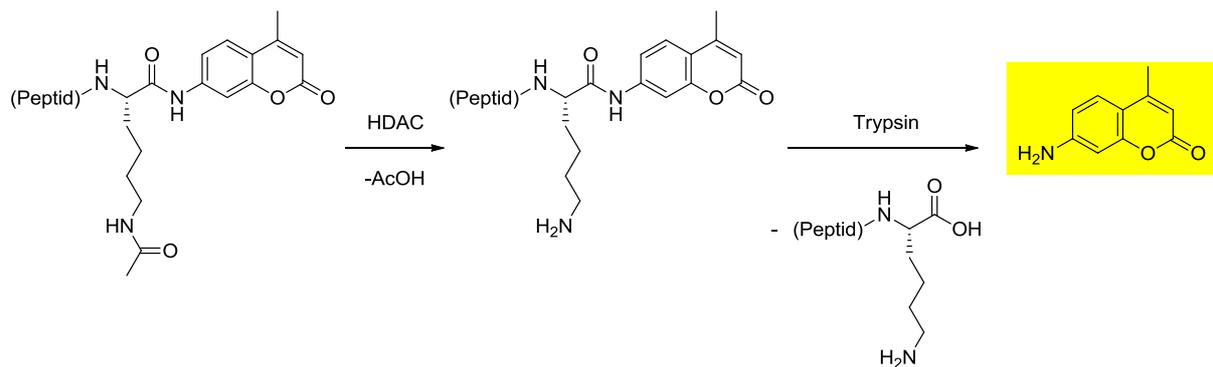
Ein wichtiges Hilfsmittel stellen synthetische Peptide dar. Fast zeitgleich mit den ersten biochemischen Untersuchungen von Histon-Acetylierungen ermöglichte die Entwicklung der Festphasen-Peptidsynthese [Merrifield 1963] erstmals eine effiziente Synthese von Polypeptiden und eröffnete somit neue Perspektiven für die Untersuchung von Histon-modifizierenden Enzymen. Insbesondere die flexiblen und unstrukturierten Histon-*tails* mit Längen von bis zu 38 Aminosäuren bieten sich hervorragend als Vorlagen für die Gestaltung von Peptid-basierten HDAC-Substraten an. Gleichzeitig ermöglicht die Verfügbarkeit von modifizierten Bausteinen (*building blocks*) die Generierung von isolierten Histon-*tails* mit mannigfaltigen Kombinationen an Modifizierungszuständen und gestattet so eine exaktere Erforschung der Spezifität der interagierenden Enzyme [Schwarzer 2010; Müller und Muir 2015].

Um die katalytischen Eigenschaften von Histon-Deacetylasen zu untersuchen sind heutzutage vielfältige Methoden im Einsatz. Weit verbreitet sind *in vitro* Assays die das Auslesen der Enzymaktivität mittels Inkorporation bzw. Freisetzung von radioaktiven Sonden, Fluorophoren und Farbstoffen verfolgen [Hauser *et al.* 2009].

Die ersten Aktivitäts-Assays, welche auch heute noch genutzt werden, basierten auf der Messung von [<sup>3</sup>H]Acetat aus radioaktiv markierten Histonen oder Oligopeptiden. Nach Inkubation des Substrats mit der Deacetylase erfolgt die Quantifizierung des freigesetzten [<sup>3</sup>H]Acetats mittels Szintillationszähler und gestattet somit eine direkte Korrelation zur HDAC-Aktivität. Nachteilig stellt sich hier, neben den Unannehmlichkeiten bei Arbeiten mit radioaktiven Materialien und der umständlichen Substratpräparation, die Notwendigkeit einer extraktiven Trennung des [<sup>3</sup>H]Acetats vom Substrat dar; neue und verbesserte Protokolle (*scintillation proximity assay*) [Nare *et al.* 1999] können durch den Verzicht einer Lösungsmittel-Extraktion zumindest letzteres Problem umgehen.

Aufgrund der einfachen Handhabung und der Eignung für Hochdurchsatz-Anwendungen gelten vorallem Fluoreszenz-basierte Verfahren zu den meistverwendeten HDAC-Aktivitätsassays. Zu den wichtigsten Methoden zählt die zweistufige Trypsin-gekoppelte Reaktion unter der Verwendung des Fluoreszenzträgers AMC (7-Amino-4-methylcoumarin) [Wegener *et al.* 2003]. Als Substrat dient hier eine kurze Peptidsequenz mit einem N $\epsilon$ -acetylierten Lysinrest und dem C-terminal konjugierten AMC (Schema 1.3). Innerhalb dieser Verbindung wird die Fluoreszenz des Fluorophors unterdrückt. Die

tryptische Spaltung der Peptidbindung wird durch die Acetylierung der Lysinseitenkette unterbunden. Die Zugabe des HDACs bewirkt die Spaltung der Nε-Amidbindung. Anschließend kann Trypsin die Abspaltung zwischen Lysinrest und Fluorophor katalysieren. Das Auslesen der Fluoreszenz durch den freigesetzten Fluorophor gibt somit einen direkten Aufschluss über die vorherige Deacetylierungsreaktion. Insbesondere die Sondenstruktur (der Fluorophor ist dem Lysinrest direkt C-terminal benachbart) sowie der zusätzliche Trypsin-vermittelte Spaltungsschritt gelten jedoch als Einschränkungen was die Anwendbarkeit des Assays beispielsweise für das Screening von HDAC-Inhibitoren betrifft.



**Schema 1.3: Trypsin-gekoppelter HDAC-Assay unter Verwendung einer Peptid-basierten Fluoreszenzsonde.**

Das Substrat enthält C-terminal gebunden den Fluorophor 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC), welcher erst nach erfolgreicher Deacetylierung proteolytisch abgespalten werden kann.

Einen neuen Ansatz für das Verfolgen von endogener HDAC-Aktivität von mehreren Acetylierungsstellen (*multi-site*) bietet die Methode von Jost *et al.* (2015). Der Auslesemechanismus basiert hierbei auf der MALDI-TOF-Massenspektrometrie, die benötigten Mengen an Analysesubstanzen sind somit wesentlich geringer als bei vergleichbaren Detektionstechniken. Die Quantifizierung der Reaktion kann mittels der Verwendung von isotope markierten Referenzproben erzielt werden.

**1.4.2 Proteom-weite Analyse von Deacetylase-Aktivität**

Ebenso haben sich proteomische Ansätze in Kombination mit der Massenspektrometrie als mittlerweile fast unentbehrliche Methoden im gesamten Forschungsfeld der Epigenetik und auch der Lysin-Acetylierung im speziellen durchgesetzt [Zhang *et al.* 2013].

Eine vielfach genutzte Strategie in der chemischen Proteomik für die Isolierung von Zielproteinen aus komplexen Gemischen stellt dabei die Affinitätschromatographie dar. Hierbei wird eine modifizierte Köderverbindung auf einer festen Phase immobilisiert. Nach Inkubation des Köders mit einer gewählten Proteinlösung können interagierende Proteine mittels Festphasenextraktion in einem einzigen Schritt im sogenannten Pulldown-Experiment gereinigt bzw. isoliert werden. Um die Interaktion zum Protein zu vermitteln werden als Köderverbindungen oftmals Proteine, Proteindomänen bzw. spezifische Peptidsequenzen eingesetzt; diese ermöglichen zudem, durch Veränderungen der Proteinsequenz oder den Einsatz von PTMs wie z. B. Acetylierungen, veränderte Affinitäten zu entsprechenden Vergleichsverbindungen hervorzurufen. Die nachfolgende Analyse beinhaltet den enzymatischen Verdau der isolierten Proteine sowie die Auftrennung des entstandenen Peptidgemischs mittels nano-HPLC und anschließender Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Die Identifizierung erfolgt über einen Datenbankabgleich der Peptidsequenzen, inklusive der Gegenwart und Lokalisation von PTMs.

Fortschritte in der Massenspektrometrie konnten für große technologische Durchbrüche auf dem Gebiet der Proteinidentifizierung und relativen Proteomquantifizierung sorgen [Eberl *et al.* 2011; Merrill und Coon 2013]. Für die Erforschung des Acetyloms haben sich MS-basierte proteomische Ansätze z. B. für die Bestimmung der Substratspezifität und der Quantifizierung der HDAC-Aktivität [Chen *et al.* 2012] sowie für die globale Analyse von Lysin-Acetylierungen [Choudhary *et al.* 2009] als äußerst wertvoll erwiesen. Fast unverzichtbar für Acetylomstudien im großen Maßstab sind proteomische „shotgun“- oder „bottom-up“-Ansätze. Hierbei werden alle Proteine aus Gesamtzellextrakten (das Proteom) mit Proteasen, im meisten Fall Trypsin, verdaut. Entscheidend für eine Verringerung der Probenkomplexität ist die nachfolgende Anreicherung der acetylierten Peptide mittels Immunoaffinitätsreinigung mit immobilisierten Acetyllysin-spezifischen Antikörpern. Anschließend erfolgt die Analyse der acetylierten Peptide per nano-LC-MS/MS. Aus den Massenspektren können die Peptidsequenzen einschließlich der Existenz und Lokalisierung von PTMs sowie eine Quantifizierung der Peptide und Proteine abgeleitet werden [Choudhary *et al.* 2014].

Ein semiquantitativer Ansatz für die Analyse von komplexen Proteingemischen nutzt dabei die Verwendung von stabiler Isotopenmarkierung. Die metabolische Markierung mittels SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*), welche auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde, stellt dabei eine der gebräuchlichsten Methoden in der quantitativen Proteomik dar. Das Prinzip beruht auf der parallelen Kultivierung von Zellen in unterschiedlichen isotopenmarkierten Nährmedien [Ong *et al.* 2002; Ong und Mann 2006]. Der metabolische Einbau der Markierungen in Proteine erfolgt durch die Zugabe von definierten isotopenmarkierten Aminosäuren zum Kulturmedium. Während der Proteinbiosynthese erfolgt der Einbau der Isotope, wobei die quantitative Einfügung in das Proteom nach ca. sechs Zellzyklen erreicht ist. Etabliert hat sich die

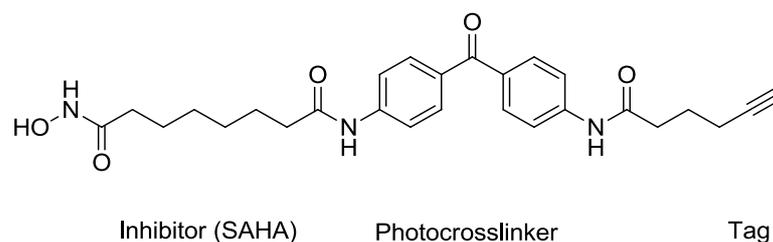
Zugabe der Aminosäuren Lysin und/oder Arginin mit den schweren Isotopen  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ . Für die anschließende LC-MS/MS-Messung werden mit diesen beiden Aminosäuren nach standardmäßiger C-terminaler Spaltung der Proteine mit der Endopeptidase Trypsin, idealerweise Peptide mit mindestens einer markierten Aminosäure erzeugt. Die gewählte Isotopenmarkierung resultiert in der massenspektrometrischen Analyse in einer charakteristischen Massendifferenz der Peptide (z. B. +10 Da bei Verwendung von  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ -Arginin). Die Auswertung und Quantifizierung, z. B. mithilfe der Auswertungssoftware MaxQuant [Cox und Mann 2008], erfolgt dabei durch den relativen Vergleich der MS-Signale zwischen den leichten, unmarkierten und den schweren, isotopenmarkierten Peptiden. Der Vorteil von SILAC ergibt sich u. a. in der experimentellen Durchführung aus der frühen Vermischung der zu vergleichenden Proben, die Variationen bleiben somit minimal, womit eine hohe Präzision in der Quantifizierung ermöglicht wird.

Neben SILAC haben sich auch Verfahren etabliert, die auf den chemischen Einbau von Markierungen, beispielsweise über die Thiolgruppe von Cysteinen, wie der ICAT-Methode (*isotope-coded affinity tag*) basieren [Gygi *et al.* 1999]; hierbei erfolgt die Quantifizierung über den Vergleich der Intensitäten der MS-Signale. Das chemische Markierungsverfahren ITRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) [Ross *et al.* 2004] hingegen beruht auf der kovalenten Markierung des N-Terminus bzw. der Aminosäuren-Seitenketten. Die Quantifizierung findet hierbei im MS/MS-Spektrum statt, wo jede Markierung spezifische Fragmentationen generiert. Die chemische Markierung bietet sich für Proben an, die für metabolische Markierung nicht zugänglich sind. Aufgrund der Verfügbarkeit vielfältiger isobarer Markierungen kann außerdem eine Quantifizierung von bis zu 8 Proben parallel erfolgen.

Für die Erforschung von posttranslationalen Modifikationen gelten zudem biochemische Methoden der Proteomik als leistungsfähige Hilfsmittel. Für die Analyse von Histon-Acetylierungslevel sind insbesondere Antikörper-basierte Detektionsverfahren wie Western Blot, ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) oder ChIP (Chromatin-Immunpräzipitation) als leistungsstarke Instrumente zu nennen. Beispielsweise kann im Immunoblotting die HDAC-Aktivität mit einem Antikörper, welches ein spezielles deacetyliertes Lysin eines Proteinsubstrates erkennt, direkt gemessen werden; die Deacetylase-Aktivität wird anschließend über das Signal einer Zweitantikörper-Anwendung quantifiziert. Grundsätzlich bieten all diese Methoden eine hohe Sensitivität und Spezifität, bedürfen jedoch einer Generierung von Antikörpern gegen spezielle Lysinmotive. Dabei muss zudem sichergestellt werden, dass eine Kreuzreaktivität mit anderen Lysinresten oder den acetylierten Zielverbindungen auszuschließen ist [Sodji *et al.* 2015]. Die Haupteinschränkung für die Verwendung von derartigen Nachweisverfahren ist deshalb in der starken Abhängigkeit der spezifischen Antikörper bzw. in deren Qualität begründet [Egelhofer *et al.* 2011].

### 1.4.3 Aktivitätsbasiertes HDAC-Profilung

Eine weitere interessante Herangehensweise für das Detektieren von HDACs und deren Substrate mittels chemischer Hilfsmittel stellt die Technik des aktivitätsbasierten Protein-Profilung (ABPP, *activity-based protein profiling*) dar. Mithilfe von aktivitätsbasierten Sondenmolekülen die kovalent an das aktive Zentrum binden, können zielgerichtet Enzyme chemisch markiert und somit identifiziert werden [Cravatt *et al.* 2008]. Die Sonden bestehen meist aus einem kovalent bindenden Enzyminhibitor, auch „Warhead“ genannt, welcher über einen Linker mit einem Reportertag, der eine schnelle und einfache Isolierung und Identifizierung der sondierten Proteine ermöglichen soll, verbunden ist. Beispiele dieser Tags, welche das markierte Protein für weitere proteomische Analysen wie z. B. LC-MS/MS befähigen, umfassen Biotin, Fluorophore sowie Azide oder Alkine für anschließende Modifizierungen mithilfe der Cu(I)-katalysierten 1,3-Cycloaddition („Click-Chemie“). Die Strategie der Aktivitätssonden wurde bereits für die Untersuchung vieler verschiedener Enzymklassen darunter Serin- und Cysteinproteasen, Kinasen und Acetyltransferasen angewandt. Basierend auf diesem Prinzip konnten auch erfolgreich aktivitätsbasierte Sonden für Zink-abhängige HDACs entwickelt werden [Salisbury und Cravatt 2007; Salisbury und Cravatt 2008] (Abb. 1.5). Im Ergebnis wurden HDACs der Klassen I und II (HDAC1, 2, 6) als spezifische Ziele dieser Sonden im Proteom identifiziert. Außerdem konnten zusätzlich mittels Crosslinking mehrere HDAC-assoziierte Proteine, u. a. Bestandteile endogener HDAC-Komplexe, angereichert werden, wobei die räumliche Nähe dieser Proteine zu den gefangenen HDACs einen damit verbundenen Einfluss auf Substraterkennung und Aktivität vermuten lässt [Salisbury und Cravatt 2007].



**Abbildung 1.5: Aktivitätsbasierte Sonde SAHA-BPyn für proteomisches Profiling von HDAC-Komplexen.** Diese beinhaltet den Inhibitor SAHA als reaktive Gruppe konjugiert mit einem Alkin-Tag und einem Benzophenon für das Vernetzen mit den gebundenen HDACs unter UV-Bestrahlung [Salisbury und Cravatt 2007].

## 1.5 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten unterschiedliche chemische Methoden für die Aufklärung der Aktivität und Selektivität von Histon-Deacetylasen entwickelt werden.

Für die Anwendung in HDAC-Assays basierend auf hochauflösender NMR-Spektroskopie sollte ein Konzept für das Design und die Synthese von isotopenmarkierten Reporterpeptiden erstellt werden. Zielsetzung des Verfahrens sollte dabei ein gezielter Einbau von stabilen  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Lysinresten in den Histon-H4-*tail* sein.

Ebenso sollte ein Syntheseweg von Peptidsubstraten für den Einsatz in kolorimetrischen HDAC-Assays entwickelt werden.

Für Untersuchungen von Deacetylase-Aktivität sollten Hydroxamat-basierte Peptidsonden synthetisiert werden. Diese sollten anschließend in Affinitäts-Pulldown-Experimenten für die Isolierung von HDACs aus zellulären Extrakten zum Einsatz kommen; die Identifizierung sollte mittels Western Blot Analyse und quantitativer Massenspektrometrie erfolgen. Dabei sollte besonders der Einfluss von Linkerlänge und Sequenzkontext der Sonden auf die Substraterkennung bzw. Substratselektivität der HDACs untersucht werden.

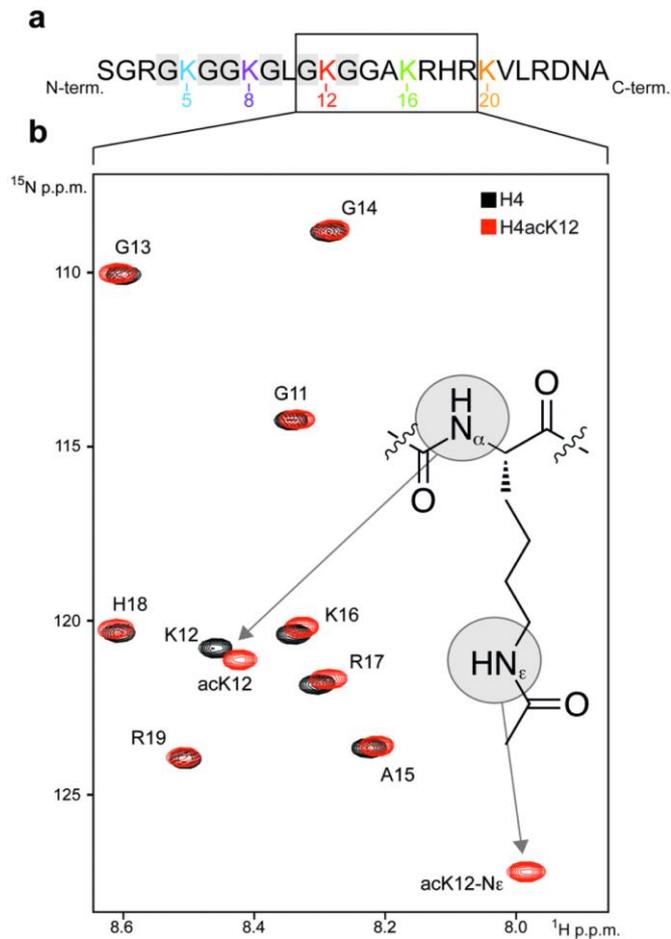
---

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Isotopenmarkierte Histon-H4-Reporterpeptide für NMR-basierte Deacetylierungsassays

#### 2.1.1 Strategie

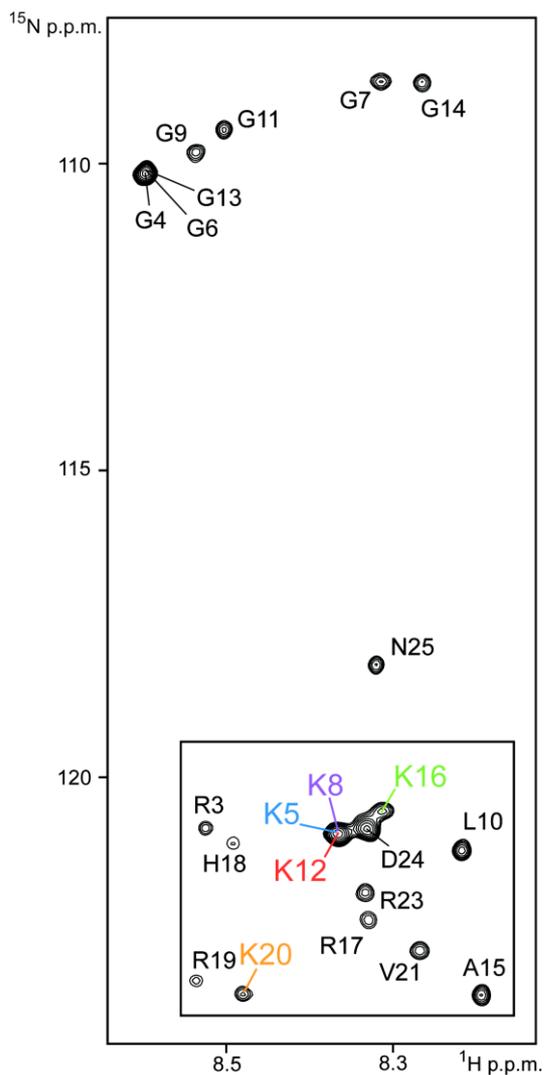
Die Methode basiert auf zwei charakteristischen Effekten die acetylierte Lysinreste im  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  2D-heteronuklear korrelierten NMR-Experimenten aufweisen [Liokatis *et al.* 2010; Smet-Nocca *et al.* 2010]. Um diese Besonderheiten zu demonstrieren, wurden in Vorversuchen 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren von zwei Peptiden aufgenommen, die sich vom *N*-terminalen *tail* des Histons H4 ableiten (Aminosäurenreste 11-19) (Abbildung 2.1.a). Die Peptide unterscheiden sich lediglich in der Acetylierung der Seitenkette am Lysin12. Abbildung 2.1.b zeigt eine Überlagerung der Spektren der beiden Peptide mit ihrer natürlichen Isotopenhäufigkeit. Dabei ist zu beobachten, dass am acetylierten Peptid (acK12) das  $^1\text{H}/^{15}\text{N}\alpha$ -Amidsignal am Peptidrückgrat eine signifikante Veränderung der chemischen Verschiebung gegenüber dem unmodifizierten Peptid aufweist. Darüber hinaus erzeugt die Acetylierung ein zusätzliches  $^1\text{H}/^{15}\text{N}\epsilon$ -Signal, welches dem neu entstandenen Amid an der Lysinseitenkette entspricht. Die Resonanz zwischen Proton ( $^1\text{H}$ ) und Stickstoff ( $^{15}\text{N}$ ) kann im nicht modifizierten Zustand, d. h. im Amin, aufgrund des schnellen Austauschs zwischen Aminprotonen und Lösungsmittel in der Regel nicht detektiert werden. Dieses zusätzliche  $^1\text{H}/^{15}\text{N}\epsilon$ -Signal lässt deshalb einen konkreten Rückschluss auf die Existenz einer acetylierten Lysinseitenkette zu [Liokatis *et al.* 2010; Smet-Nocca *et al.* 2010]. Allerdings stellte sich heraus, dass bei mehrfach acetylierten Peptiden die Resonanzen der  $\epsilon$ -Amide von acetylierten Lysinresten aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Verschiebungen auf ein Signal ( $\sim 7.9 / 127$  ppm,  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ ) zusammenfallen. Eine eindeutige Zuordnung allein aufgrund des  $\epsilon$ -Amidsignals ist in einem Molekül mit mehreren Acetylierungsstellen deshalb nicht möglich. Das  $^1\text{H}/^{15}\text{N}\alpha$ -Signal der Peptidbindung ist daher für solch eine Entschlüsselung besser geeignet. Im Gegensatz zur Seitenkette ist das  $\alpha$ -Amid einer sequenzspezifischen Umgebung ausgesetzt, die sich aus der räumlichen Nähe zu den flankierenden Aminosäuren ergibt. Aus dieser



**Abbildung 2.1: Einfluss der Lysin-Acetylierung im NMR.** (a) N-terminale Sequenz des Histons H4 (AS 1-25), die Acetylierungsstellen sind farblich markiert. (b) Überlagerung von 2D -  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von zwei Histon H4-Peptiden (AS 11-19) natürlicher Isotopenhäufigkeit mit unmodifiziertem (K12, schwarz) bzw. modifiziertem (acK12, rot) Lysinrest. Abb. aus [Dose, Liokatis *et al.* 2011]

Tatsache heraus ergeben sich unterschiedliche chemische Verschiebungen der  $\alpha$ -Amide, was wiederum eine exaktere Zuordnung der Acetylierungsstellen ermöglicht. Im Falle der N-terminalen Sequenz des Histons H4 (AS 1-25) ist eine derartige Zuordnung der Acetylierungsstellen jedoch nur eingeschränkt möglich. Abbildung 2.2 zeigt das 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrum eines einheitlich  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Histon H4-tails [Dose, Liokatis *et al.* 2011]. Man erkennt, dass die  $^1\text{H}/^{15}\text{N}\alpha$ -Resonanzen von K5, K8 und K12 auf ein Signal zusammenfallen. Dies lässt sich mit der Ähnlichkeit in der Sequenz der umgebenden Aminosäuren erklären: in benachbarten Positionen, +1 und -1, befinden sich jeweils Glycinreste (Abbildung 2.1.a).

Die Gegebenheit, dass sich der Acetylierungszustand an Lysinresten mithilfe hochauflösender NMR-Spektroskopie ablesen lässt, ermöglicht die Etablierung einer Verfahrensweise, in der mit sogenannten Reporterpeptiden die komplexe Acetylierungs- und Deacetylierungsdynamik der entsprechenden Histon-modifizierenden Enzyme in Echtzeit verfolgt werden kann. Die Verwendung von gezielt isotopenmarkierten Peptiden erweist sich dabei als zusätzlicher Vorteil für NMR-spektroskopische Untersuchungen. Der Einbau von  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierungen erlaubt eine Reduzierung der



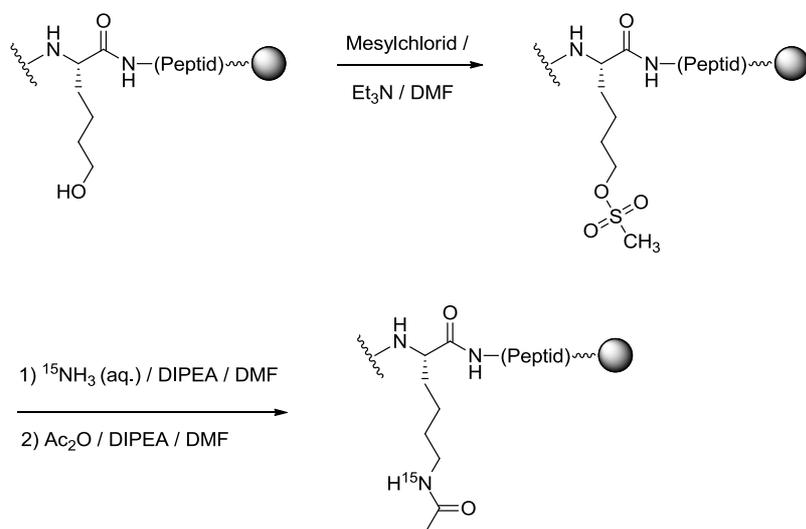
**Abbildung 2.2:** 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrum eines einheitlich  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Histon H4-tails (AS 1-25). Die  $^1\text{H}/^{15}\text{N}\alpha$ -Resonanzen von K5, K8 und K12 überlagern zu einem Signal. Abb. aus [Dose, Liokatis *et al.* 2011]

Aufnahmezeit gegenüber einem Peptid mit natürlicher Isotopenhäufigkeit, was ein maßgeblicher Vorteil für die Verfolgung des Reaktionsverlaufs und der Bestimmung von kinetischen Parametern mittels NMR-Spektroskopie darstellt. Dies erfordert die Entwicklung einer chemischen Synthesestrategie für den Einbau von stabilen, NMR-aktiven Isotopen an ausgewählten Lysinpositionen innerhalb des Histon-H4-tails.

Diese Arbeiten entstanden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Philipp Selenko (*In-Cell* NMR, Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie FMP, Berlin), wobei die Aufnahmen der NMR-spektroskopischen Deacetylierungsassays und sonstigen 2D-Korrelationsspektren von Dr. Stamatios Liokatis durchgeführt wurden.

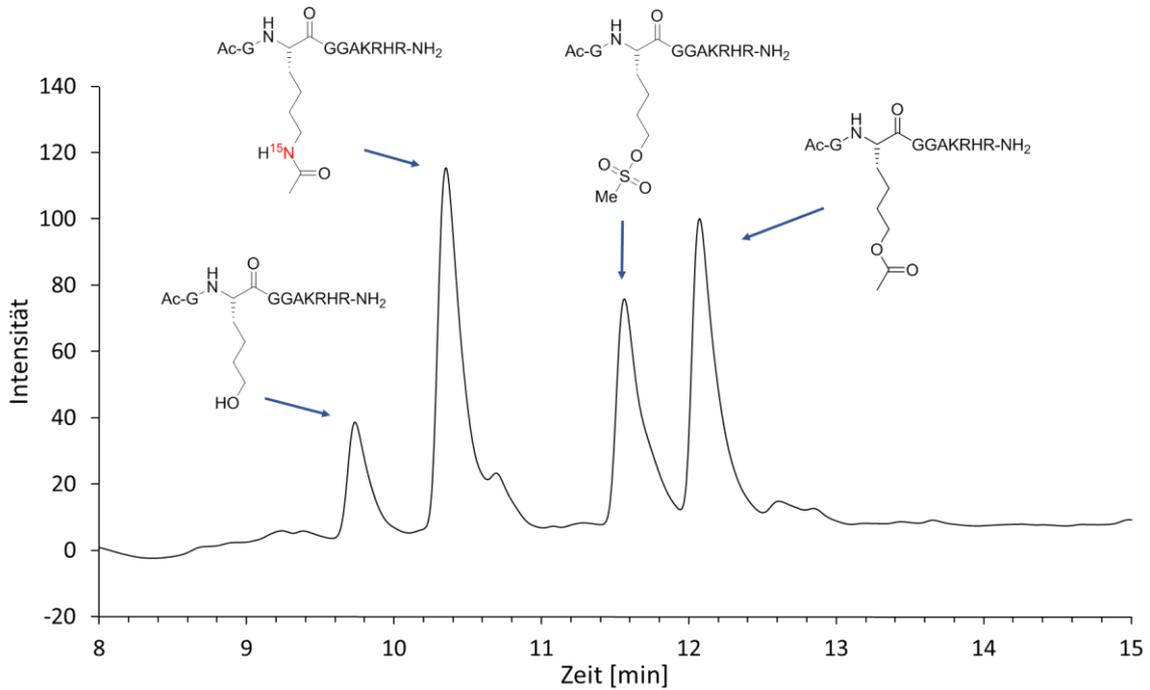
### 2.1.2 Einbau von $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierungen in N $\epsilon$ -Lysin

Einleitend sollte die Fragestellung der realisierbaren Nutzung des oben beschriebenen charakteristischen NMR-Effekts (zusätzliches  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Signal an acetylierten Lysinseitenketten) erörtert werden. Dazu sollte ein Syntheschema für den gezielten Einbau einer  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung in N $\epsilon$ -Lysinreste entwickelt werden; der Histon-*tail* H4 (AS 11-19) mit der Acetylierungsstelle K12 sollte dabei als Modellpeptid dienen. Die Einführung der  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung wurde während der Festphasensynthese in Anlehnung einer analogen Strategie [Culhane *et al.* 2006] durchgeführt (Schema 2.1). Das vollständig Seitenketten-geschützte H4-Peptid enthielt dabei das Oxa-Analogon 6-Hydroxy-Norleucin an der Position K12. Nach Mesylierung der Hydroxygruppe wurde das Mesylat mithilfe einer  $^{15}\text{N}$ -markierten wässrigen Ammoniaklösung substituiert. Das entstandene Amin wurde anschließend mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Das Peptid wurde abgespalten, entschützt und mittels semipräparativer HPLC gereinigt.



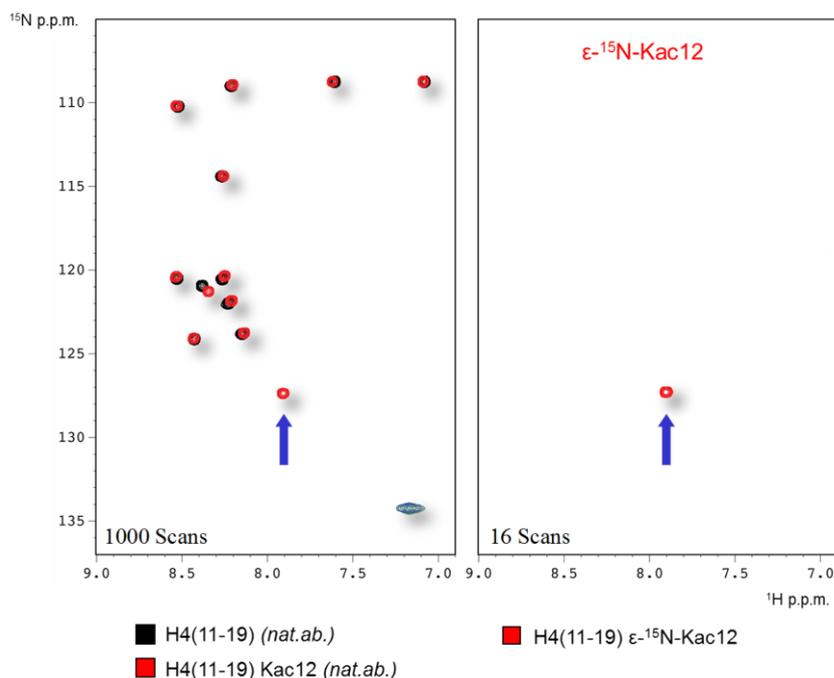
**Schema 2.1: Einbau der  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung in N $\epsilon$ -Lysin.** Die Synthese des H4-Peptids ( $^{15}\text{N}\epsilon$ -Kac12) konnte durch einen Mesylaustausch mit  $^{15}\text{NH}_4\text{OH}$  realisiert werden.

Das Chromatogramm (Abb. 2.3) zeigt vier Signale, die mittels Massenspektrometrie dem Produkt, dem Mesylat-Edukt, sowie dem Peptid mit freier bzw. acetylierter 6-Hydroxy-Norleucingruppe zugeordnet werden konnte. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Substitution mit der Hydrolyse der Mesylgruppe konkurriert. Das Chromatogramm zeigt aber auch, dass das gewünschte isotopenmarkierte Peptid H4(11-19)- $^{15}\text{N}\epsilon$ -Kac12 erfolgreich von sämtlichen Nebenprodukten und Zwischenstufen getrennt werden konnte.



**Abbildung 2.3: Abspaltung von H4(11-19)-<sup>15</sup>Nε-Kac12 nach Mesylaustausch:** Ausschnitt aus Chromatogramm (semipräparative HPLC) mit Zuordnung der Peaks zu Neben- und Zwischenprodukten der Reaktion.

Die NMR-Charakterisierung des Peptids konnte ausschließlich das <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>Nε-Signal des acetylierten Amids zutage fördern (Abb. 2.4). Der Vorteil der gezielten Isotopenmarkierung gegenüber Peptiden mit natürlicher Isotopenhäufigkeit zeigte sich somit insbesondere in der stark verringerten Aufnahmezeit. Dies ist bedingt durch die deutlich geringere Anzahl an Scans die für die Aufnahme des Spektrums im Vergleich zum nicht-markierten Peptid benötigt werden.

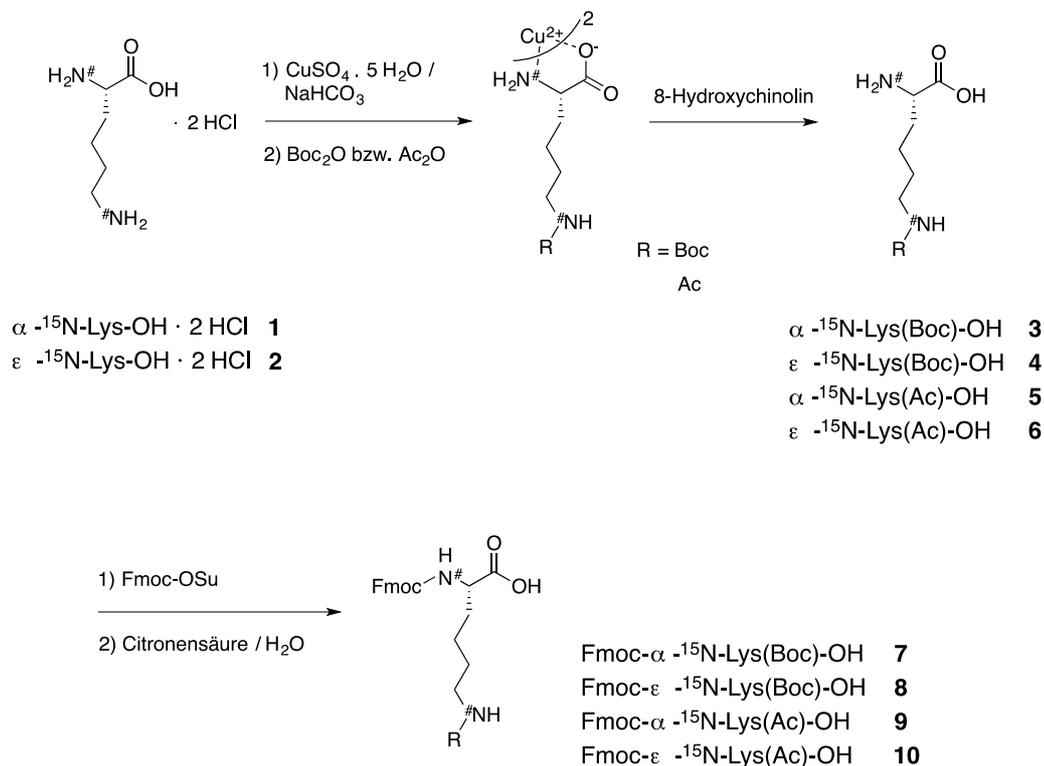


**Abbildung 2.4: Charakterisierung von H4(11-19)- $^{15}\text{N}\epsilon$ -Kac12:** Das 2D -  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum liefert nur das charakteristische  $^1\text{H}/^{15}\text{N}\epsilon$ -Signal des acetylierten Amids (rechts), zum Vergleich ist die Überlagerung der H4(11-19)-Peptide mit natürlicher Isotopenhäufigkeit zu sehen (links).

### 2.1.3 Synthese von $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Lysin-Bausteinen

Die Isotopenmarkierung per Mesylaustausch mit Ammoniak konnte erfolgreich eine Einführung von  $^{15}\text{N}$  an das  $\epsilon$ -Amid von acetylierten Lysinresten direkt auf dem Harz bewerkstelligen. Eine verbesserte Strategie sollte darüber hinaus den NMR-spektroskopischen Effekt der  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung des  $\alpha$ -Amids (siehe Abb. 2.1) berücksichtigen. Hierfür schien die Verwendung von bereits markierten Lysin-Bausteinen für die Festphasen-Peptidsynthese am geeignetsten. Aufbauend auf einem bekannten Protokoll [Leman *et al.* 2007] wurde eine Methode entwickelt (Schema 2.2), um orthogonal geschützte  $^{15}\text{N}\alpha$ - und  $^{15}\text{N}\epsilon$ -isotopenmarkierte Lysin-Bausteine für die anschließende Verwendung in der Fmoc-basierten SPPS zu synthetisieren. Dabei sollte die  $\epsilon$ -Aminogruppe entweder in acetylierter Form für die Untersuchung von Deacetylase-Aktivität (HDACs) bzw. in unmodifizierter Form für die Verfolgung der Acetylase-Aktivität (HATs) vorliegen. Ausgehend von kommerziell erhältlichen  $^{15}\text{N}\alpha$ - bzw.  $^{15}\text{N}\epsilon$ -isotopenmarkierten Lysin (**1,2**) wurde die  $\alpha$ -Amino- und Carboxylgruppe mit  $\text{Cu}^{2+}$  komplexiert. Die Maskierung ermöglicht einen exklusiven Zugang zur  $\epsilon$ -Aminogruppe, welche daraufhin mit

Essigsäureanhydrid acetyliert bzw. mit Boc-Anhydrid (Boc<sub>2</sub>O) mit der Boc-Gruppe geschützt wurde. Der Kupferkomplex wurde daraufhin mit 8-Hydroxychinolin gelöst und die Fmoc-Schutzgruppe wurde mithilfe von Fmoc-OSu an das α-Amin installiert. Die fertigen isotopenmarkierten Lysin-Bausteine (**7-10**) wurden mit Gesamtausbeuten von jeweils ca. 50 % gewonnen und mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR, ESI-MS und HPLC auf Identität und Reinheit hin überprüft.



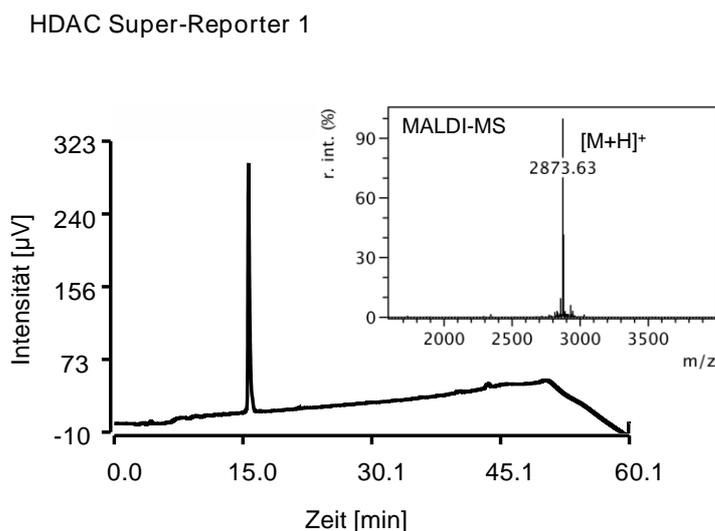
**Schema 2.2: Einführung der Schutzgruppen in <sup>15</sup>N-isotopenmarkierte Lysinderivate.** Die Synthese der Bausteine (**7-10**) umfasste die Acetylierung bzw. Boc-Schutzung der Seitenkette und die anschließende Fmoc-Installation am α-Amin. (#: <sup>15</sup>N-Markierung)

#### 2.1.4 Synthese von <sup>15</sup>N-isotopenmarkierten Reporterpeptiden

Die isotopenmarkierten Lysin-Bausteine wurden verwendet um mithilfe der Festphasen-Peptidsynthese Reporterpeptide zu synthetisieren. Die Peptide sind von der N-terminalen Sequenz des Histons H4 (AS 1-25) abgeleitet, wobei die N-terminale Acetylgruppe und das Alaninamid am C-Terminus eine Erhöhung der Stabilität in zellulären Extrakten gewährleisten sollten. Tabelle 2.1 zeigt die verschiedenen Sätze der Peptide mit Hervorhebung der isotopenmarkierten und acetylierten Lysinreste. Die Peptide der Sätze 1 und 2 stellen die sogenannten *single-site* HDAC-Reporter dar. Sie

enthalten jeweils an den Positionen 5, 8, 12, 16 und 20 einen einzelnen acetylierten Lysinrest mit der  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung am  $\alpha$ - (Satz 1) bzw. am  $\epsilon$ -Amid (Satz 2). Die Peptide des dritten Satzes sind  $^{15}\text{N}\alpha$ -isotopenmarkiert und nicht acetyliert; sie fungieren als *single-site* HAT-Reporter. Die *multi-site* Reporterpeptide (HDAC- bzw. HAT-Super-Reporter) erlauben das gleichzeitige Auslesen des Acetylierungszustands von vier der insgesamt fünf Acetylierungsstellen innerhalb eines Histon-H4-*tails*. Die Markierungsstrategie orientierte sich hierbei an der Fähigkeit die Lysin-Amidresonanzen im NMR eindeutig zu unterscheiden (Abbildung 2.2). Aufgrund der schlechten Auflösung der  $\alpha$ -Amidsignale von K5, K8 und K12 im acetylierten und nicht acetylierten Zustand, konnten nur eine der drei Stellen für die  $^{15}\text{N}\alpha$ -Isotopenmarkierung in Betracht gezogen werden (hier: K12). Demgegenüber lagen die Resonanzen der Rückgrat-Amide von K16 und K20 hinreichend voneinander getrennt. Als zusätzliches Signal für eine weitere Detektionsstelle diente daher der Einbau eines Lysinrestes mit  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung am  $\epsilon$ -Amid.

Die Peptide wurden mittels semipräparativer HPLC gereinigt, über MALDI-Massenspektrometrie und analytischer HPLC auf Reinheit überprüft und konnten anschließend in NMR-spektroskopischen *in vitro*-HDAC-Assays eingesetzt werden (siehe Diskussion: 3.1.1). In Abbildung 2.5 ist exemplarisch für die Charakterisierung der synthetisierten und gereinigten Peptide das MALDI-Massenspektrum und HPLC-Chromatogramm des HDAC-Super-Reporters 1 dargestellt.



**Abbildung 2.5: HDAC-Super-Reporter 1.** HPLC-Chromatogramm und MALDI-MS-Spektrum

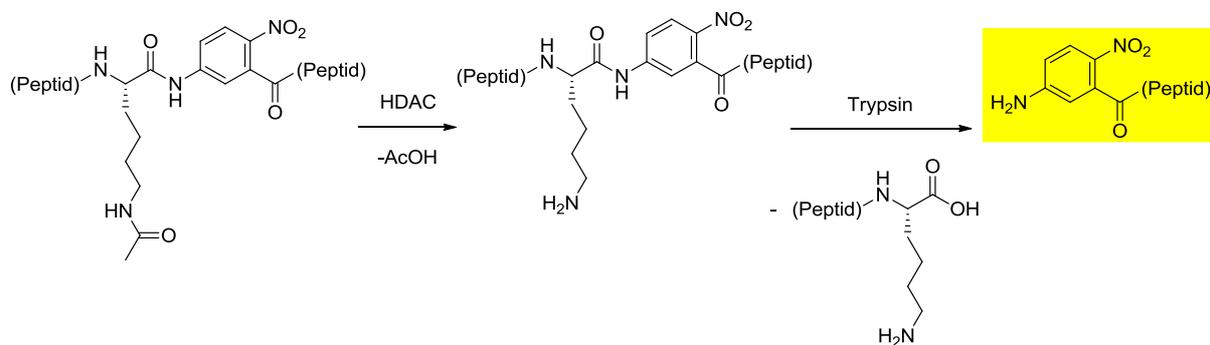
**Tabelle 2.1: Sätze der Histon H4-tail-Reporterpeptide.** Satz 1: *single-site* HDAC-Reporter mit <sup>15</sup>N $\alpha$ -Markierung, Satz 2: *single-site* HDAC-Reporter mit <sup>15</sup>N $\epsilon$ -Markierung, Satz 3: *single-site* HAT-Reporter mit <sup>15</sup>N $\alpha$ -Markierung, *multi-site* HDAC- bzw. HAT-Super-Reporter mit <sup>15</sup>N-Markierung an vier der fünf Acetylierungsstellen.

	Bezeichnung	Peptidsequenz	<sup>15</sup> N-Label	Acetylierung
Satz 1	H4- $\alpha^{15}$ N-Kac5	Ac-SGRG- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-GGKGLGKGGAKRHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -5	5
	H4- $\alpha^{15}$ N-Kac8	Ac-SGRGKGG- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-GLGKGGAKRHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -8	8
	H4- $\alpha^{15}$ N-Kac12	Ac-SGRGKGGKGLG- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-GGAKRHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -12	12
	H4- $\alpha^{15}$ N-Kac16	Ac-SGRGKGGKGLGKGG- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-RHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -16	16
	H4- $\alpha^{15}$ N-Kac20	Ac-SGRGKGGKGLGKGGAKRHR- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-VLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -20	20
Satz 2	H4- $\epsilon^{15}$ N-Kac5	Ac-SGRG- $\epsilon^{15}$ N-K(Ac)-GGKGLGKGGAKRHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\epsilon$ -5	5
	H4- $\epsilon^{15}$ N-Kac8	Ac-SGRGKGG- $\epsilon^{15}$ N-K(Ac)-GLGKGGAKRHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\epsilon$ -8	8
	H4- $\epsilon^{15}$ N-Kac12	Ac-SGRGKGGKGLG- $\epsilon^{15}$ N-K(Ac)-GGAKRHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\epsilon$ -12	12
	H4- $\epsilon^{15}$ N-Kac16	Ac-SGRGKGGKGLGKGG- $\epsilon^{15}$ N-K(Ac)-RHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\epsilon$ -16	16
	H4- $\epsilon^{15}$ N-Kac20	Ac-SGRGKGGKGLGKGGAKRHR- $\epsilon^{15}$ N-K(Ac)-VLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\epsilon$ -20	20
Satz 3	H4- $\alpha^{15}$ N-K5	Ac-SGRG- $\alpha^{15}$ N-K-GGKGLGKGGAKRHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -5	-
	H4- $\alpha^{15}$ N-K8	Ac-SGRGKGG- $\alpha^{15}$ N-K-GLGKGGAKRHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -8	-
	H4- $\alpha^{15}$ N-K12	Ac-SGRGKGGKGLG- $\alpha^{15}$ N-K-GGAKRHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -12	-
	H4- $\alpha^{15}$ N-K16	Ac-SGRGKGGKGLGKGG- $\alpha^{15}$ N-K-RHRKVLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -16	-
	H4- $\alpha^{15}$ N-K20	Ac-SGRGKGGKGLGKGGAKRHR- $\alpha^{15}$ N-K-VLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -20	-
	HDAC Super-Reporter 1	Ac-SGRG- $\epsilon^{15}$ N-K(Ac)-GGKGLG- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-GGA- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-RHR- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-VLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\epsilon$ -5, $\alpha$ -12/16/20	5/12/16/20
	HDAC Super-Reporter 2	Ac-SGRGKGG- $\epsilon^{15}$ N-K(Ac)-GLG- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-GGA- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-RHR- $\alpha^{15}$ N-K(Ac)-VLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\epsilon$ -8, $\alpha$ -12/16/20	8/12/16/20
	HAT Super-Reporter	Ac-SGRG- $\epsilon^{15}$ N-K-GGKGLG- $\alpha^{15}$ N-K-GGA- $\alpha^{15}$ N-K-RHR- $\alpha^{15}$ N-K-VLRDNA-NH <sub>2</sub>	$\epsilon$ -5, $\alpha$ -12/16/20	-

## 2.2 Entwicklung von kolorimetrischen HDAC-Substraten

### 2.2.1 Strategie

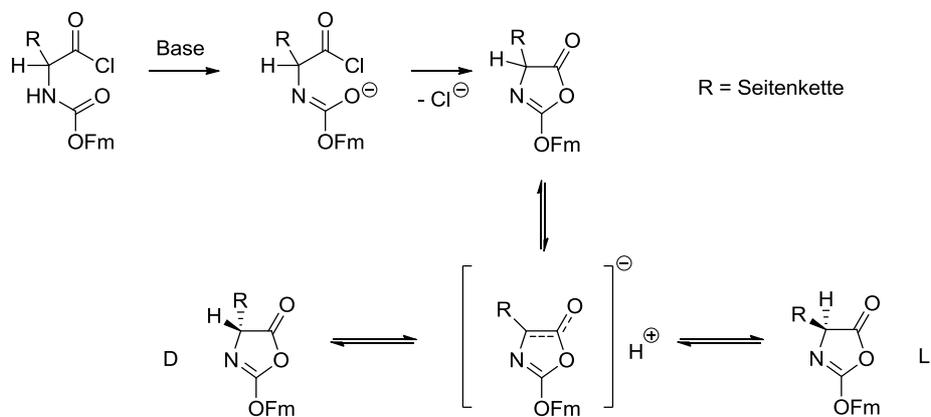
Ziel dieses Projekts war die Synthese von Substraten für die Verwendung in kolorimetrischen HDAC-Assays. Die meisten existierenden Assays beruhen auf dem Prinzip, dass die HDAC-Aktivität mit der Protease Trypsin verknüpft ist, das Auslesen geschieht somit indirekt unter der Benutzung des Fluorophors 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC, siehe Kapitel 1.4: Schema 1.3) [Wegener *et al.* 2003]. Der Nachteil dieses Konzepts liegt einerseits in der umständlichen Synthese der Peptide, der Lys(Ac)-Fluorophor-Baustein muss in Lösung an das C-terminale Ende des geschützten Peptids geknüpft werden [Borra *et al.* 2005], andererseits gibt es Einschränkungen bezüglich der Position des Lys(Ac)-Bausteins innerhalb des Peptids. Da der Einbau des Bausteins ausschließlich an das C-terminale Ende erfolgt, können beim Design des Substrats die flankierenden Aminosäuren der Deacetylierungsstelle nicht vollständig berücksichtigt werden. Eine Alternative bietet daher die Verwendung des Chromophors 5-Amino-2-nitrobenzoesäure (5,2-ANB) (Schema 2.3).



**Schema 2.3: Trypsin-gekoppelter HDAC-Assay.** Der Chromophor 5-Amino-2-nitrobenzoesäure (5,2-ANB) liegt eingebettet im Peptidsubstrat.

Der Baustein ist für den Einsatz in Trypsin-gekoppelten Assays schon beschrieben [Spichalska *et al.* 2008, Wysocka *et al.* 2010] und kann ohne Schutzgruppe der 5-Aminofunktion in das Peptid eingebaut werden. Hierbei zeichnet sich jedoch der Nachteil des Derivats ab. Aufgrund der schwachen Nucleophilie der 5-Aminogruppe versagen konventionelle Methoden wie die Zuhilfenahme von Aktivierungsreagenzien (HBTU, HATU) bei der Kupplung der nachfolgenden Aminosäure. Die Verwendung stärker aktivierter Aminosäure-Bausteine wie Säurechloride erscheint daher notwendig. In Vorversuchen konnte eine Kupplung an 5,2-ANB mittels Acetylchlorid realisiert werden.

Aminosäurehalogenide finden jedoch selten eine Anwendung in der Festphasenpeptidsynthese, da ihre „Überaktivierung“ die Ursache verschiedener Nebenreaktionen ist [Carpino *et al.* 1996]. Eine dominante Nebenreaktion ist die Oxazolombildung von Fmoc- und anderen urethangeschützten Aminosäurechloriden in Gegenwart einer Base [Carpino *et al.* 1991]. Oxazolone sind weniger reaktiv als ihre entsprechenden Säurechloride. Aufgrund der Reversibilität der Reaktion kann die chirale Integrität der Aminosäure verloren gehen, das bedeutet, dass die Oxazolombildung nach dem unten gezeigten Mechanismus (Schema 2.4) zur Racemisierung des Bausteins führt [Carpino *et al.* 1991]. Die anschließende Öffnung des Oxazolons durch die Aminokomponente kann somit die Epimerisierung des Peptids zur Folge haben.

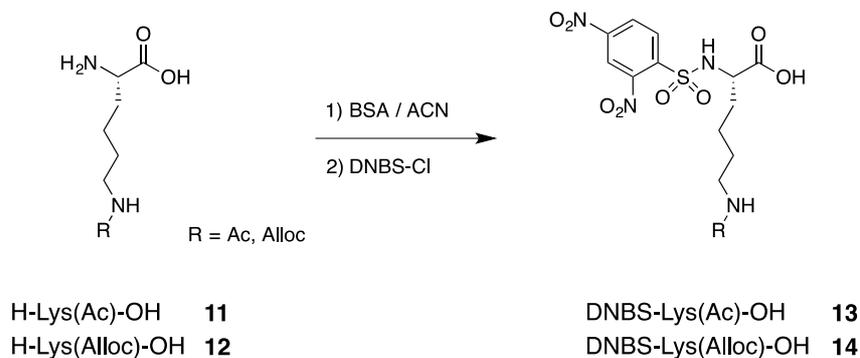


**Schema 2.4: Basenkatalysierter Mechanismus der Oxazolombildung.** Bei Fmoc-geschützten Aminosäurechloriden führt diese Nebenreaktion zum Verlust der chiralen Integrität.

Dieses Hindernis kann man umgehen, indem man anstatt Urethan-basierte Schutzgruppen *N*-Arensulfonylschutzgruppen verwendet, da diese aufgrund ihrer Struktur keine Oxazolone mit Aminosäurehalogeniden bilden können [Carpino *et al.* 1998]. Eine gute Alternative bietet daher die Verwendung der 2,4-Dinitrobenzylsulfonylgruppe (DNBS) als Schutzgruppe des Lys(Ac)-Bausteins [Fukuyama *et al.* 1997]. Die DNBS-Schutzgruppe lässt sich mithilfe von nukleophilen Thiolen leicht vom Stickstoff der  $\alpha$ -Aminofunktion abspalten.

## 2.2.2 Synthese von DNBS-geschützten Lysin-Bausteinen

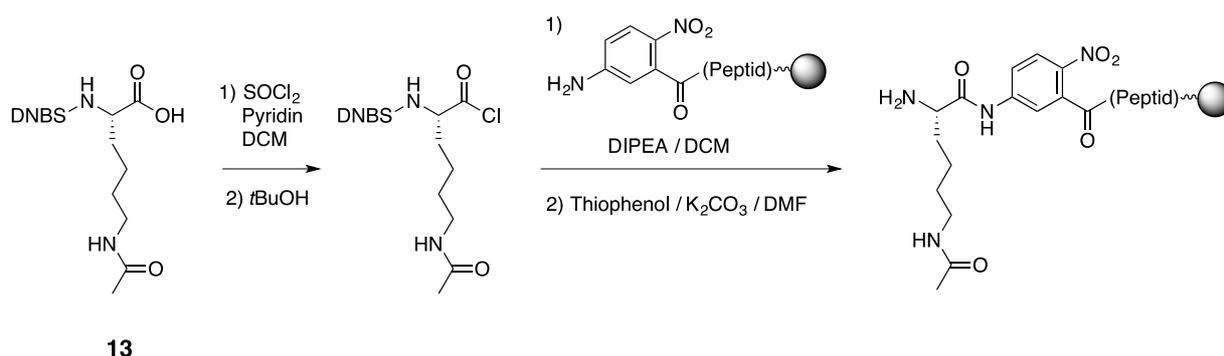
Für die Herstellung von kolorimetrischen HDAC-Substraten sollte ein Syntheseweg gefunden werden, den Lys(Ac)-Baustein racemisierungsfrei mit dem Chromophor 5,2-ANB im Peptid zu verknüpfen. Für eine potentielle Bestimmung von kinetischen Parametern der tryptischen Spaltung sollte zusätzlich ein nicht acetyliertes Peptid synthetisiert werden, hierfür sollte der Baustein Lys(Alloc) verwendet werden. Die zu dem Syntheseweg orthogonale Alloc-Schutzgruppe kann nach Abschluss der Peptidsynthese entfernt werden und so das Substrat mit freier  $\epsilon$ -Aminogruppe am Lysin liefern. Die üblich verwendete  $\epsilon$ -Aminoschutzgruppe Boc konnte nicht eingesetzt werden, da diese unter den stark sauren Bedingungen in der Aufarbeitung des Produkts nicht stabil ist. Die Durchführung der Synthese (Schema 2.5) orientierte sich dabei an einem Protokoll von Petra Henklein (2000). Ausgehend von den kommerziell erhältlichen Derivaten Lys(Ac)-OH (**11**) und Lys(Alloc)-OH (**12**) wurde die N- $\alpha$ -Funktion mithilfe von *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) vorübergehend silyliert. Dies diente einerseits der Erhöhung der Löslichkeit des zu sulfonierenden Lysinderivats in Acetonitril und erleichterte andererseits die anschließende Einführung der DNBS-Gruppe, welche mithilfe von DNBS-Chlorid an die N- $\alpha$ -Position installiert wurde. Die Aufarbeitung des Produkts erfolgte mittels Extraktion in salzsaurer Lösung. Die DNBS-geschützten Lysin-Bausteine wurden in Ausbeuten von 98 % (**13**) bzw. 63 % (**14**) gewonnen und mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR, ESI-MS und HPLC charakterisiert.



**Schema 2.5: N $\alpha$ -Schützung von Lysinderivaten mit DNBS-Chlorid.** Synthese der Bausteine DNBS-Lys(Ac) (**13**) und DNBS-Lys(Alloc)-OH (**14**).

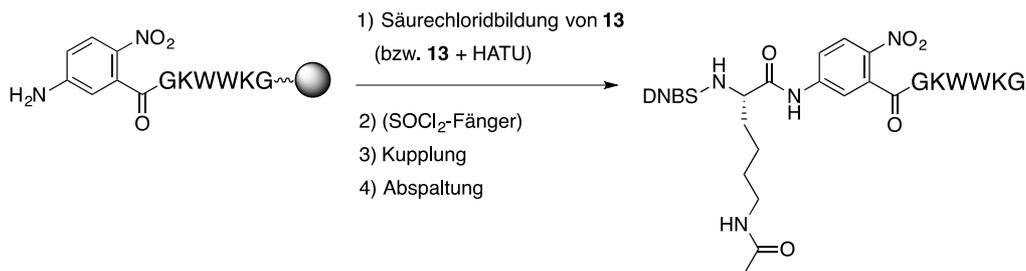
### 2.2.3 Peptidsynthese mit *in situ* gebildeten Aminosäurechloriden

Für die Verknüpfung der DNBS-geschützten Lysin-Bausteine an das peptidgebundene 5,2-ANB wurde ein Protokoll unter Anlehnung der Arbeiten von Petra Henklein (2000) entwickelt. Dieses basiert auf der Bildung des Säurechlorids *in situ* mittels Thionylchlorid und anschließender Kupplung an das Peptid; die Abspaltung der DNBS-Gruppe geschieht unter Zuhilfenahme einer Thiophenolatlösung (Schema 2.6).



**Schema 2.6: *In situ* Säurechloridbildung und Peptidkupplung.** Nach Umsetzung von DNBS-Lys(Ac)-OH (**13**) mit Thionylchlorid und anschließender Verknüpfung an das Peptid erfolgte die DNBS-Abspaltung mittels Thiophenolat.

Für die Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde DNBS-Lys(Ac)-OH (**13**) mit einem Modellpeptid (ANB-Pep) umgesetzt, welches anschließend vom Harz abgespalten wurde (Schema 2.7). Die Reaktionsumsätze wurden per HPLC analysiert (Tabelle 2.2). Dabei zeigte sich eine Umsetzung von 72 % schon nach 5 Minuten, eine verlängerte Reaktionszeit hat dagegen keinen signifikanten Einfluss auf den Umsatz. Dafür beeinflusst die Verwendung von *tert*-Butanol als Fänger von überschüssigen Thionylchlorid die Ausbeute wesentlich (40 % Umsetzung in Abwesenheit des *Scavengers*). Bei Aktivierung von **13** mithilfe des Kupplungsreagenzes HATU konnte erwartungsgemäß keine Umsetzung beobachtet werden.



**Schema 2.7: Optimierung der Kupplungsreaktion.** Verknüpfung von **13** an das Modellpeptid ANB-Pep.

**Tabelle 2.2: Kupplungseffizienz bei veränderten Reaktionsbedingungen**

Kupplungszeit [min]	Aktivierung	<i>Scavenger</i>	Umsetzung [%]
5	Thionylchlorid	tBuOH	72
10	Thionylchlorid	tBuOH	72
30	Thionylchlorid	tBuOH	74
60	Thionylchlorid	-	40
60	HATU	-	-

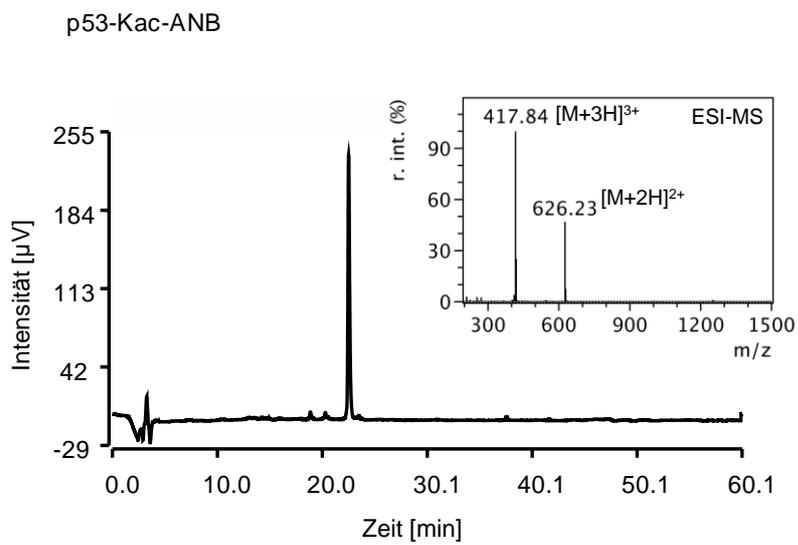
Entsprechend Schema 2.6 wurden kolorimetrische HDAC-Substrate, basierend auf den Sequenzen von p53 (AS 378-385) und Histon H4 (AS 13-19) synthetisiert (Tabelle 2.3). Der Lysin-Baustein wurde an den Acetylierungsstellen K382 (p53) bzw. K16 (Histon H4) dem Chromophor 5,2-ANB direkt vorgeschaltet eingeführt. In Abbildung 2.6 ist beispielhaft für die Charakterisierung der synthetisierten Peptide das MALDI-Massenspektrum und HPLC-Chromatogramm des HDAC-Substrats p53-Kac-ANB nach der Reinigung mittels präparativer HPLC zu sehen.

Um sicherzustellen, dass während der Synthese die stereochemische Integrität des eingesetzten Lys(Ac)-Bausteins erhalten geblieben ist, wurde das Peptid p53-Kac-ANB einer chiralen GC-MS-Analyse zur Bestimmung der optischen Reinheit der Aminosäurenderivate unterworfen (C.A.T. GmbH & Co. Chromatographie und Analysetechnik KG, Tübingen). Die optische Reinheit des Lysinrestes entsprach dabei mit 99,5 % des L-Enantiomers dem Wert des Ausgangsmaterials.

Das Peptid p53-Kac-ANB wurde anschließend als Substrat in HDAC-Assays [Dose, Jost *et al.* 2012] eingesetzt (siehe Diskussion 3.2.1).

**Tabelle 2.3: Kolorimetrische HDAC-Substrate**

Bezeichnung	Peptidsequenz	Acetylierungsstelle
p53-Kac-ANB	SRHK-K(Ac)-5,2-ANB-LMF-NH <sub>2</sub>	K382 in p53
H4-Kac-ANB	Ac-GGA-K(Ac)-5,2-ANB-RHRA-NH <sub>2</sub>	K16 in Histon H4
H4-K-ANB	Ac-GGA-K-5,2-ANB-RHRA-NH <sub>2</sub>	K16 in Histon H4



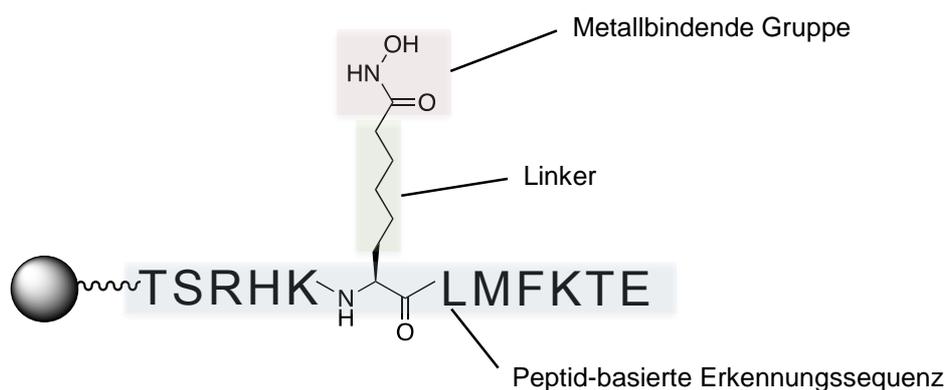
**Abbildung 2.6: p53-Kac-ANB. HPLC-Chromatogramm und ESI-MS-Spektrum**

## 2.3 Hydroxamate als proteomische Sonden für Histon-Deacetylasen

### 2.3.1 Strategie

Das vorliegende Kapitel visiert die Problemstellung an, dass der Kenntnisstand über die Substratspezifität von Histon-Deacetylasen sehr gering ist. Die dafür notwendigen biochemischen Untersuchungen sind nur beschränkt zugänglich, da HDACs im Regelfall im rekombinanten und aktiven Zustand nur sehr schwer verfügbar sind. Die Fragestellung, welcher HDAC verantwortlich für die Deacetylierung einer bekannten Acetylierungsstelle in einem Protein ist, bedarf deshalb neuer biochemischer Werkzeuge. Für diese Untersuchungen, sollte mit chemischen Hilfsmitteln ein Affinitätsbasiertes System entwickelt werden, mit dem es gestattet ist, mithilfe von geeigneten Sonden per Pull-down-Experimenten Histon-Deacetylasen aus komplexen Proteingemischen wie z. B. Zellextrakten zu isolieren. Der Ansatz der bei der Gestaltung der proteomischen Sonden verfolgt werden sollte, beinhaltet die Kombination eines peptidischen Sequenzkontextes einer bekannten Acetylierungsstelle und einer Hydroxamateinheit, welche aufgrund ihrer hohen Affinität gegenüber Zink-abhängigen HDACs der Klasse I, II und IV als Inhibitor zum Einsatz kommen. Der Hydroxamatrest ist hierfür hervorragend geeignet, da die Wechselwirkungen zwischen Hydroxamat und HDAC zu einem ähnlichen Netzwerk aus Wasserstoffbrücken führen, wie es auch für den Übergangszustand der Deacetylierungsreaktion vermutet wird (siehe Kapitel 1.3, Abb.1.4).

Die Sonde sollte Gemeinsamkeiten mit den strukturellen Eigenschaften von synthetischen HDAC-Inhibitoren wie z. B. SAHA aufweisen (Abb. 2.7): Der Hydroxamatrest dient als Metall-Bindungsdomäne, welches das  $Zn^{2+}$ -Atom im katalytischen Zentrum komplexiert. Die Peptidsequenz der Sonde fungiert als Kappe und interagiert mit den Resten am Rand des aktiven Zentrums in ähnlicher Weise wie die Reste an der Oberfläche von den Protein-Substraten. Zusätzlich besetzt ein aliphatischer Linker den Kanal zum aktiven Zentrum des Enzyms. Hierbei sollte insbesondere der Einfluss des Linkers auf die Effektivität der Sonde untersucht werden. Nach den Affinitäts-Pull-down-Experimenten sollte die Analyse und Identifizierung der gebundenen HDACs mittels Western Blot und semiquantitativer, SILAC-basierter Massenspektrometrie erfolgen.

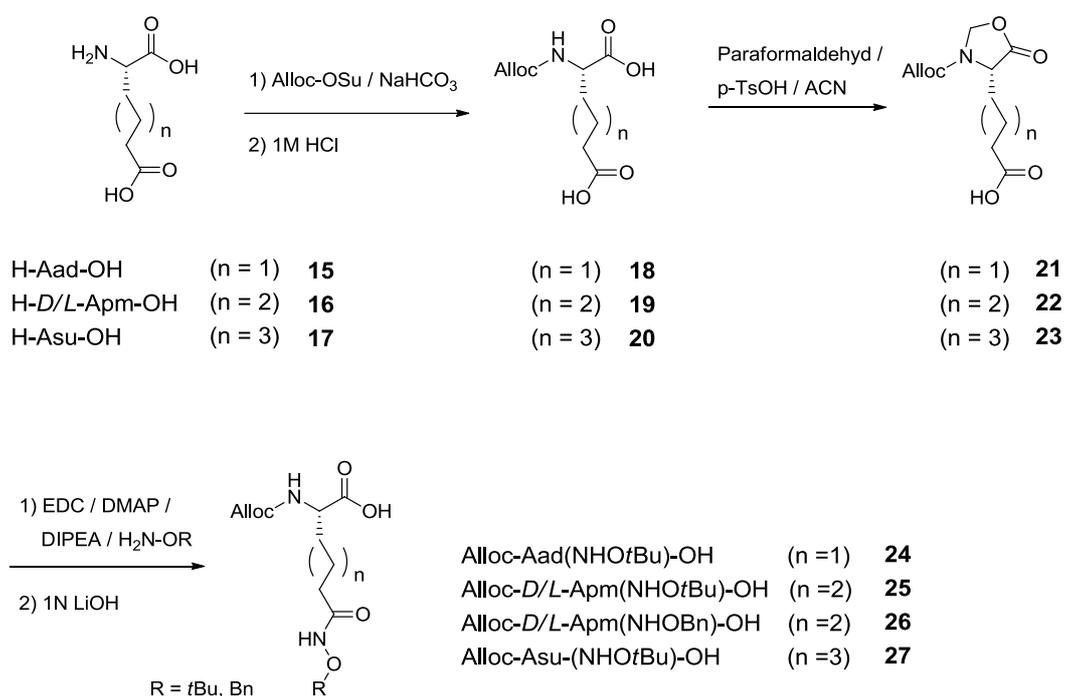


**Abbildung 2.7: Strukturelle Merkmale der HDAC-Sonden.** Der Zink-bindende Hydroxamatrest ist in die Sequenz einer bekannten Acetylierungsstelle eingebunden und über eine aliphatische Kette mit dem Peptid verbunden.

### 2.3.2 Design und Synthese der Hydroxamat-Bausteine und Sondenpeptide

Für die Synthese der Sondenpeptide sollten Aminosäuren mit einem Hydroxamatrest in entsprechend geschützter Form und unterschiedlicher Linkerlänge eingebaut werden. Es wurde eine Synthesestrategie in Anlehnung an ein bestehendes Protokoll [Liu *et al.* 2007] entwickelt (Schema 2.8) um orthogonal geschützte Hydroxamat-Bausteine für den Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese darzustellen; die ausführlichen Durchführungen der Synthesen sind in Abschnitt 4.4 beschrieben. Um den Einfluss der Linkerlänge zwischen Hydroxamateinheit und Peptidrückgrat auf die HDAC-Affinität zu untersuchen, sollten Bausteine mit unterschiedlichen Kettenlängen, bestehend aus zwei bis fünf Methylengruppen, synthetisiert werden. Ausgehend von den kommerziell erhältlichen Aminodicarbonsäuren *L*-2-Aminoadipinsäure (**15**) (Aad, 3 Methylengruppen), *D/L*-2-Aminopimelinsäure (**16**) (Apm, nur erhältlich als Racemat, 4 Methylengruppen) und *L*-2-Aminosuberinsäure (**17**) (Asu, 5 Methylengruppen) wurde die  $\alpha$ -Aminogruppe mithilfe von Alloc-OSu mit der Alloc-Gruppe geschützt (**18-20**). Die für die  $\alpha$ -Aminoschutz übliche Fmoc-Schutzgruppe konnte nicht eingesetzt werden, da im weiteren Verlauf des Synthesepfads die notwendigen basischen Reaktionsbedingungen eine partielle Abspaltung der Fmoc-Gruppe zur Folge hätte. Für die Einführung des Hydroxamats an die Carboxylgruppe der Seitenkette musste zudem die  $\alpha$ -Carboxylgruppe geschützt werden. Hier erwies sich die Bildung eines Oxazolidinons als Mittel der Wahl [Ben-Ishai 1957]. Dies konnte mithilfe von Paraformaldehyd und para-Toluolsulfonsäure in einer schnellen Mikrowellen-unterstützten Reaktion realisiert werden [Govender und Arvidsson 2006; Venkataramanarao und Sureshbabu 2007]. Die säulenchromatographisch gereinigten

Zwischenprodukte (**21-23**) wurden anschließend mit *O*-benzyl- bzw. *O*-*t*-butylgeschützten Hydroxylamin unter Zuhilfenahme von EDC als Kupplungsreagenz und DMAP als Katalysator zu den jeweiligen *O*-geschützten Hydroxamaten umgesetzt. Nach Befreiung des Reaktionsgemischs von nicht umgesetzten Reaktanten durch Extraktion wurde der Oxazolidinonring basisch mit LiOH hydrolysiert. Die erhaltenen Hydroxamat-Aminosäuren-Bausteine (**24-27**) wurden bei Bedarf per HPLC gereinigt und mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR, ESI-MS und HPLC auf Identität und Reinheit hin überprüft. Die Gesamtausbeuten lagen bei 19 % (**24**), 17 % (**25**), 10 % (**26**) bzw. 27 % (**27**).

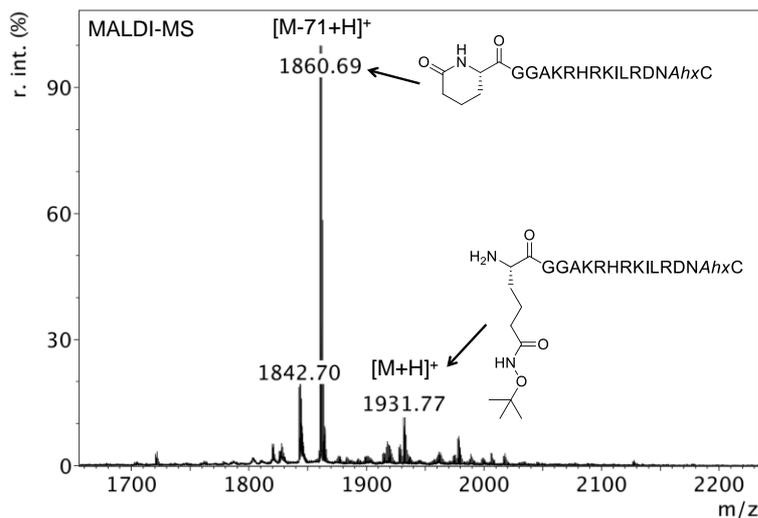


**Schema 2.8: Synthese der geschützten Hydroxamat-Aminosäuren-Bausteine.** Die Route beinhaltet Alloc-Installation am  $\alpha$ -Amin, transiente Oxazolidinonbildung und Einführung des Hydroxamats mittels Hydroxylamin an der Seitenkettencarboxylgruppe. Abgeleitet von den Aminodicarbonsäuren Aad, Apm und Asu, variieren **24-27** in der Anzahl der Seitenketten-Methylengruppen und repräsentieren somit HDAC-Sonden mit unterschiedlichen Linkerlängen.

Die Bausteine konnten nun mithilfe von Standardkupplungsmethoden für die Synthese der Sondenpeptide verwendet werden. Die Wahl der Schutzgruppen erwies sich für die Peptidsynthese als überwiegend geeignet. Die Alloc-Schutzgruppe ließ sich mittels des gängigen Katalysators Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) abspalten. Die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppe konnte hingegen nicht exakt nach Standardbedingungen für die Fmoc-*t*Bu-basierte Peptidsynthese

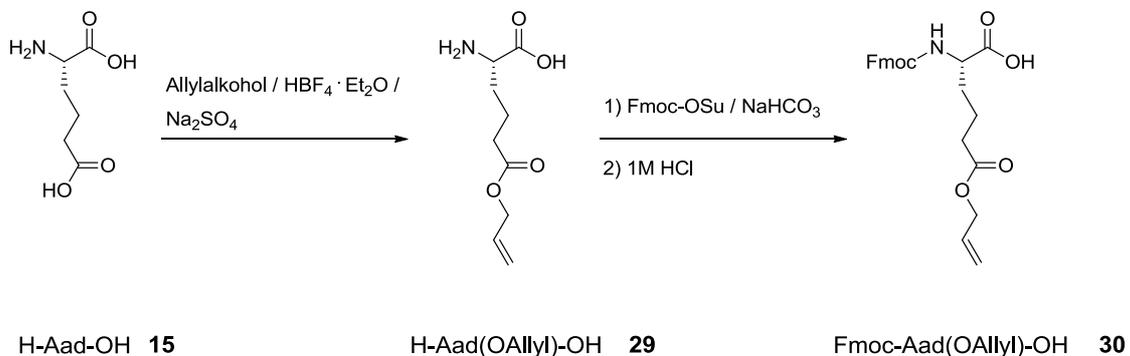
vollzogen werden: Die Peptide, die den benzylgeschützten Apm-Baustein (**26**) enthielten, wurden mit TFA von der Festphase entfernt und somit von allen übrigen TFA-labilen Schutzgruppen befreit. Anschließend wurde das Rohpeptid mit TFMSA in einer TFA/EDT/Thioanisol-Mischung behandelt um die Benzylgruppe abzuspalten. Der Versuch der gleichzeitigen Totalabspaltung vom Harz und Entfernung der Benzylgruppe mit TFMSA resultierte in die Zersetzung des *Tentagel*-Harzes und einer Verunreinigung des Produktes mit PEG-Polymerfragmenten (Daten nicht gezeigt). Dieser notwendige zusätzliche Schritt resultierte jedoch in einer erschwerten Handhabbarkeit der Aufarbeitung und einer verringerten Peptidausbeute (<5%), woraufhin in allen folgenden Peptidsynthesen die Verwendung der *t*-butylgeschützten Bausteine vorgezogen wurde. Bei dieser Schutzgruppe zeigte sich, dass die gebräuchliche Abspaltungsdauer von ca. 4 h nicht ausreichte, um die *t*-Butylschutzgruppe vollständig zu entfernen, diese Erfahrungen mit derartig geschützten Hydroxamaten wurden schon in der Literatur beschrieben [Hanessian *et al.* 1999]. Erst eine Erhöhung der Abspaltungsdauer auf mindestens 16 h führte zur quantitativen Entschützung.

Die oben beschriebene Syntheseroute konnte jedoch nicht für Sonden, die den Hydroxamat-Baustein Aad (**24**) (3 Methylengruppen) enthalten, angewandt werden. In Testkupplungen des Aad-Bausteins an ein Peptid resultierte die Alloc-Abspaltung in einer raschen Cyclisierungsreaktion. Trotz geschützter Seitenkette führte vermutlich der nukleophile Angriff der freien  $\alpha$ -Aminogruppe auf das Carbonyl des Hydroxamats zu der Bildung eines stabilen Lactams, das weitere Kupplungen am Peptid verhinderte. Die überwiegende Bildung des vermeintlichen Lactams und der einhergehende Verlust der Hydroxamateinheit konnten mithilfe der Massenspektrometrie belegt werden (Abbildung 2.8). Die Nebenreaktion weist Ähnlichkeiten zur Pyroglutamatbildung auf. Hierbei sind in der Literatur Fälle dokumentiert, in denen *N*-terminale seitenkettengeschützte Glutamine bzw. Glutaminsäuren bei längerer Entschützungsdauer des *N*-Terminus, d. h. bei längerer Basenexposition, verstärkt zu Bildung eines Pyroglutamatrings neigen [Löhr *et al.* 1999].



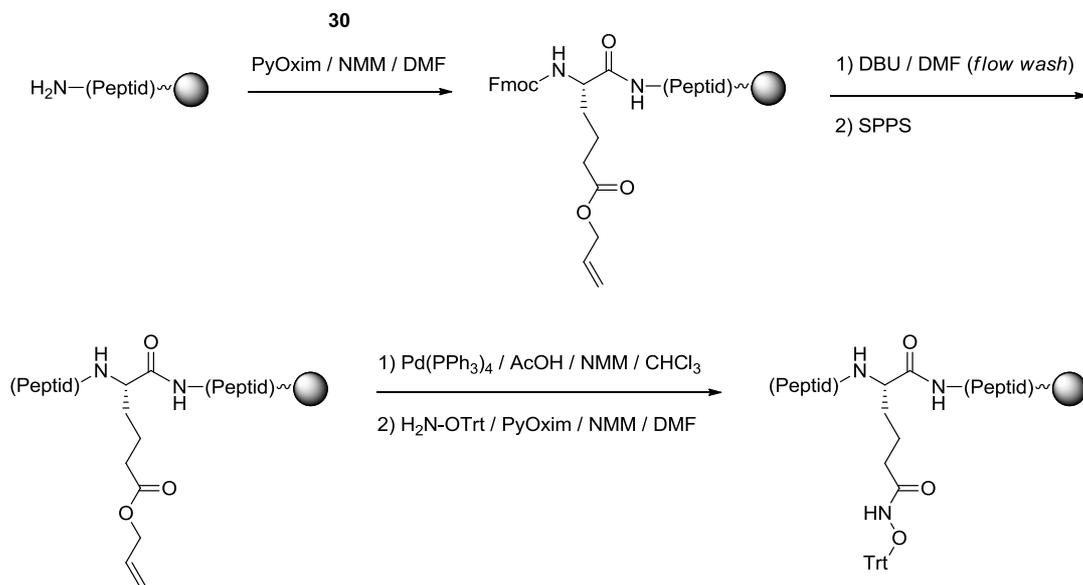
**Abbildung 2.8: MALDI-MS eines H4-Testpeptids nach N-terminaler Cyclisierung.** Nach Kupplung des Aad-Bausteins (**24**) und anschließender Entschützung der Alloc-Gruppe bildete sich größtenteils das N-terminale Lactam.

Als Alternative für die Einführung der Aad-Hydroxamateinheit bot sich die Strategie an, den Baustein in Form eines Aad-Vorläufers mit orthogonaler Schutzgruppe an der Seitenkette mit dem Peptid zu verknüpfen. Die anschließende N-terminale Schutzgruppenentfernung sollte zeitlich rasch vollzogen werden um die Lactambildung zu minimieren. Nach vollendeter Peptidsynthese sollte die Hydroxamateinheit mittels Verknüpfung der freien Seitenkettencarboxylgruppe mit einer geeigneten Hydroxylaminkomponente gebildet werden. Die Synthese [Long *et al.* 2003] startete mit der selektiven Einführung der Allylschutzgruppe an der Seitenkette der freien Aminosäure L-2-Amino adipinsäure (**15**) durch säurekatalysierte Veresterung mithilfe von Allylalkohol und Tetrafluoroborsäure-Diethylether. Die  $\alpha$ -Aminofunktion des Zwischenprodukts (**29**) wurde anschließend mithilfe von Fmoc-OSu umgesetzt (Schema 2.9). Das Baustein (**30**) wurde per HPLC gereinigt und mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR, ESI-MS und HPLC auf Identität und Reinheit hin überprüft; die Gesamtausbeute der Synthese betrug 37 %.



**Schema 2.9: Einführung der Schutzgruppen am Hydroxamat-Vorläufer-Baustein Aad.** Die Synthese von **30** umfasste die Installation der Allylgruppe an der Seitenkette und die anschließende Fmoc-Schützung am  $\alpha$ -Amin.

Der Aad-Baustein (**30**) konnte, ebenso wie das kommerziell erhältliche Glu-Derivat (Fmoc-Glu(OAllyl)-OH), an das gewünschte Peptid mit Standardmethoden geknüpft werden. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit DBU und anschließendem Ansäuern im *flow wash*-Verfahren durchgeführt. Durch die schnelle Ausführung dieser Abspaltung konnte somit das Auftreten der Lactambildung größtenteils verhindert werden. Nach der beendeten Synthese des Gesamtpeptids wurde die Allyl-Gruppe mithilfe des Katalysators Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) entfernt. Die freie Carboxylgruppe konnte abschließend mit *O*-Tritylhydroxylamin zum Hydroxamat umgesetzt werden (Schema 2.10).



**Schema 2.10: Einbau des Aad-Vorläufer-Bausteins (30) und Modifizierung der Seitenkette zur Einführung der Hydroxamateinheit.**

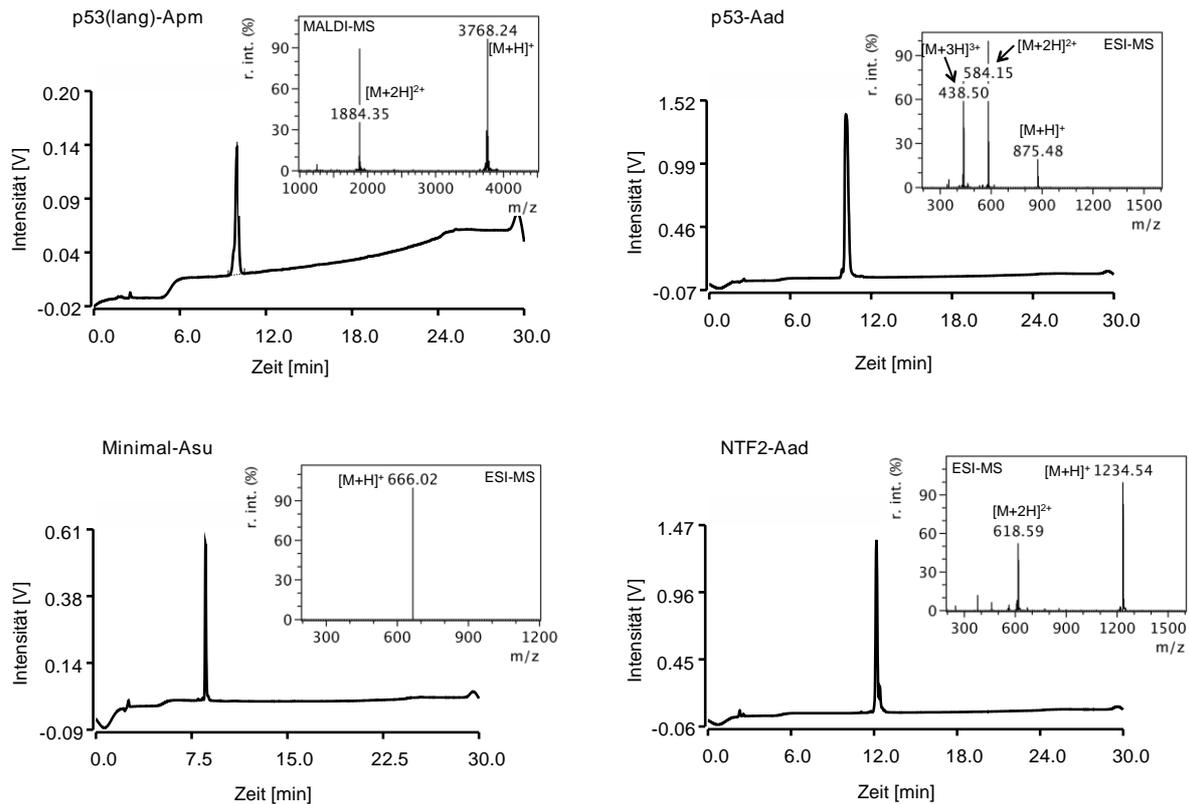
Für die Pulldown-Experimente wurde eine Reihe von Peptiden (Tabelle 2.4) synthetisiert. Die Peptide des Satzes p53(lang) sind abgeleitet vom C-Terminus des Proteins p53 (AS 363-393). Die bekannte Acetylierungsstelle K382 ist entweder in nativer Form belassen und dient somit als Negativkontrolle bzw. mit den Hydroxamatresten Aad und Apm substituiert. Die HDAC-Sonden der Reihe p53 stellen kürzere Varianten der p53-Sequenz (AS 377-388) mit unterschiedlicher Kettenlänge der Hydroxamateinheit, Aad, Apm und Asu dar. In der Peptidserie der Minimalsonden ist die Hydroxamateinheit (Glu, Aad, Apm und Asu) in eine kurze GXG-Sequenz eingebettet. Ausgehend vom *N*-Terminus des NTF2-Protein (*nuclear transport factor 2*) wurden die NTF2-Peptide (AS 1-9) synthetisiert. Diese dienten dabei als Beispiele für Sonden, die im Gegensatz zur p53-Sequenz eine

Sequenzumgebung der Acetylierungsstelle (K4) mit veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften aufweisen.

**Tabelle 2.4: Peptide für den Einsatz als Sonden in HDAC-Pulldown-Experimenten.** Bekannte Acetylierungsstellen wurden dabei mit Hydroxamateinheiten (Glu, Aad, Apm und Asu) ersetzt bzw. in nativer Form (Lys) belassen.

Satz	Bezeichnung	Peptidsequenz
p53(lang)	p53(lang)-Lys	RAHSSHLKSKKGQSTSRHK- <b>Lys</b> -LMFKTEGPDSD- <i>Ahx</i> -C-NH <sub>2</sub>
	p53(lang)-Aad	RAHSSHLKSKKGQSTSRHK- <b>Aad</b> -LMFKTEGPDSD- <i>Ahx</i> -C-NH <sub>2</sub>
	p53(lang)-Apm	RAHSSHLKSKKGQSTSRHK- <b>Apm</b> -LMFKTEGPDSD- <i>Ahx</i> -C-NH <sub>2</sub>
p53	p53-Lys	TSRHK- <b>Lys</b> -LMFKTE- <i>Ahx</i> -C-NH <sub>2</sub>
	p53-Aad	TSRHK- <b>Aad</b> -LMFKTE- <i>Ahx</i> -C-NH <sub>2</sub>
	p53-Apm	TSRHK- <b>Apm</b> -LMFKTE- <i>Ahx</i> -C-NH <sub>2</sub>
	p53-Asu	TSRHK- <b>Asu</b> -LMFKTE- <i>Ahx</i> -C-NH <sub>2</sub>
Minimal	mini-Lys	Ac-G- <b>Lys</b> -G-PEG-C-NH <sub>2</sub>
	mini-Glu	Ac-G- <b>Glu</b> -A-PEG-C-NH <sub>2</sub>
	mini-Aad	Ac-G- <b>Aad</b> -G-PEG-C-NH <sub>2</sub>
	mini-Apm	Ac-G- <b>Apm</b> -G-PEG-C-NH <sub>2</sub>
	mini-Asu	Ac-G- <b>Asu</b> -G-PEG-C-NH <sub>2</sub>
NTF2	NTF2-Lys	MGD- <b>Lys</b> -PIWEQC-NH <sub>2</sub>
	NTF2-Aad	MGD- <b>Aad</b> -PIWEQC-NH <sub>2</sub>

In Abbildung 2.9 sind exemplarisch für die Charakterisierung der synthetisierten und gereinigten Peptide Massenspektren und analytische HPLC-Chromatogramme ausgewählter Sonden gezeigt. Bis auf die NTF2-Peptide beinhalten sämtliche Sonden am C-Terminus einen Aminohexansäurelinker (Ahx), bzw. im Falle der Minimalsonden eine PEG-Linkereinheit, und einen abschließenden Cysteinrest. Über dessen Thiolgruppe wurden die Peptide mit einer Iodoacetyl-funktionalisierten Agarosematrix kovalent verbunden und konnten somit immobilisiert werden.



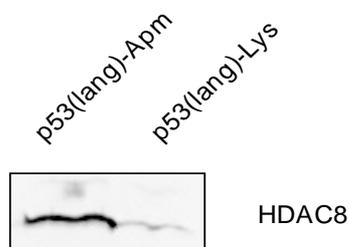
**Abbildung 2.9: Charakterisierung ausgewählter Hydroxamatpeptide.** HPLC-Chromatogramme und MALDI- bzw. ESI-MS-Spektren von p53(lang)-Apm, p53-Aad, Minimal-Asu und NTF2-Aad

### 2.3.3 Peptid-Pulldown-Experimente

Die generelle Anwendbarkeit des Systems, d. h. die Identifizierung der spezifischen Bindung von Histon-Deacetylasen aus Zellextrakten mithilfe von Hydroxamat-basierten Sonden, sollte anhand von Pulldown-Experimenten und anschließender Detektion durch Western Blotting gezeigt werden. In einem ersten Versuch sollte die Eignung des Modells mithilfe von Lysaten aus rekombinanten HDAC8 demonstriert werden. HDAC8 ist der einzige humane HDAC der in aktiver Form in *E.coli*-Zellen produziert werden kann [Hu *et al.* 2000]. Für das Pulldown-Experiment wurde das modifizierte Peptid p53(lang)-Apm als Hydroxamatköder und das entsprechende unmodifizierte Peptid p53(lang)-Lys als Negativkontrolle gewählt. Der Hydroxamatrest substituiert in den gewählten Sonden im Tumorsuppressorprotein p53 die Acetylierungsstelle K382ac, die von rekombinanten HDAC8 *in vitro* deacetyliert wird.

Nach erfolgter Expression von HDAC8 in *E.coli* wurde das Zelllysate nicht gereinigt, dies sollte die Bindung von HDAC8 in Gegenwart von unspezifischen Proteinen simulieren. Nach der Inkubation der immobilisierten Peptidkonjugate mit dem Zelllysate und der anschließenden Auswaschung von unspezifischen gebundenen Proteinen wurden die gebundenen Proteine mittels Detergenzien abgelöst und im SDS-PAGE voneinander getrennt.

In Abbildung 2.10 ist die entsprechende Western Blot Analyse dargestellt. Gut zu erkennen ist, dass beim qualitativen Vergleich der Bandenintensitäten unter den Pulldown-Bedingungen die Anreicherung von HDAC8 am Hydroxamat-Peptid (Apm) wesentlich stärker ist als am unmodifizierten Peptid (Lys). Mit diesem ersten Machbarkeitsnachweis konnte gezeigt werden, dass die gewählte Sonde mit Einbettung in die Peptidsequenz einer bekannten Acetylierungsstelle grundsätzlich in der Lage ist HDAC8 zu binden.

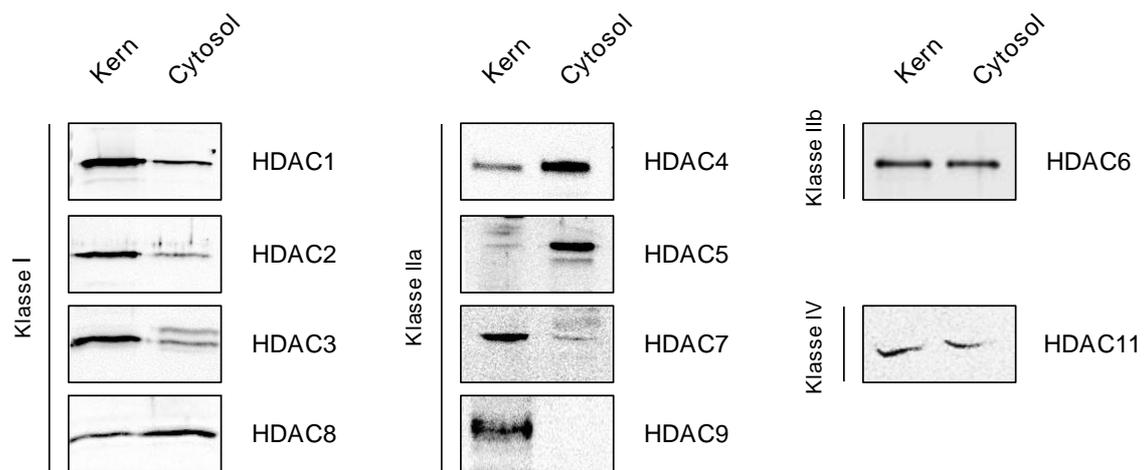


**Abbildung 2.10: Western Blot von HDAC8.** Pulldown-Experiment mit der modifizierten Sonde p53(lang)-Apm bzw. der unmodifizierter Sonde p53(lang)-Lys in rekombinanten HDAC8-Zelllysate aus *E.coli* (Konz. = 1 mg/ml).

Um die Leistungsfähigkeit des Experiments unter Beweis zu stellen, sollten die Sonden in Pulldown-Experimenten mit HDACs aus endogenen Quellen d. h. in komplexeren Säugetier-Zelllysaten zum Einsatz kommen. Dafür wurden Zellen der HeLa-S3-Linie, humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, als Modellsystem gewählt. In derartigen Lysaten sind im Vergleich zu überexprimierten HDAC8 aus *E.coli* die Proteinkonzentrationen wesentlich geringer und bieten so ein aussagekräftigeres Bild über die Befähigung der Sonde HDACs spezifisch zu isolieren und anzureichern. Zudem sind in komplexen Lysaten die HDACs unterschiedlich im Zellkern bzw. im Cytosol lokalisiert. Um in Pulldown-Experimenten ein Screening über die Gesamtheit der Histon-Deacetylasen der Klassen I, II und IV zu ermöglichen, sollte daher die subzelluläre Verteilung und das natürliche Vorkommen der HDACs 1 bis 11 in HeLa-S3-Zelllysaten zumindest qualitativ untersucht werden.

In den verschiedenen Gewebetypen von gesunden und kanzerösen Zellen bestehen große Unterschiede der Expressionslevel von HDACs [de Ruijter *et al.* 2003, Ververis und Karagiannis 2012]. So ist bekannt, dass beispielsweise die HDACs der Klasse I in Krebszellen häufig überexprimiert sind [Nakagawa *et al.* 2007]. Für die Untersuchung der subzellulären Verteilung der HDACs wurde ein bekanntes Protokoll [Dignam *et al.* 1983] für die Präparation von nuklearen und cytosolischen HeLa-

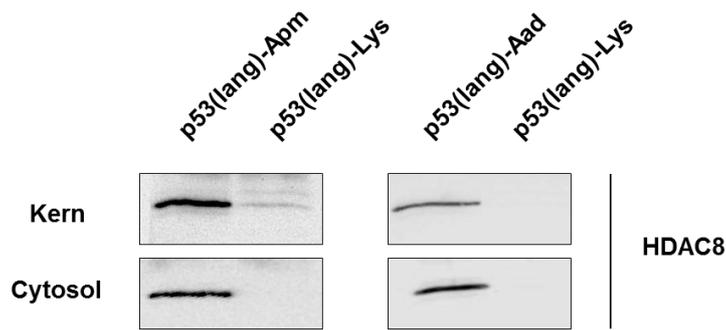
S3-Extrakten angewandt. Anhand von Western Blot Analysen konnte ein semiquantitativer Überblick über die Verteilung und Expression der HDACs 1 - 11 gewonnen werden (Abb. 2.11). HDAC1, 2 und 3 sind überwiegend aber nicht ausschließlich im Kern lokalisiert, wohingegen HDAC8 in beiden zellulären Komponenten annähernd gleichermaßen exprimiert ist. Klasse II HDACs konnten entweder hauptsächlich in einer (HDAC4 und 5 im Cytoplasma, HDAC7 und 9 im Kern) bzw. in beiden Fraktionen (HDAC 6, ebenso HDAC11 [Klasse IV]) gefunden werden. HDAC10 konnte dagegen mit den verwendeten Antikörpern nicht detektiert werden.



**Abbildung 2.11: Western Blots von HDAC1-9 und HDAC11.** Nachweis von HDACs der Klasse I, IIa, IIb und IV in nuklearen bzw. cytosolischen HeLa-S3-Zellextrakt (Beladung = 16 µg)

Darauf aufbauend sollte die Eignung der Sonde gegenüber HDAC8 aus HeLa-Zellextrakten überprüft werden. Aufgrund der Verteilung von HDAC8 in beiden Zellkompartimenten (Kern und Cytosol) wurden daher die Pulldown-Experimente dementsprechend erweitert. Für die biologische Relevanz ist zudem zu erwähnen, dass p53 ebenfalls in der gesamten Zelle lokalisiert ist. Die Aktivität wird hauptsächlich im Zellkern entfaltet; es ist jedoch auch bekannt, dass p53 im Cytoplasma ebenfalls tumorsuppressive Funktionen erfüllen kann [Comel *et al.* 2014].

Zusätzlich sollte zur Sonde p53(lang)-Apm die Fähigkeit der um eine Methylengruppe kürzeren Aad-Sonde überprüft werden. In Abbildung 2.12 ist die Western Blot Analyse der Pulldown-Experimente mit den Ködern p53(lang)-Apm sowie p53(lang)-Aad jeweils im Vergleich mit dem nicht modifizierten Vergleichspeptid p53(lang)-Lys in nuklearen bzw. cytosolischen HeLa-S3-Extrakt dargestellt. Auch hier zeigt sich im Vergleich der Bandenintensitäten in jeweils beiden Extraktfraktionen eine starke Anreicherung von HDAC8 am Hydroxamatpeptid Apm sowie, in etwas abgeschwächter Form, an der kürzeren Aad-Sonde.



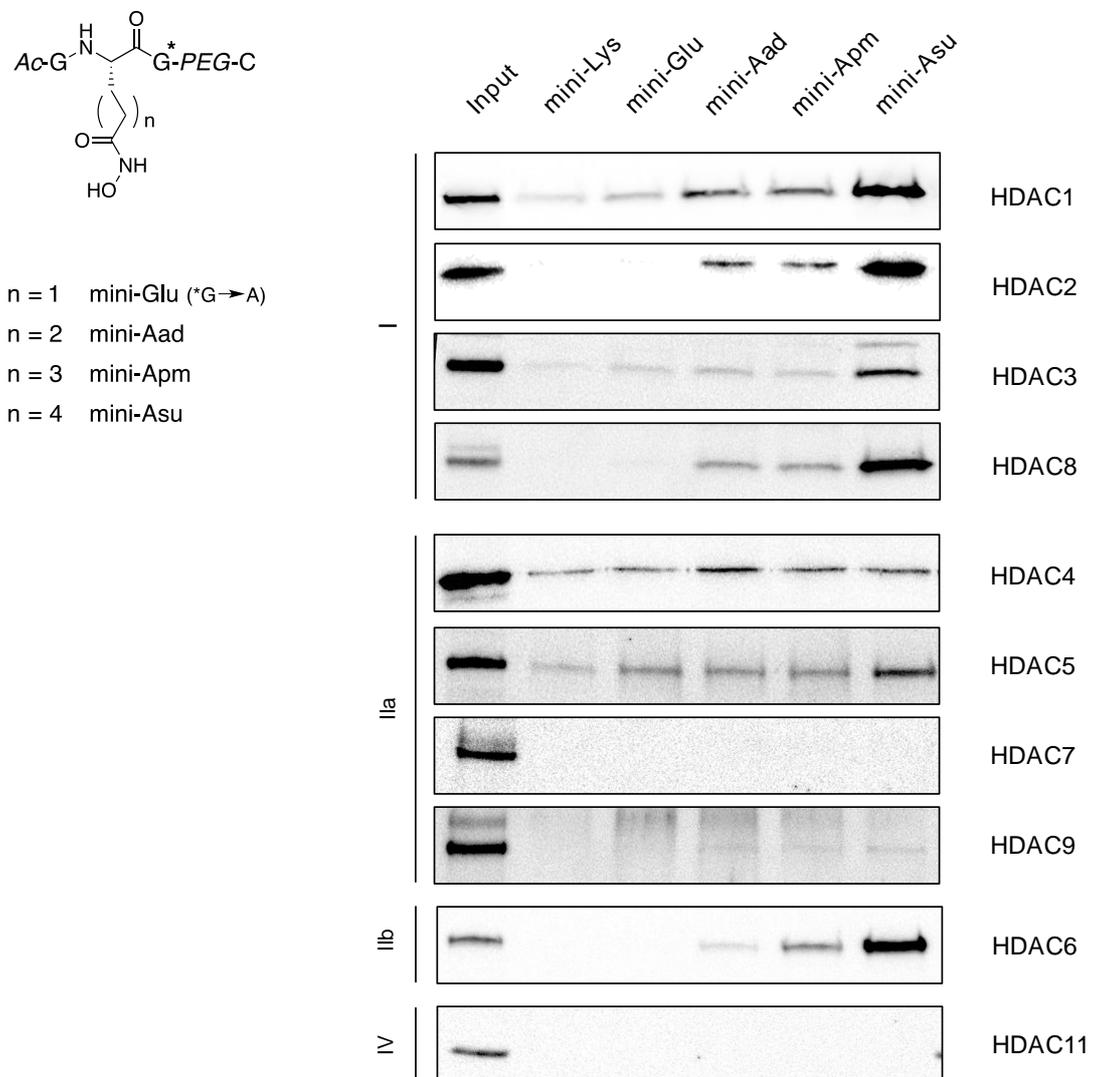
**Abbildung 2.12: Western Blots von HDAC8.** Pulldown-Experimente mit den Sonden p53(lang)-Apm, p53(lang)-Aad und der unmodifizierten Sonde p53(lang)-Lys in nuklearen bzw. cytosolischen HeLa-S3-Zellextrakt (Konz. = 1 mg/ml)

Die Ergebnisse verdeutlichen die prinzipielle Eignung der Sonden für die Anreicherung von endogenem HDAC8 und erlaubten somit weitere Untersuchungen zu dessen Substratspezifitäten und Interaktionspartnern. Für eine Ausweitung des Experiments auf die Sondierung sämtlicher Zink-abhängigen Histon-Deacetylasen (HDAC1-11) in HeLa-Zellextrakten sollten verschiedene Kennzeichen der Sonde bezüglich deren Optimierung erörtert werden. Folgende Faktoren für eine optimale Effizienz des Pulldowns sollten dabei in Erwägung gezogen werden:

- I. Einfluss der Linkerlänge des Hydroxamats
- II. Konkurrenz der HDACs um Bindestelle der Sonde
- III. Bedeutung des Sequenzkontexts

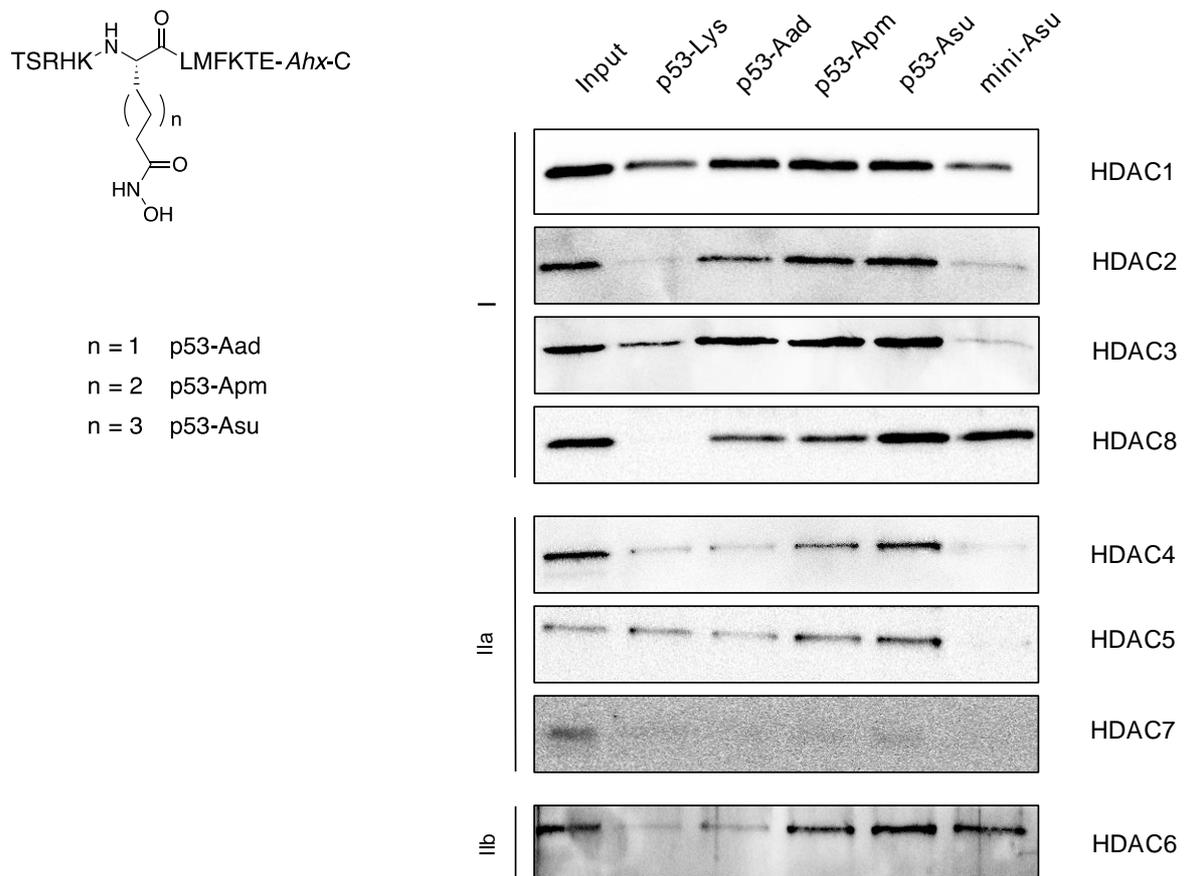
Für genauere Untersuchungen des Pulldown-Systems in Bezug auf die beiden erstgenannten Merkmale dienten die Minimalsonden (Abb. 2.13). Hierbei handelte es sich um Hydroxamatreste innerhalb einer kurzen und unspezifischen Peptidsequenz mit unterschiedlichen Linkerlängen, variierend von 2 (Glu) bis 5 (Asu) Methylengruppen. Dieser minimalistische Sequenzkontext sollte die Interaktion zu den Histon-Deacetylasen primär über die Affinität zur Hydroxamateinheit vermitteln. Im Vordergrund des Experiments standen die Fragen, welche HDACs sich generell mithilfe des Hydroxamats anreichern lassen und welche Folgerungen sich aus den variierenden Linkerlängen ableiten lassen. Die Minimalsonden wurden in Pulldown-Experimenten mit HeLa-S3-Gesamtzellextrakt eingesetzt; die Ergebnisse der Western Blot Analyse sind in Abbildung 2.13 zusammengefasst. Die Sonde mit der längsten Seitenkette (mini-Asu) erreichte die größte Anreicherung mit den detektierten

HDACs. Die Verkürzung der Kettenlänge resultierte dagegen in einer deutlichen Abnahme der Bindungsaffinität; der kürzeste Hydroxamatköder (mini-Glu) zeigte keine bzw. nur noch eine geringe detektierbare Anreicherung. Anhand dieser Ergebnisse lassen sich die HDAC-Sonden qualitativ in hoch- (Asu), mittel- (Apm, Aad) und niederaffin (Glu) klassifizieren. Innerhalb der HDAC-Klassifikation gibt es ebenfalls erkennbare Unterschiede. HDACs der Klasse I (1, 2, 3, 8) wiesen bei der Sonde mini-Asu eine stärkere Anreicherung als HDACs der Klasse IIa (4, 5, 9) auf. HDAC6 (Klasse IIb) kennzeichnete bei Verringerung der Kettenlänge ein stufenweise abgeschwächtes Bindungsverhalten. HDAC7 und 11 konnten mit keiner der Sonden isoliert werden.



**Abbildung 2.13: Western Blots von HDAC1-9 und HDAC11.** Pulldown-Experimenten mit den modifizierten Minimalsonden (links) und der unmodifizierten Sonde mini-Lys in HeLa-S3-Gesamtzellextrakt (Konz. = 1 mg/ml). Als Kontrolle wurden 16 µg Lysat aufgetragen (Input).

Für die Behandlung der Frage, welchen Einfluss die Einbettung der Acetylierungsstelle in eine bekannte Sequenz auf die Effizienz des Pulldowns hat, wurden die Untersuchungen dahingegen erweitert, als das dem Modell wieder einen komplexen Sequenzkontext hinzugefügt wurde (Abb. 2.14). Hierbei wurde wieder die Position K382 aus p53 gewählt. Diesmal wurden die Sonden, u. a. aus Gründen der Praktikabilität in der Peptidsynthese, in verkürzter Form synthetisiert (AS: 377-388).



**Abbildung 2.14: Western Blots von HDAC1-8.** Pull-down-Experimente mit den modifizierten p53-Sonden (links) und der unmodifizierten Sonde p53-Lys in HeLa-S3-Gesamtzellextrakt (Konz. = 0.2 mg/ml, HDAC1: 0.07 mg/ml). Als Kontrolle wurden 16 µg Lysat aufgetragen (Input).

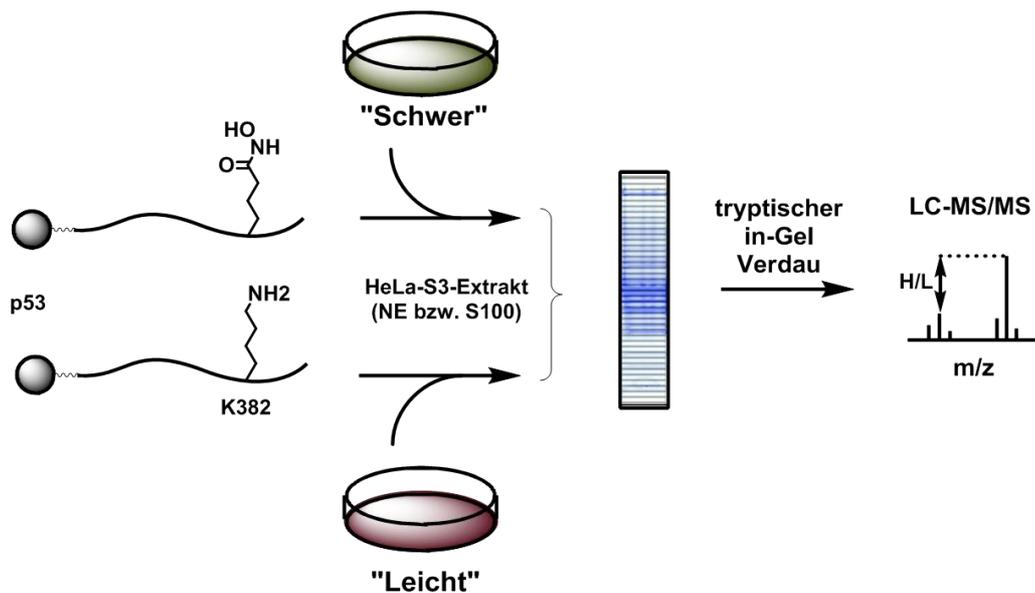
Für die Pull-down-Experimente ausgewählter HDACs der Klassen I und II wurde die Konzentration des eingesetzten Gesamtzellextrakts auf 0.2 mg/ml (HDAC1: 0.07 mg/ml) verringert. Dieses Vorgehen war notwendig, da in Vorversuchen eine besonders starke Wechselwirkung zwischen diesen Sonden und HDACs beobachtet wurde. In der Auswertung der Ergebnisse (Abb. 2.14) zeigten die HDACs eine erhöhte Bindungsaffinität zu den p53-Sonden gegenüber den Minimalsonden sogar bei abnehmender Kettenlänge. Insbesondere HDAC1, 2 und 3 zeigten unter diesen Bedingungen eine deutliche

Reduzierung der Anreicherung an mini-Asu gegenüber p53-Asu, während HDAC6 und HDAC8 mit vergleichbarer Effizienz an beiden Sonden angereichert wurden. Im Vergleich der verschiedenen Klassen konnten bei HDACs der Klasse I selbst bei den kurzen, restriktiveren Linkern eine wesentlich stärkere Anreicherung als bei allen anderen HDACs beobachtet werden. HDAC1 und HDAC3 wiesen dabei keinerlei Unterschiede in den Anreicherungsverhältnissen zu den drei verschiedenen modifizierten p53-Sonden auf.

Zusammengefasst zeigten die Western Blot Analysen, dass die HDAC-Affinität zu den Hydroxamat-Sonden mit der Länge der Linker korreliert, wobei Sonden mit fünf Methylengruppen (Asu) die maximale Anreicherung ermöglichten. Damit der Sequenzkontext besser zum Tragen kommt, sollte eine auf Spezifität hin optimierte Sonde jedoch besser mit einem kürzeren und damit weniger affinen Hydroxamat-Baustein in Verbindung mit einem komplexen Sequenzkontext ausgestattet sein. Diese Überlegungen führten zu dem Schluss, dass für den Einsatz in weiterführenden proteomischen Untersuchungen die p53(long)-Aad-Sonde, mit einem mittelaffinen Hydroxamatrest und mit einem maximalen Sequenzkontext, geeignet sein sollte.

### 2.3.4 SILAC-Pulldown-Experimente

Für eine umfassendere Identifizierung von Histon-Deacetylasen als Interaktionspartner der Sonden wurden Pulldown-Experimente in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt. Zur Differenzierung zwischen unspezifisch und hydroxamatspezifisch bindenden Proteinen wurde das Verfahren der stabilen Isotopenmarkierung durch Aminosäuren in Zellkultur verwendet (SILAC, *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) [Ong und Mann 2006] (Abb. 2.15).

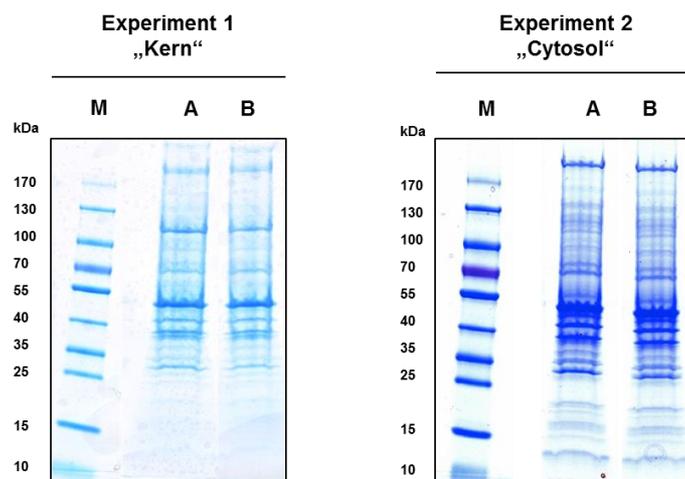


**Abbildung 2.15: Prinzip der Peptid-Pulldown-Experimente unter Einsatz der SILAC-Methode.** Nach Inkubation der immobilisierten p53-Peptide mit SILAC-markierten HeLa-S3-Extrakten erfolgte die Auftrennung der gebundenen Proteine per SDS-PAGE und die Analyse der tryptischen Peptide mittels LC-MS/MS. Die Experimente wurden zusätzlich mit inverser Markierungsstrategie durchgeführt.

Da p53 sowohl im Kern als auch im Cytosol lokalisiert ist, wurden die SILAC-Pulldown-Experimente in den beiden Zellkompartimenten getrennt voneinander durchgeführt um so zu Einblicken über mögliche Aktivitätsunterschiede der interagierenden Proteine zu gelangen. Die beiden Köderpeptide, die modifizierte Sonde p53(lang)-Aad und das korrespondierende unmodifizierte Referenzpeptid p53(lang)-Lys, wurden in zwei Experimenten mit „schwer“- (*Heavy*, H) und „leicht“- (*Light*, L) markiertem HeLa-S3 Kernextrakten (Experiment 1) bzw. cytosolischen Extrakten (Experiment 2) mit jeweils einer Konzentration von 5 mg/ml (Gesamtproteinmenge: 1 mg) inkubiert. Die Zellextrakte (Kern und Cytosol) für die Experimente stammten aus unterschiedlichen Präparationen. Für die SILAC-Extrakte wurde in Experiment 1 (Kern)  $^2\text{H}_4$ -Lys und  $^{13}\text{C}_6$ -Arg bzw. in Experiment 2 (Cytosol)  $^{13}\text{C}_6$ -Lys und  $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$ -Arg verwendet, somit ergibt sich für die tryptischen Peptide ein Massenunterschied von 4 Da

und 6 Da (1) bzw. 6 Da und 10 Da (2). Beide Pulldown-Experimente wurden doppelt mit zusätzlich inverser Markierungsstrategie durchgeführt. Dieses sogenannten Überkreuzexperimente sollten Kontaminationen und mögliche Schwankungen in den Zellextraktpräparationen ausgleichen, d. h. beide Peptidsonden (modifiziert und nicht modifiziert) wurden sowohl mit „schwer“- als auch mit „leicht“-markierten Zelllysate inkubiert, was zu zwei unabhängigen Pulldown-Experimenten (A: *forward* und B: *reverse*) jeder Peptidsequenz führte.

Nach Elution der gebundenen Proteine erfolgte die Vereinigung der unterschiedlich markierten Proteinfractionen. Die Auftrennung wurde anschließend per SDS-PAGE realisiert; in Abbildung 2.16 sind die beiden Gelspuren der jeweiligen SILAC-Pulldown-Experimente dargestellt. Die Proteine wurden in-Gel tryptisch verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden per Nano-LC-MS/MS an einem Orbitrap Massenspektrometer getrennt und analysiert. Die LC-MS/MS-Messungen und die anschließende Datenverarbeitung mittels MaxQuant-Software wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Eberhard Krause (Massenspektrometrie, FMP Berlin) durchgeführt.

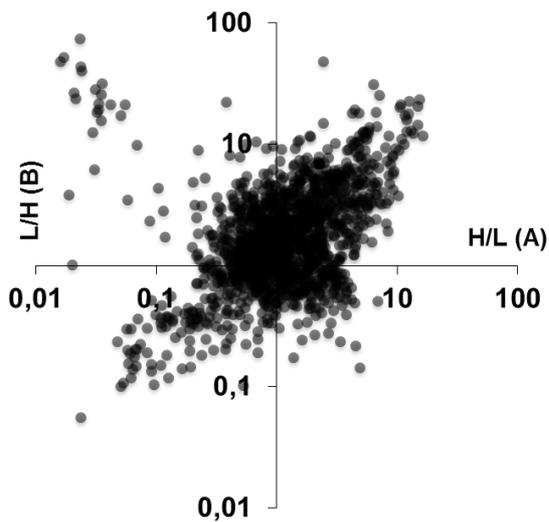


**Abbildung 2.16: SDS-PAGE der SILAC-Pulldown-Experimente.** Coomassie-gefärbte Gele nach Pulldown-Experimenten mit der Hydroxamat-basierten Sonde p53(lang)-Aad und der unmodifizierten Sonde p53(lang)-Lys in HeLa-S3-Kernextrakt (Experiment 1) und cytosolischem Extrakt (Experiment 2). A und B stellen zwei unabhängige Pulldown-Experimente mit jeweils vertauschter Markierungsstrategie dar.

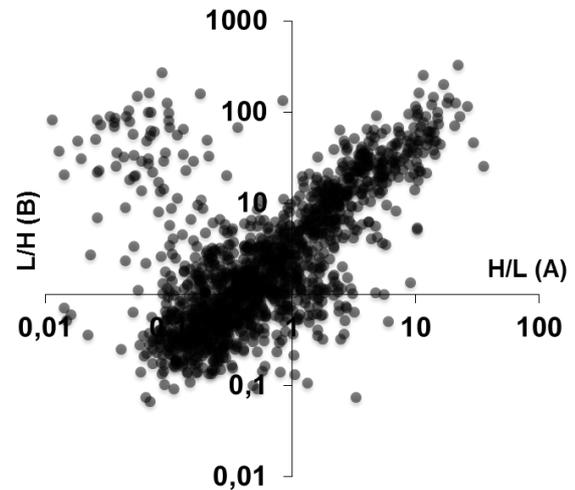
Durch die Verwendung der isoto­penmarkierten Aminosäuren Lysin und Arginin lässt sich der Unterschied zwischen Hydroxamat-vermittelt bindenden Proteinen und unspezifischen, z. B. an die Agarosematrix, bindenden Proteinen über das Isotopenverhältnis „schwer/leicht“ (Heavy/Light, H/L), bzw. im inversen Experiment „leicht/schwer“ (L/H), der tryptischen Peptidfragmente detektieren. Tryptische Peptide von hydroxamatspezifisch gebundenen Proteinen zeichnen sich durch hohe Isotopenverhältnisse aus, wohingegen Proteine, die unabhängig von der Modifizierung als bindend nachgewiesen werden, in beiden Experimenten ein Isotopenverhältnis um 1 aufweisen sollten. Es galten nur solche Proteine als identifiziert zu denen mindestens 2 spezifische Peptide (*unique peptides*) zugeordnet werden konnten. Im Kernextrakt-Pulldown konnten so im Experiment (A) 1625 Proteine mit 13691 proteinspezifischen Peptiden und im Experiment (B) 1835 Proteine (15997 Peptide) identifiziert werden, wobei eine Überlappung der Proteinquantifizierungen zwischen beiden Experimenten bei 1453 Proteinen liegt. Im Pulldown-Experiment mit cytosolischen Extrakt ist die Anzahl der quantifizierten Proteine in Experiment A mit 1499 (12120 Peptide) und im Experiment B 1912 (15384 Peptide) und einer Überlappung von 1395 Proteinen mit dem ersten Experiment vergleichbar. Im Vergleich zwischen den eindeutig identifizierten Proteinen aus dem nuklearen (1453) und dem cytosolischen Extrakt (1395), zeigte sich eine Überlappung von 901 Proteinen, die in beiden Fraktionen zu finden sind. Die große Übereinstimmung ist in der natürlichen Lokalisierung der Proteine in beiden subzellulären Fraktionen sowie mit technisch bedingten Einschränkungen in der Extraktpräparation begründet.

In Abbildung 2.17 sind die Gegenüberstellungen der Proteinverhältnisse (H/L bzw. L/H) aus den beiden Experimenten A (*forward*) und B (*reverse*) der jeweiligen SILAC-Pulldown-Experimente mit nuklearen und cytosolischen Extrakt in Form von Streudiagrammen logarithmisch dargestellt. Im oberen rechten Quadranten befinden sich die Proteine, welche in beiden Pulldown-Experimenten bevorzugt an die Hydroxamat-basierte Sonde angereichert sind. Proteine, die in Experiment A und B überwiegend an der unmodifizierten Sonde gebunden haben, weisen ein niedriges Isotopenverhältnis auf und befinden sich im linken unteren Quadranten. Im linken oberen Quadranten handelt es sich um Proteine, die praktisch nicht in der schweren Form gefunden worden sind. Da dies in beiden Experimenten (A und B) beobachtet wird, sind es wahrscheinlich Verunreinigungen, die von der Datenbank nicht als Kontaminanten erkannt worden sind oder nur in der leichten Zellpopulation vorhandene Proteine. Die Mehrzahl der Proteine zeigt in beiden Experimenten kein spezifisches Bindungsverhalten zu einem der beiden Köderpeptide, sie weisen ein Isotopenverhältnis von ungefähr 1 zu 1 auf und liegen gehäuft um den Achsenschnittpunkt. Diese Darstellungen gelten überdies als Maß für die Reproduzierbarkeit der Verhältnisse H/L und L/H. Im Experiment mit nuklearen Extrakt liegen die Proteine verteilt auf einer durch den Ursprung gehenden Geraden mit der Steigung von 1. Dagegen ist die Verteilung im Diagramm mit cytosolischen Extrakt zu einem höheren Ordinatenwert (L/H B) hin verschoben. Dies

### SILAC-Pulldown 1 (Kernextrakt)



### SILAC-Pulldown 2 (cytosolischer Extrakt)



**Abbildung 2.17: Isotopenverhältnisse der SILAC-Pulldown-Experimente.** Die Proteinverhältnisse aus den unabhängigen Pulldown-Versuchen mit *forward* (A) und *reverse* (B) Markierungsstrategie der beiden Experimente 1 (Kern) und 2 (Cytosol) wurden in Form von Streudiagrammen gegenübergestellt. Ein Punkt repräsentiert ein Protein. Es wurden nur Proteine mit einer Quantifizierung über mindestens 2 spezifische (*unique*) Peptide und mindestens 2 Sequenzereignisse (*ratio counts*) berücksichtigt.

deutet darauf hin, dass die eingesetzte Konzentration des leichten Extrakts wesentlich höher lag als die des schweren Extrakts. Die absoluten Verhältniswerte aus Experiment B, welche um ca. den Faktor 10 höher liegen als die entsprechenden Werte aus Experiment A, sind dementsprechend mit Einschränkung zu betrachten. Die hohe Anzahl und die breite, fast kontinuierliche Verteilung der Proteine über eine große Spannweite der Isotopenverhältnisse lässt eine scharfe Einteilung in Klassen (angereichert bzw. nicht angereichert) nicht zu. Als Kriterium für die Berücksichtigung von Proteinen die als eindeutig an die modifizierte Sonde angereichert gelten, wurde deshalb ein Isotopenverhältnis von mindestens 5 in beiden Experimenten (A und B) gesetzt. Für Experiment 1 erfüllten 50 Proteine diese Maßgabe, in Experiment 2 wiesen 58 Proteine dieses Mindest-Isotopenverhältnis auf.

In der Tabelle 2.5 sind alle gefundenen HDACs im Vergleich mit den 20 stärksten am Hydroxamat angereicherten Proteinen aus den SILAC-Pulldown-Experimenten mit nuklearen Hela-S3-Extrakt aufgeführt. Für die gefundenen Histon-Deacetylasen als Bindungspartner konnte nur HDAC8 mit einem sehr hohen Isotopenverhältnis angereichert werden. Die weiteren HDACs der Klasse I (HDAC1-3) weisen entweder nur in einem der beiden Doppelerperimente ein erhöhtes Anreicherungsverhältnis auf, bzw. gelten mit nur einem proteinspezifischen Peptid, wie im Falle des

HDAC3, als nicht sicher quantifiziert. Darüber hinaus wurde mit HDAC6 ein weiterer HDAC der Klasse IIb hydroxamatspezifisch identifiziert. In der Tabelle 2.6 sind die entsprechenden Ergebnisse aus den SILAC-Pulldown-Experimenten mit cytosolischen Zellextrakt zusammengefasst. Hier konnte ebenfalls HDAC8 mit hohen Isotopenverhältnissen an der Hydroxamat-basierten Sonde spezifisch angereichert werden. Überdies wurden nur HDAC1 und 6 gefunden; die Verhältnisse lassen jedoch auf keine spezifische Bindung schließen. Weitere Interpretationen dieser Ergebnisse werden im Kapitel 3.3.1 diskutiert.

**Tabelle 2.5: Hydroxamatspezifisch bindende Proteine (Top 20) aus den SILAC-Pulldown-Experimenten mit nuklearen HeLa-S3-Extrakt.** Anreicherungsverhältnisse von >5 im Doppelversuch (Sortierung nach Exp. A) sowie eine Quantifizierung von mind. 2 proteinspezifischen Peptiden dienten als Auswahlkriterien. Unabhängig von den Kriterien sind sämtliche gefundenen HDACs mit aufgeführt.

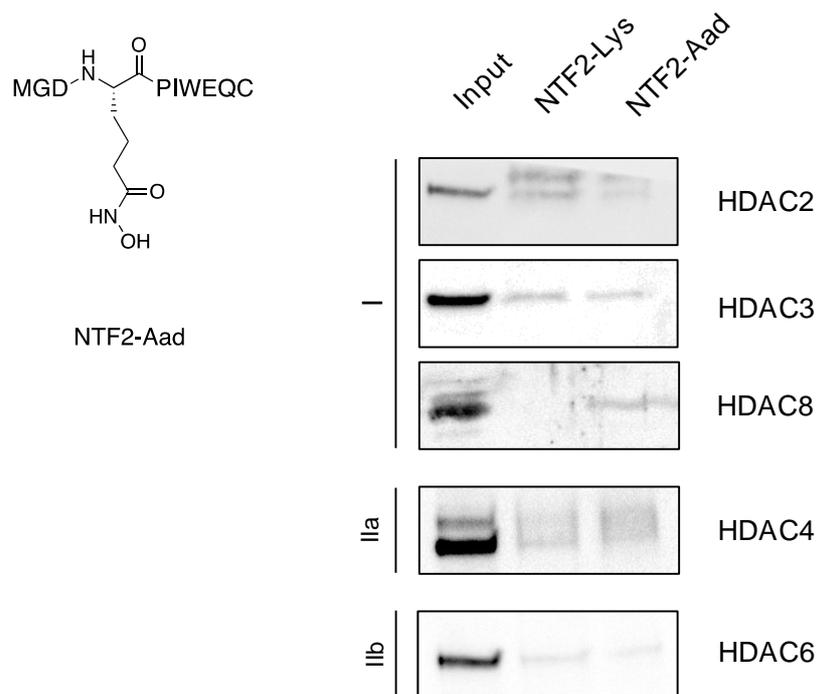
Gen-name	UniProtKB Nr.	Proteinname	A (forward)		B (reverse)	
			unique Pep.	H/L	unique Pep.	L/H
DCTPP1	Q9H773	<i>dCTP pyrophosphatase 1</i>	7	16,30	5	11,74
METTL1	Q9UBP6	<i>tRNA (guanine-N(7))-methyltransferase</i>	7	15,15	7	23,58
PUS1	Q9Y606	<i>tRNA pseudouridine synthase A</i>	5	14,80	5	14,44
HDAC8	Q9BY41	<i>Histone deacetylase 8</i>	5	14,62	8	20,52
GARS	P41250	<i>Glycine--tRNA ligase</i>	20	13,51	21	12,31
CHM	P24386	<i>Rab proteins geranylgeranyltransferase component A 1</i>	3	12,84	3	12,90
NOL3	B4DFL0	<i>Nucleolar protein 3</i>	5	12,45	7	22,92
NSUN2	Q08J23	<i>tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase</i>	29	12,21	26	17,75
YWHAQ	P27348	<i>14-3-3 protein theta</i>	6	11,99	7	12,70
USP4	Q13107	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4</i>	3	11,85	4	15,88
OLA1	Q9NTK5	<i>Obg-like ATPase 1</i>	11	11,52	10	17,26
RCC2	Q9P258	<i>Protein RCC2</i>	7	11,39	7	10,12
PDE12	Q6L8Q7	<i>2',5'-phosphodiesterase 12</i>	7	10,76	6	11,02
ATE1	O95260	<i>Arginyl-tRNA--protein transferase 1</i>	6	10,70	6	21,43
TRMT1	Q9NXH9	<i>tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase</i>	9	10,51	14	20,23
HDGF	P51858	<i>Hepatoma-derived growth factor</i>	14	10,26	16	9,03
NAE1	A6NCK0	<i>NEDD8 activating enzyme E1 regulatory subunit</i>	14	9,61	6	9,31
GSPT1	Q96GF2	<i>Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A</i>	17	9,26	16	6,06
TRMT6	Q9UJA5	<i>tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6</i>	8	9,15	4	8,14
CTU1	Q7Z7A3	<i>Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1</i>	4	9,11	2	5,71
...	...	...	...	...	...	...
HDAC6	Q9UBN7	<i>Histone deacetylase 6</i>	7	4,88	7	8,07
HDAC2	Q92769	<i>Histone deacetylase 2</i>	7	2,09	7	4,17
HDAC1	Q13547	<i>Histone deacetylase 1</i>	3	1,40	7	4,74
HDAC3	O15379	<i>Histone deacetylase 3</i>	(1)	1,11	6	2,91

**Tabelle 2.6: Hydroxamatspezifisch bindende Proteine aus den SILAC-Pulldown-Experimenten mit cytosolischen HeLa-S3-Extrakt.** Anreicherungsverhältnisse von >5 im Doppelversuch (Sortierung nach Exp. A) sowie eine Quantifizierung von mind. 2 proteinspezifischen Peptiden dienten als Auswahlkriterien. Unabhängig von den Kriterien sind sämtliche gefundenen HDACs mit aufgeführt.

Gen-name	UniProtKB Nr.	Proteinname	A (forward)		B (reverse)	
			unique Pep.	H/L	unique Pep.	L/H
ADAT3	Q96EY9	<i>Probable inactive tRNA-specific adenosine deaminase-like protein 3</i>	5	29,244	6	87,16
GSTM3	P21266	<i>Glutathione S-transferase Mu 3</i>	8	25,923	9	163,37
METTL1	Q9UBP6	<i>tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase</i>	8	22,669	8	90,41
DCTPP1	Q9H773	<i>dCTP pyrophosphatase 1</i>	7	22,042	7	150,57
PDE12	Q6L8Q7	<i>2,5-phosphodiesterase 12</i>	10	20,799	11	72,20
BID	P55957	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>	5	18,456	4	70,72
CWC15	Q9P013	<i>Spliceosome-associated protein CWC15 homolog</i>	5	17,907	5	144,93
HDAC8	Q9BY41	<i>Histone deacetylase 8</i>	4	16,774	5	125,48
DCUN1D5	Q9BTE7	<i>DCN1-like protein 5</i>	4	15,018	6	74,02
DOHH	Q9BU89	<i>Deoxyhypusine hydroxylase</i>	3	14,967	3	86,51
IL18	Q14116	<i>Interleukin-18</i>	5	14,461	5	331,50
HDGF	P51858	<i>Hepatoma-derived growth factor</i>	16	14,156	18	178,58
PNPO	Q9NVS9	<i>Pyridoxine-5'-phosphate oxidase</i>	2	14,008	3	90,33
YWHAQ	P27348	<i>14-3-3 protein theta</i>	7	13,868	9	77,81
DUT	P33316	<i>Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase</i>	4	13,519	5	99,91
OTUB1	Q96FW1	<i>Ubiquitin thioesterase OTUB1</i>	9	13,466	9	105,19
SFN	P31947	<i>14-3-3 protein sigma</i>	9	12,838	12	127,48
UBE2R2	Q712K3	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 R2</i>	3	12,834	4	82,94
GLOD4	Q9HC38	<i>Glyoxalase domain-containing protein 4</i>	2	12,327	3	146,04
HPRT1	P00492	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	4	12,271	5	72,05
...	...	...	...	...	...	...
HDAC1	Q13547	<i>Histone deacetylase 1</i>	4	1,13	4	1,99
HDAC6	Q9UBN7	<i>Histone deacetylase 6</i>	4	0,26	2	0,63

### 2.3.5 Peptid-Pulldown-Experimente mit NTF2-Sonden

Abschließend wurden Sonden mit komplexem Sequenzkontext synthetisiert und analysiert, die sich deutlich von den p53-Sonden unterschieden. Die Wahl fiel auf Sonden, welche sich vom *nuclear transport factor 2* Protein (NTF2) ableiten (AS: 1-9). Dieses Protein, welches im Cytoplasma lokalisiert ist, hat die Funktion den Transport von Proteinen in den Zellkern zu ermöglichen. Die Acetylierungsposition K4 [Choudhary *et al.* 2009], dessen modifizierende Enzyme nicht bekannt sind, wurde mit dem Hydroxamatrest Aad substituiert. Im Vergleich zu der Acetylierungsstelle K382 in p53 liegt hier der Unterschied in den benachbarten Aminosäuren: anstatt eines basischen Restes in -1 Position (K381) befindet sich hier ein saurer Aspartatrest. Die Western Blot Analysen (Abb. 2.18) von ausgewählten HDACs zeigen dabei keinerlei Anreicherung an die Sonde NTF2-Aad bzw. keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle (NTF2-Lys).



**Abbildung 2.18: Western Blots ausgewählter HDACs.** Pulldown-Experimente mit der modifizierten NTF2-Sonde (NTF2-Aad, links) und der unmodifizierten Sonde NTF2-Lys in HeLa-S3-Gesamtzellextrakt (Konz. = 1 mg/ml). Als Kontrolle wurden 16 µg Lysat aufgetragen (Input).

### 3 Diskussion

Posttranslationale Modifikationen beeinflussen entscheidend die Struktur des Chromatins und steuern somit die Interaktion zwischen DNA und Histonen. Heutzutage wissen wir, dass PTMs unter anderem ihre Funktion über die Rekrutierung von Proteinen und Komplexen mit spezifischen enzymatischen Aktivitäten vermitteln. Insbesondere die Histon-Acetylierung ist ein epigenetischer Mechanismus, der bedeutenden Einfluss auf die Genaktivierung sowie die Chromatinkondensation und den Nukleosomenaufbau hat. Die dafür zuständigen Histon-modifizierenden Enzyme, die Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen spielen deshalb als Regulatoren der Gentranskription in diversen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle und machen sie so zu vielversprechenden pharmazeutischen Angriffspunkte für eine Vielzahl von Krankheiten wie Krebs [Dokmanovic *et al.* 2007], Neurodegenerative- [Hahnen *et al.* 2008] und Herz-Kreislauf-Erkrankungen [Webster *et al.* 2013]. Zusätzlich ist die Lysin-Acetylierung auch in vielen Nicht-Histonproteinen bekannt, von denen u. a. das Tumorsuppressorprotein p53, ein prominentes Beispiel darstellt. In Anbetracht des enormen Umfangs von bisher ca. 35500 identifizierten Acetylierungsstellen (PhosphoSitePlus, Stand Mai 2015 [Hornbeck *et al.* 2015]) ist die Aufklärung der enzymatischen Eigenschaften von Histon-Deacetylasen bezüglich der Kinetik und der bevorzugten Deacetylierungsstelle mit neuen und schnellen Assays Postdeshalb von besonderem Interesse.

#### 3.1 NMR-basierter HDAC-Assay

Das Verfolgen der HDAC-Aktivität basiert in den meisten biochemischen *in vitro*-Assays auf Auslesemechanismen, welche die Freisetzung von Radioaktivität [Nare *et al.* 1999], Fluoreszenz [Wegener *et al.* 2003] bzw. die Veränderung der Absorbanz [Fatkins und Zheng 2008] beinhalten. Mithilfe dieser konventionellen Methoden können jedoch Modifizierungen an jeweils nur einer Position in einem einzigen Substrat beobachtet werden. Die reversible Lysin-Acetylierung findet *in vivo* jedoch oft gleichzeitig an mehreren Positionen statt. Der NMR-basierte Deacetylierungsassay und die Anwendung am Histon H4-*tail* sollte diese Lücke schließen und die vorteilhaften Eigenschaften dieser Methode gegenüber anderen existierenden biochemischen Assays für die Untersuchung von Histon-modifizierenden Enzymen verdeutlichen [Dose, Liokatis *et al.* 2011]; für den Assay sollten dabei die charakteristischen Eigenschaften von acetylierten Lysinresten in  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  2D-heteronuklear korrelierten NMR-Experimenten genutzt werden [Liokatis *et al.* 2010; Smet-NoCCA *et al.* 2010]. Die Kombination aus chemischer Synthese, d. h. dem positionsspezifischen Einbau von stabilen Isotopenmarkierungen

in Reporterpeptide, und hochauflösender NMR-Spektroskopie ermöglicht die Verfolgung von Acetylierungs- bzw. Deacetylierungsreaktionen an mehreren Positionen in zeitaufgelöster und quantitativer Art und Weise. Im Gegensatz zu Substraten die per Expression metabolisch uniform isotopenmarkiert werden, erlauben gezielte positionsspezifische Isotopenmarkierungen die Aufnahme von Spektren mit einzelnen bzw. wenigen Signalen. In  $^{15}\text{N}$ -editierten 1D-Experimenten ermöglicht die niedrige Akquisitionszeit und der damit verbundenen schnellen Aufnahmegeschwindigkeit ein direktes zeitaufgelöstes Auslesen der spezifischen Aktivität von Deacetylasen mit der Möglichkeit der Bestimmung von kinetischen Parametern. Im Gegensatz dazu kann in den 2D-Experimenten ein sekundengenau aufgelöstes Verfolgen der HDAC-Aktivität nicht erzielt werden, hier schränkt die hohe Komplexität der einzelnen Datenpunkte die Aufnahmegeschwindigkeit stark ein, das Experiment bietet daher einen eher qualitativeren Ablauf der Reaktion, ein Nachteil gegenüber anderen etablierten HDAC-Assays.

In Hinblick auf die Synthese von isotopenmarkierten Reporterpeptiden konnte mit einem Mesylaustausch durch Ammoniak eine zweckmäßige Methode für die Einführung von  $^{15}\text{N}$ - $\epsilon$ -Aminen gefunden werden. Im Vergleich zu einem  $^{15}\text{N}$ -Einbau mittels markierten Aziden und anschließender Reduktion zum Amin bietet sich diese Syntheseroute als günstige Alternative an. Aufgrund der unvollständigen ammonolytischen Umsetzung des Peptids (siehe Abb. 2.3) wurde jedoch mit der Verwendung von vorgeformten Lysin-Bausteinen schlussendlich ein Darstellungsweg beschritten, welcher zudem die  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung am  $\alpha$ -Amid berücksichtigt. Die Einführung von Modifikationen und Schutzgruppen an isotopenmarkierte freie Lysinderivate und die anschließende Verwendung der Bausteine in der standardmäßigen Fmoc-/tBu-basierten Festphasenpeptidsynthese konnte problemlos realisiert werden. Hierbei stellte sich insbesondere die Bildung von Kupfer(II)-Chelatkomplexen für die Schützung der  $\alpha$ -Amino- und  $\alpha$ -Carboxylfunktion von Lysin, u. a. aufgrund der sehr guten Löslichkeit, als exzellentes Mittel der Wahl dar [Wiejak *et al.* 1999; Leman *et al.* 2007].

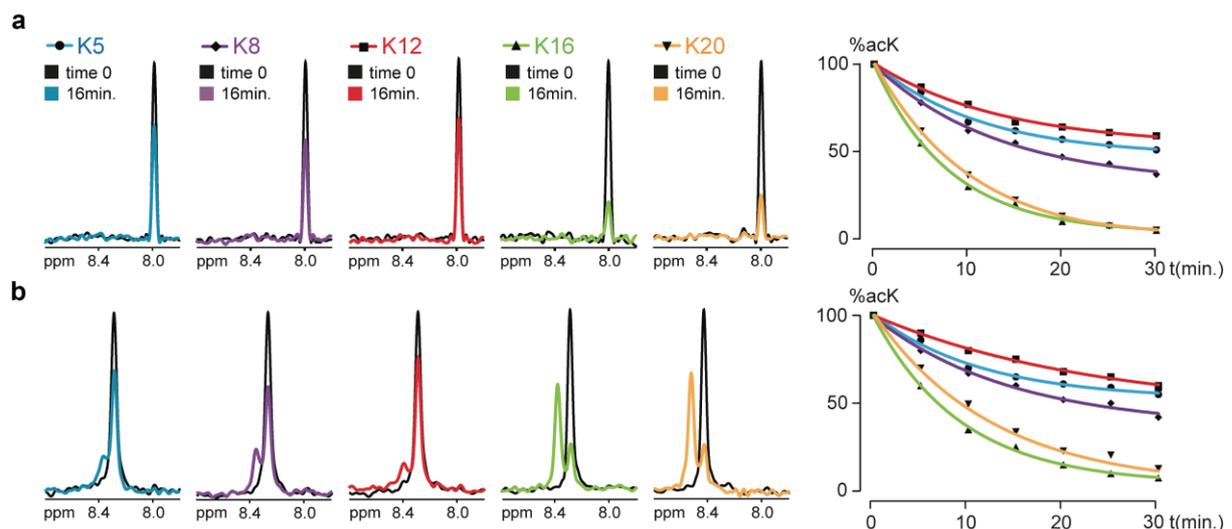
Das Prinzip des gezielten positionsspezifischen Einbaus von stabilen Isotopen in peptidischen Substraten in Kombination mit NMR-Spektroskopie kann auch auf Reportersysteme für andere posttranslationale Modifikationen übertragen werden. So wurde das Konzept erfolgreich für die Untersuchung von Lysin-Methylierungen durch Methyltransferasen [Theillet *et al.* 2012] und Serin- bzw. Threonin-Phosphorylierungen durch Kinasen [Thongwichian 2012] angewandt.

### 3.1.1 Deacetylierungen am Histon-H4-tail

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten isotopenmarkierten Reporterpeptide wurden in NMR-basierten Deacetylierungsassays unter der Durchführung von Dr. Stamatios Liokatis eingesetzt [Dose, Liokatis *et al.* 2011].

In den Experimenten mit den Histon-H4-Reporterpeptiden (*single-site*, Satz 1 und 2) wurde das spezifische Verhalten der NAD<sup>+</sup>-abhängigen rekombinanten Histon-Deacetylase Sir2.1 aus *C. elegans*, einem Homolog des humanen SIRT1, aufgeklärt (Abb. 3.1). Die alleinige <sup>15</sup>N-Isotopenmarkierung im Peptid führt nur zu einem einzigen Signal in <sup>15</sup>N-editierten NMR-Experimenten. Dies ermöglicht den Einsatz von schnellen zeitaufgelösten eindimensionalen NMR-Messungen um die spezifische Aktivität von Sir2.1 an den verschiedenen Substratpositionen zu verfolgen. Die zwei Methoden der Isotopenmarkierung, Seitenkette (<sup>15</sup>Nε) und Rückgrat (<sup>15</sup>Nα), sind beidermaßen gut geeignet Deacetylierungen mittels NMR-Spektroskopie *in vitro* zu untersuchen.

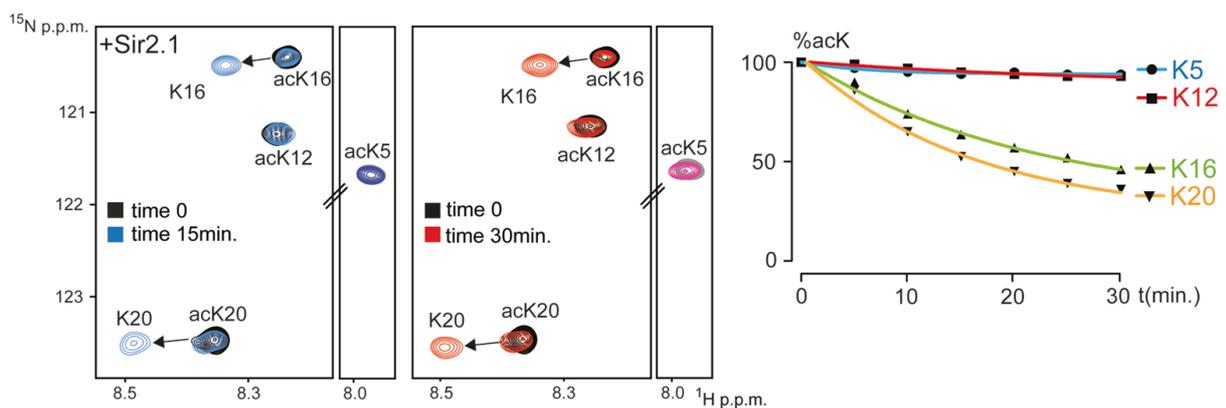
Im Ergebnis zeigte sich eine klare Bevorzugung der Positionen K16 und K20 gegenüber den Acetylierungsstellen K5, K8 und K12. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Literaturdaten [Borra *et al.* 2004], die eine Bevorzugung von K16 gegenüber den anderen Deacetylierungsstellen K5, K8 und K12 mit Sir2-Homologen (Sir2 aus Hefe und humanes SIRT2) beschreiben. Hingegen ist die Deacetylierung von K20 von Sirtuinen nicht beschrieben. Bisher ist in Metazoen nur die Methylierung



**Abbildung 3.1: NMR-basierter Deacetylierungsassay mit Sir2.1.** Untersuchung des spezifischen Verhaltens von rekombinanten Sir2.1 (2 μM) aus *C. elegans* mit (a) <sup>15</sup>Nε-isotopenmarkierten (Peptidsatz 1) bzw. (b) <sup>15</sup>Nα-isotopenmarkierten (Peptidsatz 2) H4-Substraten (200 μM) mittels 1D-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HMQC-NMR. Dargestellt sind links die 1D-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-Korrelationsspektren bzw. rechts die Reaktionsprofile.

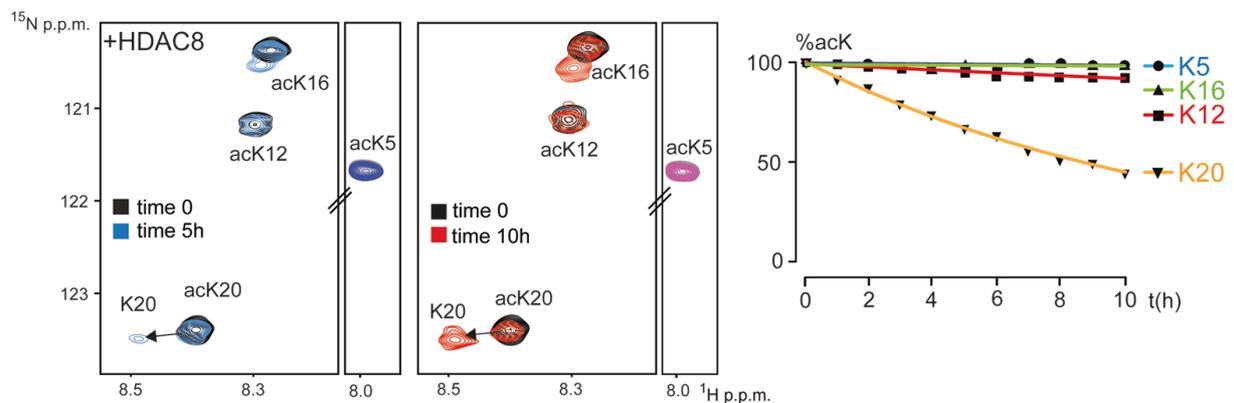
von K20 an Histon-H4, hauptsächlich in dimethylierter Form, intensiv studiert wurden [Phanstiel *et al.* 2008], sie spielt unter anderem eine bedeutende Rolle in der Erhaltung der genomischen Integrität [Pei *et al.* 2011]. Die Acetylierung wurde bisher nur in Pflanzen beschrieben [Zhang *et al.* 2007]. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch auch eine Identifizierung von H4-K20 als Acetylierungsstelle in menschlichen Krebszellen [Tang *et al.* 2014]. Die physiologische Relevanz bzw. die Funktion der Acetylierungsstelle H4-K20 in Säugetiersystemen ist momentan jedoch noch ungeklärt und bedarf weiterer Forschung.

Im Deacetylierungsassay mit *multi-site* HDAC-Super-Reporter 1 und Sir2.1 stehen die Acetylierungsstellen intramolekular in Konkurrenz. In einer Reihe von 2D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperimenten (Abb. 3.2) zeigte sich das gleiche Resultat wie schon bei den *single-site* Reporterpeptiden: eine deutliche Präferenz von K16 und K20 gegenüber den langsamen Stellen K5 und K8. Zusätzlich ist eine deutliche Selektivität zu beobachten, die langsamen Deacetylierungsstellen K5 und K12 zeigen nahezu gar keine Änderung des Acetylierungsniveaus. Dies deutet auf eine unterschiedlich starke Substrataffinität des Enzyms hin, eine Schlussfolgerung, die auch durch die Bestimmung von kinetischen Parametern mit anderen Sirtuinen unterstützt wird [Borra *et al.* 2004]. Zusätzlich verdeutlicht der Sir2.1-vermittelte Assay mithilfe nur eines Substrates und dem Einsatz von relativ geringen Mengen an Enzym die ökonomische Arbeitsweise. Dies stellt sich insbesondere dann als vorteilhaft heraus, wenn HDACs der Klassen I und II untersucht werden sollen, die nur schwer rekombinant zu erhalten sind [Fischle *et al.* 2002].



**Abbildung 3.2: NMR-basierter Deacetylierungsassay mit Sir2.1.** Untersuchung der intramolekularen Deacetylierungsreaktion mit dem *multi-site* HDAC-Super-Reporter 1 (200  $\mu\text{M}$ ) und rekombinanten Sir2.1 (2  $\mu\text{M}$ ) aus *C. elegans* mittels 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC-NMR. Dargestellt sind links die 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren bzw. rechts das Reaktionsprofil. (Abb. aus [Dose, Liokatis *et al.* 2011])

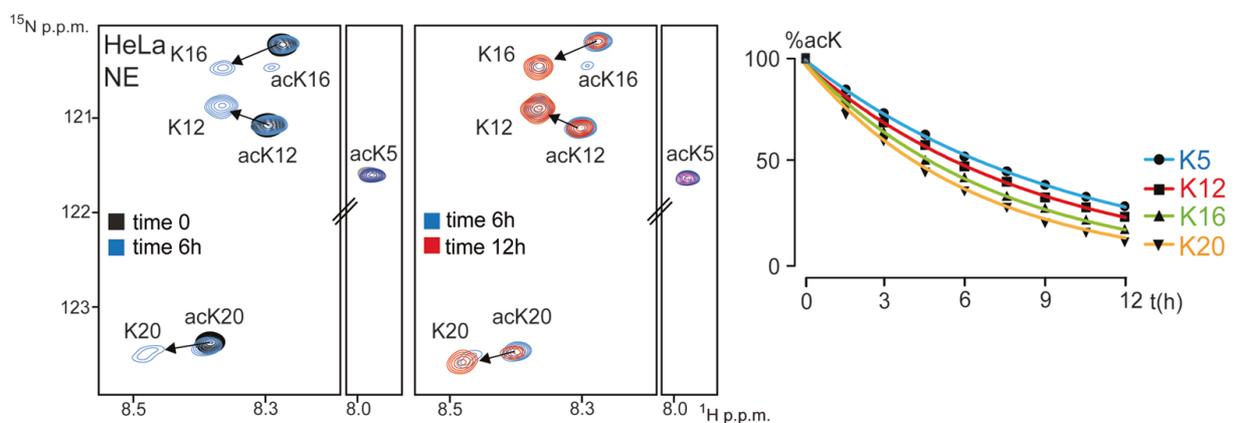
Die Untersuchung der Deacetylierungsreaktion des *multi-site* HDAC-Super-Reporters 1 mit dem rekombinanten Zn<sup>2+</sup>-abhängigen HDAC8 zeigte, dass die Deacetylase wesentlich langsamer, d. h. mit geringerer Aktivität als Sir2.1, H4 deacetyliert und dabei ausschließlich K20 modifiziert (Abb. 3.3). Die Frage ob der Histon-H4-*tail* generell von HDAC8 deacetyliert werden kann, ist strittig [Buggy *et al.* 2000; Hu *et al.* 2000; Van den Wyngaert *et al.* 2000]. Im Gegensatz zu den übrigen HDACs der Klasse I befindet sich HDAC8 nicht überwiegend im Zellkern, außerdem sind keine Multiproteinkomplexe, die für HDACs 1-3 typisch sind, von HDAC8 bekannt. Der Befund im Assay überrascht daher, da die Substratspezifität von HDAC8 in Bezug auf die Deacetylierung von Histonen allgemein in Frage steht und außerdem H4-K20 keine klassische Deacetylierungsstelle darstellt. Ein Erklärungsversuch ergibt sich in bei der Betrachtung des Sequenzkontextes von K20. Dieser weist im Histon H4 (Arg-His-Arg-**Lys**) eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenzumgebung von K382 des Tumorsuppressorproteins p53 auf (Arg-His-Lys-**Lys**). Diese Stelle ist dafür bekannt von Sirtuinen und HDAC8 deacetyliert zu werden [Gu und Roeder 1997; Vaziri *et al.* 2001; Fatkins und Zheng 2008]. Zusätzlich befindet sich K382 in p53 in einer relativ unstrukturierten C-terminalen Umgebung, welche mit dem Kontext von K20 im H4-*tail*-Peptid vergleichbar ist.



**Abbildung 3.3: NMR-basierter Deacetylierungsassay mit HDAC8.** Untersuchung der intramolekularen Deacetylierungsreaktion mit dem *multi-site* HDAC-Super-Reporter 1 (200  $\mu$ M) und humanen rekombinanten HDAC8 (15 U) mittels 2D-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HMQC-NMR. Dargestellt sind links die 2D-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-Korrelationspektren bzw. rechts das Reaktionsprofil. (Abb. aus [Dose, Liokatis *et al.* 2011])

Um zu demonstrieren ob der *multi-site* HDAC-Reporter auch von endogenen HDACs deacetyliert werden kann, wurde der HDAC-Super-Reporter 1 mit zellfraktionierten Kernextrakt aus humanen HeLa-Zellen inkubiert. Die 2D <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-Korrelationspektren und das Reaktionsprofil (Abb. 3.4) zeigen eine fortschreitende Deacetylierung an allen vier isotopenmarkierten Positionen (5, 12, 16, 20). Es zeigte sich, dass der H4-HDAC-Reporter auch in einer zellulären Umgebung von endogenen HDACs

deacetyliert wird. Es ist zu bemerken, dass K20 durchaus von p300/CBP *in vitro* acetyliert wird [Dose, Liokatis *et al.* 2011]. Inwieweit diese Befunde physiologische Bedeutung haben, d. h. ob K20 tatsächlich *in vivo* in Metazoen acetyliert bzw. deacetyliert wird, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Einen Ansatz der Begründung bietet der oben genannte Methylierungszustand von K20. *In vivo* könnte eine zelluläre Deacetylase-Aktivität dafür sorgen, dass diese Position ausschließlich für Methylierungen verfügbar bleibt. Zu erwähnen ist außerdem, dass der Histon-*tail* in der Natur als ein eingebetteter Bestandteil von Nukleosomen zu betrachten ist. Die unterschiedliche strukturelle Umgebung und die daraus eventuell folgende schlechte Zugänglichkeit von HATs und HDACs an die Position K20 schränkt die Vergleichbarkeit zwischen dem künstlichen Reporterpeptid und dem Histon-H4-*tail in vivo* ein.



**Abbildung 3.4: NMR-basierter Deacetylierungsassay in HeLa-Kernextrakt.** Untersuchung der intramolekularen Deacetylierungsreaktion mit dem *multi-site* HDAC-Super-Reporter (200  $\mu$ M) und endogenen HDACs in HeLa-Kernextrakten (5 mg/ml) mittels  $2D\text{-}^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC-NMR. Dargestellt sind links die  $2D\text{-}^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren bzw. rechts das Reaktionsprofil. (Abb. aus [Dose, Liokatis *et al.* 2011])

Mit dem Konzept der isopenmarkierten Reporterpeptide ist es ebenso möglich die HAT-Aktivität zu untersuchen. Mithilfe des nicht modifizierten *multi-site* HAT-Super-Reporter wurde das Acetylierungsverhalten der rekombinanten Histon-Acetyltransferase HAT1 aus Hefe untersucht [Dose, Liokatis *et al.* 2011]. Die Übertragung der Acetylgruppen an den Positionen K5 und K12 im Histon H4 von HAT1, die auch schon in der Literatur beschrieben worden ist [Verreault *et al.* 1998], konnte im Experiment bestätigt werden.

## 3.2 Kolorimetrischer HDAC-Assay

Für den Einsatz in kolorimetrischen HDAC-Assays sollte ein einfach und allgemein zu verwendendes Syntheseverfahren für Peptid-basierte HDAC-Substrate entwickelt werden [Dose, Jost *et al.* 2012]. Hierfür sollte das Chromophor 2,5-ANB zum Einsatz kommen, welches schon in anderen Trypsin-gekuppelten Assays [Spichalska *et al.* 2008; Wysocka *et al.* 2010] jedoch noch nicht explizit in HDAC-Assays zum Einsatz gekommen ist. Die Verwendung von 2,5-ANB erlaubt eine größere Flexibilität bei der Gestaltung von HDAC-Substraten; die umgebende Sequenz der Acetylierungsstelle insbesondere im C-terminalen Bereich findet im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen Substraten, wie z. B. AMC, eine größere Berücksichtigung. Die Verknüpfung an die schwach nukleophile Aminofunktion des Chromophors konnte mit *in situ* gebildeten Säurechloriden von Lysin-Bausteinen realisiert werden; gegenüber der Verwendung von vorgeformten Aminosäurechloriden liegt der Vorteil zudem in der leichten Lagerbarkeit der Aminosäuren. Für eine Optimierung der Umsetzungseffizienz ist alternativ die *in situ* Präparation von Aminosäurechloriden mittels Triphosgen (Bis(trichlormethyl)carbonat) für die Verwendung von „schwierigen“ Kupplungen in der Literatur beschrieben [Falb *et al.* 1999]; für die gewünschten Synthesezwecke erwiesen sich die erhaltenen Ausbeuten jedoch als völlig ausreichend. Zur Verhinderung der Razemisierung während der Säurechloridkupplung wurde DNBS als  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe eingesetzt. Aufgrund der einfach zu handhabenden und schnellen Abspaltung sowie der Orthogonalität gegenüber Boc- und Trityl-Gruppen erwies sie sich als hervorragend geeignete Schutzgruppe. Der Verlust der chiralen Integrität durch Oxazolombildung während der Umsetzung des Säurechlorids konnte somit unterbunden werden.

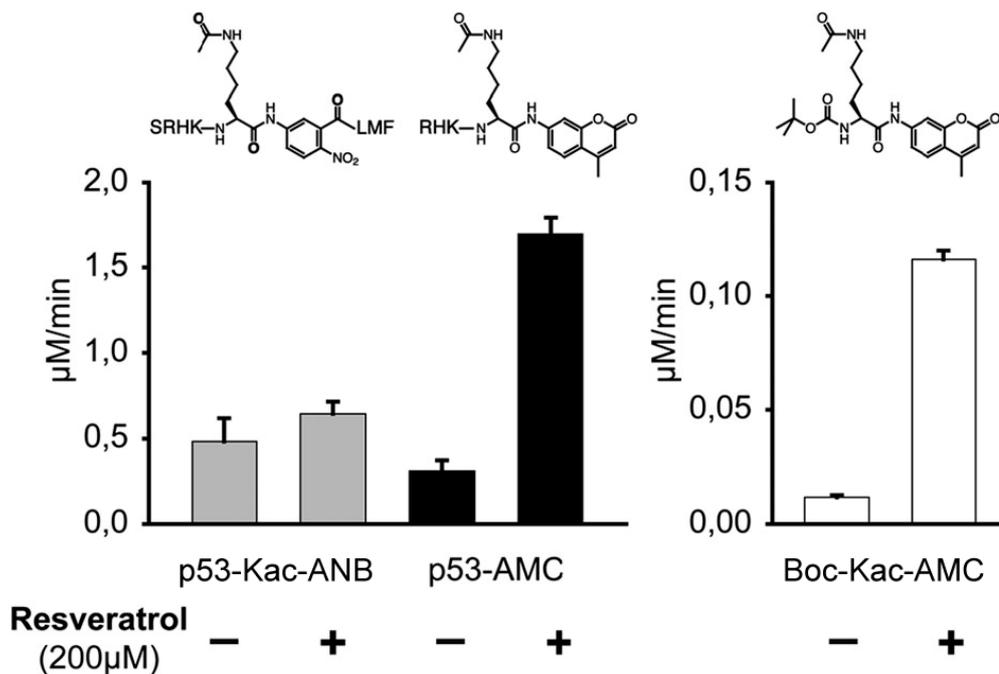
### 3.2.1 Deacetylierung von p53-K382ac

Das Peptid p53-Kac-ANB konnte erfolgreich als HDAC-Substrat mit rekombinanten Sir2.1 aus *C. elegans* eingesetzt werden. Unter der Durchführung von Jan Oliver Jost wurde die Deacetylierung sowohl mit Hilfe der HPLC als auch mittels optischen Auslesens (bei 405 nm) per Kolorimetrie verfolgt. Im Vergleich mit dem kommerziell erhältlichen HDAC-Substrat p53-AMC konnten mit dem Peptid p53-Kac-ANB in Deacetylierungsversuchen mit dem menschlichen Sir2.1-Homolog SIRT1 ähnliche Ergebnisse mit vergleichbaren kinetischen Parametern erzielt werden (Abb. 3.5) [Dose, Jost *et al.* 2012].

Der beobachtete Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentrationen von SIRT1 und homologen Enzymen und einem verlängerten zellulären Alterungsprozess [Guarente und Kenyon 2000] führte auf der Suche nach einem molekularen Aktivator zur Entdeckung des Polyphenols Resveratrol [Howitz *et al.* 2003]. Obgleich der physiologische Effekt umstritten ist, scheinen neueste Ergebnisse die Wirkung

von Resveratrol als Aktivator auf Sirtuine zu bestätigen [Hubbard *et al.* 2013], dabei ist der Effekt der SIRT1-Aktivierung jedoch stark abhängig von der Substratsequenz und nur bei einer geringen Anzahl von Substraten beobachtet worden [Lakshminarasimhan *et al.* 2013].

Anfangs deuteten Experimente darauf hin, dass die Aktivierung hauptsächlich aufgrund von großen hydrophoben Fluorophoren wie AMC in den Assay-Substraten zustande kam [Kaeberlein *et al.* 2005]. Diese Beobachtung konnte in Versuchen mit dem neuen Substrat bestätigt werden. Tatsächlich konnte beim Vergleich von p53-Kac-ANB mit den beiden kommerziell erhältlichen Substraten p53-AMC und Boc-Kac-AMC in einer SIRT1 katalysierten Reaktion in Gegenwart von Resveratrol eine 5 bis 7-fach erhöhte Deacetylierungsrate bei p53-AMC und Boc-Kac-AMC beobachtet werden. Bei dem Substrat p53-Kac-ANB konnte hingegen keine nennenswerte Steigerung der Rate festgestellt werden; eine artefaktische Aktivierung durch Resveratrol blieb aus (Abb. 3.5) [Dose, Jost *et al.* 2012].



**Abbildung 3.5: SIRT1-Aktivierung mit Resveratrol.** Deacetylierungsraten mit 100 µM p53-Kac-ANB, p53-AMC und Boc-Kac-AMC (Abb. mod. aus [Dose, Jost *et al.* 2012]).

### 3.3 Hydroxamat-basierte HDAC-Sonden

Für die Sondierung von Zink-abhängigen Histon-Deacetylasen aus komplexen Proteingemischen sollte ein Affinitäts-Pulldownsystem entwickelt werden. Das Modell beruht auf der großen inhibitorischen Wirksamkeit der Hydroxamsäure gegenüber den HDACs und dessen Einbettung in eine auf einer bekannten Acetylierungsstelle basierenden peptidischen Erkennungssequenz. Um eine spezifische HDAC-Bindung zu verwirklichen, galt für das Design der Sonden der Einbau einer Hydroxamatfunktion in ein gewünschtes Peptid als Vorgabe. Darüber hinaus sollten die HDAC-Sonden mit unterschiedlichen Linkerlängen, d. h. mit einer variierenden Anzahl (2-5) von Methylengruppen in der Seitenkette, synthetisiert werden. Die Methoden für die Synthese von biologisch aktiven Hydroxamatverbindungen sind vielfältig [Ugwu *et al.* 2014], z. B. können mittels Festphasensynthese [Krchňák 2006] Hydroxamate in fast beliebiger Position in das gewünschte Molekül inkorporiert werden. Ebenso sind Synthesewege für Hydroxamatderivate der 2-Aminosuberinsäure mit verschiedenen Schutzgruppen in der Literatur bekannt [Belvedere *et al.* 2007; Liu *et al.* 2007; Wilson *et al.* 2013]. Das für diese Arbeit gewählte Verfahren der vorgeformten Aminosäuren-Bausteine (Apm und Asu) mit geschützter Hydroxamateinheit ausgehend von kommerziell erhältlichen Aminodicarbonsäuren erwies sich als komfortable Methode für den Einbau in das Peptid, die gewählten orthogonalen Schutzgruppen gestatten dabei eine stabile und einfache Handhabung. Insbesondere die Bildung des Oxazolidinonrings mittels Mikrowellenreaktion zum Schutz der  $\alpha$ -Carboxylgruppe stellt eine schnellere und verbesserte Methode gegenüber der abgeleiteten Originalvorschrift [Liu *et al.* 2007] dar. Ebenso konnte zur Umgehung der unerwünschten Cyclisierungsreaktion im Falle des Aad-Bausteins erfolgreich eine Alternative in Form eines Vorläufer-Bausteins gefunden werden.

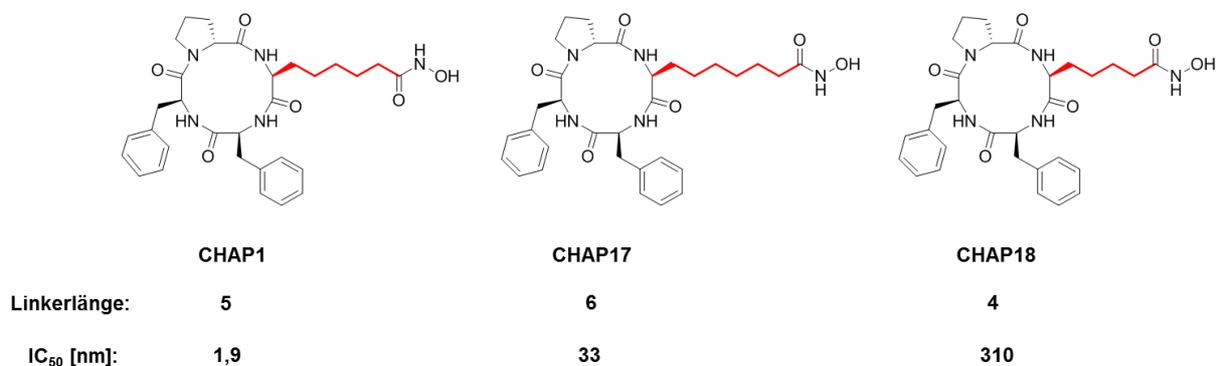
In Hinblick auf einen möglichen Einsatz der HDAC-Sonden in Peptid-Mikroarrays sollte jedoch über eine Neugestaltung der Schutzgruppenwahl bzw. des Synthesewegs nachgedacht werden. Für den Gebrauch der Bausteine in der vollautomatisierten Fmoc/*t*Bu-basierten Festphasenpeptidsynthese ist ein Austausch der Schutzgruppe von Alloc hin zu Fmoc für die  $\alpha$ -Aminofunktion zu empfehlen. Ein Hindernis stellte zudem auch die Verwendung von *t*-Butyl für die Schützung des Hydroxamatrests dar. Die schwierigen Abspaltungen mit langer Dauer (> 16 h) und dem Einsatz von ausschließlich frischen TFA-Lösungen sind in der Literatur bekannt [Hanessian *et al.* 1999]. Für eine Optimierung des Synthesewegs mit mildereren Bedingungen bietet sich hier der Gebrauch der Tritylgruppe an [Yang *et al.* 2007].

### 3.3.1 HDAC-Interaktion in humanen Zellextrakten

Für die Identifizierung von spezifischen HDACs wurden Pulldown-Experimente unter Verwendung der modifizierten, Hydroxamat-basierten, und der entsprechenden unmodifizierten Sonde durchgeführt. Die Eignung des Systems wurde in Pulldown-Experimenten mit Hydroxamatpeptiden, abgeleitet vom C-terminalen Ende des Tumorsuppressorproteins p53, in rekombinanten HDAC8-Zelllysat aus *E.coli* bzw. in HeLa-S3-Zelllysat festgestellt.

Eine semiquantitative Profilerstellung aller 11 Zn<sup>2+</sup>-abhängigen HDACs in HeLa-Zellfraktionen (Kern und Cytosol) gab Aufschluss über deren Verteilung bzw. Expression (siehe Abb. 2.14). Die überwiegend im Kern lokalisierten HDACs der Klasse I (HDAC8 in beiden zellulären Komponenten) entsprachen den Erwartungen [Waltregny *et al.* 2004]. Bei den HDACs der Klasse II und IV ist es bekannt, dass sie basierend auf der Interaktion mit 14-3-3 Proteinen zwischen Kern und Cytoplasma pendeln [Verdin *et al.* 2003], was sich auch in der variierenden subzellulären Verteilung widerspiegelt.

Für die Selektivität der Bindung zwischen Sonde und HDAC ist nicht nur die Peptidsequenz, sondern auch die Länge des Linkers zwischen Erkennungs- und Metall-Bindungsdomäne von Bedeutung. Zu diesem Zweck dienten die Pulldown-Experimente mit den Minimalsonden; der Hydroxamatrest ist dazu mit einer kurzen unspezifischen Peptidsequenz über einen Linker mit unterschiedlicher Anzahl von Methylengruppen (2-5) verbunden. Zu beobachten war hierbei eine Steigerung der Affinität bei zunehmender Länge der Seitenkette insbesondere bei HDAC1-3, 6 und 8. Dieses Ergebnis ist in Korrelation mit der Erwartung, dass der Linker einer gewissen Länge genügen muss, um eine optimale Bindung des Hydroxamatrests im katalytischen Zentrum zu ermöglichen. Diverse Untersuchungen mit HDAC-Inhibitoren zeigten, dass die Linkerlänge zwischen den Domänen eine entscheidende Rolle für die optimale Inhibition der HDACs spielt [Jung *et al.* 1999; Furumai *et al.* 2001; Oanh *et al.* 2011], wobei eine Kettenlänge von fünf Methyleneinheiten ein Optimum für die maximale Effizienz darstellt (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6: Einfluss der aliphatischen Kettenlänge auf die HDAC1-inhibitorische Wirksamkeit von CHAP1.** Fünf Methyleneinheiten gelten als optimale Linkerlänge für eine ideale Wirkstärke [Furumai *et al.* 2001].

Durch Hinzufügen eines Sequenzkontexts machte sich der Unterschied zu den Minimalsonden bemerkbar. Dies zeigte sich deutlich in den Pulldown-Experimenten mit den p53-Sonden. Bei wesentlich geringeren Konzentrationen des eingesetzten Zelllysats konnte bei allen detektierbaren HDACs eine erhöhte Affinität beobachtet werden. Speziell die HDACs der Klasse I zeichneten sich durch eine ebenfalls hohe Anreicherung an kurz-kettigen Sonden aus. Vorallem HDAC1-3 zeigten eine deutliche Affinität an die p53-Sonde gegenüber der Minimalsonde, im Gegensatz zu HDAC6 und HDAC8, welche bei gleichen Bedingungen ähnliche Anreicherungen an beide Sonden aufwiesen. Bei HDAC6 und HDAC8 scheint sich die Affinität zu den Sonden weniger aufgrund des Sequenzkontexts, sondern primär aus der Hydroxamatfunktion abzuleiten. Ebenso deutet die starke Anreicherung an der Negativkontrolle (p53-Lys) bei HDAC1 und HDAC3 darauf hin, dass die Ursache der HDAC-Interaktion mit der Sonde wesentlich in der Peptidsequenz begründet liegt.

Trotz einer geringeren Aktivität zu kurz-kettigen Hydroxamaten (Aad-Sonde) ermöglichte der Peptidkontext in Form der p53-Sequenz den Sonden einen beträchtlichen Affinitätszugewinn. Diese Eigenschaft gestattet somit eine Aussage über die Selektivität: diejenigen Histon-Deacetylasen die an der kurzen Sonde (Aad) angereichert wurden, erwiesen sich somit als die effizientesten Binder. Je kürzer und somit restriktiver der Linker gestaltet ist, desto mehr sollte sich auch die Spezifität der Sonde erhöhen. Obgleich der Expressionsspiegel und somit die Konzentrationen von endogenen HDACs in tumorhaften Zellen voneinander abweichen, kann das unterschiedliche Bindungsverhalten der HDACs zusätzlich durch die Konkurrenz untereinander bestimmt werden. HDACs mit stärkerer Affinität zu den Sonden besetzen diese und machen sie so weniger zugänglich für HDACs mit schwächeren Bindungsvermögen.

Als Beispiel für den Einfluss der Sequenzumgebung des Hydroxamatrests dienten Untersuchungen mit NTF2-Sonden, die sich erheblich von der Sequenz von p53 unterscheiden. Über modifizierende Enzyme der gefundenen Acetylierungsstelle K4 [Choudhary *et al.* 2009] sind bisher keine Informationen bekannt. Die Pulldown-Experimente zeigten, dass keine der ausgewählten HDACs mit der restriktiven Aad-Sonde isoliert werden konnte. Augenfälligster Unterschied in der Sequenzumgebung ist die benachbarte Position -1, die hier im Gegensatz zu den p53-Sonden (K381) einen sauren Aspartatrest aufweist. Spezifische Positionen von Aminosäuren scheinen einen signifikanten Einfluss auf die Substraterkennung von kleinen Peptiden zu haben. Tatsächlich scheint ein positiv geladener Rest in N-terminaler Position zumindest für HDAC8 sowie dessen Isoenzyme der Klasse I bevorzugt zu sein. Untersuchungen der Selektivität von HDAC8 mittels kleinen Peptidsubstraten ergaben, dass Arginin in -1 Position einen positiven Effekt auf die Aktivität hat [Gurard-Levin *et al.* 2009]. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte auch, dass das RHR-Motiv am C-Terminus der Peptidsubstrate eine Erhöhung der HDAC8-Aktivität bewirkt [Gurard-Levin und Mrksich 2008]. Wie schon oben erwähnt ist die RHR-Sequenz im Histon-*tail* H4 (RHRK) wie auch in ähnlicher Form in p53 (RHKK) zu finden. Zusammen

deutet dies darauf hin, dass spezifische Positionen von Aminosäuren in der lokalen und erweiterten Umgebung die Reaktivität von HDAC8 mit diesen Substraten *in vivo* verstärken.

Für die Identifizierung und Quantifizierung von hydroxamatspezifischen Histon-Deacetylasen und anderen unbekanntem Interaktionspartnern der p53-Sonde wurden Affinitäts-Pulldown-Experimente in SILAC-markiertem HeLa Kern- bzw. Cytosolextrakt durchgeführt. Primär sollten die SILAC Pulldown-Experimente für die Feststellung der prinzipiellen Eignung der Hydroxamatpeptide als proteomische Sonden dienen. Die Auftrennung der Experimente in beide Zellkompartimente (p53 ist sowohl im Kern als auch im Cytosol aktiv) sollte Einblicke über mögliche Aktivitätsunterschiede der HDACs gewähren. Unter der Vielzahl der gebundenen hydroxamatspezifischen Proteine konnte in beiden Experimenten HDAC8 als einzige hochangereicherte Histon-Deacetylase verifiziert werden. Zu den weiteren detektierten Histon-Deacetylasen zählen HDAC1-3 und 6 im nuklearen Extrakt bzw. HDAC1 und HDAC6 im cytosolischen Extrakt, die Anreicherungsverhältnisse sind hier jedoch wesentlich geringer bzw. erfüllen zum Teil nicht den Auswahlkriterien der Quantifizierung.

Auffällig ist in beiden Experimenten die insgesamt große Anzahl an hochangereicherten hydroxamatspezifischen Bindungspartnern. Ein Überblick ergab keine bereits beschriebene Zuordnung dieser Proteine zu Bestandteilen von Multiproteinkomplexen bzw. zu vorhergesagten Interaktionen mit Histon-Deacetylasen. Eine Erklärung dafür könnten unspezifische Bindungen sein; viele der identifizierten Proteine könnten aufgrund von Interaktionen mittels Sekundärbindungen zu Nucleinsäuren (z. B. zellulärer RNA) angereichert worden sein. Um diese falsch-positiven Protein-Interaktionen zu unterdrücken, bietet sich für zukünftige SILAC-Pulldown-Experimente der Gebrauch von mikrococcaler Nuklease an, die eine Spaltung von einfach- und doppelsträngige DNA und RNA bewirkt [Nguyen und Goodrich 2006].

Die hochangereicherten Proteine METTL1, PUS1, NSUN2, TRMT1 und TRMT6 können als tRNA-assoziierte Proteine zusammengefasst werden; über STRING-Datenbankanalysen (Version 10) konnte eine Interaktion über die Pseudouridinsynthetase 1 (PUS1) festgestellt werden. Diese Bindung ist zuvor an acetylierten Histon-*tails* in vergleichbaren Pulldown-Experimenten beschrieben worden [Lang 2012]. Die Ursache im Hydroxamat-Pulldown bleibt unklar, die genannte mögliche Erklärung der strukturellen Ähnlichkeit des Uracils zu acetylierten Lysinresten [Lang 2012] lässt sich durchaus auch auf den Hydroxamatrest übertragen.

Die Ergebnisse verleiten zu der Hypothese von HDAC8 als bevorzugte Deacetylase für p53-K382ac und verlangen daher nach einer genauen Betrachtung der Reaktionsbedingungen. Ein wichtiger Punkt stellt dabei die Extraktkonzentration (Input) dar. Die eingesetzten Konzentrationen von 5 mg/ml, die über den verwendeten Extraktmengen für die Western Blot Analyse liegen, erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Anreicherung von hoch abundanten Proteinen bzw. unspezifischen Bindern. Für zukünftige Pulldowns könnte eine Verringerung der Konzentration diesen Nachteilen entgegenwirken. Zusätzlich

stellt sich die Frage welche der Sondeneigenschaften, Sequenzumgebung oder Hydroxamatfunktion, ausschlaggebend für die hohe HDAC8-Affinität ist. Diese Problematik konnte mittels einem Vergleich zwischen den Sonden mit identischen Hydroxamatresten und unterschiedlichen Peptidsequenzen in weiterführenden Pulldown-Experimenten und anschließender LC-MS/MS-Analyse behandelt werden [Dose, Sindlinger *et al.* 2015]. Im Vergleich der Sonden mini-Asu-Hydroxamat und mini-Lys (Untersuchung des Hydroxamateinflusses) konnte eine starke Anreicherung von HDAC8 und HDAC6 sowie eine moderate Anreicherung der HDACs 1-3 an die Hydroxamat-basierte Sonde bestätigt werden. Der Vergleich zwischen p53-Asu und mini-Asu (Untersuchung des Sequenzeinflusses) bestätigte hingegen keinerlei Anreicherung von HDAC6 und 8, jedoch noch immer eine signifikante Anreicherung von HDAC1 und 2 an die p53-Sonde. Diese Befunde unterstützen die Beobachtungen der Western Blot Analysen und deuten darauf hin, dass die Anreicherung von HDAC8 größtenteils Hydroxamat-gesteuert ist. Die Substraterkennung der HDACs wird jedoch ebenso über den Sequenzkontext der Sonden reguliert. Im Zusammenwirken dieser beiden Funktionen scheint sich daher eher das Bild abzuzeichnen, dass die HDACs 1-3 als wesentliche Deacetylasen für p53-K382ac verantwortlich sind [Dose, Sindlinger *et al.* 2015].

Die Pulldown-Experimente mit den p53-Sonden werfen die Frage nach der physiologischen Signifikanz der Ergebnisse auf. p53 hat als Tumorsuppressorprotein u. a. die Funktion bei Zellen die in Gefahr sind kanzerös zu werden den Zellzyklus-Arrest auszulösen oder die Apoptose einzuleiten [Zilfou und Lowe 2009]. Ersteres erfolgt, indem p53 als Transkriptionsfaktor die Produktion des Proteins p21 induziert, einem Inhibitor für cyclin-abhängige Kinasen, welche für die Kontrolle des Zellzyklus verantwortlich sind. Ist eine DNA-Reparatur nicht möglich, führen Wechselwirkungen mit den Genen der Bcl-2-Familie, u. a. dem Apoptose-Regulator BAX, zum programmierten Zelltod. In gesunden Zellen ist p53 auf niedrigem Level exprimiert und wird vom regulatorischen Protein MDM2 durch negative Rückkopplung kontrolliert. Die E3-Ligase MDM2 vermittelt dabei die Ubiquitinierung von p53 was zum Kernexport und proteasomalen Abbau führt. Phosphorylierungen hauptsächlich an N-terminalen Resten beeinflussen dabei die Bindung von MDM2 an p53 und regulieren somit die Ubiquitinierung an C-terminalen Lysinresten [Toledo und Wahl 2006]. Die Acetylierung dieser Reste am C-Terminus durch p300/CBP [Liu *et al.* 1999] wiederum verhindert die Ubiquitinierung [Bode und Dong 2004]. Eine Erhöhung des Acetylierungsgrades korreliert somit mit der Stabilisierung und Aktivierung von p53 in Antwort auf zellulären Stress [Tang *et al.* 2008; Brooks und Gu 2011]. Die Deacetylierung spielt daher möglicherweise eine bedeutende Rolle in der Runterregulierung der transkriptionellen Aktivität von p53. Tatsächlich sind HDAC-Komplexe bekannt, die imstande sind p53 zu deacetylieren und dabei die p53-abhängigen Transkriptionsvorgänge, welche zu Zellzyklus-Arrest und Apoptose führen, zu unterdrücken [Reed und Quelle 2015]. Dokumentierte HDACs die p53, speziell auch die Position K382, deacetylieren sind HDAC1 [Luo *et al.* 2000; Ito *et al.* 2002] und SIRT1 [Vaziri *et al.* 2001]. Zusätzlich

stehen ebenfalls HDAC2 und 3 [Juan *et al.* 2000] sowie HDAC6 [Ding *et al.* 2013] im Verdacht die p53-Acetylierung zu regulieren, obgleich hier noch mehr Nachweise bezüglich dieser Interaktionen und dessen biologischer Signifikanz benötigt werden. Die Ergebnisse aus den Pulldown-Experimenten via Western Blot und SILAC deuten auf HDACs der Klasse I (1, 2, 3 und 8) und HDAC6 als bevorzugte Deacetylasen für p53 hin und stimmen somit überwiegend mit den bekannten Beobachtungen überein. Zelluläre Daten über HDAC8-Katalyse von p53 *in vivo* sind spärlich und die tatsächliche physiologische Bedeutung von HDAC8 als Deacetylase von p53 ist bisher nicht sicher begründet. Es ist eher zu vermuten, dass diese Rolle gleich mehrere HDAC-Isoenzyme abhängig von subzellulärer Lokalisation und Expressionslevel übernehmen können. SIRT1 ist ein ebenfalls wichtiger Regulator von p53, u. a. als Antagonist der p53-vermittelten zellulären Seneszenz [Langley *et al.* 2002]. Als Vertreter der Sirtuine ist SIRT1 als NAD<sup>+</sup>-abhängiger HDAC jedoch immun gegen Hydroxamatinhibition und kann somit nicht mit dem Pulldown-System isoliert werden. Interessanterweise wurden auch HDAC4 und 5 an p53-Asu angereichert gefunden, nicht aber an den mini-Sonden (Abb. 2.14). Die physiologische Relevanz dieser Beobachtung ist noch unklar, es könnte sich aber um sekundäre Binder handeln, die mit HDAC3 co-angereichert wurden [Lahm *et al.* 2007].

### 3.4 Methodenvergleich und Ausblick

Das Forschungsfeld der Lysin-Acetylierung hat sich aufgrund technologischer Fortschritte (siehe Kapitel 1.4) in den letzten Jahren rapide entwickelt. Eine besondere Herausforderung stellen dabei Fragen dar, welche die HDACs, die regulierenden Enzyme des Acetyloms, adressieren. Insbesondere der Zugang zum Wissen über die bevorzugte Acetylierungsstelle und die Vermittlung von Substratspezifität gilt aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit von Zink-abhängigen HDACs bzw. deren Einbettung in Multiproteinkomplexe als erschwert. Wie auch die in dieser Arbeit vorgestellten Bioassays, weisen die methodischen Ansätze diese Fragestellungen zu bearbeiten eine enorme Vielfalt auf und sind mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen behaftet.

Einen Ansatz für die Erforschung von HDAC-Substraten bietet das Acetylom *mapping* [Choudhary *et al.* 2009; Schölz *et al.* 2015]. Unter Einsatz von HDAC-Inhibitoren kann auf diese Weise eine Bestimmung des Lysin-Acetyloms von Zellen oder Organismen ermöglicht werden. Herausragend ist hierbei die Identifizierung von tausenden Acetylierungsstellen in nur einem gleichwohl technisch anspruchsvollen Experiment. Eine besondere Herausforderung stellt jedoch die oft niedrige Stöchiometrie der globalen Acetylierung, vor allem im Vergleich zur Phosphorylierung, dar [Baeza *et al.* 2014; Choudhary *et al.* 2014]. Zusätzlich sind diese Experimente abhängig von vorgeschalteten HAT-Aktivitäten. Eine weitere Einschränkung besteht in der Spezifität der verwendeten Anti-Acetyllysin-Antikörper für die

Anreicherung der acetylierten Peptide. Das Hauptproblem besteht in der vollständigen Erkennung von sämtlichen Acetylierungsstellen, wobei insbesondere die flankierenden Aminosäurenreste Einfluss auf die Erkennung haben. Zudem kann mit den existierenden Antikörpern keine gleichbleibend hohe und konsistente Zielspezifität und Anreicherungseffizienz erzielt werden, was wiederum Einfluss auf die experimentelle Reproduzierbarkeit hat und somit eine Interpretation der Ergebnisse erschwert [Egelhofer *et al.* 2011; Choudhary *et al.* 2014]. Derzeitige Anstrengungen konzentrieren sich daher auf die Entwicklung von verbesserten panspezifischen Anti-Acetyllysine-Antikörpern, die Optimierung von Parametern in der Anwendung der Antikörper [Svinkina *et al.* 2015] oder die Verwendung von alternativen Anreicherungsverfahren, wie z. B. bioorthogonale chemische Reporter als Analoga zu Acetyl-CoA [Yang *et al.* 2010]. Ein weiteres Problem besteht in der stark unterschiedlichen Spezifität der HDAC-Inhibitoren. Hierfür sind besonders Studien über die Evaluierung von Inhibitor-Spezifitäten auf der Ebene von betroffenen Acetylierungsstellen in menschlichen Zellen äußerst hilfreich [Schölz *et al.* 2015].

Deacetylierungsassays basierend auf Peptid-Microarrays sind ebenfalls leistungsstarke Methoden um HDAC-Spezifität und -Substrate im großen Umfang parallel zu untersuchen, z. B. konnten Rauh *et al.* (2013) Deacetylierungsprofile für die humanen Sirtuine Sirt1-7 von über 6800 Acetylierungsstellen beschreiben. Von Vorteil ist hierbei im Gegensatz zum Acetylom *mapping* die Unabhängigkeit von jeglicher HAT-Aktivität, die Peptide werden direkt in acetylierter Form generiert. Eine Charakterisierung insbesondere Zink-abhängiger HDACs ist jedoch extrem eingeschränkt, die Enzyme sind, wenn überhaupt, nur in rekombinanter Form bzw. ohne Einbettung in Multiproteinkomplexe erhältlich. Zudem ist auch mit dieser Methode die experimentelle Genauigkeit durch die Abhängigkeit von der Qualität der spezifischen Anti-Acetyllysine-Antikörper eingeschränkt; Rauh *et al.* (2013) konnten in Acetylom-Microarray-Experimenten nur mit einer optimierten Mischung aus drei Antikörpern eine Erkennung von annähernd allen Microarray-Peptiden ermöglichen.

Im Gegensatz zu den beiden genannten Methoden bieten die Hydroxamat-basierten HDAC-Sonden keine Untersuchungen über das gesamte Lysin-Acetylom, der Vorteil liegt hier vielmehr in der Erforschung der Selektivität und Redundanz von endogener Deacetylase-Aktivität der schwer zugänglichen Zink-abhängigen HDACs (Kapitel 3.3.1). Eine Quantifizierung ist hier aufgrund der Methodik nur relativ möglich, dafür bietet der vorgestellte Ansatz keine Einschränkungen aufgrund von Abhängigkeiten der Acetyllysine-Antikörpern. Die Verwendung proteomischer Methoden erlaubt zudem die Untersuchung der Zusammensetzung von HDAC-Komplexen [Dose, Sindlinger *et al.* 2015]. Die entwickelten Peptid-basierten HDAC-Sonden ermöglichen zudem ein breites Anwendungsspektrum für zukünftige Untersuchungen. Die Verknüpfung zwischen Hydroxamat als HDAC-Inhibitor und dem Sequenzkontext gilt als das Hauptmerkmal dieser HDAC-Sonden, daher bieten sich Variationen beider Komponenten an. Die SPPS erlaubt nicht nur einen einfachen Zugang

für Untersuchungen von weiteren interessanten Acetylierungsstellen, ebenso können Sonden generiert werden, welche zusätzliche PTMs tragen. Ferner lassen sich nicht alle Zink-abhängigen HDACs gleichermaßen stark von nur einer Substanzklasse inhibieren, demzufolge kann ein Austausch der Hydroxamateinheit mit anderen Klassen von HDAC-Inhibitoren, wie Benzamide, elektrophile Ketone oder Hydroxamate mit cyclischen bzw. aromatischen Linkern zusätzlichen Aufschluss über die Spezifität von HDACs geben. Die Herausforderung besteht hierbei in der Synthese der entsprechenden geschützten Bausteine für die SPPS.

Für die Untersuchung von HDAC-Aktivität eignen sich die klassischen *in vitro*-Assays, welche auf Detektion mittels Radioaktivität oder Fluoreszenz beruhen, als hervorragende und vielseitige Methoden, insbesondere für Anwendungen in Hochdurchsatz-Screenings von neu entwickelten Wirkstoffen wie z. B. HDAC-Inhibitoren [Hauser *et al.* 2009; Minoshima und Kikuchi 2015]. In diesem Einsatzgebiet sind die Vorteile der beiden Assays zu sehen, die in dieser Arbeit entwickelt wurden. Beide Methoden ermöglichen eine Auswertung bzw. Bestimmung der Aktivität und Substratspezifität verschiedener HDACs sowie deren enzymkinetischen Parametern.

Der Einsatz von neuen Substraten für das kolorimetrische Auslesen von HDAC-Aktivität (Kapitel 3.2.1) bietet vor allem eine höhere Flexibilität in der Gestaltung von Peptid-basierten Substraten im Vergleich zu den weit verbreiteten kommerziell erhältlichen fluorogenen Fluor-de-Lys<sup>®</sup>-Sonden.

Obschon technisch anspruchsvoller im experimentellen Aufbau, befähigt der NMR-spektroskopische HDAC-Assays auf Basis von isotoopenmarkierten Reporterpeptiden die Beobachtung von mehreren Deacetylierungen gleichzeitig. Mit diesem Assay konnte das Deacetylierungsverhalten von Sir2.1 und HDAC8 *in vitro* sowie von endogenen HDACs aus nuklearen HeLa-Zellextrakten am Histon-H4-*tail* aufgeklärt werden (Kapitel 3.1.1). Vorteilhaft gegenüber den konventionellen Assays ist hierbei, dass die Reaktionen unmittelbar, zeitaufgelöst und zudem quantitativ verfolgt werden kann. Darüber hinaus ist, wie schon weiter oben erwähnt, diese Methode auch auf das Verfolgen von weiteren posttranslationalen Modifizierungsreaktionen anwendbar.

Im Bereich der Chromatinforschung wären Untersuchungen im nukleosomalen Kontext u. a. mit einer Verknüpfung von isotoopenmarkierten Histon-*tails* mit den Histonproteinen mithilfe semisynthetischer Ansätze wie z. B. der nativen chemischen Ligation denkbar. Unter diesen nahezu physiologischen Bedingungen, vor allem in Gegenwart von DNA, könnten so genauere Aufschlüsse über das Acetylierungs- bzw. Deacetylierungsverhalten der HATs und HDACs gewonnen werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Allgemeines

#### 4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), VWR International GmbH (Darmstadt), Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Merck KGaA (Darmstadt) und Biosolve BV (Valkenswaard, Niederlande) in der Qualität „Reinst“ (p.A.) bezogen.

Die Standard-Fmoc-Aminosäuren wurden von GLS (Shanghai, China), die isotopenmarkierten Aminosäuren von Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA), Pseudoprolin-Bausteine von Novabiochem (Merck KGaA, Darmstadt) und alle weiteren Aminosäurederivate von Bachem Distribution Services GmbH (Weil am Rhein) bezogen.

Aktivierungsreagenzien für die Peptidsynthese wurden von Iris Biotech GmbH (Marktredwitz) bzw. von Novabiochem bezogen.

#### 4.1.2 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Glasplatten der Marke DC Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck Millipore, Darmstadt) verwendet. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte unter UV-Belichtung bei 254 nm bzw. in einer mit Ioddampf gesättigten Gefäßkammer (Iodkammer).

#### 4.1.3 HPLC

Für die analytische HPLC wurde ein ProStar 210 HPLC System (Varian, Agilent Technologies, USA) bzw. ein LC10 System (Shimadzu Corp., Japan) unter Verwendung einer Nucleosil C18-Säule (4.6 x 250 mm, 5 µm, Machery-Nagel, Dürren) benutzt. Die Elution erfolgte unter folgenden Bedingungen: Laufmittel A (0.1 % TFA in Wasser, v/v), Laufmittel B (0.1 % TFA + 80 % ACN in Wasser, v/v/v), der lineare Gradient betrug entweder 5-95 % B in 40 min mit einer Flussrate von 1 ml/min (Varian-System) oder 5-95 % B in 20 min mit einer Flussrate von 1.5 ml/min (Shimadzu-System). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 218 nm.

Die präparative Reinigung der Aminosäuren-Bausteine und Peptide erfolgte an einem Varian ProStar 210 HPLC System ausgerüstet mit einer semipräparativen VariTide RP-Säule (10 x 250 mm, 6 µm, Varian), einer semipräparativen Reprosil 100 C18-Säule (10 x 250 mm, 5 µm, Dr. Maisch GmbH) bzw. einer präparativen Dynamax C18-Säule (21.4 x 250 mm, 10 µm, Varian). Es wurden folgende Bedingungen verwendet: Laufmittel A (0.1 % TFA in Wasser, v/v), Laufmittel B (0.1 % TFA + 80 % ACN in Wasser, v/v/v), der lineare Gradient betrug 5-95 % B in 40 min mit einer Flussrate von 4 ml/min (VariTide RP und Reprosil 100) bzw. 13 ml/min (Dynamax C18). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 218 nm. Die gereinigten Fraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet. Die erhaltenen Lyophilisate wurden bei -20°C gelagert.

#### **4.1.4 Massenspektrometrie**

Die Peptide und Aminosäuren-Bausteine wurden zwecks Charakterisierung mithilfe von MALDI- und ESI-MS analysiert. MALDI-Spektren wurden an einem MALDI-TOF-TOF-Instrument (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, USA) aufgenommen. Als Matrixlösung wurde  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure (5 mg/ml in 50 % ACN in Wasser, v/v) verwendet. ESI-Messungen wurden an einem Mariner ESI-TOF (PerSeptive Biosystem) durchgeführt. Die Probe wurde in einer Lösung aus 0.1 % Ameisensäure + 50 % ACN in Wasser (v/v/v) injiziert und im positiven Ionenmodus gemessen.

#### **4.1.5 NMR-Spektroskopie**

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopischen Experimente für die Charakterisierung der Aminosäurenderivate wurden an den Geräten AV-300 MHz und DRX-250 MHz der Firma Bruker (Rheinstetten) durchgeführt. Für die Experimente wurden deuterierte Lösungsmittel von Euriso-Top GmbH (Saarbrücken) verwendet. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  wurden in parts per million (ppm) angegeben. Für die Feinstruktur der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: br = breites Signal, s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett.





mmol) und Essigsäureanhydrid (94  $\mu$ l, 1 mmol) hinzugefügt und für 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der Rückstand getrocknet. Das blaue Filtrat wurde auf 1 ml konzentriert; nach Zugabe von zusätzlich 1 ml 1 M - Natriumbicarbonatlösung und Essigsäureanhydrid (94  $\mu$ l, 1 mmol) wurde für 16 h gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der Rückstand getrocknet und vereinigt. Der gewünschte acetylierte Kupferkomplex wurde in Form eines blauen Feststoffs erhalten.

Um das Kupfer zu entfernen wurde der Komplex in 15 ml H<sub>2</sub>O suspendiert und 8-Hydroxychinolin (145 mg, 1 mmol) hinzugegeben. Die Suspension wurde 16 h gerührt. Die entstandene gelbe Suspension wurde filtriert, der Rückstand verworfen und das Filtrat dreimal mit je 30 ml Ethylacetat gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase lyophilisiert.

#### 4.2.2.1 Darstellung von <sup>15</sup>N $\alpha$ -Lys(Ac)-OH (5)

Das <sup>15</sup>N $\alpha$ -isotopenmarkierte Zwischenprodukt (5) wurde in Form eines weißen Feststoffs erhalten (103 mg, 0.54 mmol, 60 % d. th. Ausbeute)

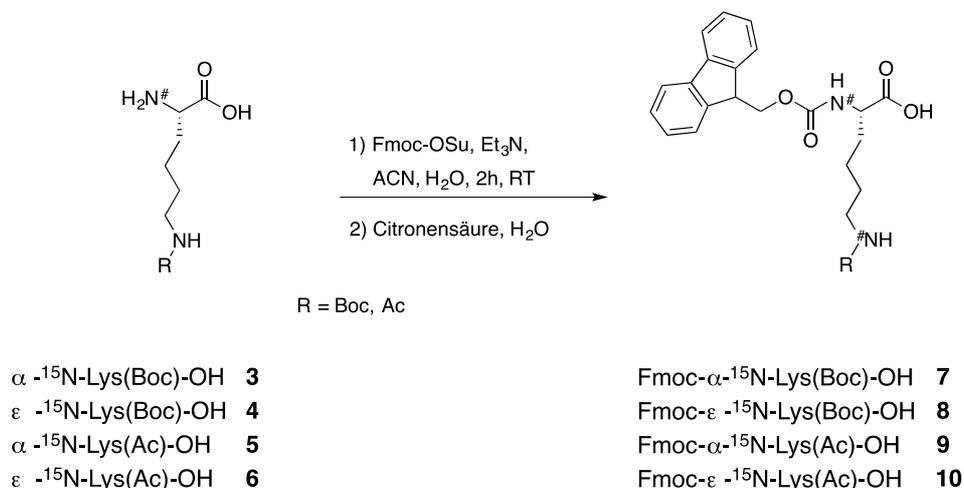
<sup>1</sup>H-NMR: (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 3.64 (t, 1H, C2), 3.10 (t, 2H, C6), 1.90 (s, 3H, C(O)CH<sub>3</sub>), 1.79 (m, 2H, C3), 1.47 (m, 2H, C5), 1.32 (m, 2H, C4)

#### 4.2.2.2 Darstellung von <sup>15</sup>N $\epsilon$ -Lys(Ac)-OH (6)

Das <sup>15</sup>N $\epsilon$ -isotopenmarkierte Zwischenprodukt (6) wurde in Form eines weißen Feststoffs erhalten (96 mg, 0.51 mmol, 57 % d. th. Ausbeute)

<sup>1</sup>H-NMR: (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 3.65 (t, 1H, C2), 3.11 (t, 2H, C6), 1.90 (s, 3H, C(O)CH<sub>3</sub>), 1.80 (m, 2H, C3), 1.47 (m, 2H, C5), 1.32 (m, 2H, C4)

### 4.2.3 Fmoc-Schützung der $\alpha$ -Aminogruppe



**Schema 4.3: Darstellung von Fmoc-<sup>15</sup>N $\alpha$ -Lys(Boc)-OH (7), Fmoc-<sup>15</sup>N $\epsilon$ -Lys(Boc)-OH (8), Fmoc-<sup>15</sup>N $\alpha$ -Lys(Ac)-OH (9) und Fmoc- $\epsilon$ -<sup>15</sup>N-Lys(Ac)-OH (10)**

Das jeweils Boc-geschützte bzw. acetylierte Lysin (**3-6**) wurde in 5 ml H<sub>2</sub>O gelöst und Triethylamin (96  $\mu$ l, 0.7 mmol) wurde hinzugefügt. Anschließend wurde Fmoc-Osu (219 mg, 0.65 mmol), gelöst in 3 ml Acetonitril, hinzugegeben; die Mischung wurde mit Triethylamin tropfenweise auf pH 9-10 eingestellt und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat unter Vakuum zu einem Öl eingedunstet, welches zu einer rührenden Lösung aus 20 ml wässriger 20 % Citronensäure (w/v) gegeben wurde. Der entstandene viskose Feststoff wurde filtriert, in 30 ml Ethylacetat gelöst und dreimal mit je 20 ml wässriger 20 % Citronensäure (w/v), H<sub>2</sub>O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt unter Vakuum getrocknet.

#### 4.2.3.1 Darstellung von Fmoc- $\alpha^{15}\text{N}$ -Lys(Boc)-OH (7)

Fmoc- $^{15}\text{N}$ -Lys(Boc)-OH (7) (196 mg, 0.42 mmol, 69 % d. th. Ausbeute) wurde als hellgelber Feststoff gewonnen.

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 470.23, gefunden: 470.32

**$^1\text{H-NMR}$ :** (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 12,52 (br, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 7,88 (d, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7,79 + 7,63 (m, 1H,  $^{15}\text{NH-Fmoc}$ ), 7,71 (d, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7,41 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7,32 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6,75 (t, 1H,  $\text{NH-Boc}$ ) 4,30 – 4,17 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ,  $\text{CH-Fmoc}$ ), 3,89 (m, 1H, C2), 2,89 (m, 2H, C6), 1,61 (m, 2H, C3), 1,42 - 1,22 (überlappt, 13H, C4, C5,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ )

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (DMSO, 75.5 MHz):  $\delta$  [ppm] = 174,2 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 156,4 + 155,9 ( $\text{CO-Fmoc} + \text{CO-Boc}$ ), 144,1 ( $\text{C}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 141,0 ( $\text{C}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 127,9 ( $\text{CH}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 127,4 ( $\text{CH}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 125,6 ( $\text{CH}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 120,4 ( $\text{CH}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 77,7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 65,9 ( $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 54,1 (C2), 47,0 ( $\text{CH-Fmoc}$ ), 30,7, 29,4, 28,6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 23,2 (C4)

**RP-HPLC** (5-95 % B in 40 min, Flussrate: 1 ml/min):  $R_t = 38.2$  min

#### 4.2.3.2 Darstellung von Fmoc- $^{15}\text{N}\epsilon$ -Lys(Boc)-OH (8)

Fmoc- $^{15}\text{N}\epsilon$ -Lys(Boc)-OH (8) (200 mg, 0.43 mmol, 75 % d. th. Ausbeute) wurde als hellgelber Feststoff gewonnen.

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 470.23, gefunden: 470.32

**$^1\text{H-NMR}$ :** (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 12,47 (br, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 7,88 (d, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7,71 (d, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7,56 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz,  $\text{NH-Fmoc}$ ), 7,41 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7,32 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6,90 + 6,60 (2t, 1H,  $^{15}\text{NH-Boc}$ ), 4,30 – 4,18 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ,  $\text{CH-Fmoc}$ ), 3,89 (m, 1H, C2), 2,88 (m, 2H, C6), 1,62 (m, 2H, C3), 1,45 - 1,20 (überlappt, 13H, C4, C5,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ )

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (DMSO, 75.5 MHz):  $\delta$  [ppm] = 174,2 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 156,4 + 155,9 ( $\text{CO-Fmoc} + \text{CO-Boc}$ ), 144,1 ( $\text{C}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 141,0 ( $\text{C}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 127,9 ( $\text{CH}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 127,4 ( $\text{CH}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 125,6 ( $\text{CH}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 120,4 ( $\text{CH}_{\text{ar-Fmoc}}$ ), 77,7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 65,9 ( $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 54,1 (C2), 47,0 ( $\text{CH-Fmoc}$ ), 30,7, 29,4, 28,6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 23,2 (C4)

**RP-HPLC** (5-95 % B in 40 min, Flussrate: 1 ml/min):  $R_t = 38.5$  min

#### 4.2.3.3 Darstellung von Fmoc-<sup>15</sup>N $\alpha$ -Lys(Ac)-OH (**9**)

Fmoc-<sup>15</sup>N $\alpha$ -Lys(Ac)-OH (**9**) (171 mg, 0.42 mmol, 78 % d. th. Ausbeute) wurde als hellgelber Feststoff gewonnen.

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 412.19, gefunden: 412.17

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 12,52 (br, 1H, CO<sub>2</sub>H), 7,88 (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>ar</sub>), 7,79 (m, 1H, NH-Ac), 7,76 + 7,61 (m, 1H, <sup>15</sup>NH-Fmoc), 7,72 (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>ar</sub>), 7,41 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>ar</sub>), 7,32 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>ar</sub>), 4,30 – 4,18 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH-Fmoc), 3,89 (m, 1H, C2), 2,99 (m, 2H, C6), 1,76 (s, 3H, C(O)CH<sub>3</sub>), 1,64 (m, 2H, C3), 1,34 (m, 4H, C4, C5)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (DMSO, 75.5 MHz):  $\delta$  [ppm] = 174,2 (CO<sub>2</sub>H), 169,2 (CO-Boc), 156,5 (CO-Fmoc), 144,1 (C<sub>ar</sub>-Fmoc), 141,0 (C<sub>ar</sub>-Fmoc), 127,9 (CH<sub>ar</sub>-Fmoc), 127,4 (CH<sub>ar</sub>-Fmoc), 125,6 (CH<sub>ar</sub>-Fmoc), 120,4 (CH<sub>ar</sub>-Fmoc), 65,9 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 54,1 (C2), 47,0 (CH-Fmoc), 38,6 (C6), 30,7, 29,0, 23,4, 22,9

**RP-HPLC** (5-95 % B in 40 min, Flussrate: 1 ml/min):  $R_t = 30.6$  min

#### 4.2.3.4 Darstellung von Fmoc-<sup>15</sup>N $\epsilon$ -Lys(Ac)-OH (**10**)

Fmoc-<sup>15</sup>N $\epsilon$ -Lys(Ac)-OH (**10**) (202 mg, 0.49 mmol, 96 % d. th. Ausbeute) wurde als hellgelber Feststoff gewonnen.

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 412.19, gefunden: 412.27

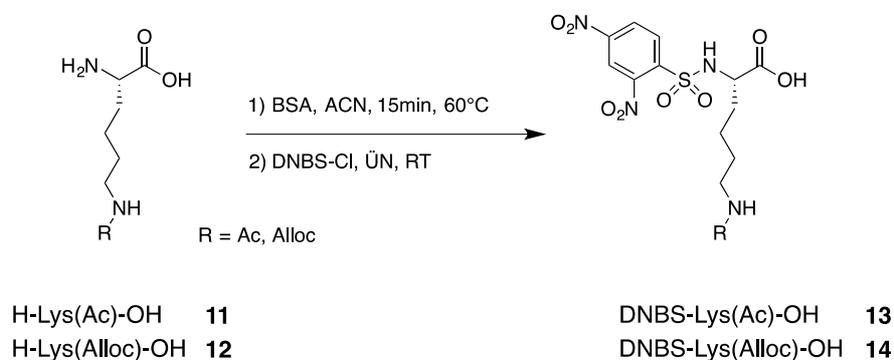
**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 12,52 (br, 1H, CO<sub>2</sub>H), 7,93 + 7,63 (2t, 1H, <sup>15</sup>NH-Ac), 7,88 (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>ar</sub>), 7,72 (d, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H<sub>ar</sub>), 7,58 (d, 1H, NH-Fmoc), 7,41 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>ar</sub>), 7,32 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>ar</sub>), 4,30 – 4,18 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH-Fmoc), 3,89 (m, 1H, C2), 2,99 (m, 2H, C6), 1,76 (s, 3H, C(O)CH<sub>3</sub>), 1,64 (m, 2H, C3), 1,34 (m, 4H, C4, C5)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (DMSO, 75.5 MHz):  $\delta$  [ppm] = 174,2 (CO<sub>2</sub>H), 169,2 (CO-Boc), 156,4 (CO-Fmoc), 144,1 (C<sub>ar</sub>-Fmoc), 141,0 (C<sub>ar</sub>-Fmoc), 127,9 (CH<sub>ar</sub>-Fmoc), 127,4 (CH<sub>ar</sub>-Fmoc), 125,6 (CH<sub>ar</sub>-Fmoc), 120,4 (CH<sub>ar</sub>-Fmoc), 65,9 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 54,1 (C2), 47,0 (CH-Fmoc), 38,6 (C6), 30,7, 29,0, 23,4, 22,9

**RP-HPLC** (5-95 % B in 40 min, Flussrate: 1 ml/min):  $R_t = 30.7$  min

## 4.3 Synthese der DNBS-geschützten Lysin-Bausteine

### 4.3.1 Installation der $\alpha$ -DNBS-Schutzgruppe



Schema 4.4: Darstellung von DNBS-Lys(Ac)-OH (**13**) und DNBS-Lys(Alloc)-OH (**14**)

Zu einer Suspension aus Lysinderivat (**11-12**) (1 Äq.) in Acetonitril (0.2 – 0.33 M) wurde N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) (2.16 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 15 min auf 58°C erhitzt bis sich eine Lösung gebildet hat. Nach Abkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur wurde DNBS-Cl (0.98 Äq.) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die gelbe Lösung wurde im Vakuum eingengt und das resultierende Öl wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde viermal mit je 10 ml HCl (16 %) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde unter Vakuum getrocknet.

#### 4.3.1.1 Darstellung von DNBS-Lys(Ac)-OH (**13**)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Methode für die DNBS-Schutzung mit folgendem Ansatz: H-Lys(Ac)-OH (**11**) (376 mg, 2 mmol), BSA (1.056 ml, 4.32 mmol) und DNBS-Cl (523 mg, 1.96 mmol) in 6 ml ACN. Das Produkt (**13**) wurde als hellgelber Feststoff erhalten (810 mg, 1.93 mmol, 98 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 419.39, gefunden: 419.02

**$^1\text{H-NMR}$ :** (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 12.78 (br, 1H, CO<sub>2</sub>H), 8.90 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz DNBS-NH), 8.86 (s, 1H,  $J = 2.0$  Hz H<sub>Ar</sub>), 8.61 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 2.0$  Hz H<sub>Ar</sub>), 8.25 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H<sub>Ar</sub>), 7.73 (t, 1H, NH-Ac), 3.84 (m, 1H, C2), 2.92 (m, 2H, C6), 1.74 (s, 3H, C(O)CH<sub>3</sub>), 1.64 (m, 2H, C3), 1.37-1.17 (m, 4H, C4, C5)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (DMSO, 75.5 MHz):  $\delta$  [ppm] = 172.6 (**CO<sub>2</sub>H**), 169.2 (**C(O)CH<sub>3</sub>**), 149.9 (**C<sub>ar</sub>-DNBS**), 147.5 (**C<sub>ar</sub>-DNBS**), 138.6 (**CH<sub>ar</sub>-DNBS**), 132.1 (**CH<sub>ar</sub>-DNBS**), 127.2 (**CH<sub>ar</sub>-DNBS**), 120.0 (**CH<sub>ar</sub>-DNBS**), 56.2 (**C2**), 38.5 (**C6**), 31.5, 28.7, 22.9, 22.9

**RP-HPLC** (5-95 % B in 40 min, Flussrate: 1 ml/min):  $R_t$  = 23.5 min

#### 4.3.1.2 Darstellung von DNBS-Lys(Alloc)-OH (**14**)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Methode für die DNBS-Schützung mit folgendem Ansatz: H-Lys(Alloc)-OH (**12**) (115 mg, 0.5 mmol), BSA (264  $\mu$ l, 1.08 mmol) und DNBS-Cl (131 mg, 490  $\mu$ mol) in 2.5 ml ACN. Das Produkt (**14**) wurde als hellgelber Feststoff erhalten (142 mg, 309  $\mu$ mol, 63 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:**  $m/z$  =  $[M+H]^+$  berechnet: 461.10, gefunden: 461.03

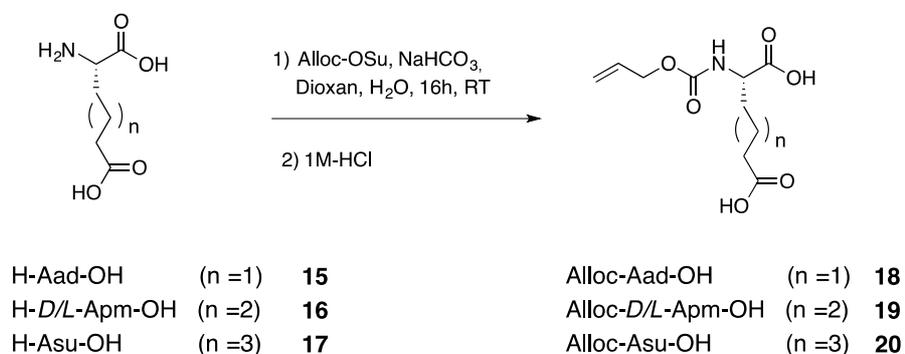
**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 12.79 (br, 1H, **CO<sub>2</sub>H**), 8.91 (d, 1H,  $J$  = 8.8 Hz **DNBS-NH**), 8.86 (s, 1H,  $J$  = 2.0 Hz **H<sub>Ar</sub>**), 8.63 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz,  $J$  = 2.0, Hz **H<sub>Ar</sub>**), 8.27 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz, **H<sub>Ar</sub>**), 7.13 (t, 1H, **NH-Alloc**), 5.88 (m, 1H, **CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-**), 5.28-5.14 (m, 2H, **CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-**), 4.44 (d, 2H, **CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-**), 3.85 (m, 1H, **C2**), 2.90 (m, 2H, **C6**), 1.70-1.61 (m, 2H, **C3**), 1.32-1.25 (m, 4H, **C4, C5**)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (DMSO, 75.5 MHz):  $\delta$  [ppm] = 172.3 (**CO<sub>2</sub>H**), 155.8 (**CO-Alloc**), 149.5 (**C<sub>ar</sub>-DNBS**), 147.1 (**C<sub>ar</sub>-DNBS**), 138.3 (**CH<sub>ar</sub>-DNBS**), 133.8 (**CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-**), 131.7 (**CH<sub>ar</sub>-DNBS**), 126.9 (**CH<sub>ar</sub>-DNBS**), 119.7 (**CH<sub>ar</sub>-DNBS**), 116.8 (**CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-**), 64.1 (**CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-**), 55.9 (**C2**), 31.2, 28.7, 22.4

**RP-HPLC** (5-95 % B in 40 min, Flussrate: 1 ml/min):  $R_t$  = 30.4 min

## 4.4 Synthese der Hydroxamat-Bausteine

### 4.4.1 Installation der N<sup>α</sup>-Alloc-Schutzgruppe



Schema 4.5: Darstellung von Alloc-Aad-OH (18), Alloc-D/L-Apm-OH (19) und Alloc-Asu-OH (20)

Zu einer Lösung der jeweiligen 2-Aminocarbonsäure (**15-17**) (1 Äq.) in 20 ml 1,4-Dioxan/Wasser (1:1) wurde Natriumbicarbonat (2-3 Äq.) und Alloc-OSu (1 Äq.) hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Die Lösung wurde unter Vakuum eingengt und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde mit 1 M - HCl auf pH 1 angesäuert und dreimal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H<sub>2</sub>O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet, anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

#### 4.4.1.1 Darstellung von Alloc-Aad-OH (18)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: L-2-Aminoadipinsäure (**15**) (410 mg, 2.5 mmol), Natriumbicarbonat (420 mg, 5 mmol) und Alloc-OSu (498 mg, 2.5 mmol). Das Produkt (**18**) wurde als farbloser viskoser Feststoff erhalten (493 mg, 2.01 mmol, 80 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:** m/z = [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 246.24, gefunden: 246.27

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 250 MHz): δ [ppm] = 5.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.33-5.21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.57 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.18 (m, 1H, C2), 2.42 (t, 2H, C5), 1.88-1.68 (m, 4H, C3 C4),

**<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 62.9 MHz): δ [ppm] = 178.5 (CO<sub>2</sub>H), 176.8 (CO<sub>2</sub>H), 158.5 (CO-Alloc), 133.0 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>), 117.6 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 66.4 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 54.3 (C2), 33.4 (C5), 30.3 (C3), 21.0 (C4)

#### 4.4.1.2 Darstellung von Alloc-*D/L*-Apm-OH (19)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: *D/L*-2-Aminopimelinsäure (**16**) (350 mg, 2 mmol), Natriumbicarbonat (504 mg, 4 mmol) und Alloc-OSu (468 mg, 2.35 mmol). Das Produkt (**19**) wurde als farbloses Öl erhalten (483 mg, 1.86 mmol, 93 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 260.26, gefunden: 260.22

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 5.94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.34-5.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.58 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.17 (m, 1H, C2), 2.40 (t, 2H, C6), 1.84-1.63 (m, 4H, C3 C5), 1.44 (m, 2H, C4)

**<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 100 MHz):  $\delta$  [ppm] = 179.2 (CO<sub>2</sub>H), 177.1 (CO<sub>2</sub>H), 158.5 (CO-Alloc), 133.0 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>), 117.5 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 66.3 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 54.4 (C2), 33.8 (C6), 30.6 (C3), 24.8, 24.0 (C4, C5)

#### 4.4.1.3 Darstellung von Alloc-Asu-OH (20)

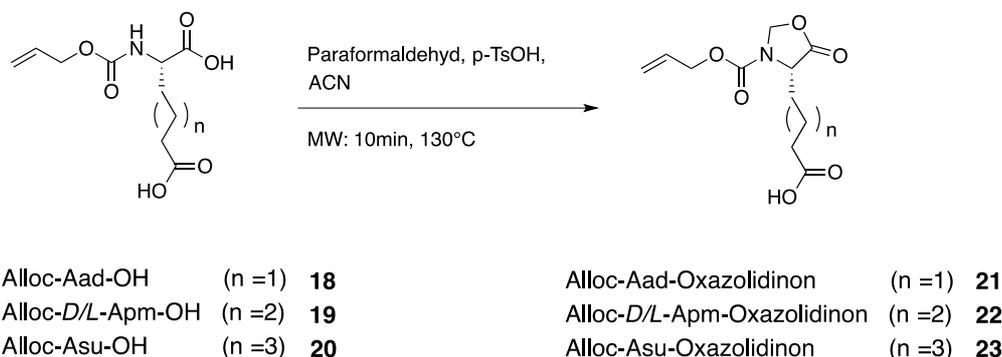
Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: *L*-2-Aminosuberinsäure (**17**) (193 mg, 1.02 mmol), Natriumbicarbonat (252 mg, 3 mmol) und Alloc-OSu (219 mg, 1.1 mmol). Das Produkt (**20**) wurde als farbloses viskoser Feststoff erhalten (122 mg, 0.45 mmol, 89 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 274.28, gefunden: 274.27

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 250 MHz):  $\delta$  [ppm] = 5.94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.35-5.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.58 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.17 (m, 1H, C2), 2.38 (t, 2H, C7), 1.85-1.61 (m, 4H, C3 C6), 1.40 (m, 2H, C4, C5)

**<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 62.9 MHz):  $\delta$  [ppm] = 179.4 (CO<sub>2</sub>H), 177.1 (CO<sub>2</sub>H), 158.5 (CO-Alloc), 133.0 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>), 117.6 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 66.3 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 54.4 (C2), 34.0 (C7), 30.8 (C3), 27.9 (C6), 24.9, 24.4 (C4, C5)

#### 4.4.2 Oxazolidinon-Bildung



**Schema 4.6: Darstellung von Alloc-Aad-Oxazolidinon (21), Alloc-D/L-Apm-Oxazolidinon (22) und Alloc-Asu-Oxazolidinon (23)**

Die Alloc-geschützte Aminosäure (**18-20**) (1 Äq.) wurde in 6 ml Acetonitril gelöst; anschließend wurde Paraformaldehyd (6-8 Äq.) und p-Toluolsulfonsäure (katalytische Mengen) hinzugegeben. Die Suspension wurde in einem geschlossenen Röhrchen in der Mikrowelle (*Discover Benchmate*, CEM GmbH, Kamp-Lintfort) bei 130°C für 10 min erhitzt. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat unter Vakuum zu einem farblosen Öl eingengt. Das Rohprodukt wurde mithilfe einer Flash-Chromatographie über Silicagel (60 Å, 230-400 mesh, Sigma-Aldrich) (Fließmittel: Chloroform/Methanol 6:1, 1 % AcOH) gereinigt.

##### 4.4.2.1 Darstellung von Alloc-Aad-Oxazolidinon (21)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: Alloc-Aad-OH (**18**) (390 mg, 1.59 mmol), Paraformaldehyd (384 mg, 12.8 mmol) und p-Toluolsulfonsäure (19 mg, 0.1 mmol). Das Produkt (**21**) wurde als farbloses Öl erhalten (225 mg, 0.87 mmol, 55 % d. th. Ausbeute).

**DC:**  $R_f = 0.48$  (Chloroform/Methanol 6:1, 1 % AcOH)

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 258.24, gefunden: 258.25

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 5.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.56-5.25 (m, 4H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>-Oxazolidinon), 4.68 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.35 (t, 1H, C2), 2.43 (t, 2H, C5), 2.09-1.72 (m, 4H, C3, C4),

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 62.9 MHz):  $\delta$  [ppm] = 174.4 (CO<sub>2</sub>H), 173.0 (CO-Oxazolidinon), 153.0 (CO-Alloc), 133.1 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 118.0 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 78.2 (CH<sub>2</sub>-Oxazolidinon) 66.1 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 54.9 (C2), 33.5 (C5), 29.9 (C3), 20.0 (C4)

#### 4.4.2.2 Darstellung von Alloc-*D/L*-Apm-Oxazolidinon (**22**)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: Alloc-*D/L*-Apm-OH (**19**) (1.26 g, 4.86 mmol), Paraformaldehyd (1 g, 33.35 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäure (100 mg, 0.52 mmol). Das Produkt (**22**) wurde als farbloses Öl erhalten (818 mg, 3 mmol, 62 % d. th. Ausbeute).

**DC:**  $R_f = 0,39$  (Chloroform/Methanol 6:1)

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 272.27, gefunden: 272.07

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 12.03 (br, 1H, CO<sub>2</sub>H), 5.94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.43-5.23 (m, 4H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>-Oxazolidinon), 4.62 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.34 (t, 1H, C2), 2.22 (t, 2H, C6), 1.93-1.78 (m, 2H, C3), 1.51-1.25 (m, 4H, C4, C5)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 62.9 MHz):  $\delta$  [ppm] = 174.3 (CO<sub>2</sub>H), 172.7 (CO-Oxazolidinon), 152.5 (CO-Alloc), 132.7 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 117.5 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 77.8 (CH<sub>2</sub>-Oxazolidinon) 65.6 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 54.5 (C2), 33.4 (C6), 29.7 (C3), 24.1, 23.3 (C4, C5)

#### 4.4.2.3 Darstellung von Alloc-Asu-Oxazolidinon (**23**)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: Alloc-Asu-OH (**20**) (144 mg, 0.53 mmol), Paraformaldehyd (127 mg, 4 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäure (19 mg, 0.1 mmol). Das Produkt (**23**) wurde als farbloses Öl erhalten (120 mg, 0.42 mmol, 79 % d. th. Ausbeute).

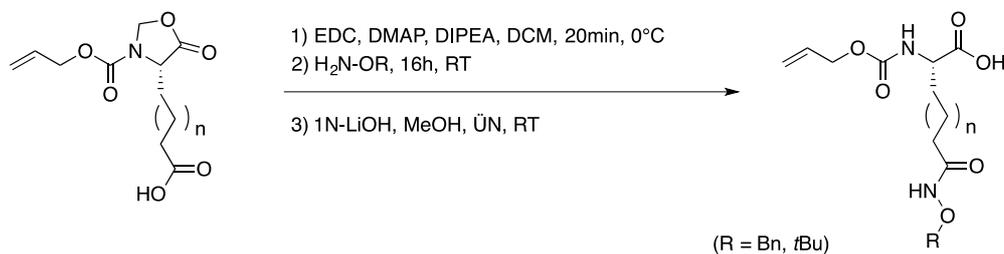
**DC:**  $R_f = 0,51$  (Chloroform/Methanol 6:1, 1 % AcOH)

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 286.29, gefunden: 286.10

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 11.99 (br, 1H, CO<sub>2</sub>H), 5.92 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.43-5.20 (m, 4H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>-Oxazolidinon), 4.60 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.32 (t, 1H, C2), 2.15 (t, 2H, C7), 1.86-1.75 (m, 2H, C3), 1.48-1.27 (m, 6H, C4, C5, C6)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 62.9 MHz):  $\delta$  [ppm] = 174.4 (CO<sub>2</sub>H), 172.7 (CO-Oxazolidinon), 152.5 (CO-Alloc), 132.7 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 117.5 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 77.8 (CH<sub>2</sub>-Oxazolidinon) 65.6 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 54.6 (C2), 33.5 (C7), 29.8 (C3), 28.1 (C6), 24.1, 23.3 (C4, C5)

#### 4.4.3 Hydroxamat-Bildung



Alloc-Aad-Oxazolidinon	(n =1)	<b>21</b>	Alloc-Aad(NHO <i>t</i> Bu)-OH	(n =1)	<b>24</b>
Alloc- <i>D/L</i> -Apm-Oxazolidinon	(n =2)	<b>22</b>	Alloc- <i>D/L</i> -Apm(NHO <i>t</i> Bu)-OH	(n =2)	<b>25</b>
Alloc-Asu-Oxazolidinon	(n =3)	<b>23</b>	Alloc- <i>D/L</i> -Apm(NHOBn)-OH	(n =2)	<b>26</b>
			Alloc-Asu-(NHO <i>t</i> Bu)-OH	(n =3)	<b>27</b>

**Schema 4.7: Darstellung von Alloc-Aad(NHO*t*Bu)-OH (24), Alloc-*D/L*-Apm(NHO*t*Bu)-OH (25), Alloc-*D/L*-Apm(NHOBn)-OH (26) und Alloc-Asu(NHO*t*Bu)-OH (27)**

Zu einer eisbadgekühlten Lösung aus *N*-geschützten Aminosäuren-Oxazolidinon (**21-23**) (1 Äq.) in 5 ml wasserfreien DCM wurde EDC (1.2 Äq.), DMAP (katalytische Mengen) und DIPEA (3 Äq.) hinzugefügt und für 20 min bei 0°C gerührt. Die Lösung wurde daraufhin auf Raumtemperatur erwärmt, die *O*-geschützte Hydroxylaminkomponente (1.3 Äq.) hinzugefügt und für 16 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit 15 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit je 15 ml 0.3 M - HCl, gesättigter Natriumbicarbonatlösung und H<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wurde unter Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 10 ml Methanol gelöst. Unter Kühlung der Lösung im Eisbad wurde daraufhin 1 N - LiOH-Lösung (2 ml, 2 mmol) tropfenweise hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Hydrolyse wurde das Methanol unter Vakuum abgezogen, Wasser (10 ml) zum Rückstand hinzugefügt und mit 1 M - HCl auf pH 2-3 angesäuert. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit je 15 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit je 20 ml H<sub>2</sub>O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt unter Vakuum getrocknet. In einigen Fällen wurde das Produkt mittels HPLC gereinigt.

#### 4.4.3.1 Darstellung von Alloc-Aad(NHOtBu)-OH (**24**)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: Alloc-Aad-Oxazolidinon (**21**) (60 mg, 233  $\mu\text{mol}$ ), EDC (48 mg, 250  $\mu\text{mol}$ ), DMAP (3.4 mg, 28  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (125  $\mu\text{l}$ , 750  $\mu\text{mol}$ ) und *O*-*tert*-Butylhydroxylamin-Hydrochlorid (38 mg, 303  $\mu\text{mol}$ ). Das Produkt (**24**) wurde als farbloses Öl erhalten (33 mg, 104  $\mu\text{mol}$ , 44 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 317.35, gefunden: 317.15

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO, 250 MHz):  $\delta$  [ppm] = 10.24 (s, 1H, CO-NH-OtBu), 7.52 (d, 1H, Alloc-NH), 5.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.32-5.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.47 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 3.91 (m, 1H, C2), 2.00 (t, 2H, C5), 1.67-1.54 (m, 4H, C3, C4), 1.13 (s, 9H, tBu)

**$^{13}\text{C-NMR}$** : (DMSO, 62.9 MHz):  $\delta$  [ppm] = 173.8 (CO<sub>2</sub>H), 170.0 (CO-NH-OtBu), 155.9 (CO-Alloc), 133.6 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 117.0 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 80.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 64.4 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 53.5 (C2), 31.8 (C5), 30.2 (C3), 26.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.8 (C4)

**RP-HPLC** (5-95 % B in 20 min, Flussrate: 1.5 ml/min):  $R_t = 12.3$  min

#### 4.4.3.2 Darstellung von Alloc-D/L-Apm(NHOtBu)-OH (**25**)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: Alloc-D/L-Apm-Oxazolidinon (**22**) (100 mg, 386  $\mu\text{mol}$ ), EDC (82 mg, 425  $\mu\text{mol}$ ), DMAP (2 mg, 20  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (202  $\mu\text{l}$ , 1.16 mmol) und *O*-*tert*-Butylhydroxylamin-Hydrochlorid (63 mg, 500  $\mu\text{mol}$ ). Das Produkt (**25**) wurde per HPLC gereinigt und in Form eines farblosen Öls erhalten (37 mg, 110  $\mu\text{mol}$ , 29 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 331.39, gefunden: 331.13

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 12.52 (br, 1H, CO<sub>2</sub>H), 10.22 (s, 1H, CONH-OtBu), 7.49 (d, 1H, Alloc-NH), 5.91 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.34-5.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.49 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 3.91 (m, 1H, C2), 2.00 (t, 2H, C6), 1.69-1.50 (m, 4H, C3, C5), 1.31 (m, 2H, C4), 1.16 (s, 9H, tBu)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO, 62.9 MHz):  $\delta$  [ppm] = 173.9 (CO<sub>2</sub>H), 170.3 (CO-NH-OtBu), 156.0 (CO-Alloc), 133.6 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 117.0 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 80.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 64.4 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 53.7 (C2), 32.3 (C6), 30.5 (C3), 26.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.2, 24.8 (C4, C5)

**RP-HPLC** (5-95 % B in 20 min, Flussrate: 1.5 ml/min):  $R_t = 13.0$  min

#### 4.4.3.3 Darstellung von Alloc-*D/L*-Apm(NHOBn)-OH (**26**)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: Alloc-*D/L*-Apm-Oxazolidinon (**22**) (356 mg, 1.32 mmol), EDC (280 mg, 1.46 mmol), DMAP (2 mg, 0.02 mmol), DIPEA (667  $\mu$ l, 4 mmol) und *O*-Benzylhydroxylamin-Hydrochlorid (216 mg, 1.72 mmol). Das Produkt (**26**) wurde per HPLC gereinigt und in Form eines farblosen Öls erhalten (88 mg, 0.24 mmol, 18 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 365.39, gefunden: 365.10

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 12.42 (br, 1H, CO<sub>2</sub>H), 10.94 (s, 1H, CONH-OBn), 7.49 (d, 1H, Alloc-NH), 7.38 (s, 5H, Ph), 5.90 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.33-5.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph) 4.47 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 3.90 (m, 1H, C2), 1.95 (t, 2H, C6), 1.67-1.49 (m, 4H, C3, C5), 1.30 (m, 2H, C4)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 62.9 MHz):  $\delta$  [ppm] = 174.2 (CO<sub>2</sub>H), 169.5 (CO-NH-OBn), 156.3 (CO-Alloc), 136.4 (Ph), 133.9 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 129.1 (Ph), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph) 117.5 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 77.1 (CH<sub>2</sub>-Ph) 64.7 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 54.0 (C2), 33.4 (C6), 30.8 (C3), 25.4, 24.8 (C4, C5)

**RP-HPLC** (5-95 % B in 40 min, Flussrate: 1 ml/min):  $R_t = 23.6$  min

#### 4.4.3.4 Darstellung von Alloc-Asu(NHOtBu)-OH (**27**)

Die Synthese erfolgte nach der generellen Darstellung mit folgendem Ansatz: Alloc-Asu-Oxazolidinon (**23**) (100 mg, 0.35 mmol), EDC (74 mg, 0.386 mmol), DMAP (2 mg, 0.02 mmol), DIPEA (183  $\mu$ l, 1 mmol) und *O-tert*-Butylhydroxylamin-Hydrochlorid (57 mg, 0.455 mmol). Das Produkt (**27**) wurde über die HPLC gereinigt und in Form eines farblosen viskosen Feststoffs erhalten (47 mg, 0.137  $\mu$ mol, 39 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:**  $m/z = [M+H]^+$  berechnet: 345.40, gefunden: 345.25

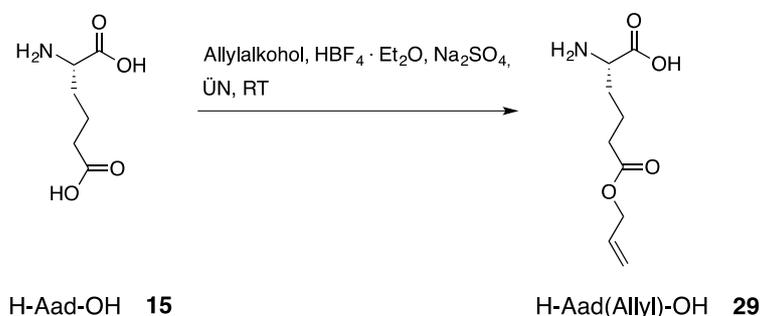
**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 250 MHz):  $\delta$  [ppm] = 10.20 (s, 1H, CONH-OtBu), 7.49 (d, 1H, Alloc-NH), 5.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.32-5.15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 4.46 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 3.89 (m, 1H, C2), 1.98 (t, 2H, C7), 1.59-1.47 (m, 4H, C3, C6), 1.25 (m, 2H, C4, C5), 1.13 (s, 9H, tBu)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 62.9 MHz):  $\delta$  [ppm] = 174.0 (CO<sub>2</sub>H), 170.3 (CO-NH-OtBu), 156.0 (CO-Alloc), 133.6 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 117.0 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 80.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 64.4 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 53.7 (C2), 32.3 (C7), 30.6, 28.1 (C3, C6), 26.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.2, 25.0 (C4, C5)

**RP-HPLC** (5-95 % B in 20 min, Flussrate: 1.5 ml/min):  $R_t = 14.0$  min

#### 4.4.4 Schützung von 2-Amino adipinsäure

##### 4.4.4.1 Darstellung von H-Aad(OAllyl)-OH (**29**)



##### Schema 4.8: Darstellung von H-Aad(Allyl)-OH (**29**)

Eine Mischung aus 2-Amino adipinsäure (**15**) (161 mg, 1 mmol) und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (750 mg) wurde in einem 2-Halskolben vorgelegt. Unter N<sub>2</sub> wurde Allylalkohol (5 ml, 73.5 mmol) und Tetrafluoroborsäure-Diethylether-Komplex (271 µl, 2 mmol) hinzugefügt. Die Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 20 ml THF hinzugegeben und die Mischung filtriert. Das Filtrat wurde mit Triethylamin (461 µl, 3 mmol) behandelt und unter Vakuum eingeeengt. Der gelbliche Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen; der dabei entstandene weiße Niederschlag wurde mithilfe eines Feinfilters abfiltriert. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat mehrmals gewaschen und abschließend unter Vakuum getrocknet. Das Produkt (**29**) wurde als weißer Feststoff erhalten (185 mg, 0.92 mmol, 92 % d. th. Ausbeute).

**ESI-MS:** m/z = [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 202.22, gefunden: 202.30

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 250 MHz): δ [ppm] = 5.92 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5.27 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>), 4.59 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 3.71 (m, 1H, C2), 2.46 (t, 2H, C5), 1.83+1.68 (m, 4H, C3, C4)

**<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 62.9 MHz): δ [ppm] = 175.9 (CO<sub>2</sub>H), 174.3 (CO-OAllyl), 132.2 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>), 118.8 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 66.3 (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 54.8 (C2), 33.6 (C5), 30.1 (C3), 20.3 (C4)



## 4.5 Peptidsynthese

### 4.5.1 Allgemeine Vorschrift zur manuellen und automatisierten Synthese

Die Peptidsynthese erfolgte mit Standardmethoden für die Fmoc-basierte Festphasensynthese. Als feste Phase wurde TentaGel R RAM Harz (Rapp Polymere, Tübingen) (Kapazität: 0.18 – 0.20 mmol/g) eingesetzt. Als Synthesemaßstab wurden Ansätze zwischen 10 bis 25  $\mu\text{mol}$  gewählt. Soweit nicht anders angegeben, wurden folgende Aminosäurederivate für die Synthese verwendet: Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Ac-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Ac)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Nle(6-OH)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH und Fmoc-Val-OH.

Für Synthesen von langen bzw. schwierig zu synthetisierenden Peptidsequenzen wurden als Aggregationsminimierung an geeigneten Stellen folgende Pseudoprolin-Dipeptid-Bausteine eingesetzt: Fmoc-Lys(Boc)-Ser( $\Psi\text{Me}$ ,Mepro)-OH (KS), Fmoc-Ser(tBu)-Thr( $\Psi\text{Me}$ ,Mepro)-OH (ST) und Fmoc-Gln(Trt)-Thr( $\Psi\text{Me}$ ,Mepro)-OH (QT).

Manuelle Synthesen erfolgten generell im Glasreaktor mit Fritte. Dabei wurde die Aminosäure (5 Äq.) und HBTU (4.5 Äq.) in 1.5 ml NMM (400 mM in DMF) gelöst und zum vorgelagerten Harz gegeben. Die Durchmischung wurde durch kontinuierliche Stickstoffdurchströmung für 1 h realisiert. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 5 ml 20 % Piperidin in DMF (v/v) realisiert (3 x 5 min). Zwischen den Kupplungs- und Abspaltungsschritten wurde mit 3 ml DMF (6 x 1 min) und 3 ml DCM (3 x 1 min.) gewaschen. Acetylierungen des *N*-Terminus (*Capping*) wurden mit einer Lösung aus Essigsäureanhydrid (0.6 ml) und DIPEA (0.6 ml) in DMF (2.8 ml) für 20 min durchgeführt.

Für die Entfernung der Alloc- bzw. der Allyl-Schutzgruppe wurde das Harz unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (3 Äq.) in  $\text{CHCl}_3/\text{AcOH}/\text{NMM}$  (3.7 ml / 0.2 ml / 0.1 ml) gelöst und unter Argon zu dem Harz gegeben. Die Suspension wurde für 3 h unter Argon und unter Lichtausschluss gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Harz jeweils dreimal nacheinander mit DMF, 0.5 % DIPEA in DMF (v/v), DMF, 0.5 % Diethyldithiocarbamat in DMF (w/w), DMF und DCM gewaschen.

Für die Untersuchung von vollständigen Peptidkupplungen wurden Kaisertests durchgeführt. Dabei wurde eine geringe Menge Peptidharz in einem Röhrchen zusammen mit je 40  $\mu\text{l}$  80 % Phenol in Ethanol (w/v), 20  $\mu\text{M}$  KCN in Wasser/Pyridin (1:50) und 6 % Ninhydrin in Ethanol (w/v) für 15 min. auf 120 °C erhitzt. Die Abwesenheit eines blauen Farbumschlags zeigte die vollständige Peptidkupplung an.

Automatisierte Synthesen wurden an einem Respep XL Synthesizer (Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln) durchgeführt. Jede aufeinanderfolgende Aminosäure wurde mit einem fünffachen molaren Überschuss doppelt gekuppelt. Die Kupplungen wurden mit HBTU als Aktivierungsreagenz und NMM als Base in DMF/NMP durchgeführt. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 20 % Piperidin in DMF (v/v). Zwischen den Kupplungs- und Abspaltungsschritten wurde mehrmals mit DMF und DCM gewaschen.

Die Endabspaltung der Peptide vom Harz mit gleichzeitiger Entfernung aller Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit 10 ml einer aus TFA/Phenol/TIPS/Wasser (85:5:5:5) bestehenden Mischung für mind. 4 h. Anschließend wurde das Harz zusätzlich mit 3 ml DCM gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingeeengt und in eiskaltem Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit Diethylether gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in wenig Wasser/ACN gelöst und anschließend am Lyophilisator getrocknet. Die Rohpeptide wurden mittels (semi-)präparativer RP-HPLC gereinigt. Generell wurden keine Gesamtausbeuten der Peptide bestimmt, da die präparative Reinigung größtenteils nur portionsweise erfolgte.

#### **4.5.2 Synthese der <sup>15</sup>N-isotopenmarkierten Histon-*tail*-H4-Peptide**

Die Kupplungen der Standard-Fmoc-Aminosäuren erfolgten bis zum Einbau des isotopenmarkierten Derivats gemäß der allgemeinen Vorschrift am Synthesizer. Der Maßstab der Synthese betrug 15 µmol. Die <sup>15</sup>N-markierten Lysin-Bausteine (**7-10**) wurden einmalig für 1 h mit einem dreifachen molaren Überschuss manuell gekuppelt. Die Kupplung erfolgte mit der Fmoc-Aminosäure (45 µmol), HATU (40 µmol) als Aktivierungsreagenz und NMM (0.6 mmol) als Base in DMF mit anschließendem Schutzcapping. Die restlichen Kupplungen der Aminosäuren wurden am Synthesizer durchgeführt. Abschließend wurde der Amino-Terminus acetyliert. Die Peptide wurden wie im Standardprotokoll beschrieben vom Harz abgespalten, aufgearbeitet und über die semipräparative HPLC gereinigt. Die gereinigten Peptide wurden mittels MALDI-MS und analytischer HPLC (5-95 % B in 40 min, Flussrate: 1 ml/min) charakterisiert (Tabelle 4.1).

Für die Synthese des Peptids H4(11-19)-<sup>15</sup>Nε-Kac12 erfolgte der Einbau der Isotopenmarkierung per Ammonolyse, der Syntheseansatz betrug 25 µmol. An der Position K12 wurde manuell Fmoc-Hydroxynorleucin-OH gekuppelt. Der primäre Alkohol wurde zum Schutz mit Essigsäureanhydrid verestert bevor anschließend die Kupplung der restlichen Aminosäuren erfolgte. Das vollständig geschützte H4-Peptid wurde mit 125 mM Hydroxylamin bei pH 10 in H<sub>2</sub>O / DMF (50:50) für 4 h behandelt. Der nun entschützte primäre Alkohol wurde mit Mesylchlorid (0.5 mmol, 20 Äq.) in

Gegenwart von Triethylamin (1 mmol, 40 Äq.) in DMF für mindestens 24 h unter leichter Agitation bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach mehrmaligen Waschen mit DMF und DCM wurde das mesylierte Peptid anschließend mit 3.3M-<sup>15</sup>NH<sub>3</sub>(aq.) (500 µl, 1,65 mmol, 66 Äq.) und DIPEA (350 µl, 2,1 mmol, 84 Äq.) in zusätzlich 150 µl DMF unter leichten Schütteln für 48 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach Waschen des Peptids mit DMF und DCM wurde das primäre Amin mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Das Peptid wurde wie im Standardprotokoll beschrieben vom Harz abgespalten, aufgearbeitet und über die semipräparative HPLC gereinigt.

**Tabelle 4.1: Analysedaten der synthetisierten <sup>15</sup>N-isotopenmarkierten H4-tail-Reporterpeptide.** Die Bestimmung der Molekülmasse und der Reinheit erfolgte mittels MALDI-MS und analytischer HPLC.

Bezeichnung	Peptidsequenz	M in g/mol	[M] <sup>+</sup> ber.	[M+H] <sup>+</sup> gef.	Reinheit (%)	R <sub>t</sub> [min]
H4-α <sup>15</sup> N-Kac5	Ac-SGRG-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-GGKGLGGAKRHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.29	>99	13.8
H4-α <sup>15</sup> N-Kac8	Ac-SGRGKG-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-GLGKGGAKRHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.30	96	13.9
H4-α <sup>15</sup> N-Kac12	Ac-SGRGKGGKGLG-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-GGAKRHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.28	>99	13.8
H4-α <sup>15</sup> N-Kac16	Ac-SGRGKGGKGLGKGG-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-RHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.29	>99	13.7
H4-α <sup>15</sup> N-Kac20	Ac-SGRGKGGKGLGKGGAKRHR-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-VLRDVA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.26	>99	14.1
H4-ε <sup>15</sup> N-Kac5	Ac-SGRG-α <sup>15</sup> N-K-GGKGLGGAKRHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2703.13	2701.56	2702.37	>99	13.3
H4-ε <sup>15</sup> N-Kac8	Ac-SGRGKG-α <sup>15</sup> N-K-GLGGKGGAKRHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2703.13	2701.56	2702.83	>99	13.3
H4-ε <sup>15</sup> N-Kac12	Ac-SGRGKGGKGLG-α <sup>15</sup> N-K-GGAKRHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2703.13	2701.56	2702.35	>99	13.4
H4-ε <sup>15</sup> N-Kac16	Ac-SGRGKGGKGLGKGG-α <sup>15</sup> N-K-RHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2703.13	2701.56	2702.34	88	13.3
H4-ε <sup>15</sup> N-Kac20	Ac-SGRGKGGKGLGKGGAKRHR-α <sup>15</sup> N-K-VLRDVA-NH <sub>2</sub>	2703.13	2701.56	2702.29	94	13.4
H4-α <sup>15</sup> N-K5	Ac-SGRG-ε <sup>15</sup> N-K(Ac)-GGKGLGGAKRHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.29	>99	13.9
H4-α <sup>15</sup> N-K8	Ac-SGRGKG-ε <sup>15</sup> N-K(Ac)-GLGKGGAKRHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.25	>99	13.9
H4-α <sup>15</sup> N-K12	Ac-SGRGKGGKGLG-ε <sup>15</sup> N-K(Ac)-GGAKRHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.26	97	13.8
H4-α <sup>15</sup> N-K16	Ac-SGRGKGGKGLGKGG-ε <sup>15</sup> N-K(Ac)-RHRKVLVDNA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.26	98	13.7
H4-α <sup>15</sup> N-K20	Ac-SGRGKGGKGLGKGGAKRHR-ε <sup>15</sup> N-K(Ac)-VLRDVA-NH <sub>2</sub>	2745.17	2743.57	2744.30	>99	14.3
HDAC	Ac-SGRG-ε <sup>15</sup> N-K(Ac)-GGKGLG-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-GGA-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-RHR-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-VLRDVA-NH <sub>2</sub>	2874.26	2872.59	2873.63	>99	15.7
Super-Reporter 1						
HDAC	Ac-SGRG-ε <sup>15</sup> N-K-GGKGLG-α <sup>15</sup> N-K-GGA-α <sup>15</sup> N-K-	2706.11	2704.55	2705.60	>99	13.5
Super-Reporter 2	RHR-α <sup>15</sup> N-K-VLRDVA-NH <sub>2</sub>					
HAT	Ac-SGRGKG-ε <sup>15</sup> N-K(Ac)-GLG-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-GGA-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-	2874.26	2872.59	2873.89	>99	15.6
Super-Reporter	RHR-α <sup>15</sup> N-K(Ac)-VLRDVA-NH <sub>2</sub>					

### 4.5.3 Synthese der kolorimetrischen HDAC-Substrate

Die Kupplungen der Standard-Fmoc-Aminosäuren sowie des p-Nitroanilinderivats 5-Amino-2-Nitrobenzoesäure (5,2-ANB) erfolgten gemäß der allgemeinen Vorschrift am Synthesizer; der Syntheseansatz betrug 25  $\mu\text{mol}$ . Für die Bildung des Säurechlorids wurde DNBS-Lys(Ac)-OH (**13**) (42 mg, 100  $\mu\text{mol}$ ) bzw. DNBS-Lys(Alloc)-OH (**14**) (46 mg, 100  $\mu\text{mol}$ ) in trockenem DCM (0.3 M) suspendiert. Nach Zugabe von Thionylchlorid (14.6  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{mol}$ , 2 Äq.) und Pyridin (8  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{mol}$ , 1 Äq.) wurde die Mischung bei 45°C unter Rückfluss für 30 min bis zur vollständigen Auflösung gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt; *tert*-Butanol (28  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{mol}$ , 3 Äq.) wurde hinzugefügt und die Lösung wurde für weitere 15 min gerührt. Das Peptidharz wurde hinzugegeben und trockenes DCM wurde tropfenweise bis zur Entstehung eines homogenen Gemisches hinzugefügt. Anschließend wurde DIPEA (50  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{mol}$ , 3 Äq.) hinzugegeben und die Suspension wurde für 30 min gerührt. Das Harz wurde mit DMF und DCM gewaschen. Die DNBS-Gruppe wurde mit einer frisch hergestellten 5 % Thiophenolat-Lösung abgespalten. Dazu wurde Thiophenol (25.6  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{mol}$ , 10 Äq.) zu einer Suspension bestehend aus  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (74.3 mg, 537  $\mu\text{mol}$ , 21 Äq.) in 0.5 ml DMF gegeben und geschüttelt. Das Harz wurde mit der gefilterten Lösung für 15 min behandelt. Die restlichen Kupplungen der Aminosäuren wurden am Synthesizer durchgeführt, der letzte Glycinrest der H4-Peptide H4-Kac-ANB und H4-K-ANB wurde als Ac-Gly-OH eingeführt. Die Alloc-Schutzgruppe des Peptids p53-Kac-ANB wurde entsprechend dem oben genannten Protokoll entfernt. Die Peptide wurden gemäß der Standardvorschrift vom Harz abgespalten, aufgearbeitet und mithilfe der präparativen HPLC gereinigt. Die gereinigten Peptide wurden mittels MALDI-MS (H4-Substrate) bzw. ESI-MS (p53-Peptid) und analytischer HPLC (5-95 % B in 40 min, Flussrate: 1 ml/min) charakterisiert (Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2: Analysedaten der synthetisierten kolorimetrischen Peptide.** Die Bestimmung der Molekülmasse und der Reinheit erfolgte mittels MALDI- bzw. ESI-MS und analytischer HPLC.

Bezeichnung	Peptidsequenz	M in g/mol	[M] <sup>+</sup> ber.	[M+H] <sup>+</sup> gef.	Reinheit (%)	R <sub>t</sub> [min]
p53-Kac-ANB	SRHK-K(Ac)-5,2-ANB-LMF-NH <sub>2</sub>	1251.48	1250.63	1251.38	>99	22.6
H4-Kac-ANB	Ac-GGA-K(Ac)-5,2-ANB-RHRA-NH <sub>2</sub>	1099.18	1098.54	1099.49	>99	13.8
H4-K-ANB	Ac-GGA-K-5,2-ANB-RHRA-NH <sub>2</sub>	1057.14	1056.53	1057.54	>99	11.8

Die Untersuchung der optischen Reinheit der Aminosäuren von Peptid p53-Kac-ANB wurde mithilfe von GC-MS von C.A.T. GmbH & Co. Chromatographie und Analysetechnik KG (Tübingen) durchgeführt.

Für die Bestimmung der Kupplungseffizienz wurde *in situ* gebildetes DNBS-Lys(Ac)-Cl, wie oben beschrieben, an das harzgebundene Modellpeptid ANB-Pep geknüpft. Nach 5, 10 und 30 min wurden Proben des Harzes vom Produkt Lys-ANB-Pep entnommen.

Zusätzlich wurde ANB-Pep mit DNBS-Lys(Ac)-Cl für 60 min behandelt, ohne dass ein vorheriges Abfangen des Thionylchlorids mit *tert*-Butanol stattfand. Für die Untersuchung von konventionellen Kupplungsmethoden wurde ANB-Pep mit DNBS-Lys(Ac)-OH (**13**) (3 Äq.), HATU (2.5 Äq.) und DIPEA (9 Äq.) in 0.5 ml DCM für 60 min umgesetzt.

Die Peptide Lys-ANB-Pep und ANB-Pep wurden vom Harz abgespalten und in kaltem Diethylether gefällt. Nach anschließender Lyophilisation der Peptide wurde die Umsetzung mithilfe analytischer HPLC (5-95 % B in 60 min, Flussrate: 1 ml/min) untersucht.

#### **4.5.4 Synthese der Hydroxamat-basierten Sondenpeptide**

##### **4.5.4.1 p53(lang)-Peptide**

Die Verknüpfungen der Standard-Fmoc-Aminosäuren erfolgten bis zum Einbau des Hydroxamat-Bausteins gemäß der allgemeinen Vorschrift am Automaten. Zur Aggregationsminimierung wurden an den Positionen 19 (377 in p53) bzw. 25 (371 in p53) die Pseudoprolin-Bausteine ST bzw. KS eingebaut. Das Peptid p53(lang)-Lys wurde in einem Maßstab von 25 µmol komplett am Automaten synthetisiert, in den anderen Fällen erfolgte die Verknüpfung der Hydroxamatderivate manuell.

Für die Synthese von p53(lang)-Apm wurde 12.5 µmol an Harz gebundenes Peptid vorgelegt. Die Kupplung erfolgte mit Alloc-*D/L*-Apm(NHOBn)-OH (**26**) (3 Äq.) zusammen mit HATU (2.7 Äq.) in 1.5 ml 400 mM NMM in DMF für 2h. Nach anschließendem Capping wurde die Alloc-Schutzgruppe nach der allgemeinen Vorschrift entfernt. Nach beendeter Verknüpfungen aller weiteren Aminosäuren am Automaten wurde das Peptid für die Abspaltung vom Harz und gleichzeitiger Entfernung der Schutzgruppen in eine eisbadgekühlte Lösung aus 420 µl Thioanisol/EDT (2:1) gegeben und gerührt. Nach Zugabe von 2.5 ml TFA wurde für 10 min gerührt und anschließend tropfenweise 250 µl TFMSA hinzugegeben. Die Suspension wurde für 16 h gerührt. Das Harz wurde filtriert und mehrmals mit TFA gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden unter Vakuum eingengt. Das Peptid wurde in eiskaltem Diethylether gefällt und anschließend lyophilisiert.

Die Synthese von p53(lang)-Aad erfolgte mit 10  $\mu\text{mol}$  Peptidharz, Alloc-Aad(NHOtBu)-OH (**24**) (2.6 Äq.), Pyoxim (2 Äq.) in 1.5 ml 400 mM NMM in DMF für 2h. Nach anschließendem Capping wurde die Alloc-Schutzgruppe nach der allgemeinen Vorschrift entfernt. Nach beendeter Verknüpfung aller weiteren Aminosäuren am Automaten wurde das Peptid mit 5 ml einer Lösung aus TFA/Phenol/TIPS/Wasser (85:5:5:5) für 16 h vom Harz abgespalten, in eiskaltem Diethylether gefällt und anschließend lyophilisiert. Die gesamten Peptide wurden mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Die gereinigten Peptide wurde mittels MALDI-MS und analytischer HPLC (5-95 % B in 20 min, Flussrate: 1.5 ml/min) charakterisiert (Tabelle 4.3).

#### 4.5.4.2 Minimal-Peptide

Die Peptide wurden gemäß der Standardvorschrift manuell in einem Maßstab von jeweils 25  $\mu\text{mol}$  synthetisiert. Dabei wurde der PEG-Linker als Fmoc-NH-(PEG)<sub>2</sub>-COOH (Novabiochem, 3 Äq.) und der letzte Glycinrest als Ac-Gly-OH eingeführt. Zur Vermeidung von Glutarimidbildung wurde bei der Synthese des Peptids mini-Glu der Glycinrest in +1 Position mit einem Alaninrest ausgetauscht.

Die Synthese der Peptide mini-Glu und mini-Aad wurde wie folgt realisiert: Mit einem dreifachen molaren Überschuss wurden Fmoc-Glu(OAllyl)-OH (**31**) (Sigma-Aldrich) bzw. Fmoc-Aad(OAllyl)-OH (**30**) zusammen mit Pyoxim (3 Äq.) in 1.5 ml 400 mM NMM in DMF für 1 h an das jeweilige Peptid geknüpft. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 10 ml 2 % DBU in DMF (v/v) (*flow wash*, 3 min) und anschließendem Ansäuern mit 10 ml 1 % TFA in DMF (v/v) (*flow wash*, 1 min) erreicht. Nach anschließender Verknüpfung des letzten Glycinrests wurde die Allyl-Schutzgruppe nach oben genannter Vorschrift abgespalten. Die Installation des geschützten Hydroxamats wurde mit *O*-Tritylhydroxylamin (10 Äq.) und Pyoxim (1 Äq.) in 2 ml 400 mM NMM in DMF durchgeführt. Die Endabspaltung der Peptide wurde mit einer Mischung aus 10 ml TFA/TIPS/Wasser (20:1:1) für 2 h erreicht.

Für die Synthese der Peptide mini-Apm und mini-Asu wurden die Bausteine Alloc-*D/L*-Apm(NHOtBu)-OH (**25**) bzw. Alloc-Asu(NHOtBu)-OH (**27**) (je 3 Äq.) zusammen mit Pyoxim (3 Äq.) in 1.5 ml 400 mM NMM in DMF für 1 h an das jeweilige Peptid geknüpft. Anschließend wurde die Alloc-Schutzgruppe entfernt und der letzte Glycinrest eingeführt. Die Endabspaltung der Peptide wurde mit einer Mischung aus 10 ml TFA/TIPS/Wasser (20:1:1) für 16 h vollzogen.

Die weitere Aufarbeitung aller Peptide wurde nach der allgemeinen Vorschrift durchgeführt. Die Peptide wurden über semipräparative HPLC gereinigt und mithilfe analytischer HPLC (5-95 % B in 20 min, Flussrate: 1.5 ml/min) und ESI-MS auf Reinheit und Identität hin überprüft (Tabelle 4.3).

#### 4.5.4.3 p53-Peptide

Die Peptide wurden gemäß der Standardvorschrift in einem Maßstab von jeweils 25 µmol am Automaten synthetisiert. Die Synthese der Peptide p53-Apm und p53-Asu wurde wie folgt realisiert: Mit einem dreifachen molaren Überschuss wurden Alloc-*D/L*-Apm(NHOtBu)-OH (**25**) bzw. Alloc-Asu(NHOtBu)-OH (**27**) zusammen mit Pyoxim (3 Äq.) in 1.5 ml 400 mM NMM in DMF für 1 h manuell an das jeweilige Peptid gekuppelt. Nach der Alloc-Abspaltung wurden die restlichen Aminosäuren am Automaten verknüpft.

Die manuelle Einführung des Aad-Hydroxamat-Bausteins wurde mithilfe Fmoc-Aad(OAllyl)-OH (**30**) (3 Äq.) und Pyoxim (3 Äq.) in 1.5 ml 400 mM NMM in DMF für 1 h durchgeführt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 10 ml 2 % DBU in DMF (v/v) (*flow wash*, 3 min) und anschließendem Ansäuern mit 10 ml 1 % TFA in DMF (v/v) (*flow wash*, 1 min) erreicht. Nach anschließender Verknüpfung der restlichen Aminosäuren am Automaten wurde die Allylschutzgruppe entfernt. Die Installation des geschützten Hydroxamats wurde mit *O*-Tritylhydroxylamin (10 Äq.) und Pyoxim (1 Äq.) in 2 ml 400 mM NMM in DMF durchgeführt. Die Peptide wurden gemäß dem Standardprotokoll für 4 h vom Harz abgespalten, in Diethylether gefällt und aus Wasser lyophilisiert. Nach der Reinigung über semipräparative HPLC wurden die Peptide mithilfe analytischer HPLC (5-95 % B in 20 min, Flussrate: 1.5 ml/min) und ESI-MS charakterisiert (Tabelle 4.3).

#### 4.5.4.4 NTF2-Peptide

Die Peptide wurden gemäß der Standardvorschrift in einem Maßstab von jeweils 25 µmol am Automaten synthetisiert. Die manuelle Einführung des Aad-Hydroxamat-Bausteins wurde mithilfe Fmoc-Aad(OAllyl)-OH (**30**) (3 Äq.) und Pyoxim (3 Äq.) in 1.5 ml 400 mM NMM in DMF für 1 h durchgeführt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 10 ml 2 % DBU in DMF (v/v) (*flow wash*, 3 min) und anschließendem Ansäuern mit 10 ml 1 % TFA in DMF (v/v) (*flow wash*, 1 min) erreicht. Nach anschließender Verknüpfung der restlichen Aminosäuren am Automaten wurde die Allylschutzgruppe entfernt. Die Installation des geschützten Hydroxamats wurde mit *O*-Tritylhydroxylamin (10 Äq.) und Pyoxim (1 Äq.) in 2 ml 400 mM NMM in DMF durchgeführt. Die Peptide wurden gemäß dem Standardprotokoll vom Harz abgespalten, in Diethylether gefällt und aus Wasser lyophilisiert. Nach der Reinigung über semipräparative HPLC wurden die Peptide mithilfe analytischer HPLC (5-95 % B in 20 min, Flussrate: 1.5 ml/min) und ESI-MS charakterisiert (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3: Analysedaten der synthetisierten Hydroxamatsonden.** Die Bestimmung der Molekülmasse und der Reinheit erfolgte mittels MALDI- bzw. ESI-MS und analytischer HPLC.

Bezeichnung	Peptidsequenz	M in g/mol	[M] <sup>+</sup> ber.	[M+H] <sup>+</sup> gef.	Reinheit (%)	R <sub>t</sub> [min]
p53(lang)-Lys	RAHSSHLKSKKGGQSTSRHK-Lys-LMFKTEGPDSD-Ahx-C-NH <sub>2</sub>	3769.28	3766.91	3768.24	>99	10.0
p53(lang)-Aad	RAHSSHLKSKKGGQSTSRHK-Aad-LMFKTEGPDSD-Ahx-C-NH <sub>2</sub>	3755.26	3752.90	3754.05	>99	9.9
p53(lang)-Apm	RAHSSHLKSKKGGQSTSRHK-Apm-LMFKTEGPDSD-Ahx-C-NH <sub>2</sub>	3725.27	3722.92	3723.03	99	15.2
p53-Lys	TSRHK-Lys-LMFKTE-Ahx-C-NH <sub>2</sub>	1721.12	1719.93	1719.27 ± 0.39	>99	10.1
p53-Aad	TSRHK-Aad-LMFKTE-Ahx-C-NH <sub>2</sub>	1751.10	1749.90	1749.47 ± 0.42	98	10.1
p53-Apm	TSRHK-Apm-LMFKTE-Ahx-C-NH <sub>2</sub>	1765.13	1763.92	1763.53 ± 0.42	98	10.3
p53-Asu	TSRHK-Asu-LMFKTE-Ahx-C-NH <sub>2</sub>	1779.16	1777.93	1777.44 ± 0.41	97	10.5
mini-Lys	Ac-G-Lys-G-PEG-C-NH <sub>2</sub>	607.72	607.30	608.12	>99	7.9
mini-Glu	Ac-G-Glu-A-PEG-C-NH <sub>2</sub>	637.71	637.27	637.98	>99	8.3
mini-Aad	Ac-G-Aad-G-PEG-C-NH <sub>2</sub>	637.71	637.27	638.14	96	8.0
mini-Apm	Ac-G-Apm-G-PEG-C-NH <sub>2</sub>	651.73	651.29	652.07	96	8.3
mini-Asu	Ac-G-Asu-G-PEG-C-NH <sub>2</sub>	665.76	665.31	666.02	99	8.6
NTF2-Lys	MGD-Lys-PIWEQC-NH <sub>2</sub>	1205.41	1204.54	1204.71	99	11.8
NTF2-Aad	MGD-Aad-PIWEQC-NH <sub>2</sub>	1235.40	1234.51	1234.54	95	12.2

#### 4.5.5 Immobilisierung der Peptide an Agarosematrices

Für die Anwendung der Sonden in Pulldown-Experimenten wurden die gereinigten Peptide an eine Agarosematrix (*SulfoLink coupling resin*, Thermo Scientific) immobilisiert. Dabei wurde eine Thioetherbindung zwischen der Thiolgruppe des Cysteins und der mit Iodoacetylgruppen funktionalisierten festen Phase ausgebildet. Zu diesem Zweck wurden 300 µl einer Suspension des Trägermaterials (enthält 50 % feste Phase) sechsmal mit 800 µl Kopplungspuffer (50 mM TRIS, 5 mM EDTA-Na, pH 8.5) gewaschen und anschließend für 1 h mit 300 µl des in Kopplungspuffer gelösten Peptids (1 mM) inkubiert. Das Trägermaterial wurde dreimal mit 800 µl Kopplungspuffer gewaschen. Um die restlichen reaktiven Iodoacetylgruppen zu blockieren wurde die Matrix für 1 h mit 50 mM 2-Mercaptoethanol, gelöst in 500 µl Kopplungspuffer, inkubiert. Die Matrix wurde sechsmal mit 1 ml 1 M NaCl, zweimal mit 1 ml H<sub>2</sub>O und viermal mit 1 ml ACN / H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) gewaschen und in 150 µl ACN/ H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) suspendiert. Die Peptid-beladene Agarosematrix wurde in Aliquots zu je 20 µl bei -20°C gelagert.

## 4.6 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden

### 4.6.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde spektrophotometrisch (Genesys 10S UV-Vis Spektrophotometer, Thermo Scientific) über die Absorption bei 280 nm bzw. mithilfe der BCA-Reaktion durchgeführt; im letzteren Fall wurde die Absorption bei 562 nm mit einem Plattenlesegerät (Infinite M200, Tecan, Schweiz) bestimmt.

### 4.6.2 SDS-PAGE

Als Standardmethode für die Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei wurden folgende Zusammensetzungen der Puffer verwendet.

SDS-Laufpuffer:	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS (w/v)
Probenpuffer (5x):	250 mM TRIS-HCl (pH 6.8), 10 % SDS (w/v), 30 % Glycerol (v/v), 500 mM DTT, 0.02 % Bromphenolblau
Sammelgel:	125 mM TRIS-HCl (pH 6.8), 3.75 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1) (w/v), 0.1 % SDS (w/v), 0.1 % TEMED (v/v), 0.04 % APS (w/v)
Trenngel:	(10-15 %): 375 mM TRIS-HCl (pH 8.8), 10-15 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1) (w/v), 0.1 % SDS (w/v), 0.1 % TEMED (v/v), 0.04 % APS (w/v)

Für die Proteinauftrennung aus SILAC-Pulldown-Experimenten wurden Gradientengele (Tris-Glycin 4 – 20 % Mini-Protean TGX, Bio-Rad, München) verwendet.

Die Proteinproben wurden in Probenpuffer (5x) aufgenommen und zwecks Denaturierung und Reduzierung für 10 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstant 180 V für 45 min durchgeführt. Für die Sichtbarmachung der Proteinbanden, wurde das Gel für 1 h fixiert (40 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v)) und anschließend in kolloidaler Coomassie-Färbelösung für mehrere Stunden gefärbt (17 % Ammoniumsulfat (w/v), 2.55 % ortho-Phosphorsäure (v/v), 34 % Methanol (v/v), 0.1 % Coomassie G-250 (w/v)). Für eine Erhöhung des Kontrasts wurde der proteinfreie Hintergrund mit 1 % Essigsäure entfärbt.

Alternativ wurde das Gel, für ein rascheres Anfärben, dreimalig mit heißem Wasser gewaschen und anschließend 15 min mit einer Coomassie-Lösung behandelt (0.07 % Coomassie G-250 (w/v), ~35 mM HCl).

#### 4.6.3 Western Blotting

Die Immunodetektion von Proteinen mithilfe von spezifischen Antikörpern erlaubt die Identifizierung von Proteinen, die vorher durch die Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Größe getrennt wurden sind. Dafür wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Roti-PVDF, Carl-Roth) transferiert. Dies wurde im Tank-Blotting-Verfahren in einem Transferpuffer (12 mM TRIS-HCl, pH 8.3 (RT), 96 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v), 0.015 % SDS (v/v)) für 2 h bei konstant 200 mA und 4 °C realisiert. Anschließend wurde die Membran kurz in TBST-Puffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7.2 - 7.4 (RT), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween20 (v/v)) gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver in TBST (w/v) (Blockierlösung) gegeben.

Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper gegen das Zielprotein erfolgte über Nacht bei 4°C. Die jeweiligen Antikörper (Tabelle 4.4) wurden dabei in der Blockierlösung verdünnt. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST für jeweils 10 min, wurde die Membran mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in TBST gewaschen. Die Visualisierung erfolgte mithilfe der *enhanced* Chemilumineszenz (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific) an einem Lumineszenz Image Analyzer (Fujifilm LAS-3000). Das Ablösen des Antikörpers von der Membran (*stripping*) für eine erneute Immunodetektion wurde durch zweimalige Inkubation der Membran für jeweils 5 min mit folgender Lösung erreicht: (6 M Guanidin-HCl, 0.2 % Nonidet P40 (v/v), 0.1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20 mM TRIS-HCl, pH 7.5). Anschließend wurde fünfmal für 5 min gewaschen (140 mM NaCl, 0.05 % Nonidet P-40 (v/v), 10 mM TRIS-HCl, pH 7.2).

**Tabelle 4.4: Verwendete Antikörper**

Primärantikörper	Host / Isotyp	WB-Verdünnung	Artikel-Nr. (Firma)
HDAC1	mouse-mono-IgG1	1:200	ab46985 (abcam plc, Cambridge, England)
HDAC1	rabbit-poly-IgG	1:1000	PA1-860 (Thermo Fisher Scientific)
HDAC2	rabbit-poly-IgG	1:2000	PA1-861 (Thermo)
HDAC2	goat-poly-IgG	1:500	sc-6296 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
HDAC3	rabbit-poly-IgG	1:500	PA1-862 (Thermo)
HDAC4	rabbit-poly-IgG	1:1000	PA1-863 (Thermo)
HDAC4	goat-poly-IgG	1:500	sc-5245 (Santa Cruz)
HDAC5	rabbit-poly-IgG	1:500	PA1-14188 (Thermo)
HDAC6	rabbit-poly-IgG	1:1000	sc-11420 (Santa Cruz)
HDAC7	rabbit-poly-IgG	1:1000	PA5-29937 (Thermo)
HDAC8	rabbit-poly-IgG	1:1000	sc-11405 (Santa Cruz)
HDAC9	rabbit-poly-IgG	1:250	PA5-11245 (Thermo)
HDAC10	rabbit-poly-IgG	1:250	PA1-23496 (Thermo)
HDAC11	rabbit-poly-IgG	1:1000	PA5-30703 (Thermo)

Sekundärantikörper	Host / Isotyp	WB-Verdünnung	Artikel-Nr. (Firma)
goat anti-rabbit	IgG-HRP	1:2000	sc-2004 (Santa Cruz)
goat anti-mouse	IgG-HRP	1:2000	sc-2005 (Santa Cruz)
donkey anti-goat	IgG-HRP	1:1000	sc-2020 (Santa Cruz)

#### 4.6.4 Pulldown-Experimente

##### 4.6.4.1 Allgemeine Methodik

Für die Untersuchung von Peptid-spezifischen Anreicherungen von Histon-Deacetylasen aus komplexen Zellextrakten wurden Pulldown-Experimente mit immobilisierten Hydroxamat-basierten Sondenpeptiden durchgeführt. Jeweils 20 µl der Agarosematrix-gebundenen Peptide wurden in Mikrozentrifugeneinheiten (Ultrafree-MC, Merck-Millipore) überführt und fünfmal mit 200 µl Pulldown-Puffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 20 % Glycerol (v/v)) für 2 min äquilibriert. Anschließend wurde die Peptidmatrix mit 200 µl des jeweiligen Zellextrakts (*E.coli* bzw. HeLa-S3: Cytosol-, Kern- oder Gesamtzellextrakt) inkubiert; die Proteinkonzentration des Extrakts wurde mit Pulldown-Puffer auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 1 h geschüttelt. Der Überstand wurde abzentrifugiert und die Protein-beladene Festphase sechsmal

mit je 500 µl Waschpuffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 300 mM KCl, 20 % Glycerol (v/v)) für 5 min gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte unter Erhitzen (95°C, 10 min) in 20 µl SDS-Probenpuffer (5x) und anschließender Zentrifugation (12000 rpm, 5 min). Die reduzierten und denaturierten Proteine konnten bis zum Auftragen auf ein SDS-Gel bei 4°C gelagert werden.

#### 4.6.4.2 SILAC-Pulldown-Experimente

Die SILAC-Extrakte für die Pulldown-Experimente mit den Peptidkonjugaten p53(lang)-Aad und p53(lang)-Lys wurden entweder aus eigener Zellkultur präpariert oder wurden von der Forschungsgruppe Massenspektrometrie und Chromatin Biochemie (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Dabei wurden für SILAC-Experiment **1** HeLa-S3 Kernextrakte und für SILAC-Experiment **2** HeLa-S3 Cytosolextrakte (S100-Fraktion) eingesetzt. Die Pulldown-Experimente wurden in Doppelbestimmungen mit jeweils vertauschter Isotopenmarkierung durchgeführt, d. h. die beiden Peptidköder wurden sowohl mit „schwerem“ (*Heavy*, H) als auch mit „leichtem“ SILAC-Extrakten (*Light*, L) inkubiert (Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5: Markierungsschema der HeLa-S3-Zellextrakte in den SILAC-Pulldown-Experimenten**

Sonde	Isotopenmarkierung der Aminosäuren			
	Experiment 1 (Kernextrakt)		Experiment 2 (cytosol. Extrakt)	
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
p53(lang)-Aad	Lys-4 ( $^2\text{H}_4$ ) Arg-6 ( $^{13}\text{C}_6$ )	Lys-0 Arg-0	Lys-6 ( $^{13}\text{C}_6$ ) Arg-10 ( $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$ )	Lys-0 Arg-0
p53(lang)-Lys	Lys-0 Arg-0	Lys-4 ( $^2\text{H}_4$ ) Arg-6 ( $^{13}\text{C}_6$ )	Lys-0 Arg-0	Lys-6 ( $^{13}\text{C}_6$ ) Arg-10 ( $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$ )

Die Pulldown-Experimente mit den SILAC-Extrakten wurden analog der allgemeinen Vorschrift durchgeführt. Die Konzentrationen der Extrakte betragen 5 mg/ml bei einem eingesetzten Volumen von 200 µl. Nach der Ablösung der Proteine wurden die Eluatfraktionen der beiden Peptidköder 1:1 vereinigt und mithilfe der SDS-PAGE aufgetrennt.

#### 4.6.5 Tryptischer In-Gel-Verdau

Für eine massenspektrometrische Untersuchung der angereicherten Proteine aus den SILAC-Pulldown-Experimenten wurde eine Reihe von Probenvorbereitungsschritten an den im Gel befindlichen Proteinen unternommen. Diese beinhalteten die Entfärbung des Gels, die proteolytische Spaltung der Proteine mithilfe Trypsins und die Extraktion der resultierenden Peptide. Dazu wurde die Coomassie-gefärbte SDS-Gelspur in vierzig Teile zerschnitten. Die Proben wurden hintereinander mit je 200  $\mu$ l 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7.9) in ACN/Wasser (1:1, v/v) und anschließend 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7.8) für 10 min bei 30°C unter Schütteln gewaschen. Der überstehende Puffer wurde verworfen; die Gelstücke wurden in 100  $\mu$ l ACN dehydriert und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Für den enzymatischen Verdau wurden pro Probe 0.05  $\mu$ g Trypsin (*sequencing grade modified*, Promega, Mannheim), gelöst in 10  $\mu$ l 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7.8), zu den Gelstücken gegeben und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ l 0.5 % TFA in ACN (v/v) abgestoppt und die Proben wurden für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Die Überstände wurden in Glasfläschchen überführt; die Gelstücke wurden mit 50  $\mu$ l ACN dehydriert und die Überstände wurden mit den vorherigen vereint. Nach anschließendem Trocknen der Proben in der Vakuumzentrifuge, wurden die Rückstände in 6  $\mu$ l 0.1 % TFA, 5 % ACN in Wasser (v/v/v) gelöst und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

#### 4.6.6 Nano-LC-ESI-MS/MS

Die LC-MS/MS-Messungen wurden von Dr. Michael Schümann (Massenspektrometrie, FMP Berlin) an einem LQT-Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo) mit einem vorgeschalteten Eksigent nano-LC-System (Axel Semrau GmbH, Sprockhövel) durchgeführt. Es wurden jeweils 5.4  $\mu$ l der Probe injiziert. Die Auftrennung erfolgte zuerst über eine LC PepMap C18-Vorsäule (5  $\mu$ m, 100 Å, 5 mm x 300  $\mu$ m, Dionex, Idstein) und anschließend über eine PepMap C18-Säule (3  $\mu$ m, 100 Å, 250 mm x 75  $\mu$ m, Dionex). Als Lösungsmittelsystem wurde A (0.1 % Ameisensäure in Wasser, v/v) und B (0.1 % Ameisensäure in ACN, v/v) benutzt. Für Proben aus deutlich gefärbten Gelbanden wurde ein linearer Gradient von 0.25 % B/min mit einer Flussrate von 250 nl/min und einer Gesamtzeit von 112 min verwendet. Für Proben aus weniger gefärbten Banden wurde ein linearer Gradient von 0.4 % B/min mit einer Flussrate von 300 ml/min und eine Gesamtzeit von 75 min angewandt. Die Erfassung der Massenspektren erfolgte im datenabhängigen Modus unter Erzeugung von einem MS-Übersichtsscans im Massenbereich m/z 75 – 1500 im Orbitrap (Auflösung: 60000) und parallelen MS/MS-Scans der vier intensivsten Vorläuferionen in der Ionenfalle (LQT) mit einer dynamischen Ausschlusszeit von 90 sec.

#### 4.6.7 Datenverarbeitung und Quantifizierung

Für die Identifizierung und Quantifizierung der Proteine wurde die MaxQuant-Software (Version 1.2.0.18) verwendet. Die generierten Peaklisten wurden an die Suchmaschine Mascot übermittelt und mit der Datenbank IPI.HUMAN (Version 3.78) abgeglichen. Die Massentoleranz für Vorläufer- und Fragmentationen wurde auf 20 ppm bzw. 0.35 Da gesetzt. Für die Suche wurden Methioninoxidationen und Cystein-Propionamidaddukte als variable Modifizierungen berücksichtigt und eine Falschidentifizierungsrate von < 0.01 zugelassen. Ein Protein wurde als identifiziert angesehen, wenn mindestens zwei einzigartige Peptide (*unique peptides*) der Sequenz zugewiesen werden konnte. Die Proteinverhältnisse wurden anerkannt, wenn mindestens zwei Quantifizierungsereignisse (*ratio counts*) beitrugen.

#### 4.6.8 Expression von HDAC8

Für die Proteinexpression von humanen HDAC8 wurde ein entsprechender Glycerolvorrat von *E. coli* BL21(DE3) Zellen, die das Plasmid (pet-23b-HDAC8-His6) enthalten, verwendet. Die Zellen wurden von Oliver Krätke (AG Schwarzer, FMP Berlin) zur Verfügung gestellt. Man ließ die Zellkultur in 700 ml LB-Medium, welches 0.7 ml Ampicillin enthielt, bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0.6 – 0.7 bei 37°C wachsen. Die Expression wurde durch Zugabe von 0.5 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C unter Schütteln über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4°C) geerntet und das Zellpellet wurde in 30 ml Lysepuffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT) resuspendiert. Die Zellen wurden am Homogenisator unter Druck aufgeschlossen und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (40 min, 15000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und im Zentrifugalkonzentrator (MWCO 10k Da, Amicon) aufkonzentriert. Nach Zugabe von 20 % Glycerol (v/v) wurde das Lysat bei -20°C gelagert. Das Proteinlysate wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

#### 4.6.9 Kultivierung von HeLa-S3 Zellen

Für die Herstellung von cytosolischen und nuklearen Extrakten wurden HeLa-S3-Zellen, humane Epithelzellen eines Gebärmutterkarzinoms, für die Kultivierung verwendet. Diese wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) (DSMZ-Nr. ACC 161) erworben.

Die HeLa-S3-Zellen wurden adhären in Zellkulturflaschen als Monolayer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Low Glucose, PAA Laboratories GmbH, Österreich) kultiviert. Dem Medium wurde 10 % fetales Kälberserum (v/v) (FBS Gold, PAA) und 1 % Penicillin-Streptomycin (v/v) (PAA) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 %. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte nach 3-4 Tagen bei ca. 80 % Konfluenz. Dabei wurden die Zellen mit PBS (Dulbeccos's PBS, PAA) zweimal gewaschen und anschließend durch fünfminütige Inkubation mit 0.05 % Trypsin und EDTA (0.2 g/L) (PAA) abgelöst. Die Zellen wurden im Medium (10 % FBS) aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in ca. 1:10-Verdünnung neu ausgesät.

#### **4.6.10 Stabile Isotopenmarkierung in Zellkultur**

Die stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur (SILAC) wurde in Anlehnung an das Protokoll von Ong und Mann (2006) durchgeführt.

Die Präparation von isotopenmarkierten Extrakten aus HeLa-S3-Zellen wurde unter Verwendung des SILAC-Media-Kits (SILAC-Lys8-Arg10-Kit, Silantes, München) realisiert. Es wurde jeweils eine Zellpopulation in „leichtem“ und eine in „schwerem“ Medium kultiviert, die sich ausschließlich in der Isotopenmarkierung von Lysin und Arginin unterscheiden. Dafür wurde zu jeweils 500 ml SILAC-Medium (Lysin- und Arginin-defizientes DMEM mit 10 % dialysierten FBS, 1 % Penicillin-Streptomycin, v/v/v) unmarkiertes L-Lysin-HCl (0.798 mM) und L-Arginin-HCl (0.398 mM) für das leichte Medium, sowie <sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub>-markiertes L-Lysin-HCl (0.798 mM) und <sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>-L-Arginin-HCl (0.398 mM,) für das schwere Medium, gegeben. Die Zellen wurden in zehn Tagen über fünf Passagen in 75 cm<sup>2</sup>- bzw. 175 cm<sup>2</sup>- Zellkulturflaschen kultiviert und anschließend in Gewebekulturschalen ausgesät.

#### **4.6.11 Präparation von cytosolischen und nuklearen Zellextrakten**

Die Herstellung von cytosolischen und nuklearen Extrakten aus HeLa-S3-Zellen erfolgte gemäß dem Protokoll von Dignam *et al.* (1983). Jegliche Lyse-, Zentrifugation- und Dialyseschritte der Präparation, wurden bei 0 – 4°C mit eiskalten Pufferlösungen durchgeführt.

Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers abgelöst und in PBS suspendiert. Im Anschluss an die Bestimmung der Zellzahl wurde die gesammelte Zellsuspension durch Zentrifugation pelletiert (1000 g, 10 min) und das gepackte Zellvolumen wurde bestimmt. Das Zellpellet wurde mit dem fünffachen Volumen PBS resuspendiert und zentrifugiert (1000 g, 10 min). Anschließend wurden die Zellen im fünffachen Volumen an Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5

mM DTT, 0.5 mM AEBSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM NaF) resuspendiert und für 10 min kühl gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (1000 g, 10 min) wurde das Pellet mit dem zweifachen Volumen an Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit zehn Pistillstößen in einem *Dounce*-Glashomogenisator aufgeschlossen. Nach Pelletierung des Zelllysats durch Zentrifugation (1000 g, 10 min) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet wurde erneut zentrifugiert (25000 g, 20 min). Der Überstand wurde mit dem aus dem vorherigen Schritt vereint und beinhaltete die cytoplasmatische Fraktion; das Pellet enthielt die nukleare Fraktion des Lysats. Die vereinigten Überstände wurde mit dem 0.11-fachen Volumen des folgenden Puffers ergänzt (300 mM HEPES, pH 7.9, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.4 M KCl) und bei 100k g für 1 h zentrifugiert. Der resultierende Überstand, die cytosolische Fraktion, wurde über Nacht mithilfe einer Dialysemembran (MWCO 3500 Da) gegen das 20-fache Volumen an Dialysepuffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM AEBSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM NaF, 20 % Glycerol) dialysiert. Das Zellpellet, welches die nukleare Fraktion enthielt, wurde zusammen mit 1 ml pro 10<sup>8</sup> Zellen Hochsalz-Lysepuffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5 mM AEBSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM NaF, 25 % Glycerol) im *Dounce*-Glashomogenisator mit 10 Pistillstößen aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 30 min gerührt und anschließend zentrifugiert (25000 g, 30 min). Der Überstand wurde gegen das 50-fache Volumen an Dialysepuffer über Nacht dialysiert (MWCO 3500 Da). Klares nukleares Extrakt wurde nach einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt (25000 g, 30 min) erhalten. Die erhaltenen Extraktfraktionen wurden entweder einzeln oder vereint, in Repräsentation eines Gesamtzellextraktes, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen der Extrakte betragen zwischen 4-7 mg/ml.

## 5 Literatur

**Allfrey, V. G., Faulkner, R., Mirsky, A. E.** "Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis" *Proc Natl Acad Sci U S A* (1964) 51(5): 786-794

**Baeza, J., Dowell, J. A., Smallegan, M. J., Fan, J., Amador-Noguez, D., Khan, Z., Denu, J. M.** "Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire proteome" *J Biol Chem* (2014) 289(31): 21326-2138

**Bannister, A. J., Kouzarides, T.** "Regulation of chromatin by histone modifications" *Cell Res* (2011) 21: 381-395

**Bantscheff, M., Hopf, C., Savitski, M. M.; Dittmann, A., Grandi, P., Michon, A.-M., Schlegl, J., Abraham, Y., Becher, I., Bergamini, G., Boesche, M., Delling, M., Dümpelfeld, B., Eberhard, D., Huthmacher, C., Mathieson, T., PoECKel, D., Reader, V., Strunk, K., Sweetman, G., Kruse, U., Neubauer, G., Ramsden, N. G., Drewes, G.** "Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes" *Nat Biotechnol* (2011) 29: 255–265

**Belvedere, S., Witter, D. J., Yan, J., Secrist, J. P., Richon, V., Miller, T. A.** "Aminosuberoyl hydroxamic acids (ASHAs): a potent new class of HDAC inhibitors" *Bioorg Med Chem Lett* (2007) 17(14): 3969-3971

**Ben-Ishai, D.** "Reaction of acylamino acids with paraformaldehyde" *J Am Chem Soc* (1957) 79: 5736-5738

**Biel, M., Wascholowski, V., Giannis, A.** "Epigenetik - ein Epizentrum der Genregulation: Histone und histonmodifizierende Enzyme." *Angew Chem* (2005) 117(21): 3248-3280

**Bode, A. M., Dong, Z.** "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis" *Nat Rev Cancer* (2004) 4(10): 793-805

**Borra, M. T., Langer, M. R., Slama, J. T., Denu, J. M.** "Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD<sup>+</sup>-dependent histone/protein deacetylases" *Biochemistry* (2004) 43: 9877-9887

**Borra, M. T., Smith, B. C., Denu, J.** "Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol" *J Biol Chem* (2005) 280(17): 17187-17195

**Bradner, J. E., West, N., Grachan, M. L., Greenberg, E. F., Haggarty, S. J., Warnow, T., Mazitschek, R.** "Chemical phylogenetics of histone deacetylases" *Nat Chem Biol* (2010) 6: 238–243

**Buggy, J. J., Sideris, M. L., Mak, P., Lorimer, D. D., McIntosh, B., Clark, J. M.** "Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8" *Biochem J* (2000) 350(Pt 1): 199–205

**Carpino, L. A., Beyermann, M., Wenschuh, H., Bienert, M.** "Peptide synthesis via amino acid halides" *Acc Chem Res* (1996) 29: 268-274

**Carpino, L. A., Chao, H. G., Beyermann, M., Bienert, M.** "[[9-Fluorenylmethyl]oxy]carbonyl amino acid chlorides in solid-phase peptide synthesis" *J Org Chem* (1991) 56(8): 2635-2642

**Carpino, L. A., Ionescu, D., El-Faham, A., Henklein, P., Wenschuh, H., Bienert, M., Beyermann, M.** "Protected amino acid chlorides vs protected amino acid fluorides: reactivity comparisons" *Tetrahedron Lett* (1998) 39: 241-244

**Chen, Y., Zhao, W., Yang, J. S., Cheng, Z., Luo, Z., Tan, M., Gu, W., Zhao, Y.** "Quantitative acetylome analysis reveals the roles of SIRT1 in regulating diverse substrates and cellular pathways" *Mol Cell Proteomics* (2012) 11(10): 1048-1062

**Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehmann, M., Walther, T. C., Olsen, J. V., Mann, M.** "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions" *Science* (2009) 325(5942): 834-840

**Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E., Mann, M.** "The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signaling" *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) 15(8): 536-550

**Cole, P. A.** "Chemical probes for histone-modifying enzymes" *Nat Chem Biol* (2008) 4(10): 590-597

**Comel, A., Sorrentino, G., Capaci, V., Del Sal, Giannino** "The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities" *FEBS Lett* (2014) 588(16): 2600-2609

**Cox, J., Mann, M.** "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification" *Nat Biotechnol* (2008) 26(12): 1367-1372

**Cravatt, B. F., Wright, A. T., Kozarich, J. W.** "Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry" *Annu Rev Biochem* (2008) 77: 383-414

**Culhane, J. C., Szewczuk, L. M., Liu, X., Da, G., Marmorstein, R., Cole, P.** "A mechanism-based inactivator for histone demethylase LSD1" *J Am Chem Soc* (2006) 128: 4536-4537

**Dai, L., Peng, C., Montellier, E., Lu, Z., Chen, Y., Ishii, H., Debernardi, A., Buchou, T., Rousseaux, S., Jin, F., Sabari, B. R., Deng, Z., Allis, C. D., Ren, B., Khochbin, S., Zhao, Y.** "Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark" *Nat Chem Biol* (2014) 10(5): 365-370

**Davey, C. A., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W., Richmond, T. J.** "Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution" *J Mol Biol* (2002) 319(5): 1097-1113

**De Ruijter, A. J. M., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., van Kuilenburg, A. B. P.** "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family" *Biochem J* (2003) 370: 737-749

**Dignam, J. D., Martin, P. L., Shastry, B. S., Roeder, R. G.** "Eukaryotic gene transcription with purified components." *Methods Enzymol* (1983) 101: 582-598

**Ding, G., Liu, H.-D., Huang, Q., Liang, H.-X., Ding, T.-H., Liao, Z.-J., Huang, G.** "HDAC6 promotes hepatocellular carcinoma progression by inhibiting p53 transcriptional activity" *FEBS Lett* (2013) 587: 880-886

**Dion, M. F., Altschuler, S. J., Wu, L. F., Rando, O. J.** "Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(15): 5501-5506

**Dokmanovic, M., Clarke, C., Marks, P. A.** "Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives" *Mol Cancer Res* (2007) 5(10): 981-989

**Dose, A., Jost, J. O., Spieß, A. C., Henklein, P., Beyermann, M., Schwarzer, D.** “Facile synthesis of colorimetric histone deacetylase substrates” *Chem Commun* (2012) 48(76): 9525-9527

**Dose, A., Liokatis, S., Theillet, F.-X., Selenko, P., Schwarzer, D.** “NMR profiling of histone deacetylase and acetyl-transferase activities in real time” *ACS Chem Biol* (2011) 6: 419-424

**Dose, A., Sindlinger, J., Bierlmeier, J., Bakirbas, A., Schulze-Osthoff, K., Einsele-Scholz, S., Hartl, M., Finkemeier, I., Schwarzer, D.** “Interrogating substrate selectivity and composition of endogenous histone deacetylase complexes with chemical probes” *Angew Chem Int Ed Engl.* (2015) 55(3): 1192-1195

**Eberl, H. C., Mann, M., Vermeulen, M.** “Quantitative proteomics for epigenetics” *Chembiochem* (2011) 12(2): 224-234

**Egelhofer, T. A., Minoda, A., Klugman, S., Lee, K., Kolasinska-Zwierz, P., Alekseyenko, A. A., Cheung, M. S., Day, D. S., Gadel, S., Gorchakov, A. A., Gu, T., Kharchenko, P. V., Kuan, S., Latorre, I., Linder-Basso, D., Luu, Y., Ngo, Q., Perry, M., Rechtsteiner, A., Riddle, N. C., Schwartz, Y. B., Shanower, G. A., Vielle, A., Ahringer, J., Elgin, S. C., Kuroda, M. I., Pirrotta, V., Ren, B., Strome, S., Park, P. J., Karpen, G. H., Hawkins, R. D., Lieb, J. D.** “An assessment of histone-modification antibody quality” *Nat Struct Mol Biol* (2011) 18(1): 91-93

**Fatkins, D. G., Zheng, W.** “A spectrophotometric assay for histone deacetylase 8” *Anal Biochem* (2008) 372: 82-88

**Felsenfeld, G., Groudine, M.** “Controlling the double helix” *Nature* (2003) 421(6921): 448-453

**Filippakopoulos, P., Knapp, S.** “The bromodomain interaction module” *FEBS Lett* (2012) 586(17): 2692-2704

**Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., Pavletich, N. P.** “Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors” *Nature* (1999) 401(6749): 188-193

**Fischle, W., Dequiedt, F., Fillion, M., Hendzel, M. J., Voelter, W., Verdin, E.** “Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo” *J Biol Chem* (2001) 276(38): 35826-35835

**Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., Verdin, E.** "Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR" *Mol Cell* (2002) 9: 45-57

**Fukuyama, T., Cheung, M., Jow, C. K., Hidai, Y., Kan, T.** "2,4-Dinitrobenzenesulfoamides: a simple and practical method for preparation of a variety of secondary amines and diamines" *Tetrahedron Lett* (1997) 38(33): 5831-5834

**Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M., Horinouchi, S.** "Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98(1): 87-92

**Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M., Steinkühler, C.** "HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics" *Cell Res* (2007) 17(3): 195-211

**Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X., Seto, E.** "Acetylation and deacetylation of non-histone proteins" *Gene* (2005) 363: 15-23

**Govender, T., Arvidsson, P. I.** "Facile synthesis of Fmoc-N-methylated  $\alpha$ - and  $\beta$ -amino acids" *Tetrahedron Lett* (2006) 47: 1691-1694

**Gregoretto, I. V., Lee, Y. M., Goodson, H. V.** "Molecular Evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis" *J Mol Biol* (2004) 338(1): 17-31

**Gu, W., Roeder, R. G.** "Activation of p53 sequence-specific DANN binding by acetylation of the p53 C-terminal domain" *Cell* (1997) 90: 595-606

**Guarente, L., Kenyon, C.** "Genetic pathways that regulate ageing in model organisms" *Nature* (2000) 408: 255-262

**Gupta, S., Kim, S. Y., Artis, S., Molfese, D. L., Schumacher, A., Sweatt, J. D., Paylor, R. E., Lubin, F. D.** "Histone methylation regulates memory formation" *J Neurosci* (2010) 30(10): 3589-3599

**Gurard-Levin, Z. A., Mrksich, M.** "The activity of HDAC8 depends on local and distal sequences of its peptide substrates" *Biochemistry* (2008) 47: 6242-6250

**Gurard-Levin, Z. A., Kim, J., Mrksich, M.** "Combining mass spectrometry and peptide arrays to profile the specificity of histone deacetylases" *ChemBioChem* (2009) 10(13): 2159-2161

**Gutierrez, R. M., Hnilica, L. S.** "Tissue specificity of histone phosphorylation" *Science* (1967) 157(3794): 1324-1325

**Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R.** "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags." *Nat Biotechnol* (1999) 17(10): 994-999

**Hahnen, E., Hauke, J., Tränkle, C., Eyüpoglu, I.Y., Wirth, B., Blümcke, I.** "Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders" *Expert Opin Investig Drugs* (2008) 17(2): 169-184

**Hanessian, S., Bouzbouz, S., Boudon, A., Tucker, C. G., Peyroulan, D.** "Picking the S1, S1' and S2' pockets of matrix metalloproteinases. A niche for potent acyclic sulfonamide inhibitors" *Bioorg & Med Chem Lett* (1999) 9: 1691-1696

**Hauser, A.-T., Jung, M., Jung, M.** "Assays for histone deacetylases" *Curr Top Med Chem* (2009) 9: 227-234

**Henikoff, S.** "Histone modifications: combinatorial complexity or cumulative simplicity?" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(15): 5308-5309

**Henklein, P.** "N<sup>α</sup>-Arensulfonyl-Aminosäurechloride – Kupplung sterisch stark gehinderter Komponenten in der Peptidsynthese" *Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Diss.* (2000)

**Hennig, W.** "Heterochromatin" *Chromosoma* (1999) 108(1): 1-9

**Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Lartham, V., Skrzypek, E.** "PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations" *Nucleic Acids Res* (2015) 43:D512-20

**Howitz, K., Bittermann, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L-L., Scherer, B., Sinclair, D. A.** "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan" *Nature* (2003) 425: 191-196

**Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G. F., Johanson, K., Sung, C. M., Liu, R., Winkler, J.** "Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor" *J Biol Chem* (2000) 275: 15254–15264

**Hubbard, B. P., Gomes, A. P., Dai, H., Li, J., Case, A. W., Considine, T., Riera, T. V., Lee, J. E., E, S. Y., Lamming, D. W., Pentelute, B. L., Schuman, E. R., Stevens, L. A., Ling, A. J., Armour, S. M., Michan, S., Zhao, H., Jiang, Y., Sweitzer, S. M., Blum, C. A., Disch, J. S., Ng, P. Y., Howitz, K. T., Rolo, A. P., Hamuro, Y., Moss, J., Perni, R. B., Ellis, J. L., Vlasuk, G. P., Sinclair, D. A.** "Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators" *Science* (2013) 339(6124): 1216-1219

**Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.-H., Kovacs, J. J., Higashimoto, Y., Appella, E., Yao, T.-P.** "MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation" *EMBO J* (2002) 21(22): 6236-6245

**Jenuwein, T., Allis, C. D.** "Translating the histone code" *Science* (2001) 293: 1074–1080

**Jost, J. O., Hanswillemenke, A., Schwarzer, D.** "A miniaturized readout strategy for endogenous histone deacetylase activity" *Mol Biosyst* (2015) 11(7): 1820-1823

**Juan, L.-J., Shia, W.-J., Chen, M.-H., Yang, W.-M., Seto, E., Lin, Y.-S., Wu, C.-W.** "Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation" *J Biol Chem* (2000) 275(27): 20436-20443

**Jung, M., Brosch, G., Kölle, D., Scherf, H., Gerhäuser, C., Loidl, P.** "Amide analogues of Trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducer of terminal cell differentiation" *J Med Chem* (1999) 42(22): 4669-4679

**Kaeberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E. A., Caldwell, S. D., Napper, A., Curtis, R., DiStefano, P. S., Fields, S., Bedalov, A., Kennedy, B. K.** "Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol" *J Biol Chem* (2005) 280: 17038-17045

**Kim, S. C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N. V., White, M., Yang, X. J., Zhao, Y.** "Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey" *Mol Cell* (2006) 23(4): 607-618

**Kornberg, R. D.** "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." *Science* (1974) 184(4139): 868-871

**Krchňák, V.** "Solid-phase synthesis of biologically interesting compounds containing hydroxamic acid moiety" *Mini Rev Med Chem* (2006) 6(1): 27-36

**Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M. C., Jones, P., Neddermann, P., Sambucini, S., Bottomley, M. J., Lo Surdo, F., Carfí, A., Koch, U., De Francesco, R., Steinkühler, C., Gallinari, P.** "Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(44): 17335-17340

**Lakshminarasimhan, M., Rauh, D., Schutkowski, M., Steegborn, C.** "Sirt1 activation by resveratrol is substrate sequence-selective" *Aging* (2013) 5(3): 151-154

**Lang, D.** "Proteomische Methoden zur Identifizierung acetylierungsabhängiger Interaktionspartner von Histon H4" *Technische Universität Berlin, Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften*, Diss. (2012)

**Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U. M., Frye, R. A., Minucci, S., Pelicci, P. G., Kouzarides, T.** "Human Sir2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence" *EMBO J* (2002) 21(10): 2383-2396

**Laemmli, U. K.** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* (1970) 227(5259): 680-685

**Leman, L. J., Weinberger, D. A., Huang, Z. Z., Wilcoxon, K. M., Ghadiri, M. R.** "Functional and mechanistic analyses of biomimetic aminoacyl transfer reactions in de novo designed coiled coil peptides via rational active site engineering" *J Am Chem Soc* (2007) 129: 2959-2966

**Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J. M., Qin, J., Wong, J.** "Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3" *EMBO J* (2000) 19(16): 4342-4350

**Liokatis, S., Dose, A., Schwarzer, D., Selenko, P.** "Simultaneous detection of protein phosphorylation and acetylation by high-resolution NMR spectroscopy" *J Am Chem Soc* (2010) 132(42): 14704-14705

**Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., Berger, S. L.** "p53 sites acetylated *in vitro* and p300 are acetylated *in vivo* in response to DNA damage" *Mol Cell Biol* (1999) 19(2): 1202-1209

**Liu, T., Kapustin, G., Etkorn, F. A.** "Design and synthesis of a potent histone deacetylase inhibitor" *J Med Chem* (2007) 50: 2003-2206

**Löhr, B., Ohrlich, S., Kunz, H.** "Modified trityl ester protecting groups in peptide synthesis" *Synlett* (1999) 7: 1136-1138

**Long, Y.-Q., Lung, F.-D. T., Roller, P. P.** "Global optimization of conformational constraint on non-phosphorylated cyclic peptide antagonists of the Grb2-SH2 domain" *Bioorg Med Chem* (2003) 11: 3929-3936

**Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J.** "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution" *Nature* (1997) 389(6648): 251-260

**Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., Gu, W.** "Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis" (2000) *Nature* 408(6810): 377-381

**Merrifield, R. B.** "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide." *J Am Chem Soc* (1963) 85(14): 2149-2154

**Merril, A. E., Coon, J. J.** "Quantifying proteomes and their post-translational modifications by stable isotope label-based mass spectrometry" *Curr Opin Chem Biol* (2013) 17(5): 779-786

**Miller, T.A., Witter, D.J., Belvedere, S.** "Histone deacetylase inhibitors" *J Med Chem* (2003) 46: 5097–5116.

**Minoshima, M., Kikuchi, K.** "Chemical tools for probing histone deacetylase (HDAC) activity" *Anal Sci* (2015) 31(4): 287-292

**Minucci, S., Pelicci, P. G.** "Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer" *Nat Rev Cancer* (2006) 6(1): 38-51

**Müller, M. M., Muir, T. W.** "Histones: at the crossroads of peptide and protein chemistry" *Chem Rev* (2015) 115(6): 2296-2349

**Nagarajan, P., Ge, Z., Sirbu, B., Doughty, C., Agudelo Garcia, P. A., Schleederer, M., Annunziato, A. T., Cortez, D., Kenner, L., Parthun, M. R.** "Histone acetyl transferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones H3 and H4" *PLoS Genet* (2013) 9(6): e1003518

**Nakagawa, M., Oda, Y., Eguchi, T., Aishima, S., Yao, T., Hosoi, F., Basaki, Y., Ono, M., Kuwano, M., Tanaka, M., Tsuneyoshi, M.** "Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues" *Oncol Rep* (2007) 18: 769–774.

**Nare, B., Alloco, J. J., Kunigas, R., Galuska, S., Myers, R. W., Bednarek, M. A., Schmatz, D. M.** "Development of a scintillation proximity assay for histone deacetylase using a biotinylated peptide derived from histone-H4" *Anal Biochem* (1999) 267(2): 390-396

**Nguyen, N. T., Goodrich, J. A.** "Protein-protein interaction assays: eliminating false positive interactions" *Nat Methods* (2006) 3(2): 135-139

**Oanh, D. T., Hai, H. V., Park, S. H., Kim, H. J., Han, B. W., Kim, H. S., Hong, J. T., Han, S. B., Hue, V. T., Nam, N. H.** "Benzothiazole-containing hydroxamic acids as histone deacetylase inhibitors and antitumor agents" *Bioorg Med Chem Lett* (2011) 21(24): 7505-7512

**Oppikofer, M., Kueng, S., Gasser, S. M.** "SIR-nucleosome interactions: structure-function relationships in yeast silent chromatin" *Gene* (2013) 527(1): 10-25

**Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Panday, A., Mann, M.** "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics" *Mol Cell Proteomics* (2002) 1(5): 376-386

**Ong, S. E., Mann, M.** "A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)." *Nature Protocols* (2006) 1: 2650-2660

**Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P. L., Wang, L., Luo, Z.** "MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites" *Nature* (2011) 470 (7332): 124-128

**Phanstiel, D., Brumbaugh, J., Berggren, W. T., Conard, K., Feng, X., Levenstein, M. E., McAlister, G. C., Thomson, J. A., Coon, J. J.** "Mass spectrometry identifies and quantifies 74 unique histone H4 isoforms in differentiating human embryonic stem cells" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(11): 4093-4098

**Rauh, D., Fischer, F., Gertz, M., Lakshminarasimhan, M., Bergbrede, T., Aladini, F., Kambach, C., Becker, C. F., Zerweck, J., Schutkowski, M., Steegborn, C.** "An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms" *Nat Commun* (2013) 4:2327

**Reed, S. M., Quelle, D. E.** "p53 acetylation: regulation and consequences" *Cancers* (2015) 7: 30-69

**Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D. J.** "Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents" *Mol Cell Proteomics* (2004) 3(12): 1154-1169

**Roth, S. Y., Denu, J. M., Allis, C. D.** "Histone acetyltransferases" *Annu Rev Biochem* (2001) 70: 81-120

**Salisbury, C. M., Cravatt, B. F.** "Activity-based probes for proteomic profiling of histone deacetylase complex" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(4): 1171-1176

**Salisbury, C. M., Cravatt, B. F.** "Optimization of activity-based probes for proteomic profiling of histone deacetylase complexes" *J Am Chem Soc* (2008) 130(7): 2184-2194

**Schölz, C., Weinert, B. T., Wagner, S. A., Beli, P., Miyake, Y., Qi, J., Jensen, L. J., Streicher, W., McCarthy, A. R., Westwood, N. J., Lain, S., Cox, J., Matthias, P., Mann, M., Bradner, J. E., Choudhary, C.** "Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells" *Nat Biotechnol* (2015) 33(4): 415-423

**Schutkowski, M., Fischer, F., Roessler, C., Steegborn, C.** "New assays and approaches for discovery and design of Sirtuin modulators" *Expert Opin Drug Discov.* (2014) 2: 183-199

**Schwarzer, D.** "Chemical tools in chromatin research" *J Pept Sci* (2010) 16(10): 530-537

**Shahbazian, M. D., Grunstein, M.** “Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation” *Annu Rev Biochem* (2007) 76: 75–100

**Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M. J., Davie, J. R., Peterson, C. L.** “Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions” *Science* (2006) 311(5762): 844-847

**Smet-Nocca, C., Wieruszkeski, J. M., Melnyk, O., Benecke, A.** “NMR-based detection of acetylation sites in peptides” *J Pept Sci* (2010) 16: 414-423

**Sodji, Q. H., Kornacki, J. R., Mrksich, M., Oyelere, A. K.** “*In vitro* histone deacetylase activity screening: making a case for better assays” in *Epigenetic Technological Applications* (Ed.: Y. G. Zheng), Academic Press, Boston (2015) 319-332.

**Somoza, J. R., Skene, R. J., Katz, B. A., Mol, C., Ho, J. D., Jennings, A. J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J. J., Chi, E., Tang, J., Sang, B. C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E. M., Dougan, D. R., Snell, G., Navre, M., Knuth, M. W., Swanson, R. V., McRee, D. E., Tari, L. W.** “Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases” *Structure* (2004) 12(7): 1325-1334

**Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., Krämer, O. H.** “Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels” *Int J Biochem Cell Biol* (2009) 41(1): 185-198

**Spichalska, B., Lesner, A., Wysocka, M., Sledz, M., Legowska, A., Jaskiewicz, A., Miecznikowska, H., Rolka, K.** “The influence of substrate peptide length on human  $\beta$ -tryptase specificity” *J Pept Sci* (2008) 14: 917-923

**Strahl, B. D., Allis, C. D.** “The language of covalent histone modifications” *Nature* (2000) 403(6765): 41-45

**Svinkina, T., Gu, H., Silva, J. C., Mertins, P., Qiao, J., Fereshetian, S., Jaffe, J. D., Kuhn, E., Udeshi, N. D., Carr, S. A.** “Deep, quantitative coverage of the lysine acetylome using novel anti-acetyl-lysine antibodies and an optimized proteomic workflow” *Mol Cell Proteomics* (2015) 14(9): 2429-29240

**Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B., Zhao, Y.** "Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification" *Cell* (2011) 146(6): 1016-1028

**Tang, H., Fang, H., Yin, E., Brasier, A. R., Sowers, L. C., Zhang, K.** "Multiplexed parallel reaction monitoring targeting histone modifications on the QExactive mass spectrometer" *Anal Chem* (2014) 86(11): 5526-5534

**Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., Gu, Y.** "Acetylation is indispensable for p53 activation" *Cell* (2008), 133(4): 612-626

**Taunton, J., Hassig, C. A., Schreiber, S. L.** "A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p" *Science* (1996) 272(5260): 408-411

**Theillet, F. X., Liokatis, S., Jost, J. O., Bekei, B., Rose, H. M., Binolfi, A., Schwarzer, D., Selenko, P.** "Site-specific mapping and time-resolved monitoring of lysine methylation by high-resolution NMR spectroscopy" *J Am Chem Soc* (2012) 134(18): 7616-7619

**Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., Patel, D. J.** "How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers." *Nat Struct Mol Biol* (2007) 14(11): 1025-1040

**Thoma, F., Koller, T., Klug, A.** "Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin" *J Cell Biol* (1979) 83(2 Pt 1): 403-427

**Thongwhichian, R.** "Kinase activity reporters for eukaryotic signaling pathway study" *Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie*, Diss. (2012)

**Toledo, F., Wahl, G. M.** "Regulating the p53 pathway: in vitro hypothesis, in vivo veritas" *Nat Rev Cancer* (2006) 6(12): 909-923

**Ugwu, D. I., Ezema, B. E., Eze, F. U., Ayogu, J. I., Ezema, C. G., Ugwuja, D. I.** "Synthesis and biological applications of hydroxamates" *Am J Org Chem* (2014) 4(2): 26-51

**Van den Wyngaert, I., de Vries, W., Kremer, A., Neefs, J., Verhasselt, P., Luyten, W. H., Kass, S. U.** "Cloning and characterization of human histone deacetylase 8" *FEBS Lett* (2000) 478: 77–83

**Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E. C., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., De Francesco, R., Gallinari, P., Steinkühler, C., Di Marco, S.** "Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101(42): 15064-15069

**Vannini, A., Volpari, C., Gallinari, P., Jones, P., Mattu, M., Carfi, A., De Francesco, R., Steinkühler, C., Di Marco, S.** "Substrate binding to histone deacetylases as shown by the crystal structure of the HDAC8-substrate complex" *EMBO Rep* (2007) 8(9): 879-884

**Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., Weinberg, R. A.** "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase" *Cell* (2001) 107(2): 149-159

**Venkataramanarao, R., Sureshbabu, V. V.** "An efficient synthetic route to *N*-glycosylamino acids using *N*<sup>α</sup>-Fmoc-Asp/Glu-5-oxazolidinone as internal protection" *Synlett* (2007) 16: 2492-2496

**Verdin, E., Dequiedt, F., Kasler, H. G.** "Class II histone deacetylases: versatile regulators" *Trends Genet* (2003) 19: 286–293

**Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Stillman, B.** "Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4" *Cell* (1996) 87(1): 95-104

**Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Stillman, B.** "Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human HAT1 acetyltransferase" *Curr Biol* (1998) 8: 96-108

**Ververis, K., Karagiannis, T. C.** "An atlas of histone deacetylase expression in breast cancer: fluorescence methodology for comparative semi-quantitative analysis" *Am J Transl Res* (2012) 4(1): 24-43

**Vidali, G., Gershey, E. L., Allfrey, V. G.** "Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones." *J Biol Chem* (1968) 243(24): 6361-6366

**Waltregny, D., De Leval, L., Glénisson, W., Ly Tran, S., North, B. J., Bellahcène, A., Weidle, U., Verdin, E., Castronovo, V.** "Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues" *Am J Pathol* (2004) 165(2): 553-564

**Webster, A. L., Yan, M. S., Marsden, P. A.** "Epigenetics and cardiovascular disease" *Can J Cardiol* (2013) 29(1): 46-57

**Wegener, D., Wirsching, F., Riester, D., Schwienhorst, A.** "A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening" *Chem Biol* (2003) 10: 61-68

**Wiejak, S., Masiukiewicz, E., Rzeszotarska, B.** "A large scale synthesis of mono- and di-urethane derivatives of lysine" *Chem Pharm Bull* (1999) 47(10): 1489-1490

**Wilson, D. M., Silverman, L. N., Bergauer, M., Keshari, K. R.** "Solid phase synthesis of hydroxamate peptides for histone deacetylase inhibition" *Tetrahedron Lett* (2013) 54(2): 151-153

**Winkler, D. D., Zhou, H., Dar, M. A., Zhang, Z., Luger, K.** "Yeast CAF-1 assembles histone (H3-H4)<sub>2</sub> tetramers prior to DNA deposition" *Nucleic Acids Res* (2012) 40(20): 10139-10149

**Wolffe, A. P., Hayes, J. J.** "Chromatin disruption and modification" *Nucleic Acids Res* (1999) 27(3): 711-720

**Wysocka, M., Lesner, A., Majkowska, G., Legowska, A., Guzow, K., Rolka, K., Wiczak, W.** "The new fluorogenic substrates of neutrophil proteinase 3 optimized in prime site region" *Anal Biochem* (2010) 399(2): 196-201

**Yang, S.-M., Lagu, B., Wilson, L. J.** "Mild and efficient Lewis acid-promoted detritylation in the synthesis of N-hydroxy amides: a concise synthesis of (-)-Cobactin T" *J Org Chem* (2007) 72(21): 8123-8126

**Yang, X. J., Seto, E.** "The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men" *Nat Rev Mol Cell Biol* (2008), 9(3): 206-218

**Yang, Y. Y., Ascano, J. M., Hang, H. C.** "Bioorthogonal chemical reporters for monitoring protein acetylation" *J Am Chem Soc* (2010) 132(11): 3640-3641

**You, A., Tong, J. K., Grozinger, C. M., Schreiber, S. L.** "CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98(4): 1454-1458

**Zhang, K., Sridhar, V. V., Zhu, J., Kapoor, A., Zhu, J.-K.** "Distinctive core histone post-translational modification patterns in *arabidopsis thaliana*" *PLoS One* (2007) 2: e1210

**Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D.** "Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex" *Cell* (1997) 89(3): 357-364

**Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., Reinberg, D.** "Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation" *Genes Dev* (1999) 13(15): 1924-1935

**Zhang, K., Tian, S., Fan, E.** "Protein lysine acetylation analysis: current Ms-based proteomic technologies" *Analyst* (2013) 138(6): 1628-1636

**Zhao, K., Hashaw, R., Chai, X., Marmorstein, R.** "Structural basis for nicotinamid cleavage and ADP-ribose transfer by NAD<sup>+</sup>-dependent Sir2 histone/protein deacetylases" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101(23): 8563-8568

**Zilfou, J. T., Lowe, S. W.** "Tumor suppressive functions of p53" *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2009) 1: a001883

# Anhang

## Abkürzungsverzeichnis

Aad	2-Aminoadipinsäure
Ac	Acetyl-
ACN	Acetonitril
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
Ahx	6-Aminohexansäure
Alloc	Allyloxy-carbonyl-
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
ANB	5-Amino-2-nitrobenzoesäure
Apm	2-Aminopimelinsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asu	2-Aminosuberinsäure
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchonic acid</i> )
Bn	Benzyl-
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNBS	2-,4-Dinitrobenzylsulfonyl-
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDT	1,2-Ethandithiol

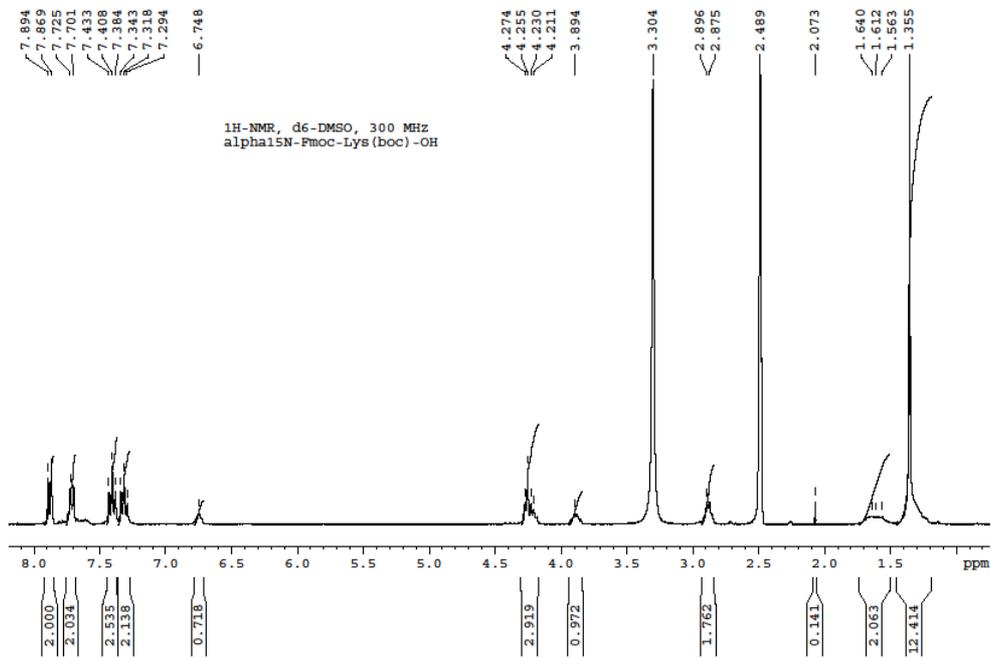
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
FBS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl-
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HAT	Histon-Acetyltransferase
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisierung ( <i>Matrix assisted laser desorption/-ionisation</i> )
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholine
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernmagnetische Resonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
OSu	<i>O</i> -Succinimid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R <sub>F</sub>	Retentionsfaktor
RP	Umkehrphase ( <i>reversed phase</i> )
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
SAHA	Suberoylanilid Hydroxamsäure

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SILAC	Stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur ( <i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i> )
TBST	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween20 ( <i>Tris buffered saline - Tween20</i> )
tBu	<i>tert</i> -Butyl-
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TOF	Flugzeit ( <i>time of flight</i> )
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Triphenylmethyl- (Trityl-)
TSA	Trichostatin A

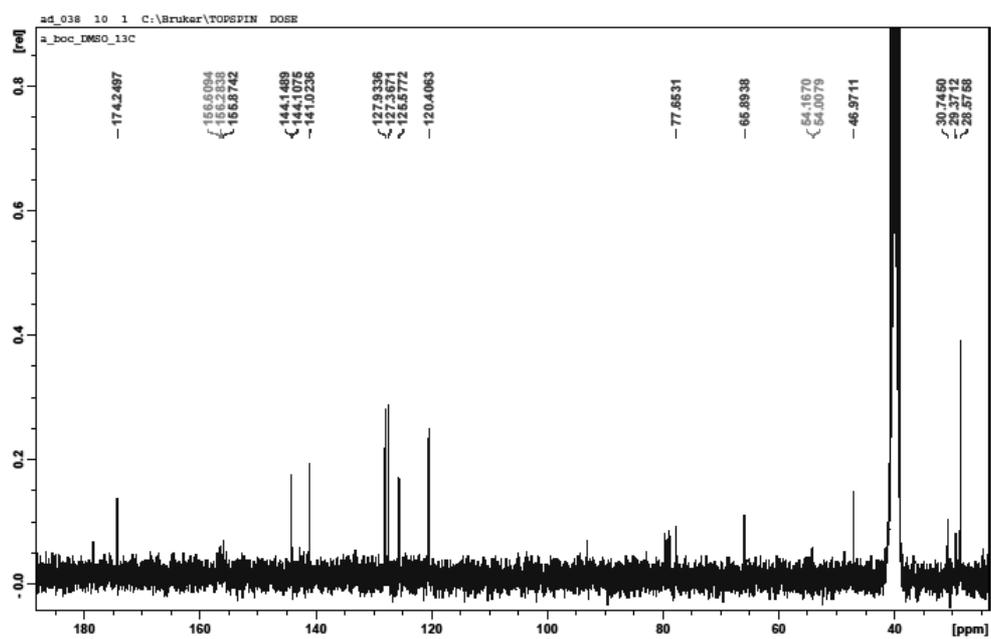
# NMR-Spektren

Fmoc-<sup>15</sup>Nα-Lys(Boc)-OH (**7**)

<sup>1</sup>H-NMR

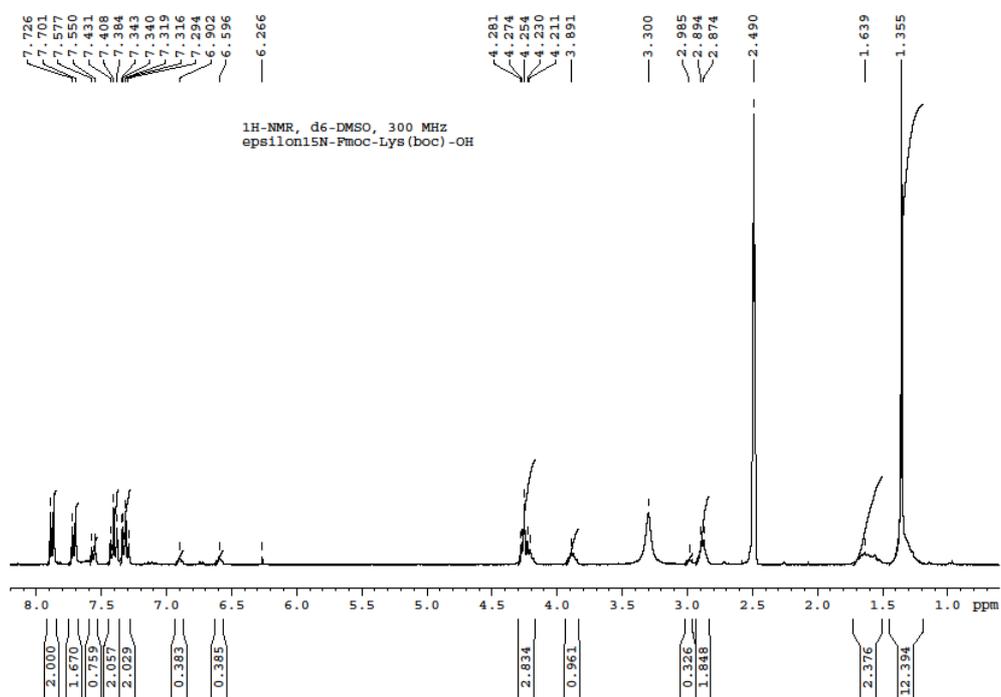


<sup>13</sup>C-NMR

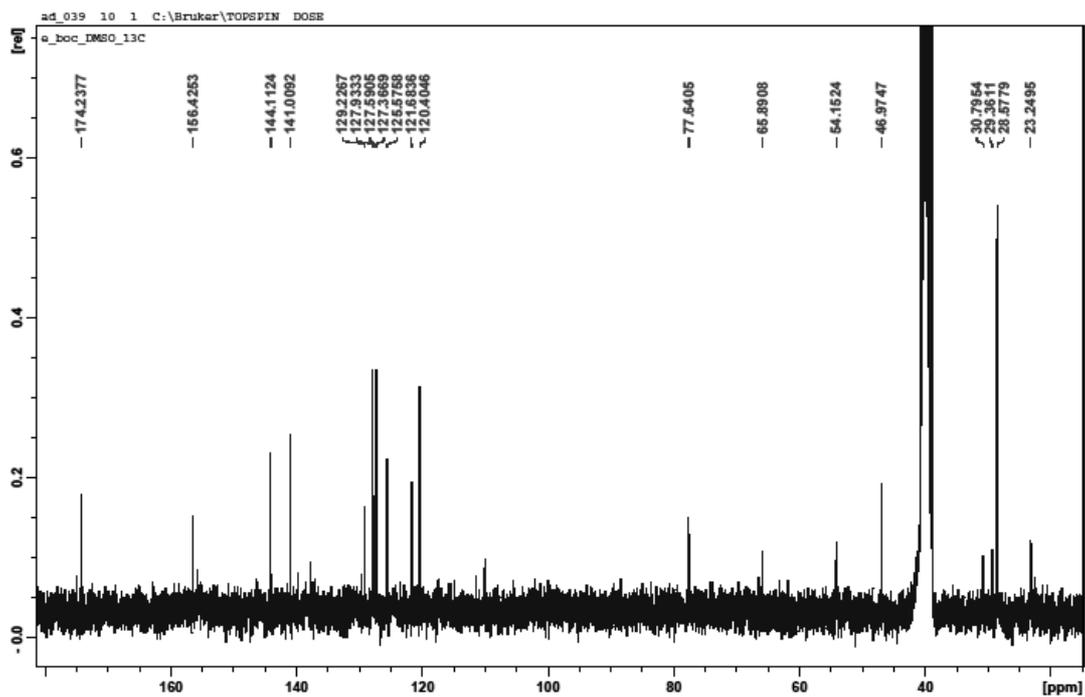


# Fmoc-<sup>15</sup>Nε-Lys(Boc)-OH (**8**)

## <sup>1</sup>H-NMR

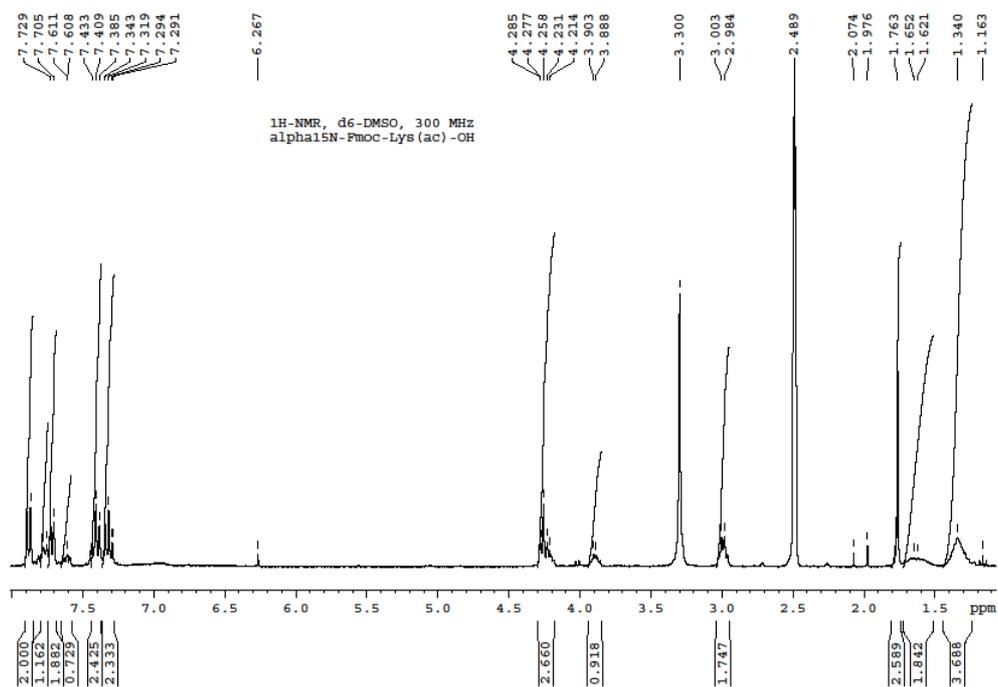


## <sup>13</sup>C-NMR

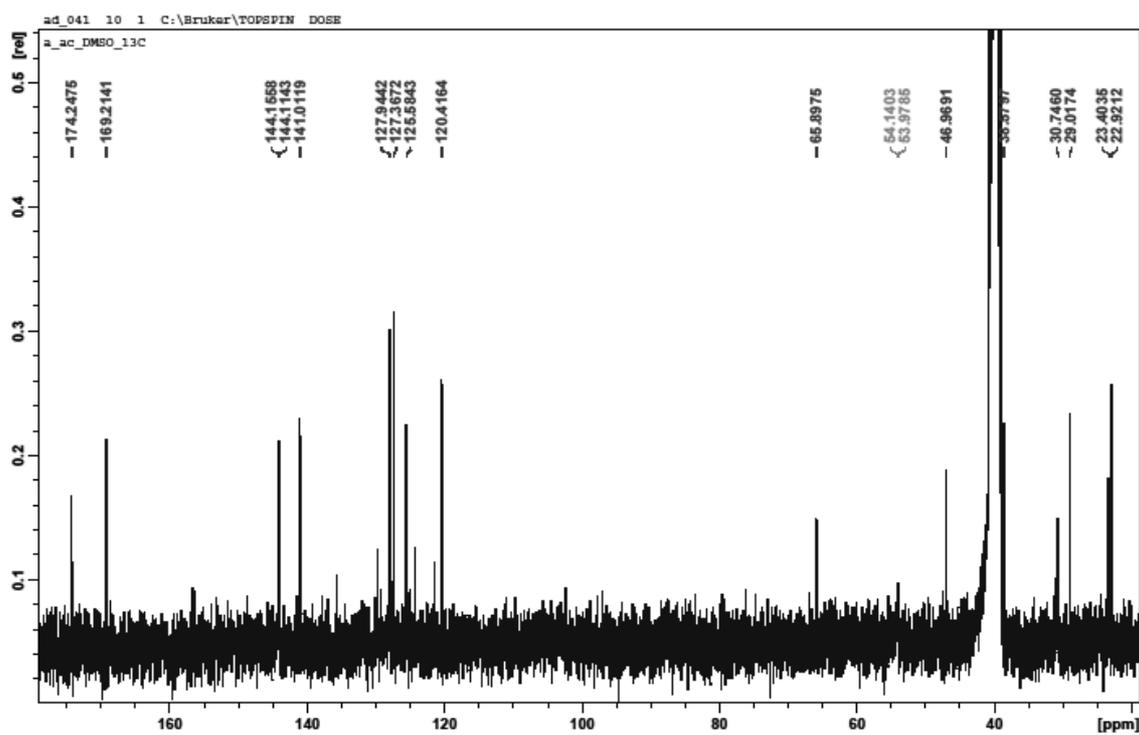


# Fmoc-<sup>15</sup>Nα-Lys(Ac)-OH (9)

## <sup>1</sup>H-NMR

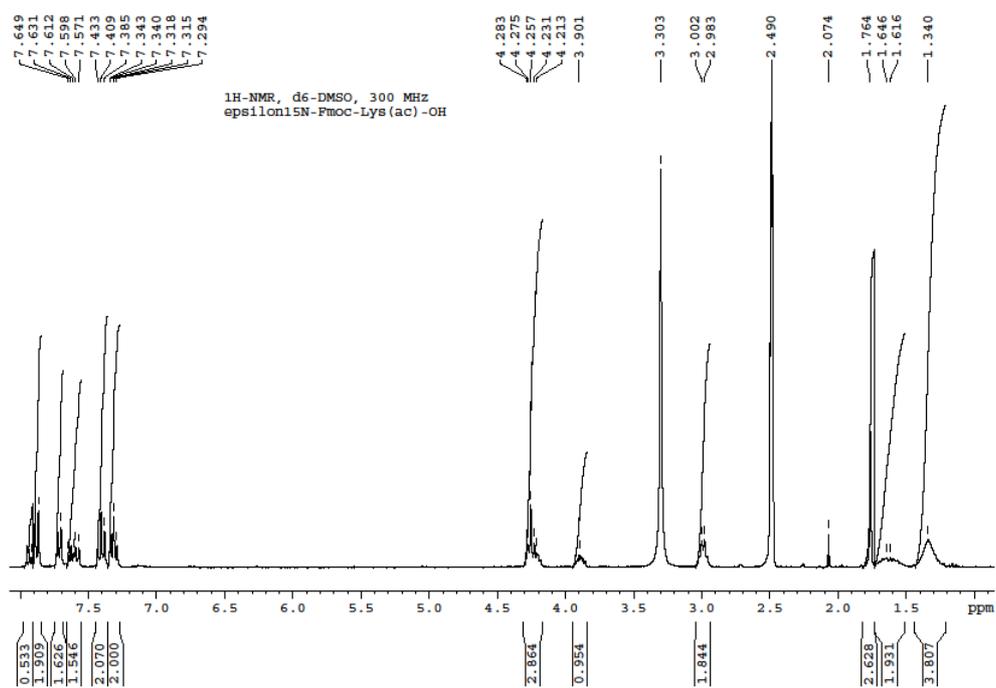


## <sup>13</sup>C-NMR

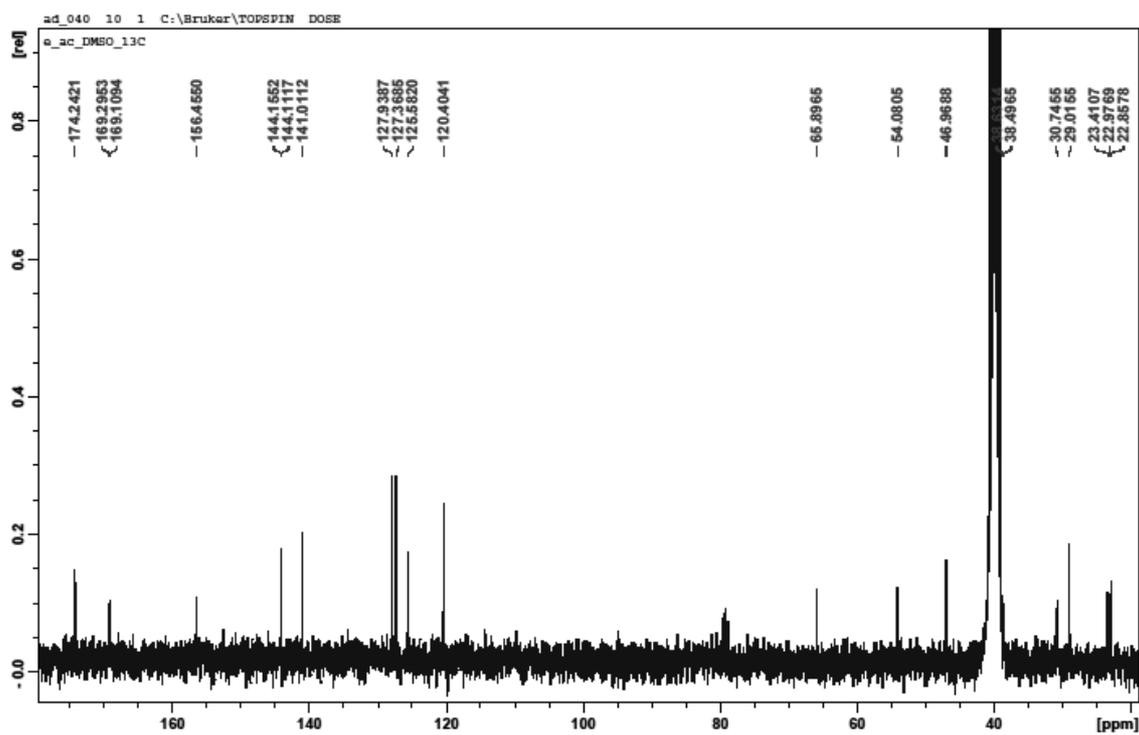


# Fmoc-<sup>15</sup>Nε-Lys(Ac)-OH (10)

## <sup>1</sup>H-NMR

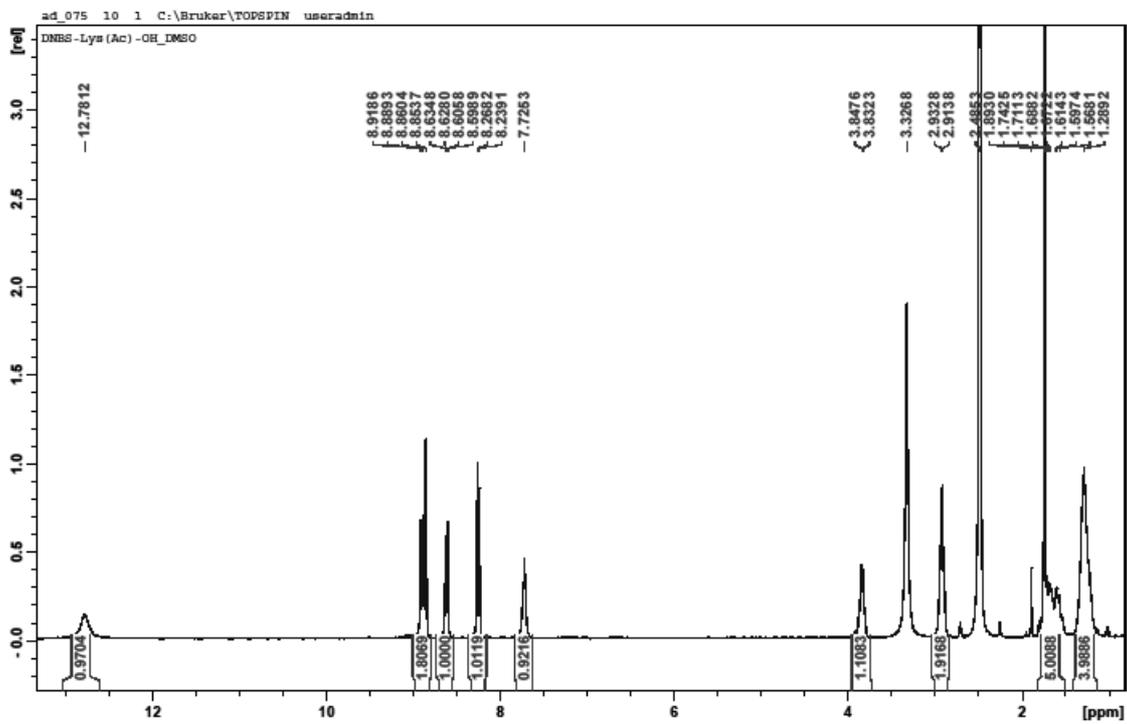


## <sup>13</sup>C-NMR

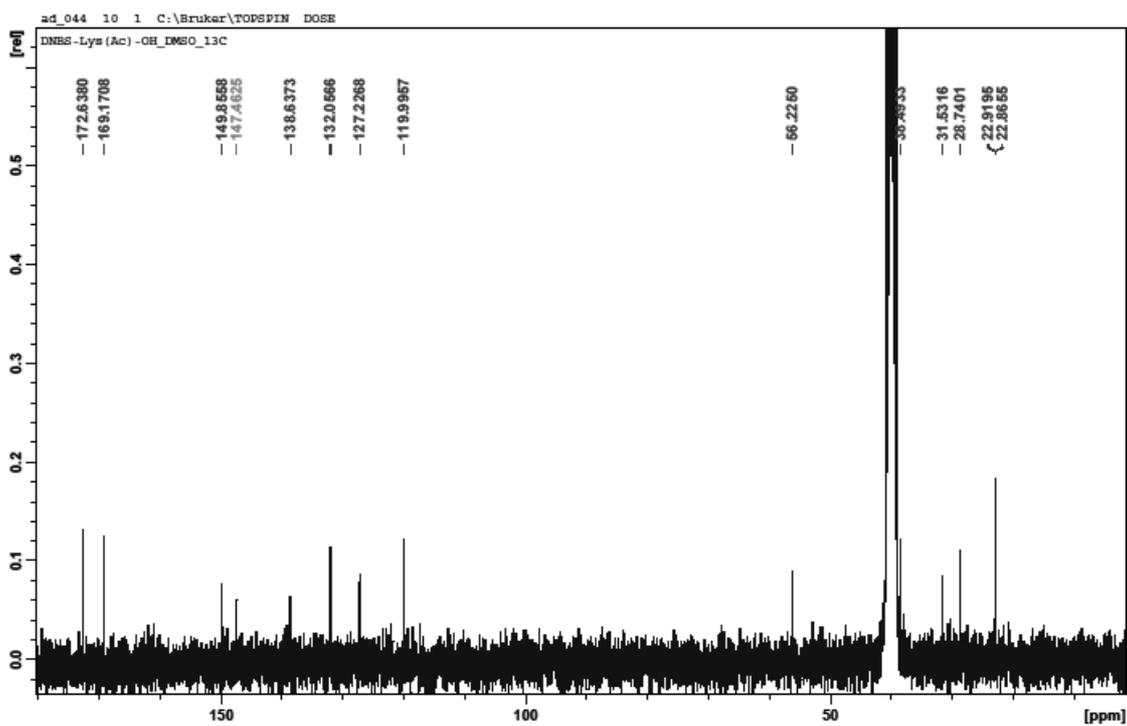


# DNBS-Lys(Ac)-OH (13)

## <sup>1</sup>H-NMR

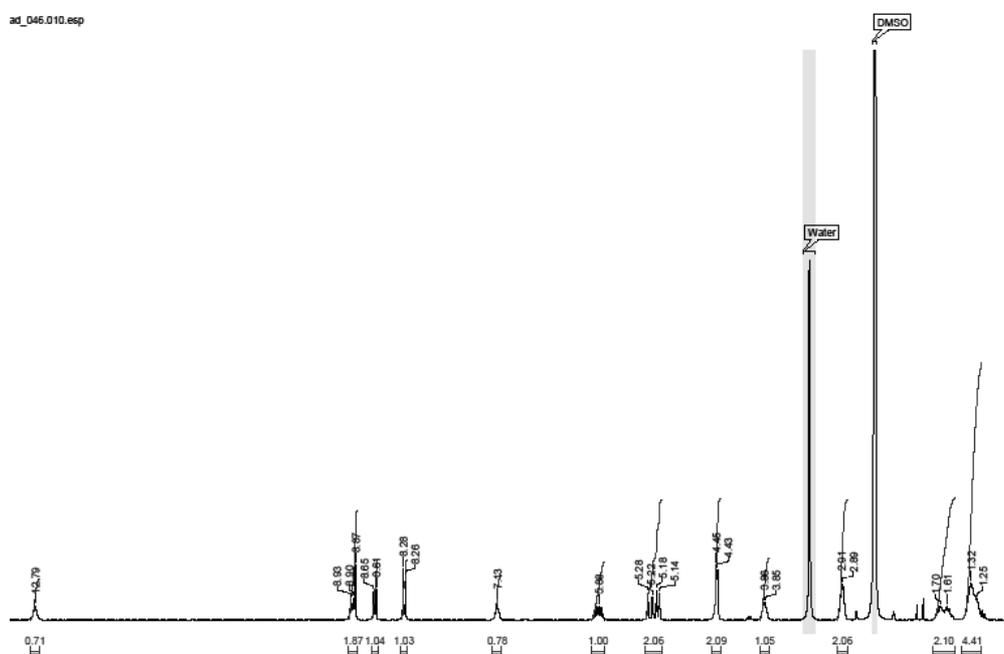


## <sup>13</sup>C-NMR

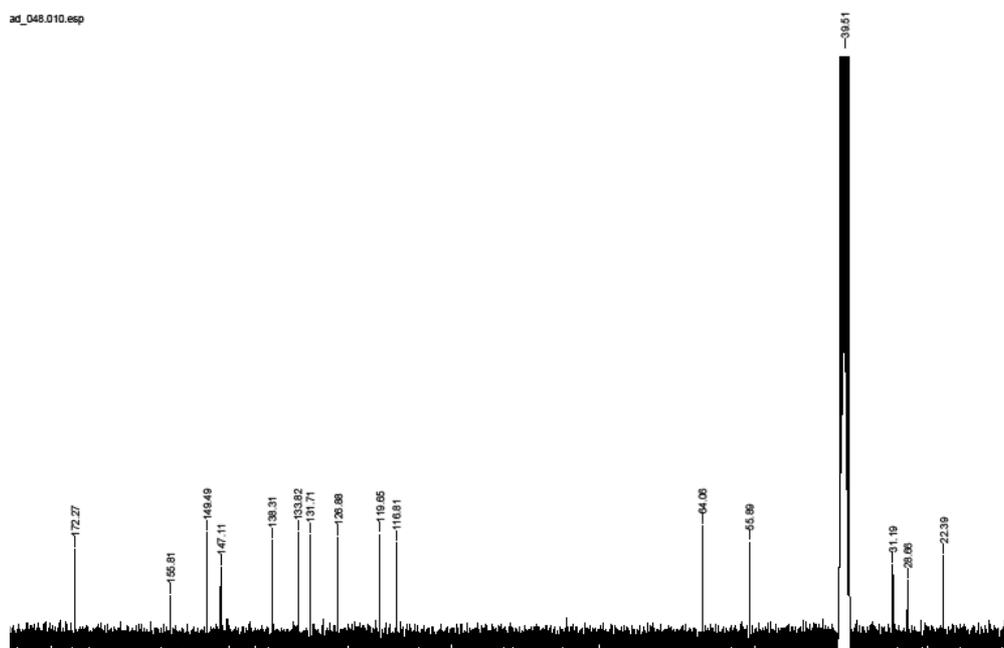


# DNBS-Lys(Alloc)-OH (**14**)

## <sup>1</sup>H-NMR

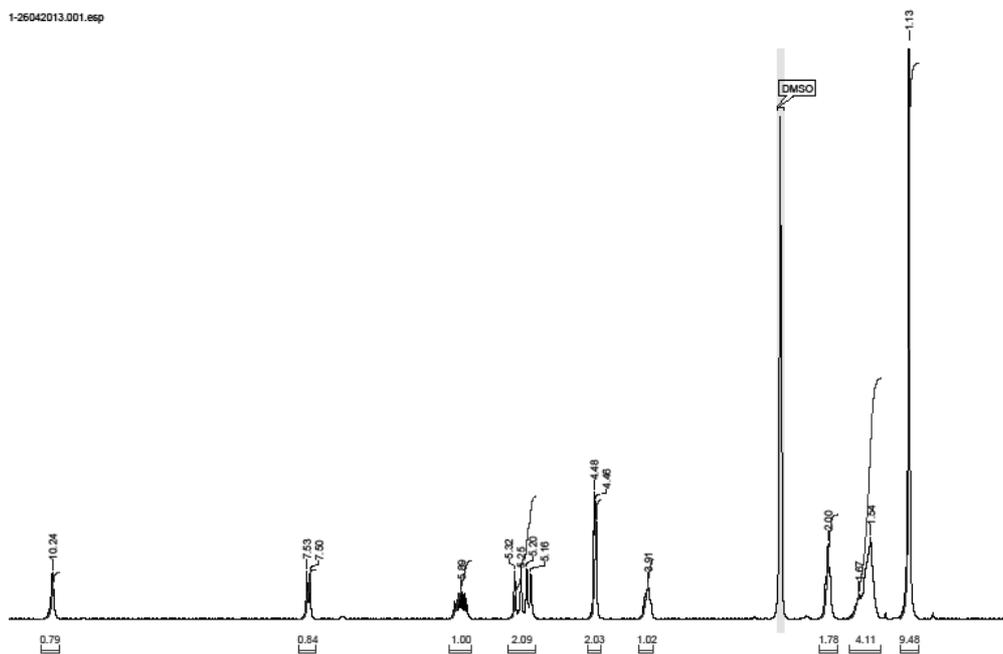


## <sup>13</sup>C-NMR

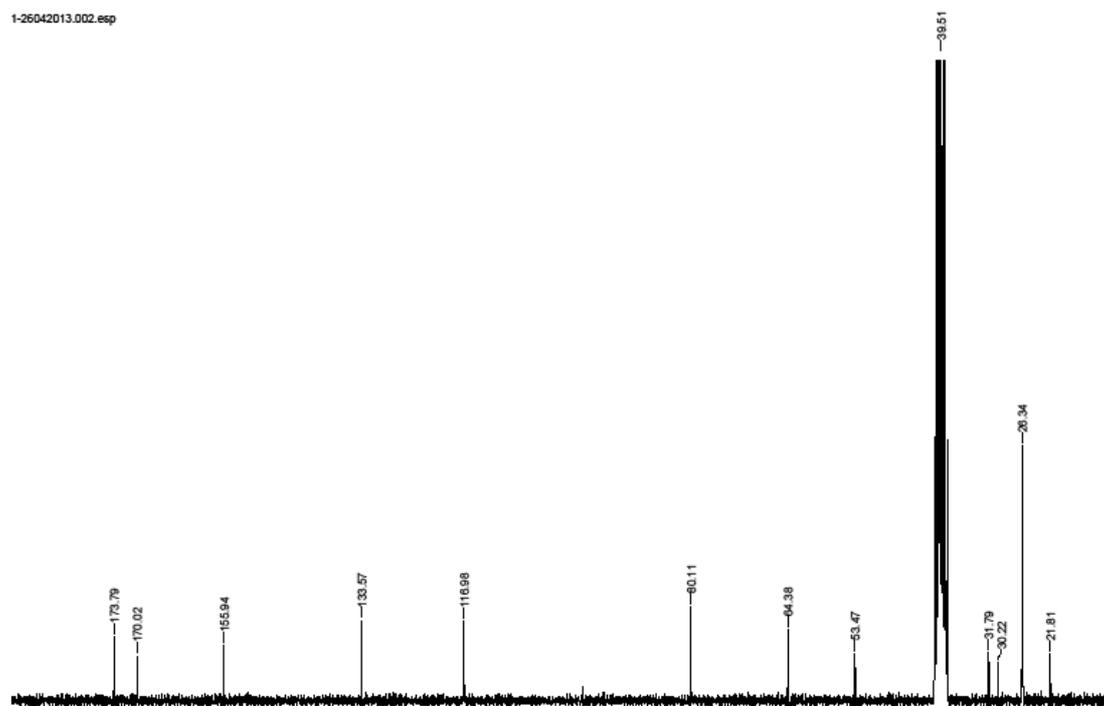


# Alloc-Aad(NH*t*Bu)-OH (**24**)

## <sup>1</sup>H-NMR

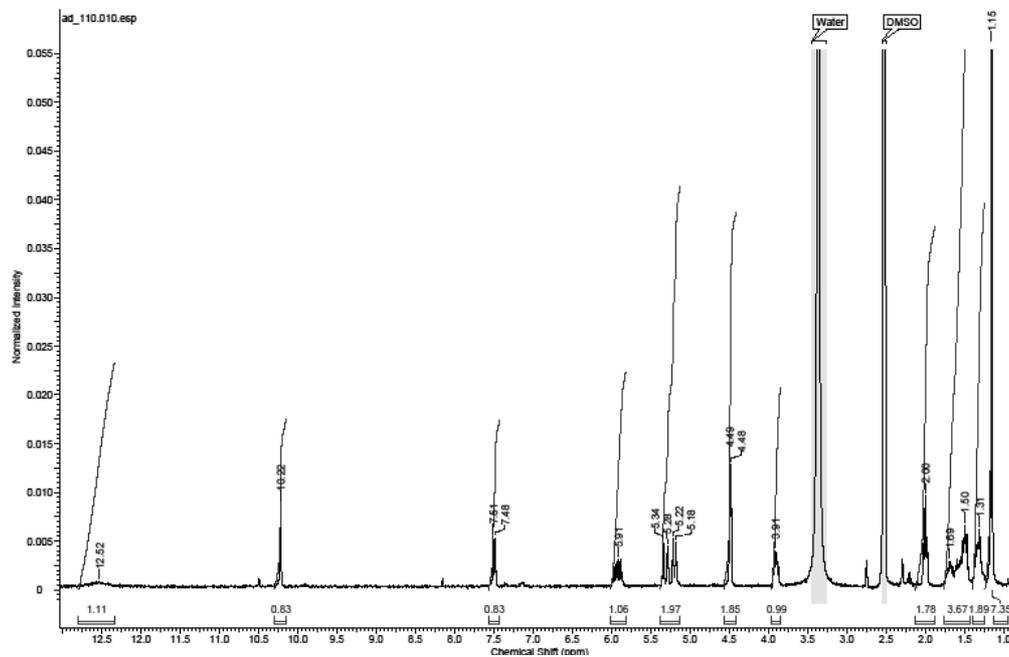


## <sup>13</sup>C-NMR

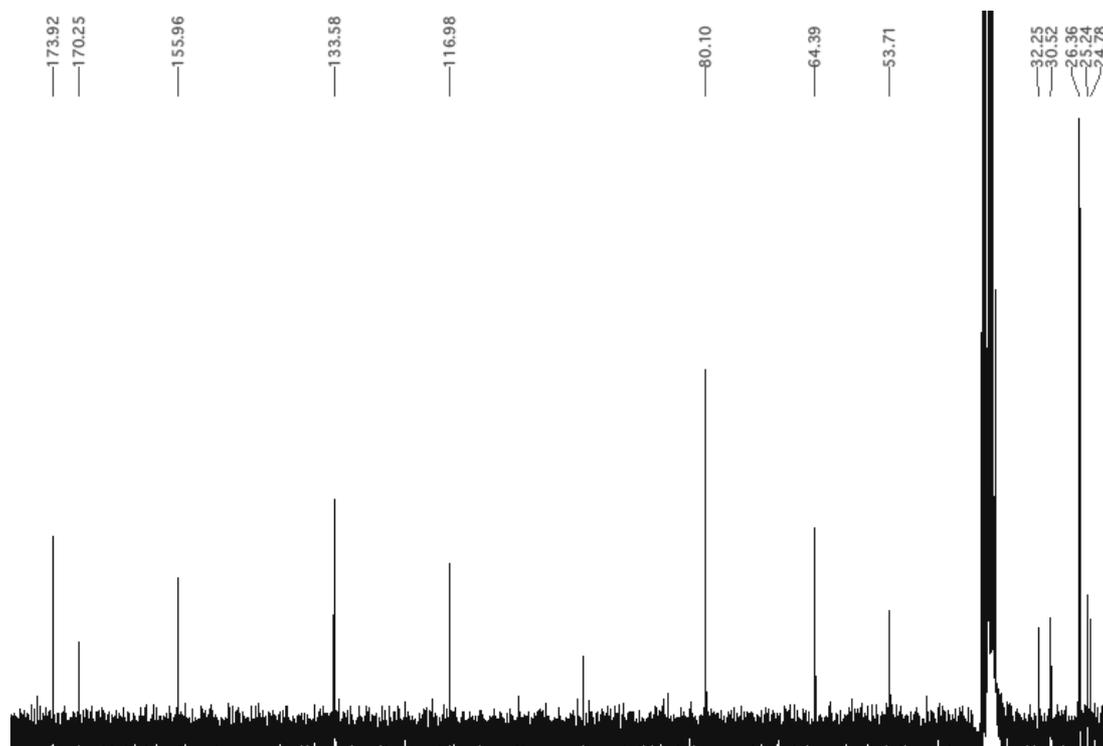


Alloc-*D/L*-Apm(NH*O*tBu)-OH (**25**)

<sup>1</sup>H-NMR

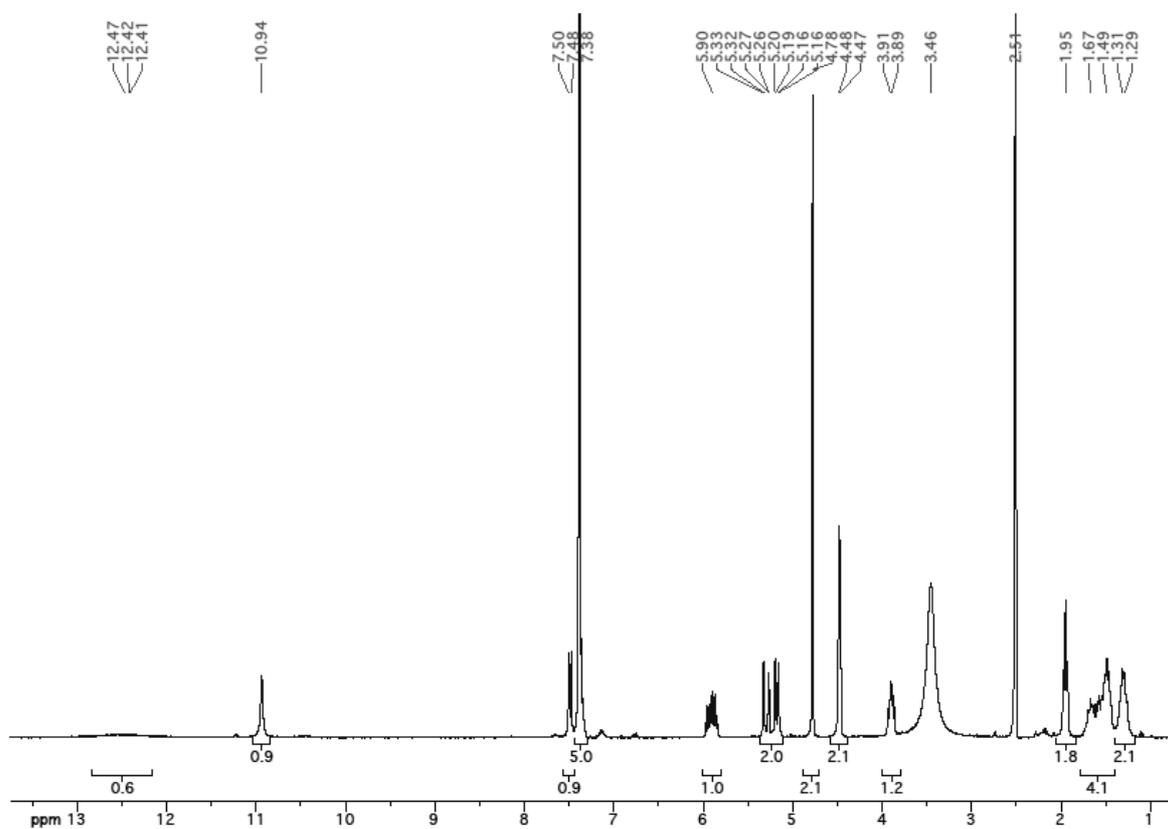


<sup>13</sup>C-NMR

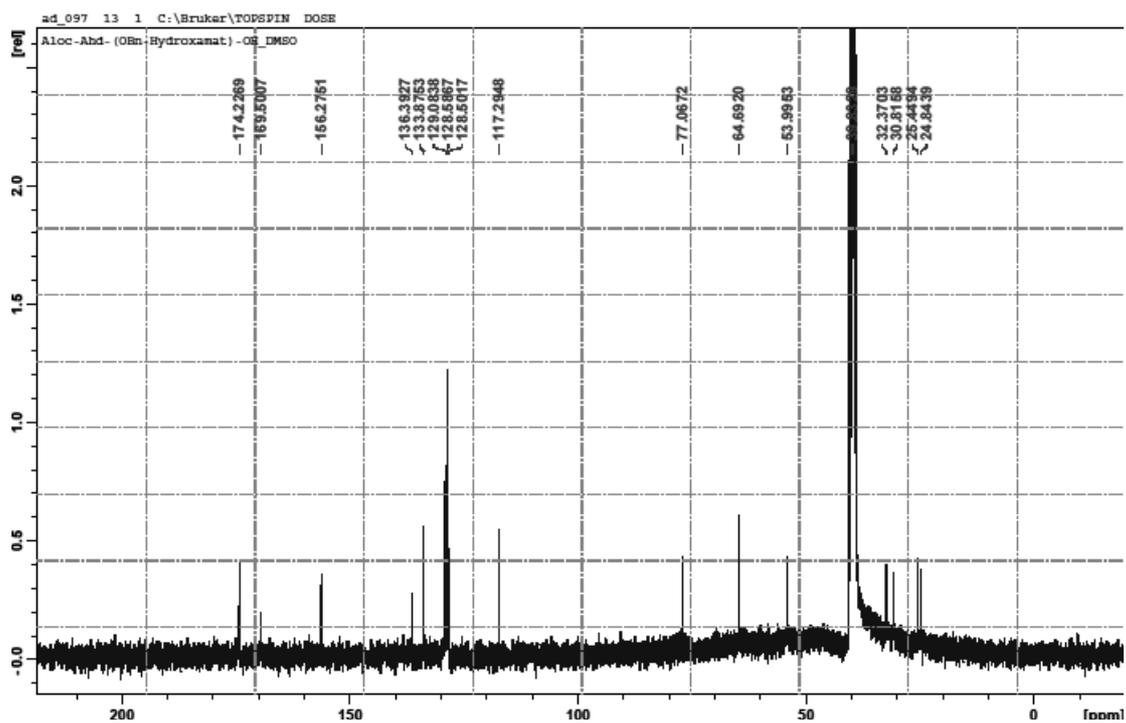


Alloc-*D/L*-Apm(NHOBn)-OH (**26**)

<sup>1</sup>H-NMR



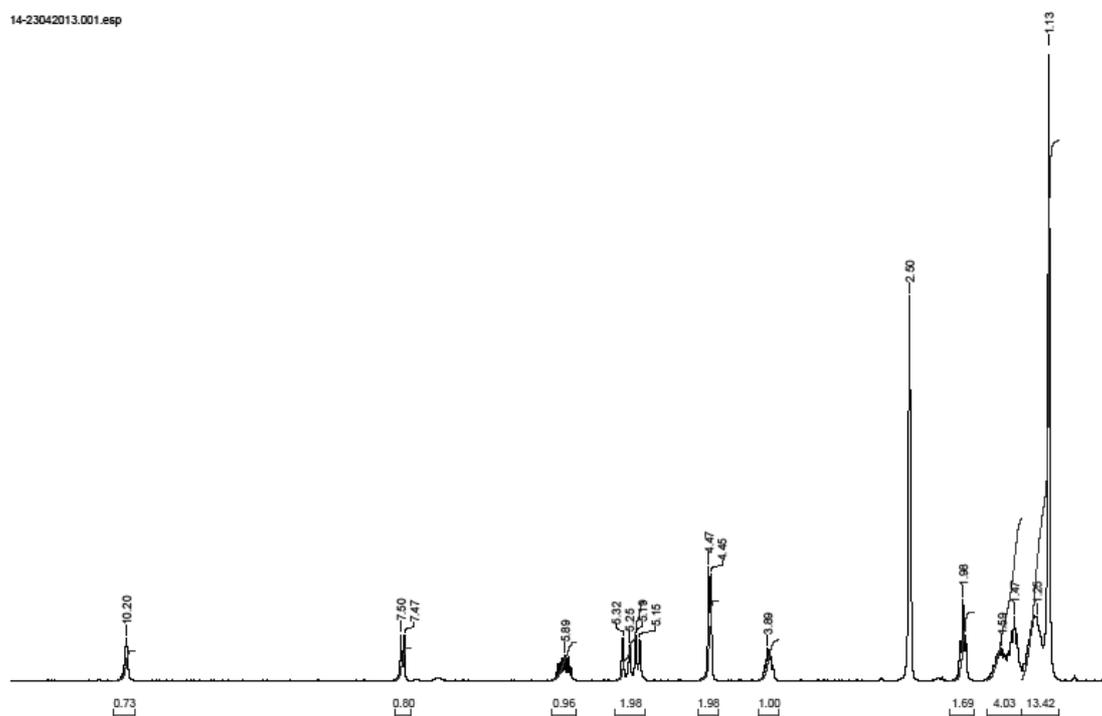
<sup>13</sup>C-NMR



Alloc-Asu(NH<sub>4</sub>tBu)-OH (**27**)

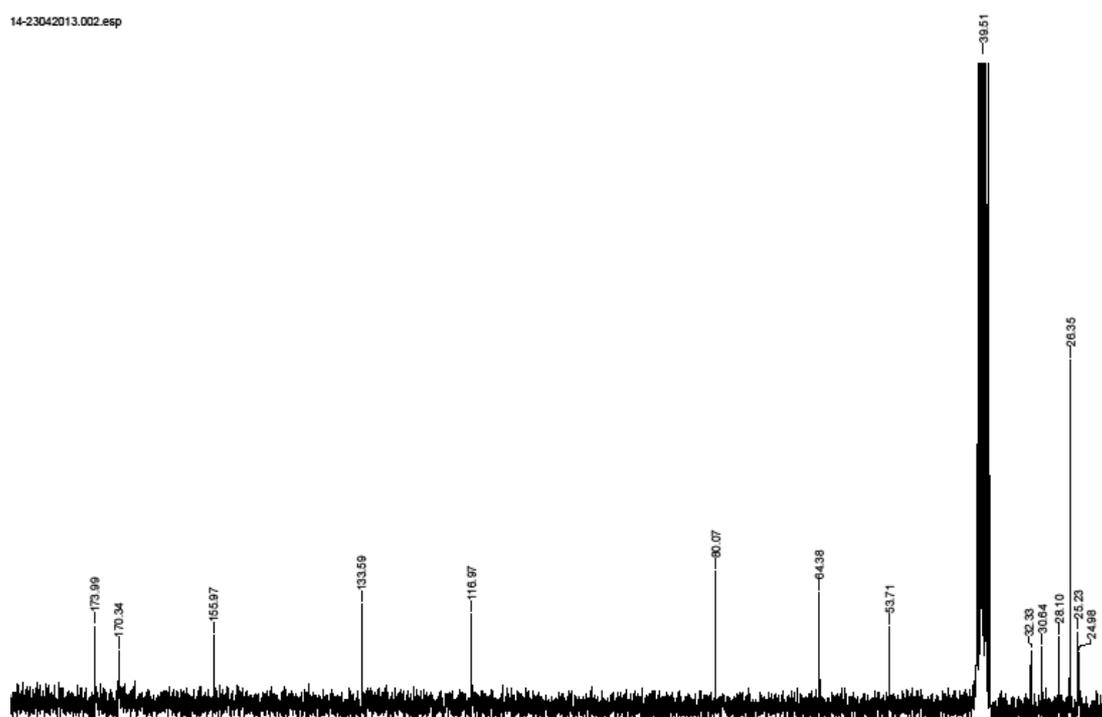
<sup>1</sup>H-NMR

14-23042013.001.esp



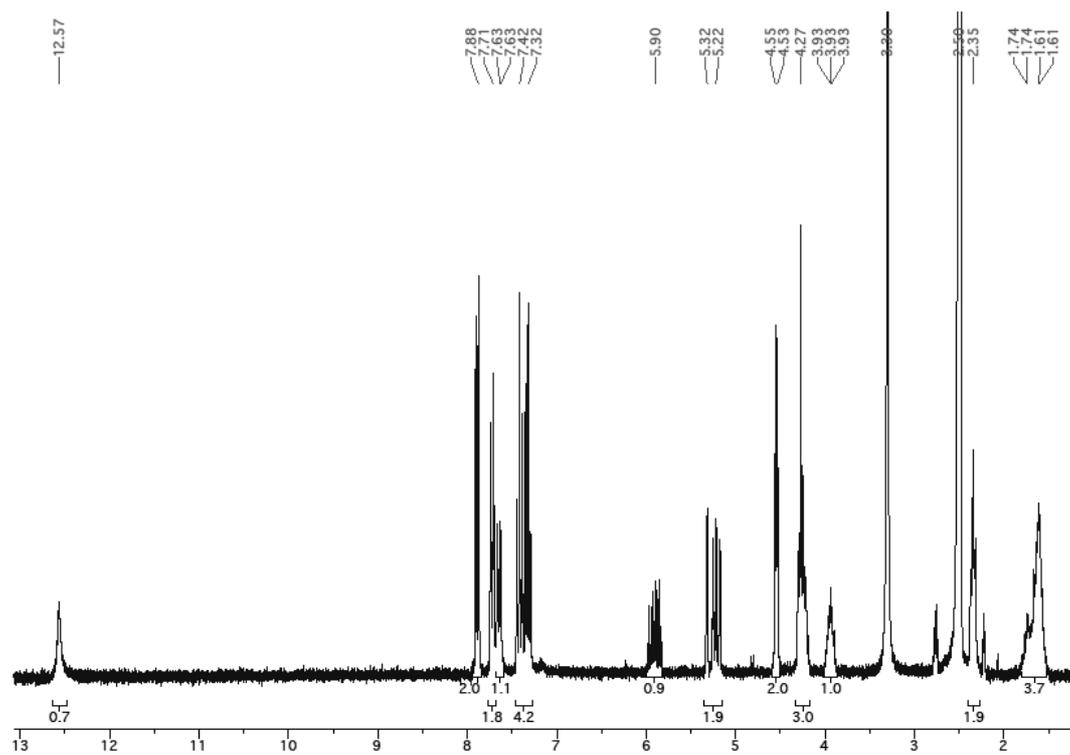
<sup>13</sup>C-NMR

14-23042013.002.esp



Fmoc-Aad(Oallyl)-OH (**30**)

$^1\text{H-NMR}$



$^{13}\text{C-NMR}$

