

**Charakterisierung der Isocitrat-Dehydrogenase 1 im
Zusammenhang der Tumorgenese von Gliomen
mithilfe der Proteomanalyse**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nina Carolin Overbeck
aus Dülmen

Düsseldorf, Juni 2018

aus dem Molecular Proteomics Laboratory
des Instituts für Molekulare Medizin und
aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Kai Stühler
2. Prof. Dr. Mathias Beller

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2018

Für meine Familie

*„Wissenschaft ist ein integraler Bestandteil unserer Kultur.
Es ist kein fremdartiger Geheimkult, betrieben von einer
obskuren Priesterschaft, sondern eine der herrlichsten,
intellektuellen Traditionen der Menschheit.“*

Stephen Jay Gould

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iv
Summary	vi
1 Einleitung	1
1.1 Entstehung, Therapie und Epidemiologie von Gliomen.....	1
1.2 Diffuse Gliome und die Identifizierung von IDH1-Mutationen	1
1.3 Die Isocitrat-Dehydrogenase 1.....	2
1.4 Zelluläre Auswirkungen der <i>IDH1</i> -Mutation	3
1.5 Mutation der <i>IDH1</i> als frühes Ereignis in der Entstehung von Gliomen.....	6
1.5.1 Neurale Stamm- und Vorläuferzellen und ihre Bedeutung in der Tumorgenese	6
1.6 Charakterisierung der Tumorgenese mittels Proteomanalyse.....	7
1.6.1 Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie	8
1.6.2 Analyse des Phosphoproteoms als wichtiger Schalter der Zelle	11
1.7 Die Rolle der Bioinformatik in der Proteomanalyse.....	12
2 Zielsetzung der Arbeit	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Geräte.....	16
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	17
3.1.3 Chemikalien.....	17
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	19
3.1.5 Software.....	21
3.1.6 Antikörper.....	22
3.2 Methoden	22
3.2.1 Zellkultur-Methoden und Transfektion für die U87MG Zelllinie.....	22
3.2.2 Zellkultur-Methoden für die NSC/NPCs.....	23
3.2.3 Zellernte und Formaldehyd- <i>Crosslinking</i>	24
3.2.4 Zellaufschluss	24
3.2.5 Fraktionierung.....	25
3.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung	25
3.2.7 Immunpräzipitation gegen HA-Kopplung.....	26

3.2.8	Antikörperbasierte Immunpräzipitation.....	26
3.2.9	Anreicherung von Phosphopeptiden in einer komplexen Probe.....	27
3.2.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	28
3.2.11	Silberfärbung.....	29
3.2.12	Coomassie-Färbung.....	29
3.2.13	<i>Semidry</i> Western Blot.....	30
3.2.14	Immunzytochemie.....	30
3.2.15	Konfokal Mikroskopie.....	31
3.2.16	Metabolitenanalyse.....	31
3.2.17	LC-MS/MS-Analysen.....	32
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Proteomische Untersuchung einer Gliomzelllinie in Bezug auf IDH1 und ihre Mutation.....	38
4.1.1	Expression der IDH1 in den U87MG Zelllinien.....	38
4.1.2	IDH1 und ihre posttranslationalen Modifikationen.....	41
4.1.3	Charakterisierung des U87MG Proteoms.....	42
4.1.4	Differenzielle Analyse der U87MG Zelllinie.....	44
4.2	Interaktionsanalysen der IDH1.....	46
4.2.1	Interaktionsstudien mit antikörperbasierten Immunpräzipitationen gegen IDH1.....	46
4.2.2	Zelluläre Lokalisation der IDH1.....	48
4.2.3	Anreicherung der IDH1 durch Immunpräzipitation.....	49
4.2.4	Charakterisierung der IDH1 Interaktoren unter Vermeidung unspezifischer Bindungen.....	50
4.2.5	Interaktionsstudien der HA-gekoppelten IDH1 nach Durchführung einer subzellulären Fraktionierung.....	55
4.3	Untersuchung des Gesamt- und Phosphoproteoms der neuralen Stamm- und Vorläuferzellen.....	61
4.3.1	Charakterisierung des NSC/NPC Proteoms.....	61
4.3.2	Analyse des Phosphoproteoms der NSC/NPCs.....	64
5	Diskussion.....	68
5.1	Methodische Aspekte der Modellsysteme für die Analyse der mutierten IDH1	68
5.2	IDH1 und ihre posttranslationalen Modifikationen.....	69
5.3	Identifizierung potenzieller Interaktionspartner der IDH1 in Abhängigkeit ihrer Mutation.....	71

5.3.1	Methodische Aspekte.....	72
5.3.2	Biologische Diskussion	74
5.4	Quantitative und differenzielle Proteomanalyse der U87MG Zelllinie	76
5.4.1	Methodische Aspekte.....	76
5.4.2	Biologische Diskussion	77
5.5	Differentielle Proteomanalyse der neuralen Stamm- und Vorläuferzellen.....	79
5.6	Differenzielle Phosphoproteomanalyse der neuralen Stamm- und Vorläuferzellen...	80
5.6.1	Methodische Aspekte.....	81
5.6.2	Biologische Diskussion	82
5.7	Fazit.....	84
6	Literatur	86
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	99
8	Abkürzungsverzeichnis	102
Anhang	104
	Abbildungen.....	104
	Tabellen.....	106
	Danksagung.....	152
	Erklärung.....	153

Zusammenfassung

Aufgrund ihres frühen Auftretens in der Tumorgenese sowie der prognostischen Relevanz scheint die Rolle der Mutation der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH1) bei Gliomen von großer Bedeutung zu sein. Dennoch sind bisher lediglich Teilaspekte hinsichtlich des entstehenden Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat, welche nicht alle zu beobachtenden Effekte vollumfänglich erklären können, näher untersucht. Funktionelle Aspekte der IDH1 selbst sind allerdings bisher noch weitestgehend unverstanden. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, ein detaillierteres Bild des funktionellen biologischen Kontexts der wild-typischen und mutierten IDH1 mithilfe der Proteomanalyse zu erstellen.

- Die markierungsfreie differenzielle Analyse der U87MG Zelllinie, welche wild-typische bzw. mutierte IDH1 überexprimiert, ergab eine Quantifizierung von 2.020 Proteinen, von denen 101 Proteine einen signifikanten Abundanzunterschied aufwiesen. Die anschließende Analyse der biologischen Prozesse zeigte keine signifikant angereicherten Prozesse innerhalb dieser Gruppe, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die IDH1 Mutation innerhalb des verwendeten Zellmodells keine gravierenden Veränderungen hervorruft. Auch die Proteomanalyse der murinen Stamm- und Vorläuferzellen zeigte keinen starken Einfluss der IDH1 Mutation auf die Proteinabundanzen.
- Die Charakterisierung des Phosphoproteoms erlaubte es, nach ihrer erfolgreichen Etablierung, Aussagen über eventuelle Aktivitätsveränderungen und beteiligte Signalwege in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen, welche wild-typische bzw. mutierte IDH1 exprimieren, zu treffen. Dies führte zur Identifizierung von 1.887 Proteinen, welche mindestens ein phosphoryliertes Peptid tragen, von denen 540 exklusiv in einer der beiden analysierten Gruppen detektiert wurden. Deren bioinformatische Analyse zeigte, dass in den IDH1 mutierten Zellen exklusiv identifizierte Phosphoproteine in die Bindung des Tumorsuppressors p53 involviert sind und in dessen negativen Regulierung resultieren könnte.
- Eine Analyse der posttranslationalen Modifikationen mithilfe einer Kombination aus Immunpräzipitationen, gegen wild-typische bzw. mutierte HA-gekoppelte IDH1, und massenspektrometrischer Analyse führte zur Identifizierung von vier Phosphorylierungsstellen, welche exklusiv der wild-typischen IDH1 zugeordnet werden konnten. Außerdem konnten für beide Isoformen verschiedene, bisher nicht beschriebene Acetylierungen, Ubiquitinylierungen und Phosphorylierungen

identifiziert werden, deren möglicher funktioneller Einfluss auf die Aktivität der IDH1 in weiteren Experimenten geklärt werden müsste.

- Eine differenzielle Analyse der Interaktoren zwischen wild-typischer und mutierter IDH1, unter Verwendung der U87MG Zelllinie und einer affinitätsbasierten MS-Methode, ergab keine signifikant veränderten Interaktoren zwischen den IDH1 Isoformen. Eine Untersuchung der generellen Interaktionspartner der IDH1 zeigte, dass die identifizierten Proteine vorrangig an Prozessen beteiligt sind, welche typisch für den Lebenszyklus eines Proteins sind. Dies führt zu dem Schluss, dass IDH1 innerhalb der Zelle keine starken Interaktionen eingeht und nicht in einem funktionellen Komplex organisiert ist.

Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels proteomanalytischer Methoden die IDH1 und ihre mutierte Isoform, unter Verwendung zweier Zellkulturmodelle, umfassend charakterisiert werden. Hierdurch konnten neue Ausgangspunkte für die Aufklärung ihrer bisher unzureichend erklärten Rolle im Zellmetabolismus sowie für IDH1 vermittelte, 2-Hydroxyglutarat-unabhängige Effekte in der Tumorgenese von Gliomen geschaffen werden.

Summary

Mutation of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) plays a significant role in glioma due to the facts that this mutation is an early event in tumorigenesis and has prognostic relevance. A lot is known about the resulting oncometabolite 2-hydroxyglutarate, however the existing results only represent the observed effects to a minor extent. Besides this, the functional aspects of IDH1 are almost undetermined. The goal of this study was to provide a detailed characterization of the functional and biological context of wild-type and mutant IDH1 using proteomic approaches.

- Labelfree differential analysis of the U87MG cell line, overexpressing either wild-type or mutant *IDH1*, yielded quantifications of 2,020 proteins. Within this group 101 proteins displayed a significant change in abundance although subsequent analysis of biological processes revealed no significant enrichment. Therefore, it can be assumed, that IDH1 mutation does not lead to serious alterations in the studied cell model. An additional fact supporting this conclusion is that the proteome analysis of murine neural stem- and progenitor cells revealed no substantial influence of this mutation on protein abundance.
- Through successful establishment and implementation of phosphoproteome analysis, conclusions about potential changes in activity and signaling pathways in neural stem- and progenitor cells, expressing wild-type and mutant *IDH1*, respectively, were drawn. This led to the identification of 1,887 proteins containing at least one phosphorylated peptide, of which 540 were exclusively detected in one of the analyzed groups. The bioinformatic analysis of those 540 proteins revealed, that phosphoproteins only identified in IDH1 mutated cells are involved in binding tumor suppressor p53 and might result in the negative regulation of the tumor suppressor.
- Posttranslational modifications were examined with a combination of immunoprecipitation against wild-type or mutant HA-tagged *IDH1* and mass spectrometric based analysis. This resulted in identification of four phosphorylation sites unique for wild-type IDH1. Furthermore, it was possible to detect different, not yet described, acetylations, ubiquitinations and phosphorylations for both IDH1 isoforms. A possible functional impact on the activity of IDH1 should be further validated.

- The differential analysis of interactors between wild-type and mutant IDH1, using the U87MG cell line and an affinity based MS-method, showed no difference between the IDH1 isoforms. Within the group of general IDH1 interaction partners, the proteins are primarily involved in processes that are substantial for protein lifecycle. This leads to the conclusion that IDH1 has no strong interactions inside the cell and is not organized in a functional complex.

This work extensively contributes to the characterization of IDH1 and its mutant isoform by using proteome analysis and two different cell culture models. It provides new aspects to elucidate the not yet fully understood role of IDH1 in cell metabolism, as well as IDH1-mediated, 2-hydroxyglutarate independent effects in tumorigenesis of glioma.

1 Einleitung

1.1 Entstehung, Therapie und Epidemiologie von Gliomen

Das Gliom ist der häufigste primäre Hirntumor und bei ca. 80 % der Gliome handelt es sich um bösartige Tumore (Weller *et al.*, 2015). Diese entstehen aus neuroglialen Stamm- und Vorläuferzellen und wurden bislang nach ihren morphologischen Ähnlichkeiten zu gesunden Gliazellen in Ependymome, Astrozytome und Oligodendrogliome unterteilt (Louis *et al.*, 2007; Weller *et al.*, 2015). 2016 hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine neue Klassifizierung für Tumore herausgegeben, diese berücksichtigt erstmals auch molekulare Unterschiede zwischen den Tumoren (Louis *et al.*, 2016). Bei Gliomen spielen für die molekulare Einteilung die Isocitrat-Dehydrogenasen 1 und 2 (IDH1 und IDH2) und deren Mutationen eine wichtige Rolle. Da die IDH-Mutationen sehr früh in der Tumorgenese auftreten, werden diese als einer der Initiationsfaktoren gesehen (Suzuki *et al.*, 2015). Die R132H Mutation der *IDH1* ist die am häufigsten auftretende Mutation in Gliomen (ca. 90 %), zudem gibt es noch die R132C, R132L und R132S Mutationen bei der *IDH1* und Mutationen am Kodon 172 bei der IDH2 (Balss *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009). Außerdem werden eine Kodeletion der Chromosomenarme 1p und 19q, eine K27M-Mutation im H3F3A-(H3 *histone family member 3A*)-Gen und Fusionen zwischen den Genen C11orf95 und *RELA* berücksichtigt (Louis *et al.*, 2016). Gliome des WHO-Grades I sind kaum aggressiv und können meist durch eine Resektion behandelt werden. Bei Gliomen des WHO-Grades II spricht man von diffusen Gliomen, welche langsam wachsen. Auch hier wird meist eine Resektion vorgenommen, die bei älteren Patienten durch eine Strahlen- und/oder Chemotherapie ergänzt wird (Reifenberger *et al.*, 2017). Wenn diffuse Gliome nach erster Therapie erneut auftreten, ist das Rezidiv häufig ein anaplastisches Gliom (WHO-Grad III) oder ein sekundäres Glioblastom (WHO-Grad IV). Patienten mit diesen Tumoren werden in jedem Fall nach einer Resektion mit Radio- und/oder Chemotherapie behandelt.

1.2 Diffuse Gliome und die Identifizierung von IDH1-Mutationen

Bei Erwachsenen sind Gliome die am häufigsten auftretenden Hirntumore. Aus histologischer Sicht werden die Gliome den WHO-Graden II bis IV zugeordnet. Innerhalb dieser Gruppe ist das Glioblastom der aggressivste und bösartigste Tumor und gehört deshalb zum WHO-Grad IV. Patienten mit diffusen Gliomen der WHO-Grade II und III sind bei erstmaligem Auftritt der Erkrankung durchschnittlich 40 Jahre alt. Bei Patienten mit Glioblastomen liegt die

durchschnittliche Überlebensdauer bei 15 Monaten und ca. 75 % der Patienten sterben innerhalb der ersten 18 Monate nach der Diagnose (Westphal und Lamszus, 2011). Patienten mit niedriggradigen Tumoren haben eine deutlich bessere Prognose als Patienten mit höhergradigen Tumoren.

Bis 2008 galt eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 als häufigste Mutation in Gliomen, jedoch wurde im selben Jahr in einer Sequenzierungsstudie, die 22 Glioblastomproben enthielt, erstmalig eine Mutation im *IDH1*-Gen identifiziert (Parsons *et al.*, 2008). Es zeigte sich, dass es sich bei dieser Mutation um einen Aminosäureaustausch im Codon 132 handelt, der häufig in sekundären Glioblastomen vorkommt. Außerdem tritt diese Mutation in knapp 90 % aller Gliome der WHO-Grade II und III auf. Es handelt sich hierbei um eine heterozygote Mutation, es bleibt somit ein Wildtyp-Allel erhalten und das andere Allel trägt die R132H Mutation (Balss *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009). Diese Mutation ist eine frühe Veränderung im Laufe der Tumorgenese und bereits vor einer Mutation von TP53 nachweisbar (Watanabe *et al.*, 2009). Aus prognostischer Sicht zeigen Patienten, bei denen ein *IDH1* mutiertes Gliom diagnostiziert wurde, eine signifikant höhere Überlebensrate (Hartmann *et al.*, 2010; Sanson *et al.*, 2009).

1.3 Die Isocitrat-Dehydrogenase 1

Die Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) ist ein 47 kDa großes Enzym, das im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist und Homodimere bildet (Geisbrecht und Gould, 1999; Xu *et al.*, 2004). Codiert wird IDH1 durch das *IDH1* Gen, welches sich auf dem zweiten Chromosom befindet. Weitere humane Isocitratdehydrogenasen sind die mitochondrialen Isoformen IDH2 und IDH3. Die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat und CO₂ wird von allen drei Isoformen katalysiert. Allerdings ist IDH3 ein NAD⁺-abhängiges Enzym, während IDH1 und IDH2 NADP⁺ als Coenzym verwenden (Corpas *et al.*, 1999). Für die humane IDH1 sind nur wenige posttranslationale Modifikationen (PTM) bekannt, für die murine IDH1 hingegen sind gesicherte Informationen vorhanden. Laut Uniprot-Datenbank liegen für die murine IDH1 folgende Modifikationen vor: Acetylierungen an den Lysinen 81, 224, 233 und 243 (Rardin *et al.*, 2013), Succinylierungen an den Lysinen 126 und 400 (Park *et al.*, 2013) sowie eine Phosphorylierung am Serin 389 (Huttlin *et al.*, 2010). Die Uniprot-Datenbank zeigt für die humane IDH1 drei posttranslationale Modifikationen, welche durch experimentelle Daten abgesichert sind: Acetylierungen am Serin 2 (Van Damme *et al.*, 2012) und Lysin 321 (Choudhary *et al.*, 2009) und eine Phosphorylierung am Tyrosin 42 (Bian *et*

al., 2014). Zudem sind in der Literatur bislang neun Interaktionspartner (IDH2, IDH3B, IDH3G, AK1, AK2, MDH2, ASF1B, FAM49B und LTA4H) der wild-typischen IDH1 beschrieben, wobei viele von diesen durch Hochdurchsatzexperimente identifiziert wurden (Havugimana *et al.*, 2012; Kerrien *et al.*, 2007; Snel *et al.*, 2000; Stark *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2015).

1.4 Zelluläre Auswirkungen der *IDH1*-Mutation

In seiner wild-typischen Form bildet das Enzym IDH1 Homodimere und ist im Zytoplasma der Zelle zuständig für die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat (α -KG) unter Reduktion von NADP^+ zu NADPH (Abbildung 1).

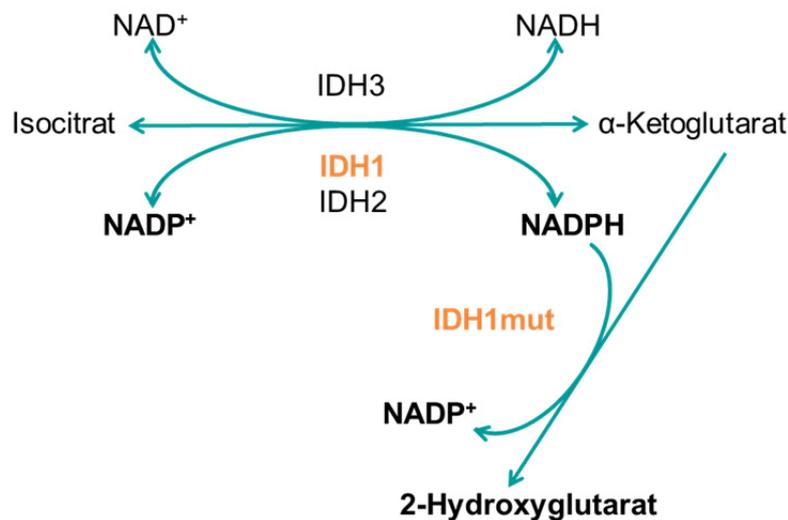


Abbildung 1: Funktion der wild-typischen und mutierten IDH1 im Zytoplasma. Die kanonische Funktion der IDH1 ist die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -KG, wobei NADPH generiert wird. Ist IDH1 mutiert, wird die Reaktion von α -KG zu 2-Hydroxyglutarat (2-HG) katalysiert und NADPH wird verbraucht.

NADPH spielt in der Zelle eine wichtige Rolle als Reduktionsäquivalent und ist beispielsweise für die Umwandlung von reduziertem Glutathion zu oxidiertem Glutathion verantwortlich, welches für die Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wichtig ist (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2012). Die *IDH1* Mutation betrifft nur ein Allel und es bilden sich Heterodimere mit wild-typischer IDH1. Dies führt zum Verlust der kanonischen Funktion des Enzyms (Atai *et al.*, 2011; Bleeker *et al.*, 2010). Die Mutation wird als *gain-of-function* Mutation bezeichnet und führt zu einer Umwandlung von α -Ketoglutarat (α -KG) zu 2-Hydroxyglutarat (2-HG) und dem Verbrauch von NADPH (Abbildung 1).

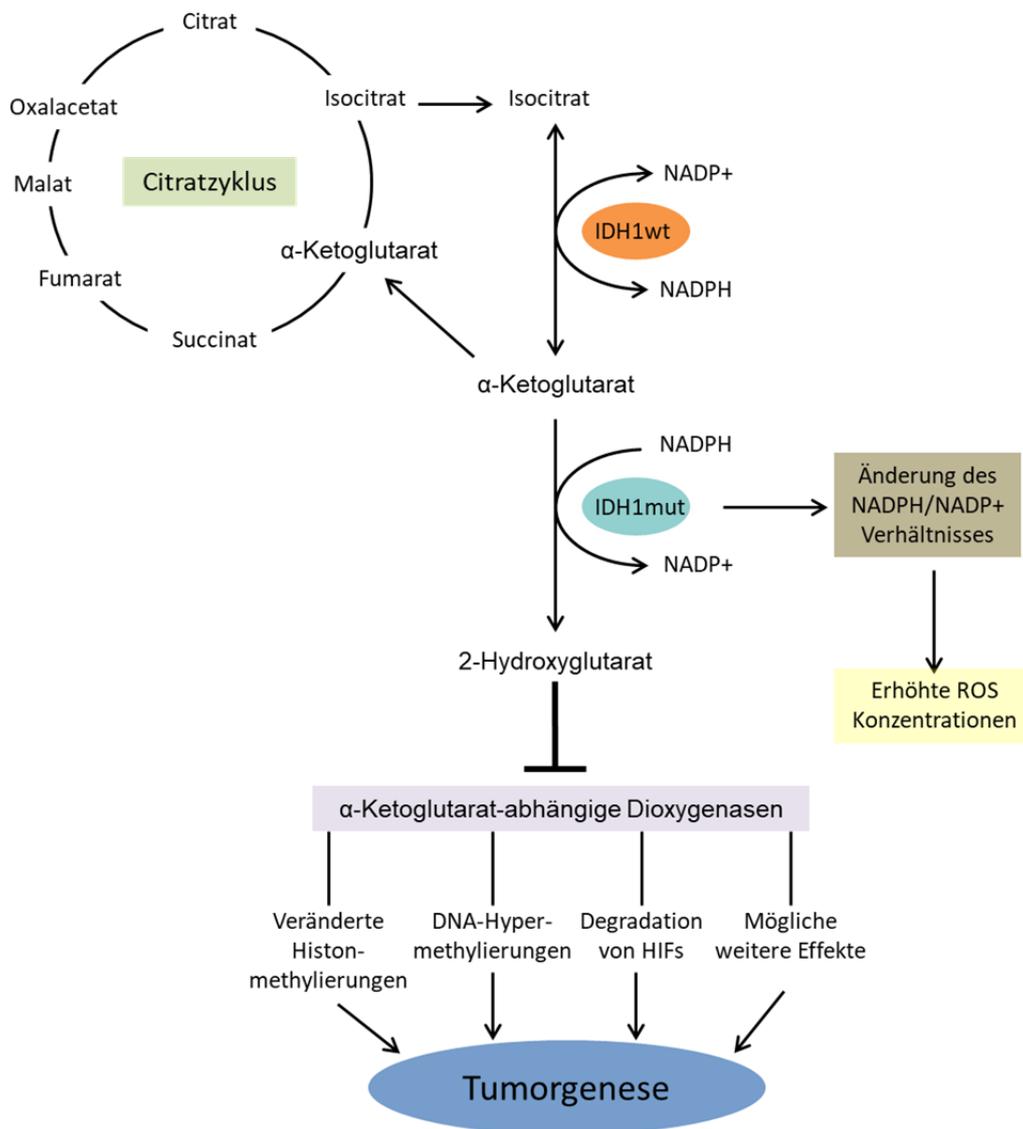


Abbildung 2: Auswirkungen der *gain-of-function* Mutation der *IDH1* (modifiziert nach Clark *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016).

Das 2-HG akkumuliert in der Zelle und führt zur Inhibition von α -KG-abhängigen Dioxygenasen (Dang *et al.*, 2009) und in der Folge auch zu Hypermethylierungen der DNA (Figueroa *et al.*, 2010) (Abbildung 2). Zudem ist es wahrscheinlich, dass die erhöhte 2-HG Menge die Aktivität des Proteins PHD2 (*propyl hydroxylase domain-containing protein 2*) unterstützt und dies zur Degradation von Hypoxie-induzierten Faktoren (HIFs) führt. Zu dieser Gruppe zählt auch HIF1 α , ein bekannter Tumorsuppressor (Koivunen *et al.*, 2012). 2-HG inhibiert außerdem α -KG abhängige Dioxygenasen wie TET2 (Tet Methylcytosin Dioxygenase 2) (Xu *et al.*, 2011). TET2 ist unter anderem für die Demethylierung der DNA zuständig, wird das Enzym inhibiert kommt es zur DNA Hypermethylierung und hierdurch,

über die Inhibierung von Differenzierungsgenen und die Aktivierung von stammzellerhaltenden Genen, zur Induktion der Onkogenese (Figueroa *et al.*, 2010). Auch Histonmodifizierungen sind eine bekannte Auswirkung der Akkumulation von 2-HG, da es die α -KG abhängigen Jumonji-C Domäne-enthaltenen Histon Lysin Demethylasen (JHKDMs) inhibiert (Chowdhury *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). Es ist bekannt, dass die Lysin Demethylasen KDM2B und KDM3B in Gliomzellen eine geringere Expression aufweisen (Frescas *et al.*, 2007). Da JHKDMs bekannte Tumorsuppressoren sind, könnte eine Inhibierung dieser, und die damit einhergehende geringere Expression, die Onkogenese fördern (Varier und Timmers, 2011).

Allerdings wurde bereits gezeigt, dass die Akkumulation von 2-HG nicht allein alle Auswirkungen der *IDH1* Mutation auf die Tumorzellen erklären kann, sondern dass diese noch weitere Veränderungen in der Zelle bewirken muss (Molenaar *et al.*, 2014a; Oizel *et al.*, 2015). Durch die Oxidation von NADPH zu NADP^+ durch die mutierte IDH1 ist die Menge an NADPH in den Zellen erniedrigt (Atai *et al.*, 2011), dies führt vermutlich zu erhöhten ROS-Konzentrationen, welche eine entscheidende Rolle in der Tumorentwicklung spielen können (Sosa *et al.*, 2013).

Die positive Auswirkung der *IDH1* Mutation auf die Überlebensdauer der Patienten könnte hingegen auf einem veränderten Metabolismus beruhen, welcher das Wachstum der Tumorzellen verlangsamt (Molenaar *et al.*, 2014a). Ein Grund hierfür könnte die verringerte Expression des Aminosäuretransporters BCAT1 sein (Tonjes *et al.*, 2013) oder auch eine gestörte Lipidbiosynthese, was wiederum einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation hätte (Grassian *et al.*, 2014). Eine andere Erklärung für die bessere Prognose von Patienten mit einer *IDH1* Mutation wäre ein therapieverstärkender Effekt, wie eine intensiviere Wirkung von Temozolomid (Houillier *et al.*, 2010) und eine sensiblere Reaktion auf Radiochemotherapie (Tran *et al.*, 2014). Die Wirkung von Temozolomid wird durch DNA-Reparaturenzyme aufgehoben (Hegi *et al.*, 2005). Zu dieser Gruppe gehört auch die MGMT (O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase), deren Promotor-Methylierung häufig mit der *IDH1* Mutation einhergeht. Durch die Methylierung verringert sich die MGMT Expression und dies sensibilisiert die Zellen gegenüber der Behandlung mit Temozolomid (SongTao *et al.*, 2012). Durch den Verbrauch von α -KG und NADPH sind *IDH1* mutierte Zellen zudem sensitiver gegenüber oxidativem Stress (Gilbert *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013), weshalb der Zelltod bei radiochemotherapeutischer Behandlung bereits nach kürzerer Zeit eintritt (Molenaar *et al.*, 2014a).

Obwohl bisher schon eine Vielzahl von Effekten der mutierten IDH1 sowie den durch sie entstehenden neuen Metabolit 2-HG in der Tumorgenese beobachtet wurden, ist deren Einordnung in beteiligte Signalwege und Prozesse nach wie vor erschwert, da immer noch wenig über die eigentliche Funktion und biologische Rolle der IDH1 und ihrer Metabolite im Zytoplasma bekannt ist.

1.5 Mutation der *IDH1* als frühes Ereignis in der Entstehung von Gliomen

In einer großangelegten Studie von Watanabe *et al.* (2009) wurden 321 Gewebeproben von histologisch unterschiedlichen Gliomen hinsichtlich genomischer Varianzen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in 130 der untersuchten Fälle eine *IDH1* Mutation festgestellt werden konnte. Im Weiteren wurden Biopsien zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, um das Auftreten verschiedener molekularer Veränderungen zeitlich in der Entstehung der Gliome einordnen zu können. Es zeigte sich, dass die *IDH1* Mutation in allen Fällen bereits vor einer Mutation von p53 und auch vor der Deletion der Chromosomenarme 1p und 19q detektiert werden konnte und somit ein frühes Ereignis in der Tumorgenese darstellt. Da es wahrscheinlich ist, dass Gliome aus mutierten neuralen Stamm- und Vorläuferzellen entstehen (Johansson *et al.*, 1999), könnten diese ein geeignetes Modell für die Analyse dieser frühen Phase der Tumorgenese sein.

1.5.1 Neurale Stamm- und Vorläuferzellen und ihre Bedeutung in der Tumorgenese

Da aus Stammzellen verschiedenste Zelltypen hervorgehen können, sind diese in den meisten Geweben für die Regeneration zuständig. Diese Eigenschaft der Selbsterneuerung wird innerhalb der Gewebe streng überprüft, da unkontrolliertes Wachstum der Zellen zu Tumoren oder Metastasen führen kann (Al-Hajj und Clarke, 2004). Es ist bekannt, dass Zellen mit diesen stammzellähnlichen Eigenschaften in Tumorgewebe vorkommen, die somit zur Selbsterneuerung in der Lage sind und möglicherweise den Ursprung eines Tumors darstellen könnten (Clarke *et al.*, 2006).

Auch die zelluläre Quelle von Gliomen ist zurzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird angenommen, dass Krebszellen, sowie Stammzellen, eine unbegrenzte Lebensdauer haben (Al-Hajj *et al.*, 2003; Lapidot *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2003). Deshalb wird davon

ausgegangen, dass Gliome aus mutierten neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen (NSC/NPCs) entstehen (Johansson *et al.*, 1999). Durch verschiedene Stimuli, wie z.B. Traumata, sind die NSC/NPCs in der Lage zu proliferieren und zu differenzieren. Um die Frage nach den Entstehungszellen für unterschiedliche Tumorentitäten zu adressieren, wurden mittlerweile diverse Mausmodelle etabliert, in welchen spezifische Mutationen in NSC/NPCs induziert wurden. Alcantara Llaguno *et al.* (2009) beobachteten beispielsweise, dass eine Inaktivierung von *p53*, *Nfl* und *Pten* zur Ausbildung von malignen Astrozytomen führen kann. Des Weiteren wurde von Persson *et al.* (2009) gezeigt, dass Oligodendrogliome wahrscheinlich nicht aus neuronalen Stammzellen entstehen.

1.6 Charakterisierung der Tumorgenese mittels Proteomanalyse

Während der Entstehung von Gliomen finden viele Veränderungen auf unterschiedlichsten Ebenen statt. Zur Analyse dieser bedient sich die Forschung unterschiedlicher Techniken wie der Transkriptom- und Genomanalyse oder der Proteom- und Metabolitenanalyse. Hierbei erlaubt die Proteomanalyse als einzige Veränderungen auf Ebene des translatierten Genprodukts, den Proteinen, und somit auch den zellulären Phänotyp direkt zu untersuchen. Als Proteom werden alle Proteine bezeichnet, die zu einem definierten Zeitpunkt und Zustand in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus vorhanden sind (Wilkins *et al.*, 1996). Hierbei variiert sowohl der Abundanzbereich (ca. sieben Größenordnungen) als auch die Anzahl der Proteinvarianten (10.000 bis 20.000) zwischen verschiedenen Zuständen teils erheblich (Beck *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2001). Zudem ist das Proteom höchst dynamisch, da die Abundanzen und Proteinvarianten von multiplen Faktoren wie beispielsweise pH-Wert oder Stresssignalen beeinflusst werden (Anderson und Anderson, 1996). Eine häufig auftretende Art der Variation von Proteinen sind posttranslationale Modifikationen (PTM), wie beispielsweise Phosphorylierungen oder Glykosylierungen, die Einfluss auf die Funktionalität der Proteine nehmen können (Karve und Cheema, 2011). Die Proteomanalyse hat sich zum Ziel gesetzt Proteine nicht isoliert, sondern im Kontext komplexer biologischer Systeme genauer zu analysieren und führt hierzu eine Identifizierung und Quantifizierung derselben, auch unter Beachtung möglicher Isoformen und posttranslationaler Modifikationen, durch (Lottspeich, 2009).

Die Proteomik befasst sich zum einen mit der vollständigen Beschreibung des Proteoms eines Organismus, zum anderen kann sie auch verwendet werden, um differenzielle Analysen der Proteinexpression zwischen verschiedenen Zelltypen oder Zuständen durchzuführen. In

biologischen Organismen können bereits kleine Veränderungen in den Proteinabundanz regulatorische Effekte auf diverse Prozesse in der Zelle haben und somit enormen Einfluss auf das gesamte System nehmen (Choudhary und Grant, 2004). So wurden beispielsweise differenzielle Proteomanalysen zwischen Gewebematerial von gesunden und erkrankten Patienten durchgeführt, um eventuell veränderte Signalwege oder Prozesse zu charakterisieren (Lovric, 2011). In dieser Arbeit wurde die differenzielle Proteomanalyse zur Untersuchung möglicher Unterschiede im Proteom zwischen *IDH1* wild-typischen und *IDH1* mutierten Zellen verwendet.

Von besonderer Relevanz für den Ablauf biologischer Prozesse sind Protein-Protein-Interaktionen. Ihre Analyse mittels Massenspektrometrie liefert neue Einblicke in die Funktion von Proteinen (Stelzl *et al.*, 2005). Hier ist es nicht nur möglich globale Interaktionsstudien für gesamte Organismen durchzuführen (Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002), sondern auch Interaktionsnetzwerke für bestimmte Proteine zu erstellen (McDonald *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2007). Protein-Protein-Interaktionen können sowohl stabile Komplexe als auch transiente Bindungen, die auf Stimuli reagieren, sein (Nudelman *et al.*, 2016; Perkins *et al.*, 1999). Durch den Kontakt von zwei oder mehreren Proteinen kann es zu Konformationsänderungen kommen und dadurch möglicherweise auch zu einer veränderten Funktionsweise oder Aktivität der betroffenen Proteine (Hsu *et al.*, 2013). Für die Analyse der Interaktion eines Proteins ist die Verwendung einer Affinitätsaufreinigung, z.B. mittels Immunpräzipitation gekoppelt mit Massenspektrometrie, eine effektive Methode, da hier über die Anreicherung des Zielproteins auch spezifisch interagierende Proteine identifiziert werden können (Zhang *et al.*, 2017b). Die weitere bioinformatische Auswertung der so gewonnenen Daten kann beispielsweise Hinweise auf eine Veränderung des Interaktoms eines Proteins durch eine Mutation, und einem damit einhergehenden veränderten Metabolismus, aufzeigen (Coffill *et al.*, 2012).

1.6.1 Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels

Massenspektrometrie

Als klassische Methoden werden in der Proteomanalyse die 2D-Gelelektrophorese (Klose und Kobalz, 1995) und Methoden, die auf massenspektrometrischer Analyse basieren, wie die markierungsfreie Analyse (Silva *et al.*, 2005) oder *stable isotope labeling by amino acids in cell culture* (SILAC) (Ong *et al.*, 2002), verwendet. Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteinproben mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und nach ihrem isoelektrischen Punkt und

dem Molekulargewicht aufgetrennt, so dass ein Vergleich der Proben anhand des Spotmusters möglich ist. Außerdem lässt sich eine weiterführende Analyse der Spots mittels Massenspektrometrie durchführen. Aufgrund der enormen technischen Entwicklungen in der Massenspektrometrie im letzten Jahrzehnt und der damit verbundenen Möglichkeit zur parallelen Quantifizierung und Identifizierung mehrerer tausend Proteine hat die quantitative Massenspektrometrie mittlerweile die 2D-Gelelektrophorese als Goldstandard für die Proteomanalyse abgelöst. Bei den MS-basierten Ansätzen werden meist komplexe Protein- oder Peptidgemische über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt, durch Elektrosprayionisation (ESI) von der Flüssig- in die Gasphase gebracht und anschließend wird im Massenspektrometer das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) analysiert (Fenn *et al.*, 1989). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Fragmentierung bestimmter Mutterionen, um zusätzliche Informationen über die Sequenz zu erhalten (Tandem MS). Die Spektren dieser m/z -Werte können mit verschiedenen Datenbanken abgeglichen und so Proteinen zugeordnet werden. Dies ist möglich, da die DNA-Sequenzierung in der Lage ist ganze Genome zu entschlüsseln (Mann *et al.*, 1993). Die Genauigkeit der Massenbestimmung und die hohe Sensitivität verschaffen der MS-basierten Analyse einen Vorteil gegenüber anderen Identifizierungsmethoden (Aebersold und Mann, 2003). Eine Methode, bei der Peptidgemische analysiert werden, wird als *bottom-up*-Methode bezeichnet. Bei dieser Art der Analyse werden die Proteine zunächst proteolytisch verdaut, die so entstehenden Peptide werden via ESI oder Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) ionisiert, die so entstehenden niedrig geladenen Peptidionen werden dann massenspektrometrisch analysiert (Catherman *et al.*, 2014). Da bei der Elektrosprayionisation eine vorherige Auftrennung der Probe mittels HPLC möglich und die Komplexität humaner Proben häufig hoch ist, wird diese Ionisierungsmethode mittlerweile in der Proteomanalyse oftmals bevorzugt verwendet. Die Analyse intakter Proteine hingegen wird als *top-down*-Methode bezeichnet. Hier werden die Proteine mittels ESI (Fenn *et al.*, 1989) oder MALDI (Karas und Hillenkamp, 1988) in die Gasphase gebracht. Die so zu analysierenden Proteine besitzen allerdings hohe Ladungszustände, wodurch eine Intaktmessung von komplexen Proteingemischen nach momentanem Stand der Technik nur bedingt möglich ist (Catherman *et al.*, 2014).

Je nach Wahl des Analysators (Orbitrap, Triple-Quadrupole, Ionenfalle, TOF) für die massenspektrometrische Analyse können gerichtete Analysen, wie *selected reaction monitoring* (SRM) (Anderson und Hunter, 2006), oder ungerichtete Analysen, wie die markierungsfreie Quantifizierung, durchgeführt werden. Die ungerichteten Analysen werden

häufig für die Identifizierung und Quantifizierung von komplexen Proben verwendet. Bei der gerichteten Analyse werden einige Zielproteine selektiert, um so beispielsweise niedrigabundante Proteine wie Transkriptionsfaktoren zu identifizieren oder Biomarker in Hochdurchsatzexperimenten zu detektieren. Mittels quantitativer Analyse ist es möglich Abundanzunterschiede der Proteine zwischen verschiedenen Proben Gruppen zu vergleichen. Hier stehen sowohl Methoden zur relativen als auch zur absoluten Quantifizierung zur Verfügung (Bantscheff *et al.*, 2007). Bei der relativen Quantifizierung werden lediglich die Abundanzen in den verschiedenen Proben Gruppen im Verhältnis zueinander betrachtet, bei der absoluten Quantifizierung können hingegen genaue Konzentrationen bestimmt werden. Für solche quantitativen Analysen stehen grundsätzlich die markierungsfreie Quantifizierung wie auch metabolische Markierungsstrategien wie die Inkorporation von schweren Aminosäuren (SILAC) oder chemische Markierungen wie die Dimethyl-Markierung zur Verfügung (Abbildung 3) (Bantscheff *et al.*, 2007).

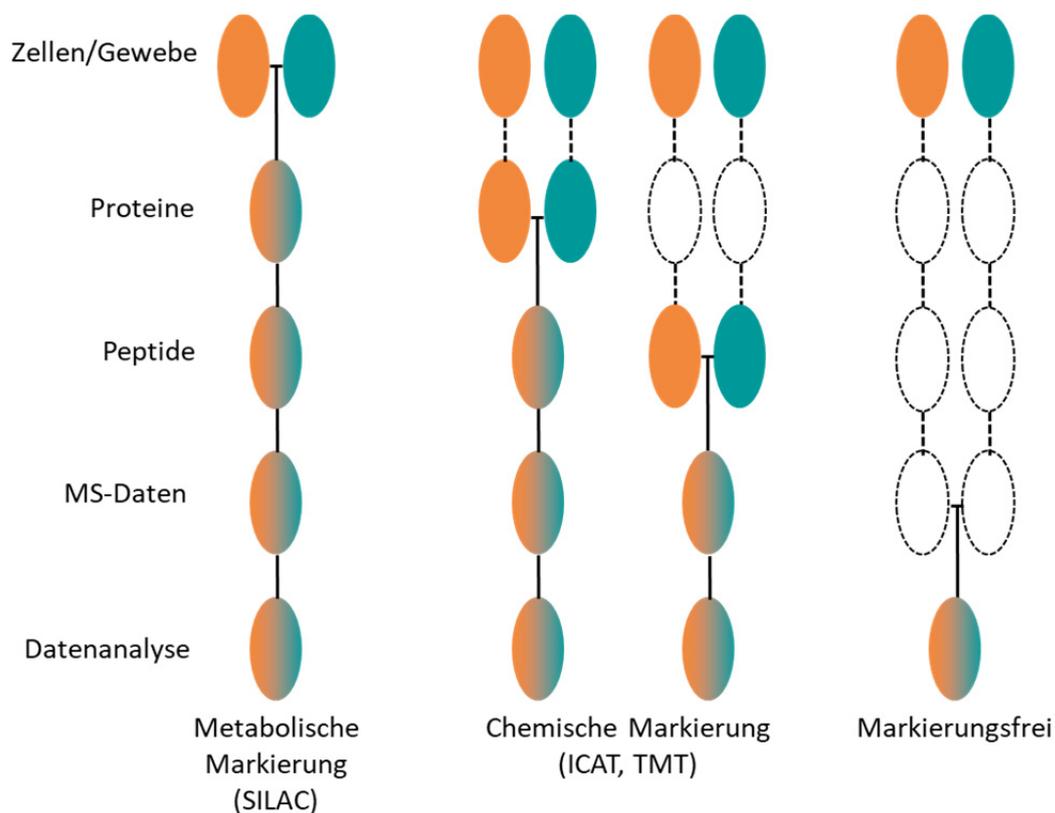


Abbildung 3: Verschiedene Methoden zur MS-basierten Quantifizierung von Proteinen (modifiziert nach Bantscheff *et al.*, 2007). In Orange und Grün sind die unterschiedlichen Proben Gruppen gezeigt. Es wird dargestellt, an welchem Punkt der Probenanalyse die verschiedenen Gruppen miteinander vereint werden.

Bei Methoden wie SILAC oder *isotope-coded affinity tag* (ICAT) erfolgt die Quantifizierung eines Peptids über das Verhältnis der Signalintensitäten seiner unterschiedliche isotopenenthaltenden Varianten. Für die markierungsfreie Quantifizierung hingegen wurden verschiedene Methoden entwickelt wie die Quantifizierung auf Basis der Intensität des Mutterions (*area under the curve*) oder das *spectral counting* (Liu *et al.*, 2004), bei dem die Anzahl der aufgenommenen Fragmentspektren pro Protein als Maß für die Abundanz herangezogen wird. Die markierungsfreie Analyse bietet den Vorteil, dass keine Manipulation der Proteine stattfindet, sondern die Probe direkt analysiert werden kann. Diese Vorgehensweise setzt jedoch eine hohe Reproduzierbarkeit und Robustheit der HPLC und des Massenspektrometers voraus (Cox und Mann, 2011).

1.6.2 Analyse des Phosphoproteoms als wichtiger Schalter der Zelle

Als posttranslationale Modifikationen (PTM) werden Veränderungen von Proteinen bezeichnet, welche nach der Translation reversibel oder irreversibel an Proteine angebracht werden. Diese Information ist nicht im Genom codiert. Je nach Lokalisation des Proteins können verschiedene posttranslationale Modifikationen auftreten (Larsen *et al.*, 2006). Die Modifikationen können mannigfaltige Einflüsse in der Zelle haben. So bestimmen sie zum Teil maßgeblich z.B. die Zell-Zell-Erkennung, Proteinfaltung, Halbwertszeit von Proteinen oder deren Lokalisation. In eukaryotischen Zellen zeigen über 300 bekannte Modifikationen welche zusätzliche Diversität durch PTM im Proteom erzielt werden kann (Witze *et al.*, 2007). Phosphorylierungen, Disulfidbrücken, Sulfonierungen, Acetylierungen und Glykolysierungen sind nach heutigem Kenntnisstand die am häufigsten untersuchten Proteinmodifikationen.

Eine besondere Rolle unter den reversiblen Modifikationen nehmen hierbei Phosphorylierungen ein. Die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms brachte 518 Gene für Kinasen (Manning *et al.*, 2002) und 214 für Phosphatasen (Mueller *et al.*, 2007) hervor. Es wird vermutet, dass im gesamten Proteom über 500.000 Phosphorylierungsstellen vorhanden sind (Lemeer und Heck, 2009). In der Zelle haben Proteinphosphorylierungen vielfältige Einflüsse auf verschiedenste Signalwege, das Zellwachstum, die Proliferation oder auch die Apoptose (Hunter, 2000). Durch eine oder mehrere Phosphorylierungen können sich diverse Eigenschaften eines Proteins ändern, hierzu zählen die Struktur, die Aktivität oder die Lokalisierung des Proteins in der Zelle. Dies ist der Grund, weshalb aberrante Phosphorylierungen eines Proteins erheblichen Einfluss auf den gesamten Organismus haben

können und mit der Entstehung verschiedener Krankheiten wie Krebs oder Diabetes in Zusammenhang stehen (Clevenger, 2004). Da Phosphorylierungen reversible Veränderungen sind, ist eine genaue Anzahl phosphorylierter Proteine nicht bekannt. Allerdings wird angenommen, dass 30 bis 50 % aller Proteine im Laufe ihres Daseins mindestens eine Phosphorylierung tragen (Cohen, 2002; Hubbard und Cohen, 1993). In den letzten Jahren ist die massenspektrometrische Analyse von Phosphorylierungen immer weiter in den Fokus gerückt, da hier auch Informationen über die genaue Lokalisation der Modifikation generiert werden können. Für die Analyse von Phosphorylierungen muss normalerweise ein Anreicherungsschritt durchgeführt werden, da in einer komplexen Probe deutlich mehr unphosphorylierte Peptide vorhanden sind, welche die Signale der phosphorylierten Peptide überlagern können. Eine Möglichkeit der Anreicherung ist die Verwendung von Antikörpern, welche die phosphorylierten Peptide spezifisch binden (Pandey *et al.*, 2000; Salomon *et al.*, 2003). Eine andere Möglichkeit ist die Vorfraktionierung und Anreicherung aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Phosphopeptide. Neben einer Kationenaustauschchromatographie (Ballif *et al.*, 2004) kann auch die *hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) hierzu verwendet werden (Alpert, 1990; McNulty und Annan, 2008). Diese Methoden zur Vorfraktionierung können mit weiteren Anreicherungsmethoden, wie *immobilized metal ion affinity chromatography* (IMAC) oder *metal oxide affinity chromatography* (MOAC, beispielsweise TiO₂), kombiniert werden (Larsen *et al.*, 2005). Bei diesen Methoden wird sich die stärkere negative Ladung der Phosphopeptide zu Nutze gemacht, welche so mit einem bestimmten Trägermaterial interagieren und im Laufe der Anreicherung von diesem wieder eluiert werden können. Jede dieser Methoden hat ihre Vorteile und Limitierungen, MOAC zeigt im Vergleich zu IMAC eine höhere Kapazität und Selektivität für Phosphopeptide (Larsen *et al.*, 2005), mit der Verwendung von IMAC wiederum ist die Ausbeute an multiphosphorylierten Peptiden höher (Jensen und Larsen, 2007).

1.7 Die Rolle der Bioinformatik in der Proteomanalyse

Aufgrund der großen Datenmengen, welche durch die Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie generiert werden, ist heutzutage für die Auswertung hinsichtlich der biologischen Relevanz dieser Daten ein softwarebasierter Ansatz unerlässlich (Kumar und Mann, 2009). Man kann hierbei zwischen statistischen (Identifizierung und Quantifizierung

von Proteinen) und funktionellen (Einordnung der Proteindaten in den biologischen Kontext) Methoden unterscheiden (Bessarabova *et al.*, 2012).

Für die Identifizierung von Peptidmassenspektren werden Abgleiche mit Proteinsequenzdaten verwendet, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen, welche alle ein ähnliches Konzept innehaben (James *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 1993; Pappin *et al.*, 1993; Yates *et al.*, 1993). Zunächst kann die Datenbank meist durch Einschränkungen, wie Taxonomie, verkleinert werden. Anschließend werden die Proteineinträge *in silico* proteolytisch verdaut und theoretische Massenspektren werden erstellt, welche dann mit den experimentellen Spektren abgeglichen werden. Hier ist eine hohe Massengenauigkeit von großer Bedeutung, um möglichst eindeutige Übereinstimmungen zu identifizieren. Programme wie SEQUEST (Eng *et al.*, 1994) oder Mascot (Perkins *et al.*, 1999) führen neben der Identifizierung von Peptidmassenspektren auch die Interpretation von Peptidfragmentspektren durch. Hier werden die theoretischen Peptide weiter fragmentiert zu theoretischen Peptidfragmenten, von welchen wiederum ein Spektrum erstellt wird, welches mit den experimentellen Daten abgeglichen und über ein Punktesystem, das die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung angibt, bewertet wird. Im Weiteren können diese Daten dann Proteineinträgen in der Datenbank zugeordnet werden, wodurch der Nutzer eine Proteinliste mit allen identifizierten Proteinen erhält. Allerdings kann dieser Identifizierungsprozess durch überlesene Schnittstellen der Protease oder posttranslationale Modifikationen erschwert werden, da ein Algorithmus all diese Variablen berücksichtigen muss. Vor allem die massenspektrometrische Analyse von komplexen Proben erfordert einen enormen Rechenaufwand, da mehrere tausend Spektren abgeglichen und interpretiert werden müssen. Die Untersuchung von verschiedenen experimentellen Bedingungen erfordert neben der Identifizierung auch die Quantifizierung der Proteine, um etwaige Unterschiede zwischen Probengruppen zu detektieren. Bei der markierungsfreien Proteinquantifizierung wird das Expressionsniveau eines Proteins in einer Probe mit dem Expressionsniveau des gleichen Proteins in einer anderen Probe ins Verhältnis gesetzt. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Parameter mit der Proteinabundanz in einer Probe korrelieren. Dies sind Merkmale wie die Sequenzabdeckung, die Signalintensität, die Anzahl identifizierter Peptide oder die Anzahl an Fragmentspektren (Neilson *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2006). Für die Durchführung der Quantifizierung werden verschiedene Programme, wie MaxQuant (Cox und Mann, 2008) oder Progenesis (Nonlinear Dynamics), angeboten, die eigene Algorithmen verwenden, welche auf den obengenannten Parametern beruhen, um die Unterschiede in den Proteinabundanzen zwischen verschiedenen Proben zu berechnen.

Für die funktionelle Analyse von Proteomdaten werden häufig Anreicherungsanalysen durchgeführt, um mehr über die Eigenschaften und Beziehungen der experimentell nachgewiesenen Proteine zu erfahren. Hierbei werden die Daten, in Form von Protein-IDs oder Gennamen, funktionellen Ontologie-Begriffen zugeordnet und in Relation zu einem Bezugsproteom gesetzt, welches als Basis für die statistische Berechnung dient (Bessarabova *et al.*, 2012). Häufig wird die *Gene Ontology*-Datenbank genutzt, welche in drei Kategorien gegliedert ist: Biologischer Prozess, molekulare Funktion und zelluläres Kompartiment (Ashburner *et al.*, 2000; Blake und Harris, 2008). Da Proteomanalysen vielfach zur Identifizierung mehrerer tausend Proteine führen, ist die Aufteilung dieser Proteine in kleinere funktionell verbundene Untergruppen eine Möglichkeit zur weiteren Analyse (Khatri *et al.*, 2012). Hierdurch können mögliche veränderte Signalwege oder Prozesse durch Interaktionen zwischen Proteinen sichtbar gemacht werden. Für diese Analyse von Protein-Protein-Interaktionen stehen verschiedene Programme wie STRING (Snel *et al.*, 2000) oder Cytoscape (Bindea *et al.*, 2009) zur Verfügung, welche auf verschiedene Datenbanken wie Uniprot oder *Gene Ontology* zurückgreifen und so Proteinnetzwerke visualisieren und parallel Anreicherungsanalysen erlauben.

Da in der heutigen Zeit sehr große Datensätze nicht nur durch die Proteomik, sondern auch die Transkriptomik und Metabolomik generiert werden und eine integrative Auswertung dieser Daten einen tieferen Einblick in zelluläre Prozesse zeichnen soll, ist die Verwendung der Bioinformatik unerlässlich (Zhang *et al.*, 2010).

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Isocitrat-Dehydrogenase 1 und ihre Mutation im Zusammenhang der Tumorgenese von Gliomen mithilfe der Proteomanalyse tiefergehend charakterisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- Erstellung des Proteomprofils der Gliomzelllinie U87MG in Abhängigkeit der *IDH1* Mutation durch die Verwendung der Massenspektrometrie mit drauffolgender markierungsfreier Quantifizierung mit anschließender Ermittlung differentieller Proteine zwischen der Gliomzelllinie U87MG, welche wild-typische *IDH1* bzw. mutierte *IDH1* exprimiert, und weiterer bioinformatischer Auswertung mithilfe von Anreicherungsanalysen zur Bestimmung der zugrundeliegenden biologischen Prozesse.
- Untersuchung der posttranslationalen Modifikationen der wild-typischen und mutierten IDH1 nach Anreicherung von IDH1 mittels einer Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse.
- Etablierung und Durchführung einer affinitätsbasierten MS-Methode zur Identifizierung der Interaktionsnetzwerke der wild-typischen und mutierten IDH1 der Gliomzelllinie U87MG.
- Erstellung des Proteomprofils der murinen neuralen Stamm- und Vorläuferzellen in Abhängigkeit der IDH1 Mutation unter Verwendung der markierungsfreien MS-Analyse.
- Etablierung und Durchführung einer MS-basierten Methode zur Anreicherung und Analyse des Phosphoproteoms der neuralen Stamm- und Vorläuferzellen und anschließender bioinformatischer Untersuchung möglicher veränderter biologischer Prozesse.

Mit Hilfe der durchgeführten Arbeiten soll die bisher noch nicht im vollen Umfang verstandene Rolle der IDH1 in der Tumorgenese von Gliomen eingehend untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Feinwaage, Entris	Sartorius, Göttingen
Folienschweißgerät	Severin, Sundern
Heizschüttler, MKR 13	Hettich Benelux, Geldermalsen, Niederlande
Inkubator	Binder, Tuttlingen
Probenschüttler, <i>HulaMixer</i>	Thermo Fisher Scientific
Laser Scanner, Typhoon 9400	GE Healthcare, München
Massenspektrometer, Orbitrap Elite	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Massenspektrometer, QExactive	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Mikroskop, Olympus IX50	Olympus Corporation, Japan
Milli-Q® Integral	Merck Millipore, Darmstadt
Wasseraufbereitungssystem	
PAGE-Kammer, 1D-PAGE	Thermo Fisher Scientific
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer, <i>accu-jet pro</i>	Brand, Wertheim
Plattenlesegerät, DTX 880	Beckman Coulter, Krefeld
Plattformschüttler, KS250 basic	Ika, Staufen
Plattformschüttler, Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Präzisionswaage, PCB	Kern, Balingen-Frommern
Präzisionswaage, 822	Kern, Balingen-Frommern
Scanner, ViewPix 700	Biostep, Burkhardtsdorf
Semi-Dry Blotter, <i>Multiphor II</i>	Amersham Pharmacia Biotech
Spannungsggerät, Consort E815	Sigma, München
Spannungsggerät, EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
Sterilbank, <i>clean air</i>	Clean Air Techniek B.V., Niederlande
Tischzentrifuge, Mikro 20	Hettich, Mülheim an der Ruhr
Tischzentrifuge, Mikro 220R	Hettich, Mülheim an der Ruhr
<i>Tissue Lyser</i> LT	QIAGEN, Hilden

Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Vakuumkonzentrator, 5301	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Rotina 46 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, 5430 R	Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra 0,5 ml 3K	Merck, Darmstadt
Analytische Säule	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Dispenser-Spitzen	Eppendorf, Hamburg
HyperSep SpinTip HILIC	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2 µl	Eppendorf, Hamburg
ESI-Nadeln	New Objective, Woburn, USA
Falcons 15, 50 ml	Eppendorf, Hamburg
Kapillarsäule	Thermo Fisher Scientific, Bremen
<i>Low Bind</i> Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10, 200, 1.000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz 200, 1.000 µl	Eppendorf, Hamburg
PVDF-Membran Immobilon®-FL	Merck Millipore, Darmstadt
Stripetten 10, 25 ml	Corning, New York, USA
TiO ₂ Mag Sepharose	Merck, Darmstadt
Zellschaber	Corning, New York, USA

3.1.3 Chemikalien

Acetonitril	Sigma
Ammoniumbicarbonat	Fluka
Bromphenolblau Na-Salz	Roth
<i>Complete Ultra EDTA free Mini</i> Tablette	Roche
Dimethylpimelimidat (DMP)	Thermo Fisher Scientific
Dithiothreitol (DTT)	Serva

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Thermo Fisher Scientific
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	Thermo Fisher Scientific
<i>Dynabeads Protein G</i>	Thermo Fisher Scientific
Ethanol 99,5 %, vergällt	VWR
Ethanol, absolut	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck
EDTA (Titriplex III)	Merck
Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific
Formaldehydlösung 37 %	Roth
Geneticin (G418)	Thermo Fisher Scientific
Glycin	Roth
HEPES 4-2 Hydroxyethylpiperazin- Ethansulfonsäure	Sigma
Iodoacetamid	Sigma
Kaliumhexacyanoferrat III $K_3[Fe(CN)_6]$	Merck
Magermilchpulver	Fluka
MOPS	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Sigma
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Fluka
<i>Neural Tissue Dissociation Kit (P)</i>	Miltenyi
Nonidet P 40 Substitute	Sigma
Nu PAGE 4-12 % Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific
Pen Strep	Thermo Fisher Scientific
Pierce® 660 nm Protein Assay	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ Anti-HA <i>Magnetic Beads</i>	Thermo Fisher Scientific
Protein Standard Micro 1 mg BSA/ml	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma

Silbernitrat	Sigma
Tricin	Sigma
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Trizma base	Sigma
Trypsin NB	Serva
Trypsin-EDTA 0,05 %	Thermo Fisher Scientific
Tween 20	Sigma

3.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer	126 g Harnstoff 35 ml Phosphorsäure (85 %) dH ₂ O (Gesamtvolumen 700 ml)
Bindungspuffer	1 M Glykolsäure 80 % Acetonitril 5 % TFA
Blockierlösung	2 % BSA 3 % Skim Milk Powder in 50 ml TBST
Coomassie Färbelösung	40% EtOH 10 % Essigsäure 250 mg Coomassie in dH ₂ O
Coomassie Entfärbelösung	10 % Essigsäure in dH ₂ O
DTT	1,4 M in 100 mM NH ₄ HCO ₃
DTT für In-Gel-Verdau	7,14 µl 1,4 M DTT 995 µl 50mM NH ₄ HCO ₃
Elutionspuffer	5 % Ammoniumhydroxid
Entfärbelösung 1	30 mM Natriumthiosulfat
Entfärbelösung 2	100 mM Kaliumhexacyanoferrat
Extraktionslösung (Gelbande)	50 % TFA (aus 0,1 %iger Lösung) 50 % Acetonitril
Extraktionspuffer	20 mM NaCl 1 % Natriumdeoxycholat 1 % NP-40 20 mM Tris

Material und Methoden

Formaldehydlösung	2,5 % Formaldehyd in PBS
Größenstandard	<i>Page Ruler PreStained Protein Ladder</i> , Thermo Fisher Scientific
Hinterkolbenspülung	10 % Isopropanol
Homogenisierungspuffer	50 mM Ammoniumchlorid 80 mM Tris pH 8
IAA für In-Gel-verdau	55 mM Iodacetamid in 50mM NH_4HCO_3
Kathodenpuffer	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris
LC-MS Lösemittel A	0,1 % TFA
LC-MS-Lösemittel B	0,1 % FA 84 % ACN
MOPS Puffer, 20-fach konzentriert	1M MOPS 1M Tris Base 2% SDS 20mM EDTA pH 7,7
SDS-Probenpuffer, 4-fach konzentriert	600 mM DTT (wurde bei Bedarf verwendet) 30 % Glycerin 12 % SDS 150 mM Tris/HCl pH 7,0 wenig Bromphenolblau
Silberfärbung Lösung A	50 % EtOH 10 % Essigsäure
Silberfärbung Lösung B	30 % EtOH 500 mM Natriumacetat 8 mM Natriumthiosulfat
Silberfärbung Lösung C	6 mM Silbernitrat
Silberfärbung Lösung D	236 mM Natriumcarbonat
Silberfärbung Lösung E	236 mM Natriumcarbonat 0,01% Formaldehyd
Silberfärbung Lösung F	50 mM EDTA
TBS, 10-fach konzentriert	100 mM Tris Base 1,5 M NaCl pH 8
TBST	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
Trypsin Lösung	0,033 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Trypsin in 50 mM NH_4HCO_3

Waschlösung A	10 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Waschlösung B	50% 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat 50% Acetonitril (v/v)
Waschpuffer	0,5 M NaCl 0,05 % SDS 20 mM HEPES 1 % NP-40
Waschpuffer (TiO ₂)	80 % Acetonitril 1 % TFA

3.1.5 Software

Chromeleon	Thermo Fisher Scientific
Mascot	Matrix Science, London, UK
Max Quant	Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried
Perseus	Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried
Progenesis	Nonlinear Dynamics
Proteome Discoverer	Thermo Fisher Scientific
Tune/X-Calibur	Thermo Fisher Scientific

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Quelle (Bestellnr.)	Spezies	Verdünnung WB	Verdünnung IP	Verdünnung IF
Anti-IDH1	Cell Signaling (8137)	Hase monoklonal	1:1.000	1:50	1:400
Anti-IDH1 R132H	Dianova (DIA-H09)	Maus monoklonal	1:500	-	1:20
Anti-Profilin	Cell Signaling (3237)	Hase polyklonal	1:500	-	-
Anti-Tri-Methyl-Histon H3	Cell Signaling (9733)	Hase monoklonal	1:100	-	-
Normal rabbit IgG	Santa Cruz (sc-2027)	Hase	-	1:40	-

3.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Quelle (Bestellnr.)	Spezies	Verdünnung WB	Verdünnung IF
Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555	Invitrogen (A21429)	Ziege	1:5.000	-
Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594	Introgen (A11037)	Ziege	-	1:1.000
Anti-mouse IgG Alexa Fluor 647	Invitrogen (A21236)	Ziege	1:2.500	-
Anti-mouse IgG Alexa Fluor 594	Invitrogen (A11032)	Ziege	-	1:1.000

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur-Methoden und Transfektion für die U87MG Zelllinie

Für die Analyse der Auswirkungen der *IDH1* Mutation auf das Proteom wurde die Glioblastom-Zelllinie U87MG (*American Type Culture Collection, USA*) eingesetzt. Zur Kultivierung wurde ein Begasungsbrutschrank mit 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit verwendet. Die Zellen wurden in Petrischalen mit unterschiedlichen Durchmessern kultiviert. Es wurde DMEM-Medium (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) mit 10 % fetalem Kälberserum und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin benutzt. Die Zellen wurden bei einer

Konfluenz von ca. 90 % passagiert. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit einer 0,25 %igen Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion des Trypsins durch die Zugabe von Medium gestoppt, die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 umgesetzt und frisches Medium auf die Zellen gegeben.

Die U87MG Zellen wurden für einige Experimente transfiziert. Dies wurde von Miriam Knühmann im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Hierzu wurde der pIRES2-EGFP-Neomycin Vektor als Leervektor-Kontrolle und der pIRES2-EGFP-Neomycin Vektor mit HA-gekoppelter mutierter IDH1 (R132H) oder HA-gekoppelter wild-typischer IDH1 cDNA verwendet. Die Transfektion wurde mit dem LipofectaminTM 2000 Reagenz (Thermo Fisher Scientific) in Opti-MEMTM (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden in dem oben beschriebenen Medium kultiviert, zusätzlich wurde diesem 0,5 mg/ml Geneticin (Thermo Fisher Scientific) zur Selektion hinzugefügt. Außerdem wurden die Zellen regelmäßig mittels Durchflusszytometrie sortiert.

3.2.2 Zellkultur-Methoden für die NSC/NPCs

Sowohl die Präparation der NSC/NPCs als auch die Kultivierung der Zellen wurden von Dr. Christiane Knobbe-Thomsen und Miriam Knühmann im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Es wurden transgene Mäuse verwendet, bei denen die Expression von mutierter bzw. wild-typischer *IDH1* nach Präparation der Zellen durch Zugabe von Tamoxifen induziert werden kann (Sasaki *et al.*, 2012). Für die Präparation wurden die Gehirne der Mäuse (P0, P1, P2) isoliert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und durch mehrmaliges pipettieren in 1 ml Mix 1 (1ml Puffer X (*Neural tissue Dissociation* Kit), 26,3 µl Enzym P, 1,23 µl β-Mercaptoethanol) gelöst. Dem folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad bei regelmäßigem Invertieren des Reaktionsgefäßes. Nach der Zugabe von 35 µl Mix 2 (10 µl Puffer Y (*Neural tissue Dissociation* Kit), 5 µl Puffer A (*Neural tissue Dissociation* Kit), 20 µl DNase) erfolgte eine erneute Inkubation bei 37 °C im Wasserbad für 20 min, wobei die Probe, nach der Hälfte der Zeit, durch mehrmaliges Pipettieren gemischt wurde. Anschließend wurden 10 ml PBS^{-/-} hinzugegeben und es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 100 rpm. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet erneut in 10 ml PBS^{-/-} resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml NSC/NPC-Medium aufgenommen, auf eine mit Laminin beschichtete Platte

gegeben und zur Kultivierung in einem Begasungsbrutschrank mit 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und Tamoxifen wurde zur Aktivierung der Cre-Rekombinase hinzugegeben. Nach fünf weiteren Kultivierungstagen wurde das Medium erneut gewechselt und am Tag sieben konnten die Zellen geerntet und gegebenenfalls lysiert werden.

3.2.3 Zellernte und Formaldehyd-Crosslinking

Für den Nachweis von Proteininteraktionen wurden die Zellen in einigen Fällen vor der Ernte mit Formaldehyd behandelt. Das Formaldehyd diffundiert in die Zelle und bildet Methylenbrücken zwischen den primären Aminogruppen und Stickstoffatomen aus. Hierzu wurden Zellen mit einer Konfluenz von 90 % verwendet. Zunächst wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die 2,5 %ige Formaldehydlösung auf die Zellen gegeben und für 15 min bei RT schüttelnd inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und eine 15-minütige Inkubation mit 125 mM Glycin. Die Zellen wurden wiederum zweimal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber in 5 ml 4 °C kaltem PBS geerntet. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 2.000 rpm, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet weiter aufgearbeitet oder bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Zellaufschluss

Nach der Bestimmung des Gewichts des Zellpellets, wurde die einfache Menge dieser Einwaage des Homogenisierungspuffers auf das Pellet gegeben und die Zellen wurden resuspendiert. Daraufhin wurde die gleiche Menge Extraktionspuffer auf das Pellet gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben sechsmal für 10 s sonifiziert und anschließend bei 16.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das so gewonnene Zelllysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um eine möglichst große Ausbeute zu erhalten, wurde das verbliebene Pellet zusätzlich mechanisch aufgeschlossen. Hierzu wurden erneut die gleichen Mengen an Homogenisierungs- und Extraktionspuffer auf die Zellen gegeben und anschließend die Proben mit einer 5 mm Stahlkugel versetzt und für eine Minute bei 40 Hz mit dem *Tissue Lyser* aufgeschlossen. Es folgte eine erneute Behandlung für sechsmal 10 s im Ultraschallbad und anschließend eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 16.000 g. Der Überstand wurde mit dem bereits gewonnenen Zelllysate vereint.

3.2.5 Fraktionierung

Die Fraktionierung wurde durchgeführt, um das Zytoplasma und den Nukleus zu trennen. Hierzu wurde das NE-PER-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Bei einer Konfluenz von 90 % wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 500 g und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Pellet gewogen und in der fünffachen Menge des Gewichts an CER I Puffer durch Vortexen gelöst, es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. In dem Protokoll werden drei Puffer verwendet, CER I, CER II und NER, welche im Verhältnis 200:11:100 genutzt werden sollten. Nachdem die entsprechende Menge eiskalter CER II Puffer hinzugefügt und die Proben erneut 1 min auf Eis gestellt worden waren, wurden die Proben für 15 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, hierbei handelt es sich um die zytoplasmatische Fraktion. Das verbliebene Pellet wurde mit CER I Puffer gewaschen und für 5 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und zum Pellet wurde die entsprechende Menge NER Puffer gegeben. Es folgte ein mechanischer Aufschluss mit anschließendem Sonifizieren der Proben und einer 10-minütigen Inkubation auf Eis. Diese Folge wurde alternierend fünfmal wiederholt. Daraufhin wurde die Probe bei 16.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der dann entstandene Überstand stellte die nukleäre Fraktion dar und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fraktionen konnten nun kurzfristig bei -20 °C und langfristig bei -80 °C gelagert werden.

3.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurde der Pierce 660 nm Protein-Assay verwendet. Dieser beruht auf der Bindung eines Farbstoff-Metall-Komplexes, in einem sauren Puffer, an die Proteine in der Probe und einer daraus resultierenden Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs. Der Assay deckt den Konzentrationsbereich von 50 µg/ml bis 2,0 mg/ml ab. Die Messung wurde in einer Doppelbestimmung für jede Probe durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 10 µl einer BSA-Standardreihe (0 ng/µl bis 2000 ng/µl) und 10 µl der Probe in eine *non-binding* 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde sowohl zur Standardreihe als auch zu den Proben 150 µl des Pierce-Reagenz hinzugegeben und die Platte wurde für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Messung mit einem Multimode Detektor bei einer Wellenlänge von 660 nm durchgeführt und die Proteinkonzentration anhand der Kalibriergeraden bestimmt.

3.2.7 Immunpräzipitation gegen HA-Kopplung

Zur spezifischen Aufreinigung der HA-gekoppelten IDH1 wurde eine spezielle Immunpräzipitation verwendet. Hierfür kamen magnetische Partikel mit immobilisiertem anti-HA Antikörper zur Anwendung. Durch Probenzugabe konnte die HA-Kopplung, und somit auch das gekoppelte Protein, kovalent über den Antikörper an die Partikel binden und nach mehrmaligem Waschen eluiert werden. Pro Probe wurden 25 µl dieser Partikel verwendet und zunächst mit einer 1:1 Mischung aus Homogenisierungs- und Extraktionspuffer zweimal gewaschen. Anschließend wurden 500 µg der Probe in 200 µl Puffer auf die Partikel gegeben und für 30 min bei RT rotierend inkubiert. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit 300 µl Puffer und ein Waschschrte mit dH₂O. Die jetzt noch gebundenen Proteine wurden durch Erhitzen für 5 min bei 95 °C in 20 µl 1x SDS-Probenpuffer ohne DTT eluiert. Anschließend wurde 1,08 µl 1,4 M DTT zu den Proben geben und diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt oder für die LC-MS/MS-Analyse weiter prozessiert.

3.2.8 Antikörperbasierte Immunpräzipitation

Für die antikörperbasierten Immunpräzipitationen wurden magnetische Partikel genutzt an deren Oberfläche Protein G kovalent gebunden ist. Antikörper, die zuvor über ihre Fc-Regionen an Protein G gekoppelt wurden, können so zur spezifischen Anreicherung ihres Antigens verwendet werden. Pro Probe wurden 20 µl der Partikel verwendet und zunächst dreimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde der verwendete Antikörper in 200 µl PBS/Tween (0,02 %) verdünnt und über Nacht bei 4 °C rotierend mit den Partikeln inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und drei Waschschrte mit 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2). Anschließend wurden 500 µl 20 mM Dimethylpimelimidat (DMP) in 0,2 M Triethanolamin auf die Proben gegeben und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Das DMP stabilisiert die Bindung des Antikörpers an das Protein G. Diese Vernetzungsreaktion wurde am nächsten Tag durch die 15-minütige Inkubation mit 50 mM Tris (pH 7,5) gestoppt. Es folgten zwei Waschschrte mit 0,1 % BSA in PBS, zwei Waschschrte mit 0,1 M Citrat (pH 2,3) und erneut drei Waschschrte mit 0,1 % BSA in PBS. Anschließend wurde 1 mg Protein auf die Partikel gegeben und erneut bei 4 °C über Nacht rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Partikel viermal mit PBS gewaschen und die Probe wurde mit 30 µl 1x SDS-Probenpuffer ohne DTT für 10 min bei 56 °C eluiert. Anschließend wurde 1,08 µl

1,4 M DTT zu den Proben geben und diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt oder für die LC-MS/MS-Analyse weiter prozessiert.

3.2.9 Anreicherung von Phosphopeptiden in einer komplexen Probe

Die Anreicherung der Phosphopeptide beruht zum einen auf der Fraktionierung durch hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC), um die Komplexität der Probe zu reduzieren. Hierfür wird ein polares Trägermaterial verwendet, an welches die Peptide binden und mit steigender Polarität eluiert werden. Zum anderen werden die Phosphopeptide über Titandioxid Partikel, durch Bindung der Phosphorylgruppe der Peptide an deren Metallionen, spezifisch angereichert. Für die Anreicherung der Phosphopeptide wurden die Zellen zunächst wie bereits beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Im Anschluss daran wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Für den weiteren Verlauf wurde 1 mg Protein pro Probe verwendet. Zunächst wurde ein tryptischer Flüssigverdau über FASP (*filter aided sample preparation*) durchgeführt. Hierzu wurde das Zellysate in Amicon[®] Ultra *Centrifugal Filter Units* überführt und 60 min bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 400 µl 8 M Harnstoffpuffer mit 50 mM Tris hinzugefügt und es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 10 °C und 14.000 g. Daraufhin wurden zunächst 150 µl DTT für 45 min zur Probe gegeben und anschließend wurde die Probe mit 15 µl IAA für 30 min im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 350 µl 50 mM NH₄HCO₃ jeweils gefolgt von einer 45-minütigen Zentrifugation bei 10 °C und 14.000 g. Anschließend wurde das Amicon[®] Ultra mit der Öffnung voran in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4 °C und 1.000 g zentrifugiert. Daraufhin wurde Trypsin im Verhältnis 1:100 zu der Probe gegeben und der Verdau fand über Nacht bei 37 °C statt. Am nächsten Tag wurden 10 µl 10 %ige Ameisensäure zur Probe gegeben und diese wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Um die Komplexität der Probe zu reduzieren, wurde diese fraktioniert. Hierzu wurden Filterspitzen verwendet, welche mit Säulenmaterial für eine hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) ausgestattet sind. Zunächst wurden die Filterspitzen dreimal mit Lösung A (2 % Acetonitril, 0,1 % TFA) und dreimal mit Lösung B (98 % Acetonitril, 0,1 % TFA) gewaschen. Hierzu wurde die Lösung auf das Säulenmaterial gegeben und die Filterspitze wurde für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert. Die Probe wurde in einer Mischung aus 20 % Lösung A und 80 % Lösung B aufgenommen, auf das Säulenmaterial gegeben und für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und aufbewahrt. Es folgten drei Waschschrte mit Lösung B.

Anschließend wurde eine Mischung aus 30 % Lösung A und 70 % Lösung B auf das Säulenmaterial gegeben und es wurde für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und aufbewahrt. Für die letzte Fraktion wurde 100 % Lösung B hinzugefügt und die Filterspitze wurde wie bereits beschrieben zentrifugiert. Auch hier wurde der Durchfluss aufgehoben. Die so gewonnenen drei Fraktionen wurden anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Nachfolgend fand die Anreicherung der Phosphopeptide über magnetische Titandioxid Partikel statt. Pro Fraktion wurden 100 µl der Partikel verwendet und zunächst zur Equilibrierung mit 500 µl Bindungspuffer gewaschen. Anschließend wurde die in Bindungspuffer gelöste Probe auf die Partikel gegeben und für 30 min rotierend inkubiert. Daraufhin wurde die Probe abgenommen und aufbewahrt. Es folgten ein Waschschrift der Partikel mit Bindungspuffer und zwei Waschschrift mit Waschpuffer. Anschließend wurden 50 µl Elutionspuffer zu den Partikeln gegeben und diese wurden für 5 min rotierend inkubiert. Das Eluat wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden alle Schritte ab der Equilibrierung der Partikel noch zweimal wiederholt, die Eluate vereint und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Um eventuelle Verunreinigungen der Probe zu minimieren wurde eine Festphasenextraktion mittels der Oasis HLB µElutionPlate (Waters) durchgeführt. Hierzu wurde das Säulenmaterial zunächst mit je 200 µl Acetonitril und 0,1 % TFA gewaschen. Anschließend wurde die in 0,1 % TFA gelöste Probe hinzugegeben. Es folgten zwei Waschschrift, zunächst mit 0,1 % TFA, dann mit H₂O. Zum Eluieren wurden 50 µl 70 % Acetonitril auf das Säulenmaterial gegeben. Der Durchfluss wurde aufbewahrt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bis zur LC-MS/MS-Analyse bei -80 °C gelagert.

3.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach Größe im elektrischen Feld (Laemmli, 1970). SDS ist ein anionisches Tensid, das die Eigenladungen der Proteine überdeckt, so haben die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung. Das Polyacrylamidgel wirkt wie ein Sieb auf die Proben, nach Anlegen eines elektrischen Feldes können kleine Proteine leicht durch die Maschen des Gels laufen, während große Proteine langsamer wandern. Zusätzlich zu den Proben wird ein Proteinstandard auf das Gel aufgetragen. Dieser besteht aus Proteinen mit bekannter Größe, so kann die Größe der Proteine der Proben abgeschätzt werden. Für die Gelelektrophorese wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C erhitzt. Daraufhin wurden 20 bis

30 µg Protein auf das Gel geladen (10- und 12-Well Gele von Invitrogen). Die Trennung erfolgte für 15 min bei 50 V und anschließend für ca. 60 min bei 200 V.

3.2.11 Silberfärbung

Die Silberfärbung kann verwendet werden, um mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine zu visualisieren (Nesterenko *et al.*, 1994). Der Ablauf der Silberfärbung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Reihenfolge und Inkubationszeiten der Silberfärbung.

Schritt	Lösung	Dauer
Fixierung	Lösung A	15 min – 24 h
Inkubation	Lösung B	15 min – 24 h
Wässern	H ₂ O	3x 5 – 15 min
Färbung	Lösung C	15 – 30 min
Wässern	H ₂ O	Einige Sekunden
Spülen	Lösung D	1 min
Entwicklung	Lösung E	1 – 7 min
Stoppen	Lösung F	20 min
Waschen	H ₂ O	10 min

3.2.12 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde verwendet, um die Proteine, die zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf dem Gel sichtbar zu machen. Das Gel verblieb dazu mindestens eine Stunde in der Coomassie-Färbelösung (250 mg/l) und wurde schüttelnd inkubiert. Hierbei lagert sich der Farbstoff an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren an und färbt so alle Proteine an. Anschließend wurde Coomassie-Entfärbelösung auf das Gel gegeben, um die Hintergrundfärbung zu minimieren und überschüssige Färbelösung zu entfernen. Daraufhin konnte das Gel mit Wasser gewaschen, eingescannt und weiter verwendet werden.

3.2.13 Semidry Western Blot

Mittels eines Western Blots werden die Proteine, die zuvor durch eine Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden, auf eine Trägermembran übertragen, mit der anschließend beispielsweise eine Immunfärbung durchgeführt werden kann. Durch ein angelegtes elektrisches Feld wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Durch hydrophobe Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche haften und das Muster der Auftrennung bleibt erhalten. Zunächst wurden hierzu zwei in Anodenpuffer eingeweichte Filterpapiere auf die Anodenplatte gelegt. Darauf wurde die Membran, welche zuvor in 100 % Isopropanol aktiviert und in Anodenpuffer gewaschen worden war, platziert und das Gel auf die Membran gelegt. Den Abschluss bildeten zwei in Kathodenpuffer inkubierte Filterpapiere. Mögliche Luftblasen wurden entfernt und der Transfer wurde bei 2 mM pro cm² für eine Stunde durchgeführt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde diese zunächst für 30 min in Blockierlösung auf einem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde pro Membran 1 ml primäre Antikörper-Lösung (verdünnt in Blockierlösung) hergestellt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran zweimal 5 min mit TBST gewaschen worden war, wurde diese mit dem sekundären Antikörper für 1,5 Stunden auf dem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Dann folgten erneut zwei Waschschriffe à 5 min mit TBST und ein Waschschriff für 5 min mit TBS. Schließlich wurde die Membran für mindestens 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet und die Signale anschließend mit einem Fluoreszenzbildgeber (Typhoon 9400) detektiert.

3.2.14 Immunzytochemie

Um die Lokalisation der IDH1 in der Zelle zu überprüfen, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Hierzu wurden die U87MG Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Die in Ethanol gelagerten Deckgläser wurden durch Abflämmen sterilisiert und anschließend in eine 24-Well Platte gelegt. Hier wurden diese dann dreimal mit PBS gewaschen und 250 µl Zellmedium wurde vorgelegt. Es wurden ca. 60.000 Zellen pro Deckglas verwendet, um eine Konfluenz von 70 % zu erreichen. Die 24-Well Platte wurde über Nacht bei 37 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Medium verworfen und die Deckgläser wurden für eine Minute mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zur Fixierung mit 4 %iger Paraformaldehydlösung in PBS unter dem Abzug für 15 min inkubiert. Es folgten zwei fünfminütige Waschschriffe mit PBS. Daraufhin wurde für 15 min eine Lösung aus 10 % FCS

und 0,6 % TritonX-100 auf die Zellen geben, um freie Bindungsstellen zu blockieren und die Membran zu permeabilisieren. Der entsprechende Primärantikörper wurde in 200 µl PBS verdünnt und die Zellen wurden mit diesem über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschriffe mit PBS und anschließend wurden die Deckgläser mit Eindeckel-Medium mit DAPI auf einen Objektträger aufgebracht. Die Deckgläser wurden mit Klarlack fixiert und dunkel gelagert.

3.2.15 Konfokal Mikroskopie

Die Aufnahmen der immunzytochemischen Färbungen wurden am *Center for advanced imaging (Cai)* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem inversen konfokalen Laserscanning-System LSM 710 (Zeiss) erstellt. Die Aufnahmen wurden in einem Mehrspurmodus nach Anregung der Fluorophore durch einen Argon- ($\lambda = 488$ nm), einen Helium-Neon- ($\lambda = 555$ nm) und einen blauen Diodenlaser ($\lambda = 405$ nm) unter Verwendung des 63x Objektivs aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software ZEN 2011.

3.2.16 Metabolitenanalyse

Die Metabolitenanalyse wurde am Institut für Biochemie der Pflanzen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Dr. Tabea Mettler-Altman durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben auf die Messung wurde von Miriam Knühmann im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf vorgenommen. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin von der Petrischale gelöst, in ein 15 ml Gefäß überführt und bei 800 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 4 °C kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet wurde in 2,5 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Daraufhin wurden 1×10^6 Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 2.000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml einer 1:2,5:1 Mischung aus H₂O, Methanol und CHCl₃ gelöst und Ribitol (interne Kontrolle für die spätere Metabolitenmessung) wurde im Verhältnis 1:1.000 hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 4 °C rotierend inkubiert und für 5 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die Metabolitenanalyse wurde mittels einem an eine Gaschromatographie gekoppeltem TOF Massenspektrometers durchgeführt. Für die relative Quantifizierung der

Metabolite wurden deren Signalintensität auf die Signalintensität der internen Kontrolle Ribitol normalisiert.

3.2.17 LC-MS/MS-Analysen

3.2.17.1 Probenvorbereitung für die LC-MS/MS-Analyse

Die Proben für die LC-MS/MS-Analyse wurden zunächst über kurzes Einlaufen in ein SDS-Gel aufkonzentriert. Anschließend wurde dieses Gel mit Silbernitrat gefärbt und die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Verdauröhrchen überführt. Um die Gelstücke zu entfärben, wurden die Entfärbelösungen A und B im Verhältnis 1:1 kurz auf die Probe gegeben. Anschließend wurden die Banden je dreimal mit Waschlösung A und B im Wechsel für 5 min inkubiert. Als nächstes wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, um anschließend 10 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 auf die Proben zu geben und diese bei 56 °C für 45 min zu inkubieren. Daraufhin wurde die überschüssige Lösung abgenommen, zügig 55 mM Iodacetamid in 50 mM NH_4HCO_3 hinzugegeben und die Proben für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgten erneut je zwei alternierende Waschschrte mit Waschlösung A und B gefolgt von erneutem Trocknen der Banden in der Vakuumzentrifuge. Daraufhin konnten die Gelstücke bei -20 °C gelagert werden oder direkt tryptisch verdaut werden. Hierzu wurde eine 0,033 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konzentrierte Trypsinlösung erstellt und von dieser je 6 μl auf die Banden gegeben. Anschließend wurden die Verdauröhrchen verschlossen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Peptide dann aus den Gelstücken extrahiert werden. Hierzu wurde so viel Extraktionslösung auf die Banden gegeben, bis diese vollständig bedeckt waren. Anschließend wurden die Proben für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt und der Überstand wurde in ein HPLC-Probengefäß überführt. Daraufhin wurde erneut Extraktionslösung auf die Gelstücke gegeben, die Proben sonifiziert und der Überstand wurde mit dem vorherigen vereint. Dann wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge getrocknet und konnten entweder für die LC-MS/MS-Analyse in 0,1 % TFA aufgenommen oder bei -20 °C gelagert werden.

3.2.17.2 Massenspektrometrie

Die, wie oben beschrieben, prozessierten Proben wurden mittels Massenspektrometrie analysiert. Hierbei wurde der *Bottom-up* Ansatz verwendet, bei welchem die Proteine anhand ihrer Peptide mittels eines Datenbankabgleichs identifiziert werden. Da es sich um komplexe Peptidgemische handelt, ist dem Massenspektrometer eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorgeschaltet. Nach der LC-MS/MS-

Analyse wurden die verschiedenen Probengruppen durch eine markierungsfreie Quantifizierung weiter untersucht.

3.2.17.3 Flüssigkeitschromatographie

Für die Auftrennung der Peptidgemische wurde ein *Ultimate 3000* Flüssigkeitschromatographie System (Dionex/Thermo Fisher Scientific) verwendet. Über den *Autosampler* wurden 15 µl der Probe aufgenommen und auf die Vorsäule (Acclaim PepMap C18, 100 µm Innendurchmesser, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 2 cm Länge) aufgespült, um bereits eine Vortrennung zu erreichen und mögliche Verschmutzungen der Probe zu entfernen. Anschließend wurde die Probe auf die analytische Hauptsäule (Acclaim PepMap C18, 75 µm Innendurchmesser, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 25 cm Länge) überführt. Die Dauer des Gradienten wurde anhand der Komplexität der Probe bestimmt. Für weniger komplexe Proben wurde ein 60 min Gradient verwendet und für komplexe Peptidgemische ein 120 min Gradient. Auf diesen Gradient folgt jeweils ein Spül- und Equilibrierungsschritt von 60 min. In Tabelle 2 und Tabelle 3 sind die einzelnen Schritte der verwendeten Gradienten dargestellt. Anschließend wurden die Proben über eine Nanoelektrospray-Ionisationsquelle in das Massenspektrometer eingebracht.

Tabelle 2: Teilschritte des 60-minütigen HPLC-Gradienten

Zeit [min]	Anteil an B [%]	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]	Schritt
0-10	4	0,3	Beladen der Vorsäule
10-12	4-10	0,3	Beladen der analytischen Säule
12-65	10-40	0,3	Linearer Gradient
65-69	95	0,3	Spülen und Equilibrieren
69,5-70	4	0,3	
71-75	95	0,4	
75,5-80	4	0,4	
81-85	50	0,4	
85,5-90	96	0,4	
95,5-120	4	0,4	

Tabelle 3: Teilschritte des 120-minütigen HPLC-Gradienten

Zeit [min]	Anteil an B [%]	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]	Schritt
0-15	4	0,3	Beladen der Vorsäule
15-78	10-20	0,3	Beladen der analytischen Säule
78-130	20-40	0,3	Linearer Gradient
130-137	95	0,3	Spülen und Equilibrieren
141-145	50	0,4	
145,5-150	96	0,4	
150,5-153	4	0,4	
153-158	96	0,4	
158,5-180	4	0,4	

3.2.17.4 Massenspektrometrische Analyse

Für die Analyse der Peptidgemische wurden zwei Massenspektrometer verwendet: Die Orbitrap Elite, ein Hybrid Ionenfallen-Orbitrap Massenspektrometer und die Q Exactive Plus, ein Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer. Beide Geräte operierten im positiven Modus, wurden mit einer nano-ESI-Quelle ausgestattet und online mit einem nano HPLC-System gekoppelt. Die verwendeten Parameter beider Massenspektrometer sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Massenspektrometrische Parameter für die MS/MS-Analysen mit der Orbitrap Elite bzw. der Q Exactive Plus

Parameter	Orbitrap Elite	Q Exactive Plus
Spray Spannung	1,4 kV	1,4 kV
Temperatur des <i>ion transfer tube</i>	275 °C	250 °C
Druck des Kollisionsgases (Helium)	1.3 mTorr	-
Normalisierte Kollisionsenergie	35 %	30 %
MS Scan Bereich	350-1.700 m/z	250-2.000 m/z
MS Auflösung	60.000	70.000
Breite des Isolationsfensters für MS/MS	2 m/z	2 m/z
MS/MS Scan Bereich	150-2.000 m/z	200-2.000 m/z
MS/MS Scantyp/Auflösung	normal	17.500
Schwellenwert der Intensität für die MS/MS Auswahl	500 <i>counts</i>	0
Ausschlusszeit eines Ions nach Aufnahme eines MS/MS-Spektrums	45 s	10 s
Fragmentierungsmethode	CID	HCD

In beiden Fällen wurde ein Top 20 datenabhängiger Modus verwendet und Ionen mit einfacher und höher als dreifacher Ladung wurden von der Fragmentierung ausgeschlossen. Bei dieser Methode werden die 20 intensivsten Signale im Übersichtsscan ausgewählt, isoliert und erneut fragmentiert.

3.2.17.5 Bioinformatrische Datenanalyse

Je nach Probenart, Aufbereitung und Komplexität wurden verschiedene Arten der Datenanalyse verwendet.

3.2.17.5.1 Auswertung der Gesamtproteomanalysen

Die Identifizierung der Proteine wurde mittels Proteome Discoverer 1.4.1.14 (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung des Mascot Algorithmus (Matrix Science, Version 2.41) gegen die UniProtKB/SwissProt humane Datenbank (20.255 Sequenzen, Datum 09/2015) durchgeführt. Hierzu wurden folgende Parameter verwendet: Protease: Trypsin; maximal zwei überlesene Schnittstellen; Taxonomie: homo sapiens; 10 ppm Vorläuferion-

Massentoleranz; 0,4 bzw. 0,01 Da Fragment-Massentoleranz; variable Modifikationen: Oxidation von Methionin; feste Modifikationen: Carbamidomethylierung an Cystein. Die *false discovery rate* (FDR) wurde auf 1 % ($p \leq 0.01$) gesetzt. Konnten identifizierte Peptide mehreren Proteinen zugeordnet werden, wurden diese in einer Proteingruppe zusammengefasst.

Für die Auswertung der Proteomstudien wurde die Software Progenesis QI *for proteomics* (nonlinear Dynamics) verwendet. Für die Quantifizierung wurden nur valide Peptide zugelassen. Die LC-MS/MS Daten wurden zunächst im *raw*-Format in die Progenesis Software eingeladen, anschließend wurde ein Referenzlauf ausgewählt. Dieser sollte ein möglichst gleichmäßiges, repräsentatives Peptidmuster aufweisen. Daraufhin glich die Software anhand dieses Referenzlaufs die anderen Läufe hinsichtlich der Retentionszeiten an. Dieser Vorgang wurde anschließend manuell überprüft und ggf. korrigiert. Bevor die Normalisierung und Quantifizierung stattfand, wurden die Bereiche der Läufe, in denen das Spülen und Equilibrieren der HPLC durchgeführt wurde, ausgeschlossen. Auch einfach geladene Ionen und Peptide, deren Identifizierung mit einem Massenfehler größer als 10 ppm erfolgte, wurden für die weitere Analyse nicht verwendet. Schließlich wurden die Proben anhand ihrer Zugehörigkeit in verschiedene Gruppen eingeteilt und die Resultate der Proteinidentifizierungen wurden importiert. Differenzielle Kandidatenproteine mussten mindestens einen p-Wert von 0,05 oder kleiner aufweisen und die Quantifizierung des Proteins musste auf mindestens zwei für das betreffende Protein spezifischen Peptiden beruhen.

3.2.17.5.2 Auswertung der Immunpräzipitationsexperimente

Für die Auswertung der Immunpräzipitationsexperimente wurde die Software MaxQuant (Cox und Mann, 2008) eingesetzt. Für die Identifizierung wurde eine humane UniProtKB/SwissProt Datenbank (Datum 03/2016) mit 20.198 Einträgen herangezogen und die Identifizierung erfolgte unter Verwendung des Andromeda Algorithmus. Zudem wurden die folgenden Parameter eingestellt: Protease: Trypsin; maximal zwei überlesene Schnittstellen; Taxonomie: homo sapiens; 10 ppm Vorläuferion-Massentoleranz; 0,4 bzw. 0,01 Da Fragment-Massentoleranz; variable Modifikationen: Oxidation von Methionin; feste Modifikationen: Carbamidomethylierung an Cystein. Für die markierungsfreie Quantifizierung wurde der Modus *match between runs* verwendet. Die FDR betrug sowohl auf Peptid- als auch auf Proteinebene 1 %. Zusätzlich wurden nur Proteine zugelassen, welchen mindestens zwei spezifische Peptide zugeordnet werden konnten. Die weitere

Analyse wurde mit der Perseus Software (Version 1.5.0.15) durchgeführt. Hier wurden zunächst alle Informationen aus der MaxQuant Software eingeladen und die Proteinidentifizierungen nach definierten Gütekriterien gefiltert. So wurden potenzielle Kontaminanten und Proteine, die nur modifiziert identifiziert wurden, entfernt. Anschließend wurde von den normalisierten Intensitäten der Logarithmus zur Basis zwei gebildet und die Proben entsprechend ihrer Zugehörigkeit gruppiert. Anschließend wurden alle Proteine entfernt, die nicht in mindestens einer Gruppe in allen Replikaten identifiziert worden waren. Die jetzt noch fehlenden Werte wurden imputiert, um im Folgenden eine statistische Analyse zu ermöglichen. Potenzielle Interaktionspartner wurden durch die Durchführung eines Zwei-Proben-T-Tests (FDR 0,05; S0 0,1; $p \leq 0,05$) identifiziert.

3.2.17.5.3 Anreicherungsanalysen

Um Proteinnetzwerke zu erstellen, sowie Informationen über mögliche Überrepräsentation bestimmter Zellkompartimente oder biologischer Prozesse in den jeweiligen Datensätzen zu erhalten, wurden unterschiedliche Strategien verwendet. Sowohl das Programm STRING (Snel *et al.*, 2000) als auch Cytoscape (Bindea *et al.*, 2009) wurden für die Erstellung von Proteinnetzwerken sowie die Annotierung von Proteinen mit ihren Ontologie-Begriffen eingesetzt. Zusätzlich wurde die Software FunRich (Pathan *et al.*, 2015) verwendet, um die Verteilung der Proteine über die unterschiedlichen Zellkompartimente zu visualisieren und weitere Anreicherungsanalysen durchzuführen.

4 Ergebnisse

4.1 Proteomische Untersuchung einer Gliomzelllinie in Bezug auf IDH1 und ihre Mutation

Die R132H Mutation der *IDH1* ist ein frühes Ereignis während der Tumorgenese von Gliomen. Zudem handelt es sich bei der Mutation um eine *gain-of-function* Mutation, welche zum Auftreten des neuen Metaboliten 2-HG führt. Aus diesen Gründen ist eine genauere Analyse des Enzyms in Abhängigkeit seiner Mutation, und deren Auswirkungen auf das Proteom, ein weiterer Schritt zum besseren Verständnis der Entstehung von Gliomen.

4.1.1 Expression der IDH1 in den U87MG Zelllinien

Für die funktionelle Untersuchung des pathogenen Effekts der *IDH1*-Mutation stellt das Fehlen einer entsprechenden Gliomzelllinie ein Hindernis dar (Piaskowski *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit unter anderem die Gliomzelllinie U87MG, welche HA-gekoppelte wild-typische oder mutierte *IDH1* überexprimiert, als Modell verwendet (transfiziert von Miriam Knühmann im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, siehe 3.2.1). Um die HA-IDH1 Expression in den Zellen zu überprüfen, wurde eine Immunfärbung durchgeführt (Abbildung 4). Zum einen wurde ein Antikörper gegen die gesamte IDH1 verwendet, welcher sowohl ein Signal in den Zellen zeigt, die wild-typische *IDH1* überexprimieren als auch in den Zellen, die mutierte *IDH1* überexprimieren. Zum anderen wurde ein spezifischer Antikörper gegen die R132H Mutation verwendet, hier zeigt sich ausschließlich in den IDH1 mutierten Zellen ein Signal bei 48 kDa. Insgesamt zeigt sich eine Überexpression beider Isoformen, welche für die weiteren Experimente wichtig ist.

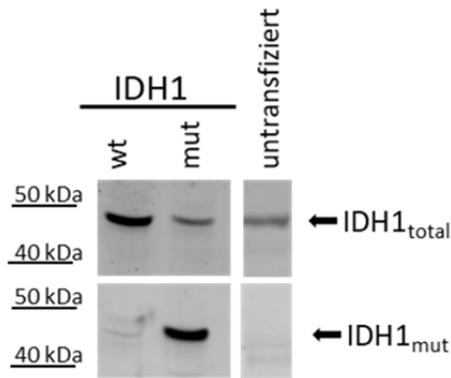


Abbildung 4: Immunfärbung von HA-IDH1 in U87MG Zelllysaten. Die Expression der gesamten IDH1 und der mutierten Form wurde durch Immunfärbungen überprüft (20 µg). Das Signal für die gesamte IDH1 zeigt sich in allen Proben bei 48 kDa. Die mutierte Form der IDH1 gibt nur in dem Lysat ein Signal, in welchem Zellen stabil mit mutierter IDH1 transfiziert wurden.

Die Mutation der IDH1 führt in der Zelle zu einer *gain-of-function* Mutation, wobei aus α -Ketoglutarat der neue Metabolit 2-Hydroxyglutarat entsteht, der in der Zelle akkumuliert. Um die funktionelle Aktivität der Mutation in den Zellen zu testen, wurde die relative Menge an 2-HG in den Zellen via GC-MS analysiert (Abbildung 5).

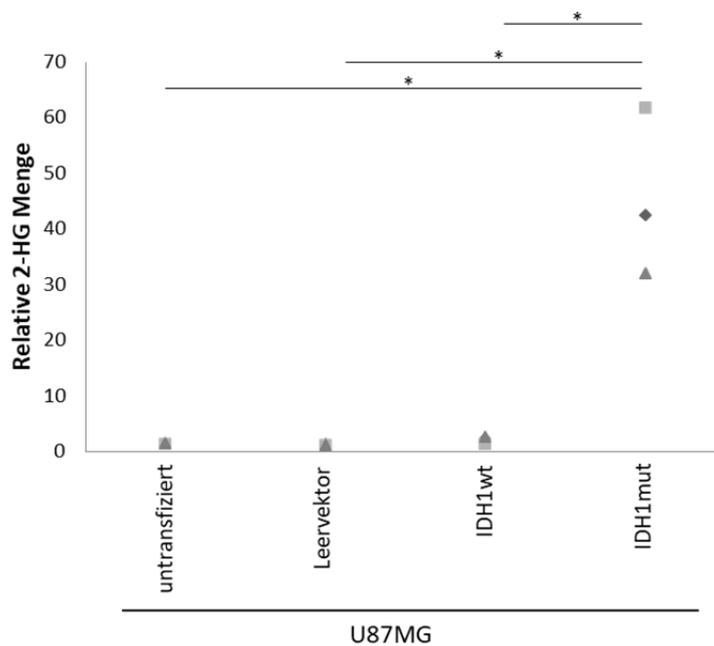


Abbildung 5: Messung der relativen 2-HG Menge. Die funktionelle Aktivität der HA-IDH1 Mutante wurde durch die Messung der relativen 2-HG Menge via GC-MS, in drei Replikaten (Quadrat, Raute, Dreieck), in den Zellen bestätigt (durchgeführt von Dr. Tabea Mettler-Altmann am Institut für Biochemie der Pflanzen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Es zeigt sich eine signifikant höhere Menge an 2-HG in den IDH1 mutierten Zellen.

Die Analyse der relativen Menge an 2-HG zeigt, dass diese in den Zellen mit *IDHI* Mutation signifikant erhöht ist und somit die, in die Zellen eingebrachte *IDHI*-Mutante, funktionell aktiv ist. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt nun ein Zellmodell vor, das für die weiteren geplanten Experimente eingesetzt werden kann.

Um den Einfluss der Mutation auf den Phänotyp der Zellen genauer zu betrachten, wurde die Zellmorphologie der untransfizierten Zellen und der Zellen, die *IDHI* Wild-Typ oder Mutante oder den Leervektor überexprimieren, verglichen (Abbildung 6).

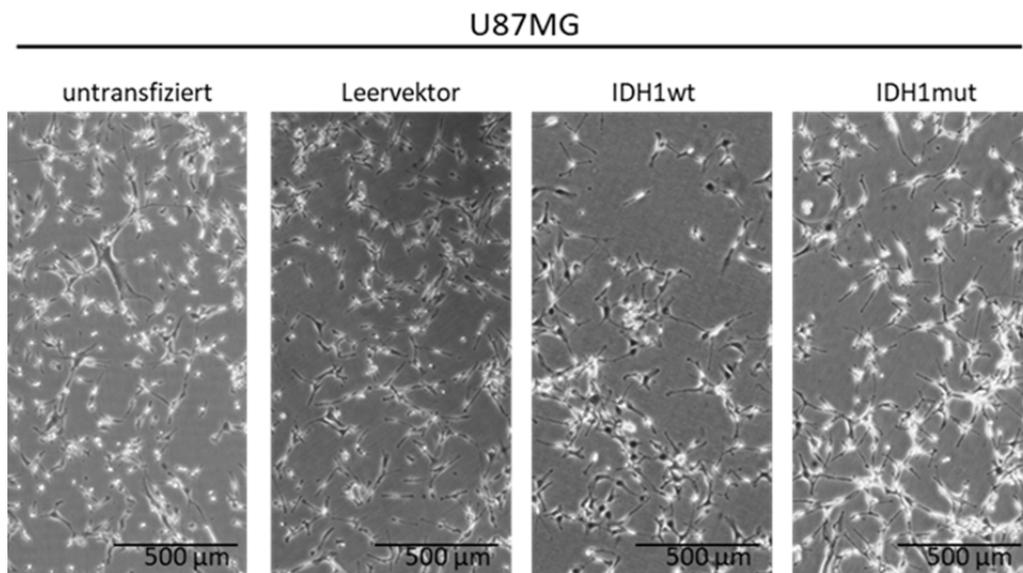


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahmen der unterschiedlich transfizierten U87MG Zelllinie. Die mikroskopischen Aufnahmen der untransfizierten U87MG Zellen und der drei stabil transfizierten Formen zeigen keinen phänotypischen Unterschied.

Ein Vergleich der Morphologie der Zellen mittels Lichtmikroskopie zeigt keinen phänotypischen Unterschied zwischen den HA-*IDHI* transfizierten und den untransfizierten Zellen, auch die eingebrachte Mutation scheint keinen Effekt auf den Phänotyp der Zellen zu haben. Auch dies unterstützt die Verwendung der Zellen als Modellsystem für die weiteren Analysen.

4.1.2 IDH1 und ihre posttranslationalen Modifikationen

Da posttranslationale Modifikationen (PTM) einen großen Einfluss auf die Funktion eines Proteins haben und eine Mutation möglicherweise einen Effekt auf das PTM-Muster eines Proteins ausüben kann, wurden neben der Untersuchung der Expression von wild-typischer und mutierter IDH1 und der Analyse der funktionellen Aktivität der IDH1-Mutante auch potenzielle PTM der IDH1 analysiert. Hierzu wurden die U87MG Zellen mit HA-gekoppelter wild-typischer oder mutierter *IDH1* verwendet, mit diesen wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt und sie wurden per LC-MS/MS analysiert. Im Anschluss wurde über den Mascot-Algorithmus sowohl nach Phosphorylierungen und Acetylierungen als auch nach Ubiquitinylierungen gesucht. In Abbildung 7 sind die identifizierten PTM der wild-typischen und mutierten IDH1 dargestellt.

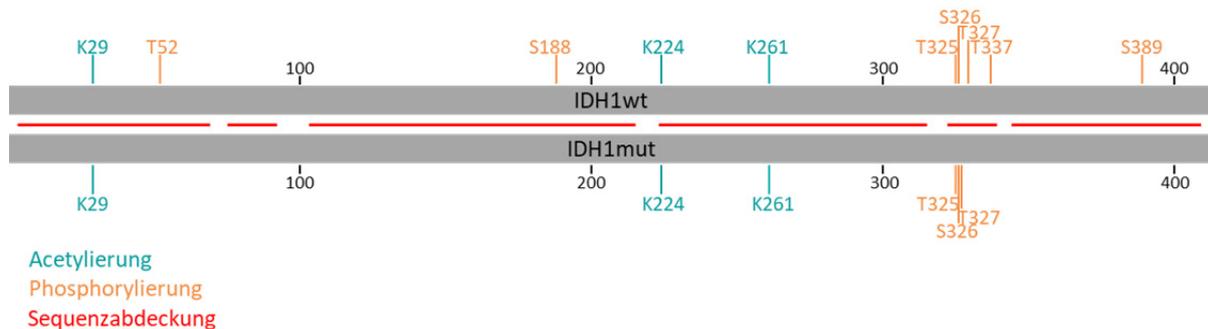


Abbildung 7: Identifizierte Phosphorylierungen und Acetylierungen an IDH1. Der obere graue Balken stellt die wild-typische IDH1 dar und der untere Balken die mutierte IDH1. In Grün sind identifizierte Acetylierungen gekennzeichnet und orange zeigt Phosphorylierungen an. In Rot ist die Sequenzabdeckung gezeigt.

Für die wild-typische IDH1 und die mutierte IDH1 konnten jeweils drei acetylierte Lysine identifiziert werden. Bei den Phosphorylierungen sind in einem Peptid bis zu vier Modifikationen identifiziert worden. Da sich hier die potenziell modifizierten Aminosäuren in unmittelbarer Nähe befinden (T325, S326, T327, T337), ist eine Aussage über die Position der Phosphorylierung nicht möglich. Exklusiv in der wild-typischen IDH1 konnten Phosphorylierungen an Threonin 52, Serin 188 und Serin 389 identifiziert werden. Für die mutierte IDH1 wurden keine exklusiven PTM detektiert. Zusätzlich zu Phosphorylierungen und Acetylierungen wurden ebenfalls Ubiquitinylierungen analysiert. In beiden Fällen konnten 17 potenziell ubiquitinylierte Aminosäuren identifiziert werden (Tabelle 6). Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Isoformen.

4.1.3 Charakterisierung des U87MG Proteoms

Um relevante biologische Prozesse und Proteine mit einer Verbindung zu IDH1 zu detektieren, welche über die Effekte von 2-HG hinausgehen, wurde die U87MG Zelllinie, welche entweder wild-typische oder mutierte HA-*IDH1* überexprimiert, in einem das gesamte Proteom umfassenden Ansatz analysiert.

Mögliche vorhandene Unterschiede in der Proteinexpression, welche durch die Mutation hervorgerufen werden könnten, wurden durch eine markierungsfreie Quantifizierung via LC-MS/MS untersucht. Insgesamt konnten 3.247 Proteine identifiziert und davon 2.020 quantifiziert werden. Für die Quantifizierung wurden nur Proteine zugelassen, die mindestens zwei, für das Protein spezifische, Peptide aufwiesen.

Für die generelle Betrachtung des U87MG Proteoms wurde das Verhältnis zwischen den *peptide spectrum matches* (PSMs) und der Anzahl der identifizierten Peptide für jedes Protein ermittelt. Aufgrund dieser Verhältnisse wurden die Proteine in drei Gruppen unterteilt: hochabundante Proteine (top 25 %), mittelabundante Proteine (die nächsten 50 %) und niedrigabundante Proteine (die letzten 25 %) (Abbildung 8). Es zeigte sich, dass viele der niedrigabundanten Proteine in die Regulierung der Translation oder RNA-Bindung involviert sind oder zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren gehören. Die Proteine mit mittlerer Abundanz sind hauptsächlich an Stoffwechselwegen, Metabolismus, der Synthese und dem Abbau von Proteinen beteiligt. Die dritte Proteingruppe, welche die höchste Abundanz im Proteom aufweist, besteht größtenteils aus zytoskelettalen und zellstabilisierenden Proteinen (Nagaraj *et al.*, 2011). HA-IDH1 befindet sich in der Gruppe der Proteine mit mittlerer Abundanz, was zu ihrer Funktion im Metabolismus der Zelle passt.

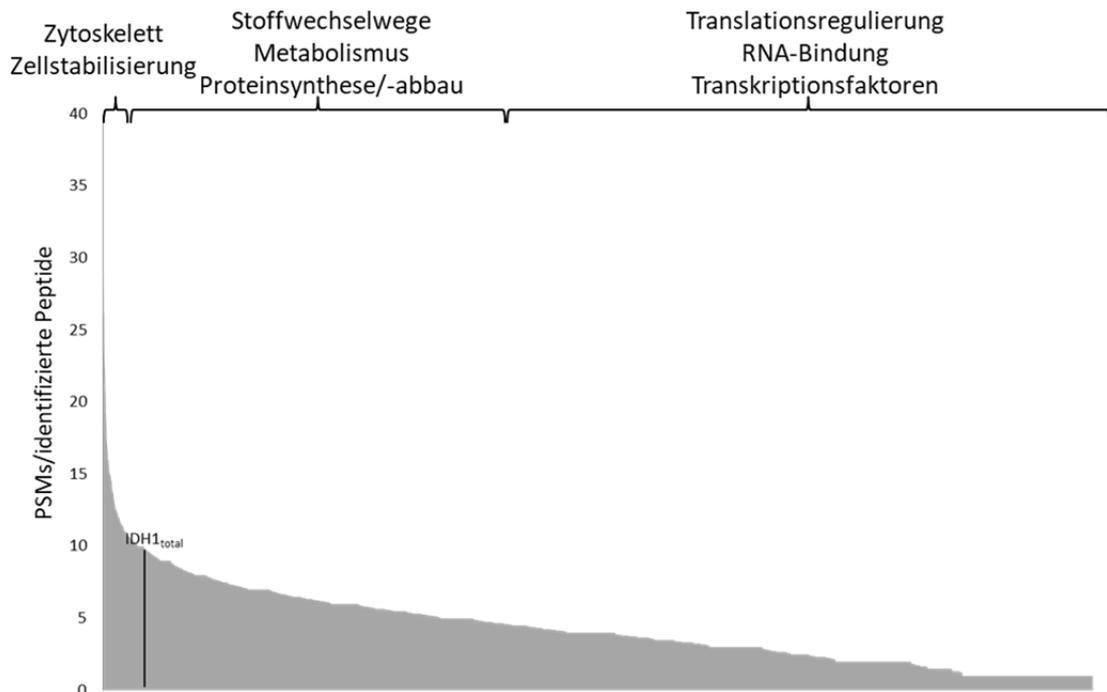


Abbildung 8: Unterteilung aller im U87MG Proteom quantifizierten Proteine. Das Diagramm zeigt das Verhältnis der *peptide spectrum matches* (PSMs) zu den identifizierten Peptiden aller Proteine, die über die LC-MS/MS Analyse der U87MG Zelllinie (HA-*IDH1* Wild-Typ oder Mutante überexprimierend) quantifiziert wurden. Der schwarze Balken zeigt das Verhältnis für HA-IDH1.

Des Weiteren zeigt eine Annotation der Proteine entsprechend ihrer Lokalisation in der Zelle, dass die identifizierten Proteine über viele zelluläre Kompartimente verteilt sind (Abbildung 9; Mehrfachnennungen möglich). Dem Zytoplasma sind 51,8 %, den Lysosomen 43,5 %, den Mitochondrien 17,4 %, der Membran 3,7 %, den Ribosomen 2,7 % und dem Nukleus 43,5 % der Proteine zugeordnet.

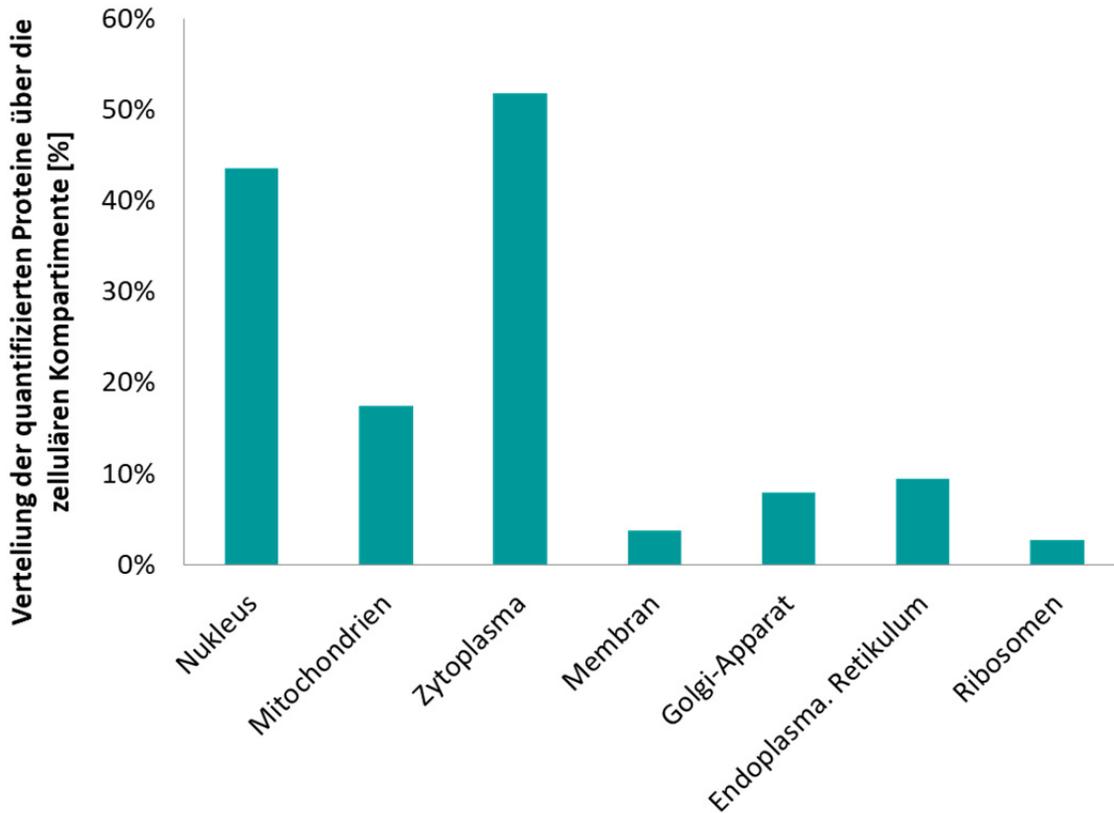


Abbildung 9: Verteilung der im U87MG quantifizierten Proteine über die zellulären Kompartimente. Das Balkendiagramm zeigt, zu welchem Anteil die Proteine den unterschiedlichen Kompartimenten zugeordnet werden können (Mehrfachnennung möglich). Die meisten Proteine sind mit 51,8 % im Zytoplasma lokalisiert, gefolgt vom Nucleus mit 43,5 %.

4.1.4 Differenzielle Analyse der U87MG Zelllinie

Es wurde eine differenzielle Studie zwischen den U87MG Zellen, welche die wild-typische bzw. die mutierte *HA-IDHI* überexprimieren, durchgeführt, um etwaige Unterschiede im Proteom der beiden Isoformen zu analysieren. Es wurden fünf Lysate jeder Isoform für die Analyse verwendet. Zur Veranschaulichung potenzieller Unterschiede in der Proteinexpression wurde ein hierarchisches Cluster der quantifizierten Proteine erstellt, wobei die Gruppierung vorab fixiert wurde (Abbildung 10). Die Analyse der Proteinabundanzen zeigt keine Abgrenzung zwischen den unterschiedlichen Isoformen im hierarchischen Cluster.

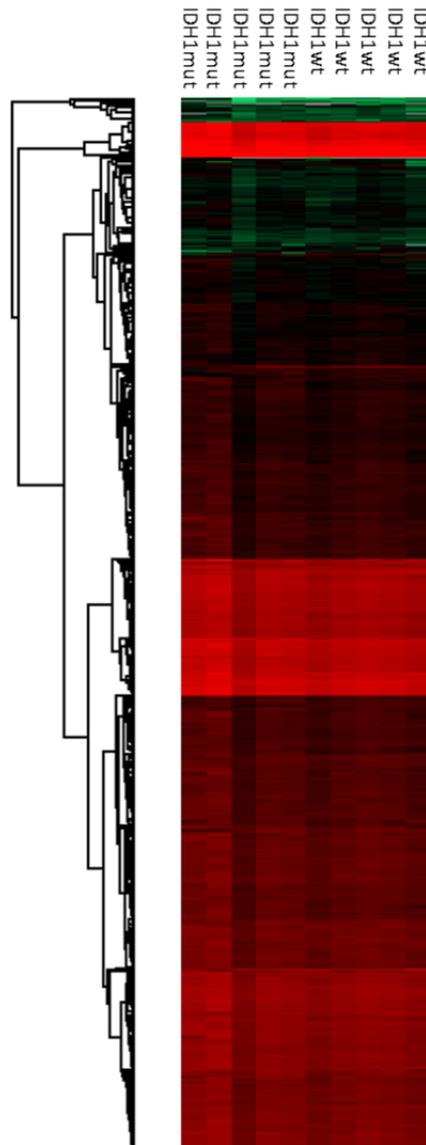


Abbildung 10: Hierarchisches Cluster der im U87MG Proteom quantifizierten Proteine. Für diese Darstellung wurde die Gruppierung der Proben vorgegeben (*semi-supervised*). Verwendet wurden die U87MG Zellen, welche entweder HA-*IDH1* Wild-Typ oder Mutante überexprimieren (n=5). Insgesamt konnten 3.247 Proteine identifiziert und 2.020 davon quantifiziert werden (mindestens zwei spezifische Peptide).

Anschließend wurde ein Zwei-Proben-T-Test ($p \leq 0,05$) zwischen den normalisierten Proteinabundanzanzen der U87MG Zellen, welche entweder die mutierte oder die wild-typische HA-*IDH1* überexprimieren, durchgeführt. Hier zeigten 101 Proteine eine differenzielle Expression in den HA-*IDH1* mutierten Zellen, wobei 99 hoch- und zwei herunterreguliert waren. Um weitere Hinweise auf möglicherweise veränderte Signalwege zu erhalten, wurde mit diesen 101 Proteinen ein Netzwerk mittels der STRING Software angefertigt. Für die Erstellung des Netzwerks wurden nur Interaktionen zugelassen, die auf experimentellen Daten

beruhen. Es wurde keine hohe Interaktionsdichte innerhalb der differentiellen Proteine detektiert. Weiterführende Anreicherungsanalysen des Netzwerks zeigten keine angereicherten biologischen Prozesse oder molekulare Funktionen. Dies führt zu dem Schluss, dass die Überexpression der mutierten *HA-IDH1* keine beträchtlichen Veränderungen in den Proteinabundanz der Gliomzelllinie hervorbringt.

4.2 Interaktionsanalysen der IDH1

Die Aufklärung von Interaktionspartnern erlaubt es neue Funktionszusammenhänge von Kandidatenproteinen aufzuklären. Durch die Analyse des Interaktoms der HA-IDH1 sollen Hinweise für die bisher nicht geklärten Funktionen der IDH1 bei der Tumorgenese gefunden werden.

Bislang sind nur wenige Interaktionspartner der IDH1 bekannt, die in unterschiedlichen Zelllinien in Hochdurchsatzexperimenten identifiziert wurden (Snel *et al.*, 2000), außerdem ist unklar, ob die Mutation einen Einfluss auf diese Interaktionen hat. Deshalb sollten in dieser Arbeit potenzielle Interaktionspartner von wild-typischer und mutierter HA-IDH1 untersucht werden.

4.2.1 Interaktionsstudien mit antikörperbasierten Immunpräzipitationen gegen IDH1

Zunächst wurde ein Ansatz verwendet, bei dem die Immunpräzipitation (IP) nach der Ernte und dem Lysieren der Zellen mit einem Antikörper gegen die gesamte IDH1 durchgeführt wurde. Hierbei bindet die IDH1 an einen, zuvor an magnetische Partikel gebundenen, Antikörper, die mit IDH1 interagierenden Proteine wurden so ebenfalls aufgereinigt und diese angereicherten Proben wurden anschließend per LC-MS/MS analysiert. Hierzu wurden U87MG Zellen verwendet, die *IDH1* Wild-Typ oder Mutante überexprimieren, wobei die *IDH1* jedoch keine HA-Kopplung trägt.

In Abbildung 11 sind die potenziellen Interaktionspartner der IDH1 in einem Volcano Plot dargestellt. Als Negativkontrolle und zur Detektion unspezifischer Bindungen wurde für diesen Ansatz eine IgG Antikörperkontroll-IP verwendet, da auch der für die IDH1 spezifische IP genutzte Antikörper auf einem IgG Antikörper basiert. Der Kontrollantikörper bindet kein spezifisches Protein, so dass eine, mit diesem Antikörper durchgeführte, Immunpräzipitation

somit unspezifische Bindungspartner, also Proteine, die mit dem Antikörper und nicht mit IDH1 interagieren, ausschließt.

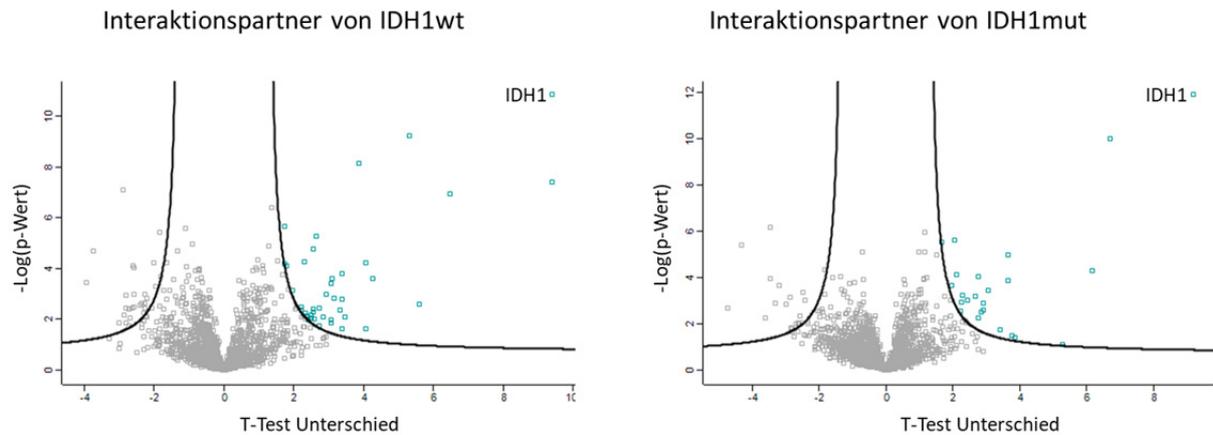


Abbildung 11: Potenzielle Interaktionspartner der IDH1. Nach der Zellernte wurde eine antikörperbasierte Immunpräzipitation gegen die gesamte IDH1 durchgeführt. Es wurden U87MG Zellen verwendet, die entweder die wild-typische oder mutierte *IDH1* überexprimieren. In Grün sind die potenziellen Interaktionspartner der IDH1 in beiden Diagrammen dargestellt.

Im linken Bereich des Diagramms sind diese, wahrscheinlich unspezifischen Bindungspartner, dargestellt. Auf der rechten Seite sind in Grün die möglichen Interaktoren gezeigt, mit diesem Ansatz konnten 67 potenzielle Interaktionspartner für wild-typische IDH1 und 28 für mutierte IDH1 gefunden werden ($p \leq 0,05$, $FDR < 0,05$). Während der Auswertung dieser Interaktionsstudien zeigte sich, dass durch die antikörperbasierte Immunpräzipitation in den IDH1 mutierten Zellen auch endogene, wild-typische IDH1 angereichert wurde, so dass sich eine Unterscheidung zwischen den Isoformen als schwierig darstellte.

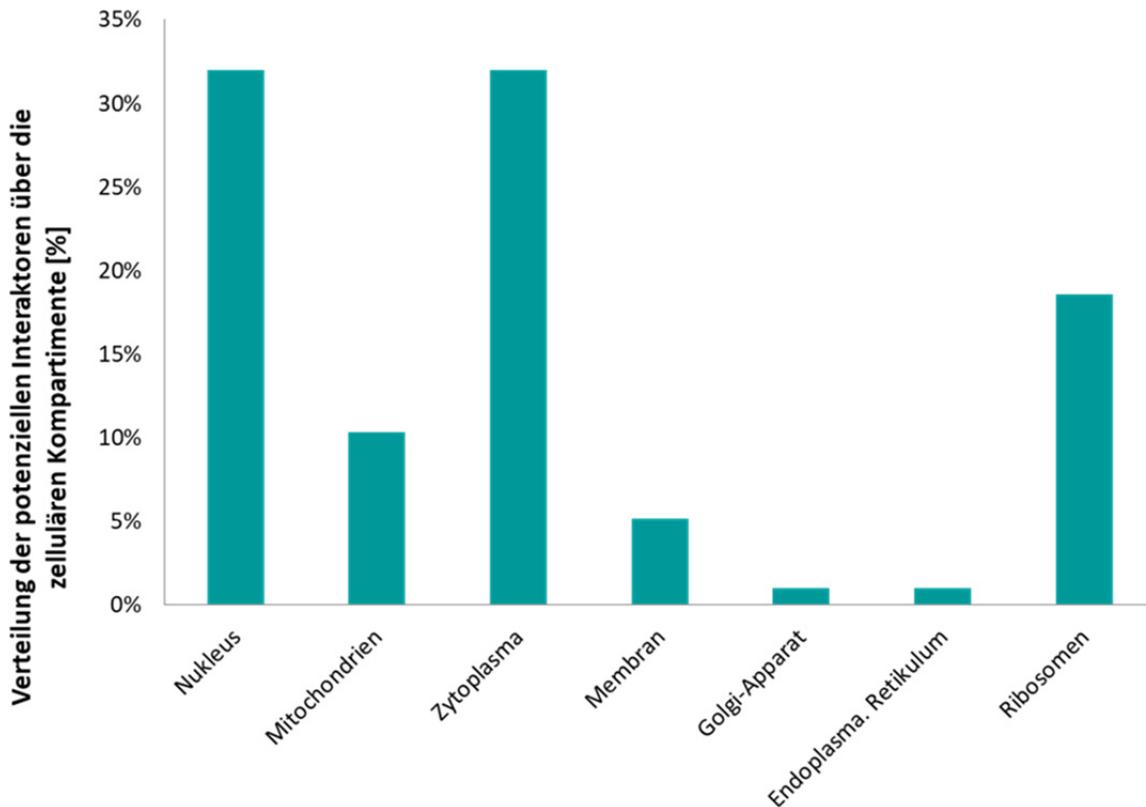


Abbildung 12: Verteilung der potenziellen Interaktoren der IDH1 über die zellulären Kompartimente. Das Balkendiagramm zeigt, zu welchem Anteil die identifizierten Interaktoren der wild-typischen und mutierten IDH1 den unterschiedlichen Kompartimenten zugeordnet werden können (Mehrfachnennung möglich). Die meisten Proteine wurden dem Zytoplasma und dem Nucleus zugeordnet.

Um die detektierten Interaktoren im zellulären Kontext einzuordnen, wurde die Verteilung der Kandidaten über die zellulären Kompartimente genauer betrachtet (Abbildung 12). Hierbei fiel auf, dass die potenziellen Interaktionspartner über viele Kompartimente verteilt sind. Beispielsweise sind sowohl bei der mutierten Form als auch bei der wild-typischen Form ca. 30 % dem Nucleus und ca. 5 % der Membran zugeordnet.

4.2.2 Zelluläre Lokalisation der IDH1

Da eine Vielzahl von nukleären Interaktionspartnern gefunden wurde, sollte untersucht werden, ob die Mutation eventuell einen Einfluss auf die bekannte zytoplasmatische Lokalisation der IDH1 (Geisbrecht und Gould, 1999) hat. Aus diesem Grund wurden Fluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen die gesamte IDH1 und spezifisch gegen die mutierte Form durchgeführt (Abbildung 13). Hierzu wurden die U87MG Zellen mit HA-gekoppelter wild-typischer oder mutierter *IDH1* verwendet. Die Färbungen zeigen bei beiden Isoformen ein deutliches Signal für IDH1 im Zytoplasma, somit muss davon ausgegangen

werden, dass es sich bei einigen identifizierten Interaktionspartnern, die in der lebenden Zelle nukleär lokalisiert sind, um artifizielle Bindungspartner handelt.

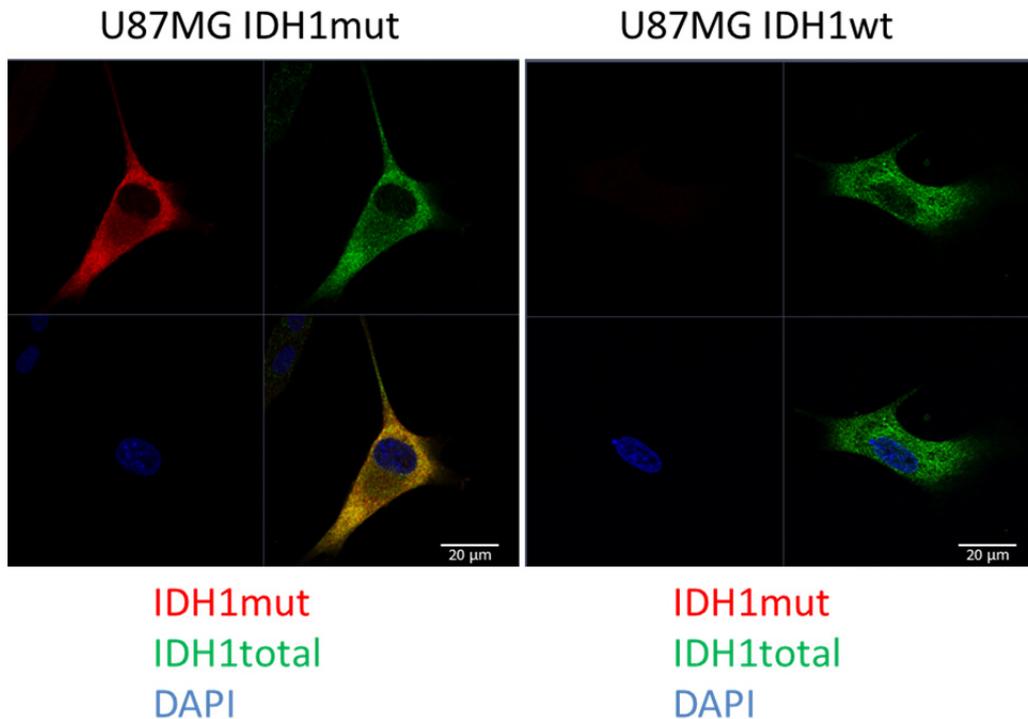


Abbildung 13: Lokalisation der IDH1 in der Zelle. Die mikroskopischen Aufnahmen von Fluoreszenzfärbungen gegen das gesamte IDH1 und deren mutierte Form in den U87MG Zellen, die entweder den *IDH1* Wild-Typ oder die Mutante überexprimieren, zeigen, dass IDH1 in beiden Fällen im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist. In Rot ist die mutierte IDH1 gefärbt, in Grün die wild-typische Form und in Blau wurde mit DAPI der Nukleus angefärbt.

4.2.3 Anreicherung der IDH1 durch Immunpräzipitation

Um die gezeigten Kontaminationen durch endogene IDH1 zu minimieren und somit eine spezifischere Immunpräzipitation durchführen zu können, wurden im weiteren Verlauf U87MG Zellen mit HA-gekoppelter *IDH1* Wild-Typ oder Mutante verwendet. Zur Überprüfung der Anreicherung der IDH1 in den unterschiedlichen U87MG Zellen und darauf basierend auch mit den verschiedenen Immunpräzipitationsmethoden wurden die *peptide spectrum matches* (PSMs) der IDH1 in den jeweiligen Lysaten mit den PSMs der IDH1 in den dazugehörigen IPs verglichen (Abbildung 14).

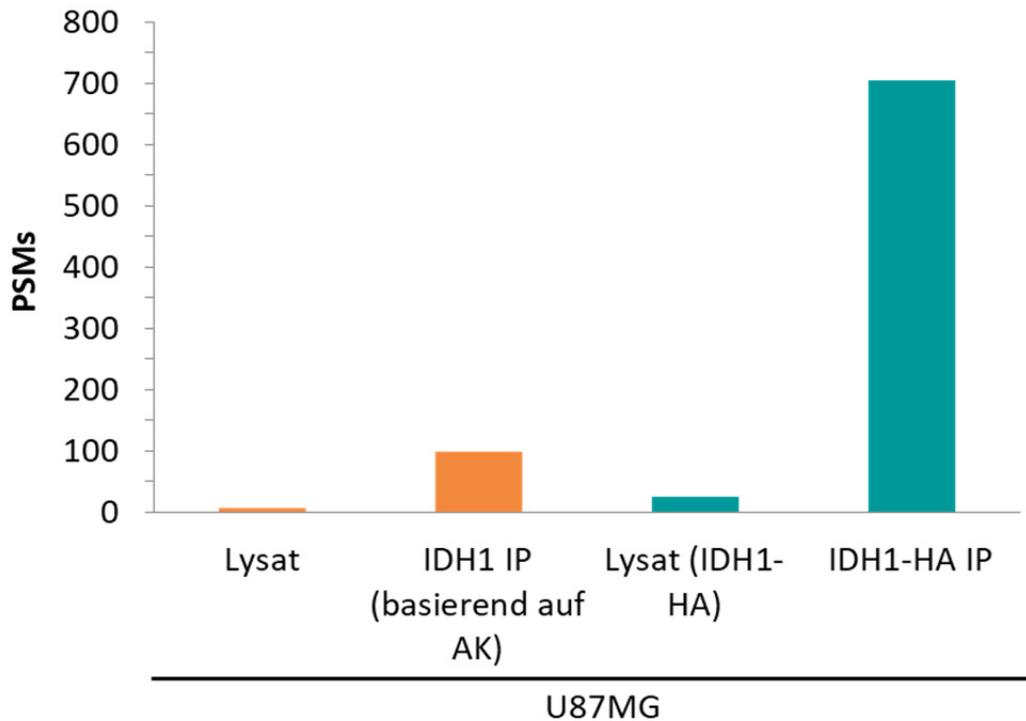


Abbildung 14: Anreicherung der IDH1 durch eine IP. Als Maß für die Quantität der Anreicherung zeigt das Diagramm die PSMS der IDH1 in unterschiedlichen Zelllysaten und den dazugehörigen Immunpräzipitationen. Vor dem Einbringen der HA-gekoppelten IDH1 zeigte sich eine 16-fache Anreicherung der IDH1 durch eine IP. Durch die Möglichkeit IDH1 über die HA-Kopplung zu isolieren, konnte eine 28-fache Anreicherung erreicht werden.

Die antikörperbasierte IP zeigt eine 16-fache Anreicherung der IDH1 gegenüber dem dazugehörigen Lysat. Wird die IP gegen die HA-gekoppelte IDH1 durchgeführt, erreicht man hingegen eine 28-fache Anreicherung im Vergleich zum Lysat. Somit kann mit dieser Methode nicht nur eine höhere Anreicherung erzielt werden, sondern sie gewährleistet auch, dass in den IDH1 mutierten Zellen nur diese angereichert wird und nicht zusätzlich die wildtypische IDH1, die ebenfalls endogen in den Zellen vorliegt.

4.2.4 Charakterisierung der IDH1 Interaktoren unter Vermeidung unspezifischer Bindungen

Da die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, dass unspezifische Bindungen mit Proteinen aus anderen zellulären Kompartimenten während der IP auftreten, wurden zwei unterschiedliche Methoden etabliert, um diese zu minimieren: subzelluläre Fraktionierung und Formaldehyd-*Crosslinking*.

Für die subzelluläre Fraktionierung wurden aus den Zellen direkt nach der Ernte durch sukzessive Lyse und verschiedene Zentrifugationsschritte eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion isoliert. Um den Erfolg der Fraktionierung zu überprüfen, wurden Immunfärbungen gegen zwei Markerproteine für die unterschiedlichen Kompartimente durchgeführt (Abbildung 15).

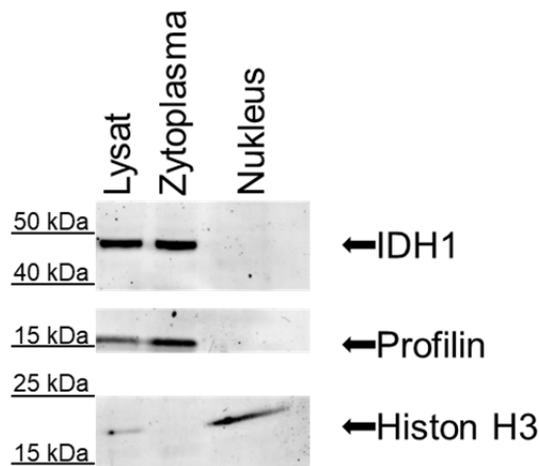


Abbildung 15: Immunfärbung gegen IDH1, Histon und Profilin nach Fraktionierung. Nach der Zellernte wurde eine Fraktionierung in Zytoplasma und Nukleus durchgeführt. Um die Fraktionierung zu bestätigen, wurden Immunfärbungen gegen Profilin, als Marker für das Zytoplasma, und Histon H3, als Marker für die nukleäre Fraktion, durchgeführt. Außerdem wurde ebenfalls ein Antikörper gegen IDH1 verwendet. Hier zeigte sich ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion ein Signal.

Als Marker für das Zytoplasma wurde Profilin verwendet, es zeigte sich ein deutliches Signal im Lysat und in der zytoplasmatischen Fraktion. Das Signal für das Histon H3 ist hingegen nur im Lysat und in der nukleären Fraktion sichtbar. Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen IDH1 verwendet, um erneut die Lokalisation zu überprüfen und auch hier ist ausschließlich im Lysat und im Zytoplasma ein Signal zu sehen. Darüber hinaus wurden die generierten Fraktionen mittels LC-MS/MS analysiert (Abbildung 16).

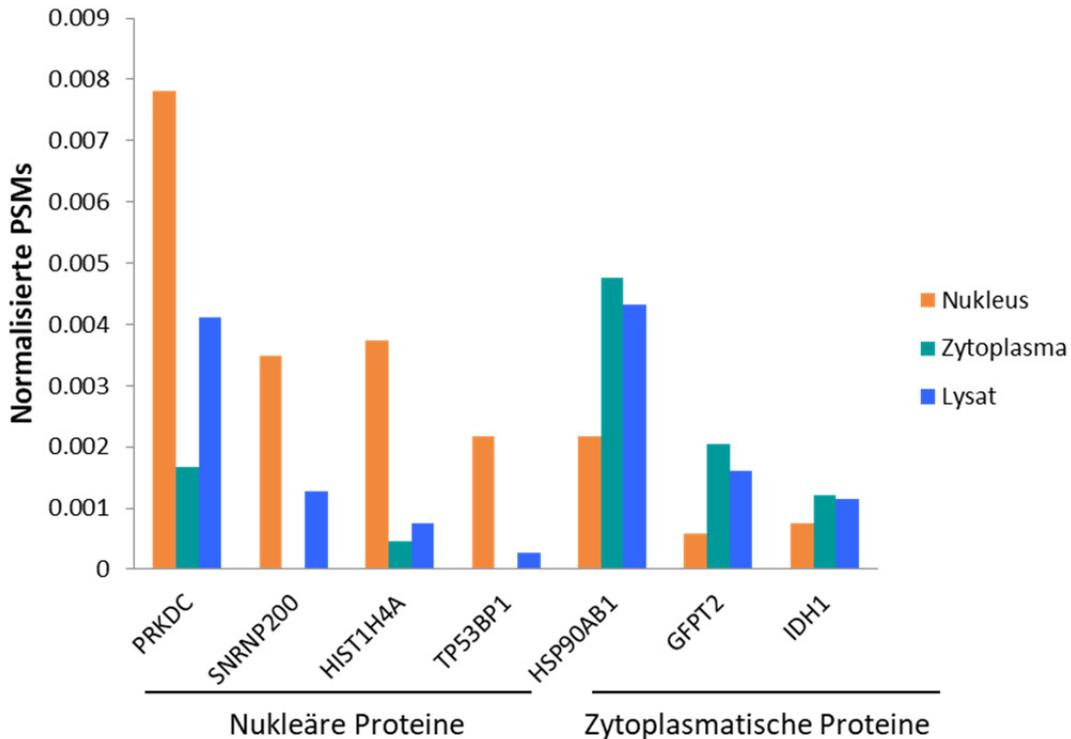


Abbildung 16: Analyse der Fraktionierung mittels LC-MS/MS. Um die Fraktionierung in zytoplasmatische und nukleäre Fraktion, welche direkt nach der Zellernte durchgeführt wurde, zu analysieren, wurden die PSMs, auf die Gesamtheit dieser normalisiert, von unterschiedlichen entweder nukleär oder zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen aufgetragen. Es zeigte sich eine deutliche Abreicherung der nukleären Proteine in der zytoplasmatischen Fraktion.

Hier wurden, nach LC-MS/MS Messungen der Fraktionen und des Volllysats, verschiedene, exemplarische nukleäre und zytoplasmatische Proteine ausgewählt. Anschließend konnten deren PSMs, als Hinweis auf deren Abundanz, in den unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu gewährleisten, wurden die jeweiligen PSMs auf die Gesamtzahl der PSMs in jeder Fraktion normalisiert. Die nukleären Proteine sind, im Vergleich zur nukleären Fraktion, im Zytoplasma deutlich abgereichert. Im Gegensatz dazu zeigen IDH1 und die anderen zytoplasmatischen Markerproteine über die Fraktionen ein anderes Abundanzprofil. Hier ist eine Abreicherung in der nukleären Fraktion sichtbar und das höchste Signal zeigt sich im Zytoplasma. Mittels Fraktionierung konnte somit eine deutliche Abreicherung der Kernproteine erzielt werden, so dass bei der Durchführung der IP gegen IDH1 in der zytoplasmatischen Fraktion artifizielle Bindungen weitgehend vermieden werden können.

Eine weitere Methode zur Reduktion der unspezifischen Bindungspartner aus anderen Zellkompartimenten ist das *FA-Crosslinking*. Für dieses Experiment wurden die U87MG

Zellen vor dem Ernten mit 2,5 % Formaldehyd quervernetzt, um anschließend eine IP gegen die HA-gekoppelte IDH1 durchzuführen (n=3). Zur Kontrolle des FA-Crosslinking wurden die Proben, nach der experimentellen Durchführung, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Silbernitrat gefärbt (Abbildung 17). Hier ist eine deutliche Signalsteigerung der Färbung zu erkennen, wenn die Proben vor der Zellernte mit 2,5 % Formaldehyd quervernetzt wurden. Außerdem zeigt sich in der Leervektor-Kontrolle ein deutlich schwächeres Signal im Vergleich zu den Proben, in denen IDH1 mittels der HA-Kopplung angereichert wurde.

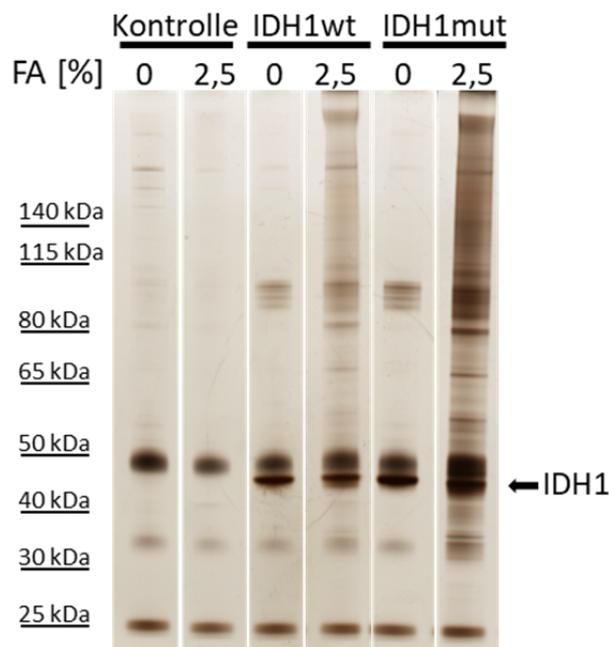


Abbildung 17: Kontrolle des Formaldehyd-Crosslinkings. Nach dem *Crosslinken* der Zellen mit 2,5 % Formaldehyd (FA), wurden die Zellen geerntet und eine IP gegen die HA-gekoppelte IDH1 wurde durchgeführt. Mit den Proben wurde anschließend eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel mit Silbernitrat gefärbt. Es zeigen sich deutlich stärkere Signale in den mit 2,5 % FA quervernetzten Proben.

Um zu überprüfen, ob durch die Verwendung der neu etablierten Methoden, subzelluläre Fraktionierung und FA-Crosslinking, eine Reduktion der potenziell artifiziellen Interaktoren stattgefunden hat, wurde die Verteilung der signifikanten Interaktoren der IDH1 hinsichtlich ihrer zellulären Kompartimente analysiert (Abbildung 18).

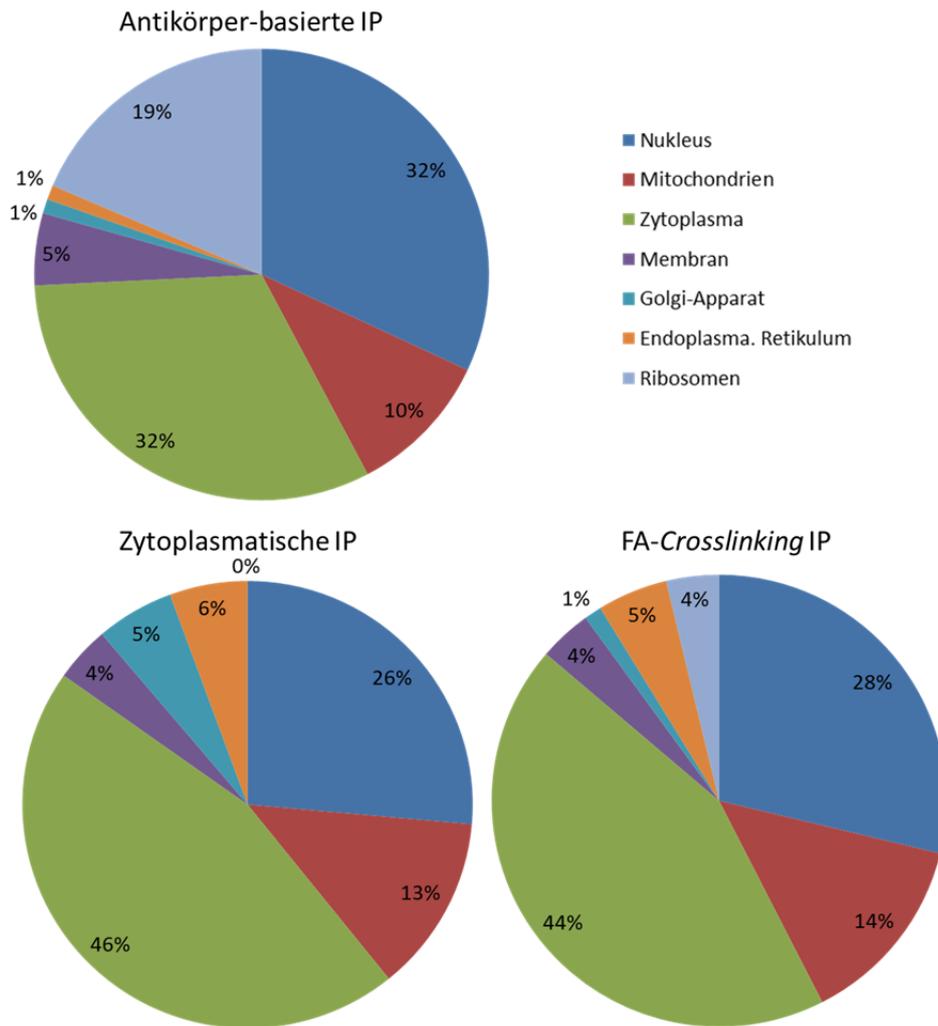


Abbildung 18: Verteilung der potenziellen Interaktoren der IDH1 über die zellulären Kompartimente. Die Tortendiagramme zeigen, zu welchem Anteil die identifizierten Interaktoren der wild-typischen und mutierten IDH1, aus den unterschiedlich durchgeführten Interaktionsstudien, den verschiedenen Kompartimenten zugeordnet werden können (Mehrfachnennung möglich).

Die Analyse zeigt, dass sowohl die subzelluläre Fraktionierung als auch das *FA-Crosslinking* zu einer deutlichen Abnahme nicht zytoplasmatisch lokalisierter Proteine führen (bis zu 30 %). Dennoch können nach wie vor ca. 50 Proteine anderen Kompartimenten zugeordnet werden, dies kann weitgehend durch die mehrfache Zuordnung der Proteine zu unterschiedlichen Kompartimenten erklärt werden.

Da sich beide Ansätze als valide Methoden zur Reduktion von nicht zytoplasmatischen Proteinen herausstellten, das *FA-Crosslinking* allerdings zu vermehrtem Zellsterben führte und die subzelluläre Fraktionierung eine höhere methodische Reproduzierbarkeit aufwies, wurden die weiteren Analysen der potenziellen Interaktoren der IDH1 mit dem Ansatz der

subzellulären Fraktionierung mit anschließender Immunpräzipitation gegen die HA-gekoppelte IDH1 durchgeführt.

4.2.5 Interaktionsstudien der HA-gekoppelten IDH1 nach Durchführung einer subzellulären Fraktionierung

Ziel der Identifizierung neuer Interaktionspartner der IDH1 ist es neue Funktionszusammenhänge, auf welche IDH1 Einfluss nimmt, aufzuklären. Hierfür wurden subzelluläre Fraktionierungsexperimente, unter Verwendung der U87MG Zellen mit HA-gekoppelter wild-typischer oder mutierter *IDH1* bzw. U87MG Zellen, welche den Leervektor überexprimieren, mit anschließender IP gegen die HA-gekoppelte IDH1 durchgeführt. Insgesamt konnten mit diesem Fraktionierungsansatz 3.674 Proteine identifiziert und 2.550 quantifiziert werden.

Unspezifische Bindungen, wie Proteine, die mit der HA-Kopplung, dem Antikörper oder dem Vektor interagieren, sind aus Immunpräzipitationsexperimenten hinlänglich bekannt (Mellacheruvu *et al.*, 2013). Um spezifisch bindende Proteine zu selektieren, wurde zunächst ein Zwei-Proben-T-Test ($p \leq 0,05$, FDR $< 0,05$) zwischen den IDH1 wild-typischen oder mutierten Proben und der Leervektor-Kontrolle durchgeführt (Abbildung 19). Hierbei wurden ca. 16 % der quantifizierten Proteine als unspezifische Bindungspartner identifiziert. Viele dieser Proteine sind in den Ribosomen lokalisiert und an der RNA-Bindung beteiligt.

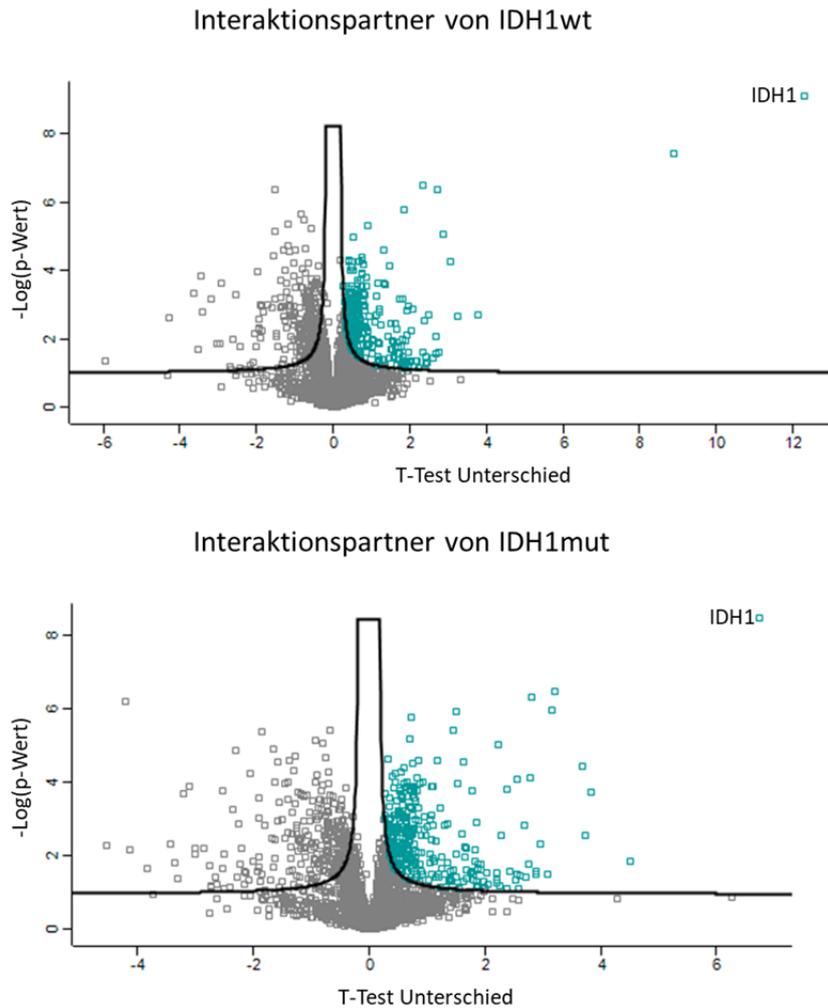


Abbildung 19: Potenzielle Interaktionspartner der HA-IDH1. Nach der Zellernte wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit anschließender IP gegen die HA-gekoppelte IDH1 durchgeführt. Als Kontrolle wurden U87MG Zellen verwendet, die einen HA-gekoppelten Leervektor tragen. In Grün sind die potenziellen Interaktionspartner der IDH1 in beiden Diagrammen dargestellt.

Um zu evaluieren, ob IDH1 noch in weiteren als den bereits bekannten funktionellen Zusammenhängen involviert ist, wurde zunächst das Interaktom über beide Isoformen erstellt und analysiert. Hierzu wurde mittels der STRING Software ein Netzwerk dieser 470 potenziellen Interaktoren der IDH1 angefertigt (Abbildung 20). Für die Erstellung des Netzwerks wurden nur Interaktionen zugelassen, die auf experimentellen Daten beruhen.

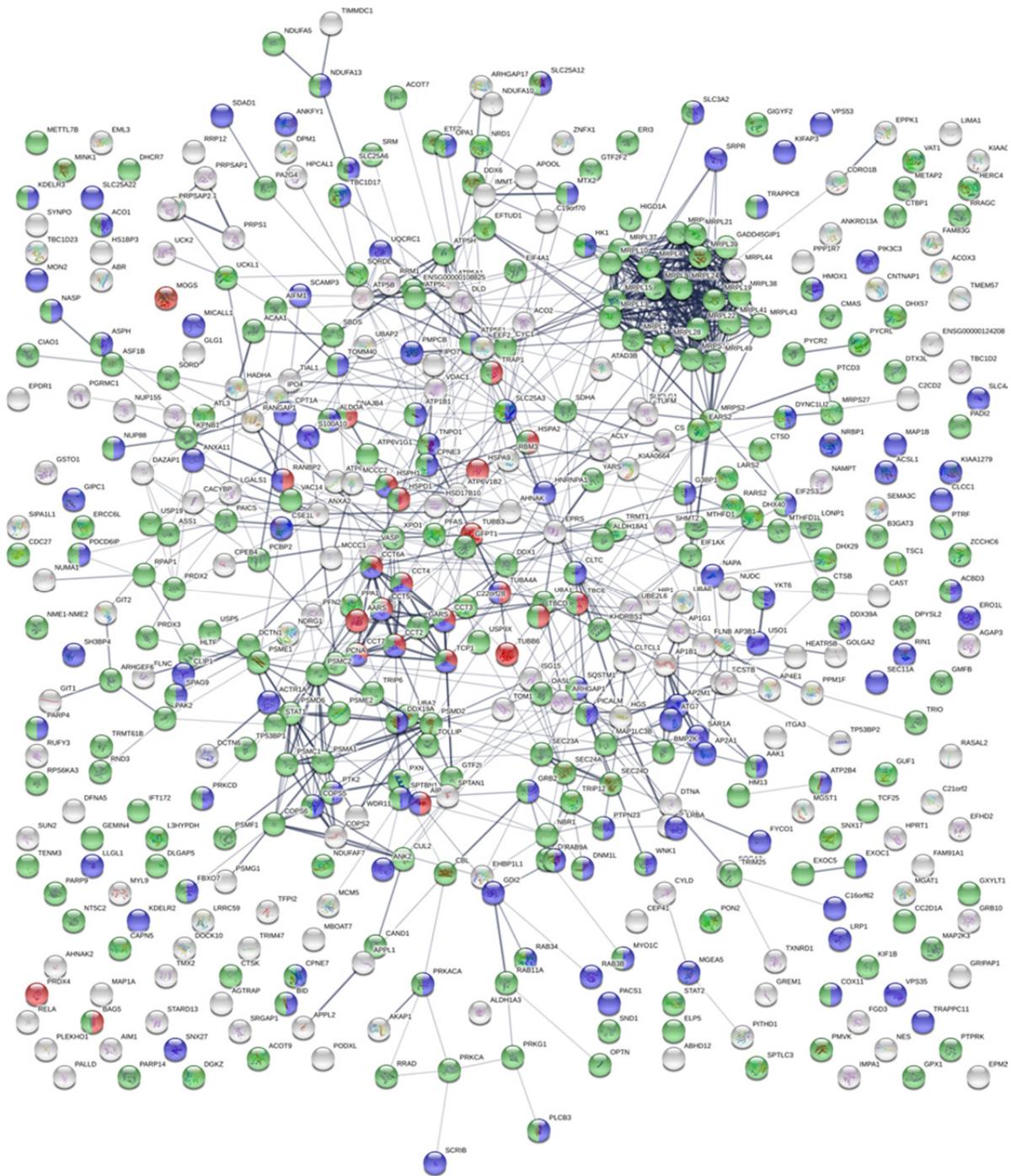


Abbildung 20 Netzwerk der potenziellen Interaktoren der HA-IDH1. Nach der Durchführung eines Zwei-Proben-T-Tests ($p \leq 0,05$) zwischen den U87MG Zellen, die HA-IDH1 exprimieren und den Leervektor-tragenden Zellen, zeigten diese 470 Proteine eine signifikante Interaktion mit IDH1. Das Netzwerk wurde mittels der STRING Software erstellt. In Blau sind Proteine, die am Proteintransport beteiligt sind markiert, in Grün metabolische Proteine und in Rot an der Proteinfaltung beteiligte Proteine.

Eine Anreicherungsanalyse der Proteine in Hinsicht auf deren Beteiligung an biologischen Prozessen zeigte, dass Prozesse wie Metabolismus, Transport, Stoffwechsel oder Proteinmetabolismus angereichert sind (Abbildung 21). Die Beteiligung an diesen Prozessen ist typisch für den Lebenszyklus eines Proteins (Jovanovic *et al.*, 2015).

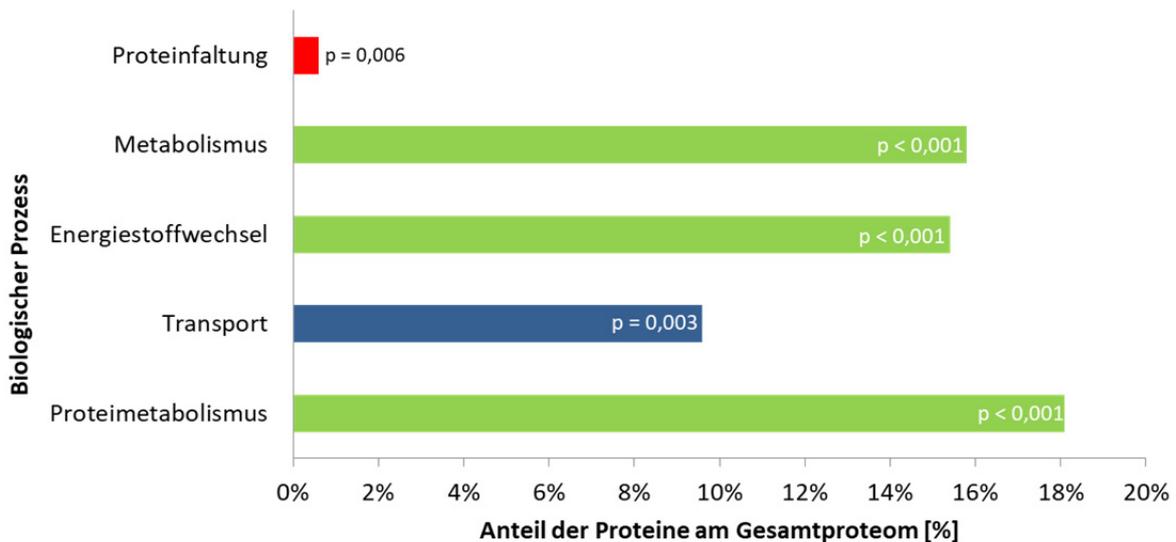


Abbildung 21: Angereicherte biologische Prozesse basierend auf dem Netzwerk der potenziellen Interaktoren der HA-IDH1 (Abbildung 20). Die verwendeten Farben entsprechen den markierten Proteinen des Netzwerks, so dass blau markierte Proteine am Proteintransport beteiligt sind, in Grün metabolische Proteine und in Rot Proteine, die an der Proteinfaltung beteiligt sind, gekennzeichnet sind.

In einem weiteren Schritt sollten mögliche Unterschiede zwischen den Interaktomen der mutierten bzw. wild-typischen IDH1 analysiert werden, um denkbare veränderte Komplexbildungen oder Unterschiede in starken, dauerhaften Bindungen zu detektieren. Hierzu wurden die signifikanten Interaktoren der beiden Isoformen aus Abbildung 19 verwendet und ein Zwei-Proben-T-Test ($p \leq 0,01$, $FDR < 0,01$) zwischen den beiden Isoformen durchgeführt (Abbildung 22).

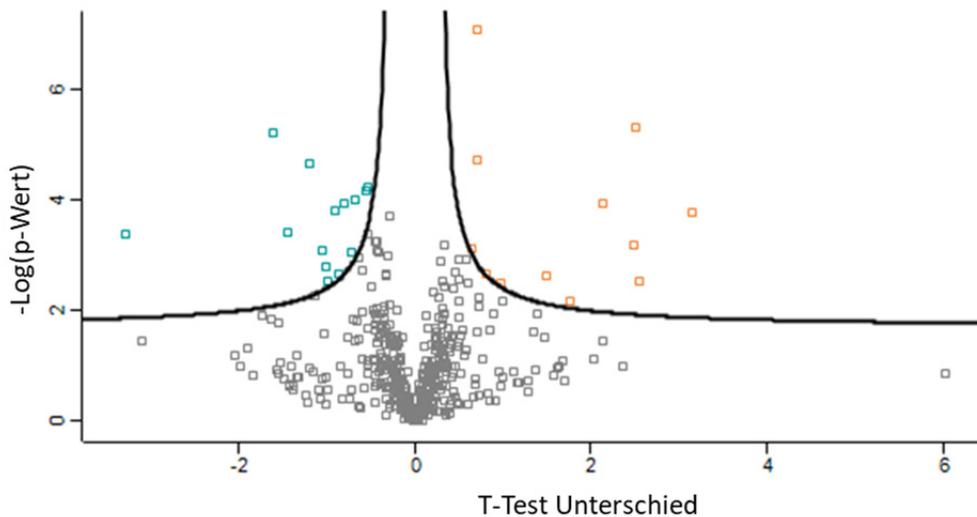


Abbildung 22: Differenzielle Interaktionspartner zwischen wild-typischer und mutierter IDH1. In Grün sind die potenziellen Interaktionspartner von mutierter IDH1 und in Orange die Interaktoren von wild-typischer IDH1 dargestellt.

Die differenzielle Analyse ergab 11 potenzielle Interaktoren für die wild-typische IDH1 und 14 Proteine, welche signifikant in den Immunpräzipitationen gegen mutierte IDH1 angereichert waren (Tabelle 5; um Kontaminanten bereinigt). Da in diesem Ansatz spezifische Unterschiede zwischen den beiden IDH1 Isoformen untersucht werden sollten, wurden hier, im Vergleich zum generellen Interaktom der IDH1, stringenter Filterkriterien verwendet ($p \leq 0,01$, $FDR < 0,01$). Zusätzlich wurde die Intensität der Proteine berücksichtigt. Diese sollte für eine besonders starke Interaktion, wie beispielsweise in einem Proteinkomplex, zumindest näherungsweise im Bereich der Intensität von IDH1 liegen, da dies auf eine starke dauerhafte Interaktion schließen lässt. Diese Kriterien wurden von drei Kandidaten für die mutierte IDH1 erfüllt (AHNAK, MAP1A, AHNAK2) und von einem Protein für die wild-typische IDH1 (SQSTM1). Allerdings lag der T-Test Unterschied bei diesen Kandidaten unter 1,5, weshalb keiner der potenziellen Kandidaten allen geforderten Gütekriterien entsprach.

Tabelle 5: Differenzielle potenzielle Interaktoren zwischen wild-typischer und mutierter IDH1

Proteinbeschreibung	Genname	p-Wert	T-Test	Intensität	differenziell in
Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	SIPA1L1	1.64E-04	3.15	1.72E+08	IDH1wt
Rho-related GTP-binding protein RhoE	RND3	3.00E-03	2.56	1.01E+08	IDH1wt
StAR-related lipid transfer protein 13	STARD13	4.65E-06	2.52	1.55E+08	IDH1wt
Next to BRCA1 gene 1 protein	NBR1	6.62E-04	2.49	7.10E+08	IDH1wt
Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	PLEKHO1	6.77E-03	1.77	7.94E+07	IDH1wt
Sequestosome-1	SQSTM1	2.39E-03	1.49	8.91E+09	IDH1wt
Tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	3.25E-03	0.98	1.44E+09	IDH1wt
LIM domain and actin-binding protein 1	LIMA1	2.20E-03	0.82	3.90E+09	IDH1wt
Terminal uridylyltransferase 7	ZCCHC6	1.83E-05	0.72	3.42E+09	IDH1wt
Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC4	HERC4	7.93E-08	0.70	1.71E+09	IDH1wt
Cytosolic purine 5-nucleotidase	NT5C2	7.30E-04	0.66	3.94E+08	IDH1wt
SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 1	SRGAP1	5.93E-05	-0.53	8.97E+08	IDH1mut
Microtubule-associated protein 1A	MAP1A	6.64E-05	-0.56	1.03E+11	IDH1mut
SH3 domain-binding protein 4	SH3BP4	9.93E-05	-0.67	1.82E+09	IDH1mut
Teneurin-3	TENM3	8.53E-04	-0.72	2.41E+08	IDH1mut
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	1.16E-04	-0.80	2.24E+11	IDH1mut
Histone chaperone ASF1B	ASF1B	2.21E-03	-0.86	1.06E+08	IDH1mut
Huntingtin-interacting protein 1	HIP1	1.52E-04	-0.91	1.58E+09	IDH1mut
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	TXNRD1	2.94E-03	-0.98	5.70E+08	IDH1mut
TBC1 domain family member 2A	TBC1D2	1.58E-03	-1.00	7.56E+08	IDH1mut
4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A2	7.82E-04	-1.05	2.64E+08	IDH1mut
Protein AHNAK2	AHNAK2	2.17E-05	-1.19	6.98E+10	IDH1mut
Palladin	PALLD	3.75E-04	-1.44	7.09E+08	IDH1mut
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	PRPS1	6.07E-06	-1.61	2.48E+09	IDH1mut
Protein-arginine deiminase type-2	PADI2	4.16E-04	-3.29	2.31E+08	IDH1mut

4.3 Untersuchung des Gesamt- und Phosphoproteoms der neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen

4.3.1 Charakterisierung des NSC/NPC Proteoms

Die *IDH1*-Mutation ist ein frühes Ereignis in der Entstehung von Gliomen, für diesen Zeitpunkt sind die neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen (NSC/NPCs) ein geeignetes Modell, da die Zellen direkt nach der Geburt der Maus extrahiert werden und die Expression von wild-typischer bzw. mutierter *IDH1* induziert wird. Da diese NSC/NPCs auf Proteinebene noch nicht charakterisiert wurden, so allerdings ein Einblick in das Proteom dieser Zellen generiert werden kann, wurde zunächst eine markierungsfreie Analyse der NSC/NPCs durchgeführt. Hierzu wurden vier NSC/NPCs verwendet, bei welchen die Expression von mutierter *IDH1* induziert wurde, und vier, welche die wild-typische Form der *IDH1* exprimieren. Die Reexpression und funktionelle Aktivität der *IDH1* Mutation in den NSC/NPCs konnten experimentell bestätigt werden (persönliche Kommunikation mit Dr. Christiane Knobbe-Thomsen).

Die markierungsfreie Quantifizierung via LC-MS/MS führte zu einer Quantifizierung von 3.576 Proteinen, wobei diese mindestens über zwei spezifische Peptide verfügen mussten.

In einem ersten Schritt wurde das Proteom auf die Verteilung der Proteine auf die unterschiedlichen Zellkompartimente überprüft (Abbildung 23; Mehrfachnennungen möglich). Es zeigte sich ein sehr ähnliches Muster zu der Analyse des U87MG Proteoms (Abbildung 9), so dass auch hier die verwendete Methode ein probates Mittel zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen aus unterschiedlichen Kompartimenten ist.

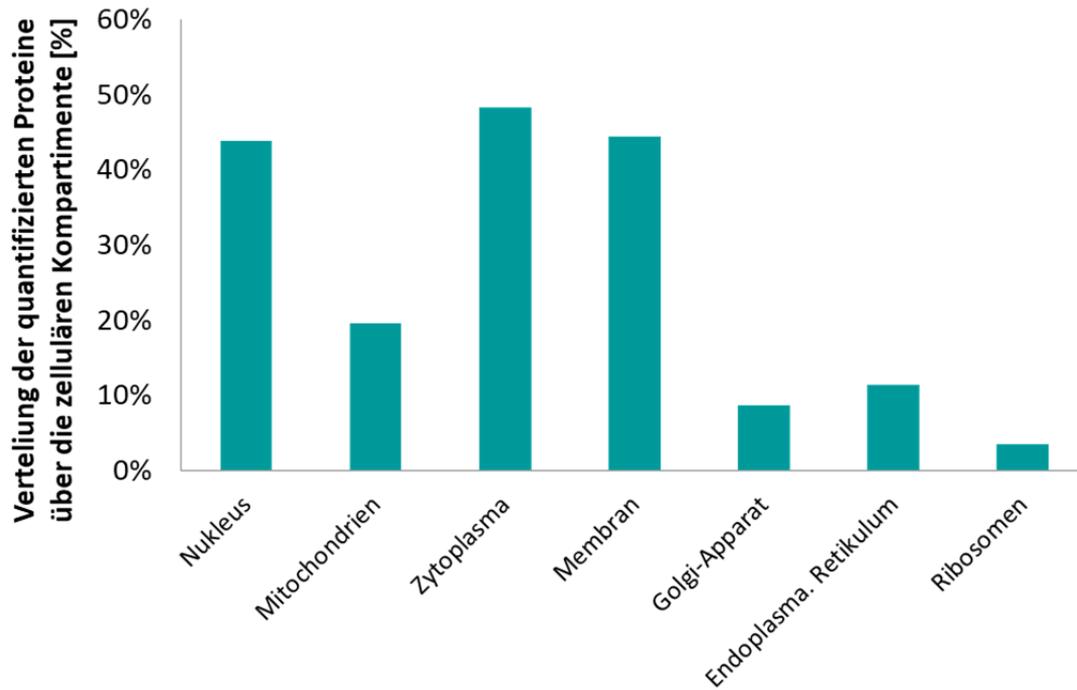


Abbildung 23: Verteilung der Proteine aus der NSC/NPC-Proteomstudie auf die zellulären Kompartimente. In dem Balkendiagramm werden der prozentuale Anteil der quantifizierten Proteine an den verschiedenen Kompartimenten gezeigt (Mehrfachnennungen möglich).

Um etwaige Einflüsse der Expression von wild-typischer bzw. mutierter IDH1 auf das Gesamtproteom zu überprüfen, wurden die Proteinabundanzen in einem hierarchischen Cluster visualisiert (Abbildung 24).

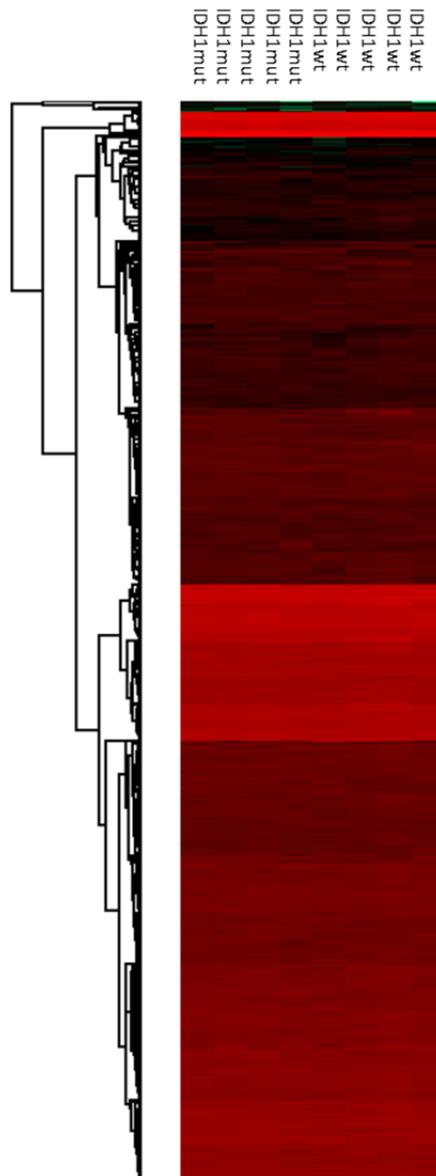


Abbildung 24: Hierarchisches Cluster aller quantifizierten Proteine der NSC/NPC Proteome. Die Probengruppierung wurde im Vorhinein festgelegt. Es wurden NSC/NPCs verwendet, welche entweder wild-typische oder mutierte *IDH1* exprimieren (n=4).

Die Analyse des hierarchischen Clusters zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Proteinabundanzen zwischen den neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen, bei denen die Expression der *IDH1* Mutation induziert wurde, im Vergleich zu den *IDH1* Wild-Typ Zellen. Eine Analyse der biologischen Prozesse der quantifizierten Proteine hebt hervor, dass in dem gewählten Zellmodell stammzelltypische Prozesse angereichert sind. In Abbildung 25 sind einige Beispiele für diese biologischen Prozesse gezeigt.

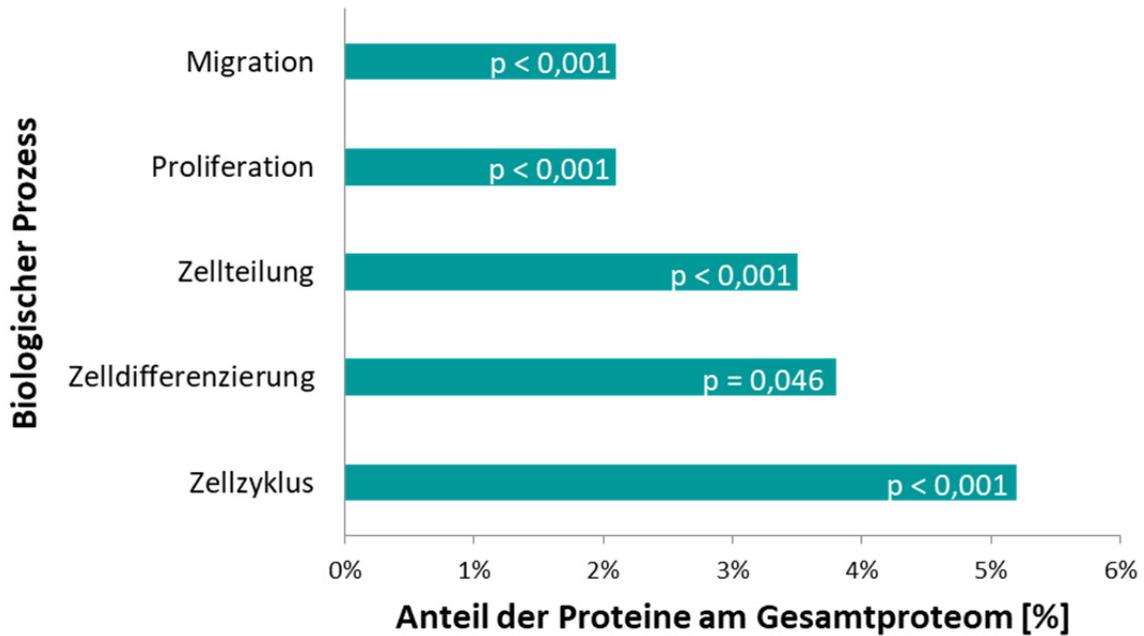


Abbildung 25: Analyse der biologischen Prozesse des NSC/NPC Proteoms. Das Balkendiagramm zeigt angereicherte biologische Prozesse, die auf allen quantifizierten Proteinen der markierungsfreien Analyse basieren.

Neben der allgemeinen Analyse des NSC/NPC Proteoms wurde auch eine differenzielle Studie zwischen den *IDH1* mutierten und wild-typischen NSC/NPCs durchgeführt, um eventuelle Einflüsse der Mutation auf die Proteinabundanz zu detektieren. Es wurden von jeder Isoform vier biologische Replikate verwendet und ein Zwei-Proben-T-Test ($p \leq 0,05$) zwischen den normalisierten Proteinabundanz der beiden Gruppen durchgeführt. Die Analyse dieser Daten zeigte keine Expressionsunterschiede einzelner Proteine zwischen den beiden Gruppen.

4.3.2 Analyse des Phosphoproteoms der NSC/NPCs

Da die differenzielle Analyse des Proteoms der NSC/NPCs keine Unterschiede zwischen den beiden Isoformen zeigte, wurde im nächsten Schritt das Phosphoproteom untersucht, da der Vergleich der Phosphorylierungsmuster verschiedener Proben möglicherweise einen Aufschluss über die eventuell veränderte Aktivierung von Signalwegen geben kann.

Da in einer komplexen Probe, wie einem Zelllysate, der Anteil an phosphorylierten Peptiden deutlich geringer ist als der an unphosphorylierten Peptiden, musste zunächst ein Protokoll zur Anreicherung der Phosphopeptide etabliert werden. Abschließend wurden die Proben für

die Analyse des Phosphoproteoms der NSC/NPCs wie in Abschnitt 3.2.9 beschrieben aufgearbeitet. Für eine nähere Betrachtung wurden zunächst alle Fraktionen gemeinsam analysiert, um eine generelle Charakterisierung des Phosphoproteoms der NSC/NPCs zu erstellen. Pro Gruppe (*IDH1*wt bzw. *IDH1*mut) wurden vier biologische Replikate verwendet und es konnten insgesamt 6.260 Phosphorylierungsstellen an 5.294 Peptiden identifiziert werden. Diese Peptide verteilen sich auf 1.887 Proteine. In der Auswertung wurde unter Verwendung des Mascot Algorithmus nach Phosphorylierungen an den Aminosäuren Tyrosin, Threonin und Serin gesucht. 94 % der gefundenen Phosphorylierungsstellen befinden sich an einem Serin, 5,7 % an einem Threonin und 0,3 % an einem Tyrosin (Abbildung 26).

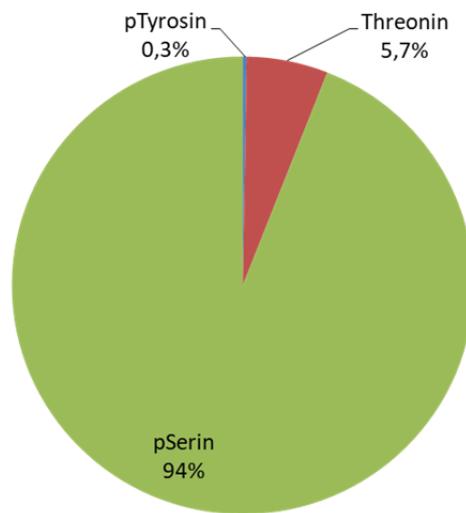


Abbildung 26: Prozentuale Verteilung der Phosphorylierungsstellen auf die Aminosäuren Tyrosin, Threonin und Serin.

Wie bereits in Abschnitt 1.6.2 erläutert wird mit der Anreicherung der Phosphorylierungsstellen über Titandioxidpartikel ein verstärktes Auftreten von monophosphorylierten Peptiden begünstigt. Dies zeigt sich auch bei der Analyse der Anzahl der Phosphorylierungsstellen pro Peptid in dieser Studie (Abbildung 27). Nur 4 % der identifizierten Phosphopeptide tragen drei Phosphorylierungen, wobei 59 % der Peptide eine einzige Phosphorylierungsstelle aufweisen.

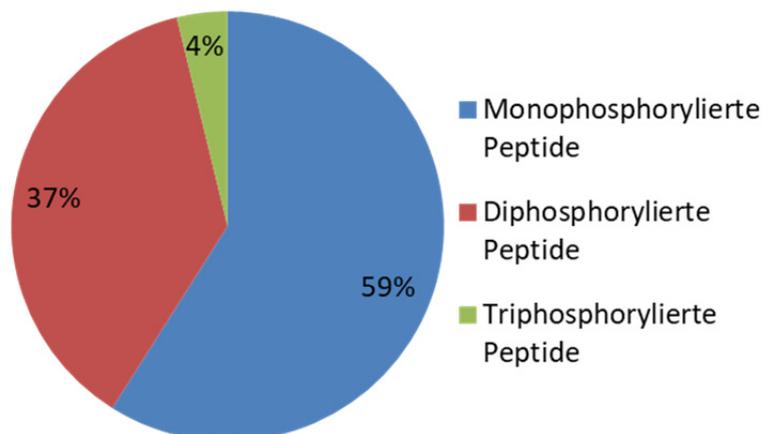


Abbildung 27: Prozentuale Verteilung der Anzahl der Phosphorylierungsstellen pro Peptid des Phosphoproteoms der NSC/NPCs.

In der Gruppe der IDH1 wild-typischen NSC/NPCs konnten 1.732 Phosphoproteine identifiziert werden und bei den IDH1 mutierten Zellen 1.560 Phosphoproteine. Ein Vergleich dieser beiden Proteinlisten zeigt, dass ein Großteil der Proteine in beiden Gruppen identifiziert wurde (71,8 %). Allerdings sind 356 Phosphoproteine ausschließlich in den IDH1 wild-typischen NSC/NPCs identifiziert worden und 184 alleinig in den IDH1 mutierten Zellen (Abbildung 28).

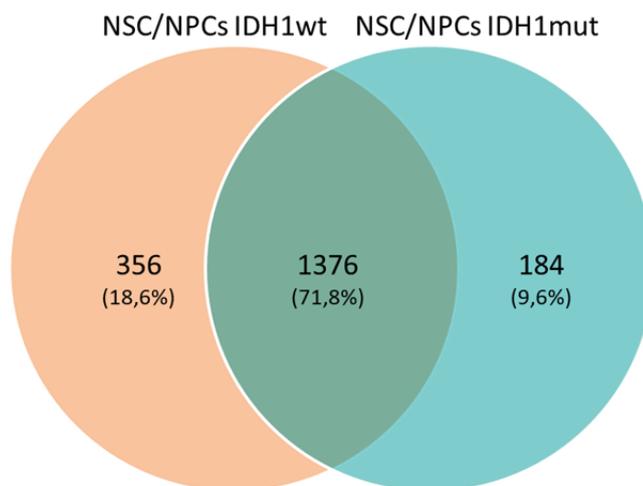


Abbildung 28: VENN-Diagramm der identifizierten Phosphoproteine in den NSC/NPCs. 18,6 % der Phosphoproteine wurden nur in den IDH1 Wild-Typ Zellen identifiziert, 9,6 % nur in den IDH1 mutierten Zellen. Die Schnittmenge enthält 71,8 % der Phosphoproteine.

Auf Grundlage des in Abbildung 28 gezeigten VENN-Diagramms, wurden die Phosphoproteine, welche exklusiv in einer der beiden Gruppen identifiziert wurden, weitergehend untersucht, hierzu wurden die angereicherten molekularen Funktionen in den jeweiligen Proteingruppen analysiert (Abbildung 29).

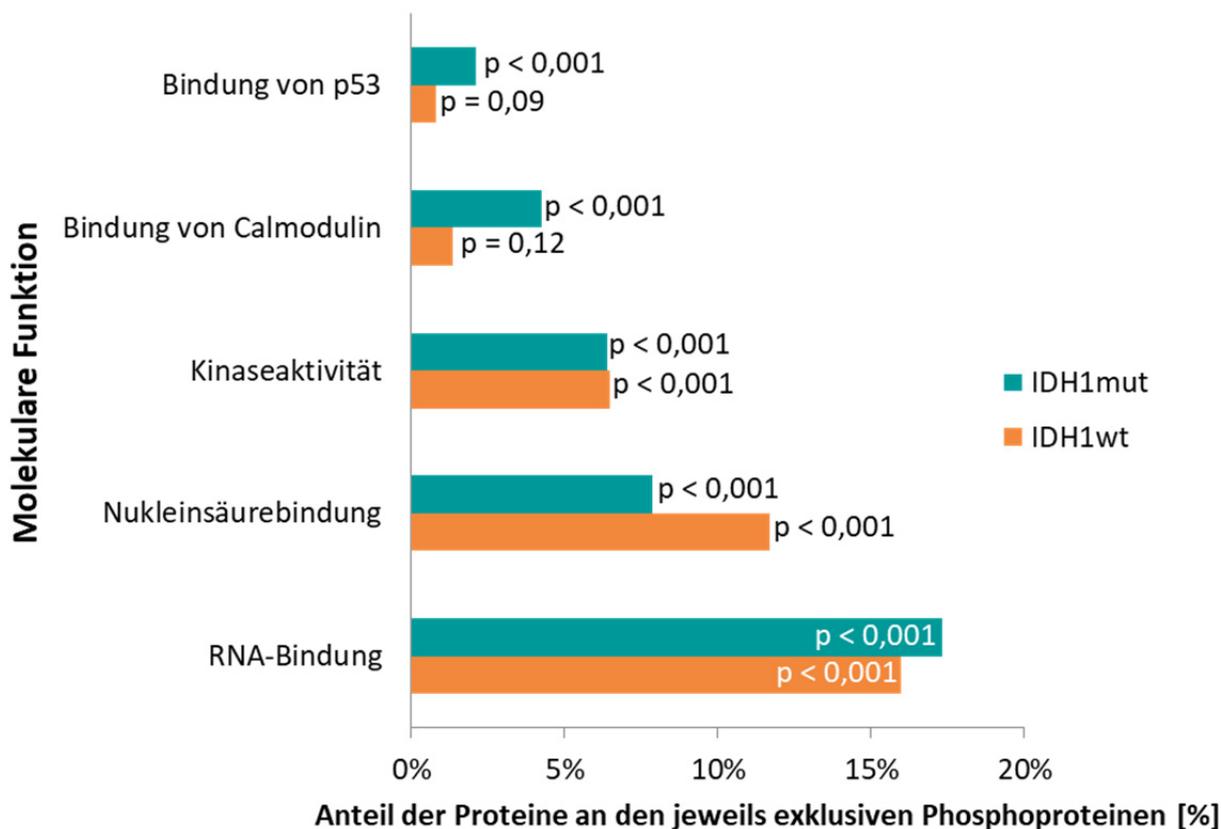


Abbildung 29: Analyse der molekularen Funktionen der Phosphoproteine der NSC/NPCs. Verwendet wurden nur die Phosphoproteine, welche ausschließlich in einer der beiden Gruppen (NSC/NPCs *IDH1*wt bzw. *IDH1*mut) identifiziert wurden. Die Balkendiagramme zeigen angereicherte molekulare Funktionen der je Isoform exklusiven Phosphoproteine.

Eine Untersuchung der exklusiven Phosphoproteine der beiden Gruppen (NSC/NPCs *IDH1*wt bzw. *IDH1*mut) zeigt, dass in beiden Fällen viele identische molekulare Funktionen angereichert sind, wie Kinaseaktivität, Nukleinsäure- oder RNA-Bindung. Allerdings zeigen sich auch einige Unterschiede: Ausschließlich in den exklusiven Phosphoproteinen der NSC/NPCs, die mutierte *IDH1* exprimieren, sind die Bindung von p53 und die Bindung von Calmodulin signifikant angereichert.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der IDH1 in Abhängigkeit ihrer Mutation bei der Tumorgenese von Gliomen zu charakterisieren. Die IDH1 Mutation ist ein frühes Ereignis in der Entstehung von Gliomen (Suzuki *et al.*, 2015) und wird für die WHO-Klassifizierung dieser verwendet (Louis *et al.*, 2016). Die Proteomanalyse wurde zur Aufklärung von Interaktionspartnern und posttranslationalen Modifikationen eingesetzt, um ein detaillierteres Bild der wild-typischen und mutierten IDH1 zu erstellen und somit neue funktionelle Zusammenhänge aufzuklären.

5.1 Methodische Aspekte der Modellsysteme für die Analyse der mutierten IDH1

Da für die IDH1 Mutation kein Modellsystem in Form einer Zelllinie für Verfügung steht und Zelllinien aus Tumoren mit einer IDH1 Mutation nicht in Kultur gehalten werden können (Piaskowski *et al.*, 2011), war die erste Herausforderung ein geeignetes Modellsystem zu erzeugen. Hierzu wurde die U87MG Gliomzelllinie, mit genomischem IDH1 Wild-Typ Hintergrund, mit einem Vektor, welcher die mutierte *IDH1* trägt, transfiziert. Zudem wurden die Zellen mit einem Leervektor transfiziert und in den Experimenten als Kontrollen verwendet. Um eine höhere Vergleichbarkeit hinsichtlich der Expressionshöhe der IDH1-Isoformen zu erlangen, wurden die U87MG Zellen auch mit der wild-typischen *IDH1* transfiziert. Eine Untersuchung der transfizierten Zellen zeigte eine moderate Überexpression der wild-typischen bzw. mutierten IDH1 im Vergleich zur endogenen Form des Proteins (Abbildung 4). In dieser Arbeit wurde sich bewusst für eine moderate Überexpression entschieden, da durch eine sehr starke Überexpression Artefakte, wie eine veränderte Lokalisation oder Komplexbildungen, auftreten können (Freitag *et al.*, 2012; Wienisch und Klingauf, 2006). Dang *et al.* (2009) wiesen bereits darauf hin, dass eine Mutation der IDH1 zu einer Akkumulation von 2-HG in der Zelle führt. Diese funktionelle Aktivität der Mutante wurde in dieser Arbeit über die Messung der relativen 2-HG Menge in den U87MG Zellen bestätigt. Aus diesen Gründen kann davon ausgegangen werden, dass das in dieser Arbeit verwendete Modell geeignet ist, um etwaige proteomische Unterschiede zwischen den IDH1 Isoformen zu analysieren.

Für die Analyse der neuralen Stamm- und Vorläuferzellen existieren bereits transgene Mäuse, aus welchen die NSC/NPCs präpariert werden können (Sasaki *et al.*, 2012) und bei denen durch Aktivierung eine Cre-Rekombinase nach Tamoxifen Behandlung die Expression der

wild-typischen bzw. mutierten *IDH1* induziert werden kann (Zhang *et al.*, 1996). Diese Methodik wird dazu verwendet verschiedenste Gene zu aktivieren oder zu inaktivieren (Hayashi und McMahon, 2002). Für die Untersuchung der unterschiedlichen Mutationen von *p53* oder *Pten* wurde diese Art der Analyse erfolgreich eingesetzt (Kwon *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit für die Analyse des Einflusses der *IDH1* Mutation wäre die Nutzung von Tumormaterial von Patienten gewesen. Allerdings ist hier die Materialmenge stark beschränkt, wodurch eine Analyse des Phosphoproteoms nur mit großem Materialaufwand möglich gewesen wäre. Für eine Phosphoproteomstudie von Tumorgewebe nutzen Zanivan *et al.* (2008) beispielsweise 10 mg Gewebematerial. Zum anderen ist die Heterogenität zwischen einzelnen Patientenproben, durch beispielsweise unterschiedliche Altersgruppen, verschiedene Vorerkrankungen oder medikamentöse Behandlung, meist sehr hoch (Dick, 2008; Fidler und Hart, 1982; Heppner, 1984; Nicolson, 1984).

Aus diesen Gründen wurden für diese Arbeit zum einen die wild-typische und mutierte *IDH1* überexprimierende Gliomzelllinie U87MG und zum anderen die aus transgenen Mäusen generierten neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen für die Charakterisierung der *IDH1* und ihrer Mutation verwendet.

5.2 *IDH1* und ihre posttranslationalen Modifikationen

Durch posttranslationale Modifikationen kann die Funktion eines Proteins moduliert werden. Zudem können mit speziellen PTM, wie etwa der Phosphorylierung, Signale innerhalb, aber auch außerhalb der Zelle, vermittelt werden. Aus diesem Grund stellt die Charakterisierung der PTM eines Proteins eine wichtige Rolle bei der Aufklärung der Funktionszusammenhänge eines Proteins dar. Für die Analyse der PTM der *IDH1* wurde in dieser Arbeit ein MS-basierter Ansatz nach Immunpräzipitation gegen die mutierte oder wild-typische *IDH1* durchgeführt und im Anschluss bei der Identifizierung der Proteine mittels Datenbanksuche Phosphorylierungen, Acetylierungen und Ubiquitinylierungen, aufgrund ihrer Häufigkeit, berücksichtigt (Khoury *et al.*, 2011). Die Sequenzabdeckung des zu analysierenden Proteins spielt besonders bei der Untersuchung von PTM eine wichtige Rolle, um so umfassend das PTM-Muster beschreiben zu können (Mann und Jensen, 2003). Durch die Immunpräzipitation der *IDH1* konnte für beide *IDH1* Isoformen eine Sequenzabdeckung von ca. 90 % erreicht werden, welche ohne Immunpräzipitation bei ca. 35 % lag.

Es konnten sowohl bei der wild-typischen als auch bei der mutierten *IDH1* 17, bisher nicht bekannte, Ubiquitinylierungen über den Mascot-Algorithmus identifiziert werden (Tabelle 6).

Lange war Ubiquitinylierungen einzig die Rolle der Markierung der zum Abbau durch das Proteasom vorgesehenen Proteine zugeschrieben. Mittlerweile ist bekannt, dass Ubiquitinylierungen Einfluss auf die Proteinstabilität, Lokalisierung, Interaktionen und funktionellen Aktivität nehmen, weshalb eine solche Anzahl für ein Protein dieser Größe nicht unüblich ist (Kirkpatrick *et al.*, 2005).

Hinsichtlich der Proteinphosphorylierungen konnten in dieser Arbeit für die IDH1 sieben Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Elias *et al.* (2013) bzw. Mikula *et al.* (2015) konnten mit einer zu der in dieser Arbeit verwendeten ähnlichen Methodik sieben bzw. vier Phosphorylierungsstellen für Proteine mit vergleichbar molekularer Masse wie IDH1 identifizieren. Bian *et al.* (2014) identifizierten in einem Hochdurchsatzexperiment eine Phosphorylierung am Tyrosin 42, welche in der hier durchgeführten Studie nicht bestätigt werden konnte. Ein Grund dafür könnte sein, dass eine Phosphorylierung eine reversible Modifikation ist, dies bedeutet, dass nicht alle potenziell phosphorylierten Aminosäuren immer diese Modifikation tragen (Cohen, 2002; Hubbard und Cohen, 1993). Generell ist die Anzahl an nicht phosphorylierten Peptiden in einer Probe deutlich höher als die der phosphorylierten Peptide, so dass es zu Signalüberlagerungen kommen kann und keine MS/MS-Spektren der phosphorylierten Peptide aufgenommen werden können (Steen *et al.*, 2006). Für die genaue Analyse phosphorylierter Tyrosine wird deshalb häufig ein zusätzlicher Anreicherungsschritt über spezifische Antikörper genutzt (Pandey *et al.*, 2000). Sowohl für die wild-typische als auch für die mutierte IDH1 konnten in dieser Studie potenzielle Phosphorylierungen an folgenden Aminosäuren identifiziert werden: T325, S326 und T327. Exklusiv für die wild-typische IDH1 konnten zudem Phosphorylierungen an Threonin 52, Serin 188, Serin 389 und Threonin 337 identifiziert werden. Nach heutigem Stand der Uniprot-Datenbank sind diese Phosphorylierungsstellen für IDH1 noch nicht beschrieben und die mögliche Funktion dieser ist bisher unbekannt. Da Phosphorylierungen multiple Effekte auf Proteine haben, ist es durchaus möglich, dass die hier identifizierten Phosphorylierungsstellen einen Einfluss auf die Regulation oder Bindungsaffinitäten von IDH1 ausüben. Um eine abschließende Klärung der Funktion dieser phosphorylierten Aminosäuren zu erhalten, müssten weiterführende Mutagenese-Experimente durchgeführt werden.

Lange waren Acetylierungen nur für Proteine im Nukleus bekannt und dort vor allem für Histone (Allfrey *et al.*, 1964). Durch globale Studien konnte aber im Laufe der letzten Jahre der Wissensstand über Acetylierungen auf Proteomebene deutlich erhöht werden und es wurde gezeigt, dass viele acetylierte Proteine auch im Zytoplasma lokalisiert sind (Choudhary

et al., 2009; Kim *et al.*, 2006; Schwer *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Zhao *et al.* (2010) konnten zudem zeigen, dass viele der acetylierten Proteine im Metabolismus der Zelle aktiv sind und die Acetylierungen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von metabolischen Enzymen spielen. Für die humane IDH1 sind bisher zwei Acetylierungen bekannt und experimentell betätigt: Serin 2 (Van Damme *et al.*, 2012) und Lysin 321 (Choudhary *et al.*, 2009). In dieser Studie konnten beide bereits bekannten Acetylierungen nicht bestätigt werden, da die entsprechenden Peptide in der Datenbanksuche nicht identifiziert werden konnten. In beiden Fällen handelt es sich um sehr kurze Peptide, bestehend aus drei bzw. vier Aminosäuren, was wiederum eine Erklärung liefern kann, weshalb diese Peptide während der LC-MS Analyse nicht detektiert wurden (Mann und Jensen, 2003). In dieser Arbeit konnten allerdings drei noch nicht beschriebene Acetylierungen an den Lysinen 29, 224 und 261 identifiziert werden. Für die humane IDH1 ist bislang kein Einfluss auf die Aktivität durch Acetylierungen bekannt. Um mögliche Einflüsse der in dieser Arbeit identifizierten Acetylierungen zu analysieren, müssten weitere Experimente wie beispielsweise die Mutation der unterschiedlichen Aminosäuren durchgeführt werden.

Die Analyse der posttranslationalen Modifikationen der IDH1 zeigt, dass vier Phosphorylierungen an Threonin 52, Serin 188, Serin 389 und Threonin 337 exklusiv für die wild-typische IDH1 detektiert werden konnten. Zudem wurden für beide IDH1 Isoformen verschiedene, bislang nicht bekannte, Modifikationen in dieser Arbeit identifiziert, deren funktioneller Einfluss auf die Aktivität der IDH1 in weiterführenden Experimenten geklärt werden müsste.

5.3 Identifizierung potenzieller Interaktionspartner der IDH1 in Abhängigkeit ihrer Mutation

Bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen ist das Zusammenspiel verschiedener Proteine notwendig. Hierbei kommt es zur Ausbildung von stabilen oder transienten Proteinkomplexen. Aus diesem Grund stellt die Aufklärung von Interaktionspartnern eine Möglichkeit dar, die Funktion eines Proteins näher zu charakterisieren. Für die IDH1 Mutation können eine Vielzahl der tumorbiologischen Aspekte durch die Bildung des Onkometaboliten 2-HG erklärt werden. Allerdings ist 2-HG nicht Grundlage für alle durch die IDH1 Mutation hervorgerufenen Veränderungen (Molenaar *et al.*, 2014a), weshalb in dieser

Arbeit das Interaktionsnetzwerk von mutierter und wild-typischer IDH1 untersucht werden sollte.

5.3.1 Methodische Aspekte

In einem ersten Schritt wurde für die Identifizierung der Interaktionspartner die U87MG Gliomzelllinie verwendet, welche wild-typische bzw. mutierte *IDH1* überexprimiert, wobei die *IDH1* jedoch keine HA-Kopplung trägt. Dies stellte sich im weiteren Verlauf als schwierig heraus, da der Antikörper, der für die Immunpräzipitation verwendet wurde, ein Epitop erkennt, welches innerhalb der IDH1 Sequenz nicht die Mutation abdeckt. Somit wurde nicht nur die mutierte Form der IDH1, sondern auch die endogene Form mittels Immunpräzipitation angereichert. Aus diesem Grund war eine Unterscheidung zwischen den potenziellen Interaktionspartnern beider IDH1 Isoformen nicht möglich. Um diesen Einfluss von Interaktoren der endogenen IDH1 zu minimieren und eine spezifischere Immunpräzipitation auch gegen die mutierte IDH1 durchführen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf eine transgene U87MG Zelllinie erstellt, welche die wild-typische *IDH1*, die mutierte *IDH1* oder einen Leervektor, jeweils mit einer HA-Kopplung, trägt. So konnten die weiteren Immunpräzipitationen gegen die HA-Kopplung durchgeführt werden und eine spezifischere Anreicherung wurde gewährleistet (Hu *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2003).

Eine weitere zu berücksichtigende Komponente war die Verteilung der möglichen Interaktoren über verschiedene zelluläre Kompartimente. So wurden beispielsweise ca. 30 % der Proteine dem Nukleus zugeordnet. Die zytoplasmatische Lokalisation der IDH1 ist jedoch bereits beschrieben (Geisbrecht und Gould, 1999) und wurde in dieser Arbeit nochmals per Fluoreszenzfärbung bestätigt, so dass eine Interaktion mit ausschließlich nukleär lokalisierten Proteinen als eher unwahrscheinlich erachtet werden kann. Diese vermutlich unspezifischen Bindungen mit nukleären und auch mitochondrialen Proteinen sind häufig zu beobachtende Kontaminationen (Mellacheruvu *et al.*, 2013). Um diese zu minimieren wurden in dieser Arbeit zunächst zwei Ansätze getestet: Formaldehyd-*Crosslinking* und subzelluläre Fraktionierung. Für das Formaldehyd-*Crosslinking* (Knobbe *et al.*, 2011; Schmitt-Ulms *et al.*, 2001) wurde zunächst ein Protokoll etabliert, bei dem stringenter Waschschritte, im Vergleich zur subzellulären Fraktionierung, verwendet werden konnten. Formaldehyd wird häufig als *Crosslinking*-Reagenz verwendet, da es wasserlöslich ist und die gebildeten Bindungen kurz und recht stabil (2 bis 3 Å), aber trotzdem reversibel sind (Schmitt-Ulms *et*

al., 2001). Ein weiterer Vorteil ist die Kompatibilität der Methode mit der massenspektrometrischen Analyse (Sutherland *et al.*, 2008). Durch die Verwendung einer geringen Menge (1 bis 3 %) Formaldehyd und einer kurzen Inkubation (10 bis 30 min) der Zellen mit dem Reagenz, gilt das Formaldehyd-*Crosslinking* als geeignet, um spezifische Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle zu analysieren (Klockenbusch *et al.*, 2012). Für den zweiten Ansatz zur Detektion von potenziellen Interaktionspartnern der IDH1 wurde nach der Zellernte eine Fraktionierung in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion durchgeführt und im Anschluss wurde die Immunpräzipitation gegen IDH1 ausschließlich mit der zytoplasmatischen Fraktion vorgenommen. Eine Fraktionierung wird häufig verwendet, um beispielsweise Unterschiede in der Abundanz eines Proteins zwischen Nukleus und Zytoplasma oder auch mögliche Veränderungen in der Lokalisation eines Proteins zu detektieren (Koike *et al.*, 2013). Ein weiterer Vorteil dieser Art der Fraktionierung und der anschließenden weiteren Verwendung der für das Experiment relevanten Fraktion ist die Reduktion von potenziellen Störfaktoren wie unspezifischen Bindungen (Yang *et al.*, 2013). Um potenzielle Interaktoren der IDH1 zu identifizieren und so mögliche Signalwege zu finden, auf welche IDH1 Einfluss nimmt, wurden beide beschriebenen Protokolle unter Verwendung der U87MG Zelllinie, welche entweder die mutierte oder wild-typische *IDH1* überexprimiert, durchgeführt. Da unspezifische Bindungen an die HA-Kopplung, den Vektor oder den Antikörper bei Immunpräzipitationsexperimenten hinlänglich bekannt sind (Markham *et al.*, 2007; Selbach und Mann, 2006), wurden die Experimente zusätzlich mit den U87MG Zellen, welche den HA-gekoppelten Leervektor exprimieren, durchgeführt, um auf spezifische Bindungen selektieren zu können. In der Literatur finden sowohl das *Crosslinking* (Bai *et al.*, 2008; Vasilescu *et al.*, 2004) als auch die subzelluläre Fraktionierung (Crockett *et al.*, 2004; Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008) Anwendung bei der Durchführung von Interaktionsstudien. Auch in dieser Arbeit zeigte die Analyse der Verteilung der potenziellen Interaktoren der IDH1 über die zellulären Kompartimente aus beiden Ansätzen ein ähnliches Bild. Da die Inkubation mit Formaldehyd während des *Crosslinkings* allerdings zu einem erhöhten Zellsterben führte und die subzelluläre Fraktionierung eine höhere methodische Reproduzierbarkeit aufwies, wurden die weiteren Analysen beruhend auf dem Ansatz der subzellulären Fraktionierung durchgeführt.

5.3.2 Biologische Diskussion

Für die Unterscheidung von differenziellen Interaktoren zwischen der wild-typischen und mutierten IDH1 wurden stringentere Filterkriterien als bei der Betrachtung des gesamten Interaktoms verwendet. Neben einem p-Wert kleiner als 0,01 und einer FDR von 0,01 wurden auch die Signalintensität und der T-Test Unterschied (größer 1,5) betrachtet, da so auf eine starke dauerhafte Interaktion, z.B. in Komplexen, geschlossen werden kann (Senkler *et al.*, 2017; Wildburger *et al.*, 2015). Unter Verwendung ähnlicher Kriterien konnten beispielsweise Breitkopf *et al.* (2016) p85 und SHP2 als direkte Interaktoren von PI3K identifizieren. Die Verwendung dieser Parameter für die in dieser Arbeit durchgeführte Interaktionsstudie bringt keine differenziellen Interaktoren zwischen wild-typischer und mutierter IDH1 hervor. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Lage der R132H Mutation innerhalb der IDH1 sein, da diese im Inneren des Proteins liegt und somit ein Einfluss dieser auf Protein-Protein-Interaktionen eher unwahrscheinlich ist. Außerdem lässt dieses Ergebnis darauf schließen, dass sowohl die wild-typische als auch die mutierte IDH1 keine starken Interaktionen eingehen und in keinem dauerhaften funktionellen Komplex agieren.

Für eine Betrachtung des generellen Interaktoms der IDH1 wurden die potenziellen Interaktionspartner beider Isoformen zusammengefasst und analysiert. Hierbei konnten keine der bislang beschriebenen Interaktionspartner der IDH1 identifiziert werden. Allerdings handelt es sich bei den Experimenten, durch welche diese Interaktoren identifiziert wurden, um Hochdurchsatzanalysen, bei denen weder IDH1 spezifisch angereichert noch eine Strategie zur Vermeidung von artifiziellen Interaktionen durchgeführt wurde. Zudem stehen jene generierten Daten teilweise in Widerspruch zu den Lokalisationsdaten der betreffenden Proteine. So wurde beispielsweise IDH2 als Interaktionspartner der IDH1 beschrieben, ist aber ausschließlich in den Mitochondrien der Zelle lokalisiert (Xu *et al.*, 2004), so dass eine Interaktion *in vivo* mit IDH1 eher unwahrscheinlich ist, jedoch auf Grund der hohen Homologie der beiden Isoformen (81 % Sequenzübereinstimmung) und ihrer Fähigkeit zur Dimerbildung (Xu *et al.*, 2004) eine artifizielle Interaktion *in vitro* höchst wahrscheinlich scheint. Die Analyse der in dieser Arbeit detektierten Interaktoren zeigte in erster Linie eine Anreicherung von Prozessen, wie Proteintransport oder Metabolismus, welche im Wesentlichen den Lebenszyklus eines Proteins widerspiegeln (Jovanovic *et al.*, 2015). Ein weiteres Beispiel ist die Proteinfaltung, welche neu synthetisierte Proteine durchlaufen und die meist durch Chaperone, welche ebenfalls als Interaktionspartner identifiziert wurden, unterstützt wird. Neben der globalen Betrachtung der potenziellen Interaktoren wurden auch die einzelnen Kandidaten hinsichtlich einer besonderen biologischen Relevanz überprüft. Die

Interaktionsstudie führte zur Detektion von zwei Kinasen als potentielle Interaktoren der IDH1: PRKCA (Proteinkinase C Typ Alpha) und PRKACA (c-AMP-abhängige Proteinkinase katalytische Untereinheit Alpha). Da die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der posttranslationalen Modifikationen der IDH1 zur Identifizierung von sieben bisher nicht bekannten Phosphorylierungsstellen für die wild-typische IDH1 und drei für die mutierte IDH1 führte, könnten beide Kinasen für die Phosphorylierung der IDH1 zuständig sein. Sowohl PRKCA als auch PRKACA phosphorylieren Serine und Threonine, haben eine Vielzahl von Substraten im Zytoplasma und Nukleus und sind somit an der Regulation von Prozessen wie Differenzierung, Proliferation oder Apoptose beteiligt (Lahn und Sundell, 2004; Turnham und Scott, 2016). Des Weiteren konnten Proteine wie ACO1 (Aconitase 1) oder ACLY (ATP-Citrat-Lysae), welche im Zellmetabolismus mit Substraten bzw. deren Vorstufen der IDH1 agieren, identifiziert werden. ACO1 ist hierbei für die zytoplasmatische reversible Umwandlung von Citrat zu Isocitrat verantwortlich und stellt somit das Edukt der IDH1 zur Verfügung. ACLY ist hingegen im Zytoplasma für die Synthese von Acetyl-CoA zuständig und spielt eine zentrale Rolle in der Fettsäurebiosynthese (Srere, 1959). In Glioblastomen ist ACLY an der Regulation der Glykolyse beteiligt. Durch die Spaltung von zytosolischem Citrat, einem Inhibitor der Phosphofruktokinase 1 (Szutowicz *et al.*, 1976), welches ein Schlüsselenzym der Glykolyse darstellt, kann diese angetrieben werden. Es ist bereits bekannt, dass die Aufnahme von Glukose und die glykolytische Aktivität in Glioblastomen erhöht ist (Oudard *et al.*, 1997). ACLY wird eine erhöhte Expression in Glioblastomen zugeschrieben, welches möglicherweise zu einer erhöhten Tumordinvasion und -migration führt und ist mit einer verminderten Überlebensrate der Patienten assoziiert (Beckner *et al.*, 2010). Da ACLY für die Produktion von Acetyl-CoA Citrat benötigt und dieses aus der reduktiven Carboxylierung von α -Ketoglutarat entsteht (Hatzivassiliou *et al.*, 2005), wobei diese Reaktion wiederum von der IDH1 katalysiert wird, ist eine Interaktion von ACLY mit IDH1 auch durch die Nähe beider Proteine im Zellmetabolismus plausibel.

Die hier durchgeführte Detektion und Analyse potenzieller Interaktoren der wild-typischen bzw. mutierten IDH1 führte zu keinen differenziell interagierenden Proteinen zwischen den IDH1 Isoformen. Es konnten allerdings generelle Interaktionen der IDH1 mit Proteingruppen detektiert werden, welche Prozesse repräsentieren, die zum Proteinmetabolismus und somit zum Lebenszyklus eines Proteins gehören. Außerdem lässt die Interaktionsanalyse darauf schließen, dass beide Isoformen der IDH1 keine starken Interaktionen eingehen und in keinem dauerhaften funktionellen Komplex agieren.

5.4 Quantitative und differenzielle Proteomanalyse der U87MG Zelllinie

5.4.1 Methodische Aspekte

Um eine umfassende Charakterisierung des Proteoms der U87MG Zelllinie unter Berücksichtigung der IDH1 Mutation zu bekommen, wurde die markierungsfreie Quantifizierung mittels Massenspektrometrie verwendet (Silva *et al.*, 2005). Als Goldstandard für die Analyse von komplexen Proben gilt auch heute noch der peptidbasierte (*bottom up*) Ansatz (Megger *et al.*, 2013). Die gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung der Proben ist ein wichtiger Vorteil dieser Methodik. Die markierungsfreie Quantifizierung wurde gewählt, da hier keine weitere Manipulation der Analyten nötig ist, beispielsweise im Gegensatz zum Einbringen von schweren Aminosäuren (SILAC) oder einer Dimethyl-Markierung (chemische Modifikation).

In dieser Studie konnten 3.247 Proteine identifiziert und 2.020 Proteine relativ quantifiziert werden. Jain *et al.* (2014) konnte mittels MALDI-MS 1.738 Proteine in der U87MG Gliomzelllinie identifizieren. Bei Fischer *et al.* (2010) wurden mit einem markierungsfreien Ansatz über 4.000 Proteine in der Gliomzelllinie A172 identifiziert. Somit konnte in der hier vorliegenden Arbeit mittels markierungsfreier Analyse eine durchschnittliche Anzahl an Proteinen identifiziert werden. Die tiefere Analyse der quantifizierten Proteine zeigte, dass die hochabundanten Proteine vor allem dem Zytoskelett zugehörig und für die Zellstabilisierung verantwortlich sind. Proteine mit mittlerer Abundanz, in dieser Gruppe befindet sich auch IDH1, waren vornehmlich am Metabolismus beteiligt und niedrigabundante Proteine waren zum Großteil Transkriptionsfaktoren und Proteine, welche an der Translationsregulierung und der RNA-Bindung beteiligt sind. Die Proteomanalyse von Nagaraj *et al.* (2011) zeigte eine ähnliche Verteilung abhängig von der Abundanz in einer Zervixkarzinomzelllinie, dies wird hier in Zusammenhang mit der Funktion der Proteine in der Zelle gebracht. Des Weiteren wurden die quantifizierten Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation annotiert. Hier zeigte sich eine Verteilung über viele Kompartimente der Zelle, so dass die verwendete Methode eine gute Quantifizierung von Proteinen aus unterschiedlichen Zellkompartimenten ermöglicht, unter anderem auch des Zytoplasmas, der bekannten Lokalisation der IDH1 (Geisbrecht und Gould, 1999). Die Proteinverteilung zeigte in beiden Fällen keinen signifikanten Unterschied zwischen den *IDH1* Wild-Typ und den *IDH1* Mutante überexprimierenden Zellen. Dies war zu erwarten, da beispielsweise Puchades *et al.* (2007) zeigten, in einem Vergleich zwischen der gleichen Zelllinie, in mutierter und in

wild-typischer Form von *p53*, dass keine massiven Auswirkungen auf die Proteinabundanzen detektiert wurden.

5.4.2 Biologische Diskussion

Um mögliche Unterschiede zwischen den Proteomen der beiden IDH1 Isoformen zu untersuchen, wurden in einem weiteren Analyseschritt die Proteome der *IDH1* wild-typischen bzw. mutierten U87MG Zelllinie differenziell verglichen. Ein erster Vergleich zeigte, dass das Einbringen der IDH1 Mutation keine beträchtlichen Veränderungen in den Proteinabundanzen der Gliomzelllinie hervorbringt. Es konnten 101 differenzielle Proteine zwischen beiden analysierten Zelllinien gefunden werden. Eine Analyse dieser differenziellen Proteine zeigte keine Anreicherung bestimmter biologischer Prozesse oder molekularer Funktionen. Allerdings konnten einige im Kontext der Tumorbiologie bereits beschriebenen Proteine als signifikant in ihrer Abundanz verändert gefunden werden. So konnte z.B. für die, in den *IDH1* mutierten Zellen signifikant herunterregulierte (Faktor 2,4), Acetyl-CoA-Acetyltransferase 2 (ACAT2) bereits gezeigt werden, dass bei Nierenzellkarzinomen eine erhöhte Abundanz mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Zhao *et al.*, 2016). Huang *et al.* (2017) fanden außerdem heraus, dass die Expression von ACAT2 in Brustkrebszellen zu erhöhter Proliferation und Migration führt. ACAT2 ist, wie IDH1, im Zytoplasma lokalisiert und dort an der Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA beteiligt (Cai *et al.*, 2011). Außerdem wird ACAT2 eine wichtige Rolle in der intrazellulären Cholesterinhomöostase zugeschrieben (Anderson *et al.*, 1998). Molenaar *et al.* (2014) zeigten bereits, dass Patienten, welche eine IDH1 Mutation tragen, eine bessere Überlebensrate haben als Patienten mit IDH1 wild-typischen Gliomen. Darüber hinaus wurde durch Parker *et al.* (2015) ausgeführt, dass IDH1 mutierte Tumore einen perturbierten Acetyl-CoA Metabolismus aufweisen. Dies könnte zum einen mittels Feedbackregulation durch ihr Substrat die erniedrigte zelluläre Konzentration von ACAT2 erklären, so konnte z.B. für die Glutaryl-Cystein Synthetase gezeigt werden, dass dessen Expression in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats Glutathion reguliert wird (Richman und Meister, 1975). Zum anderen könnten die Aberrationen im Acetyl-CoA Metabolismus selbst durch die veränderte Proteinexpression von ACAT2 bedingt werden, denn auf molekularer Ebene könnte die verringerte Abundanz von ACAT2 zu einer niedrigeren Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA in den IDH1 mutierten Gliomzellen führen. Diese verringerte Menge Acetoacetyl-CoA führt wiederum zu einer geringeren Verwendung der Cholesterinsynthese in

der Zelle. Rao (1995) hat bereits gezeigt, dass eine hohe Cholesterinsynthese einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation hat. Somit könnte die erniedrigte Menge an ACAT2 ein Grund für das langsamere Wachstum von IDH1 mutierten Gliomen sein.

Ein zweiter interessanter Kandidat mit tumorbiologischer Relevanz, welcher im Gegensatz zu ACAT2 eine signifikante Hochregulation (Faktor 1,9) in den *IDH1* mutierten U87MG Zellen zeigt, ist die Aldolase A (ALDOA). ALDOA ist im Zytoplasma lokalisiert und übernimmt durch die reversible Umwandlung von Fructose-1,6-Biphosphat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton eine wichtige Rolle in der Glykolyse und der Gluconeogenese (Du *et al.*, 2014). Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass ALDOA eine hohe Expression in unterschiedlichen malignen Tumoren, wie Lungenkarzinomen (Du *et al.*, 2014), Osteosarkomen (Chen *et al.*, 2014), kolorektalen Karzinomen (Peng *et al.*, 2012) und Leberzellkarzinomen (Hamaguchi *et al.*, 2008), aufweist. Auch für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom wird ALDOA mit der Tumorgenese in Zusammenhang gebracht (Zhang *et al.*, 2017a). In all diesen Studien steht eine erhöhte ALDOA Expression mit einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen in Kontext. Ein direkter Einfluss der ALDOA Hochregulation in IDH1 mutierten Zellen auf eine mögliche veränderte Proliferation kann anscheinend nicht hergestellt werden, da bekannt ist, dass IDH1 mutierte Zellen eine geringere Proliferation aufweisen (Bralten *et al.*, 2011). Möglicherweise werden nach IDH1 Mutation andere Faktoren beeinflusst, die der gesteigerten Proliferation nach ALDOA Hochregulation entgegenwirken. Die IDH1 Mutation ist bekannt als frühe Veränderung während der Entstehung von Gliomen (Watanabe *et al.*, 2009), so dass die erhöhte ALDOA Menge in den IDH1 mutierten Gliomzellen möglicherweise einen Anteil an der onkogenen Eigenschaft der IDH1 Mutation hat.

Auf Gewebeebene führte der Vergleich von mikrodissektierten Glioblastomproben mit und ohne IDH1 Mutation zu einer Identifizierung von 130 Proteinen mit signifikantem Abundanzunterschied (Stefanski, 2014). Ein Vergleich dieser differenziellen Kandidaten mit den hier identifizierten Proteinen führte zu keiner Übereinstimmung. Dies könnte an dem gewählten Reexpressionsmodell liegen. Obwohl gezeigt werden konnte, dass nach Transfektion mit R132H mutierter *IDH1*, durch Produktion von 2-HG, ein Funktionsgewinn nachweisbar ist, könnte möglicherweise der genetische Hintergrund, durch die Reexpression der IDH1 in einer Glioblastomzelllinie, einen Grund darstellen. Auch die Dauer der Kultivierung der IDH1 mutierten Zellen könnte dazu beitragen, da die Mutation in Tumoren von Patienten monatelang Einfluss auf das Proteom nimmt, die Zellen allerdings nur wenige Tage kultiviert werden. Solide Tumore entstehen in einem Gewebeverband, der sich schlecht

in der Zellkultur nachstellen lässt. So befinden sie sich in ständiger Interaktion mit ihrer Umgebung und bilden eine sogenannte Tumornische. Die Tumorzellen stehen hier innerhalb des Gewebes mit anderen Zellen über Sekretion oder Zell-Zell-Kommunikation in Kontakt, so dass andere Prozesse ablaufen als in einem zelllinienbasierten System, in dem die Mikroumgebung durch andere Gewebezellen nicht gegeben ist (Calabrese *et al.*, 2007; Sneddon und Werb, 2007).

Die in dieser Arbeit durchgeführte differenzielle Studie zwischen den IDH1 wild-typischen bzw. mutierten Gliomzellen zeigt zum einen, dass das Einbringen der IDH1 Mutation keine globalen Auswirkungen auf die Proteinabundanzen in den Zellen hat. Außerdem wurden mögliche differenzielle Kandidaten detektiert, welche im Fall der geringeren Expression von ACAT2 in den IDH1 mutierten Zellen einen Hinweis auf einen Mechanismus, der zu einer geringeren Aggressivität der Tumore führt, geben könnten und zum anderen die erhöhte ALDOA Expression in den IDH1 mutierten Zellen, welche für den onkogenen Einfluss der IDH1 Mutation zu Beginn der Tumorgenese sprechen könnte.

5.5 Differentielle Proteomanalyse der neuralen Stamm- und Vorläuferzellen

Da die IDH1 Mutation ein frühes Ereignis in der Entstehung von Gliomen ist (Suzuki *et al.*, 2015) wurde ein Modellsystem neuraler Stamm- und Vorläuferzellen, bei dem die Expression von wild-typischer und mutierter *IDH1* über eine Tamoxifen sensitive Cre-Rekombinase induziert wurde, gewählt. Ein ähnliches Modell wurde von Chen *et al.* (2008) verwendet, um Unterschiede in der Verteilung eines Östrogen-Rezeptors zwischen jungen und adulten Mäusen zu analysieren. Außerdem wird diese Methode häufig für die Analyse von Tumoren verwendet, da humanes Patientenmaterial mitunter schwer zugänglich ist und die molekularbiologischen Merkmale der NSC/NPCs denen der humanen Tumorzellen stark ähneln (Holland, 2001; Visvader, 2011).

Bislang wurden die NSC/NPCs, welche die wild-typische bzw. mutierte *IDH1* exprimieren, noch nicht proteomisch charakterisiert, weshalb in dieser Arbeit zunächst eine markierungsfreie Quantifizierung der Zellen vorgenommen wurde. In dieser Studie konnten 3.576 Proteine identifiziert und anschließend quantifiziert werden. In proteomischen Charakterisierungen von murinen oder humanen embryonalen Stammzellen konnte eine vergleichbare Anzahl von Proteinen (ca. 4.000 Proteine) quantifiziert werden (Chaerkady *et al.*, 2011; Graumann *et al.*, 2008). Obwohl die Expression und auch die funktionelle Aktivität

der mutierten IDH1 in den NSC/NPCs nachgewiesen werden konnte (persönliche Kommunikation mit Dr. Christiane Knobbe-Thomsen), zeigte die differentielle Proteomanalyse, dass die Mutation der IDH1 keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtproteom hat und bestätigt damit den Befund der Proteomanalyse der U87MG Zellen. Eine Analyse der zellulären Lokalisation der quantifizierten Proteine wies eine ähnliche Verteilung wie die quantifizierten Proteine der U87MG Zelllinie auf, beispielsweise wurden in beiden Fällen ca. 50 % der Proteine dem Zytoplasma und ca. 43 % dem Nukleus zugeordnet. Um einen genaueren Einblick in die biologischen Prozesse zu bekommen, in welche die quantifizierten Proteine involviert sind, wurden die Daten mittels Netzwerk- und Anreicherungsanalysen näher untersucht. Es zeigte sich, dass, neben Prozessen des Zellmetabolismus und der Proteinbiosynthese, im Gegensatz zur Analyse der angereicherten Prozesse im U87MG Proteom, auch einige mit Stammzellen assoziierte Prozesse, wie Zelldifferenzierung oder Zellteilung, angereichert waren. Diese Prozesse sind typisch für die kanonischen Funktionen von Stammzellen (Yun *et al.*, 2010). Sowohl die Analyse der zellulären Lokalisation der Proteine als auch die Untersuchung der biologischen Prozesse zeigten, wie bei der Proteomanalyse der U87MG Zellen, keine signifikanten Unterschiede zwischen den IDH1 wild-typischen und den mutierten NSC/NPCs. Auch eine durchgeführte differenzielle Analyse zwischen den Proteinabundanz der beiden IDH1 Isoformen brachte keine signifikanten Expressionsunterschiede einzelner Proteine zwischen den beiden Gruppen hervor. Grundsätzlich können hierfür dieselben Erklärungen wie bei der differentiellen Proteomanalyse der U87MG Gliomzelllinie zugrunde liegen (5.4.2). Ein weiterer denkbarer Grund ist die durch Tamoxifen induzierte Expressionsdauer der IDH1, möglicherweise ist diese zu kurz, um weitreichende Effekte auf der Proteinebene zu erzeugen.

Insgesamt zeigte diese Studie, dass, obwohl eine Vielzahl an Proteinen aus den verschiedensten zellulären Kompartimenten via LC-MS/MS Analyse identifiziert werden konnten, mutiertes IDH1 keinen nachweisbaren Einfluss auf die neuralen Stamm- und Vorläuferzellen hat.

5.6 Differenzielle Phosphoproteomanalyse der neuralen Stamm- und Vorläuferzellen

Da die quantitative Proteomanalyse wiederholt gezeigt hat, dass die Anwesenheit der funktionell aktiven mutierten IDH1 keine oder nur geringe Veränderungen des Gesamtproteoms hervorruft, besteht mit der Analyse des Phosphoproteoms die Möglichkeit

Aussagen über eventuelle Aktivitätsveränderungen der Proteine oder beteiligte Signalwege im Hinblick auf die IDH1 Mutation zu treffen (Hunter, 2000).

5.6.1 Methodische Aspekte

Da Phosphorylierungen reversible Modifikationen sind und nicht alle Proteine eine Phosphorylierung tragen und somit substöchiometrisch vorliegen (Cohen, 2002; Hubbard und Cohen, 1993), ist für die Analyse des Phosphorylierungsmusters einer komplexen Probe eine Anreicherung der phosphorylierten Peptide erforderlich. In dieser Arbeit wurde eine Vorfraktionierung mit anschließender Anreicherung der phosphorylierten Peptide für die Phosphoproteomanalyse verwendet, da sie zu einer hohen Ausbeute an Phosphopeptiden führt (Zhao und Jensen, 2009). In Vortests konnte gezeigt werden, dass neben der Verringerung der Probenkomplexität, auch bereits eine deutliche Anreicherung der phosphorylierten Peptide in einer Fraktion erzielt werden konnte, so dass nur drei Fraktionen generiert werden mussten. Bath *et al.* (2018) verwenden für die Phosphoproteomanalyse komplexer Proben bis zu 60 Fraktionen, allerdings steigen hierdurch die benötigte Probenmenge und die Messzeit massiv. Die Erhöhung der einzusetzenden Menge ist eine weitere Möglichkeit die Anzahl an identifizierten phosphorylierten Peptiden zu erhöhen, Pines *et al.* (2011) setzten beispielsweise bis zu 10 mg Protein pro Probe ein. Da die NSC/NPCs nur zeitlich begrenzt kultiviert und expandiert werden können, war hier jedoch der Einsatz von mehr als 1 mg Protein nicht möglich. Die Fraktionierung wurde für diese Arbeit mit einem weiteren Anreicherungsschritt über magnetische Titandioxid Partikel für die phosphorylierten Peptide gekoppelt. In der Literatur werden häufig *immobilized metal ion affinity chromatography* (IMAC) oder *metal oxide affinity chromatography* (MOAC, beispielsweise TiO₂) genannt (Larsen *et al.*, 2005). Bei beiden Methoden binden die phosphorylierten Peptide aufgrund ihrer negativen Ladung an das Trägermaterial und werden anschließend eluiert. MOAC basierte Methoden besitzen eine höhere Selektivität und Kapazität für Phosphopeptide (Larsen *et al.*, 2005), die Verwendung von IMAC wiederum führt zu einer höheren Identifizierung von multiphosphorylierten Peptiden (Jensen und Larsen, 2007).

In dieser Studie konnten somit insgesamt 6.260 Phosphorylierungsstellen an 5.294 Peptiden identifiziert werden, welche sich auf 1.887 Proteine verteilen. Eine Phosphorylierung der IDH1 konnte in dieser globalen Phosphoproteomanalyse nicht identifiziert werden. Dies weist auf die Notwendigkeit der Immunpräzipitation für eine umfassende Beschreibung der posttranslationalen Modifikation eines bestimmten Zielproteins hin. Eine Analyse der

Verteilung der Phosphorylierungen auf die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin zeigte sowohl für die IDH1 wild-typischen NSC/NPCs als auch für die IDH1 mutierten NSC/NPCs eine gleiche Aufteilung: ~95 % Serine, ~5 % Threonine und ~1 % Tyrosine, dies entspricht in etwa der in der Literatur bekannten Verteilung (Ding *et al.*, 2007). Jensen und Larsen (2007) haben bereits gezeigt, dass die Verwendung von Titandioxid Partikeln für die Anreicherung von Phosphopeptiden zu einer überproportionalen Identifizierung von monophosphorylierten Peptiden führt. Auch dies spiegelt sich in der Analyse der NSC/NPCs, bezüglich der Anzahl an mono-, di- und triphosphorylierten Peptiden, wider: 59 % monophosphorylierte Peptide, 37 % diphosphorylierte Peptide und 4 % triphosphorylierte Peptide. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die stärkere Bindung der multiphosphorylierten Peptide an das Trägermaterial, so dass die Peptide bei der späteren Elution nicht mehr von dem Trägermaterial gelöst werden können.

5.6.2 Biologische Diskussion

Die Analyse der Phosphoproteine, welche jeweils exklusiv für die IDH1 wild-typischen oder mutierten NSC/NPCs identifiziert wurden, zeigte, dass 356 (18,6 %) Phosphoproteine ausschließlich in den IDH1 wild-typischen NSC/NPCs identifiziert wurden und 184 (9,6 %) nur in den IDH1 mutierten Zellen. Innerhalb der ausschließlich in den *IDH1* mutierten NSC/NPCs detektierten phosphorylierten Proteinisofomen zeigte eine Untersuchung der biologischen Prozesse eine signifikante Anreicherung von Proteinen, die in die Bindung von p53 involviert sind. Insgesamt konnten vier Proteine dieser Gruppe zugeordnet werden: Mdm2 (E3 Ubiquitin-Protein Ligase 2), Ep300 (E1A bindendes Protein p300), Noc21 (Nukleolar Komplex Protein 2) und Chd8 (Chromodomäne DNA bindendes Protein 8). Sowohl Mdm2 als auch Chd8 sind beschriebene negative Regulatoren des Tumorsuppressors p53 (Nishiyama *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008). Die Aktivität von p53 schützt den Organismus durch programmierten Zelltod oder Zellzyklusarrest vor genomischer Instabilität durch beispielsweise DNA-Schäden. Eine verminderte Aktivität oder der Verlust von p53 erhöht somit das Risiko der Zellentartung und der Entstehung von malignen Zellen (Attardi und Jacks, 1999). Watanabe *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die IDH1 Mutation bereits vor einer Mutation von p53 auftritt, welche in ca. 65 % der niedriggradigen IDH1 mutierten Tumore vorkommt, und somit eine Rolle als onkogener Treiber in der frühen Phase der Tumorgenese nahelegt. Nishiyama *et al.* (2009) konnten zeigen, dass Chd8 an p53 bindet und so dessen Aktivierung verhindert. Ein Zusammenhang zwischen der Chd8 Aktivierung und dessen Phosphorylierung ist bislang zwar nicht beschrieben, jedoch ist im Hinblick auf die

regulatorischen Effekte durch Phosphorylierungen (Hunter, 2000) eine Aktivitätsveränderung durch diese durchaus denkbar. Mit Mdm2 ist hingegen ein Protein in seiner phosphorylierten Variante detektiert worden, welches für die Ubiquitinylierung von p53 verantwortlich ist, welche wiederum zum Abbau von p53 über das Proteasom führt (Haupt *et al.*, 1997). Für die humane Mdm2 ist bereits bekannt, dass eine Phosphorylierung am Serin 166 die Ubiquitinylierung von p53 aktiviert und somit dessen Abbau einleitet (Amato *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte eine, exklusiv in den IDH1 mutierten murinen neuralen Stamm- und Vorläuferzellen, auftretende Phosphorylierung der Mdm2 am Serin 183 detektiert werden. Durch die große Homologie (86 % Sequenzübereinstimmung) zwischen der humanen und murinen Variante und der ähnlichen Region innerhalb der Proteinsequenz könnte diese Phosphorylierung möglicherweise einen ähnlichen Effekt wie die S166 Phosphorylierung in humanem Material haben, zur Aktivierung der Mdm2 führen und so zur negativen Regulierung von p53. Molenaar *et al.* (2014) weisen darauf hin, dass das Auftreten der IDH1 Mutation zu einer verringerten NADPH Menge in den Zellen führt und dies wiederum gesteigerte ROS-Konzentrationen hervorruft. Zudem konnten Son *et al.* (2012) darlegen, dass ROS, wahrscheinlich durch Oxidation, die Aktivierung verschiedener Kinasen zur Folge haben kann. Somit könnte das frühe Auftreten der IDH1 Mutation während der Entstehung von Gliomen, durch veränderte NADPH und daraus resultierenden veränderten ROS Mengen ein aberrantes Phosphorylierungsmuster herbeiführen. Im Falle der Mdm2 und Chd8 könnte dies zu deren Aktivierung und in der Folge zu einer negativen Regulierung von p53 führen (Abbildung 30). Auf diese Weise könnte die frühe Mutation der IDH1, unabhängig von 2-HG, einen ähnlichen Effekt wie die p53 Mutation bereits vor deren Auftreten in der Tumorgenese hervorrufen.

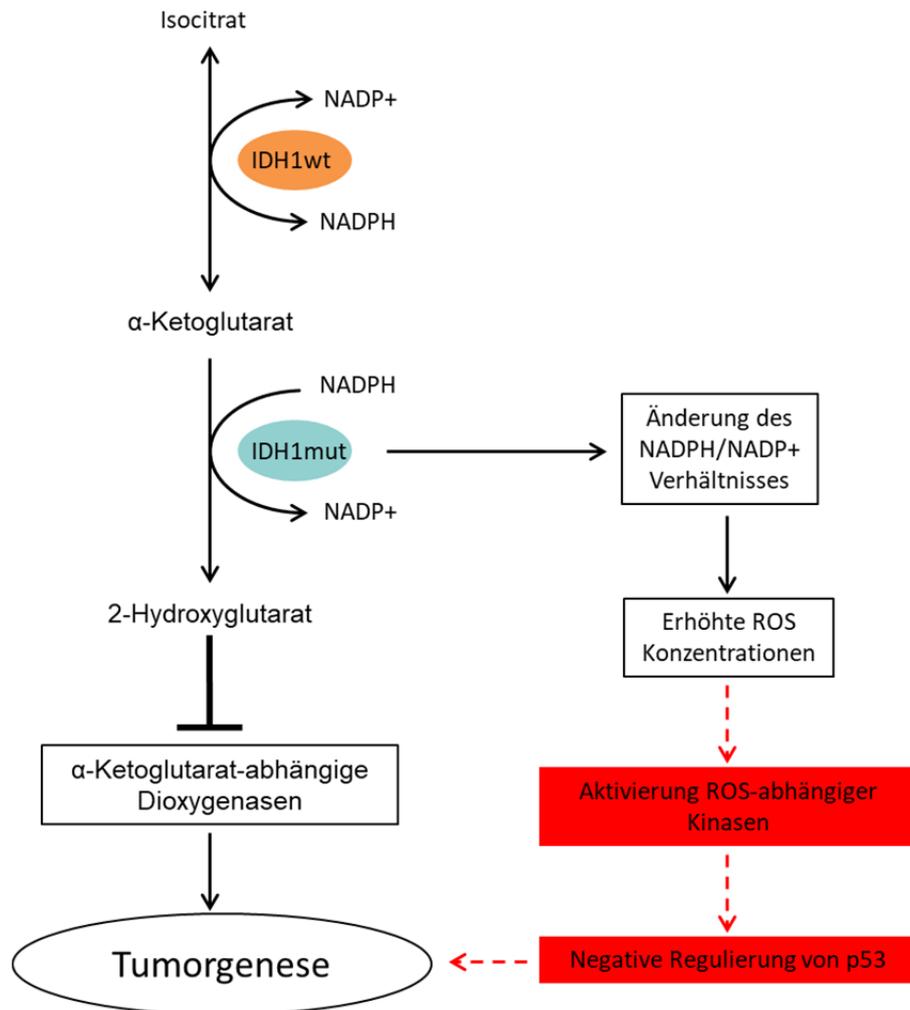


Abbildung 30: Mögliche negative Regulierung von p53 durch IDH1 Mutation induzierte Phosphorylierungen. Durch die IDH1 Mutation veränderte NADPH und ROS Mengen könnten über die Aktivierung von Kinasen zur Phosphorylierung p53-bindender Proteine führen. Auf diese Weise wird p53 möglicherweise in seiner Funktion inhibiert und dadurch ein onkogener Effekt, ähnlich der in der Tumorgene später auftretenden p53 Mutation, bewirkt. Die aufgestellte Hypothese ist in Rot dargestellt.

5.7 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe der Proteomanalyse gezeigt werden, dass die Expression von mutierter IDH1 unter Zellkulturbedingungen sowohl in der Gliomzelllinie U87MG, als auch in den neuralen Stamm- und Vorläuferzellen einen geringen nachweisbaren Einfluss auf das Gesamtproteom hat. Ebenso lassen die vergleichbaren Interaktome der beiden IDH1-Isoformen vermuten, dass die mutierte IDH1 scheinbar keine alternative Funktion als die bisher beschriebene veränderte enzymatische Aktivität hat. Demnach legen die gefundenen Unterschiede auf Ebene des Phosphoproteoms und die daraus abgeleitete Hypothese der Phosphorylierung von p53 Inhibitoren eine indirekte Rolle der mutierten IDH1

aufgrund der veränderten Enzymaktivität und der damit assoziierten veränderten ROS-Konzentrationen nahe. Um die bisher unklaren Funktionszusammenhänge der mutierten IDH1, die unabhängig von der Funktion des Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat sind, interpretieren zu können, sollten in Zukunft die Veränderungen auf Ebene der Redox-Regulation im Fokus des Interesse stehen. Aus diesem Grund sollte zum einen die Rolle der ROS-induzierten Aktivierung von Kinasen näher analysiert werden und zum anderen sollten ROS-abhängige Signalwege untersucht werden. Die veränderte Redox-Homöostase könnte zudem die gegensinnige Rolle der mutierten IDH1 hinsichtlich ihres frühen Auftretens während der Tumorgenese durch Inhibierung von p53, sowie durch Apoptose der Tumorzellen in Folge der Erhöhung der ROS-Konzentration durch Chemo- und Radiotherapie während der Behandlung von Patienten erklären.

6 Literatur

- Aebersold, R. und Mann, M. (2003). **Mass spectrometry-based proteomics**. *Nature* 422, 198-207, doi: 10.1038/nature01511.
- Al-Hajj, M. und Clarke, M. F. (2004). **Self-renewal and solid tumor stem cells**. *Oncogene* 23, 7274-7282, doi: 10.1038/sj.onc.1207947.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. und Clarke, M. F. (2003). **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988, doi: 10.1073/pnas.0530291100.
- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C. H., Jackson, E. L., Li, Y., Burns, D. K., Alvarez-Buylla, A. und Parada, L. F. (2009). **Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model**. *Cancer Cell* 15, 45-56, doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.006.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R. und Mirsky, A. E. (1964). **Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.
- Alpert, A. J. (1990). **Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds**. *J Chromatogr* 499, 177-196.
- Amato, R., D'Antona, L., Porciatti, G., Agosti, V., Menniti, M., Rinaldo, C., Costa, N., Bellacchio, E., Mattarocci, S., Fuiano, G., Soddu, S., Paggi, M. G., Lang, F. und Perrotti, N. (2009). **Sgk1 activates MDM2-dependent p53 degradation and affects cell proliferation, survival, and differentiation**. *J Mol Med (Berl)* 87, 1221-1239, doi: 10.1007/s00109-009-0525-5.
- Anderson, L. und Hunter, C. L. (2006). **Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins**. *Mol Cell Proteomics* 5, 573-588, doi: 10.1074/mcp.M500331-MCP200.
- Anderson, N. G. und Anderson, N. L. (1996). **Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future**. *Electrophoresis* 17, 443-453, doi: 10.1002/elps.1150170303.
- Anderson, R. A., Joyce, C., Davis, M., Reagan, J. W., Clark, M., Shelness, G. S. und Rudel, L. L. (1998). **Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates**. *J Biol Chem* 273, 26747-26754.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. und Sherlock, G. (2000). **Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium**. *Nat Genet* 25, 25-29, doi: 10.1038/75556.
- Atai, N. A., Renkema-Mills, N. A., Bosman, J., Schmidt, N., Rijkeboer, D., Tigchelaar, W., Bosch, K. S., Troost, D., Jonker, A., Bleeker, F. E., Miletic, H., Bjerkvig, R., De Witt Hamer, P. C. und Van Noorden, C. J. (2011). **Differential activity of NADPH-producing dehydrogenases renders rodents unsuitable models to study IDH1R132 mutation effects in human glioblastoma**. *J Histochem Cytochem* 59, 489-503, doi: 10.1369/0022155411400606.
- Attardi, L. D. und Jacks, T. (1999). **The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models**. *Cell Mol Life Sci* 55, 48-63, doi: 10.1007/s000180050269.
- Bai, Y., Markham, K., Chen, F., Weerasekera, R., Watts, J., Horne, P., Wakutani, Y., Bagshaw, R., Mathews, P. M., Fraser, P. E., Westaway, D., St George-Hyslop, P. und Schmitt-Ulms, G. (2008). **The in vivo brain interactome of the amyloid precursor protein**. *Mol Cell Proteomics* 7, 15-34, doi: 10.1074/mcp.M700077-MCP200.
- Ballif, B. A., Villen, J., Beausoleil, S. A., Schwartz, D. und Gygi, S. P. (2004). **Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain**. *Mol Cell Proteomics* 3, 1093-1101, doi: 10.1074/mcp.M400085-MCP200.
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C. und von Deimling, A. (2008). **Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors**. *Acta Neuropathol* 116, 597-602, doi: 10.1007/s00401-008-0455-2.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. und Kuster, B. (2007). **Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review**. *Anal Bioanal Chem* 389, 1017-1031, doi: 10.1007/s00216-007-1486-6.

- Batth, T. S., Papetti, M., Pfeiffer, A., Tollenaere, M. A. X., Francavilla, C. und Olsen, J. V. (2018). **Large-Scale Phosphoproteomics Reveals Shp-2 Phosphatase-Dependent Regulators of Pdgf Receptor Signaling.** *Cell Rep* 22, 2784-2796, doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.038.
- Beck, M., Schmidt, A., Malmstroem, J., Claassen, M., Ori, A., Szymborska, A., Herzog, F., Rinner, O., Ellenberg, J. und Aebersold, R. (2011). **The quantitative proteome of a human cell line.** *Mol Syst Biol* 7, 549, doi: 10.1038/msb.2011.82.
- Beckner, M. E., Fellows-Mayle, W., Zhang, Z., Agostino, N. R., Kant, J. A., Day, B. W. und Pollack, I. F. (2010). **Identification of ATP citrate lyase as a positive regulator of glycolytic function in glioblastomas.** *Int J Cancer* 126, 2282-2295, doi: 10.1002/ijc.24918.
- Bessarabova, M., Ishkin, A., JeBailey, L., Nikolskaya, T. und Nikolsky, Y. (2012). **Knowledge-based analysis of proteomics data.** *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 16, S13, doi: 10.1186/1471-2105-13-S16-S13.
- Bian, Y., Song, C., Cheng, K., Dong, M., Wang, F., Huang, J., Sun, D., Wang, L., Ye, M. und Zou, H. (2014). **An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome.** *J Proteomics* 96, 253-262, doi: 10.1016/j.jprot.2013.11.014.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W. H., Pages, F., Trajanoski, Z. und Galon, J. (2009). **ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks.** *Bioinformatics* 25, 1091-1093, doi: 10.1093/bioinformatics/btp101.
- Blake, J. A. und Harris, M. A. (2008). **The Gene Ontology (GO) project: structured vocabularies for molecular biology and their application to genome and expression analysis.** *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 7*, Unit 7 2, doi: 10.1002/0471250953.bi0702s23.
- Bleeker, F. E., Atai, N. A., Lamba, S., Jonker, A., Rijkeboer, D., Bosch, K. S., Tigchelaar, W., Troost, D., Vandertop, W. P., Bardelli, A. und Van Noorden, C. J. (2010). **The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma.** *Acta Neuropathol* 119, 487-494, doi: 10.1007/s00401-010-0645-6.
- Bralten, L. B., Kloosterhof, N. K., Balvers, R., Sacchetti, A., Lapre, L., Lamfers, M., Leenstra, S., de Jonge, H., Kros, J. M., Jansen, E. E., Struys, E. A., Jakobs, C., Salomons, G. S., Diks, S. H., Peppelenbosch, M., Kremer, A., Hoogenraad, C. C., Smitt, P. A. und French, P. J. (2011). **IDH1 R132H decreases proliferation of glioma cell lines in vitro and in vivo.** *Ann Neurol* 69, 455-463, doi: 10.1002/ana.22390.
- Breitkopf, S. B., Yang, X., Begley, M. J., Kulkarni, M., Chiu, Y. H., Turke, A. B., Lauriol, J., Yuan, M., Qi, J., Engelman, J. A., Hong, P., Kontaridis, M. I., Cantley, L. C., Perrimon, N. und Asara, J. M. (2016). **A Cross-Species Study of PI3K Protein-Protein Interactions Reveals the Direct Interaction of P85 and SHP2.** *Sci Rep* 6, 20471, doi: 10.1038/srep20471.
- Cai, L., Sutter, B. M., Li, B. und Tu, B. P. (2011). **Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes.** *Mol Cell* 42, 426-437, doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.004.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I. T., Zakharenko, S. S., Gajjar, A., Davidoff, A. und Gilbertson, R. J. (2007). **A perivascular niche for brain tumor stem cells.** *Cancer Cell* 11, 69-82, doi: 10.1016/j.ccr.2006.11.020.
- Catherman, A. D., Skinner, O. S. und Kelleher, N. L. (2014). **Top Down proteomics: facts and perspectives.** *Biochem Biophys Res Commun* 445, 683-693, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.041.
- Chaerkady, R., Letzen, B., Renuse, S., Sahasrabudhe, N. A., Kumar, P., All, A. H., Thakor, N. V., Delanghe, B., Gearhart, J. D., Pandey, A. und Kerr, C. L. (2011). **Quantitative temporal proteomic analysis of human embryonic stem cell differentiation into oligodendrocyte progenitor cells.** *Proteomics* 11, 4007-4020, doi: 10.1002/pmic.201100107.
- Chen, X., Yang, T. T., Zhou, Y., Wang, W., Qiu, X. C., Gao, J., Li, C. X., Long, H., Ma, B. A., Ma, Q., Zhang, X. Z., Yang, L. J. und Fan, Q. Y. (2014). **Proteomic profiling of osteosarcoma cells identifies ALDOA and SULT1A3 as negative survival markers of human osteosarcoma.** *Mol Carcinog* 53, 138-144, doi: 10.1002/mc.21957.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V. und Mann, M. (2009). **Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions.** *Science* 325, 834-840, doi: 10.1126/science.1175371.

- Choudhary, J. und Grant, S. G. (2004). **Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning**. *Nat Neurosci* 7, 440-445, doi: 10.1038/nn1240.
- Chowdhury, R., Yeoh, K. K., Tian, Y. M., Hillringhaus, L., Bagg, E. A., Rose, N. R., Leung, I. K., Li, X. S., Woon, E. C., Yang, M., McDonough, M. A., King, O. N., Clifton, I. J., Klose, R. J., Claridge, T. D., Ratcliffe, P. J., Schofield, C. J. und Kawamura, A. (2011). **The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases**. *EMBO Rep* 12, 463-469, doi: 10.1038/embor.2011.43.
- Clark, O., Yen, K. und Mellingshoff, I. K. (2016). **Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer**. *Clin Cancer Res* 22, 1837-1842, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1333.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. und Wahl, G. M. (2006). **Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells**. *Cancer Res* 66, 9339-9344, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126.
- Clevenger, C. V. (2004). **Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer**. *Am J Pathol* 165, 1449-1460, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63403-7.
- Coffill, C. R., Muller, P. A., Oh, H. K., Neo, S. P., Hogue, K. A., Cheok, C. F., Vousden, K. H., Lane, D. P., Blackstock, W. P. und Gunaratne, J. (2012). **Mutant p53 interactome identifies nardilysin as a p53R273H-specific binding partner that promotes invasion**. *EMBO Rep* 13, 638-644, doi: 10.1038/embor.2012.74.
- Cohen, P. (2002). **The origins of protein phosphorylation**. *Nat Cell Biol* 4, E127-130, doi: 10.1038/ncb0502-e127.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Lupianez, J. A. und del Rio, L. A. (1999). **Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence**. *Plant Physiol* 121, 921-928.
- Cox, J. und Mann, M. (2008). **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification**. *Nat Biotechnol* 26, 1367-1372, doi: 10.1038/nbt.1511.
- Cox, J. und Mann, M. (2011). **Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology**. *Annu Rev Biochem* 80, 273-299, doi: 10.1146/annurev-biochem-061308-093216.
- Crockett, D. K., Lin, Z., Elenitoba-Johnson, K. S. und Lim, M. S. (2004). **Identification of NPM-ALK interacting proteins by tandem mass spectrometry**. *Oncogene* 23, 2617-2629, doi: 10.1038/sj.onc.1207398.
- Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liau, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., Vander Heiden, M. G. und Su, S. M. (2009). **Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate**. *Nature* 462, 739-744, doi: 10.1038/nature08617.
- Dick, J. E. (2008). **Stem cell concepts renew cancer research**. *Blood* 112, 4793-4807, doi: 10.1182/blood-2008-08-077941.
- Ding, S. J., Qian, W. J. und Smith, R. D. (2007). **Quantitative proteomic approaches for studying phosphotyrosine signaling**. *Expert Rev Proteomics* 4, 13-23, doi: 10.1586/14789450.4.1.13.
- Du, S., Guan, Z., Hao, L., Song, Y., Wang, L., Gong, L., Liu, L., Qi, X., Hou, Z. und Shao, S. (2014). **Fructose-bisphosphate aldolase a is a potential metastasis-associated marker of lung squamous cell carcinoma and promotes lung cell tumorigenesis and migration**. *PLoS One* 9, e85804, doi: 10.1371/journal.pone.0085804.
- Eng, J. K., McCormack, A. L. und Yates, J. R. (1994). **An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database**. *J Am Soc Mass Spectrom* 5, 976-989, doi: 10.1016/1044-0305(94)80016-2.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. und Whitehouse, C. M. (1989). **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules**. *Science* 246, 64-71.
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A. und Bolanos, J. P. (2012). **Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes**. *Biochem J* 443, 3-11, doi: 10.1042/BJ20111943.
- Fidler, I. J. und Hart, I. R. (1982). **Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications**. *Science* 217, 998-1003.

- Figuerola, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H. F., Tallman, M. S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J. K., Liu, W., Choe, S. E., Fantin, V. R., Paietta, E., Lowenberg, B., Licht, J. D., Godley, L. A., Delwel, R., Valk, P. J., Thompson, C. B., Levine, R. L. und Melnick, A. (2010). **Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation.** *Cancer Cell* 18, 553-567, doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.015.
- Fischer Jde, S., Liao, L., Carvalho, P. C., Barbosa, V. C., Domont, G. B., Carvalho Mda, G. und Yates, J. R., 3rd (2010). **Dynamic proteomic overview of glioblastoma cells (A172) exposed to perillyl alcohol.** *J Proteomics* 73, 1018-1027, doi: 10.1016/j.jprot.2010.01.003.
- Freitag, J., Ast, J. und Bolker, M. (2012). **Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi.** *Nature* 485, 522-525, doi: 10.1038/nature11051.
- Frescas, D., Guardavaccaro, D., Bassermann, F., Koyama-Nasu, R. und Pagano, M. (2007). **JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes.** *Nature* 450, 309-313, doi: 10.1038/nature06255.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelman, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. und Superti-Furga, G. (2002). **Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes.** *Nature* 415, 141-147, doi: 10.1038/415141a.
- Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., Wisniewski, J. R. und Mann, M. (2010). **Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue.** *Nat Methods* 7, 383-385, doi: 10.1038/nmeth.1446.
- Geisbrecht, B. V. und Gould, S. J. (1999). **The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase.** *J Biol Chem* 274, 30527-30533.
- Gilbert, M. R., Liu, Y., Neltner, J., Pu, H., Morris, A., Sunkara, M., Pittman, T., Kyprianou, N. und Horbinski, C. (2014). **Autophagy and oxidative stress in gliomas with IDH1 mutations.** *Acta Neuropathol* 127, 221-233, doi: 10.1007/s00401-013-1194-6.
- Grassian, A. R., Parker, S. J., Davidson, S. M., Divakaruni, A. S., Green, C. R., Zhang, X., Slocum, K. L., Pu, M., Lin, F., Vickers, C., Joud-Caldwell, C., Chung, F., Yin, H., Handy, E. D., Straub, C., Growney, J. D., Vander Heiden, M. G., Murphy, A. N., Pagliarini, R. und Metallo, C. M. (2014). **IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism.** *Cancer Res* 74, 3317-3331, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0772-T.
- Graumann, J., Hubner, N. C., Kim, J. B., Ko, K., Moser, M., Kumar, C., Cox, J., Scholer, H. und Mann, M. (2008). **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) and proteome quantitation of mouse embryonic stem cells to a depth of 5,111 proteins.** *Mol Cell Proteomics* 7, 672-683, doi: 10.1074/mcp.M700460-MCP200.
- Hamaguchi, T., Iizuka, N., Tsunedomi, R., Hamamoto, Y., Miyamoto, T., Iida, M., Tokuhisa, Y., Sakamoto, K., Takashima, M., Tamesa, T. und Oka, M. (2008). **Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1alpha is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma.** *Int J Oncol* 33, 725-731.
- Hartmann, C., Hentschel, B., Wick, W., Capper, D., Felsberg, J., Simon, M., Westphal, M., Schackert, G., Meyermann, R., Pietsch, T., Reifenberger, G., Weller, M., Loeffler, M. und von Deimling, A. (2010). **Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas.** *Acta Neuropathol* 120, 707-718, doi: 10.1007/s00401-010-0781-z.
- Hartmann, C., Meyer, J., Balss, J., Capper, D., Mueller, W., Christians, A., Felsberg, J., Wolter, M., Mawrin, C., Wick, W., Weller, M., Herold-Mende, C., Unterberg, A., Jeuken, J. W., Wesseling, P., Reifenberger, G. und von Deimling, A. (2009). **Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and**

- age: a study of 1,010 diffuse gliomas.** *Acta Neuropathol* 118, 469-474, doi: 10.1007/s00401-009-0561-9.
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., Hingorani, S. R., Tuveson, D. A. und Thompson, C. B. (2005). **ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth.** *Cancer Cell* 8, 311-321, doi: 10.1016/j.ccr.2005.09.008.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. und Oren, M. (1997). **Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.** *Nature* 387, 296-299, doi: 10.1038/387296a0.
- Havugimana, P. C., Hart, G. T., Nepusz, T., Yang, H., Turinsky, A. L., Li, Z., Wang, P. I., Boutz, D. R., Fong, V., Phanse, S., Babu, M., Craig, S. A., Hu, P., Wan, C., Vlasblom, J., Dar, V. U., Bezginov, A., Clark, G. W., Wu, G. C., Wodak, S. J., Tillier, E. R., Paccanaro, A., Marcotte, E. M. und Emili, A. (2012). **A census of human soluble protein complexes.** *Cell* 150, 1068-1081, doi: 10.1016/j.cell.2012.08.011.
- Hayashi, S. und McMahon, A. P. (2002). **Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse.** *Dev Biol* 244, 305-318, doi: 10.1006/dbio.2002.0597.
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C. und Stupp, R. (2005). **MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.** *N Engl J Med* 352, 997-1003, doi: 10.1056/NEJMoa043331.
- Heppner, G. H. (1984). **Tumor heterogeneity.** *Cancer Res* 44, 2259-2265.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W., Figeys, D. und Tyers, M. (2002). **Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry.** *Nature* 415, 180-183, doi: 10.1038/415180a.
- Holland, E. C. (2001). **Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models.** *Nat Rev Genet* 2, 120-129, doi: 10.1038/35052535.
- Houillier, C., Wang, X., Kaloshi, G., Mokhtari, K., Guillemin, R., Laffaire, J., Paris, S., Boisselier, B., Idbaih, A., Laigle-Donadey, F., Hoang-Xuan, K., Sanson, M. und Delattre, J. Y. (2010). **IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas.** *Neurology* 75, 1560-1566, doi: 10.1212/WNL.0b013e3181f96282.
- Hsu, W. L., Oldfield, C. J., Xue, B., Meng, J., Huang, F., Romero, P., Uversky, V. N. und Dunker, A. K. (2013). **Exploring the binding diversity of intrinsically disordered proteins involved in one-to-many binding.** *Protein Sci* 22, 258-273, doi: 10.1002/pro.2207.
- Hu, H. M., O'Rourke, K., Boguski, M. S. und Dixit, V. M. (1994). **A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40.** *J Biol Chem* 269, 30069-30072.
- Huang, Y., Jin, Q., Su, M., Ji, F., Wang, N., Zhong, C., Jiang, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Yang, J., Wei, L., Chen, T. und Li, B. (2017). **Leptin promotes the migration and invasion of breast cancer cells by upregulating ACAT2.** *Cell Oncol (Dordr)* 40, 537-547, doi: 10.1007/s13402-017-0342-8.
- Hubbard, M. J. und Cohen, P. (1993). **On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation.** *Trends Biochem Sci* 18, 172-177.
- Hunter, T. (2000). **Signaling--2000 and beyond.** *Cell* 100, 113-127.
- Huttlin, E. L., Jedrychowski, M. P., Elias, J. E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S. A., Villen, J., Haas, W., Sowa, M. E. und Gygi, S. P. (2010). **A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression.** *Cell* 143, 1174-1189, doi: 10.1016/j.cell.2010.12.001.
- Ishihama, Y., Sato, T., Tabata, T., Miyamoto, N., Sagane, K., Nagasu, T. und Oda, Y. (2005). **Quantitative mouse brain proteomics using culture-derived isotope tags as internal standards.** *Nat Biotechnol* 23, 617-621, doi: 10.1038/nbt1086.

- Jain, R., Kulkarni, P., Dhali, S., Rapole, S. und Srivastava, S. (2015). **Quantitative proteomic analysis of global effect of LLL12 on U87 cell's proteome: An insight into the molecular mechanism of LLL12.** *J Proteomics* 113, 127-142, doi: 10.1016/j.jprot.2014.09.020.
- James, P., Quadroni, M., Carafoli, E. und Gonnet, G. (1993). **Protein identification by mass profile fingerprinting.** *Biochem Biophys Res Commun* 195, 58-64, doi: 10.1006/bbrc.1993.2009.
- Jensen, S. S. und Larsen, M. R. (2007). **Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 3635-3645, doi: 10.1002/rcm.3254.
- Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U. und Frisen, J. (1999). **Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system.** *Cell* 96, 25-34.
- Jovanovic, M., Rooney, M. S., Mertins, P., Przybylski, D., Chevrier, N., Satija, R., Rodriguez, E. H., Fields, A. P., Schwartz, S., Raychowdhury, R., Mumbach, M. R., Eisenhaure, T., Rabani, M., Gennert, D., Lu, D., Delorey, T., Weissman, J. S., Carr, S. A., Hacohen, N. und Regev, A. (2015). **Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens.** *Science* 347, 1259038, doi: 10.1126/science.1259038.
- Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988). **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.** *Anal Chem* 60, 2299-2301.
- Karve, T. M. und Cheema, A. K. (2011). **Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease.** *J Amino Acids* 2011, 207691, doi: 10.4061/2011/207691.
- Kerrien, S., Alam-Farouque, Y., Aranda, B., Bancarz, I., Bridge, A., Derow, C., Dimmer, E., Feuermann, M., Friedrichsen, A., Huntley, R., Kohler, C., Khadake, J., Leroy, C., Liban, A., Lieftink, C., Montecchi-Palazzi, L., Orchard, S., Risse, J., Robbe, K., Roechert, B., Thorneycroft, D., Zhang, Y., Apweiler, R. und Hermjakob, H. (2007). **IntAct—open source resource for molecular interaction data.** *Nucleic Acids Res* 35, D561-565, doi: 10.1093/nar/gkl958.
- Khatri, P., Sirota, M. und Butte, A. J. (2012). **Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges.** *PLoS Comput Biol* 8, e1002375, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002375.
- Khoury, G. A., Baliban, R. C. und Floudas, C. A. (2011). **Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database.** *Sci Rep* 1, doi: 10.1038/srep00090.
- 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. und Zhao, Y. (2006). **Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey.** *Mol Cell* 23, 607-618, doi: 10.1016/j.molcel.2006.06.026.
- Kirkpatrick, D. S., Denison, C. und Gygi, S. P. (2005). **Weighing in on ubiquitin: the expanding role of mass-spectrometry-based proteomics.** *Nat Cell Biol* 7, 750-757, doi: 10.1038/ncb0805-750.
- Klockenbusch, C., O'Hara, J. E. und Kast, J. (2012). **Advancing formaldehyde cross-linking towards quantitative proteomic applications.** *Anal Bioanal Chem* 404, 1057-1067, doi: 10.1007/s00216-012-6065-9.
- Klose, J. und Kobalz, U. (1995). **Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome.** *Electrophoresis* 16, 1034-1059.
- Knobbe, C. B., Revett, T. J., Bai, Y., Chow, V., Jeon, A. H., Bohm, C., Ehsani, S., Kislinger, T., Mount, H. T., Mak, T. W., St George-Hyslop, P. und Schmitt-Ulms, G. (2011). **Choice of biological source material supersedes oxidative stress in its influence on DJ-1 in vivo interactions with Hsp90.** *J Proteome Res* 10, 4388-4404, doi: 10.1021/pr200225c.
- Koike, S., Ogasawara, Y., Shibuya, N., Kimura, H. und Ishii, K. (2013). **Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells.** *FEBS Lett* 587, 3548-3555, doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.013.
- Koivunen, P., Lee, S., Duncan, C. G., Lopez, G., Lu, G., Ramkissoon, S., Losman, J. A., Joensuu, P., Bergmann, U., Gross, S., Travins, J., Weiss, S., Looper, R., Ligon, K. L., Verhaak, R. G., Yan,

- H. und Kaelin, W. G., Jr. (2012). **Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation.** *Nature* 483, 484-488, doi: 10.1038/nature10898.
- Kumar, C. und Mann, M. (2009). **Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets.** *FEBS Lett* 583, 1703-1712, doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.035.
- Kwon, C. H., Zhao, D., Chen, J., Alcantara, S., Li, Y., Burns, D. K., Mason, R. P., Lee, E. Y., Wu, H. und Parada, L. F. (2008). **Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas.** *Cancer Res* 68, 3286-3294, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6867.
- Laemmli, U. K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 227, 680-685.
- Lahn, M. M. und Sundell, K. L. (2004). **The role of protein kinase C-alpha (PKC-alpha) in melanoma.** *Melanoma Res* 14, 85-89.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A. und Dick, J. E. (1994). **A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice.** *Nature* 367, 645-648, doi: 10.1038/367645a0.
- Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P. und Jorgensen, T. J. (2005). **Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns.** *Mol Cell Proteomics* 4, 873-886, doi: 10.1074/mcp.T500007-MCP200.
- Larsen, M. R., Trelle, M. B., Thingholm, T. E. und Jensen, O. N. (2006). **Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry.** *Biotechniques* 40, 790-798.
- Lemeer, S. und Heck, A. J. (2009). **The phosphoproteomics data explosion.** *Curr Opin Chem Biol* 13, 414-420, doi: 10.1016/j.cbpa.2009.06.022.
- Li, S., Chou, A. P., Chen, W., Chen, R., Deng, Y., Phillips, H. S., Selfridge, J., Zurayk, M., Lou, J. J., Everson, R. G., Wu, K. C., Faull, K. F., Cloughesy, T., Liao, L. M. und Lai, A. (2013). **Overexpression of isocitrate dehydrogenase mutant proteins renders glioma cells more sensitive to radiation.** *Neuro Oncol* 15, 57-68, doi: 10.1093/neuonc/nos261.
- Liu, A., Hou, C., Chen, H., Zong, X. und Zong, P. (2016). **Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation.** *Front Oncol* 6, 16, doi: 10.3389/fonc.2016.00016.
- Liu, H., Sadygov, R. G. und Yates, J. R., 3rd (2004). **A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics.** *Anal Chem* 76, 4193-4201, doi: 10.1021/ac0498563.
- Lottspeich, F. (2009). **Introduction to proteomics.** *Methods Mol Biol* 564, 3-10, doi: 10.1007/978-1-60761-157-8_1.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W. und Kleihues, P. (2007). **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.** *Acta Neuropathol* 114, 97-109, doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. und Ellison, D. W. (2016). **The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.** *Acta Neuropathol* 131, 803-820, doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Lovric, J. (2011). **Introducing proteomics: from concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis,** John Wiley & Sons.
- Mann, M., Hojrup, P. und Roepstorff, P. (1993). **Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases.** *Biol Mass Spectrom* 22, 338-345, doi: 10.1002/bms.1200220605.
- Mann, M. und Jensen, O. N. (2003). **Proteomic analysis of post-translational modifications.** *Nat Biotechnol* 21, 255-261, doi: 10.1038/nbt0303-255.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. und Sudarsanam, S. (2002). **The protein kinase complement of the human genome.** *Science* 298, 1912-1934, doi: 10.1126/science.1075762.
- Markham, K., Bai, Y. und Schmitt-Ulms, G. (2007). **Co-immunoprecipitations revisited: an update on experimental concepts and their implementation for sensitive interactome**

- investigations of endogenous proteins.** *Anal Bioanal Chem* 389, 461-473, doi: 10.1007/s00216-007-1385-x.
- McDonald, P. C., Oloumi, A., Mills, J., Dobрева, I., Maidan, M., Gray, V., Wederell, E. D., Bally, M. B., Foster, L. J. und Dedhar, S. (2008). **Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival.** *Cancer Res* 68, 1618-1624, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5869.
- McNulty, D. E. und Annan, R. S. (2008). **Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection.** *Mol Cell Proteomics* 7, 971-980, doi: 10.1074/mcp.M700543-MCP200.
- Megger, D. A., Bracht, T., Meyer, H. E. und Sitek, B. (2013). **Label-free quantification in clinical proteomics.** *Biochim Biophys Acta* 1834, 1581-1590, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.04.001.
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A. L., Lambert, J. P., St-Denis, N. A., Li, T., Miteva, Y. V., Hauri, S., Sardi, M. E., Low, T. Y., Halim, V. A., Bagshaw, R. D., Hubner, N. C., Al-Hakim, A., Bouchard, A., Faubert, D., Fermin, D., Dunham, W. H., Goudreault, M., Lin, Z. Y., Badillo, B. G., Pawson, T., Durocher, D., Coulombe, B., Aebersold, R., Superti-Furga, G., Colinge, J., Heck, A. J., Choi, H., Gstaiger, M., Mohammed, S., Cristea, I. M., Bennett, K. L., Washburn, M. P., Raught, B., Ewing, R. M., Gingras, A. C. und Nesvizhskii, A. I. (2013). **The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data.** *Nat Methods* 10, 730-736, doi: 10.1038/nmeth.2557.
- Molenaar, R. J., Radivoyevitch, T., Maciejewski, J. P., van Noorden, C. J. und Bleeker, F. E. (2014a). **The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation.** *Biochim Biophys Acta* 1846, 326-341, doi: 10.1016/j.bbcan.2014.05.004.
- Molenaar, R. J., Verbaan, D., Lamba, S., Zanon, C., Jeuken, J. W., Boots-Sprenger, S. H., Wesseling, P., Hulsebos, T. J., Troost, D., van Tilborg, A. A., Leenstra, S., Vandertop, W. P., Bardelli, A., van Noorden, C. J. und Bleeker, F. E. (2014b). **The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone.** *Neuro Oncol* 16, 1263-1273, doi: 10.1093/neuonc/nou005.
- Mueller, M., Martens, L. und Apweiler, R. (2007). **Annotating the human proteome: beyond establishing a parts list.** *Biochim Biophys Acta* 1774, 175-191, doi: 10.1016/j.bbapap.2006.11.011.
- Nagaraj, N., Wisniewski, J. R., Geiger, T., Cox, J., Kircher, M., Kelso, J., Paabo, S. und Mann, M. (2011). **Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line.** *Mol Syst Biol* 7, 548, doi: 10.1038/msb.2011.81.
- Neilson, K. A., Ali, N. A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., van Sluyter, S. C. und Haynes, P. A. (2011). **Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry.** *Proteomics* 11, 535-553, doi: 10.1002/pmic.201000553.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M. und Upton, S. J. (1994). **A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels.** *J Biochem Biophys Methods* 28, 239-242.
- Nicolson, G. L. (1984). **Generation of phenotypic diversity and progression in metastatic tumor cells.** *Cancer Metastasis Rev* 3, 25-42.
- Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoultschi, A. I. und Nakayama, K. I. (2009). **CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis.** *Nat Cell Biol* 11, 172-182, doi: 10.1038/ncb1831.
- Nudelman, R., Gloukhikh, E., Rekun, A. und Richter, S. (2016). **Investigation of the pH-dependence of dye-doped protein-protein interactions.** *Protein Sci* 25, 1918-1923, doi: 10.1002/pro.3021.
- Oizel, K., Gratas, C., Nadaradjane, A., Oliver, L., Vallette, F. M. und Pecqueur, C. (2015). **D-2-Hydroxyglutarate does not mimic all the IDH mutation effects, in particular the reduced etoposide-triggered apoptosis mediated by an alteration in mitochondrial NADH.** *Cell Death Dis* 6, e1704, doi: 10.1038/cddis.2015.13.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. und Mann, M. (2002). **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 1, 376-386.

- Oudard, S., Boitier, E., Miccoli, L., Rousset, S., Dutrillaux, B. und Poupon, M. F. (1997). **Gliomas are driven by glycolysis: putative roles of hexokinase, oxidative phosphorylation and mitochondrial ultrastructure**. *Anticancer Res* 17, 1903-1911.
- Pandey, A., Fernandez, M. M., Steen, H., Blagoev, B., Nielsen, M. M., Roche, S., Mann, M. und Lodish, H. F. (2000). **Identification of a novel immunoreceptor tyrosine-based activation motif-containing molecule, STAM2, by mass spectrometry and its involvement in growth factor and cytokine receptor signaling pathways**. *J Biol Chem* 275, 38633-38639, doi: 10.1074/jbc.M007849200.
- Pappin, D. J., Hojrup, P. und Bleasby, A. J. (1993). **Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting**. *Curr Biol* 3, 327-332.
- Park, J., Chen, Y., Tishkoff, D. X., Peng, C., Tan, M., Dai, L., Xie, Z., Zhang, Y., Zwaans, B. M., Skinner, M. E., Lombard, D. B. und Zhao, Y. (2013). **SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways**. *Mol Cell* 50, 919-930, doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.001.
- Parker, S. J. und Metallo, C. M. (2015). **Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations**. *Pharmacol Ther* 152, 54-62, doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.003.
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Jr., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K., Shinjo, S. M., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. und Kinzler, K. W. (2008). **An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme**. *Science* 321, 1807-1812, doi: 10.1126/science.1164382.
- Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C. S., Gangoda, L., Quek, C. Y., Williamson, N. A., Mouradov, D., Sieber, O. M., Simpson, R. J., Salim, A., Bacic, A., Hill, A. F., Stroud, D. A., Ryan, M. T., Agbinya, J. I., Mariadason, J. M., Burgess, A. W. und Mathivanan, S. (2015). **FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool**. *Proteomics* 15, 2597-2601, doi: 10.1002/pmic.201400515.
- Peng, Y., Li, X., Wu, M., Yang, J., Liu, M., Zhang, W., Xiang, B., Wang, X., Li, X., Li, G. und Shen, S. (2012). **New prognosis biomarkers identified by dynamic proteomic analysis of colorectal cancer**. *Mol Biosyst* 8, 3077-3088, doi: 10.1039/c2mb25286d.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. und Cottrell, J. S. (1999). **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data**. *Electrophoresis* 20, 3551-3567, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.
- Persson, A. I., Petritsch, C., Swartling, F. J., Itsara, M., Sim, F. J., Auvergne, R., Goldenberg, D. D., Vandenberg, S. R., Nguyen, K. N., Yakovenko, S., Ayers-Ringler, J., Nishiyama, A., Stallcup, W. B., Berger, M. S., Bergers, G., McKnight, T. R., Goldman, S. A. und Weiss, W. A. (2010). **Non-stem cell origin for oligodendroglioma**. *Cancer Cell* 18, 669-682, doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.033.
- Piaskowski, S., Bienkowski, M., Stoczynska-Fidelus, E., Stawski, R., Sieruta, M., Szybka, M., Papierz, W., Wolanczyk, M., Jaskolski, D. J., Liberski, P. P. und Rieske, P. (2011). **Glioma cells showing IDH1 mutation cannot be propagated in standard cell culture conditions**. *Br J Cancer* 104, 968-970, doi: 10.1038/bjc.2011.27.
- Pines, A., Kelstrup, C. D., Vrouwe, M. G., Puigvert, J. C., Typas, D., Misovic, B., de Groot, A., von Stechow, L., van de Water, B., Danen, E. H., Vrieling, H., Mullenders, L. H. und Olsen, J. V. (2011). **Global phosphoproteome profiling reveals unanticipated networks responsive to cisplatin treatment of embryonic stem cells**. *Mol Cell Biol* 31, 4964-4977, doi: 10.1128/MCB.05258-11.
- Rao, K. N. (1995). **The significance of the cholesterol biosynthetic pathway in cell growth and carcinogenesis (review)**. *Anticancer Res* 15, 309-314.
- Rardin, M. J., Newman, J. C., Held, J. M., Cusack, M. P., Sorensen, D. J., Li, B., Schilling, B., Mooney, S. D., Kahn, C. R., Verdin, E. und Gibson, B. W. (2013). **Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6601-6606, doi: 10.1073/pnas.1302961110.

- Reifenberger, G., Wirsching, H. G., Knobbe-Thomsen, C. B. und Weller, M. (2017). **Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy**. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 434-452, doi: 10.1038/nrclinonc.2016.204.
- Richman, P. G. und Meister, A. (1975). **Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione**. *J Biol Chem* 250, 1422-1426.
- Salomon, A. R., Ficarro, S. B., Brill, L. M., Brinker, A., Phung, Q. T., Ericson, C., Sauer, K., Brock, A., Horn, D. M., Schultz, P. G. und Peters, E. C. (2003). **Profiling of tyrosine phosphorylation pathways in human cells using mass spectrometry**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 443-448, doi: 10.1073/pnas.2436191100.
- Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K. und Delattre, J. Y. (2009). **Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas**. *J Clin Oncol* 27, 4150-4154, doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832.
- Sasaki, M., Knobbe, C. B., Munger, J. C., Lind, E. F., Brenner, D., Brustle, A., Harris, I. S., Holmes, R., Wakeham, A., Haight, J., You-Ten, A., Li, W. Y., Schalm, S., Su, S. M., Virtanen, C., Reifenberger, G., Ohashi, P. S., Barber, D. L., Figueroa, M. E., Melnick, A., Zuniga-Pflucker, J. C. und Mak, T. W. (2012). **IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics**. *Nature* 488, 656-659, doi: 10.1038/nature11323.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M. A., Ball, H. L., Bradon, N., Bosque, P. J., Crossin, K. L., Edelman, G. M., DeArmond, S. J., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (2001). **Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein**. *J Mol Biol* 314, 1209-1225, doi: 10.1006/jmbi.2000.5183.
- Schwer, B., Eckersdorff, M., Li, Y., Silva, J. C., Fermin, D., Kurtev, M. V., Giallourakis, C., Comb, M. J., Alt, F. W. und Lombard, D. B. (2009). **Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation**. *Aging Cell* 8, 604-606, doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00503.x.
- Selbach, M. und Mann, M. (2006). **Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK)**. *Nat Methods* 3, 981-983, doi: 10.1038/nmeth972.
- Senkler, J., Senkler, M., Eubel, H., Hildebrandt, T., Lengwenus, C., Schertl, P., Schwarzlander, M., Wagner, S., Wittig, I. und Braun, H. P. (2017). **The mitochondrial complexome of Arabidopsis thaliana**. *Plant J* 89, 1079-1092, doi: 10.1111/tpj.13448.
- Silva, J. C., Denny, R., Dorschel, C. A., Gorenstein, M., Kass, I. J., Li, G. Z., McKenna, T., Nold, M. J., Richardson, K., Young, P. und Geromanos, S. (2005). **Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs**. *Anal Chem* 77, 2187-2200, doi: 10.1021/ac048455k.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J. und Dirks, P. B. (2003). **Identification of a cancer stem cell in human brain tumors**. *Cancer Res* 63, 5821-5828.
- Sneddon, J. B. und Werb, Z. (2007). **Location, location, location: the cancer stem cell niche**. *Cell Stem Cell* 1, 607-611, doi: 10.1016/j.stem.2007.11.009.
- Snel, B., Lehmann, G., Bork, P. und Huynen, M. A. (2000). **STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene**. *Nucleic Acids Res* 28, 3442-3444.
- Son, Y., Cheong, Y. K., Kim, N. H., Chung, H. T., Kang, D. G. und Pae, H. O. (2011). **Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?** *J Signal Transduct* 2011, 792639, doi: 10.1155/2011/792639.
- SongTao, Q., Lei, Y., Si, G., YanQing, D., HuiXia, H., XueLin, Z., LanXiao, W. und Fei, Y. (2012). **IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma**. *Cancer Sci* 103, 269-273, doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02134.x.
- Sosa, V., Moline, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. und ME, L. L. (2013). **Oxidative stress and cancer: an overview**. *Ageing Res Rev* 12, 376-390, doi: 10.1016/j.arr.2012.10.004.
- Srere, P. A. (1959). **The citrate cleavage enzyme. I. Distribution and purification**. *J Biol Chem* 234, 2544-2547.
- Stark, C., Breitkreutz, B. J., Chatr-Aryamontri, A., Boucher, L., Oughtred, R., Livstone, M. S., Nixon, J., Van Auken, K., Wang, X., Shi, X., Reguluy, T., Rust, J. M., Winter, A., Dolinski, K. und Tyers, M. (2011). **The BioGRID Interaction Database: 2011 update**. *Nucleic Acids Res* 39, D698-704, doi: 10.1093/nar/gkq1116.

- Steen, H., Jebanathirajah, J. A., Rush, J., Morrice, N. und Kirschner, M. W. (2006). **Phosphorylation analysis by mass spectrometry - Myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements.** *Molecular & Cellular Proteomics* 5, 172-181, doi: 10.1074/mcp.M500135-MCP200.
- Stefanski, A. (2014). **Proteomanalytische Charakterisierung des Glioblastoms im Hinblick auf das Langzeitüberleben.** Dissertation, Medizinisches Proteom-Center, Ruhr-Universität Bochum.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F. H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., Timm, J., Mintzlaff, S., Abraham, C., Bock, N., Kietzmann, S., Goedde, A., Toksoz, E., Droege, A., Krobitsch, S., Korn, B., Birchmeier, W., Lehrach, H. und Wanker, E. E. (2005). **A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome.** *Cell* 122, 957-968, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.029.
- Sutherland, B. W., Toews, J. und Kast, J. (2008). **Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions.** *J Mass Spectrom* 43, 699-715, doi: 10.1002/jms.1415.
- Suzuki, H., Aoki, K., Chiba, K., Sato, Y., Shiozawa, Y., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Niida, A., Motomura, K., Ohka, F., Yamamoto, T., Tanahashi, K., Ranjit, M., Wakabayashi, T., Yoshizato, T., Kataoka, K., Yoshida, K., Nagata, Y., Sato-Otsubo, A., Tanaka, H., Sanada, M., Kondo, Y., Nakamura, H., Mizoguchi, M., Abe, T., Muragaki, Y., Watanabe, R., Ito, I., Miyano, S., Natsume, A. und Ogawa, S. (2015). **Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas.** *Nat Genet* 47, 458-468, doi: 10.1038/ng.3273.
- Szutowicz, A., Stepien, M., Lysiak, W. und Angielski, S. (1976). **Effect of (-)hydroxycitrate on the activities of ATP citrate lyase and the enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain.** *Acta Biochim Pol* 23, 227-234.
- Tonjes, M., Barbus, S., Park, Y. J., Wang, W., Schlotter, M., Lindroth, A. M., Pleier, S. V., Bai, A. H. C., Karra, D., Piro, R. M., Felsberg, J., Addington, A., Lemke, D., Weibrecht, I., Hovestadt, V., Rolli, C. G., Campos, B., Turcan, S., Sturm, D., Witt, H., Chan, T. A., Herold-Mende, C., Kemkemmer, R., Konig, R., Schmidt, K., Hull, W. E., Pfister, S. M., Jugold, M., Hutson, S. M., Plass, C., Okun, J. G., Reifenberger, G., Lichter, P. und Radlwimmer, B. (2013). **BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1.** *Nat Med* 19, 901-908, doi: 10.1038/nm.3217.
- Tran, A. N., Lai, A., Li, S., Pope, W. B., Teixeira, S., Harris, R. J., Woodworth, D. C., Nghiemphu, P. L., Cloughesy, T. F. und Ellingson, B. M. (2014). **Increased sensitivity to radiochemotherapy in IDH1 mutant glioblastoma as demonstrated by serial quantitative MR volumetry.** *Neuro Oncol* 16, 414-420, doi: 10.1093/neuonc/not198.
- Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F. M., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H. und Lamond, A. (2008). **Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes.** *J Cell Biol* 183, 223-239, doi: 10.1083/jcb.200805092.
- Turnham, R. E. und Scott, J. D. (2016). **Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology.** *Gene* 577, 101-108, doi: 10.1016/j.gene.2015.11.052.
- Van Damme, P., Lasa, M., Polevoda, B., Gazquez, C., Elosegui-Artola, A., Kim, D. S., De Juan-Pardo, E., Demeyer, K., Hole, K., Larrea, E., Timmerman, E., Prieto, J., Arnesen, T., Sherman, F., Gevaert, K. und Aldabe, R. (2012). **N-terminal acetylome analyses and functional insights of the N-terminal acetyltransferase NatB.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12449-12454, doi: 10.1073/pnas.1210303109.
- Varier, R. A. und Timmers, H. T. (2011). **Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer.** *Biochim Biophys Acta* 1815, 75-89, doi: 10.1016/j.bbcan.2010.10.002.
- Vasilescu, J., Guo, X. und Kast, J. (2004). **Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry.** *Proteomics* 4, 3845-3854, doi: 10.1002/pmic.200400856.
- Visvader, J. E. (2011). **Cells of origin in cancer.** *Nature* 469, 314-322, doi: 10.1038/nature09781.
- Wan, C., Borgeson, B., Phanse, S., Tu, F., Drew, K., Clark, G., Xiong, X., Kagan, O., Kwan, J., Bezginov, A., Chessman, K., Pal, S., Cromar, G., Papoulas, O., Ni, Z., Boutz, D. R., Stoilova, S., Havugimana, P. C., Guo, X., Maly, R. H., Sarov, M., Greenblatt, J., Babu, M., Derry, W. B., Tillier, E. R., Wallingford, J. B., Parkinson, J., Marcotte, E. M. und Emili, A. (2015).

- Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes.** *Nature* 525, 339-344, doi: 10.1038/nature14877.
- Wang, Q., Zhang, Y., Yang, C., Xiong, H., Lin, Y., Yao, J., Li, H., Xie, L., Zhao, W., Yao, Y., Ning, Z. B., Zeng, R., Xiong, Y., Guan, K. L., Zhao, S. und Zhao, G. P. (2010). **Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux.** *Science* 327, 1004-1007, doi: 10.1126/science.1179687.
- Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P. und Ohgaki, H. (2009). **IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas.** *Am J Pathol* 174, 1149-1153, doi: 10.2353/ajpath.2009.080958.
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S. M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P. Y., Stupp, R. und Reifenberger, G. (2015). **Glioma.** *Nat Rev Dis Primers* 1, 15017, doi: 10.1038/nrdp.2015.17.
- Westphal, M. und Lamszus, K. (2011). **The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches.** *Nat Rev Neurosci* 12, 495-508, doi: 10.1038/nrn3060.
- Wienisch, M. und Klingauf, J. (2006). **Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical.** *Nat Neurosci* 9, 1019-1027, doi: 10.1038/nn1739.
- Wildburger, N. C., Ali, S. R., Hsu, W. C., Shavkunov, A. S., Nenov, M. N., Lichti, C. F., LeDuc, R. D., Mostovenko, E., Panova-Elektronova, N. I., Emmett, M. R., Nilsson, C. L. und Laezza, F. (2015). **Quantitative proteomics reveals protein-protein interactions with fibroblast growth factor 12 as a component of the voltage-gated sodium channel 1.2 (nav1.2) macromolecular complex in Mammalian brain.** *Mol Cell Proteomics* 14, 1288-1300, doi: 10.1074/mcp.M114.040055.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. und Williams, K. L. (1996). **Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.** *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19-50.
- Witze, E. S., Old, W. M., Resing, K. A. und Ahn, N. G. (2007). **Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry.** *Nat Methods* 4, 798-806, doi: 10.1038/nmeth1100.
- Xiao, K., McClatchy, D. B., Shukla, A. K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S. K., Yates, J. R., 3rd und Lefkowitz, R. J. (2007). **Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12011-12016, doi: 10.1073/pnas.0704849104.
- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S. H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M. T., Liu, L. X., Jiang, W. Q., Liu, J., Zhang, J. Y., Wang, B., Frye, S., Zhang, Y., Xu, Y. H., Lei, Q. Y., Guan, K. L., Zhao, S. M. und Xiong, Y. (2011). **Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases.** *Cancer Cell* 19, 17-30, doi: 10.1016/j.ccr.2010.12.014.
- Xu, X., Zhao, J., Xu, Z., Peng, B., Huang, Q., Arnold, E. und Ding, J. (2004). **Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity.** *J Biol Chem* 279, 33946-33957, doi: 10.1074/jbc.M404298200.
- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B. und Bigner, D. D. (2009). **IDH1 and IDH2 mutations in gliomas.** *N Engl J Med* 360, 765-773, doi: 10.1056/NEJMoa0808710.
- Yang, F., Yi, F., Han, X., Du, Q. und Liang, Z. (2013). **MALAT-1 interacts with hnRNP C in cell cycle regulation.** *FEBS Lett* 587, 3175-3181, doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.048.
- Yang, W., Dicker, D. T., Chen, J. und El-Deiry, W. S. (2008). **CARPs enhance p53 turnover by degrading 14-3-3sigma and stabilizing MDM2.** *Cell Cycle* 7, 670-682, doi: 10.4161/cc.7.5.5701.
- Yates, J. R., 3rd, Speicher, S., Griffin, P. R. und Hunkapiller, T. (1993). **Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification.** *Anal Biochem* 214, 397-408, doi: 10.1006/abio.1993.1514.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P. und Yu, X. F. (2003). **Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex.** *Science* 302, 1056-1060, doi: 10.1126/science.1089591.

- Yun, S. J., Byun, K., Bhin, J., Oh, J. H., Nhung le, T. H., Hwang, D. und Lee, B. (2010). **Transcriptional regulatory networks associated with self-renewal and differentiation of neural stem cells.** *J Cell Physiol* 225, 337-347, doi: 10.1002/jcp.22294.
- Zanivan, S., Gnad, F., Wickstrom, S. A., Geiger, T., Macek, B., Cox, J., Fassler, R. und Mann, M. (2008). **Solid tumor proteome and phosphoproteome analysis by high resolution mass spectrometry.** *J Proteome Res* 7, 5314-5326.
- Zhang, B., VerBerkmoes, N. C., Langston, M. A., Uberbacher, E., Hettich, R. L. und Samatova, N. F. (2006). **Detecting differential and correlated protein expression in label-free shotgun proteomics.** *J Proteome Res* 5, 2909-2918, doi: 10.1021/pr0600273.
- Zhang, F., Lin, J. D., Zuo, X. Y., Zhuang, Y. X., Hong, C. Q., Zhang, G. J., Cui, X. J. und Cui, Y. K. (2017a). **Elevated transcriptional levels of aldolase A (ALDOA) associates with cell cycle-related genes in patients with NSCLC and several solid tumors.** *BioData Min* 10, 6, doi: 10.1186/s13040-016-0122-4.
- Zhang, J., Sprung, R., Pei, J., Tan, X., Kim, S., Zhu, H., Liu, C. F., Grishin, N. V. und Zhao, Y. (2009). **Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in Escherichia coli.** *Mol Cell Proteomics* 8, 215-225, doi: 10.1074/mcp.M800187-MCP200.
- Zhang, W., Li, F. und Nie, L. (2010). **Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies.** *Microbiology* 156, 287-301, doi: 10.1099/mic.0.034793-0.
- Zhang, W., Zhong, T. und Chen, Y. (2017b). **LC-MS/MS-based targeted proteomics quantitatively detects the interaction between p53 and MDM2 in breast cancer.** *J Proteomics* 152, 172-180, doi: 10.1016/j.jprot.2016.11.002.
- Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A. M., Sablitzky, F., Littlewood, T. D. und Reth, M. (1996). **Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells.** *Nucleic Acids Res* 24, 543-548.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S. M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y. und Guan, K. L. (2010). **Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation.** *Science* 327, 1000-1004, doi: 10.1126/science.1179689.
- Zhao, Y. und Jensen, O. N. (2009). **Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques.** *Proteomics* 9, 4632-4641, doi: 10.1002/pmic.200900398.
- Zhao, Z., Lu, J., Han, L., Wang, X., Man, Q. und Liu, S. (2016). **Prognostic significance of two lipid metabolism enzymes, HADHA and ACAT2, in clear cell renal cell carcinoma.** *Tumour Biol* 37, 8121-8130, doi: 10.1007/s13277-015-4720-4.
- Zhu, Y., Guignard, F., Zhao, D., Liu, L., Burns, D. K., Mason, R. P., Messing, A. und Parada, L. F. (2005). **Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma.** *Cancer Cell* 8, 119-130, doi: 10.1016/j.ccr.2005.07.004.
- Zuo, X., Echan, L., Hembach, P., Tang, H. Y., Speicher, K. D., Santoli, D. und Speicher, D. W. (2001). **Towards global analysis of mammalian proteomes using sample prefractionation prior to narrow pH range two-dimensional gels and using one-dimensional gels for insoluble and large proteins.** *Electrophoresis* 22, 1603-1615, doi: 10.1002/1522-2683(200105)22:9<1603::AID-ELPS1603>3.0.CO;2-I.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Funktion der wild-typischen und mutierten IDH1 im Zytoplasma.....	3
Abbildung 2: Auswirkungen der <i>gain-of-function</i> Mutation der <i>IDH1</i>	4
Abbildung 3: Verschiedene Methoden zur MS-basierten Quantifizierung von Proteinen	10
Abbildung 4: Immunfärbung von HA-IDH1 in U87MG Zelllysaten	39
Abbildung 5: Messung der relativen 2-HG Mengen.....	39
Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahmen der unterschiedlich transfizierten U87MG Zelllinie	40
Abbildung 7: Identifizierte Phosphorylierungen und Acetylierungen an IDH1	41
Abbildung 8: Unterteilung aller im U87MG Proteom quantifizierten Proteine.....	43
Abbildung 9: Verteilung der im U87MG quantifizierten Proteine über die zellulären Kompartimente.....	44
Abbildung 10: Hierarchisches Cluster der im U87MG Proteom quantifizierten Proteine.	45
Abbildung 11: Potenzielle Interaktionspartner der IDH1	47
Abbildung 12: Verteilung der potenziellen Interaktoren der IDH1 über die zellulären Kompartimente.....	48
Abbildung 13: Lokalisation der IDH1 in der Zelle.....	49
Abbildung 14: Anreicherung der IDH1 durch eine IP. Als Maß für die Quantität der Anreicherung zeigt das Diagramm die PSMs der IDH1 in unterschiedlichen Zelllysaten und den dazugehörigen Immunpräzipitationen.....	50
Abbildung 15: Immunfärbung gegen IDH1, Histon und Profilin nach Fraktionierung.....	51
Abbildung 16: Analyse der Fraktionierung mittels LC-MS/MS.....	52
Abbildung 17: Kontrolle des Formaldehyd- <i>Crosslinkings</i>	53
Abbildung 18: Verteilung der potenziellen Interaktoren der IDH1 über die zellulären Kompartimente.....	54
Abbildung 19: Potenzielle Interaktionspartner der HA-IDH1	56
Abbildung 20 Netzwerk der potenziellen Interaktoren der HA-IDH1.....	57
Abbildung 21: Angereicherte biologische Prozesse basierend auf dem Netzwerk der potenziellen Interaktoren der HA-IDH1	58
Abbildung 22: Differenzielle Interaktionspartner zwischen wild-typischer und mutierter IDH1	59
Abbildung 23: Verteilung der Proteine aus der NSC/NPC-Proteomstudie auf die zellulären Kompartimente.....	62

Abbildung 24: Hierarchisches Cluster aller quantifizierten Proteine der NSC/NPC Proteome	63
Abbildung 25: Analyse der biologischen Prozesse des NSC/NPC Proteoms.....	64
Abbildung 26: Prozentuale Verteilung der Phosphorylierungsstellen auf die Aminosäuren Tyrosin, Threonin und Serin	65
Abbildung 27: Prozentuale Verteilung der Anzahl der Phosphorylierungsstellen pro Peptid des Phosphoproteoms der NSC/NPCs.....	66
Abbildung 28: VENN-Diagramm der identifizierten Phosphoproteine in den NSC/NPCs.....	66
Abbildung 29: Analyse der molekularen Funktionen der Phosphoproteine der NSC/NPC	67
Abbildung 30: Mögliche negative Regulierung von p53 durch IDH1 Mutation induzierte Phosphorylierungen.....	84
Abbildung 31: Netzwerk der differentiellen Proteine der HA-IDH1 mutierten Proben im Vergleich zu den HA-IDH1 Wild-Typ überexprimierenden Proben	104
Abbildung 32: Normalisierte Abundanzen von ACAT2 und ALDOA.....	105
Abbildung 33: Normalisierte Abundanz von ACLY	105
Tabelle 1: Reihenfolge und Inkubationszeiten der Silberfärbung.....	29
Tabelle 2: Teilschritte des 60-minütigen HPLC-Gradienten	34
Tabelle 3: Teilschritte des 120-minütigen HPLC-Gradienten	34
Tabelle 4: Massenspektrometrische Parameter für die MS/MS-Analysen mit der Orbitrap Elite bzw. der Q Exactive Plus	35
Tabelle 5: Differentielle potenzielle Interaktoren zwischen wild-typischer und mutierter IDH1	60
Tabelle 6: Ubiquitylierungen, welche nach Immunpräzipitation und LC-MS/MS Analyse der wild-typischen bzw. mutierten IDH1 zugeordnet werden konnten	106
Tabelle 7: Proteine, die eine differentielle Regulation zwischen U87MG IDH1wt und IDH1mut aufweisen	107
Tabelle 8: Proteine, welche in den antikörperbasierten IPs gegen IDH1, durchgeführt mit der U87MG Zelllinie, eine differentielle Regulation zwischen den IDH1 Wild-Typ Zellen und den Antikörperkontrollen aufwiesen.....	111
Tabelle 9: Proteine, welche in den antikörperbasierten IPs gegen IDH1, durchgeführt mit der U87MG Zelllinie, eine differentielle Regulation zwischen den IDH1 mutierten Zellen und den Antikörperkontrollen aufwiesen.....	114

Tabelle 10: Proteine, welche in der IP gegen HA-gekoppelte wild-typische IDH1 nach Durchführung einer subzellulären Fraktionierung eine differenzielle Regulation zwischen den IDH1 wild-typischen Zellen und den Leervektorkontrollen aufwiesen.....	116
Tabelle 11: Proteine, welche in der IP gegen HA-gekoppelte mutierte IDH1 nach Durchführung einer subzellulären Fraktionierung eine differenzielle Regulation zwischen den IDH1 mutierten Zellen und den Leervektorkontrollen aufwiesen	127
Tabelle 12: Proteine, welche mindestens ein phosphoryliertes Peptid tragen und exklusiv in den NSC/NPCs, welche die mutierte Form der IDH1 tragen, identifiziert wurden.....	138
Tabelle 13: Proteine, welche mindestens ein phosphoryliertes Peptid tragen und exklusiv in den NSC/NPCs, welche die wild-typische Form der IDH1 tragen, identifiziert wurden	143

8 Abkürzungsverzeichnis

1D	Eindimensional
2-HG	D-2-Hydroxyglutarat
α -KG	Alpha-Ketoglutarat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CHAPS	3-[N-(Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfat
CID	Collision-induced Dissociation
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FDR	<i>false discovery rate</i>
GBM	Glioblastom
GC-MS	Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie
GO	<i>Gene Ontology</i>
HCD	<i>High-energy collision dissociation</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
Ig	Immunoglobulin
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilo-Dalton
LC-ESI-MS	Kopplung von HPLC und ESI-MS
mM	Millimolar
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mRNA	messenger RNA
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
mut	Mutiert

Abkürzungsverzeichnis

MW	Molekulargewicht
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
PAGE	Polyacrylamidgel Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PSMs	<i>Peptide spectrum matches</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies (<i>reactive oxygen specie</i> s)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SILAC	<i>stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organisation</i>)
wt	Wild-Typ

Anhang

Abbildungen

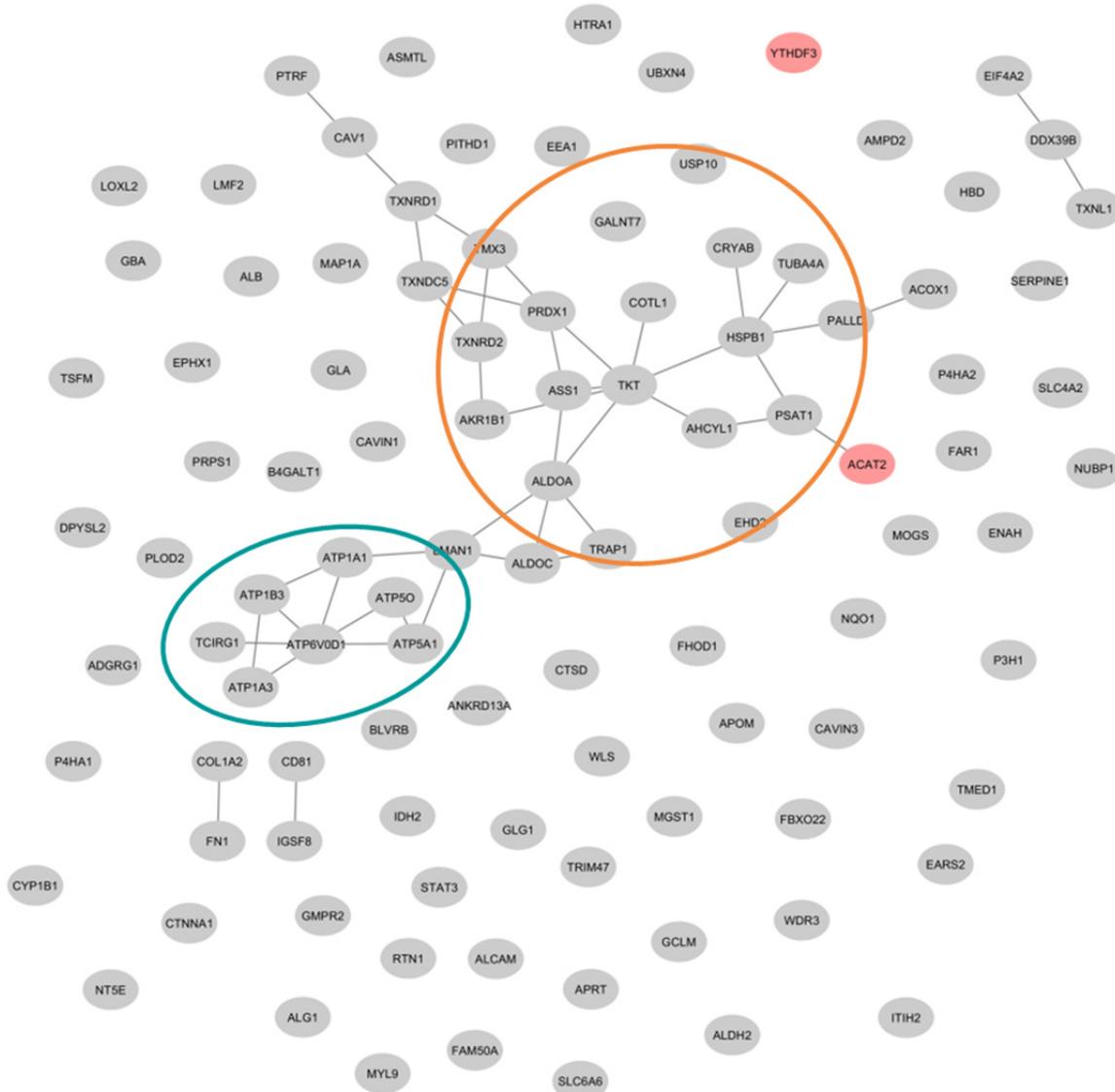


Abbildung 31: Netzwerk der differentiellen Proteine der HA-IDH1 mutierten Proben im Vergleich zu den HA-IDH1 Wild-Typ überexprimierenden Proben. Nach der Durchführung eines Zwei-Proben-T-Tests ($p \leq 0,05$) zeigen 101 Proteine eine differentielle Expression. 99 dieser Proteine waren signifikant hoch- und zwei runterreguliert (rot markiert). Das Netzwerk wurde mittels der STRING Software erstellt.

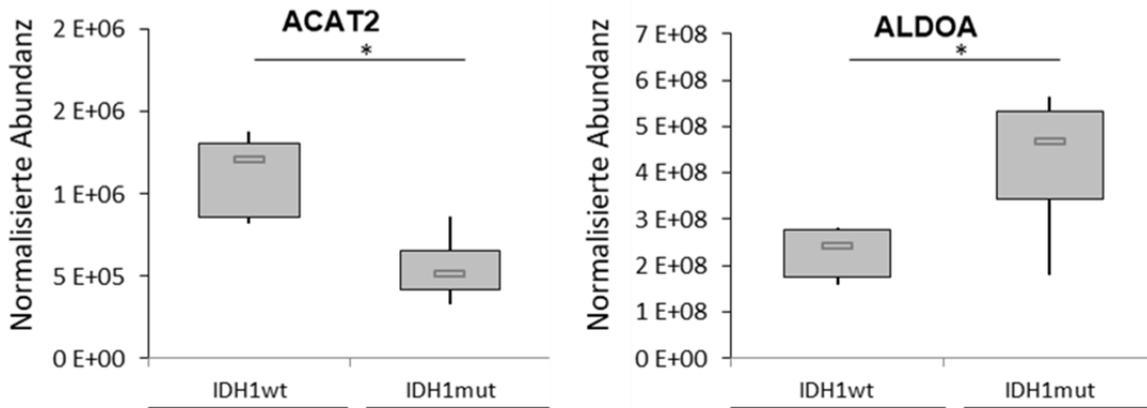


Abbildung 32: Normalisierte Abundanzen von ACAT2 und ALDOA. Diese Box-Plots zeigen die normalisierte Abundanz von zwei differenziell exprimierten Proteinen zwischen den IDH1 wild-typischen und mutierten Proben. ACAT2 ist in den HA-IDH1 mutierten Proben signifikant herunterreguliert (Abundanzunterschied 2,4) wohingegen ALDOA eine Hochregulation (Abundanzunterschied 1,9) zeigt.

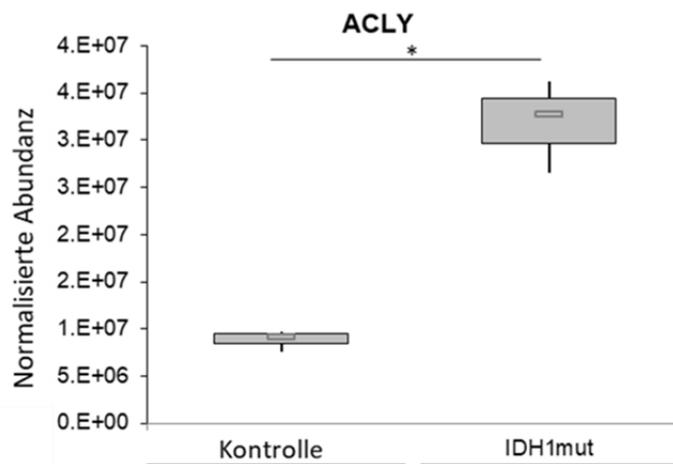


Abbildung 33: Normalisierte Abundanz von ACLY. Dieser Box-Plot zeigt die normalisierte Abundanz von einem differenziell exprimierten Protein, exemplarisch gezeigt zwischen den IDH1 mutierten Proben und den Leervektor-Kontrollen. ACLY ist signifikant hochreguliert in den IDH1 Proben.

Tabellen

Tabelle 6: Ubiquitylierungen, welche nach Immunpräzipitation und LC-MS/MS Analyse der wild-typischen bzw. mutierten IDH1 zugeordnet werden konnten.

Position	identifiziert in	
	IDH1wt	IDH1mut
K27	x	x
K29	x	x
K115	x	x
K126	x	x
K151	x	x
K164	x	x
K203	x	x
K212	x	x
K224	x	x
K243	x	x
K270	x	x
K301	x	x
K321	x	x
K345	x	x
K350	x	x
K381	x	x
K400	x	x

Anhang

Tabelle 7: Proteine, die eine differentielle Regulation zwischen U87MG IDH1wt und IDH1mut aufweisen (Filterkriterien: p-Wert < 0,05; mind. 2 quantifizierte Peptide) (Seite 107 bis 110).

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	Abundanz-unterschied	Gruppe mit höherer Abundanz	Gruppe mit niedrigerer Abundanz
Cytochrome P450 1B1	Q16678	0.008	2.32	IDH1mut	IDH1wt
Beta-1,4-galactosyltransferase 1	P15291	0.031	2.03	IDH1mut	IDH1wt
Sodium- and chloride-dependent taurine transporter	P31641	0.006	2.41	IDH1mut	IDH1wt
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	P19823	0.011	2.22	IDH1mut	IDH1wt
Myosin regulatory light polypeptide 9	P24844	0.003	2.83	IDH1mut	IDH1wt
Elongation factor Ts, mitochondrial	P43897	0.034	1.62	IDH1mut	IDH1wt
PITH domain-containing protein 1	Q9GZP4	0.022	1.79	IDH1mut	IDH1wt
Anion exchange protein 2	P04920	0.027	1.8	IDH1mut	IDH1wt
GMP reductase 2	Q9P2T1	0.04	2.87	IDH1mut	IDH1wt
CD166 antigen	Q13740	0.048	2.01	IDH1mut	IDH1wt
F-box only protein 22	Q8NEZ5	0.013	3.05	IDH1mut	IDH1wt
Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	P48507	0.036	1.94	IDH1mut	IDH1wt
Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	Q9NNW7	0.009	2.6	IDH1mut	IDH1wt
Caveolin-1	Q03135	0.024	2.02	IDH1mut	IDH1wt
Protein disulfide-isomerase TMX3	Q96JJ7	0.028	1.87	IDH1mut	IDH1wt
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	P48735	0.017	1.85	IDH1mut	IDH1wt
N-acetylserotonin	O95671	0.001	4.41	IDH1mut	IDH1wt
Serum albumin	P02768	0.038	2.15	IDH1mut	IDH1wt
Protein wntless homolog	Q5T9L3	0.032	1.82	IDH1mut	IDH1wt
Palladin	Q8WX93	0.032	1.54	IDH1mut	IDH1wt
Protein ERGIC-53	P49257	0.006	1.97	IDH1mut	IDH1wt
Hemoglobin subunit delta	P02042	0.003	2.11	IDH1mut	IDH1wt
Protein FAM50A	Q14320	0.027	1.75	IDH1mut	IDH1wt
AMP deaminase 2	Q01433	0.044	1.91	IDH1mut	IDH1wt
Transmembrane emp24 domain-containing protein 1	Q13445	0.015	1.51	IDH1mut	IDH1wt
WD repeat-containing protein 3	Q9UNX4	0.015	3.43	IDH1mut	IDH1wt

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	Abundanz- unterschied	Gruppe mit höherer Abundanz	Gruppe mit niedrigerer Abundanz
Tripartite motif-containing protein 47	Q96LD4	0.025	2.83	IDH1mut	IDH1wt
V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 3	Q13488	0.001	5.72	IDH1mut	IDH1wt
Lysyl oxidase homolog 2	Q9Y4K0	0.015	2.76	IDH1mut	IDH1wt
Collagen alpha-2(I) chain	P08123	0	6.28	IDH1mut	IDH1wt
Immunoglobulin superfamily member 8	Q969P0	0.008	1.83	IDH1mut	IDH1wt
Apolipoprotein M	O95445	0.015	2.4	IDH1mut	IDH1wt
CD81 antigen	P60033	0.001	2.45	IDH1mut	IDH1wt
Alpha-galactosidase A	P06280	0.01	2.3	IDH1mut	IDH1wt
Microsomal glutathione S-transferase 1	P10620	0.048	1.52	IDH1mut	IDH1wt
Protein enabled homolog	Q8N8S7	0.007	2.1	IDH1mut	IDH1wt
UBX domain-containing protein 4	Q92575	0.007	1.69	IDH1mut	IDH1wt
Fatty acyl-CoA reductase 1	Q8WVX9	0.028	2.12	IDH1mut	IDH1wt
Alpha-crystallin B chain	P02511	0.027	2.68	IDH1mut	IDH1wt
G-protein coupled receptor 56	Q9Y653	0.026	2.31	IDH1mut	IDH1wt
Probable glutamate--tRNA ligase, mitochondrial	Q5JPH6	0.029	1.83	IDH1mut	IDH1wt
Ankyrin repeat domain-containing protein 13A	Q8IZ07	0.024	2.31	IDH1mut	IDH1wt
Plasminogen activator inhibitor 1	P05121	0.034	1.72	IDH1mut	IDH1wt
Reticulon-1	Q16799	0.046	1.77	IDH1mut	IDH1wt
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	Q15067	0.026	1.71	IDH1mut	IDH1wt
Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP1	P53384	0.048	1.88	IDH1mut	IDH1wt
Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase	Q9BT22	0	7.38	IDH1mut	IDH1wt
V-type proton ATPase subunit d 1	P61421	0.022	1.91	IDH1mut	IDH1wt
Lipase maturation factor 2	Q9BU23	0.047	2.38	IDH1mut	IDH1wt
Serine protease HTRA1	Q92743	0.012	2.64	IDH1mut	IDH1wt
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	P13637	0.035	1.85	IDH1mut	IDH1wt
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P13674	0.024	2.4	IDH1mut	IDH1wt
Golgi apparatus protein 1	Q92896	0.035	1.71	IDH1mut	IDH1wt
FH1/FH2 domain-containing protein 1	Q9Y613	0.038	1.79	IDH1mut	IDH1wt

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	Abundanz- unterschied	Gruppe mit höherer Abundanz	Gruppe mit niedrigerer Abundanz
Eukaryotic initiation factor 4A-II	Q14240	0.04	1.86	IDH1 mut	IDH1 wt
EH domain-containing protein 2	Q9NZN4	0.032	2.01	IDH1 mut	IDH1 wt
Peroxiredoxin-1	Q06830	0.023	1.62	IDH1 mut	IDH1 wt
NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	P15559	0.035	1.67	IDH1 mut	IDH1 wt
Microtubule-associated protein 1A	P78559	0.024	1.87	IDH1 mut	IDH1 wt
Spliceosome RNA helicase DDX39B	Q13838	0.022	1.69	IDH1 mut	IDH1 wt
Putative adenosylhomocysteinase 2	O43865	0.035	1.91	IDH1 mut	IDH1 wt
Thioredoxin domain-containing protein 5	Q8NBS9	0.049	1.83	IDH1 mut	IDH1 wt
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705	0.042	1.73	IDH1 mut	IDH1 wt
Aldose reductase	P15121	0.024	1.61	IDH1 mut	IDH1 wt
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	P05023	0.031	1.69	IDH1 mut	IDH1 wt
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Q16555	0.042	1.9	IDH1 mut	IDH1 wt
Tubulin alpha-4A chain	P68366	0.01	2.09	IDH1 mut	IDH1 wt
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	O00469	0.022	2.19	IDH1 mut	IDH1 wt
Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	0.047	1.84	IDH1 mut	IDH1 wt
Cathepsin D	P07339	0.034	1.74	IDH1 mut	IDH1 wt
Transketolase	P29401	0.024	1.76	IDH1 mut	IDH1 wt
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	Q16881	0.021	1.69	IDH1 mut	IDH1 wt
Catenin alpha-1	P35221	0.039	1.66	IDH1 mut	IDH1 wt
Fibronectin	P02751	0.009	3.13	IDH1 mut	IDH1 wt
Polymerase I and transcript release factor	Q6NZI2	0.037	2.01	IDH1 mut	IDH1 wt
Prolyl 3-hydroxylase 1	Q32P28	0.002	2.13	IDH1 mut	IDH1 wt
N-acetylgalactosaminyltransferase 7	Q86SF2	0.018	2.01	IDH1 mut	IDH1 wt
Signal transducer and activator of transcription 3	P40763	0.034	1.84	IDH1 mut	IDH1 wt
Adenine phosphoribosyltransferase	P07741	0.015	2.13	IDH1 mut	IDH1 wt
Flavin reductase (NADPH)	P30043	0.048	1.46	IDH1 mut	IDH1 wt
Protein kinase C delta-binding protein	Q969G5	0.025	2.5	IDH1 mut	IDH1 wt
5'-nucleotidase	P21589	0.029	2.19	IDH1 mut	IDH1 wt

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	Abundanz- unterschied	Gruppe mit höherer Abundanz	Gruppe mit niedrigerer Abundanz
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P05091	0.001	3.3	IDH1mut	IDH1wt
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	Q14694	0.048	1.78	IDH1mut	IDH1wt
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Q12931	0.044	1.52	IDH1mut	IDH1wt
ATP synthase subunit	P48047	0.02	1.59	IDH1mut	IDH1wt
Heat shock protein beta-1	P04792	0.002	1.92	IDH1mut	IDH1wt
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	P60891	0.024	2.19	IDH1mut	IDH1wt
Coactosin-like protein	Q14019	0.02	2	IDH1mut	IDH1wt
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	O15460	0.013	2.43	IDH1mut	IDH1wt
Phosphoserine aminotransferase	Q9Y617	0.048	1.62	IDH1mut	IDH1wt
Thioredoxin-like protein 1	O43396	0.035	1.82	IDH1mut	IDH1wt
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	P54709	0.037	1.64	IDH1mut	IDH1wt
Early endosome antigen 1	Q15075	0.038	2.9	IDH1mut	IDH1wt
Fructose-bisphosphate aldolase C	P09972	0.028	1.97	IDH1mut	IDH1wt
Argininosuccinate synthase	P00966	0.003	2.2	IDH1mut	IDH1wt
Epoxide hydrolase 1	P07099	0.011	1.88	IDH1mut	IDH1wt
Glucosylceramidase	P04062	0.046	1.38	IDH1mut	IDH1wt
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	Q13724	0.031	1.98	IDH1mut	IDH1wt
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	Q9BWD1	0.006	2.01	IDH1wt	IDH1mut
YTH domain family protein 3	Q7Z739	0.029	1.62	IDH1wt	IDH1mut

Anhang

Tabelle 8: Proteine, welche in den antikörperbasierten IPs gegen IDH1, durchgeführt mit der U87MG Zelllinie, eine differenzielle Regulation zwischen den IDH1 Wild-Typ Zellen und den Antikörperkontrollen aufwiesen (Filterkriterien: p-Wert < 0,05; mind. 2 quantifizierte Peptide) (Seite 111 bis 113).

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	Abundanzunterschied
GEM-interacting protein	Q9P107	3.54E-11	10.69
Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	Q15057	9.57E-07	10.13
Huntingtin-interacting protein 1	O00291	4.24E-09	9.16
Microtubule-associated protein 1A	E9PGC8	2.02E-10	8.67
Protein furry homolog-like	O94915	1.76E-09	8.18
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	Q16630	2.99E-06	7.57
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O75874	1.96E-05	7.18
Centrosomal protein of 170 kDa	Q5SW79	6.86E-06	6.32
Probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	O75592	2.47E-03	6.03
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	P48735	2.27E-04	4.86
Homer protein homolog 3	Q9NSC5	4.36E-09	4.69
WASH complex subunit FAM21A;WASH complex subunit FAM21B	Q641Q2	9.79E-07	4.68
Leucine zipper protein 1	Q86V48	1.01E-04	4.63
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	O43809	9.65E-06	4.46
WASH complex subunit strumpellin	Q12768	3.12E-06	4.29
Tubulin gamma-1 chain;Tubulin gamma-2 chain;Tubulin gamma chain	P23258	3.55E-08	3.92
Disks large homolog 1	Q12959	1.41E-04	3.47
WASH complex subunit 7	Q2M389	3.68E-05	3.44
TRIO and F-actin-binding protein	Q9H2D6	4.04E-04	3.34
60S acidic ribosomal protein P1	P05386	2.20E-02	3.26
Cell division cycle 5-like protein	Q99459	2.12E-03	3.16
E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog	Q96J02	8.78E-04	3.15
Myosin-14	Q7Z406	4.30E-02	2.84
60S ribosomal protein L37a	C9J4Z3	5.06E-03	2.78
Growth factor receptor-bound protein 2	P62993	5.24E-03	2.77
Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2	P46087	1.38E-04	2.72

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	Abundanzunterschied
AP-2 complex subunit sigma	M0QZ21	1.20E-04	2.63
Beta-2-syntrophin	Q13425	1.91E-04	2.52
Death-associated protein kinase 3	O43293	5.28E-06	2.49
Serine/arginine-rich splicing factor 2;Serine/arginine-rich splicing factor 8	J3QL05	4.66E-02	2.45
Peripheral plasma membrane protein CASK	O14936	4.82E-05	2.38
Nucleolar GTP-binding protein 1	Q9BZE4	1.59E-03	2.35
NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2	O00308	3.53E-03	2.25
RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1	E7ETU5	1.94E-02	2.19
Nucleophosmin	P06748	4.65E-05	2.18
Uncharacterized protein C7orf50	C9JQV0	8.24E-03	2.16
Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog	Q8TDN6	5.05E-03	2.15
mRNA turnover protein 4 homolog	Q9UKD2	1.51E-06	2.14
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	P08107	2.15E-02	2.11
RNA-binding protein 28	Q9NW13	3.54E-05	2.11
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	P20042	5.98E-03	2.10
F-box/SPRY domain-containing protein 1	P0C2W1	1.08E-02	2.09
60S acidic ribosomal protein P2	H0YDD8	4.19E-03	2.04
Utrophin	P46939	1.47E-02	2.01
Nucleolin	P19338	6.55E-07	2.00
SPRY domain-containing protein 3	Q8NCJ5	1.99E-02	1.97
Myb-binding protein 1A	Q9BQG0	1.96E-02	1.96
Nucleolar protein 56	O00567	8.33E-03	1.95
60S ribosomal protein L35a	P18077	1.63E-06	1.85
60S ribosomal protein L30	E5RI99	1.96E-06	1.85
60S ribosomal protein L21	P46778	1.62E-05	1.82
60S ribosomal protein L7	P18124	7.18E-06	1.78
60S ribosomal protein L8	P62917	1.11E-04	1.76
Heterochromatin protein 1-binding protein 3	Q5SSJ5	7.55E-03	1.75

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	Abundanzunterschied
60S ribosomal protein L12	P30050	2.46E-05	1.73
60S acidic ribosomal protein P0	P05388	2.91E-06	1.68
60S ribosomal protein L6	Q02878	1.68E-04	1.63
ATP-dependent RNA helicase DDX18	Q9NVP1	8.51E-03	1.63
60S ribosomal protein L10a	P62906	1.16E-06	1.61
60S ribosomal protein L18a	M0R117	7.32E-06	1.58
60S ribosomal protein L7a	P62424	1.95E-04	1.54
60S ribosomal protein L3	P39023	3.04E-05	1.51
60S ribosomal protein L28	P46779	3.82E-05	1.50
60S ribosomal protein L27	P61353	6.62E-05	1.50
60S ribosomal protein L13a	P40429	6.27E-04	1.47
60S ribosomal protein L18	Q07020	3.33E-04	1.45
60S ribosomal protein L4	P36578	7.09E-05	1.39

Anhang

Tabelle 9: Proteine, welche in den antikörperbasierten IPs gegen IDH1, durchgeführt mit der U87MG Zelllinie, eine differenzielle Regulation zwischen den IDH1 mutierten Zellen und den Antikörperkontrollen aufwiesen (Filterkriterien: p-Wert < 0,05; mind. 2 quantifizierte Peptide) (Seite 114 bis 115).

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	Abundanzunterschied
Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	Q15057	4.57E-07	9.58
GEM-interacting protein	Q9P107	2.64E-08	9.45
Huntingtin-interacting protein 1	O00291	1.80E-04	8.13
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	Q16630	4.49E-05	7.73
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O75874	1.27E-05	7.41
Protein furry homolog-like	O94915	2.56E-04	7.37
Microtubule-associated protein 1A	E9PGC8	5.50E-04	6.92
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	O43809	4.30E-04	5.43
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	P48735	1.70E-06	5.43
Homer protein homolog 3	Q9NSC5	2.76E-05	4.51
Tubulin gamma-1 chain;Tubulin gamma-2 chain;Tubulin gamma chain	P23258	9.76E-04	4.50
E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog	Q96J02	2.35E-04	4.26
WASH complex subunit FAM21A;WASH complex subunit FAM21B	Q641Q2	1.24E-04	4.19
WASH complex subunit strumpellin	Q12768	2.54E-04	3.57
NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2	O00308	9.00E-04	3.46
Disks large homolog 1	Q12959	5.81E-03	3.01
Profilin-1	P07737	6.25E-03	2.90
WASH complex subunit 7	Q2M389	2.94E-03	2.82
Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog	Q8TDN6	7.20E-03	2.70
Cell division cycle 5-like protein	Q99459	5.99E-04	2.61
Beta-2-syntrophin	Q13425	2.68E-03	2.53
RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1	E7ETU5	7.29E-04	2.48
TRIO and F-actin-binding protein	Q9H2D6	1.10E-02	2.45
Growth factor receptor-bound protein 2	P62993	3.03E-03	2.44
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7	F5H669	4.09E-03	2.34
Nucleophosmin	P06748	2.00E-03	2.25

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	Abundanzunterschied
Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	G3V3B0	1.43E-03	2.04
Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	Q14684	1.51E-03	1.97

Anhang

Tabelle 10: Proteine, welche in der IP gegen HA-gekoppelte wild-typische IDH1 nach Durchführung einer subzellulären Fraktionierung eine differenzielle Regulation zwischen den IDH1 wild-typischen Zellen und den Leervektorkontrollen aufwiesen (Filterkriterien: p-Wert < 0,05; mind. 2 quantifizierte Peptide) (Seite 116 bis 126).

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O75874	7.80E-10	12.30
Transcription factor p65	Q2TAM5	3.79E-08	8.90
RNA-binding protein 3	P98179	0.002	3.79
7-dehydrocholesterol reductase	E9PJ54	5.34E-05	3.07
Methionine aminopeptidase 2	F8VRR3	9.01E-06	2.89
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	P50552	0.025	2.78
Dynactin subunit 6	O00399	0.008	2.69
PDZ domain-containing protein GIPC1	O14908	0.027	2.68
EH domain-binding protein 1-like protein 1	Q8N3D4	0.037	2.60
Calpain-5	A0A087X0C8	0.002	2.48
Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	O43166	0.049	2.47
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	Q15008	0.034	2.41
39S ribosomal protein L43, mitochondrial	B1AL05	0.054	2.41
Protein MON2 homolog	Q7Z3U7	0.003	2.40
Nuclear autoantigenic sperm protein	P49321	3.37E-07	2.34
Ankyrin-2	I6L894	0.026	2.34
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	I3L0A0	0.071	2.22
UPF0505 protein C16orf62	Q7Z3J2	0.045	2.17
DCC-interacting protein 13-beta	Q8NEU8	0.045	2.14
Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	O00154	0.065	2.12
Macoilin	Q8N5G2	0.001	2.09
Rho-related GTP-binding protein RhoE	P61587	0.006	2.05
ATP synthase subunit d, mitochondrial	O75947	0.046	2.01
Nuclear mitotic apparatus protein 1	A0A087WY61	0.049	2.00
RNA polymerase II-associated protein 1	H3BRE8	0.062	1.97

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
N-acylneuraminat cytidyltransferase	Q8NFW8	0.001	1.95
Proteasome inhibitor PI31 subunit	Q5QPM7	0.024	1.95
Alanyl-tRNA editing protein Aarsd1	C9J5N1	0.043	1.93
Diacylglycerol kinase zeta	Q13574	0.008	1.93
Complex I assembly factor TIMMDC1, mitochondrial	Q9NPL8	0.001	1.91
Protein-tyrosine-phosphatase	Q5TG12	0.075	1.90
39S ribosomal protein L22, mitochondrial	E7ESL0	0.044	1.90
Copine-7	Q9UBL6	0.062	1.90
C2 domain-containing protein 2	Q9Y426	0.053	1.89
PITH domain-containing protein 1	Q9GZP4	0.011	1.87
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	P05026	1.69E-06	1.86
Argininosuccinate synthase	P00966	0.001	1.83
Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial	Q5T160	0.047	1.83
Protein C21orf2	O43822	0.010	1.81
Uridine-cytidine kinase-like 1	Q9NWZ5	0.032	1.80
SUMO-activating enzyme subunit 2	Q9UBT2	0.017	1.79
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	B5MBZ8	0.067	1.77
Rho GTPase-activating protein 17	Q68EM7	0.052	1.77
Peroxiredoxin-2	P32119	0.026	1.74
tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase, mitochondrial	F8WDR2	0.001	1.73
StAR-related lipid transfer protein 13	Q9Y3M8	0.029	1.70
Contactin-associated protein 1	P78357	0.017	1.69
Toll-interacting protein	F2Z2Y8	0.039	1.68
Ubiquitin-like protein ISG15	A0A096LNZ9	0.005	1.66
AP-4 complex subunit epsilon-1	Q9UPM8	0.013	1.66
Tripartite motif-containing protein 47	Q96LD4	0.061	1.66
Gremlin-1	O60565	0.018	1.64
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	Q96RQ3	0.003	1.62

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	K7ERT7	0.012	1.60
Probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein CIAO1	O76071	0.032	1.60
Probable leucine--tRNA ligase, mitochondrial	Q15031	0.037	1.57
Inositol monophosphatase 1	P29218	0.012	1.56
Signal transducing adapter molecule 2	O75886	0.021	1.55
Exocyst complex component 1	Q9NV70	0.021	1.51
ERO1-like protein alpha	Q96HE7	0.004	1.51
Signal transducing adapter molecule 1	Q92783	0.036	1.46
Nestin	P48681	7.71E-05	1.46
Coronin-1B	Q9BR76	0.008	1.44
Synaptobrevin homolog YKT6	O15498	0.000	1.38
Proteasome subunit alpha type-1	P25786	0.069	1.37
Optineurin	Q96CV9	0.059	1.36
Protein kinase C delta type	Q05655	0.068	1.32
Huntingtin-interacting protein 1	O00291	0.000	1.31
Rho GTPase-activating protein 1	Q07960	2.49E-05	1.31
Proteasome activator complex subunit 1	Q06323	0.040	1.30
ER lumen protein-retaining receptor 3	O43731	0.069	1.29
28S ribosomal protein S27, mitochondrial	G5EA06	0.065	1.28
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Q9HCC0	0.004	1.26
Protein SDA1 homolog	F8W8T7	0.065	1.24
Tumor suppressor p53-binding protein 1	Q12888	0.002	1.22
GTP-binding protein SAR1a	Q9NR31	0.001	1.20
RRP12-like protein	Q5JTH9	0.042	1.20
39S ribosomal protein L41, mitochondrial	Q8IXM3	0.014	1.20
Integrin alpha-3	P26006	0.046	1.18
Cathepsin K	P43235	0.000	1.17
Next to BRCA1 gene 1 protein	Q14596	0.034	1.16

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Misshapen-like kinase 1	Q8N4C8	0.013	1.16
Protein NDRG1	Q92597	0.002	1.15
Proteasome activator complex subunit 2	A0A087X1Z3	0.001	1.15
Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	Q53GL0	0.060	1.14
Elongation factor Tu GTP-binding domain-containing protein 1	Q7Z2Z2	0.003	1.11
Sequestosome-1	Q13501	0.011	1.05
Phosphomevalonate kinase	Q15126	0.016	1.04
Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	E7EPA1	0.028	1.02
Ras-related protein Rab-3B	P20337	0.010	1.00
ER lumen protein-retaining receptor 2	P33947	0.013	0.96
Translation factor GUF1, mitochondrial	Q8N442	0.002	0.93
HEAT repeat-containing protein 5B	Q9P2D3	0.009	0.91
Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	Q9Y6N5	5.05E-06	0.90
Nuclear receptor-binding protein	F8W6G1	0.015	0.89
Alpha-catulin	Q9UBT7	0.006	0.89
Nicotinamide phosphoribosyltransferase	P43490	0.000	0.88
Importin-7	O95373	0.005	0.87
Poly [ADP-ribose] polymerase 9	Q8IXQ6	0.015	0.86
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6	A0AVT1	0.000	0.86
BAG family molecular chaperone regulator 5	Q9UL15	0.024	0.86
ATP-dependent RNA helicase DDX39A	O00148	0.001	0.84
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	A0A087WXC5	0.038	0.83
Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1	P43353	0.001	0.83
Gem-associated protein 4	I3L2C7	0.002	0.83
Non-syndromic hearing impairment protein 5	O60443	0.003	0.82
Glutathione S-transferase omega-1	P78417	0.004	0.82
Microsomal glutathione S-transferase 1	P10620	6.38E-05	0.81
Inorganic pyrophosphatase	Q15181	0.001	0.80

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Clathrin heavy chain	A0A087WVQ6	0.000	0.79
Cytosolic purine 5-nucleotidase	P49902	0.007	0.79
Nucleoside diphosphate kinase	Q32Q12	0.015	0.79
Target of Myb protein 1	O60784	0.001	0.79
EPM2A-interacting protein 1	Q7L775	0.007	0.78
Transportin-1	Q92973	0.004	0.77
Hippocalcin-like protein 1	P37235	0.004	0.77
Glycine--tRNA ligase	P41250	0.000	0.76
Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	4.11E-05	0.75
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3	O15254	0.010	0.75
Dynamamin-1	Q05193	5.04E-05	0.75
Dedicator of cytokinesis protein 10	Q96BY6	0.000	0.74
Copine-3	O75131	0.000	0.74
V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	P21281	0.000	0.73
Sorbitol dehydrogenase	Q00796	0.003	0.72
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	Q9P0J0	0.009	0.71
Probable ATP-dependent RNA helicase DHX40	Q8IX18	0.037	0.71
Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 L6	O14933	0.041	0.71
HCLS1-binding protein 3	Q53T59	0.026	0.70
Tissue factor pathway inhibitor 2	P48307	0.033	0.69
Stress-70 protein, mitochondrial	P38646	0.001	0.69
39S ribosomal protein L44, mitochondrial	Q9H9J2	0.022	0.68
E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	Q14669	0.002	0.67
LIM domain and actin-binding protein 1	Q9UHB6	0.005	0.67
Ran GTPase-activating protein 1	P46060	0.001	0.67
Ras and Rab interactor 1	Q13671	0.006	0.67
Poly [ADP-ribose] polymerase 4	Q9UKK3	0.001	0.66
TBC1 domain family member 17	Q9HA65	0.034	0.66

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Cathepsin D	P07339	5.47E-05	0.66
Importin subunit beta-1	Q14974	0.008	0.66
Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	Q13492	0.001	0.66
39S ribosomal protein L21, mitochondrial	Q7Z2W9	0.000	0.65
Citrate synthase	B4DJV2	0.004	0.65
Tubulin-specific chaperone D	J3KR97	0.036	0.65
DCC-interacting protein 13-alpha	Q9UKG1	0.001	0.65
ATPase family AAA domain-containing protein 3B	Q5T9A4	0.000	0.64
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	P54886	0.002	0.64
Disks large-associated protein 5	Q15398	0.007	0.64
Exportin-1	O14980	0.000	0.64
Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 3	Q96P47	0.005	0.64
Tubulin beta-6 chain	Q9BUF5	0.026	0.64
2-5-oligoadenylate synthase-like protein	Q15646	0.001	0.64
ATP-dependent RNA helicase DDX19A	I3L0H8	0.003	0.63
Ras-related GTP-binding protein C	Q9HB90	0.030	0.63
Trafficking protein particle complex subunit 11	Q7Z392	0.015	0.63
Glucoside xylosyltransferase 1	Q4G148	0.001	0.63
Profilin	C9J0J7	0.023	0.62
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	O95352	0.001	0.62
Exocyst complex component 5	F8W9B8	0.011	0.61
Signal transducer and activator of transcription 2	P52630	0.002	0.61
T-complex protein 1 subunit alpha	P17987	0.003	0.61
3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	P09110	0.006	0.61
Serine/threonine-protein kinase PAK 2	Q13177	0.004	0.61
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	Q01082	0.007	0.61
39S ribosomal protein L47, mitochondrial	Q9HD33	0.001	0.60
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	P45974	0.007	0.60

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
39S ribosomal protein L4, mitochondrial	K7ES61	0.008	0.60
Nuclear migration protein nudC	Q9Y266	0.003	0.59
Proliferating cell nuclear antigen	P12004	0.001	0.59
Peroxiredoxin-4	Q13162	0.000	0.59
Dynamamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	O60313	0.026	0.59
Triple functional domain protein	O75962	0.001	0.58
Serum paraoxonase/arylesterase 2	J3QT77	0.008	0.58
Active breakpoint cluster region-related protein	A0A0G2JQ41	0.001	0.58
Lysophospholipid acyltransferase 7	Q96N66	0.032	0.58
V-type proton ATPase subunit G 1	O75348	0.009	0.58
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	P31930	0.003	0.57
Electron transfer flavoprotein subunit beta	P38117	0.001	0.57
Galectin-1	P09382	0.005	0.57
Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	Q13813	0.011	0.57
KIF1-binding protein	Q96EK5	0.003	0.57
KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	Q07666	0.018	0.57
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	Q01970	0.001	0.57
Tubulin-specific chaperone E	Q15813	0.005	0.57
Glutathione peroxidase	A0A087WUQ6	0.002	0.56
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	P22314	0.000	0.56
Filamin-C	Q14315	0.000	0.56
Golgi resident protein GCP60	Q9H3P7	0.006	0.56
DNA excision repair protein ERCC-6-like	B5MDQ0	0.003	0.56
Exportin-2	P55060	0.001	0.56
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Q16555	0.001	0.55
Protein O-GlcNAcase	O60502	0.001	0.55
Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	P50851	0.023	0.55
Protein RUFY3	Q7L099	0.026	0.54

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	O75439	0.021	0.54
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	P49792	0.003	0.54
Protein transport protein Sec24A	O95486	9.48E-05	0.54
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Q13200	0.001	0.54
Protein transport protein Sec24D	O94855	1.11E-05	0.54
Hamartin	Q92574	0.003	0.53
Glia maturation factor beta	G3V4P8	0.026	0.53
F-box only protein 7	Q9Y3I1	0.023	0.53
Phosphoribosylformylglycinamide synthase	O15067	0.011	0.53
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	Q6P158	0.012	0.53
Protein scribble homolog	A0A0G2JNZ2	0.001	0.53
Dystrobrevin alpha	Q9Y4J8	0.003	0.52
39S ribosomal protein L39, mitochondrial	Q9NYK5	0.008	0.52
COP9 signalosome complex subunit 2	B4DIH5	0.006	0.51
39S ribosomal protein L19, mitochondrial	P49406	0.007	0.51
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P06576	0.018	0.51
E3 ubiquitin-protein ligase CBL	A0A0U1RQX8	0.015	0.51
General vesicular transport factor p115	O60763	0.005	0.51
Absent in melanoma 1 protein	A0A0J9YWL0	0.005	0.51
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	0.001	0.51
T-complex protein 1 subunit delta	P50991	0.021	0.51
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	Q13724	0.007	0.51
Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	Q6VY07	0.004	0.51
T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	0.001	0.51
Rabankyrin-5	Q9P2R3	0.002	0.50
General transcription factor II-I	P78347	0.021	0.50
Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	Q96EY7	0.001	0.50
EF-hand domain-containing protein D2	Q96C19	0.012	0.50

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
TBC1 domain family member 23	Q9NUY8	0.015	0.50
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	Q93008	0.008	0.50
Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC4	Q5GLZ8	8.34E-05	0.50
tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase	K7EQQ8	0.008	0.49
GTP-binding protein RAD	P55042	0.002	0.49
Helicase-like transcription factor	A0A0C4DGA6	0.004	0.49
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	Q99714	0.006	0.49
Ras-related protein Rab-34	A8MYQ9	0.008	0.49
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	O14964	0.002	0.49
Cytoplasmic aconitate hydratase	P21399	5.40E-05	0.48
Protein kinase C alpha type	P17252	0.003	0.48
Cathepsin B	P07858	0.005	0.48
T-complex protein 1 subunit beta	P78371	0.005	0.48
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Q96QK1	0.021	0.48
Transcription factor 25	Q9BQ70	0.006	0.48
Rho guanine nucleotide exchange factor 6	Q15052	0.010	0.48
Microtubule-associated protein 1B	P46821	0.000	0.47
Phosphatidylinositol 3-kinase	A8MYT4	0.004	0.47
Alpha-soluble NSF attachment protein	P54920	0.013	0.47
Mitochondrial glutamate carrier 1	Q9H936	0.002	0.47
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	P42224	9.63E-05	0.47
Multifunctional protein ADE2	P22234	0.015	0.46
Cullin-2	A0A0A0MTN0	0.019	0.46
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	P08574	0.001	0.46
Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3	P47895	0.001	0.46
39S ribosomal protein L37, mitochondrial	Q9BZE1	0.016	0.46
Atlastin-3	Q6DD88	0.010	0.46
Heat shock protein 105 kDa	Q92598	0.006	0.45

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
T-complex protein 1 subunit zeta	P40227	0.002	0.45
Paxillin	P49023	0.009	0.45
Minor histocompatibility antigen H13	Q8TCT9	0.013	0.45
MICOS complex subunit MIC27	A0A087WYF7	0.007	0.44
FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	Q9BQS8	0.013	0.43
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	P50416	0.001	0.43
Lon protease homolog, mitochondrial	K7EJE8	0.008	0.43
Hexokinase-1	P19367	0.000	0.43
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	P11586	4.92E-05	0.42
Uncharacterized protein FLJ45252	A0A096LP25	0.014	0.42
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	P49588	0.000	0.42
T-complex protein 1 subunit gamma	P49368	5.29E-05	0.42
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	O95831	0.012	0.42
Vesicle-trafficking protein SEC22b	O75396	0.009	0.42
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	P09622	0.001	0.42
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	P23921	0.005	0.42
Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	0.001	0.42
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	F8W6I7	0.009	0.42
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	Q9H3S7	0.001	0.41
Protein VAC14 homolog	Q08AM6	0.008	0.41
Aconitate hydratase, mitochondrial	Q99798	0.011	0.41
Serine palmitoyltransferase 3	Q9NUV7	0.007	0.41
Importin-4	Q8TEX9	0.009	0.40
AP-2 complex subunit mu	A0A087WY71	0.003	0.40
26S protease regulatory subunit 7	P35998	0.003	0.40
NFX1-type zinc finger-containing protein 1	Q9P2E3	0.003	0.40
Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652	0.004	0.40
Nuclear pore complex protein Nup88	J3KMX1	0.000	0.40

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Calcyclin-binding protein	Q9HB71	0.011	0.39
COP9 signalosome complex subunit 6	E7EM64	0.002	0.39
Ras-related protein Rab-9A	P51151	0.010	0.39
Nuclear pore complex protein Nup155	E9PF10	0.006	0.39
Golgin subfamily A member 2	A0A0C4DGS5	0.004	0.39
PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	Q6Y7W6	0.004	0.38
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD	Q9NQC7	0.009	0.38
Eukaryotic initiation factor 4A-I	P60842	0.008	0.38
COP9 signalosome complex subunit 5	Q92905	0.007	0.37
Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	Q12797	0.006	0.37
Terminal uridylyltransferase 7	Q5VYS8	0.003	0.37
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	Q86VP6	0.003	0.36
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	P26196	0.002	0.36
T-complex protein 1 subunit eta	Q99832	0.001	0.36
ARF GTPase-activating protein GIT2	Q14161	0.001	0.35
tRNA-splicing ligase RtcB homolog	Q9Y3I0	0.002	0.35
Dynactin subunit 1	E7EX90	0.005	0.35
Programmed cell death 6-interacting protein	Q8WUM4	0.003	0.35
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	P00492	0.001	0.34
ATP-dependent RNA helicase DDX1	Q92499	0.002	0.33
Protein transport protein Sec23A	F5H365	0.003	0.33
Elongation factor 2	P13639	0.000	0.32
39S ribosomal protein L9, mitochondrial	Q9BYD2	0.001	0.32
AP-3 complex subunit beta-1	O00203	0.001	0.31
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	P07814	0.003	0.30
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	A0A087WVM4	0.001	0.29
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	P17612	0.000	0.28

Anhang

Tabelle 11: Proteine, welche in der IP gegen HA-gekoppelte mutierte IDH1 nach Durchführung einer subzellulären Fraktionierung eine differenzielle Regulation zwischen den IDH1 mutierten Zellen und den Leervektorkontrollen aufwiesen (Filterkriterien: p-Wert < 0,05; mind. 2 quantifizierte Peptide) (Seite 127 bis 137).

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O75874	3.25E-09	6.75
Clathrin heavy chain 2	P53675	0.014	4.52
39S ribosomal protein L43, mitochondrial	B1AL05	0.000	3.82
RNA-binding protein 3	P98179	0.003	3.75
Heme oxygenase 1	B1AHA8	3.59E-05	3.68
Copine-7	Q9UBL6	3.23E-07	3.22
Nucleolysin TIAR	Q01085	0.032	3.08
AH receptor-interacting protein	O00170	0.005	2.96
Mammalian ependymin-related protein 1	Q9UM22	0.026	2.88
Methionine aminopeptidase 2	F8VRR3	4.79E-07	2.81
7-dehydrocholesterol reductase	E9PJ54	7.71E-05	2.78
DnaJ homolog subfamily B member 4	Q9UDY4	0.017	2.75
Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 3	G3V150	0.038	2.70
Calpain-5	A0A087X0C8	0.001	2.68
EH domain-binding protein 1-like protein 1	Q8N3D4	0.035	2.60
cGMP-dependent protein kinase 1	B1ALS0	0.076	2.58
Semaphorin-3C	Q99985	8.56E-05	2.57
PDZ domain-containing protein GIPC1	O14908	0.031	2.57
Kinesin-associated protein 3	Q92845	0.047	2.54
C2 domain-containing protein 2	Q9Y426	0.026	2.43
General transcription factor IIF subunit 2	P13984	0.080	2.39
Podocalyxin	O00592	0.000	2.37
Type-1 angiotensin II receptor-associated protein	Q6RW13	0.003	2.29
GRIP1-associated protein 1	Q4V328	0.064	2.25
Huntingtin-interacting protein 1	O00291	9.23E-06	2.22
39S ribosomal protein L22, mitochondrial	E7ESL0	0.029	2.22

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
DAZ-associated protein 1	K7EQ02	0.046	2.22
Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	O00154	0.055	2.22
Protein-tyrosine-phosphatase	Q5TG12	0.060	2.06
Ras-related protein Rab-11A	H3BMH2	0.028	2.04
NADH dehydrogenase [ubiquinone] complex I, assembly factor 7	C9J236	0.081	2.00
ATP synthase subunit d, mitochondrial	O75947	0.049	1.98
PITH domain-containing protein 1	Q9GZP4	0.017	1.94
Membrane-associated progesterone receptor component 1	O00264	0.024	1.94
Proteasome assembly chaperone 1	O95456	0.017	1.92
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	Q16718	0.023	1.88
Protein C21orf2	O43822	0.017	1.88
Centrosomal protein of 41 kDa	Q9BYV8	0.064	1.88
RNA polymerase II-associated protein 1	H3BRE8	0.073	1.87
FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 3	Q5JSP0	0.048	1.86
ERI1 exoribonuclease 3	F6QUN3	0.001	1.86
Protein-arginine deiminase type-2	Q9Y2J8	0.014	1.83
Methyltransferase-like protein 7B	A0A087WZT2	0.007	1.83
Annexin A11	P50995	0.047	1.80
Chloride channel CLIC-like protein 1	Q96S66	0.031	1.80
Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	P26572	0.027	1.79
Cell division cycle protein 27 homolog	G5EA36	0.000	1.79
Nuclear mitotic apparatus protein 1	A0A087WY61	0.029	1.75
Complex I assembly factor TIMMDC1, mitochondrial	Q9NPL8	0.006	1.69
Centrosomal protein of 170 kDa protein B	J3KQR7	0.042	1.67
Probable leucine--tRNA ligase, mitochondrial	Q15031	0.025	1.67
Nuclear autoantigenic sperm protein	P49321	0.011	1.65
39S ribosomal protein L41, mitochondrial	Q8IXM3	0.006	1.64
SUMO-activating enzyme subunit 2	Q9UBT2	0.052	1.64
Nestin	P48681	0.000	1.62

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Protein phosphatase 1F	P49593	0.003	1.61
Rho GTPase-activating protein 17	Q68EM7	0.077	1.56
39S ribosomal protein L1, mitochondrial	Q9BYD6	0.074	1.56
Ras-related protein Rab-3B	P20337	0.000	1.53
Probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein CIAO1	O76071	0.038	1.51
Protein FAM83G	A6ND36	0.009	1.50
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	P60891	1.13E-06	1.50
Protein AHNAK2	Q8IVF2	3.66E-06	1.47
Apoptosis-stimulating of p53 protein 2	Q13625	0.024	1.45
Peroxiredoxin-2	P32119	0.051	1.43
Probable glutamate--tRNA ligase, mitochondrial	H3BTB7	0.041	1.42
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	H3BTL1	0.027	1.40
Ankyrin repeat domain-containing protein 13A	H0YIN8	0.051	1.40
28S ribosomal protein S27, mitochondrial	G5EA06	0.047	1.38
HIG1 domain family member 1A, mitochondrial	C9JAW5	0.001	1.36
Inositol monophosphatase 1	P29218	0.016	1.35
Elongator complex protein 5	I3L1Q3	0.074	1.34
Argininosuccinate synthase	P00966	0.001	1.31
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	O96008	0.032	1.30
C-terminal-binding protein 1	Q13363	0.023	1.25
Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	P47813	0.011	1.24
Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1	P43353	0.001	1.23
Signal transducing adapter molecule 1	Q92783	0.071	1.23
28S ribosomal protein S2, mitochondrial	Q5T8A0	0.039	1.22
Secretory carrier-associated membrane protein 3	O14828	0.031	1.21
Microsomal glutathione S-transferase 1	P10620	2.48E-05	1.17
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	Q96RQ3	0.040	1.15
HEAT repeat-containing protein 5B	Q9P2D3	0.004	1.15
Spermidine synthase	P19623	0.015	1.13

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	B5MEG5	0.012	1.11
Synaptobrevin homolog YKT6	O15498	0.002	1.10
Rho GTPase-activating protein 1	Q07960	0.000	1.10
GTP-binding protein SAR1a	Q9NR31	0.004	1.09
Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	E7EPA1	0.030	1.08
EPM2A-interacting protein 1	Q7L775	0.000	1.07
TBC1 domain family member 2A	Q9BYX2	0.001	1.07
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Q9HCC0	0.009	1.06
Synaptopodin	Q8N3V7	0.001	1.05
Protein S100-A10	P60903	0.016	1.05
Nardilysin	G3V1R5	0.045	1.04
Translation factor GUF1, mitochondrial	Q8N442	0.002	1.00
Cystatin-B	P04080	0.003	0.98
Elongation factor Tu GTP-binding domain-containing protein 1	Q7Z2Z2	0.001	0.95
Cytochrome c oxidase assembly protein COX11, mitochondrial	Q9Y6N1	0.002	0.95
Stress-70 protein, mitochondrial	P38646	9.93E-05	0.94
ADP/ATP translocase 3	P12236	0.031	0.92
Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	P53597	0.008	0.92
Golgi apparatus protein 1	Q92896	0.027	0.92
39S ribosomal protein L44, mitochondrial	Q9H9J2	0.003	0.91
Proliferation-associated protein 2G4	Q9UQ80	0.017	0.89
Phosphomevalonate kinase	Q15126	0.000	0.88
SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 1	Q7Z6B7	0.050	0.87
Cathepsin B	P07858	2.57E-05	0.86
Electron transfer flavoprotein subunit beta	P38117	0.001	0.85
ER lumen protein-retaining receptor 2	P33947	0.008	0.85
Metaxin-2	C9JAZ1	0.001	0.84
39S ribosomal protein L19, mitochondrial	P49406	0.002	0.84
Annexin A2	P07355	7.66E-05	0.84

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Target of Myb protein 1	O60784	0.000	0.83
Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog	F6VX93	0.037	0.83
BH3-interacting domain death agonist	P55957	0.032	0.82
39S ribosomal protein L28, mitochondrial	Q13084	0.011	0.81
Tumor suppressor p53-binding protein 1	Q12888	0.007	0.81
Thioredoxin-related transmembrane protein 2	Q9Y320	0.018	0.81
Dedicator of cytokinesis protein 10	Q96BY6	0.000	0.80
Alpha-catulin	Q9UBT7	0.001	0.80
28S ribosomal protein S18a, mitochondrial	Q5QPA5	0.037	0.80
Palladin	Q8WX93	0.002	0.79
Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	Q9Y6N5	0.000	0.79
39S ribosomal protein L39, mitochondrial	Q9NYK5	0.000	0.79
ATP-dependent RNA helicase DDX19A	I3L0H8	0.014	0.79
Filamin-C	Q14315	0.000	0.79
Sorbitol dehydrogenase	Q00796	0.000	0.79
Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	P67812	0.027	0.78
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	O95352	0.000	0.78
Myosin regulatory light polypeptide 9	P24844	0.005	0.78
Nicotinamide phosphoribosyltransferase	P43490	0.000	0.78
3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	P09110	0.002	0.77
Focal adhesion kinase 1	H0YBP1	0.003	0.76
Inorganic pyrophosphatase	Q15181	0.001	0.75
39S ribosomal protein L4, mitochondrial	K7ES61	0.002	0.75
Hexokinase-1	P19367	2.99E-05	0.75
39S ribosomal protein L15, mitochondrial	Q9P015	0.018	0.75
Protein QIL1	A0A140TA86	0.009	0.75
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Q16555	0.000	0.74
Histone chaperone ASF1B	Q9NVP2	0.012	0.74
Non-syndromic hearing impairment protein 5	O60443	0.002	0.73

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
39S ribosomal protein L13, mitochondrial	Q9BYD1	0.003	0.73
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	Q13724	1.65E-06	0.73
Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	O60313	0.013	0.73
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	P49792	0.001	0.72
GTP-binding protein RAD	P55042	0.022	0.72
Transcription factor 25	Q9BQ70	0.000	0.72
Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	Q8TAE8	0.044	0.71
Copine-3	O75131	0.003	0.71
Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	Q13492	0.000	0.71
SUN domain-containing protein 2	Q9UH99	6.31E-06	0.71
39S ribosomal protein L37, mitochondrial	Q9BZE1	0.004	0.71
39S ribosomal protein L49, mitochondrial	Q13405	0.004	0.70
39S ribosomal protein L10, mitochondrial	Q7Z7H8	0.011	0.70
39S ribosomal protein L21, mitochondrial	Q7Z2W9	0.003	0.70
39S ribosomal protein L47, mitochondrial	Q9HD33	0.005	0.69
MICOS complex subunit MIC27	A0A087WYF7	0.002	0.68
Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 L6	O14933	0.007	0.67
Rabankyrin-5	Q9P2R3	0.001	0.67
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	P08574	0.000	0.67
Intraflagellar transport protein 172 homolog	Q9UG01	0.026	0.66
Teneurin-3	Q9P273	0.002	0.66
Mitochondrial glutamate carrier 1	Q9H936	0.002	0.66
Ubiquitin-associated protein 2	Q5T6F2	0.005	0.66
Clathrin heavy chain	A0A087WVQ6	0.001	0.66
TBC1 domain family member 23	Q9NUY8	0.013	0.66
Dynamin-1	Q05193	9.93E-05	0.66
39S ribosomal protein L9, mitochondrial	Q9BYD2	0.001	0.65
F-box only protein 7	Q9Y3I1	0.001	0.65
Cathepsin K	P43235	0.006	0.65

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	P31930	0.005	0.65
FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	Q9BQS8	0.002	0.65
MICAL-like protein 1	Q8N3F8	0.016	0.64
Tubulin beta-3 chain	Q13509	0.000	0.64
BMP-2-inducible protein kinase	Q9NSY1	0.017	0.64
39S ribosomal protein L24, mitochondrial	Q96A35	0.037	0.63
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	P42224	0.001	0.63
Disks large-associated protein 5	Q15398	0.004	0.63
ATPase family AAA domain-containing protein 3B	Q5T9A4	0.002	0.63
39S ribosomal protein L38, mitochondrial	Q96DV4	0.001	0.63
Poly [ADP-ribose] polymerase 9	Q8IXQ6	0.009	0.62
Paxillin	P49023	3.99E-05	0.61
Tubulin alpha-4A chain	P68366	0.001	0.61
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	Q09666	0.000	0.61
Ribosome maturation protein SBDS	A0A087X020	0.007	0.61
T-complex protein 1 subunit alpha	P17987	0.007	0.60
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	A0A087WSW9	0.006	0.60
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Q7KZF4	0.009	0.59
Signal recognition particle receptor subunit alpha	P08240	0.004	0.59
Aconitate hydratase, mitochondrial	Q99798	0.001	0.59
Filamin-B	O75369	0.000	0.59
V-type proton ATPase subunit C 1	P21283	0.008	0.58
Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 3	Q96P47	0.002	0.58
Phosphatidylinositol 3-kinase	A8MYT4	0.003	0.58
Peroxisredoxin-4	Q13162	0.000	0.58
Trafficking protein particle complex subunit 8	Q9Y2L5	0.012	0.57
Active breakpoint cluster region-related protein	A0A0G2JQ41	0.001	0.57
Kinesin-like protein	A0A087WWA3	0.005	0.57
Citrate synthase	B4DJV2	0.002	0.57

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	P24539	0.023	0.57
Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	Q96C36	0.008	0.56
Monoacylglycerol lipase ABHD12	Q8N2K0	0.019	0.56
ATP-citrate synthase	P53396	0.006	0.56
A-kinase anchor protein 1, mitochondrial	Q92667	0.000	0.56
2-5-oligoadenylate synthase-like protein	Q15646	0.002	0.56
SH3 domain-binding protein 4	Q9P0V3	5.16E-05	0.56
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Q13200	0.000	0.56
Glycine--tRNA ligase	P41250	0.001	0.56
Anion exchange protein 2	P04920	0.009	0.56
Proliferating cell nuclear antigen	P12004	0.002	0.54
C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	O60271	0.008	0.54
Glucoside xylosyltransferase 1	Q4G148	0.004	0.54
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	O95831	0.004	0.54
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	O43237	0.022	0.53
ATP-dependent RNA helicase DDX39A	O00148	0.001	0.53
Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	Q6P1N0	0.022	0.53
Sorting nexin-27	Q96L92	0.007	0.53
Atlastin-3	Q6DD88	0.012	0.53
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	P54886	0.019	0.53
ATP-dependent RNA helicase DHX29	A0A087WYN9	0.000	0.53
Glutathione S-transferase omega-1	P78417	0.002	0.52
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	O75746	0.000	0.52
Microtubule-associated protein 1B	P46821	0.001	0.52
4F2 cell-surface antigen heavy chain	F5GZS6	0.005	0.52
Cathepsin D	P07339	0.002	0.52
KIF1-binding protein	Q96EK5	0.009	0.51
Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	Q9Y305	0.015	0.51
Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	Q96EY7	0.001	0.50

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	P34897	0.017	0.50
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	0.009	0.50
Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	Q06210	0.002	0.49
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	P33121	0.001	0.49
Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1	Q14558	0.019	0.49
Ran GTPase-activating protein 1	P46060	0.017	0.49
Leucine-rich repeat-containing protein 59	Q96AG4	0.027	0.49
Pyrroline-5-carboxylate reductase	A0A0A0MQS1	0.020	0.49
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	P26196	0.018	0.49
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	P54577	0.006	0.48
Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	P51812	0.002	0.48
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	0.002	0.48
Protein FAM91A1	Q658Y4	0.007	0.48
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	Q13283	0.012	0.47
Poly [ADP-ribose] polymerase 14	Q460N5	0.024	0.47
T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	0.000	0.47
Triple functional domain protein	O75962	0.002	0.47
Trans-3-hydroxy-L-proline dehydratase	Q96EM0	0.023	0.47
PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	Q6Y7W6	0.001	0.47
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	O75439	0.009	0.47
Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	0.005	0.46
Growth factor receptor-bound protein 2	P62993	0.002	0.46
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	P40939	0.002	0.46
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705	0.007	0.45
Growth factor receptor-bound protein 10	Q13322	5.87E-05	0.45
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Q12931	9.65E-05	0.44
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	P09622	0.002	0.44
Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	Q5QPK2	0.020	0.44
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	Q01082	0.006	0.44

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
T-complex protein 1 subunit zeta	P40227	0.000	0.44
MICOS complex subunit MIC60	Q16891	0.010	0.43
ARF GTPase-activating protein GIT2	Q14161	0.001	0.43
CAP-Gly domain-containing linker protein 1	P30622	0.018	0.43
Poly [ADP-ribose] polymerase 4	Q9UUK3	0.003	0.43
Ras GTPase-activating protein nGAP	Q9UJF2	0.007	0.42
Trafficking protein particle complex subunit 11	Q7Z392	0.002	0.42
NFX1-type zinc finger-containing protein 1	Q9P2E3	0.005	0.42
Uridine-cytidine kinase 2	Q9BZX2	0.016	0.42
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	P23634	0.005	0.42
Protein scribble homolog	A0A0G2JNZ2	0.011	0.42
AP-1 complex subunit beta-1	Q10567	0.015	0.42
Sorting nexin-17	Q15036	0.003	0.41
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	P46734	0.002	0.41
ATP synthase subunit g, mitochondrial	E9PN17	0.015	0.41
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein	Q07954	0.003	0.41
T-complex protein 1 subunit gamma	P49368	7.13E-05	0.40
Golgin subfamily A member 2	A0A0C4DGS5	0.004	0.40
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	P07814	0.002	0.40
ARF GTPase-activating protein GIT1	Q9Y2X7	0.015	0.40
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Q96QK1	0.014	0.40
V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	P21281	0.004	0.39
WD repeat-containing protein 11	Q9BZH6	0.003	0.38
Minor histocompatibility antigen H13	Q8TCT9	0.008	0.38
Microtubule cross-linking factor 1	Q9Y4B5	0.013	0.38
Echinoderm microtubule-associated protein-like 3	G3V195	0.003	0.38
Lethal(2) giant larvae protein homolog 1	A0A087WW77	0.001	0.38
Dynamamin-1-like protein	G8JLD5	0.005	0.37
26S protease regulatory subunit 4	P62191	0.002	0.37

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID	p-Wert	T-Test Unterschied
Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4	B7ZLQ8	0.009	0.37
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	0.008	0.36
Serine/threonine-protein kinase WNK1	F5GWT4	0.000	0.36
AP-2 complex subunit alpha-1	O95782	0.004	0.36
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	P41091	0.008	0.36
E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	Q8TDB6	0.007	0.36
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	P11586	0.002	0.35
DNA replication licensing factor MCM5	P33992	0.002	0.35
Clustered mitochondria protein homolog	K7EIG1	0.000	0.35
Alpha-centractin	P61163	0.001	0.35
Elongation factor Tu, mitochondrial	P49411	0.000	0.34
E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	Q14258	0.004	0.34
AP-1 complex subunit gamma-1	O43747	0.004	0.34
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	P50416	0.003	0.34
Polymerase I and transcript release factor	Q6NZI2	0.002	0.33
Unconventional myosin-Ic	F5H6E2	0.002	0.33
ATP-dependent RNA helicase DDX1	Q92499	0.006	0.32
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	P00492	0.001	0.28
Thyroid receptor-interacting protein 6	Q15654	0.001	0.28
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	D6RFM5	0.000	0.27

Tabelle 12: Proteine, welche mindestens ein phosphoryliertes Peptid tragen und exklusiv in den NSC/NPCs, welche die mutierte Form der IDH1 tragen, identifiziert wurden (Seite 138 bis 142).

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
G patch domain-containing protein 1	Q9DBM1
Unconventional myosin-Ic	Q9WTI7
Lysine-specific demethylase 3B	Q6ZPY7
AP-4 complex subunit epsilon-1	Q80V94
Bardet-Biedl syndrome 2 protein homolog	Q9CWF6
Protein ALEX	Q6R0H6
Titin	A2ASS6
Scm-like with four MBT domains protein 1	Q9JMD1
Beta-adducin	Q9QYB8
Protein lin-37 homolog	Q9D8N6
Diacylglycerol kinase theta	Q6P5E8
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8	Q09XV5
Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 2	Q812E0
Uncharacterized protein C4orf46 homolog	Q3UUX7
Protein bicaudal D homolog 1	Q8BR07
Histone-lysine N-methyltransferase SETD1B	Q8CFT2
Nucleolar complex protein 2 homolog	Q9WV70
Poly(A)-specific ribonuclease PNLDC1	B2RXZ1
Aprataxin and PNK-like factor	Q9D842
ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1	Q99MI1
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2	Q6P549
Glycogen synthase kinase-3 alpha	Q2NL51
Kelch domain-containing protein 2	Q4G5Y1
Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-1	P51141
Pogo transposable element with KRAB domain	Q80TC5
Tryptophan 2,3-dioxygenase	P48776
Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	Q9CR26
F-box/LRR-repeat protein 20	Q9CZV8
Proton-coupled amino acid transporter 2	Q8BHK3
ATP-binding cassette sub-family A member 13	Q5SSE9
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P17742
Nuclear receptor-binding protein	Q99J45
DNA replication licensing factor MCM4	P49717
SUN domain-containing protein 2	Q8BJS4
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1S	Q02789
G1/S-specific cyclin-D1	P25322
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	Q9Z0W1
Spermatogenesis-associated protein 4	Q8K3V1
Sodium/hydrogen exchanger 7	Q8BLV3
Homeobox and leucine zipper protein Homez	Q80W88
Ankyrin repeat and BTB/P	Q6GQW0
Multidrug resistance-associated protein 5	Q9R1X5

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2, mitochondrial	Q14DK4
Protein S	E1U8D0
14-3-3 protein theta	P68254
Liprin-beta-2	O35711
Golgin subfamily A member 4	Q91VW5
Putative uncharacterized protein ZNRD1-AS1	Q8R0E5
Transcription elongation factor A protein-like 3	Q8R0A5
Heme oxygenase 1	P14901
E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7	Q922B6
Rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha	P27664
Vesicle transport protein SFT2A	Q5SSN7
IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	Q5DU25
Src kinase-associated phosphoprotein 2	Q3UND0
Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A	O88939
Ras-related protein R-Ras2	P62071
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	Q9D898
Neuroigin-3	Q8BYM5
Rho guanine nucleotide exchange factor 12	Q8R4H2
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	Q9Z2B5
Uncharacterized protein C12orf45 homolog	Q9CX66
TAR DNA-binding protein 43	Q921F2
HIV Tat-specific factor 1 homolog	Q8BGC0
Tripartite motif-containing protein 47	Q8C0E3
Sortilin	Q6PHU5
Uncharacterized protein KIAA1109	A2AAE1
Protein HIRA	Q61666
Spartin	Q8R1X6
Ubiquitin-associated protein 2	Q91VX2
Nucleoside diphosphate kinase A	P15532
Histone-binding protein RBBP7	Q60973
Chromatin assembly factor 1 subunit B	Q9D0N7
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-4	Q3UQI9
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4	P47809
Transcription factor Sp3	O70494
Solute carrier family 35 member C2	Q8VCX2
Terminal uridylyltransferase 4	B2RX14
Apoptosis-stimulating of p53 protein 2	Q8CG79
BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like	Q9Z2F7
Transducin-like enhancer protein 6	Q9WVB3
Cell division cycle protein 16 homolog	Q8R349
DNA fragmentation factor subunit alpha	O54786
Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 4	Q8VED2
cAMP-regulated phosphoprotein 21	Q9DCB4
Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform	P18826

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
Pericentrin	P48725
Exocyst complex component 2	Q9D4H1
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	P11881
SH3 domain-binding protein 4	Q921I6
GAS2-like protein 1	Q8JZP9
Probable histidine--tRNA ligase, mitochondrial	Q99KK9
Low-density lipoprotein receptor-related protein 4	Q8VI56
Homer protein homolog 3	Q99JP6
FH2 domain-containing protein 1	Q3ULZ2
E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	Q4U2R1
SNF-related serine/threonine-protein kinase	Q8VDU5
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	Q9CX86
Putative monooxygenase p33M	Q9DBN4
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1	Q8BJQ2
Lysine-specific demethylase 2A	P59997
Actin filament-associated protein 1-like 2	Q5DTU0
Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	Q8R574
Repressor of RNA polymerase III transcription MAF1 homolog	Q9D0U6
TBC1 domain family member 24	Q3UUG6
E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6	P97868
Leucine rich adaptor protein 1	Q9D6I9
StAR-related lipid transfer protein 3	Q61542
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	P05132
TNFAIP3-interacting protein 1	Q9WUU8
SRSF protein kinase 1	O70551
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 35	Q9D8C8
Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	Q3UHK8
Inactive phospholipase C-like protein 1	Q3USB7
Myocyte-specific enhancer factor 2C	Q8CFN5
Spindle and kinetochore-associated protein 3	Q8C263
Integrin alpha-4	Q00651
Histone acetyltransferase p300	B2RWS6
TBC1 domain family member 10A	P58802
Engulfment and cell motility protein 1	Q8BPU7
Serine/threonine-protein kinase LMTK2	Q3TYD6
F-box only protein 2	Q80UW2
Mdm2-binding protein	Q8BJS8
ATPase SWSAP1	Q8VCI7
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	Q9JMA1
Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein	Q3UHC0
Zinc finger MYM-type protein 2	Q9CU65
Roquin-1	Q4VGL6
SURP and G-patch domain-containing protein 1	Q8CH02
Coiled-coil domain-containing protein 22	Q9JIG7

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
Putative adenosylhomocysteinase 3	Q68FL4
Alpha-enolase	P17182
RE1-silencing transcription factor	Q8VIG1
PDZ and LIM domain protein 1	O70400
Fos-related antigen 2	P47930
Protein canopy homolog 4	Q8BQ47
Retrotransposon-derived protein PEG10	Q7TN75
CD2-associated protein	Q9JLQ0
REST corepressor 1	Q8CFE3
FAS-associated factor 1	P54731
Vacuolar fusion protein M	Q6PDG8
Autophagy-related protein 16-1	Q8C0J2
Monoacylglycerol lipase ABHD2	Q9QXM0
Transcription initiation factor TFIID subunit 6	Q62311
Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2	P58801
Signal recognition particle 14 kDa protein	P16254
Adiponectin receptor protein 1	Q91VH1
Zinc finger SWIM domain-containing protein 8	Q3UHH1
E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	P23804
Nuclear factor of activated T-cells 5	Q9WV30
Serine/arginine-rich splicing factor 3	P84104
Golgin subfamily A member 1	Q9CW79
Neuromodulin	P06837
Adhesion G protein-coupled receptor L3	Q80TS3
Phosphatidylserine synthase 2	Q9Z1X2
Small integral membrane protein 13	E9Q942
Nucleoside diphosphate kinase B	Q01768
Dedicator of cytokinesis protein 11	A2AF47
BTB/P	Q80X66
Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1	Q9JKC6
Adrenodoxin, mitochondrial	P46656
Histone deacetylase 5	Q9Z2V6
Calcineurin subunit B type 1	Q63810
Sestrin-2	P58043
Bcl-2-binding component 3	Q99ML1
Heat shock protein beta-1	P14602
Class E basic helix-loop-helix protein 40	O35185
Integrator complex subunit 12	Q9D168
Transcription factor Dp-1	Q08639
Egl nine homolog 1	Q91YE3
IQ domain-containing protein E	Q6PCQ0
Ski-like protein	Q60665
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm8	Q6ZWM4
cGMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase	Q922S4

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
Protein Dr1	Q91WV0
Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	Q8R2M2
CREB-regulated transcription coactivator 1	Q68ED7
Microtubule-associated protein 9	Q3TRR0
Lysine-specific demethylase 4B	Q91VY5
Filamin-B	Q80X90
Interstitial collagenase A	Q9EPL5
Coiled-coil domain-containing protein 85A	Q5SP85
Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family A member 1	B2RUJ5
SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	Q9D8T7

Tabelle 13: Proteine, welche mindestens ein phosphoryliertes Peptid tragen und exklusiv in den NSC/NPCs, welche die wild-typische Form der IDH1 tragen, identifiziert wurden (Seite 143 bis 151).

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
RIMS-binding protein 2	Q80U40
WW domain-containing oxidoreductase	Q91WL8
KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4	Q6P9J5
snRNA-activating protein complex subunit 1	Q8K0S9
Centrosomal protein of 55 kDa	Q8BT07
AT-rich interactive domain-containing protein 3A	Q62431
Protein TSSC4	Q9JHE7
Histone H2A deubiquitinase MYSM1	Q69Z66
Putative Polycomb group protein ASXL2	Q8BZ32
Calcipressin-3	Q9JKK0
Insulin gene enhancer protein ISL-2	Q9CXV0
Fibroblast growth factor receptor 3	Q61851
Protein lin-54 homolog	Q571G4
Sorting nexin-17	Q8BVL3
Microtubule cross-linking factor 1	Q3UHU5
mRNA decay activator protein ZFP36L2	P23949
Thyroglobulin	O08710
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	P08775
Rap guanine nucleotide exchange factor 2	Q8CHG7
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14	A2ABV5
5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	Q5EG47
RNA-binding protein with serine-rich domain 1	Q99M28
Nuclear distribution protein nudE-like 1	Q9ERR1
N-alpha-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit	Q9D2U5
AF4/FMR2 family member 1	O88573
Cell division cycle-associated protein 3	Q99M54
Kinesin-like protein KIF21B	Q9QXL1
Glycogen synthase kinase-3 beta	Q9WV60
Cyclin-dependent kinase 2	P97377
Unconventional myosin-Va	Q99104
DnaJ homolog subfamily C member 21	E9Q8D0
Integrin alpha-E	Q60677
Zinc transporter ZIP10	Q6P5F6
Sperm head and tail associated protein	C4P6S0
Protein angel homolog 1	Q8VCU0
Phosphorylated adapter RNA export protein	Q9JJT9
Protein Noxp20	Q9D281
Cytosolic 5'-nucleotidase 1B	Q91YE9
Transcriptional repressor CTCF	Q61164
Cingulin	P59242
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	P21278
Histone-lysine N-methyltransferase EZH2	Q61188

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
AT-rich interactive domain-containing protein 5A	Q3U108
Translin-associated protein X	Q9QZE7
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	Q64518
WD repeat-containing protein 48	Q8BH57
Elongation factor 1-gamma	Q9D8N0
Kelch-like protein 9	Q6ZPT1
Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Q5SUR0
Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit	Q9WTK5
Centrobin	Q8CB62
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1	Q91YS8
60S ribosomal protein L12	P35979
SET domain-containing protein 5	Q5XJV7
APC membrane recruitment protein 2	Q8CCJ4
Plasminogen	P20918
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	Q8CI11
RAB6A-GEF complex partner protein 1	Q69ZJ7
G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1	Q5U4C1
Leucine-rich repeat-containing protein 4B	P0C192
DNA ligase 3	P97386
Ral GTPase-activating protein subunit beta	Q8BQZ4
Multiple PDZ domain protein	Q8VBX6
Sodium bicarbonate cotransporter 3	Q8BTY2
Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, liver isoform	Q8BWJ3
Cyclin-T2	Q7TQK0
Protein Daple	Q6VGS5
Coilin	Q5SU73
Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 3	Q8BLB7
Protein FAM160B1	Q8CDM8
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	B9EKR1
EH domain-binding protein 1	Q69ZW3
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	Q6PDQ2
E3 SUM	O88907
ATP-dependent RNA helicase DDX24	Q9ESV0
ADP-ribosylation factor-like protein 13B	Q640N2
Atherin	D3YXK1
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56	Q80VI1
Caskin-1	Q6P9K8
MKL/myocardin-like protein 1	Q8K4J6
WD repeat-containing protein 11	Q8K1X1
Dystonin	Q91ZU6
Krueppel-like factor 10	O89091
Immunoglobulin superfamily DCC subclass member 4	Q9EQS9
DDB1- and CUL4-associated factor 5	Q80T85
Protein SMG7	Q5RJH6

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
ETS-related transcription factor Elf-1	Q60775
DnaJ homolog subfamily C member 2	P54103
Disks large-associated protein 5	Q8K4R9
MAPK regulated corepressor interacting protein 2	Q9CQB2
Dystrophin	P11531
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	P51480
Suppressor of SWI4 1 homolog	Q91YU8
Protein KRI1 homolog	Q8VDQ9
Zinc finger protein ZFPM2	Q8CCH7
Zinc finger protein 703	P0CL69
Msx2-interacting protein	Q62504
Pre-mRNA-splicing factor 38B	Q80SY5
Metastasis-associated protein MTA3	Q924K8
WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2	Q80W47
60S ribosomal protein L14	Q9CR57
G patch domain-containing protein 4	Q3TFK5
StAR-related lipid transfer protein 13	Q923Q2
Nardilysin	Q8BHG1
ATP-dependent RNA helicase DDX54	Q8K4L0
Serine/threonine-protein kinase TA	Q5F2E8
Little elongation complex subunit 1	E9Q286
Histone acetyltransferase KAT6A	Q8BZ21
Origin recognition complex subunit 6	Q9WUJ8
Partitioning defective 3 homolog B	Q9CSB4
Multiple myeloma tumor-associated protein 2 homolog	Q99LX5
Centrosomal protein of 97 kDa	Q9CZ62
Folliculin	Q8QZS3
Cerebellar degeneration-related protein 2-like	A2A6T1
CASP8-associated protein 2	Q9WUF3
Ubiquitin thioesterase	Q7TQI3
TBC1 domain family member 4	Q8BYJ6
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	Q99L45
RING1 and YY1-binding protein	Q8CCI5
Heparanase	Q6YGZ1
STAGA complex 65 subunit gamma	Q9CZV5
F-box only protein 42	Q6PDJ6
Ribosome-binding protein 1	Q99PL5
Transcription factor III B 90 kDa subunit	Q8CFK2
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 45	Q8K387
cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 7B	Q9QXQ1
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	P39689
Potassium voltage-gated channel subfamily A member 2	P63141
Breast carcinoma-amplified sequence 1 homolog	Q80YN3
Histone H1.2	P15864

Anhang

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	Q91ZW3
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	Q91ZX7
Zinc finger E-box-binding homeobox 2	Q9R0G7
Zinc finger protein 48	Q3US17
Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2	Q9Z2Z9
Plexin domain-containing protein 2	Q9DC11
Keratin, type I cytoskeletal 42	Q6IFX2
Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B	Q01065
Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD2	Q8CDU6
Telomere length regulation protein TEL2 homolog	Q9DC40
Tripartite motif-containing protein 3	Q9R1R2
Kelch domain-containing protein 7A	A2APT9
Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific	O88491
Rab-3A-interacting protein	Q68EF0
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform	Q60996
Homeobox-containing protein 1	Q8BJA3
Tudor domain-containing protein 3	Q91W18
Rho GTPase-activating protein 1	Q5FWK3
Non-canonical poly(A) RNA polymerase PAPD5	Q68ED3
Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2	O35219
Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 2	P59178
Fibronectin type III domain-containing protein 3B	Q6NWW9
Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 3	Q8BVU0
Cyclin-dependent kinase 17	Q8K0D0
Protein FAM53B	Q8BGR5
Plexin-C1	Q9QZC2
FERM domain-containing protein 4A	Q8BIE6
Citron Rho-interacting kinase	P49025
Serine/threonine-protein kinase greatwall	Q8C0P0
Adhesion G protein-coupled receptor L2	Q8JZZ7
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14	Q62130
Translocon-associated protein subunit alpha	Q9CY50
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	P31230
Non-histone chromosomal protein HMG-14	P18608
Nucleus accumbens-associated protein 1	Q7TSZ8
Luc7-like protein 3	Q5SUF2
AP-2 complex subunit alpha-1	P17426
Poly(A) polymerase gamma	Q6PCL9
Glucocorticoid receptor	P06537
Protein Spindly	Q923A2
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	O88569
Nucleolar protein 7	Q9D7Z3
TNF receptor-associated factor 6	P70196
N-lysine methyltransferase SETD6	Q9CWY3

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
AN1-type zinc finger protein 5	O88878
LIM domain-containing protein ajuba	Q91XC0
TNF receptor-associated factor 4	Q61382
Aladin	P58742
Signal transducing adapter molecule 1	P70297
Proteasome subunit alpha type-3	O70435
Ectoderm-neural cortex protein 1	O35709
Methyl-CpG-binding protein 2	Q9Z2D6
Zinc finger protein 513	Q6PD29
Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP1	Q9R060
Beta-actin-like protein 2	Q8BFZ3
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	Q60829
Metal transporter CNNM3	Q32NY4
B-cell CLL/lymphoma 7 protein family member C	O08664
SHC-transforming protein 4	Q6S5L9
Histone-lysine N-methyltransferase 2B	O08550
60S ribosomal protein L18a	P62717
Dedicator of cytokinesis protein 6	Q8VDR9
Ancient ubiquitous protein 1	P70295
m7GpppX diphosphatase	Q9DAR7
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	Q9CPN8
Zinc finger CCHC-type and RNA-binding motif-containing protein 1	Q9CZ96
(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2	Q6ZPJ3
WAS/WASL-interacting protein family member 2	Q6PEV3
3'-5' exoribonuclease 1	Q7TMF2
Chromosome-associated kinesin KIF4	P33174
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	Q9JHS4
E3 ubiquitin-protein ligase CHFR	Q810L3
Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A	Q8VDS4
Gap junction alpha-1 protein	P23242
DCC-interacting protein 13-alpha	Q8K3H0
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	P70398
Chromatin accessibility complex protein 1	Q9JKP8
Cyclin-dependent kinase 4	P30285
Transcription factor S	Q06831
Sodium channel modifier 1	Q8K136
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21	Q9EPU5
Trimethylguanosine synthase	Q923W1
Terminal uridylyltransferase 7	Q5BLK4
Serine/threonine-protein kinase Nek1	P51954
CCR4-N	Q8C5L3
Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	Q08460
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	O35737
Cell division cycle 5-like protein	Q6A068

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
Eukaryotic translation initiation factor 4H	Q9WUK2
Zinc finger protein 516	Q7TSH3
Melanoma-associated antigen H1	Q9NWXG9
Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2	Q80Y81
Zinc finger and BTB domain-containing protein 7C	Q8VCZ7
Zinc finger CCCH domain-containing protein 14	Q8BJ05
Homeobox protein Nkx-6.1	Q99MA9
Presenilin-2	Q61144
BRISC and BRCA1-A complex member 1	Q3UI43
Paired amphipathic helix protein Sin3a	Q60520
Fas-binding factor 1	A2A870
ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 4	Q9JM93
SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	Q8R550
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36	B1AQJ2
Kalirin	A2CG49
Tubulin beta-2A chain	Q7TMM9
Protein unc-79 homolog	Q0KK59
Protein sprouty homolog 1	Q9QXV9
Septin-7	O55131
UAP56-interacting factor	Q91Z49
Prostate tumor-overexpressed gene 1 protein homolog	Q91VU8
Ephrin type-A receptor 10	Q8BYG9
SLAIN motif-containing protein 1	Q68FF7
Solute carrier family 15 member 4	Q91W98
Nucleolar protein 3	Q9D1X0
WD repeat and FYVE domain-containing protein 3	Q6VNB8
Transmembrane protein 132A	Q922P8
AMME syndrome candidate gene 1 protein homolog	Q9JHT5
AN1-type zinc finger protein 6	Q9DCH6
Pleckstrin homology domain-containing family G member 5	Q66T02
Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family A member 2	P98084
Claspin	Q80YR7
Ribosomal protein S6 kinase delta-1	Q8BLK9
Rho guanine nucleotide exchange factor 18	Q6P9R4
Neurogenic locus notch homolog protein 3	Q61982
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-3	Q9CV28
Mitochondrial fission regulator 2	Q8VED8
Eyes absent homolog 3	P97480
Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	P05480
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	Q9D0R2
Nuclear speckle splicing regulatory protein 1	Q5NCR9
Protein quaking	Q9QYS9
Sperm-associated antigen 5	Q7TME2
Twinfilin-1	Q91YR1

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
WD repeat-containing protein 20	Q9D5R2
Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	Q3UPF5
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	Q8BVY0
Zinc finger and BTB domain-containing protein 22	Q9Z0G7
Sorting nexin-16	Q8C080
WD repeat-containing protein 81	Q5ND34
Transcription factor S	P53783
Allograft inflammatory factor 1-like	Q9EQX4
Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	Q9WV32
Neurologin-2	Q69ZK9
Vasculin	Q6NXH3
G1/S-specific cyclin-E1	Q61457
Tyrosine-protein kinase ABL1	P00520
PHD finger protein 6	Q9D4J7
Protocadherin-16	E9PVD3
Inactive tyrosine-protein kinase 7	Q8BKG3
Separin	P60330
Krueppel-like factor 4	Q60793
Inositol hexakisphosphate kinase 1	Q6PD10
Uncharacterized protein KIAA0513	Q8R0A7
DNA polymerase alpha subunit B	P33611
Hermansky-Pudlak syndrome 5 protein homolog	P59438
DNA-binding protein SMUBP-2	P40694
Folliculin-interacting protein 2	Q80TD3
Protein FAM234B	Q8BYI8
Amino-terminal enhancer of split	P63002
ER membrane protein complex subunit 4	Q9CZX9
Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4	Q7TN98
Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein homolog	Q9CZD0
YEATS domain-containing protein 2	Q3TUF7
YY1-associated factor 2	Q99LW6
Lamin-B receptor	Q3U9G9
KAT8 regulatory NSL complex subunit 2	Q8BQR4
Protein ABHD15	Q5F2F2
Dystrophia myotonica WD repeat-containing protein	Q08274
Armadillo repeat-containing X-linked protein 3	Q8BHS6
E3 ubiquitin-protein ligase CBL	P22682
E3 UFM1-protein ligase 1	Q8CCJ3
Tight junction-associated protein 1	Q9DCD5
SUN domain-containing ossification factor	Q8C341
Transcription initiation factor TFIID subunit 9	Q8VI33
Zinc finger FYVE domain-containing protein 26	Q5DU37
26S proteasome regulatory subunit 6B	P54775
E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	Q7TPV2

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E2	Q91W82
Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1	Q8K341
Zinc finger and BTB domain-containing protein 20	Q8K0L9
Zinc finger and BTB domain-containing protein 46	Q8BID6
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1A	Q9ERT9
RAD51-associated protein 1	Q8C551
Transmembrane protein 131	O70472
Sodium-dependent multivitamin transporter	Q5U4D8
DNA replication licensing factor MCM6	P97311
TBC1 domain family member 8	Q9Z1A9
Protein FAM135A	Q6NS59
Splicing factor 3A subunit 1	Q8K4Z5
Protein C-ets-1	P27577
DmX-like protein 1	Q6PNC0
Unconventional myosin-VI	Q64331
Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	Q5H8C4
Polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase N	Q3TZX8
Low-density lipoprotein receptor	P35951
TBC1 domain family member 22A	Q8R5A6
Smoothelin	Q921U8
E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH	Q7TPQ3
Ras-responsive element-binding protein 1	Q3UH06
	Q9EQW6
Activated CDC42 kinase 1	O54967
Zinc finger protein 622	Q91VY9
Protein-associating with the carboxyl-terminal domain of ezrin	Q9DBQ7
Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 3	P31650
Regulator of cell cycle RGCC	Q9DBX1
Protein FAM193A	Q8CGI1
Active breakpoint cluster region-related protein	Q5SSL4
Transcription initiation factor TFIID subunit 9B	Q6NZA9
Transmembrane and coiled-coil domain protein 3	Q8R310
Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	Q80UJ7
Mitogen-activated protein kinase 4	Q6P5G0
Protein TALPID3	E9PV87
Histone deacetylase 7	Q8C2B3
Rho-associated protein kinase 1	P70335
Kelch-like protein 17	Q6TDP3
Solute carrier family 15 member 2	Q9ES07
PHD finger protein 12	Q5SPL2
BCL-6 corepressor	Q8CGN4
B-cell CLL/lymphoma 9 protein	Q9D219
Tubby-related protein 3	O88413
BTB/P	Q8K0E1

Proteinbeschreibung	Uniprot-ID
Apoptosis regulator Bcl-2	P10417
TRAF3-interacting protein 1	Q149C2
Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	Q9ESE1
Protein lin-9 homolog	Q8C735
Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2	Q9Z0V2
Cell death regulator Aven	Q9D9K3

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Kai Stühler für die Überlassung des interessanten Themas, die vielen Diskussionen und guten Anregungen und Ideen bedanken.

Mein zweiter Dank gilt Prof. Dr. Mathias Beller für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die gute Zusammenarbeit und ausführliche biologische Diskussionen möchte ich mich herzlich bei Dr. Christiane Knobbe-Thomsen und den weiteren Mitgliedern des KnoTho-Labs bedanken. Besonders möchte ich mich bei Miriam Knühmann bedanken, die mir in allen Zellkulturfragen eine große Hilfe und Unterstützung war.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Anja Stefanski, die mich über meine gesamte Promotion hin begleitet hat, mir immer neue Denkanstöße geliefert hat und durch die die Proteinanalytik und massenspektrometrische Analysen mittlerweile die gleiche Faszination auf mich ausüben wie auf sie. Ich hätte mir keine bessere Betreuung für meine Promotion wünschen können!

Auch bei meinen anderen Kollegen am Molecular Proteomics Laboratory möchte ich mich herzlich für die Hilfestellungen, Diskussionen und die Unterstützung bedanken. Für die ausführliche Einarbeitung danke ich Eva Bruns. Besonderer Dank gilt Christin Hafermann, Falk Baberg und Daniel Waldera. Wir haben fruchtbare Diskussionen geführt, Ideen besprochen und viel gelacht. Diese gute Zusammenarbeit und das super Arbeitsklima haben meine Arbeit immer wieder weiter voran gebracht.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken, ohne euch wäre das nicht möglich gewesen! Zu dem danke ich meinen Eltern, meinem Bruder Nils und auch meinen Freunden, besonders Marcel, Robin und Rudi, dafür, dass ihr mir immer wieder gezeigt habt, dass man das Leben nicht zu ernst nehmen sollte.

Mein letztes großes Dankeschön gilt meinem Mann Marvin Overbeck für seine Unterstützung, Geduld und Zuneigung. Du gibst meinem Leben Stabilität und bist mein Ruhepol. Danke!

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den

Nina Overbeck