

**Charakterisierung der
Calmodulin/bMunc13-2-Interaktion
mit massenspektrometrischen Methoden**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Christine Piotrowski

geboren am 25. Juli 1988 in Wurzen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andrea Sinz
2. Prof. Dr. Gary Sawers
3. Prof. Dr. Katrin Marcus

Verteidigungsdatum: 17.04.2019

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| Abbildungsverzeichnis | VIII |
| Tabellenverzeichnis | XI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Biologischer Hintergrund | 1 |
| 1.1.1 Calmodulin | 1 |
| 1.1.2 Munc13-Proteinfamilie | 3 |
| 1.1.3 Synaptische Signalweiterleitung | 5 |
| 1.1.4 Strukturelle Aufklärung der Calmodulin/Munc13-Interaktion | 7 |
| 1.2 Massenspektrometrie | 8 |
| 1.2.1 Ionisationsmethoden..... | 9 |
| 1.2.1.1 Elektrospray-Ionisation..... | 9 |
| 1.2.1.2 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation | 10 |
| 1.2.2 Massenanalysatoren | 11 |
| 1.2.2.1 Quadrupol-Massenanalysator..... | 11 |
| 1.2.2.2 Lineare Ionenfalle | 12 |
| 1.2.2.3 Orbitrap | 13 |
| 1.2.2.4 Flugzeitanalysator | 14 |
| 1.2.3 Fragmentierung | 15 |
| 1.2.4 Hybridmassenspektrometer | 16 |
| 1.2.4.1 Orbitrap-Massenspektrometer..... | 16 |
| 1.2.4.2 Q-TOF 2-Massenspektrometer | 18 |
| 1.3 Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteininteraktionen | 19 |
| 1.3.1 Chemische Vernetzung in Kombination mit Massenspektrometrie..... | 19 |
| 1.3.1.1 Design und Reaktivität der Vernetzungsreagenzien | 22 |
| 1.3.1.2 MS-spaltbare Vernetzungsreagenzien..... | 25 |
| 1.3.2 Massenspektrometrie intakter Proteine | 27 |
| 1.4 Weitere Methoden zur Untersuchung von Proteininteraktionen | 27 |
| 1.4.1 Isothermale Titrationskalorimetrie | 27 |
| 1.4.2 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie | 28 |
| 1.5 Zielstellung | 29 |
| 2 Material | 31 |
| 2.1 Chemikalien..... | 31 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2 | Verbrauchsmaterialien..... | 33 |
| 2.3 | Geräte..... | 34 |
| 2.4 | Bakterienstämme | 36 |
| 2.5 | Plasmide und Primer..... | 37 |
| 2.6 | Proteine, Enzyme und Peptide..... | 37 |
| 2.7 | Software..... | 38 |
| 2.8 | Kulturmedien und Zusätze..... | 40 |
| 2.9 | Puffer und Lösungen | 41 |
| 3 | Methoden | 45 |
| 3.1 | Molekularbiologische Methoden..... | 45 |
| 3.1.1 | Stammhaltung..... | 45 |
| 3.1.2 | Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen..... | 45 |
| 3.1.3 | Transformation mit chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen | 45 |
| 3.1.4 | Plasmidpräparation..... | 45 |
| 3.1.5 | Ortsgerichtete Mutagenese | 46 |
| 3.1.6 | Agarosegelelektrophorese | 47 |
| 3.2 | Proteinbiochemische Methoden | 47 |
| 3.2.1 | Expression der bMunc13-2-Fusionsproteine | 47 |
| 3.2.2 | Einbau von Photo-Methionin in Calmodulin | 47 |
| 3.2.3 | Proteinreinigung | 48 |
| 3.2.3.1 | bMunc13-2-Segment-A und Varianten..... | 48 |
| 3.2.3.2 | bMunc13-2-Segment-B..... | 49 |
| 3.2.3.3 | Photo-Met-markiertes CaM | 49 |
| 3.2.4 | Pufferaustausch | 50 |
| 3.2.5 | Proteinkonzentrationsbestimmung | 50 |
| 3.2.6 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 51 |
| 3.2.7 | Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 52 |
| 3.2.8 | Isothermale Titrationskalorimetrie | 52 |
| 3.2.9 | Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie | 53 |
| 3.3 | Chemische Vernetzung von Proteinen | 53 |
| 3.3.1 | Chemische Vernetzung mit verschiedenen Reagenzien..... | 54 |
| 3.3.1.1 | Homobifunktionelle, aminreaktive Reagenzien – DSBU, BS ³ und CDI..... | 54 |
| 3.3.1.2 | Heterobifunktionelles, amin- und sulfhydrylreaktives Reagenz – Sulfo- GMBS | 55 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.1.3 | Homobifunktionelles, sulfhydrylreaktives Reagenz - DAU | 55 |
| 3.3.2 | Chemische Vernetzung mit eingebautem Photo-Methionin | 55 |
| 3.4 | Massenspektrometrische Methoden | 56 |
| 3.4.1 | Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse | 56 |
| 3.4.1.1 | Enzymatische Proteinspaltung im Gel | 56 |
| 3.4.1.2 | Enzymatische Proteinspaltung in Lösung | 56 |
| 3.4.2 | Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS | 57 |
| 3.4.3 | Native Massenspektrometrie | 58 |
| 3.4.4 | MALDI-TOF-Massenspektrometrie | 59 |
| 3.4.5 | Quantifizierung der Einbaurate von Photo-Met in CaM | 59 |
| 3.5 | Bioinformatische Methoden | 60 |
| 3.5.1 | Identifizierung der Vernetzungsprodukte | 60 |
| 3.5.2 | Modellierung der CaM/bMunc13-2-Segment-C-Interaktion mit ROSETTA | 61 |
| 4 | Ergebnisse | 63 |
| 4.1 | Expression und Reinigung des bMunc13-2-Segment-A | 63 |
| 4.2 | Expression und Reinigung von Photo-Met-markiertem Calmodulin | 67 |
| 4.2.1 | Einbau von Photo-Methionin in Calmodulin | 67 |
| 4.2.2 | Bestätigung der Bildung von Vernetzungsprodukten mit Photo-Methionin | 71 |
| 4.3 | Charakterisierung der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 | 74 |
| 4.3.1 | Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 | 74 |
| 4.3.2 | Vernetzung des CaM/bMunc13-2-Segment-A-Komplexes | 76 |
| 4.3.3 | Native Massenspektrometrie des CaM/bMunc13-2-Segment-A-Komplexes | 79 |
| 4.4 | C-terminale Verlängerung des bMunc13-2-Segment-A | 80 |
| 4.5 | Modellierung der CaM/bMunc13-2-Interaktion | 81 |
| 4.6 | Verlängerung der C-terminalen CaM-Binderegion in bMunc13-2 | 83 |
| 4.6.1 | Chemische Vernetzung des CaM/bMunc13-2-Segment-C-Komplexes | 84 |
| 4.6.2 | Affinitätsbestimmung der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 | 87 |
| 4.6.3 | Verdrängungsstudien mit bMunc13-2-Segment-C-Varianten | 90 |
| 4.7 | Charakterisierung der C-terminalen CaM-Bindestelle in bMunc13-2 | 93 |
| 4.7.1 | Austausch der hydrophoben Aminosäuren 709, 714 und 723 in bMunc13-2- Segment-C | 93 |
| 4.7.2 | Austausch der hydrophoben Aminosäuren 709, 714 und 723 in bMunc13-2- Segment-A | 97 |

| | | |
|----------|--|-------------|
| 5 | Diskussion | 101 |
| 5.1 | Einbau von Photo-Met in rekombinant hergestelltes Calmodulin..... | 101 |
| 5.2 | Calciumabhängige Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 | 102 |
| 5.3 | Distanzinformationen innerhalb von bMunc13-2-Segment-A | 105 |
| 5.4 | Modellierung der CaM/bMunc13-2-Interaktion..... | 106 |
| 5.5 | Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-C..... | 108 |
| 5.6 | Charakterisierung der verlängerten CaM-Binderegion | 110 |
| 5.7 | Manuelle Analyse der CaM Bindemotive in bMunc13-2-Segment-C | 113 |
| 5.8 | Vergleich der CaM-Bindestellen der Munc13-Isoformen..... | 115 |
| 6 | Ausblick | 117 |
| | Literaturverzeichnis..... | XXI |
| | Anhang | XXIX |
| | Zusätzliche Methoden: | LXV |
| A.1 | Proteolytische Spaltung von Proteinen mit Hilfe des Verdauungssaftes von Kannepflanzen (<i>Nepenthes</i>) | LXV |
| A.2 | Skripte und Modellierungsdateien | LXVI |
| A.2.1 | Dateien für Rosetta:..... | LXVI |
| A.2.2 | Berechnung von Distanzen in Proteinen mit Pymol | LXVIII |
| | Danksagung..... | LXIX |
| | Publikationen und Tagungsbeiträge..... | LXXI |
| | Selbstständigkeitserklärung | LXXV |
| | Lebenslauf | LXXV |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| ACN | Acetonitril |
| API | Atmosphärendruckionisation (<i>atmospheric pressure ionization</i>) |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS (<i>aa</i>) | Aminosäure (<i>amino acid</i>) |
| b | Gehirn (<i>brain</i>) |
| B | Carbamidomethyliertes Cystein |
| BS ³ | Bis(sulfosuccinimidyl)suberat |
| CaM | Calmodulin |
| CCS | Kollisionsquerschnitt (<i>collisional cross section</i>) |
| CDI | 1,1'-Carbonyldiimidazol |
| CID | Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision-induced dissociation</i>) |
| CRM | Modell des geladenen Rückstands (<i>charged residue model</i>) |
| DAG | Diacylglycerol |
| DAU | Diallylurea |
| DHB | Dihydroxybenzoesäure |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DSBU | Disuccinimidyl dibutylurea (vorher BuUrBu) |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure |
| ELKS | Protein mit hohem Gehalt der Aminosäuren E, L, K und S |
| ESI | Elektrosprayionisation |
| ETD | Elektronentransferdissoziation (<i>electron transfer dissociation</i>) |
| FA | Ameisensäure |
| FT-ICR | Fourier Transformation-Ionenzyklotronresonanz |
| GSH | Reduziertes Glutathion |
| GST | Glutathion-S-transferase |
| HCD | Kollisionsinduzierte Dissoziation mit höherer Energie (<i>higher energy collisional-induced dissociation</i>) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| HDX | Wasserstoff-Deuterium-Austausch (<i>hydrogen-deuterium exchange</i>) |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| IAA | Iodacetamid |
| ICP | induktiv gekoppeltes Plasma |
| ID | Innerer Durchmesser (<i>inner diameter</i>) |
| IEM | Modell der Ionenverdampfung (<i>ion evaporation model</i>) |
| IMAC | Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie |
| ITC | Isothermale Titrationskalorimetrie |
| LD | Laserdesorption |
| MALDI | Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation |
| MCP | Multikanalplatten (<i>multi channel plate</i>) |
| MHD | Munc-Homologiedomäne |
| MS | Massenspektrometrie |
| MS/MS | Tandemmassenspektrometrie |
| Munc | <i>Mammalian uncoordinated protein</i> |
| m/z | Masse-zu-Ladungsverhältnis |
| NHS | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |
| NMR | Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)-Spektroskopie |
| NOS | Nitroxid-Synthase |
| OD | Äußerer Durchmesser (<i>outer diameter</i>) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PDB | Proteindatenbank |
| Photo-Met | Photo-Methionin |
| RF | Radiofrequenz |
| RIM | <i>Rab3-interacting molecule</i> |
| RRP | Anzahl an fusionskompetenten Vesikeln (<i>readily releasable pool</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SEC | Größenausschlusschromatographie (<i>size-exclusion chromatography</i>) |
| Segment-A | Aminosäuren 367-780 von bMunc13-2 |
| Segment-B | Aminosäuren 367-903 von bMunc13-2 |
| Segment-C | Aminosäuren 703/704-742 von bMunc13-2 |

| | |
|------------|--|
| SEV | Sekundärelektronenvervielfacher |
| SNARE | <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor</i> |
| SPR | Oberflächenplasmonresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>) |
| STD | Kurzzeitige Depression (<i>short-term depression</i>) |
| STE | Kurzzeitige Erhöhung (<i>short-term enhancement</i>) |
| STP | Synaptische Plastizität |
| Sulfo-GMBS | <i>N</i> - γ -Maleimidobutyryloxysulfosuccinimidester |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TCEP | Tris(2-carboxyethyl)phosphin |
| TEMED | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TOF | Flugzeit (<i>time-of-flight</i>) |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| WT | Wildtyp |

Ein- und Dreibuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren

| | | | | | | | |
|----------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|------------|-------|
| Alanin | Ala A | Glycin | Gly G | Methionin | Met M | Serin | Ser S |
| Cystein | Cys C | Histidin | His H | Asparagin | Asn N | Threonin | Thr T |
| Asparaginsäure | Asp D | Isoleucin | Ile I | Prolin | Pro P | Valin | Val V |
| Glutaminsäure | Glu E | Lysin | Lys K | Glutamin | Gln Q | Tryptophan | Trp W |
| Phenylalanin | Phe F | Leucin | Leu L | Arginin | Arg R | Tyrosin | Tyr Y |

Abkürzungen der in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuremodifikationen

| | |
|------------------------------------|---|
| Oxidiertes Methionin | m |
| Photo-Methionin | x |
| Carbamidomethyliertes Cystein | B |
| Acetylierung am <i>N</i> -Terminus | X |
| Amidierung am <i>C</i> -Terminus | Z |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1: | 3D-Struktur von Calmodulin | 2 |
| Abbildung 2: | Schematische Darstellung der Munc13-Proteinfamilie | 4 |
| Abbildung 3: | 3D-Struktur von Munc13-1 | 5 |
| Abbildung 4: | Schematische Darstellung des synaptischen Vesikelzyklus | 6 |
| Abbildung 5: | Strukturen von CaM/Munc13-Interaktionen | 8 |
| Abbildung 6: | Darstellung der Elektrospray-Ionisation..... | 10 |
| Abbildung 7: | Darstellung eines linearen Quadrupols..... | 11 |
| Abbildung 8: | Aufbau einer linearen Ionenfalle | 12 |
| Abbildung 9: | Aufbau eines Orbitrap-Massenanalysators | 13 |
| Abbildung 10: | Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers | 15 |
| Abbildung 11: | Nomenklatur der Fragmentierung der Peptidbindung | 15 |
| Abbildung 12: | Schematische Darstellung der verwendeten Orbitrap Hybrid-Massenspektrometer | 17 |
| Abbildung 13: | Schematische Darstellung des High-Mass Q-TOF 2-Massenspektrometers | 18 |
| Abbildung 14: | Darstellung eines Vernetzungsexperimentes..... | 20 |
| Abbildung 15: | Strategie des unspezifischen Einbaus von Aminosäureanaloga während der Zellkultur | 24 |
| Abbildung 16: | Verwendete Vernetzungsreagenzien | 25 |
| Abbildung 17: | MS-Spaltbarkeit von verwendeten Vernetzungsreagenzien | 26 |
| Abbildung 18: | Schematische Darstellung der Isothermalen Titrationskalorimetrie..... | 28 |
| Abbildung 19: | bMunc13-2-Segmente | 29 |
| Abbildung 20: | Verwendete bMunc13-2-Segmente | 63 |
| Abbildung 21: | Schematische Darstellung des GST-bMunc13-2-Segment-A-Fusionsproteins..... | 63 |
| Abbildung 22: | Expression des GST-bMunc13-2-Segment-A-Fusionsproteins in <i>E. coli</i> | 64 |
| Abbildung 23: | GST-Affinitätschromatographie von bMunc13-2-Segment-A..... | 65 |
| Abbildung 24: | Ionenaustauschchromatographie von bMunc13-2-Segment-A | 66 |
| Abbildung 25: | bMunc13-2-Segment-A nach der Reinigung aus <i>E. coli</i> -Zelllysat..... | 67 |
| Abbildung 26: | Expression von rekombinantem Calmodulin mit Photo-Methionin..... | 68 |
| Abbildung 27: | Chromatographische Reinigung von Photo-Met-CaM aus <i>E. coli</i> -Zelllysat..... | 69 |
| Abbildung 28: | Gereinigtes Photo-Met-CaM und Einbauraten von Photo-Methionin..... | 70 |
| Abbildung 29: | Massenspektrometrische Analyse des CaM-Peptids ELGTVMR mit und ohne Photo-Methionin..... | 71 |
| Abbildung 30: | Fragmentionenmassenspektrum eines intramolekularen Vernetzungsproduktes von CaM mit Photo-Methionin..... | 72 |
| Abbildung 31: | Vernetzte Aminosäuren in CaM..... | 74 |

| | | |
|---------------|--|-----|
| Abbildung 32: | SDS-PAGE Analyse der calciumabhängigen Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-A..... | 75 |
| Abbildung 33: | Vernetzung von CaM und bMunc13-2-Segment-A mit BS ³ , DSBU, Sulfo-GMBS und Photo-Met..... | 77 |
| Abbildung 34: | Analyse der CaM/ bMunc13-2-Segment-A-Interaktion mittels nativer Massenspektrometrie..... | 80 |
| Abbildung 35: | Modellierung der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-C..... | 82 |
| Abbildung 36: | Calcium-Titrationsexperiment der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-C..... | 84 |
| Abbildung 37: | Analyse der Vernetzung von CaM mit bMunc13-2-Segment-C mit den Vernetzungsreagenzien DSBU und CDI..... | 85 |
| Abbildung 38: | MALDI-TOF-MS des CaM/bMunc13-2-Segment-C-Komplexes..... | 87 |
| Abbildung 39: | Charakterisierung der CaM/bMunc13-2-Segment-C-Interaktion mittels nativer PAGE, Vernetzung mit photo-Met und ITC..... | 89 |
| Abbildung 40: | Native Massenspektrometrie des CaM/bMunc13-2-Segment-C-Komplexes..... | 90 |
| Abbildung 41: | Verdrängungsexperimente zur Analyse der Bindung von bMunc13-2-Segment-C-Bpa-Varianten an CaM..... | 92 |
| Abbildung 42: | Vernetzung der Varianten von bMunc13-2-Segment-C mit Photo-Met-CaM..... | 94 |
| Abbildung 43: | Verdrängung von bMunc13-2-Segment-C-Bpa aus der Interaktion mit CaM..... | 95 |
| Abbildung 44: | Nachweis der Biotinylierung des Photo-Met-CaM mittels MALDI-TOF-MS..... | 96 |
| Abbildung 45: | Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie der Interaktion von CaM mit bMunc13-2-Segment-C und seinen Varianten (V709D, I714D und F723D)..... | 97 |
| Abbildung 46: | Vernetzung von bMunc13-2-Segment-A und dessen Varianten bei 750 nM Calcium..... | 98 |
| Abbildung 47: | Sequenzvergleich der CaM-Bindestellen von ubMunc13-2 und bMunc13-2..... | 104 |
| Abbildung 48: | Analyse der möglichen CaM-Bindemotive in der N-terminalen Region des bMunc13-2-Segment-C..... | 114 |
| Abbildung 49: | Vergleich der möglichen CaM-Bindemotive der Munc13-Isoformen..... | 116 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------------|--|---------|
| Abbildung A1: | Reaktivität der verwendeten Vernetzungsreagenzien..... | XXIX |
| Abbildung A2: | Für die Quantifizierung eingesetzte Spezies von Met und Photo-Met. | XXX |
| Abbildung A3: | Aminosäuresequenzen der verwendeten bMunc13-2-Segmente..... | XXXI |
| Abbildung A4: | Sequenzabdeckung GST-bMunc13-2-Segment-A. | XXXI |
| Abbildung A5: | Aminosäuresequenz der Glutathion-S-transferase..... | XXXII |
| Abbildung A6: | Sequenzabdeckung bMunc13-2-Segment-A. | XXXII |
| Abbildung A7: | Aminosäuresequenz des rekombinanten CaM-(His) ₆ | XXXII |
| Abbildung A8: | Sequenzabdeckung des rekombinanten CaM-(His) ₆ mit Photo-Met..... | XXXII |
| Abbildung A9: | Vernetzung von Segment-A mit DSBU. | XXXIII |
| Abbildung A10: | Vernetzte Aminosäuren innerhalb von bMunc13-2 Segment-A mittels DAU. | XXXIII |
| Abbildung A11: | Fragmentenmassenspektren von Vernetzungsprodukten mit photo-Met zwischen CaM und bMunc13-2..... | XXXIV |
| Abbildung A12: | Fragmentenmassenspektren von Vernetzungsprodukten mit DSBU innerhalb von bMunc13-2. | XXXV |
| Abbildung A13: | Vorhersage der Sekundärstruktur von Segment-A. | XXXVI |
| Abbildung A14: | Vergleich der vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und Segment-A, -B und -C. | XXXVII |
| Abbildung A15: | Sequenzvergleich der <i>N</i> -terminalen Regionen der Munc13-2-Isoformen ubMunc13-2 und bMunc13-2..... | XXXVIII |
| Abbildung A16: | CaM-Bindemotive in bMunc13-2 Segment-C – Datenbanksuche. | XXXIX |
| Abbildung A17: | CaM-Bindemotive der Munc13-Isoformen. | XL |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1: | Nomenklatur von vernetzten Peptiden..... | 21 |
| Tabelle 2: | Funktionelle Gruppen der verwendeten Vernetzungsreagenzien | 23 |
| Tabelle 3: | Reaktionsansatz der ortsgerichteten Mutagenese | 46 |
| Tabelle 4: | Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine | 50 |
| Tabelle 5: | Pipettierschema für Gele der SDS-PAGE. | 51 |
| Tabelle 6: | Schema für Molekulargewichtsstandard für native PAGE..... | 52 |
| Tabelle 7: | Verwendete Gradienten für die HPLC | 58 |
| Tabelle 8: | Einstellungen für StavroX/MeroX..... | 60 |
| Tabelle 9: | Vernetzte Aminosäuren innerhalb von CaM. | 73 |
| Tabelle 10: | Vernetzte Aminosäuren zwischen Calmodulin und bMunc13-2-Segment-A. | 78 |
| Tabelle 11: | Zusammenfassung aller vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-A/-B | 81 |
| Tabelle 12: | C_{α} - C_{α} -Distanzen der vernetzten Aminosäuren innerhalb der Modelle. | 83 |
| Tabelle 13: | Vergleich der mit Photo-Met vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und den drei verwendeten bMunc13-2-Segmenten. | 85 |
| Tabelle 14: | Vernetzte Aminosäuren des CaM/bMunc13-2-Segment-C-Komplexes mit DSBU und CDI. | 86 |
| Tabelle 15: | Varianten des bMunc13-2-Segment-C. | 91 |
| Tabelle 16: | Varianten des bMunc13-2-Segment-C mit ausgetauschten Aminosäuren | 93 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|--------------|---|--------|
| Tabelle A1: | Vernetzte Aminosäuren mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-A bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. | XLI |
| Tabelle A2: | Zusammenfassung der intermolekularen Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-A. | XLII |
| Tabelle A3: | Intramolekulare Vernetzungsprodukte in Segment-A - BS ³ und DSBU. | XLIV |
| Tabelle A4: | Zusammenfassung der intramolekularen Vernetzungsprodukte innerhalb von Segment-A aus dem Monomersignal - BS ³ | XLV |
| Tabelle A5: | Zusammenfassung der intramolekularen Vernetzungsprodukte innerhalb von Segment-A aus dem Monomersignal - DSBU. | XLVI |
| Tabelle A6: | Zusammenfassung der intramolekularen Vernetzungsprodukte innerhalb von Segment-A aus dem CaM/Segment-A-Heterodimer – DSBU. | XLVII |
| Tabelle A7: | Vernetzte Aminosäuren innerhalb von Segment-A – DAU. | XLVIII |
| Tabelle A8: | Vernetzte Aminosäuren mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-B bei 750 nM und 1 mM Calcium. | XLIX |
| Tabelle A9: | Zusammenfassung der Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-B mit Photo-Met. | L |
| Tabelle A10: | Vernetzte Aminosäuren mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-C bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. | LI |
| Tabelle A11: | C _α -C _α -Distanzen der zusätzlich mit Segment-C identifizierten mit Photo-Met vernetzten Aminosäuren innerhalb der Modelle. | LI |
| Tabelle A12: | Zusammenfassung der Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-C. | LII |
| Tabelle A13: | Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-C-V709D mit Photo-Met. | LV |
| Tabelle A14: | Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-C- I714D mit Photo-Met. | LIX |
| Tabelle A15: | Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-C-F723D mit Photo-Met. | LX |
| Tabelle A16: | Intermolekulare Vernetzungsprodukte mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-A- V709D bei 750 nM Calcium. | LXII |
| Tabelle A17: | Intermolekulare Vernetzungsprodukte mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-A-I714D bei 750 nM Calcium. | LXIII |
| Tabelle A18: | Intermolekulare Vernetzungsprodukte mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-A-F723D bei 750 nM Calcium. | LXIV |

Zusammenfassung

Calcium ist ein essentieller sekundärer Botenstoff (*second messenger*), der an vielen biologischen Prozessen wie Proliferation, Wachstum, Migration und Signalweiterleitung beteiligt ist. Calciumabhängige Proteine werden durch die direkte Bindung von Calcium oder deren Interaktion mit calciumbindenden Proteinen reguliert. Für das calciumbindende, ubiquitär vorkommende Protein Calmodulin (CaM) sind über 300 Interaktionspartner beschrieben. CaM reguliert in neuronalen Zellen Munc13-Proteine, welche eine essentielle Funktion für die Regulation der Ausschüttung von Neurotransmittern und der damit verbundenen synaptischen Kurzzeitplastizität ausüben. Die Bindung von CaM an Munc13 erfolgt calciumabhängig über spezifische Bindemotive in der *N*-terminalen Region von Munc13, wobei für die vier Isoformen (Munc13-1, ubMunc13-2, bMunc13-2 und Munc13-3) unterschiedliche Motive existieren. Außerdem wurde für bMunc13-2 und Munc13-3 jeweils eine weitere potentielle Bindestelle in der *N*-terminalen Region postuliert, welche jedoch in Bindungsstudien als physiologisch irrelevant eingestuft wurden. Beide Isoformen, bMunc13-2 und Munc13-3, sind aufgrund der beiden CaM-Bindestellen, welche im Folgenden als *N*- und *C*-terminale CaM-Bindestellen benannt werden, für die detailliertere strukturelle Aufklärung der Interaktion mit CaM interessant. Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die im Gehirn lokalisierte bMunc13-2-Isoform gelegt, da sich diese in elektrophysiologischen Untersuchungen von der Munc13-3-Isoform unterschied. Ziel dieser Arbeit war die detaillierte strukturelle Charakterisierung der CaM/bMunc13-2-Interaktion an der postulierten *C*-terminalen CaM-Bindestelle (AS 719-742), welche ein calciumabhängiges 1-5-10-Bindemotiv aufweist. Zusätzlich sollte eine mögliche Funktion der *N*-terminalen CaM-Bindestelle (AS 572-594) aufgeklärt werden.

Die zentrale Methode zur Untersuchung der beiden CaM-Bindestellen in bMunc13-2 war die chemische Vernetzung von Proteinen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse zur Ableitung von Distanzbeschränkungen zur bioinformatischen Modellierung der CaM/bMunc13-2-Interaktion. Aminosäuren in räumlicher Nähe innerhalb eines Proteins oder Proteinkomplexes werden durch ein Vernetzungsreagenz kovalent verknüpft und die vernetzten Aminosäuren anschließend massenspektrometrisch identifiziert. Dadurch können Distanzinformationen gewonnen werden, welche die nachfolgende bioinformatische Modellierung dreidimensionaler Proteinstrukturen unterstützen. Für die Untersuchungen wurde zunächst ein Segment von bMunc13-2 (AS 367-780, Segment-A), welches beide CaM-Bindestellen (AS 572-594 und AS 719-742) enthält, in *E. coli*-Zellen exprimiert und

Zusammenfassung

gereinigt. Neben der Verwendung von verschiedenen Vernetzungsreagenzien wurde Photo-Methionin (Photo-Met), welches eine Diazirinegruppe enthält, in rekombinantes CaM zur UV-induzierten Vernetzung eingebaut. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte, generell anzuwendende Protokoll führte zu einer Einbaurrate von Photo-Met in CaM von über 30%. Nachfolgende Vernetzungsexperimente zwischen CaM und bMunc13-2 zeigten die erwartete 1:1-Stöchiometrie des CaM/bMunc13-2-Komplexes, welche durch native Massenspektrometrie (MS) verifiziert wurde. Die identifizierten vernetzten Aminosäuren in bMunc13-2 wiesen eine überwiegende Lokalisation in der C-terminalen CaM-Bindestelle (AS 719-742) und ihrer flankierenden N-terminalen Region (AS 704-718) auf. Diese Präferenz konnte anschließend mit einem größeren Segment (AS 367-903, Segment-B) von bMunc13-2 bestätigt werden und gibt Hinweise auf eine N-terminale Verlängerung der bislang postulierten CaM-Binderegion. Eine Modellierung des Komplexes zwischen CaM und bMunc13-2 (AS 704-742) zeigte zwei mögliche Konformationen, welche auf ein verändertes Bindeverhalten im Vergleich zu Munc13-1, ubMunc13-2 und Munc13-3 hindeuteten. Zur weiteren strukturellen Analyse wurde diese Region von bMunc13-2 mit einem zusätzlichen N-terminalen Lysin (AS 703-742, Segment-C) zur verbesserten Peptidsynthese hergestellt und weitere Untersuchungen durchgeführt. Diese umschlossen Vernetzungsexperimente mit anschließender MS-Analyse, Verdrängungsexperimente, native MS sowie isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) und Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR). Die Experimente bestätigten eine starke Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 ($K_{D(ITC)} = 43 \text{ nM}$, $K_{D(SPR)} = 159 \text{ nM}$), welche auf der N-terminalen Verlängerung der CaM-Bindestelle basierte. Welche hydrophoben Aminosäuren in bMunc13-2 für diese starke Affinität verantwortlich sind und ein mögliches neues Bindemotiv darstellen, sollte durch den Austausch von spezifischen hydrophoben Ankeraminosäuren zu Asparaginsäure geklärt werden. Hierfür wurden drei Positionen (V709, I714 und F723) gewählt, welche in der bMunc13-2-Aminosäuresequenz in der Nähe der identifizierten verknüpften Aminosäuren lokalisiert waren. Die Verdrängungs- und SPR-Experimente mit den bMunc13-2-Segmenten, welche die jeweilige Mutation enthielten, zeigten eine deutlich verringerte Affinität durch den Austausch der hydrophoben Aminosäuren in Segment-C ($K_{D(V709D)} = 416 \text{ nM}$, $K_{D(I714D)} = 466 \text{ nM}$, $K_{D(F723D)} = \text{nicht bestimmbar}$). Dabei wurde die geringste Affinität beobachtet, wenn die ausgetauschte Aminosäure direkt in der postulierten Binderegion (AS 719-742) lokalisiert war. Die Einführung der beschriebenen Mutationen (V709D, I714D und F723D) in das bMunc13-2-Segment-A, welches beide postulierten Bindestellen enthält, zeigte in Vernetzungsexperimenten ein überraschendes Verhalten: Durch Austausch der einzelnen

hydrophoben Aminosäuren (V709, I714 und F723) wurde anscheinend die C-terminale Bindestelle beeinträchtigt, was zu einer erhöhten Anzahl von verknüpften Aminosäuren der N-terminalen CaM-Bindestelle führte. Es ist denkbar, dass hier ein Regulationsmechanismus eintritt, wobei die N-terminale Bindestelle die eingeschränkte Affinität der C-terminalen Bindestelle ausgleicht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bMunc13-2 an der C-terminalen CaM-Bindestelle offensichtlich ein Bindemotiv enthält, welches nicht dem postulierten 1-5-10-Bindemotiv entspricht, sondern N-terminal des bekannten Bindemotivs beginnt und vermutlich einen Teil der postulierten Region (AS 719-742) einschließt. Der Vergleich der Positionierung der hydrophoben Aminosäuren in der bMunc13-2-Aminosäuresequenz 703-742 mit bekannten CaM-Bindemotiven ergab sechs mögliche Bindemotive, welche im N-terminalen Bereich des bMunc13-2-Segment-C an den Positionen V709, I714, L716 und I720 beginnen. Auffällig ist hierbei, dass diese CaM-Bindemotive mit Leucin, Isoleucin oder Valin beginnen, anstatt mit einer charakteristischen großen hydrophoben Aminosäure (Phenylalanin oder Tryptophan), wie in Munc13-1, ubMunc13-2 oder dem postulierten 1-5-10-Bindemotiv in bMunc13-2. Welches dieser sechs möglichen CaM-Bindemotive vorliegt oder ob ein bisher nicht bekanntes CaM-Bindemotiv existiert, muss in weiteren Experimenten bestimmt werden.

Ein abschließender Vergleich der Aminosäuresequenz der C-terminalen CaM-Bindestelle (Segment-C) in bMunc13-2 mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen der verbleibenden Munc13-Isoformen (Munc13-1, ubMunc13-2 und Munc13-3) zeigte einen deutlichen Unterschied bezüglich der Häufigkeit und Positionierung hydrophober Aminosäuren in den Binderegionen. Die Bindung von CaM an bMunc13-2 scheint somit einzigartig in der Munc13-Familie zu sein.

Summary

Calcium is an important second messenger that is involved in the regulation of various biological processes, such as proliferation, growth, migration, and signal transduction. Target proteins either bind calcium directly or interact with calcium-binding proteins. One prominent ubiquitous calcium-binding protein is calmodulin (CaM) targeting over 300 proteins. An important neuronal target is the Munc13 protein family, which is essential for the regulation of neurotransmitter release during synaptic short-term plasticity. The interaction between CaM and Munc13 is based on calcium-dependent binding motifs that differ between the four isoforms Munc13-1, ubMunc13-2, bMunc13-2, and Munc13-3. Additionally, a second potential CaM binding site has been proposed for bMunc13-2 and Munc13-3, which however does not seem to be physiologically relevant for the interaction with CaM. Due to these two CaM binding sites, termed *N*- and *C*-terminal CaM binding sites, bMunc13-2 and Munc13-3 were interesting for further studies on the interaction with CaM. This work focusses on the brain-located isoform bMunc13-2 that exhibits a different behavior in electrophysiological experiments compared to Munc13-3. The aim of this work was to structurally characterize the *C*-terminal binding site (aa 719-742) of bMunc13-2 containing a calcium-dependent 1-5-10 binding motif and to investigate potential functions of the second *N*-terminal CaM binding site (aa 572-594).

The central method applied for investigating the CaM/bMunc13-2 interaction was chemical cross-linking combined with mass spectrometry (MS). In cross-linking experiments, functional groups of amino acid side chains located in spatial proximity within a protein or a protein complex are covalently connected by a chemical reagent. Depending on the specific spacer length of the cross-linker, distance information is obtained for the connected amino acids, which is the basis for computational modeling studies of three dimensional protein structures. Initial studies were performed with a segment of bMunc13-2 (aa 367-780, Segment-A), comprising the two CaM binding sites (aa 572-594 and aa 719-742). Segment-A was expressed in *E. coli* cells and purified. The cross-linking experiments conducted with CaM and bMunc13-2 relied on a variety of external cross-linkers as well as on the incorporation of photo-methionine (photo-Met) in CaM. The protocol established for the facile incorporation of photo-Met led to an incorporation rate of over 30 % and is generally applicable to different protein systems. Subsequent cross-linking experiments revealed an interaction between CaM and bMunc13-2 with the expected 1:1 stoichiometry, which was confirmed by native MS. The majority of the cross-linked amino acids identified between

CaM and bMunc13-2 were detected in the region of aa 704-742 in bMunc13-2, harboring the C-terminal CaM binding site (aa 719-742). Cross-linking experiments with a larger segment of bMunc13-2 (aa 367-903, Segment-B) verified the preference of cross-linked amino acids in the region of aa 704-742. Modeling of the complex between CaM and the respective bMunc13-2 region (aa 704-742) revealed two conformations of the CaM/bMunc13-2 complex, giving first evidence of a potential CaM binding mode that is different from Munc13-1, ubMunc13-2, and Munc13-3. For a detailed structural analysis of the interaction between CaM and bMunc13-2, the respective region was synthesized with an additional lysine residue, Lys703 (aa 703-742, Segment-C) to facilitate peptide synthesis and subjected to different investigations. These included cross-linking experiments combined with MS, competition experiments, native MS, isothermal titration calorimetry (ITC), and surface plasmon resonance spectroscopy (SPR). A strong interaction between CaM and bMunc13-2 ($K_{D(\text{ITC})} = 43 \text{ nM}$, $K_{D(\text{SPR})} = 159 \text{ nM}$) was observed giving a hint on the importance of the N-terminal enlargement of the CaM binding site in bMunc13-2. To evaluate which hydrophobic amino acids in bMunc13-2 are involved in CaM binding and comprise the CaM binding motif, specific exchanges of selected hydrophobic amino acids to aspartic acid were performed. Residues V709, I714 and F723 were selected as they are located in proximity to the observed cross-linked amino acids within the bMunc13-2 amino acid sequence. Competition and SPR experiments applying Segment-C with the respective mutations showed a decreased affinity to CaM due to the exchange of specific hydrophobic amino acids ($K_{D(\text{V709D})} = 416 \text{ nM}$, $K_{D(\text{I714D})} = 466 \text{ nM}$, $K_{D(\text{F723D})} = \text{not determined}$). The most pronounced effect was observed when the exchanged hydrophobic amino acid was located in the proposed CaM binding region (aa 719-742). Introducing these mutations (V709D, I714D and F723D) into bMunc13-2-Segment-A, which contains both CaM binding sites, showed a surprising effect: Apparently, the exchange of the hydrophobic amino acids induced a decreased binding at the C-terminal CaM binding site resulting in a higher number of cross-linked amino acids at the N-terminal CaM binding site. Probably, bMunc13-2 exhibits a “replacement system” guaranteeing the regulation of bMunc13-2 in case the C-terminal CaM binding site is impaired.

The results presented herein show that bMunc13-2 harbors a CaM binding motif in the C-terminal CaM binding site that is not consistent with the proposed 1-5-10 binding motif. The CaM binding motif in bMunc13-2 appears to start N-terminally to the proposed CaM binding motif and includes a part of its amino acid sequence (aa 719-742). Analysis of the CaM binding motifs as well as a comparison with known CaM binding motifs resulted in the

Summary

identification of six potential binding motifs within the amino acid sequence 703-742, starting in the *N*-terminal region of Segment-C at residues V709, I714, L716, and I720. Intriguingly, none of these motifs start with a characteristic large hydrophobic amino acid, such as phenylalanine or tryptophane as in Munc13-1 and ubMunc13-2 or the postulated 1-5-10 binding motif in bMunc13-2, but with leucine, isoleucine or valine. Which one of these six potential binding motifs or whether a so far unknown CaM binding motif is present in bMunc13-2, remains to be clarified in future studies.

A comparison of the amino acid sequence of the elongated *C*-terminal CaM binding region (Segment-C) in bMunc13-2 with the respective amino acid sequences of the remaining Munc13 isoforms (Munc13-1, ubMunc13-2 and Munc13-3) displayed striking differences between the isoforms. As such, the binding mechanisms underlying CaM binding of bMunc13-2 seem to be unique within the Munc13 protein family.

1 Einleitung

1.1 Biologischer Hintergrund

Calcium ist einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe in Organismen und reguliert eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose und die Freisetzung von Neurotransmittern¹⁻³. Gesteuert werden diese Prozesse durch die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration, welche im Ruhezustand der Zelle bei ~100 nM liegt³ und durch Calciumkanäle in der Membran, Komplexierung mit anorganischen oder kleinen organischen Molekülen und calciumbindenden Proteinen reguliert wird^{1, 3}. Änderungen der umgebenden Calciumkonzentration können von Proteinen erfasst werden, welche selbst Calcium binden oder mit einem calciumbindenden Protein interagieren³.

1.1.1 Calmodulin

Eines der prominentesten calciumbindenden Proteine ist Calmodulin (*calcium modulated protein*, CaM), welches abhängig von der Calciumbindung und der Interaktion mit Bindungspartnern unterschiedliche Konformationen annehmen kann. Es ist ein ubiquitäres Protein, welches in einer Konzentration von bis zu 100 µM in Nervenzellen vorliegt⁴⁻⁶. Diese hohe Konzentration impliziert seine Bedeutung in der Regulation von Proteinen, welche an der Signalweiterleitung in Nervenzellen beteiligt sind⁷.

Die Aminosäuresequenz des Calmodulins ist in allen Eukaryoten hochkonserviert, wobei sie in Vertebrata identisch ist und in Invertebrata, Pflanzen und Pilzen einen Austausch weniger Aminosäuren aufweist⁸⁻¹¹. So ist die Aminosäuresequenz des humanen CaM mit der des CaM aus der Gerste (*Hordeum vulgare*) zu 94% identisch¹². Die 148 Aminosäuren des CaM bilden eine dreidimensionale Struktur mit zwei globulären Domänen, die jeweils zwei EF-Handstrukturen besitzen und über eine flexible Struktur verbunden sind, aus¹³⁻¹⁵. Jede EF-Handstruktur besteht aus einem charakteristischen Helix-Loop-Helix-Motiv und ermöglicht die Bindung eines Calciumions, wodurch CaM maximal vier Calciumionen binden kann^{16, 17}. Die Calciumsensitivität des CaM wird durch die unterschiedlichen Affinitäten der vier EF-Hände, welche abhängig von der Aminosäuresequenz sind, reguliert^{14, 18}. CaM kann somit Calciumionen kooperativ binden, da die globulären Domänen unterschiedliche Affinitäten aufweisen ($K_{D(C\text{-terminale Domäne})} \approx 0,2 \mu\text{M}$; $K_{D(N\text{-terminale Domäne})} \approx 2 \mu\text{M}$)^{19, 20}.

Einleitung

Die Flexibilität der CaM-Struktur ist bereits ohne Bindung an ein Zielprotein erkennbar. Abhängig von der Calciumbindung nimmt CaM verschiedene Strukturen an: Apo- (ohne Calcium, Abbildung 1A), Intermediat- (zwei Calciumionen) und Holoform (vier Calciumionen, Abbildung 1B)²¹⁻²³. Ob der gestreckte Zustand der Holoform einer nativen Konformation entspricht oder es sich dabei um ein Artefakt der Röntgenkristallographie handelt, steht unter Diskussion^{22, 24}. Der intermediäre Zustand von CaM, in dem nur zwei Calciumionen in der C-terminalen Domäne binden, konnte bisher nicht strukturell charakterisiert werden.²⁵

CaM ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, wodurch bereits über 300 Interaktionspartner identifiziert wurden^{7, 26-30}. Die Interaktion zwischen CaM und seinen Zielproteinen erfolgt an basischen, amphiphilen Helices abhängig oder unabhängig von der Calciumbindung an CaM³¹. CaM wird dabei einer Konformationsänderung unterzogen, welche hydrophobe Aminosäuren von CaM für die Interaktion mit Zielproteinen zugänglich macht³². Für jeden Interaktionsmodus sind spezielle kanonische Bindemotive bekannt, die in Datenbanken zusammengefasst sind^{30, 33}. Die calciumunabhängige Bindung von CaM an seine Zielproteine erfolgt über IQ-Motive, welche zu Beginn der Erkennungssequenz eine hydrophobe Aminosäure (Isoleucin, Leucin, Phenylalanin oder Valin), gefolgt von einem Glutamin, aufweisen^{32, 34}. In der weiteren Sequenz sind Arginin und hydrophobe Aminosäuren (Ile, Leu, Val, Phe oder Trp) an den Positionen 4, 5, 10 und 13 relativ zur Position des Glutamins essentiell für die Bindung an Calmodulin^{32, 34}. Sind die Aminosäuren in diesen spezifischen Positionen verändert, wird das CaM-Bindemotiv als *IQ-like*

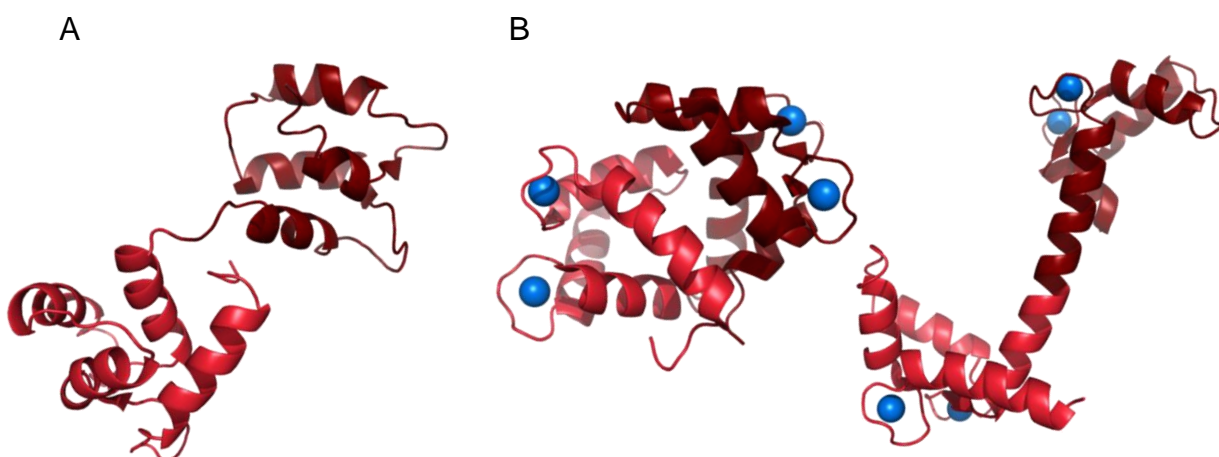


Abbildung 1: 3D-Struktur von Calmodulin. Dargestellt sind die calciumfreie und calciumgebundene Struktur von Calmodulin als Bändermodell. Die N-terminale Domäne ist hellrot, die C-terminale Domäne ist dunkelrot gefärbt. (A) Apoform: calciumfrei (PDB-Eintrag 1DMO), (B) Holoform: vier Calciumionen gebunden (PDB-Einträge 1PRW und 1CLL). Zwei mögliche Konformationen der Holoform des CaM sind gezeigt, wobei CaM geschlossen oder gestreckt vorliegt. Blaue Kugeln: Calciumionen.

bezeichnet³⁰. Im Vergleich zur calciumabhängigen Interaktion, sind die Helices der calciumunabhängigen CaM-Bindemotive weniger amphiphil³⁴. Die calciumabhängige Interaktion von CaM mit seinen Zielproteinen erfolgt über Motive mit hydrophoben Aminosäuren (Ile, Leu, Val, Phe oder Trp) an bestimmten Positionen des CaM-Bindemotivs zueinander und eines *Clusters* benachbarter basischer Aminosäuren (Arg und Lys)³⁵. Die Interaktion mit hydrophoben Aminosäuren des CaM, welche hauptsächlich über Methionine erfolgt³¹, und die Positionierung des basischen Clusters relativ zum CaM-Bindemotiv bestimmen die Orientierung des Zielproteins am CaM³⁶. Eine Vielzahl von calciumabhängigen CaM-Bindemotiven, z.B. 1-10, 1-5-10, 1-8-14 oder 1-4-7-8, ist bekannt, wobei die Nomenklatur die Positionen der hydrophoben Aminosäuren angibt^{30, 37}. Einige CaM-Zielproteine können sowohl calciumabhängig als auch -unabhängig reguliert werden. So weist die Helix A des KCNQ2-Calciumkanals ein calciumabhängiges 1-12- und ein calciumunabhängiges *IQ-like*-Bindemotiv auf³⁰.

1.1.2 Munc13-Proteinfamilie

Munc13-Proteine sind CaM-bindende Proteine, welche eine Größe von 160-220 kDa aufweisen, hauptsächlich in Nervenzellen lokalisiert sind und eine essentielle Bedeutung für die Signaltransduktion zwischen Nervenzellen und benachbarten Zellen, der synaptischen Signalweiterleitung, haben^{38, 39}. *In-vivo*-Versuche, in denen die Expression von Munc13-Proteinen unterdrückt wurde, zeigten, dass ohne Munc13-Proteine keine Signalweiterleitung möglich ist, was die hohe Bedeutung von Munc13 belegt^{40, 41}.

Die Bezeichnung Munc ergibt sich aus der Definition als ungeordnetes Protein (*uncoordinated*, *unc*) und dessen Vorkommen in Säugetieren (*mammalia*). Zunächst wurde Unc-13 in *Caenorhabditis elegans* beschrieben⁴². In Säugetieren sind Munc13-Proteine durch die drei Gene, *Munc13-1*, *Munc13-2* und *Munc13-3*, codiert, wobei *Munc13-2* in verschiedene Spleißformen mündet⁴². Die vier resultierenden Isoformen sind Munc13-1, ubMunc13-2, bMunc13-2 und Munc13-3, wobei ub für ubiquitär und b für die ausschließliche Lokalisierung im Gehirn (*brain*) steht⁴³⁻⁴⁶. Munc13-1 ist die häufigste Isoform und kommt gemeinsam mit Munc13-3 in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vor⁴⁷.

Eine schematische Darstellung der Domänenstruktur der Munc13-Proteine ist in Abbildung 2 gezeigt. Sie verfügen über C1-, C2- und Munc-Homologie-Domänen (MHD), deren Anordnung und Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich der Munc13-Proteine hochkonserviert sind. Die C1-Domäne ermöglicht die Bindung von Diacylglycerol (DAG)

Einleitung

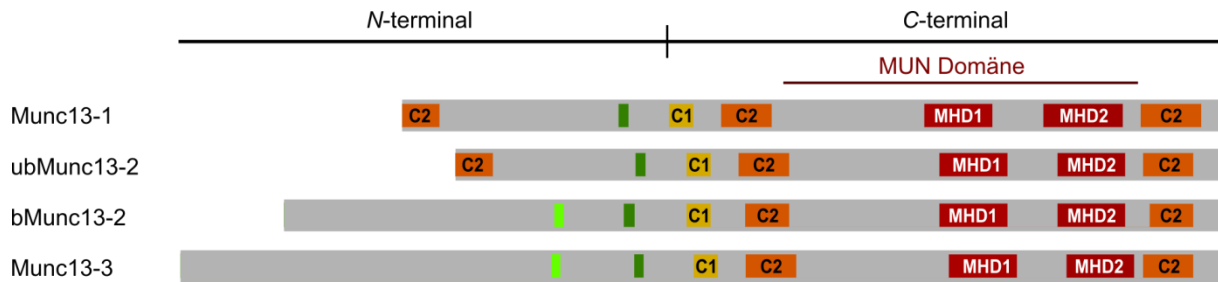


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Munc13-Proteinfamilie. C1: Diacylglycerol/Phorbol ester-Bindestelle, C2: Ca^{2+} /Phospholipid-Bindestelle, MHD: Munc-Homologie-Domäne und grün: CaM-Bindestellen.

oder Phorbolestern, was in einer Bindung an die Zellmembran und eine Beteiligung am DAG-Signalweg resultiert⁴⁸. C2-Domänen binden Calciumionen und Phospholipide, was ihre regulatorische Funktion bedingt⁴². Die zwei MHD-Domänen und deren flankierende Aminosäuresequenzen bilden die MUN-Domäne aus, welche für die Funktion von Munc13 im synaptischen Vesikelzyklus essentiell ist⁴⁹⁻⁵¹. Im N-terminalen Bereich sind Munc13-1 und bMunc13-2 aufgrund ihrer zusätzlichen C2-Domäne homolog, während bMunc13-2 und Munc13-3 verschieden sind⁵². Alle vier Munc13-Isoformen besitzen im N-terminalen, vorwiegend unstrukturierten Bereich eine Bindestelle für calciumbeladenes CaM (Abbildung 2), welche in Peptid-Bindungsstudien bestätigt werden konnten⁵²⁻⁵⁴. Für bMunc13-2 und Munc13-3 wurden durch bioinformatische Methoden jeweils zwei CaM-Bindestellen identifiziert, welche in den Peptidstudien eine Interaktion mit CaM zeigten⁵². In Folgeexperimenten, in welchen größere Segmente beider Proteine verwendet wurden, konnte jedoch die C-terminal gelegene CaM-Bindestelle als physiologisch relevante Interaktionssequenz in bMunc13-2 und Munc13-3 identifiziert werden⁵². Munc13-Proteine werden somit über Calcium⁵⁵, calciumbeladenes CaM^{38, 52-54} und DAG^{48, 56} reguliert.

Die röntgenkristallographische Strukturaufklärung der Munc13-Proteine wurde bisher für einen Teil der Munc13-1-Isoform durchgeführt, wobei die 3D-Strukturen der N-terminalen C2-Domäne und des C1C2MUN-Segments aufgeklärt werden konnten (Abbildung 3)^{57, 58}. Zuvor wurden bereits die C1-, C2- und MUN-Domäne des C1C2MUN-Segments einzeln strukturell charakterisiert^{28, 51, 59, 60}. Während die C1- und C2-Domänen überwiegend aus β -Faltblatt-strukturen bestehen, zeigt die MUN-Domäne eine helikale Struktur.

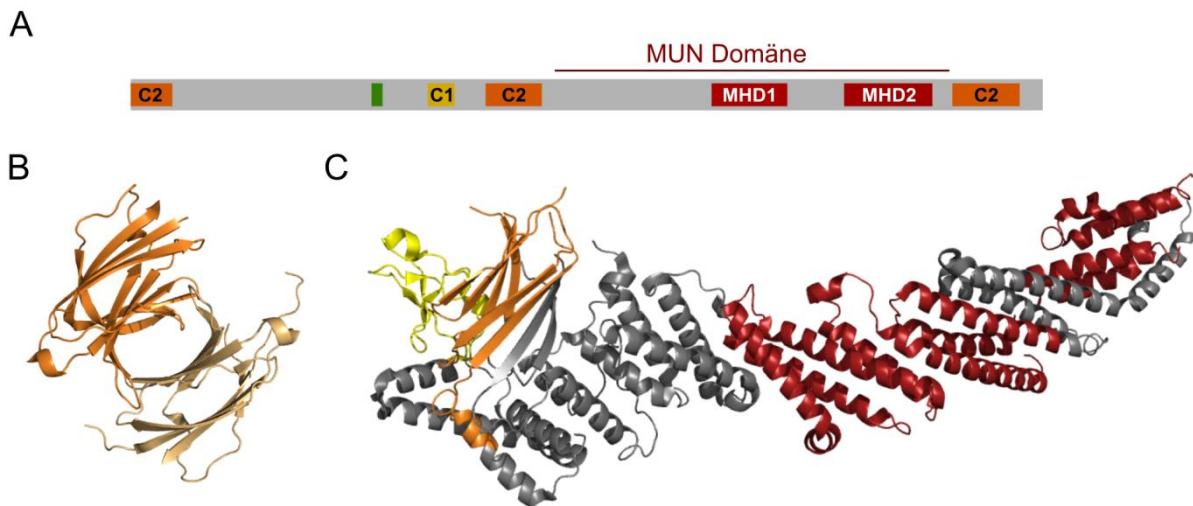


Abbildung 3: 3D-Struktur von Munc13-1. Die Domänen sind in allen Darstellungen farblich identisch zu Abbildung 2 eingefärbt. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Munc13-1. C1: Diacylglycerol/Phorbolster-Bindestelle, C2: Ca^{2+} /Phospholipid-Bindestelle, MHD: Munc-Homologie-Domäne, grün: CaM-Bindestelle. (B) Dimer der N-terminalen C2-Domäne als Bändermodell. PDB-Eintrag: 2CJT. (C) 3D-Struktur der C1C2MUN-Domäne als Bändermodell. Modifiziert nach Xu, et al. 2017⁵⁸. PDB-Eintrag: 5UE8.

1.1.3 Synaptische Signalweiterleitung

Die Signalweiterleitung zwischen Nervenzellen oder zwischen Nervenzellen und anderen Zelltypen erfolgt über interzelluläre Kontaktstellen, den Synapsen. Die Synapse besteht aus einer Präsynapse, dem synaptischen Spalt und einer Postsynapse (Abbildung 4). Die synaptischen Vesikel werden in der Präsynapse vom Endosom abgeschnürt, mit Neurotransmittern beladen und in die aktive Zone der Membran transportiert, wo sie zunächst während des *Docking*prozesses angelagert werden³⁹. Bevor die Neurotransmitter entlassen werden können, reifen die Vesikel während des *Priming*prozesses und werden fusionskompetent⁶¹. Munc13-Proteine sind in beiden Prozessen essentiell, da sie die Bildung des SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Komplexes induzieren, welcher die Membranassoziation der Vesikel ermöglicht. Die Rekrutierung von Munc13-Proteinen an die Membran erfolgt dabei über verschiedene Protein-Protein-Interaktionen. Munc13-1 und ubMunc13-2 interagieren über ihre zusätzliche N-terminale C2-Domäne mit RIM (*Rab3-interacting molecules*)-Proteinen, wodurch sie an der Membran verankert werden^{62, 63}. Da bMunc13-2 keine C2-Domäne am N-Terminus besitzt, interagiert dieses nicht mit RIM, aber mit dem Protein ELKS (Protein, das reich an Aminosäuren E, L, K und S ist)⁶⁴. Für Munc13-3 ist bisher kein interagierendes Protein vergleichbar zu RIM oder ELKS bekannt⁶⁴. Munc13-Proteine lagern sich in ringförmigen Strukturen bestehend aus sechs oder neun Munc13-Molekülen an die Membran, wobei eine Oligomerisierung über ihre

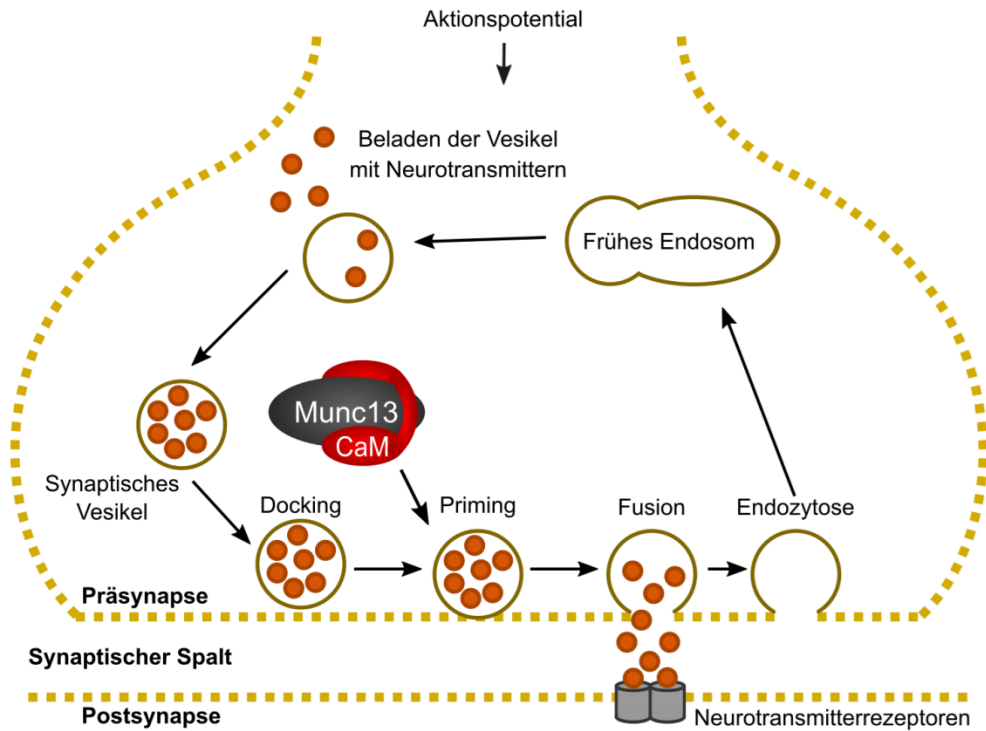


Abbildung 4: Schematische Darstellung des synaptischen Vesikelzyklus. Vesikel werden vom Endosom abgeschnürt und mit Neurotransmittern beladen. Nach Andocken der Vesikel an der Membran, werden sie für die Fusion mit der Membran vorbereitet (Primingprozess). Für das Docking und Priming sind Munc13-Proteine essentiell, welche neben DAG und Calcium auch durch calciumbeladenes CaM reguliert werden. Nach der Fusion mit der Membran werden die Vesikel über Endozytose recycelt oder erneut mit Neurotransmittern befüllt. Abbildung erstellt nach Gundelfinger, et al. 2003⁶¹.

MUN-Domänen erfolgt^{65, 66}. In diese Ringstrukturen, kann das SNARE-Protein Syntaxin-1 ebenfalls als Ringstruktur angelagert werden⁶⁵, wodurch es in eine geöffneten Struktur übergeht und weitere SNARE-Proteine, wie Synaptobrevin-2 und SNAP-25^{67, 68}, rekrutieren kann. Dies ermöglicht die Ausbildung einer „Fusionspore“, über welche die Neurotransmitter entlassen werden können⁶⁵.

Erreicht nun ein Aktionspotential die Präsynapse, werden die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt und können an Rezeptoren der postsynaptischen Membran binden. Dadurch wird in der postsynaptischen Zelle eine Signalkaskade ausgelöst und das Signal weitergeleitet³⁹.

In der Präsynapse liegen gleichzeitig mehrere fusionsbereite Vesikel vor (*readily releasable pool*, RRP), welche die Signalweiterleitung ermöglichen. Deren Menge kann an die erforderliche Signalübertragung angepasst werden, was als synaptische Kurzzeitplastizität (*short-term plasticity*, STP) bezeichnet wird⁷. Erreichen vermehrt Aktionspotentiale die Präsynapse, wird der RRP erhöht, was als kurzzeitige Erhöhung der synaptischen Aktivität

(*short-term enhancement*, STE) bezeichnet wird. Ebenso kann dieser Prozess umgekehrt als kurzzeitige Depression (*short-term depression*, STD) erfolgen. Die Regulation der STP erfolgt unterschiedlich für die verschiedenen Munc13-Isoformen. So zeigen beispielsweise Neuronen, welche nur Munc13-1 enthalten, ein STD-Verhalten, während ausschließlich ubMunc13-2 enthaltende Neuronen STE aufweisen⁶⁹.

1.1.4 Strukturelle Aufklärung der Calmodulin/Munc13-Interaktion

Für ein Verständnis der Regulation von Munc13-Proteinen durch calciumgebundenes CaM ist die strukturelle Aufklärung der Interaktion von hoher Bedeutung. Bisher wurden Studien mit synthetisierten Munc13-Peptiden der CaM-Bindestellen durchgeführt (Abbildung 5A), bei denen für bMunc13-2 und Munc13-3 die physiologisch relevanten C-terminalen CaM-Bindestellen verwendet wurden⁵². Diese enthalten ein calciumabhängiges 1-5-8- oder 1-5-10-Bindemotiv^{52, 53}. Das 1-5-8-Bindemotiv von Munc13-3 ist hierbei ungewöhnlich, da es zwei Alanine enthält, welche als Ankeramino­säuren zu klein sind und daher in den CaM-Bindemotiv-Datenbanken nicht berücksichtigt werden. Eine Datenbanksuche (<http://cam.umassmed.edu>) identifizierte für Munc13-3 ein 1-16-Bindemotiv mit Phenylalanin an erster Position und Leucin an Position 16.

Die Peptide der vier Munc13-Isoformen bilden eine α -helikale Struktur aus, die antiparallel an das CaM bindet und für alle vier Isoformen vergleichbar ist⁵². Zur Analyse weiterer möglicher Interaktionsstellen, wurden die Munc13-1- und ubMunc13-2-CaM-Bindestellen C-terminal verlängert (Abbildung 5B) und die Interaktion mittels Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR)-Spektroskopie untersucht. Die Analyse zeigte, dass CaM eine gestreckte Konformation nach Bindung der C-terminal verlängerten Munc13-Peptide annimmt (Abbildung 5B). Die dargestellte Struktur des Munc13-1-Peptids wurde mittels NMR bestimmt und eine vergleichbare Struktur für ubMunc13-2 mit Hilfe von chemischer Vernetzung und massenspektrometrischer Analyse ermittelt⁷⁰. Darüber wurde für die beiden Isoformen Munc13-1 und ubMunc13-2 ein neues CaM-Bindemotiv, 1-5-8-26, postuliert, welches in den Isoformen bMunc13-2 und Munc13-3 nicht gefunden werden konnte und somit für Munc13-1 und ubMunc13-2 bisher einzigartig ist^{70, 71}. Versuche, das 1-5-8-26-Motiv zu imitieren, verliefen ohne Erfolg, was die Einzigartigkeit dieses Motivs unterstreicht⁷¹. Ob in bMunc13-2 und Munc13-3 andere oder ähnliche CaM-Bindemotive existieren, ist Gegenstand dieser Arbeit.

Einleitung

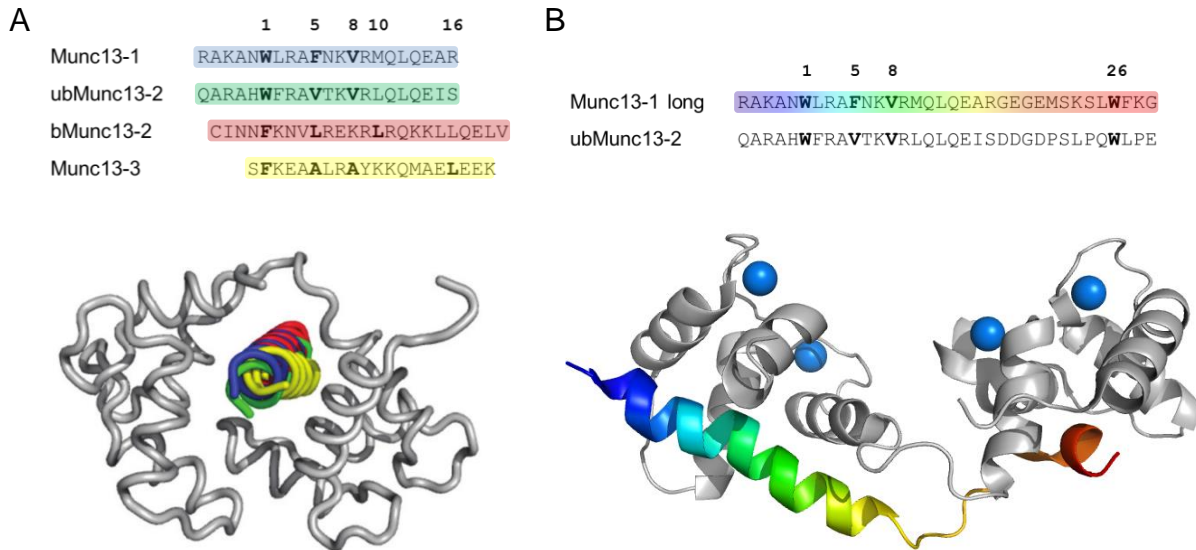


Abbildung 5: Strukturen von CaM/Munc13-Interaktionen. Die Abbildung zeigt die Strukturen von CaM mit verschiedenen Munc13-Peptiden. Die Aminosäuresequenzen der Peptide sind in den entsprechenden Farben der 3D-Struktur hinterlegt. CaM ist in grau eingefärbt, wobei sich die N-terminale Domäne rechts und die C-terminale Domäne links befinden. (A) Peptide der CaM-Bindestellen von Munc13-1, ubMunc13-2, bMunc13-2 und Munc13-3. Der N-Terminus der Peptide zeigt nach vorne. Entnommen aus Lipstein, et al. 2012⁵². (B) C-terminal verlängerte Peptide der CaM-Bindestellen von Munc13-1 und ubMunc13-2 mit einer zusätzlichen Ankeraminosäure (Trp) an Position 26. In der Struktur ist das Munc13-1-Peptid in Regenbogenfarben gezeigt, welches N-terminal (blau) mit der C-terminalen Domäne von CaM und C-terminal (rot) mit der N-terminalen CaM-Domäne interagiert. N-terminal am Peptid verbleiben zusätzlich ein Glycin und Serin von der Thrombinspaltstelle, welche in der Sequenz nicht dargestellt sind. Blaue Kugeln: Calciumionen. PDB-Eintrag: 2KDU.

1.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) hat sich in den letzten Jahrzehnten als vielseitiges Verfahren in vielen naturwissenschaftlichen Bereichen zur Analyse von organischen und anorganischen Verbindungen etabliert. Sie ermöglicht die Identifizierung von Analyten durch Bestimmung ihrer Molekül- bzw. Atommassen⁷². Hierfür werden die Analyten ionisiert und in die Gasphase überführt, wo sie nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt werden. Die Ionisierung erfolgt dabei im Vakuum oder bei Atmosphärendruck, während die Analyse und Detektion der Ionen im Massenspektrometer im Vakuum stattfindet. Der prinzipielle Aufbau eines Massenspektrometers besteht demzufolge aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor⁷².

Die Ionisation von Biomolekülen, wie Proteinen und Peptiden, muss mit besonderer Sorgfalt erfolgen, um diese intakt in die Gasphase zu überführen. Die Entwicklung der „sanften“ Ionisationsmethoden, wie der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI)^{73, 74}

und der Elektrospray-Ionisation (ESI)^{75, 76}, ermöglichte die Analyse dieser organischen Makromoleküle.

Die Analyse der Ionen kann mit unterschiedlichen Massenanalytoren, wie Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz (FT-ICR)-, Flugzeit-, Quadrupol-, Ionenfallen- oder Orbitrapanalytoren, erfolgen. Beispiele für verwendete Detektoren sind Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder Mikrokanalplatten (MCP)⁷².

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Ionisationsmethoden und Massenanalytoren sowie die verwendeten Massenspektrometer werden im Folgenden erläutert.

1.2.1 Ionisationsmethoden

1.2.1.1 Elektrospray-Ionisation

Die Schwierigkeit bei der Analyse nicht flüchtiger Analyten aus einer Flüssigkeit besteht in deren Überführung in die Gasphase und schließlich in einen Massenanalysator. Dies konnte mittels Atmosphärendruckionisation (API) realisiert werden^{77, 78}. Die Elektrospray-Ionisation (ESI) ist die am häufigsten verwendete Ionisationsmethode für Proteine, welche von Fenn⁷⁶ basierend auf den Arbeiten von Dole⁷⁵ weiterentwickelt und mit der massenspektrometrischen Analyse gekoppelt wurde.

Bei der ESI wird die Analytlösung durch eine Kapillare geleitet, an der eine hohe Spannung angelegt ist und die als Gegenelektrode zum Einlass ins Massenspektrometer dient (Abbildung 6A). Durch das angelegte Potential kommt es zur Ladungstrennung innerhalb der Flüssigkeit und zur Verformung des Meniskus am Ende der Kapillare, wodurch sich der Taylor-Konus ausbildet^{79, 80}. Dient die Kapillare als Anode, so sammeln sich negativ geladene Ionen an der Kapillarwand, während sich positiv geladene Ionen im Taylor-Konus akkumulieren. Aus dem Taylor-Konus wird ein Flüssigkeitsstrom emittiert, sobald die elektrostatischen Wechselwirkungen die Oberflächenspannung überschreiten. Dieser wird als *Taylor-jet* bezeichnet und zerfällt am Ende des Strahls in Tröpfchen, welche durch Coulomb-Abstoßung der Ladungsträger in eine Spraywolke zerstäuben (Abbildung 6A/B). Die Flüssigkeit verdampft stetig weiter, bis die Ladungsabstoßung das Rayleigh-Limit erreicht. Gleichzeitig werden die Tröpfchen aufgrund ihrer Beschleunigung verformt, wodurch es zur Emission von Mikrotröpfchen aus verjüngten Bereichen der Tröpfchen mit einer erhöhten Ladungsdichte kommt (*droplet jet fission*, Abbildung 6A/C)⁸¹. Die Freisetzung der Ionen aus den Mikrotröpfchen wird in zwei Modellen beschrieben. Das Modell des geladenen Rückstands (*charged residue model*, CRM)⁷⁵ und der Ionenverdampfung (*ion evaporation*

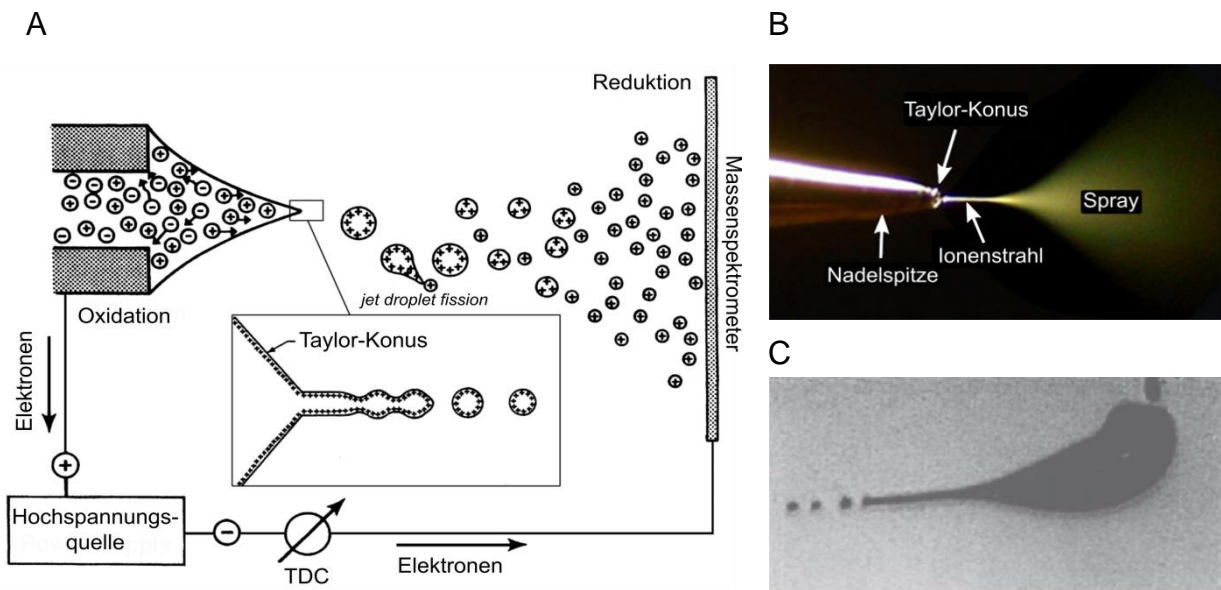


Abbildung 6: Darstellung der Elektrospray-Ionisation. (A) Schematische Darstellung des ESI-Prozesses. Nach Ausbildung des Taylor-Konus am Ende der Kapillare, wird ein Flüssigkeitsstrom emittiert, welcher in Tröpfchen und anschließend in Mikrotröpfchen zerfällt. TDC: Strommesser. Modifiziert nach Gross, 2011⁷². (B) Fotografie des ESI-Prozesses⁸². Modifiziert nach Gross, 2011⁷². (C) Schattenbild eines deformierten Tropfens beim Prozess des jet droplet fission. Ermöglicht durch Blitzlichtfotografie⁸¹. Entnommen aus Gomez, et al. 1994⁸¹.

model, IEM)⁸³. Das CRM beschreibt, dass die Nanotröpfchen durch weitere Coulomb-Explosionen in noch kleinere Tröpfchen zerfallen, welche nur ein Ion tragen. Durch vollständiges Verdampfen des Lösungsmittels werden verbleibende Ladungen auf das Ion übertragen und dieses schließlich freigesetzt^{75, 84, 85}. Das IEM hingegen beschreibt die Freisetzung einzelner Ionen aus Nanotröpfchen, welche mehrere Ionen enthalten. Beide Modelle wurden bestätigt, wobei das CRM für größere Analyten und das IEM für kleinere Analyten angenommen wird⁸⁶

Während der Ionisation erhalten kleinere globuläre Proteine, ihrer Oberfläche entsprechend, weniger Ladungen als größere Moleküle. Diese Theorie stimmt mit der Beobachtung überein, dass ein Protein im denaturierten Zustand mehr Ladungen trägt als in seinem nativen, globulär gefalteten Zustand⁸⁷.

1.2.1.2 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation

Die Methode der Laserdesorption (LD) wurde bereits in den 1960er Jahren genutzt⁸⁸. Problematisch waren hierbei die hohen Temperaturen, welche die Analyse von Biomolekülen nicht zuließen. 1985/87 wurde MALDI von Karas und Hillenkamp entwickelt, um empfindliche, nicht flüchtige Analyten, wie Proteine, zu untersuchen^{73, 74}.

Für MALDI werden Analyten mit einer UV-absorbierenden Matrix auf einer Trägerplatte immobilisiert. Für eine effektive Ionisation wird in der Regel ein 100- bis 10.000-facher Überschuss der Matrix zum Analyten verwendet. Die Desorption/Ionisation erfolgt mittels Laserbeschuss im Vakuum, wobei der Prozess der Ionisation noch nicht detailliert aufgeklärt ist und durch mehrere Theorien beschrieben wird⁸⁹. Durch Beschuss der mit den Analyten kokristallisierten Matrix kommt es zur Anregung und Desorption eines Teils des Kokristallisats unter Ausbildung einer Desorptionswolke⁷². Die Ionisation der Analyten erfolgt durch die Übertragung von Protonen von Matrixmolekülen auf den Analyten oder durch Protonierung in Folge der Verwendung eines sauren Lösungsmittels. Außerdem kann es durch direkte Photoionisation zur direkten Bildung von Radikalkationen oder -anionen kommen⁷². Die Ionen werden anschließend durch das Anlegen einer elektrischen Spannung beschleunigt und in den Massenanalysator überführt.

1.2.2 Massenanalysatoren

1.2.2.1 *Quadrupol-Massenanalysator*

Quadrupole werden in der Massenspektrometrie zum gerichteten Ionentransport oder als Massenfiter genutzt. Sie bestehen aus vier zylindrischen oder hyperbolischen Elektrodenstäben, die quadratisch um eine Längsachse angeordnet sind (Abbildung 7). Alle Elektrodenstäbe besitzen ein Potential bestehend aus einer Gleichstrom- und einer Wechselstromkomponente⁷². Dabei ist das Potential der jeweils gegenüberliegenden Stäbe gleich. Die Ionen werden im entstehenden Feld abwechselnd in x- und y-Richtung bewegt.

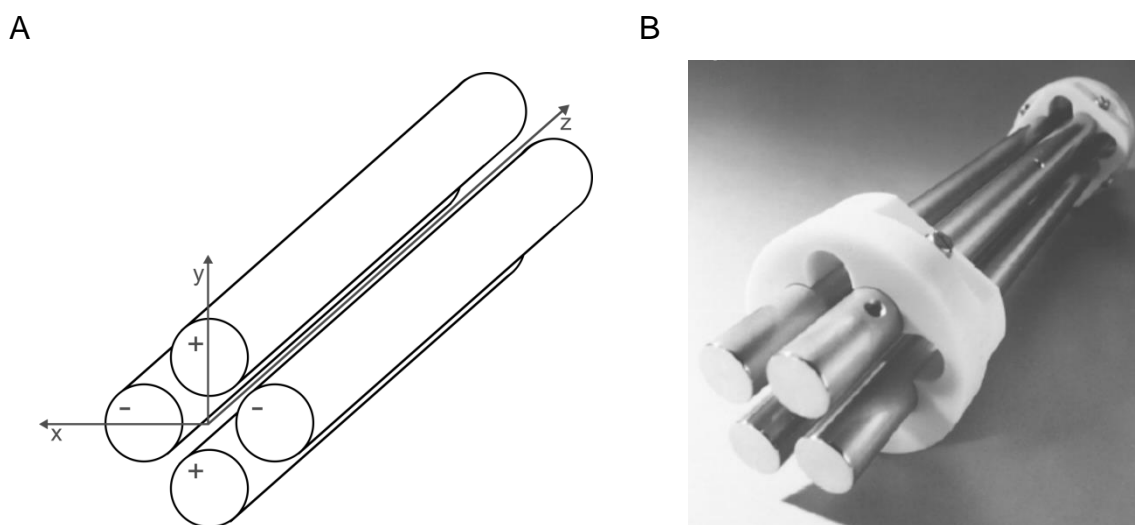


Abbildung 7: Darstellung eines linearen Quadrupols. (A) Schematischer Aufbau der vier um eine Längsachse angeordneten Elektrodenstäbe. Die Potentiale der gegenüberliegenden Elektrodenstäbe sind identisch. (B) Fotografie eines Quadrupols der Firma Waters. Entnommen und modifiziert nach Gross, 2011⁷².

Einleitung

Das angelegte Potential ist spezifisch für Ionen eines bestimmten m/z -Wertes, wodurch ausschließlich diese Ionen durch den Quadrupol geleitet werden, während Ionen mit anderen m/z -Werten seitlich ausgeworfen werden oder mit den Elektrodenstäben kollidieren. Durch Abschalten der Gleichstromkomponente und der verbleibender Radiofrequenz (RF-*only*-Modus) werden alle Ionen durch den Quadrupol geleitet und somit der Quadrupol nur für den Transfer von Ionen genutzt.

1.2.2.2 Lineare Ionenfalle

Die Ionenfalle besteht, analog zum Quadrupol-Analysator, aus vier hyperbolen Elektrodenstäben, welche in drei Segmente geteilt sind (Abbildung 8)⁷². Nach Einlass der Ionen durch eine RF-Spannung in axialer Richtung, können diese durch Anlegen einer Gleichspannung am vorderen und hinteren Segment und des dadurch entstehenden Potentials vom Austritt aus der Ionenfalle gehindert werden⁹⁰. Somit werden die Ionen im mittleren Segment der Ionenfalle axial gespeichert und durch Stoßkühlung mit einem Inertgas gekühlt. Der Auswurf in axialer Richtung erfolgt durch Anlegen einer Wechselspannung an den beiden äußeren Segmenten⁹¹. Dabei können auch Ionen eines spezifischen m/z -Wertes ausgeworfen werden. Dies wird durch eine zusätzliche Wechselspannung an den Außensegmenten mit einer Frequenz, welche der radialen Frequenz des Ions entspricht, ermöglicht. Eine weitere Möglichkeit ist der Auswurf der Ionen in radialer Richtung⁹². Hierfür enthält ein gegenüberliegendes Elektrodenstabpaar Öffnungen für den Ionenauswurf. Die Ionen werden durch eine zusätzlich angelegte Wechselspannung im mittleren Segment massenselektiv angeregt und in radialer Richtung nach außen zu einem SEV für die Detektion ausgeworfen.

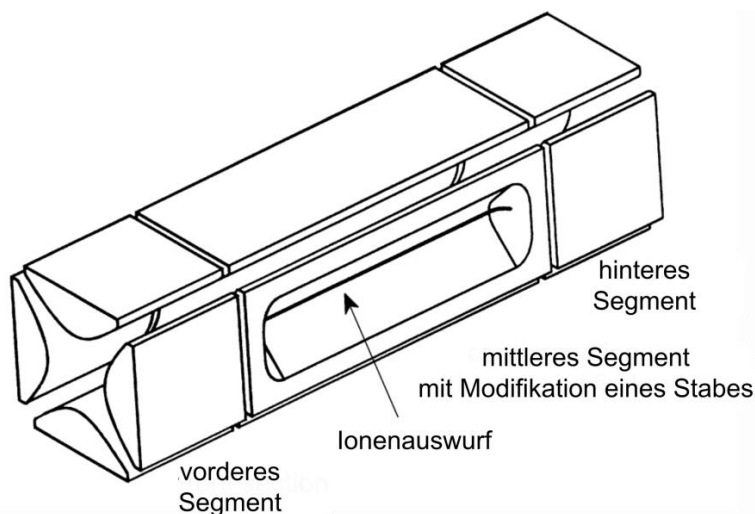


Abbildung 8: Aufbau einer linearen Ionenfalle. Schematischer Aufbau einer linearen Ionenfalle mit seitlichem Ionenauswurf zum Detektor. Modifiziert nach Gross, 2011⁷².

1.2.2.3 Orbitrap

Der Orbitrap-Massenanalysator ist eine durch Makarov weiterentwickelte Kingdon-Falle bzw. deren Optimierung durch Knight⁹³ mit einer vergleichbaren Auflösung und Sensitivität wie FTICR-Massenanalysatoren⁹⁴. Sie besteht aus einer spindelförmigen Zentralelektrode und einer Außenelektrode, deren Radius von innen zu den Außenseiten abnimmt (Abbildung 9)⁹⁵. Die Außenelektrode ist in zwei Hälften unterteilt, die durch einen Keramikring verbunden sind. Zur Analyse von Ionen wird zusätzlich ein gekrümmter Quadrupol benötigt (*curved Trap, C-Trap*), um die Ionen in die Orbitrap zu leiten. In der *C-Trap* werden die Ionen gespeichert, durch Stickstoff gekühlt und im Zentrum akkumuliert bevor sie durch Anlegen einer Hochspannung in die Orbitrap injiziert werden. Die Ionen gelangen tangential zur Zentralelektrode in die Orbitrap und oszillieren aufgrund des quadrologarithmischen, statischen elektrischen Feldes in stabilen Kreisbahnen in z -Richtung entlang der Zentralelektrode⁹⁵. Durch die geteilte Außenelektrode kann die Oszillationsfrequenz ω_z der Ionen detektiert werden. Diese ist indirekt proportional zur Quadratwurzel des m/z -Wertes des zu analysierenden Ions und wird anhand Gleichung 1 beschrieben. Mit Hilfe dieser Gleichung ist die Ermittlung der m/z -Werte der in der Orbitrap befindlichen Ionen möglich.

$$\omega_z = \sqrt{k \left(\frac{q}{m_i} \right)} \quad (\text{Gleichung 1})$$

ω_z - axiale Oszillationsfrequenz

k - Gerätekonstante

q - Elementarladung

m - Masse des Ions

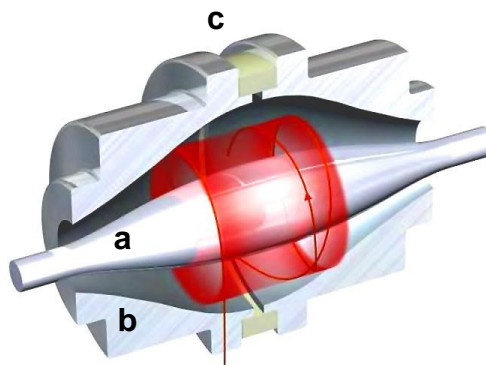


Abbildung 9: Aufbau eines Orbitrap-Massenanalysators. Dargestellt ist ein Querschnitt durch einen Orbitrap-Massenanalysator. Die Ionen oszillieren in z -Richtung in Kreisbahnen um die spindelförmige Zentralelektrode (a). Die Außenelektrode (b) zeichnet die Oszillationsfrequenz der Ionen auf, was durch die Trennung der Elektrode in zwei Hälften mit Hilfe eines Keramikrings (c) ermöglicht wird. Modifiziert nach Scigelova und Makarov, 2006⁹⁴.

1.2.2.4 Flugzeitanalysator

Die Analyse von Ionen mit Hilfe eines Flugzeitanalysators (*time-of-flight*, TOF) beruht auf Trennung der Analyten nach ihrem m/z -Wert entsprechend ihrer Flugzeit im Vakuum⁷². Hierfür werden die Ionen durch ein elektrisches Feld beschleunigt, erhalten dadurch eine definierte kinetische Energie und werden in ein feldfreies Flugrohr geleitet. Aufgrund unterschiedlicher Energien der Ionen sind die Flugzeiten spezifisch für Ionen bestimmter m/z -Werte. Der physikalische Zusammenhang der potentiellen Energie der Ionen und der erhaltenen kinetischen Energie ist in Gleichung 2 beschrieben. U entspricht der angelegten Beschleunigungsspannung, e der Elementarladung, z der Ladungszahl, m_i der Masse des Ions und v der Fluggeschwindigkeit. Wird v durch Gleichung 3 ersetzt, wird zudem die Flugstrecke s und die Flugzeit t beachtet. Aus dem resultierendem Zusammenhang, ist nun die Bestimmung der Flugzeit t im feldfreien Flugrohr (Gleichung 4) und des m/z -Verhältnisses der Ionen (Gleichung 5) möglich.

$$E_{pot} = ezU = \frac{1}{2} m_i v^2 = E_{kin} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$v = \frac{s}{t} \quad (\text{Gleichung 3})$$

$$t = s \sqrt{\frac{m_i}{2ezU}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

$$\frac{m_i}{z} = \frac{2eUt^2}{s^2} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Häufig wird ein Flugrohr-Massenanalysator mit einer MALDI-Ionenquelle kombiniert (Abbildung 10). Durch die Ionisation mit Hilfe des Lasers erhalten die Ionen bereits eine kinetische Energie, welche über die Verwendung einer hohen Beschleunigungsspannung (10-30 kV) ausgeglichen wird⁹⁶.

Die Analyse im Flugrohr verläuft auf einer geraden Flugbahn (linearer Modus) oder unter Verwendung eines Reflektrons auf einer verlängerten Flugbahn. Mit Hilfe des Reflektrons werden die Ionen mittels ringförmiger Elektroden gebremst und treten entgegen ihrer Flugrichtung wieder aus dem Reflektron aus. Dabei können Ionen mit identischem m/z -Wert aber verschiedener Energie unterschiedlich tief in das Reflektron eindringen und werden mit gleicher Energie und Geschwindigkeit emittiert. Dies ermöglicht eine Fokussierung von Ionenspezies identischer m/z -Werte und führt zur Erhöhung der Auflösung.

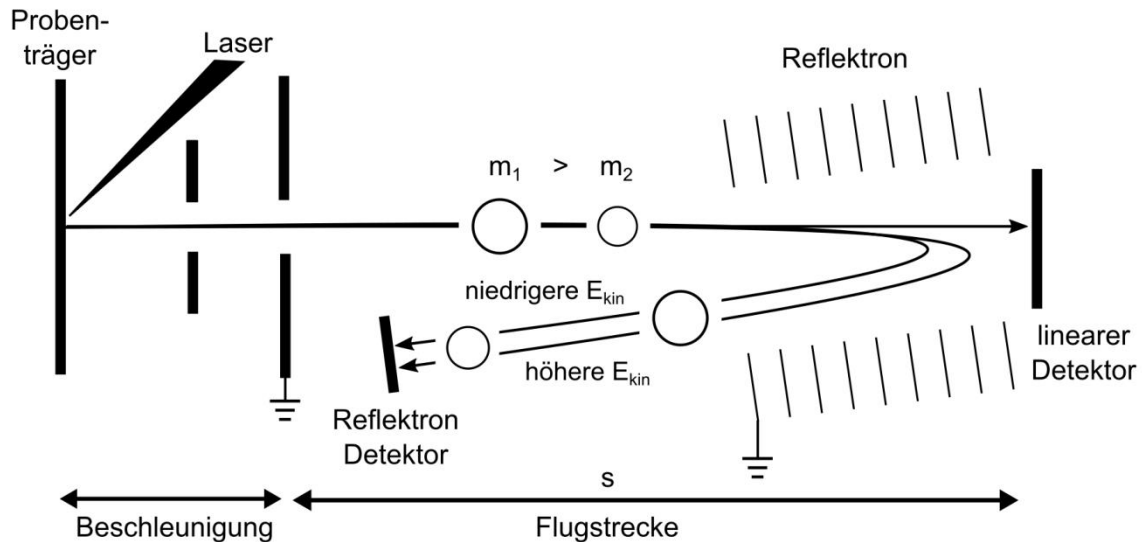


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers. Der Analyt auf dem Proben-träger wird durch MALDI ionisiert und anschließend in den Flugzeit-Massenanalysator überführt. Die Ionen werden am linearen Detektor oder bei Verwendung des Ionenspiegels (Reflektron) am Reflektron-Detektor detektiert. Modifiziert nach Gross, 2011⁷².

1.2.3 Fragmentierung

Zur eindeutigen Identifizierung von Analyten ist meist eine Fragmentierung notwendig, um ihre genaue Zusammensetzung zu untersuchen. Besonders in der Protein- und Peptidanalytik ist die Aufklärung der Aminosäuresequenz für eine eindeutige Bestimmung unentbehrlich^{97, 98}. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometern können Fragmentierungsexperimente durch Kollisionen der Analyten mit Stoßgasen oder Übertragung von Elektronen auf die Analyten erfolgen. Je nach Art der Fragmentierung kommt es zum Bruch verschiedener Bindungen im Peptidrückgrat (Abbildung 11). Verbleibt die positive Ladung nach der Fragmentierung am N-terminalen Fragment, entstehen a-, b- oder c-Ionen, während respektive x-, y- oder z-Ionen detektiert werden, wenn die Ladung am C-terminalen Fragment verbleibt^{99, 100}.

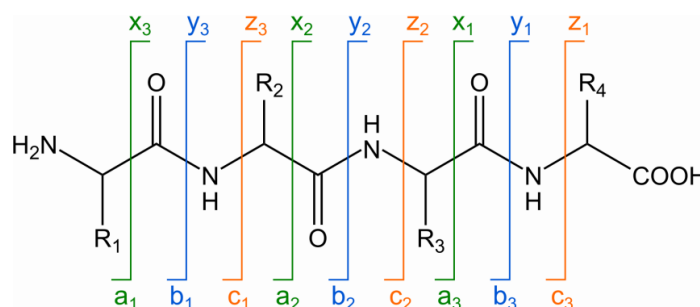


Abbildung 11: Nomenklatur der Fragmentierung der Peptidbindung. Erstellt nach Roepstorff, et al. 1998, Fohlmann, et al. 1985 und Biemann, 1988^{99, 100}.

Einleitung

Bei der kollisionsinduzierten Dissoziation (*collision-induced dissociation*, CID) werden die Ionen nach Beschleunigung durch ein angelegtes Potential zur Kollision mit einem Inertgas, wie Stickstoff, Helium oder Argon, gebracht¹⁰¹. Durch die Kollision werden die schwächsten Bindungen innerhalb des Analyten, bei Peptiden sind dies die Amidbindungen, fragmentiert. Daraus folgend sind bei CID b- und y-Ionen zu beobachten. Bei einer kollisionsinduzierten Dissoziation mit höherer Energie (*higher energy collision-induced dissociation*, HCD) erfolgt die Beschleunigung der Ionen mit einer Radiofrequenz¹⁰². Dadurch kommt es zu einer effektiveren Fragmentierung der Peptidbindung und zu mehrfachen Fragmentierungen¹⁰³. Eine dritte Möglichkeit der Fragmentierung ist die Dissoziation durch einen Elektronentransfer auf die Analytionen (*electron transfer dissociation*, ETD). Hierbei wird ein Fluoranthen-Radikalanion erzeugt, welches gemeinsam mit dem Analytion in die Ionenfalle geleitet wird. Dort überträgt das Fluoranthen-Radikalanion ein niederenergetisches Elektron auf das Analytion, wodurch die Bindung zwischen dem Amidstickstoff und dem folgenden C_α-Atom gespalten wird. Folglich entstehen c-Ionen und z-Radikationen¹⁰⁴.

1.2.4 Hybridmassenspektrometer

Zwei oder mehr Massenanalytoren können in Tandem-Massenspektrometern vereint werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Tandem-Massenspektrometer werden im Folgenden vorgestellt.

1.2.4.1 Orbitrap-Massenspektrometer

Die massenspektrometrische Analyse mit Orbitrap-Massenanalytoren wurden an den Hybridmassenspektrometern Orbitrap Fusion Tribrid¹⁰⁵ und Q Exactive Plus, jeweils mit Nano-ESI-Quellen, von Thermo Fisher Scientific durchgeführt (Abbildung 12). Nach Ionisation der Analyten werden die Ionen über den Ionentrichter (*S-Lens*) in das Massenspektrometer geleitet. Durch die anschließende gebogene Ionenoptik werden die geladenen Probenmoleküle in den Quadrupol-Massenfilter transferiert und von neutralen Molekülen abgetrennt. Der Quadrupol wird zunächst im *RF-only*-Modus zum Transfer der Ionen über die anschließende *C-Trap* in die Orbitrap oder zur linearen Ionenfalle (nur Orbitrap Fusion) betrieben. Sollen einzelne Ionen isoliert werden, so arbeitet der Quadrupol als Massenfilter und erlaubt nur die Weiterleitung der selektierten Ionen. Die Fragmentierung von ausgewählten Ionen kann im Falle der Orbitrap Fusion Tribrid durch CID, HCD oder ETD, und im Falle der Q Exactive Plus durch HCD erfolgen. Zusätzlich ist es möglich, eine Fragmentierung in der Quelle (*in-source*-CID) an dem Q Exactive Plus-Massenspektrometer

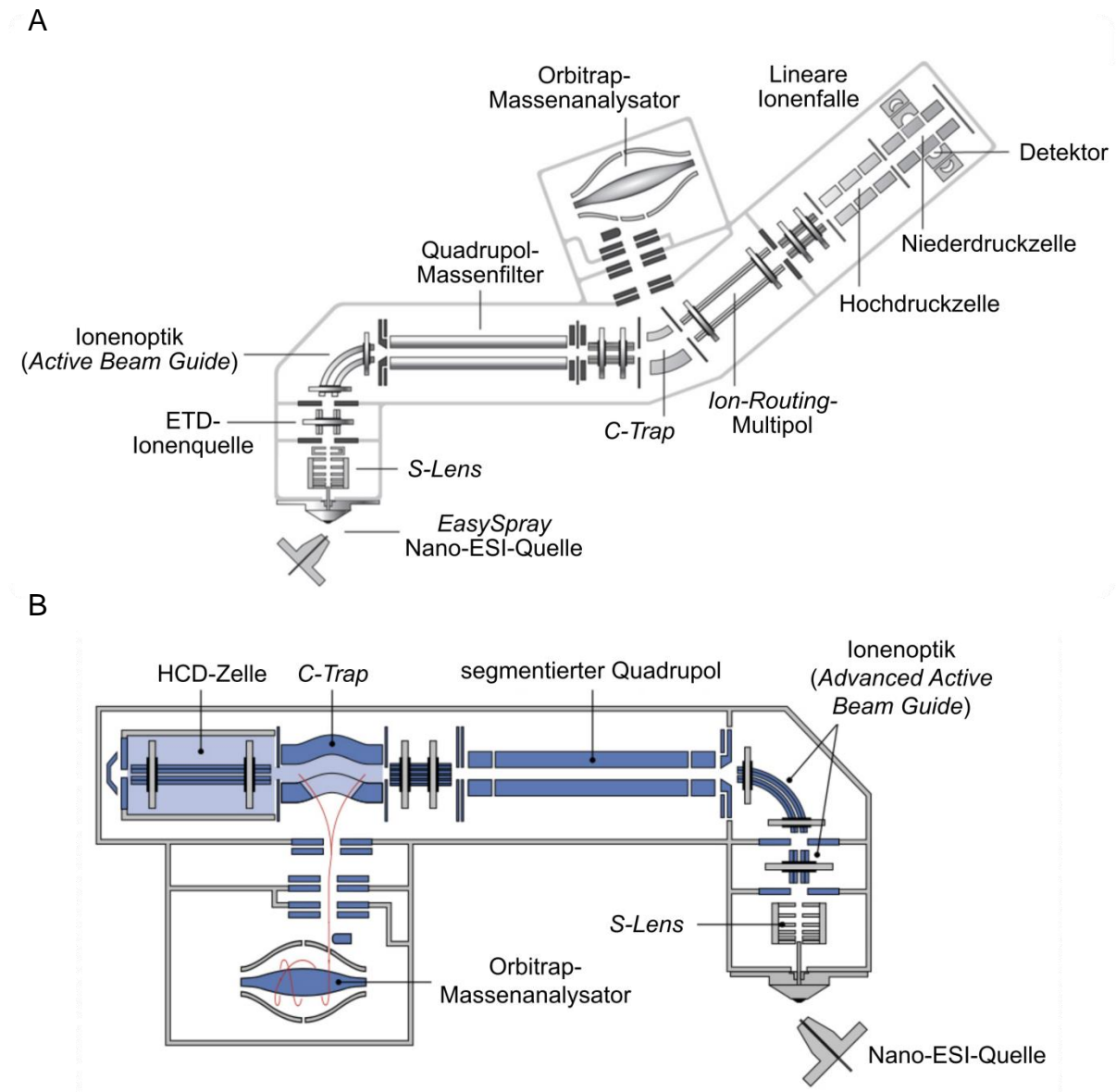


Abbildung 12: Schematische Darstellung der verwendeten Orbitrap Hybrid-Massenspektrometer. (A) Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer. Entnommen und modifiziert nach Senko, et al., 2013¹⁰⁵. (B) Q Exactive Plus-Massenspektrometer. Entnommen und modifiziert von planetorbitrap.com.

durchzuführen, wobei aber keine vorherige Isolation von gewünschten Ionen möglich ist. CID und ETD finden im Orbitrap Fusion-Massenspektrometer im Hochdrucksegment der Ionenfalle statt, während HCD im *Ion Routing*-Multipol realisiert wird. Die Detektion der Ionen erfolgt anschließend in der linearen Ionenfalle oder in der Orbitrap. ETD kann zusätzlich mit HCD oder CID kombiniert werden, indem zwei Fragmentierungen nacheinander durchgeführt werden. In dem Q Exactive Plus-Massenspektrometer findet die HCD-Fragmentierung in der HCD-Zelle statt, die anschließende Detektion in der Orbitrap.

1.2.4.2 Q-TOF 2-Massenspektrometer

Das Hybridmassenspektrometer *High-Mass Q-TOF 2*¹⁰⁶ (Micromass/MS Vision) ist eine Kombination aus Quadrupol-Massenfilter und TOF-Analysator mit einer Nano-ESI-Quelle (Abbildung 13). Es ermöglicht die Analyse von intakten Proteinen in nahezu nativer Umgebung¹⁰⁶. Durch verschiedene Modifikationen des Instrumentes können mit diesem Massenspektrometer Proteine mit einem hohen Molekulargewicht (bis 5 MDa) analysiert werden, was mit den in dieser Arbeit verwendeten Orbitrap-Massenanalysatoren nicht möglich ist. Durch die Kombination des TOF mit einem Quadrupolanalysator und einer Kollisionszelle ist die Isolation einzelner Spezies und deren Fragmentierung durchführbar. Dadurch können Stöchiometrien von Proteinkomplexen und Interaktionen von Proteinen durch Dissoziation der einzelnen Untereinheiten bestätigt werden. Ionen werden durch eine Z-Spray-Ionenquelle generiert, mittels der RF-Lens ins Massenspektrometer geleitet und durch die Ionenoptik zum *Pusher* transportiert. Hier werden die Ionen vertikal zur Flugrichtung direkt aus dem Ionenstrahl beschleunigt, in den TOF-Analysator überführt und schließlich am MCP-Detektor detektiert.

Für die Analyse großer Makromoleküle weist das in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer Modifikationen auf¹⁰⁶. Zur Weiterleitung von Makromolekülen von bis

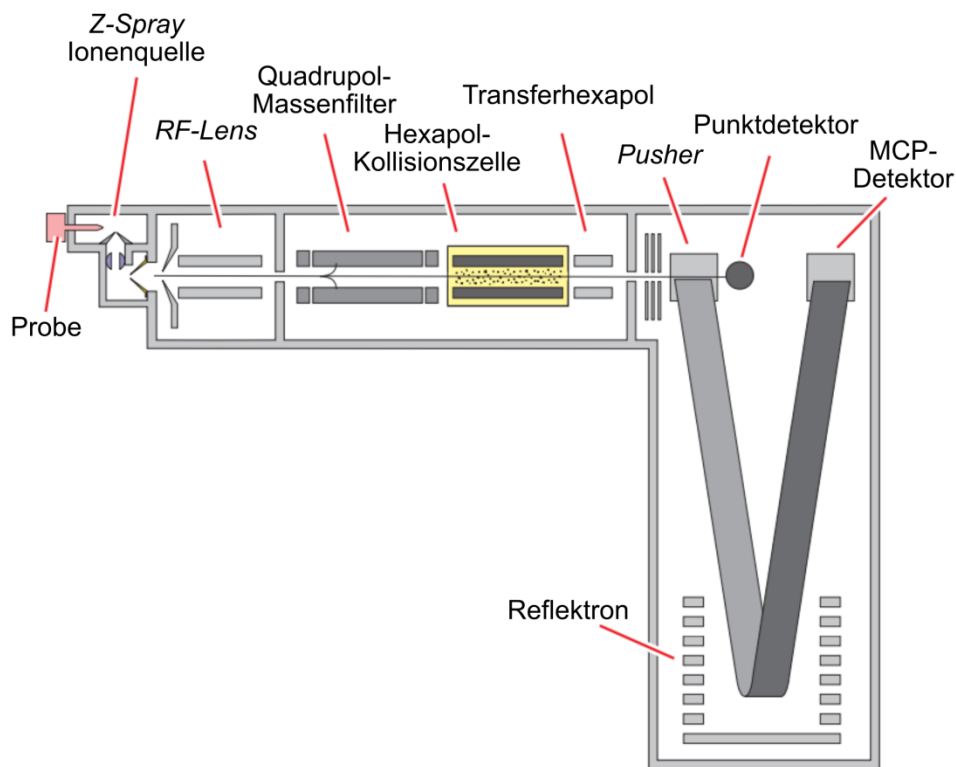


Abbildung 13: Schematische Darstellung des *High-Mass Q-TOF 2*-Massenspektrometers. Modifiziert nach Sobott, et al. 2002¹⁰⁶.

zu m/z 30.000 wurde die Frequenz des Quadrupol-Massenfilters von 832 kHz auf 300 kHz verringert. Die Möglichkeit zur Regulation des Druckes in der Ionenquelle und der Kollisionszelle ermöglicht ein effektives Kühlen der einströmenden Ionen, wodurch die kinetische Energie erniedrigt und die Flugbahn der Ionen stabilisiert werden. Die Detektion der Makromoleküle wird durch eine verlängerte Zeit zwischen den Pulsen des *Pushers* ermöglicht. Ist die Zeit zu kurz gewählt, kann es zu Überlagerungen der Signale kommen, da Ionen nicht am Detektor ankommen bevor neue Ionenpakete beschleunigt werden. Somit überlagern sich die Signale der langsameren Ionen mit denen der neu beschleunigten Ionen. Die Detektionszeit entspricht hier der Zeit zwischen den Pulsen des *Pushers*.

1.3 Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteininteraktionen

Eine Vielfalt an massenspektrometrischen Verfahren ermöglicht die umfangreiche Charakterisierung von von Proteininteraktionen und -strukturen. Die Techniken, wie die chemische Vernetzung, Wasserstoff-Deuterium-Austausch (*hydrogen-deuterium exchange*, HDX), Protein-,*footprinting*“ und native MS, werden unter dem Begriff „Strukturelle Massenspektrometrie“ zusammengefasst¹⁰⁷. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Charakterisierung der CaM/Munc13-Interaktion werden in diesem Kapitel erläutert.

1.3.1 Chemische Vernetzung in Kombination mit Massenspektrometrie

Die chemische Vernetzung in Kombination mit Massenspektrometrie ist eine seit 2000¹⁰⁸ intensiv weiterentwickelte, vielversprechende Methode zur Strukturaufklärung von Proteinen¹⁰⁹⁻¹¹⁴. Sie ist neben Röntgenkristallographie, Kernspinresonanzspektroskopie und Kryoelektronenmikroskopie eine weitere Technik, um hochauflösende Daten zur Aufklärung von Proteinstrukturen zu generieren^{115, 116}. Vorteile der chemischen Vernetzung sind die mögliche Analyse von Proteinen mit teilweise unstrukturierten Bereichen sowie der Einsatz von wesentlich geringen Proteinmengen im nanomolaren Bereich im Vergleich zur Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie.

Der Ablauf eines Experimentes der chemischen Vernetzung ist in Abbildung 14 dargestellt. Durch Verwendung eines Vernetzungsreagenzes erfolgt die kovalente Verknüpfung von räumlich benachbarten Aminosäuren¹¹⁰. Das Vernetzungsreagenz beinhaltet funktionelle Gruppen, welche durch einen „*Spacer*“ definierter Länge verbunden sind. Dieser bleibt nach der Reaktion zwischen den Aminosäuren erhalten, wodurch die maximal mögliche Distanz

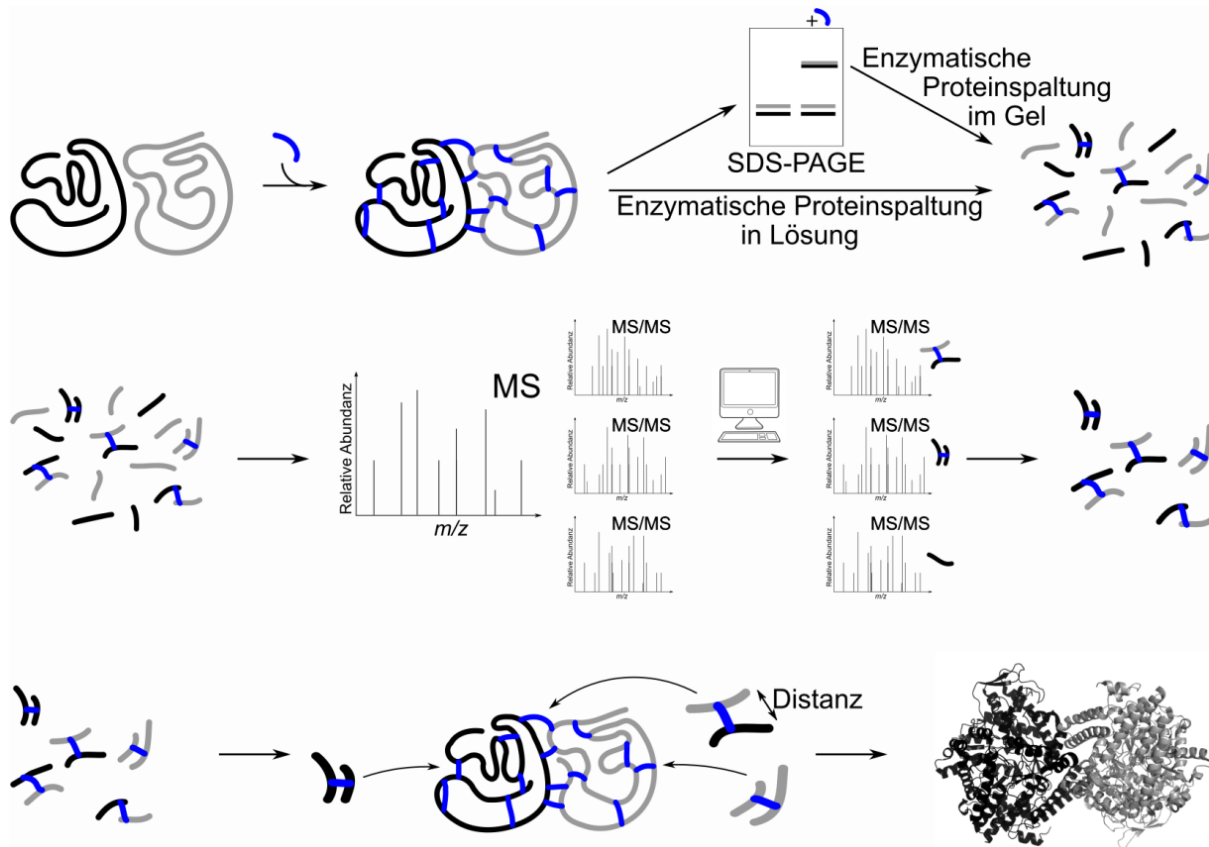


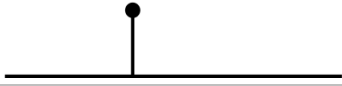

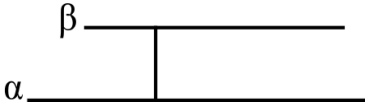
Abbildung 14: Darstellung eines Vernetzungsexperimentes.

zwischen den vernetzten Aminosäuren bestimmt werden kann. Durch Trennung der vernetzten Proteine mit Hilfe der Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kann die chemische Vernetzung visuell überprüft werden. Im Vergleich zu einer unvernetzten Probe, sollten nach der Reaktion mit einem Vernetzungsreagenz zusätzliche Signale bei höheren apparenten Molekulargewichten auftreten, welche die kovalente Verbindung von interagierenden oder oligomerisierenden Proteinen bestätigen. Enthält die Probe nur ein Protein, welches nicht zur Oligomerisierung neigt, so kann die chemische Vernetzung durch eine Unschärfe des Signals aufgrund unterschiedlicher mit dem Vernetzungsreagenz modifizierten Spezies während der SDS-PAGE-Analyse beobachtet werden. Die Analyse der Vernetzungsprodukte erfolgt mit Hilfe einer „Bottom-up“ Strategie¹¹⁰. Hierbei werden die vernetzten Proteine enzymatisch in Lösung oder innerhalb der Gelmatrix gespalten und die resultierende Peptidlösung der Massenspektrometrie zugeführt. Vor der massenspektrometrischen Analyse wird die Peptidmischung über eine Umkehrphasen-HPLC zur Verringerung der Komplexität der Probe aufgetrennt. Die eluierten Peptide werden direkt über eine Kopplung der HPLC mit einer ESI-Quelle ins Massenspektrometer überführt. Nach Aufnahme von Übersichts-Massenspektren der Peptidionen, werden einzelne Spezies isoliert, fragmentiert und die resultierenden Fragmentenmassenspektren (MS/MS) aufgenommen. Anschließend werden diese

Massenspektren mit Hilfe einer speziellen Software, wie StavroX¹¹⁷, MeroX¹¹⁸ oder XlinkX¹¹⁹, den vernetzten Peptiden zugeordnet. Hierfür führt die Software einen *in-silico*-Verdau der Proteine und eine theoretische Fragmentierung der erhaltenen Peptide durch. Die so erhaltenen Informationen über Fragmente von vernetzten Peptiden werden mit den aufgenommenen Fragmentenmassenspektren abgeglichen und zugeordnet. Nach Identifizierung der verknüpften Peptide werden die vernetzten Aminosäuren aufgrund der Fragmentierung der Peptide bestimmt. Mit diesen und der bekannten Länge des „*Spacers*“ des Vernetzungsreagenzes können anschließend Rückschlüsse über die räumliche Distanz der beiden Aminosäuren innerhalb der Proteinstruktur gezogen werden, welche in die Strukturanalyse einfließt (Abbildung 14, unterste Reihe). Durch Verwendung von verschiedenen Vernetzungsreagenzien mit unterschiedlichen Längen und Spezifitäten können komplementäre strukturelle Informationen erhalten werden^{110, 120, 121}

Durch Reaktion mit einem Vernetzungsreagenz können verschiedene Varianten vernetzter Peptide entstehen¹²². Die drei wichtigsten Varianten sind in Tabelle 1 dargestellt. Typ 0 beschreibt die Modifikation einer Aminosäure mit einem Vernetzungsreagenz, wobei nur eine funktionelle Gruppe mit der Aminosäure reagiert hat, während die zweite funktionelle Gruppe intakt ist oder eine andere Reaktion, z.B. eine Hydrolyse, eingegangen ist. Mit Hilfe dieser Modifikationen kann die Zugänglichkeit von Aminosäuren analysiert und die Oberfläche von Proteinen erfasst werden¹²³. Durch die Verknüpfung von zwei Aminosäuren innerhalb eines Peptids werden Typ 1-Vernetzungsprodukte erhalten, welche ebenfalls Informationen über die Oberfläche eines Proteins liefern können, aber die Strukturanalyse von Proteinen durch die Nähe der Aminosäuren innerhalb der Aminosäuresequenz nur wenig unterstützen. Typ 2-Vernetzungsprodukte beschreiben die vernetzten Peptide, welche die wichtigsten Strukturinformationen liefern. Sie bestehen aus zwei miteinander verknüpften Peptiden, welche innerhalb der Aminosäuresequenz nah oder weit voneinander entfernt liegen oder von

Tabelle 1: Nomenklatur von vernetzten Peptiden

| Bezeichnung ¹²² | Alternative Nomenklatur | Schematische Darstellung |
|----------------------------|--|--|
| Typ 0 | „ <i>Dead-end</i> “ ¹⁰⁸ „ <i>Monolink</i> “ ¹¹¹ |  |
| Typ 1 | intrapeptidal „ <i>loop</i> “-link“ ¹¹¹ |  |
| Typ 2 | interpeptidal |  |

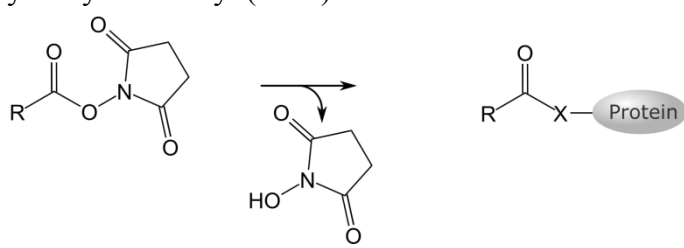
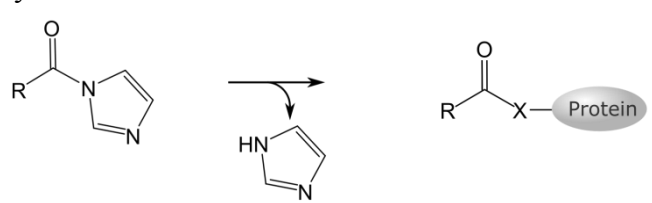
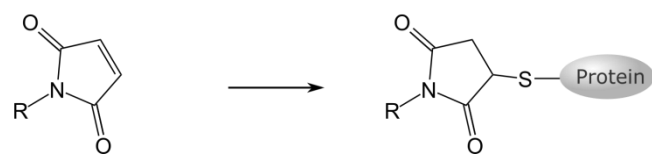
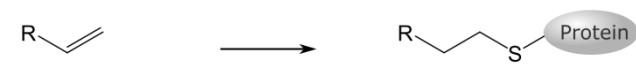
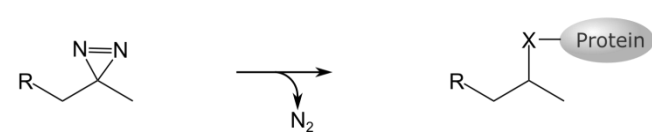
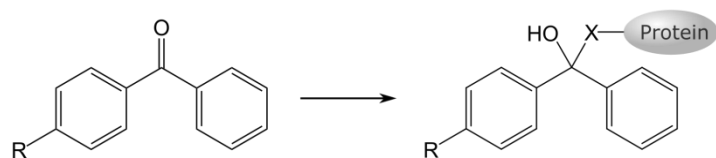
zwei miteinander interagierenden Proteinen stammen können. Innerhalb der Typ 2-Vernetzungsprodukte gibt es eine weitere Nomenklatur, welche die Peptide beschreibt. Das Peptid mit höherer molekularer Masse wird als α -Peptid, und das Peptid mit kleinerer molekularer Masse als β -Peptid bezeichnet¹²².

1.3.1.1 Design und Reaktivität der Vernetzungsreagenzien

Durch unterschiedliches Design von Vernetzungsreagenzien mit verschiedenen Längen und funktionellen Gruppen ist eine Vielfalt von Vernetzungsreagenzien entwickelt worden. Die am häufigsten verwendeten Moleküle sind additive Reagenzien. Sie bestehen meist aus zwei funktionellen Gruppen, welche durch einen „Spacer“ verbunden sind¹¹⁰. Die Gruppen können dabei identische oder unterschiedliche Reaktivitäten aufweisen und werden somit in homo- und heterobifunktionelle Vernetzungsreagenzien eingeteilt. Kommt eine weitere funktionelle Gruppe hinzu, z.B. eine Biotingruppe für eine spätere Affinitätsanreicherung, handelt es sich um ein trifunktionelles Vernetzungsreagenz.

Eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Vernetzungsprinzipien beinhaltet Tabelle 2. *N*-Hydroxysuccimidyl (NHS)-Ester sind die häufigsten verwendeten reaktiven Gruppen und reagieren hauptsächlich mit primären Aminen der Lysinseitenketten oder den *N*-Termini von Proteinen¹²³. Die kovalente Modifikation der Hydroxygruppen von Serin, Threonin und Tyrosin konnte ebenfalls beobachtet werden^{124, 125}. Eine ähnliche Reaktivität weisen Carbonylimidazole auf, wobei diese eine höhere Reaktionsfreudigkeit mit Hydroxygruppen aufweisen¹²⁶. Zur Vernetzung von Cysteinen können Maleimid- und Allylgruppen¹²⁷ verwendet werden, wobei die Allylgruppe nur nach Ausbildung eines Thiylradikals mit der Cystein-Seitenkette reagieren kann. Die Aktivierung der Thiolgruppe erfolgt durch gleichzeitige Zugabe eines photo-aktivierbaren Reagenzes, z.B. Benzophenon¹²⁷. Photo-reaktive Gruppen, wie Diazirin und Benzophenon, werden durch Bestrahlung mit UV-A-Licht aktiviert und reagieren mit allen Aminosäureseitenketten, weisen aber spezifische Präferenzen auf. So verknüpfen Diazirine bevorzugt saure Aminosäuren¹²⁸, während Benzophenone eine Präferenz für Methionin zeigen¹²⁹. Durch UV-A-Bestrahlung des Diazirins wird ein reaktives Carben nach Verlust von molekularem Stickstoff ausgebildet oder das Diazirin zu einer Diazoverbindung umgelagert¹²⁸. Während das Carben unspezifisch mit allen Aminosäureketten reagieren kann, bildet die Diazoverbindung eine Esterbindung mit Carbonsäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure und C-Terminus) aus. Eingehende Untersuchungen zur Reaktivität der Diazirine zeigten, dass die Ausbildung der Esterbindung hierbei deutlich bevorzugt ist¹²⁸.

Tabelle 2: Funktionelle Gruppen der verwendeten Vernetzungsreagenzien

| Vernetzungsprinzip | Zielaminosäuren |
|---|---|
| <p><i>N</i>-Hydroxysuccimidyl (NHS) ester</p>  | <p>Lysin, <i>N</i>-Terminus, Serin, Threonin, Tyrosin X = NH, O</p> |
| <p>Carbonylimidazol</p>  | <p>Lysin, <i>N</i>-Terminus, Serin, Threonin, Tyrosin X = NH oder O</p> |
| <p>Maleimid</p>  | <p>Cystein</p> |
| <p>Allyl</p>  | <p>Cystein</p> |
| <p>Diazirin</p>  | <p>Alle Aminosäuren, <i>N</i>- and <i>C</i>-Terminus X = CH₂, NH, O oder S Präferenz für saure Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäure)¹²⁸</p> |
| <p>Benzophenon</p>  | <p>Alle Aminosäuren, <i>N</i>- and <i>C</i>-Terminus X = CH₂, NH, O oder S Präferenz für Methionin¹²⁹</p> |

Vernetzungsreagenzien, welche direkt in Proteine eingebaut werden und nur eine funktionelle Gruppe besitzen, werden in Form von artifiziellen Aminosäuren angewendet. Hierbei wird ein Aminosäureanalogon genutzt, bei dem die Seitenkette eine photo-reaktive Gruppe enthält, z.B. ein Diazirin oder ein Benzophenon^{130, 131}. Dadurch enthält diese Art von Vernetzungsreagenzien keinen *Spacer* und verknüpft Aminosäuren in unmittelbarer Umgebung. Ein

Einleitung

Vorteil der photo-reaktiven Aminosäuren liegt in einer bereits bekannten Position der Verknüpfung zwischen zwei Aminosäuren, so dass nur die zweite verknüpfte Aminosäure während der massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden muss.

Photo-reaktive Aminosäuren werden spezifisch oder unspezifisch in die Proteine während der Translation eingebaut und anschließend durch Bestrahlung mit UV-A-Licht aktiviert^{130, 132, 133}. Der spezifische Einbau erfolgt über die Verwendung eines Amber-Stoppcodons (UAG) in der DNA an der gewünschten Position zur Einführung des Aminosäureanalogons während der Translation mit Hilfe einer speziellen tRNA¹³². Im Gegensatz dazu können Aminosäureanaloge, welche nur geringfügig von der natürlichen Aminosäure abweichen, wie Photo-Methion (Photo-Met)¹³⁰, Photo-Leucin¹³⁰ und Photo-Lysin¹³⁴ unspezifisch mit Hilfe der tRNAs für die natürlichen Aminosäuren in die Proteine während der Translation eingebaut werden. Dazu werden die unnatürlichen Aminosäuren dem Medium für das Zellwachstum zugegeben und in die Proteine eingebaut (Abbildung 15)^{130, 135, 136}. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Unabhängigkeit von einer veränderten DNA-Sequenz sowie einer speziellen tRNA zum Einbau der Aminosäureanaloge.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vernetzungsreagenzien sind in Abbildung 16 mit ihren entsprechenden *Spacer*längen dargestellt. Die photo-reaktiven Aminosäuren enthalten keinen *Spacer*, da die funktionelle Gruppe bereits in der Aminosäure inkorporiert ist.

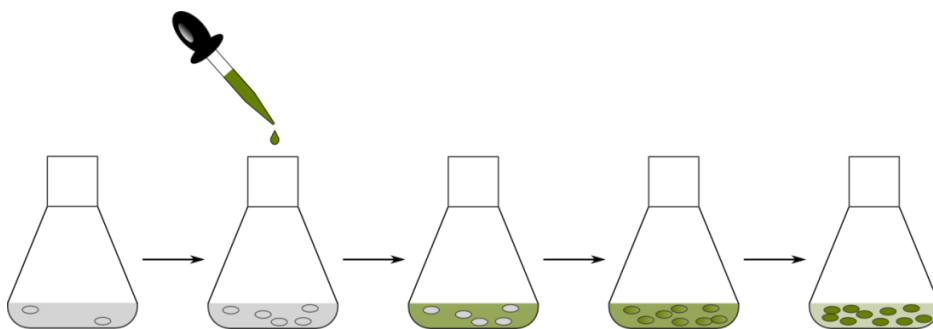


Abbildung 15: Strategie des unspezifischen Einbaus von Aminosäureanaloge während der Zellkultur. Zellen werden zunächst in Medium ohne die entsprechende Zielaminosäure angezogen. Anschließend wird die photo-reaktive Aminosäure zugesetzt, von den Zellen aufgenommen und in Proteine der Zelle eingebaut. Dies ist schematisch durch die zunehmende Grünfärbung der Zellen dargestellt. Die Zellen benötigen keine zusätzliche DNA zur Herstellung einer spezifischen tRNA.

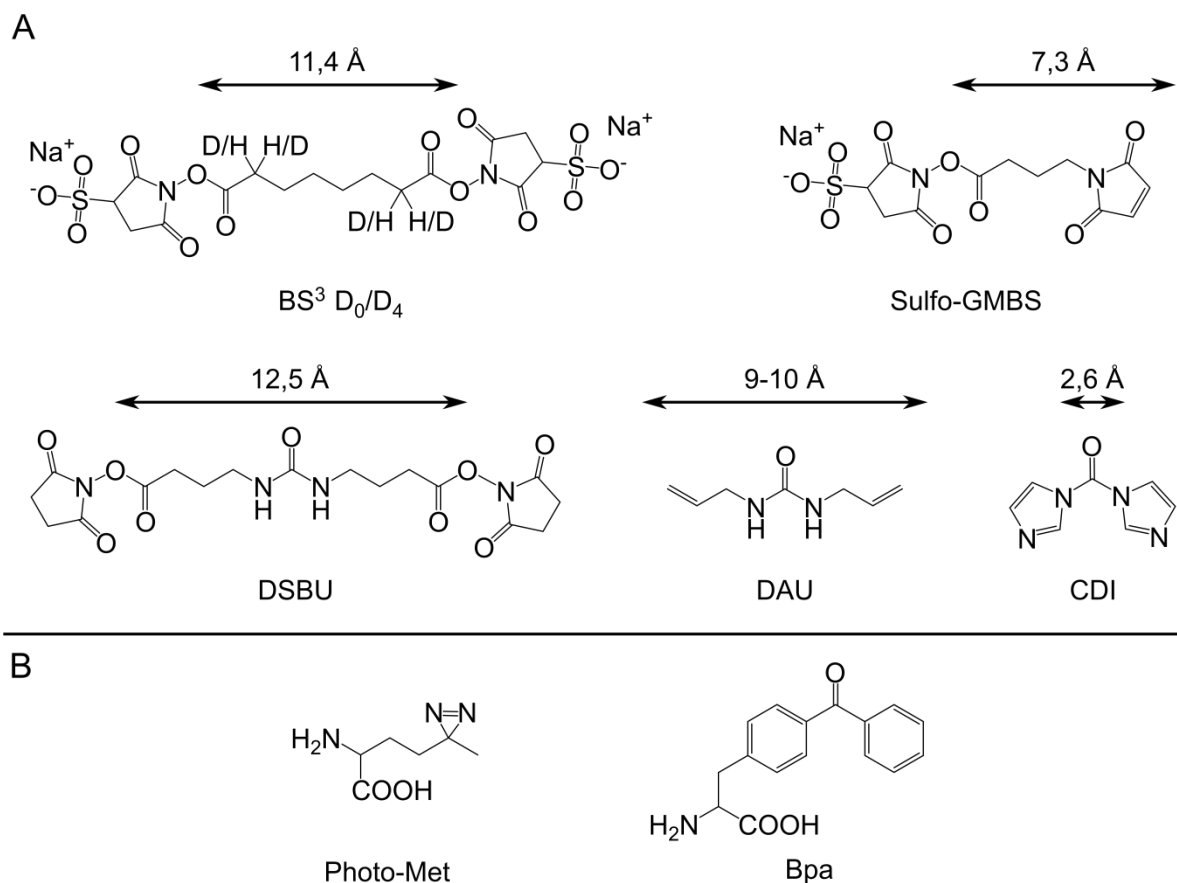


Abbildung 16: Verwendete Vernetzungsreagenzien. (A) Bifunktionelle Vernetzungsreagenzien. Die Länge der jeweiligen Spacer ist angegeben. D_0/D_4 bezeichnet die Verwendung von nicht-deutertem und vierfach deutertem BS^3 . (B) Photo-reaktive Aminosäuren. Eine Übersicht der Reaktionen aller Reagenzien befindet sich im Anhang (Abbildung A1). BS^3 : Bis(sulfosuccinimidyl)suberat, Sulfo-GMBS: *N*- γ -Maleimidobutyryloxysulfosuccinimidester, DSBU: Disuccinimidyl dibutylurea, CDI: Carbonyldiimidazol, DAU: Diallylurea, Bpa: Benzoylphenylalanin.

1.3.1.2 MS-spaltbare Vernetzungsreagenzien

Zur vereinfachten Analyse von Vernetzungsprodukten wurden Vernetzungsreagenzien entwickelt, welche spezifische Eigenschaften aufweisen. Drei Strategien sind dabei möglich: (i) die Einführung einer funktionellen Gruppe zur Affinitätsanreicherung, (ii) die Isotopenmarkierung des Vernetzungsreagenzes oder (iii) die Einführung einer spaltbaren Bindung im Vernetzungsreagenz. In dieser Arbeit fand zunächst die Isotopenmarkierung für Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS^3 , Abbildung 16A) Anwendung. Dabei wird das Vernetzungsreagenz in einer äquimolaren Mischung der nicht-deutertierten und vierfach deutertierten Variante (D_0/D_4) zugegeben, wodurch jedes Vernetzungsprodukt ein spezifisches Isotopenmuster im Massenspektrum aufweist.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Fokus verstärkt auf vielversprechende und stetig weiterentwickelte Vernetzungsreagenzien gesetzt, welche durch kollisionsinduzierte

Einleitung

Dissoziation im Massenspektrometer spezifisch fragmentieren. Eine bedeutende Anwendung ist eine zentrale Harnstoffgruppe (Abbildung 17, linke Spalte), die in den Vernetzungsreagenzien Disuccimidyl dibutylurea (DSBU, früher BuUrBu)¹³⁷, 1,1-Carbonyldiimidazol (CDI)¹²⁶ und Diallylurea (DAU)¹²⁷ genutzt wird. Während der Fragmentierung brechen die Bindungen zwischen der Carbonylgruppe und den Stickstoffatomen, wodurch charakteristische Bruchstücke (Bu und BuUr) mit einer Massendifferenz von 25,979 u entstehen¹³⁸. Diese Bruchstücke sind als spezifische „Dublett-Signale“ in den Fragmentionenmassenspektren sichtbar und führen zur eindeutigen Identifizierung des Vernetzungsproduktes.

Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die Diazirine bei Ausbildung der Esterbindung (Abbildung 17, rechte Spalte)¹²⁸. Diese kann ebenfalls während der Fragmentierung gespalten werden und zwei spezifische Signale für die beiden Peptide im Fragmentionenmassenspektrum liefern (Pep§ und Pep#).

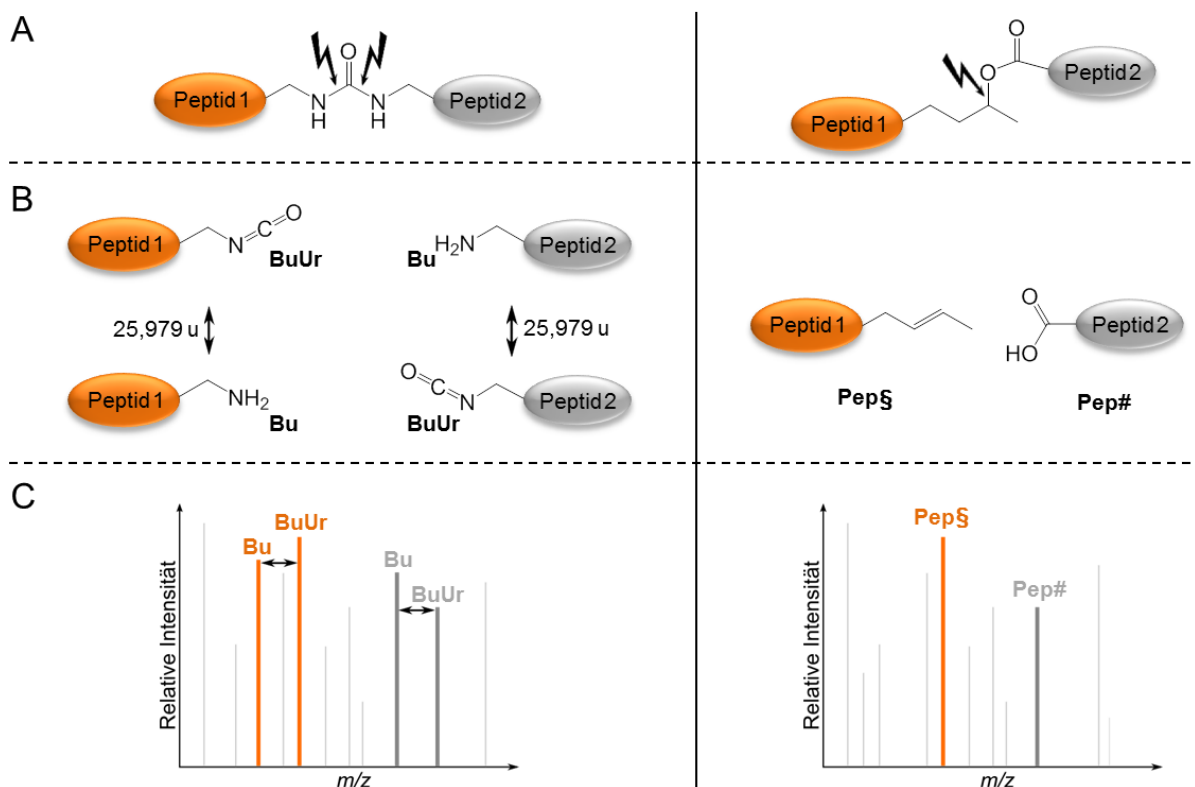


Abbildung 17: MS-Spaltbarkeit von verwendeten Vernetzungsreagenzien. Links: das Vernetzungsreagenz enthält eine spaltbare Harnstoffgruppe, Rechts: die Vernetzung zwischen zwei Peptiden besteht in einer neu gebildeten Esterbindung. (A) Vernetzung von zwei Peptiden, (B) Nomenklatur der spezifischen Fragmente, die aus dem Bruch der Amidbindung oder Esterbindung des Vernetzungsproduktes entstehen und (C) charakteristische Signale in den resultierenden Fragmentionenmassenspektren durch Spaltung der Bindung zwischen den vernetzten Peptiden. Bu/BuUr: verbleibende Fragmente des DSBU-Linkers nach der Spaltung der Harnstoffgruppe des Linkers, Pep§: Photo-Met enthaltendes Peptid, Pep#: durch photo-Met vernetztes Peptid.

1.3.2 Massenspektrometrie intakter Proteine

Die Analyse intakter Proteine und Proteinkomplexe mittels MS gibt Aufschluss über das Vorhandensein von Monomeren oder Oligomeren von einzelnen Proteinen sowie über die Stöchiometrie eines Proteinkomplexes^{139, 140}. Veränderungen der Komplexbildung unter Zugabe von interagierenden Substanzen, wie Inhibitoren oder DNA, können mit dieser Methode analysiert werden^{141, 142}. Die native MS ermöglicht die Analyse der Proteine unter nicht denaturierenden Bedingungen, wodurch ihre natürliche Struktur erhalten bleibt¹⁴³. Sie werden in einer flüchtigen Lösung, z.B. Ammoniumacetat, vorbereitet und aus dieser mittels ESI in die Gasphase überführt. In der Gasphase sind die Wechselwirkungen, welche die Proteinstruktur zusammenhalten, verändert. So sind hydrophobe Wechselwirkungen nahezu vollständig aufgehoben, während elektrostatische Wechselwirkungen verstärkt werden. Deshalb sind Proteinkomplexe, welche nur auf hydrophoben Interaktionen basieren, nicht detektierbar¹⁴⁴.

1.4 Weitere Methoden zur Untersuchung von Proteininteraktionen

1.4.1 Isothermale Titrationskalorimetrie

Mit Hilfe der Isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) werden die Interaktionen von Proteinen nicht strukturell, sondern thermodynamisch charakterisiert. Durch die Titration eines Proteins zu einem Zielprotein werden die thermodynamische Konstante Enthalpie (ΔH), die Gibbs'sche freie Energie (ΔG) sowie die Stöchiometrie (N) und die Affinität der Interaktion bestimmt¹⁴⁵. Ein ITC-Gerät besteht aus einer Messzelle und einer Referenzzelle, wobei in die Messzelle über eine Spritze das interagierende Protein zugeführt wird (Abbildung 18A). Die Temperatur wird in beiden Zellen konstant gehalten. Ändert sich die Temperatur in der Messzelle durch Titration des Analyten wird diese wieder auf den Ausgangswert angepasst. Die verbrauchte Energie für diesen Vorgang wird aufgezeichnet (Abbildung 18B)^{145, 146}.

Die thermodynamischen Konstanten werden über Gleichungen 6 und 7 bestimmt.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (\text{Gleichung 6})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Gleichung 7})$$

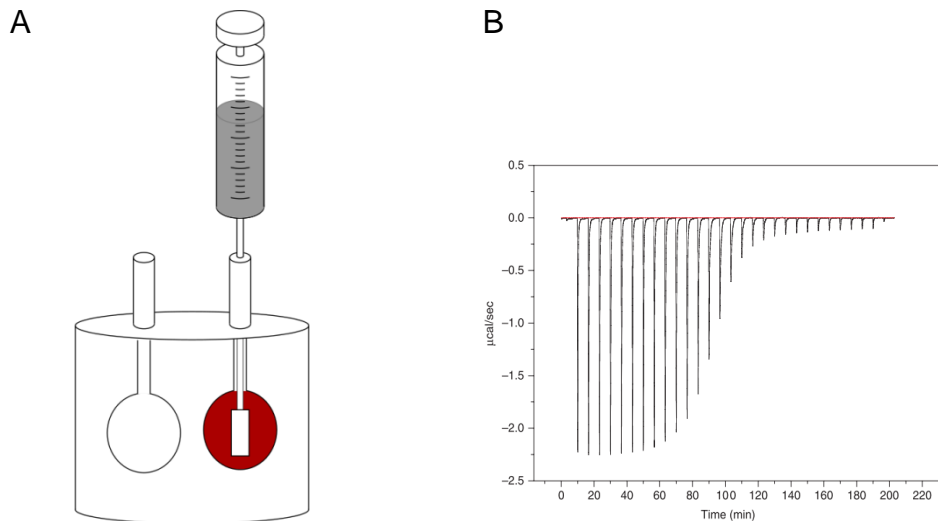


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Isothermalen Titrationskalorimetrie. Schematischer Aufbau eines ITC-Messgerätes. Das Gerät enthält eine Referenz- und eine Messzelle (rot). Der Analyt (grau) wird über eine Spritze injiziert. Ein integrierter Rührstab an der Spritze sorgt für eine homogene Mischung der Analysenlösung in der Messzelle. (B) Diagramm einer ITC-Messung. Modifiziert nach Leavitt und Freire, 2001¹⁴⁵.

1.4.2 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) ermöglicht die Bestimmung der Affinität von Protein-Protein-Interaktionen durch die Reflexion von Licht auf einer Goldoberfläche¹⁴⁷. Durch Einstrahlung des Lichtes in Totalreflektion durch ein Prisma werden Oberflächenplasmonen angeregt und deren Ausbreitungseigenschaften durch Messung des Reflexionswinkels des Lichts ermittelt. Verändert sich die Goldoberfläche, z.B. durch Bindung eines Proteins, ändert sich die Ausbreitung des Oberflächenplasmons und die Reflexion des einfallenden Lichtstrahls.

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wird ein Protein auf einem Gold-Chip immobilisiert, während das interagierende Protein in Lösung über die Oberfläche geleitet wird, um sich an das immobilisierte Protein anzulagern. Dadurch kommt es zur Veränderung der Chipoberfläche und einer daraus resultierenden veränderten Reflexion des Lichtes, welche sich linear zur Anzahl interagierender Moleküle verhält¹⁴⁸.

1.5 Zielstellung

Munc13-Proteine sind essentiell für die Signalweiterleitung zwischen Nervenzellen, wodurch Lern- und Gedächtnisprozesse ermöglicht werden. Neben der Bindung von Calcium⁵⁵ und DAG^{38, 43} an Munc13, ist die Interaktion mit calciumbeladenem CaM^{31, 39-41} ein wichtiger Regulationsmechanismus von Munc13. Die Interaktion findet an CaM-Binderegionen *N*-terminal zur hochkonservierten C1C2MUN-Domäne statt und ist bisher nur begrenzt aufgeklärt. Während Munc13-1 und ubMunc13-2 ein 1-5-8-26-CaM-Bindemotiv aufweisen⁷⁰, konnte dieses nicht in den entsprechenden Regionen in den Isoformen bMunc13-2 und Munc13-3 identifiziert werden. Dafür weisen bMunc13-2 und Munc13-3 im Vergleich zu Munc13-1 und ubMunc13-2 jeweils eine zusätzliche, näher am *N*-Terminus lokalisierte, vermutlich physiologisch nicht relevante CaM-Bindestelle auf. Beide Isoformen, bMunc13-2 und Munc13-3, sind daher für weitere Untersuchungen der Interaktion mit CaM interessant.

Der Fokus wurde in dieser Arbeit auf die für die Signalweiterleitung interessantere Isoform bMunc13-2 gesetzt. Diese zeigte in vorherigen elektrophysiologischen Experimenten eine größere Veränderung der synaptischen Plastizität durch Unterdrückung der Expression als Munc13-3⁵². Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Interaktion mit CaM an der *C*-terminalen CaM-Bindestelle (As 719-742) zu verifizieren und zu charakterisieren, das enthaltende CaM-Bindemotiv detaillierter zu untersuchen und die *N*-terminale CaM-Bindestelle (AS 572-594) in bMunc13-2 zu überprüfen. Dazu sollten verschiedene Segmente von bMunc13-2 aus *Rattus norvegicus*, welche eine oder beide CaM-Bindestellen enthalten, verwendet werden (Abbildung 19). Bisher wurden alle Untersuchungen zu CaM/Munc13-Interaktionen mit Munc13-Proteinen aus *Rattus norvegicus* durchgeführt^{38, 52-54, 70}.

Zur Untersuchung der CaM/bMunc13-2-Interaktion wurden verschiedene Methoden ausgewählt. Zunächst sollte die chemische Vernetzung der Proteine in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) erfolgen, um strukturelle Informationen zu erhalten, welche für eine Modellierung der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 verwendet werden sollten. Der Vorteil dieser Methode liegt hierbei für dieses Proteinsystem in der Anwendbarkeit für



Abbildung 19: bMunc13-2-Segmente. Segment-A (AS 367-780), Segment-B (AS 367-903) und Segment-C (AS 703/704-742).

Einleitung

partiell (intrinsisch) ungeordnete Proteine, was für den *N*-terminalen Bereich von Munc13-Proteinen zutrifft. Unterstützend sollten weitere Untersuchungen für die Bildung des Komplexes zwischen CaM und bMunc13 2 angewendet werden, wobei die Interaktion beider Proteine stöchiometrisch und thermodynamisch charakterisiert werden sollte. Diese umfassen die Analyse intakter Proteine mittels MS, isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) und Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR).

2 Material

2.1 Chemikalien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--------------------------------|
| Aceton | VWR |
| Acetonitril (ACN) | VWR |
| Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 40 % (w/v) | Roth |
| Agarose | Lonza |
| Ameisensäure (FA) | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumbicarbonat | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumchlorid | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumchlorid, ¹⁵ N-markiert | Cambridge Isotope Laboratories |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumsulfat | Roth |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Roth |
| Carbenicillin | Roth |
| Coomassie-Brillantblau G-250 | Roth |
| Coomassie-Brillantblau R-250 | Roth |
| Desoxyadenosintriphosphat (dATP) | Fermentas |
| Desoxycytidintriphosphat (dCTP) | Fermentas |
| Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) | Fermentas |
| Desoxythymidintriphosphat (dTTP) | Fermentas |
| Dikaliumhydrogenphosphat | Roth |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich |
| Dithiothreitol (DTT) | AppliChem |
| Essigsäure | Roth |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich |
| Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA) | Fluka |
| Glutathion, reduziert (GSH) | Roth |
| Glycerol | Roth |

Material

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|-------------------|
| Glycin | Roth |
| Harnstoff | Roth |
| Hefeextrakt | Roth |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES) | Roth |
| Imidazol | Merck |
| Iodacetamid | AppliChem |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Roth |
| Kanamycin | Roth |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Merck |
| β-Mercaptoethanol | Roth |
| Methanol | VWR |
| <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth |
| Natriumchlorid (NaCl) | Grüssing |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth |
| Natriumdesoxycholat | Roth |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Roth |
| ortho-Phosphorsäure | VWR |
| Rotiphorese 10x SDS-PAGE Laufpuffer | Roth |
| Salzsäure (HCl) | Grüssing |
| Super-DHB (90 % Dihydroxybenzoesäure + 10 % 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure) | Sigma-Aldrich |
| Thiamin | Roth |
| Trifluoressigsäure (TFA) | Sigma-Aldrich |
| Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) | Roth |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) | Roth |
| Trypton | Roth |

| Vernetzungsreagenzien | Hersteller |
|---|---|
| Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS ³) | Thermo Fisher Scientific |
| 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) | Carbolution Chemicals GmbH |
| Diallylharnstoff (DAU) | Claudio Iacobucci, MLU Halle-Wittenberg |
| Disuccimidyl dibutylurea (DSBU) | Mathias Schäfer, Universität zu Köln |
| <i>N</i> - γ -Maleimidobutyryloxysulfosuccinimidester (Sulfo-GMBS) | Thermo Fisher Scientific |
| Photo-Methionin | Thermo Fisher Scientific |

2.2 Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|--|--------------------------|
| Falconröhrchen (15 ml, 50 ml) | Greiner bio-one |
| Dialyseknöpfe Slide-A-Lyzer 2 kDa <i>molecular weight cut-off</i> | Thermo Scientific |
| GSTrap FF (1 ml) | GE Healthcare |
| HisTrap FF (1 ml) | GE Healthcare |
| HiTrap Q HP (1 ml) | GE Healthcare |
| Membranfilter, Porengröße 0,2 μ m | Sartorius |
| PEG-Biotin-Sensorchip | Cenibra |
| Phusion-DNA-Polymerase-Puffer (10x) | Thermo Fisher Scientific |
| Spritzen Injekt Solo (20 ml, 10 ml, 5 ml, 3 ml) | B. Braun |
| Spritzenvorsätze Filtropur S 0,2 μ m | Sarstedt |
| Superdex 200pg 16/600 | GE Healthcare |
| Zeba Spin-Entsalzungssäule 0,5 ml, 7 kDa <i>molecular weight cut-off</i> | Thermo Fisher Scientific |
| Zentrifugationsfiltereinheit Amicon Ultra-0,5 0,5 ml, 3 kDa, 10 kDa <i>molecular weight cut-off</i> | Merck Millipore |
| Zentrifugationsfiltereinheit Amicon Ultra-15 15 ml, 10 kDa, 30 kDa <i>molecular weight cut-off</i> | Merck Millipore |
| ZipTip-Entsalzungssäulen C4 Matrix | Merck Millipore |

Komplettpakete

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--------------------------|
| DNA-Marker <i>GeneRuler</i> 1 kb | Thermo Fisher Scientific |
| Fast'n easy Plasmid Prep | Jena Bioscience |
| GelGreen <i>Nucleic Acid Gel Stain</i> | Biotium |
| GeneJet Plasmid Miniprep-Kit | Thermo Fisher Scientific |
| Gradientengele (4-20 % Polyacrylamid) | Bio-Rad |
| Laemmli-Probenpuffer (2-fach) | Bio-Rad |
| Molekulargewichtsstandard <i>PageRuler prestained</i> | Thermo Fisher Scientific |
| Molekulargewichtsstandard <i>Protein Calibration Standard II</i> | Bruker Daltonik |
| Probenpuffer Agarosegel <i>DNA Gel Loading Buffer</i> (6-fach) | Merck |
| Proteaseinhibitor <i>cOmplete</i> (EDTA-frei) | Roche |

2.3 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|--|--------------------------|
| Autoklav VX-75 | Systec |
| Brutschrank ED 53 I | Binder |
| Chromatographiesysteme: ÄKTA Prime plus | GE Healthcare |
| ÄKTA FPLC | GE Healthcare |
| ÄKTA Pure | GE Healthcare |
| Elektrophoresesystem Minigel-PROTEAN Tetra | Bio-Rad |
| Geldokumentationssystem Gel Doc XR | Bio-Rad |
| Gewebehomogenisator | Wheaton |
| Horizontales Elektrophoresesystem Kuro Gel MiniPlus 10 Electrophoresis Horizontal | VWR |
| MicroCal VP-ITC System | MicroCal Inc |
| MP-SPR Navi 200 OTSO | BioNavis |
| NanoDrop 2000c | Thermo Fisher Scientific |

| Gerät | Hersteller |
|---|---|
| Rotoren JLA 8.1000, JLA 16.250, Type 45 Ti, Type 90 Ti | Beckman |
| Spektrophotometer NanoVue Plus | GE Healthcare |
| Spektrophotometer Ultrospec 1100 pro | Amersham Biosciences |
| Spektrophotometer Ultrospec 2000 | Pharmacia Biotech |
| Trockenschrank T6030 | HERAEUS |
| SpeedVac Concentrator Savant SPD1010 | Thermo Fisher Scientific |
| Ultraschall Vibra Cell™ 75185 | Bioblock Scientific |
| Ultrazentrifuge Beckman LE-80K | Beckman Coulter |
| UV-Bestrahlungskammer | Hans-Hermann Rüttinger, MLU Halle-Wittenberg |
| Wasseraufbereitungssystem GenPure xCAD UV | TKA |

Massenspektrometrie

| Geräte und Zubehör | Hersteller |
|---|---|
| Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie (HPLC): | Ultimate 3000 RSLC Nano-System Thermo Fisher Scientific |
| | HPLC-Vorsäule Acclaim PepMap, C8, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å Thermo Fisher Scientific |
| | HPLC-Vorsäule Acclaim PepMap, C18, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å Thermo Fisher Scientific |
| | HPLC-Trennsäule Acclaim PepMap, C18, nano-Viper, 75 µm x 250 mm, 2 µm, 100 Å Thermo Fisher Scientific |
| | HPLC-Trennsäule Easy Spray, C18 Thermo Fisher Scientific |
| Säulenherstellung: | Leere Chromatographiesäule Picofrit <i>self-pack</i> , 360 µm OD, 75 µm ID, Spitzendurchmesser 15 µm New Objective |
| | Packmaterial: Reprosil-Pur 120 C18- AQ, 1,9 µm Dr. Maisch |
| | Nanobaume <i>Capillary Column Packer</i> MS Wil |

| Geräte und Zubehör | | Hersteller |
|------------------------------|--|-----------------------------|
| Spraynadeln und Herstellung: | Borosilkat Glaskapillaren Kwik-Fil (1,2 mm/0,68 mm OD/ID) mit Filament | World Precision Instruments |
| | P-1000 Micropipette Puller | Sutter Instruments |
| | Scancoat Six | HHV |
| Massenspektrometer: | <i>High-Mass</i> Q-TOF 2-Massenspektrometer | Micromass/MS Vision |
| | Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer mit Nano-ESI-Quelle Nanospray Flex | Thermo Fisher Scientific |
| | Orbitrap Q Exactive Plus-Massenspektrometer mit Nano-ESI-Quelle Nanospray Flex | Thermo Fisher Scientific |
| | Ultraflex III MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer | Bruker Daltonik, Bremen |

2.4 Bakterienstämme

| Bakterienstamm | Genotyp | Resistenz | Referenz/Herkunft |
|-----------------------------|--|-------------------------------------|----------------------------------|
| DH5 α | <i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> | - | Meselson und Yuan ¹⁴⁹ |
| BL21(DE3) | <i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT</i> <i>gal</i> (λ <i>sBamHI</i> Δ <i>EcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)</i> <i>i21</i> Δ <i>nin5</i>) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> | - | Invitrogen |
| BL21(DE3)c ⁺ RIL | <i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_{B-}</i> <i>m_{B-}</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cam ^r] | Chlor- amphenicol Tetracyclin | Invitrogen |

2.5 Plasmide und Primer

| Plasmid | Herkunft |
|--------------------------------------|---|
| pGEX-4T-1-bMunc13-2(367-780) | Noa Lipstein-Thoms, MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen |
| pGEX-4T-1-bMunc13-2(367-780)V709D | Diese Arbeit |
| pGEX-4T-1-bMunc13-2(367-780)I714D | Diese Arbeit |
| pGEX-4T-1-bMunc13-2(367-780)F723D | Diese Arbeit |
| pGEX-4T-1-bMunc13-2(367-903) | Noa Lipstein-Thoms, MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen |
| pET28a-Calmodulin-(His) ₆ | Olaf Jahn, MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen |

| Primer | DNA-Sequenz (5' → 3') | Herkunft |
|---------------|-------------------------------|----------|
| V709D_forward | GTCCTTAGAACAAGACTGTGCCGAAACC | Seqlab |
| V709D_reverse | GGTTTCGGCACAGTCTTGTCTAAGGAC | Seqlab |
| I714D_forward | CTGTGCCGAAACCGATTATCTCAACAAG | Seqlab |
| I714D_reverse | CTTGTTGAGATAATCGGTTTCGGCACAG | Seqlab |
| F723D_forward | GTGCATTAACAACGACAAGAATGTGCTTC | Seqlab |
| F723D_reverse | GAAGCACATTCTTGTCGTTGTTAATGCAC | Seqlab |

2.6 Proteine, Enzyme und Peptide

| Protein/Protease | Hersteller |
|--|---------------------|
| Asp-N, rekonstituiert in 20 mM NH ₄ CO ₃ -Lösung | Promega |
| β-Lactoglobulin | Sigma Aldrich |
| Benzonase | Sigma Aldrich |
| Calmodulin (aus Rinderhirn), rekonstituiert in 20 mM HEPES, pH 7,2 | Athens Research |
| Glu-C, 0,5 µg/ml Aliquots in 20 mM NH ₄ CO ₃ -Lösung | Promega |
| Humanalbumin | Sigma Aldrich |
| Ovalbumin | Sigma Aldrich |
| Phusion DNA-Polymerase | New England Biolabs |
| Streptavidin | Promega |

| Protein/Protease | Hersteller |
|---|---------------|
| Thrombin | Merck |
| Trypsin (<i>sequencing grade</i>), 0,5 µg/ml Aliquots in 1 mM HCl | Promega |
| Trypsininhibitor | Sigma Aldrich |

| bMunc13-2 | Aminosäuresequenz | Herkunft |
|--------------------|--|--|
| Segment-C | ⁷⁰³ KLSLEQVCAETIYLNKCINNFKNVLRQKLLQELV ₇₄₂ | Olaf Jahn, MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen |
| Segment-C V709D | ⁷⁰³ KLSLEQDCAETIYLNKCINNFKNVLRQKLLQELV ₇₄₂ | |
| Segment-C I714D | ⁷⁰³ KLSLEQVCAETDYLNKCINNFKNVLRQKLLQELV ₇₄₂ | |
| Segment-C F723D | ⁷⁰³ KLSLEQVCAETIYLNKCINNDKNVLRQKLLQELV ₇₄₂ | |

2.7 Software

| Software | Hersteller/ Entwickler | Anwendung |
|--|---|--|
| ChemDraw | Perkin Elmer Informatics Inc. | Erstellen chemischer Formeln |
| Chromleon | Thermo Fisher Scientific | Steuerung der HPLC |
| Circos ¹⁵⁰ | Martin Krzywinski | Erstellen von zirkulären Plots |
| Clustal Omega | https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ | Vergleich von Aminosäuresequenzen |
| GENtle 1.9.4 | Magnus Manske | Analyse und Visualisierung von DNA-Sequenzen |
| Inkscape | www.inkscape.org | Erstellen von Grafiken |
| MaxChelator | Chris Patton (http://maxchelator.stanford.edu/CaEGTA-TS.htm) | Berechnung der freien Calciumkonzentrationen |
| MeroX ¹¹⁸ 1.4.12 bis 1.6.6.6 | Michael Götze (MLU Halle-Wittenberg) | Analyse von vernetzten Peptiden |
| MP-SPR Navi Control 4.3.3 | BioNavis | Steuerung des SPR-Gerätes |
| MP-SPR Navi Data Viewer 4.3.3 | BioNavis | Extraktion der SPR-Daten |

| Software | Hersteller/ Entwickler | Anwendung |
|--|---|--|
| Orbitrap Fusion Tune | Thermo Fisher Scientific | Steuerung des Orbitrap Fusion Tribid-Massenspektrometers |
| Q Exactive Plus Tune | Thermo Fisher Scientific | Steuerung des Q Exactive Plus-Massenspektrometers |
| Origin 2016G | OriginLab Corporation | Visualisierung von Messdaten |
| Proteome Discoverer 1.4 und 2.0 | Thermo Fisher Scientific | Datenbanksuche |
| ProtParam | https://web.expasy.org/protparam/ | Berechnung von Extinktionskoeffizienten |
| PsiPred ¹⁵¹ | Daniel Buchan and David T. Jones | Vorhersage von Proteinsekundärstrukturen |
| Pymol | DeLano Scientific | Visualisierung von Proteinstrukturen |
| Quantity One | Bio-Rad | Dokumentation von SDS-Gelen |
| ROSETTA 2015.31.58019 und 2016.32.58837 | David Baker | Modellierung von Proteinstrukturen |
| SnapGene | GSL Biotech | Analyse und Visualisierung von DNA-Sequenzen |
| StavroX ¹¹⁷ 1.5.1.bis 3.6.0.1 | Michael Götze, MLU Halle-Wittenberg | Analyse von vernetzten Peptiden |
| UNICORN | GE Healthcare | Steuerung der ÄKTA-Chromatographiesysteme |
| TraceDrawer 1.8 | ridgeview | Analyse von SPR-Daten |
| VPViewer | Malvern | Steuerung des ITC-Gerätes |
| Xcalibur 4.0.27.13 | Thermo Fisher Scientific | Steuerung von Massenspektrometern und HPLC-Systemen Visualisierung und Auswertung von massenspektrometrischen Daten |

2.8 Kulturmedien und Zusätze

Die Herstellung der Medien und Zusätze erfolgte mit MilliQ-H₂O.

| | |
|--|--|
| LB-Medium ¹⁵² | 0,5 % (w/v) Hefeextrakt |
| | 1,0 % (w/v) Trypton |
| | 0,5 % (w/v) NaCl |
| Agar-Agar-Kulturplatten | 0,5 % (w/v) Hefeextrakt |
| | 1,0 % (w/v) Trypton |
| | 0,5 % (w/v) NaCl |
| | 1,5 % (w/v) Agar-Agar |
| TB-Medium | 1,2 % (w/v) Trypton |
| | 2,4 % (w/v) Hefeextrakt |
| | 0,4 % (v/v) Glycerol |
| Nach Autoklavieren zugeben | 10 % (v/v) Kaliumphosphatpuffer |
| Kaliumphosphatpuffer | 0,17 M KH ₂ PO ₄ |
| | 0,72 M K ₂ HPO ₄ |
| Mineralsalzmedium | 84 mM K ₂ HPO ₄ |
| | 26,1 mM NaH ₂ PO ₄ |
| | 14,1 mM Na ₂ SO ₄ |
| | 55 mM NH ₄ Cl |
| Nach Autoklavieren zugeben | 1 ml/l Spurenelementelösung |
| | 5 mM 1M MgSO ₄ |
| | 0,8 % (w/v) Glukose |
| | 0,3 mM Thiamin (sterilfiltriert) |
| Spurenelementelösung | 80,6 mM Na ₂ -EDTA |
| | 92,5 mM FeCl ₃ x 6 H ₂ O |
| | 102 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O |
| | 2,15 mM CoCl ₂ x 6 H ₂ O |
| | 1,56 mM ZnSO ₄ x 7 H ₂ O |
| | 13,5 mM CuSO ₄ x 5 H ₂ O |
| | 10,6 mM MnSO ₄ x H ₂ O |
| MgCl ₂ /CaCl ₂ -Lösung | 80 mM MgCl ₂ |
| | 20 mM CaCl ₂ |
| CaCl ₂ /Glycerol-Lösung | 0,1 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O |
| | 15 % (v/v) Glycerol |

| | |
|------------|-------------------------|
| SOC-Medium | 2 % (w/v) Trypton |
| | 0,5 % (w/v) Hefeextrakt |
| | 0,05 % (w/v) NaCl |
| | 2,5 mM KCl |
| | 10 mM MgCl ₂ |
| | 20 mM Glukose |

Antibiotika

Kanamycin 30 mg/ml in H₂O sterilfiltriert

Carbenicillin 100 mg/ml in H₂O sterilfiltriert

2.9 Puffer und Lösungen

Die pH-Werte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur eingestellt. Die Herstellung der Lösungen erfolgte mit MilliQ-H₂O.

Agarosegelelektrophorese

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Agarosegel-Probenpuffer | 10 mM TRIS, pH 7,6 |
| <i>DNA Gel Loading Buffer</i> | 0,03 % (w/v) Bromphenolblau |
| | 0,03 % (w/v) Xylencyanol |
| | 60 % (w/v) Glycerin |
| | 60 mM EDTA |
| TAE-Puffer, 50-fach konzentriert | 2 M TRIS, pH 8,5 |
| | 1 M Essigsäure |
| | 0,05 M EDTA |

Proteinreinigung

bMunc13-2

| | |
|---------------|---------------------------|
| GST-Puffer I | 40 mM TRIS, pH 7,4 (6 °C) |
| | 300 mM NaCl |
| | 2 mM EDTA |
| | 0,5 mM TCEP |
| GST-Puffer II | 40 mM TRIS, pH 8 (6 °C) |
| | 300 mM NaCl |
| | 2 mM EDTA |
| | 0,5 mM TCEP |
| | 30 mM GSH |

Material

| | |
|---------------|--|
| IEX-Puffer I | 40 mM TRIS, pH 7,0 (6 °C) 0,5 mM TCEP |
| IEX-Puffer II | 40 mM TRIS, pH 7,0 (6 °C) 1000 mM NaCl 0,5 mM TCEP |
| Lagerpuffer | 20 mM HEPES, pH 7,2 (25 °C) 300 mM NaCl 0,5 mM TCEP 10 % (v/v) Glycerol |

Calmodulin

| | |
|----------------|---|
| IMAC-Puffer I | 20 mM HEPES, pH 7,2 (25 °C) 500 mM NaCl 20 mM Imidazol |
| IMAC-Puffer II | 20 mM HEPES, pH 7,2 (25 °C) 500 mM NaCl 500 mM Imidazol |
| SEC-Puffer | 20 mM HEPES, pH 7,2 (25 °C) 150 mM NaCl |

Polyacrylamidgelelektrophorese

| | |
|----------------------------------|---|
| Laemmli-Probenpuffer | 62,5 mM TRIS, pH 6,8 25 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Bromphenolblau |
| vor Gebrauch frisch dazugeben | 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol |
| Native PAGE-Probenpuffer | 62,5 mM TRIS, pH 6,8 40 % (v/v) Glycerin 0,01 % (w/v) Bromphenolblau |
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung | 40 % (w/v) |
| Ammoniumperoxosulfat-Lösung | 10 % (w/v) |
| Trenngelpuffer | 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8 |
| Sammelgelpuffer | 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8 |
| Laufpuffer native PAGE (10-fach) | 0,25 M TRIS 1,92 M Glycin |
| SDS-Lösung | 10 % (w/v) |

| | | |
|------------------------------|------|---|
| Coomassie-Färbelösung | 1 % | (v/v) Essigsäure |
| | 40 % | (v/v) Methanol |
| | 1 % | (w/v) Coomassie-Brillantblau R250 |
| Entfärbelösung | 10 % | (v/v) Essigsäure |
| | 25 % | (v/v) Methanol |
| Fixierlösung | 10 % | (v/v) Essigsäure |
| | 40 % | (v/v) Methanol |
| Färbelösung A ¹⁵³ | 5 % | (w/v) Coomassie-Brillantblau G250 |
| Färbelösung B ¹⁵³ | 2 % | (v/v) ortho-Phosphorsäure |
| | 10 % | (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ |

Enzymatische Proteinspaltung im Gel

| | | |
|--------------------------|---------|---------------------------------|
| Ammoniumbicarbonatlösung | 100 mM | NH ₄ CO ₃ |
| Dithiothreitol | 10 mM | in Ammoniumbicarbonatlösung |
| Iodacetamid | 55 mM | in Ammoniumbicarbonatlösung |
| Extraktionslösung | 1,67 % | (v/v) TFA |
| | 66,67 % | (v/v) ACN |

Enzymatische Proteinspaltung in Lösung

| | | |
|--|--------|---------------------------------|
| Harnstoff/ NH ₄ CO ₃ -Lösung | 8 M | Harnstoff |
| | 400 mM | NH ₄ CO ₃ |
| Natriumdesoxycholat | 10 % | (w/v) |
| Dithiothreitol | 40 mM | in H ₂ O |
| Ioadacetamid | 100 mM | in H ₂ O |
| TFA | 10 % | (v/v) |

Massenspektrometrie

| | | |
|----------------|--------|-----------|
| Transferlösung | 0,1 % | (v/v) TFA |
| Fließmittel I | 0,1 % | (v/v) FA |
| Fließmittel II | 80 % | (v/v) ACN |
| | 0,08 % | (v/v) FA |

Material

Isothermale Titrationskalorimetrie/ Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

| | |
|----------------|-----------------------------|
| ITC/SPR-Puffer | 20 mM HEPES, pH 7,2 (25 °C) |
| | 230 mM NaCl |
| | 0,5 mM TCEP |

Stammlösungen

| | |
|---------------------------|-----------------------------|
| CaCl ₂ -Lösung | 200 mM CaCl ₂ |
| EGTA | 200 mM EGTA, pH 7,2 (25 °C) |

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Stammhaltung

E. coli-Stämme wurden für einen kurzen Zeitraum auf selektiven Agarplatten im Kühlschrank gelagert. Die Lagerung für mehrere Monate erfolgte in Glycerol-Kryostocks. Zur Herstellung wurden die entsprechenden *E. coli*-Zellen in 30 ml LB-Medium angezogen, bis sie eine OD_{600nm} von 1 erreicht hatten. Anschließend wurden sie pelletiert, in 1000 μ l LB-Medium, versetzt mit 15% Glycerol, resuspendiert und zu je 250 μ l aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

3.1.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemokompetenter Zellen erfolgte nach einem etablierten Protokoll¹⁵². *E. coli*-Zellen wurden in 100 ml LB-Medium bei $37^{\circ}C$ bis zu einer OD_{600nm} von 0,35 inkubiert. Anschließend wurden sie sofort auf Eis gekühlt, in vorgekühlte 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 5000 Upm sedimentiert. Das LB-Medium wurde abgenommen und jedes Zellpellet in 30 ml eiskalter $MgCl_2/CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach dem Sedimentieren der Zellen (10 min, 5000 Upm) erfolgten ein erneuter Waschschrift mit $MgCl_2/CaCl_2$ -Lösung und die vollständige Abnahme des Überstandes. Die pelletierten Zellen wurden in jeweils 2 ml $CaCl_2$ /Glycerol-Lösung aufgenommen, in 100 μ l Aliquots aufgeteilt und bei $-80^{\circ}C$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.3 Transformation mit chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Die Transformation von Plasmiden erfolgte mit chemokompetenten *E. coli*-Zellen. Eine 100 μ l-Kryokultur wurde auf Eis aufgetaut, sofort mit 3-10 μ l Plasmid versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei $42^{\circ}C$ für 90 s, gefolgt von der Zugabe von 400 μ l vorgewärmtem SOC-Medium. Nach 90-minütiger Inkubation bei $37^{\circ}C$ und 450 Upm wurde die Kultur auf selektive Agarplatten ausgestrichen.

3.1.4 Plasmidpräparation

E. coli-Zellen (DH5 α , BL21(DE3) oder BL21(DE3)^cRIL) für die Plasmidpräparation wurden in 5 ml LB-Medium über Nacht bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Nach Pelletieren der *E. coli*-Zellen bei 13.000 x g für 5 min wurden die Plasmide nach dem Protokoll des entsprechenden

Methoden

Plasmidisolationskits aus den *E. coli*-Zellen isoliert. Die Konzentration der erhaltenen DNA-Lösungen wurde mittels UV-Spektroskopie (NanoDrop) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Die DNA-Konstrukte wurden sequenziert (Seqlab). Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit den Computerprogrammen GENTle und SnapGene.

3.1.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Zum Austausch von Nukleotiden in der Plasmidsequenz erfolgte eine ortsgerichtete Mutagenese mit komplementären Primern (Kapitel 2.5). Die gewünschte Mutation wurde dabei zentral in die Primer eingefügt. Die Vorbereitung der Reaktionsansätze erfolgte auf Eis nach dem in Tabelle 3 angegebenen Schema.

Tabelle 3: Reaktionsansatz der ortsgerichteten Mutagenese

| Komponente | Konzentration der Stammlösung | Konzentration im Ansatz |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Plasmid | 260 ng/μl | 2,6 ng/μl |
| Phusion-DNA-Polymerase-Puffer | 5-fach | einfach |
| dNTPs | 10 mM | 200 μM |
| Primer forward pASK-IBA3plus | 10 μM | 0,5 μM |
| Primer reverse pASK-IBA3plus | 10 μM | 0,5 μM |
| Phusion-DNA-Polymerase | 2 U/μl | 0,02 U/μl |
| MilliQ-H ₂ O | – | ad 50 μl |

Anschließend wurde die Mutagenese wie folgt durchgeführt:

| | Mutation V709D | | Mutationen I714D / F723D | | |
|------------------------|----------------|-------|--------------------------|-------|-------------|
| Initiale Denaturierung | 98 °C | 5 min | 98 °C | 5 min | |
| Denaturierung | 98 °C | 45 s | 98 °C | 45 s | } 30 Zyklen |
| Hybridisierung | 71 °C | 30 s | 60 °C | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 5 min | 72 °C | 5 min | |
| Finale Elongation | 72 °C | 5 min | 72 °C | 5 min | |
| Lagerung | 6 °C | 5 min | 6 °C | 5 min | |

Zur Kontrolle wurden die Mutageneseansätze mittels eines 1 %-igen Agarosegel analysiert.

3.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von Plasmid-DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. 1 g Agarose wurde in 100 ml TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst, mit 5 µl GelGreen-Farbstoff versetzt und in die Agarosegelapparatur gegossen. 5 µl DNA-Lösung wurden mit 1 µl Agarosegel-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des ausgekühlten Agarosegels überführt. Die Gelelektrophorese erfolgte für 90 min bei 120 V und die anschließende Visualisierung und Analyse der DNA unter UV-Licht bei 302 nm.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Expression der bMunc13-2-Fusionsproteine

Die rekombinanten Fusionsproteine GST-bMunc13-2-Segment-A, GST-bMunc13-2-Segment-A-V709D, GST-bMunc13-2-Segment-A-I714D, GST-bMunc13-2-Segment-A-F723D und GST-bMunc13-2-Segment-B (Nomenklatur siehe Abbildung 19, Seite 29) wurden mit Hilfe des *E. coli*-Stammes BL21(DE3)^cRIL hergestellt. Dazu wurde das entsprechende Plasmid in den *E. coli*-Stamm transformiert und die Zellen als Kryostocks bei -80 °C gelagert. Die Kultivierung für die Expression erfolgte in TB-Medium. Zunächst wurden 100 ml TB-Medium mit den *E. coli*-Zellen aus einer Kryokultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 l TB-Medium mit dem entsprechenden Volumen der Zellen der Übernachtskultur versetzt, um eine OD_{600nm} von 0,1 zu erhalten. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, bis eine OD_{600nm} von 0,4 erreicht wurde. Anschließend wurde die Kultur auf 18 °C gekühlt und bei einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 die Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG induziert. Das weitere Wachstum der Zellen und die Expression der Proteine erfolgten bei 18 °C über Nacht. Die Zellen wurden pelletiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2 Einbau von Photo-Methionin in Calmodulin

Zur Expression des CaM wurde ein pET28a-Plasmid verwendet, welches für einen Hexahistidin-*tag* kodiert. Das für das Fusionsprotein CaM-(His)₆ codierende Plasmid wurde in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert und die Zellen in Kryostocks gelagert. Die Kultivierung für die Expression des CaM erfolgte in Mineralsalzmedium, wofür Kryostocks mit Mineralsalzmedium hergestellt wurden (analog zu 3.1.1). Zunächst wurden 30 ml Mineralsalzmedium mit Zellen aus einem Kryostock versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 l Mineralsalzmedium auf eine OD_{600nm} von 0,1 mit der

Methoden

Vorkultur inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 wurde der Erlenmeyerkolben zur Unterbindung der vorzeitigen Aktivierung des Photo-Methionins mit Aluminiumfolie abgedunkelt, 30 mg Photo-Met pro Liter Medium hinzugegeben und die Expression des CaM-(His)₆-Fusionsproteins mit 0,1 mM IPTG induziert. Anschließend erfolgte die weitere Inkubation bei 37 °C für ein bis 19 Stunden. Nach der Inkubation wurden die Zellen pelletiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3 Proteinreinigung

Die Isolation der verwendeten Proteine aus *E. coli*-Zellysaten erfolgte mit Hilfe der ÄKTA-Chromatographiesysteme (ÄKTA Prime Plus, FPLC und Pure).

3.2.3.1 *bMunc13-2-Segment-A und Varianten*

Zur Reinigung des Fusionsproteins GST-Segment-A (AS 367-780) und GST-Segment-A-Varianten (V709D, I714D und F723D) aus den *E. coli*-Zellen (Kapitel 3.2.1) wurden ~4 g Zellen in 40 ml mit Proteaseinhibitor versetztem GST-Puffer I resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschall (6 x 30 s auf Eis bei einer Amplitude von 15-20%) aufgeschlossen. Anschließend wurde 1 µl Benzonase zugegeben, wodurch DNA und RNA während der Inkubation (30 min auf Eis) abgebaut wurden. Die Entfernung unlöslicher Proteine und Zellbestandteile erfolgte mit einem Zentrifugationsschritt bei 35000 x g für 45 min. Der das Fusionsprotein enthaltende Überstand wurde über zwei gekoppelte 1 ml-GSTrapFF-Affinitätschromatographiesäulen mit einer Flussrate von 0,3 ml/min geleitet, so dass das Fusionsprotein daran binden konnte. Nach Waschen der Chromatographiesäulen mit 10-15 ml GST-Puffer I wurde das Fusionsprotein mit GST-Puffer II in 1 ml-Fraktionen eluiert. Anschließend wurden die entsprechenden Fusionsprotein-enthaltenden Fraktionen vereint und mit 0,08 mg Thrombin je ml Proteinlösung versetzt, wodurch die Abspaltung des GST-tags erreicht wurde. Nach Inkubation über Nacht bei 6 °C, erfolgte ein Pufferaustausch gegen GST-Puffer I, wobei GSH aus der Lösung entfernt wurde. Die Abtrennung des GST-tags erfolgte über erneute Bindung des GSTs an die zwei GSTrapFF-Chromatographiesäulen (Flussrate 0,3 ml/min), wobei das Segment-A nicht interagiert und sich im Durchfluss befand. Für die Abtrennung weiterer Verunreinigungen wurde ein Pufferaustausch in IEX-Puffer I durchgeführt, wobei die Salzkonzentration für die folgende Ionenaustauschchromatographie verringert wurde. Die Segment-A-enthaltende Proteinlösung wurde anschließend über eine 1 ml-HiTrap Q HP-Anionenaustauschchromatographiesäule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min geleitet. Die Elution erfolgte mit IEX-Puffer II (Stufengradient: 5 % Schritte bis 35 %, 50 % und 100 %). Die Konzentration an IEX-Puffer II wurde erhöht, wenn die Leitfähigkeit

konstant und die Absorption bei 280 nm die Basislinie erreicht hatte. Die Segment-A enthaltenden Fraktionen wurden vereint und ein Pufferaustausch in Lagerpuffer durchgeführt. Das gereinigte Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

3.2.3.2 *bMunc13-2-Segment-B*

Die Reinigung des Fusionsproteins GST-bMunc13-2-Segment-B erfolgte zunächst analog zu Kapitel 3.2.3.1 bis zur ersten chromatographischen Trennung mit Hilfe der Affinitätschromatographie (2 x 1ml GSTrap FF). Die Reihenfolge der darauf folgenden Reinigungsschritte wurde verändert. Zunächst erfolgte die Abtrennung des GST-Segment-B von *E. coli*-Proteinen über eine 1 ml HiTrap Q HP-Anionenaustauschchromatographiesäule und anschließend die Abspaltung des GST-tags durch Thrombin. Nach Inkubation über Nacht bei 6°C erfolgte die Abtrennung des GST-tags über eine weitere GST-Affinitätschromatographie. Die Lagerung von Segment-B erfolgte wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben.

3.2.3.3 *Photo-Met-markiertes CaM*

Die Reinigung des CaM-(His)₆-Fusionsproteins erfolgte unter Lichtausschluss, um eine vorzeitige Aktivierung des Photo-Met zu unterbinden. Zunächst wurden die CaM-(His)₆ enthaltenden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit IMAC-Puffer I, versetzt mit Proteaseinhibitor, resuspendiert (1 ml pro 0,1 g Zellmasse) und mittels Ultraschall (6 x 30 s auf Eis bei einer Amplitude von 15-20%) aufgeschlossen. DNA und RNA wurden durch Zugabe von 1 µl Benzonase und Inkubation für 30 min auf Eis abgebaut. Anschließend erfolgte die Abtrennung der unlöslichen Zellkomponenten und Proteine mittels Zentrifugation bei 35000 x g für 45 min. Für die chromatographische Trennung wurde auf eine UV-Detektion verzichtet und alle Fraktionen mittels SDS-PAGE überprüft. Die lösliche Proteinfraction wurde mittels Nickel-Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC, 1 ml HisTrapFF-Chromatographiesäule) mit einer Flussrate von 0,3 ml/min aufgetrennt. Nach dem Waschen der Chromatographiesäule mit fünf Säulenvolumina IMAC-Puffer I erfolgte die Elution des Fusionsproteins mit IMAC-Puffer II in 0,5 ml-Fractionen. Die Elutionsfraktionen wurden vereint und auf ein Volumen von 2 ml reduziert. Nun erfolgte die weitere Trennung des CaM-(His)₆-Fusionsproteins von verbleibenden Kontaminanten und ein paralleler Pufferaustausch in SEC-Puffer durch eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 16/60-Chromatographiesäule bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. CaM-enthaltende Fraktionen wurden vereint und das Volumen auf 100-500 µl mit

Methoden

Amicon-Zentrifugationseinheiten (10 kDa *cut-off*) reduziert. Das gereinigte, Photo-Met-enthaltende CaM wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Pufferaustausch

Für den Austausch von Puffern wurden Amicon-Zentrifugationseinheiten verwendet. Diese wurden entsprechend des Volumens der Proteinlösung und des Molekulargewichts des Proteins ausgewählt. Die Zentrifugation mit 0,5 ml-Einheiten erfolgte bei 14 000 x g für 15-20 min pro Schritt, für die 15 ml-Einheiten bei 5000 x g für 15-20 min. Für einen effektiven Austausch des Puffers wurde das Volumen der Proteinlösung reduziert und anschließend 1:10 (v/v) mit dem frischem Puffer verdünnt. Dieser Schritt wurde sechsfach wiederholt, so dass ein ausreichender Pufferaustausch gewährleistet war.

3.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 280 nm. Durch die Verwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes (Gleichung 8) konnte die Konzentration berechnet werden.

$$A = \epsilon_{280 \text{ nm}} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gleichung 8})$$

A - Extinktion bei 280 nm

ϵ_{λ} - molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

c - Konzentration der Proteinlösung [mol l^{-1}]

d - Schichtdicke [cm]

Die molaren Extinktionskoeffizienten (Tabelle 4) wurden anhand der enthaltenen Tryptophane, Tyrosine und Cysteine der Proteine ermittelt.

Tabelle 4: Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine

| Protein | Molarer Extinktionskoeffizient [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$] (reduzierte Cysteine) |
|---------------------|---|
| Calmodulin | 2980 |
| bMunc13-2-Segment-A | 12490 |
| bMunc13-2-Segment-B | 30940 |
| bMunc13-2-Segment-C | 1490 |

3.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse und Visualisierung von Proteinen erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dafür wurden Gele anhand des in Tabelle 5 beschriebenen Schemas hergestellt oder Gradientengele (4-20 % (w/v) Acrylamid) eingesetzt. Zu analysierende Proteinlösungen wurden 1:1 (v/v) mit Laemmli-Probenpuffer (supplementiert mit 5 % β -Mercaptoethanol) versetzt und bei 95 °C für 5-10 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen überführt und die SDS-PAGE 50 min bei 180-200 V durchgeführt. Die Färbung der Gele erfolgte mit nachfolgend beschriebenen Färbemethoden.

Tabelle 5: Pipettierschema für Gele der SDS-PAGE. Angaben in μ l.

| | Trenngel | | | Sammelgel |
|---|----------|------|------|-----------|
| | 10 % | 12 % | 15 % | 5 % |
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 37,5:1 40 % (w/v) | 5000 | 6000 | 7500 | 1300 |
| 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8 | 5000 | 5000 | 7180 | – |
| 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8 | – | – | – | 2500 |
| H ₂ O | 9680 | 8680 | 7180 | 6000 |
| 10 % (w/v) SDS | 200 | 200 | 200 | 100 |
| 10 % (w/v) APS | 100 | 100 | 100 | 50 |
| TEMED | 20 | 20 | 20 | 20 |

Coomassie-Färbung

Zur Färbung wurde das Gel direkt in die Coomassie-Färbelösung gegeben. Nach Schwenken für 30 min bis 4 h wurde die Färbelösung verworfen, das Gel mit H₂O gespült, in Entfärbelösung überführt und geschwenkt, bis der Gelhintergrund entfärbt war. Abschließend erfolgte die Lagerung in MilliQ-H₂O.

Kolloidale Coomassie (*BlueSilver*)-Färbung

Die Färbelösung wurde aus 0,5 ml Färbelösung A und 24,5 ml Färbelösung B frisch hergestellt und bis zum Gebrauch 2-4 h geschwenkt. Das Gel wurde zunächst mit H₂O gespült, um verbleibenden SDS-PAGE-Laufpuffer zu entfernen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Proteine im Gel durch Schwenken des Gels in Fixierlösung für 30-60 min. Nach Entfernen der Fixierlösung wurde das Gel erneut gründlich mit H₂O gewaschen und die frisch hergestellte Färbelösung dazugegeben. Die vollständige Färbung erfolgte über Nacht unter

Schwenken. Proteine wurden eindeutig sichtbar durch Schwenken des Gels in H₂O für 0,5-24 h, wodurch die Farbe aus dem Gelhintergrund entfernt wurde.

3.2.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurde eine native PAGE durchgeführt. Hierfür wurden Gele nach den Angaben in Tabelle 5 hergestellt, wobei SDS durch MilliQ-Wasser ersetzt wurde. Die Proteinlösungen wurden mit nativem Probenpuffer im Verhältnis 1:1 (v/v) versetzt und direkt in die Geltaschen überführt. Die Elektrophorese und Färbung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben.

Der Molekulargewichtsstandard wurde für die native PAGE frisch nach Tabelle 6 hergestellt.

Tabelle 6: Schema für Molekulargewichtsstandard für native PAGE

| Komponente | Molekulargewicht (kDa) | Konzentration der Stammlösung in MilliQ-H ₂ O | Endkonzentration | Benötigtes Volumen für 30 µl |
|--------------------------|------------------------|--|------------------|------------------------------|
| β-Lactoglobulin | 18,4 | 500 µM | 30 µM | 1,8 µl |
| Trypsininhibitor | 24,0 | 250 µM | 25 µM | 3 µl |
| Ovalbumin | 42,9 | 250 µM | 15 µM | 1,8 µl |
| Humanalbumin | 69,3 | 50 µM | 8 µM | 4,8 µl |
| MilliQ-H ₂ O | – | – | – | 11,4 µl |
| Native PAGE-Probenpuffer | – | – | – | 15 µl |

3.2.8 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die Bindungsaffinität des Segment-C an CaM wurde mittels ITC an einem MicroCal VP-ITC System bestimmt. CaM wurde einem Pufferaustausch mit dem entsprechenden ITC-Puffer unterzogen. Das Segment C wurde direkt in ITC-Puffer aufgenommen und anschließend gegen den ITC-Puffer dialysiert.

Die Dialyse wurde mit Dialyseknöpfen (2 kDa *molecular weight cut-off*) durchgeführt, in welche 100-200 µl einer 100 µM Segment-C-Lösung pipettiert wurden. Anschließend erfolgte die Dialyse gegen 100 ml ITC-Puffer bei 6 °C. Nach 30 min wurde der ITC-Puffer durch frischen ITC-Puffer getauscht und dieser Schritt fünfmal wiederholt. Die Segment-C-Lösungen wurden anschließend vereint und für die ITC-Messungen verwendet.

Vor der ITC-Messung wurden die CaM- und Segment-C-Lösungen 10 min unter Vakuum entgast. CaM wurde in einer Endkonzentration von 4 µM in der Probenzelle (1,4 ml)

vorgelegt, während eine 80 μM Lösung des Segment-C über eine Spritze in die Probenzelle injiziert wurde. Die Messung erfolgte durch Injizieren von jeweils 5 μl der Segment-C-Lösung in 5 min-Intervallen über einen Zeitraum von 3 h. Als Referenz wurde die Messung wiederholt, wobei die Segment-C-Lösung in ITC-Puffer ohne CaM injiziert wurde. Die entsprechende Referenzmessung wurde anschließend von der CaM/Segment-C-Messung subtrahiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Origin.

3.2.9 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Ein Vergleich der Affinität der Segment-C-Varianten zu CaM wurde mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) an einem MP-SPR Navi 200 OTSO-Gerät durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einer Wellenlänge von 670 nm. Vor Modifizierung eines PEG-Biotin-Sensorchips wurde Photo-Met-CaM biotinyliert. Dazu wurde ein Pufferaustausch in 20 mM HEPES (pH 6.5) durchgeführt, um eine bevorzugte Biotinylierung des *N*-Terminus zu erreichen. Die Biotinylierung erfolgte mit einem 10-fachen molaren Überschuss an NHS-LC-Biotin über Photo-Met-CaM bei 25 °C für 60 min. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von NH_4HCO_3 (20 mM Endkonzentration) und Inkubation für 15 min bei 25 °C. Anschließend wurde der Überschuss an Biotinylierungsreagenz mit Zeba Spin-Entsalzungssäulen abgetrennt und die Biotinylierung von Photo-Met-CaM mittels MALDI-TOF-MS überprüft.

Der PEG-Biotin-Sensorchip wurde zunächst mit Streptavidin modifiziert. Dazu wurden 2 μM tetrameres Streptavidin, rekonstituiert in 20 mM HEPES (pH 7,5), in zwei aufeinander folgenden Schritten injiziert. Anschließend erfolgte die Immobilisierung von biotinyliertem Photo-Met-CaM in der Probenzelle. 7 μM biotinyliertes Photo-Met-CaM wurden injiziert und das nicht-immobilisierte Protein gesammelt, um dieses wiederholt zu injizieren. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, so dass drei Injektionen für eine optimale Immobilisierung von biotinyliertem Photo-Met-CaM durchgeführt wurden. Für die Analyse der Affinität der Segment-C-Varianten zu CaM wurden diese in SPR-Puffer gelöst, welcher ebenfalls als Laufpuffer für alle Messungen verwendet wurde. Die SPR-Messungen mit Segment-C und seinen Varianten erfolgten mit folgenden Konzentrationen: 0,1 μM , 0,5 μM und 1 μM . Die K_D -Werte wurden mit der Software TraceDrawer bestimmt.

3.3 Chemische Vernetzung von Proteinen

Im Folgenden wird die chemische Vernetzung von CaM mit den verschiedenen bMunc13-2-Segmenten (Abbildung 19, Seite 29) beschrieben. Dabei wurden alle Schritte für die

Methoden

verwendeten bMunc13-2-Segmente analog durchgeführt, so dass die Abläufe nicht für jedes Segment einzeln beschrieben werden. Für die Einstellung der gewünschten Calciumkonzentrationen wurde ein EGTA-Chelatorsystem verwendet. Hierzu wurde die benötigte Menge an CaCl_2 in Anwesenheit von 5 mM EGTA mit Hilfe des MaxChelator-Programms unter Berücksichtigung der Reaktionsbedingungen und Salzkonzentrationen berechnet.

Ein Reaktionsansatz für eine Calciumkonzentration von 750 nM ergibt sich wie folgt:

| | | | |
|------------------|-----------------|--------|---------|
| 20 mM | HEPES | pH 7,2 | (25 °C) |
| 250 mM | NaCl | | |
| 10 μM | CaM | | |
| 10 μM | bMunc13-2 | | |
| 5 mM | EGTA | | |
| 0,5 mM | TCEP | | |
| 3,47 mM | CaCl_2 | | |

Die verwendeten Segment-C-Varianten wurden in Lagerpuffer gelöst, um identische Bedingungen zu bMunc13-2 Segment-A und -B zu erhalten.

Ein Teil aller Reaktionsansätze wurde für die SDS-PAGE-Analyse verwendet, während das verbleibende Volumen für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet wurde.

3.3.1 Chemische Vernetzung mit verschiedenen Reagenzien

Von den Vernetzungsreagenzien wurden vor Zugabe zu den Reaktionsansätzen Stammlösungen von 25-100 mM in DMSO frisch hergestellt.

3.3.1.1 Homobifunktionelle, aminreaktive Reagenzien – DSBU, BS^3 und CDI

CaM wurde zunächst mit allen Komponenten, außer bMunc13-2, gemischt (siehe Reaktionsansatz in Kapitel 3.3). Anschließend erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 10-15 min. Dann wurde bMunc13-2 zugegeben, so dass beide Proteine in einer Konzentration von 10 μM vorlagen. Der Reaktionsansatz wurde bei 25 °C für 60 min inkubiert, wobei sich die gewünschte Calciumkonzentration einstellte und der Komplex zwischen CaM und bMunc13-2 gebildet wurde. Nach der Inkubation wurde das Vernetzungsreagenz in einer Konzentration von 1 mM zugegeben. Dabei lag für BS^3 ein 1:1 (w/w)-Verhältnis von $\text{BS}^3\text{-D}_0/\text{BS}^3\text{-D}_4$ vor. Die Reaktion erfolgte bei 25 °C für 60 min und wurde mit NH_4CO_3 oder TRIS (20 mM Endkonzentration) für 15 min bei Raumtemperatur abgestoppt.

3.3.1.2 Heterobifunktionelles, amin- und sulfhydrylreaktives Reagenz – Sulfo-GMBS

Die Reaktion mit Sulfo-GMBS erfolgte in zwei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt wurden 60 μM CaM mit 6 mM Sulfo-GMBS für 60 min bei 25 °C inkubiert, so dass der aminreaktive NHS-Ester des Vernetzungsreagenzes mit CaM reagierte. Anschließend wurde die Reaktion mit NH_4CO_3 (20 mM Endkonzentration) für 15 min bei Raumtemperatur abgestoppt und das überschüssige Vernetzungsreagenz durch Zentrifugation mit Zeba Spin-Entsalzungssäulen (1 min bei 1000 x g) entfernt. Hierfür wurden die Zentrifugationssäulen zunächst dreifach mit 300 μl 20 mM HEPES, pH 7,2 (25 °C), äquilibriert, bevor die CaM-Lösung zugegeben wurde. Das mit Vernetzungsreagenz markierte CaM wurde dann mit allen Komponenten (siehe Reaktionsansatz in 3.3), außer bMunc13-2, versetzt und für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bMunc13-2 zugegeben, wonach beide Proteine in einer Konzentration von 10 μM vorlagen. Die Reaktion des Maleimids von Sulfo-GMBS wurde während einer Inkubation bei 25 °C für 60 min ermöglicht. Abschließend wurde die Reaktion mit GSH (20 mM Endkonzentration) für 15 min bei Raumtemperatur abgestoppt.

3.3.1.3 Homobifunktionelles, sulfhydrylreaktives Reagenz - DAU

Das bMunc13-2-Segmen-A wurde mit dem Vernetzungsreagenz DAU in Abwesenheit von CaM vernetzt. Die Reaktionsansätze wurden identisch zu den Experimenten mit BS³, DSBU und CDI hergestellt, wobei nur der SEC-Puffer anstelle der CaM-Lösung verwendet wurde, um die gleichen Bedingungen zu erhalten. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 25 °C, welche identisch zu allen anderen Vernetzungsexperimenten war, wurden zu den 10 μM bMunc13-2 1 mM DAU und 200 μM Benzophenon zugegeben. Die Reaktion des DAU erfolgte unter UV-A-Bestrahlung ($\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$) für 8000 mJ/cm^2 und wurde durch die Zugabe von DTT (5 mM Endkonzentration) abgestoppt.

3.3.2 Chemische Vernetzung mit eingebautem Photo-Methionin

Photo-Met-CaM (Kapitel 3.2.2 und 3.2.3.3) wurde mit allen Komponenten, außer bMunc13-2, gemischt (siehe Reaktionsansatz in Kapitel 3.3) und bei Raumtemperatur für 10-15 min inkubiert. Anschließend wurde bMunc13-2 zugegeben, so dass beide Proteine in einer Konzentration von 10 μM vorlagen. Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 25 °C inkubiert, wobei sich die gewünschte Calciumkonzentration einstellte und sich der Komplex zwischen CaM und bMunc13-2 bildete. Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz mit 8000 mJ/cm^2 UV-A-Licht ($\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$) bestrahlt.

3.4 Massenspektrometrische Methoden

3.4.1 Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse

Alle durchgeführten Schritte der Probenvorbereitung wurden unter einem Abzug und unter Verwendung von Handschuhen und Ärmelschonern durchgeführt, um eine Kontamination mit Keratin möglichst gering zu halten.

3.4.1.1 *Enzymatische Proteinspaltung im Gel*

Zur proteolytischen Spaltung von Proteinen im Gel¹⁵⁴ wurden die entsprechenden Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten, in Würfel (ca. 1 mm³) zerteilt und in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend erfolgte ein erster Waschschrift mit 500 µl ACN für 10 min. Nach Abnahme des Überstandes wurden 50 µl 10 mM DTT zugegeben und weitere 30 min bei 56 °C inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift und die lichtgeschützte, 20-minütige Inkubation in 50 µl 55 mM IAA für 20 min. Anschließend, wurden erneut 500 µl ACN zugeben, 10 min inkubiert und der Überstand vollständig abgenommen. Die Proteolyse erfolgte mit einer Kombination der Endoproteinasen Trypsin und Glu-C in einem Enzym:Protein-Verhältnis von jeweils ~1:30 (w/w). Für die Verwendung wurden die Proteasen auf eine maximale Konzentration von 0,025 µg/µl mit 20 mM NH₄CO₃-Lösung verdünnt. Zunächst wurde Glu-C zugesetzt. Anschließend wurde mit 20 mM NH₄CO₃-Lösung aufgefüllt, so dass alle Gelstückchen bedeckt waren. Nach einer Inkubationszeit von 15-30 min bei 4 °C wurde bei Bedarf erneut 20 mM NH₄CO₃-Lösung hinzugegeben, um ein Austrocknen der Gelwürfel zu vermeiden. Die enzymatische Spaltung mit Glu-C erfolgte bei 30 °C über Nacht. Anschließend wurde Trypsin in gleichem Verhältnis wie Glu-C zugegeben und der Ansatz weitere vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe der Extraktionslösung wurde die Proteolyse abgestoppt und gleichzeitig die Peptide während der Inkubation für 15 min bei 37 °C aus dem Gel extrahiert. Zur vollständigen Extraktion, wurde der Extraktionsschritt nach Abnahme des Überstandes wiederholt. Abschließend wurde das Volumen der erhaltenen Peptidlösung auf 40 µl mit Hilfe des Vakuumkonzentrators reduziert und die Lösung der massenspektrometrischen Analyse zugeführt.

3.4.1.2 *Enzymatische Proteinspaltung in Lösung*

Zur proteolytischen Spaltung wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:3 (v/v) mit 8 M Harnstoff/ 400 mM NH₄CO₃-Lösung versetzt. Alternativ wurde anstelle von Harnstoff Natriumdesoxycholat in einer Endkonzentration von 1 % (w/v) zugegeben und die Lösung im Ultraschallbad für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 4 mM DTT zugegeben und 30 min

bei 56 °C inkubiert. Danach erfolgten die Zugabe von 10 mM IAA und die lichtgeschützte 20-minütige Inkubation. Nach einer Verdünnung des Reaktionsansatzes im Verhältnis 1:10 (v/v) mit MilliQ-H₂O wurde die enzymatische Spaltung durchgeführt. Hierzu wurde erst Glu-C im Enzym:Protein-Verhältnis 1:30 (w/w) zugegeben und die Lösung bei 30 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde Trypsin in gleichem Verhältnis zugegeben und die Proteolyse für weitere 4 h bei 37 °C durchgeführt. Durch Zugabe von TFA in einer Endkonzentration von 1 % (v/v) wurde die enzymatische Spaltung gestoppt. Bei Verwendung von Natriumdesoxycholat, wurde dieses durch die Zugabe der TFA gefällt, die Lösung bei 13.000 Upm für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde eine Extraktion von verbleibendem Natriumdesoxycholat aus dem Überstand mit dem zweifachen Volumen an Dichlormethan durchgeführt und die wässrige Phase abgenommen. Abschließend wurde das Volumen der erhaltenen Peptidlösung auf 40-60 µl mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators reduziert und die Lösung der massenspektrometrischen Analyse zugeführt.

Statt Glu-C wurde für die Analyse der Vernetzung mittels Photo-Met auch Asp-N eingesetzt, welches bei 37 °C anstatt bei 30 °C inkubiert wurde.

3.4.2 Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS

Die massenspektrometrische Analyse wurde mit einem Ultimate 3000 RSLC Nano-System gekoppelt mit einem Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer oder Q Exactive Plus-Massenspektrometer durchgeführt.

Es wurde maximal eine Peptidmenge von 2 µg pro Messung injiziert. Die Lösung wurde zunächst zur Entfernung von Salzen mit 30 µl/min auf eine Vorsäule geleitet. Anschließend wurden die Peptide von dieser eluiert, an die Trennsäule gebunden und nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Dies erfolgte bei einer Flussrate von 300 nl/min. Die Elution erfolgte mit einem linearen oder konkaven Gradienten, welcher für die jeweilige verwendete Trennsäule angepasst wurde (Tabelle 7).

Das Nano-HPLC-System wurde direkt mit einem Orbitrap-Massenspektrometer gekoppelt, wodurch die Peptide nach der Elution mittels ESI ionisiert und der Massenanalyse zugeführt wurden. Daten wurden im datenabhängigen (*data-dependent*) Modus aufgenommen, wobei nach jedem hochaufgelösten Massenspektrum (*m/z*-Bereich 300-1500, Auflösung 120.000), Fragmentenmassenspektren mit einer Auflösung von 15.000 in einem Zeitraum von 5 s (Top 5s-Methode) aufgenommen wurden. Die Auswahl der Vorläuferionen erfolgte dabei

Tabelle 7: Verwendete Gradienten für die HPLC

| Trennsäule | Gradient |
|----------------------------|---|
| Acclaim PepMap/ Easy Spray | Linearer Gradient von 1 % bis 35 % (v/v) Fließmittel II (90 min), linearer Gradient von 35 % bis 85 % (v/v) Fließmittel II (5 min), 85 % (v/v) Fließmittel II (5 min) |
| Picofrit-Nanospray | Konkaver Gradient von 1 % bis 40 % (v/v) Fließmittel II (90 min), linearer Gradient von 40 % bis 85 % (v/v) Fließmittel II (5 min), 85 % (v/v) Fließmittel II (5 min) |

nach absteigender Signalintensität. Das Isolationsfenster betrug 2 Th. Die Fragmentierung der Vorläuferionen erfolgte durch CID (35 % normalisierte Kollisionsenergie), HCD (29 % normalisierte Kollisionsenergie), ETD oder abgestufter (*stepped*) HCD (27 %, 30 % und 33 % normalisierte Kollisionsenergie). Letztere Fragmentierungsmethode wurde für die DSBU-, CDI- und DAU-Vernetzungsreagenzien verwendet. Zur Erfassung von Peptiden mit geringer Signalintensität wurde ein dynamischer Ausschluss (*dynamic exclusion*) angewendet, wobei bereits zweimal zur Fragmentierung ausgewählte Vorläuferionen für 60 s für eine weitere Fragmentierung ausgeschlossen wurden. Die maximale Abweichung der Vorläuferionen war dabei auf ± 2 ppm gesetzt.

3.4.3 Native Massenspektrometrie

Die Messung intakter Massen von Proteinen erfolgte mit einem Q-TOF 2-Massenspektrometer, welches für die Analyse hoher Molekulargewichte (bis 5 MDa) umgerüstet worden war. Vor der Messung wurde ein Pufferaustausch (Kapitel 3.2.4) in 300 mM Ammoniumacetat durchgeführt und die Proteinlösung in goldbeschichtete Borosilikatglas-Kapillaren überführt. Die Messung erfolgte mittels ESI mit einer Kapillarspannung von 1,38 kV, einer Konusspannung von 160-180 V, einer Extraktionskonusspannung von 5-10 V und Kollisionsenergien im Bereich von 10-80 V. Die Proteine (10 μ M) wurden einzeln oder in einem 1:1 (v/v)-Gemisch (CaM:Segment-A/ C) nach Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min analysiert. Für die Analyse des CaM/Segment-C-Komplexes nach Durchführung der ITC wurde die vorliegende Proteinlösung (3,33 μ M CaM und 12 μ M Segment-C) einem Pufferaustausch unterzogen und dem Massenspektrometer zugeführt.

3.4.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS wurden die Proteinlösungen zunächst mit Hilfe von ZipTip-Entsalzungssäulen von Salzen und Puffersubstanzen befreit. Dazu wurden die ZipTip-Entsalzungssäulen zunächst dreimal mit je 10 µl ACN und 10 µl 1% (v/v) FA äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung zehnmal über das Säulenmaterial gegeben, um die Proteine daran zu binden. Nach Waschen des Säulenmaterials mit 100 µl 1% (v/v) FA in 5 µl-Schritten, erfolgte die Elution in 5-10 µl 70% (v/v) ACN/ 1% (v/v) FA. Die Proteine wurden mit der Matrix Super-DHB auf eine MALDI-Probenplatte kristallisiert. Hierzu wurde eine Lösung von 50 mg/ml Super-DHB in 50% (v/v) Methanol/ 0,1% (v/v) TFA hergestellt und 1 µl mit jeweils 1 µl oder 2 µl Proteinlösung auf der Probenplatte vermischt. Als Kalibrierung wurde ein Molekulargewichtsstandard im Bereich von ~10 bis 70 kDa verwendet. Dieser wurde in direkter Nachbarschaft zu den Analyten auf die Probenplatte aufgetragen. Nach Trocknung aller Proben wurde die Analyse mit dem Ultraflex III-MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer im linearen Detektionsmodus durchgeführt, wobei bis zu 5000 Laserschüsse für ein Massenspektrum akkumuliert wurden.

3.4.5 Quantifizierung der Einbaurrate von Photo-Met in CaM

Zur Bestimmung der Einbaurrate von Photo-Met in CaM wurde eine enzymatische Spaltung von 4,4 µg des rekombinant hergestellten CaM in Lösung (Kapitel 3.4.1.2) für verschiedene Zeitpunkte nach Induktion der Proteinexpression durchgeführt. Die erhaltenen Peptidlösungen wurden massenspektrometrisch (Nano-HPLC/Nano-ESI-MS/MS) analysiert und die Peakflächen der monoisotopischen Signale der Methionin- oder Photo-Met-enthaltenden Peptide verglichen. Hierfür wurden nur Peptide verwendet, die in allen zu vergleichenden Proben identifiziert wurden und einen Ladungszustand von +2 aufwiesen. Die Einbaurrate wurde zunächst für jedes Peptid nach Gleichung 9 einzeln berechnet. Dabei wurden alle Spezies des Peptids berücksichtigt (Abbildung A2). Diese unterteilen sich in Met- (Met oder oxidiertes Met) bzw. Photo-Met-enthaltend (intaktes Photo-Met, hydrolysiertes Photo-Met und Verlust von N₂). Anschließend erfolgte die Berechnung der Einbaurrate für jede Methioninposition als Durchschnitt aller Peptide, die das entsprechende Methionin enthielten. Eine Gesamteinbaurrate für CaM ergab sich als Mittelwert aller Methioninpositionen.

$$\text{Einbaurrate} = \frac{\text{Photo-Met-enthaltende Spezies}}{\text{Photo-Met-enthaltende Spezies} + \text{Met-enthaltende Spezies}} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Die Peakflächen wurden manuell aus den extrahierten Ionenchromatogrammen mit Hilfe der Xcalibur-Software ermittelt.

3.5 Bioinformatische Methoden

3.5.1 Identifizierung der Vernetzungsprodukte

Die Analyse der vernetzten Peptide erfolgte mit StavroX¹¹⁷ und MeroX¹¹⁸. Als Eingabe dienten eine Datenbankdatei, welche die entsprechenden Proteinsequenzen im FASTA-Format enthielt, und die massenspektrometrischen Daten als MGF-Datei. Die MGF-Dateien wurden mit Hilfe der ProteomeDiscoverer-Software erstellt. Die Sucheinstellungen wurden wie folgt und wie in Tabelle 8 angegeben gewählt:

- drei verpasste Schnittstellen für jede theoretische Spaltstelle der Enzyme
 - Glu-C: C-terminal zu Asparagin- und Glutaminsäure
 - Trypsin: C-terminal zu Lysin und Arginin
 - Asp-N: N-terminal zu Asparagin- und Glutaminsäure
- Massentoleranz für die Vorläuferionen: 3 ppm
- Massentoleranz für die Fragmentionen: 10 ppm
- Signal-zu-Rausch-Verhältnis: 2

Alle zugeordneten Fragmentionenmassenspektren von vernetzten Peptiden wurden manuell validiert.

Tabelle 8: Einstellungen für StavroX/MeroX. B: Acetylierung Cystein, m: Oxidation Methionin, x: Photo-Met.

| Vernetzungsreagenz | Photo-Met | DAU | DSBU/CDI | BS ³ | Sulfo-GMBS | |
|------------------------|------------|---------|----------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Statische Modifikation | - | - | B | B | - | |
| Variable Modifikation | B, m, x | m | m | m | B | |
| Vernetzte Aminosäuren | Position 1 | x | C | K, S, T, Y, N-Terminus | K, S, T, Y, N-Terminus | C |
| | Position 2 | alle AS | C | K, S, T, Y, N-Terminus | K, S, T, Y, N-Terminus | K, S, T, Y, N-Terminus |

3.5.2 Modellierung der CaM/bMunc13-2-Segment-C-Interaktion mit ROSETTA

Die Modellierung der Interaktion zwischen CaM und Segment-C (AS 704-742) wurde mit der Software ROSETTA in der Arbeitsgruppe von Prof. Jens Meiler durchgeführt. Der Start an Position 704 basiert auf dem in Vernetzungsexperimenten identifizierten Peptid ${}_{704}\text{LSLEQVCAE}_{712}$. Hauptsächlich wurden die Funktionen *BuildPeptide*, *FlexPepDock ab-initio*¹⁵⁵, *Rescore* und *Relax* genutzt.

Zunächst wurde eine dreidimensionale Struktur des Segment-C mit Hilfe von *BuildPeptide* erstellt. Anschließend wurde die PDB nach passenden CaM-Strukturen durchsucht und die Struktur des CaM im Komplex mit einem Peptid der Nitritoxid (NO)-Synthase (PDB-Eintrag: 2O60) für das Docking ausgewählt. Grundlage der Auswahl war die Ähnlichkeit der Sequenz des NOS-Peptids mit der Sequenz von Segment-C. Die Anordnung der hydrophoben Aminosäuren ist ähnlich, wodurch eine vergleichbare Struktur des CaM/Segment-C-Komplexes erwartet werden kann. Mit Hilfe von Pymol wurde eine Startstruktur des CaM/Segment-C-Modells erstellt, indem das Segment-C manuell an der erwarteten Position⁵², umschlossen von beiden globulären Domänen von CaM, in die CaM-Struktur eingefügt wurde. Diese Startstruktur wurde dann für die *FlexPepDock*-Applikation genutzt, um die Interaktion zu modellieren. Neben der Startstruktur wurden auch Distanzbeschränkungen zur Positionierung des Segment-C innerhalb des Komplexes mit CaM verwendet. Die Distanzen wurden aus den PDB-Strukturen 2KDU und 2O60 bestimmt. Mit Hilfe der *FlexPepDock ab-initio*-Software wurden 10.000 Modelle erstellt, welche anschließend mit den Distanzbeschränkungen aus den Vernetzungsexperimenten gefiltert wurden. Hierbei wurden für Photo-Met $\sim 8 \text{ \AA}$ und für DSBU 40 \AA als maximale C_{α} - C_{α} -Distanzen angenommen. Eine Abweichung von diesen Distanzen wurde durch eine Standardabweichung (sd-Wert) von 0,5 oder 1 erlaubt. Das Filtern erfolgte mit Hilfe von *KofN*-Dateien, wobei nur eine bestimmte Anzahl K aus N Distanzbeschränkungen mit dem Modell übereinstimmen musste. Nach dem Filtern wurden die Strukturen nach *atom_pair_constraints* zu Clustern zusammengefasst und 181 Strukturen, welche den Distanzbeschränkungen am besten entsprachen, ausgesucht. Diese wurden erneut mit den experimentellen Distanzbeschränkungen verglichen, wobei hier zwei unterschiedliche Dateien verwendet wurden. Wiese waren eine *KofN* (N=7)-Datei und eine Datei mit den zwei häufigsten Photo-Met (x)-Vernetzungen: x76-E707 und x145-C719. Die erhaltenen Scores der Modelle wurden gegen die *atom_pair_constraints* aufgetragen und die am Pareto-Optimum liegenden Modelle für die weitere Analyse verwendet. Hierbei wurden die Distanzbeschränkungen in zwei Gruppen geteilt, welche entweder mit x145 oder x72/x76 von CaM interagieren. Die Vernetzungen zwischen x72-E740 and x36-E712 wurden für

Methoden

weitere Analysen ausgeschlossen, da sie entweder nur mit einer sehr hohen Flexibilität oder einer anderen Konformation von CaM erklärt werden können. Ebenfalls wurde die Vernetzung mit DSBU nicht weiter in die Analyse einbezogen, da die mit DSBU verknüpften Aminosäuren in den vorliegenden Modellen nicht über 40 Å voneinander entfernt liegen konnten. Somit ist die Distanzbeschränkung von DSBU in jedem möglichen Modell erfüllt.

Nun erfolgte ein Relaxierungsschritt, um die Struktur des CaM/Segment-C-Komplexes anhand der experimentellen Distanzbeschränkungen zu verbessern. Anschließend folgte ein weiterer Relaxierungsprozess ohne Distanzbeschränkungen, um eine erzwungene Struktur zu vermeiden. Die erhaltenen Modelle wurden dann erneut mit den experimentellen Distanzbeschränkungen gefiltert und die besten Modelle manuell mit Pymol analysiert. Da einzelne Distanzen noch bis zu 20 Å über den Beschränkungen lagen, wurden die letzten Schritte (Relaxierung mit geringeren Abweichungen für die Distanzen, Relaxierung ohne Beschränkungen und Filtern) erneut durchgeführt.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten Einblicke in die Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 erhalten werden. Dafür wurden verschiedene Segmente der N-terminalen Region von bMunc13-2 verwendet, welche eine oder beide CaM-Bindestellen von bMunc13-2 enthalten. Zur verbesserten Darstellung wurde eine Nomenklatur für die verwendeten bMunc13-2-Segmente eingeführt, welche in Abbildung 20 gezeigt ist. Zusätzlich befindet sich eine komplette Übersicht über die verwendeten bMunc13-2-Segmente und der in dieser Arbeit enthaltenen Varianten am Ende dieser Dissertation (ausklappbare Seite).



Abbildung 20: Verwendete bMunc13-2-Segmente. Für die Analyse der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 wurden drei Segmente des bMunc13-2 Proteins verwendet: Segment-A (AS 367-780), Segment-B (AS 367-903) und Segment-C (AS 703/704-742). C1: Diacylglycerol/Phorbol-ester-Bindestelle, C2: Ca²⁺/Phospholipid-Bindestelle, MHD: Munc-Homologie-Domäne, grün: CaM-Bindestellen. Die Aminosäuresequenzen sind in Abbildung A3 gezeigt.

4.1 Expression und Reinigung des bMunc13-2-Segment-A

Die spätere Analyse der Interaktion von CaM mit bMunc13-2 sollte zunächst mit Segment-A von bMunc13-2 (Aminosäuren 367-780) erfolgen, welches die zwei bekannten CaM-Bindestellen (AS 572-594 und AS 719-742) enthält. Zur Herstellung von Segment-A wurde dieses als rekombinantes Fusionsprotein mit einem N-terminalen Glutathion-S-transferase (GST)-tag (Abbildung 21) in *E. coli* (Kapitel 3.2.1) exprimiert. Neben dem GST-tag enthielt das Fusionsprotein eine Thrombin-Schnittstelle, welche die Abspaltung des GST-tags ermöglichte.



Abbildung 21: Schematische Darstellung des GST-bMunc13-2-Segment-A-Fusionsproteins. Das Fusionsprotein besteht aus einem N-terminalen GST-tag und dem Segment-A (AS 367-780). Beide Proteine sind durch einen Linker von elf Aminosäuren verbunden, der eine Erkennungssequenz (unterstrichen) und die entsprechende Schnittstelle (rote Linie) für Thrombin enthält. Das Farbschema von bMunc13-2 ist identisch zu Abbildung 20. Blau: GST, grau: Segment-A, grün: CaM-Bindestelle, dunkelgrau: verbleibende Aminosäuren der Multiple Cloning Site (fünf N-terminal, sieben C-terminal).

Ergebnisse

Die Expression des Fusionsproteins erfolgte bei 18 °C über Nacht (Kapitel 3.2.1) und wurde mittels SDS-PAGE-Analyse verfolgt (Abbildung 22). Das Fusionsprotein wies ein apparentes Molekulargewicht von ~90 kDa auf. Obwohl dieses Molekulargewicht größer als das theoretisch berechnete Molekulargewicht von 72 kDa war, handelte es sich bei diesem Signal um das GST-Segment-A-Fusionsprotein. Die Identität konnte mittels proteolytischer Spaltung im Gel mit anschließender massenspektrometrischer Analyse eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung A4). Bei Inkubation über Nacht zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression des Fusionsproteins.

Die Reinigung erfolgte nach Aufschluss der *E. coli*-Zellen aus dem Zellysate in drei chromatographischen Schritten (Kapitel 3.2.3.1). Zunächst wurde das Fusionsprotein über eine GST-Affinitätschromatographie angereichert, was durch das starke Signal bei einem apparenten Molekulargewicht von 90 kDa in den Elutionsfraktionen 1-12 deutlich sichtbar ist (Abbildung 23A). Anschließend erfolgte die enzymatische Abspaltung des GST-tags mit Thrombin. Die Abspaltung ist auf dem Gel in Abbildung 23B der Proben vor und nach Spaltung sehr gut erkennbar. Das Signal bei einem apparenten Molekulargewicht von 90 kDa war nach der Spaltung nicht mehr sichtbar. Dafür erschienen zwei neue Signale mit apparenten Molekulargewichten von 55 kDa und 26 kDa, welche dem Segment-A und dem GST (Abbildung A5) entsprechen. Segment-A wurde stets bei einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa detektiert, obwohl es ein Molekulargewicht von 46 kDa

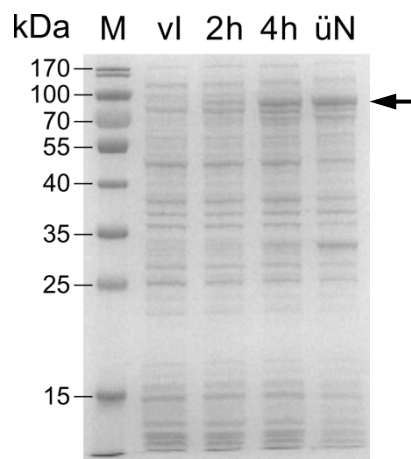


Abbildung 22: Expression des GST-bMunc13-2-Segment-A-Fusionsproteins in *E. coli*. Die Expression erfolgte in BL21(DE3) c^+ RIL-*E. coli*-Zellen. Die Zellsuspensionen wurden auf eine OD_{600nm} von 0,5 normiert. Die Proteine wurden mit einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. M: Molekulargewichtsstandard, vl: vor Induktion der Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG, 2h - 4h: Stunden nach Induktion der Proteinexpression, üN: Inkubation über Nacht nach Induktion der Proteinexpression, schwarzer Pfeil: GST-Segment-A.

aufweist. Beide Proteine wurden mittels Peptidfragmentmassen-Fingerprint-Analyse eindeutig identifiziert. Zwölf zusätzliche Aminosäuren verblieben aufgrund der Klonierungsstrategie an Segment-A (fünf *N*-terminal und sieben *C*-terminal), welche bei der weiteren Analyse berücksichtigt werden mussten (Abbildung 21 und Abbildung A3A). Mit Hilfe einer weiteren

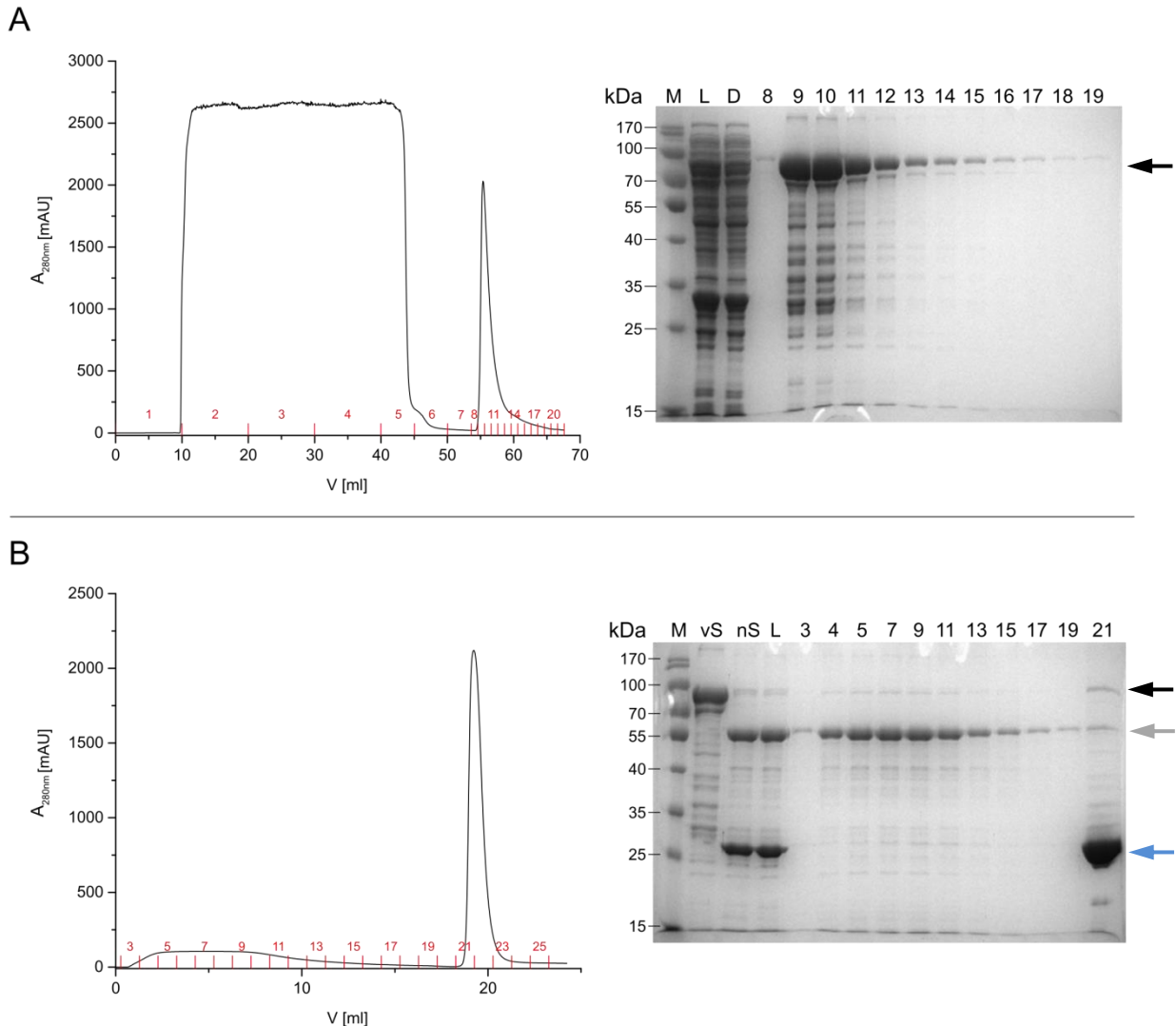


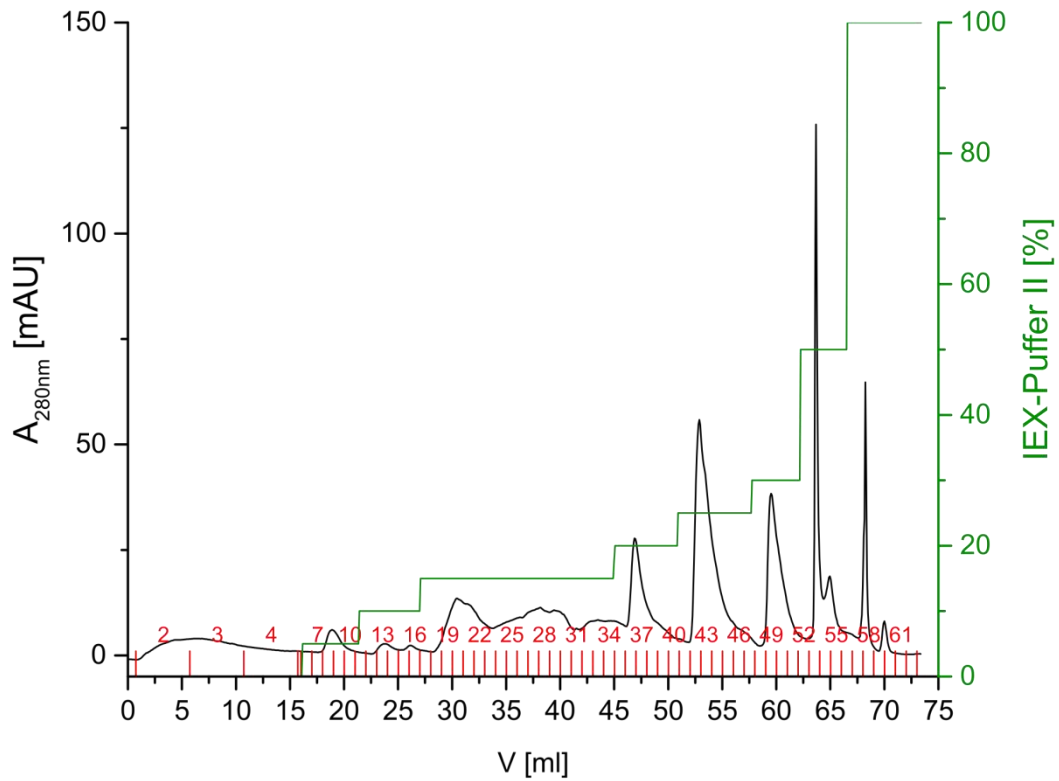
Abbildung 23: GST-Affinitätschromatographie von *bMunc13-2*-Segment-A. Dargestellt sind das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse der ersten beiden chromatographischen Schritte zur Reinigung des GST-Segment-A aus dem *E. coli*-Zelllysate mit Hilfe einer GST-Affinitätschromatographie. Das Chromatogramm zeigt die Absorption bei 280 nm und die erhaltenen Fraktionen. Rechts ist die Analyse ausgewählter Fraktionen in einem 12%igen Polyacrylamidgel dargestellt. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie-Brillantblau. M: Molekulargewichtsstandard, L: für die Chromatographie verwendete Proteinlösung, schwarzer Pfeil: GST-Segment-A, grauer Pfeil: Segment-A, blauer Pfeil: GST. (A) Affinitätschromatographie zur Abtrennung des Fusionsproteins von *E. coli*-Proteinen. D: Durchfluss (gezeigt ist hier nur Fraktion 3 von 2-6), 1-12 Elutionsfraktionen. (B) GST-Affinitätschromatographie zur Trennung von GST und Segment-A nach Abspaltung des GST-tags mit Thrombin; vS: Proteinlösung vor Zugabe von Thrombin zur GST-Abspaltung, nS: Proteinlösung nach Abspaltung des GST-tags, 3-19: Durchflussfraktionen, 21: Elutionsfraktion.

Ergebnisse

GST-Affinitätschromatographie (Abbildung 23B) konnte das GST (Fraktion 21-24) erfolgreich vom Segment-A (Fraktionen 3-19) getrennt werden.

Für die Abtrennung des Segment-A von verbleibenden *E. coli*-Proteinen wurde eine starke Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (Abbildung 24). Die Proteine

A



B

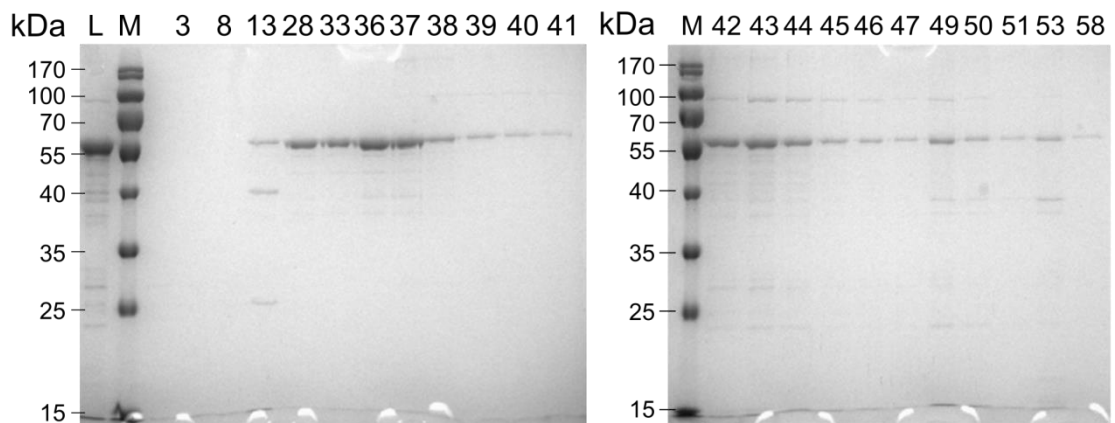


Abbildung 24: Ionenaustauschchromatographie von *bMunc13-2*-Segment-A. (A) Chromatogramm der starken Anionenaustauschchromatographie. Die Absorption bei 280 nm und die Konzentration an IEX-Puffer II sind dargestellt. Die Fraktionen sind gekennzeichnet. (B) SDS-PAGE-Analyse einzelner Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie in einem 12%igen Polyacrylamidgel. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie-Brillantblau. M: Molekulargewichtsstandard, L: Proteinlösung vor der Trennung, 3: Durchfluss, 8-58: Elutionsfraktionen.

wurden zunächst an die Matrix gebunden und anschließend mit einem Stufengradienten eluiert, wobei die Salzkonzentration schrittweise erhöht wurde. Der Stufengradient sollte eine bestmögliche Trennung des Segment-A von *E. coli*-Proteinen ermöglichen. Das Segment-A konnte mit mehreren Schritten des Stufengradienten eluiert werden, war allerdings nur in den Fraktionen 28-38 weitgehend frei von kontaminierenden *E. coli*-Proteinen. Diese Fraktionen wurden zusammengefasst und das Volumen reduziert, bis eine Endkonzentration von $\sim 13 \mu\text{M}$ erreicht war (Abbildung 25).

Die Identität des Segment-A wurde mittels Peptidfragmentmassen-Fingerprint-Analyse bestätigt. Dabei wurde eine Kombination der Proteasen Trypsin und GluC sowie eine Mischung von Proteasen aus der Kannenpflanze (*Nepenthes hybride*) (Methode im Anhang, Seite LXV) genutzt. Dies erlaubte eine 100%ige Abdeckung der Sequenz des Segment-A und eine damit verbundene, zuverlässige Identifizierung des Proteins (Abbildung A6). Als verbleibende Verunreinigungen wurden zwei Chaperone, Triggerfaktor und DnaJ, identifiziert.

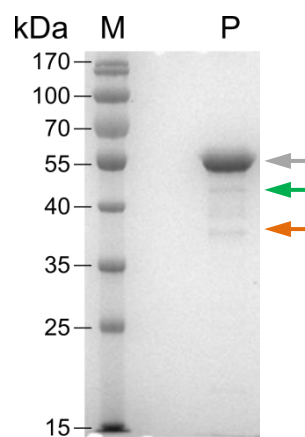


Abbildung 25: *bMunc13-2-Segment-A* nach der Reinigung aus *E. coli*-Zelllysate. Die Proteine wurden in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. M: Molekulargewichtsstandard, P: gereinigtes Segment-A. Grauer Pfeil: Segment-A, grüner Pfeil: Triggerfaktor, orangener Pfeil: DnaJ.

4.2 Expression und Reinigung von Photo-Met-markiertem Calmodulin

4.2.1 Einbau von Photo-Methionin in Calmodulin

Zur Durchführung der photo-induzierten Vernetzungsexperimente wurde Photo-Met in CaM eingebaut (Kapitel 3.2.2). CaM erwies sich als gut geeignetes Protein für den Einbau von Photo-Met, da es neun Methionine in einer Gesamtsequenz von 148 Aminosäuren enthält (entspricht 6%). Somit können im Vergleich zum gerichteten Einbau unnatürlicher

Ergebnisse

Aminosäuren, bei dem meist nur eine Position innerhalb des Proteins ausgetauscht wird, bis zu neun Photo-Methionine pro Proteinmolekül eingebaut werden. Zur Gewährleistung des Einbaus wurde das verwendete Mineralsalzmedium zum Zeitpunkt der Induktion der Proteinexpression des rekombinanten CaM mit 30 mg/l Photo-Met supplementiert (Abbildung 26A). Der Einbau von Photo-Met in Proteine und der damit verbundene Einfluss des Photo-Met auf das Wachstum der *E. coli*-Zellen wurde über verschiedene Expressionszeiträume beobachtet und analysiert. Eine Beeinträchtigung der Teilungsrate der *E. coli*-Zellen durch Photo-Met konnte nicht gezeigt werden, da die Wachstumskurve einen erwarteten exponentiellen Anstieg (Abbildung 26A) aufwies. Die erfolgreiche Expression des rekombinanten CaM mit C-terminalem (His)₆-tag konnte anhand der Zunahme des Signals in der SDS-PAGE-Analyse bei einem apparenten Molekulargewicht von ~13 kDa über die verschiedenen Inkubationszeiträume bestätigt werden (Abbildung 26B). CaM erscheint in der SDS-PAGE-Analyse kleiner als sein Molekulargewicht von 17,8 kDa (Abbildung A7) und weist mehrere Signale abhängig von der Calciumbeladung (keine, zwei oder vier Ca²⁺-Ionen) auf.

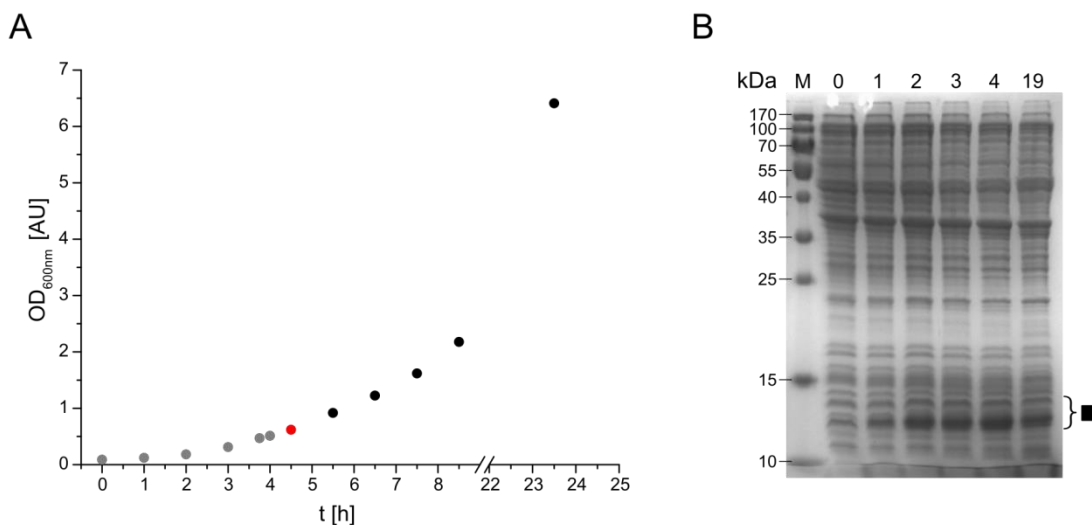


Abbildung 26: Expression von rekombinatem Calmodulin mit Photo-Methionin. (A) Wachstumskurve der BL21(DE3) *E. coli*-Zellen vor und während der Expression des rekombinanten CaM-(His)₆ unter Zugabe von Photo-Met. Grau: Zelldichte vor Induktion der Proteinexpression und Photo-Met-Zugabe, rot: Zelldichte bei Induktion der Proteinexpression und Zugabe von 30 mg/l Photo-Met (bei 4,5 h), schwarz: Zelldichte nach Induktion der Proteinexpression. (B) SDS-PAGE-Analyse der Überexpression des rekombinanten CaM-(His)₆. Die Zellsuspensionen wurden auf eine einheitliche OD_{600nm} von 0,5 normiert, die Proteine in einem 15%igen Polyacrylamidgel getrennt und mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. 0-19: Zeitpunkte in Stunden nach Induktion der Proteinexpression, ■: verschiedene Calcium-beladene Zustände von CaM.

Zur Kontrolle des Einbaus von Photo-Met in CaM wurden stündlich und nach 19 h Zellen entnommen, aus denen das rekombinante CaM anschließend chromatographisch isoliert wurde. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe einer IMAC und einer anschließenden Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.2.3.3). Während der Chromatographie wurde auf die UV-Detektion verzichtet, um das Photo-Met vor einer vorzeitigen Aktivierung zu schützen. Die Analyse ausgewählter Fraktionen beider Chromatographieschritte ist in Abbildung 27 dargestellt. Abbildung 27A zeigt die Nickel-Affinitätschromatographie, durch die das rekombinante CaM (Spuren 11-16) von einer großen Anzahl der Proteine der Ausgangsproteidlösung (Spur L) abgetrennt werden konnte. Nicht gebundene Proteine sind im Durchfluss (Spur D) sichtbar. Die Elutionsfraktionen wurden vereint und einem größenausschlusschromatographischen Schritt unterzogen (Abbildung 27B), wobei das rekombinante CaM (Spuren 65-71) erfolgreich von den verbleibenden Proteinen (Spuren 83-89) abgetrennt werden konnte.

Die SDS-PAGE-Analyse des isolierten Photo-Met-CaM ist für alle Zeitpunkte (1-4 h und 19 h) in Abbildung 28A dargestellt. Die Reinigung des Photo-Met-CaM war für alle Zeitpunkte identisch, was sich am vergleichbaren Verhalten des Proteins in der SDS-PAGE-Analyse zeigte. Zusätzlich wiesen alle CaM-Spezies die charakteristische Signalverteilung abhängig von der Calciumbeladung auf. Dieses Verhalten war identisch zu bovinem CaM (Spur CaM). Anschließend erfolgte eine Quantifizierung des Einbaus von Photo-Met (Kapitel 3.4.5) abhängig von der Expressionszeit (Abbildung 28B). Hierbei wurden für alle Zeitpunkte

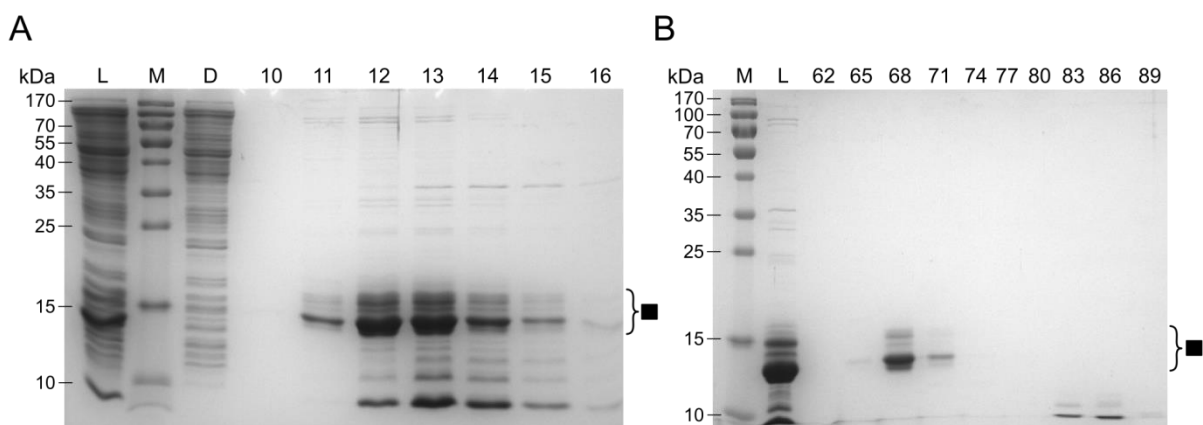


Abbildung 27: Chromatographische Reinigung von Photo-Met-CaM aus *E. coli*-Zelllysate. SDS-PAGE-Analyse einzelner Fraktionen der chromatographischen Trennung von Photo-Met-CaM aus *E. coli*-Zelllysate. Die Proteine wurden in einem 15%igen Polyacrylamidgel getrennt und mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. M: Molekulargewichtsstandard, L: Proteinlösung vor der chromatographischen Trennung, D: Durchflussfraktion, 10-89 Elutionsfraktionen, ■: verschiedene Calcium-beladene Zustände von CaM. (A) IMAC, (B) Größenausschlusschromatographie.

Ergebnisse

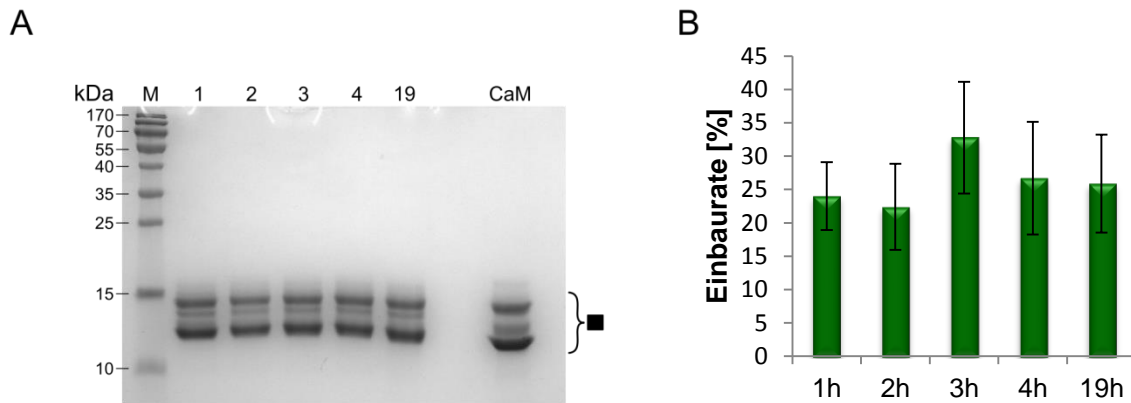


Abbildung 28: Gereinigtes Photo-Met-CaM und Einbauraten von Photo-Methionin. (A) SDS-PAGE von gereinigtem Photo-Met-CaM bei verschiedenen Expressionszeiten (1-19 h). Als Vergleich wurde das aus Rinderhirn isolierte CaM (Spur CaM) analysiert (Molekulargewicht 17 kDa). Die Trennung erfolgte in einem 15%igen Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. ■: verschiedene Calcium-beladene Zustände von CaM. (B) Die Einbauraten von Photo-Met wurde, wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben, für fünf verschiedene Zeitpunkte nach Induktion der Proteinexpression bestimmt.

4,4 μ g CaM mit Glu-C und Trypsin proteolytisch gespalten und die resultierende Peptidmischung der massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Alle Peptide, welche Methionin bzw. Methioninspezies (oxidiertes Met, Photo-Met, hydrolysiertes Photo-Met sowie der Verlust von N₂ aus Photo-Met) enthielten (Abbildung A2) und für alle Zeitpunkte identifiziert werden konnten, wurden für die Quantifizierung berücksichtigt. Zur Quantifizierung wurden die Peakflächen aus den extrahierten Ionenchromatogrammen für die jeweiligen Peptidspezies bestimmt (Kapitel 3.4.5). Im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte war der höchste Einbau von Photo-Met 3 h nach Induktion der Expression des rekombinanten CaM zu verzeichnen. Daher wurde ein Zeitraum von 3 h für alle folgenden Expressionen des rekombinanten Photo-Met-markierten CaM gewählt.

Der Einbau von Photo-Met konnte für alle Methioninpositionen massenspektrometrisch bestätigt werden (Abbildungen 29 und A8). Das Massenspektrum (Abbildung 29, oben rechts) zeigt zwei Signale für das Peptid ELGTVMR (AS 31-37 des CaM), entsprechend des Einbaus von Photo-Met (gekennzeichnet als x), welches eine Massendifferenz von 8 u zu Met aufweist. Durch die zweifache Ladung des Peptids zeigt sich der Einbau des Photo-Met in einer Differenz von 4 Th zwischen den beiden Spezies. Das Fragmentationmassenspektrum des zweifach positiv geladenen ELGTVxR-Peptids (m/z 407,232) zeigte eine vollständige Fragmentierung des Peptids (Abbildung 29) und bestätigt den Einbau des Photo-Met. Besonders auffällig ist der Verlust von Stickstoff (N₂) der Photo-Met enthaltenen b- und y-Ionen, was mit einer Massendifferenz von 28,006 u einhergeht. Dieser spezifische Verlust ist

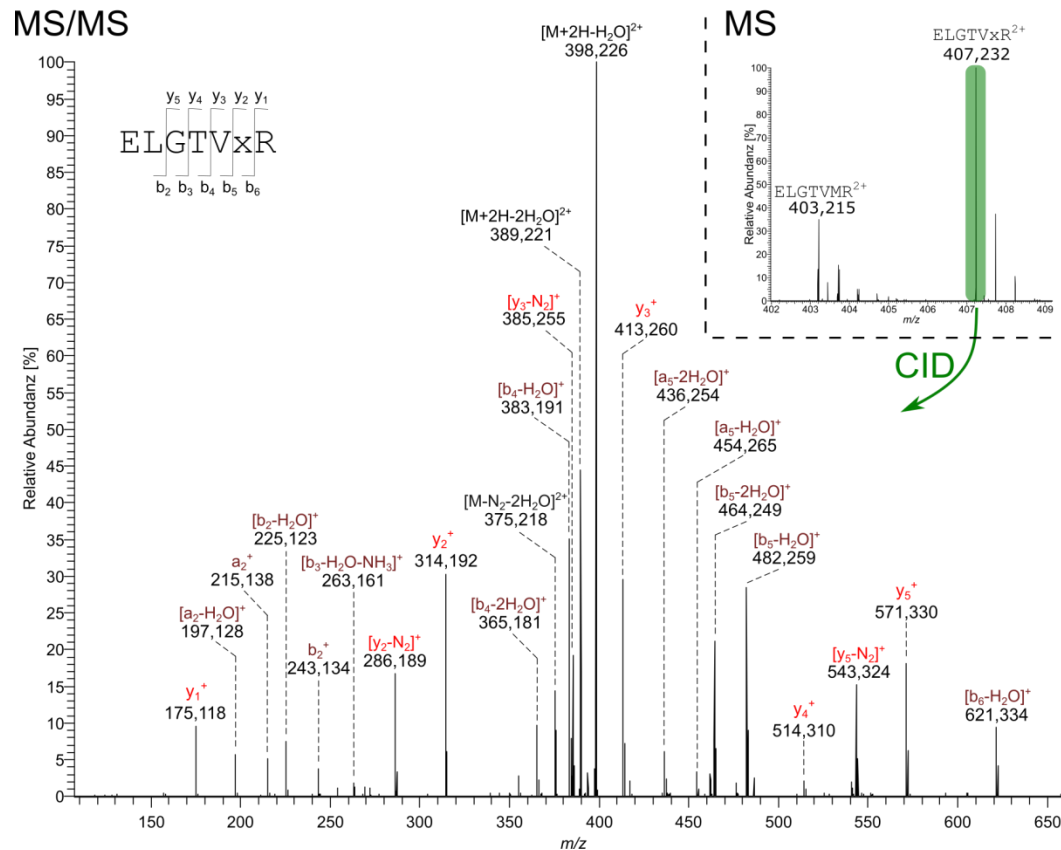


Abbildung 29: Massenspektrometrische Analyse des CaM-Peptids ELGTVMR mit und ohne Photo-Methionin. x: Photo-Met. Fragmentionenmassenspektrum des doppelt positiv geladenen ELGTVxR-Peptids (m/z 407,232). Das Massenspektrum des zweifach geladenen ELGTVMR-Peptids (Aminosäuren 31-37) mit und ohne Einbau von Photo-Met ist oben rechts dargestellt.

nur detektierbar, wenn Photo-Met im Fragmention enthalten ist. Ein Beispiel für diesen spezifischen Stickstoffverlust ist das y_5 -Fragmention (y_5^+ bei m/z 571,330; $[y_5-N_2]^+$ bei m/z 543,324).

4.2.2 Bestätigung der Bildung von Vernetzungsprodukten mit Photo-Methionin

Zur Bestätigung der Bildung von UV-induzierten Vernetzungsprodukten in Photo-Met-CaM wurden zunächst 10 μM Photo-Met CaM in Anwesenheit von 75 nM Calcium inkubiert und UV-A-Strahlung von 8000 mJ/cm^2 ausgesetzt. So wurde das Diazirin des Photo-Met aktiviert und die Vernetzungsreaktion ermöglicht. Nach der UV-A-Bestrahlung wurde CaM einer proteolytischen Spaltung mit Glu-C und Trypsin sowie der anschließenden massenspektrometrischen Analyse unterzogen.

Ein Fragmentionenmassenspektrum eines identifizierten Vernetzungsproduktes innerhalb von CaM ist in Abbildung 30 dargestellt. Die Peptide VDEMIRE (AS 48-54) und EFVQMMTAK (AS 140-148) wurden miteinander vernetzt, wobei an Position M51 Photo-Met (x) eingebaut

Ergebnisse

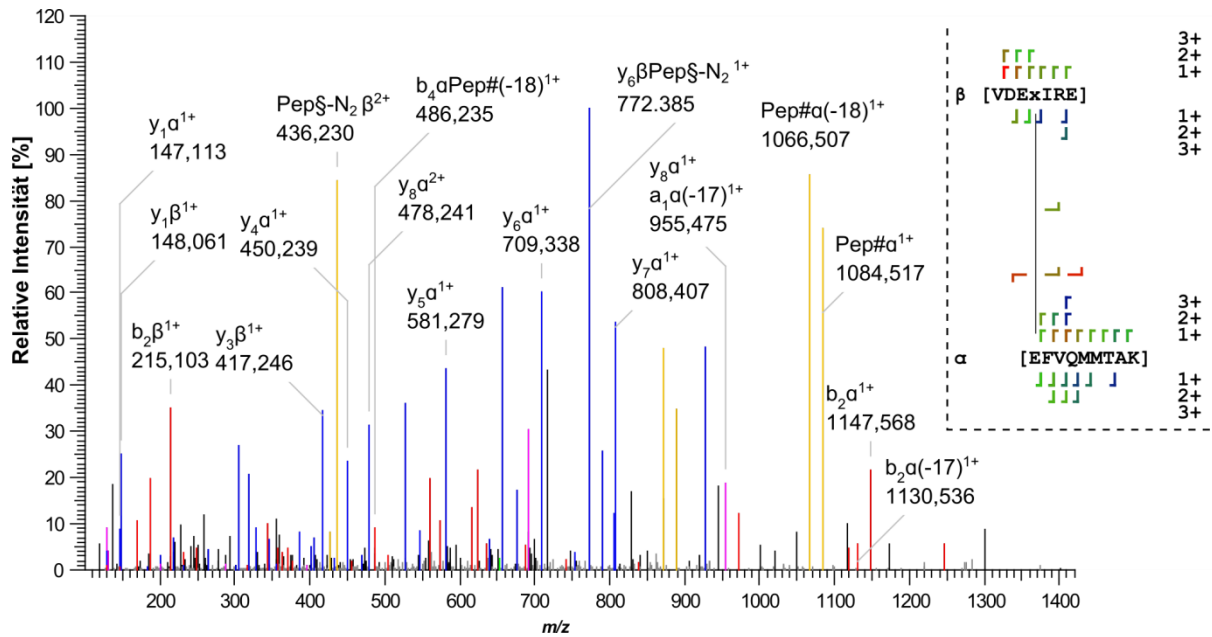


Abbildung 30: Fragmentionenmassenspektrum eines intramolekularen Vernetzungsproduktes von CaM mit Photo-Methionin. Vernetzt sind die Peptide VDExIRE (AS 121-127) und EFVQMMTAK (AS 140-148) von CaM. Vorläuferion: Ladungszustand:3+, m/z 652,326. Die Signale sind wie folgt gekennzeichnet: blau: y-Ionen, rot: a- und b-Ionen, gelb: Ionen, die durch Spaltung der Esterbindung zwischen den vernetzten Peptiden entstehen, schwarz: nicht annotierte Signale. Pep§: Photo-Met enthaltendes Peptid, Pep#: vernetztes Peptid. Die vernetzten Peptide und die im Spektrum detektierten Fragmentionen sind anhand der Aminosäuresequenzen dargestellt (⌋: a- und b-Ionen, ⌈: y-Ionen, —: Fragmentionen der neu entstandenen Esterbindung). Die Farbe der Fragmentionensymbole gibt die Intensität der entsprechenden Peaks im Spektrum an: rot: hohe Intensität, blau: geringe Intensität. Die Nomenklatur α , β , ξ und # ist in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.3.1.2).

war. Das Spektrum zeigt eine umfangreiche Fragmentierung beider Peptide, welche eine eindeutige Aussage über die vernetzten Aminosäuren ermöglichte. Zusätzlich waren die charakteristischen Signale für die einzelnen Peptide nach Spaltung der gebildeten Esterbindung zwischen x51 und E140 sichtbar (gelbe Signale).

Die C_α - C_α -Distanzen zwischen den vernetzten Aminosäuren wurden innerhalb der PDB-Strukturen von calciumfreien Apo- (PDB-Eintrag 1DMO) und mit vier Calciumionen beladenem Holo-CaM (PDB-Einträge 1PRW und 1CLL) ermittelt (Tabelle 9 und Abbildung 31). Es wurden beide Calciumzustände betrachtet, da aufgrund der geringen Calciumkonzentration von 75 nM CaM nicht vollständig gesättigt mit Calcium vorliegt. Für die Holoform wurden zwei mögliche Konformationen betrachtet, wobei die gestreckte Form (Abbildung 31C) vermutlich ein kristallographisches Artefakt ist^{22, 24}. Eine Intermediatform des CaM mit nur zwei gebundenen Calciumionen konnte nicht analysiert werden, da für diese bisher keine dreidimensionale Struktur vorliegt.

Photo-Met überbrückt abhängig von der verknüpften Aminosäure eine C_{α} - C_{α} -Distanz von 5-11 Å¹⁵⁶. Bei Beachtung der hohen Flexibilität von CaM aufgrund seiner calciumabhängigen Konformationsänderung und der flexiblen α -Helix zwischen den beiden globulären Domänen, sind allerdings größere Distanzen (bis zu ~17 Å)¹⁵⁶ innerhalb von CaM zu erwarten.

Tabelle 9: Vernetzte Aminosäuren innerhalb von CaM. Die Tabelle zeigt die vernetzten Aminosäuren innerhalb von CaM und die jeweiligen C_{α} - C_{α} -Distanzen für calciumfreies CaM (PDB-Eintrag: 1DMO) und calciumgesättigtes CaM (PDB-Einträge: 1PRW und 1CLL). Wenn mehrere Aminosäuren als Vernetzungsstelle möglich waren, wurde die wahrscheinlichste Position zur Bestimmung der C_{α} - C_{α} -Distanz verwendet, x: Photo-Met.

| Vernetzte Aminosäuren in CaM | | C_{α} - C_{α} -Distanz in Å | | |
|------------------------------|-------------------------------------|---|----------|------|
| Position 1 | Position 2 | Apoform | Holoform | |
| | | 1DMO | 1PRW | 1CLL |
| x36 | E47 | 11,7 | 11,6 | 11,1 |
| x36 | K75 | 10,5 | 12,0 | 17,5 |
| x36 | K77 | 15,2 | 16,7 | 22,5 |
| x36 | D78/D80 | 16,3 | 14,8 | 21,2 |
| x36 | G113/E114 | 27,2 | 14,6 | 48,4 |
| x51 | F68/L69 | 9,9 | 10,1 | 11,8 |
| x51 | K77 | 14,3 | 13,0 | 19,0 |
| x51 | (His) ₆ -tag, C-Terminus | – | – | – |
| x71/x72 | N-Terminus | 15,5 | 9,9 | – |
| x71/x72 | D2 | 13,2 | 11,9 | – |
| x71/x72 | E45/E47 | 15,1 | 18,2 | 22,1 |
| x71/x72 | D78 | 9,5 | 10,0 | 10,0 |
| x71/x72 | E87 | 23,3 | 15,7 | 22,5 |
| x71/x72 | E114 | 22,8 | 19,7 | 40,0 |
| x71/x72 | (His) ₆ -tag, C-Terminus | – | – | – |
| x76 | N-Terminus | 12,9 | 13,5 | – |
| x76 | D2 | 11,2 | 14,1 | – |
| x76 | G40/Q41/N42 | 10,7 | 13,7 | 21,8 |
| x76 | E114 | 19,7 | 23,9 | 34,2 |
| x76 | K115 | 20,2 | 26,8 | 37,2 |
| x76/M76 | x144/x145/M144/M145 | 19,1 | 6,1 | 19,3 |
| x76 | (His) ₆ -tag, C-Terminus | 10,0 | 18,4 | 15,4 |
| x124 | E140 | 12,0 | 12,1 | 12,0 |
| x124 | (His) ₆ -tag, C-Terminus | – | – | – |
| x144/x145 | S81 | 11,1 | 9,0 | 10,8 |
| x144/x145 | E114 | 10,9 | 21,2 | 18,2 |

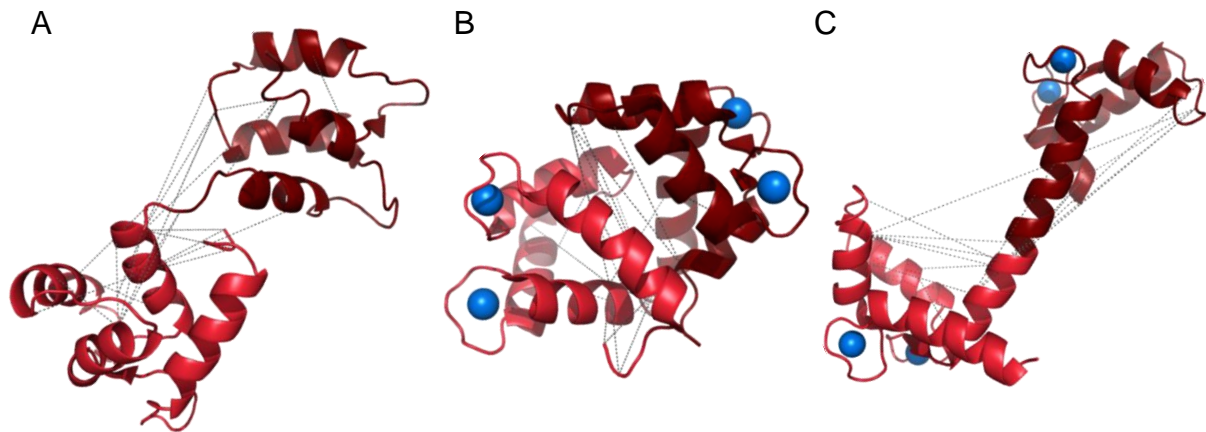


Abbildung 31: Vernetzte Aminosäuren in CaM. Dargestellt sind die vernetzten Aminosäuren (gestrichelte Linien; Tabelle 9) in den Strukturen von Apo-CaM (A, PDB-Eintrag: 1DMO) und Holo-CaM (B, PDB-Eintrag: 1PRW; C, PDB-Eintrag: 1CCL). Die N-terminale Domäne ist in hellrot hervorgehoben. Blaue Kugeln: Calciumionen.

4.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2

4.3.1 Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2

Die Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 wurde anhand des Segment-A von bMunc13-2 (Abbildung 20) analysiert. Zunächst wurde der Einfluss der Calciumkonzentration auf die Bildung des Komplexes untersucht. Komplexe zwischen den beiden Proteinen wurden mit Hilfe von Photo-Met-CaM unter UV-A-Bestrahlung kovalent fixiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Ein Komplexsignal bei einem apparenten Molekulargewicht von ~64 kDa war somit im Gel nur sichtbar, wenn der Komplex zwischen CaM (~18 kDa) und Segment-A (~46 kDa) ausgebildet und mittels der Vernetzungsreaktion kovalent fixiert werden konnte. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne Calcium mitgeführt, in der keine Komplexbildung zwischen CaM und bMunc13-2 möglich sein sollte und auch bestätigt wurde (Abbildung 32A).

Die ersten Experimente wurden mit einer Calciumkonzentration von 75 nM, angelehnt an vorherige Studien⁵², durchgeführt, wobei überraschenderweise keine Komplexbildung zwischen CaM und Segment-A zu beobachten war. Daraus folgend wurde eine sehr hohe Calciumkonzentration von 1 mM angewendet, um die calciumabhängige Komplexbildung zu induzieren und zu überprüfen. Tatsächlich wurde ein Komplex zwischen CaM und dem Segment-A unter der hohen Calciumkonzentration gebildet (Abbildung 32A). Das Signal des Komplexes bei einem apparenten Molekulargewicht von ~70 kDa (Δ) bestätigte eine

1:1-Stöchiometrie der Interaktion von CaM und Segment-A. Das Erscheinen des Signals bei einem höheren apparenten Molekulargewicht ist zu erwarten, da das Segment-A bei ~55 kDa (○) erscheint, obwohl es eine molekulare Masse von 46 kDa aufweist (Kapitel 4.1, Abbildung 23B).

Nach Bestätigung der Interaktion wurde die minimale Calciumkonzentration für die Bildung des Komplexes zwischen CaM und Segment-A bestimmt. Dafür wurde die Calciumkonzentration schrittweise von 75 nM bis 1 mM erhöht und die Komplexbildung beobachtet (Abbildung 32B). Die SDS-PAGE-Analyse zeigte eindeutig, dass bei den niederen Calciumkonzentrationen bis 250 nM kein Komplex detektierbar war. Eine Interaktion fand erst ab einer Calciumkonzentration von 750 nM statt, wofür ein eindeutiges Signal erkennbar war. Die Intensität des Komplexsignals war anschließend trotz steigender Calciumkonzentration in allen Proben vergleichbar. Somit fand keine erhöhte Komplexbildung bei einer weiteren Steigerung der Calciumkonzentration über 750 nM statt und auch eine 2:1-Stöchiometrie der CaM/Segment-A-Interaktion konnte nicht beobachtet werden. Die hier bestimmte Calciumkonzentration für die Komplexbildung liegt damit in einem deutlich höheren Bereich als in vorangegangenen Bindungsstudien mit bMunc13-2-Peptiden der CaM-Bindestellen (~30 nM)⁵².

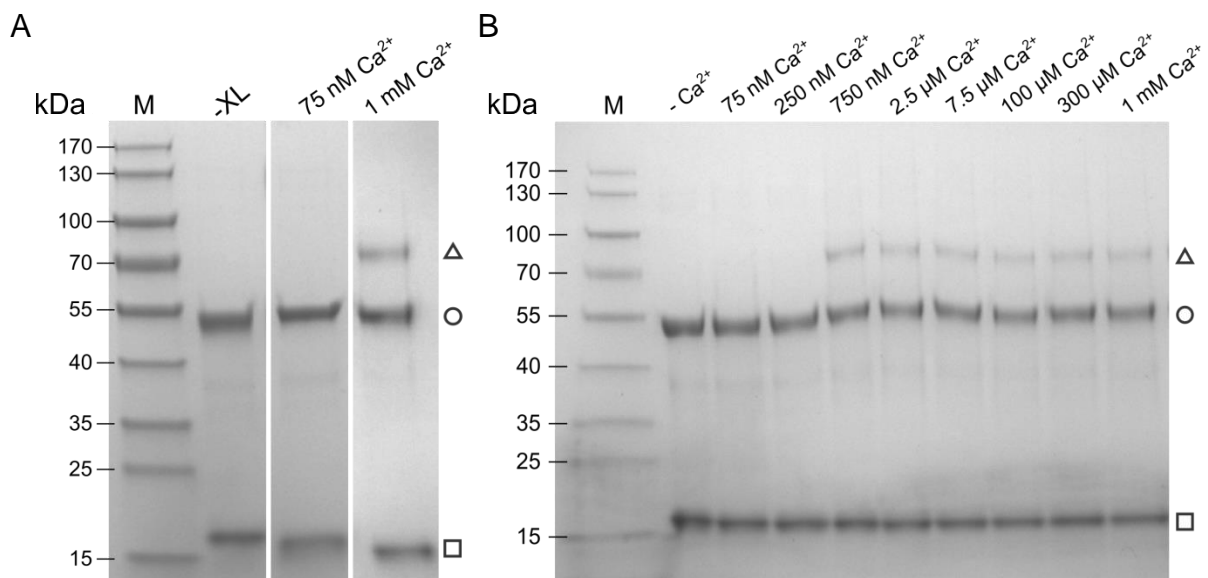


Abbildung 32: SDS-PAGE Analyse der calciumabhängigen Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-A. Calciumkonzentrationen wurden bis 300 μM mit Hilfe eines EGTA-Chelatorsystems eingestellt. Die Proteine wurden in einem Polyacrylamidgel (Gradient 4-20%) getrennt und durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht. M: Molekulargewichtsstandard, -XL: CaM ohne Photo-Met, -Ca²⁺: ohne Calcium (5 mM EGTA), □: CaM, ○: Segment-A, Δ: CaM/Segment-A-(1:1)-Komplex. (A) Überprüfung der Komplexbildung bei Calciumkonzentrationen von 75 nM und 1 mM. (B) Titration der Calciumkonzentration von 75 nM bis 1 mM.

4.3.2 Vernetzung des CaM/bMunc13-2-Segment-A-Komplexes

Zur Gewinnung von Distanzinformationen, um Einblicke in die Interaktion zwischen CaM und Segment-A zu erhalten, wurde eine Kombination der Vernetzung von Proteinen und Massenspektrometrie genutzt. Die chemische Vernetzung erfolgte dabei mit BS³, DSBU und Sulfo-GMBS (Abbildung 16, Abbildung 33A), die photo-chemische Vernetzung mit Photo-Met-markiertem CaM (Abbildung 33A, Kapitel 4.3.1). Die Reaktion des Maleimids des Sulfo-GMBS mit Cysteinen bietet hierbei einen großen Vorteil, da CaM keine Cysteine enthält und somit Cysteine des bMunc13-2 in einer Zweischnittreaktion spezifisch vernetzt werden können. Mit Hilfe dieser verschiedenen Reagenzien mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen und verschiedenen Überbrückungsdistanzen sollten komplementäre Informationen über die Struktur des CaM/bMunc13-2-Komplexes erhalten werden.

Der Vergleich der vier Vernetzungsansätze bei einer Calciumkonzentration von 1 mM ist in Abbildung 33B dargestellt. Mit allen Vernetzungsreagenzien konnte eine kovalente Fixierung des CaM/Segment-A-Komplexes beobachtet werden. Die Kontrollprobe ohne Vernetzungsreagenz und nur mit DMSO zeigte erwartungsgemäß keine Komplexbildung. Im Gegensatz dazu war im Reaktionsansatz mit DSBU ein zusätzliches Signal bei einem apparenten Molekulargewicht von 100 kDa zu erkennen, welches auch bei BS³ mit geringerer Intensität auftrat. Ein Segment-A-Dimer konnte hierbei ausgeschlossen werden, da dieses bei einem höheren apparenten Molekulargewicht auf dem SDS-Gel erscheint (Abbildung A9). Vermutlich handelte es sich hierbei um einen artifiziellen CaM:Segment-A-(2:1)-Komplex, welcher nur bei den Vernetzungsreagenzien DSBU und BS³ zu beobachten ist. Bei Sulfo-GMBS, welches als Vernetzungsreagenz in zwei Reaktionsschritten angewendet wurde, war der 2:1-Komplex nicht sichtbar.

Die Analyse der Vernetzungsprodukte erfolgte für die BS³, DSBU und Sulfo-GMBS über eine Proteinspaltung im Gel, wobei Banden des CaM/Segment-A-Komplexes und des Segment-A-Monomers ausgeschnitten wurden. Für Photo-Met hingegen wurde die Proteinspaltung in Lösung und im Gel durchgeführt.

Eine Zusammenfassung aller identifizierten, vernetzten Aminosäuren des CaM/Segment-A-Komplexes ist für die Calciumkonzentrationen von 750 nM und 1 mM in Abbildung 33C und Tabelle 10 dargestellt. Auffällig war hierbei die verstärkte Identifizierung von vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und bMunc13-2 im Bereich der C-terminalen Bindestelle (AS 719-742) in Segment-A. Bei Calmodulin konnten für die Vernetzung mit bMunc13-2 bevorzugt die Aminosäuren 71/72, 76 sowie 144/145 beobachtet werden.

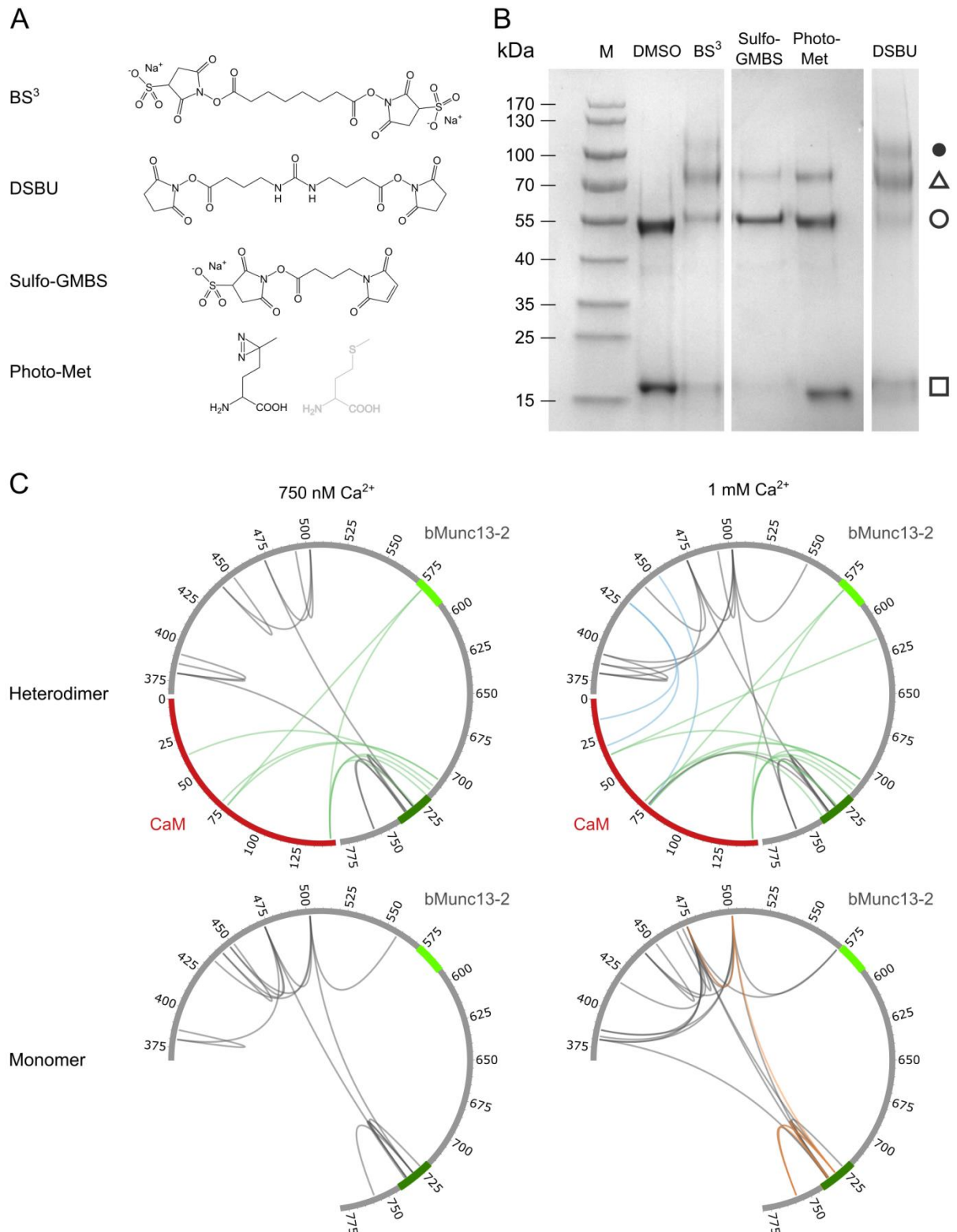


Abbildung 33: Vernetzung von CaM und bMunc13-2-Segment-A mit BS³, DSBU, Sulfo-GMBS und Photo-Met. (A) Dargestellt sind die Strukturen der verwendeten Vernetzungsreagenzien. Für Photo-Met ist im Vergleich Methionin in grau gezeigt. (B) SDS-PAGE-Analyse der verschiedenen Vernetzungsexperimente bei einer Calciumkonzentration von 1 mM. Die Proteine wurden in einem Polyacrylamidgel (Gradient 4-20%) aufgetrennt und mit kolloidaler Coomassie-Brillantblau-Färbelösung angefärbt. M: Molekulargewichtsstandard, DMSO: ohne Vernetzungsreagenz, □: CaM, ○: Segment-A, △: CaM/Segment-A-Komplex, ●: CaM:Segment-A-(2:1)-Komplex. (C) Zirkuläre Darstellung der identifizierten vernetzten Aminosäuren innerhalb des

Ergebnisse

CaM/Segment-A-Komplexes und des Segment-A-Monomers für die Calciumkonzentrationen 750 nM und 1 mM. CaM ist in rot, Segment-A in grau mit grün hervorgehobenen CaM-Bindestellen (Färbung vgl. Abbildung 2) dargestellt. Die Vernetzungen sind entsprechend des Vernetzungsreagenzes dargestellt: grün: Photo-Met, blau: Sulfo-GMBS, grau: DSBU und orange: BS³. Alle vernetzten Aminosäuren sind in den Tabellen 10 und A2-A6 aufgelistet.

Die höchste Anzahl an verknüpften Aminosäuren wurde mit Photo-Met beobachtet (12 von insgesamt 16 Vernetzungsprodukten in Tabelle 10), welche für die zwei Calciumkonzentrationen von 750 nM und 1 mM größtenteils identisch waren. Ob die nicht identischen Vernetzungen (x36-D615, x71/x72-E740, x76-E729 und x144/x145-E707) nicht im Komplex vorkamen oder nicht detektiert wurden, konnte hierbei nicht geklärt werden. Zur Untersuchung dieser Unterschiede wurden weitere Calciumkonzentrationen (2,5 µM, 45 µM und 300 µM) analysiert, um eine mögliche Calciumabhängigkeit der Konformation des Komplexes zwischen CaM und Segment-A zu klären. Die identifizierten verknüpften Aminosäuren waren unter steigenden Calciumkonzentrationen identisch (Tabelle A1), was gegen eine Konformationsänderung bei erhöhter Calciumkonzentration spricht. Zwei Verknüpfungen, x76-E707 und x144/x145-C719, wurden mehrfach beobachtet (Tabelle A2).

Tabelle 10: Vernetzte Aminosäuren zwischen Calmodulin und bMunc13-2-Segment-A. Die vernetzten Aminosäuren zwischen Segment-A und CaM sind für die Calciumkonzentrationen 750 nM und 1 mM dargestellt. x: Photo-Met.

| Vernetzungsreagenz | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc-13-2 Segment-A | Calciumkonzentration | |
|--------------------|---------------------------|--|----------------------|------|
| | | | 750 nM | 1 mM |
| Photo-Met | x36 | D615 | | ✓ |
| | x36 | E712 | ✓ | ✓ |
| | x71/x72 | E707 | ✓ | ✓ |
| | x71/x72 | E740 | | ✓ |
| | x76 | H578 | ✓ | ✓ |
| | x76 | E707 | ✓ | ✓ |
| | x76 | E729 | | ✓ |
| | x144/x145 | H578/H579 | ✓ | ✓ |
| | x144/x145 | E707 | | ✓ |
| | x144/x145 | Y715 | ✓ | ✓ |
| | x144/x145 | C719 | ✓ | ✓ |
| | x144/x145 | E729 | ✓ | ✓ |
| DSBU | K75 | K735 | | ✓ |
| Sulfo-GMBS | K75 | C453 | | ✓ |
| | K13 | C428 | | ✓ |
| | K30 | C428 | | ✓ |

Mit Hilfe des Vernetzungsreagenz BS³ konnten nur Vernetzungsprodukte innerhalb von Segment-A identifiziert werden (Abbildung 33C, orangene Linien), welche in Tabelle A3 neben allen intramolekularen DSBU-vernetzten Aminosäuren aufgeführt sind. In einem weiteren Experiment wurden einige intramolekulare Vernetzungsprodukte in Segment-A mit dem cystein-reaktiven Vernetzungsreagenz DAU identifiziert. Die vernetzten Aminosäuren sind in einer zirkulären Darstellung gezeigt (Abbildung A10) und in Tabelle A7 zusammengefasst.

Fragmentenmassenspektren von ausgewählten Vernetzungsprodukten mit Photo-Met und DSBU sind im Anhang (Abbildung A11 und A12) dargestellt.

4.3.3 Native Massenspektrometrie des CaM/bMunc13-2-Segment-A-Komplexes

Neben der chemischen Vernetzung (Kapitel 4.3.2), wurde die Interaktion zwischen CaM und Segment-A mittels nativer Massenspektrometrie überprüft. Hierfür wurden CaM und Segment-A in flüchtigem Ammoniumacetat-Puffer eingesetzt, um sie der Massenanalyse zugänglich zu machen. Beide Proteine wurden mittels eines für hohe Molekularmassen optimierten ESI-Q-TOF-Massenspektrometers zunächst einzeln analysiert. Die erhaltenen Massenspektren sind in Abbildung 34 dargestellt. Beide Massenspektren zeigten Signale des Monomers (CaM: m/z 1850-2500, Segment-A: m/z 2700-3600) und des Dimers (CaM: m/z 2800-3200, Segment-A: m/z 3800-4500) der analysierten Proteine in verschiedenen Ladungszuständen. Zur Analyse des Komplexes zwischen CaM und Segment-A wurden beide Proteine im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Calciumkonzentration war hierbei nur vom Calciumgehalt der Ammoniumacetatlösung und des verbleibenden Calciums am CaM während des Pufferaustauschs abhängig und betrug $\sim 2 \mu\text{M}$ (Bestimmung mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma, ICP-MS, in der Abteilung Molekulare Mikrobiologie der Universität Halle-Wittenberg durch Dr. Martin Herzberg). Das erhaltene Massenspektrum des CaM/Segment-A-Komplexes (Abbildung 34, unten) wies Signale im m/z -Bereich zwischen ~ 3300 - 4300 auf, welche in den Massenspektren von CaM und Segment-A nicht zu beobachten waren. Diese Signale konnten dem CaM/Segment-A-Komplex in einer 1:1-Stöchiometrie zugeordnet werden, wodurch die Bildung des Komplexes zwischen CaM und Segment-A verifiziert wurde. Die Massendifferenz von 238 u zwischen dem experimentell bestimmten und dem theoretischen Molekulargewicht stellt möglicherweise ein nicht-kovalent gebundenes HEPES-Molekül ($M = 238,3 \text{ g/mol}$) dar. Dieses könnte beim Pufferaustausch an CaM oder dem Segment-A verblieben sein.

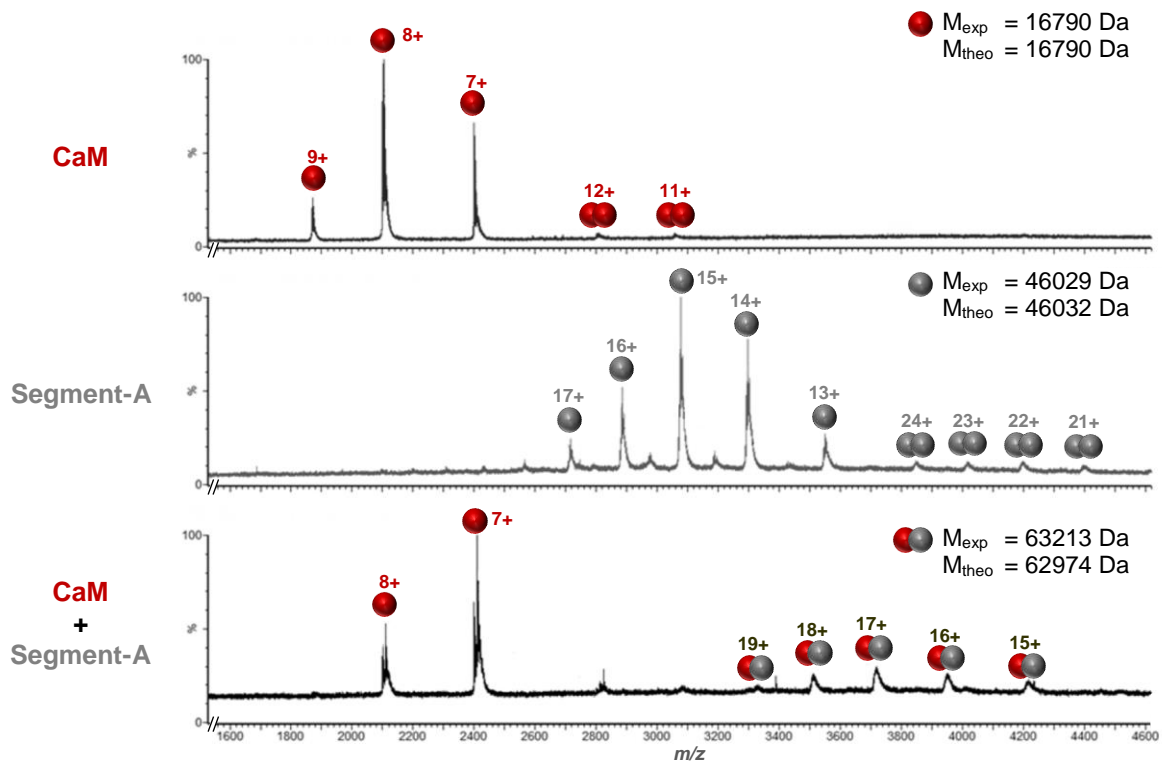


Abbildung 34: Analyse der CaM/ bMunc13-2-Segment-A-Interaktion mittels nativer Massenspektrometrie. Dargestellt sind die Massenspektren von CaM und Segment-A sowie ihres 1:1-Komplexes. Rot: CaM, grau: Segment-A.

4.4 C-terminale Verlängerung des bMunc13-2-Segment-A

C-terminal zur Aminosäuresequenz 367-780 in bMunc13-2 ist die C1-Domäne lokalisiert, welche überwiegend eine β -Faltblatt Struktur aufweist²⁸. Der Einfluss dieser Domäne auf das Bindevverhalten an CaM sollte analysiert werden, wofür das Segment-A C-terminal bis zur Aminosäure 903 erweitert wurde (Abbildung 20). Das so erhaltene Segment-B wurde ebenfalls als Fusionsprotein mit einem N-terminalen GST-tag exprimiert. Die Expression und Reinigung des Segment-B erfolgte analog zu Segment-A, wobei zwei chromatographische Schritte getauscht wurden (Kapitel 3.2.3.2). Nach der Reinigung erfolgte die Interaktionsanalyse mit CaM durch chemische Vernetzung mit Photo-Met, da mit diesem zuvor die meisten vernetzten Aminosäuren detektiert wurden und zum Vergleich genutzt werden konnten. Die Vernetzungsexperimente wurden analog zu denen mit Segment-A durchgeführt (Kapitel 4.3.2).

Die identifizierten vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und Segment-B sind in Tabelle 11 sowie in Tabelle A8 und A9 aufgeführt. Ein Vergleich mit den vernetzten Aminosäuren

Tabelle 11: Zusammenfassung aller vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-A/-B
x: Photo-Met.

| Vernetzte Aminosäure CaM | Vernetzte Aminosäure bMunc13-2 | bMunc13-2 Segment-A | bMunc13-2 Segment-B |
|--------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| x36 | D615 | ✓ | |
| x36 | E712 | ✓ | |
| x71/x72 | E707 | ✓ | ✓ |
| x71/x72 | E740 | ✓ | ✓ |
| x76 | H578 | ✓ | |
| x76 | E707 | ✓ | ✓ |
| x76 | E729 | ✓ | |
| x144/x145 | H578/H579 | ✓ | |
| x144/x145 | E707 | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | Y715 | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | C719 | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | E729 | ✓ | |

aus den Experimenten mit Segment-A zeigte, dass mit Segment-B keine zusätzlichen Verknüpfungen im Bereich der Aminosäuresequenz des Segments-A detektiert wurden. Außerdem konnten wie erwartet, keine Vernetzungen zur C1-Domäne (Aminosäuren 853-903) identifiziert werden.

4.5 Modellierung der CaM/bMunc13-2-Interaktion

Die aus den Vernetzungsexperimenten erhaltenen Distanzbeschränkungen dienten als Grundlage für die Modellierung der CaM/bMunc13-2-Interaktion. Der Fokus wurde hierbei auf das Segment-A (AS 367-780) gelegt, da keine zusätzlichen vernetzten Aminosäuren im Bereich der C1-Domäne identifiziert wurden.

Zunächst wurde eine Sekundärstrukturanalyse des Segment-A mit Hilfe von PsiPred durchgeführt (Abbildung A13). Diese ergab eine überwiegend ungeordnete Struktur, wodurch eine *de novo*-Modellierung des gesamten Segment-A nicht möglich war. Außerdem konnte kein Homologiemodelling angewendet werden, da kein Templat aus der PDB identifiziert werden konnte. Somit wurde nur der Bereich der Aminosäuren 704-742 von bMunc13-2 (Segment-C) für die Modellierung verwendet, welcher in der PsiPred-Sekundärstrukturanalyse eine helikale Struktur aufwies. Segment-C enthält die C-terminale CaM-Bindestelle (AS 719-742) und 10 von 16 Vernetzungsprodukten (Tabelle 10), wobei nur DSBU- und Photo-Met-Vernetzungen in dieser Region identifiziert wurden.

Ergebnisse

Die Modellierung des CaM/Segment-C-Komplexes erfolgte mit ROSETTA¹⁵⁷ (Kapitel 3.5.2). Für CaM wurde die Struktur aus der PDB-Datei 2O60, eines Komplexes von CaM mit einem Peptid der NO-Synthetase, verwendet, während das Segment-C komplett modelliert wurde. 10.000 Modelle wurden generiert, welche anschließend mit den C_α-C_α-Distanzen aus den Vernetzungsexperimenten (8 Å für Photo-Met und 40 Å für DSBU) gefiltert wurden. Für DSBU wurde zum Zeitpunkt der Modellierung eine sehr hohe Flexibilität angenommen, wodurch die Distanz größer ist als ~30 Å¹⁵⁸. Die erhaltenen Modelle der Interaktion zwischen CaM und Segment-C zeigten für das Segment-C eine Struktur, welche aus zwei durch einen *Loop* verbundenen Helices besteht (Abbildung 35). Es konnten zwei sich gering voneinander unterscheidende Konformationen identifiziert werden, bei denen die N-terminale Helix leicht

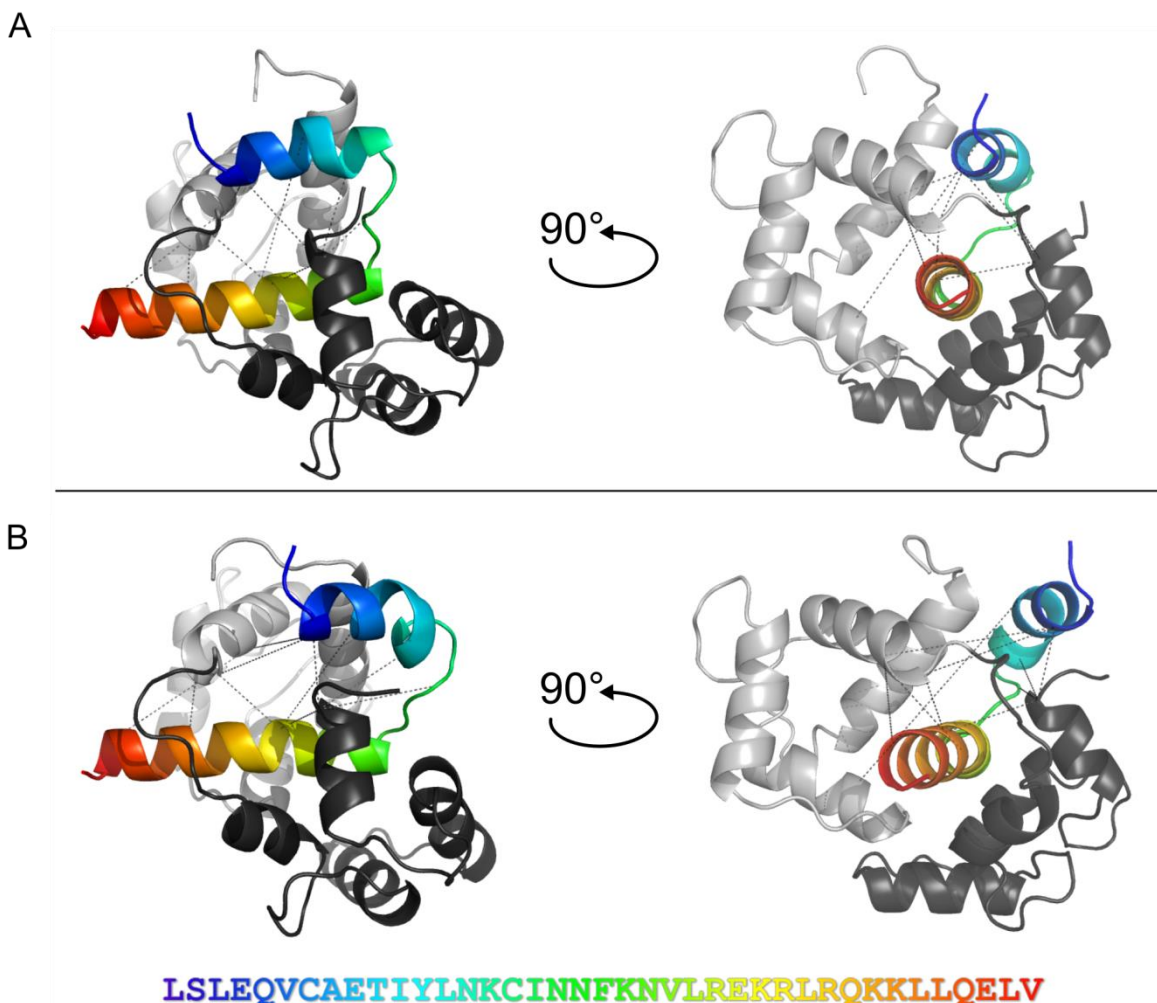


Abbildung 35: Modellierung der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-C. Die Modellierung der Interaktion von CaM mit Segment-C (AS 704-742) unter Berücksichtigung der ermittelten vernetzten Aminosäuren (gestrichelte Linien, Tabelle 10) resultierte in zwei leicht voneinander abweichenden Modellen. Segment-C und seine Aminosäuresequenz sind regenbogenfarben dargestellt (blau: N-Terminus, rot: C-Terminus). CaM ist in zwei Grautönen eingefärbt: hellgrau: N-terminale Domäne, dunkelgrau: C-terminale Domäne. Der N-Terminus des Segment-C interagiert mit (A) zentralen Aminosäuren (71-76) von CaM oder mit (B) dem C-Terminus von CaM.

in der Orientierung zu CaM abweicht. Sie interagiert in Modell A mit zentralen Aminosäuren (im Bereich 72-76) von CaM und in Modell B mit C-terminalen Aminosäuren des CaM.

Abschließend wurden die C_{α} - C_{α} -Distanzen der experimentell identifizierten vernetzten Aminosäuren in den beiden Modellen bestimmt (Tabelle 12) und mit den verwendeten Distanzbeschränkungen verglichen. Außer den beiden Vernetzungsprodukten zwischen den Aminosäuren x36-E712 und x71/x72-E740 befinden sich alle C_{α} - C_{α} -Distanzen bis auf eine kleine Abweichung von 1,8 Å im Bereich der maximalen Distanzen von 8 Å für Photo-Met und 40 Å für DSBU.

Tabelle 12: C_{α} - C_{α} -Distanzen der vernetzten Aminosäuren innerhalb der Modelle. x: Photo-Met. Grau: C_{α} - C_{α} -Distanzen, welche die maximal überbrückbaren Distanzen überschreiten (photo-Met: 8 Å, DSBU: 40 Å).

| Vernetzungsreagenz | Vernetzte Aminosäure CaM | Vernetzte Aminosäure bMunc13-2 | C_{α} - C_{α} -Distanz in Å Modell A | C_{α} - C_{α} -Distanz in Å Modell B |
|--------------------|--------------------------|--------------------------------|--|--|
| Photo-Met | x36 | E712 | 24,7 | 26,4 |
| | x71/x72 | E707 | 7,0 | 16,9 |
| | x71/x72 | E740 | 15,5 | 15,7 |
| | x76 | E707 | 6,7 | 15,0 |
| | x76 | E729 | 7,6 | 7,9 |
| | x144/x145 | E707 | 13,0 | 7,2 |
| | x144/x145 | Y715 | 11,5 | 9,3 |
| | x144/x145 | C719 | 8,1 | 11,7 |
| | x144/x145 | E729 | 11,6 | 9,8 |
| DSBU | K75 | K735 | 9,3 | 10,2 |

4.6 Verlängerung der C-terminalen CaM-Binderegion in bMunc13-2

Die durchgeführten Experimente deuteten auf eine Beteiligung der Region N-terminal (Aminosäuren 704-718) zur CaM-Bindestelle (AS 719-742) an der CaM/bMunc13-2-Interaktion hin (Abbildung 33). Zur Fokussierung auf diese Region, welche auch für die Modellierung (Kapitel 4.5) genutzt wurde, erfolgte die Synthese des im Modellierungsprozess verwendeten Segment-C. Hierbei wurde das Lysin 703 N-terminal an die Sequenz angefügt, um die Synthesestrategie zu vereinfachen.

Das Peptid wurde für verschiedene Ansätze zur Analyse der Interaktion mit CaM und der Bestätigung der Modelle (Kapitel 4.5) eingesetzt. Zum einen wurde die Interaktion mit CaM mit der chemischen Vernetzung überprüft und mittels MALDI-TOF-MS sowie nativer MS bestätigt. Zusätzlich wurde die Affinität zwischen CaM und Segment-C mit ITC analysiert, der K_D -Wert bestimmt und Verdrängungsstudien mit bMunc13-2-Peptiden aus vorherigen Studien durchgeführt⁵².

4.6.1 Chemische Vernetzung des CaM/bMunc13-2-Segment-C-Komplexes

Die Vernetzung des CaM/bMunc13-2 Segment-C-Komplexes erfolgte mit Photo-Met, DSBU und CDI. Photo-Met war hierbei das interessanteste Vernetzungsreagenz, da mit diesem die meisten vernetzten Aminosäuren mit Segment-A (AS 367-780) identifiziert wurden und zum Vergleich mit Segment-A verwendet werden konnten.

Zunächst wurde die Calciumabhängigkeit der Komplexbildung zwischen CaM und Segment-C über die Vernetzung mit Photo-Met analysiert. Dies diente zur Klärung, ob sich das Segment-C gleich zu den zuvor untersuchten Segment-A und-B (Kapitel 4.3.1 und 4.4) verhält. Die SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 36) zeigte eine vergleichbare Calciumabhängigkeit der Komplexbildung wie Segment-A (Abbildung 32B). Eine Interaktion zwischen CaM und Segment-C wurde ab einer Calciumkonzentration von 750 nM detektiert.

Die vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und Segment-C wurden für alle verwendeten Calciumkonzentrationen bestimmt (Tabelle A10) und mit denen aus den Experimenten mit Segment-A und Segment-B verglichen (Abbildung A14, Tabelle 13). Bis auf x36-E707, x71/x72-E729 und x124-E729 waren alle verknüpften Aminosäuren zwischen CaM und Segment-C identisch zu Segment-A und Segment-B. Von diesen drei Vernetzungen konnte nur die Verknüpfung x36-E707 (C_{α} - C_{α} -Distanzen von 9,5 und 9,9 Å) in den Modellen der CaM/bMunc13-2-Interaktion (Kapitel 4.5) unter Berücksichtigung einer hohen Flexibilität erfüllt werden (Tabelle A11).

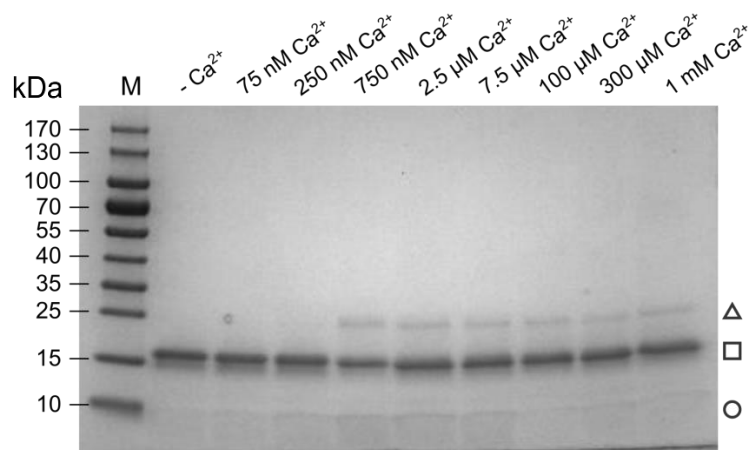


Abbildung 36: Calcium-Titrationsexperiment der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-C. Die Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen CaM und Segment-C wurde durch schrittweise Erhöhung der Calciumkonzentration bestimmt. Das Experiment erfolgte unter den identischen Bedingungen wie für Segment-A (Abbildung 32). Die Proteine wurden durch kolloidale Coomassie-Brillantblau -Färbung im Polyacrylamidgel (Gradient 4-20%) sichtbar gemacht. □: CaM, ○: Segment-C, Δ: CaM/Segment-C-Komplex, M: Molekulargewichtsstandard.

Zusätzlich wurde der CaM/Segment-C-Komplex mit DSBU und CDI vernetzt (Abbildung 37). Beide Vernetzungsreagenzien vernetzten Amin- und Hydroxygruppen, aber überbrücken unterschiedliche Distanzen.

Tabelle 13: Vergleich der mit Photo-Met vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und den drei verwendeten bMunc13-2-Segmenten. x: Photo-Met.

| Vernetzte Aminosäure CaM | Vernetzte Aminosäure bMunc13-2 | bMunc13-2 Segment-A | bMunc13-2 Segment-B | bMunc13-2 Segment-C |
|--------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| x36 | E707 | | | ✓ |
| x36 | D615 | ✓ | | |
| x36 | E712 | ✓ | | ✓ |
| x71/x72 | E707 | ✓ | ✓ | ✓ |
| x71/x72 | E729 | | | ✓ |
| x71/x72 | E740 | ✓ | ✓ | |
| x76 | H578 | ✓ | | |
| x76 | E707 | ✓ | ✓ | ✓ |
| x76 | E729 | ✓ | | ✓ |
| x124 | E729 | | | ✓ |
| x144/x145 | H578/H579 | ✓ | | |
| x144/x145 | E707 | ✓ | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | Y715 | ✓ | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | C719 | ✓ | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | E729 | ✓ | | ✓ |

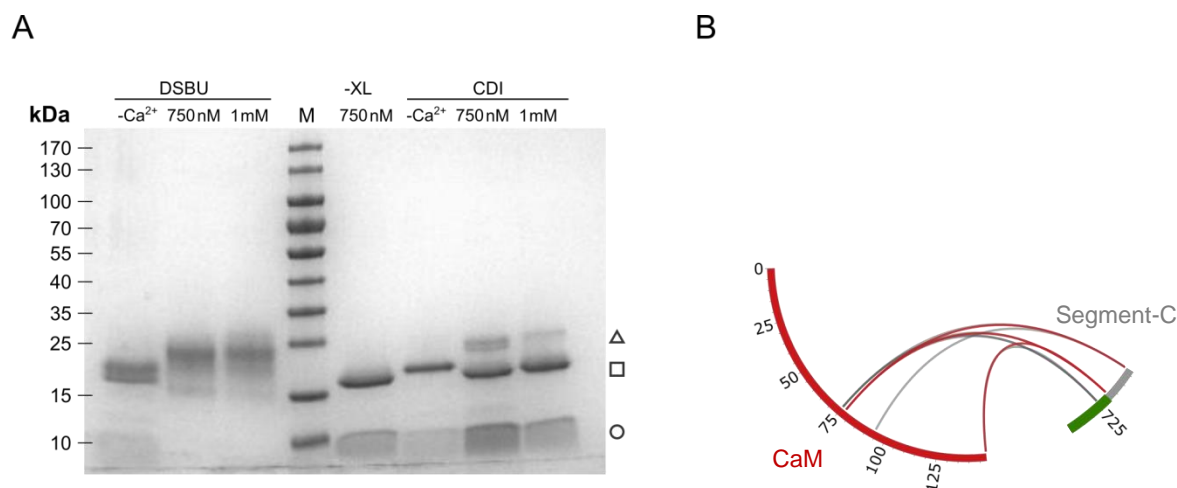


Abbildung 37: Analyse der Vernetzung von CaM mit bMunc13-2-Segment-C mit den Vernetzungsreagenzien DSBU und CDI. (A) SDS-PAGE-Analyse der Vernetzungsreaktion (Reaktionsbedingungen in Kapitel 3.3.1). M: Molekulargewichtsstandard, $-Ca^{2+}$: Probe ohne Calcium (5 mM EGTA), 750nM - 1 mM: Calciumkonzentration, □: CaM, ○: Segment-C, Δ: CaM/Segment-C-Komplex. (B) Zirkulärer Plot der vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und den Segment-C mit DSBU (grau) und CDI (rot). CaM ist in rot und Segment-C in grau mit grün hervorgehobener CaM-Bindestelle dargestellt (Färbung vgl. Abbildung 2). Alle vernetzten Aminosäuren sind in Tabelle A12 aufgelistet.

Ergebnisse

Die C_α-C_α-Distanzen der mit DSBU und CDI vernetzten Aminosäuren wurden mit Pymol bestimmt (Tabelle 14). DSBU kann eine C_α-C_α-Distanz von bis zu 30 Å^{156, 158} überbrücken, wodurch alle Distanzen, bis auf K94-K703, mit den beiden Modellen der CaM/Segment-C-Interaktion (Abbildung 35) übereinstimmen. Mit Hilfe von CDI sind C_α-C_α-Distanzen von bis zu 17 Å überbrückbar¹²⁶. Somit sind diese Distanzen ebenfalls, bis auf K77-K718, im Einklang mit beiden Modellen. Die Vernetzung des CaM/Segment-C-Komplexes mit DSBU wurde zusätzlich mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die mit DSBU vernetzte Probe wurde mit einer Probe ohne Vernetzungsreagenz verglichen (Abbildung 38). Neben CaM mit einem Signal bei *m/z* 16790 war auch ein Signal des nicht-kovalenten CaM/Segment-C-Komplexes bei *m/z* 21644 sichtbar. Diese Beobachtung lieferte einen ersten Hinweis auf eine starke Interaktion beider Proteine, da der Komplex während der MALDI-MS-Analyse stabil blieb. Zusätzlich ist die Vernetzung mit DSBU eindeutig im Massenspektrum erkennbar. Sowohl CaM im *m/z*-Bereich 16790-17900, als auch der CaM/Segment-C-Komplex im *m/z*-Bereich 22000-23000 wiesen charakteristische Signalmuster auf, welche auf die Vernetzung mit einem bis vier DSBU-Molekülen schließen ließen. Die Vernetzung mit DSBU führt zu einer Massenverschiebung von 214 u, welche eindeutig im Massenspektrum für CaM und den CaM/Segment-C-Komplex detektierbar war.

Tabelle 14: Vernetzte Aminosäuren des CaM/bMunc13-2-Segment-C-Komplexes mit DSBU und CDI. Für die Distanzmessung mit K703 wurde im Modell das C_α-Atom von L704 genutzt, da K703 im Modell nicht vorhanden ist. Somit muss eine maximale Abweichung der Distanz um ± 3.8 Å berücksichtigt werden. Grau: C_α-C_α-Distanzen, welche die maximal überbrückbare Distanz überschreiten (DSBU: 30 Å, CDI: 17 Å).

| Vernetzungsreagenz | Vernetzte Aminosäure CaM | Vernetzte Aminosäure bMunc13-2 Segment-C | Calciumkonzentration | | C _α -C _α -Distanz in Å Modell A | C _α -C _α -Distanz in Å Modell B |
|--------------------|--------------------------|--|----------------------|-----|---|---|
| | | | 750 nM | 1mM | | |
| DSBU | K75 | K703 | ✓ | ✓ | 14,2 | 22,1 |
| | K75 | K718 | ✓ | | 22,5 | 25,4 |
| | K75 | K724 | ✓ | | 17,2 | 18,8 |
| | K75/K77 | K718/724 | | ✓ | - | - |
| | K77 | K703 | ✓ | ✓ | 9,9 | 16,1 |
| | K77 | K718 | ✓ | | 17,8 | 22,6 |
| | K77 | K724 | ✓ | | 14,6 | 17,1 |
| | K94 | K703 | ✓ | ✓ | 36,4 | 36,1 |
| | K148 | K718 | ✓ | ✓ | 9,1 | 13,8 |
| | K148 | K724 | ✓ | | 14,2 | 14,2 |
| CDI | K77 | K703 | | ✓ | 9,9 | 16,1 |
| | K77 | K718 | ✓ | ✓ | 17,8 | 22,6 |
| | K148 | K718 | ✓ | ✓ | 9,1 | 13,8 |

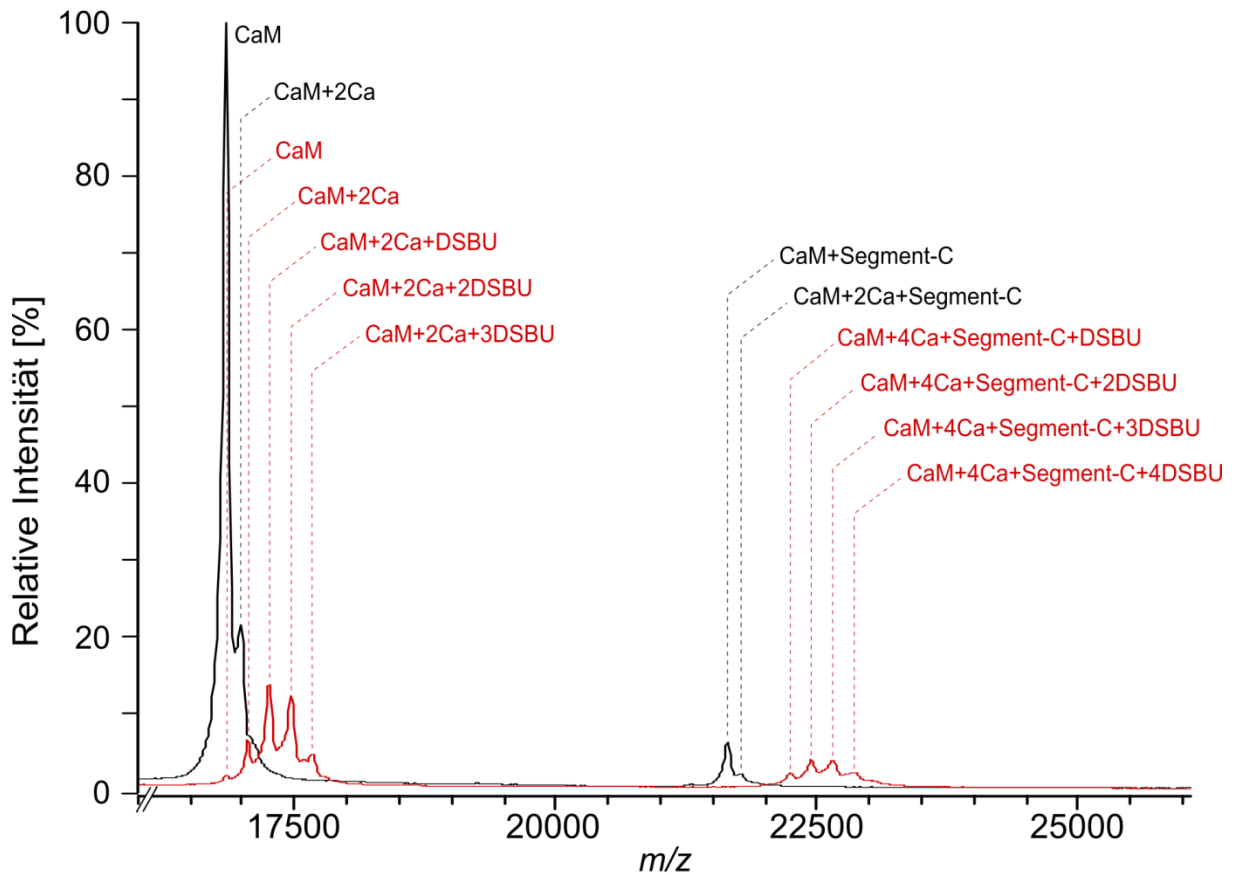


Abbildung 38: MALDI-TOF-MS des CaM/bMunc13-2-Segment-C-Komplexes. Schwarz: Kontrollprobe ohne Vernetzung, rot: mit DSBU vernetzte Probe. Calciumkonzentration: 1 mM. Alle Signale sind einfach geladene Ionen.

4.6.2 Affinitätsbestimmung der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2

Für die Bestimmung der Affinität zwischen CaM und bMunc13-2 unter Verwendung des Segment-C mittels ITC wurde ein Puffer für die Messungen ohne EGTA und CaCl_2 hergestellt, da dieses Chelatorsystem die Messung negativ beeinflusste. Die Calciumkonzentration war somit nur vom Calciumgehalt der Pufferkomponenten abhängig. Eine Bestimmung der Calciumkonzentration mit ICP-MS durch Dr. Martin Herzberg, Molekulare Mikrobiologie der Universität Halle-Wittenberg ergab eine Konzentration von $6,14 \mu\text{M Ca}^{2+}$.

Die Bestätigung der Komplexbildung in diesem Puffer, wurde mittels nativer PAGE und Photo-Met-Cross-Linking durchgeführt. Hierfür wurden rekombinant hergestelltes Photo-Met-CaM sowie bovines CaM verwendet. Als Vergleich wurde ein Reaktionsansatz mit EGTA versetzt, um calciumfreie Reaktionsbedingungen zu erhalten.

Für die native PAGE wurde auf SDS in allen Pufferlösungen verzichtet. Zusätzlich erfolgte die Probenvorbereitung ohne Zugabe von β -Mercaptoethanol sowie ohne Erhitzen der Probe

Ergebnisse

vor der Analyse, um eine Denaturierung und eine damit verbundene Dissoziation des Komplexes zu vermeiden. Der verwendete Proteinstandard wurde für die PAGE aus globulären Proteinen hergestellt (Kapitel 3.2.7), um eine Abschätzung des Molekulargewichtes des CaM/Segment-C Komplexes zu ermöglichen. Die Analyse mittels nativer PAGE zeigte eine eindeutige Komplexbildung zwischen beiden CaM-Spezies (Photo-Met-CaM und bovines CaM) und Segment-C (Δ , Abbildung 39A), was eine Interaktion beider Proteine im ITC-Puffer bestätigte. Die durchgeführte Vernetzungsreaktion mit Photo-Met ergab ein identisches Ergebnis, bei dem der kovalente Komplex zwischen Photo-Met-CaM und Segment-C detektiert werden konnte (Abbildung 39B). In der Kontrollprobe mit bovinem CaM wurde kein Komplex beobachtet, da hier kein Photo-Methionin enthalten war und somit keine kovalente Verknüpfung zwischen CaM und Segment-C erfolgen konnte. Beide Methoden (native PAGE und Vernetzung mit Photo-Met) bestätigten eine Komplexbildung zwischen CaM und Segment-C unter Verwendung des ITC-Puffers.

Zur Analyse der Affinität von Segment-C an CaM wurde eine ITC-Messung durchgeführt. Dabei wurde bovines CaM und das Segment-C im ITC-Puffer vorbereitet, um Einflüsse des Puffers auf die Messung auszuschließen. Die Resultate der ITC-Messung sind in Abbildung 39C dargestellt und zeigten eine 1:1-Stöchiometrie der CaM/Segment-C-Interaktion mit einem N-Wert von 1,04 und einer Affinität im nanomolaren Bereich ($K_D = 43 \pm 8$ nM).

Eine weitere Überprüfung der Stabilität des Komplexes zwischen CaM und Segment-C erfolgte mittels nativer MS. Hierfür wurde die in der ITC-Messung verwendete Proteinlösung (3,33 μ M CaM, 12 μ M Segment-C) einem Pufferaustausch zu Ammoniumacetat unterzogen. Das Massenspektrum des Komplexes (Abbildung 40A) zeigt Signale von CaM, Segment-C und dem CaM/Segment-C-Komplex. Nach Isolation des CaM/Segment-C Komplexes bei m/z 3118 und Erhöhung der Kollisionsenergie von 10 auf 70 V konnte eine Dissoziation des Komplexes beobachtet werden (Abbildung 40B, nur 10 V, 50 V und 70 V sind dargestellt). Auffällig war hierbei, dass eine Kollisionsenergie von mindestens 50 V angewendet werden musste, um eine Dissoziation des Komplexes zu erreichen. Diese Beobachtung bestätigte die hohe Affinität zwischen CaM und dem Segment-C.

Zusätzlich konnte mittels nativer MS die Calciumabhängigkeit der Interaktion verifiziert werden. Nach Zugabe von EGTA wurden Calciumionen komplexiert, welche dadurch nicht mehr für die Komplexbildung zwischen CaM und Segment-C zur Verfügung standen. Wie

erwartet, konnte der Komplex zwischen CaM und Segment-C nach Zugabe von EGTA nicht mehr detektiert werden (Abbildung 40C).

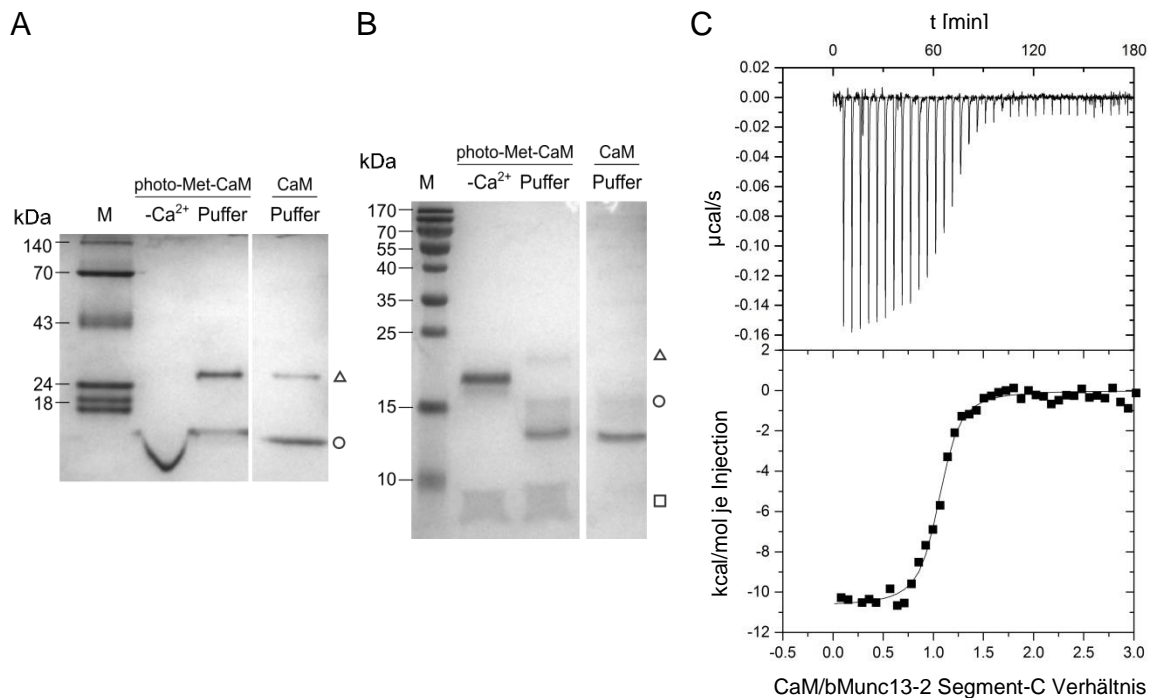


Abbildung 39: Charakterisierung der CaM/bMunc13-2-Segment-C-Interaktion mittels nativer PAGE, Vernetzung mit photo-Met und ITC. (A/B) Die Proteine wurden in einem 15 %igen Polyacrylamidgel getrennt und mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. M: Molekulargewichtsstandard, □: CaM, ○: bMunc13-2 Segment-C, Δ: CaM/Segment-C-Komplex. (A) Native PAGE. Molekulargewichtsstandard: β-Lactoglobulin, 18,4 kDa (Doppelsignal); Trypsininhibitor, 24 kDa; Ovalbumin, 42,9 kDa; Humanalbumin 69,3 kDa (Dimer ~140 kDa). Das gekrümmte Signal von CaM in der EGTA-Probe ist durch den Calciumgehalt der beiden benachbarten Spuren bedingt. (B) SDS-PAGE-Analyse der Interaktion zwischen Photo-Met-CaM/bovinem CaM und Segment-C ohne Calcium und in ITC-Puffer. (C) ITC-Messung der Interaktion zwischen CaM und Segment-C. CaM wurde in der Messzelle in einer Konzentration von 4 μM vorgelegt und das Segment-C (80 μM) in 5 μl-Schritten zugegeben. Die Parameter der beobachteten Interaktion sind wie folgt: $N = 1.04$, $K_D = 43 \pm 8 \text{ nM}$, $\Delta H = 10.68 \pm 0.1716 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta S = -2.12 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$.

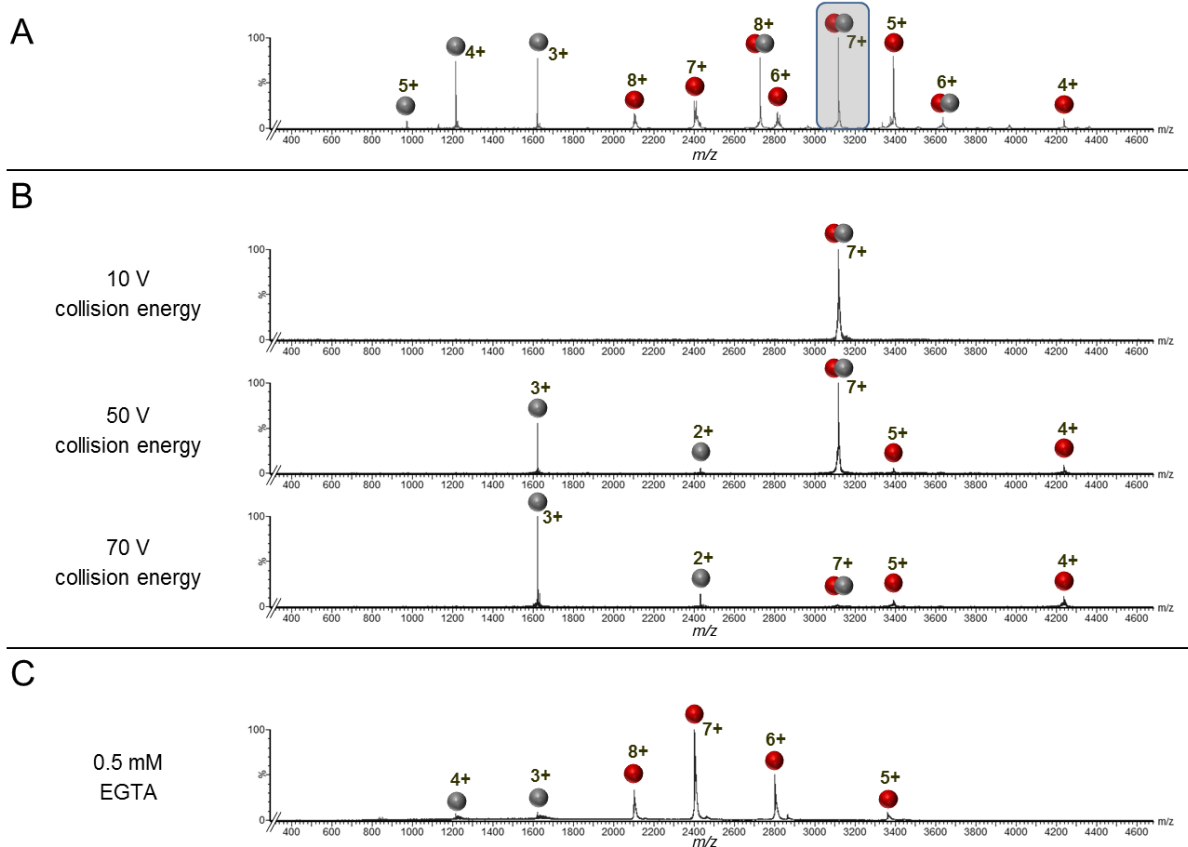


Abbildung 40: Native Massenspektrometrie des CaM/bMunc13-2-Segment-C-Komplexes. (A) Analyse der für die ITC-Messung verwendeten CaM/Segment-C-Lösung. (B) Die siebenfach geladene Spezies des Komplexes bei m/z 3118 (in (A) grau hinterlegt) wurde isoliert und mit steigender Kollisionsenergie (10-70 V) dissoziiert. (C) Als Kontrolle wurde der Probe EGTA zugegeben, um die Komplexbildung zu unterbinden. Rot: CaM, grau: Segment-C. Der Komplex zwischen CaM und Segment-C wurde in 300 mM Ammoniumacetat analysiert. Die Kollisionsenergie betrug für (A) und (C) 10 V.

4.6.3 Verdrängungsstudien mit bMunc13-2-Segment-C-Varianten

Parallel zu den Arbeiten in dieser Dissertation wurden Verdrängungsexperimente mit CaM und Segment-C am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in der Arbeitsgruppe von Dr. Olaf Jahn in Göttingen durchgeführt. So sollte der Einfluss der N-terminalen Verlängerung der CaM-Bindestelle (AS 719-742) auf die Bindung von bMunc13-2 an CaM untersucht werden. Diese Experimente sind nachfolgend beschrieben.

Für die Verdrängungsstudien wurden folgende Varianten des Segment-C verwendet: Segment-C (AS 703-742), Segment-CS (eine verkürzte Variante von Segment-C aus vorherigen Studien, welches nur die CaM-Bindestelle enthält, AS 719-742)^{52, 53}, Segment-CL (ein C-terminal zur CaM-Bindestelle verlängertes Peptid, AS 719-752)¹⁵⁹, sowie *p*-Benzoylphenylalanin (Bpa)-enthaltende Varianten von Segment-C und Segment-CS (Tabelle 15).

Tabelle 15: Varianten des bMunc13-2-Segment-C. Bpa ist als **u** in den Sequenzen gekennzeichnet.

| Aminosäuresequenzen | Varianten des Segment-C |
|---|-------------------------|
| 703 KLSLEQVCAETIYLNKCINNFKNVLREKRLRQKKLLQELV $_{742}$ | Segment-C |
| 703 KLSLEQVCAETIYLNKCINN <u>u</u> KNVLREKRLRQKKLLQELV $_{742}$ | Segment-C-Bpa |
| 719 CINNFKNVLREKRLRQKKLLQELV $_{742}$ | Segment-CS |
| 719 CINN <u>u</u> KNVLREKRLRQKKLLQELV $_{742}$ | Segment-CS-Bpa |
| 719 CINNFKNVLREKRLRQKKLLQELVQTASHLSVED $_{752}$ | Segment-CL |

Zum Vergleich der Komplexbildung zwischen CaM und verschiedenen Segment-C Varianten, wurden zwei Varianten mit der photo-reaktiven Aminosäure Bpa erstellt (Segment-C-Bpa und Segment-CS-Bpa⁵²). Unter UV-A-Bestrahlung bildet Bpa eine kovalente Verknüpfung zu Aminosäuren in naher räumlicher Umgebung (C_{α} - C_{α} -Distanz bis zu 14 Å⁵²), wodurch ein Komplex zwischen CaM und den Bpa-Segment-C-Varianten fixiert wird und mit Hilfe von SDS-PAGE oder MS nachgewiesen werden kann. Wird beispielsweise das Segment-C-Bpa von Segment-C aus der Bindung mit CaM verdrängt, so ist dies an einem verringerten Signal des Segment-C-Bpa/CaM-Komplexes erkennbar. Je stärker die Bindung des Segment-C an CaM, desto mehr wird Segment-C-Bpa verdrängt und das Signal des CaM/Segment-C-Bpa-Komplexes nicht mehr oder schwächer detektiert.

Bpa wird vornehmlich an Stelle großer hydrophober Aminosäuren eingebaut, um einen Effekt des Einbaus auf die Struktur und Funktion des Proteins zu minimieren¹³³. Daher wurde Bpa an Stelle des Phenylalanins an Position 723 eingebaut, da diese als große, hydrophobe Ankeraminosäure in bMunc13-2 bekannt ist⁵².

Zunächst wurde die Verdrängung von Segment-C-Bpa aus der Interaktion mit CaM durch die Varianten Segment-C, Segment-CS und Segment-CL untersucht (Abbildung 41A). Dieses Experiment zeigte eine starke Verdrängung von Segment-C-Bpa aus dem Komplex mit CaM durch die Zugabe von Segment-C. Bereits bei einer niedrigen Konzentration von 5 µM Segment-C war eine Verringerung des Signals von CaM/Segment-C-Bpa detektierbar. Um die Bpa-Variante vollständig zu verdrängen, war eine Konzentration von 250 µM Segment-C erforderlich. Sowohl Segment-CS als auch Segment-CL konnten die Interaktion von Segment-C-Bpa mit CaM nicht unterdrücken.

Vergleichend wurde dasselbe Experiment mit Segment-CS-Bpa durchgeführt (Abbildung 41B). Bei diesem wurde überraschenderweise bereits bei einer Zugabe von 5 µM Segment-C die Interaktion des Segment-CS-Bpa mit CaM komplett unterdrückt. Es konnte

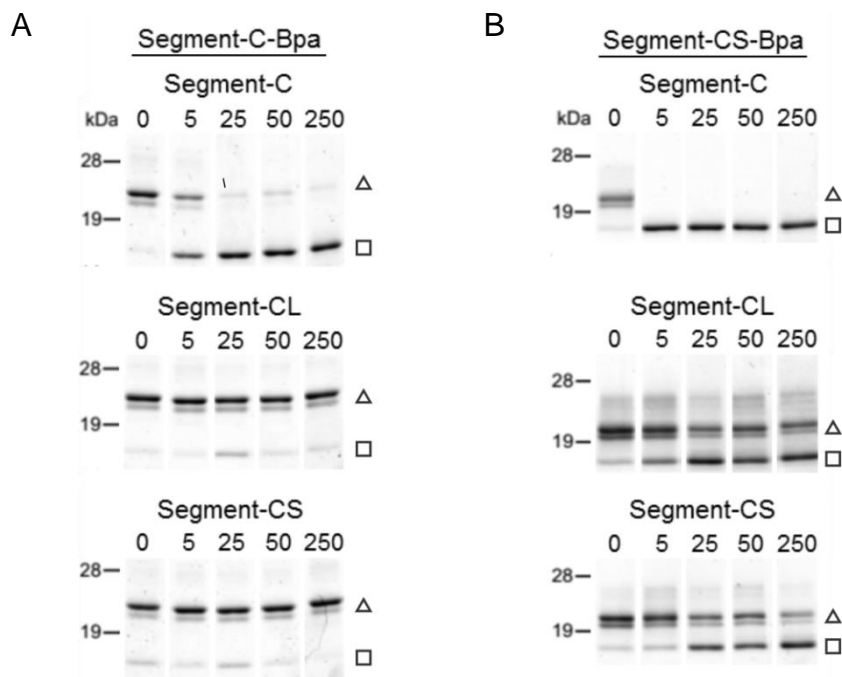


Abbildung 41: Verdrängungsexperimente zur Analyse der Bindung von *bMunc13-2*-Segment-C-Bpa-Varianten an CaM. Dargestellt sind die SDS-PAGE-Analysen der Verdrängungsexperimente von (A) Segment-C-Bpa und (B) Segment-CS-Bpa. 5 μ M CaM und 5 μ M Segment-C-Bpa bzw. Segment-CS-Bpa wurden mit 0-250 μ M einer weiteren Segment-C-Variante unter Anwesenheit von 200 μ M Calcium inkubiert. Nach UV-A-Bestrahlung wurden die Proteine mit einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Coomassie-Brillantblau angefärbt. 0-250: Konzentration in μ M der zugegebenen Segment-C-Varianten (Segment-C, Segment-CS und Segment-CL). Die Aminosäuresequenzen der Segment-C-Varianten sind in Tabelle 15 gezeigt. \square : CaM, Δ : CaM/Segment-C-Bpa-Komplex bzw. CaM/Segment-CS-Bpa-Komplex. Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Olaf Jahn (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) durchgeführt.

kein Signal für diesen Komplex detektiert werden, was auf einen starken Einfluss der *N*-terminalen Verlängerung des Segment-C hindeutet. Segment-CS konnte Segment-CS-Bpa nur wenig verdrängen und Segment-CL wies ebenfalls nur eine geringere Unterdrückung des Signals auf.

Die Verdrängung der Bpa-Varianten mit Segment-C war am stärksten. Die verbleibenden Segment-C Varianten zeigten eine deutlich schwächere oder keine Verdrängung, welche den Einfluss der *N*-terminalen Verlängerung der CaM-Bindestelle (AS 719-742), die nur in Segment-C enthalten ist, unterstreicht.

4.7 Charakterisierung der C-terminalen CaM-Bindestelle in bMunc13-2

Nachdem der Einfluss der N-terminalen Verlängerung der CaM-Bindestelle (AS 719-742) auf die Interaktion mit CaM in Experimenten mit dem entsprechenden Segment-C (703-742) eindeutig gezeigt wurde (Abbildung 41), erfolgte eine detailliertere Analyse der hydrophoben Aminosäuren in diesem Bereich. Da die Interaktion mit CaM über hydrophobe Ankeraminosäuren erfolgt, wurden drei mögliche Interaktionsstellen, V709, I714 und F723, für die weitere Analyse gewählt. In vorigen Studien zur Identifizierung calciumabhängiger CaM-Interaktionspartner wurden hydrophobe Aminosäuren in der Binderegion mit Asparaginsäure ersetzt¹⁶⁰⁻¹⁶³ oder mögliche interagierende Aminosäuren deletiert^{164, 165}. Davon ausgehend wurde ein Austausch der hydrophoben Aminosäuren in bMunc13-2 zu Asparaginsäure gewählt.

4.7.1 Austausch der hydrophoben Aminosäuren 709, 714 und 723 in bMunc13-2-Segment-C

Die Varianten von Segment-C wurden zunächst mit den entsprechenden ausgetauschten Aminosäuren (V709D, I714D und F723D) synthetisiert (Tabelle 16). Erste Vernetzungsexperimente mit Photo-Met-CaM zeigten zunächst keinen Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren auf die Bindung an CaM (Abbildung 42). Die SDS-PAGE-Analysen waren vergleichbar und zeigten für alle Segment-C-Varianten eine Komplexbildung mit CaM unter Anwesenheit von Calcium (750 nM bis 1 mM). Auch die vernetzten Aminosäuren, welche in Abbildung 42B und Tabelle A12-A15 für alle Calciumkonzentrationen zusammengefasst sind, waren nahezu identisch. Auffallend war hierbei zudem, dass die eingeführten Asparaginsäureseitenketten ebenfalls, vermutlich aufgrund der bevorzugten Reaktion von Photo-Met mit sauren Aminosäuren¹²⁸, vernetzt wurden.

Tabelle 16: Varianten des bMunc13-2-Segment-C mit ausgetauschten Aminosäuren

| Aminosäuresequenzen | Varianten des Segment-C |
|---|-------------------------|
| <small>703</small> KLSLEQVCAETIYLNKCINNFKNVLREKRLRQKKLLQELV ₇₄₂ | Segment-C |
| <small>703</small> KLSLEQ D CAETIYLNKCINNFKNVLREKRLRQKKLLQELV ₇₄₂ | Segment-C-V709D |
| <small>703</small> KLSLEQVCAET D YLNKCINNFKNVLREKRLRQKKLLQELV ₇₄₂ | Segment-C-I714D |
| <small>703</small> KLSLEQVCAETIYLNKCINN D KNVLREKRLRQKKLLQELV ₇₄₂ | Segment-C-F723D |

Ergebnisse

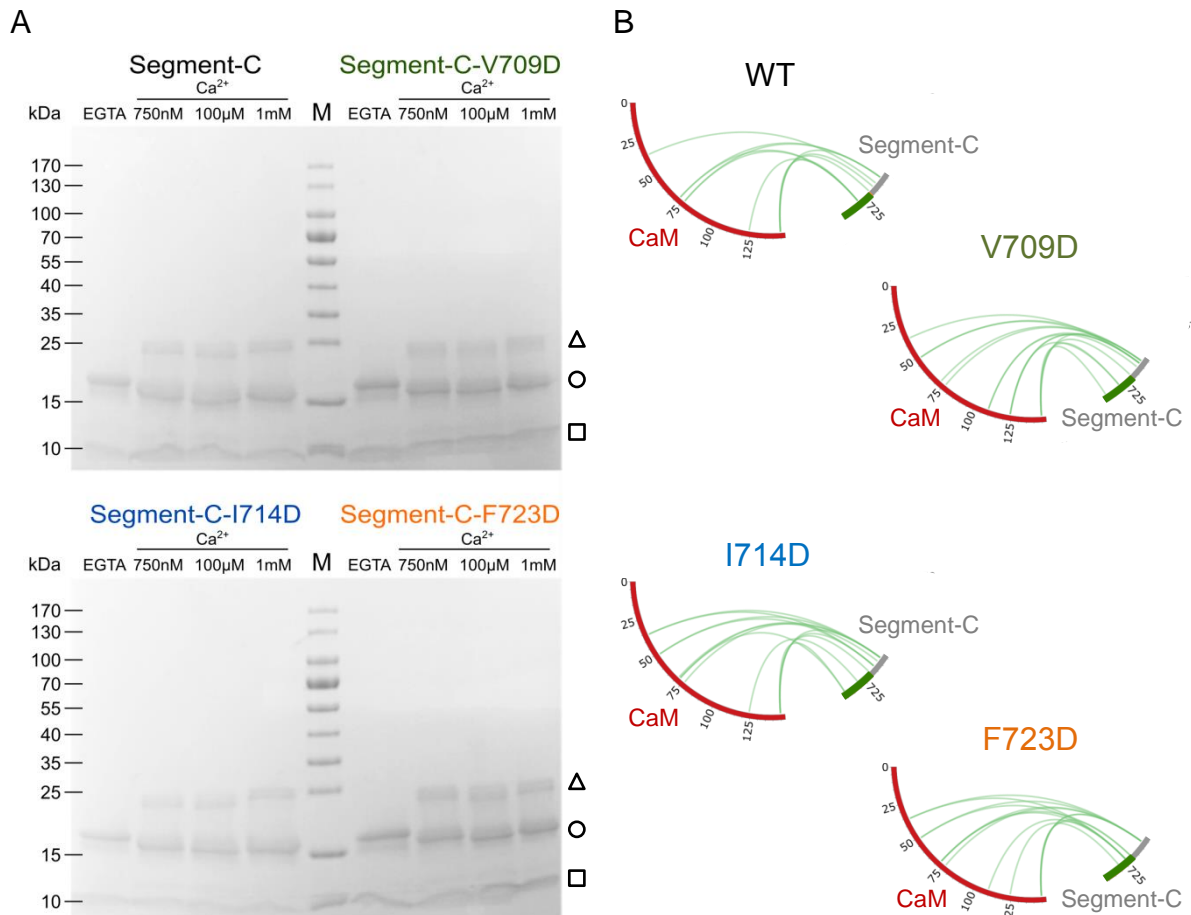


Abbildung 42: Vernetzung der Varianten von bMunc13-2-Segment-C mit Photo-Met-CaM. Alle Varianten von Segment-C wurden analog zu 3.3.2 mit CaM bei drei verschiedenen Calciumkonzentrationen vernetzt. Die Probe EGTA (5 mM EGTA) diente dabei als Kontrolle, in welcher der Komplex aufgrund des fehlenden Calciums nicht gebildet wurde. (A) SDS-PAGE-Analyse mit einem Polyacrylamidgel (Gradient 4-20%). Die Proteine wurden durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung angefärbt. M: Molekulargewichtsstandard, □: CaM, ○: Segment-C, Δ: CaM/Segment-C-Komplex. (B) Graphische Darstellung der vernetzten Aminosäuren zwischen Photo-Met-CaM und den Segment-C-Varianten. WT: Wildtyp von Segment-C. CaM ist in rot und Segment-C in grau mit grün hervorgehobener CaM-Bindestelle (Färbung vgl. Abbildung 2) dargestellt. Alle vernetzten Aminosäuren der Segment-C-Varianten sind in den Tabellen A12-A15 aufgelistet.

Um den Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren weiter zu untersuchen, wurden weitere Verdrängungsexperimente mit Segment-C-Bpa, Segment-C und den Segment-C Varianten (V709D, I714D und F723D) durchgeführt (Abbildung 43). Segment-C-Bpa konnte erwartungsgemäß erneut durch Segment-C von der Interaktion mit CaM verdrängt werden, wobei die Verdrängung bereits ab einer Konzentration von 5 µM Segment-C erfolgte. Im Vergleich dazu ist die Verdrängung von Segment-C-Bpa durch Segment-C-V709D und -I714D deutlich geringer als für Segment-C. Auch bei 250 µM Segment-C-V709D und -I714D war keine vollständige Verdrängung des Segment-C-Bpa aus dem Komplex mit

CaM möglich. Der stärkste Effekt konnte bei Segment-C-F723D beobachtet werden. Segment-C-F723D konnte Segment-C-Bpa nicht verdrängen. Der Komplex zwischen Segment-C-Bpa und CaM blieb stabil und auch eine Konzentration von 250 μM Segment-C-F723D zeigte keine Intensitätsänderung des Komplexsignals. Der Austausch der hydrophoben Aminosäuren an Positionen 709, 714 und 723 zu Asparaginsäure verringerte somit die Bindung der Varianten an CaM und deutete auf eine geringere Affinität der Segment-C-Varianten zu CaM im Vergleich zum Segment-C hin.

Zur Bestimmung der Affinität von Segment-C und seinen Varianten (V709D, I714D und F723D) zu CaM wurden SPR-Messungen durchgeführt. Für die Messung wurde ein PEG-Biotin-Chip genutzt, welcher zunächst mit Streptavidin modifiziert wurde. Parallel wurde Photo-Met-CaM *N*-terminal mit NHS-LC-Biotin modifiziert, so dass CaM mit Hilfe der LC-Biotin-Gruppe an Streptavidin immobilisiert werden konnte. Die Biotinylierung von CaM wurde vor der Injektion auf die Chipoberfläche mittels MALDI-TOF-MS analysiert (Abbildung 44). Zum Vergleich wurde auch nicht-modifiziertes CaM untersucht. Das Massenspektrum zeigte eine eindeutige Modifikation von CaM (m/z 17774) mit einem (m/z 18113) bzw. zwei (m/z 18452) LC-Biotin-Molekülen, wobei die Modifikation mit LC-Biotin zu einer Massenverschiebung von 339 u führt. Die Spezies mit einem LC-Biotin-Molekül war die dominanteste und ließ darauf schließen, dass diese vorrangig in der Lösung vorlag. Das modifizierte CaM wurde nun an Streptavidin immobilisiert, wodurch die Oberfläche für die Affinitätsuntersuchungen vorbereitet war.

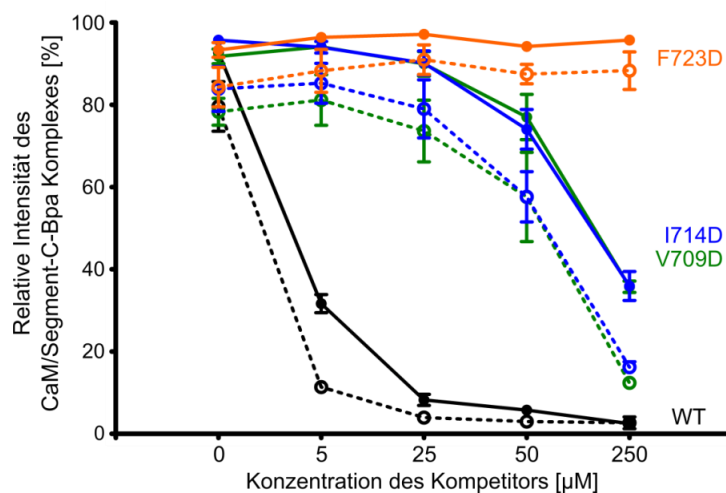


Abbildung 43: Verdrängung von *bMunc13-2*-Segment-C-Bpa aus der Interaktion mit CaM. Durchgehende Linie: Signalintensität des CaM/Segment-C-Bpa-Komplexes in der SDS-PAGE, gestrichelte Linie: Peakfläche des CaM/Segment-C-Bpa-Komplexes der MALDI-TOF-MS-Analyse. Die Segment-C-Varianten sind in schwarz, grün, blau und orange dargestellt. WT: Wildtyp von Segment-C. Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Olaf Jahn (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) durchgeführt.

Ergebnisse

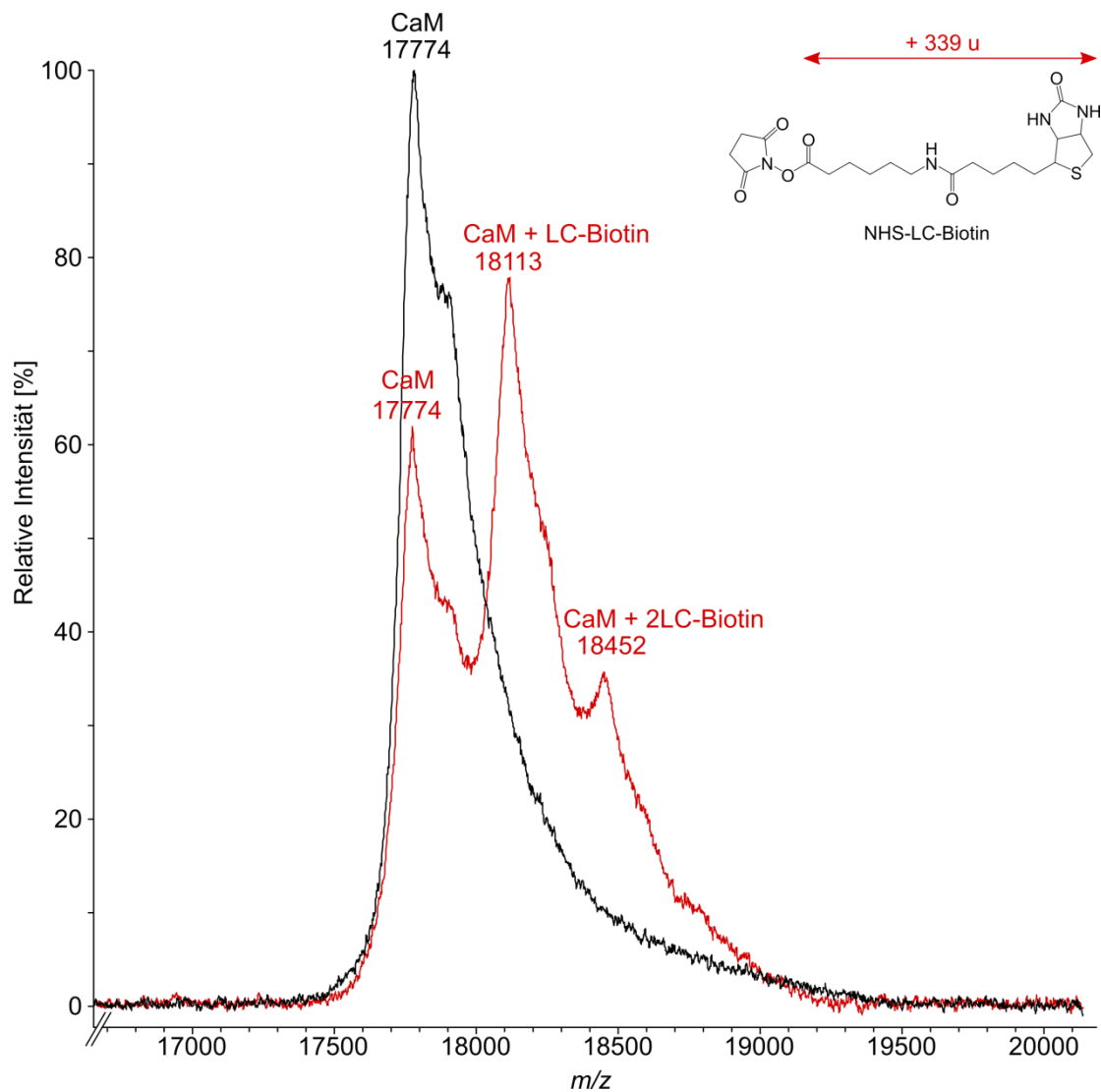


Abbildung 44: Nachweis der Biotinylierung des Photo-Met-CaM mittels MALDI-TOF-MS. Photo-Met-CaM (schwarz) und biotinyliertes Photo-Met-CaM (rot) wurden analysiert. Photo-Met-CaM besitzt ein Molekulargewicht von ~17,8 kDa, welches durch die Modifikation mit LC-Biotin um 339 u je Molekül erhöht wird. Alle Signale sind einfach geladene Ionen.

Segment-C und die drei Varianten (V709D, I714D und F723D) wurden in aufsteigender Konzentration für die SPR-Analyse injiziert. Die aufgenommenen Sensogramme und ermittelten K_D -Werte sind in Abbildung 45 dargestellt. Während Segment-C eine deutliche Interaktion mit CaM zeigte, wiesen Segment-C-V709D und -I714D geringere Affinitäten auf. Deutlich wurde diese Beobachtung durch die flacheren Kurvenverläufe und die berechneten K_D -Werte von Segment-C-V709D und -I714D im Vergleich zu Segment-C. Während die K_D -Werte von Segment-C-V709D (466 nM) und Segment-C-I714D (416 nM) ähnlich waren, betrug der K_D -Wert für Segment-C nur 159 nM. Besonders stark war der Einfluss des Austausches der hydrophoben Aminosäure F723. Für Segment-C-F723D konnte nur eine sehr schwache Interaktion mit CaM detektiert werden, welche eine Bestimmung des K_D -Wertes nicht zuließ.

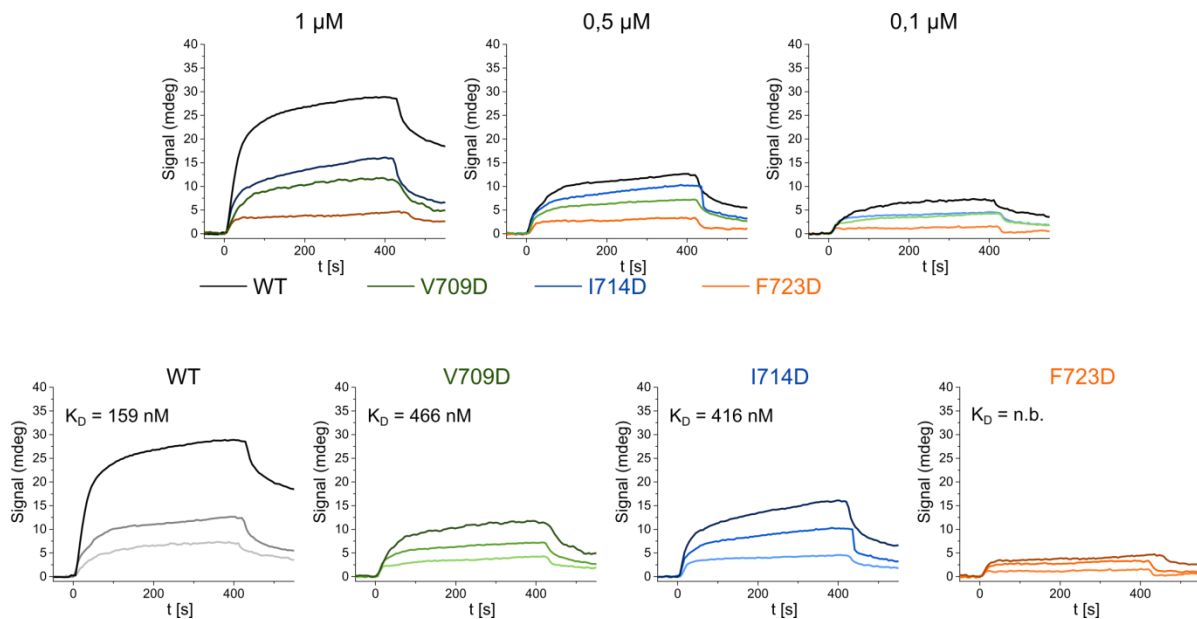


Abbildung 45: Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie der Interaktion von CaM mit bMunc13-2-Segment-C und seinen Varianten (V709D, I714D und F723D). Die SPR-Messung wurde mit einem PEG-Biotin-Chip durchgeführt, an den Streptavidin und biotinyliertes CaM immobilisiert wurden. Die Messungen erfolgten mit 0,1, 0,5 und 1 μM Segment-C (WT) und dessen drei Varianten (V709D, I714D und F723D). Aus den unteren Graphen wurden K_D -Werte mit Hilfe der TraceDrawer-Software berechnet. n.b.: nicht bestimmbar.

4.7.2 Austausch der hydrophoben Aminosäuren 709, 714 und 723 in bMunc13-2-Segment-A

Nachdem für Segment-C ein Einfluss der N-terminalen Region zur C-terminalen CaM-Bindestelle (AS 719-742) eindeutig bestätigt worden war, sollte dieser nun auch mit dem längeren Segment-A (AS 367-780, Abbildung 20, Seite 63) überprüft werden. Dazu wurden die drei Mutationen in die Plasmid-DNA für die Expression des rekombinanten Segment-A mit Hilfe von ortsgerichteter Mutagenese (Kapitel 3.1.5) eingeführt (daraus resultierten Segment-A-V709D, Segment-A-I714D und Segment-A-F723D). Die anschließende Expression der drei Varianten in *E. coli* BL31(DE3) Codon Plus-Zellen und die Reinigung aus *E. coli*-Zelllysate erfolgte analog zu Kapitel 4.1.

Zur Analyse der Interaktion zwischen CaM und den Segment-A-Varianten, wurde eine chemische Vernetzung mit Photo-Met durchgeführt. Es wurde eine Calciumkonzentration von 750 nM eingestellt und die Vernetzung analog zu den vorherigen Photo-Met-Experimenten durchgeführt. Die vernetzten Aminosäuren der einzelnen Segment-A-Varianten mit CaM wurden analysiert und in zirkulären Darstellungen visualisiert (Abbildung 46). Zum Vergleich sind in der Abbildung auch die vernetzten Aminosäuren des Segment-A mit CaM bei 750 nM Ca^{2+} dargestellt.

Ergebnisse

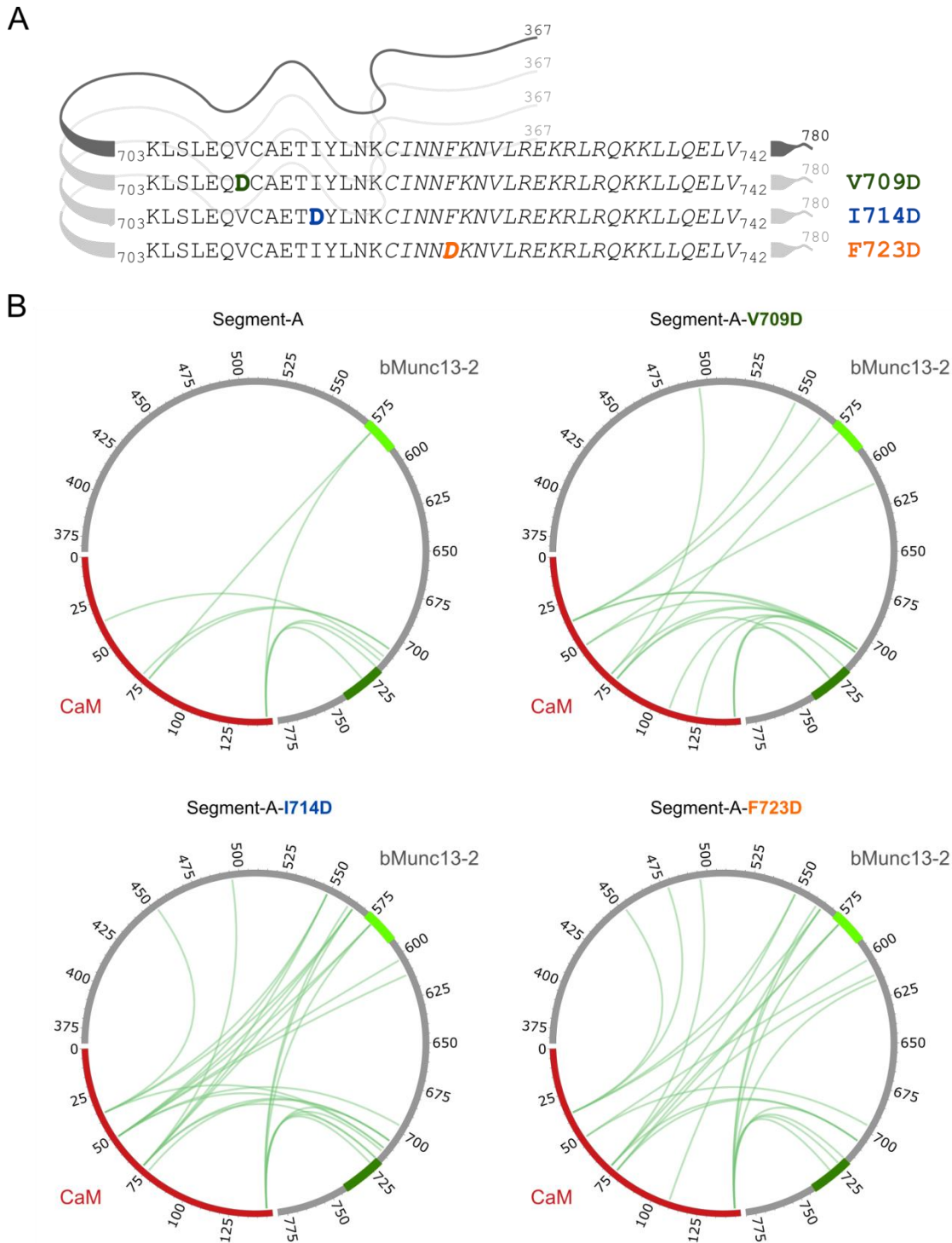


Abbildung 46: Vernetzung von bMunc13-2-Segment-A und dessen Varianten bei 750 nM Calcium. (A) Verwendete Varianten des Segment-A. In der Aminosäuresequenz der N-terminal verlängerten Binderegion (Segment-C) ist die bekannte Bindestelle kursiv hervorgehoben. Die einzelnen Mutationen sind farblich markiert und entsprechen demselben Farbschema wie in Kapitel 4.7.1. (B) Zirkuläre Darstellung der identifizierten vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und Segment-A bzw. seinen Varianten bei 750 nM Ca^{2+} . CaM ist in rot und Segment-A ist in grau dargestellt. CaM-Bindestellen sind in grün hervorgehoben (vgl. Abbildung 2). Alle vernetzten Aminosäuren der Segment-A-Varianten sind in den Tabellen 10 und A16-A18 aufgelistet.

Trotz Austausch von hydrophoben Aminosäuren (V709D, I714D und F723D) in der Region AS 703-742, konnten vernetzte Aminosäuren in dieser Region detektiert werden, was mit den Beobachtungen aus den Vernetzungsexperimenten mit den Segment-C-Varianten übereinstimmt (Abbildung 42). Wie für Segment-C wurden ebenfalls die eingeführten Asparaginseitenketten vernetzt. Interessanterweise konnten durch die Einführung der Mutationen verstärkt vernetzte Aminosäuren in der Region der *N*-terminalen CaM-Bindestelle (AS 572-574) detektiert werden. In Segment-A (Abbildung 46B, links oben) wurden nur einzelne vernetzte Aminosäuren in dieser Region beobachtet. Im Vergleich dazu zeigte der Austausch von V709 zu Asparaginsäure jedoch eine höhere Anzahl von vernetzten Aminosäuren in dieser Region. Besonders stark war dieser Effekt der erhöhten Vernetzung der *N*-terminalen CaM-Bindestelle (AS 572-574) bei den Mutationen von I714D und F723D. Bei beiden sind noch immer kovalent gebundene Aminosäuren zwischen CaM und der bMunc13-2-Sequenz 703-742 zu beobachten, jedoch konnte zusätzlich eine erhöhte Anzahl von vernetzten Aminosäuren innerhalb und benachbart zur *N*-terminalen CaM Bindestelle (AS 572-594) identifiziert werden.

5 Diskussion

5.1 Einbau von Photo-Met in rekombinant hergestelltes Calmodulin

Für die Vernetzung von Proteinen ist es von Vorteil, verschiedene Reagenzien zu verwenden, welche unterschiedliche Distanzen zwischen den verknüpften Aminosäuren überbrücken können. Sehr kurze Distanzen können durch den Einbau von photo-reaktiven Aminosäuren, wie Photo-Met, erhalten werden. Dazu sollte das zu verwendende Protein möglichst viele Methionine enthalten, welche durch das photo-reaktive Analogon ersetzt werden können. CaM wurde für den Einbau von Photo-Met gewählt, da es neun Methionine innerhalb seiner 148 Aminosäuren umfassenden Sequenz besitzt, was einem Methioningehalt von 6 % entspricht. Dieser ist im Vergleich zum durchschnittlichen Methioningehalt von 2,3 %¹⁶⁶ in Proteinen sehr hoch. Durch die möglichen Positionen in CaM (M36, M51, M71, M72; M76, M109, M124, M144 und M145) für den Einbau des photo-reaktiven Methioninanalogs, können so unterschiedliche Bereiche von CaM für die Interaktion mit bMunc13-2 untersucht werden.

Der Einbau von Photo-Met erfolgte in rekombinantes CaM, welches in *E. coli* exprimiert worden war (Kapitel 4.2). Die Kultivierung wurde in Mineralsalzmedium, das keine zusätzlichen Aminosäuren und nur 0,8 % Glukose enthielt (Kapitel 2.8), durchgeführt. Photo-Met wurde zum Zeitpunkt der Induktion der Expression von CaM zugegeben. Dabei zeigte sich, dass Photo-Met keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der *E. coli*-Zellen hatte und auch die geringe Glukosekonzentration des Mineralsalzmediums für ein exponentielles Wachstum von *E. coli* ausreichte (Abbildung 26A). Somit konnte Photo-Met als nicht toxisch für *E. coli*-Zellen eingestuft werden. Die Reinigung des rekombinanten Photo-Met-markiertem CaM aus dem Zellysate konnte ohne kontaminierende *E. coli*-Proteine in einer vergleichbaren Reinheit zum bovinen CaM durchgeführt werden (Kapitel 4.2.1). Der Einbau von Photo-Met wurde für alle neun Methioninpositionen nachgewiesen (Abbildung A8) und die Einbauraten nach verschiedenen Expressionszeiträumen bestimmt. Die höchste Einbauraten von über 30 %, welche vergleichbar zu der beobachteten Einbauraten von ~35 % in HEK293-Zellen in vorangegangenen Studien ist¹⁵⁶, konnte nach einer Expressionszeit von nur drei Stunden beobachtet werden (Abbildung 28B). Vermutlich liegt bei einer Einbauraten von ~30 % eine heterogene Mischung von CaM ohne Photo-Met und CaM mit 1-9 eingebauten Photo-Methioninen vor. Da der Einbau von Photo-Met in Proteine keine strukturellen und funktionellen Konsequenzen hat¹³⁰, ist diese heterogene CaM-Mischung für anschließende

Interaktionsexperimente mit bMunc13-2 verwendbar. Zu beachten ist aber, dass die CaM-Spezies ohne Photo-Met keine kovalente Bindung nach UV-Bestrahlung mit benachbarten Aminosäuren eingehen können. Demzufolge wurden diese CaM-Spezies während der photo-reaktiven Vernetzung nicht berücksichtigt.

Die erzielte Einbaurrate von über 30% in CaM war für Vernetzungsexperimente ausreichend, was anhand von zahlreichen intramolekularen Vernetzungsprodukten innerhalb von Photo-Met-CaM bestätigt wurde (Kapitel 4.2.2). Daraus folgend wurde das Erreichen höherer Einbauraten nicht weiter verfolgt. Die C_{α} - C_{α} -Distanzen der verknüpften Aminosäuren innerhalb von Photo-Met-CaM wurden in drei Kristallstrukturen (Apo-CaM, PDB-Eintrag: 1DMO, und zwei Strukturen für Holo-CaM, PDB-Einträge: 1PRW und 1CLL) bestimmt (Tabelle 9). Für die Holoform wurden eine kompakte und eine gestreckte Konformation gewählt. Es wird vermutet, dass die gestreckte Konformation des calciumgebundenen CaM aufgrund der ungewöhnlich langen zentralen helikalen Struktur zwischen den Domänen ein Kristallisationsartefakt sein könnte^{22, 24}. Die Mehrzahl der berechneten C_{α} - C_{α} -Distanzen stimmt entweder mit allen Konformationen oder der Apoform bzw. einer der beiden Holoformen von CaM überein. Distanzen, welche in beiden Strukturen die maximale Distanz von $\sim 17 \text{ \AA}$ (4 \AA Methioninseitenkette + max $6,4 \text{ \AA}$ (Lysinseitenkette) + $\sim 6 \text{ \AA}$ Flexibilität des Proteins¹⁶⁷) überschritten, könnten von einer Intermediatform des CaM stammen, welche nur zwei Calciumionen bindet. Für diesen Zustand ist bisher keine Struktur publiziert, die für einen Vergleich herangezogen werden könnte. Aufgrund der geringen Calciumkonzentration von 75 nM ist denkbar, dass alle drei Zustände (Apo-, Intermediat- und Holoform) vorlagen.

5.2 Calciumabhängige Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2

Zur Analyse der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 an den postulierten CaM-Bindestellen wurde ein Segment von bMunc13-2, Segment-A (AS 367-780) (Abbildung 19 und 20), welches beide Bindestellen (AS 572-594 und AS 719-742) enthält, in *E. coli* exprimiert. Zur vereinfachten Isolierung aus dem *E. coli*-Zelllysate wurde es mit einem N-terminalen GST-tag versehen, der für die Interaktionsstudien mit CaM durch Thrombin abgespalten wurde (Kapitel 4.1). Die Reinigung des Segment-A (46 kDa) wurde erfolgreich durchgeführt und es konnten nur geringe Mengen an kontaminierenden *E. coli*-Proteinen detektiert werden. Zwei in größerer Menge vorhandene *E. coli*-Proteine wurden mittels Massenspektrometrie als Triggerfaktor (47,8 kDa) und DnaJ (41 kDa) identifiziert. Eine weitere Abtrennung dieser Proteine wurde durch eine Größenausschlusschromatographie angestrebt, da die Proteine in der SDS-PAGE-Analyse unterschiedliche apparente

Molekulargewichte aufwiesen. Die Trennung gelang nicht (Daten nicht gezeigt), weil vermutlich der Stokes-Radius der drei Proteine zu ähnlich und somit eine Trennung nicht möglich war. Da beide verbleibende Proteine jedoch nicht hochabundant waren, wurde von einer weiteren chromatographischen Reinigung des Segment-A abgesehen.

Die Identität des Segment-A konnte mittels Peptidfragmentmassen-Fingerprint-Analyse eindeutig bestätigt werden (Abbildung A6), so dass es für die anschließenden Interaktionsstudien mit CaM in dieser Arbeit genutzt werden konnte.

Zur Untersuchung der für die Komplexbildung zwischen CaM und Segment-A benötigten Calciumkonzentration wurde Photo-Met-markiertes CaM verwendet. In vorherigen Interaktionsstudien mit bMunc13-2-Peptiden, welche die beiden Bindestellen repräsentieren, wurde eine Interaktion bereits ab ~30 nM Calcium festgestellt⁵². Für die Interaktion zwischen CaM und Segment-A wurde eine etwas höhere Calciumkonzentration von 75 nM gewählt (Abbildung 32)⁵². Da bei 75 nM Calcium keine Komplexbildung zwischen CaM und Segment-A zu beobachten war, ist zu vermuten, dass sich das Segment-A mit 414 Aminosäuren anders verhält als die bMunc13-2-Peptide mit 22 (*N*-terminale CaM-Bindestelle, AS 572-574) bzw. 24 (*C*-terminale CaM-Bindestelle, AS 719-742) Aminosäuren. Zur Überprüfung, ob das Segment-A mit calciumbeladenen CaM interagiert, wurde eine Konzentration von 1 mM Calcium verwendet. Hier konnte eindeutig ein Komplex zwischen CaM und dem Segment-A in einer 1:1-Stöchiometrie beobachtet werden. Dies zeigte die calciumabhängige Interaktion beider Proteine, welche durch native MS bestätigt wurde (Abbildung 34). Die in der nativen MS detektierte Dimerisierung von CaM und Segment-A, ist für beide Proteine nicht überraschend, da für Segment-A ebenfalls eine Dimerisierung bei der Vernetzung mit DSBU beobachtet wurde (Abbildung A9) und für CaM eine Dimerisierung in der Literatur beschrieben ist¹⁶⁸.

Um die minimale Calciumkonzentration für die CaM/Segment-A-Interaktion zu untersuchen, wurden verschiedene Calciumkonzentrationen von 75 nM bis 1 mM eingesetzt und die Komplexbildung verfolgt (Abbildung 32B). Die Titration zeigte, dass bei einer Konzentration von 250 nM Calcium noch immer kein Komplex beobachtet werden konnte, obwohl dieser Wert bereits deutlich über der für die Munc13-Peptide verwendeten Calciumkonzentration⁵² und der EC₅₀-Konzentration von 100 nM für die CaM/ubMunc13-2-Interaktion liegt¹⁶⁹. Diese Beobachtung lässt ein unterschiedliches Bindeverhalten der beiden Munc13-2-Splicevarianten vermuten, welche auf die nicht konservierten, *N*-terminalen Bereiche beider Isoformen zurückzuführen sein könnte. Ein Sequenzvergleich der CaM-Bindestellen beider Isoformen

Diskussion

(Abbildung 47) zeigte bereits eine unterschiedliche Anordnung von geladenen und neutralen Aminosäuren, welche im Vergleich des gesamten *N*-terminalen Bereiches bis zur C1-Domäne (AS 1-763 in bMunc13-2) noch deutlicher wurde (Sequenzabgleich in Abbildung A15).

```
ubMunc13-2      QARAHWFRA-VTKVRLQ----LQEIS
bMunc13-2      --CINNFKNVLRKRLRQKLLQELV
                : *:   : : **:   ***:
```

Abbildung 47: Sequenzvergleich der CaM-Bindestellen von ubMunc13-2 und bMunc13-2. Stern: übereinstimmende Aminosäuren, Doppelpunkt: Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften.

Die Interaktion von CaM und Segment-A konnte bei einer Calciumkonzentration von 750 nM beobachtet werden. Ab dieser Konzentration war ein eindeutiges Signal des Heterodimers im SDS-Gel sichtbar, welches bis zu einer Konzentration von 1 mM Calcium keine starke Zunahme der Intensität zeigte (Abbildung 32). Dies könnte bedeuten, dass eine erhöhte Calciumkonzentration nicht zu einer erhöhten Komplexbildung führt und keine Konformationsänderung in CaM induziert. Zur detaillierteren Analyse der Calciumabhängigkeit der CaM/bMunc13-2-Interaktion wurden mehrere Calciumkonzentrationen (750 nM, 2,5 μ M, 45 μ M, 300 μ M und 1mM) untersucht. In allen Reaktionsansätzen wurden identische vernetzte Aminosäuren detektiert, was auf ähnliche Konformationen des CaM/bMunc13-2-Komplexes bei den verwendeten Calciumkonzentrationen hindeutet. Eine sequentielle CaM-Bindung, wie es für die verlängerten Peptide von Munc13-1 und ubMunc13-2 gezeigt wurde⁷⁰, konnte hier nicht beobachtet werden.

Für die strukturelle Analyse des CaM/bMunc13-2-Komplexes wurden zusätzlich zur Vernetzung mit Photo-Met auch Vernetzungen mit DSBU, Sulfo-GMBS und BS³ durchgeführt (Abbildung 33). Auffällig war hierbei die Detektion eines Komplexes von CaM und Segment-A in einem 2:1-Verhältnis unter Verwendung der Vernetzungsreagenzien BS³ und DSBU. Dieser Komplex ist vermutlich ein Artefakt, da er sowohl bei der Verwendung von Photo-Met und Sulfo-GMBS als auch mittels nativer MS nicht detektierbar war (Abbildung 33B und 34). Sollte ein 2:1-CaM/Segment-A-Komplex vorliegen, so müsste er mit allen Vernetzungsreagenzien detektierbar sein. Ob die Beobachtung des 2:1-Komplexes auf der Reaktivität der NHS-Ester basiert oder abhängig von der Länge des *Spacers* des Vernetzungsreagenzes ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Verknüpfte Aminosäuren wurden sowohl zwischen CaM und bMunc13-2 als auch innerhalb von bMunc13-2 detektiert. Die Vernetzung von CaM und Segment-A mit Photo-Met, DSBU und Sulfo-GMBS führte zur Identifizierung von 16 Verknüpfungen zwischen CaM und bMunc13-2, wovon 10 im Bereich der C-terminalen CaM-Bindestelle (AS 719-742) lokalisiert waren. Auffällig war, dass diese Verknüpfungen direkt in der CaM-Bindestelle oder N-terminal von dieser auftraten (Abbildung 33). Dies unterstreicht die Bedeutung dieser CaM-Bindestelle, welche bereits in vorherigen Untersuchungen als die physiologisch bedeutsamere Bindestelle der beiden zuvor postulierten CaM-Bindestellen in bMunc13-2 identifiziert worden war⁵².

Die Nähe der CaM-Bindestelle zu der C1-Domäne in der Aminosäuresequenz von bMunc13-2, welche eine β -Faltblattstruktur mit einer α -Helix aufweist, stellte die Frage, ob die Struktur der C1-Domäne einen Einfluss auf die Bindung von CaM an der CaM-Bindestelle haben könnte. Daraus folgend wurde das Segment-A C-terminal um die C1-Domäne erweitert, woraus das Segment-B (AS 367-903) resultierte (Abbildung 19 und 20). Dieses wurde ebenfalls mit einem N-terminalen GST-tag in *E. coli* exprimiert, aus dem Zellysat isoliert und der GST-tag abgespalten. Die in darauf folgenden Vernetzungsexperimenten mit Photo-Met identifizierten verknüpften Aminosäuren waren zu den Experimenten mit Segment-A identisch (Tabelle 13). Dies weist darauf hin, dass die C1-Domäne keinen Einfluss auf die Bindung von CaM an bMunc13-2 hat. Vermutlich ist die Bindung von CaM im ungeordneten N-terminalen Bereich von Munc13 unabhängig von der strukturierten C1C2MUN-Region.

5.3 Distanzinformationen innerhalb von bMunc13-2-Segment-A

Neben den Informationen über die Interaktion zwischen bMunc13-2 und CaM, konnten auch vernetzte Aminosäuren innerhalb von Segment-A ermittelt werden, welche sowohl aus dem Komplex mit CaM, als auch aus dem Monomer ohne Interaktionspartner stammen (Abbildung 33 und Tabelle A3). Die mit den Vernetzungsreagenzien BS³ und DSBU erhaltenen Distanzinformationen sollten für die Ableitung von 3D-Strukturaussagen über Segment-A genutzt werden. Diese sollten anschließend in die Modellierung der CaM/bMunc13-2 Interaktion einfließen, um neue Erkenntnisse über die Komplexstruktur zu erlangen. Aufgrund der vorhergesagten, überwiegend ungeordneten Proteinstruktur des Segment-A (Abbildung A13) konnte diese Modellierung aber nicht durchgeführt werden. Eine *de novo*-Modellierung eines Proteins von 414 Aminosäuren und einer ungeordneten Struktur ist kaum möglich, da keine Sekundärstrukturelemente vorliegen¹⁵⁷. Die Grenze für

ein aussagekräftiges *de novo*-Modelling einer Proteinstruktur liegt bei 100 Aminosäuren, wobei es von Vorteil ist, wenn für die zu modellierende Sequenz eine Sekundärstruktur vorhergesagt werden kann¹⁵⁷.

Da außerdem keine homologen Strukturen für die Sequenz des Segment-A identifiziert werden konnten, war auch eine Homologie-Modellierung nicht möglich. Somit konnte mit den in Segment-A beobachteten, vernetzten Aminosäuren nur die Abhängigkeit einer möglichen Konformationsänderung von verschiedenen verwendeten Calciumkonzentrationen und der Bindung an CaM untersucht werden. Die Tabelle der vernetzten Aminosäuren (Tabelle A3) zeigte, dass die vernetzten Aminosäuren für alle Calciumkonzentrationen (75 nM, 750 nM und 1 mM) in vergleichbaren Regionen lokalisiert sind. Vermutlich liegt eine vergleichbare Konformation des Segment-A bei allen eingesetzten Calciumkonzentrationen vor. Aufgrund der vorhergesagten, ungeordneten Struktur, ist hier aber nicht von einer stabilen, sondern von einer flexiblen Struktur auszugehen. Da die vernetzten Aminosäuren innerhalb von Segment-A im Monomer mit denen im Heterodimer mit CaM vergleichbar sind, ist zu vermuten, dass bMunc13-2 keine tiefgreifende Strukturänderung unter Bindung von CaM eingeht.

Das mit Thiolgruppen reagierende Vernetzungsreagenz DAU sollte ebenfalls Informationen über die Struktur von bMunc13-2 geben, jedoch verlief das Experiment nicht so erfolgreich wie erwartet. Es konnte nur eine geringe Anzahl an Vernetzungsprodukten im Monomer beobachtet werden (Tabelle A7), weshalb Aussagen über Konformationsänderungen bei verschiedenen Calciumkonzentrationen nicht möglich waren. Ob die vernetzten Peptide nicht aus dem Gel extrahiert werden konnten oder die Vernetzung insgesamt nur gering war, konnte nicht geklärt werden. Da aber vernetzte Aminosäuren beobachtet wurden, konnte mit diesem Experiment die prinzipielle Verwendbarkeit von DAU zur Vernetzung von Cysteinen demonstriert werden¹²⁷.

5.4 Modellierung der CaM/bMunc13-2-Interaktion

Zur weiteren Analyse der CaM/bMunc13-Interaktion wurden die aus den Vernetzungsexperimenten erhaltenen Distanzinformationen zwischen CaM und bMunc13-2 für eine computergestützte Modellierung genutzt (Kapitel 4.5). Aufgrund der nicht durchführbaren Modellierung des Segment-A und der Detektion der meisten Verknüpfungen im Bereich der C-terminalen Bindestelle, erfolgte die Modellierung der Interaktion nur für den Bereich von bMunc13-2, in dem die meisten verknüpften Aminosäuren erhalten wurden.

Das so erhaltene Segment-C (Abbildung 19 und 20) umfasst die Aminosäuren 704-742. AS 719-742 repräsentieren die postulierte CaM-Bindestelle und AS 704-718 die Aminosäuren, welche *N*-terminal der Bindestelle vernetzt wurden. Die *N*-terminale Aminosäure des Segment-C, L704, wurde aufgrund des identifizierten Peptids (${}_{704}\text{LSLEQVCAE}_{712}$) eines Vernetzungsproduktes gewählt, das E707 als vernetzte Aminosäure bestätigt.

Vorversuche im Modellierungsprozess zeigten, dass es nicht möglich war, ein Modell mit allen Distanzbeschränkungen zu erstellen. Das erhaltene Modell, in dem alle Distanzbeschränkungen erfüllt waren, zeigte eine zirkuläre, erzwungene Struktur des Segment-C. Diese Struktur beschrieb keinen natürlichen Aufbau einer helikalen Struktur, wodurch sie nicht als real angesehen wurde. Daraus folgend wiesen die Distanzbeschränkungen auf mehrere mögliche Konformationen des CaM/Segment-C Komplexes hin, von denen jede die Distanzbeschränkungen partiell erfüllte.

In dieser Arbeit konnten zwei Modelle mit nur leicht unterschiedlichen Konformationen für die Interaktion zwischen CaM und Segment-C erstellt werden (Abbildung 35). Segment-C zeigt in diesen eine helikale Struktur, die durch eine kurze *Loop*struktur unterbrochen ist. Diese ermöglicht dem Segment-C eine Flexibilität, welche die antiparallele Lokalisation der CaM-Bindestelle in CaM und gleichzeitig die Interaktion der *N*-terminalen Helix des Segment-C mit zentralen oder *C*-terminalen Aminosäuren von CaM ermöglicht. Diese flexible Struktur des Segment-C könnte auf das eine sequentielle Bindung von CaM an bMunc13-2 hindeuten, welcher für Munc13-1 und ubMunc13-2 beobachtet wurde⁷⁰, aber in dieser Arbeit für bMunc13-2 nicht gezeigt werden konnte.

Mit diesen beiden Modellen (Abbildung 35) konnten sieben von zehn Distanzinformationen in Einklang gebracht werden (Tabelle 12). Da die Interaktion vermutlich nicht in einem strukturell ungeordneten Bereich von bMunc13-2 stattfindet, wurde für Photo-Met- C_{α} - C_{α} -Distanzen eine Grenze von $\sim 8 \text{ \AA}$ gesetzt, welche der Methioninseitenkette, verknüpft mit einer Glutaminsäure in ausgestreckter Konformation entspricht. Diese Grenze ist somit geringer als für die hochflexible Konformation des CaM ohne Interaktionspartner ($\sim 17 \text{ \AA}$, Kapitel 5.1). Für die Verknüpfung mit C719 und Y715, welche sich in der *Loop*struktur von Segment-C befinden, kann eine höhere Distanz bis zu 10 \AA aufgrund der Flexibilität erlaubt werden. Dies gilt allerdings nicht für die Verknüpfung von x144/x145 (x: Photo-Met) und E729, da E729 innerhalb der helikalen Struktur der postulierten CaM-Bindestelle lokalisiert ist. Hier weicht die C_{α} - C_{α} -Distanz um $1,8 \text{ \AA}$ ab, was nur durch eine leichte Verlagerung des *C*-terminus von CaM erklärt werden könnte. Die verbleibenden zwei Verknüpfungen

x36-E712 sowie x71/x72-E740 sind in den Modellen mit 15-26 Å räumlich zu weit voneinander entfernt, um von Photo-Met kovalent verbunden zu werden. Diese Diskrepanz deutet auf eine weitere, bisher nicht beschriebene Konformation hin, in der Segment-C eine andere Orientierung aufweist und die Distanzen zwischen x36-E712 und x71/x72-E740 überbrückt werden können. Die für DSBU ermittelte C_{α} - C_{α} -Distanzen sind im Einklang mit beiden Modellen. Hier ist die Distanz geringer als die *Spacer*länge von 12,5 Å und das Vernetzungsreagenz hatte vermutlich eine *Loop*struktur zwischen den verknüpften Aminosäuren ausgebildet.

5.5 Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-C

Aufgrund der Vielzahl an verknüpften Aminosäuren im Bereich der C-terminalen CaM-Bindestelle und der Modellierung des Komplexes zwischen CaM und Segment-C wurde der Fokus der weiteren Arbeit auf diese bMunc13-2-Region gelegt. Segment-C wurde hierzu für eine optimierte Synthese mit Lysin an Position 703 hergestellt und für eine detaillierte Analyse der Interaktion mit CaM genutzt. Zunächst wurde mittels chemischer Vernetzung überprüft, ob sich das Segment-C vergleichbar zu Segment-A verhält (Kapitel 4.6.1). Dazu wurde eine erneute Calciumtitration durchgeführt, welche eine identische Calciumabhängigkeit der Komplexbildung mit Segment-A zeigte und ein identisches Verhalten zu Segment-A bestätigte. Vernetzungsexperimente mit Segment-C zur Überprüfung des Modells zwischen CaM und Segment-C wurden mit Photo-Met, DSBU und CDI durchgeführt und bestätigten die Interaktion zwischen CaM und Segment-C mit einer 1:1-Stöchiometrie. DSBU liefert aufgrund seiner großen überbrückbaren Distanz (bis 30 Å¹⁵⁸) keine Informationen über den CaM/Segment-C Komplex, da fast alle Aminosäuren in der kompakten Struktur durch den langen *Spacer* verknüpft werden können, aber bestätigte die Interaktion beider Proteine. Die beobachteten verknüpften Aminosäuren wurden dennoch analysiert und die C_{α} - C_{α} -Distanzen in den Modellen bestimmt. Wie erwartet, sind alle C_{α} - C_{α} -Distanzen im überbrückbaren Bereich von ~30 Å des DSBU-Vernetzungsreagenzes. Die angewendete maximale überbrückbare Distanz lag hierbei unter den für den Modellierungsprozess ursprünglich angenommenen 40 Å, da eine geringere Flexibilität als in der ungeordneten Struktur des Segment-A angenommen wurde. Die größere Anzahl der mit DSBU vernetzten Aminosäuren im CaM/Segment-C-Komplex im Vergleich zur Interaktion von CaM mit Segment-A könnte auf der besseren Zugänglichkeit des CaM/Segment-C-Komplexes für DSBU basieren. Möglicherweise könnte die verbleibende ungeordnete Struktur des Segment-A außerhalb der CaM-Bindestellen zu einer sterischen Hinderung für

DSBU in der Umgebung der CaM-Bindestelle führen, welche die Bindung des DSBU in der Interaktionsregion von CaM und bMunc13-2 erschwert.

CDI und Photo-Met können aufgrund ihrer kurzen überbrückbaren C_{α} - C_{α} -Distanzen von 17 \AA^{126} bzw. $5\text{-}11 \text{ \AA}^{156}$ Informationen über die Konformation des Komplexes liefern. Alle beobachteten vernetzten Aminosäuren mit CDI überbrückten Distanzen von maximal 17 \AA , wodurch die modellierten Konformationen (Abbildung 35) bestätigt wurden. Für Photo-Met wurden bis auf x36-E707, x71/x72-E729 und x124-E729 identische verknüpfte Aminosäuren wie in Segment-A und -B identifiziert. Dabei ist die Distanz zwischen x71/x72-E729 nur geringfügig länger als die angenommenen 8 \AA und konnte aufgrund der flexiblen Struktur, welche die N- und C-terminale Domäne von CaM verbindet (Kapitel 1.1.1), angenommen werden. Die verbleibenden zusätzlichen Distanzen zwischen x36-E707 und x124-E729 waren sehr groß ($15,7\text{-}24,3 \text{ \AA}$) und deuteten erneut auf eine weitere Konformation des Komplexes, wie in Kapitel 5.4 beschrieben, hin.

Da gezeigt wurde, dass sich das Segment-C vergleichbar zu Segment-A verhält, wurden mit diesem weitere Analysen (ITC und native MS) zur Komplexbildung mit CaM durchgeführt (Kapitel 4.6.2 und 4.6.3). Die ITC-Messung zeigte eine starke Interaktion ($K_D = 43 \pm 8 \text{ nM}$) zwischen CaM und Segment-C, welche durch native Massenspektrometrie bestätigt wurde. Der Komplex zwischen CaM und Segment-C blieb während der massenspektrometrischen Analyse stabil und konnte nur durch Anlegen einer höheren Kollisionsenergie von 50 V dissoziiert werden. Die Stabilität des Komplexes in der Gasphase deutet auf eine sehr starke Interaktion, z.B. durch elektrostatische Interaktionen, hin. Diese bleiben in der Gasphase im Vergleich zu hydrophoben Wechselwirkungen erhalten¹⁷⁰. Nicht interagierende, unspezifisch angelagerte Peptide können im Gegensatz dazu bereits mit einer sehr geringen Kollisionsenergie (30 V) dissoziiert werden¹⁰⁶.

Verdrängungsexperimente, welche in Kooperation mit Dr. Olaf Jahn (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) durchgeführt wurden, sollten das neu synthetisierte Segment-C mit bMunc13-2-Segmenten aus vorherigen Studien vergleichen (Abbildung 41)^{52, 159}. Dafür wurde ein Bpa-enthaltendes Segment-C synthetisiert, wobei das Bpa ebenfalls wie in den vorherigen Munc13-Peptidstudien⁵² an Stelle des Phenylalanins an Position 723 eingebaut wurde. Diese Position beschreibt die Position 1 des postulierten 1-5-10-CaM-Bindemotivs, in dem sich an den benannten Positionen hydrophobe Ankeramino-säuren befinden. Bpa wird bevorzugt an Positionen von großen hydrophoben Aminosäuren, z.B. Tryptophan oder Phenylalanin, eingebaut, sodass der hydrophobe Charakter und die große Struktur der

Aminosäure erhalten bleibt^{132, 133}. Die für die Verdrängungsexperimente angewendeten Segment-C-Varianten waren: Segment-C, Segment-C-Bpa, Segment-CS (Aminosäuresequenz der CaM-Bindestelle), Segment-CS-Bpa und Segment-CL (C-terminal verlängerte CaM-Bindestelle) (Tabelle 15). Nun wurde die Verdrängung der Segment-C-Bpa-Varianten aus der Interaktion mit CaM durch die Segment-C-Varianten ohne Bpa analysiert, um die Affinität der einzelnen Segment-C-Varianten mit CaM zu vergleichen. Interessant war hierbei besonders, ob die N-terminale Verlängerung der CaM-Bindestelle in Segment-C, im Vergleich zu Segment-CS und -CL, einen großen Einfluss auf die Interaktion mit CaM aufweist. Bei der Verdrängung von Segment-CS-Bpa wurde der größte Effekt bei Segment-C beobachtet. Auffallend war hierbei, dass direkt bei Zugabe von Segment-C zu der CaM/Segment-CS-Bpa-Mischung eine Verdrängung von Segment-CS-Bpa stattfand, wodurch der Segment-CS-Bpa/CaM-Komplex nicht mehr detektierbar war. Segment-C verdrängte Segment-CS-Bpa somit komplett aus der Bindung mit CaM (Abbildung 41A). Dieser Effekt konnte mit Segment-CS und -CL nicht erreicht werden und war für Segment-C einzigartig. Daraus ist zu schließen, dass die N-terminale Verlängerung der CaM-Bindestelle für eine stärkere Affinität zu CaM verantwortlich ist. Diese Beobachtung zeigte sich auch bei der Verdrängung des Segment-C-Bpa aus der Bindung zu CaM (Abbildung 41B). Nur Segment-C konnte dieses aus der Bindung verdrängen. Segment-CS und Segment-CL hatten keinen Einfluss auf die Bindung des Segment-C-Bpa an CaM, was erneut die Bedeutung der N-terminalen Verlängerung der CaM-Bindestelle für die starke Bindung an CaM bestätigt. Diese Region (AS 703-718) schien nach diesen Experimenten eine große Bedeutung zur Aufklärung der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2 zu haben.

5.6 Charakterisierung der verlängerten CaM-Binderegion

Zur Charakterisierung der erweiterten CaM-Bindestelle (AS 703-742) wurde die Sequenz erneut mit der Datenbank für CaM-Bindemotive (<http://cam.umassmed.edu>) abgeglichen. Neben dem postulierten calciumabhängigen 1-5-10-Bindemotiv, welches die Aminosäuren F723, L727 und L732 umfasst, könnte ein zusätzliches oder verlängertes Motiv in der Region 703-718 existieren. Die Datenbanksuche³⁰ ergab, dass verschiedene calciumabhängige Bindemotive in dieser Sequenz möglich sind, welche N-terminal des bereits postulierten CaM-Bindemotivs liegen oder mit diesem überlappen. Diese sind 1-10 (I714-F723)-, 1-12 (V709-I720 oder L716-L727)- oder 1-14 (I714-L727)-Bindemotive (Abbildung A16).

Basierend auf den in den vorangegangenen Untersuchungen beobachteten verknüpften Aminosäuren in der N-terminalen Region des CaM-Bindemotivs (E707, E712, Y715 und

C719) wurden drei Positionen V709, I114 und F723 zu detaillierten Analysen des in Segment-C enthaltenen CaM-Bindemotives ausgewählt. Diese drei Aminosäuren befinden sich sowohl in vorhergesagten CaM-Bindemotiven, als auch nahe der in dieser Arbeit verknüpften Aminosäuren. In Studien zur Untersuchung anderer CaM-bindender Proteine wurden für die Bindung an CaM verantwortliche hydrophobe Aminosäuren mit Asparaginsäure ausgetauscht¹⁶⁰⁻¹⁶³ oder deletiert^{143, 144}. In dieser Arbeit wurde der Austausch zu Asparaginsäure gewählt, da dadurch keine Verkürzung der Aminosäuresequenz entsteht. Desweiteren sollte der Austausch zu Asparaginsäure die Interaktion unterbinden oder abschwächen, da die Interaktion mit CaM auf basischen und hydrophoben Aminosäuren basiert³¹.

Segment-C wurde mit den drei Mutationen V709D, I714D und F723D synthetisiert, was in den drei neuen Varianten, Segment-C-V709D, Segment-C-I714D und Segment-C-F723D, resultierte (Tabelle 16). Mit diesen wurden die Vernetzungsexperimente mit dem in dieser Arbeit etablierten Photo-Met-CaM wiederholt (Kapitel 4.7.1). Die vernetzten Aminosäuren waren identisch für die drei Segment-C-Varianten. Alle verhielten sich vergleichbar zum natürlichen Segment-C und zeigten auch die verknüpften Aminosäuren in den gleichen Regionen (Abbildung 42). Außerdem wurden durch die Einführung der Asparaginsäure neue Reaktionspartner für Photo-Met innerhalb des Segment-C eingebaut, welche ebenfalls vernetzt wurden. Diese Beobachtung beruht auf der Präferenz von Photo-Met für saure Aminosäuren¹²⁸ und nicht auf einer verstärkten Interaktion mit CaM, was im späteren Verlauf der Arbeit gezeigt werden konnte. Eine vollständige Unterdrückung der CaM-Bindung ist somit durch den Austausch der einzelnen Aminosäuren nicht gegeben. Daher lässt sich vermuten, dass wie bereits vorher gezeigt⁵², mehrere Aminosäuren für die Bindung an CaM erforderlich sind.

Da die Vernetzungsexperimente keine Rückschlüsse auf eine veränderte Affinität des Segment-C zu CaM aufgrund des Aminosäureaustauschs geben, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde die Verdrängungsstudie wiederholt, in der Segment-C-Bpa durch Segment-C und seine drei Varianten (V709D, I714D und F723D) aus der Bindung zu CaM verdrängt werden sollte (Abbildung 43). Segment-C zeigte hier erneut eine starke Verdrängung des Segment-C-Bpa, die bereits vorher gezeigt wurde. Die Varianten Segment-C-V709D und Segment-C-I714D hingegen zeigten eine deutlich geringere Verdrängung im Vergleich zu Segment-C, wodurch die Bedeutung der *N*-terminalen Verlängerung der CaM-Bindestelle sichtbar wurde. Diese Region scheint an der CaM-Bindung beteiligt zu sein, da sonst ein Austausch der hydrophoben Aminosäuren V709 und

Diskussion

I714 keinen Einfluss auf die Affinität von Segment-C zu CaM haben sollte. Der größte Verdrängungseffekt wurde, wie erwartet, bei Segment-C-F723D beobachtet. Der Austausch der großen hydrophoben Aminosäure führte zu keiner Verdrängung von Segment-C-Bpa aus der Bindung zu CaM. Dadurch wurde F723 in bMunc13-2 als essentielle hydrophobe Aminosäure für die Interaktion mit CaM bestätigt. Welche Position diese Aminosäure innerhalb eines möglichen CaM-Bindemotivs einnimmt, kann jedoch aus diesen Experimenten nicht abgeleitet werden.

Um Aussagen über die Stärke der Affinitätsänderungen zu erhalten, wurden mit Segment-C und seinen drei Varianten (V709D, I714D und F723D) SPR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt (Kapitel 4.7.1). Der Vorteil dieser Methode ist die Verwendung der identischen CaM-Oberfläche für alle Segment-C-Varianten. CaM wurde biotinyliert und an einen PEG-Biotin-Sensorchip über die Interaktion mit Streptavidin gekoppelt. Dieser Chip wurde dann für alle Messungen verwendet, was eine hohe Vergleichbarkeit ermöglichte. Die Bindung von Segment-C an CaM war stärker als für die drei Segment-C-Varianten (V709D, I714D und F723D). Dies zeigte sich anhand der SPR-Messdaten und den daraus berechneten K_D -Werten (Abbildung 45). Segment-C wies eine hohe Affinität (K_D -Wert: 159 nM) auf, während Segment-C-V709D (K_D -Wert: 466 nM) und Segment C-I714D (K_D -Wert: 416 nM) geringere Affinitäten zu CaM zeigten. Für Segment-C-F723D konnte kein K_D -Wert ermittelt werden, da die Kurvenverläufe zu flach waren und mit diesen keine Berechnung durchgeführt werden konnte. Auffällig war, dass die CaM-Affinität abnahm, je näher die ausgetauschte Aminosäure an dem postulierten 1-5-10-CaM-Bindemotiv lokalisiert ist. Diese Beobachtung lässt ein *N*-terminal verlängertes Bindemotiv vermuten, welches die Region des postulierten 1-5-10-Bindemotivs einschließt.

Ob der Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren nur mit kurzen bMunc13-2-Segmenten zu beobachten ist oder auch in größeren Segmenten eine Auswirkung hat, wurde abschließend untersucht. Das in vorherigen Experimenten dieser Arbeit erfolgreich verwendete Segment-A wurde durch ortsgerichtete Mutagenese auf DNA-Ebene modifiziert, wodurch die Varianten Segment-A-V709D, Segment-A-I714D und Segment-A-F723D generiert wurden (Kapitel 4.7.2). Für eine vergleichende SPR-Messung konnte Segment-A nicht in ausreichender Menge exprimiert und gereinigt werden. Aufgrund dessen wurde der Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren durch die Vernetzung mit Photo-Met analysiert (Abbildung 46). Der Vergleich der vernetzten Aminosäuren von Segment-A und seinen Varianten mit CaM zeigte deutliche Unterschiede. Obwohl in der Region der C-terminalen Bindestelle (AS 703-742) keine Veränderungen feststellbar waren, wurden in der Region der

N-terminalen postulierten CaM-Bindestelle (AS 572-594) mehr verknüpfte Aminosäuren nach dem Aminosäureaustausch detektiert (Abbildung 46). Dieses Verhalten war unerwartet und deutet darauf hin, dass die *N*-terminale Bindestelle in bMunc13-2 mit CaM interagiert, wenn die *C*-terminale CaM-Bindestelle beeinträchtigt ist. Dies könnte ein Ausweichmechanismus sein, um die Regulation von bMunc13-2 durch CaM zu erhalten. Obwohl eine CaM/bMunc13-2-Interaktion an der *N*-terminalen CaM-Bindestelle mit *Pull-Down*-Versuchen nicht bestätigt werden konnte⁵², deuten die hier gezeigten Ergebnisse eindeutig auf eine Interaktion hin. In diesen *Pull-Down*-Versuchen wurde die Funktion der *C*-terminalen CaM-Bindestelle ebenfalls durch Mutationen unterdrückt⁵². Dabei wurden sowohl F723 durch ein Arginin, als auch einige Aminosäuren des basischen *Clusters* (K724, R728 und R731) durch Glutaminsäure ersetzt, was zur Unterdrückung der Bindung von CaM an bMunc13-2 führte⁵². Möglicherweise hat die Entfernung des basischen *Clusters* eine strukturelle Auswirkung auf das gesamte bMunc13-2-Protein, welche ebenfalls die Bindung an die *N*-terminale Bindestelle verhindert.

Eine weitere mögliche Erklärung für den Unterschied zwischen den Vernetzungsexperimenten dieser Arbeit und den vorherigen Bindungsstudien⁵² könnte in einer geringen Affinität der *N*-terminalen Bindestelle liegen. Es wäre möglich, dass die Affinität nicht ausreichte, um CaM während der Waschschriffe der *Pull-Down*-Experimente in der Interaktion zu halten und es anschließend zu detektieren.

5.7 Manuelle Analyse der CaM Bindemotive in bMunc13-2-Segment-C

In der Datenbanksuche (<http://cam.umassmed.edu>) wurden die CaM-Bindemotive 1-5-8 sowie 1-5-8-26 von Munc13-1 bzw. ubMunc13-2 und das 1-4-7-8-CaM-Bindemotiv von AKAP79 nicht berücksichtigt^{37, 52, 70}. Aufgrund dessen wurde abschließend die Sequenz nochmals manuell überprüft. Dabei konnte keines dieser Motive mit großen hydrophoben Ankeraminosäuren, wie Phenylalanin oder Tryptophan an Position 1 identifiziert werden. Wurde dieses Kriterium jedoch nicht angenommen und nur die relativen Positionen der hydrophoben Aminosäuren zueinander verglichen, so konnte sowohl das 1-5-8-(L716-I720-F723) als auch das 1-4-7-8-(I720-F723-V726-L727) CaM-Bindemotiv identifiziert werden (Abbildung 48A). Ebenso war das verlängerte CaM-Bindemotiv 1-5-8-26 (L716-I720-F723-L741) erkennbar. Alle drei Motive weisen statt Phenylalanin oder Tryptophan ein Isoleucin oder Leucin an erster Position auf, was untypisch für calciumabhängige CaM-Bindemotive ist. Ebenfalls stellt Position 26 im 1-5-8-26-Bindemotiv hier ein Leucin statt einem Tryptophan dar.

Diskussion

Die Anordnung der Ankeraminosäuren des postulierten 1-5-10-Bindemotivs sowie der von der Datenbank und manuell identifizierten Bindemotive in einer helikalen Struktur sind in Abbildung 48B dargestellt. Während das postulierte 1-5-10- sowie das vorhergesagte 1-10- und 1-14-Bindemotiv auf gegenüberliegenden Seiten der Helix Ankeraminosäuren aufweisen, sind die verbleibenden 1-12-Bindemotive und das 1-5-8-26-Bindemotiv auf einer Seite der Helix lokalisiert. Das manuell identifizierte 1-4-7-8-Bindemotiv hingegen besitzt Ankeraminosäuren in benachbarten Bereichen der Helix. Diese Unterschiede könnten ausschlaggebend in der Bindung an CaM sein, da so die Interaktion entweder mit der C-terminalen globulären Domäne von CaM oder mit beiden globulären Domänen stattfinden kann. Die CaM-Bindemotive in bMunc13-2, welche die gegenüberliegenden

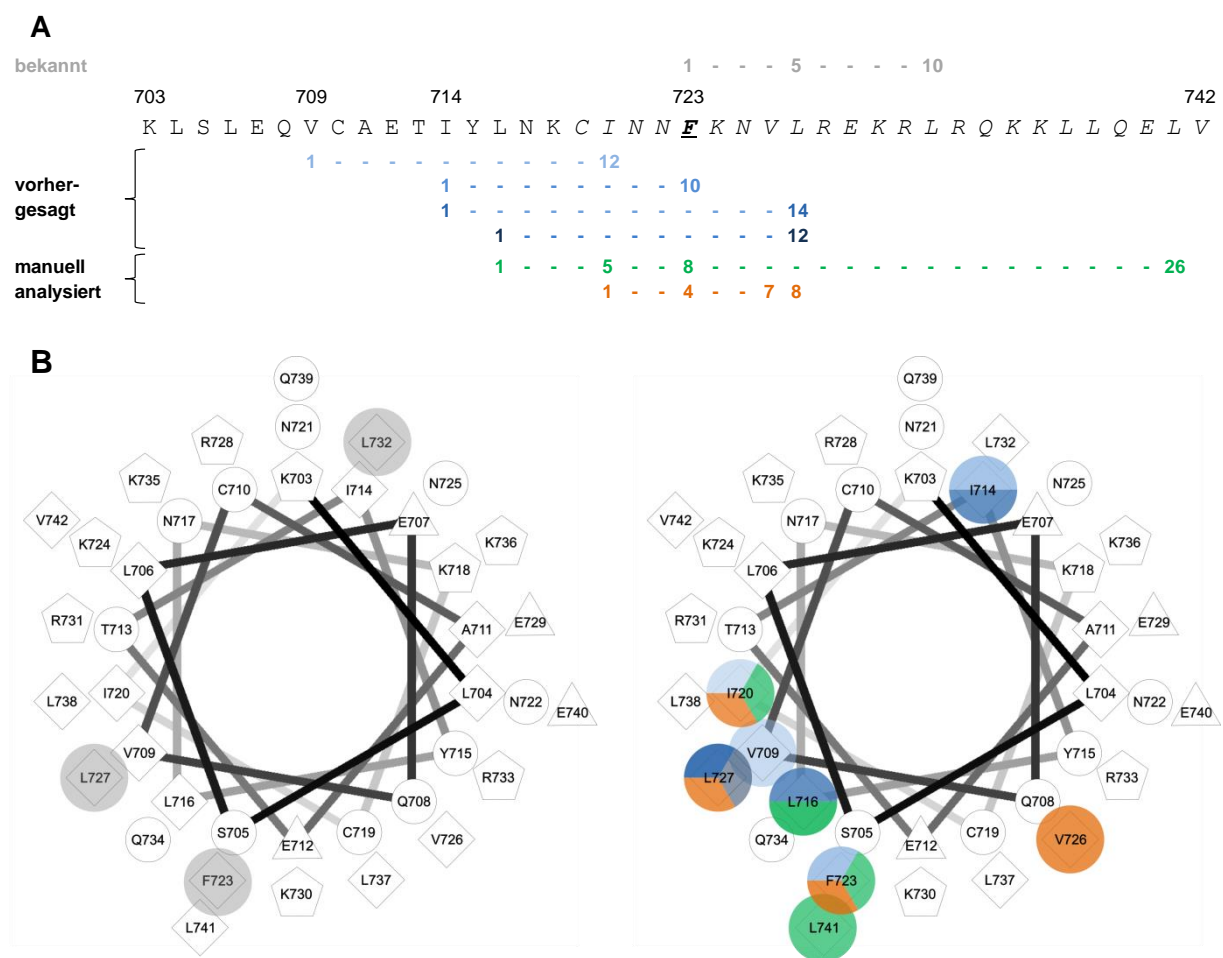


Abbildung 48: Analyse der möglichen CaM-Bindemotive in der N-terminalen Region des bMunc13-2-Segment-C. Das postulierte 1-5-10-CaM-Bindemotiv ist in grau gezeigt. In blau sind die identifizierten Bindemotive der Datenbanksuche (<http://cam.umassmed.edu>) dargestellt. Durch manuelle Analyse der hydrophoben Aminosäuren Ile, Leu, Val, Phe und Trp konnten zwei weitere Motive identifiziert werden: Grün: 1-5-8(-26), orange: 1-4-7-8. (A) Sequenzanalyse, (B) Positionen der Ankeraminosäuren in der helikalen Anordnung der Aminosäuren. Aminosäuren sind wie folgt entsprechend ihrer Eigenschaften umrahmt: Kreis: polar, Dreieck: sauer, Fünfeck: basisch, Viereck: hydrophob.

Ankeraminosäuren enthalten, könnten somit mit den beiden CaM-Domänen in einer geschlossenen Konformation des CaM interagieren, wie in den Modellen postuliert wird (Abbildung 35). Ebenso wäre dies für das 1-4-7-8-Bindemotiv denkbar. Ist das Bindemotiv jedoch nur auf einer Seite der Helix lokalisiert, so könnte ein 1-12- oder 1-5-8-Bindemotiv nur mit der C-terminalen Domäne von CaM interagieren.

Eine besondere Stellung hätte hierbei das 1-5-8-26-Bindemotiv, das aufgrund der in der Sequenz weit voneinander entfernten Ankeraminosäuren in einer gestreckten Konformation mit beiden CaM-Domänen, wie für Munc13-1 und ubMunc13-2 gezeigt⁷⁰, interagieren könnte. Dies konnte aber in dieser Arbeit nicht gezeigt werden und die Sequenzanalyse allein gibt keine Auskunft über die realen Bindungsverhältnisse zwischen CaM und bMunc13-2 an diesen Motiven. Zusätzlich weist die verringerte Affinität des Segment-C an CaM durch die Mutationen an Position V709 und I714 auf ein anderes Bindemotiv hin, welches nicht mit den derzeit bekannten übereinstimmt. Anscheinend wurde in dieser Arbeit ein neues CaM-Bindemotiv in bMunc13-2 entdeckt, welches bisher nicht charakterisiert wurde.

5.8 Vergleich der CaM-Bindestellen der Munc13-Isoformen

Abbildung 49 zeigt einen Vergleich der CaM-Binderegionen der vier Isoformen von Munc13 (Munc13-1 (AS 444-490), ubMunc13-2 (AS 367-413), bMunc13-2 (AS 703-742) und Munc13-3 (AS 942-988)). Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Munc13-1 und ubMunc13-2 im Vergleich zu bMunc13-2 und Munc13-3. Während bMunc13-2 und Munc13-3 viele hydrophobe Aminosäuren N-terminal der postulierten CaM-Bindestelle enthalten, sind hydrophobe Aminosäuren bei Munc13-1 und ubMunc13-2 in dieser Region kaum vorhanden. Für alle Munc13-Isoformen wurden die möglichen CaM-Bindemotive, welche N-terminal der postulierten CaM-Bindestelle beginnen, analysiert und verglichen. Aufgrund der niedrig abundanten hydrophoben Aminosäuren konnten für Munc13-1 und ubMunc13-2 nur maximal zwei Bindemotive (1-10 und 1-12) identifiziert werden. Im Gegensatz dazu sind in bMunc13-2 und Munc13-3 bis zu acht Bindemotive möglich. Diese Beobachtung deutet auf ein unterschiedliches Bindeverhalten der verschiedenen Munc13-Isoformen hin.

Die Fokussierung auf bMunc13-2 und Munc13-3 zeigt eine hohe Abundanz an hydrophoben Aminosäuren für beide Isoformen, wobei aber nur ein CaM-Bindemotiv in beiden Isoformen übereinstimmt (1-10-Motiv, I714-F723 in bMunc13-2). Die zusätzlich manuell gefundenen, veränderten 1-4-7-8- und 1-5-8-26-Bindemotive waren ausschließlich in bMunc13-2 zu

Diskussion

identifizieren, was auf eine Abgrenzung von Munc13-3 hindeutet. Diese Vergleiche zeigten, dass bMunc13-2 scheinbar ein einzigartiges CaM-Bindemotiv zeigt, welches nicht in den anderen Munc13-Isoformen vorhanden ist.

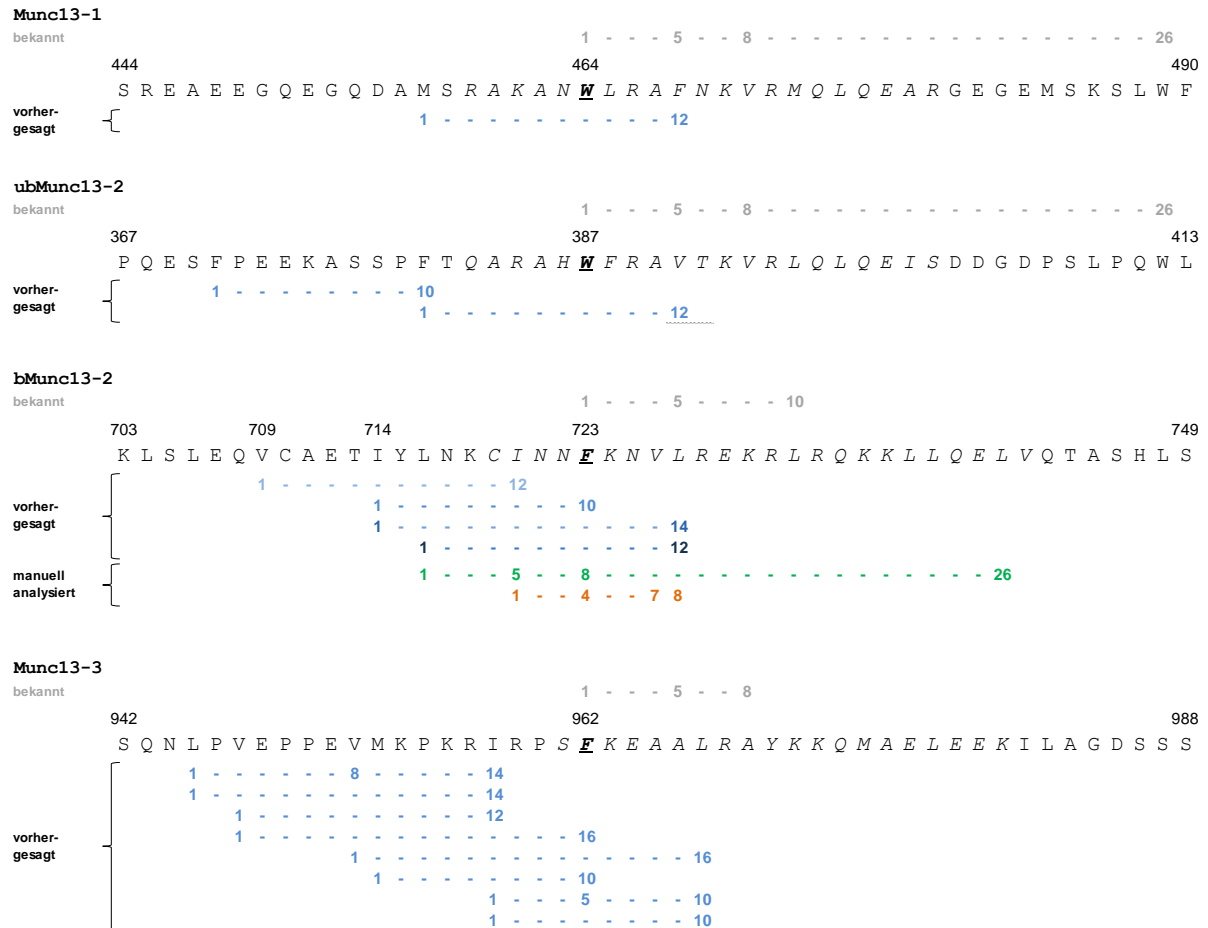


Abbildung 49: Vergleich der möglichen CaM-Bindemotive der Munc13-Isoformen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Website <http://cam.umassmed.edu/index.php> (blau) und manuell (orange und grün) analysiert. Gezeigt sind nur Bindemotive, welche N-terminal der postulierten CaM-Binderegion⁵³ beginnen. Die bekannte CaM-Binderegion ist kursiv hervorgehoben. Das bekannte CaM-Bindemotiv jeder Munc13-Isoform ist in grau dargestellt und die postulierte Ankeraminosäure in Position 1 fett hervorgehoben und nummeriert. Die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren in bMunc13-2 sind angegeben.

6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten neue Einblicke in die calciumabhängige Interaktion von CaM und bMunc13-2 gewonnen werden. Vernetzungsexperimente mit verschiedenen Vernetzungsreagenzien bestätigten die bekannten CaM-Bindestellen in bMunc13-2. Darüber hinaus konnte erstmals eine *N*-terminale Verlängerung der Sequenz der *C*-terminalen Binderegion (AS 719-742) von bMunc13-2 identifiziert werden, welche vermutlich ein bisher unbekanntes CaM-Bindemotiv enthält. Zur weiteren, detaillierten Analyse dieser neuen CaM-Binderegion in bMunc13-2 sollten weitere hydrophobe Aminosäuren in der Region 703-723 durch Asparaginsäure ersetzt werden. So können Informationen über die Positionen der Ankeraminosäuren des enthaltenen CaM-Bindemotivs erhalten und die Einzigartigkeit dieses Bindemotivs überprüft werden. Denkbar wäre auch ein Austausch aller hydrophoben Ankeraminosäuren eines vorhergesagten oder manuell identifizierten CaM-Bindemotivs. Interessant wäre besonders, ob der Austausch mehrerer hydrophober Aminosäuren eines CaM-Bindemotivs die Bindung an CaM unterdrücken kann. Vernetzungsexperimente mit CaM und bMunc13-2, sowie SPR- oder ITC-Messungen könnten für diese Untersuchungen genutzt werden.

Da in das Modell der Interaktion von CaM und Segment-C nicht alle verknüpften Aminosäuren einfließen konnten und dadurch vermutlich nicht alle möglichen Konformationen des Komplexes bei der Modellierung berücksichtigt wurden, sollten weitere strukturelle Untersuchungen mit CaM und den bereits verwendeten bMunc13-2-Segmenten durchgeführt werden. So könnte die Vernetzung der Proteine durch weitere Vernetzungsreagenzien mit kurzen *Spacern* und verschiedenen Reaktivitäten noch detailliertere Einblicke in die Bindungsregion ermöglichen. Ein möglicher Ansatz wäre der Einbau von Photo-Leucin in CaM oder bMunc13-2 mit dem für Photo-Met etablierten Protokoll oder die Verwendung von CDI zum Studium der Interaktion zwischen CaM und bMunc13-2-Segment-A und -B.

Aufgrund des hier entdeckten, veränderten 1-5-8-26-Motivs ist eine geöffnete Konformation von CaM in der Interaktion mit bMunc13-2 denkbar, welche allerdings beim Modellierungsprozess mit den erhaltenen verknüpften Aminosäuren zwischen CaM und bMunc13-2 nicht gezeigt werden konnte. Ebenfalls wäre die sequentielle Bindung basierend auf dem 1-5-8-26-Motiv von bMunc13-2 an CaM zu untersuchen⁷⁰. Hierzu wären NMR-spektroskopische Untersuchungen möglich, welche analog zu dem *C*-terminal verlängerten

Ausblick

Munc13-1-Segment (AS 459-492) durchgeführt werden könnten⁷⁰. Ebenfalls könnte untersucht werden, ob es mehrere, simultan vorliegende Konformationen des CaM/bMunc13-2-Komplexes gibt. Diese Untersuchung wäre ebenfalls durch Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie möglich. Sind unterschiedliche Konformationen des CaM/bMunc13-2-Komplexes vorhanden, sollten verschiedene Kollisionsquerschnitte (CCS, *collisional cross section*) erhalten werden.

Zusätzlich sollte die *N*-terminale Bindestelle (AS 572-594) in bMunc13-2 detaillierter charakterisiert werden. Diese wurde in den beschriebenen Vernetzungsexperimenten bei Verwendung der Segment-A-Varianten verknüpft, obwohl sie in einer vorherigen Bindungsstudie als physiologisch nicht relevant eingestuft worden war⁵². In dieser früheren Bindungsstudie wurde die Funktion der *C*-terminalen CaM-Bindestelle durch Mutationen (F723R, K724E, R728E und R731E) unterdrückt. Daher stellt sich die Frage, ob die komplette Unterdrückung der CaM-Bindung durch die Veränderung des basischen *Clusters* in bMunc13-2 bedingt ist. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob die Bindung durch den Austausch von mehreren hydrophoben Aminosäuren eines CaM-Bindemotivs zu Asparaginsäure in der Region 703-742 unterdrückt werden kann.

Ergänzend zu den *in-vitro*-Versuchen sollten *in-vivo*-Versuche in Neuronen durchgeführt werden, in denen der Einfluss der eingeführten Mutationen (V709D, I714D und F723D) in bMunc13-2 auf die Signalweiterleitung untersucht wird. In weiterer Zukunft sollten auch strukturelle Daten von *in-vitro*-Experimenten der CaM/bMunc13-2-Interaktion *in-vivo* in Neuronen verifiziert werden. Eine Möglichkeit bietet hier das Einbringen von kleinen Vernetzungsreagenzien in isolierte Nervenzellen. Vorteilhaft wären hierbei photo-reaktive Reagenzien, welche zunächst in die Zellen eindringen können und erst am Bestimmungsort durch UV-Bestrahlung aktiviert werden. Einen Vorteil würden hier ebenfalls MS-spaltbare Reagenzien bringen, da mit diesen eine erleichterte Analyse der vernetzten Aminosäuren möglich ist.

Literaturverzeichnis

- [1] Carafoli, E. and Krebs, J., *Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator*. J Biol Chem, 2016. **291**(40): p. 20849-20857.
- [2] Berchtold, M.W. and Villalobo, A., *The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(2): p. 398-435.
- [3] Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1047-1058.
- [4] Burgoyne, R.D., *Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(3): p. 182-193.
- [5] Kreutz, M.R., et al., *The Neuronal Functions of EF-Hand Ca²⁺-Binding Proteins*. Front Mol Neurosci, 2012. **5**: p. 92.
- [6] Mikhaylova, M., et al., *Between promiscuity and specificity: novel roles of EF-hand calcium sensors in neuronal Ca²⁺ signalling*. J Neurochem, 2011. **118**(5): p. 695-713.
- [7] Lipstein, N., et al., *Presynaptic Calmodulin targets: lessons from structural proteomics*. Expert Rev Proteomics, 2017. **14**(3): p. 223-242.
- [8] Chin, D. and Means, A.R., *Calmodulin: a prototypical calcium sensor*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(8): p. 322-328.
- [9] Davis, T.N. and Thorner, J., *Vertebrate and yeast calmodulin, despite significant sequence divergence, are functionally interchangeable*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 7909-7913.
- [10] Friedberg, F. and Rhoads, A.R., *Evolutionary aspects of calmodulin*. IUBMB Life, 2001. **51**(4): p. 215-221.
- [11] Friedberg, F. and Rhoads, A.R., *Sequence homology of the 3'-untranslated region of calmodulin III in mammals*. Mol Biol Rep, 2001. **28**(1): p. 27-30.
- [12] Ling, V. and Zielinski, R.E., *Cloning of cDNA Sequences Encoding the Calcium-Binding Protein, Calmodulin, from Barley (Hordeum vulgare)*. Plant Physiology, 1989. **90**(2): p. 714-719.
- [13] Babu, Y.S., et al., *Three-dimensional structure of calmodulin*. Nature, 1985. **315**(6014): p. 37-40.
- [14] Cox, J.A., *Interactive properties of calmodulin*. Biochem J, 1988. **249**(3): p. 621-629.
- [15] Ikura, M., et al., *Secondary structure and side-chain 1H and 13C resonance assignments of calmodulin in solution by heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy*. Biochemistry, 1991. **30**(38): p. 9216-9228.
- [16] Potter, J.D., et al., *Ca²⁺ binding to calmodulin*. Methods Enzymol, 1983. **102**: p. 135-143.
- [17] Ogawa, Y. and Tanokura, M., *Calcium binding to calmodulin: effects of ionic strength, Mg²⁺, pH and temperature*. J Biochem, 1984. **95**(1): p. 19-28.
- [18] Kawasaki, H. and Kretsinger, R.H., *Calcium-binding proteins. 1: EF-hands*. Protein Profile, 1994. **1**(4): p. 343-517.
- [19] Vetter, S.W. and Leclerc, E., *Novel aspects of calmodulin target recognition and activation*. Eur J Biochem, 2003. **270**(3): p. 404-414.
- [20] Linse, S., et al., *Calcium binding to calmodulin and its globular domains*. J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8050-8054.
- [21] Zhang, M., et al., *Calcium-Induced Conformational Transition Revealed by the Solution Structure of Apo Calmodulin*. Nature Structural Biology, 1995. **2**(9): p. 758-767.
- [22] Fallon, J.L. and Quioco, F.A., *A closed compact structure of native Ca²⁺-calmodulin*. Structure, 2003. **11**(10): p. 1303-1307.
- [23] Chattopadhyaya, R., et al., *Calmodulin Structure Refined at 1.7 Angstrom Resolution*. Journal of Molecular Biology, 1992. **228**(4): p. 1177-1192.

- [24] Bertini, I., et al., *Experimentally exploring the conformational space sampled by domain reorientation in calmodulin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**: p. 6841-6846.
- [25] Park, H.Y., et al., *Conformational changes of calmodulin upon Ca²⁺ binding studied with a microfluidic mixer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 542-547.
- [26] Ikura, M. and Ames, J.B., *Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1159-1164.
- [27] Junker, J.P. and Rief, M., *Single-molecule force spectroscopy distinguishes target binding modes of calmodulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(34): p. 14361-14366.
- [28] Shen, N., et al., *Intramolecular occlusion of the diacylglycerol-binding site in the C1 domain of munc13-1*. Biochemistry, 2005. **44**(4): p. 1089-1096.
- [29] Villarroel, A., et al., *The ever changing moods of calmodulin: how structural plasticity entails transductional adaptability*. J Mol Biol, 2014. **426**(15): p. 2717-2735.
- [30] Mruk, K., et al., *Calmodulation meta-analysis: predicting calmodulin binding via canonical motif clustering*. J Gen Physiol, 2014. **144**(1): p. 105-114.
- [31] Cox, J.A., et al., *The interaction of calmodulin with amphiphilic peptides*. J Biol Chem, 1985. **260**(4): p. 2527-2534.
- [32] Rhoads, A.R. and Friedberg, F., *Sequence motifs for calmodulin recognition*. FASEB J, 1997. **11**(5): p. 331-340.
- [33] Yap, K.L., et al., *Calmodulin target database*. Journal of structural and functional genomics, 2000. **1**(1): p. 8-14.
- [34] Bähler, M. and Rhoads, A., *Calmodulin signaling via the IQ motif*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 107-113.
- [35] Schulz, D.M., et al., *Mapping the topology and determination of a low-resolution three-dimensional structure of the calmodulin-melittin complex by chemical cross-linking and high-resolution FTICRMS: direct demonstration of multiple binding modes*. Biochemistry, 2004. **43**(16): p. 4703-4715.
- [36] Crivici, A. and Ikura, M., *Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1995. **24**: p. 85-116.
- [37] Patel, N., et al., *Molecular basis of AKAP79 regulation by calmodulin*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1681.
- [38] Junge, H.J., et al., *Calmodulin and Munc13 form a Ca²⁺ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity*. Cell, 2004. **118**(3): p. 389-401.
- [39] Südhof, T.C., *The synaptic vesicle cycle*. Annu Rev Neurosci, 2004. **27**: p. 509-547.
- [40] Varoqueaux, F., et al., *Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(13): p. 9037-9042.
- [41] Augustin, I., et al., *Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles*. Nature, 1999. **400**(6743): p. 457-461.
- [42] Brose, N., et al., *Mammalian homologues of Caenorhabditis elegans unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 25273-25280.
- [43] Betz, A., et al., *Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin*. J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2520-2526.
- [44] Brose, N., et al., *Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(3): p. 303-311.
- [45] Song, Y., et al., *Cloning of a novel gene in the human kidney homologous to rat munc13s: Its potential role in diabetic nephropathy*. Kidney International, 1998. **53**(6): p. 1689-1695.
- [46] Betz, A., et al., *Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming*. Neuron, 2001. **30**(1): p. 183-196.
- [47] Augustin, I., et al., *Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain*. Biochem J, 1999. **337** (Pt 3): p. 363-371.

- [48] Betz, A., et al., *Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release*. *Neuron*, 1998. **21**(1): p. 123-136.
- [49] Richmond, J.E., et al., *An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming*. *Nature*, 2001. **412**(6844): p. 338-341.
- [50] Basu, J., et al., *A minimal domain responsible for Munc13 activity*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(11): p. 1017-1018.
- [51] Yang, X., et al., *Syntaxin opening by the MUN domain underlies the function of Munc13 in synaptic-vesicle priming*. *Nat Struct Mol Biol*, 2015. **22**(7): p. 547-554.
- [52] Lipstein, N., et al., *Nonconserved Ca²⁺/Calmodulin Binding Sites in Munc13s Differentially Control Synaptic Short-Term Plasticity*. *Molecular and Cellular Biology*, 2012. **32**(22): p. 4628-4641.
- [53] Dimova, K., et al., *Characterization of the Munc13-calmodulin interaction by photoaffinity labeling*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1763**(11): p. 1256-1265.
- [54] Dimova, K., et al., *Structural insights into the calmodulin-Munc13 interaction obtained by cross-linking and mass spectrometry*. *Biochemistry*, 2009. **48**(25): p. 5908-5921.
- [55] Xie, J. and Schultz, P.G., *A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(10): p. 775-782.
- [56] Rhee, J.S., et al., *Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs*. *Cell*, 2002. **108**(1): p. 121-133.
- [57] Lu, J., et al., *Structural Basis for a Munc13-1 Homodimer to Munc13-1/RIM Heterodimer Switch*. *PLOS Biology*, 2006. **4**(7): p. e192.
- [58] Xu, J., et al., *Mechanistic insights into neurotransmitter release and presynaptic plasticity from the crystal structure of Munc13-1 C1C2BMUN*. *Elife*, 2017. **6**.
- [59] Shin, O.H., et al., *Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca²⁺ regulator of synaptic exocytosis*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(3): p. 280-238.
- [60] Li, W., et al., *The crystal structure of a Munc13 C-terminal module exhibits a remarkable similarity to vesicle tethering factors*. *Structure*, 2011. **19**(10): p. 1443-1455.
- [61] Gundelfinger, E.D., et al., *Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(2): p. 127-139.
- [62] Andrews-Zwilling, Y.S., et al., *Binding to Rab3A-interacting molecule RIM regulates the presynaptic recruitment of Munc13-1 and ubMunc13-2*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(28): p. 19720-19731.
- [63] Deng, L., et al., *RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13*. *Neuron*, 2011. **69**(2): p. 317-331.
- [64] Kawabe, H., et al., *ELKS1 localizes the synaptic vesicle priming protein bMunc13-2 to a specific subset of active zones*. *J Cell Biol*, 2017. **216**(4): p. 1143-1161.
- [65] Rothman, J.E., et al., *Hypothesis - buttressed rings assemble, clamp, and release SNAREpins for synaptic transmission*. *FEBS Lett*, 2017. **591**(21): p. 3459-3480.
- [66] Sakamoto, H., et al., *Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies*. *Nat Neurosci*, 2018. **21**(1): p. 41-49.
- [67] Südhof, T.C. and Rothman, J.E., *Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins*. *Science*, 2009. **323**(5913): p. 474-477.
- [68] Jahn, R. and Fasshauer, D., *Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles*. *Nature*, 2012. **490**(7419): p. 201-207.
- [69] Rosenmund, C., et al., *Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms*. *Neuron*, 2002. **33**(3): p. 411-424.
- [70] Rodriguez-Castaneda, F., et al., *Modular architecture of Munc13/calmodulin complexes: dual regulation by Ca²⁺ and possible function in short-term synaptic plasticity*. *EMBO J*, 2009. **29**(3): p. 680-691.
- [71] Herbst, S., et al., *Munc13-like skMLCK variants cannot mimic the unique calmodulin binding mode of Munc13 as evidenced by chemical cross-linking and mass spectrometry*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e75119.
- [72] Gross, J.H., *Mass Spectrometry*. Springer Verlag 2011. **2nd Edition**.

- [73] Karas, M., et al., *Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules*. Analytical Chemistry, 1985. **57**(14): p. 2935-2939.
- [74] Karas, M., et al., *Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1987. **78**: p. 53-68.
- [75] Dole, M., et al., *Molecular Beams of Macroions*. Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
- [76] Yamashita, M. and Fenn, J.B., *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*. The Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
- [77] Horning, E.C., et al., *Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream*. J Chromatogr Sci, 1974. **12**(11): p. 725-729.
- [78] Horning, E.C., et al., *New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure*. Analytical Chemistry, 1973. **45**(6): p. 936-943.
- [79] Zeleny, J., *Instability of Electrified Liquid Surfaces*. Physical Review, 1917. **10**(1): p. 1-6.
- [80] Taylor, G., *Disintegration of water drops in an electric field*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, 1964. **280**(1382): p. 383-397.
- [81] Gomez, A. and Tang, K., *Charge and fission of droplets in electrostatic sprays*. Physics of Fluids, 1994. **6**(1): p. 404-414.
- [82] <http://www.newobjective.com/electrospray/whatisESI.shtml> 30.01.2018 11:20.
- [83] Iribarne, J.V. and Thomson, B.A., *Evaporation of Small Ions from Charged Droplets*. Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.
- [84] Felitsyn, N., et al., *Origin and number of charges observed on multiply-protonated native proteins produced by ESI*. International Journal of Mass Spectrometry, 2002. **219**(1): p. 39-62.
- [85] L. Mack, L., et al., *Molecular Beams of Macroions. II*. The Journal of Chemical Physics. 1970. 4977-4986.
- [86] Konermann, L., et al., *Unraveling the mechanism of electrospray ionization*. Anal Chem, 2013. **85**(1): p. 2-9.
- [87] Chowdhury, S.K., et al., *Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 1990. **112**(24): p. 9012-9013.
- [88] Fenner, N.C. and Daly, N.R., *Laser Used for Mass Analysis*. Review of Scientific Instruments, 1966. **37**(8): p. 1068-1070.
- [89] Knochenmuss, R. and Zenobi, R., *MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes*. Chemical Reviews, 2003. **103**(2): p. 441-452.
- [90] Mao, D. and Douglas, D.J., *H/D exchange of gas phase bradykinin ions in a linear quadrupole ion trap*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(2): p. 85-94.
- [91] Londry, F.A. and Hager, J.W., *Mass selective axial ion ejection from a linear quadrupole ion trap*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(10): p. 1130-1147.
- [92] Schwartz, J.C., et al., *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(6): p. 659-669.
- [93] Knight, R.D., *Storage of ions from laser-produced plasmas*. Applied Physics Letters, 1981. **38**(4): p. 221-223.
- [94] Scigelova, M. and Makarov, A., *Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics*. Proteomics, 2006. **6 Suppl 2**: p. 16-21.
- [95] Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-443.
- [96] Brown, R.S. and Lennon, J.J., *Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(13): p. 1998-2003.
- [97] Pappin, D.J.C., et al., *Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting*. Current Biology, 1993. **3**(6): p. 327-332.
- [98] Mann, M. and Wilm, M., *Error-Tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(24): p. 4390-4399.

- [99] Roepstorff, P. and Fohlman, J., *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biomed Mass Spectrom, 1984. **11**(11): p. 601.
- [100] Biemann, K., *Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure*. Biomed Environ Mass Spectrom, 1988. **16**(1-12): p. 99-111.
- [101] McLafferty, F.W., et al., *Metastable ion characteristics. XXIV. Application of collisional activation spectra to the elucidation of organic ion structures*. Journal of the American Chemical Society, 1973. **95**(12): p. 3886-3892.
- [102] Olsen, J.V., et al., *Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis*. Nature Methods, 2007. **4**: p. 709.
- [103] Gabelica, V. and Pauw, E.D., *Internal energy and fragmentation of ions produced in electrospray sources*. Mass Spectrometry Reviews, 2005. **24**(4): p. 566-587.
- [104] Syka, J.E., et al., *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9528-9533.
- [105] Senko, M.W., et al., *Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates*. Anal Chem, 2013. **85**(24): p. 11710-11714.
- [106] Sobott, F., et al., *A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies*. Anal Chem, 2002. **74**(6): p. 1402-1407.
- [107] Sinz, A., *Cross-Linking/Mass Spectrometry for Studying Protein Structures and Protein-Protein Interactions: Where Are We Now and Where Should We Go from Here?* Angew Chem Int Ed Engl, 2018. **57**(22): p. 6390-6396.
- [108] Young, M.M., et al., *High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5802-5806.
- [109] Politis, A., et al., *A mass spectrometry-based hybrid method for structural modeling of protein complexes*. Nat Methods, 2014. **11**(4): p. 403-406.
- [110] Sinz, A., *Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions*. Mass Spectrom Rev, 2006. **25**(4): p. 663-682.
- [111] Leitner, A., et al., *Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics*. Mol. Cell. Proteomics, 2010. **9**(8): p. 1634-1649.
- [112] Rappsilber, J., *The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes*. J Struct Biol, 2011. **173**(3): p. 530-540.
- [113] Sinz, A., *The advancement of chemical cross-linking and mass spectrometry for structural proteomics: from single proteins to protein interaction networks*. Expert Rev Proteomics, 2014. **11**(6): p. 733-743.
- [114] Walzthoeni, T., et al., *Mass spectrometry supported determination of protein complex structure*. Curr Opin Struct Biol, 2013. **23**(2): p. 252-260.
- [115] Zorn, M., et al., *Mapping cell envelope and periplasm protein interactions of Escherichia coli respiratory formate dehydrogenases by chemical cross-linking and mass spectrometry*. J Proteome Res, 2014. **13**(12): p. 5524-5535.
- [116] Brodie, N.I., et al., *Solving protein structures using short-distance cross-linking constraints as a guide for discrete molecular dynamics simulations*. Sci Adv, 2017. **3**(7): p. e1700479.
- [117] Götze, M., et al., *StavroX--a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies*. J Am Soc Mass Spectrom, 2012. **23**(1): p. 76-87.
- [118] Götze, M., et al., *Automated assignment of MS/MS cleavable cross-links in protein 3D-structure analysis*. J Am Soc Mass Spectrom, 2015. **26**(1): p. 83-97.
- [119] Liu, F., et al., *Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry*. Nat Methods, 2015. **12**(12): p. 1179-1184.
- [120] Leitner, A., et al., *Crosslinking and Mass Spectrometry: An Integrated Technology to Understand the Structure and Function of Molecular Machines*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(1): p. 20-32.
- [121] Hofmann, T., et al., *Protein structure prediction guided by crosslinking restraints--A systematic evaluation of the impact of the crosslinking spacer length*. Methods, 2015. **89**: p. 79-90.

- [122] Schilling, B., et al., *MS2Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(8): p. 834-850.
- [123] Sinz, A., *Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes*. J Mass Spectrom, 2003. **38**(12): p. 1225-1237.
- [124] Kalkhof, S. and Sinz, A., *Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters*. Anal Bioanal Chem, 2008. **392**(1-2): p. 305-312.
- [125] Mädler, S., et al., *Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities*. J Mass Spectrom, 2009. **44**(5): p. 694-706.
- [126] Hage, C., et al., *The First Zero-Length Mass Spectrometry-Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis*. Angew Chem Int Ed Engl, 2017. **56**(46): p. 14551-14555.
- [127] Iacobucci, C., et al., *The First MS-Cleavable, Photo-Thiol-Reactive Cross-Linker for Protein Structural Studies*. J Am Soc Mass Spectrom, 2018.
- [128] Iacobucci, C., et al., *Carboxyl-Photo-Reactive MS-Cleavable Cross-Linkers: Unveiling a Hidden Aspect of Diazirine-Based Reagents*. Anal Chem, 2018. **90**(4): p. 2805-2809.
- [129] Wittelsberger, A., et al., *Methionine acts as a "magnet" in photoaffinity crosslinking experiments*. FEBS Lett, 2006. **580**(7): p. 1872-1876.
- [130] Suchanek, M., et al., *Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells*. Nat Methods, 2005. **2**(4): p. 261-267.
- [131] Jahn, O., et al., *Characterization of peptide-protein interactions using photoaffinity labeling and LC/MS*. Anal Bioanal Chem, 2004. **378**(4): p. 1031-1036.
- [132] Ryu, Y. and Schultz, P.G., *Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in Escherichia coli*. Nat Methods, 2006. **3**(4): p. 263-265.
- [133] Schwarz, R., et al., *Monitoring Solution Structures of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta upon Ligand Binding*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151412.
- [134] Yang, T., et al., *Photo-lysine captures proteins that bind lysine post-translational modifications*. Nat Chem Biol, 2016. **12**(2): p. 70-72.
- [135] Piotrowski, C., et al., *Extending the cross-linking/mass spectrometry strategy: Facile incorporation of photo-activatable amino acids into the model protein calmodulin in Escherichia coli cells*. Methods, 2015. **89**: p. 121-127.
- [136] Häupl, B., et al., *Combining affinity enrichment, cross-linking with photo-amino acids, and mass spectrometry for probing protein kinase D2 interactions*. Proteomics, 2017.
- [137] Müller, M.Q., et al., *Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis: Reliable Identification of Cross-Linking Products by Tandem MS*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(16): p. 6958-6968.
- [138] Muller, M.Q., et al., *Cleavable cross-linker for protein structure analysis: reliable identification of cross-linking products by tandem MS*. Anal Chem, 2010. **82**(16): p. 6958-6968.
- [139] Hernandez, H. and Robinson, C.V., *Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 715-726.
- [140] van Duijn, E., *Current limitations in native mass spectrometry based structural biology*. J Am Soc Mass Spectrom, 2010. **21**(6): p. 971-978.
- [141] Arlt, C., et al., *An Integrated Mass Spectrometry Based Approach to Probe the Structure of the Full-Length Wild-Type Tetrameric p53 Tumor Suppressor*. Angew Chem Int Ed Engl, 2017. **56**(1): p. 275-279.
- [142] Sinz, A., et al., *Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology*. Protein Sci, 2015. **24**(8): p. 1193-1209.
- [143] Gan, J., et al., *Native Mass Spectrometry of Recombinant Proteins from Crude Cell Lysates*. Anal Chem, 2017. **89**(8): p. 4398-4404.
- [144] Bich, C., et al., *Probing the hydrophobic effect of noncovalent complexes by mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(2): p. 286-289.
- [145] Leavitt, S. and Freire, E., *Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(5): p. 560-266.

- [146] Freyer, M.W. and Lewis, E.A., *Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions*, in *Methods in Cell Biology*. 2008, Academic Press. p. 79-113.
- [147] Pattnaik, P., *Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005. **126**(2): p. 79-92.
- [148] Núñez, S., et al., *Target–drug interactions: first principles and their application to drug discovery*. *Drug Discovery Today*, 2012. **17**(1): p. 10-22.
- [149] Meselson, M. and Yuan, R., *DNA restriction enzyme from E. coli*. *Nature*, 1968. **217**(5134): p. 1110-1114.
- [150] Krzywinski, M., et al., *Circos: an information aesthetic for comparative genomics*. *Genome Res*, 2009. **19**(9): p. 1639-1645.
- [151] Buchan, D.W.A., et al., *Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench*. *Nucleic Acids Research*, 2013. **41**(Web Server issue): p. W349-W357.
- [152] Sambrook, J. and Russell, D., *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001.
- [153] Candiano, G., et al., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(9): p. 1327-1333.
- [154] Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(6): p. 2856-2860.
- [155] Raveh, B., et al., *Rosetta FlexPepDock ab-initio: simultaneous folding, docking and refinement of peptides onto their receptors*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e18934.
- [156] Lössl, P., et al., *Analysis of Nidogen-1/Laminin gamma1 Interaction by Cross-Linking, Mass Spectrometry, and Computational Modeling Reveals Multiple Binding Modes*. *PLoS One*, 2014. **9**(11): p. e112886.
- [157] Kaufmann, K.W., et al., *Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you*. *Biochemistry*, 2010. **49**(14): p. 2987-2998.
- [158] Merkley, E.D., et al., *Distance restraints from crosslinking mass spectrometry: mining a molecular dynamics simulation database to evaluate lysine-lysine distances*. *Protein Sci*, 2014. **23**(6): p. 747-759.
- [159] Göth, M., *Investigation of Protein-Ligand Complexes by Native Mass Spectrometry and Ion Mobility-Mass Spectrometry*. Dissertation Freie Universität Berlin, 2017.
- [160] Glaser, P., et al., *Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in Bordetella pertussis adenylate cyclase by site-directed mutagenesis*. *EMBO J*, 1989. **8**(3): p. 967-972.
- [161] Tokumitsu, H., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase: identification of regulatory domains*. *Biochemistry*, 1997. **36**(42): p. 12823-12827.
- [162] Osawa, M., et al., *A novel target recognition revealed by calmodulin in complex with Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase kinase*. *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(9): p. 819-824.
- [163] de Diego, I., et al., *Molecular basis of the death-associated protein kinase-calcium/calmodulin regulator complex*. *Sci Signal*, 2010. **3**(106): p. ra6.
- [164] Pley, U.M., et al., *The interaction of calmodulin with clathrin-coated vesicles, triskelions, and light chains. Localization of a binding site*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(5): p. 2395-2402.
- [165] Ruan, J., et al., *Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free Ca²⁺*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(37): p. 22679-22686.
- [166] Kozlowski, L.P., *Proteome-pI: proteome isoelectric point database*. *Nucleic Acids Research*, 2017. **45**(Database issue): p. D1112-D1116.
- [167] Herzog, F., et al., *Structural probing of a protein phosphatase 2A network by chemical cross-linking and mass spectrometry*. *Science*, 2012. **337**(6100): p. 1348-1352.
- [168] Lafitte, D., et al., *Evidence of noncovalent dimerization of calmodulin*. *European Journal of Biochemistry*, 1999. **261**(1): p. 337-344.
- [169] Zikich, D., et al., *Vesicle priming and recruitment by ubMunc13-2 are differentially regulated by calcium and calmodulin*. *J Neurosci*, 2008. **28**(8): p. 1949-1960.

Literaturverzeichnis

- [170] Breuker, K., *The study of protein–ligand interactions by mass spectrometry—a personal view*. International Journal of Mass Spectrometry, 2004. **239**(1): p. 33-41.
- [171] Rey, M., et al., *Nepenthesin from Monkey Cups for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry*. Molecular & Cellular Proteomics : MCP, 2013. **12**(2): p. 464-472.
- [172] Kadek, A., et al., *Aspartic protease nepenthesin-1 as a tool for digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Anal Chem, 2014. **86**(9): p. 4287-4294.

Anhang

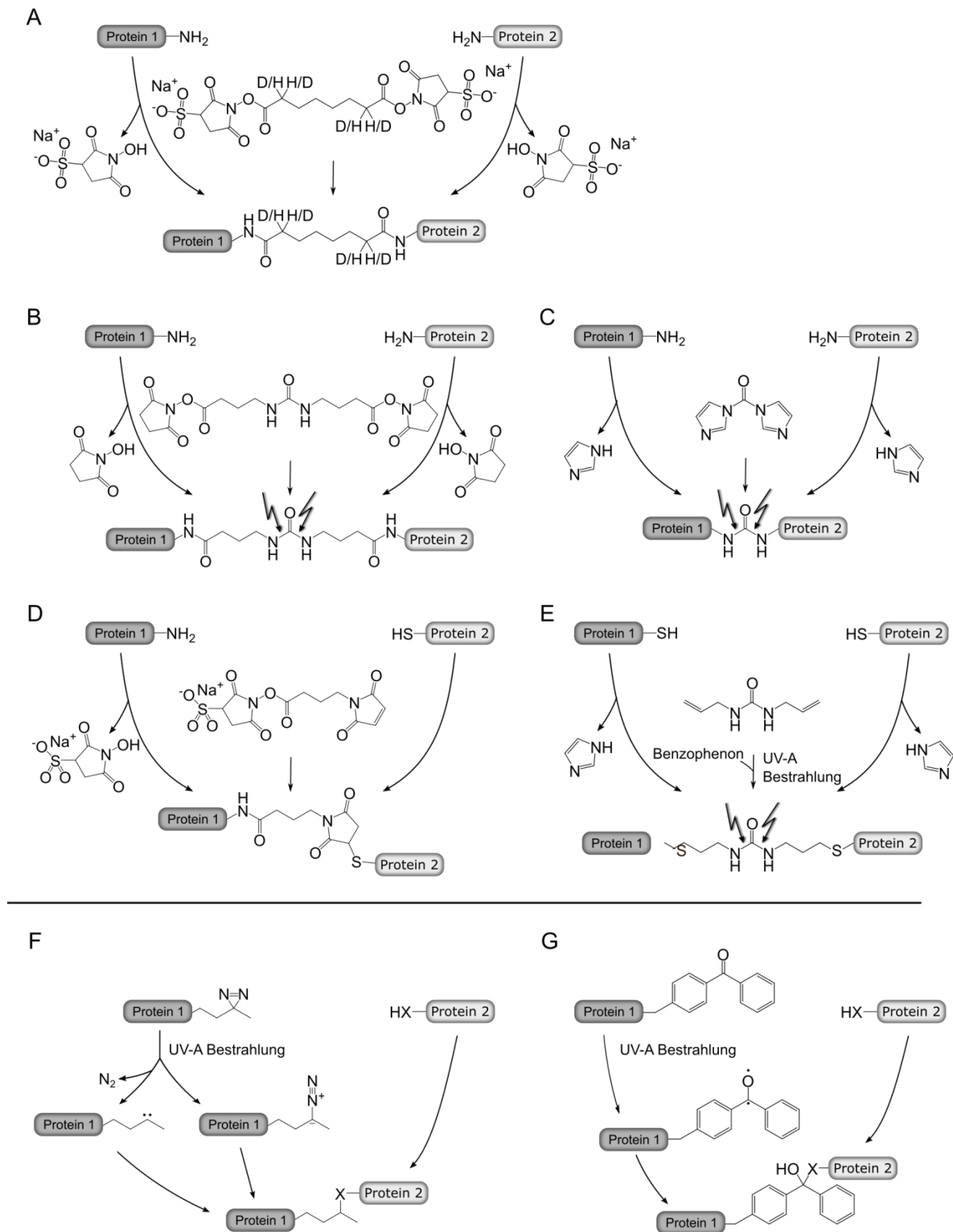


Abbildung A1: Reaktivität der verwendeten Vernetzungsreagenzien. (A) BS^3 : Bis(sulfosuccinimidyl)suberat, (B) DSBU: Disuccinimidyl dibutylurea, (C) CDI: 1,1'-Carbonyldiimidazol, (D) Sulfo-GMBS: N- γ -Maleimido-butyryloxysulfosuccinimide ester, (E) DAU: Diallylurea, (F) Photo-Met: Photo-Methionin, (G) Bpa: Benzoyl-phenylalanin.

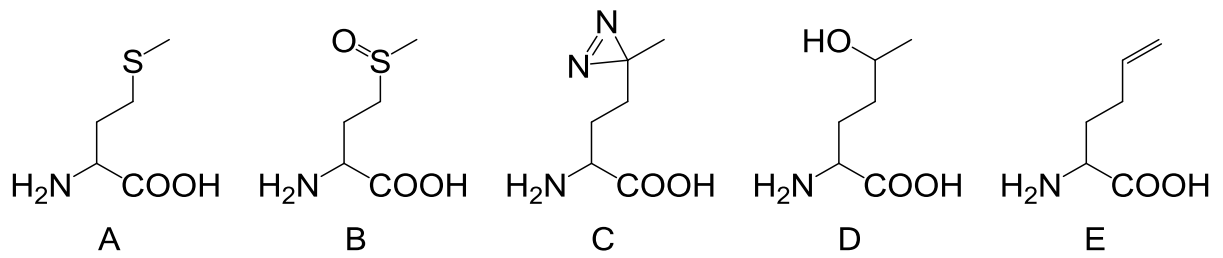


Abbildung A2: Für die Quantifizierung eingesetzte Spezies von Met und Photo-Met. (A) Met, (B) oxidiertes Met, (C) Photo-Met, (D) hydrolysiertes Photo-Met, (E) N₂-Verlust von Photo-Met.

A

GSPEFHQGL SFLPKDGS AK QSDVSKLQDE VKGTSGAPQV ISDPCGELSL LHQLEGSSPV
 421 LIPKEEDCGK LQIFKQDSQE HKACNVTKLQ SDCNNAIKAS SCLSLSGPLK AEKVNAEDRM
 481 LGGEDGLDIL SPKQLEDLLA DKSRRFATLN PDSAVEEVII GPETFSNMVH IDLNEEETCT
 541 AQVLKNVFDK SSCVLGGSQE DEDVEIKFHT TKLSRAIHHF RLALQGVFQK LENNGSISPE
 601 DLESNESGSQ SENSDRLLWT VSSGGAHDCS VESPASQGSE SLLSVVSGGV GISVQGDQTP
 661 QAPSNFSLAS NNSPLTNSLL SFPLAPGLGN ETCSRPDSPN QGKLSLEQVC AETIYLNKCI
 721 NNFKNVLREK RLRQKLLQE LVQTASHLSV EDIPSEGKRE ALQISDDGDP SLPQWLPEGP
 LERPHRD

M = 46032 Da

B

GSHQGL SFLPKDGS AK QSDVSKLQDE VKGTSGAPQV ISDPCGELSL LHQLEGSSPV
 421 LIPKEEDCGK LQIFKQDSQE HKACNVTKLQ SDCNNAIKAS SCLSLSGPLK AEKVNAEDRM
 481 LGGEDGLDIL SPKQLEDLLA DKSRRFATLN PDSAVEEVII GPETFSNMVH IDLNEEETCT
 541 AQVLKNVFDK SSCVLGGSQE DEDVEIKFHT TKLSRAIHHF RLALQGVFQK LENNGSISPE
 601 DLESNESGSQ SENSDRLLWT VSSGGAHDCS VESPASQGSE SLLSVVSGGV GISVQGDQTP
 661 QAPSNFSLAS NNSPLTNSLL SFPLAPGLGN ETCSRPDSPN QGKLSLEQVC AETIYLNKCI
 721 NNFKNVLREK RLRQKLLQE LVQTASHLSV EDIPSEGKRE ALQISDDGDP SLPQWLPEGP
 781 AGGLYGIDSM PDLRRKKPLP LVSDLAMSLV QSRKAGITSA MATRTSLKDE DLKSHVYKKT
 841 LQALIYPISC TTPHNFEVWS ATTPTYCYEC EGLLWGLARQ GMRCSECGVK CHEKCQDLLN
 901 ADCEFFGRLE RPHRD

M = 59859 Da

C

703 KLSLEQVC AETIYLNKCI NNFKNVLREK RLRQKLLQE LV

M = 4854 Da

Abbildung A3: Aminosäuresequenzen der verwendeten bMunc13-2-Segmente. (A) Segment-A, (B) Segment-B und (C) Segment-C. Die in der Sequenz enthaltenen CaM Bindestellen sind unterstrichen, wobei die C-terminale, bedeutendere Bindestelle hervorgehoben ist. Gepunktet unterstrichene Aminosäuresequenzen sind Aminosäuren, welche von der multiplen Klonierungsstelle verbleiben. Das Lysin 703 ist kursiv gekennzeichnet, da dieses für die Modellierung der CaM/bMunc13-2-Interaktion nicht einbezogen und später in der Synthese genutzt wurde.

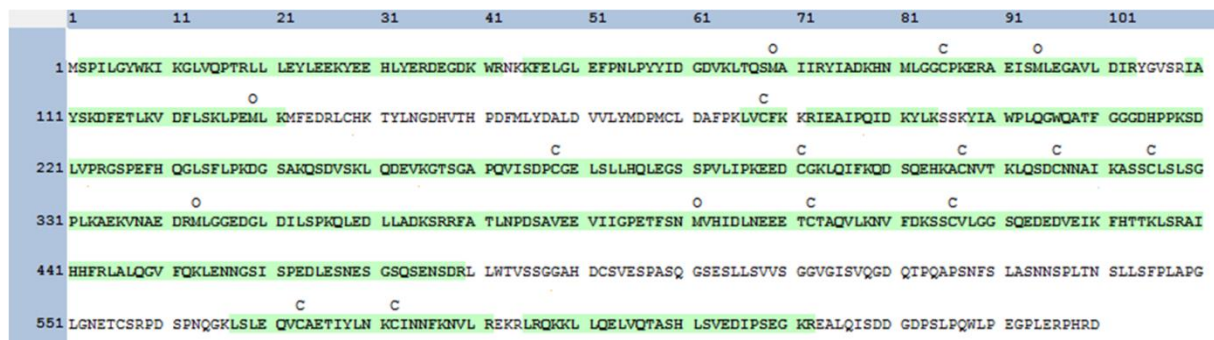


Abbildung A4: Sequenzabdeckung GST-bMunc13-2-Segment-A. O: oxidiertes Met, C: carbamidomethyliertes Cys

Anhang

001 MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID
 061 GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV
 121 DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPCLKVCFK
 181 KRIEAIPQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPKSD LVPR

M = 26166 Da

Abbildung A5: Aminosäuresequenz der Glutathion-S-transferase. Gepunktet unterstrichene Aminosäuresequenzen sind Aminosäuren, welche von der multiplen Klonierungsstelle verbleiben.

| | 1 | 11 | 21 | 31 | 41 | 51 | 61 | 71 | 81 | 91 | 101 |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 1 | | | | | C | | C | | C | C | C |
| | GSPEFHQGLS | FLPKDGSAMQ | SDVSKLQDEV | KGTSGAPQVI | SDPCGELSL | HQLEGSSPVL | IPKEEDCGKL | QIFKQDSQEH | KACNVTKLQS | DCNNAIKASS | CLSLSGPLKA |
| 111 | | O | | | | | O | C | | C | |
| | EKVNADERML | GGEDGLDILS | PKQLEDLLAD | KSRRFATLNP | DSAVEEVIIG | PETFSNMVHI | DLNEEETCTA | QVLIKNVFDKS | SCVLGGSQED | EDVEIKFHTT | KLSRAIHHRF |
| 221 | | | | | C | | | | | | |
| | LALQGVFQKL | ENNGSISPED | LESNESGSQS | ENSDRLLTWV | SSGGAHDCSV | ESPASQGSSE | LLSVVSGGVG | ISVQGDQTPQ | APSNFSLASN | NSPLTNSLLS | FPLAPGLGNE |
| 331 | C | | C | C | | | | | | | |
| | TCSRPDSPNQ | GKLSLEQVCA | ETIYLNKCIN | NFKNVLREKR | LRQKKLLQEL | VQTASHLSVE | DIPSEKREA | LQISDDGDPS | LPQWLPEGPL | ERPHRD | |

Abbildung A6: Sequenzabdeckung bMunc13-2-Segment-A. O: oxidiertes Met, C: carbamidomethyliertes Cys

001 ADQLTEEQIA EFKEAFSLFD KGDGDTITTK ELGTVMRSLG QNPTEAELQD MINEVDADGN
 061 GTIDFPEFLT MMARKMKDTD SEEEIREAFR VFDKDGNGYI SAAELRHVMT NLGEKLTDEE
 121 VDEMIREADI DGDGQVNYEE FVQMMTAKLE HHHHHH

M = 17771 Da

Abbildung A7: Aminosäuresequenz des rekombinanten CaM-(His)₆.

| | 1 | 11 | 21 | 31 | 41 | 51 | 61 | 71 | 81 | 91 | 101 |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | | | | | | D | | DD | D | | D |
| | | | | q | | q | | qq | p | | o |
| | | | | O | | O | | OO | O | | q |
| | | | | p | | p | | pp | q | | p |
| | ADQLTEEQIA | EFKEAFSLFD | KGDGDTITTK | ELGTVMRSLG | QNPTEAELQD | MINEVDADGN | GTIDFPEFLT | MMARKMKDTD | SEEEIREAFR | VFDKDGNGYI | SAAELRHVMT |
| 111 | | D | | DD | | | | | | | |
| | | O | | OO | | | | | | | |
| | | q | | qq | | | | | | | |
| | | p | | pp | | | | | | | |
| | NLGEKLTDEE | VDEMIREADI | DGDGQVNYEE | FVQMMTAKLE | HHHHHH | | | | | | |

Abbildung A8: Sequenzabdeckung des rekombinanten CaM-(His)₆ mit Photo-Met. D: doppelte Oxidation von Met, O: oxidiertes Met, p: N₂-Verlust von Photo-Met, q: hydrolysiertes Photo-Met.

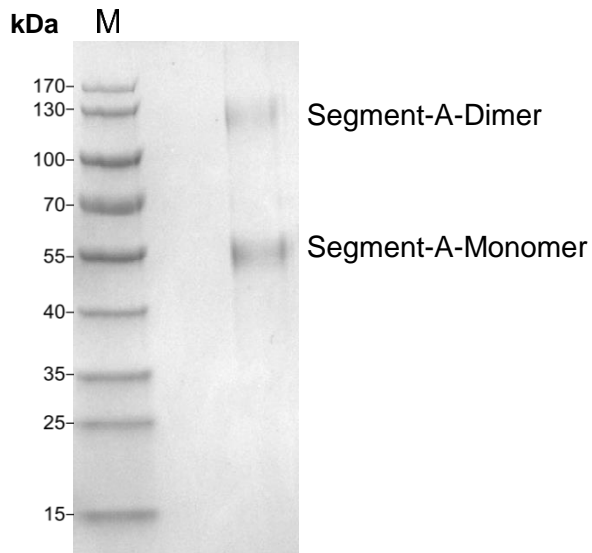
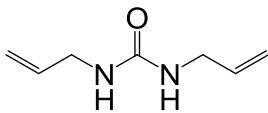


Abbildung A9: Vernetzung von Segment-A mit DSBU.

A



B

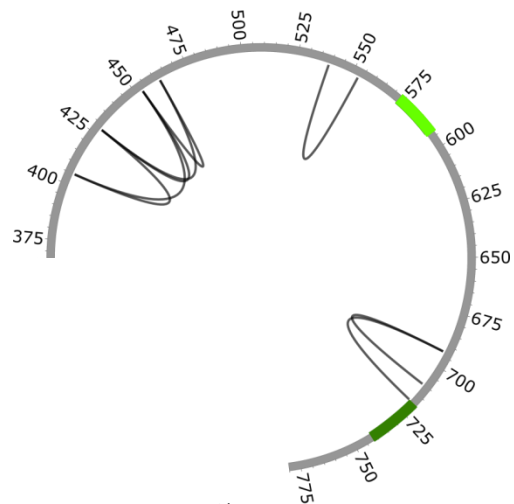


Abbildung A10: Vernetzte Aminosäuren innerhalb von bMunc13-2 Segment-A mittels DAU. (A) Struktur des DAU-Vernetzungsreagenzes. (B) Zirkulärer Plot der vernetzten Aminosäuren.

Anhang

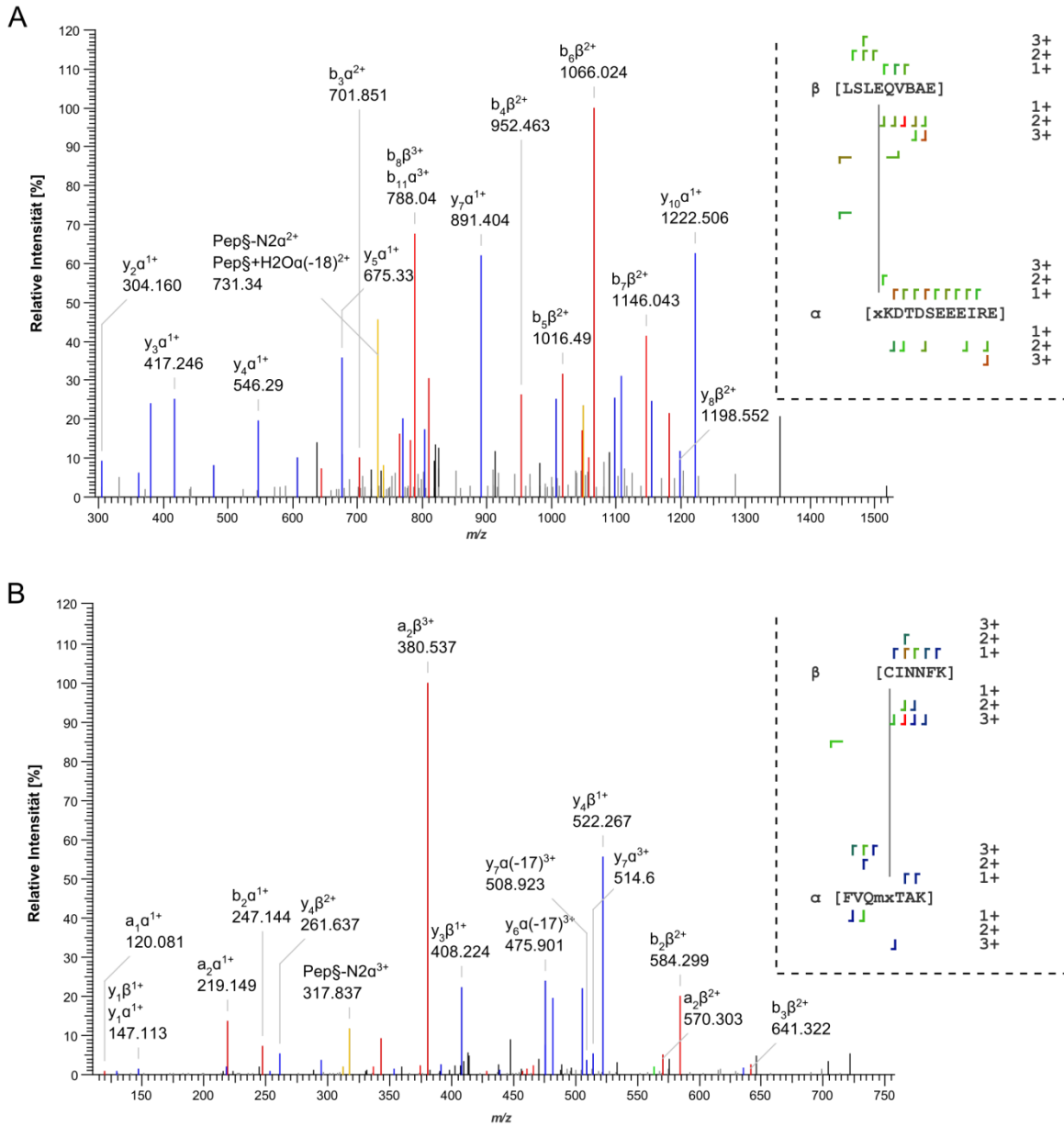


Abbildung A11: Fragmentionenmassenspektren von Vernetzungsprodukten mit photo-Met zwischen CaM und bMunc13-2. (A) Vorläuferion: m/z 837,059; Ladungszustand: 3+; LSLEQVBAE: AS 703-712 von bMunc13-2, xKDTDSEEEIRE: AS 76-87 von CaM (B) Vorläuferion: m/z 422,968; Ladungszustand: 4+; CINNFK: AS 719-724 von bMunc13-2; FVQmxTAK: AS 141-148 von CaM. m: oxidiertes Methionin, x: Photo-Met.

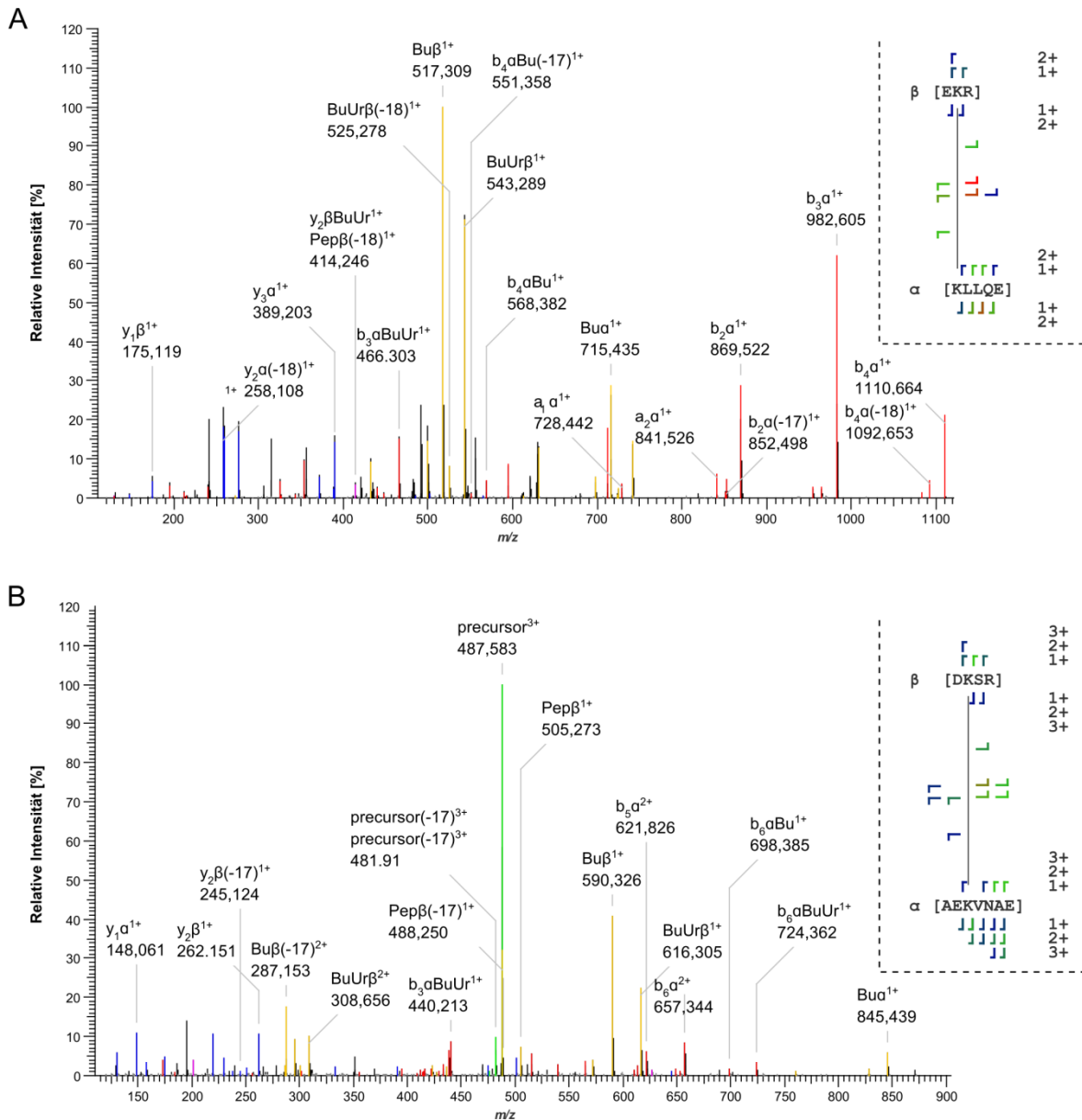


Abbildung A12: Fragmentationenmassenspektren von Vernetzungsprodukten mit DSBU innerhalb von *bMunc13-2*. (A) Vorläuferion: m/z 629,362; Ladungszustand: 2+; EKR: AS 729-731, KLLQE: AS 736-740 (B) Vorläuferion: m/z 487,583; Ladungszustand: 3+; DKSR: AS 501-504; AEKVNAE: AS 471-477.

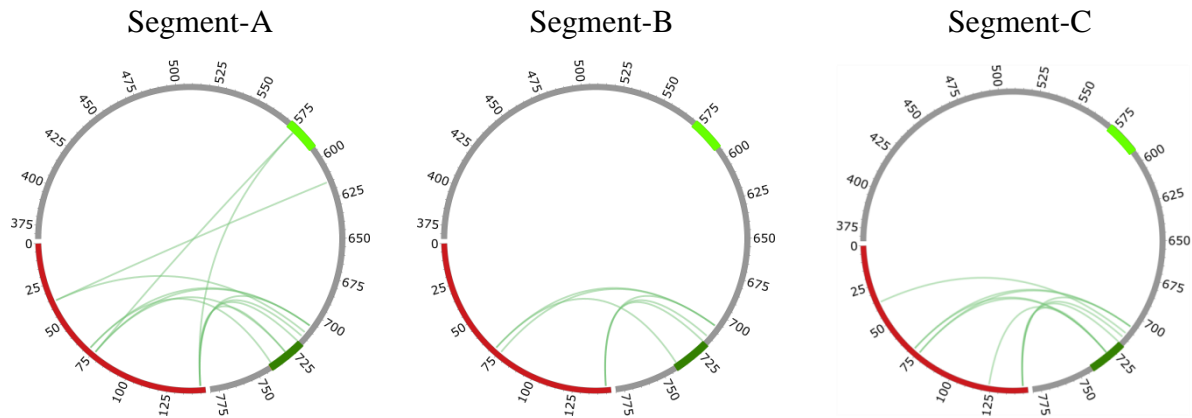


Abbildung A14: Vergleich der vernetzten Aminosäuren zwischen CaM und Segment-A, -B und -C. Die Abbildung zeigt für die vernetzten Aminosäuren mit CaM im zirkulären Plot. Zum vereinfachten Vergleich der vernetzten Aminosäuren ist für alle Segmente die Sequenz von Segment-A dargestellt. CaM ist in rot und Segment-A ist in grau mit grün hervorgehobenen CaM-Bindestellen (Färbung vgl. Abbildung 2) dargestellt.

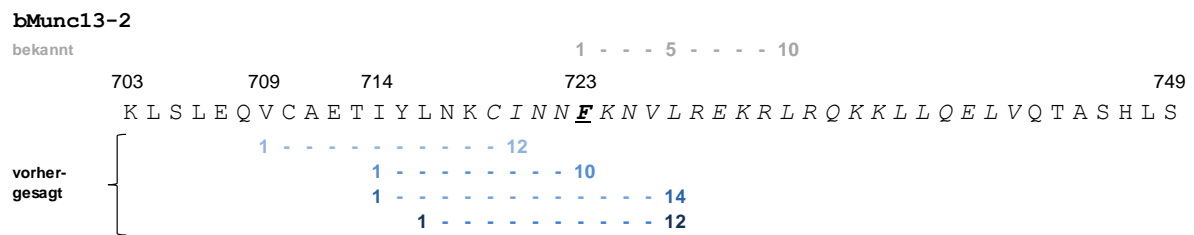
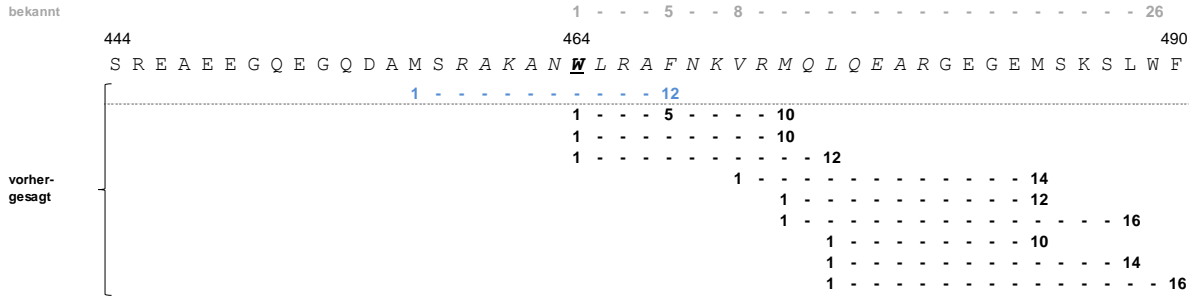


Abbildung A16: CaM-Bindemotive in bMunc13-2 Segment-C – Datenbanksuche. Die Sequenz des Segment-C wurde mit Hilfe der Website <http://cam.umassmed.edu/index.php> analysiert. In kursiv ist die bekannte CaM-Binderegion hervorgehoben. Das bekannte Motiv ist in grau dargestellt und die postulierte Ankeramino-säure in Position 1 fett hervorgehoben. Die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren sind mit der entsprechenden Position nummeriert.

Anhang

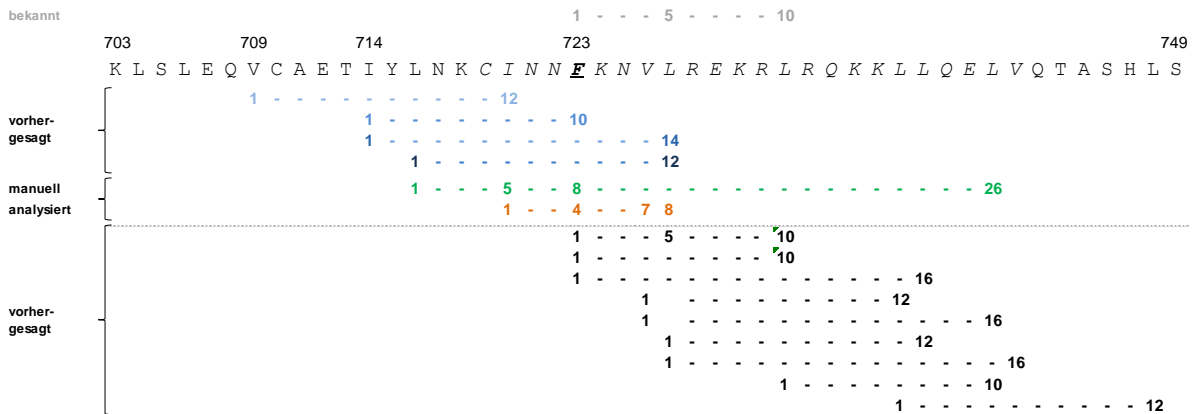
Munc13-1



ubMunc13-2



bMunc13-2



Munc13-3

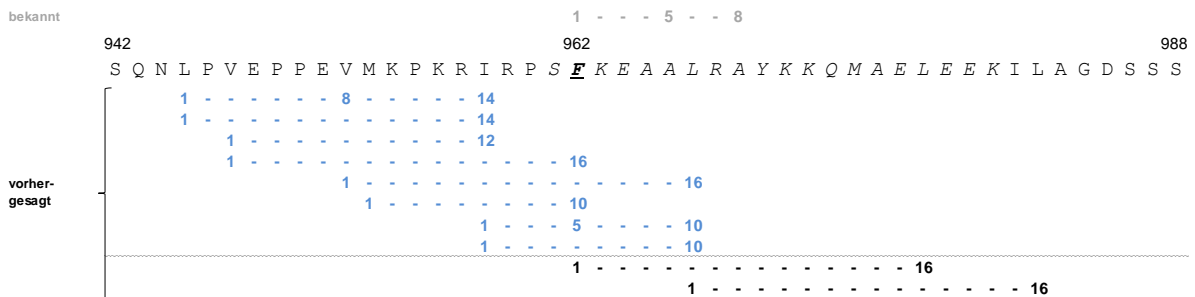


Abbildung A17: CaM-Bindemotive der Munc13-Isoformen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Website <http://cam.umassmed.edu/index.php> (blau und schwarz) und manuell (orange und grün) analysiert. In kursiv ist die bekannte CaM-Binderegion hervorgehoben⁵³. Das bekannte Motiv ist in grau dargestellt und die postulierte Ankeraminosäure in Position 1 fett hervorgehoben. Die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren sind mit der entsprechenden Position nummeriert. Die schwarz dargestellten Motive befinden sich bzw. beginnen innerhalb der postulierten Binderegionen (kursiv).

Tabelle AI: Vernetzte Aminosäuren mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-A bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. x bezeichnet die Aminosäure Photo-Met.

| Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Calciumkonzentration | | | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|--------|-------|--------|------|
| | | 750 nM | 2,5 µM | 45 µM | 300 µM | 1 mM |
| x36 | D615 | | | | | ✓ |
| x36 | E712 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| x71/x72 | E707 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| x71/x72 | E740 | | | | | ✓ |
| x76 | H578 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| x76 | E707 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| x76 | E729 | | ✓ | | | ✓ |
| x144/x145 | H578/H579 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | E707 | | | | | ✓ |
| x144/x145 | Y715 | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |
| x144/x145 | C719 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | E729 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |

Tabelle A2: Zusammenfassung der intermolekularen Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-A. *x* bezeichnet die Aminosäure Photo-Met, Kleine Buchstaben zeigen die Markierung der Aminosäuren mit ¹⁵N, B: carbamidomethyliertes Cystein, m: oxidiertes Met. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte bei CaM ohne das Startmethionin und bei bMunc13-2 mit Startmethionin. Für die Markierung mit ¹⁵N wurde *E. coli* in Mineralsalzmedium mit ¹⁵NH₄Cl kultiviert.

| Vernetzungsreagenz | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|--------------------|---------------------------|---------------------------------|---|----------------|---|--|
| | x36 | D615 | 1146,623 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁶¹³ NSDR ₆₁₆ |
| | x36 | E712 | 2436,317 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | E712 | 2565,359 | 3+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x71/x72 | E707 | 1896,956 | 2+,3+ | ⁶⁸ FLTxMAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTMxAR ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707 | 1905,929 | 2+ | ⁶⁸ fltxmar ₇₄ / ⁶⁸ fltmxar ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707 | 1912,951 | 2+,3+ | ⁶⁸ FLTxmAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTmXAR ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E729 | 1296,709 | 3+ | ⁶⁸ FLTxmAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTmXAR ₇₄ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x71/x72 | E740 | 3257,709 | 4+ | ⁶⁸ FLTxmAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTmXAR ₇₄ | ⁷³⁷ LLQELVQTASHLSVEDIPSEgK ₇₅₈ |
| | x71/x72 | E740 | 3413,810 | 5+ | ⁶⁸ FLTxmAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTmXAR ₇₄ | ⁷³⁷ LLQELVQTASHLSVEDIPSEgKR ₇₅₉ |
| | x71/x72 | E740 | 3526,857 | 4+ | ⁶⁸ FLTxMAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTMxAR ₇₄ | ⁷³⁷ LLQELVQTASHLSVEDIPSEgKRE ₇₆₀ |
| | x76 | H578 | 1165,695 | 3+ | ⁷⁵ KxK ₇₇ | ⁵⁷⁶ AIHFR ₅₆₁ |
| | x76 | H578 | 2369,184 | 5+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁵⁷⁶ AIHFR ₅₆₁ |
| | x76 | H578 | 2386,134 | 4+,5+ | ⁷⁵ kxkdtDSEEEIRE ₈₇ | ⁵⁷⁶ AIHFR ₅₆₁ |
| | x76 | E707 | 1433,767 | 3+ | ⁷⁵ KxK ₇₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2110,933 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2239,028 | 3+,4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2249,996 | 3+ | ⁷⁵ kxkdtDSEEE ₈₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2509,161 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2524,117 | 3+ | ⁷⁶ xkdtDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2637,256 | 3+,4+,5+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2654,206 | 4+,5+ | ⁷⁵ kxkdtDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E729 | 2021,015 | 3+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x76 | E729 | 2037,967 | 3+ | ⁷⁵ kxkdtDSEEEIRE ₈₇ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | E707 | 1982,993 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQmX TAK ₁₄₈ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | E707 | 1998,987 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxmTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQmX TAK ₁₄₈ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | H578/H579 | 1714,921 | 3+ | ¹¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQmX TAK ₁₄₈ | ⁵⁷⁶ AIHFR ₅₆₁ |
| | x144/x145 | H578/H579 | 1723,894 | 3+ | ¹¹⁴¹ fvqxmtak ₁₄₈ / ¹⁴¹ fvqmx tak ₁₄₈ | ⁵⁷⁶ AIHFR ₅₆₁ |
| | x144/x145 | H578/H579 | 1730,916 | 4+ | ¹⁴¹ FVQxmTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQmX TAK ₁₄₈ | ⁵⁷⁶ AIHFR ₅₆₁ |
| | x145 | Y715 | 1685,929 | 3+ | ¹⁴¹ FVQmX TAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ |
| | x144/x145 | Y715 | 1928,056 | 3+,4+ | ¹⁴¹ FVQmX TAKLE ₁₅₀ / ¹⁴¹ FVQmX TAKLE ₁₅₀ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ |
| | x144/x145 | Y715 | 1939,024 | 4+ | ¹⁴¹ fvqmx take ₁₅₀ / ¹⁴¹ fvqmx take ₁₅₀ | ³ TIYLNK ₇₁₈ |

| Vernetzungs- reagenz | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungs- zustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------|--|--|
| Photo-Met | x144/x145 | C719 | 1672,855 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | C719 | 1681,828 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ fvqxmtak ₁₄₈ / ¹⁴¹ fvqmx ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | C719 | 1688,850 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxmTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQmxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | C719 | 1914,982 | 4+ | ¹⁴¹ FVQMxTAKLE ₁₅₀ / ¹⁴¹ FVQMxTAKLE ₁₅₀ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | C719 | 3223,456 | 3+ | ¹²⁶ EADIDGDGQVNYEEFVQxmTAK ₁₄₈ / ¹²⁶ EADIDGDGQVNYEEFVQmxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | E729 | 1366,751 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | E729 | 1619,845 | 3+ | ¹⁴¹ fvqxmtakle ₁₅₀ / ¹⁴¹ fvqmx ₁₅₀ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| DSBU | K75 | K735 | 1809,853 | 3+ | ⁷⁵ KMKD ₇₇ TDSEEE ₈₄ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ |
| s-GMBS | K14 | C428 | 1267,515 | 3+ | ¹³ FKE ₁₅ | ⁴²⁵ EEDCGK ₄₃₀ |
| | K31 | C428 | 1880,770 | 3+ | ²³ DGDGTIT ₃₂ TKE ₃₂ | ⁴²⁵ EEDCGK ₄₃₀ |
| | K75 | C453 | 1675,814 | 3+, 4+ | ⁷⁵ KMK ₇₇ | ⁴⁴⁹ LQSDCNNAIK ₄₅₈ |

Anhang

Tabelle A3: Intramolekulare Vernetzungsprodukte in Segment-A - BS³ und DSBU. Die Calciumkonzentrationen der jeweiligen Reaktionsansätze sind angegeben.

| | | Monomer | | | | | Heterodimer | |
|------|------|---------|--------|------|-----------------|------|-------------|------|
| | | DSBU | | | BS ³ | | DSBU | |
| | | 75 nM | 750 nM | 1 mM | 75 nM | 1 mM | 750 nM | 1 mM |
| S378 | K386 | ✓ | | | | | | |
| K380 | K386 | | ✓ | | ✓ | | ✓ | ✓ |
| K380 | K392 | | | | | | ✓ | ✓ |
| K380 | K473 | ✓ | ✓ | ✓ | | | | ✓ |
| K380 | K502 | | | ✓ | | | | |
| K380 | K735 | | | | | | ✓ | |
| K380 | K736 | | | ✓ | | | | |
| S382 | K473 | | | ✓ | | | | |
| K386 | K473 | | | ✓ | | | | |
| K386 | K502 | | | ✓ | | | | ✓ |
| K392 | K502 | | | | | | | ✓ |
| S418 | K473 | | | ✓ | | | | |
| K435 | K502 | | ✓ | | | | | |
| K442 | S451 | | ✓ | ✓ | | | ✓ | |
| K442 | K473 | ✓ | ✓ | ✓ | | | | ✓ |
| K442 | K502 | | | ✓ | | | ✓ | |
| K448 | K473 | | ✓ | | | | | |
| K448 | K502 | | ✓ | | | | | |
| S466 | K473 | | | ✓ | | | | |
| K470 | K502 | | | ✓ | | | | |
| K473 | K502 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| K473 | K572 | | | ✓ | ✓ | | | |
| K473 | K730 | ✓ | | ✓ | | | ✓ | |
| K473 | K735 | | ✓ | | | | | ✓ |
| K473 | K736 | | | ✓ | ✓ | | | |
| K493 | K502 | | | | | | ✓ | ✓ |
| K502 | K550 | | | | | | | ✓ |
| K502 | S558 | | ✓ | | | | | |
| K502 | K572 | | | ✓ | | | | |
| K502 | K730 | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | | |
| K502 | K735 | | | | ✓ | | | |
| K502 | K736 | | | ✓ | ✓ | | | |
| K502 | K758 | | | | | | | ✓ |
| S503 | K730 | | | | ✓ | | | |
| S503 | K736 | | | | ✓ | | | |
| K572 | K730 | ✓ | | | ✓ | | | |
| K724 | K735 | | ✓ | ✓ | | | | |
| K730 | K735 | ✓ | ✓ | ✓ | | | ✓ | ✓ |
| K730 | K736 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| K730 | K758 | | ✓ | | | ✓ | ✓ | ✓ |
| K735 | K758 | | | | | ✓ | | ✓ |
| K736 | K758 | | | | | ✓ | | |

Tabelle A4: Zusammenfassung der intramolekularen Vernetzungsprodukte innerhalb von Segment-A aus dem Monomersignal - BS³. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte mit Startmethionin. B: carbamidomethyliertes Cystein.

| Vernetzte Aminosäure 1 | Vernetzte Aminosäure 2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungs-zustand | Peptid 1 | Peptid 2 | BS ³ D ₀ /D ₄ |
|------------------------|------------------------|---|-----------------|---|---|--|
| K380 | K386 | 1994,023 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAK ₃₈₀ | ³⁸¹ QSDVSKLQDEVK ₃₉₂ | D ₄ |
| K473 | K502 | 1618,895 | 3+ | ⁴⁷³ KVNAE ₄₇₇ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ | D ₄ |
| K473 | K502 | 1890,023 | 3+ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ | D ₄ |
| K473 | K502 | 2460,288 | 4+ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ | D ₄ |
| K473 | K572 | 2162,150 | 4+ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ | ⁵⁶⁸ FHTTKLSR ₅₇₅ | D ₄ |
| K473 | K736 | 1571,839 | 3+ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ | D ₀ |
| K473 | K736 | 1575,864 | 3+, 4+ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ | D ₄ |
| K502 | K730 | 1486,822 | 3+ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | D ₀ |
| K502 | K730 | 1490,847 | 3+ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | D ₄ |
| K502 | K730 | 1861,033 | 3+, 4+ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | D ₄ |
| K502 | K735 | 1832,043 | 4+ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ | D ₄ |
| K502 | K736 | 1828,017 | 4+ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ | D ₀ |
| K502 | K736 | 1832,043 | 4+ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ | D ₄ |
| S503 | K730 | 1861,033 | 3+ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | D ₄ |
| S503 | K736 | 1185,695 | 2+ | ⁵⁰³ SRR ₅₀₅ | ⁷³⁶ KLLQE ₇₄₀ | D ₀ |
| S503 | K736 | 1189,720 | 2+ | ⁵⁰³ SRR ₅₀₅ | ⁷³⁶ KLLQE ₇₄₀ | D ₄ |
| S503 | K736 | 1461,857 | 3+ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ | D ₄ |
| K572 | K730 | 1562,895 | 3+ | ⁵⁶⁸ FHTTKLSR ₅₇₅ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | D ₄ |
| K730 | K736 | 1199,699 | 2+, 3+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷³⁶ KLLQE ₇₄₀ | D ₀ |
| K730 | K736 | 1203,725 | 2+, 3+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷³⁶ KLLQE ₇₄₀ | D ₄ |
| K730 | K758 | 2639,430 | 4+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷⁴¹ LVQTASHLSVEDIPSEGKR ₇₅₉ | D ₄ |
| K735 | K758 | 2610,440 | 4+ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ | ⁷⁴¹ LVQTASHLSVEDIPSEGKR ₇₅₉ | D ₄ |

Anhang

Tabelle A5: Zusammenfassung der intramolekularen Vernetzungsprodukte innerhalb von Segment-A aus dem Monomersignal - DSBU. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte mit Startmethionin. B: carbamidomethyliertes Cystein.

| Vernetzte Aminosäure 1 | Vernetzte Aminosäure 2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungs-zustand | Peptid 1 | Peptid 2 |
|------------------------|------------------------|---|-----------------|--|--|
| S378 | K386 | 1820,851 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAK ₃₈₀ | ³⁸¹ QSDVSKLQDE ₃₉₀ |
| K380 | K386 | 1820,851 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAK ₃₈₀ | ³⁸¹ QSDVSKLQDE ₃₉₀ |
| K380 | K386 | 1576,781 | 2+, 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQS ₃₈₂ | ³⁸³ DVSKLQ ₃₈₈ |
| K380 | K473 | 1703,819 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAK ₃₈₀ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ |
| K380 | K473 | 2148,053 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQSDVSK ₃₈₆ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ |
| K380 | K473 | 2348,132 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQSDVSK ₃₈₆ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ |
| K380 | K502 | 2234,126 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQSDVSK ₃₈₆ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ |
| K380 | K736 | 1719,887 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQSDVSK ₃₈₆ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ |
| S382 | K473 | 2148,053 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQSDVSK ₃₈₆ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ |
| K386 | K473 | 2148,053 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQSDVSK ₃₈₆ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ |
| K386 | K502 | 1931,008 | 3+ | ³⁸⁴ VSKLQDE ₃₉₀ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ |
| S418 | K473 | 1924,050 | 3+ | ⁴¹⁶ GSSPVLIPK ₄₂₄ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ |
| K435 | K502 | 1476,817 | 3+ | ⁴³¹ LQIFKQ ₄₃₆ | ⁵⁰¹ DKSR ₅₀₄ |
| K442 | S451 | 2315,123 | 3+, 4+ | ⁴⁴¹ HKABNVTK ₄₄₈ | ⁴⁴⁹ LQSDBNNAIK ₄₅₈ |
| K442 | K473 | 1984,003 | 3+ | ⁴⁴¹ HKABNVTK ₄₄₈ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ |
| K442 | K502 | 2070,076 | 3+ | ⁴⁴¹ HKABNVTK ₄₄₈ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ |
| K448 | K473 | 1984,003 | 4+ | ⁴⁴¹ HKABNVTK ₄₄₈ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ |
| K448 | K502 | 1720,865 | 3+ | ⁴⁴³ ABNVTKLQS ₄₅₁ | ⁵⁰¹ DKSR ₅₀₄ |
| S466 | K473 | 2175,096 | 2+, 3+ | ⁴⁵⁹ ASSBLSLSGFLKAE ₄₇₂ | ⁴⁷³ KVNAE ₄₇₇ |
| K473 | K502 | 1145,627 | 2+ | ⁴⁷³ KVNAE ₄₇₇ | ⁵⁰² KSR ₅₀₄ |
| K473 | K502 | 1672,886 | 2+ | ⁴⁷³ KVNAE ₄₇₇ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ |
| K473 | K502 | 1872,966 | 2+ | ⁴⁷¹ AEKVNAE ₄₇₇ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ |
| K473 | K502 | 1944,014 | 3+, 4+ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ |
| K473 | K502 | 2144,094 | 3+ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ |
| K473 | K502 | 2314,200 | 3+ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ |
| K473 | K502 | 2514,279 | 3+ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ |
| K473 | K572 | 2016,062 | 3+ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ | ⁵⁶⁸ FHTTKLSR ₅₇₅ |
| K473 | K730 | 1458,766 | 3+ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| K473 | K730 | 1658,846 | 3+, 4+ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| K473 | K735 | 1629,855 | 3+ | ⁴⁷¹ AEKVNAEDR ₄₇₉ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ |
| K473 | K736 | 1385,763 | 2+ | ⁴⁷³ KVNAE ₄₇₇ | ⁷³⁶ KLLQE ₇₄₀ |
| K502 | S558 | 2123,015 | 3+ | ⁵⁰¹ DKSR ₅₀₄ | ⁴⁴⁹ DKSSBVLGGSQE ₄₆₀ |
| K502 | K572 | 2102,135 | 4+ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ | ⁵⁶⁸ FHTTKLSR ₅₇₅ |
| K502 | K730 | 1544,839 | 3+ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| K502 | K730 | 1700,940 | 3+, 4+ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| K502 | K730 | 1915,024 | 3+ | ⁴⁹⁴ QLEDLLADKSR ₅₀₄ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| K502 | K736 | 1742,965 | 2+ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ | ⁷³⁶ KLLQE ₇₄₀ |
| K572 | K730 | 1616,887 | 3+, 4+ | ⁵⁶⁸ FHTTKLSR ₅₇₅ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| K572 | K730 | 1858,066 | 3+ | ⁵⁶⁶ IKFHTTKLSR ₅₇₅ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| K724 | K735 | 1876,022 | 3+, 4+ | ⁷¹⁹ BINNFKNVLR ₇₂₈ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ |
| K730 | K735 | 1299,786 | 3+, 4+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷³² LRQKK ₇₃₆ |
| K730 | K736 | 1257,716 | 2+, 3+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷³⁶ KLLQE ₇₄₀ |
| K730 | K758 | 1528,808 | 3+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷⁵² DIPSEGR ₇₅₉ |

Tabelle A6: Zusammenfassung der intramolekularen Vernetzungsprodukte innerhalb von Segment-A aus dem CaM/Segment-A-Heterodimer – DSBU. B: carbamidomethyliertes Cystein.

| Vernetzte Aminosäure 1 | Vernetzte Aminosäure 2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Peptid 1 | Peptid 2 |
|------------------------|------------------------|---|----------------|--|--|
| K380 | K386 | 1820,851 | 2+ | ³⁷⁶ DGSAK ₃₈₀ | ³⁸¹ QSDVSKLQDE ₃₉₀ |
| K380 | K386 | 1576,781 | 2+, 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQS ₃₈₂ | ³⁸³ DVSKLQ ₃₈₈ |
| K380 | K392 | 2275,105 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQS ₃₈₂ | ³⁸⁹ DEVKGTSGAPQVIS ₄₀₂ |
| K380 | K473 | 2148,053 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQSDVSK ₃₈₆ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ |
| K380 | K735 | 1719,887 | 3+ | ³⁷⁶ DGSAKQSDVSK ₃₈₆ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ |
| K386 | K502 | 1389,733 | 2+, 3+ | ³⁸³ DVSKLQ ₃₈₈ | ⁵⁰¹ DKSR ₅₀₄ |
| K392 | K502 | 2088,056 | 3+ | ³⁸⁹ DEVKGTSGAPQVIS ₄₀₂ | ⁵⁰¹ DKSR ₅₀₄ |
| K442 | K473 | 1984,003 | 3+ | ⁴⁴¹ HKABNVTK ₄₄₈ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ |
| K442 | S451 | 1958,924 | 3+, 4+ | ⁴³⁷ DSQEHKABNVTK ₄₄₈ | ⁴⁴⁹ LQS ₄₅₁ |
| K442 | K502 | 2273,105 | 4+ | ⁴³⁷ DSQEHKABNVTK ₄₄₈ | ⁵⁰¹ DKSRR ₅₀₅ |
| K473 | K502 | 1944,014 | 3+ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ | ⁴⁹⁷ DLLADKSR ₅₀₄ |
| K473 | K502 | 1460,734 | 3+ | ⁴⁷¹ AEKVNAE ₄₇₇ | ⁵⁰¹ DKSR ₅₀₄ |
| K473 | K730 | 1458,766 | 3+ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| K473 | K735 | 1429,776 | 3+ | ⁴⁷³ KVNAEDR ₄₇₉ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ |
| K493 | K502 | 1742,928 | 2+, 3+ | ⁴⁸⁸ DILSPKQLE ₄₉₆ | ⁵⁰¹ DKSR ₅₀₄ |
| K502 | K550 | 2123,015 | 3+ | ⁴⁴⁹ DKSSBVLGGSQE ₄₆₀ | ⁵⁰¹ DKSRR ₅₀₅ |
| K502 | K758 | 1757,925 | 3+ | ⁵⁰¹ DKSRR ₅₀₅ | ⁷⁵² DIPSEGKR ₇₅₉ |
| K730 | K735 | 1299,786 | 2+, 3+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷³² LRQKK ₇₃₆ |
| K730 | K736 | 1257,716 | 2+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷³⁶ KLLQE ₇₄₀ |
| K730 | K736 | 1299,786 | 2+, 3+, 4+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷³² LRQKK ₇₃₆ |
| K730 | K758 | 1528,808 | 2+, 3+ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ | ⁷⁵² DIPSEGKR ₇₅₉ |
| K735 | K758 | 1499,818 | 3+ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ | ⁷⁵² DIPSEGKR ₇₅₉ |
| K736 | K758 | 1499,818 | 3+ | ⁷³⁴ QKK ₇₃₆ | ⁷⁵² DIPSEGKR ₇₅₉ |

Tabelle A7: Vernetzte Aminosäuren innerhalb von Segment-A – DAU.

| Calcium-konzentration | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungs-zustand | Aminosäuresequenz bMunc13-2 | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|---|-----------------|--|---|
| 1 mM | C453 | C462 | 2407,232 | 3+, 4+ | ⁴⁴⁹ LQSDCENNAIK ₄₅₈ | ⁴⁵⁹ ASSCLSLSGPLK ₄₇₀ |
| 750 nM | C405 | C428 | 2236,97 | 3+ | ³⁹³ GTSGAPQVISDPCE ₄₀₇ | ⁴²⁵ EEDCGK ₄₃₀ |
| | C453 | C462 | 2407,232 | 3+, 4+ | ⁴⁴⁹ LQSDCENNAIK ₄₅₈ | ⁴⁵⁹ ASSCLSLSGPLK ₄₇₀ |
| ohne Calcium | C405 | C428 | 1978,884 | 3+ | ³⁹³ GTSGAPQVISDPCE ₄₀₇ | ⁴²⁷ DCGK ₄₃₀ |
| | C405 | C428 | 2236,97 | 3+ | ³⁹³ GTSGAPQVISDPCE ₄₀₇ | ⁴²⁵ EEDCGK ₄₃₀ |
| | C405 | C453 | 2662,245 | 3+ | ³⁹³ GTSGAPQVISDPCE ₄₀₇ | ⁴⁴⁹ LQSDCENNAIK ₄₅₈ |
| | C428 | C453 | 1666,789 | 3+, 4+ | ⁴²⁷ DCGK ₄₃₀ | ⁴⁴⁹ LQSDCENNAIK ₄₅₈ |
| | C428 | C453 | 1924,874 | 3+, 4+ | ⁴²⁵ EEDCGK ₄₃₀ | ⁴⁴⁹ LQSDCENNAIK ₄₅₈ |
| | C428 | C462 | 1981,957 | 3+, 4+ | ⁴²⁵ EEDCGK ₄₃₀ | ⁴⁵⁹ ASSCLSLSGPLK ₄₇₀ |
| | C453 | C462 | 2407,232 | 3+, 4+ | ⁴⁴⁹ LQSDCENNAIK ₄₅₈ | ⁴⁵⁹ ASSCLSLSGPLK ₄₇₀ |
| | C453 | C462 | 2607,312 | 4+ | ⁴⁴⁹ LQSDCENNAIK ₄₅₈ | ⁴⁵⁹ ASSCLSLSGPLKAE ₄₇₂ |
| | C453 | C462 | 2735,407 | 4+ | ⁴⁴⁹ LQSDCENNAIK ₄₅₈ | ⁴⁵⁹ ASSCLSLSGPLKAEK ₄₇₃ |
| | C539 | C553 | 2556,18 | 3+ | ⁵³⁸ TCTAQVLK ₅₄₅ | ⁴⁵¹ SSCVLGGSQEDEDVE ₄₆₅ |
| | C539 | C553 | 2797,359 | 4+ | ⁵³⁸ TCTAQVLK ₅₄₅ | ⁴⁵¹ SSCVLGGSQEDEDVEIK ₄₆₇ |
| | C693 | C710 | 1977,912 | 3+ | ⁶⁹² TCSRPDSPNQGK ₇₀₃ | ⁷⁰⁸ QVCAE ₇₁₂ |
| | C693 | C719 | 2167,038 | 4+ | ⁶⁹² TCSRPDSPNQGK ₇₀₃ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |

Tabelle A8: Vernetzte Aminosäuren mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-B bei 750 nM und 1 mM Calcium. x: Photo-Met.

| Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Calciumkonzentration | |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|------|
| | | 750 nM | 1 mM |
| x71/x72 | E707 | ✓ | ✓ |
| x71/x72 | E740 | ✓ | ✓ |
| x76 | E707 | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | E707 | ✓ | |
| x144/x145 | Y715 | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | C719 | ✓ | ✓ |

┌ **Tabelle A9: Zusammenfassung der Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-B mit Photo-Met.** x: Photo-Met, B: carbamidomethyliertes Cystein, m: oxidiertes Met.
Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte bei CaM ohne das Startmethionin und bei bMunc13-2 mit Startmethionin.

| Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|---------------------------|---------------------------------|---|----------------|---|---|
| x71/x72 | E707 | 1896,956 | 3+ | ⁶⁸ FLTxMAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTMxAR ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | E707 | 1912,951 | 2+, 3+ | ⁶⁸ FLTxmAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTMxAR ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | E740 | 3257,709 | 4+, 5+ | ⁶⁸ FLTxmAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTMxAR ₇₄ | ⁷³⁷ LLQELVQTASHLSVEDIPSEGK ₇₅₈ |
| x71/x72 | E740 | 3413,810 | 4+, 5+ | ⁶⁸ FLTxmAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTMxAR ₇₄ | ⁷³⁷ LLQELVQTASHLSVEDIPSEGKR ₇₅₉ |
| x71/x72 | E740 | 3526,857 | 5+ | ⁶⁸ FLTxmAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTMxAR ₇₄ | ⁷³⁷ LLQELVQTASHLSVEDIPSEGRE ₇₆₀ |
| x76 | E707 | 1433,767 | 2+, 3+ | ⁷⁵ KxK ₇₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2166,184 | 4+ | ⁷⁵ KxK ₇₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAETIYLNK ₇₁₈ |
| x76 | E707 | 2239,028 | 3+, 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2380,118 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIR ₈₆ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2508,213 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIR ₈₆ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2509,161 | 3+, 4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2637,256 | 4+, 5+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x144/x145 | E707 | 2225,119 | 3+ | ¹⁴¹ FVQMxTAKLE ₁₅₀ / ¹⁴¹ FVQMxTAKLE ₁₅₀ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| X144/x145 | Y715 | 1701,924 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxmTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQmTAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ |
| x144/x145 | C719 | 1672,855 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| x144/x145 | C719 | 1688,850 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxmTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQmTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |

Tabelle A10: Vernetzte Aminosäuren mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-C bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. x: Photo-Met.

| Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Calciumkonzentration | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | | 750 nM | 2,5 μ M | 7,5 μ M | 100 μ M | 300 μ M | 1 mM |
| x36 | E712 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |
| x71/x72 | E707 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| x71/x72 | E729 | | | | ✓ | ✓ | |
| x76 | E707 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| x76 | E729 | | | | ✓ | | |
| x124 | E729 | | | | | | ✓ |
| x144/x145 | E707 | | | ✓ | | | |
| x144/x145 | Y715 | | | ✓ | | | ✓ |
| x144/x145 | C719 | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | ✓ |
| x144/x145 | E729 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |

Tabelle A11: C_{α} - C_{α} -Distanzen der zusätzlich mit Segment-C identifizierten mit Photo-Met vernetzten Aminosäuren innerhalb der Modelle.

| Vernetzte Aminosäure CaM | Vernetzte Aminosäure bMunc13-2 | C_{α} - C_{α} -Distanz in Å Modell A | C_{α} - C_{α} -Distanz in Å Modell B |
|--------------------------|--------------------------------|--|--|
| x36 | E707 | 18,6 | 24,3 |
| x71/x72 | E729 | 9,5 | 9,9 |
| x124 | E729 | 15,7 | 15,9 |

Tabelle A12: Zusammenfassung der Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-C. *x: Photo-Met, B: carbamidomethyliertes Cystein, m: oxidiertes Met.* Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte bei CaM ohne das Startmethionin und bei bMunc13-2 mit Startmethionin. Segment-C ist N-terminal acetyliert und C-terminal amidiert.

| Vernetzungsreagenz | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|--------------------|---------------------------|---------------------------------|---|----------------|--|--|
| Photo-Met | x36 | E707 | 1874,010 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x36 | E712 | 1994,074 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁸ QVBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | E712 | 2123,117 | 4+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁸ QVBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | E712 | 2735,465 | 4+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x71/x72 | E707 | 1896,956 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707 | 1912,951 | 3+ | ⁶⁸ FLT _{xm} AR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707 | 2067,061 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707 | 2083,056 | 3+ | ⁶⁸ FLT _{xm} AR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E729 | 1296,709 | 3+ | ⁶⁸ FLT _{xm} AR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x76 | E707 | 1821,896 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ |
| | x76 | E707 | 2220,124 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ |
| | x76 | E707 | 2281,039 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2380,118 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIR ₈₆ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2409,134 | 3+, 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2508,213 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIR ₈₆ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2509,161 | 3+, 4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2550,224 | 4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIR ₈₆ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2637,256 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2678,319 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIR ₈₆ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2679,267 | 4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2807,362 | 4+, 5+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E729 | 2021,015 | 3+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x124 | E729 | 1760,902 | 3+, 4+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIR ₁₂₆ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x124 | E729 | 1889,945 | 4+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIRE ₁₂₇ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | E707 | 1982,993 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQm _x TAK ₁₄₈ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | X144/x145 | Y715 | 1685,929 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQm _x TAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ |
| | X144/x145 | Y715 | 1701,924 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxmTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQm _x TAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ |
| | x144/x145 | C719 | 1672,855 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQm _x TAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | C719 | 1688,850 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxmTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQm _x TAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | C719 | 3223,456 | 4+ | ¹²⁶ EADIDGDGQVNYEEFVQxmTAK ₁₄₈ / ¹²⁶ EADIDGDGQVNYEEFVQm _x TAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | E729 | 1366,751 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQm _x TAK ₁₄₈ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | E729 | 1624,873 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxmTAKLE ₁₅₀ / ¹⁴¹ FVQm _x TAKLE ₁₅₀ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |

| Vernetzungs- reagenz | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungs- zustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 | |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------|--|---|--|
| DSBU | K75 | K703 | 2436,181 | 3+ | ⁷⁵ KMKD TDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ | |
| | K75 | K703 | 2452,176 | 3+, 4+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ | |
| | K75 | K703 | 3023,418 | 3+ | ⁷⁵ KMKD TDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| | K75 | K718 | 2950,381 | 4+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEE ₈₄ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| | K75 | K724 | 3348,609 | 4+, 5+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| | K75/77 | K718/724 | 3348,609 | 4+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| | K77 | K703 | 2195,038 | 3+ | ⁷⁶ mK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ | |
| | K77 | K703 | 2308,086 | 3+ | ⁷⁶ MK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ | |
| | K77 | K703 | 2324,081 | 3+ | ⁷⁶ mK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ | |
| | K77 | K703 | 2436,181 | 3+ | ⁷⁵ KMKD TDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ | |
| | K77 | K703 | 2782,276 | 3+ | ⁷⁶ mK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| | K77 | K703 | 2895,323 | 3+ | ⁷⁶ MK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| | K77 | K703 | 2910,371 | 3+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| | K77 | K703 | 2911,318 | 3+ | ⁷⁶ mK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| | K77 | K703 | 3039,413 | 3+, 4+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| | K77 | K718 | 3091,471 | 3+ | ⁷⁶ mK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| | K77 | K718 | 3219,566 | 5+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| | K77 | K724 | 3091,471 | 4+ | ⁷⁶ mK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| | DSBU | K94 | K703 | 2312,129 | 3+ | ⁹¹ VF DKGNGY I SAAE ₁₀₄ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ |
| | | K94 | K703 | 2581,314 | 3+ | ⁹¹ VF DKGNGY I SAAELR ₁₀₆ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ |
| K94 | | K703 | 3168,552 | 3+ | ⁹¹ VF DKGNGY I SAAELR ₁₀₆ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| K148 | | K718 | 2710,340 | 3+ | ¹⁴¹ FVQmmTAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| K148 | | K718 | 4244,946 | 4+ | ¹²⁶ EADIDGDGQVNYEEFVQmmTAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| K148 | | K724 | 2678,350 | 3+ | ¹⁴¹ FVQMMTAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| K148 | | K724 | 2694,345 | 3+ | ¹⁴¹ FVQmMTAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| K148 | | K724 | 2710,340 | 4+ | ¹⁴¹ FVQmmTAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNKBINNFK ₇₂₄ | |
| CDI | | K77 | K703 | 1078,581 | 2+ | ⁷⁵ KmK ₇₇ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ |
| | | K77 | K703 | 1665,819 | 2+ | ⁷⁵ KmK ₇₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | K77 | K703 | 2282,070 | 3+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ | |
| | K77 | K718 | 1182,655 | 3+ | ⁷⁵ KMK ₇₇ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |
| | K77 | K718 | 1198,650 | 2+ | ⁷⁵ KmK ₇₇ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |
| | K77 | K718 | 1875,816 | 2+, 3+ | ⁷⁶ mK DTDSEEE ₈₄ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |
| | K77 | K718 | 1987,916 | 3+ | ⁷⁵ KMK DTDSEEE ₈₄ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |
| | K77 | K718 | 2003,911 | 3+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEE ₈₄ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |
| | K77 | K718 | 2129,007 | 3+, 4+ | ⁷⁶ MK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |
| | K77 | K718 | 2145,002 | 2+, 3+ | ⁷⁶ mK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |
| | K77 | K718 | 2257,102 | 3+, 4+ | ⁷⁵ KMK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |
| | K77 | K718 | 2258,049 | 3+, 4+ | ⁷⁶ MK DTDSEEEI R ₈₇ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |
| | K77 | K718 | 2273,097 | 3+, 4+ | ⁷⁵ KmK DTDSEEEI R ₈₆ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ | |

| Vernetzungs- reagenz | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungs- zustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------|--|--------------------------------------|
| CDI | K77 | K718 | 2386,144 | 3+, 4+ | ₇₅ KMKDTSDEEEIRE ₈₇ | ₇₁₃ TIYLNK ₇₁₈ |
| | K77 | K718 | 2402,139 | 3+, 4+ | ₇₅ KmKDTDSDEEEIRE ₈₇ | ₇₁₃ TIYLNK ₇₁₈ |
| | K148 | K718 | 1747,876 | 3+ | ₁₄₁ FVQmMTAK ₁₄₈ | ₇₁₃ TIYLNK ₇₁₈ |
| | K148 | K718 | 1763,871 | 3+ | ₁₄₁ FVQmmTAK ₁₄₈ | ₇₁₃ TIYLNK ₇₁₈ |
| | K148 | K718 | 1747,876 | 3+ | ₁₄₁ FVQmMTAK ₁₄₈ | ₇₁₃ TIYLNK ₇₁₈ |
| | K148 | K718 | 1763,871 | 3+ | ₁₄₁ FVQmmTAK ₁₄₈ | ₇₁₃ TIYLNK ₇₁₈ |

Tabelle A13: Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-C-V709D mit Photo-Met. *x: Photo-Met, B: carbamidomethyliertes Cystein, m: oxidiertes Met. Segment-C-V709D ist N-terminal acetyliert und C-terminal amidiert.*

| Calcium-konzentration | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungs-zustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|---|---|---|---|
| 1 mM | x36 | D709 | 1719,858 | 2+, 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | D709 | 1848,901 | 2+, 3+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | D709 | 1889,964 | 2+, 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | D709 | 2019,006 | 3+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | D709 | 2452,275 | 4+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | D709 | 2581,318 | 3+, 4+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | D709 | 2622,381 | 4+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₇₀₃ KLSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | D709 | 2751,423 | 4+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₃ KLSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x51 | D709 | 2075,98 | 2+ | ₄₈ LQDxINE ₅₄ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707 | 1912,914 | 3+ | ₆₈ FLT _x MAR ₇₄ / ₆₈ FLTM _x AR ₇₄ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | D709 | 1928,909 | 3+ | ₆₈ FLT _{xm} AR ₇₄ / ₆₈ FLTM _x AR ₇₄ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | D709 | 2083,02 | 3+ | ₆₈ FLT _x MAR ₇₄ / ₆₈ FLTM _x AR ₇₄ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | D709 | 2099,015 | 3+ | ₆₈ FLT _{xm} AR ₇₄ / ₆₈ FLTM _x AR ₇₄ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x109 | D709 | 2071,996 | 3+ | ₁₀₇ HV _x TNLGEK ₁₁₃ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x109 | D709 | 2242,102 | 4+ | ₁₀₇ HV _x TNLGEK ₁₁₃ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x109 | D709 | 2804,413 | 4+ | ₁₀₇ HV _x TNLGEK ₁₁₃ | ₇₀₄ LSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | 100 µM | x144/x145 | E707 | 2169,057 | 3+ | ₁₄₁ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQ _m xTAK ₁₄₈ |
| x144/x145 | | E740 | 1647,95 | 2+ | ₁₄₁ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQ _m xTAK ₁₄₈ | ₇₃₇ LLQELV ₇₄₂ |
| x144/x145 | | E740 | 1663,945 | 3+ | ₁₄₁ FVQ _{xm} TAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQ _m xTAK ₁₄₈ | ₇₃₇ LLQELV ₇₄₂ |
| x36 | | E707 | 1889,964 | 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x36 | | D709 | 1719,858 | 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x36 | | D709 | 1832,942 | 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x36 | | D709 | 1848,901 | 3+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x36 | | D709 | 2019,006 | 3+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x36 | | D709 | 2581,318 | 3+, 4+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| x36 | | D709 | 2751,423 | 4+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₃ KLSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| x36 | | Y715 | 1535,879 | 3+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₁₃ TIYLNK ₇₁₈ |
| x51 | | E707 | 2075,98 | 2+ | ₄₈ LQDxINE ₅₄ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x51 | | D709 | 1905,875 | 2+ | ₄₈ LQDxINE ₅₄ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x51 | | E729 | 2300,136 | 4+ | ₃₈ SLGQNPTAEALQDxINE ₅₄ | ₇₂₉ EKR ₇₃₁ |
| x71/x72 | | E707 | 1912,914 | 2+, 3+ | ₆₈ FLT _x MAR ₇₄ / ₆₈ FLTM _x AR ₇₄ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | | D709 | 1928,909 | 3+ | ₆₈ FLT _{xm} AR ₇₄ / ₆₈ FLTM _x AR ₇₄ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | | D709 | 2083,02 | 2+, 3+ | ₆₈ FLT _x MAR ₇₄ / ₆₈ FLTM _x AR ₇₄ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | D709 | 2099,015 | 3+ | ₆₈ FLT _{xm} AR ₇₄ / ₆₈ FLTM _x AR ₇₄ | ₇₀₃ KLSLEQDBAE ₇₁₂ | |
| x71/x72 | C719 | 1586,818 | 3+, 4+ | ₆₈ FLT _x MAR ₇₄ / ₆₈ FLTM _x AR ₇₄ | ₇₁₉ CINNFK ₇₂₄ | |
| x76 | E707 | 1449,725 | 3+ | ₇₅ KxK ₇₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ | |

| Calcium-konzentration | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|---|----------------|---|--|
| 100 μ M | x76 | E707 | 2254,987 | 3+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2296,997 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2425,092 | 3+, 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2524,172 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIR ₈₆ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2525,12 | 3+, 4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2694,277 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIR ₈₆ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2695,225 | 3+, 4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2823,32 | 3+, 4+, 5+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | D709 | 1619,831 | 3+, 4+ | ⁷⁵ KxK ₇₇ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | D709 | 2653,215 | 3+, 4+, 5+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x109 | D709 | 2071,996 | 3+ | ¹⁰⁷ HVxTNLGEK ₁₁₃ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x124 | E729 | 1760,902 | 4+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIR ₁₂₆ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x124 | E729 | 1889,945 | 4+, 5+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIRE ₁₂₇ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | E707 | 1998,951 | 2+, 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | E707 | 2169,057 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | E707 | 2169,057 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | Y715 | 1685,929 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TIYLNK ₇₁₈ |
| | x144/x145 | C719 | 1672,855 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | E729 | 1366,751 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | E740 | 1647,95 | 2+, 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷³⁷ LLQELV ₇₄₂ |
| 750 nM | x36 | E707/D709 | 1719,858 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | E707/D709 | 2019,006 | 3+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | D709 | 1406,658 | 2+, 3+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁸ QDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | D709 | 1832,942 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | D709 | 1889,964 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | D709 | 2581,318 | 3+, 4+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | D709/E712 | 1277,615 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁸ QDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | D709/E712 | 1848,901 | 3+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | E707/D709/E712 | 1961,985 | 3+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x36 | E712 | 2622,381 | 4+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | E707/D709 | 2751,423 | 3+, 4+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x51 | E707/D709 | 3045,42 | 3+ | ³⁸ SLGQNPTEAELQDxINE ₅₄ | ⁷⁰³ KLSLEQDCAE ₇₁₂ |
| | x51 | E707/D709/E712 | 3102,442 | 3+ | ³⁸ SLGQNPTEAELQDxINE ₅₄ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x51 | D709 | 1463,632 | 2+ | ⁴⁸ LQDxINE ₅₄ | ⁷⁰⁸ QDBAE ₇₁₂ |
| | x51 | D709 | 1905,875 | 2+ | ⁴⁸ LQDxINE ₅₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x51 | D709/E11 | 2490,094 | 3+ | ³⁸ SLGQNPTEAELQDxINE ₅₄ | ⁷⁰⁸ QDBAE ₇₁₂ |

| Calcium-konzentration | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|---|---|---|--------------------------------------|
| 750 nM | x51 | E712 | 2075,98 | 2+ | ⁴⁸ LQDxINE ₅₄ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707 | 1722,909 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | 703KLSLEQD ₇₀₉ |
| | x71/x72 | E707 | 1928,909 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x mAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTm _x AR ₇₄ | 704LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707 | 2083,02 | 2+,3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707/D709 | 2025,998 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | 703KLSLEQDCAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707/D709 | 2211,115 | 3+,4+ | ⁶⁸ FLT _x MARK ₇₅ / ⁶⁸ FLTM _x ARK ₇₅ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707/D709/E712 | 1855,893 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | 704LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707/D709/E712 | 1912,914 | 2+,3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | 704LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707/D709/E712 | 2815,437 | 4+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | 703KLSLEQDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x71/x72 | E707/D709/E712 | 3413,588 | 3+ | ⁵⁵ VDADGNGTIDFPEFLT _x MAR ₇₄ / ⁵⁵ VDADGNGTIDFPEFLTM _x AR ₇₄ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E707/D709/E712 | 3541,683 | 4+ | ⁵⁵ VDADGNGTIDFPEFLT _x MARK ₇₅ / ⁵⁵ VDADGNGTIDFPEFLTM _x ARK ₇₅ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | D709 | 2099,015 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x mAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x71/x72 | E740 | 1561,913 | 2+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷³⁷ LLQELV ₇₄₂ |
| | x71/x72 | E740 | 1577,908 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x mAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTm _x AR ₇₄ | ⁷³⁷ LLQELV ₇₄₂ |
| | x76 | E707 | 1619,831 | 3+,4+ | ⁷⁵ KxK ₇₇ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2126,892 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEE ₈₄ | 704LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2254,987 | 2+,3+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEE ₈₄ | 704LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2296,997 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEE ₈₄ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2694,277 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIR ₈₆ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2695,225 | 3+,4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2823,32 | 3+,4+,5+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | D709/E707 | 2425,092 | 3+,4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEE ₈₄ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | D709/E707 | 2524,172 | 3+,4+,5+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIR ₈₆ | 704LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | D709/E707 | 2653,215 | 3+,4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | 704LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x76 | D709/E707 | 2766,299 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | 703KLSLEQDCAE ₇₁₂ |
| | x76 | E729 | 1892,92 | 3+,4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x76 | E729 | 2021,015 | 3+,4+,5+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x109 | E707 | 1898,939 | 3+,4+ | ¹⁰⁵ LRHVxTNLGEK ₁₁₃ | 708QDBAE ₇₁₂ |
| | x109 | D709 | 1629,754 | 3+ | ¹⁰⁷ HVxTNLGEK ₁₁₃ | 708QDBAE ₇₁₂ |
| | x109 | D709 | 2185,081 | 3+,4+ | ¹⁰⁷ HVxTNLGEK ₁₁₃ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x109 | D709 | 2242,102 | 4+ | ¹⁰⁷ HVxTNLGEK ₁₁₃ | 703KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x109 | D709 | 2341,182 | 4+ | ¹⁰⁵ LRHVxTNLGEK ₁₁₃ | 704LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x109 | D709/E712 | 2071,996 | 3+ | ¹⁰⁷ HVxTNLGEK ₁₁₃ | 704LSLEQDBAE ₇₁₂ | |

| Calcium-konzentration | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|---|----------------|---|---|
| 750 nM | x109 | E712 | 2362,171 | 4+ | ¹⁰⁷ HVxTNLGEK ₁₁₃ | ⁷⁰⁸ QDBAETIYLNK ₇₁₈ |
| | x124 | E707/D709 | 2393,102 | 3+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIR ₁₂₆ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x124 | D709 | 2079,902 | 3+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIRE ₁₂₇ | ⁷⁰⁸ QDBAE ₇₁₂ |
| | x124 | E712 | 3167,432 | 3+ | ¹²⁴ xIREADIDGDGQVNYEE ₁₄₀ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x124 | E729 | 1889,945 | 4+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIRE ₁₂₇ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | E707 | 1998,951 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷⁰⁴ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | E707 | 2169,057 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | E707/D709 | 2411,183 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAKLE ₁₅₀ / ¹⁴¹ FVQMxTAKLE ₁₅₀ | ⁷⁰³ KLSLEQDBAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | E707/D709/E712 | 2354,162 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAKLE ₁₅₀ / ¹⁴¹ FVQMxTAKLE ₁₅₀ | ⁷⁰³ KLSLEQDCAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | C719 | 1672,855 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | E729 | 1366,751 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | E740 | 1647,95 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷³⁷ LLQELV ₇₄₂ |
| | x144/x145 | E740 | 1890,077 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAKLE ₁₅₀ / ¹⁴¹ FVQMxTAKLE ₁₅₀ | ⁷³⁷ LLQELV ₇₄₂ |

Tabelle A14: Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-C- I714D mit Photo-Met. *x: Photo-Met, B: carbamidomethyliertes Cystein,m: oxidiertes Met. Segment-C- I714D ist N-terminal acetyliert und C-terminal amidiert.*

| Calcium-konzentration | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|---|----------------|---|---|
| 1 mM | x51 | E712 | 2182,033 | 3+ | ⁴⁸ LQDxINE ₅₄ | ⁷⁰⁸ QVBAETDYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | E707 | 1703,900 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x36 | E712 | 1996,017 | 4+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁸ QVBAETDYLNK ₇₁₈ |
| 100 µM | x36 | D714 | 1408,779 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷¹³ TDYLNK ₇₁₈ |
| | x76 | E707 | 1433,767 | 3+ | ⁷⁵ KxK ₇₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x124 | E729 | 1760,902 | 4+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIR ₁₂₆ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | D714 | 1687,872 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TDYLNK ₇₁₈ |
| | x144/x145 | D714 | 1703,867 | 4+ | ¹⁴¹ FVQxmTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQmxtAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TDYLNK ₇₁₈ |
| | x144/x145 | C719 | 1672,855 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNFK ₇₂₄ |
| | x36 | E712 | 1996,017 | 3+, 4+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁸ QVBAETDYLNK ₇₁₈ |
| 750 nM | x36 | E712 | 2125,059 | 3+, 4+ | ³¹ ELGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁸ QVBAETDYLNK ₇₁₈ |
| | x36 | D714 | 1408,779 | 3+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷¹³ TDYLNK ₇₁₈ |
| | x51 | D714 | 1594,796 | 3+ | ⁴⁸ LQDxINE ₅₄ | ⁷¹³ TDYLNK ₇₁₈ |
| | x71/x72 | E707 | 1896,956 | 2+ | ⁶⁸ FLTxBMAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTMxAR ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 1433,767 | 3+ | ⁷⁵ KxK ₇₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2509,161 | 3+, 4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x109 | E712 | 2348,155 | 4+ | ¹⁰⁷ HVxTNLGEK ₁₁₃ | ⁷⁰⁸ QVBAETDYLNK ₇₁₈ |
| | x124 | E729 | 1760,902 | 4+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIR ₁₂₆ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | x144/x145 | D714 | 1687,872 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹³ TDYLNK ₇₁₈ |

Tabelle A15: Vernetzungsprodukte zwischen CaM und Segment-C-F723D mit Photo-Met. *x: Photo-Met, B: carbamidomethyliertes Cystein, m: oxidiertes Met. Segment-C-F723D ist N-terminal acetyliert und C-terminal amidiert.*

| Calcium-konzentration | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 | |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|---|----------------|---|---|---|
| 1 mM | x71/x72 | D723 | 1611,798 | 3+, 4+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ | |
| | x36 | E707 | 1703,9 | 3+ | ³² LGTV _x R ₃₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| | x36 | E712 | 2123,117 | 4+ | ³¹ ELGTV _x R ₃₇ | ⁷⁰⁸ QVBAETDILNK ₇₁₈ | |
| | x36 | D723 | 1418,742 | 3+ | ³² LGTV _x R ₃₇ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ | |
| | x36 | D723 | 1547,785 | 3+, 4+ | ³¹ ELGTV _x R ₃₇ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ | |
| | x36 | D723 | 2030,081 | 4+ | ³¹ ELGTV _x R ₃₇ | ⁷¹⁹ BINNDKNVLR ₇₂₈ | |
| | x51 | E707 | 1889,916 | 2+ | ⁴⁸ LQD _x INE ₅₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| | x51 | D723 | 1604,758 | 3+ | ⁴⁸ LQD _x INE ₅₄ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ | |
| | x51 | D723 | 2087,054 | 3+, 4+ | ⁴⁸ LQD _x INE ₅₄ | ⁷¹⁹ BINNDKNVLR ₇₂₈ | |
| | x71/x72 | E707 | 1479,824 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷⁰³ KLSLE ₇₀₇ | |
| | x71/x72 | E707 | 1839,934 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVCAE ₇₁₂ | |
| | x71/x72 | E707 | 1896,956 | 3+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ | |
| | x71/x72 | C719 | 2182,111 | 5+ | ⁶⁸ FLT _x mAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷¹⁹ CINNDKNVLR ₇₂₈ | |
| | x71/x72 | C719/D723 | 1554,777 | 4+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ¹⁹ CINNDK ₇₂₄ | |
| | x71/x72 | C719/D723 | 1570,772 | 4+ | ⁶⁸ FLT _x mAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ¹⁹ CINNDK ₇₂₄ | |
| | x71/x72 | C719/D723 | 2037,073 | 3+, 5+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷¹⁹ CINNDKNVLR ₇₂₈ | |
| | x71/x72 | C719/D723 | 2166,116 | 4+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷¹⁹ BINNDKNVLR ₇₂₉ | |
| | 100 µM | x71/x72 | D723 | 1611,798 | 3+, 4+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ |
| | | x76 | E707 | 2352,112 | 3+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰³ KLSLEQVCAE ₇₁₂ |
| | | x76 | E707 | 2580,235 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | | x76 | E707 | 2750,34 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVCAE ₇₁₂ |
| | | x109 | D723 | 1770,88 | 4+ | ¹⁰⁷ HV _x TNLGEK ₁₁₃ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ |
| | | x124 | D723 | 2574,283 | 5+ | ¹¹⁶ LTDEEVDE _x IR ₁₂₆ | ⁷¹⁹ BINNDKNVLR ₇₂₈ |
| | | x124 | E729 | 1760,902 | 4+ | ¹¹⁶ LTDEEVDE _x IR ₁₂₆ | ⁷²⁹ EKR ₇₃₁ |
| | | x144/x145 | E707 | 1982,993 | 3+ | ¹⁴¹ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQM _x TAK ₁₄₈ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | | x144/x145 | E707 | 2096,077 | 3+ | ¹⁴¹ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQM _x TAK ₁₄₈ | ⁷⁰³ KLSLEQVCAE ₇₁₂ |
| | | x144/x145 | E712 | 2273,167 | 4+ | ¹⁴¹ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQM _x TAK ₁₄₈ | ⁷⁰⁸ QVBAETDILNK ₇₁₈ |
| x144/x145 | | C719 | 1640,813 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQM _x TAK ₁₄₈ | ¹⁹ CINNDK ₇₂₄ | |
| x144/x145 | | C719/D723 | 2123,11 | 4+, 5+ | ¹⁴¹ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQM _x TAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNDKNVLR ₇₂₈ | |
| x144/x145 | | C719/D723 | 2252,153 | 4+, 5+ | ¹⁴¹ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQM _x TAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNDKNVLR ₇₂₈ | |
| x144/x145 | | D723 | 1697,835 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQM _x TAK ₁₄₈ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ | |
| x144/x145 | | D723 | 1713,83 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQ _x mTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQ _m xTAK ₁₄₈ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ | |
| x144/x145 | | D723 | 1826,878 | 4+ | ¹⁴⁰ EFVQ _x MTAK ₁₄₈ / ¹⁴⁰ EFVQM _x TAK ₁₄₈ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ | |
| x144/x145 | | D723 | 2180,131 | 4+ | ¹⁴¹ FVQ _x MTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQM _x TAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ BINNDKNVLR ₇₂₈ | |

| Calcium-konzentration | Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|---|---|---|---|
| 750 nM | x36 | E712 | 1994,074 | 4+ | ³² LGTVxR ₃₇ | ⁷⁰⁸ QVBAETDILNK ₇₁₈ |
| | x51 | D723 | 2087,054 | 3+, 4+ | ⁴⁸ LQDxINE ₅₄ | ⁷¹⁹ BINNDKNVLR ₇₂₈ |
| | x71/x72 | D723 | 1554,777 | 4+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ¹⁹ CINNDK ₇₂₄ |
| | x71/x72 | D723 | 1570,772 | 4+ | ⁶⁸ FLT _x mAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTm _x AR ₇₄ | ¹⁹ CINNDK ₇₂₄ |
| | x71/x72 | D723 | 1611,798 | 3+, 4+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ |
| | x71/x72 | D723 | 2037,073 | 5+ | ⁶⁸ FLT _x MAR ₇₄ / ⁶⁸ FLTM _x AR ₇₄ | ⁷¹⁹ CINNDKNVLR ₇₂₈ |
| | x76 | E707 | 2224,017 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEE ₈₄ | ⁷⁰³ KLSLEQVCAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2452,14 | 3+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVCAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2509,161 | 4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2580,235 | 4+ | ⁷⁵ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰⁴ LSLEQVCAE ₇₁₂ |
| | x76 | E707 | 2622,245 | 4+ | ⁷⁶ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ⁷⁰³ KLSLEQVCAE ₇₁₂ |
| | x109 | D723 | 1770,88 | 3+, 4+ | ¹⁰⁷ HVxTNLGEK ₁₁₃ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ |
| | x124 | D723 | 2116,082 | 4+ | ¹²¹ VDExIRE ₁₂₇ | ⁷¹⁹ BINNDKNVLR ₇₂₈ |
| | x124 | D723 | 2574,283 | 5+ | ¹¹⁶ LTDEEVDExIR ₁₂₆ | ⁷¹⁹ BINNDKNVLR ₇₂₈ |
| | x144/x145 | E707 | 1982,993 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷⁰⁴ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | E707 | 2096,077 | 3+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷⁰³ KLSLEQVCAE ₇₁₂ |
| | x144/x145 | D723 | 1640,813 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ¹⁹ CINNDK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | D723 | 1697,835 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | D723 | 1713,83 | 3+, 4+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | D723 | 1826,878 | 3+, 4+ | ¹⁴⁰ EFVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴⁰ EFVQMxTAK ₁₄₈ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | D723 | 1939,962 | 3+ | ¹⁴⁰ FVQxMTAKLE ₁₅₀ / ¹⁴⁰ FVQMxTAKLE ₁₅₀ | ¹⁹ BINNDK ₇₂₄ |
| | x144/x145 | D723 | 2123,11 | 4+, 5+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNDKNVLR ₇₂₈ |
| | x144/x145 | D723 | 2180,131 | 3+, 4+, 5+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ BINNDKNVLR ₇₂₈ |
| x144/x145 | D723 | 2252,153 | 4+, 5+ | ¹⁴¹ FVQxMTAK ₁₄₈ / ¹⁴¹ FVQMxTAK ₁₄₈ | ⁷¹⁹ CINNDKNVLR ₇₂₉ | |

Tabelle A16: Intermolekulare Vernetzungsprodukte mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-A- V709D bei 750 nM Calcium. *x*: Photo-Met, *B*: carbamidomethyliertes Cystein, *m*: oxidiertes Met Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte bei CaM ohne das Startmethionin und bei bMunc13-2 mit Startmethionin.

| Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|---------------------------|---------------------------------|---|----------------|---|--|
| x36 | D549 | 1277,721 | 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₄₄₆ NVFDK ₄₅₀ |
| x36 | E565 | 1258,737 | 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₄₆₃ DVEIK ₄₆₇ |
| x36 | E707 | 1719,858 | 2+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x36 | D709 | 1406,658 | 2+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₈ QDBAE ₇₁₂ |
| x36 | D709 | 1719,858 | 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x36 | D709 | 1848,901 | 2+, 3+ | ₃₁ ELGTVxR ₃₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x51 | E612 | 1907,858 | 3+ | ₄₈ LQDxINE ₅₄ | ₆₀₇ SGSQSENSDR ₆₁₆ |
| x51 | D709 | 1463,632 | 2+ | ₄₈ LQDxINE ₅₄ | ₇₀₈ QDBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | E496 | 1893,015 | 4+ | ₆₈ FLTxMAR ₇₄ / ₆₈ FLTMxAR ₇₄ | ₄₉₄ QLEDLLADK ₅₀₂ |
| x71/x72 | E707 | 1855,893 | 3+ | ₆₈ FLTxMAR ₇₄ / ₆₈ FLTMxAR ₇₄ | ₇₀₄ LSLEQDCAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | E707 | 1912,914 | 2+, 3+ | ₆₈ FLTxMAR ₇₄ / ₆₈ FLTMxAR ₇₄ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | E707 | 1928,909 | 3+ | ₆₈ FLTxmAR ₇₄ / ₆₈ FLTmxAAR ₇₄ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2254,987 | 3+ | ₇₅ KxKDTDSEEE ₈₄ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2524,172 | 4+ | ₇₅ KxKDTDSEEEIR ₈₆ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2653,215 | 4+, 5+ | ₇₅ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x76 | E729 | 2021,015 | 4+, 5+ | ₇₅ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ₇₂₉ EKR ₇₃₁ |
| x76 | H578/H579 | 1970,957 | 4+ | ₇₅ KxKDTDSEEE ₈₄ | ₅₇₆ AIHFR ₅₆₁ |
| x76 | H578/H579 | 2369,184 | 5+ | ₇₅ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ₅₇₆ AIHFR ₅₆₁ |
| x109 | D709 | 2071,996 | 3+ | ₁₀₇ HVxTNLGEK ₁₁₃ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x124 | D709 | 2393,102 | 3+ | ₁₁₆ LTDEEVDExIR ₁₂₆ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x124 | D709 | 2522,145 | 3+ | ₁₁₆ LTDEEVDExIRE ₁₂₇ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x144/x145 | C719 | 1688,850 | 4+ | ₁₄₁ FVQxmTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQmxAAR ₁₄₈ | ₇₁₉ CINNFK ₇₂₄ |
| x144/x145 | E707 | 1941,930 | 3+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxAAR ₁₄₈ | ₇₀₄ LSLEQDCAE ₇₁₂ |
| x144/x145 | E707 | 1998,951 | 3+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxAAR ₁₄₈ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x144/x145 | E707 | 2014,946 | 3+ | ₁₄₁ FVQxmTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQmxAAR ₁₄₈ | ₇₀₄ LSLEQDBAE ₇₁₂ |
| x144/x145 | E729 | 1366,751 | 3+, 4+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxAAR ₁₄₈ | ₇₂₉ EKR ₇₃₁ |

Tabelle A17: Intermolekulare Vernetzungsprodukte mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-A-I714D bei 750 nM Calcium. *x*: Photo-Met, *B*: carbamidomethyliertes Cystein,*m*: oxidiertes Met. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte bei CaM ohne das Startmethionin und bei bMunc13-2 mit Startmethionin.

| Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungszustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|---------------------------|---------------------------------|---|----------------|---|-----------------------------------|
| x36 | D452 | 1760,932 | 3+ | 32LGTVxR ₃₇ | 449LQSDBNNAIK ₄₅₈ |
| x36 | D452 | 1817,954 | 3+ | 32LGTVxR ₃₇ | 449LQSDBNNAIK ₄₅₈ |
| x36 | D549 | 1277,721 | 3+ | 32LGTVxR ₃₇ | 446NVFDK ₄₅₀ |
| x36 | E565 | 1258,737 | 2+, 3+, 4+ | 32LGTVxR ₃₇ | 463DVEIK ₄₆₇ |
| x36 | E712 | 1996,017 | 3+, 4+ | 32LGTVxR ₃₇ | 708QVBAETDYLNK ₇₁₈ |
| x51 | D549 | 1463,738 | 3+ | 48LQDxINE ₅₄ | 446NVFDK ₄₅₀ |
| x51 | E565 | 1444,753 | 3+ | 48LQDxINE ₅₄ | 463DVEIK ₄₆₇ |
| x51 | H579 | 1621,845 | 3+ | 48LQDxINE ₅₄ | 576AIHHR ₅₆₁ |
| x51 | E603 | 2015,940 | 2+ | 48LQDxINE ₅₄ | 503NNGSISPEDE ₆₀₃ |
| x51 | E612 | 1907,858 | 3+ | 48LQDxINE ₅₄ | 607SGSQSENSDR ₆₁₆ |
| x51 | D697 | 2188,030 | 3+, 4+ | 48LQDxINE ₅₄ | 692TBSRPDSDPNQGK ₇₀₃ |
| x51 | E712 | 2182,033 | 3+ | 48LQDxINE ₅₄ | 708QVBAETDYLNK ₇₁₈ |
| x71/x72 | E496 | 1893,015 | 3+ | 68FLT _x MAR ₇₄ / 68FLTM _x AR ₇₄ | 494QLEDLLADK ₅₀₂ |
| x71/x72 | D549 | 1470,777 | 3+ | 68FLT _x MAR ₇₄ / 68FLTM _x AR ₇₄ | 446NVFDK ₄₅₀ |
| x71/x72 | E565 | 1451,793 | 3+, 4+ | 68FLT _x MAR ₇₄ / 68FLTM _x AR ₇₄ | 463DVEIK ₄₆₇ |
| x71/x72 | H578 | 1628,884 | 3+, 4+ | 68FLT _x MAR ₇₄ / 68FLTM _x AR ₇₄ | 576AIHHR ₅₆₁ |
| x71/x72 | E707 | 1896,956 | 3+ | 68FLT _x MAR ₇₄ / 68FLTM _x AR ₇₄ | 704LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | E707 | 1912,951 | 3+ | 68FLT _x mAR ₇₄ / 68FLTm _x AR ₇₄ | 704LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | C719 | 1586,818 | 3+ | 68FLT _x MAR ₇₄ / 68FLTM _x AR ₇₄ | [CINNFK] |
| x76 | E707 | 2182,007 | 3+ | 75KxKDTDSEEE ₈₄ | 704LSLEQVCAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2509,161 | 4+ | 76xKDTDSEEEIRE ₈₇ | 704LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2637,256 | 4+ | 75KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | 704LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x124 | E516/E517 | 2750,289 | 3+ | 116LTDEEVDExIRE ₁₂₇ | 506FATLNPDSAVEE ₅₁₇ |
| x144/x145 | E562 | 2545,143 | 3+ | 141FVQxMTAK ₁₄₈ / 141FVQm _x TAK ₁₄₈ | 451SSBVLGGSQEDEDVE ₄₆₅ |
| x144/x145 | E565 | 1537,829 | 3+ | 141FVQxMTAK ₁₄₈ / 141FVQm _x TAK ₁₄₈ | 463DVEIK ₄₆₇ |
| x144/x145 | H578 | 1714,921 | 3+ | 141FVQxMTAK ₁₄₈ / 141FVQm _x TAK ₁₄₈ | 576AIHHR ₅₆₁ |
| x144/x145 | E707 | 1925,971 | 3+ | 141FVQxMTAK ₁₄₈ / 141FVQm _x TAK ₁₄₈ | 704LSLEQVCAE ₇₁₂ |
| x144/x145 | E707 | 1982,993 | 3+ | 141FVQxMTAK ₁₄₈ / 141FVQm _x TAK ₁₄₈ | 704LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x144/x145 | D714 | 1687,872 | 3+ | 141FVQxMTAK ₁₄₈ / 141FVQm _x TAK ₁₄₈ | 713TDYLNK ₇₁₈ |
| x144/x145 | C719 | 1672,855 | 3+ | 141FVQxMTAK ₁₄₈ / 141FVQm _x TAK ₁₄₈ | 719CINNFK ₇₂₄ |
| x144/x145 | C719 | 1688,850 | 4+ | 141FVQxmTAK ₁₄₈ / 141FVQm _x TAK ₁₄₈ | 719CINNFK ₇₂₄ |
| x144/x145 | E729 | 1366,751 | 4+ | 141FVQxMTAK ₁₄₈ / 141FVQm _x TAK ₁₄₈ | 729EKR ₇₃₁ |

Tabelle A18: Intermolekulare Vernetzungsprodukte mit Photo-Met zwischen CaM und Segment-A-F723D bei 750 nM Calcium. *x*: Photo-Met, *B*: carbamidomethyliertes Cystein, *m*: oxidiertes Met. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte bei CaM ohne das Startmethionin und bei bMunc13-2 mit Startmethionin.

| Vernetzte Aminosäuren CaM | Vernetzte Aminosäuren bMunc13-2 | Theoretisches Molekulargewicht [M+H] ⁺ | Ladungs-zustand | Aminosäuresequenz CaM | Aminosäuresequenz bMunc13-2 |
|---------------------------|---------------------------------|---|-----------------|---|---|
| x36 | D452 | 1817,954 | 3+, 4+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₄₄₉ LQSDBNNAIK ₄₅₈ |
| x36 | D478 | 1358,739 | 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₄₇₂ VNAEDR ₄₇₉ |
| x36 | D549 | 1277,721 | 3+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₄₄₆ NVFDK ₄₅₀ |
| x36 | E565 | 1258,737 | 3+, 4+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₄₆₃ DVEIK ₄₆₇ |
| x36 | E565 | 2507,229 | 4+ | ₃₂ LGTVxR ₃₇ | ₄₅₁ SSBVLGGSQEDEDVEIK ₄₆₇ |
| x51 | E603 | 2015,940 | 2+ | ₄₈ LQDxINE ₅₄ | ₅₀₃ NNGSISPEDLE ₆₀₃ |
| x51 | D697 | 2188,030 | 3+, 4+ | ₄₈ LQDxINE ₅₄ | ₆₉₂ TBSRPDSPNQGK ₇₀₃ |
| x71/x72 | E496 | 1893,015 | 4+ | ₆₈ FLTxMAR ₇₄ / ₆₈ FLTMxAR ₇₄ | ₄₉₄ QLEDLLADK ₅₀₂ |
| x71/x72 | D549 | 1470,777 | 3+ | ₆₈ FLTxMAR ₇₄ / ₆₈ FLTMxAR ₇₄ | ₄₄₆ NVFDK ₄₅₀ |
| x71/x72 | E707 | 1839,934 | 3+ | ₆₈ FLTxMAR ₇₄ / ₆₈ FLTMxAR ₇₄ | ₇₀₄ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | E707 | 1896,956 | 3+ | ₆₈ FLTxMAR ₇₄ / ₆₈ FLTMxAR ₇₄ | ₇₀₄ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x71/x72 | H578/H579 | 1628,884 | 4+ | ₆₈ FLTxMAR ₇₄ / ₆₈ FLTMxAR ₇₄ | ₅₇₆ AIHHR ₅₆₁ |
| x76 | H578/H579 | 1970,9574 | 4+ | ₇₅ KxKDTDSEEE ₈₄ | ₅₇₆ AIHHR ₅₆₁ |
| x76 | H578/H579 | 2369,184 | 4+, 5+ | ₇₅ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ₅₇₆ AIHHR ₅₆₁ |
| x76 | E612 | 2655,198 | 4+ | ₇₅ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ₆₀₇ SGSQSENSDR ₆₁₆ |
| x76 | E707 | 2050,018 | 3+ | ₇₅ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ₇₀₄ LSLE ₇₀₇ |
| x76 | E707 | 2239,028 | 3+ | ₇₅ KxKDTDSEEE ₈₄ | ₇₀₄ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2509,161 | 3+ | ₇₆ xKDTDSEEEIRE ₈₇ | ₇₀₄ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2580,235 | 3+ | ₇₅ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ₇₀₄ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x76 | E707 | 2637,256 | 3+, 4+ | ₇₅ KxKDTDSEEEIRE ₈₇ | ₇₀₄ LSLEQVBAE ₇₁₂ |
| x144/x145 | E562 | 2545,143 | 3+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxTAK ₁₄₈ | ₄₅₁ SSBVLGGSQEDEDVE ₄₆₅ |
| x144/x145 | E565 | 1537,829 | 3+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxTAK ₁₄₈ | ₄₆₃ DVEIK ₄₆₇ |
| x144/x145 | H578/H579 | 1714,921 | 4+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxTAK ₁₄₈ | ₅₇₆ AIHHR ₅₆₁ |
| x144/x145 | D615 | 1425,715 | 3+, 4+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxTAK ₁₄₈ | ₆₁₃ NSDR ₆₁₆ |
| x144/x145 | C719 | 1640,813 | 3+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxTAK ₁₄₈ | ₇₁₉ CINNDK ₇₂₄ |
| x144/x145 | C719 | 2123,11 | 4+, 5+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxTAK ₁₄₈ | ₇₁₉ CINNDKNVLR ₇₂₈ |
| x144/x145 | D723 | 1697,835 | 4+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxTAK ₁₄₈ | ₇₁₉ BINNDK ₇₂₄ |
| x144/x145 | E729 | 1366,751 | 3+, 4+ | ₁₄₁ FVQxMTAK ₁₄₈ / ₁₄₁ FVQMxTAK ₁₄₈ | ₇₂₉ EKR ₇₃₁ |

Zusätzliche Methoden:

A.1 Proteolytische Spaltung von Proteinen mit Hilfe des Verdauungssaftes von Kannenpflanzen (*Nepenthes*)

Zur Verwendung der Proteasemischung aus dem Extrakt von Kannenpflanzen (*Nepenthes hybride*) wurden diese in Gefäßen mit hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert.



Der Extrakt wurde aus den Kannen entnommen und nach den Protokollen von Rey *et al.*, 2013 und Kadek, *et al.*, 2014 vorbereitet^{171, 172}. Zunächst wurde der Extrakt mit einem Spritzenfilter (0,22 μm) filtriert und anschließend mit 10 kDa-cut-off Zentrifugationseinheiten ~80-fach konzentriert. Nach einer 1:8 (v/v)-Verdünnung mit 100 mM Glycin (pH 2,5) wurde der Extrakt über Nacht bei 6 °C gelagert, um verbleibende Proteine proteolytisch zu spalten.

Die proteolytische In-Gel-Spaltung mit dem vorbereiteten Extrakt erfolgte nach Reduktion und Acetylierung (Kapitel 3.4.1.1) durch Zugabe von 10 μl Kannenpflanzenextrakt und einer Inkubation für 10 min bei 10 °C. Die Peptidmischung wurde direkt der MS-Analyse zugeführt.

A.2 Skripte und Modellierungsdateien

A.2.1 Dateien für Rosetta:

Die Nummerierung der Aminosäuren des bMunc13-2 Segment-C beginnt bei L704 mit Position 1.

Files for Rosetta runs

Fragment picker:

fragment_picker_quota.cfg

```
#pool_id    pool_namefraction
1    psipred0.6
2    jufo    0.4
```

fragment_picker_quota.options

```
-in::file::vall        vall.jul19.2011.gz
-in::file::checkpoint  CINNFK.checkpoint
-in::file::fasta       CINNFK.fasta
-frags::ss_pred        CINNFK.psipred_ss2 psipred CINNFK.jufo9d_ss jufo
-out::file::frag_prefix CINNFK_frag
-frags::describe_fragments CINNFK_frag.fsc
-frags::scoring::config ./fragment_picker_quota.wghts
-frags::frag_sizes     9 5 3
-frags::n_candidates   1000
-frags::n_fragments    200
-frags::picking::quota_config_file ./fragment_picker_quota.cfg
```

FlexPepDock *ab-initio*:

flags

```
-s loop_fixed_F1_L5_without_XL_restraints.pdb
-out:pdb
-constraints:cst_file constraints_F1_L5.cst
-constraints:cst_fa_file constraints_F1_L5.cst
-constraints:cst_weight 10
-constraints:cst_fa_weight 10
```

#flexpepdock flags:

```
-flexPepDocking:lowres_abinitio
-flexPepDocking:pep_refine
-flexPepDocking:flexpep_score_only
```

#packing flags

```
-ex1
-ex2aro
-use_input_sc
```

#fragment picker flags:

-frag3 CINNFK_fragments_loop.3mers.offset
 -frag9 CINNFK_fragments_loop.9mers.offset
 -flexPepDocking:frag5 CINNFK_fragments_loop.5mers.offset
 -flexPepDocking:frag5_weight 0.25
 -flexPepDocking:frag9_weight 0.1

#mute logging:

-mute protocols.moves.RigidBodyMover
 -mute core.chemical
 -mute core.scoring.etable
 -mute protocols.evaluation
 -mute core.pack.rotamer_trials
 -mute protocols.abinitio.FragmentMover
 -mute core.fragment
 -mute protocols.jd2.PDBJobInputter

constraints_F1_L5.cst

AtomPair CA 105A CA 20B FLAT_HARMONIC 8.4 1 1
 AtomPair CA 124A CA 20B FLAT_HARMONIC 5.7 1 1
 AtomPair CA 128A CA 20B FLAT_HARMONIC 9 1 2
 AtomPair CA 136A CA 20B FLAT_HARMONIC 11 1 1.5
 AtomPair CA 144A CA 20B FLAT_HARMONIC 9.1 1 1

AtomPair CA 92A CA 24B FLAT_HARMONIC 8.8 1 1
 AtomPair CA 141A CA 24B FLAT_HARMONIC 7.7 1 2
 AtomPair CA 144A CA 24B FLAT_HARMONIC 8.5 1 2
 AtomPair CA 145A CA 24B FLAT_HARMONIC 7.6 1 2

Filter:

constraints_XL_KofN_x.cst $x=5-7$

KofNConstraint x

AtomPair CA 72A CA 4B FLAT_HARMONIC 6.0 3 2.0
 AtomPair CA 72A CA 37B FLAT_HARMONIC 6.0 3 2.0
 AtomPair CA 76A CA 4B FLAT_HARMONIC 6.0 3 2.0
 AtomPair CA 145A CA 4B FLAT_HARMONIC 6.0 3 2.0
 AtomPair CA 145A CA 12B FLAT_HARMONIC 6.0 3 2.0
 AtomPair CA 145A CA 16B FLAT_HARMONIC 6.0 3 2.0
 AtomPair CA 76A CA 26B FLAT_HARMONIC 6.0 3 2.0
 AtomPair CA 145A CA 26B FLAT_HARMONIC 6.0 3 2.0
 AtomPair CA 36A CA 9B FLAT_HARMONIC 6.0 3 2.0
 AtomPair CA 75A CA 32B FLAT_HARMONIC 30.0 3 10.0
 END

Filter für zwei Konformationen:

constraints_XL_76.cst

AtomPair CA 76A CA 4B FLAT_HARMONIC 6.0 0.5 2.0
 AtomPair CA 72A CA 4B FLAT_HARMONIC 6.0 0.5 2.0

Anhang

```
AtomPair CA 145A CA 16B FLAT_HARMONIC 6.0 0.5 2.0
```

```
AtomPair CA 76A CA 26B FLAT_HARMONIC 6.0 0.5 2.0
```

```
constraints_XL_145.cst
```

```
AtomPair CA 145A CA 4B FLAT_HARMONIC 6.0 0.5 2.0
```

```
AtomPair CA 145A CA 12B FLAT_HARMONIC 6.0 0.5 2.0
```

```
AtomPair CA 76A CA 26B FLAT_HARMONIC 6.0 0.5 2.0
```

```
AtomPair CA 145A CA 26B FLAT_HARMONIC 6.0 0.5 2.0
```

A.2.2 Berechnung von Distanzen in Proteinen mit Pymol

```
f=open('distances_1c1l_calculated.txt','w')
```

```
dst1=cmd.distance('tmp','1c1l//A/36/CA','1c1l//A/47/CA')
```

```
...
```

```
f.write("%8.3f\n"%dst1)
```

```
...
```

```
f.close()
```

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Andrea Sinz für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe meine Dissertation anfertigen zu dürfen. Danke für das Ermöglichen des selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitens während der Promotion, das stete Interesse am Thema, die Diskussionsbereitschaft und die immer offene Tür für aufkommende Fragen. Weiterhin danke ich für die vielen Teilnahmemöglichkeiten an Konferenzen und Seminaren, welche zum Gelingen der Dissertation beitrugen und viele Erfahrungen in der Präsentation von Daten einbrachten. Ebenfalls möchte ich mich für den ermöglichten Aufenthalt in den USA und das Vertrauen in mein wissenschaftliches Arbeiten bedanken.

Vielen Dank an Prof. Dr. Gary Sawers und Prof. Dr. Simone König für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Dr. Olaf Jahn, Dr. Noa Lipstein-Thoms und Lars van Werven danke ich für die Bereitstellung der Plasmide von bMunc13-2-Segment-A und -B, sowie der Synthese der Segment-C-Varianten. Außerdem danke ich Dr. Olaf Jahn ebenfalls für die Durchführung der Verdrängungsexperimente, sowie ihm und Dr. Noa Lipstein-Thoms für die Diskussionen über die Weiterführung des Themas dieser Arbeit und interessante Neuentdeckungen.

Dr. Michael Götze danke ich für die kontinuierliche Weiterentwicklung von StavroX und MeroX, das stets offene Ohr für Probleme mit diesen beiden Softwares und dessen schnelle Lösung sowie das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Jens Meiler danke ich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe das computergestützte Modellieren von Proteinstrukturen zu erlernen. Dabei danke ich Dr. Rocco Moretti für seine Betreuung und Hilfe bei allen Fragen und der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und die Unternehmungen außerhalb der Universität.

Ich danke Dr. André Hädicke für die Möglichkeit der Durchführung der ITC-Messungen und Dr. Martin Herzberg für die Bestimmung der Calciumkonzentration mittels ICP-MS-Analyse.

Der ganzen Arbeitsgruppe und ihren ehemaligen Mitgliedern, welche ich kennenlernen durfte, danke ich für das angenehme Arbeitsklima, stets offene Ohren und die Hilfe bei aufkommenden Fragen und Problemen im Laboralltag sowie für die Diskussionsbereitschaft zu allen wissenschaftlichen Themen. Außerdem denke ich mit Freude an die ein oder andere lustige Situation bei Ausflügen, Feiern oder Veranstaltungen der Pharmazeuten zurück.

Danksagung

Besonderer Dank geht an Micha und Björn für das stete Interesse an meiner Arbeit, das Korrekturlesen von Teilen der Promotion und die gemeinsame Zeit auch außerhalb der Pharmazie - bei so manchem Bier, sowie an Jana, Anne, Konny, Claudio und Christoph für die auflockernden Gespräche über wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Themen innerhalb und außerhalb der Uni.

Ich danke allen Studenten, welche zur Bachelorarbeit, zum Praktikum oder zum Austausch unter meiner Obhut standen für die sehr angenehme gemeinsame Laborzeit, das Helfen beim Bearbeiten meines Promotionsthemas und die Möglichkeit der Wissensweitergabe. Es hat mir immer sehr viel Freude bereitet.

Ich danke allen Freunden herzlich für die angenehme und freudige Zeit während der ganzen Studien- und Doktorandenzeit und das offene Ohr für auftretende Probleme während der Arbeit oder im privaten Bereich. Ganz herzlich möchte ich an dieser Stelle Katha und Nina für das gemeinsame Überstehen kleiner und großer Krisen sowie positiver als auch negativer Situationen danken.

Der größte Dank geht an meine Eltern und Micha. Danke für die stete Unterstützung, die Geduld, den Aufbau in Tiefphasen und das Abwarten der häufig langen Labortage. Danke Micha für deine Liebe, die umsorgende Begleitung in stressigen Phasen, den Ausgleich zum Uni-Alltag und das „Nicht Ausziehen“ ;).

Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Piotrowski, C., Moretti, R., Ihling, C.H., Haedicke, A., Lipstein, N., Jahn, O., Meiler, J. and Sinz, A. Molecular Basis of bMunc13-2/Calmodulin Interaction. *Sci Rep*. Geplante Einreichung des Manuskripts im Januar 2019.

Iacobucci, C.*, **Piotrowski, C.***, Aebersold, R.^{2,3}, Amaral, B. C.⁴, Andrews, P., Borchers, C., Brodie, N. I., Bruce, J. E., Chaignepain, S., Chavez, J. D., Claverol, S., Cox, J., Degliesposti, G., Dong, M.-Q., Edinger, N., Emanuelsson, C., Gay, M., Götze, M., Gozzo, F. C., Gutierrez, C., Haupt, C., Heck, A. J. R., Herzog, F., Huang, L., Hoopmann, M.R., Kalisman, N., Klykov, O., Kukačka, Z., Liu, F., MacCoss, M. J., Mechtler, K., Mesika, R., Moritz, R. L., Nagaraj, N., Nesati, V., Ninnis, R., Novák, P., J O'Reilly, F.J., Pelzing, M., Petrotchenko, E., Piersimoni, L., Plasencia, M., Pukala, T., Rand, K. D., Rappsilber, J., Reichmann, D., Sailer, C., Sarnowski, C. P., Scheltema, R. A., Schmidt, C., Schriemer, D. C., Shi, Y., Skehel, J. M., Slavin, M., Sobott, F., Solis-Mezarino, V., Stephanowitz, H., Stengel, F., Stieger, C. E., Trnka, M., Vilaseca; M., Viner, R., Xiang, Y., Yilmaz, S., Zelter, A., Ziemianowicz, D., Leitner, A., Sinz, A. (2018) Cross-linking/Mass Spectrometry: A Community-Wide, Comparative Study Towards Establishing Best Practice Guidelines. *Nat Commun*. Eingereicht
*Autoren haben gleichermaßen beigetragen

Iacobucci, C., **Piotrowski, C.**, Rehkamp, A., Ihling, C. H. and Sinz, A. (2018) The First MS-Cleavable, Photo-Thiol-Reactive Cross-Linker for Protein Structural Studies. *J Am Soc Mass Spectrom*. doi: 10.1007/s13361-018-1952-8.

Iacobucci, C., Götze, M., Ihling, C. H., **Piotrowski, C.**, Arlt, C., Schäfer, M., Hage, C., Schmidt, R. and Sinz, A. (2018) A Cross-linking/Mass Spectrometry Workflow Based on MS-Cleavable Cross-Linkers and the MeroX Software for Studying Protein Structures and Protein-Protein Interactions. *Nat Protoc*. 13:2864–2889.

Iacobucci, C., Götze, M.*, **Piotrowski, C.***, Arlt, C., Rehkamp, A., Ihling, C. H., Hage, C., and Sinz, A. (2018) Carboxyl-Photo-Reactive MS-Cleavable Cross-Linkers: Unveiling a Hidden Aspect of Diazirine-Based Reagents. *Anal Chem*. 90(4):2805-2809.

*Autoren haben gleichermaßen beigetragen

Piotrowski, C., Ihling, C. H., and Sinz, A. (2015) Extending the cross-linking/mass spectrometry strategy: Facile incorporation of photo-activatable amino acids into the model protein calmodulin in Escherichia coli cells. *Methods*. 1;89:121-7.

Buchkapitel

Piotrowski, C., and Sinz, A. (2018) Structural Investigation of Proteins and Protein Complexes by Chemical Cross-Linking/Mass Spectrometry. Title of book: Integrative Structural Biology with Hybrid Methods, Editors: Markley, J.L., Burley, S., Nakamura, H. and Kleywegt G. *Springer Nature Singapore Pte Ltd.*

Review

Lipstein, N., Göth, M., **Piotrowski, C.**, Pagel, K., Sinz, A. and Jahn, O. (2017) Presynaptic Calmodulin targets: Lessons from structural proteomics, *Expert Rev Proteomics*. 14(3):223-242.

Vorträge

„Cross-Linking and Mass Spectrometry Give Insights into the bMunc13-2/Calmodulin Interaction”

51. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, 1st joint French/German Mass Spectrometry Conference, Saarbrücken, 2018

„Introduction into Cross-linking/Mass Spectrometry for Protein Structure Analysis”

Workshop „Cross-linking and HDX-MS: Towards the study of interacting domains in biological complexes”

51. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, 1st joint French/German Mass Spectrometry Conference, Saarbrücken, 2018

geteilter Vortrag mit Dr. Claudio Iacobucci

„Cross-Linking and Mass Spectrometry Shed New Light on the bMunc13-2/Calmodulin Interaction”

50. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, Kiel, 2017

„Structural Investigation of the Calmodulin/ bMunc13-2 Interaction by Cross-Linking and Mass Spectrometry”

Neuronal Calcium Sensors in Health and Disease, Delmenhorst, 2016

„Incorporation of Photo-Methionine into Calmodulin for Photo-Cross-Linking/MS Studies“

48. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, Wuppertal, 2015

Postervortrag

„Structural Investigation of the Calmodulin/ bMunc13-2 Interaction by Cross-Linking and Mass Spectrometry”

6th Symposium on Structural Proteomics, Dortmund, 2016

Poster

„Calmodulin/bMunc13-2 Interaction Studies by Cross-linking/Mass Spectrometry”

8th Symposium on Structural Proteomics, Berlin, 2018

„Cross-Linking and Mass Spectrometry Shed New Light on the bMunc13-2/Calmodulin Interaction”

7th Symposium on Structural Proteomics, Wien, Österreich, 2017

„Structural Investigation of the Calmodulin/ bMunc13-2 Interaction by Cross-Linking and Mass Spectrometry”

Neuronal Calcium Sensors in Health and Disease, Delmenhorst, 2016

„Structural Investigation of the Calmodulin/ bMunc13-2 Interaction by Cross-Linking and Mass Spectrometry”

6th Symposium on Structural Proteomics, Dortmund, 2016

„Structural Analysis of the bMunc13-2/Calmodulin Interaction by Cross-Linking and Mass Spectrometry”

5th Symposium on Structural Proteomics, Halle (Saale), 2015

„Structural Studies of the Calmodulin/bMunc13-2 Complex by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry”

4th Symposium on Structural Proteomics, Antwerpen, Belgien, 2014

“Expression and Purification of the α -Subunit of *E. coli* Formate Dehydrogenase N”

47. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, Frankfurt (Main), 2014

Lebenslauf

Geburtsdatum: 25. Juli 1988
Geburtsort: Wurzen
Nationalität: deutsch

Ausbildung

02/2016 – 04/2016 Forschungsaufenthalt
Vanderbilt University Nashville, Tennessee, Department of
Chemistry, Computational Chemical and Structural Biology,
Prof. Dr. Jens Meiler

12/2013 – 12/2018 wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Doktorandin
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Pharmazie,
Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik,
Prof. Dr. Andrea Sinz

04/2013 – 11/2013 Masterarbeit
„Expression und Reinigung der α -Untereinheit der
Formiatdehydrogenase N aus *E. coli*“
Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik
Prof. Dr. Andrea Sinz

08/2012 – 11/2012 Forschungspraktikum
Abteilung “Pharmazeutische Entwicklung”,
Sandoz, Kundl, Österreich

2011 – 2013 Master of Science Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

05/2011 – 07/2011 Bachelorarbeit
„Expression und Reinigung von doppelt markierten Peptiden für
Untersuchungen mittels NMR“
Forschungsgruppe “Membranproteine”
Dr. Peter Hanner

2007 – 2011 Bachelor of Science Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1999 – 2007 Magnus-Gottfried-Lichtwer Gymnasium, Wurzen
Abschluss: Abitur

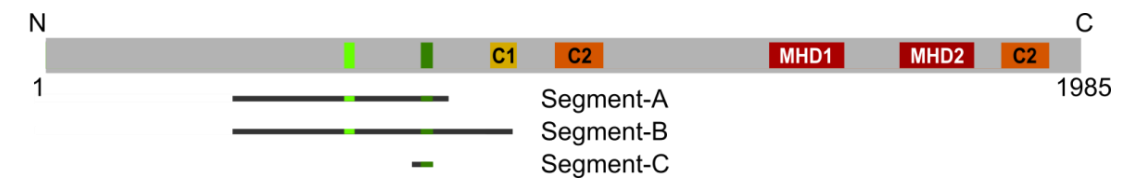
Halle (Saale), 11.12.2018

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen aus den benutzten Werken sind als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Die vorgelegte Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden. Ich versichere, dass ich vor dieser Arbeit keine andere Promotionsarbeit eingereicht habe.

Halle (Saale), 11.12.2018

bMunc13-2



Varianten des Segment-A



Varianten des Segment-C

