

**Strukturelle  
Charakterisierung der retinalen  
Guanylatzyklase 1**

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

-Biowissenschaften-

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von Anne Rehkamp  
geboren am 06.05.1992 in Ankum

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andrea Sinz
2. Prof. Dr. Gary Sawers
3. Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch

Datum der öffentlichen Verteidigung: 02.07.2021



**Inhaltsverzeichnis**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> -----	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> -----	<b>VI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> -----	<b>XII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> -----	<b>XII</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> -----	<b>XVIII</b>
<b>SUMMARY</b> -----	<b>XXII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> -----	<b>1</b>
<b>1.1 Biologische Aspekte</b> -----	<b>1</b>
1.1.1 Phototransduktion in den Stäbchenrezeptorzellen-----	2
1.1.2 Die retinale Guanylatzyklase-----	3
1.1.3 Guanylatzyklase-aktivierende Proteine 1 und 2-----	5
1.1.4 ROS-GC1/GCAP-Interaktion-----	7
<b>1.2 Massenspektrometrische Grundlagen</b> -----	<b>8</b>
1.2.1 Elektrospray als Ionisationsprozess-----	8
1.2.2 Massenanalysatoren-----	10
1.2.2.1 Flugzeitanalysator-----	10
1.2.2.2 Quadrupol-Massenanalysator-----	11
1.2.2.3 Lineare Ionenfalle-----	12
1.2.2.4 Orbitrap-----	13
1.2.3 Verwendete Massenspektrometer-----	14
1.2.3.1 Orbitrap-Hybridmassenspektrometer-----	14
1.2.3.2 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer-----	15
1.2.3.3 Q-TOF-Massenspektrometer-----	17
1.2.4 Fragmentierungstechniken-----	18
1.2.5 Strategien zur Proteinquantifizierung-----	19
1.2.6 Massenspektrometrische Analyse von Proteinstrukturen und Protein-Protein- Interaktionen-----	20
1.2.6.1 Chemische Vernetzung kombiniert mit Massenspektrometrie-----	20
1.2.6.2 Chemische Vernetzungsreagenzien-----	22
1.2.6.3 MS-Spaltbarkeit und Isotopenmarkierung zur Identifizierung von Vernetzungsprodukten-----	25

## Inhaltsverzeichnis

1.2.6.4	Native Massenspektrometrie von Proteinen	27
<b>1.3</b>	<b>Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>ZIELSTELLUNG</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Chemische Vernetzungsreagenzien</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>33</b>
<b>3.4</b>	<b>Komplettkits</b>	<b>34</b>
<b>3.5</b>	<b>Geräte</b>	<b>34</b>
<b>3.6</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>36</b>
<b>3.7</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>42</b>
<b>3.8</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>42</b>
<b>3.9</b>	<b>Medien und Zusätze</b>	<b>42</b>
<b>3.10</b>	<b>Plasmide</b>	<b>43</b>
<b>3.11</b>	<b>ROS-GC1-Peptide zur Interaktionsstudie mit GCAP-2</b>	<b>43</b>
<b>3.12</b>	<b>ROS-GC1-Peptide zur Quantifizierung von ROS-GC1</b>	<b>44</b>
<b>3.13</b>	<b>Proteine</b>	<b>44</b>
<b>3.14</b>	<b>Datenverarbeitung</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>46</b>
4.1.1	Lagerung der Kulturstämme	46
4.1.1.1	<i>E. coli</i> -Stämme	46
4.1.1.2	HEK 293-Zellstämme	46
4.1.2	Transformation chemisch kompetenter Zellen	46
4.1.3	Plasmid-DNA-Isolation	47
4.1.4	Plasmid-DNA-Spaltung	47
4.1.5	Ligation	47
4.1.6	Agarosegelelektrophorese	47
4.1.7	DNA-Sequenzierung	48
<b>4.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>48</b>
4.2.1	Produktion von GCAP-2 in <i>E. coli</i>	48
4.2.2	Photo-Methionin-Einbau in GCAP-2	48
4.2.3	Kultivierung der HEK 293-Zelllinie	49



## Inhaltsverzeichnis

4.2.3.1 Zellkultur	49
4.2.3.2 Abtrennung der unlöslichen Zellfraktion	50
<b>4.3 Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>50</b>
4.3.1 Einschlusskörperchen-Präparation und Rückfaltung der GCAP-2-Varianten	50
4.3.2 Proteinreinigung	51
4.3.2.1 GCAP-2-Varianten ohne und mit eingebautem Photo-Methionin	51
4.3.2.2 Chromatographische Abtrennung von GCAP-2 ohne Myristoylierung	52
4.3.2.3 GCAP-2-Variante mit N-terminalem His-Tag	52
4.3.3 Pufferaustausch und Konzentrierung	52
4.3.4 Acetonpräzipitation	53
4.3.5 Peptid-/ Proteinkonzentrationsbestimmung	53
4.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
4.3.7 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	54
4.3.8 Fluoreszenzspektroskopie	55
4.3.9 ROS-Präparation	55
4.3.10 Immunpräzipitation	55
4.3.11 ROS-GC1-Aktivitätsassay	56
4.3.12 Enzymatische Proteolyse im Gel	57
4.3.13 Enzymatische Proteolyse in Lösung	57
4.3.13.1 Identifizierung von ROS-GC1 aus dem HEK 293-Zelllysat	58
4.3.13.2 Quantifizierung von ROS-GC1 in ROS-Präparation	59
4.3.13.3 Identifizierung von ROS-GC1 aus ROS-Präparation	60
<b>4.4 Chemische Vernetzung</b>	<b>60</b>
4.4.1 Vernetzungsexperimente mit GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden	60
4.4.2 Vernetzungsexperimente der ROS-GC1 im HEK 293-Zelllysat	61
4.4.3 Vernetzungsexperimente der ROS-GC1 aus ROS-Präparation	62
4.4.4 Anreicherung von Vernetzungsprodukten	62
<b>4.5 Massenspektrometrische Methoden</b>	<b>62</b>
4.5.1 Nano-ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie	62
4.5.2 Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS	63
4.5.3 Bestimmung der ROS-GC1-Aktivität mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie	65

## Inhaltsverzeichnis

4.5.4	Quantifizierung der ROS-GC1 mittels Quadrupol-TOF-Massenspektrometrie	66
4.5.5	Native Massenspektrometrie	66
<b>4.6</b>	<b>Bioinformatische Methoden</b>	<b>67</b>
4.6.1	Identifizierung von Vernetzungsprodukten	67
4.6.2	Homologie-Modellierung der intrazellulären Domäne der ROS-GC1	68
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>70</b>
<b>5.1</b>	<b>Produktion des myristoylierten GCAP-2 mit und ohne Einbau von Photo-Methionin</b>	<b>70</b>
<b>5.2</b>	<b>Klonierung, Expression und Reinigung von GCAP-2 mit N-terminalem His-Tag</b>	<b>74</b>
<b>5.3</b>	<b>Vernetzungsreagenzien mit GCAP-2</b>	<b>76</b>
5.3.1	Das Reagenz CDI	76
5.3.2	Das Sulfhydryl-reaktive Reagenz DAU	77
5.3.3	Die Photo-Aminosäure Photo-Methionin	78
<b>5.4</b>	<b>Interaktionsstudien zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden</b>	<b>80</b>
5.4.1	Vernetzungen zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden	81
5.4.2	Affinität von GCAP-2 zu ROS-GC1-Peptiden	87
<b>5.5</b>	<b>Charakterisierung der humanen ROS-GC1 aus HEK 293-Zelllysat</b>	<b>90</b>
5.5.1	Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1 in den HEK 293-Membranen	90
5.5.2	Optimierung der proteolytischen Spaltung der ROS-GC1	92
5.5.3	Chemische Vernetzung zur Strukturanalyse von ROS-GC1	94
<b>5.6</b>	<b>Charakterisierung der bovinen ROS-GC1 aus Rinderaugen</b>	<b>97</b>
5.6.1	Absolute Quantifizierung der ROS-GC1 in der ROS-Präparation	97
5.6.2	Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1 in der ROS-Präparation	100
5.6.3	Experimentelle Strategie für die ROS-Präparation	103
5.6.4	ROS-GC1 Strukturanalyse mittels chemischer Vernetzung	104
<b>5.7</b>	<b>Homologie-Modellierung der intrazellulären Domäne der ROS-GC1</b>	<b>106</b>
5.7.1	Molekulare Modellierung der intrazellulären Domäne der ROS-GC1	106
5.7.2	Erstellung der 3D-Struktur der ROS-GC1	109
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>111</b>
<b>6.1</b>	<b>Vernetzungsstrategien</b>	<b>111</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>6.2</b>	<b>Strukturelle Charakterisierung der GCAP-2/ROS-GC1-Peptid-Interaktion</b> .....	<b>112</b>
<b>6.3</b>	<b>Affinität zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden</b> .....	<b>114</b>
<b>6.4</b>	<b>Quantifizierung der ROS-GC1</b> .....	<b>115</b>
<b>6.5</b>	<b>Beurteilung der ROS-GC1-Aktivität</b> .....	<b>116</b>
<b>6.6</b>	<b>Vergleich verschiedener Anreicherungsstrategien</b> .....	<b>118</b>
<b>6.7</b>	<b>GCAP-2-Bindung</b> .....	<b>120</b>
<b>6.8</b>	<b>Validierung der 3D-Struktur der bovinen ROS-GC1</b> .....	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>126</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>XXV</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>XLVI</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>LXXIV</b>
	<b>PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE</b> .....	<b>LXXVI</b>
	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b> .....	<b>LXXIX</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>LXXX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ HD	$\alpha$ -helikale Domäne ( <i><math>\alpha</math>-helical domain</i> )
ABL	<i>Abelson murine leukemia</i>
ACN	Acetonitril
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQUA	Absolute Quantifizierung ( <i>absolute quantification</i> )
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BS <sup>2</sup> G	Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat
CD	Katalytische Domäne ( <i>catalytic domain</i> )
CCD	Kern-katalytische Domäne ( <i>Core catalytic domain</i> )
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat ( <i>Cyclic guanosine monophosphate</i> )
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation ( <i>collision-induced dissociation</i> )
CMD	Carboxymethyldextran
CNG	Zyklisches Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal ( <i>cyclic nucleotide-gated ion channels</i> )
CORD	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie ( <i>Cone-rod dystrophy</i> )
CRM	Modell des geladenen Rückstands ( <i>charged residue model</i> )
CTE	C-terminale Verlängerung ( <i>C-terminal extension</i> )
Da	Dalton
DAU	Diallylurea
DD	Dimerisierungsdomäne ( <i>dimerization domain</i> )
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DSBU	Disuccinimidyl dibutylurea

## Abkürzungsverzeichnis

DTT	Dithiothreitol
D <sub>0</sub> /D <sub>12</sub>	nicht-deuteriert/ zwölfmal-deuteriert
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
E <sub>kin</sub>	kinetische Energie
EM	Elektronenmikroskopie
E <sub>pot</sub>	potentielle Energie
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETD	Elektronentransferdissoziation
ExtD	Extrazelluläre Domäne ( <i>extracellular domain</i> )
FA	Ameisensäure ( <i>formic acid</i> )
FASP	<i>Filter-aided sample preparation</i>
FBS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FDR	<i>false discovery rate</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FT-ICR	Fourier Transformation-Ionenzyklotronresonanz
GC	Guanylatzyklase ( <i>Guanylyl cyclase</i> )
GCAP	Guanylatzyklase-aktivierendes Protein ( <i>Guanylyl cyclase-activating protein</i> )
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCD	Kollisionsinduzierte Dissoziation mit höherer Energie ( <i>higher energy collision-induced dissociation</i> )
HDX	Wasserstoff-Deuterium-Austausch ( <i>hydrogen-deuterium exchange</i> )
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Iodacetamid
IBs	Einschlusskörperchen ( <i>inclusion bodies</i> )
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin

## Abkürzungsverzeichnis

ICAT	Isotopenmarkierter Affinitätstag ( <i>isotope-coded affinity tag</i> )
IcD	Intrazelluläre Domäne ( <i>intracellular domain</i> )
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
ID	Innerer Durchmesser
IEM	Modell der Ionenverdampfung ( <i>ion evaporation model</i> )
IEX	Ionenaustauschchromatographie ( <i>ion exchange</i> )
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie ( <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> )
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IM-MS	Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
JMD	Juxtamembrandomäne ( <i>juxtamembrane domain</i> )
Kan <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz
kDa	Kilodalton
KHD	Kinase-Homologie-Domäne ( <i>kinase homology domain</i> )
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose ( <i>Leber's congenital amourosis</i> )
LTQ	Lineare Ionenfalle von Thermo Fisher Scientific
LIT	Lineare Ionenfalle ( <i>linear ion trap</i> )
LS	Leitsequenz ( <i>leader sequence</i> )
M <sub>av</sub>	durchschnittliches Molekulargewicht ( <i>average</i> )
M <sub>mono</sub>	monoisotopisches Molekulargewicht
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i> )
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	Multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis

## Abkürzungsverzeichnis

NCE	Normalisierte Kollisionsenergie ( <i>normalized collision energy</i> )
NCS	Neuronale Calcium-Sensorproteine
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NPR	Natriuretische Peptidrezeptoren
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PDB	Proteindatenbank
PDE	Phosphodiesterase
PIR	<i>Protein Interaction Reporter</i>
PM	Photo-Methionin
Pkna	Proteinkinase A
PSMF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSM	<i>Peptide spectral match</i>
PTMS	Posttranslationale Modifikationen
Q	Quadrupol
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RF	Radiofrequenz
Rh	Rhodopsin
RISE	<i>Reporter Ion Scan Event</i>
RMSD	quadratisch-mittlere Abweichung, ( <i>root-mean-square deviation</i> )
ROS	Sehstäbchenaußensegment ( <i>rod outer segment</i> )
ROS-GC	Retinale Guanylatzyklase ( <i>rod outer segment guanylyl cyclase</i> )
RP	Umkehrphase ( <i>reversed phase</i> )
RPE	Retinales Pigmentepithel
rSAP	Rekombinante <i>shrimp</i> Alkalische Phosphatase
RT	Retentionszeit
SCAD	<i>Surfactant and chaotropic agent-assisted sequential extraction/on-pellet digestion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SEC	Größenausschlusschromatographie ( <i>size exclusion chromatography</i> )
SEV	Sekundärelektronenvervielfältiger

## Abkürzungsverzeichnis

SHD	Signalhelixdomäne ( <i>signaling helix domain</i> )
SILAC	Stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in der Zellkultur ( <i>stable isotope-labeling using amino acids in cell culture</i> )
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> + Glukose
SPR	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie ( <i>surface plasmon resonance</i> )
STaR	Hitzestabiler Enterotoxinrezeptor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure ( <i>Trifluoroacetic acid</i> )
Th	Thomson
TIC	Totalionenstrom ( <i>total ion current</i> )
TIMS	<i>Trapped ion mobility spectrometry</i>
TMD	Transmembrandomäne ( <i>transmembrane domain</i> )
TOF	Flugzeitanalysator ( <i>time-of-flight</i> )
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWIG	<i>Traveling-Wave-Ionentransferoptik</i> ( <i>traveling wave ion guides</i> )
u	Atomare Masseneinheit
UPLC	<i>Ultra high-performance liquid chromatography</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
z	Ladungszahl
$\omega$	Schwingungsfrequenz



## Abkürzungsverzeichnis

### Proteinogene Aminosäuren mit Drei- und Ein-Buchstabencodes

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

### Aminosäuremodifikationen in dieser Arbeit

Carbamidomethyliertes Cystein	B (StavroX, MeroX), C (Proteome Discoverer)
Oxidiertes Methionin	m (StavroX, MeroX), O (Proteome Discoverer)
Photo-Methionin	x (StavroX, MeroX), P (Proteome Discoverer)
Hydrolysiertes Photo-Methionin	M (Proteome Discoverer)
Photo-Methionin mit N <sub>2</sub> -Verlust	P (Proteome Discoverer)
N-terminale Myristoylierung am Glycin	Q (Proteome Discoverer)

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Querschnitt des Auges (A) und der Retina (B).----- 1

Abbildung 2: Aufbau eines Photorezeptorstäbchens (A) und Signalkaskade der  
Phototransduktion (B). ----- 2

Abbildung 3: Schematischer Aufbau der ROS-GC1.----- 5

Abbildung 4: GCAP-Strukturen im Calcium-beladenen Zustand.----- 6

Abbildung 5: Regulierung der ROS-GC1 durch GCAP-1 und -2.----- 7

Abbildung 6: Elektrospray-Ionisation (ESI). ----- 9

Abbildung 7: Aufbau eines linearen Quadrupols. ----- 11

Abbildung 8: Schematische Darstellung einer linearen Ionenfalle. ----- 12

Abbildung 9: Orbitrap-Massenanalysator. ----- 13

Abbildung 10: Verwendete Orbitrap-Hybridmassenspektrometer. ----- 15

Abbildung 11: Triple-Quadrupol-Massenspektrometer. ----- 16

Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Q-TOF-Massenspektrometers. ----- 17

Abbildung 13: Nomenklatur der Peptidfragmentierung nach Roepstorff, Fohlmann  
und Biemann. ----- 18

Abbildung 14: Strategie eines chemischen Vernetzungs/MS-Experiments. ----- 21

Abbildung 15: Übersicht der verwendeten Vernetzungsreagenzien.----- 23

Abbildung 16: Identifizierung eines DSBU-Vernetzungsproduktes mithilfe der MS-  
Spaltbarkeit.----- 26

Abbildung 17: Anionenaustauschchromatographie von GCAP-2. ----- 70

Abbildung 18: Größenausschlusschromatographie von GCAP-2. ----- 71

Abbildung 19: Massenspektrum der Nano-ESI-Orbitrap-MS-Analyse von GCAP-2. ----- 72

Abbildung 20: Natives Massenspektrum des myristoylierten GCAP-2. ----- 73

Abbildung 21: Identifizierung der Photo-Methionin-Modifikationen in GCAP-2. ----- 73

Abbildung 22: Schematische Darstellung und Klonierungsstrategie des GCAP-2-  
Konstrukts. ----- 74

Abbildung 23: Affinitätschromatographie des GCAP-2-Fusionsproteins. ----- 75

Abbildung 24: Fragmentationenspektrum des DAU-Vernetzungsproduktes in GCAP-2. ---- 78

Abbildung 25: Fragmentationenspektrum eines Photo-Methionin-  
Vernetzungsproduktes von GCAP-2. ----- 79

Abbildung 26: Übersicht der ROS-GC1-Peptide. ----- 81

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 27:	SDS-PAGE-Analyse der DSBU-Vernetzungsreaktionen zwischen GCAP-2 und den drei ROS-GC1-Peptiden. -----	82
Abbildung 28:	Fragmentationenspektren von Vernetzungsprodukten zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptid 2. -----	83
Abbildung 29:	Übersicht der identifizierten Vernetzungen zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden 1, 2 und 3. -----	84
Abbildung 30:	Übersicht der vernetzten Aminosäuren von GCAP-2 mit ROS-GC1-Peptid 2. -----	87
Abbildung 31:	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden. -----	88
Abbildung 32:	Kalibrierkurven zur Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1. -----	91
Abbildung 33:	Aktivitätsbestimmung der humanen ROS-GC1 in HEK 293-Membranfraktion. -----	92
Abbildung 34:	Optimierung der Proteolyse in Lösung für ROS-GC1. -----	93
Abbildung 35:	Vernetzung mit DSBU von ROS-GC1 im HEK 293-Zelllysats. -----	94
Abbildung 36:	SEC des Peptidgemisches des HEK 293-Zelllysats. -----	95
Abbildung 37:	Quantifizierungsstrategie der bovinen ROS-GC1 in der retinalen ROS-Präparation. -----	99
Abbildung 38:	Absolute Quantifizierung der ROS-GC1 in der ROS-Präparation. -----	99
Abbildung 39:	Kontrollexperiment zur Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1 in der ROS-Präparation. -----	101
Abbildung 40:	Aktivitätsbestimmung der bovinen ROS-GC1. -----	102
Abbildung 41:	Identifizierung der ROS-GC1 aus der ROS-Präparation. -----	103
Abbildung 42:	Übersicht der DSBU-Vernetzungen im bovinen ROS-GC1-Dimer aus ROS-Präparation. -----	104
Abbildung 43:	Gliederung der IcD des ROS-GC1 Dimers mithilfe von Homologiemodellen. -----	107
Abbildung 44:	Modellierungen des KHD- und des $\alpha$ HD/CD-Dimers der ROS-GC1. ----	108
Abbildung 45:	Modell der IcD der ROS-GC1. -----	110
Abbildung 46:	Vergleich der identifizierten DSBU-Vernetzungen in der bovinen (A) und humanen (B) ROS-GC1. -----	119
Abbildung 47:	Charakteristische Konformationen des flexiblen Helix- <i>Turn</i> -Helix-Motivs. -----	123

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung A 1: Reaktivität und Fragmentierungsverhalten des spaltbaren Vernetzungsreagenz CDI.-----	CXLVIII
Abbildung A 2: Reaktionsmechanismus und Fragmentierungsverhalten des Vernetzungsreagenz Photo-Methionin. -----	CXLIX
Abbildung A 3: Reaktivität und Fragmentierungsverhalten des spaltbaren Vernetzungsreagenz DAU. -----	CL
Abbildung A 4: Identifizierte Produkte von Methionin und Photo-Methionin.-----	CLI
Abbildung A 5: Aminosäuresequenzen der GCAP-2-Varianten und ROS-GC1-Peptide. -----	CLI
Abbildung A 6: Trennung der nicht-myristoylierten/myristoylierten GCAP-2-Variante.	CLII
Abbildung A 7: Identifizierung des gereinigten GCAP-2 mit <i>N</i> -terminalen His-Tag.-----	CLII
Abbildung A 8: Fragmentionenspektrum eines CDI-Vernetzungsproduktes in GCAP-2.-----	CLIII
Abbildung A 9: Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden. -----	CLIV
Abbildung A 10: Fluoreszenzspektroskopie-Messungen mit GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden.-----	CLIV
Abbildung A 11: Optimierung der Proteolyse von ROS-GC1 in Lösung aus dem HEK 293-Zellysat. -----	CLV
Abbildung A 12: Identifizierung von ROS-GC1 aus dem HEK 293-Zellysat nach der DSBU-Vernetzung. -----	CLVI
Abbildung A 13: MRM-Analyse der Nukleotide/-side GMP, cGMP und Guanosin. -----	CLVI
Abbildung A 14: Fragmentionenspektrum eines DSBU-Vernetzungsproduktes in der humanen ROS-GC1. -----	CLVII
Abbildung A 15: Fragmentionenspektren des nicht-markierten und markierten ROS-GC1-Peptides Q1. -----	CLVIII
Abbildung A 16: Fragmentionenspektren des nicht-markierten und markierten ROS-GC1-Peptides Q2. -----	CLIX
Abbildung A 17: Quantifizierung von ROS-GC1 in der ROS-Präparation. -----	CLIX
Abbildung A 18: Sequenzvergleich der humanen und bovinen ROS-GC1-Varianten. -----	CLX
Abbildung A 19: Fragmentionenspektrum eines DSBU-Vernetzungsproduktes in der bovinen ROS-GC1. -----	CLXI

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Nomenklatur von vernetzten Peptiden nach Schilling <i>et al.</i> -----	26
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.-----	54
Tabelle 3:	Verwendete $m/z$ -Übergänge im MRM-Modus. -----	66
Tabelle 4:	Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit CDI in GCAP-2 im Calcium-beladenen Zustand. -----	77
Tabelle 5:	Übersicht der vernetzten Aminosäuren in GCAP-2 mit Photo- Methionin.-----	80
Tabelle 6:	Vernetzte Aminosäuren zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1- Peptiden 1, 2 und 3. -----	84
Tabelle 7:	Ermittelte $K_D$ -Werte zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden mittels SPR und Fluoreszenzspektroskopie. -----	89
Tabelle 8:	DSBU-Vernetzungen der humanen ROS-GC1. -----	96
Tabelle 9:	DSBU-Vernetzungen der bovinen ROS-GC1.-----	105

## Tabellenverzeichnis

Tabelle A 1:	Identifizierte Vernetzungsprodukte in GCAP-2 mit CDI.-----	CLXII
Tabelle A 2:	Identifizierte Vernetzungsprodukte in GCAP-2 mit Photo-Methionin in der Anwesenheit von Calcium. -----	CLXII
Tabelle A 3:	Identifizierte Vernetzungsprodukte in GCAP-2 mit Photo-Methionin in der Abwesenheit von Calcium. -----	CLXIII
Tabelle A 4:	Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit DSBU zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden 1, 2 und 3 in der An- und Abwesenheit von Calcium. -----	CLXIII
Tabelle A 5:	Übersicht der identifizierten Vernetzung mit DAU zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptid 2 in der Anwesenheit von Calcium.-----	CLXIV
Tabelle A 6:	Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit Photo-Methionin zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden 1, 2 und 3 in der An- und Abwesenheit von Calcium. -----	CLXIV
Tabelle A 7:	Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit CDI zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden 1, 2 und 3 in der An- und Abwesenheit von Calcium. -----	CLXIV
Tabelle A 8:	DSBU-Vernetzungen in der humanen ROS-GC1. -----	CLXVI
Tabelle A 9:	Übersicht der identifizierten DSBU-Vernetzungen in der humanen ROS-GC1 in der Anwesenheit von GCAP-2 von Calcium. -----	CLXVII
Tabelle A 10:	Übersicht der identifizierten DSBU-Vernetzungen in der humanen ROS-GC1 in der Abwesenheit von GCAP-2 und Calcium. -----	CLXVIII
Tabelle A 11:	Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit DSBU D <sub>0</sub> /D <sub>12</sub> in der humanen ROS-GC1 in der Anwesenheit von GCAP-2 ohne Calcium. -----	CLXVIII
Tabelle A 12:	Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit DSBU in der bovinen ROS-GC1 aus der ROS-Präparation in der Abwesenheit von Calcium. -----	CLXX
Tabelle A 13:	Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit DSBU in der bovinen ROS-GC1 aus der ROS-Präparation in der Abwesenheit von Calcium nach Fixierung mit Glutaraldehyd. -----	CLXXII
Tabelle A 14:	HADDOCK-Statistik für das C2-binäre Docking der ROS-GC1-KHD. -----	CLXXIV

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle A 15: C<sub>α</sub>-C<sub>α</sub>-Distanzen der DSBU-Vernetzungen der bovinen ROS-GC1 im  
ROS-GC1-IcD-Modell. ----- CLXXIV
- Tabelle A 16: C<sub>α</sub>-C<sub>α</sub>-Distanzen der DSBU-Vernetzungen der humanen ROS-GC1 im  
ROS-GC1-IcD-Modell. ----- CLXXV

### Zusammenfassung

Die retinale Guanylatzyklase (ROS-GC1) stellt ein entscheidendes Element bei der Phototransduktion dar. Sie reguliert die cGMP-Konzentration im Außensegment der Stäbchen und ermöglicht somit die Adaption des Auges an die jeweiligen Lichtverhältnisse. Fehlfunktionen in der Phototransduktion, die zur Beeinträchtigung oder dem Verlust des Sehvermögens führen, stehen häufig im Zusammenhang mit auftretenden Mutationen in dem *GUCY2D*-Gen der ROS-GC1 [1]. Hierdurch kann sowohl ein verändertes Aktivitätsprofil der ROS-GC1 als auch eine gestörte Regulation durch die GCAP-Proteine hervorgerufen werden. Für mögliche Therapieansätze dieser Retinopathien ist die strukturelle Analyse der ROS-GC1 sowie ein detailliertes Verständnis des Calcium-abhängigen Aktivierungsmechanismus durch die Proteine GCAP-1 und -2 essentiell. Der methodische Schwerpunkt zur Strukturuntersuchung der ROS-GC1 und ihrer Interaktion mit GCAP-2 lag auf der chemischen Vernetzung mit einer nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse (MS). Die gebildeten Vernetzungsprodukte können funktionale Gruppen bestimmter Aminosäuren in einem definierten, räumlichen Abstand miteinander verknüpfen. Die dadurch erhaltenen Distanzbeschränkungen liefern wichtige Informationen für die Erstellung von Proteinstrukturmodellen.

Zunächst wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Vernetzungsstrategien an GCAP-2 überprüft. Hierfür wurde GCAP-2 in *E. coli*-Zellen exprimiert und anschließend aus diesen isoliert. Die Vernetzungsreagenzien CDI, DAU und Photo-Methionin, die unterschiedliche Reaktivitäten und *Spacer*-Längen aufwiesen, wurden für GCAP-2 erfolgreich getestet. Somit konnten diese Vernetzungsreagenzien gemeinsam mit DSBU für die Interaktionsstudien zwischen den ROS-GC1-Peptiden und GCAP-2 Anwendung finden. Um eine detaillierte Aussage über die Interaktionsfläche zwischen der intrazellulären Domäne (IcD) der ROS-GC1 und GCAP-2 treffen zu können, wurden drei Peptide aus der IcD für die Vernetzungsexperimente mit anschließender MS-Analyse ausgewählt. Das Peptid 1 (AS 965-981) stammt aus der C-terminalen Verlängerung (CTE) der katalytischen Domäne (CD) der ROS-GC1 und war als das Bindemotiv für GCAP-2 postuliert worden [2, 3]. Das Peptid 2 (AS 942-981) stellt eine N-terminal verlängerte Variante von Peptid 1 dar. Bei Peptid 3 (AS 503-522) handelt es sich um die postulierte Binderegion von GCAP-1 aus der Juxtamembrandomäne (JMD) der N-terminalen Region der ROS-GC1-IcD [4]. Daher diente es der Identifizierung einer möglichen überlappenden Interaktionsstelle von GCAP-1 und -2. Die Mehrheit der



## Zusammenfassung

Vernetzungsprodukte wurde zwischen Peptid 2 und GCAP-2 nachgewiesen. Es wurden zwei Segmente (AS 1-9, 18-24) in Peptid 2 der ROS-GC1 identifiziert, die bevorzugt mit GCAP-2 reagierten. Das zweite Segment entsprach der Interaktionsstelle von Peptid 1 mit GCAP-2 und bestätigte somit dessen identifizierte Vernetzungsprodukte zwischen Peptid 1 und GCAP-2. Peptid 3 enthielt zwei Lysine in seiner Sequenz, die bevorzugt Verknüpfungen mit GCAP-2 über die Amin-reaktiven Vernetzungsreagenzien eingehen sollten. Dagegen wurden nur sehr wenige Vernetzungsprodukte ausschließlich zwischen dem *N*-Terminus von Peptid 3 und GCAP-2 bestätigt. Zusätzlich erfolgte eine biophysikalische Charakterisierung der ROS-GC1-Peptiden/GCAP-2-Komplexe mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR)- und Fluoreszenzspektroskopie-Analysen. Hierbei zeigte das ROS-GC1-Peptid 2 bei der SPR-Analyse die höchste Affinität zu GCAP-2 und wies mit 2,0  $\mu\text{M}$  einen  $K_D$ -Wert im niederen mikromolaren Bereich auf. Der  $K_D$ -Wert des Peptid 1/GCAP-2-Komplexes betrug 2,4  $\mu\text{M}$  und ist somit zu der Peptid 2/GCAP-2-Interaktion vergleichbar. Die erhaltenen SPR-Daten stehen im Einklang mit weiteren Untersuchungsergebnissen, die für die ROS-GC1-Peptid-Interaktionen mit GCAP-2 mittels Fluoreszenzspektroskopie erhalten wurden. Aufgrund dessen kann von einer Interaktionsregion zwischen GCAP-2 und der CD der ROS-GC1 ausgegangen werden. Dagegen konnte weder mit SPR- noch mit Fluoreszenzspektroskopie ein  $K_D$ -Wert zwischen ROS-GC1-Peptid 3 und GCAP-2 bestimmt werden, was auf eine geringe oder ausbleibende Interaktion hindeutet. Dies wird durch die Resultate der Vernetzung/MS-Analyse bestärkt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit erfolgte die 3D-Strukturanalyse der ROS-GC1 als Volllängenprotein mit Vernetzung/MS. Hierfür wurden folgende zwei Expressionssysteme verwendet: Die HEK 293-Zellen, welche stabil mit dem humanen ROS-GC1-Gen transfiziert wurden, und eine Gewebepräparation des Sehstäbchenaußensegments aus den Rinderaugen (ROS-Präparation) mit boviner ROS-GC1. Aufgrund der hohen Probenkomplexität war es notwendig, einen angepassten Arbeitsablauf zur Analyse der ROS-GC1-Vernetzungsprodukte ohne vorherige Proteinreinigung bzw. -anreicherung zu erarbeiten. Daher wurde zunächst die enzymatische Proteolyse in Lösung für die membranständige ROS-GC1 optimiert. Des Weiteren wurden zwei Anreicherungsstrategien für die Identifizierung der gering abundanten Vernetzungsprodukte innerhalb der ROS-GC1 etabliert. Dabei wurde das HEK 293-Zellysate mit der enthaltenen humanen ROS-GC1 zunächst chemisch vernetzt und danach proteolytisch gespalten. Im Anschluss folgte die Anreicherung der Vernetzungsprodukte mittels Größenausschlusschromatographie. Dagegen wurde die bovine ROS-GC1 aus der ROS-Präparation im

## Zusammenfassung

ersten Schritt mithilfe einer Immunpräzipitation (IP) angereichert. Anschließend wurde die Vernetzungsreaktion sowie die enzymatische Proteinspaltung der ROS-GC1, immobilisiert auf den *IP-beads*, durchgeführt. Die beiden Vernetzungsstrategien resultierten in einer erfolgreichen Identifizierung von 27 Vernetzungen innerhalb der humanen ROS-GC1 bzw. 30 Vernetzungen der bovinen Variante. Dabei zeigte sich, dass die vernetzten Aminosäuren in der humanen und bovinen ROS-GC1 übereinstimmten oder komplementäre Informationen lieferten. Somit waren die unabhängig voneinander identifizierten Vernetzungsprodukte beider ROS-GC1-Varianten kombinierbar. Daraus folgt zudem, dass HEK 293-Zellen alternativ zur nativen ROS-Präparation als verlässliches Expressionssystem für die weitere Struktur- aufklärung der ROS-GC1 verwendet werden können.

Um die Gewinnung der 3D-Strukturinformationen von funktionell aktiver ROS-GC1 sicherzustellen, wurde für eine tiefgreifendere Proteincharakterisierung die enzymatische Aktivität der humanen als auch bovinen ROS-GC1 mittels MRM (*multiple reaction monitoring*)-MS nachgewiesen. Auch konnte eine absolute Quantifizierung der bovinen ROS-GC1 in der ROS-Präparation mithilfe der AQUA-Peptid-Strategie erfolgen.

Von den identifizierten DSBU-Vernetzungsprodukten in der ROS-GC1-IcD konnten 24 Distanzbeschränkungen der bovinen ROS-GC1 und 14 der humanen Variante abgeleitet werden, die für die Erstellung und Validierung eines Strukturmodells der bovinen ROS-GC1 erfolgreich genutzt wurden. Bei der Modellierung der ROS-GC1-Struktur konnten geeignete Strukturen homologer Proteine für AS 542-1066 der IcD, JMD bis CTE umfassend, identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um drei unabhängige Proteinstrukturen. Da für die *N* (AS 493-541)- und *C*-terminalen (AS 1067-1110) Regionen der IcD keine passenden Proteintemplate zur Verfügung standen, erfolgte anhand der zuvor ermittelten Homologie- modelle eine vereinfachte Neugliederung und Umbenennung der IcD in die Kinase-Homologie- Domäne (KHD, AS S542-T806), die  $\alpha$ -helikale Domäne ( $\alpha$ HD, AS F807-T859) und die katalytische Domäne (CD, AS Q860-G1066).

Mithilfe der identifizierten Vernetzungsprodukte konnten sowohl die dimere ROS-GC1-Struktur, als auch die molekulare Scharnierfunktion der  $\alpha$ HD aufgrund eines ermittelten *Helix-Turn-Helix*-Motiv bestätigt werden. Die  $\alpha$ HD verbindet die KHD und die CD miteinander und kann verschiedene Konformationen einnehmen, sodass die Orientierung und räumliche Nähe

## Zusammenfassung

zwischen KHD und CD variieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit erstmalig ein vollständiges 3D-Strukturmodell der IcD der ROS-GC1 und der Nachweis flexibler IcD-Konformationen durch das identifizierte Helix-*Turn*-Helix-Motiv der  $\alpha$ HD vorgestellt werden.

### Summary

The retinal guanylate cyclase (ROS-GC1) is a key element in the phototransduction process. ROS-GC1 regulates the cGMP concentration in the outer segment of the rods, consequently, it is responsible for adapting the eyes to the respective light conditions. Dysfunctions in the phototransduction that lead to impairment or loss of vision are often related to mutations occurring in the *GUCY2D* gene encoding the ROS-GC1 [1]. These mutations can cause a modified activity profile of the ROS-GC1 as well as a disturbed regulation by the guanylyl cyclase-activating proteins (GCAP). To develop therapeutic approaches for these retinal diseases, the structural analysis of the ROS-GC1 and a detailed understanding of the calcium-dependent activation mechanism by the proteins GCAP-1 and -2 are essential. To investigate the 3D-structure of ROS-GC1 and its interactions with GCAP-2, the methodology of this thesis mainly used was chemical cross-linking combined with mass spectrometry (MS). Cross-link reagents connect functional groups of specific amino acids at a defined spatial distance. These distance constraints obtained provide important information for computational modeling of protein 3D-structures.

In this work, GCAP-2 served as a model protein to examine different cross-linking strategies. For this purpose, bovine GCAP-2 was overexpressed in *E. coli* cells and purified. The cross-linking reagents CDI, DAU and photo-methionine, which have different reactivities and spacer lengths, were successfully tested with GCAP-2. Furthermore, these cross-linking reagents were applied together with DSBU for studying the interactions between the ROS-GC1 peptides and GCAP-2. In order to get a more detailed view about the interaction surface between the intracellular domain (IcD) of the ROS-GC1 and GCAP-2, three peptides from the IcD were selected for the cross-linking/MS experiments. Peptide 1 (aa 965-981) is derived from the C-terminal extension (CTE) of the catalytic domain (CD) of ROS-GC1 and has been postulated as the binding motif of GCAP-2 [2, 3]. Peptide-2 (aa 942-981) is an N-terminally extended variant of peptide 1. Peptide 3 (aa 503-522) is the putative binding region of GCAP-1 derived from the juxtamembrane domain (JMD) in the N-terminal region of ROS-GC1-IcD [4], aiming at identifying potential overlapping interaction site of GCAP-1 and -2. The majority of cross-linking products was detected between ROS-GC1 peptide 2 and GCAP-2. Two segments (aa 1-9, 18-24) were identified in peptide 2, which were preferentially connected with GCAP-2. The second segment correlates with the binding site of peptide 1 with GCAP-2 and therefore

## Summary

confirmed the identified cross-links between peptide 1 and GCAP-2. Peptide 3 contained two lysines in its sequence, which should preferably react with amine-reactive cross-linkers. In contrast, only a few cross-links were confirmed between the *N*-terminus of peptide 3 and GCAP-2. In addition, ROS-GC1 peptides/GCAP-2 complexes were biophysically characterized by surface plasmon resonance (SPR) and fluorescence spectroscopy measurements. During the SPR analysis, ROS-GC1 peptide 2 showed the highest affinity for GCAP-2 with a  $K_D$  value in the low micromolar range (2.0  $\mu\text{M}$ ). The  $K_D$  value of the peptide 1/GCAP-2 complex was 2.4  $\mu\text{M}$ , being comparable to the  $K_D$  value of the peptide 2/GCAP-2 interaction. These SPR data are in agreement with further experimental results that were obtained for the ROS-GC1 peptide interaction with GCAP-2 by fluorescence spectroscopy. Based on these findings, an interaction interface between the GCAP-2 and the CD of the ROS-GC1 can be postulated. In contrast, no affinity between peptide 3 and GCAP-2 was determined. The spectroscopic studies in combination with the cross-linking/MS results suggest a lacking or only a weak peptide 3/GCAP-2 interaction.

In addition, the 3D-structural analysis of the ROS-GC1 as a full-length protein was performed using exclusively DSBU as cross-linker. The following two expression systems were used for cross-linking/MS analysis: HEK 293 cells, which were stably transfected with the human ROS-GC1 gene, and a tissue preparation of the outer segment of the rods from bovine eyes (ROS preparation) containing bovine ROS-GC1. Due to the high sample complexity, it was required to adapt existing workflows to analyze the ROS-GC1 cross-links without protein purification. The *in-solution* digestion procedure was optimized for the membrane-bound ROS-GC1 and two enrichment strategies were established for the identification of less abundant cross-linking products within the ROS-GC1: 1) The HEK 293 cell lysate containing human ROS-GC1 was first cross-linked and enzymatically digested afterwards. As next step, the cross-linked peptides were enriched by size exclusion chromatography. 2) The bovine ROS-GC1 from the ROS preparation was initially enriched using an immunoprecipitation assay (IP). The immobilized ROS-GC1 was cross-linked and the subsequent *in-solution* digestion was performed without eluting the ROS-GC1 from the beads. The cross-linking strategies resulted in the identification of 27 cross-links in human ROS-GC1 and 30 cross-links in bovine protein. The cross-linked amino acids in human and bovine ROS-GC1 were consistent or provided complementary information. Thus, the cross-links found independently in both ROS-GC1

## Summary

variants are in good agreement. Consequently, HEK 293 cells might be used as an alternative to native ROS preparations for more detailed structural investigation of the ROS-GC1.

Additionally, the enzymatic activities of both human and bovine ROS-GC1 were confirmed by MRM (multiple reaction monitoring) -MS. An absolute quantification strategy of the bovine ROS-GC1 in the bovine ROS preparations was provided by AQUA peptide approach.

The DSBU cross-links identified in the ROS-GC1-IcD served as distance constraints, which were employed for a subsequent molecular modeling of the bovine ROS-GC1. Suitable structures of homologous proteins for the modeling process were identified for aa 542-1066 (JMD-CTE) of the IcD, representing independent protein structures. Since no suited protein template structures were available for the *N*- (aa 493-541) and *C*-terminal (aa 1067-1110) regions of the IcD, a simplified domain organization and renaming of the IcD were proposed, namely kinase homology domain (KHD, aa S542-T806),  $\alpha$ -helical domain ( $\alpha$ HD, aa F807-T859), and catalytic domain (CD, aa Q860-G1066), based on previously determined homology models. The identified cross-links confirmed the dimeric structure of ROS-GC1 as well as the molecular hinge function of the  $\alpha$ HD, which is characterized by a helix-turn-helix motif. The  $\alpha$ HD connects the KHD and the CD giving flexibility to the structure and enabling various conformations. Therefore, the orientation and spatial proximity between KHD and CD can vary. In this thesis, a complete 3D-structural model of the ROS-GC1 is presented for the first time, together with the description of the IcD flexibility.

# 1 Einleitung

## 1.1 Biologische Aspekte

Für Vertebraten ist der Sehprozess von größter Bedeutung, da er für die visuelle Wahrnehmung der Umgebung verantwortlich ist und somit das Verhalten entscheidend beeinflusst [5]. Der Mensch besitzt die Fähigkeit, zwischen Farben und Lichtintensitäten zu differenzieren. Hierzu wird im Auge das einfallende Licht auf die Netzhaut (Retina) übertragen und dort fokussiert (siehe Abbildung 1A). Die ca. 0,2 mm dicke Retina, das zentrale Nervengewebe, besteht aus gestapelten Zellschichten. Die äußere Schicht bilden Photorezeptorzellen, die im retinalen Pigmentepithel (RPE) eingebettet und in Zapfen und Stäbchen untergliedert werden [6]. Die Zapfen (6 Mio.) nehmen Farb-, und die lichtsensitiveren Stäbchen (110 Mio.) Helligkeitsunterschiede wahr. Diese Lichtsignale werden über ein Netzwerk aus Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen an die Ganglienzellen weitergeleitet, welche die Informationen über den Sehnerv an das Gehirn senden (siehe Abbildung 1B) [7, 8].

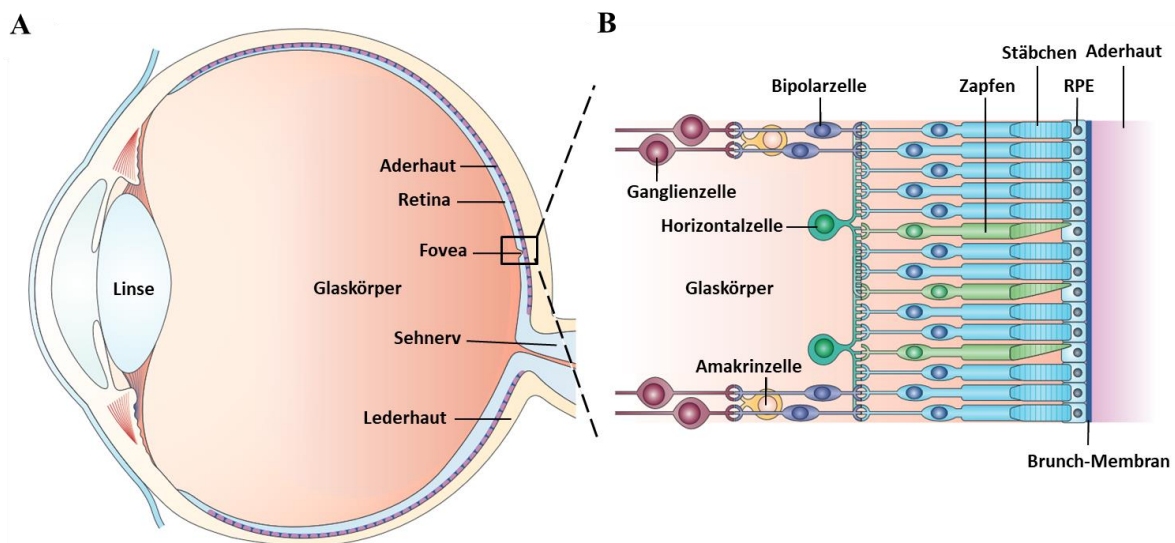
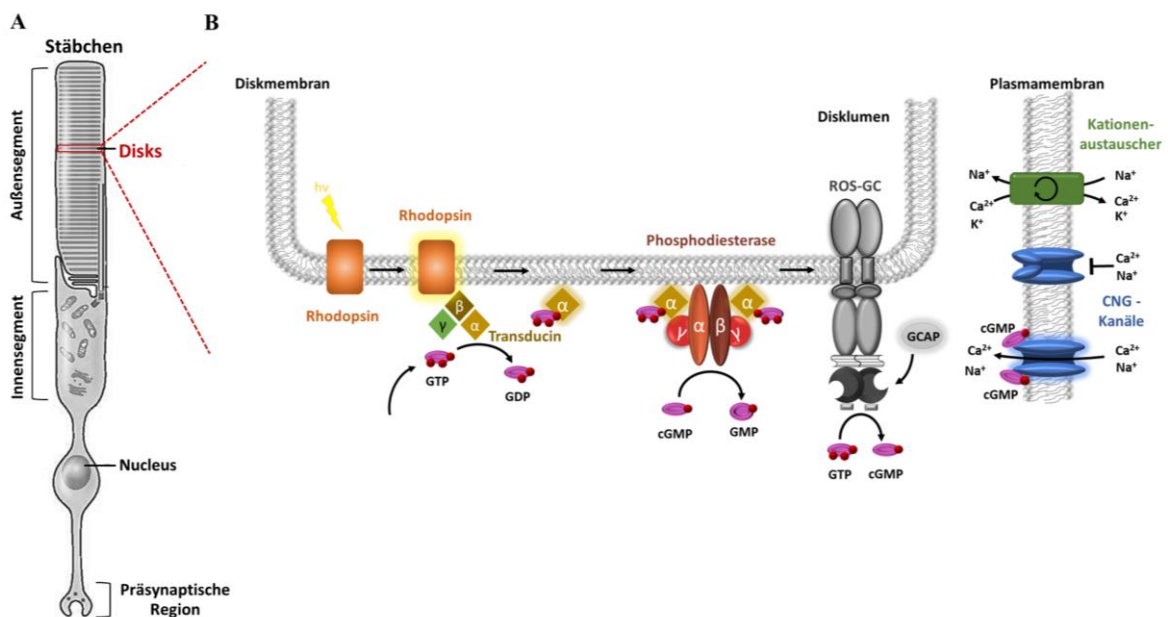


Abbildung 1: Querschnitt des Auges (A) und der Retina (B). Die Darstellung ist modifiziert nach Zhang et al. [9].

### 1.1.1 Phototransduktion in den Stäbchenrezeptorzellen

Bei der Phototransduktion erfolgt die Umwandlung einzelner Lichtphotonen in ein elektrisches Signal [10, 11] (siehe Abbildung 2). Dieser Prozess erfolgt in der Retina im Außensegment der Stäbchenrezeptorzellen (*rod outer segment, ROS*) [12]. Das Außensegment setzt sich aus einem doppelten, unabhängigen Membransystem zusammen. Hierbei sind die flachen Membranstapel, die auch als „Disk“ bezeichnet werden, von einer Plasmamembran umgeben [13]. Die Lichtsignale werden in der Diskmembran verarbeitet, sodass es zur Hyperpolarisation der Plasmamembran kommt und eine reduzierte Freisetzung von Transmittern in der präsynaptischen Region erfolgt. Somit wird das chemische Signal in eine elektrische Antwort umgewandelt, die an das Gehirn weitergeleitet werden kann [14]. Bei der Phototransduktion in den Stäbchenrezeptorzellen spielt das Sehpigment Rhodopsin, das sich aus dem Protein Opsin und dem lichtsensitiven Chromophor 11-*cis*-Retinal zusammensetzt, eine entscheidende Rolle. Durch die Absorption der Photonen geht dessen Chromophor in die *all-trans*-Konfiguration über, wodurch eine Konformationsänderung des Rhodopsins induziert und die Signalkaskade gestartet wird [15].



**Abbildung 2: Aufbau eines Photorezeptorstäbchens (A) und Signalkaskade der Phototransduktion (B).** A) Gliederung des Stäbchens in Außen-, Innensegment, Zellkörper mit Nucleus und präsynaptische Region. Abbildung modifiziert nach Veleri et al. [5]. B) Durch die Lichtaktivierung von Rhodopsin wird das Signal über Transducin an die Phosphodiesterase (PDE) weitergeleitet, was zunächst zu einer Reduktion der intrazellulären cGMP-Konzentration und anschließend zur Senkung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma führt. Um die cGMP-Konzentration des Ausgangszustandes wiederherzustellen, aktivieren die Calcium-abhängigen GCAP-Proteine ROS-GC. Die Abbildung ist erstellt nach Pugh Jr. und Lamb [16].



## Einleitung

In seinem angeregten Zustand kann Rhodopsin die Aktivierung des GTP-gebundenen Proteins Transducin katalysieren. Durch den Austausch von GDP zu GTP löst sich die  $\alpha$ -Untereinheit vom Transducin-Komplex ab und aktiviert die Phosphodiesterase (PDE) durch Bindung an deren  $\gamma$ -Untereinheit. Dies führt zur Hydrolyse von cGMP zu GMP, sodass die intrazelluläre cGMP-Konzentration sinkt [15, 17]. Folglich werden die cGMP-abhängigen Ionenkanäle (*cyclic nucleotide-gated ion channels*, CNG) geschlossen und der Einstrom an Kationen ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) gestoppt. Gleichzeitig werden über die Kationenaustauscher neben  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ - auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Zytoplasma transportiert. Es kommt zum Abfall der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wodurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von den Guanylatzyklase-aktivierenden Proteine 1 und 2 (*guanylyl cyclase-activating protein*, GCAP-1/-2) dissoziieren und diese aktiviert werden. In ihrem Calcium-freien Zustand aktivieren die GCAPs wiederum die Guanylatzyklase (*rod outer segment guanylyl cyclase*, ROS-GC) und die Synthese von cGMP wird gesteigert. Die cGMP-Konzentration erreicht erneut das Anfangsniveau, so dass der Ausgangszustand im Dunkeln wiederhergestellt ist und ein neuer Lichtreiz wahrgenommen werden kann [15, 16]. Zur Beendigung der Signalweiterleitung wird Rhodopsin durch die Phosphorylierung mithilfe der Rhodopsinkinase inaktiviert, sodass Rhodopsin Arrestin anstelle von Transducin bindet [15, 16, 18]. Als Folge der Deaktivierung zerfällt Rhodopsin in Opsin und all-*trans*-Retinal [19, 20]. Um die Lichtsensitivität von Rhodopsin wiederherzustellen, muss dieses mit einem regenerierten 11-*cis*-Retinal-Molekül beladen werden [20, 21].

### 1.1.2 Die retinale Guanylatzyklase

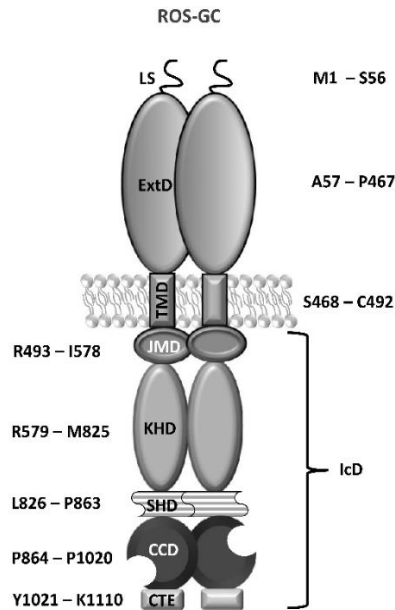
Die Guanylatzyklasen (*guanylyl cyclases*, GCs) kommen frei im Zytoplasma und in membrangebundener Form vor. Im Körper übernehmen sie entscheidende Funktionen bei regulatorischen Prozessen durch die Produktion des sekundären Botenstoffs cGMP aus GTP [22]. Die zytoplasmatischen GCs sind aktiv als Heterodimere und spielen als Stickstoffmonoxid (NO)-Sensoren eine wichtige Rolle, u. a. bei der Muskelkontraktion des Darms und der Blutgefäße sowie bei der Gehirnentwicklung [23]. Dagegen sind die membranständigen GCs als Homodimere aktiv. Diese Rezeptoren werden bei den Menschen in fünf Gruppen (GC-A bis GC-F) untergliedert. Die Typen GC-A/-B, auch als natriuretische Peptidrezeptoren (NPR)-A und -B bezeichnet, sind vor allem in kardiovaskulären Organen lokalisiert. Dagegen befindet sich die GC-C, der hitzestabile Enterotoxinrezeptor (*heat-stable enterotoxin receptor*, StaR), im Darmgewebe. Die retinalen Guanylatzyklasen 1 und 2 (ROS-GC1 und 2) werden als GC-E/-F klassifiziert. Im Gegensatz zu den ersten drei Peptidhormonrezeptoren werden ROS-GC1 und 2 im Außensegment der Stäbchen nicht extrazellulär durch Peptidbindung,

## Einleitung

sondern intrazellulär Calcium-abhängig reguliert [24, 25]. Im Stäbchenaußensegment (*rod outer segment*, ROS) von Mäusen konnte ein ROS-GC1/2-Verhältnis von 4:1 bestimmt werden [26]. In einer vorherigen Studie mit bovinen ROS-Präparationen wurde ein 25-facher höherer Überschuss von ROS-GC1 zu ROS-GC2 [27, 28] in der Membran ermittelt [29]. Somit liegt ROS-GC1 als dominante Isoform in den Stäbchen vor und stellt wahrscheinlich den entscheidenden ROS-GC-Typ für die Signalkaskade dar [30]. Die ROS-GC1 [31, 32] setzt sich aus einem extrazellulären (ExtD) sowie einem intrazellulären (IcD) Teil zusammen, die durch eine Transmembrandomäne (TMD) miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 3). Charakteristisch sind die beiden Hauptdomänen der IcD, die Kinase-ähnliche Domäne (Kinase-Homologie-Domäne, KHD) und die katalytische Domäne (CD) [32, 33]. Die CD umfasst die Kern-katalytische Domäne (CCD) mit C-terminaler Verlängerung (CTE) [34]. Strukturell ist die ROS-GC1 vergleichbar zu den anderen membranständigen Guanylatzyklasen aufgebaut [25]. Die Identität der KHD von ROS-GC1 zu den Peptidrezeptoren NPR-A, -B und StaR beträgt ~34 %, für die CD ~ 57 % [35].

Die weitere Untergliederung der ROS-GC1-IcD in ihre Subdomänen hat sich über die Jahre, wie folgt entwickelt [22]: Die N-terminale Region der KHD wird separat als Juxtamembrandomäne (JMD) betrachtet, da sie ausschließlich hochkonserviert in ROS-GC1 und 2 vorliegt und sich von den anderen membranständigen Guanylatzyklasen (NPR-A, NPR-B und StaR) unterscheidet [4, 36]. Mithilfe von Homologie- und Hydrophobizitätsanalysen konnte bei der ROS-GC1 eine Linker-Region zwischen KHD und CCD identifiziert werden, welche eine Sequenzhomologie von 71 % zur Dimerisierungsdomäne des NPR-A-Rezeptors aufweist [37, 38]. Sie kann eine *coiled-coil* Struktur [39] oder  $\alpha$ -helikale Struktur [40, 41] annehmen. Studien zeigen, dass diese Region eine entscheidende Rolle bei der Dimerisierung der ROS-GC1 sowie ihrer Regulation durch die GCAPs spielt [39, 42, 43]. Andere Ergebnisse weisen diesem Teil der IcD ausschließlich wichtige regulatorische Eigenschaften für den Signaltransfer zwischen KHD und CCD zu [40, 41]. Abhängig von ihrer Funktion wird diese Linker-Region als Dimerisierungsdomäne (DD) [37] oder als Signalhelixdomäne (SHD) [44, 45] bezeichnet. Der C-terminale Teil der ROS-GC1-IcD katalysiert die Umwandlung von GTP zu cGMP [46] und wird daher als CD definiert. Da die hydrophile C-terminale Verlängerung (CTE) [44] charakteristisch für die ROS-GC1 [37] und nicht notwendig für die katalytische Aktivität ist [34, 47], wird sie von der CCD abgegrenzt.

## Einleitung



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau der ROS-GC1.** LS: Leitsequenz, ExtD: extrazelluläre Domäne, TMD: Transmembrandomäne, JMD: Juxtamembrandomäne, KHD: Kinase-Homologie-Domäne, SHD: Signalhelixdomäne, CCD: Kernkatalytische Domäne, CTE: C-terminale Verlängerung, IcD: intrazelluläre Domäne. Die Darstellung ist modifiziert nach Duda et al. [34].

Verschiedene retinale Dysfunktionen und Krankheiten, wie die Lebersche kongenitale Amaurose (LCA1) und Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (*cone-rod-dystrophy*, CORD), stehen im Zusammenhang mit über 140 Mutationen im GUCY2D-Gen der humanen ROS-GC1 [1] und führen zur Beeinträchtigung des Sehvermögens oder sogar zur Erblindung [48, 49, 50, 51]. Beispielsweise resultiert die bovine LCA1-Mutation F514S, die der humanen F565S-Mutation entspricht [51], in einer geringeren Sensitivität für die GCAP-1-Regulation [52]. Mit CORD in Verbindung stehende Mutationen können vielfältige Auswirkungen auf die ROS-GC1-Aktivität haben, welche vom Aktivitätsverlust bis hin zur -steigerung reichen oder sich in einer veränderten Calciumsensitivität widerspiegeln [53]. So weist die CORD-Mutation R787C im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Basalaktivität auf, reagiert jedoch hyperaktiv auf die Regulierung durch GCAP-1 [54].

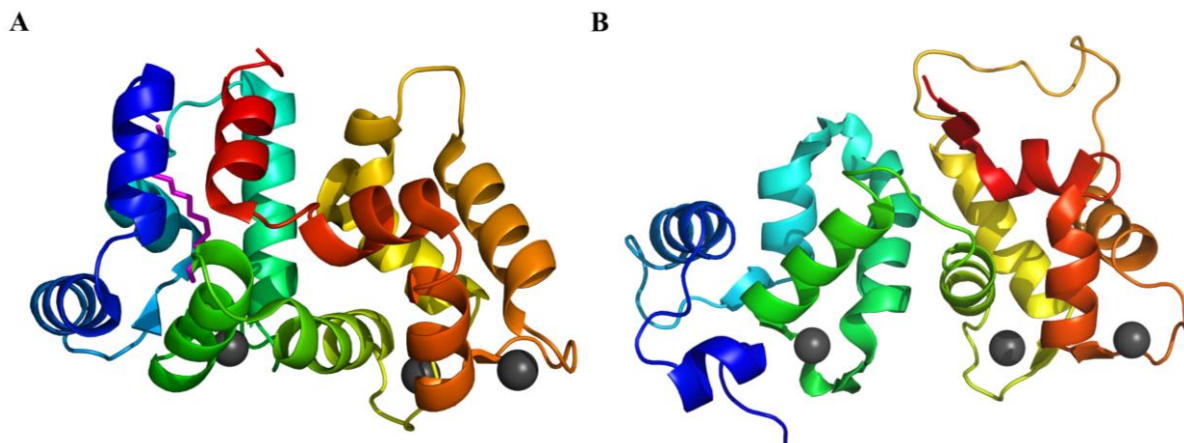
### 1.1.3 Guanylatzyklase-aktivierende Proteine 1 und 2

Die Guanylatzyklase-aktivierenden Proteine 1 und 2 (*guanylyl cyclase-activating proteins*, GCAP-1/-2) spielen eine wichtige Rolle bei der Calcium-abhängigen Regulation der ROS-GC1 und somit beim Anpassungsmechanismus der Stäbchen an unterschiedliche Lichtverhältnisse [22, 49]. Die ca. 24 kDa großen Proteine GCAP-1 und -2 gehören zur Familie der neuronalen Calcium-Sensorproteine (NCS) und besitzen vier charakteristische EF-Hände, die aus einer

## Einleitung

Helix-Loop-Helix-Struktur bestehen. Diese Aminosäuremotive ermöglichen die Bindung von Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [55, 56, 57]. Da bei den GCAPs die erste EF-Hand nicht funktional ist, können nur drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit unterschiedlichen Affinitäten im nanomolaren Bereich gebunden werden [58, 59]. Die Metallkoordination erfolgt über die Sauerstoffatome von sechs sauren Aminosäuren. Im Calcium-freien Zustand können die  $\text{Ca}^{2+}$ -Positionen durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen ersetzt werden [60]. GCAP-1 und -2 liegen in gleicher Konzentration von  $3 \mu\text{M}$  in der bovinen ROS vor [61] und besitzen eine *N*-terminale Myristoylierung, dessen Funktion bei den GCAPs nicht eindeutig geklärt ist [62, 63].

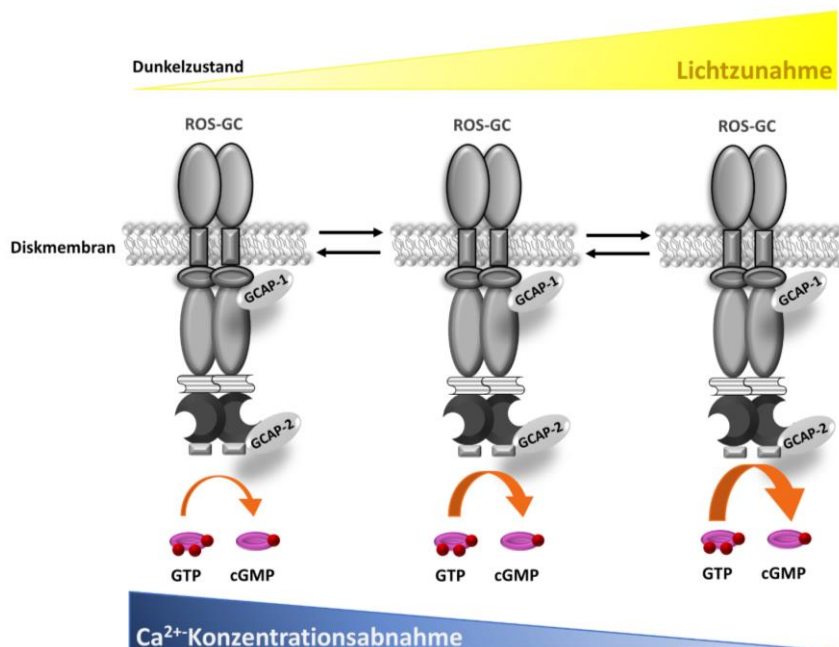
Hierzu zeigt Abbildung 4 die Röntgenkristallstruktur der myristoylierten GCAP-1-Variante (A) [64] und die NMR-Struktur des nicht myristoylierten GCAP-2 (B) [59] im Calcium-beladenen Zustand. Die GCAP-Proteine weisen vermutlich keinen klassischen, Calcium-abhängigen „*Myristoyl-Switch*“ auf, da die Myristinsäure Calcium-unabhängig im Proteininnern verborgen bleibt [65, 66]. Bei GCAP-1 hat die *N*-terminale Myristoylgruppe jedoch einen deutlichen Einfluss auf die Calciumsensitivität und ermöglicht erst eine vollständige ROS-GC1-Aktivierung. Im Vergleich zu GCAP-1 weist GCAP-2 ohne Myristoylierung nur geringfügige Unterschiede zu seiner myristoylierten Variante bei der ROS-GC1-Aktivierung sowie in der Affinitätsstärke zu ROS-GC1 auf [66, 67].



**Abbildung 4: GCAP-Strukturen im Calcium-beladenen Zustand.** A) *N*-terminal myristoyliertes GCAP-1 (PDB-Eintrag: 2R2I) [64]. Die Myristoylierung ist pink eingefärbt. B) GCAP-2 ohne *N*-terminale Myristoylierung (PDB-Eintrag: 1JBA) [59]. Die Struktur ist im Farbverlauf von blau (*N*-Terminus) nach rot (*C*-Terminus) eingefärbt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind als graue Kugeln dargestellt.

### 1.1.4 ROS-GC1/GCAP-Interaktion

Die ROS-GC1 bildet Calcium-unabhängig flexible Komplexe mit GCAP-1 und -2, welche Bindungsaffinitäten im hohen nanomolaren bis niederen mikromolaren Bereich aufweisen [18, 66, 68, 69]. Sinkt die intrazelluläre Calciumkonzentration durch die Lichtaktivierung der Signalkaskade von ~500 nM im Dunkelzustand auf ~50 nM [70], befinden sich die GCAPs in ihrem Calcium-freien Zustand und können die ROS-GC1 aktivieren. Wahrscheinlich erfolgt eine gestaffelte ROS-GC-Aktivierung, um einen möglichst großen dynamischen Bereich an Calciumkonzentrationen wahrnehmen zu können. Somit kann durch die Feinregulierung der ROS-GC1-Aktivität das Sehstäbchen an die jeweiligen Lichtverhältnisse angepasst werden. Zunächst geht GCAP-1 aufgrund seiner höheren Calciumsensitivität in den Calcium-freien, aktivierenden Zustand über, da die Aktivität von GCAP-1 bereits bei einer Calciumkonzentration von 700 – 1000 nM halbmaximal ist. Bei einer weiteren Senkung der zyttoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration erfolgt die Dissoziation der Calciumionen bei GCAP-2, da seine halb-maximale, aktivierende Wirkung auf ROS-GC1 bei 100 – 200 nM erreicht wird [61, 71] (siehe Abbildung 5). Im Detail ist der Regulationsmechanismus der ROS-GC1 durch die GCAP-Proteine noch nicht aufgeklärt, da die definierten Interaktionsflächen von GCAP-1/-2 mit ROS-GC1 nicht genau bekannt sind [2, 4, 72, 73, 74, 75].



**Abbildung 5: Regulation der ROS-GC1 durch GCAP-1 und -2.** Die zunehmende Lichteinstrahlung führt zu einer verstärkten Reduktion der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, sodass die GCAPs im Calcium-freien Zustand vorliegen und die ROS-GC1 aktivieren. Es folgt eine vermehrte cGMP-Produktion von ROS-GC1 bis zum erneuten Erreichen der cGMP-Konzentration im Dunkelzustand. Abbildung ist modifiziert nach Koch und Dell'Orco [71].

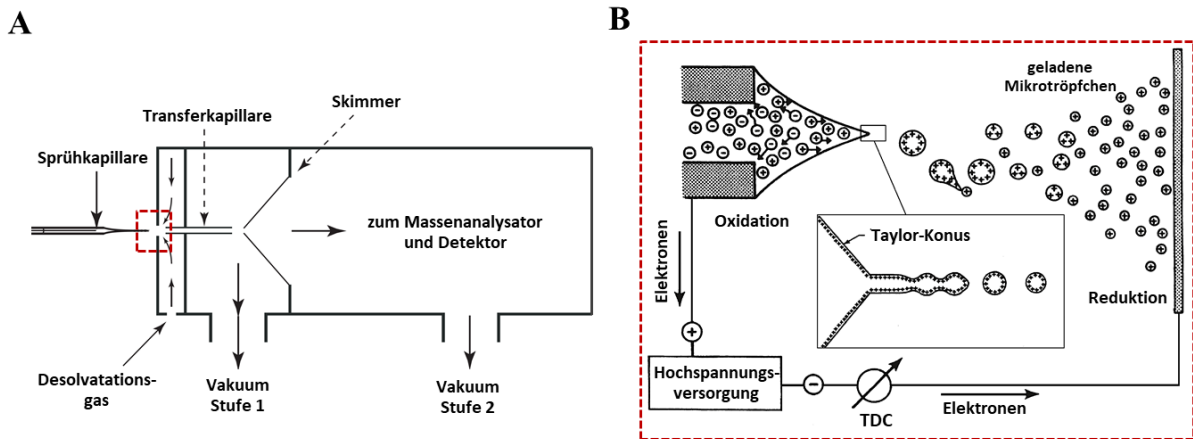
Studien deuten darauf hin, dass beide GCAPs die gleiche Binderegion in der KHD der ROS-GC1 aufweisen und somit um die Bindung konkurrieren [72, 74]. Im Gegensatz hierzu zeigten andere Studien, dass die JMD/KHD nur die Bindestelle von GCAP-1 darstellt, während GCAP-2 mit der C-terminalen Region der katalytischen Domäne interagiert [2, 4, 68].

### 1.2 Massenspektrometrische Grundlagen

Die Massenspektrometrie (MS) stellt eine analytische Methode dar, die zur Identifizierung chemischer Verbindungen anhand ihrer Atom- oder Molekülmassen genutzt wird. Die MS wird nicht nur in der naturwissenschaftlichen Grundlagenforschung, sondern auch in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik sowie der Qualitätskontrolle eingesetzt [76]. Zur Gewinnung von Informationen über die Masse der zu analysierenden Substanzen wird das folgende Prinzip angewendet: Es werden Ionen generiert, die nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) getrennt und anschließend anhand des  $m/z$ -Verhältnisses detektiert werden. Hierzu wird ein Massenspektrometer verwendet, das sich aus drei Hauptkomponenten, der Ionenquelle, dem Massenanalysator und dem Detektor zusammensetzt [76]. Mit der Entwicklung sogenannter „sanfter“ Ionisationsmethoden, welche die intakte Überführung von Biomolekülen in die Gasphase ermöglichen, konnten auch massenspektrometrische Analysen von Proteinen und Peptiden unter Hochvakuum erfolgen [77]. Hierbei waren die entscheidenden Techniken die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (*matrix-assisted laser desorption/ionisation*, MALDI) [78] sowie die Elektrospray-Ionisation (*electrospray ionisation*, ESI) [79]. Für die anschließende Trennung der Ionen nach ihren  $m/z$ -Werten steht eine Vielzahl an Massenanalysatoren zur Verfügung, die auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien beruhen. Beispiele sind die Ionenfalle, der Flugzeit- (*Time-Of-Flight*, TOF), der Quadrupol-, der Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz- (FT-ICR) sowie der Orbitrap-Analysator [76]. Im Folgenden werden die Ionisationsmethoden und Analysatoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, im Detail beschrieben.

#### 1.2.1 Elektrospray als Ionisationsprozess

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) ermöglicht unter Atmosphärendruck den Eintritt nicht-flüchtiger, in Lösung befindlicher Makromoleküle in die Gasphase. Anschließend kann der ionisierte Analyt unversehrt und schonend durch eine schrittweise Senkung des Drucks in das Massenspektrometer überführt werden (siehe Abbildung 6A).



**Abbildung 6: Elektrospray-Ionisation (ESI).** A) Schematische Darstellung einer ESI-Quelle [79]. Die Analytlösung wird mittels Kapillare in ein elektrisches Feld versprüht. Nach Verdampfung des Lösungsmittels werden Ionen in zwei Stufen mithilfe der Transferkapillare und dem Skimmer in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers überführt. Modifiziert nach Kebarle und Verkerk [80]. B) Desolvatisierungsprozess der Ionen [81]. Durch Anlegung einer Spannung entsteht an der Kapillarspitze ein Taylor-Konus, aus dem geladene Tröpfchen und nachfolgend wiederum Mikrotröpfchen freigesetzt werden. Entnommen aus [76].

Daher findet dieses Verfahren besonders häufig Anwendung im Bereich der Bioanalytik. Die Grundlage zur Etablierung des ESI-Prozesses wurde von Fenn [79], aufbauend auf den Erkenntnissen von Dole [82], gelegt. Durch Anlegen eines positiven Potentials an die Kapillarspitze fungiert diese als Anode und der Einlass des Massenspektrometers als Kathode. Aufgrund der bestehenden Potentialdifferenz werden die Ladungen in der Probenlösung getrennt. An der Kapillarspitze erfolgt die Anreicherung positiver Ladungen in der Lösung, wodurch dort ein sogenannter „Taylor-Konus“ generiert wird (siehe Abbildung 6B) [83, 84], aus dem positiv geladene Analytionen freigesetzt werden. Durch die elektrostatischen Abstoßungen entsteht ein Aerosol geladener Tröpfchen, das sogenannte Elektrospray, aus dem kontinuierlich die Flüssigkeit bis zum Erreichen der Gegenelektrode verdampft [76].

Durch die Desolvatisierung erhöht sich die Ladungsdichte an der Oberfläche der Tröpfchen, bis das sogenannte Rayleigh-Limit erreicht ist. Überschreitet die Coulomb-Abstoßung die Oberflächenspannung erneut, erfolgt die Freisetzung weiterer Tröpfchen [85]. Die Abtrennung kleinerer Tröpfchen resultiert aus der *Droplet Jet Fission* und beruht auf der Deformation der Tröpfchen. Somit wird eine lokale Steigerung der Ladungsdichte am verjüngten Ende des Tröpfchens hervorgerufen, die den Austritt von Mikrotröpfchen ermöglicht [86]. Die vollständige Freisetzung der Ionen kann durch das Entgegenleiten von Stickstoff als Desolvationsgas unterstützt werden [80]. Für diesen Prozess existieren zwei Modelle: Das

Modell des geladenen Rückstands (CRM, *charged residue model*) [82, 87] und der Ionenverdampfung (IEM, *ion evaporation model*) [88, 89]. Bei dem CRM besteht die Annahme, dass nach kontinuierlicher Entfernung des Lösungsmittels das Nanotröpfchen am Ende nur aus einem Analyt ion besteht. Diesem Ion wird die Ladung vollständig übertragen. Dagegen beruht das IEM darauf, dass Ionen direkt von der Oberfläche der geladenen Mikrotöpfchen austreten. Beide Modelle stehen weiterhin zur Diskussion, jedoch lässt sich das CRM wahrscheinlich bei größeren, IEM bei kleineren Molekülen anwenden [90].

### 1.2.2 Massenanalytoren

#### 1.2.2.1 Flugzeitanalysator

Der Flugzeitanalysator (*Time-Of-Flight*, TOF) entstand durch die Entwicklung von Stephens in den 1950er Jahren und ermöglicht die Auftrennung von Ionen nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis anhand der benötigten Flugzeit einer feldfreien Strecke [76]. Durch Anlegen einer Spannung werden die ionisierten Analyten in einem elektrischen Feld beschleunigt, so dass die potentielle Energie ( $E_{pot}$ ) der Ionen in eine spezifische, kinetische Energie ( $E_{kin}$ ) umgewandelt wird (Gleichung 1). Die Ionen mit einer geringeren Masse benötigen nach Eintritt in das feldfreie Flugrohr eine kürzere Zeit bis zum Erreichen des Detektors (Gleichung 2) [91]. Die Analyse liegt dem in Gleichung 3 beschriebenen, physikalischen Prinzip zur Grunde, das sich aus der angelegten Beschleunigungsspannung  $U$ , der Elementarladung  $e$ , der Ladungszahl  $z$ , der Flugstrecke  $s$ , der benötigten Zeit für die Flugstrecke  $t$ , der Geschwindigkeit  $v$  und der Masse des Ions  $m_i$  zusammensetzt [76].

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

$$t = \frac{s}{v} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$\frac{m_i}{z} = \frac{2eUt^2}{s^2} \quad (\text{Gleichung 3})$$

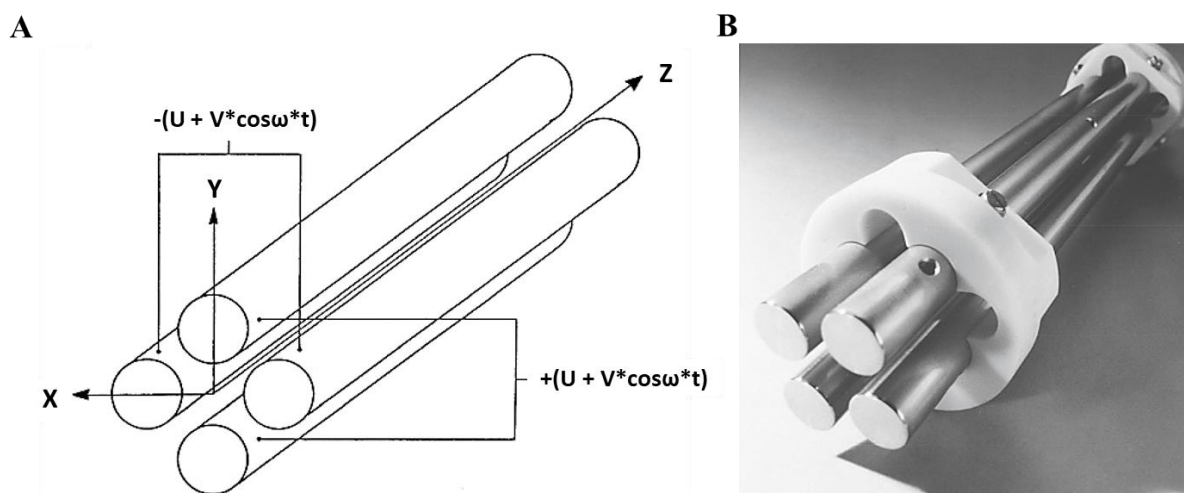
Neben linearen TOF-Massenspektrometern, bei denen die Flugstrecke zum Detektor gradlinig angeordnet ist, können TOF-Instrumente auch ein Reflektron aufweisen, das einen Richtungswechsel der Ionen hervorruft [92]. Ein Reflektron besteht aus einem Stapel ringförmiger Elektroden und stellt einen Ionenspiegel dar. Die Ionen dringen in Abhängigkeit ihrer kinetischen Energie unterschiedlich tief in das elektrische Feld ein und werden anschließend reflektiert. Hierdurch können Ionen gleicher  $m/z$ -Werte fokussiert werden. Durch diese Kompensation von möglichen Energie- und Geschwindigkeitsunterschieden erreichen



gleiche Ionenspezies zur selben Zeit den Detektor, so dass durch die Verwendung eines Reflektrons die Auflösung erhöht werden kann [93, 94].

### 1.2.2.2 Quadrupol-Massenanalysator

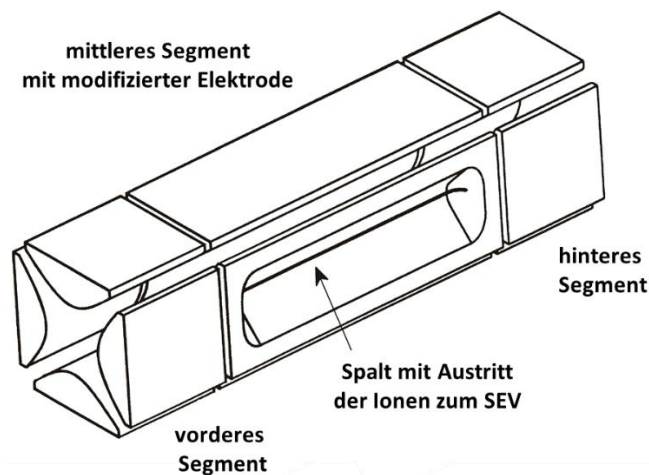
Lineare Quadrupol-Analysatoren finden in der Massenspektrometrie in der Funktion als Massenfilter sowie für den zielgerichteten Ionentransfer Anwendung. Ein Quadrupol setzt sich aus vier hyperbolischen oder zylindrischen Stabelektroden zusammen, die in einer quadratischen Anordnung aufgebaut sind (siehe Abbildung 7) [76]. Die gegenüber angeordneten Elektrodenpaare weisen das gleiche Potential auf, das sich jeweils aus einer Komponente von Gleich- und Wechselstrom zusammensetzt. Das angelegte Potential ist auf Ionen mit einem spezifischen  $m/z$ -Wert abgestimmt, so dass ausschließlich diese Ionenspezies den Quadrupol in  $z$ -Richtung durchqueren. Hierbei schwingen die Ionen auch in  $x$ - und  $y$ -Richtung, da sich das Vorzeichen der Spannung periodisch ändert und somit im Wechsel anziehende und abstoßende Kräfte von den Stäben auf die Ionen wirken. Wird auf den Gleichstrom verzichtet und nur die Wechselstromkomponente eingestellt, kann der Quadrupol als Ionentransferoptik verwendet werden. Folglich kann der vollständige Ionenstrom den Quadrupol passieren. In diesem Fall ist die Bezeichnung RF-Quadrupol (Radiofrequenz) weit verbreitet [95].



**Abbildung 7: Aufbau eines linearen Quadrupols.** A) Schematische Darstellung der Anordnung von vier Stabelektroden zu einem Quadrupol. Gegenüberliegende Elektroden weisen jeweils gleiche Potentiale auf.  $U$ = Gleichspannung,  $V$ = Wechselspannung. B) Foto eines Quadrupols. Entnommen aus [76].

## 1.2.2.3 Lineare Ionenfalle

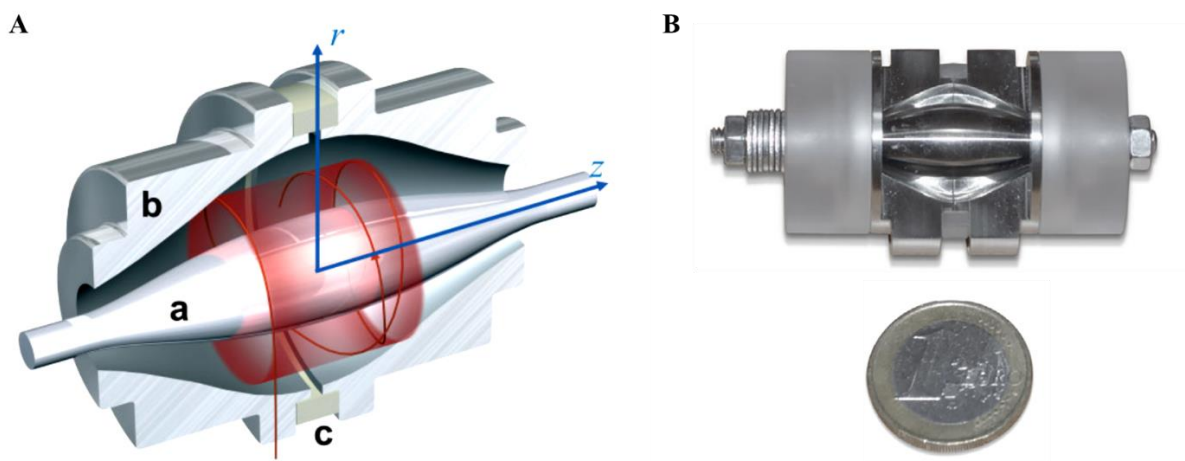
Die lineare (Quadrupol-) Ionenfalle (*linear ion trap*, LIT) besteht aus vier hyperbolischen Stabelektroden. Jede Elektrode ist wiederum in drei Segmente unterteilt (siehe Abbildung 8) [76, 96]. Der Eintritt der Ionen in das RF-Feld des Quadrupols wird durch ein niedriges Potential ermöglicht. Anschließend haben die beiden äußeren Segmente die Funktion, den direkten Wiederaustritt der Ionen zu unterbinden. Hierzu wird zusätzlich eine Gleichspannung an den Endsegmenten angelegt, die in einem höheren Potential resultiert [97]. Somit erfolgt im mittleren Segment die Ionenspeicherung, die durch die Stoßkühlung eines Inertgases unterstützt wird. Anschließend können die Ionenspezies mit einem bestimmten  $m/z$ -Wert in axiale Richtung über das hintere Segment oder radial über den Austrittsspalt im mittleren Segment austreten. Für den axialen Auswurf wird eine weitere Wechselspannung an den Endsegmenten angelegt, welche die gleiche Frequenz wie das auszuwerfende Ion aufweisen muss [98]. Ebenfalls ist bei dem radialen Auswurf eine zusätzliche Wechselspannung beim Mittelsegment notwendig. Der massenselektive Ionenaustritt über den Spalt wird über einen Sekundärelektronenvervielfältiger (SEV) detektiert [96].



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung einer linearen Ionenfalle. Die Ionenfalle besteht aus einem vorderen, mittleren und hinteren Segment. Die Modifizierung des mittleren Segments ermöglicht den radialen Ionenaustritt zum Detektor. Entnommen aus [76].

### 1.2.2.4 Orbitrap

Bei dem Orbitrap-Massenanalysator handelt es sich um eine Ionenfalle, die die Ionen mithilfe eines elektrostatischen Feldes speichert und analysieren kann [76]. Makarov entwickelte die Orbitrap [99], deren Funktionsprinzip erstmalig 1923 als Kingdon-Falle bekannt [100] und später durch Knight optimiert wurde [101]. Die Orbitrap besteht aus einer zentralen, spindelförmigen Elektrode, die von einer fassförmigen Außenelektrode umgeben ist. Die Gliederung der Außenelektrode in zwei Hälften erfolgt in der Mitte durch einen Keramikring, von dem der Radius der Elektrode zu den beiden äußeren Enden abnimmt (siehe Abbildung 9A) [102]. Der sogenannte *High-field* Orbitrap-Massenanalysator ist kleiner als die ältere Standard-Orbitrap, weist jedoch einen größeren Durchmesser der Innenelektrode auf (siehe Abbildung 9B). Mit dieser Entwicklung war es möglich, ein höheres Potential bis zu 5 kV anzulegen und somit eine vergleichbare Auflösung und Massengenauigkeit wie für ICR-Massenanalysatoren zu erzielen [103]. Zur Injektion der Ionen in die Orbitrap wird ein gekrümmter RF-Quadrupol (*curved trap, C-Trap*) verwendet [104], in dem die Ionen durch Stoßkühlung zentral akkumuliert und mithilfe eines Spannungspulses tangential und seitlich zur Mitte der Zentralelektrode in das quadrologarithmische Feld der Orbitrap gestoßen werden. Dadurch weisen die Ionen neben der Rotation um die Zentralelektrode auch eine Schwingung entlang der z-Achse auf. Die Oszillation der Ionen erfolgt auf stabilen Kreislaufbahnen, wodurch die Induktion eines Bildstroms in den Außenelektroden der Orbitrap hervorgerufen wird.



**Abbildung 9: Orbitrap-Massenanalysator.** A) Schematischer Querschnitt eines Orbitrap-Analysators. a: Spindelförmige Zentralelektrode, b: Außenelektrode und c: Keramikring zwischen den beiden Außenelektrodenhälften. Entnommen aus [102]. B) Foto eines High-field Orbitrap-Analysators. Größenvergleich mit einer 1-Euro-Münze. Entnommen aus [105].

## Einleitung

Die Detektion der Ionen anhand ihrer Schwingungsfrequenz  $\omega_z$ , die umgekehrt proportional zur Quadratwurzel des Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m_i/q$ ) eines Ions unter Einbeziehung der Gerätekonstante  $k$  ist, wird so möglich (Gleichung 4). Unter Verwendung dieses physikalischen Zusammenhangs lassen sich aus den generierten Bildstromsignalen durch die schnelle Fourier-Transformation die  $m/z$ -Werte der Ionen ermitteln [76, 99, 106].

$$\omega_z = \sqrt{k \times \left(\frac{q}{m_i}\right)} \quad (\text{Gleichung 4})$$

### 1.2.3 Verwendete Massenspektrometer

Massenspektrometer, welche aus einer Kombination verschiedener Massenanalytoren bestehen, werden als Hybridmassenspektrometer bezeichnet. Diese Geräte ermöglichen die sogenannte Tandem-Massenspektrometrie (Tandem-MS oder MS/MS), die auf einer zweistufigen Analyse der Analytione basiert [76]. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer im Detail beschrieben.

#### 1.2.3.1 Orbitrap-Hybridmassenspektrometer

Als Orbitrap-Hybridmassenspektrometer wurden die Geräte Orbitrap Fusion Tribrid [107] und Q Exactive Plus [108] des Herstellers Thermo Fisher Scientific eingesetzt (siehe Abbildung 10). Die Analytlösung wird mithilfe einer Nano-ESI-Quelle ionisiert und nachfolgend über die *S-Lens* als Ionentrichter in das Massenspektrometer überführt. Die nachgeschaltete, gebogene Ionentransferoptik dient der Abtrennung von Neutralteilchen, bevor der Ionenstrom den Quadrupol-Massenfilter erreicht. Der Quadrupol im RF-Modus kann den gesamten Ionenstrom transferieren oder die Funktion eines Massenfilters einnehmen, wodurch ausgewählte Ionen mit einem spezifischen  $m/z$ -Verhältnis zum weiteren Transfer ausgewählt werden. Die Analyse kann im Orbitrap-Massenanalysator oder alternativ bei der Orbitrap Fusion auch in der linearen Ionenfalle erfolgen.

Die Fragmentierung der Ionen mittels HCD (*higher energy collision-induced dissociation*) findet bei der Orbitrap Fusion im *Ion-Routing-Multipole*, bei der Q Exactive in der Kollisionszelle statt. Anschließend werden die Fragmentionen über die *C-Trap* in die Orbitrap geleitet. Bei der Orbitrap Fusion ist zusätzlich eine Fragmentierung durch ETD (*electron transfer dissociation*) über das Reaktandgas Fluoranthren sowie CID (*collision-induced dissociation*) in der Hochdruckzelle der linearen Ionenfalle möglich. Die anschließende Detektion erfolgt in der Niederdruckzelle der linearen Ionenfalle oder in der Orbitrap.

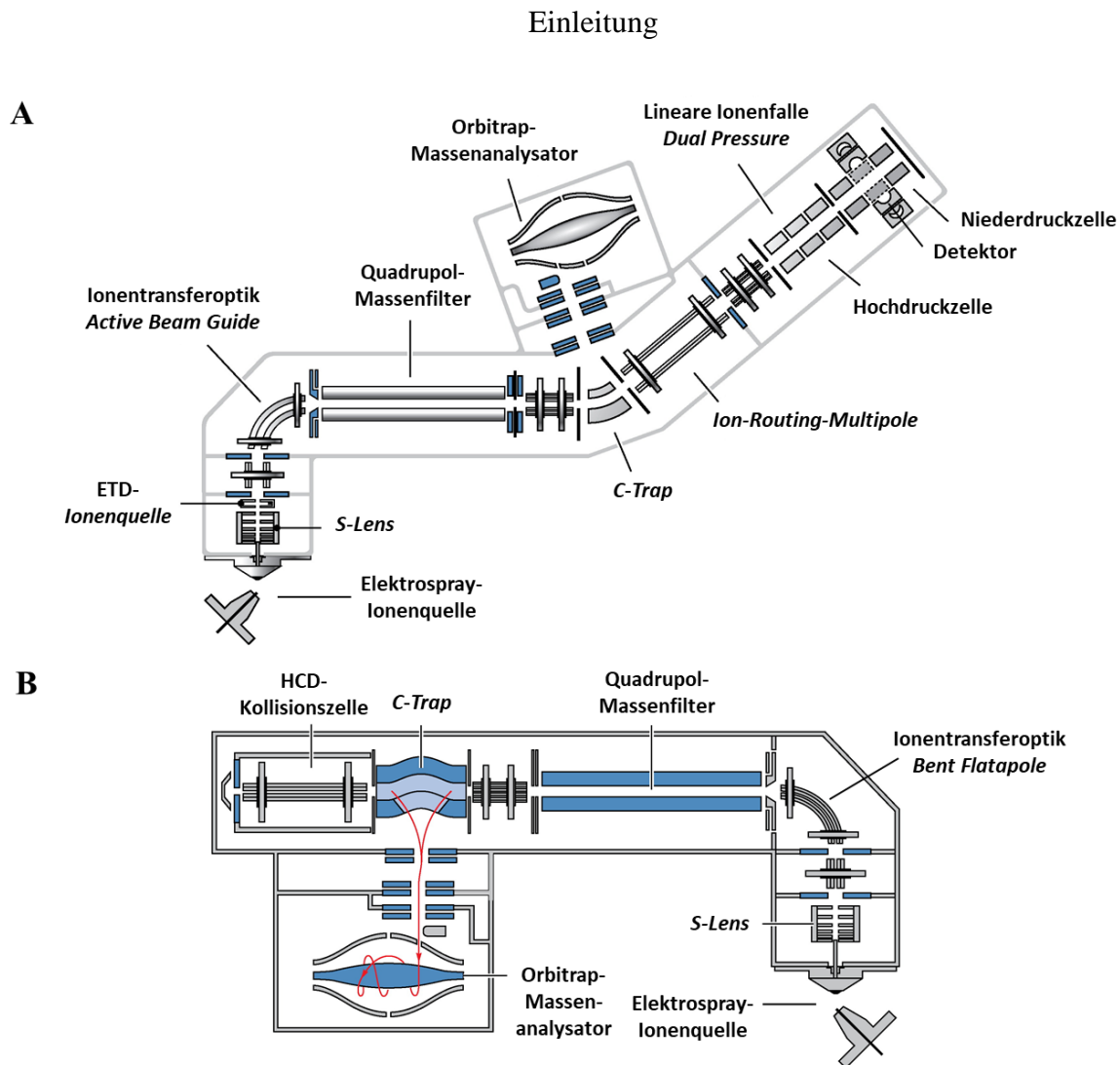


Abbildung 10: Verwendete Orbitrap-Hybridmassenspektrometer. A) Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer. B) Q Exactive Plus-Massenspektrometer. Entnommen aus [109] und beschriftet mithilfe von [www.planetorbitrap.com](http://www.planetorbitrap.com).

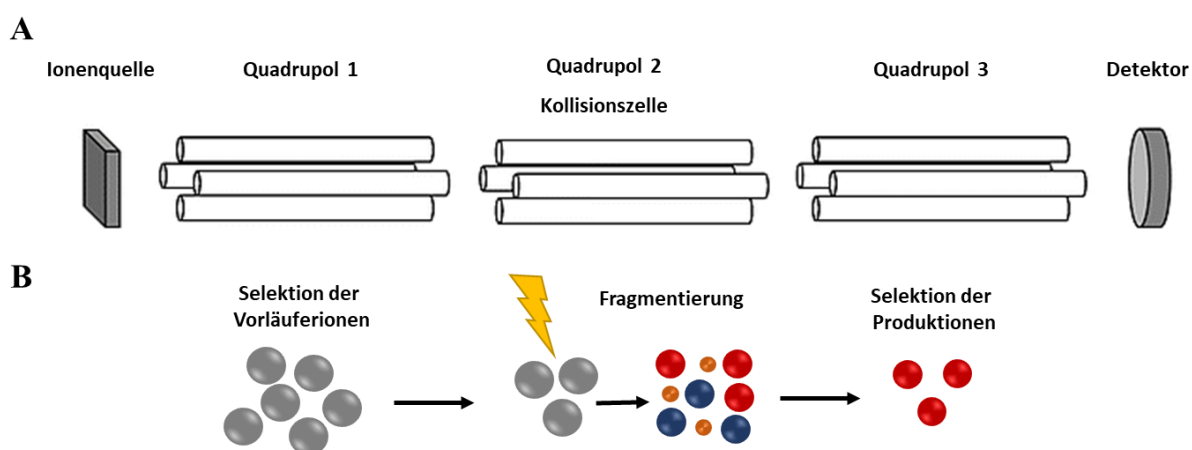
### 1.2.3.2 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer

Ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer setzt sich dem Namen nach aus drei Quadrupolen, die in Reihe geschaltet sind, zusammen (siehe Abbildung 11A). Der erste Quadrupol (Q1) kann als selektiver Massenfilter für bestimmte Ionen dienen oder im RF-Modus den gesamten  $m/z$ -Bereich transferieren. Der zweite Quadrupol (Q2) ist mit einem Kollisionsgas gefüllt und übernimmt im RF-Modus die Funktion einer Kollisionszelle, so dass die im Q1 selektierten Ionen mittels CID fragmentiert werden können. Alternativ werden als Q2 auch Hexa- oder Oktapole aufgrund ihres effektiveren Ionentransfers eingesetzt [76, 110]. Abschließend werden im dritten Quadrupol (Q3) alle Fragmentationen zum Detektor weitergeleitet oder nur eine bestimmte Ionenspezies mit einem definierten  $m/z$ -Wert für die Analyse selektiert [111]. Die Entwicklung erster Triple-Quadrupol-Massenspektrometer diente dem Einsatz von Experimenten zur Photodissoziation von Ionen [112]. Ende der 1970er Jahre analysierten Yost und Enke mit dieser Technik Zusammensetzungen von Probenmischungen, so dass der

## Einleitung

Anwendungsbereich auf die analytische Chemie erweitert wurde [113, 114, 115]. Heute spielen diese Geräte eine entscheidende Rolle bei der Quantifizierung, da sie die Möglichkeit zur Verwendung verschiedener Scan-Modi aufweisen [114]. In dieser Arbeit wurde der MRM-Modus (*multiple reaction monitoring*) an einem Xevo TQD-Gerät von Waters verwendet. Bei dieser Scan-Technik ist die Quantifizierung verschiedener Verbindungen in einer komplexen Probe möglich.

Im MRM-Modus wird das Passieren des Q1 ausschließlich Vorläuferionen mit spezifischen  $m/z$ -Werten erlaubt, sodass nur diese zur Fragmentierung in der Kollisionszelle ausgewählt werden. Im Q3 erfolgt dann eine Selektion ausgewählter Produktionen mit einem definiertem  $m/z$ -Verhältnis, die zum Detektor geleitet werden (siehe Abbildung 11B) [111]. Um die Effektivität der Scan-Events durch eine reduzierte Zeit für den Ionentransfer innerhalb des Massenspektrometers zu steigern, wird als Kollisionszelle beim verwendeten Xevo TQD-Gerät eine sogenannte Traveling-Wave-Ionentransferoptik (*traveling wave ion guides, TWIGs*) eingesetzt [76, 116]. Diese besteht aus paarweise aneinander gereihten Ringelektroden, bei denen eine RF-Spannung mit entgegengesetzten Vorzeichen zwischen benachbarten Elektrodenpaaren angelegt wird. Durch zusätzliche Gleichspannungspulse werden die Ionenpakete wellenartig in kürzester Zeit durch das TWIG-Element befördert. Durch die Q-TWIG-Q-Anordnung handelt es sich bei dem Xevo-Hybridgerät letztlich um ein Tandem-Quadrupol-Gerät.



**Abbildung 11: Triple-Quadrupol-Massenspektrometer.** A) Schematischer Aufbau. Entnommen aus [111]. B) Scan-Modus: Multiple Reaction Monitoring (MRM). Selektierte Vorläuferionen mit einem spezifischen  $m/z$ -Wert sind als graue Kugeln dargestellt. Diese werden anschließend im zweiten Quadrupol fragmentiert. Die entstandenen Produktionen sind als blaue, orange und rote Kugeln dargestellt. Im dritten Quadrupol wird nach Produktionen mit einem spezifischen  $m/z$ -Wert gescannt, die als rote Kugeln abgebildet sind.

### 1.2.3.3 Q-TOF-Massenspektrometer

Bei einem Q-TOF-Massenspektrometer handelt es sich um ein Hybridgerät, das aus einem Quadrupol-Massenfilter, einer Kollisionszelle und einem orthogonalen TOF-Analysator, also einem Flugzeitanalysator [117] (siehe Abbildung 12). In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Q-TOF-Massenspektrometer verwendet: Das *High-Mass* Q-TOF 2 von Micromass/MS Vision, das zur Charakterisierung nativer Proteine zum Einsatz kam [118] und das timsTOF-Pro-Massenspektrometer des Herstellers Bruker Daltonik [119, 120]. Mit dem Q-TOF 2-Massenspektrometer wurden die Funktionalität sowie die Stöchiometrie von Proteinkomplexen analysiert. Ein manuell kontrollierbares Drucksystem in der Z-Spray-ESI-Ionenquelle und der Kollisionszelle sowie die Reduktion der Quadrupolfrequenz auf 300 kHz ermöglichten den Transfer und die Analyse von Makromolekülen mit einem maximalen  $m/z$ -Wert von 30.000. Entscheidend dabei ist, die Energie der Ionen durch Kühlung zu verringern, sodass ein stabiler Ionenstrom durch die Transferoptik gewährleistet werden kann. In den TOF-Analysator werden die Ionen zur Analyse über einen *Pusher* senkrecht zum Eintrittswinkel mittels elektrischer Pulse eingeführt. Die Detektion erfolgt durch Multikanalplatten (*multichannel plates*, MCPs).

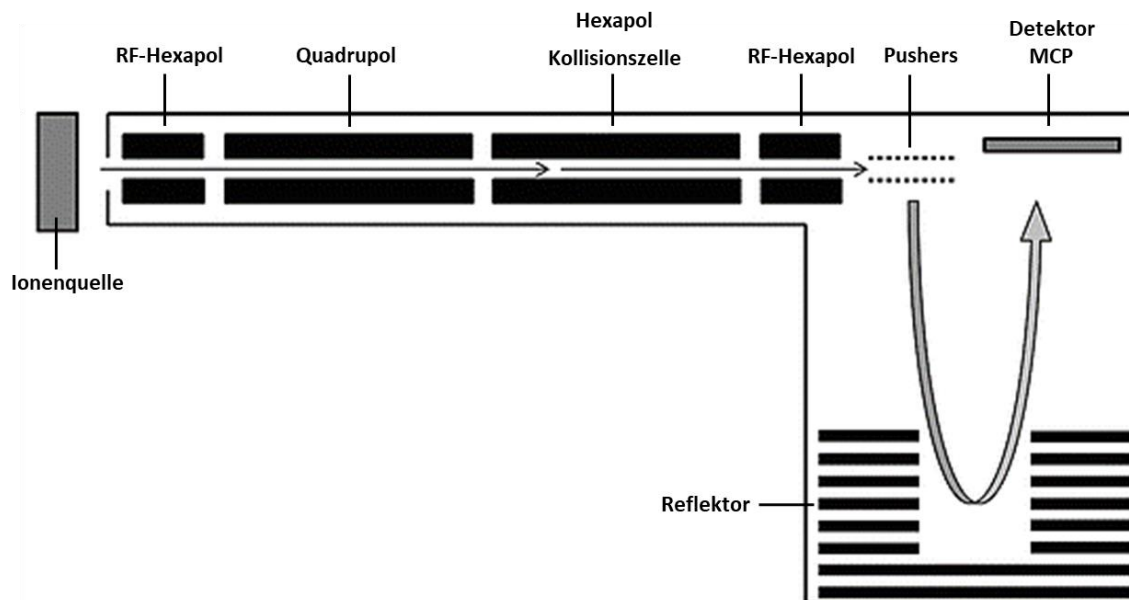


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Q-TOF-Massenspektrometers. Entnommen aus [111] und modifiziert nach Morris et al. [117].



Das timsTOF-Pro-Massenspektrometer von Bruker Daltonik [119, 120] wurde zur Proteinquantifizierung in komplexen Proben verwendet. Es weist einen vergleichbaren Aufbau auf, jedoch mit einer weiteren Hauptkomponente. Dem Quadrupol ist ein TIMS (*trapped ion mobility spectrometry*)-Analysator vorgeschaltet [121]. Eine zusätzliche Ionentrennung mithilfe der TIMS-Einheit wurde für die Experimente in dieser Arbeit nicht benötigt. Vergleichbar zum Triple-Quadrupol-Massenspektrometer wurde dieses Instrument im *pseudo*-MRM-Modus betrieben, wodurch ein MS/MS-Spektrum von allen entstandenen Fragmentionen aufgezeichnet und nicht nur ein spezifisches Fragmention analysiert wurde (siehe 1.2.3.2). Hierbei wurde anstelle des dritten Quadrupols der TOF-Analysator verwendet, sodass eine Massenauflösung von mehr als 35.000 möglich war [120].

#### 1.2.4 Fragmentierungstechniken

Um Informationen über die Zusammensetzung der zu analysierenden Probe oder die Struktur der enthaltenen Substanzen zu gewinnen, können verschiedene Fragmentierungstechniken eingesetzt werden. Hierfür kann die kollisionsinduzierte Fragmentierung (*collision-induced dissociation*, CID) in der linearen Ionenfalle oder einer Kollisionszelle erfolgen [122, 123]. Für die CID-Fragmentierung wird ein Potential angelegt, um die Analytione zu beschleunigen. So werden Kollisionen zwischen diesen Ionen und dem zugeführten, inerten Stoßgas, wie z.B. Stickstoff, Helium oder Argon, herbeigeführt. Diese Zusammenstöße können den Bruch der schwächsten Bindung im Molekül auslösen. Bei den Peptiden handelt es sich dabei um die Amidbindung zwischen einem Carbonyl-Kohlenstoffatom und dem folgenden Stickstoffatom. Befindet sich die Ladung am *N*- oder *C*-terminalen Fragment, können *b*- oder *y*-Ionen detektiert werden (siehe Abbildung 13).

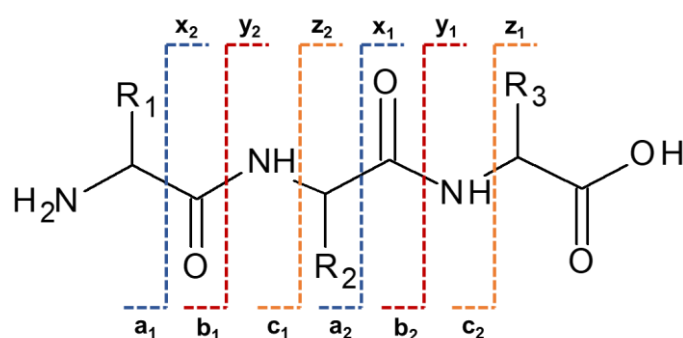


Abbildung 13: Nomenklatur der Peptidfragmentierung nach Roepstorff, Fohlmann und Biemann. Je nach Wahl der Fragmentierungstechnik werden *N*-terminal *a*-, *b*- oder *c*-Ionen und *C*-terminal *x*-, *y*- oder *z*-Ionen generiert [124, 125].



## Einleitung

Die kollisionsinduzierte Dissoziation unter Einsatz höherer Energie ermöglicht durch Verwendung einer Radiofrequenz (*higher energy collision-induced dissociation*, HCD) eine Steigerung der Fragmentierungseffektivität [126]. Bei dieser Fragmentierungsmethode können a-, b- und y-Ionen entstehen. Zusätzlich besteht bei dem Orbitrap Fusion-Massenspektrometer die Möglichkeit, die Peptidfragmentierung durch Elektronentransferdissoziation (*electron transfer dissociation*, ETD) zu induzieren [127]. Dazu werden in der linearen Ionenfalle zu den positiv geladenen Peptiden generierte Fluoranthren-Radikalanionen aus der ETD-Quelle im Einlassbereich geleitet, so dass die Übertragung eines niederenergetischen Elektrons auf das Peptidion ermöglicht wird. Es kommt zur Spaltung des Peptidrückrates zwischen dem Amidstickstoff und dem darauffolgenden C $\alpha$ -Atom in c- und z-Ionen (siehe Abbildung 13).

### 1.2.5 Strategien zur Proteinquantifizierung

Um Proteinsysteme und dynamische Signalprozesse in lebenden Zellen zu analysieren, ist die Bestimmung von Proteinkonzentrationen und posttranslationaler Modifikationen (PTMs) unter möglichst nativen Bedingungen von großer Bedeutung. Um die Genexpressionslevel von Proteinen in komplexen, biologischen Systemen zu ermitteln, wurden in der MS-basierten Proteomik verschiedene Messprinzipien zur Quantifizierung entwickelt [128]. Hierbei wird eine Gliederung der Quantifizierungsart in mit (*label*) und ohne Markierung (*label-free*) vollzogen. Bei der markierungsfreien Quantifizierung ermöglicht die Anzahl der identifizierten Peptide [129], die Gesamtanzahl aller identifizierten Peptidspektren (*peptide spectral matches*, PSMs) [130] oder die gemittelte Intensität aller Fragmentionenspektren der identifizierten Peptide [131] die Abschätzung der jeweiligen Proteinmengen in einer Probe. Für die relative Quantifizierung von Proteinen in Zellkulturen ist die stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren (*stable isotope-labeling using amino acids in cell culture*, SILAC) [132], die durch den metabolischen Einbau erfolgt, hilfreich. Alternativ kann mithilfe einer chemischen Markierung, wie z.B. einem isotopenmarkierten Affinitätstag (*Isobaric tags for absolute and relative quantification*, iTRAQ) [133], die Proteinmenge quantifiziert werden.

Seit 2003 hat sich die sogenannte AQUA-Peptid-Strategie (*absolute quantification*, AQUA) für die absolute Proteinquantifizierung etabliert [134, 135]. Hierzu werden synthetisierte Peptide mit einer isotopenmarkierten Aminosäure als interner Standard der zu analysierenden Probe zugefügt. Diese AQUA-Peptide weisen eine übereinstimmende Aminosäuresequenz zu den nicht markierten, bei der Proteolyse entstehenden Peptiden auf. Entscheidender Vorteil ist, dass keine Unterschiede zwischen den synthetisierten und natürlichen Peptidvarianten in Bezug auf

Retentionszeit, Ionisationseffizienz und Fragmentierungsverhalten vorliegen [136]. Durch eine Massenverschiebung beim isotonenmarkierten Standard ist eine Differenzierung zum Zielpeptid gewährleistet. Nach der massenspektrometrischen Analyse können die Signalintensitäten zwischen markierten Standards und unmarkierten Peptiden zur Konzentrationsbestimmung verglichen werden.

### **1.2.6 Massenspektrometrische Analyse von Proteinstrukturen und Protein-Protein-Interaktionen**

Zum Verständnis von zellulären Prozessen und den damit verbundenen Proteinfunktionen ist es notwendig, die Proteinstrukturen und -anordnungen aufzuklären. Daher verfolgt die integrative Strukturbiologie das Ziel, durch Kombination verschiedener Techniken eine Vielzahl an komplementären Strukturinformationen von einzelnen Proteinen, Proteinkomplexen bis hin zu Proteinnetzwerken für Proteinmodellierungen zu gewinnen. Beispielsweise ist es möglich, unter Verwendung der chemischen Vernetzung oder dem Wasserstoff-Deuterium-Austausch (*hydrogen-deuterium exchange*, HDX) in Verbindung mit der Massenspektrometrie sowie der Elektronenmikroskopie (*electron microscopy*, EM), umfangreiche Proteinstrukturmodelle mit den gewonnenen Informationen zu erstellen [137, 138].

#### **1.2.6.1 Chemische Vernetzung kombiniert mit Massenspektrometrie**

Innerhalb der letzten 20 Jahre konnte sich die chemische Vernetzung verknüpft mit der Massenspektrometrie (MS) als Alternative zu den konventionellen Methoden, wie der Röntgenkristallographie und der Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie, für die Strukturanalyse von Proteinen etablieren [139, 140, 141, 142]. Die Stärken der chemischen Vernetzung bestehen in dem Bedarf geringster Proteinmengen im Femtomol-Bereich und der Möglichkeit zur Analyse von Membranproteinen und sehr flexiblen Proteinen als auch der Charakterisierung von dynamischen Proteininteraktionen bei physiologischem pH-Wert [143]. Das Anwendungsspektrum für die chemische Vernetzung entwickelt sich fortlaufend weiter. Diese Methode wird nicht nur bei isolierten Proteinen, sondern immer häufiger auch für die *in-vivo*-Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in Zellen, Organellen oder Geweben eingesetzt [144, 145, 146, 147].

Die chemische Vernetzung ermöglicht mithilfe eines Reagenzes die kovalente Verknüpfung von Aminosäureseitenketten, die sich in einem bestimmten, räumlichen Distanzradius

## Einleitung

zueinander befinden. Diese Vernetzungsreagenzien bestehen aus zwei funktionellen, reaktiven Gruppen und einem sich dazwischen befindenden Abstandshalter (*Spacer*). Die reaktiven Gruppen bestimmen die zur Vernetzung verfügbaren Aminosäuren und der Abstandshalter definiert die mögliche, maximale Entfernung zwischen diesen Aminosäuren [142].

Im Folgenden werden die notwendigen Arbeitsschritte für ein chemisches Vernetzungsexperiment erläutert (siehe Abbildung 14). Nach der Vernetzungsreaktion kann anhand einer eindimensionalen Gelelektrophorese (SDS-PAGE) das vernetzte Proteingemisch aufgetrennt und die erfolgreiche Durchführung des Vernetzungsexperimentes kontrolliert werden. Ist keine Verschiebung oder die Entstehung neuer Proteinsignale in den höheren Molekulargewichtsbereich ersichtlich, können die Versuchsbedingungen optimiert werden [142, 148]. Die anschließende Vorgehensweise zur Analyse der Vernetzungen wird als *bottom-up*-Strategie bezeichnet. Hierzu können nach der SDS-PAGE-Analyse bestimmte Proteinsignale für eine Proteolyse im Gel ausgewählt und in der Gelmatrix gespalten werden. Alternativ ist die Proteinspaltung in Lösung des gesamten Proteingemisches möglich. Die Proteolyse erfolgt häufig mit der Protease Trypsin, die Proteine C-terminal nach Lysinen und Argininen spaltet.

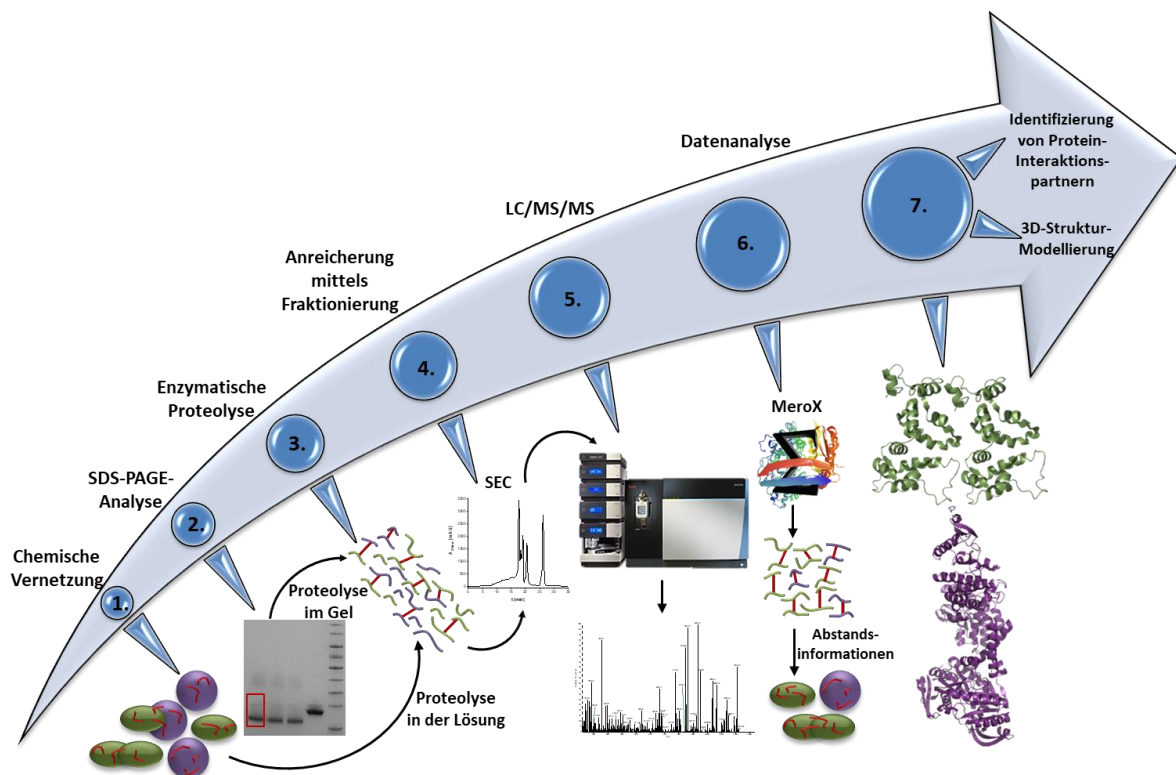


Abbildung 14: Strategie eines chemischen Vernetzungs/MS-Experiments. Entnommen aus [149].

Da vernetzte Produkte aus zwei Peptiden ein höheres Molekulargewicht als nicht vernetzte Peptide aufweisen, kann es sinnvoll sein, eine weitere Protease, wie z.B. GluC, zu verwenden, die zusätzliche Schnittstellen C-terminal nach Aspartat und Glutamat generiert. Dadurch kann gewährleistet werden, dass sich die Vernetzungsprodukte im optimal detektierbaren Bereich der MS-Analyse befinden. Die entstandene, äußerst komplexe Lösung aus vernetzten und linearen Peptiden wird direkt für die massenspektrometrische Analyse verwendet. Alternativ kann zuvor ein Anreicherungsschritt der niederabundanten Vernetzungsprodukte mithilfe der Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) zur Reduktion der Probenkomplexität erfolgen. Hierbei können vernetzte Peptide aufgrund ihres höheren Molekulargewichts von den linearen Peptiden abgetrennt werden [150, 151]. Zur Analyse des Peptidgemisches wird die anschließende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) mit dem Massenspektrometer (LC/MS/MS) gekoppelt. Zur Identifizierung vernetzter Peptide aus den aufgenommenen Fragmentationsspektren wird beispielsweise die Software StavroX/MeroX [152, 153] verwendet. Anhand des Abgleichs von den Signalen der Fragmentationsspektren mit möglichen Fragmentationen, die während der theoretischen Proteinspaltung durch die Software berechnet werden, ist eine Zuordnung der vernetzten Peptide möglich [154]. Von den Vernetzungsprodukten lassen sich durch die beteiligten Aminosäureseitenketten sowie die Länge des *Spacers* Distanzinformationen ableiten [155, 156]. Diese können für die computerbasierte Proteinmodellierung räumlicher Strukturen sowie Komplexanordnungen z.B. mithilfe des Servers HADDOCK [157] genutzt werden [158, 159].

### 1.2.6.2 Chemische Vernetzungsreagenzien

Die chemischen Vernetzungsreagenzien lassen sich anhand ihres strukturellen Aufbaus in zwei Gruppen gliedern. Die homobifunktionellen Vernetzer weisen an beiden Seiten des *Spacers* eine identische funktionelle Gruppe auf. Dagegen besitzen die heterobifunktionellen Reagenzien zwei über den *Spacer* verbundene Kopfgruppen unterschiedlicher Reaktivitäten. Die funktionellen Gruppen sind meist Amin-, Sulfhydryl- oder photo-reaktiv. Somit kann sich die Vernetzungsreaktion an verschiedene funktionelle Aminosäuregruppen richten. Zusätzlich existieren trifunktionale Vernetzungsreagenzien mit einer dritten Kopfgruppe, bei der es sich z.B. um einen Biotin-Rest [160, 161] für eine nachfolgende Anreicherungsstrategie handelt [142, 154]. Über die Jahre ist ein vielfältiges Spektrum an Vernetzungsreagenzien mit unterschiedlichen Reaktivitäten und *Spacer*längen entstanden, welches die Ableitung komplementärer Strukturinformationen ermöglicht. In Abbildung 15 sind die Vernetzungs-

## Einleitung

strategien, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, zusammengefasst. Ein weit verbreitetes Prinzip bei der chemischen Vernetzung beruht auf der Verwendung von N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Estern [162], wie z.B. bei Disuccinimidyl dibutylurea (DSBU) [163]. Diese funktionellen Gruppen sind vor allem bei der Vernetzung von primären Aminen der Lysinseitenketten und auch der N-Termini von Proteinen beteiligt. Zudem sind Reaktionen mit den Hydroxygruppen von Serinen, Threoninen und Tyrosinen möglich [164, 165]. 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) reagiert unter Freisetzung der Imidazolgruppen mit den gleichen Aminosäureseitenketten, jedoch unter einer höheren Beteiligung der Hydroxygruppen (siehe Abbildung A 1) [166].

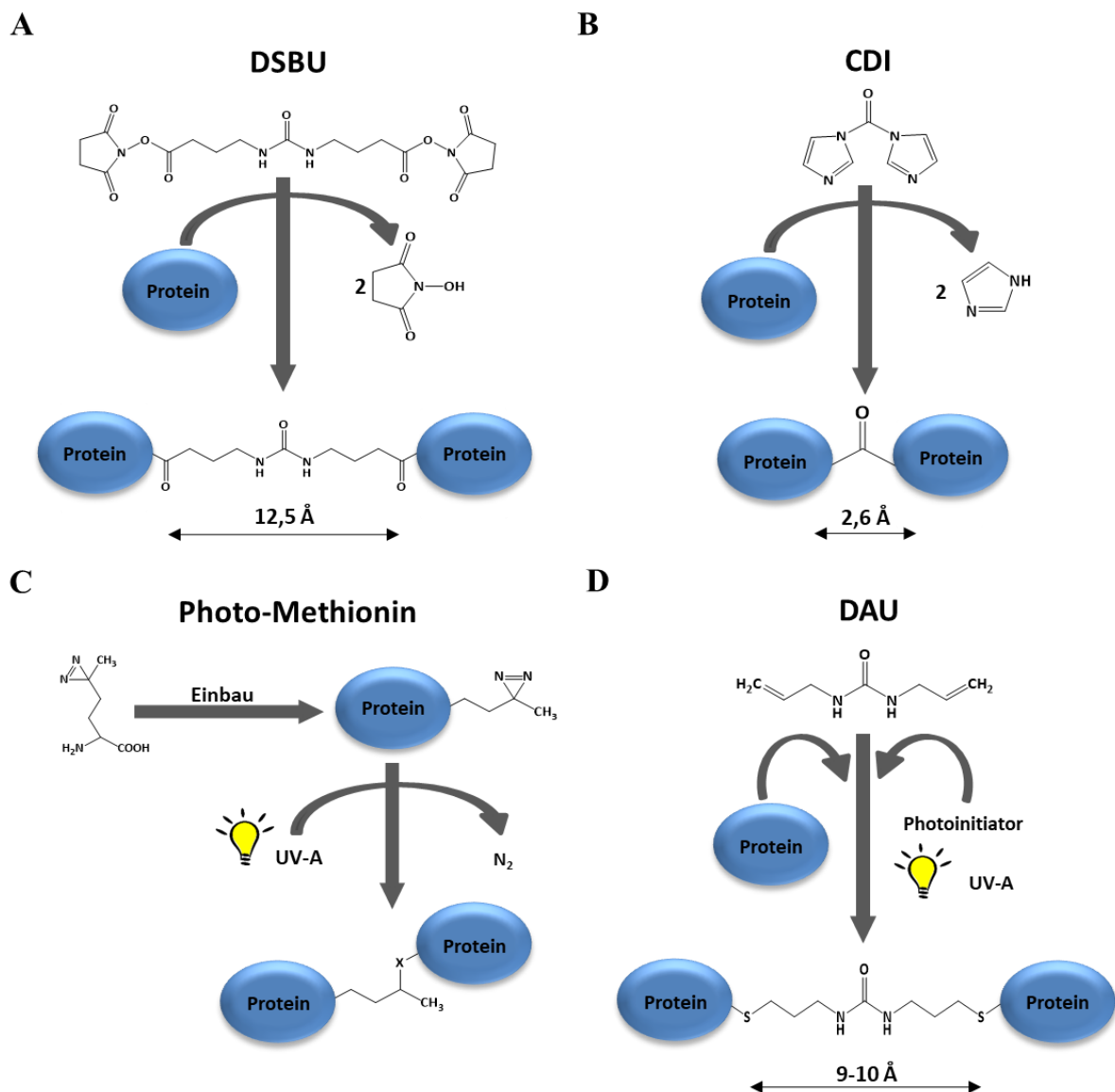


Abbildung 15: Übersicht der verwendeten Vernetzungsreagenzien. A) Disuccinimidyl dibutylurea (DSBU). B) Photo-Methionin. C) 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI). D) Diallylurea (DAU). Modifiziert nach [149].

## Einleitung

Aufgrund des ultra-kurzen *Spacers* von 2,6 Å in CDI muss die Distanz zwischen den verknüpfbaren Aminosäuren deutlich geringer sein als bei DSBU mit einem Abstandshalter von 12,5 Å. Zudem existiert eine Gruppe von Reagenzien, die ohne Einbau eines Linkers Aminosäureseitenketten in direkter Nachbarschaft miteinander vernetzen und somit als „Nulllängen-Vernetzer“ (*zero-length cross-linker*) bezeichnet werden [142]. Zu dieser Kategorie zählen die Reagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) [167] und 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (DMTMM) [168]. Diese Kopplungsreagenzien ermöglichen, auch saure Aminosäuren der Vernetzungsreaktion zugänglich zu machen.



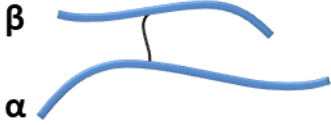
Eine weitere Möglichkeit stellen Vernetzer dar, die Diazirine als photo-reaktive Gruppe aufweisen. Generell ist mit diesen Reagenzien eine Verknüpfung mit jeder Aminosäure möglich. Jedoch ist nachgewiesen, dass die Vernetzungsreaktion vorrangig mit Asparaginsäure und Glutaminsäure erfolgt [169]. Eine solche Photoreaktion ist beispielsweise mit der artifiziiellen Aminosäure Photo-Methionin, die ebenfalls als Nulllängen-Reagenz fungiert, möglich [170]. Der Unterschied zu dem natürlichen Methionin besteht ausschließlich in dem Austausch des Schwefelatoms durch eine Diazirinegruppe am Seitenkettenende. Aufgrund dieser hohen strukturellen Ähnlichkeit ist für den Einbau in die Proteine keine modifizierte tRNA notwendig, um den unspezifischen Einbau der photo-reaktiven Variante während der Translation an den Positionen des natürlichen Methionins zu gewährleisten. Daher konnte durch Zugabe von Photo-Methionin zum Medium verschiedener Zellkulturen dessen Einbau ermöglicht werden [171, 172]. Nach der Aktivierung von Photo-Methionin mit UV-A-Licht entsteht entweder ein Carben-Intermediat, welches eine unspezifische Vernetzung hervorruft, oder eine lineare Diazoverbindung, die für die Esterbildung mit sauren Aminosäuren verantwortlich ist (siehe Abbildung A 2). Ein weiteres Vernetzungsreagenz ist Diallylurea (DAU), das aufgrund seiner Sulfhydrylreaktivität Cysteine miteinander verknüpfen kann. Hierfür werden die Thiolgruppen der Cysteine photo-induziert durch Benzophenon aktiviert und anschließend können die gebildeten Thiylradikale mit den Allylgruppen von DAU eine Vernetzung ausbilden (siehe Abbildung A 3) [173]. Außerdem besteht die Möglichkeit, unspezifisch Proteine mit geringen Mengen an Form- oder Glutaraldehyd zu fixieren [174, 175]. Aufgrund der hohen Reaktivität von Glutaraldehyd wurde gezeigt, dass Proteinstrukturen und -interaktionen in Zellen im gefrorenen Zustand stabilisiert werden konnten [176].

### 1.2.6.3 MS-Spaltbarkeit und Isotopenmarkierung zur Identifizierung von Vernetzungsprodukten

Für die massenspektrometrische Analyse liegt nach der Proteolyse von vernetzten Proteinen ein hochkomplexes Gemisch an Peptiden mit und ohne Modifikationen vor. Die Peptidmodifikationen, die durch das Vernetzungsreagenz verursacht werden, lassen sich in drei Gruppentypen unterteilen (siehe Tabelle 1) [177]. Bei Modifikationen des Typs 0, alternativ auch als „*dead-end cross-links*“ oder „*Monolinks*“ [142] bezeichnet, handelt es sich um Vernetzungsprodukte, bei denen nur eine funktionelle Gruppe des Vernetzungsreagenz eine Reaktion mit einer Aminosäureseitenkette eingegangen ist. Die zweite funktionelle Gruppe reagiert dagegen mit keiner weiteren Aminosäure und kann daher intakt oder z.B. durch die Reaktion mit Wasser hydrolysiert vorliegen. Bei Typ 1 liegt eine intrapeptidale Vernetzung („*loop-link*“ [142]) vor, sodass die beiden verknüpften Aminosäuren sich aufgrund der geringen Distanz in der Sequenzabfolge in einem Peptid befinden. Bei Typ 0 und 1-Vernetzungsprodukten lassen sich hauptsächlich Informationen zur Aminosäurezugänglichkeit erzielen. Dagegen besteht bei Typ 2-Produkten zusätzlich die Möglichkeit, Distanzinformationen der vernetzten Aminosäuren zu gewinnen, da hier eine interpeptidale Vernetzung zwischen zwei verschiedenen Peptiden erfolgte. Stammen die Peptide aus demselben Protein, wird die Verknüpfung als intramolekular klassifiziert, bei Peptiden aus unterschiedlichen Proteinen als intermolekular [139, 142]. Das verknüpfte Peptid von Typ 2-Vernetzungsprodukten mit dem höheren Molekulargewicht wird als  $\alpha$ -Peptid, das mit dem geringeren Molekulargewicht als  $\beta$ -Peptid bezeichnet [177]. Um die Identifizierung der Typ 2-Vernetzungsprodukte zu erleichtern, können die Vernetzungsreagenzien verschiedene Charakteristika aufweisen. Eine Strategie beruht darauf, dass die Vernetzer eine zusätzliche Affinitätsgruppe zur Anreicherung aufweisen, wie z.B. bei der PIR (*Protein Interaction Reporter*) -Technologie [161] oder dem PhoX-Reagenz [178]. Des Weiteren können spaltbare Vernetzungsreagenzien verwendet werden. Diese MS-Spaltbarkeit ist in Abbildung 16 graphisch am Beispiel von Disuccinimidyltributylurea (DSBU) [163] verdeutlicht. Wie DSBU besitzen 1,1-Carbonyldiimidazol (CDI) [166] (siehe Abbildung A 1) und Diallylurea (DAU) [173] (siehe Abbildung A 3) eine zentrale Harnstoffgruppe, dessen zwei NH-CO-Bindungen, wie die Amidbindungen des Peptidrückrates, mittels kollisionsinduzierter Dissoziation spaltbar sind. Aufgrund dieses asymmetrischen Fragmentierungsverhaltens entstehen für die Peptide  $\alpha$  und  $\beta$  jeweils zwei charakteristische Fragmentationen aus dem Spacer des Vernetzungsreagenz.

# Einleitung

Tabelle 1: Nomenklatur von vernetzten Peptiden nach Schilling et al.. [177]

Typ 0	Typ 1	Typ 2
„dead-end“	intrapeptidal	interpeptidal
		

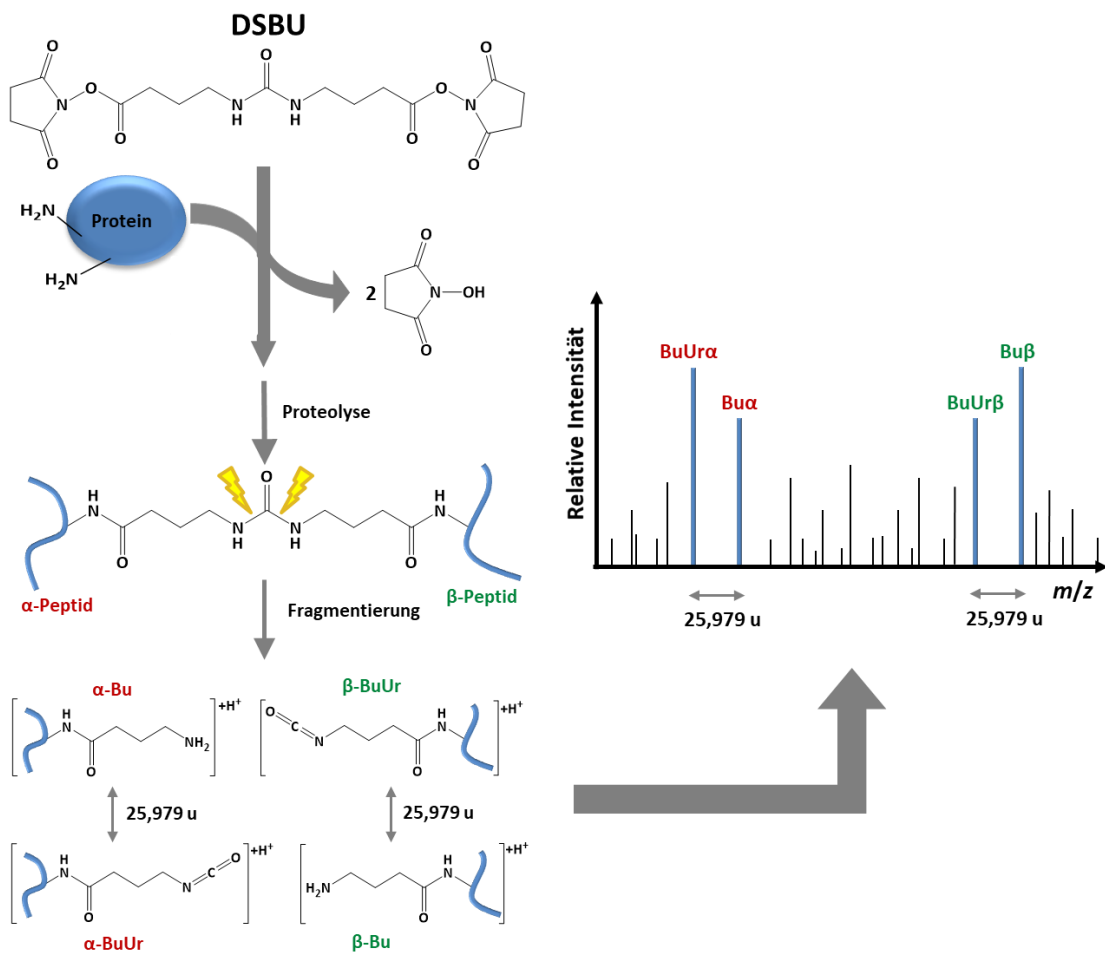


Abbildung 16: Identifizierung eines DSBU-Vernetzungsproduktes mithilfe der MS-Spaltbarkeit. Vernetzung zweier Lysine mittels DSBU. Nach der Proteolyse liegen die Vernetzungsprodukte bestehend aus einem α- und β-Peptid und dem DSBU-Spacer vor. Mittels kollisionsinduzierter Dissoziation wird die Harnstoffgruppe des DSBU-Linkers in das Bu- und BuUr-Fragment gespalten, welche einen Massenunterschied von 25,979 u aufweisen. Anhand dieses charakteristischen Fragmentierungsmusters ist eine erleichterte Identifizierung der Vernetzungsprodukte möglich. Bu: Peptid modifiziert mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure und BuUr: Peptid modifiziert mit Isocyanat [179].



## Einleitung

Diese werden, abgeleitet von der früheren DSBU-Bezeichnung „BuUrBu“, als Bu und BuUr bezeichnet und unterscheiden sich anhand eines Massenunterschied von 25,979 u voneinander. Das Bu- und BuUr-Fragment bildet im Fragmentationenspektrum ein spezifisches Dublettmuster für die beiden verknüpften Peptide und ermöglicht so eine vereinfachte und gleichzeitig eindeutige Identifizierung der Vernetzungsprodukte. Bei der Reaktion von Diazirinen mit sauren Aminosäuren entsteht eine Esterbindung, die ebenfalls fragmentiert werden kann (siehe Abbildung A 2). Aufgrund der einen Bruchstelle liegt in diesem Fall für die Identifizierung der vernetzten Peptide nur ein Signaldublett mit einer Massendifferenz von 28,006 u vor [169].

Auch isotope-markierte Vernetzungsreagenzien werden häufig verwendet, um die Analyse von Vernetzungen zu vereinfachen [142]. Ein bekannter Vertreter ist Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (BS<sup>2</sup>G) [180], der in einem 1:1-Verhältnis mit seiner vierfach deuterierten Variante (D<sub>0</sub>/D<sub>4</sub>) verwendet wird. Durch diese Markierung können Isotopenmuster im MS-Übersichtsspektrum für die Vernetzungsprodukte entstehen. Die Verwendung der 12-fach deuterierten DSBU-Variante (D<sub>12</sub>) vereint die beiden vorteilhaften Charakteristika der MS-Spaltbarkeit sowie der Isotopenmarkierung in einem Vernetzungsreagenz [181]. Hierdurch wird eine Isotopen-abhängige Selektion auf MS-Ebene und die Spaltbarkeit des Vernetzungsreagenz in MS/MS-Experimenten ermöglicht. Die Kombination der beiden Strategien kann in einer gesteigerten Anzahl an identifizierten Vernetzungen resultieren.

### 1.2.6.4 Native Massenspektrometrie von Proteinen

Neben der Kombination aus chemischer Vernetzung und MS besteht mit der nativen MS eine alternative Methode, um niederaufgelöste Strukturinformationen von Proteinen zu gewinnen. Von Vorteil ist es, dass die Analyse der Proteinstrukturen unter nativen Bedingungen möglich ist und zuvor keine Denaturierung erfolgen muss. So können Aussagen über die Funktionalität, Stöchiometrie und Komplexbildung intakter Proteine getroffen werden [182, 183]. Zur Analyse werden die Proteine in eine MS-kompatible Ammoniumacetat-Lösung mit neutralem pH-Wert überführt, die sich während des ESI-Prozesses verflüchtigt. Hierdurch bleiben die Proteinkomplexe beim Übergang in die Gasphase intakt und die Analyse kann z.B. mit einem Q-TOF-Gerät erfolgen [184]. Es muss berücksichtigt werden, dass in der Gasphase die Protein-Wechselwirkungen zur Komplexbildung hauptsächlich elektrostatischer und nicht hydrophober Natur sind [185].

### 1.3 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) hat sich in den vergangenen Jahren zu einer wertvollen Technik für die biophysikalische Charakterisierung von Proteininteraktionen entwickelt. So konnte diese optische Methode bereits bei der Analyse von Calcium-abhängigen Konformationsänderungen der NCS-Proteine Anwendung finden [186]. Das SPR-Phänomen beruht auf der Anregung von Plasmonen in einer Metalloberfläche durch Photonen, was durch den Reflektionswinkel des einfallenden Lichts zu verfolgen ist. Der Energietransfer zwischen Photonen und Metallelektronen ist nur unter Resonanzbedingungen möglich. Dazu muss die Lichteinstrahlung mithilfe eines Prismas in Totalreflektion erfolgen. Dieser SPR-Effekt resultiert in einem Intensitätsminimum der Reflexion [187]. Als Messanordnung wird bei kommerziellen SPR-Geräten hauptsächlich die sogenannte Kretschmann-Konfiguration eingesetzt. Dabei befindet sich die Metallschicht direkt auf dem Prisma [188, 189]. Liedberg gelang es erstmalig in den 1980er Jahren die Sensoren für Interaktionsstudien von Biomolekülen anzuwenden [190]. Zunächst wird der Ligand auf der Goldoberfläche immobilisiert. Der mögliche Interaktionspartner wird mit einer konstanten Geschwindigkeit über die Chipoberfläche geleitet. Die Anlagerung von Analytmolekülen aufgrund von Wechselwirkungen resultiert in einer Veränderung des Brechungsindex und somit auch des Resonanzwinkels. Der zeitliche Verlauf der Signalveränderung durch Assoziation und Dissoziation zwischen Liganden und Analyten lässt sich als Sensogramm aufzeichnen, mit dem die Bestimmung von Bindungsaffinitäten möglich ist [187].

## 2 Zielstellung

Die retinale Guanylatzyklase (ROS-GC1) ist eine essentielle Komponente bei der Phototransduktion im Außensegment der Stäbchen und ermöglicht dem menschlichen Auge die Wahrnehmung verschiedener Lichtintensitäten. Bei der ROS-GC1 handelt es sich um ein Transmembranprotein, das intrazellulär durch die Guanylatzyklase-aktivierenden Proteine 1 und 2 (GCAP-1/-2) als Antwort auf zytosolische Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert wird. Eine Vielzahl an ROS-GC1-Mutationen werden in Verbindungen mit retinalen Dysfunktionen gebracht, die das Sehen beeinträchtigen oder zur Erblindung des Menschen führen können. Bis heute konnte der Regulationsmechanismus der ROS-GC1 durch die GCAP-1 und -2 noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Des Weiteren stehen keine dreidimensionalen Strukturmodelle für die Vollängen-ROS-GC1 zur Verfügung. Um neue Therapieansätze gegen diese Retinopathien entwickeln zu können, ist es zwingend notwendig, weitere Einblicke in die ROS-GC1-Aktivierung durch GCAP-2 sowie Strukturinformation zur ROS-GC1 zu erhalten. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit zwei Schwerpunkte gesetzt:

- 1) Im Fokus stand zum einen die Aufklärung der Binderegion von GCAP-2 in der intrazellulären Domäne (IcD) der ROS-GC1. In früheren Studien konnte nicht geklärt werden, ob GCAP-1 und -2 separate oder überlappende Interaktionsflächen in der ROS-GC1 besitzen [2, 4, 72, 73, 74]. Hierzu sollten vorherige Untersuchungen mittels chemischer Vernetzung/MS zwischen GCAP-2 und einem ROS-GC1-Peptid der katalytischen Domäne, das dem möglichen Bindemotiv entspricht, erweitert werden [3]. Zur Analyse der Bindestelle sollten Interaktionsstudien zwischen GCAP-2 und drei ROS-GC1-Peptiden mithilfe von Vernetzungs-/MS-Experimenten durchgeführt werden. Zur Gewinnung komplementärer Strukturinformationen sollten verschiedene Vernetzungsstrategien verfolgt werden, die zunächst an GCAP-2 angewendet wurden, um eine erfolgreiche Versuchsdurchführung unter optimalen Reaktionsbedingungen zu gewährleisten. Um eine detaillierte Charakterisierung der GCAP-2/ROS-GC1-Peptid-Interaktionen zu ermöglichen, sollten zusätzlich die Oberflächenplasmonresonanz- und Fluoreszenzspektroskopie Anwendung finden.
- 2) Der zweite Schwerpunkt in dieser Arbeit lag in der strukturellen Charakterisierung der ROS-GC1 als Vollängen-Protein unter nativen Bedingungen. Hierzu diente eine Stäbchenaußensegment (ROS)-Präparation aus Rinderaugen sowie eine HEK 293-Zelllinie,

## Zielstellung

welche das humane Vollängen-Protein der ROS-GC1 stabil exprimierte. Für ROS-GC1 sollte MS-basiert sowohl die absolute Quantifizierung in der ROS-Präparation als auch die Überprüfung der Funktionalität anhand der Enzymaktivität erfolgen. Zudem sollte die chemische Vernetzung gemeinsam mit der nachfolgenden MS-Analyse eingesetzt werden, da diese Technik die Strukturaufklärung der ROS-GC1 im zellulären Umfeld ohne vollständige Proteinreinigung ermöglicht. Die erhaltenen Strukturinformationen sollten abschließend zur Generierung eines Strukturmodells der gesamten intrazellulären Domäne der ROS-GC1 verwendet werden.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Roth
Acetonitril (HPLC, LC/MS <i>grade</i> )	VWR
<i>N</i> -Acetyl-L-tryptophanamid	PD Dr. Ralph Golbik, MLU Halle-Wittenberg
<i>N</i> -Acetyl-L-tyrosinamid	Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 37,5:1, 40 % (w/v)	Roth
Adenosintriphosphat (ATP)	Roth
Agar	AppliChem
Agarose	Lonza
Ameisensäure (FA)	Sigma-Aldrich
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth
Carbenicillin-Dinatriumsalz	Roth
Coomassie Brilliantblau R250	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltosid (DDM)	Roth
Essigsäure, 100 % (v/v)	Roth
Ethanol (HPLC, LC-MS <i>grade</i> )	VWR
Ethanolamin	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC)	Thermo Fisher Scientific
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> - tetraessigsäure (EGTA)	Fluka
Glukosemonohydrat	Roth
Glutaraldehyd, 50 % in H <sub>2</sub> O	Electron Microscopy Science
Guanosintriphosphat (GTP)	Sigma-Aldrich
Guanosintriphosphat, <sup>13</sup> C <sub>10</sub> <sup>15</sup> N <sub>5</sub> ( <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N-GTP)	Sigma-Aldrich
Guanosinmonophosphat (GMP)	Sigma-Aldrich
Guanosin (G)	Sigma-Aldrich
Glycerin	AppliChem
Harnstoff	AppliChem
Hefeextrakt	Roth

## Material

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS)	Thermo Fisher Scientific
Imidazol	Merck
Iodacetamid (IAA)	AppliChem
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kaliumhydroxid	Grüssing
Kanamycin-Sulfat	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
Methanol (HPLC, LC-MS grade)	VWR
3- <i>N</i> -(Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Calbiochem
Myristinsäure	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Grüssing
Natriumdesoxycholat (NaDOC)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 % (w/v)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PSMF)	Sigma-Aldrich
ProteaseMAX Tensid	Promega
Rotiphorese 10 x SDS PAGE (10-fach konzentrierter Laufpuffer)	Roth
Salzsäure (HCl), 37 % (v/v)	Grüssing
Salzsäure (HCl), Endotoxin-frei	Sigma-Aldrich
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	VWR
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich
Tris-(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Triton X-100	Fluka
Trypton	Roth
Tween 80	Serva
Wasser (HPLC, LC/MS grade)	VWR
Zitronensäure	Sigma-Aldrich
Zyklisches Guanosinmonophosphat ( <i>cyclic guanosine monophosphate</i> , cGMP)	Sigma-Aldrich

### 3.2 Chemische Vernetzungsreagenzien

Vernetzungsreagenz	Hersteller
1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI)	Sigma-Aldrich und Carbolution Chemicals GmbH
Benzophenon	Sigma-Aldrich
Diallylurea (DAU)	Dr. Claudio Iacobucci, MLU Halle-Wittenberg
Disuccinimidyl dibutylurea (DSBU)	Prof. Dr. Mathias Schäfer, Universität zu Köln, CF Plus Chemicals und Thermo Fisher Scientific
Photo-Methionin	Thermo Fisher Scientific

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
<i>Deepwell Plate 96, Protein LoBind</i> , 1000 µl	Eppendorf
<i>Deepwell Plate, 96 square well</i> , 2000 µl	VWR
Dialyseschläuche, Ø 29 mm, 12 – 14 kDa	Serva
Einmalküvetten	Roth
Falcon-Röhrchen, 15 /50 ml	Corning
Membranfilter, Porengröße 0,2 µm	Sartorius
Mikroinsert G30S, 175 µl	Chromatographie Service GmbH
Mini-PROTEAN TGX Gel, 4-20 %, 10 Taschen	Bio-Rad
Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen	Roth
Reaktionsgefäße, 0,5/1,0/2,0 ml	Eppendorf
Schnappdeckel, HPLC, Ø 11 mm, Polytetrafluorethylen	Merck
Schnappdeckelgefäß, HPLC, 1,5 ml, 11,6 x 32 mm, Glas	Merck
Schnappdeckelgefäß, HPLC, 0,3 ml, 12 x 32 mm, Polypropylen	Merck
Sensorchip, SPR102-CMD-2D	BioNavis, Cenibra
Serologische Pipetten	VWR
Spritzen Injekt Solo, 3/5/10/20 ml	B. Braun
Spritze Omnifix-F Solo, 1 ml	B. Braun
Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm	Filtropur S, Sarstedt
Zellkulturflaschen, 250 ml/75 cm <sup>2</sup> , 50 ml/25 cm <sup>2</sup>	Greiner, Nunc
Zentrifugationsfiltereinheit Amicon Ultra 0,5/15 ml (30 kDa <i>molecular weight cut-off</i> )	Merck Millipore
ZipTip-Pipettenspitzen, C4/C18 Material	Merck Millipore

### 3.4 Komplettkits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
DNA-Marker Quick-Load, 1 kb	New England BioLabs
DNA-Marker Quick-Load, 100 bp	New England BioLabs
DNA-Probenladepuffer, DNA-Dye NonTox, 6 x	AppliChem
Dynabeads Protein G, 30 mg/ml	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Gene JET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
Probenpuffer, Laemmli, 2 x	Bio-Rad
Proteinkonzentrationsbestimmung, Bradford-Assay	Bio-Rad
Proteinmolekulargewichtsstandard, vorgefärbt (10-180 kDa), <i>PageRuler</i>	Thermo Fisher Scientific
Proteinmolekulargewichtsstandard, vorgefärbt (10-260 kDa), <i>Spectra Multicolor Broad Range</i>	Thermo Fisher Scientific
Proteaseinhibitor Cocktail, EDTA-frei <i>cOmplete</i> (25 x Stammlösung in Wasser)	Roche
Proteaseinhibitor Cocktail, EDTA-frei <i>cOmplete mini</i>	Roche

### 3.5 Geräte

<b>Laborgerät</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage ALC	Acculab
Analysenwaage LE225D	Sartorius
Analysenwaage (Halbmikrowaage) EX225D/AD	OHAUS EXPLORER
Autoklav VX-75	Systec
Brutschrank kelvitron t Baureihe 6000	Thermo Heraeus
CO <sub>2</sub> Inkubator Heracell, 150 Liter	Thermo Heraeus
Elektrophoresesystem Minigel-PROTEAN Tetra	Bio-Rad
Elektrophoresesystem, horizontal, <i>Kuro Gel MiniPlus 10 Electrophoresis Horizontal</i>	VWR
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300	Nikon
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC professional	Vaccuubrand GmbH
Ganz-Glas-Vakuum-Filtrationsgerät	Sartorius
Geldokumentationssystem Gel Doc XR	Bio-Rad
Gewebehomogenisatoren, Typ Dounce	Wheaton
Heizblock Thermostat	HLC
Inkubationsschüttler, New Brunswick Innova 44R	Eppendorf
Inkubationsschüttler, Thermoshake VTO500	Gerhardt
Hochdruck-Zellaufschlusssystem, Model TS (0,75 KW)	Constant System
Laborrührer SLR	Schott Instruments
Magnetrührer M21/1	Framo
Magnetrührer	Heidolph



## Material

Minishaker MS1	IKA
Minizentrifuge	Kisker Biotech GmbH
MP-SPR Navi 200 OTSO	BioNavis
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
pH-Meter	Mettler Toledo
Pipettierhelfer accu-jet	Brand
Reinstwasseranlage GenPure xCAD	TKA
Rotoren 45Ti, JLA 9.100	Beckman Coulter
Schütteltisch, <i>see-saw rocker SSL4</i>	Stuart
SpeedVac Concentrator Savant SPD1010	Thermo Fisher Scientific
Spektrorfluorometer FP-8200 mit Mini-Zirkulationsbad	Jasco
Sterilbank ScanLaf Mars	LaboGene
Stromversorgungsgerät PowerPac Basic	Bio-Rad
Thermo Mixer C	Eppendorf
Thermomixer MKR 10/13	HLC
ThermoShaker Biometra TS 1	Analytik Jena
Tischzentrifuge	VWR, Kisker Biotech GmbH
Tischzentrifuge MiniSpin Plus	Eppendorf
Überkopfschüttler	
Ultraschallbad, Ultrasonic Cleaner	VWR
Umkehrmikroskop, Motic AE 20	Ryf AG
Umwälzthermostat, Wasserbad	Julabo
UV-Bestrahlungskammer	Prof. Rüttinger, Institut für Pharmazie MLU Halle-Wittenberg
Vortex-Mixer 7-2020	Neonlab
Vortex-Mixer REAX 2000	Heidolph
Waage MXX-2001	Denver Instrument
Zentrifugen 5415 R, 5804 R, 5810R	Eppendorf
Zentrifugen Avanti J-20XP & Optima L-90K	Beckman Coulter

<b>Massenspektrometer</b>	<b>Hersteller</b>
Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer mit Nanospray Flex Nano-ESI-Quelle	Thermo Fisher Scientific
Orbitrap Q Exactive Plus-Massenspektrometer mit Nanospray Flex Nano-ESI-Quelle	Thermo Fisher Scientific
LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer mit Nano-ESI-Quelle	Thermo Fisher Scientific
Triple-Quadrupol-Massenspektrometer Xevo TQD mit Z-Spray-ESI-Quelle	Waters
Q-TOF 2-Massenspektrometer (High-Mass)	Micromass/ MS Vision
timsTOF-Pro-Massenspektrometer	Bruker Daltonik

<b>Chromatographiesysteme, Säulen &amp; Zubehör</b>	<b>Hersteller</b>
FPLC-Systeme Äkta FPLC & Pure	GE Healthcare
HiTrap Q Sepharose HP, 1 ml	GE Healthcare
HisTrap FF <i>Crude</i> , 5 ml	GE Healthcare
Superdex 75 pg, 16/600, 120 ml	GE Healthcare
Superdex 30 <i>Increase</i> 10/300, 24 ml	GE Healthcare
Nano-HPLC-System	Thermo Fisher Scientific
Ultimate 3000 RSLC Nano-System	
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, 75 µm x 250 mm, 2 µm, 100 Å	Thermo Fisher Scientific
HPLC-Trennsäule PicoFrit, C18, (75 µm x 50 cm, 15 µm Spitzendurchmesser) mit ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1,9 µm, 120 Å	New Objective Dr. Maisch GmbH
HPLC-Trennsäule µPAC, C18, 50 cm	PharmaFluidics
Nanobaume <i>Capillary Column Packer</i>	MS Will
Spraykapillaren Kwik-Fill aus Borosilikatglas (1,2 mm OD, 0,68 mm ID) mit Filament	World Precision Instruments
P-1000 Micropipette Puller	Sutter Instruments
Scancoat Six	HHV
HPLC-System Agilent 1200	Agilent Technologies
HPLC-Trennsäule Eclipse XDB-C8 4,6 x 150 mm, 5 µm, 80 Å	Agilent Technologies
nanoAcquity UPLC-System	Waters
HPLC-Trennsäule Kinetex XB-C18 100 x 1,0 mm, 2,6 µm, 100 Å	Phenomenex
nanoElute UPLC System	Bruker Daltonik
HPLC-Trennsäule nanoElute FIFTEEN C18 ReproSil AQ 75 µm x 150 mm, 1,9 µm, 120 Å	Bruker Daltonik

### 3.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Milli-Q-Wasser hergestellt, wenn nicht im Folgenden anders beschrieben.

#### Agarosegelelektrophorese

*CutSmart* Puffer, 10 x, pH 7,9  
(New England BioLabs)

500 mM Kaliumacetat  
200 mM TRIS-Acetat

## Material

	100 mM Magnesiumacetat
	1000 µg/ml BSA
T4 DNA Ligase-Reaktionspuffer, 10 x, pH 7,5 (New England BioLabs)	500 mM TRIS-HCl
	100 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM ATP
	10 mM DTT
TAE-Puffer, 50 x, pH 8,5	2 M TRIS
	1 M Essigsäure
	0,05 M EDTA

### **Isolation der HEK 293-Zellmembranfraktion**

Lysepuffer, pH 7,4	10 mM HEPES-KOH
	1 mM TCEP
Resuspensionspuffer, pH 7,4	50 mM HEPES
	50 mM KCl
	20 mM NaCl
	1 mM TCEP

### **Einschlusskörperchen (*Inclusion bodies*, IBs) Präparation**

IB Puffer I, pH 7,0	0,1 M TRIS-HCl
	1 mM EDTA
IB Puffer II, pH 7,0	60 mM EDTA
	6 % (v/v) Triton X-100
	1,5 M NaCl
Waschpuffer, pH 7,0	0,1 M TRIS-HCl
	20 mM EDTA
Solubilisierungspuffer, pH 8,0	6 M Harnstoff
	50 mM TRIS-HCl
	1 mM TCEP

### **Proteinrückfaltung & -reinigung**

Dialysepuffer I, pH 8,0	0,1 M TRIS-HCl
	1 mM CaCl <sub>2</sub>
	1 mM DTT

## Material

### Anionenaustauschchromatographie

IEX-Bindepuffer, pH 8,0	50 mM TRIS-HCl 1 mM TCEP
IEX-Elutionspuffer, pH 8,0	50 mM TRIS-HCl 1 mM TCEP 1 M NaCl

### Größenausschlusschromatographie

SEC-Fließmittel I, pH 7,5	10 mM HEPES 150 mM NaCl 2,5 mM TCEP 10 % (v/v) Glycerin
---------------------------	--

### Affinitätschromatographie

IMAC-Bindepuffer, pH 7,5	20 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM TCEP
IMAC-Elutionspuffer, pH 7,5	20 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM TCEP 500 mM Imidazol
Dialysepuffer II, pH 7,5	20 mM HEPES 1 mM TCEP
Lagerpuffer I, pH 7,5	20 mM HEPES 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM TCEP

### **ROS-Präparation**

Lagerpuffer II, pH 7,4	10 mM HEPES 1 mM DTT 0,1 mM PSMF
------------------------	--

### **Acetonpräzipitation**

Aceton-Fällungslösung I	100 % (v/v) Aceton
Aceton-Fällungslösung II	80 % (v/v) Aceton

## Material

### **Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Puffer des Sammelgels, pH 6,8	0,5 M TRIS-HCl
Puffer des Trenngels, pH 8,8	1,5 M TRIS-HCl
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS)	10 % (w/v)
Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS)	10 % (w/v)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	40 % (w/v)
Laemmli Probenpuffer, 2 x, pH 6,8	62,5 mM Tris-HCl 25 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
Zugabe vor dem Gebrauch	5 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
Coomassie-Färbelösung	1 % (w/v) Coomassie-Brillantblau R250 10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 25 % (v/v) Methanol

### **Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie**

SPR-Puffer I, pH 7,5	20 mM HEPES 0,05 % (v/v) Tween
SPR-Puffer II, pH 3,9	10 mM Natriumacetat
SPR-Puffer III, pH 2,0	10 mM Glycin 0,05 % (v/v) Tween

### **Aktivitätsassay**

Aktivitätspuffer, 2,5 x, pH 7,5	100 mM HEPES-KOH 140 mM KCl 20 mM NaCl 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM IBMX 0.25 mM ATP
Stopplösung	100 mM EDTA 100 mM Zitronensäure

## Material

### Stammlösung

GTP	20 mM GTP
<sup>13</sup> C <sup>15</sup> N-GTP	20 mM <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N-GTP
GMP	20 mM GMP
Guanosin	20 mM Guanosin
3-Isobutyl-1-methylxanthin-Lösung (IBMX)	200 mM IBMX in DMSO
EGTA	50 mM EGTA

### **Chemische Vernetzung**

Reaktionspuffer I, pH 7,5	20 mM HEPES
Reaktionspuffer II, pH 7,5	20 mM HEPES
	100 mM NaCl
	1 mM TCEP
	0,1 mM EGTA
	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,15 mM DDM
	10 % (v/v) Glycerin
Reaktionspuffer III, pH 7,5	20 mM HEPES
	100 mM NaCl
	2 mM EGTA
	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	2 mM DDM
	10 % (v/v) Glycerin

### **Enzymatische Proteolyse im Gel**

Ammoniumbicarbonat-Lösung I (NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> )	100 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>
Dithiothreitol-Lösung I (DTT)	10 mM DTT in 100 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>
Iodacetamid-Lösung I (IAA)	55 mM IAA in 100 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>
Extraktionslösung	1:2 (v/v) 5 % (v/v) TFA/ACN

### **Enzymatische Proteolyse in Lösung**

Dithiothreitol-Lösung II (DTT)	40 mM DTT
Iodacetamid-Lösung II (IAA)	100 mM IAA
Natriumdesoxycholat-Lösung (NaDOC)	20 % (w/v) NaDOC
Trifluoressigsäure-Lösung (TFA)	10 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O (LC/MS grade)

## Material

Denaturierungspuffer I, pH 7,5	8 M Harnstoff, 5 mM TCEP in 50 mM HEPES
Denaturierungspuffer II, pH 7,5	6 M Harnstoff, 2 M Guanidiniumchlorid, 5 mM TCEP in 50 mM HEPES
<u>FASP</u> ( <i>Filter Aided Sample Preparation</i> ) [191]	
Denaturierungspuffer I, pH 7,5	8 M Harnstoff, 5 mM TCEP in 50 mM HEPES
Denaturierungspuffer III, pH 7,5	6 M Harnstoff, 4 % (w/v) SDS, 5 mM TCEP in 50 mM HEPES
Denaturierungspuffer IV, pH 8,5	8 M Harnstoff, 5 mM TCEP in 100 mM TRIS-HCl
Denaturierungspuffer V, pH 8,5	8 M Harnstoff in 100 mM TRIS-HCl
Iodacetamid-Lösung III (IAA)	50 mM IAA in Denaturierungspuffer IV
Ammoniumbicarbonat-Lösung II (NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> )	50 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>
Natriumchlorid-Lösung (NaCl)	0,5 M NaCl
Trifluoressigsäure-Lösung (TFA)	10 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O (LC/MS grade)
<u>SCAD</u> ( <i>Surfactant and Chaotropic Agent Assisted Sequential Extraction/On-Pellet Digestion</i> ) [192]	
Denaturierungspuffer I, pH 7,5	8 M Harnstoff, 5 mM TCEP in 50 mM HEPES
Denaturierungspuffer III, pH 7,5	6 M Harnstoff, 4 % (w/v) SDS, 5 mM TCEP in 50 mM HEPES
Denaturierungspuffer VI, pH 7,5	4 % (w/v) SDS, 5 mM TCEP in 50 mM HEPES
<u>ProteaseMAX-Tensid</u>	
Ammoniumbicarbonat-Lösung II (NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> )	50 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>
ProteaseMAX-Lösung	1 % (w/v) und 0,2 % (w/v) in 50 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>
Denaturierungspuffer I, pH 7,5	8 M Harnstoff, 5 mM TCEP in 50 mM HEPES
Dithiothreitol-Lösung III (DTT)	500 mM DTT

## Material

Iodacetamid-Lösung IV (IAA)	550 mM IAA
Trifluoressigsäure-Lösung (TFA)	10 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O (LC/MS grade)

### Peptid-Größenausschlusschromatographie (SEC)

SEC-Fließmittel II	3 % (v/v) ACN und 0,1 % (v/v) TFA
--------------------	-----------------------------------

### HPLC/Massenspektrometrie

Fließmittel I	0,1 % TFA (v/v) in H <sub>2</sub> O (LC/MS grade)
Fließmittel II	0,1 % TFA (v/v) in ACN (LC/MS grade)
Fließmittel III	0,1 % FA (v/v) in H <sub>2</sub> O (LC/MS grade)
Fließmittel IV	ACN (LC/MS grade)
Fließmittel V	80 % (v/v) ACN und 0,08 % FA (v/v) in H <sub>2</sub> O (LC/MS grade)
Fließmittel VI	0,08 % FA (v/v) in ACN (LC/MS grade)

### 3.7 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
DH5 $\alpha$	<i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> )U169 <i>phoA glnV44</i> $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> ( $\lambda$ <i>sBamHI</i> o $\Delta$ <i>EcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21</i> $\Delta$ <i>nin5</i> ) [ <i>dcm</i> ] $\Delta$ <i>hsdS</i>

### 3.8 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HEK 293-Zellen ( <i>Human Embryonic Kidney</i> )	PD Dr. Cordelia Schiene-Fischer, Institut für Biochemie, MLU Halle- Wittenberg
HEK 293-Zellen, stabil transfiziert mit pIRES-eGFP-GC1-Plasmid	Prof. Dr. Daniele Dell'Orco, Universität Verona, Italien

### 3.9 Medien und Zusätze

<i>E. coli</i> -Zellkultur	Zusammensetzung
Carbenicillin-Lösung	100 mg/ml Carbenicillin in Wasser, steril filtriert
IPTG-Lösung	1 M IPTG in Wasser, steril filtriert
Kanamycin-Lösung	30 mg/ml Kanamycin in Wasser, steril filtriert
KPi-Puffer (10 x)	225 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 775 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
Lager-Medium	8 % (v/v) Glycerin, 92 % (v/v) LB-Medium



## Material

LB-Agar-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 10 g/l Agar
SOC-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glukose
Spurenelement-Lösung I (1000 x)	102,03 mM CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O, 80,59 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 92,49 mM FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, steril filtriert
Spurenelement-Lösung II (10.000 x)	135 mM CuSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 106 mM MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 15,6 mM ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 21,5 mM CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, steril filtriert
Minimalmedium	KPi-Puffer (1 x), 0,1 % (w/v) Glucose, 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 1,5 g/l NH <sub>4</sub> Cl, Spurenelement-Lösung I und II (1 x)

<b>HEK 293-Zellkultur</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) mit Glukose und GlutaMAX	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Fötale Kälberserum (FBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin (100x, 10.000 U/ml)	Biochrom GmbH, Merck
Geneticin (G418), 50 mg/ml-Lösung in H <sub>2</sub> O	Merck
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4	Gibco, Thermo Fisher Scientific

### 3.10 Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Herkunft</b>
pBB131_N-myristoyltransferase I (Hefe)	Prof. Dr. Daniel Huster, Universität Leipzig Prof. Dr. Teresa Duda, Salus Universität, USA
pET-11a_GCAP-2 (Rind)	Prof. Dr. Daniel Huster, Universität Leipzig
pET-21a(+)_D <sup>6</sup> S-GCAP-1 (Rind)	Prof. Dr. Teresa Duda, Salus Universität, USA
pIRES_GC1 (Mensch)	Prof. Dr. Daniele Dell'Orco, Universität Verona, Italien

### 3.11 ROS-GC1-Peptide zur Interaktionsstudie mit GCAP-2

<b>ROS-GC1</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>Hersteller</b>
Peptid 1	<sup>965</sup> YRIHVNRSTVQILSALN <sup>981</sup>	Thermo Fisher Scientific
Peptid 2	<sup>942</sup> MPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNRSTVQILSALN <sup>981</sup>	Thermo Fisher Scientific
Peptid 3	<sup>503</sup> LYEGDWVWLKKFPGDRHIAI <sup>522</sup>	Dr. Sven Rothmund, IZKF Leipzig

### 3.12 ROS-GC1-Peptide zur Quantifizierung von ROS-GC1

ROS-GC1	Aminosäuresequenz	Hersteller
Peptid Q1	<sup>162</sup> AAGTTAPVVTPAADALYALLR* <sup>182</sup> R*= <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> isotopenmarkiert, SpikeTides	JPT Peptide Technologies
Peptid Q2	<sup>1028</sup> STVQILSALNEGFLTEVR* <sup>1045</sup> R*= <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> isotopenmarkiert, SpikeTides	JPT Peptide Technologies

### 3.13 Proteine

Protein	Hersteller
Asp-N Endopeptidase, <i>sequencing grade</i> , rekonstituiert in 20 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>	Promega
Benzonase Nuklease	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin Standard, 2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific
EcoRI-HF	New England BioLabs
Glu-C Endopeptidase, <i>sequencing grade</i> , aliquotiert in 20 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> (0,5 µg/ml)	Promega
Lys-C Endopeptidase, <i>mass spec grade</i> , aliquotiert in 1 mM HCl (0,5 µg/ml)	Promega
NdeI	New England BioLabs
rekombinante <i>shrimp</i> Alkalische Phosphatase (rSAP)	New England BioLabs
ROS-GC1 Antikörper, B7, monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Trypsin, <i>sequencing grade modified</i> , aliquotiert in 1 mM HCl (0,5 µg/ml)	Promega
T4 DNA-Ligase	New England BioLabs

### 3.14 Datenverarbeitung

Software	Hersteller	Verwendungszweck
Bruker HyStar, Version 3.2	Bruker Daltonik	HPLC-Steuerung
ChemDraw	Perkin Elmer Informatics Inc.	Zeichnen chemischer Strukturformeln
Chromleon, Version 6.8	Thermo Scientific Fisher	HPLC-Steuerung
Circos (0.67-7) [193]	Martin Krzywinski, Canada's Michael Smith Genome Sciences Centre	Zirkuläre Darstellung von Vernetzungsprodukten
Clustal Omega	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>	Gegenüberstellung von Aminosäuresequenzen

## Material

ICC CLASS [194]	Creative Molecules Inc. <a href="http://www.creativemolecules.com/CM_Software.htm">http://www.creativemolecules.com/CM_Software.htm</a>	Extraktion der D <sub>0</sub> /D <sub>12</sub> Signale
MeroX, Version 1.6.0.1-2.0 beta 5 [153]	Dr. Michael Götze, MLU Halle-Wittenberg	Identifizierung von Vernetzungsprodukte von Peptiden
MP-SPR Navi Control 4.3.3	BioNavis	Steuerung & Kontrolle der SPR-Messung
MP-SPR Navi Data Viewer 4.3.3	BioNavis	Export der SPR-Messungen
Orbitrap Fusion Tune	Thermo Scientific Fisher	Bedienung des Massenspektrometers
Q Exactive Plus Tune	Thermo Scientific Fisher	Bedienung des Massenspektrometers
OriginPro 2018	Northampton, MA	Erstellen von Graphen
Proteome Discoverer 2.0 und 2.5	Thermo Scientific Fisher	Datenbanksuche, Auswertung der LC/MS/MS Rohdaten
ProtParam	<a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>	Berechnung des Extinktionskoeffizienten und pI-Wertes
PyMOL 0.99rc6	DeLano Scientific <a href="https://pymol.org/">https://pymol.org/</a>	Graphische Darstellung von 3D-Proteinstrukturen
Quantity One, Version 4.6.2	Bio-Rad	Dokumentierung von Gelen
SnapGene	GSL Biotech	Graphische Darstellung und Auswertung von DNA-Sequenzen
Skyline 20.1.0.155 [195]	MacCoss Lab, Universität Washington	Auswertung der Quantifizierungs- & Aktivitätsmessungen
StavroX, Version 3.6.0.1 [152]	Dr. Michael Götze, MLU Halle-Wittenberg	Identifizierung von Vernetzungsprodukte von Peptiden
UNICORN	GE Healthcare	Steuerung der ÄKTA-Systeme
TraceDrawer 1.8	Ridgeview Instruments AB	Auswertung der SPR-Daten
Xcalibur, Version 4.0.27	Thermo Fisher Scientific	Steuerung der LC/MS/MS-Orbitrap-Systeme, Analyse, Extraktion der LC/MS/MS-Rohdaten

## 4 Methoden

Für alle Arbeiten wurde Milli-Q-Wasser verwendet.

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Lagerung der Kulturstämme

##### 4.1.1.1 *E. coli*-Stämme

BL21 (DE3) *E. coli*-Einzelkolonien wurden für einige Wochen auf selektiven LB-Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt. Zur längerfristigen Lagerung bei -80 °C wurden von den *E. coli*-Stämmen Glycerin-Kryokulturen hergestellt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium, welches das jeweilige Antibiotikum enthielt, mit einer Einzelkolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes inokuliert. Die *E. coli*-Kultur wurde anschließend bei 37 °C und 110 Upm bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 inkubiert. Für die Herstellung eines 1 ml Kryo-Stammlösungen/Suspensionen wurden 920 µl *E. coli*-Kultur mit 80 µl Glycerin versetzt und vor dem Einfrieren geschüttelt.

##### 4.1.1.2 HEK 293-Zellstämme

Zur Herstellung von Kryokulturen wurden die HEK 293-Zellen einer konfluenten 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche im DMEM-Medium (siehe 3.9 und 4.2.3.1) resuspendiert und bei 1.200 x g und 20 °C für 3 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 4,5 ml FBS oder 4,5 ml DMEM unter Zugabe von 0,5 ml DMSO aufgenommen. Pro Kryostock wurde 1 ml der Zellsuspension verwendet und anschließend über Nacht bei -80 °C eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

#### 4.1.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die chemokompetenten *E. coli*-Zellen standen, hergestellt nach dem Protokoll von Sambrook und Russell [196], zur Verfügung. Zur Transformation wurde ein 50 µl-Kryokultur-Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen 10 min auf Eis aufgetaut, mit 2-5 µl Plasmid-DNA versetzt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen von 45 s und für DH5α *E. coli*-Zellen von 90 s erfolgte eine weitere Inkubation von 3 min auf Eis. Danach wurden 400 µl SOC-Medium hinzugegeben und die *E. coli*-Kultur wurde bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Abschließend wurde die Kultur auf selektivem LB-Agar-Medium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 4.1.3 Plasmid-DNA-Isolation

Für die Plasmid-DNA-Isolation wurden 5 ml-LB-Übernachtskulturen von *E. coli* BL21 (DE3)- oder DH5 $\alpha$ -Zellen bei 37 °C hergestellt. Nach der Zellernte bei 13.000 x g für 5 min wurden die Plasmide nach dem Herstellerprotokoll des Gene JET Plasmid Miniprep-Kit (Thermo Fisher Scientific) aus den Zellen isoliert und in 25  $\mu$ l 10 mM TRIS/HCl (pH 8,5) aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des UV/VIS-Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm.

### 4.1.4 Plasmid-DNA-Spaltung

Zur Plasmid-DNA-Spaltung wurden 2,5 bis 7,5 ng Plasmid und 1 U der Restriktionsenzyme NdeI und EcoRI in Anwesenheit von 1-fachem *CutSmart*-Puffer verwendet. Die Inkubation wurde bei 37 °C für zwei Stunden durchgeführt und nachfolgend die Endonukleasen durch Inkubation bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Um anschließend eine Re-Ligation zu verhindern, wurde die DNA mithilfe der rekombinanten *shrimp* Alkalischen Phosphatase (rSAP) durch Inkubation bei 37 °C für 30 min dephosphoryliert. Eine erfolgreiche und vollständige Linearisierung wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 4.1.6) überprüft.

### 4.1.5 Ligation

Die Reaktionsansätze der Plasmid-DNA-Spaltung, sowohl mit linearisiertem Zielvektor als auch mit geschnittenem DNA-Fragment, wurden in einem molaren Vektor/Fragment-Verhältnis von 1:3 und 1:6 im höheren femtomol-Bereich für die Ligation verwendet. Hierzu wurde 1  $\mu$ l T4 DNA-Ligase gemeinsam mit T4 DNA-Ligase-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l eingesetzt und bei 20 °C für zwei Stunden inkubiert. Die erfolgreiche Ligation wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 4.1.6) analysiert und die ligierten Plasmide in DH5 $\alpha$  *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 4.1.2).

### 4.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse der DNA erfolgte mithilfe der Agarosegelelektrophorese. Zur Herstellung der Agarosegele wurde 1 g Agarose in 100 ml 1-fachem TAE-Puffer durch Erwärmung aufgelöst. 5  $\mu$ l Probe und Marker wurden mit 1  $\mu$ l 6-fachen Probenpuffer versetzt und in die Proben-taschen des Gels überführt. Zur elektrophoretischen DNA-Auftrennung wurde eine Spannung von 200 V und zur anschließenden Detektion wurde UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm verwendet.

### 4.1.7 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der in den verwendeten *E. coli*-Zellkulturstämmen enthaltenen Plasmid-DNA wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurden 12 µl DNA-Plasmid-Präparation (siehe 4.1.3) mit einer Konzentration von 80-100 ng/µl benötigt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Microsynth SeqLab mithilfe von T7-Primern und die Ergebnisse wurden mit der Software SnapGene ausgewertet.

## 4.2 Zellbiologische Methoden

### 4.2.1 Produktion von GCAP-2 in *E. coli*

Für die Genexpression des bovinen GCAP-2-Proteins mit *N*-terminaler Myristoylierung wurde der pET-11a Vektor mit dem pBB131-Plasmid [197], das für die *N*-Myristoyltransferase I der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kodiert, in BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen koexprimiert. Der hierfür benötigte *E. coli*-Zellkulturstamm wurde von Prof. Daniel Huster, Universität Leipzig, zur Verfügung gestellt. Die *E. coli*-Zellen wurden als Kryo-Stammlösungen/Suspensionen gesichert und bei -80 °C gelagert, um sie für weitere Expressionen einsetzen zu können. Die Expression erfolgte in LB-Medium in Anwesenheit von Kanamycin (30 µg/ml) und Carbenicillin (100 µg/ml) nach dem Protokoll von Schröder *et al* [198]. Zunächst wurde eine 50 ml-Kultur mit *E. coli*-Zellen inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Kultur wurden zwei 1L-Kulturen inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe der Myristinsäure (60 µg/ml, gelöst in Ethanol) erfolgte bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4. Beim Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 wurde die Genexpression mit 1 mM IPTG induziert, welche bei 37 °C für vier Stunden erfolgte. Abschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 4.000 x g und 4°C für 30 min sedimentiert und bis zur anschließenden Proteinreinigung bei -20 °C gelagert.

Die Genexpression des bovinen GCAP-2-Proteins mit einem *N*-terminalen His-Tag wurde mit dem pET-28a-His-GCAP-2-Vektor in B21 (DE3) *E. coli*-Zellen durchgeführt. Die Produktion dieser GCAP-2-Variante erfolgte analog zum myristoylierten GCAP-2 ohne Zugabe der Myristinsäure. Die Vorgehensweise für die Produktion des bovinen GCAP-1-Proteins mit *N*-terminaler Myristoylierung in *E. coli*-Zellen war identisch zur Genexpression der myristoylierten GCAP-2-Variante. Der hierfür benötigte Zellkulturstamm wurde von Prof. Teresa Duda, Salus Universität (USA), bereitgestellt.

### 4.2.2 Photo-Methionin-Einbau in GCAP-2

Nach dem etablierten Protokoll von Piotrowski *et al.* [171] wurde der Einbau von Photo-Methionin in das myristoylierte GCAP-2-Protein verwendet. Hierzu erfolgte die Kultivierung

der *E. coli*-Zellen in Minimalmedium (siehe 3.9). Die Produktion des myristoylierten GCAP-2 wurde, wie in 4.2.1 beschrieben, durchgeführt. Für die Photo-Methionin-Markierung von GCAP-2 wurde zum Zeitpunkt der Expressionsinduktion die Photo-Aminosäure (30 mg/l) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Die Zellen wurden sedimentiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### 4.2.3 Kultivierung der HEK 293-Zelllinie

Die Kultivierung der HEK 293-Zelllinie wurde im Zellkulturlabor von Frau Dr. Cordelia Schiene-Fischer des Instituts für Biochemie der MLU Halle-Wittenberg durchgeführt. Die HEK 293-Zelllinie mit dem stabil transfizierten pIRES-eGFP-GC1-Plasmid wurde von Prof. Daniele Dell'Orco, Universität Verona (Italien), zur Verfügung gestellt und für die stabile Expression der humanen ROS-GC1 verwendet. Die nachfolgend beschriebene Kultivierung der HEK 293-Zellen, die Zellernte und der -aufschluss wurde in Anlehnung an etablierte Protokolle [41, 68, 199] durchgeführt.

#### 4.2.3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der HEK 293-Zellen erfolgte bei 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>, 37 °C und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Hierzu wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), das Glukose und GlutaMAX beinhaltet, zusätzlich mit 10 % (v/v) FBS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin versetzt, welches vor jedem Gebrauch auf 37 °C erwärmt wurde. Des Weiteren erfolgte die Zugabe von Geneticin als Antibiotikum für das stabil transfizierte pIRES-eGFP-GC1-Plasmid in einer Endkonzentration von 50 µg/ml (siehe 3.9).

Zu Beginn wurde, wie in 4.1.1.2 beschrieben, ein hergestellter Kryostock (1 ml Zellsuspension) bei 37 °C aufgetaut und zu 9 ml Medium, das zuvor auf 37 °C erwärmt wurde, hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 1.200 x g für 5 min pelletiert, das Medium abgenommen, das Zellpellet in 5 ml neuem Medium aufgenommen und in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt. Nach 48 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt und zudem wurde bei jedem weiteren Wechsel des Mediums Geneticin hinzugegeben. Sobald die Konfluenz der Kulturflasche erreicht wurde, wurde das Medium entfernt und die adhärenen Zellen durch Spülen mit 4 ml frischem Medium vom Flaschenboden abgelöst. Diese Zellsuspension wurde mit weiteren 8,5 ml Medium in eine neue 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt. Die folgende Subkultivierung erfolgte alle drei bis vier Tage. Hierzu wurden die Zellen im 1:5 (v/v) oder 1:10 (v/v) Verhältnis mit frischem Medium verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt. Alternativ wurde die Subkultivierung beim Erreichen der Konfluenz beendet, indem die Zellen pelletiert wurden.

Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 10 ml auf 37 °C vorgewärmten PBS in Lösung gebracht, bei 500 x g für 5 min sedimentiert und der PBS-Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 4.2.3.2 Abtrennung der unlöslichen Zellfraktion

Das eingefrorene Zellpellet einer 75 cm<sup>2</sup> großen Kulturflasche wurde aufgetaut und in 480 µl Lysepuffer oder alternativ direkt in den Reaktionspuffer II für die Vernetzungsexperimente resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 20 µl der Stammlösung des Protease-Inhibitor-Cocktails *cOmplete* (25 x) und eine Inkubation von 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mithilfe einer 1 ml-Spritze (Ø 0,5 mm) durch 10- bis 15-maliges Auf- und Abziehen lysiert. Dem Zellysate wurden 0,5 µl Benzonase zur DNA-Spaltung hinzugegeben, weitere 30 min auf Eis inkubiert und zu 100 µl aliquotiert. Um die unlösliche Fraktion mit der enthaltenen ROS-GC1 für die Optimierung der Proteinspaltung in Lösung oder für die Aktivitätsbestimmung abzutrennen, wurden die Aliquots bei 13.000 x g für 20 min zentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde für die weitere Analyse verwendet. Für den Aktivitätstest der ROS-GC1 wurde das Pellet eines Aliquots in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Alternativ wurde 100 µl Zellysate vor dem Zentrifugationsschritt für die Vernetzungsexperimente verwendet.

## 4.3 Proteinbiochemische Methoden

Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Für die Arbeit mit Photo-Methionin-markiertem GCAP-2 wurde die Lichteinstrahlung vor den Vernetzungsexperimenten minimiert, indem braune oder mit Alufolie abgedunkelte Reaktionsgefäße verwendet wurden, um eine frühzeitige Reaktion des Photo-Methionins zu verhindern. Die Einschlusskörperchen-Präparation, Rückfaltung und Reinigung von GCAP-1 wurde analog zu GCAP-2 durchgeführt.

### 4.3.1 Einschlusskörperchen-Präparation und Rückfaltung der GCAP-2-Varianten

Die Proteingewinnung der folgenden GCAP-2-Varianten wurde in Anlehnung an das Protokoll von Schröder *et al.* [198] durchgeführt. Da GCAP-2 unlöslich in den Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*, IBs) der *E. coli*-Zellen vorlag, erfolgte eine IB-Präparation und Solubilisierung gemäß dem Protokoll von Rudolph *et al.* [200]. Es wurden ca. 5 g der *E. coli*-Zellen in 40 ml IB-Puffer I resuspendiert. Der Puffer wurde mit einer *cOmplete* Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette versetzt, die der Inhibierung von Proteasen diente und somit den Proteinabbau verhinderte. Die Zellsuspension wurde mithilfe eines Gewebehomogenisators



vorbereitet, bevor die Zellen mittels Hochdruck-Zellaufschlusssystem bei 2,5 MPa innerhalb von zwei Zyklen aufgeschlossen wurden. Danach wurden 250 U Benzonase zum Abbau von DNA und RNA hinzugegeben und der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20 ml IB-Puffer II zugesetzt, weitere 30 min auf Eis inkubiert und die lösliche Proteinfraction durch Zentrifugation bei 15.000 x g für 20 min abgetrennt. Das unlösliche GCAP-2 in den IBs wurde hierbei pelletiert. Um Triton X-100 möglichst vollständig aus der IB-Präparation zu entfernen, wurde das Pellet in 40 ml Waschpuffer aufgenommen und bei 15.000 x g für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt. Zur IB-Solubilisierung wurden ca. 250 mg des IB-Pellets in 40 ml Solubilisierungspuffer aufgenommen und unter leichtem Rühren bei 4 °C für mindestens zwei Stunden resuspendiert. Die nicht solubilisierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 15.000 x g für 20 min abgetrennt. Der lösliche Überstand, welcher denaturiertes GCAP-2 enthielt, wurde zur Proteinrückfaltung in einen Dialyseschlauch überführt und jeweils gegen 700 ml Dialysepuffer I unter leichtem Rühren dialysiert. Der Puffer wurde fünfmal gewechselt und abschließend wurden die ausgefallenen Proteine bei 15.000 x g für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand enthielt das zurückgefaltete GCAP-2 und wurde für die folgende Proteinreinigung verwendet.

### **4.3.2 Proteinreinigung**

Zur Proteinreinigung wurde das ÄKTA-Chromatographiesystem Pure verwendet. Die Reinigungsschritte wurden anhand der UV-Absorption bei 280 nm aufgezeichnet.

#### **4.3.2.1 GCAP-2-Varianten ohne und mit eingebautem Photo-Methionin**

Die Reinigungsstrategie enthielt zwei Trennschritte, die Anionenaustauschchromatographie und Größenausschlusschromatographie. Die Ionenaustauschchromatographie (*ion exchange*, IEX) wurde mit zwei miteinander verbundenen 1 ml-HiTrap Q Sepharose-Säulen bei einer Flussrate von 1,0 ml/min durchgeführt. Nach Äquilibrierung mit 10 ml Bindepuffer wurde der Überstand des Rückfaltungsansatzes über die Säule geleitet, sodass GCAP-2 an die Matrix gebunden werden konnte. Daran wurde ein Waschschrift mit 15 ml IEX-Bindepuffer angeschlossen. Hierzu wurde der Anteil des IEX-Elutionspuffers mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % innerhalb von 20 ml gesteigert und abschließend ein 5 ml-Schritt bei 100 % angeschlossen. Die Elution erfolgte in 2 ml-Fractionen.

Im zweiten Schritt wurde für die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) als Säule eine HiLoad 16/600 Superdex 75 pg verwendet, die mit 120 ml SEC-Fließmittel I äquilibriert wurde. Es wurden 2 ml der GCAP-2-IEX-Elutionsprobe

auf die Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate 1 ml/min. Neben der Isolation des GCAP-2 Monomers konnte gleichzeitig die Salzkonzentration durch den Pufferaustausch reduziert werden. Die 1 ml-Fractionen des GCAP-2-Monomers wurden vereinigt, konzentriert (siehe 4.3.3) und bei -20 °C bis zur chromatographischen Abtrennung der nicht-myristoylierten GCAP-2-Variante gelagert.

### **4.3.2.2 Chromatographische Abtrennung von GCAP-2 ohne Myristoylierung**

Zur Isolierung der myristoylierten GCAP-2-Spezies wurde eine chromatographische Abtrennung der nicht-myristoylierten Variante mittels des HPLC-Systems Agilent 1200 bei 1,0 ml/min durchgeführt. Hierzu wurde eine Umkehrphasen-C8-Trennsäule mit Fließmittel I äquilibriert und die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % Fließmittel II. Die eluierende, myristoylierte Spezies wurde manuell fraktioniert. Danach wurde das Fließmittel der Proteinfraction vollständig verdampft und die Proteine wurden erneut in dem Solubilisierungspuffer aufgenommen. Nach 15 min Ultraschallbehandlung wurde der Rückfaltungsprozess mit dem Dialysepuffer II, wie in 4.3.1 beschrieben, wiederholt. Abschließend wurde die Proteinlösung konzentriert und bei -20 °C gelagert. Die Reinheit der Proteinlösung wurde durch Messung des intakten Proteins mittels Nano-ESI/MS überprüft (siehe 4.5.1).

### **4.3.2.3 GCAP-2-Variante mit N-terminalem His-Tag**

Die Reinigung der GCAP-2-Variante mit N-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag erfolgte bis zur Anionenaustauschchromatographie, wie in 4.3.2.1 beschrieben. Anstatt einer Größenausschlusschromatographie wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Nickel-Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung einer 5 ml-HisTrap-Säule, die mit IMAC-Puffer I äquilibriert wurde, durchgeführt. 4 ml des eluierten GCAP-2 bei der Anionenaustauschchromatographie wurden mit 1 ml/min auf die Säule geleitet. Für die Elution wurde der Anteil des IMAC-Elutionspuffers linear innerhalb von 30 ml auf 55 % gesteigert, gefolgt von 10 ml bei 55 % und weitere 10 ml bei 100 %. Die GCAP-2 enthaltenen 1 ml-Fractionen wurden vereinigt, mit Lagerpuffer I gewaschen und konzentriert. Die Lagerung der Aliquote erfolgte bei -80 °C.

### **4.3.3 Pufferaustausch und Konzentrierung**

Für den Pufferwechsel und die Konzentrierung der Proteinlösungen wurden Amicon-Zentrifugationsfiltereinheiten mit einem Füllvolumen von 0,5 ml oder 15 ml, die ein *cut-off* eines Molekulargewichts von 30 kDa aufwiesen, benutzt. Die 10- bis 20-minütigen Zentrifugationsschritte wurden für die 0,5 ml-Filtereinheiten bei 13.000 x g und für die 15 ml-Einheiten bei

5.000 x g durchgeführt. Zunächst wurden die Filter mit mindestens einem Füllvolumen äquilibriert, die Proteinlösung auf 1/10 des maximalen Volumens verringert und danach mit dem frischen Puffer auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Dieser Verdünnungsschritt wurde sechsmal wiederholt, um einen effektiven Pufferwechsel zu erzielen. Zur Konzentrierung der Proteinlösung auf das gewünschte Zielvolumen wurde die Dauer des letzten Zentrifugationsschritts entsprechend angepasst.

### **4.3.4 Acetonpräzipitation**

Eine Alternative zu 4.3.3, um das Puffersystem zu wechseln und gleichzeitig Detergenzien zu entfernen, ist die Proteinfällung durch Aceton. Die Proteinlösung wurde mit dem vierfachen Volumen an eiskalter Aceton-Fällungslösung I gemischt und anschließend über Nacht bei -20 °C inkubiert. Das Protein-Aceton-Gemisch wurde bei 13.000 x g für 20 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde erneut in eiskalter Aceton-Fällungslösung II resuspendiert, zwei Stunden bei -20 °C inkubiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach dem Trocknen des Pellets konnte dieses im gewünschten Puffer mit entsprechendem Volumen aufgenommen werden.

### **4.3.5 Peptid-/ Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Peptid-/Proteinkonzentration wurde durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm mithilfe des NanoDrop-Gerätes ermittelt. Zur Berechnung der Konzentration wurde der molare Extinktionskoeffizient des Proteins in der Anwesenheit reduzierter Cysteine, der mittels ProtParam/ExPASy-Tool bestimmt wurde, verwendet. Alternativ wurde die Proteinkonzentration des HEK-Zelllysats mittels Bradford-Methode nach Herstellerangaben des Bio-Rad Protein-Assays durchgeführt. Eine Kalibriergerade von bovinem Serumalbumin (BSA) wurde zum Vergleich genutzt [201].

### **4.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Analyse der Proteine erfolgte mit der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem apparenten Molekulargewicht. Dafür wurde die zu analysierende Proteinlösung mit zweifach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer, der vor dem Gebrauch mit 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt wurde, in einem 1:1 (v/v) Verhältnis gemischt und bei 95 °C 5 min erhitzt. Je nach dem in der Probe enthaltenen Proteinen wurden für die Analyse 10 %-, 12 %- oder 15 %-ige (w/v) Acrylamid-Trenngele verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 2 dargestellt ist. Alternativ kamen kommerzielle Gradientengele (4-20 %) zum Einsatz (siehe 3.3).

## Methoden

Tabelle 2: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.

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

Nach Überführung der Proben sowie einem geeigneten Proteinmarker-Gemisch in die Geltaschen wurde zur Gelelektrophorese eine Spannung von 200 V für 50 min angelegt. Die anschließende Gelfärbung mit Coomassie-Färbelösung erfolgte bei Raumtemperatur unter Schütteln für mindestens eine Stunde. Nach dem Entfernen der Färbelösung wurde das Gel mit Wasser gespült und bis zur gewünschten Visualisierung der Proteinsignale bei Raumtemperatur in der Entfärbelösung geschwenkt. Abschließend wurden die Gele bis zur Dokumentation und nachfolgender Proteolyse im Gel in Wasser gelagert.

### 4.3.7 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Zur Charakterisierung der GCAP-2/ROS-GC1-Peptid-Interaktionen wurde die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) verwendet. Die SPR-Messungen am MP-SPR Navi 200 OTSO-System (BioNavis) wurden mit planaren 2D-Carboxymethyl-dextran-beschichteten (CMD)-Sensorchips bei einer Flussrate von 30 µl/min und bei 22 °C durchgeführt und bei einer Wellenlänge von 670 nm verfolgt. Die GCAP-2-Immobilisierung als auch die Interaktionsanalysen erfolgten mit SPR-Puffer I. GCAP-2 wurde durch die Reaktion von freien Aminen der Aminosäureseitenketten mit NHS-Estern auf der Chipoberfläche immobilisiert. Hierzu wurde die Sensoroberfläche mit einer frisch hergestellten 0,4 M EDC/ 0,1 M NHS-Lösung mit je zwei 250 µl-Injektionen aktiviert. Anschließend wurde eine 5 µM GCAP-2-Lösung, die zuvor in SPR-Puffer II verdünnt worden war, für die Immobilisierung zweimal über die CMD-Sensoroberfläche in der Probenzelle geleitet. Dieser Schritt wurde für eine optimale Bindung von GCAP-2 wiederholt. Freie NHS-Ester-Gruppen wurden mit 1 M Ethanolamin-Lösung (pH 8,5) deaktiviert. Für die Affinitätsmessungen wurden die ROS-GC1-Peptide in folgenden Endkonzentrationen im SPR-Puffer I verdünnt: 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 10 µM, 20 µM und 40 µM (ROS-GC1-Peptid 1 und 2) und 5 µM, 10 µM, 20 µM und 40 µM (ROS-GC1-Peptid 3). Die Injektionszeit betrug bei einer

Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  jeweils 420 s. Zwischen den Peptidinjektionen erfolgten Regenerationsschritte mit jeweils 250  $\mu\text{l}$  SPR-Puffer III. Zur Bestimmung der  $K_D$ -Werte diente die Software *TraceDrawer*.

### 4.3.8 Fluoreszenzspektroskopie

Um die Bindungsaffinität von GCAP-2 zu den ROS-GC1-Peptiden zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzmessungen am Spektrofluorometer FP-8200 (Jasco) in Zusammenarbeit mit Dr. Ralph Golbik (Abteilung Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt. Dieses Spektrofluorometer war ausgestattet mit dem Mini-Zirkulationsbad MCB-100, das für eine konstante Temperatur von 20 °C sorgte. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm und die Fluoreszenzemission wurde bei 350 nm aufgezeichnet. Für die Messungen wurde GCAP-2 mit steigenden ROS-GC1-Peptid-Konzentrationen in 20 mM HEPES (pH 7,5) gemischt. Die ROS-GC1-Peptide wurden im äquimolaren Verhältnis und in folgenden Überschüssen zu GCAP-2 eingesetzt: Peptid 1 und 3 im 2-, 4-, 10-, 16-, 20-, 30-fachem Überschuss und Peptid 2 im 2,5-, 4-, 5-, 10-, und 20-fachem Überschuss. Als Negativkontrollen wurden getrennte Messungen mit *N*-Acetyl-L-tryptophanamid im Konzentrationsbereich von 5  $\mu\text{M}$  bis 300  $\mu\text{M}$  und *N*-Acetyl-L-tyrosinamid im Konzentrationsbereich von 2  $\mu\text{M}$  bis 150  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen der Kontrollen entsprachen der Zusammensetzung der Tryptophan- und Tyrosinresten bei den jeweiligen Peptidkonzentrationen. Somit konnte eine Veränderung der Fluoreszenzintensität aufgrund der Eigenfluoreszenz der Peptide ausgeschlossen werden.

### 4.3.9 ROS-Präparation

Die Präparation des Sehstäbchenaußensegments (*rod outer segment*, ROS) wurde von Prof. Karl-Wilhelm Koch (Abteilung Biochemie, Universität Oldenburg) in Lagerpuffer II zur Verfügung gestellt. Die ROS-Präparation enthielt die native, bovine Form der ROS-GC1. Sie wurde aus der Retina von Rinderaugen, die lokale Schlachthöfe bereitstellten, nach etabliertem Protokoll präpariert [202, 203]. Alternativ wurde die ROS-Präparation bei der Firma *In Vision Biosciences* (Seattle, USA) gekauft. Photometrisch wurde bei 498 nm anhand des molaren Extinktionskoeffizienten von 40.000  $1/(\text{M} \times \text{cm})$  eine Rhodopsin-Konzentration von 3,65 mg/ml in der bereit gestellten ROS-Präparation ermittelt [61].

### 4.3.10 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation mithilfe des ROS-GC1-Antikörper B7 der humanen Spezies (monoklonal) konnte die bovine Vollängen-ROS-GC1 aus der ROS-Präparation (siehe 4.3.9) angereichert werden. Hierzu wurden die magnetischen *Dynabeads* Protein G genutzt. Diese

## Methoden

besitzen auf der Oberfläche Protein G, an das der ROS-GC1-Antikörper immobilisiert werden konnte. Durch Anlegen eines Magneten wurden die *beads* an einer Stelle des Reaktionsgefäßes gesammelt und der klare Überstand entfernt. Hierzu wurden 30 µl der *Dynabeads* Protein G-Suspension (30 mg/ml) verwendet, die zunächst zweimal mit jeweils 500 µl Reaktionspuffer III gewaschen wurden. Ein Waschschrift bestand aus dem Resuspendieren der *beads* in frischem Puffer und der nachfolgenden Abnahme des Überstandes mithilfe eines Magneten. Nach der zweiten Pufferabnahme wurden die *beads* mit 15 µl ROS-GC1-Antikörper (200 µg/ml) gemischt und anschließend in einem Überkopfschüttler bei RT für eine Stunde oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschschriffe mit 500 µl Reaktionspuffer III. Zur Anreicherung der ROS-GC1 über den Antikörper an die *beads* wurden zunächst 20 µl der ROS-Präparation in 250 µl Reaktionspuffer III aufgenommen und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der ROS-Präparation mit den *beads* bei RT im Überkopfschüttler für eine Stunde. Abschließend wurden drei weitere Waschschriffe mit 500 µl Reaktionspuffer III angefügt, bevor die *beads* mit gebundenem ROS-GC1 erneut in den Reaktionspuffer III für die folgenden chemischen Vernetzungsexperimente oder direkt für die Proteolyse in Lösung in Denaturierungspuffer IV resuspendiert wurden.

### 4.3.11 ROS-GC1-Aktivitätsassay

Der Aktivitätsnachweis der ROS-GC1 aus der HEK 293-Zellmembranfraktion sowie der ROS-Präparation erfolgte in Anlehnung an die Protokolle der Arbeitsgruppe Koch [41, 204], bei dem der Umsatz von GTP zu cGMP detektiert wurde. Der Reaktionsansatz bestand aus Aktivitätspuffer (1 x), 10 mM IBMX-Lösung, 2 mM GTP und wurde mit entsprechendem Volumen Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Für die Kontrollexperimente wurde gleichzeitig 2 mM isotope-markiertes  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -GTP und 2 mM cGMP eingesetzt. Die ROS-GC1-Aktivierung durch GCAP-2 wurde durch Zugabe von 1 µM His-GCAP-2 überprüft. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl ROS-Präparation oder 5 µl HEK 293-Zellmembranpräparation gestartet und es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 5 oder 10 min. Danach wurde die Stopplösung im 1:1 Verhältnis (v/v) zum Volumen des Reaktionsansatzes hinzugegeben und die Proteine bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 3 min pelletiert und der Überstand mittels *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) am XevoTQD-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer im Hinblick auf die gebildeten Produkte analysiert (siehe 4.5.3).

### 4.3.12 Enzymatische Proteolyse im Gel

Die Probenvorbereitung für die enzymatische Proteolyse im Gel wurde unter einer Sterilbank bei Raumtemperatur mit Ärmelschonern und Handschuhen durchgeführt, um eine Kontamination der Proben mit Keratin zu reduzieren. Vor dem Gebrauch wurden alle benötigten Lösungen frisch hergestellt. Die Gelbanden der zu analysierenden Proteinsignale wurden in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Würfel geschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zunächst wurden die Gelstückchen mit 500 µl Acetonitril (ACN) für 10 min gewaschen, der Überstand wurde abgenommen und 50 µl der 10 mM Dithiothreitol (DTT)-Lösung I wurde zur Reduktion der Cysteine hinzugegeben. Hierzu erfolgte eine Inkubation bei 56 °C für 30 min. Ein weiterer Waschschriff mit 500 µl ACN wurde für 10 min angeschlossen. Im nächsten Schritt wurden die Cysteine durch Zugabe einer 55 mM Iodacetamid (IAA)-Lösung I im Dunkeln 20 min alkyliert. Anschließend wurden die Gelstückchen erneut mit 500 µl ACN inkubiert. Zur Proteolyse wurde eine Kombination der Proteasen Glu-C und Trypsin verwendet (siehe 3.13). Hierfür wurde zuerst Glu-C in einem 1:20 Enzym/Protein-Verhältnis (*w/w*) hinzugegeben und die Gelstückchen wurde mit 20 mM Ammoniumbicarbonat (NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>)-Lösung bedeckt. Nach einer Stunde Inkubation bei 4 °C erfolgte eine erneute Zugabe von 20 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>, so dass sich die Gelstückchen vollständig in Lösung befanden. Die Glu-C-Proteolyse erfolgte bei 37 °C über Nacht. Danach wurde eine Proteinspaltung mit 250 ng Trypsin für vier Stunden angeschlossen. Durch Zugabe der Extraktionslösung mit doppeltem Probenvolumen wurde die Proteolyse beendet. Gleichzeitig wurden die entstandenen Peptide während einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C aus der Gelmatrix extrahiert. Durch die Wiederholung des Extraktionsschrittes sollte eine effektive Peptidextraktion erzielt werden. Für die folgende massenspektrometrische Analyse wurde das Volumen des Peptidgemisches auf 40 µl mithilfe eines Vakuumkonzentrators verringert.

### 4.3.13 Enzymatische Proteolyse in Lösung

Die Probenvorbereitung für eine enzymatische Proteolyse in Lösung erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie in 4.3.12 beschrieben. Die Denaturierung von 15 µl einer GCAP-2/ROS-GC1-Peptid-Lösung erfolgte durch Zugabe von 2,4 µl einer 20 %igen (*w/v*) Natriumdesoxycholat (NaDOC)-Lösung und Inkubation von 5 min im Ultraschallbad. Durch Zugabe der DTT-Lösung II (4 mM Endkonzentration) und einer Inkubation bei 56 °C von 30 min wurden die Cysteine reduziert. Im nächsten Schritt wurden zur Cysteinalkylierung IAA-Lösung II mit einer Endkonzentration von 8 mM verwendet und der Ansatz wurde für 20 min im Dunkeln inkubiert. Das Probenvolumen wurde 1:1 (*v/v*) mit Wasser vor Zugabe von

Glu-C (1:20 (w/w) Protease/Protein-Verhältnis) verdünnt, um die Konzentration von NaDOC auf 1 % (w/v) zu reduzieren und somit Einflüsse auf die Proteaseaktivität auszuschließen. Für die Proben der Vernetzungsreaktion mit Photo-Methionin wurde die Protease Asp-N (1:50 (w/w) Protease/Protein-Verhältnis) statt Glu-C verwendet (siehe 3.13). Der erste Schritt der Proteinspaltung erfolgte über Nacht bei 37 °C. Anschließend wurden zusätzlich 250 ng Trypsin hinzugegeben und die Mischung wurde für weitere vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe von 5 µl einer 10 %igen (v/v) Trifluoressigsäure (TFA)-Lösung führte zur Deaktivierung der Proteasen und Fällung von NaDOC als farbloser Niederschlag. Die Abtrennung des NaDOC erfolgte durch Zentrifugation bei 14.000 x g für 10 min. Der klare Überstand der Peptidmischung wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Fällungsschritt wiederholt. Anschließend wurden 40 µl der Peptidmischung zur LC/MS/MS-Analyse injiziert.

### **4.3.13.1 Identifizierung von ROS-GC1 aus dem HEK 293-Zellysat**

Die membranständige ROS-GC1 befand sich in der unlöslichen Zellfraktion des HEK 293-Zellysats. Wie in 4.2.3.2 beschrieben, wurde diese Membranfraktion durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert und isoliert. Zur Optimierung der Proteolyse in Lösung wurde das erhaltene Pellet in jeweils 200 µl Denaturierungspuffer aufgenommen. Es wurden verschiedene Protokolle zur Proteolyse der ROS-GC1 in Lösung getestet, um eine möglichst hohe Sequenzabdeckung von ROS-GC1 aus dem HEK 293-Zellysat zu erzielen.

Neben dem angegebenen Protokoll für die enzymatischen Proteolyse in Lösung (siehe 4.3.13) wurde für die Denaturierung anstelle von NaDOC 8 M Harnstoff oder 6 M Harnstoff in Kombination mit 2 M Guanidiniumchlorid verwendet (siehe Denaturierungspuffer I/II in 3.6) und die Ansätze wurden bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Der Reduktions- und Alkylierungsschritt wurde, wie in 4.3.12 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die denaturierten Proteine durch Acetonfällung präzipitiert (siehe 4.3.4), das Pellet wurde in 25 µl des jeweiligen Denaturierungspuffer aufgenommen und die Harnstoffkonzentration mit Wasser auf 0,4 M verdünnt. Die Proteolyse erfolgte mit einem 1 µg Trypsin bei 37 °C über Nacht. Durch die Zugabe von 5 µl 10 % iger (v/v) TFA-Lösung wurde die Proteinspaltung beendet und die Peptidmischungen auf ein Volumen von 40 µl zur massenspektrometrischen Analyse konzentriert.



### *I) FASP-Protokoll (Filter-Aided Sample Preparation) [191]*

Das Zellmembranpellet (siehe 4.2.3.2) wurde in 200 µl Denaturierungspuffer I oder III aufgenommen, erwärmt und gemischt, bis es sich vollständig löste. Für den Ansatz mit Denaturierungspuffer III folgte eine Acetonpräzipitation, um SDS zu entfernen (siehe 4.3.4). Anschließend wurde das gewaschene und getrocknete Pellet direkt in 200 µl Denaturierungspuffer IV aufgenommen. Danach erfolgte die Proteinspaltung mithilfe der 0,5 ml-Amicon-Zentrifugenröhren (30 kDa *cut-off*) gemäß dem bestehenden Protokoll [191]. Die Proteolyse wurde mit 1 µg Trypsin in einer Feuchtkammer bei 37 °C über Nacht durchgeführt.

### *II) SCAD-Protokoll (Surfactant and Chaotropic Agent-Assisted Sequential Extraction/on-Pellet Digestion) [192]*

Das Pellet der Membranfraktion (siehe 4.2.3.2) wurde in 200 µl Denaturierungspuffer I, III oder VI gelöst und eine Acetonfällung der Proteine wurde durchgeführt (siehe 4.3.4). 20 µl Denaturierungspuffer I wurden zum Proteinpellet gegeben, die Harnstoffkonzentration auf 6 M mit H<sub>2</sub>O verdünnt und anschließend 0,2 µg Lys-C-Protease direkt auf das Pellet für die Inkubation bei 37 °C über Nacht gegeben. Vor der Zugabe von 1 µg Trypsin für die Inkubation bei 37 °C für vier Stunden wurde die Harnstoffkonzentration auf 0,4 M gesenkt, um die vollständige Aktivität von Trypsin gewährleisten zu können.

### *III) ProteaseMAX-Tensid-Protokoll [205, 206]*

Das Protokoll für die Spaltung von Membranproteinen in Lösung wurde nach den Herstellerangaben von Promega angewendet. Zur Denaturierung wurde das ProteaseMAX-Tensid eingesetzt, auch in Kombination mit Harnstoff im Denaturierungspuffer I. Die Proteolyse erfolgte durch Zugabe von einem 1 µg Trypsin bei 37 °C unter Schütteln bei 900 Upm für vier Stunden. Nach Ansäuerung der Probe wurde das Peptidgemisch bei 13.000 x g zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile 5 min zentrifugiert und der klare Überstand wurde zur massenspektrometrischen Analyse verwendet.

#### **4.3.13.2 Quantifizierung von ROS-GC1 in ROS-Präparation**

Die Quantifizierung der ROS-GC1 in der ROS-Präparation wurde mithilfe von zwei isotope markierten Peptiden (siehe 3.12) durchgeführt. Zunächst wurden 2,5 µl der ROS-Präparation nach dem ProteaseMAX-Tensid-Protokoll (Promega, siehe 4.3.13.1, III) zur Proteolyse in Lösung vorbereitet. Vor der Zugabe von 0,1 µg Trypsin wurde die Probe mit jeweils 500 fmol der beiden Peptidstandards versetzt, da bei diesen C-terminal nach dem

isotopenmarkierten Arginin ein mit Trypsin spaltbarer Quantifizierungstag (Q-tag) vorhanden war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  einer 10 % (v/v) TFA-Lösung gestoppt. Nach Zentrifugation bei 13.000 x g für 5 min wurde der gesamte Überstand von 100  $\mu\text{l}$  abgenommen und für die MS-Analyse verwendet (siehe 4.5.4).

### **4.3.13.3 Identifizierung von ROS-GC1 aus ROS-Präparation**

Für die massenspektrometrische Analyse der Immunpräzipitationsansätze der ROS-GC1 aus der ROS-Präparation (siehe 4.3.9 und 4.3.10) erfolgte die Proteolyse in Lösung. ROS-GC1 wurde über den ROS-GC1-Antikörper an den magnetischen *beads* gebunden. Dazu wurden die *beads* in 400  $\mu\text{l}$  Denaturierungspuffer IV resuspendiert und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Anschließend wurde die Probenvorbereitung, die eine Reduzierung und Alkylierung der Cysteine umfasst, gemäß dem FASP-Protokoll [191] durchgeführt. Bei jedem Schritt erfolgte die vollständige Suspension der *beads* in dem jeweiligen Puffer oder der Lösung. Durch das Anlegen des Magneten konnte eine Fokussierung der *beads* erreicht und der entsprechende Puffer entfernt werden. Nach dem Pufferwechsel zu 50 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  wurden die Proben mit 20  $\mu\text{l}$  0,2 % (w/v) ProteaseMAX-Lösung solubilisiert. Die Proteinspaltung mit Trypsin erfolgte wie in dem in 4.3.13.1, III beschriebenen ProteaseMAX-Tensid-Protokoll.

## **4.4 Chemische Vernetzung**

Für jede Vernetzungsreaktion wurde vor dem Gebrauch eine Stammlösung des Vernetzungsreagenz mit wasserfreiem DMSO frisch hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen variierten zwischen 14 und 40 mM, so dass das eingesetzte DMSO im Reaktionsansatz nicht mehr als 10 % (v/v) betrug.

### **4.4.1 Vernetzungsexperimente mit GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden**

Zur Analyse der GCAP-2/ROS-GC1-Peptid-Interaktionen wurden für die Vernetzungsexperimente sowohl die bovine Variante des myristoylierten GCAP-2, als auch die Peptide der bovinen ROS-GC1 verwendet (siehe Abbildung A 5). Wenn nicht anders erwähnt, wurden GCAP-2 und die ROS-GC1-Peptide in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  in Reaktionspuffer I eingesetzt. Die allgemeine Versuchsdurchführung mit den verschiedenen Vernetzungsreagenzien war wie folgt: GCAP-2 wurde zunächst bei Raumtemperatur in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  oder 10 mM EGTA für 10 min inkubiert. Nach Zugabe eines der drei ROS-GC1-Peptide folgte eine weitere 30-minütige Inkubation des Reaktionsansatzes. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Vernetzungsreagenz gestartet, gemischt und die Reaktion nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur abgestoppt. Die Vernetzungsansätze wurden bei -20°C gelagert oder für eine weitere Analyse verwendet. Im Folgenden sind die Details der

## Methoden

Durchführung der verschiedenen Vernetzungsexperimente mit den unterschiedlichen Reagenzien beschrieben.

### *I) Homobifunktionelle, Amin-reaktive Reagenzien DSBU und CDI*

Das Vernetzungsreagenz DSBU wurde mit einem 100-fachem molaren Überschuss zu GCAP-2 verwendet und die Vernetzungsreaktion wurde durch eine  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ -Lösung mit einer Endkonzentration von 20 mM gestoppt. CDI wurde mit 20-fachem molaren Überschuss zu GCAP-2 eingesetzt und die Vernetzungsreaktion wurde mit 0,5 M TRIS/HCl (pH 8,0) beendet.

### *II) Homobifunktionelles, Sulfhydryl-reaktives Reagenz DAU*

Die DAU-Vernetzungsreaktion wurde nur mit ROS-GC1-Peptid 2 durchgeführt, da dieses das einzige Peptid war, welches ein Cystein aufwies. Für die Vernetzungsreaktion wurden 200  $\mu\text{M}$  Benzophenon und 1 mM DAU zum GCAP-2/ROS-GC1-Peptid 2-Gemisch hinzugegeben. Die Vernetzung erfolgte durch UV-A-Bestrahlung ( $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$ ,  $8.000 \text{ mJ/cm}^2$ ) auf Eis. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe einer 5 mM DTT-Lösung gestoppt.

### *III) In GCAP-2 eingebautes Photo-Methionin*

Für die Reaktion mit Photo-Methionin wurden die ROS-GC1-Peptide in einem zehnfach molaren Überschuss zum mit Photo-Methionin markierten GCAP-2 eingesetzt. Die photochemische Vernetzungsreaktion wurde auf Eis durch die Bestrahlung von UV-A-Licht ( $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$ ,  $8.000 \text{ mJ/cm}^2$ ) induziert.

#### **4.4.2 Vernetzungsexperimente der ROS-GC1 im HEK 293-Zelllysat**

Für die Vernetzungsexperimente der humanen ROS-GC1 wurde das HEK 293-Zelllysat (siehe 4.2.3.2) in Reaktionspuffer III verwendet. Hierzu wurde das Reagenz DSBU ausschließlich als nicht deuterierte Variante ( $\text{D}_0$ ) oder als äquimolares Gemisch zusammen mit der zwölfmal deuterierten Variante ( $\text{D}_{12}$ ) verwendet. Bei der Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  His-GCAP-2 wurde der Reaktionsansatz zusätzlich 15 min auf Eis inkubiert. Die Vernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von DSBU mit einer Endkonzentration von 1 mM gestartet. Der 100  $\mu\text{l}$ -Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 M TRIS/HCl (pH 8,8) mit Endkonzentration von 20 mM beendet. Der Reaktionsansatz wurde bei  $13.000 \times g$  für 20 min zentrifugiert und die unlösliche Fraktion, welche die membranständige ROS-GC1 enthielt, wurde für die Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Analyse verwendet.

### 4.4.3 Vernetzungsexperimente der ROS-GC1 aus ROS-Präparation

Es wurden 20 µl der ROS-Präparation pro ROS-GC1-Vernetzungsansatz eingesetzt, mit der zunächst die Immunpräzipitation (siehe 4.3.10) durchgeführt wurde. Für die Vernetzungsexperimente befanden sich die *beads* mit gebundenem Protein in einem Gesamtvolumen von 400 µl. Zum Nachweis des ROS-GC1/GCAP-2-Komplexes wurde zusätzlich zum Reaktionsansatz 1 µM GCAP-1 oder GCAP-2 zugesetzt. Die Vernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 mM DSBU gestartet und erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde, bevor die Reaktion durch Zugabe von 20 mM TRIS/HCl (pH 8,0) beendet wurde.

Die kovalente Fixierung von Proteinen in der ROS-Präparation wurde zusätzlich nach dem Protokoll Subbotin und Chait [176] durchgeführt. Hierzu wurde zusätzlich vor der Immunpräzipitation (siehe 4.3.10) die 3D-Struktur der ROS-GC1 mit 0,05 % (v/v) Glutaraldehyd (1 %ige (v/v) Stammlösung) auf Eis für 5 min fixiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 100 mM TRIS/HCl (pH 8,0). Zur Stabilisierung des ROS-GC1/GCAP-Komplexes wurde zusätzlich 4 µg GCAP-1 oder GCAP-2 zum Reaktionsansatz hinzugegeben und die Mischung wurde für 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Zugabe von 2 mM GTP und Glutaraldehyd erfolgte.

### 4.4.4 Anreicherung von Vernetzungsprodukten

Die Anreicherung der ROS-GC1-Vernetzungsprodukte aus dem HEK 293-Zellysate erfolgte am ÄKTA Pure-System (GE Healthcare) mittels Größenausschlusschromatographie unter Verwendung der SEC-Säule Superdex 30 *Increase* 10/300 GL. Die Peptidmischungen aus den Vernetzungsansätzen (siehe 4.4.2) wurden mittels Proteolyse in Lösung nach dem ProteaseMAX-Tensid Protokoll (siehe 4.3.13.1, III) hergestellt. Vier Peptidmischungen von je 100 µl wurden vereinigt und auf die Säule geleitet. Die Trennung wurde anhand der Absorption bei 214 nm verfolgt. Die Auftrennung der Peptide erfolgte mit SEC-Fließmittel II bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. 500 µl-Fractionen wurden in 1 ml-96-*Deepwell*-Platten gesammelt. Zwölf Fractionen, deren Peptide zwischen 12-18 min eluierten, wurden auf ein Volumen von 50 µl vor der nachfolgenden LC/MS/MS-Analyse konzentriert.

## 4.5 Massenspektrometrische Methoden

### 4.5.1 Nano-ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie

Die Abtrennung des nicht-myristoylierten GCAP-2 wurde durch die Analyse der intakten Proteine am Orbitrap-Fusion-Tribrid Massenspektrometer überprüft. Als Probenvorbereitung dienten ZipTip-Entsalzungsspitzen, um den Puffer und die enthaltenen Salze zu entfernen.

Dazu wurden 7,5 µl der Proteinlösung mit 2,5 µl einer Lösung aus 20 %iger (v/v) ACN und 0,4 % (v/v) Ameisensäure (*formic acid*, FA) versetzt. Die ZipTip-C4-Pipettenspitzen wurden dreimal mit 10 µl ACN äquilibriert. Danach folgten drei Waschschrte von je 10 µl mit einer Lösung aus 5 % (v/v) ACN und 0,1 % (v/v) FA. Zum Binden der Proteine an das C4-Säulenmaterial wurden die ZipTip-Entsalzungssäulen zehnmal mit der zuvor hergestellten Proteinlösung (10 µl) beladen. Danach erfolgten drei weitere Waschschrte von je 10 µl mit 5 % (v/v) ACN/ 0,1 % (v/v) FA. Die Elution wurde in 10 µl einer Lösung aus 80 % (v/v) ACN und 0,1 % (v/v) FA durchgeführt. 5 µl der Probe wurde in eine goldbeschichtete Borsilikat-Kapillare überführt. Die Elektrosprayionisation (ESI) mit einer Spannung von 1,2 bis 1,5 kV bei 275 °C diente der Ionisation der Proteine. Die Massenspektren wurden in einem *m/z*-Bereich von 600 bis 1.800 mit einer Auflösung von 120.000 bei *m/z* 200 aufgenommen.

### **4.5.2 Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS**

Ein Nano-HPLC-System Ultimate 3000 RSLC wurde, gekoppelt mit einem Orbitrap Fusion Tribrid- oder einem Q Exactive Plus-Massenspektrometer, zur Analyse der Peptidgemische verwendet. Hierzu wurde die Analytlösung mit dem Probengeber automatisch mit einer Flussrate von 30 µl/min auf die Vorsäule geladen und für 15 min mit Fließmittel I zur Entsalzung gewaschen. Anschließend wurden die Peptide auf die Trennsäule eluiert, wo die Auftrennung mit 300 nl/min erfolgte. Die Wahl und Länge des Elutionsgradienten war abhängig von der Säule und der Probenzusammensetzung.

#### *I) GCAP-2-Identifizierung und GCAP-2/ROS-GC1-Peptid-Vernetzungsexperimente*

Als Vorsäule wurde eine C8-Umkehrphasensäule (Acclaim PepMap) verwendet. Zur Auftrennung des Peptidgemisches diente eine C18-Umkehrphasensäule (Acclaim PepMap) oder eine selbst-gepackte C18-PicoFrit-Nanospray-Säule (New Objective). Zur Elution wurde der Anteil des HPLC-Fließmittels V von 1 % auf 35 % (v/v) innerhalb von 90 min linear gesteigert, in weiteren 5 min von 35 % auf 85 % (v/v) und abschließend folgten zusätzliche 5 min bei 85 % (v/v).

#### *II) HEK 293-Zelllysate*

Die Peptide, die von der Proteolyse in Lösung des HEK 293-Zelllysates (siehe 4.3.13.1) stammten, wurden zunächst mithilfe einer C18-Vorsäule (Acclaim PepMap) konzentriert und entsalzt. Die Trennung der Peptide erfolgte unter Verwendung einer selbst-gepackten C18-PicoFrit-Nanospray-Säule (New Objective), die zuvor mit 3 % (v/v) Fließmittel V

## Methoden

äquilibriert wurde, mittels eines linearen Gradienten von 3 % auf 40 % (v/v) Fließmittel V. Zur Proteinidentifizierung wurde ein 90 min-Gradient, für die Vernetzungsexperimente ein Gradient von 175 min verwendet. Danach folgten ein 5-minütiger Gradient von 40 % auf 85 % (v/v) sowie weitere 5 min bei 85 % (v/v).

### *III) ROS-Präparation*

Zur Entsalzung einer Peptidmischung, hergestellt aus der ROS-Präparation (siehe 4.3.13.2), wurde die C18-Vorsäule (Acclaim PepMap) verwendet. Die C18- $\mu$ PAC-Trennsäule (PharmaFluidics) diente der Auftrennung der Peptide. Die Trennsäule war mit 3 % (v/v) Fließmittel V äquilibriert. Im ersten Elutionsschritt wurde das Fließmittel V von 3 % auf 10 % (v/v) mit einem konvexen Verlauf innerhalb von 15 min gesteigert. Anschließend folgte ein konkaver Gradient von 10 % bis 30 % (v/v) innerhalb von 345 min, bevor das Fließmittel auf 85 % (v/v) erneut mit einem konkaven Verlauf in 5 min erhöht wurde und 5 min bei 85 % (v/v) folgten.

Die Nano-HPLC war über eine Nano-ESI-Quelle mit dem Massenspektrometer gekoppelt, so dass die eluierten Peptide direkt für die massenspektrometrischen Analysen ionisiert werden konnten. Die Überführung der Peptide in das Massenspektrometer wurde anhand des Totalionenstroms (*total ion current*, TIC) für die komplette Trennung kontrolliert. Es wurden Übersichtsmassenspektren im Bereich von  $m/z$  300-1700 mit einer Auflösung von 120.000 (Orbitrap Fusion) oder 140.000 (Q-Exactive Plus) bei  $m/z$  200 aufgenommen. Die Aufzeichnung der Massenspektren erfolgte im datenabhängigen (*data-dependent*) Modus, bei dem für 5 s Vorläuferionen mit der höchsten Signalintensität, in einem Massenfenster von 2 *Th*, isoliert und fragmentiert wurden. Die Fragmentationenspektren wurden mit einer Auflösung von 15.000 (Orbitrap Fusion) bzw. 17.500 (Q-Exactive Plus) bei  $m/z$  200 aufgenommen. Die Fragmentierung der Vorläuferionen mit Ladungszuständen von drei bis acht erfolgte mittels einer gestuften (*stepped*) HCD-Methode (*higher-energy collision dissociation*), bei der eine normalisierte Kollisionsenergie (*normalized collision energy*, NCE) von  $29/30 \pm 3$  % verwendet wurde. Für die Fragmentierung von Vorläuferionen mit zweifacher Ladung wurde mit 28 % NCE fragmentiert. Um möglichst viele, gering abundante Signale zu fragmentieren, wurden bereits aufgezeichnete Vorläuferionen mit einer maximalen Abweichung von  $\pm 2$  ppm für 60 s zur erneuten Fragmentierung ausgeschlossen (*dynamic exclusion*).

Bei den Vernetzungsexperimenten des HEK 293-Zelllysates und der ROS-Präparation wurde zusätzlich eine zielgerichtete Analyse für ROS-GC1 durchgeführt. Hierzu wurden eine Liste von allen theoretisch möglichen ROS-GC1-Vernetzungsprodukten (*targeted inclusion list*) erstellt, die bevorzugt fragmentiert werden sollten. Alternativ wurden bei den DSBU-D<sub>0</sub>/D<sub>12</sub>-Vernetzungsexperimenten vorrangig Signale mit einer Massendifferenz von 12,075 u ausgewählt (*targeted mass difference*, TMD). Mithilfe der Software Xcalibur und ICC-CLASS wurden die D<sub>0</sub>/D<sub>12</sub>-Signale extrahiert, eine Liste der DSBU-D<sub>0</sub>/D<sub>12</sub>-Vernetzungsprodukte erstellt und als *inclusion list* für eine erneute Analyse der gleichen Probe verwendet.

### **4.5.3 Bestimmung der ROS-GC1-Aktivität mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie**

Zum Nachweis der ROS-GC1-Aktivität wurden die aus GTP gebildeten Produkte mittels Triple-Quadrupol-MS (Xevo TQD) analysiert. Hierzu wurde die hergestellte Analytlösung (siehe 4.3.11) zunächst mit 50 µl/min auf eine C18-Trennsäule bei einer Temperatur von 45 °C geleitet. Nach einminütiger Äquilibration mit Fließmittel III wurde das Gemisch durch einen 5 min-Gradienten von 1 % auf 35 % (v/v) Fließmittel IV eluiert. Es folgte eine weitere Steigerung auf 85 % (v/v) Fließmittel IV innerhalb einer Minute und zusätzlich eine Minute bei 85 % (v/v). Mit der Injektion der zu analysierenden Probe wurde das Eluat über die gesamte Laufzeit der Trennung kontinuierlich mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) bei einer Temperatur von 200 °C und einer Kapillarspannung von 2,4 kV in das Massenspektrometer überführt. Zur Analyse des Probengemisches wurde als Scanmodus das *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) verwendet, bei dem die spezifischen Ionen mit den in Tabelle 3 dargestellten *m/z*-Übergängen detektiert wurden. Die im ersten Quadrupol selektierten Vorläuferionen wurden im zweiten Quadrupol mittels Kollision-induzierter Dissoziation (*collision induced dissociation*, CID) bei 28 V fragmentiert und spezifische Fragmentationen wurden im dritten Quadrupol analysiert. Die Peakflächen der aufgezeichneten Ionenchromatogramme wurden für die einzelnen Verbindungen mithilfe der Software Skyline 20.1.0.155 [195, 207] ausgewertet. Dabei erfolgten die Konzentrationsbestimmungen anhand der zuvor durchgeführten Messungen mit cGMP, GMP und Guanosin.

Tabelle 3: Verwendete  $m/z$ -Übergänge im MRM-Modus.

Bezeichnung	Vorläuferion ( $m/z$ )	Fragmention ( $m/z$ )
GMP	364,0	152,0
cGMP	346,0	152,0
Guanosin	284,0	152,0
$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -GMP	379,0	162,0
$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -cGMP	361,0	162,0
$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Guanosin	299,0	162,0

#### 4.5.4 Quantifizierung der ROS-GC1 mittels Quadrupol-TOF-Massenspektrometrie

Zur absoluten Quantifizierung der ROS-GC1 in der ROS-Präparation wurden von den vorbereiteten Proben (siehe 4.3.13.2) 5, 10, 25, 50 und 75 fmol der isotopenmarkierten Peptidstandards (siehe 3.12) mit der NanoElute-UPLC (Bruker) gekoppelt an ein timsTOF-Pro-Massenspektrometer analysiert. Nach Konzentration des Peptidgemisches mit einer C18-Vorsäule folgte die Peptidtrennung mittels einer C18-Trennsäule bei einer Flussrate von 0,3  $\mu\text{l}/\text{min}$  mit Fließmittel III. Zur Elution der Peptide wurde ein linearer Gradient von 40 min verwendet, bei dem der Anteil an Fließmittel VI von 2 % (v/v) auf 50 % (v/v) erhöht wurde. Die Übersichtsmassenspektren wurden im Bereich von  $m/z$  150 bis 2200 aufgezeichnet. Zusätzlich wurden im *pseudo*-MRM-Modus (siehe 1.2.3.3) die dreifach positiv geladenen Ionen der Peptidstandards in ihrer markierten und nicht markierten Variante zur Fragmentierung mittels CID (35 % NCE) analysiert. Es wurden die Intensitätsverhältnisse zwischen den nicht isotopenmarkierten Peptidvarianten, die bei der Proteolyse gebildet wurden, und den zur Probe hinzugefügten, markierten Peptiden bestimmt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Skyline 20.1.0.155 [195, 208].

#### 4.5.5 Native Massenspektrometrie

Für die Analyse von GCAP-2 im nativen Zustand am Q-TOF-2-Massenspektrometer wurde eine 3  $\mu\text{M}$  GCAP-2-Lösung eingesetzt. Ein Pufferwechsel in 300 mM Ammoniumacetat wurde, wie in 4.3.3 beschrieben, vollzogen. Zur MS-Analyse wurden 5  $\mu\text{l}$  der Probe in eine goldbeschichtete Borosilikatglas-Kapillare gefüllt und durch ESI ionisiert. Hierfür wurde eine Kapillarspannung im Bereich von 1,2-1,4 kV, einer Konusspannung von 120-180 V sowie einer Kollisionsenergie zwischen 10 und 60 V angelegt. Zur Kalibrierung des Instruments wurde eine 25 mM Cäsiumiodid-Lösung verwendet.



## 4.6 Bioinformatische Methoden

### 4.6.1 Identifizierung von Vernetzungsprodukten

Für die Identifizierung von Vernetzungsprodukten wurden die Programme StavroX [152] und MeroX [153] verwendet. Zur Analyse wurden die MS-Rohdaten mithilfe der Software Proteome Discoverer in das mgf/mzML-Format konvertiert. Des Weiteren wurde eine FASTA-Datei mit den Aminosäuresequenzen zur Annotation der vernetzten Peptide eingesetzt. Die Identifizierung potenzieller Vernetzungsprodukte mit MeroX erfolgte im RISE-Modus (*Reporter Ion Scan Event*). Die maximale Standardabweichung von Vorläufer- und Fragmentationen betrug 3 bzw. 10 ppm. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurde auf  $\geq 2$  und die Peptidlänge auf minimal drei und maximal 20 Aminosäuren gesetzt. Für die Proteolyse wurden folgende Spaltstellen berücksichtigt: Für Trypsin C-terminal von K und R, für Glu-C C-terminal von D und E und für Asp-N N-terminal von D und E mit jeweils einer maximalen Anzahl von drei Fehlschnittstellen. Die Oxidation von Methionin war als variable und Carbamidomethylierung von Cystein als statische Modifikationen möglich. Für DSBU und CDI wurde eine Vernetzung der Aminosäure K oder dem N-Terminus mit den Aminosäuren K, S, T, Y oder dem N-Terminus angenommen. Photo-Methionin kann mit allen Aminosäuren und DAU ausschließlich mit Cystein reagieren. Es wurde eine FDR (*false discovery rate*) von maximal 5 % erlaubt. Alle Fragmentationenspektren der möglichen Vernetzungsprodukte wurden manuell validiert.

Im Folgenden werden abweichende Einstellungen beschrieben, die auf die Weiterentwicklung der MeroX-Software-Versionen 1.6.0.1 bis 2.0 beta 5 [209] zurückzuführen sind. Zur Identifizierung der ROS-GC1-Vernetzungsprodukte aus dem HEK 293-Zelllysate und der ROS-Präparation wurde der *RISEUP*-Modus mit maximal drei fehlenden Signalen des Vernetzungsreagenz DSBU verwendet. Eine maximale Massenabweichung bei Vorläuferionen von 5 ppm und bei Fragmentationen von 10 ppm wurde angenommen. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis war  $\geq 1,5$ . Die Peptidlänge wurde auf drei bis 40 Aminosäuren beschränkt. Bei der Analyse der ROS-Präparation wurden zudem Phosphorylierungen als variable Modifikation an S, T, Y berücksichtigt. Die DSBU-Masse der zwölfmal deuterierten Variante wurde zudem berücksichtigt.

#### 4.6.2 Homologie-Modellierung der intrazellulären Domäne der ROS-GC1

Die Modellierung der intrazellulären Domäne (IcD) der bovinen ROS-GC1 wurde von Dr. Christian Tüting und Jun.-Prof. Dr. Panagiotis Kastritis (ZIK Halomen, Abteilung Kryoelektronmikroskopie & computerbasierte Strukturbiologie, MLU Halle) durchgeführt.

Die IcD besteht nach Duda *et al.* [34] aus folgenden Subdomänen (siehe Abbildung 3): Der Juxtamembrandomäne (JMD, AS 493-578), der Kinase-Homologie-Domäne (KHD, AS 579-825), der Signalhelixdomäne (SHD, AS 826-863), der Kern-katalytischen Domäne (CCD, AS 864-1020) und der C-terminalen Verlängerung (CTE, AS 1021-1110). Für die Subdomänen der IcD wurden geeignete Proteinstrukturvorlagen (Template) mit der Software HHpred [210, 211] identifiziert und anhand des besten Scores ausgewählt. Auf Grundlage der identifizierten Proteintemplate wurden die Domänengrenzen angepasst und eine neue Untergliederung der IcD in KHD (AS 542-806),  $\alpha$ -helikale Domäne ( $\alpha$ HD, AS 807-859) und katalytische Domäne (CD, AS 860-1066) vollzogen. Zur Erstellung der Modelle diente die Software MODELLER (Version 9.24) [212, 213]. Die Proteinvorlage (PDB-Eintrag: 4NEU [214]) für die KHD-Domäne umfasste die Aminosäuren 542-815 mit Ausnahme der flexiblen *Loop*-Regionen bestehend aus AS 618-626 und AS 688-709. Für den *Loop* AS 618-626 konnte kein Template gefunden werden. Die zweite *Loop*-Region (AS 688-709) konnte mithilfe einer homologen Proteinstruktur der Kinasedomäne von PknA aus *Mycobacterium tuberculosis* mit dem PDB-Eintrag 4OW8 [215] modelliert werden. Für die KHD existierte ein konserviertes Proteintemplate für das Monomer, jedoch nicht für die Struktur des Dimers. Zur Generierung des KHD-Dimers wurde das modellierte Monomer zweimal verwendet. Das Docking zwischen den zwei Monomeren wurde anhand der identifizierten intermolekularen Vernetzungen mithilfe des HADDOCK Docking-Servers durchgeführt [157, 216]. Für die identifizierten intermolekularen Vernetzungen wurden Distanzen zwischen 3 bis 30 Å angenommen. Das Proteintemplate des Monomers umfasste als letzte aufgelöste Aminosäure K815, sodass K818 sich nur drei Aminosäuren C-terminal von K815 befand. Daher wurde die verwendete maximale Distanz für K818 von 30 Å auf 35 Å erhöht. Acht Vernetzungsprodukte resultierten in 16 Distanzbeschränkungen, da Vernetzungsprodukte von einem zum anderen Monomer und umgekehrt möglich waren. Beim initialen Docking-Prozess wurden 5.000 Modelle erstellt. Der folgende Optimierungsprozess resultierte in 400 Modellen und nach dem Verfeinerungsprozess mit dem HADDOCK-Server verblieben 200 Modelle unter Verwendung der C2-Symmetrie.

## Methoden

Es folgte die Modellierung der C-terminalen Region der IcD, die sich aus der  $\alpha$ -helikalen Domäne ( $\alpha$ HD, AS 807-859) und der katalytischen Domäne (CD, AS 860-1066) zusammensetzt. Für die 3D-Struktur der  $\alpha$ HD und CD wurde das Dimer der löslichen Nitrit-Rezeptor-Guanylatzyklase mit dem PDB-Struktureintrag 6PAS [217] als Vorlage verwendet, welches die AS 823-1066 umfasste. Durch die N-terminale Verlängerung des Modells der Nitrit-Rezeptor-Guanylatzyklase (6PAS) konnte die N-terminale, helikale Region der  $\alpha$ HD vollständig konstruiert werden. Die Struktur 6F3T [218] des TAF5-TAF6-TAF9-Komplexes wurde bei der HHPRED-Suche als Template für die Region zur KHD-Domäne (AS 801-836) identifiziert.

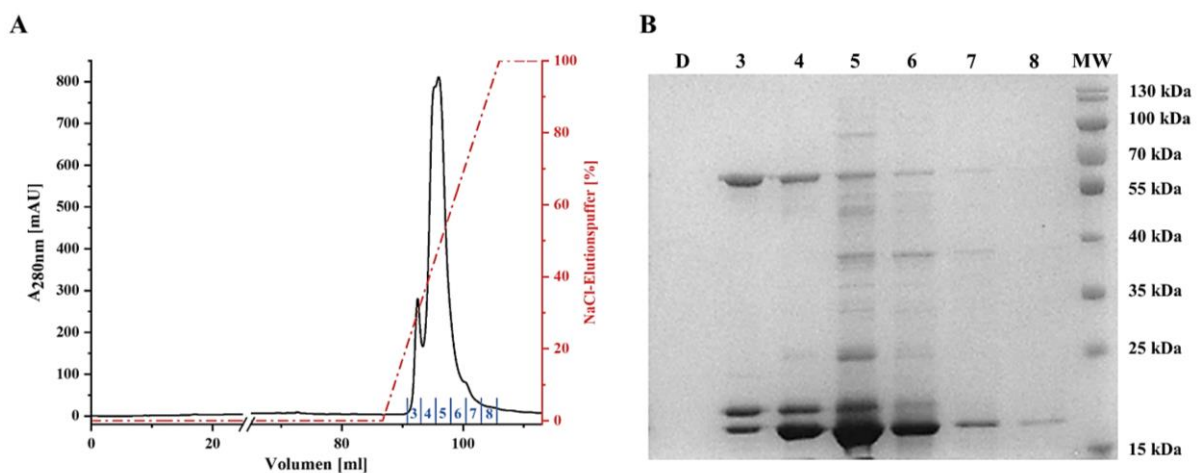
Abschließend wurden die Modelle der KHD und  $\alpha$ HD/CD zur IcD der ROS-GC1 zusammengefügt. Hierbei lag eine Überschneidung zwischen der C-terminalen Region der KHD und der N-terminalen Verlängerung der  $\alpha$ HD vor, sodass die Region zwischen AS 801-815 angeglichen wurde. Die Überlagerung der überlappenden Aminosäuren erfolgte mit PyMOL und wurde anschließend mit MODELLER optimiert. Für den abschließenden Verfeinerungsprozess der IcD wurde der HADDOCK-Server [157, 219, 220] verwendet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Produktion des myristoylierten GCAP-2 mit und ohne Einbau von Photo-Methionin

Für die Charakterisierung der GCAP-2-Bindestelle in der intrazellulären Domäne (IcD) der ROS-GC1 sowie für die Überprüfung verschiedener Vernetzungsreagenzien an GCAP-2 wurde die myristoylierte Variante von GCAP-2 in *E. coli*-Zellen produziert und anschließend isoliert (siehe Abbildung A 5).

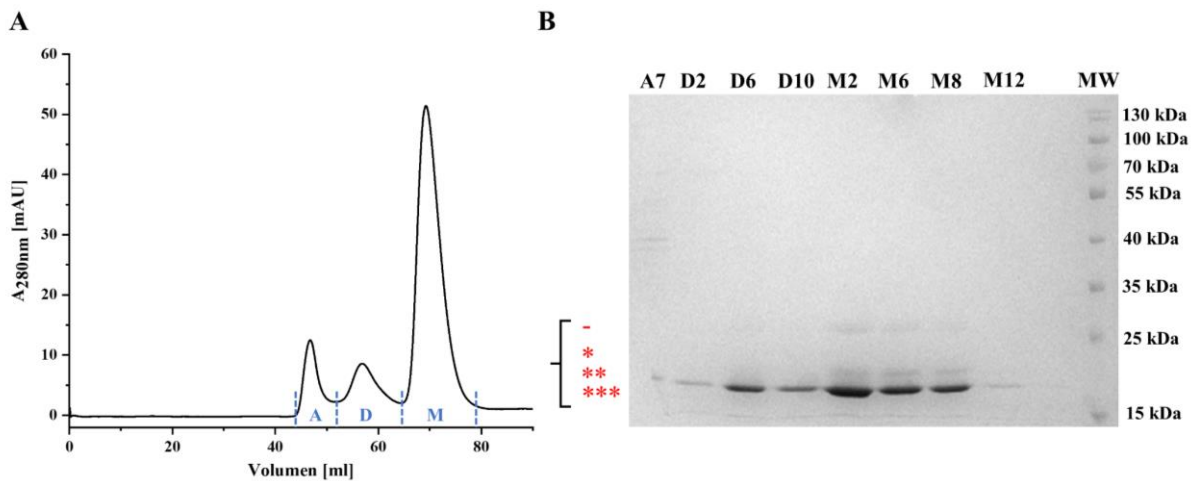
Das GCAP-2-Plasmid wurde zunächst in DH5 $\alpha$  *E. coli*-Zellen zur Vervielfältigung des Plasmids und darauffolgend in BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen zur Genexpression transformiert (siehe 4.1.2). Die erzeugten *E. coli*-Stämme wurden als Kyrususpensionen gelagert (siehe 4.1.1.1). Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, wurde die Expressionskultur durch Inokulation mit der Kyrkultur hergestellt und die anschließende Expression erfolgte nach Induktion bei OD<sub>600nm</sub> von 0,6 bei 37 °C für vier Stunden. Hierbei konnte eine Biofeuchtmassenproduktion von ca. 5 bis 8 g pro Liter Medium erzielt werden. Da GCAP-2 unlöslich in den Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*, IBs) in *E. coli* vorlag, erfolgte vor der Proteinreinigung die IB-Präparation sowie die Rückfaltung des solubilisierten GCAP-2 (siehe 4.3.1). Nach Sedimentation der unlöslichen Bestandteile wurde der Überstand auf die *HiTrap* Q-Sepharose-Säule, einem starken Anionenaustauscher, überführt (siehe Abbildung 17A).



**Abbildung 17: Anionenaustauschchromatographie von GCAP-2.** A) Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie (IEX). Der Rückfaltungsansatz von GCAP-2 wurde über Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q-Sepharose-Säule) getrennt. Die Absorption bei 280 nm sowie der Gradient der Elution mit NaCl [%] sind dargestellt. Die analysierten Elutionsfraktionen sind blau markiert. B) SDS-PAGE-Analyse (Coomassie-Brillantblau-Färbung) der eluierten Fraktionen erfolgte mit einem 12 %igen Polyacrylamidgel. D: Durchfluss, 3-8: Fraktionen der eluierten Lösung und MW: Molekulargewichtsstandard (molecular weight).

## Ergebnisse

Aufgrund fehlender Proteinsignale im Durchfluss (D) (siehe Abbildung 17B) konnte von einer vollständigen Proteinbindung an die Säule ausgegangen werden. GCAP-2 mit ca. 24 kDa wurde anschließend mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die fünfte Elutionsfraktion mit der höchsten Absorptionsintensität von ~800 mAU wurde für die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) (siehe Abbildung 18) verwendet. Hierbei wurde der Reinigungsverlauf mithilfe einer SDS-PAGE-Analyse von ausgewählten Elutionsfraktionen überprüft. Bei den Proteinsignalen in Abbildung 18B handelt es sich um die charakteristischen Calcium-Beladungszustände von GCAP-2, was die erfolgreiche Abtrennung aller Verunreinigungen zeigt. Die Fraktionen des GCAP-2-Monomers (M, siehe Abbildung 18) wurden vereinigt und zur Abtrennung der nicht-myristoylierten Variante einer C8-Umkehrphasen-Chromatographie unterzogen (siehe 4.3.2.2 und Abbildung A 6).

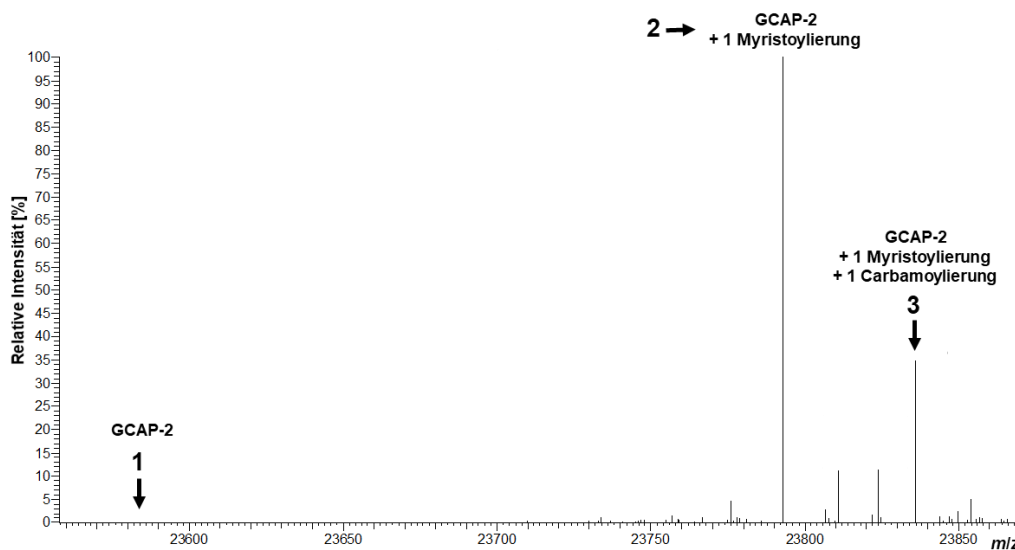


**Abbildung 18: Größenausschlusschromatographie von GCAP-2.** A) Chromatogramm der SEC. Absorption bei 280 nm ist gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Es wurde Elutionsfraktion 5 der IEX verwendet (siehe Abbildung 17). A: Fraktionen des Ausschlussvolumens, D: Fraktionen des GCAP-2-Dimers, M: Fraktionen des GCAP-2-Monomers. B) SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen mit einem 12 %igen Polyacrylamidgel (Coomassie-Brillantblau-Färbung). Calcium-Beladungszustände von GCAP-2 sind angegeben: \*\*\*: GCAP-2 mit drei  $Ca^{2+}$ -Ionen, \*\*: mit zwei  $Ca^{2+}$ -Ionen, \*: mit einem  $Ca^{2+}$ -Ion und -: GCAP-2 im Calcium-freien Zustand. MW: Molekulargewichtsstandard (molecular weight).

## Ergebnisse

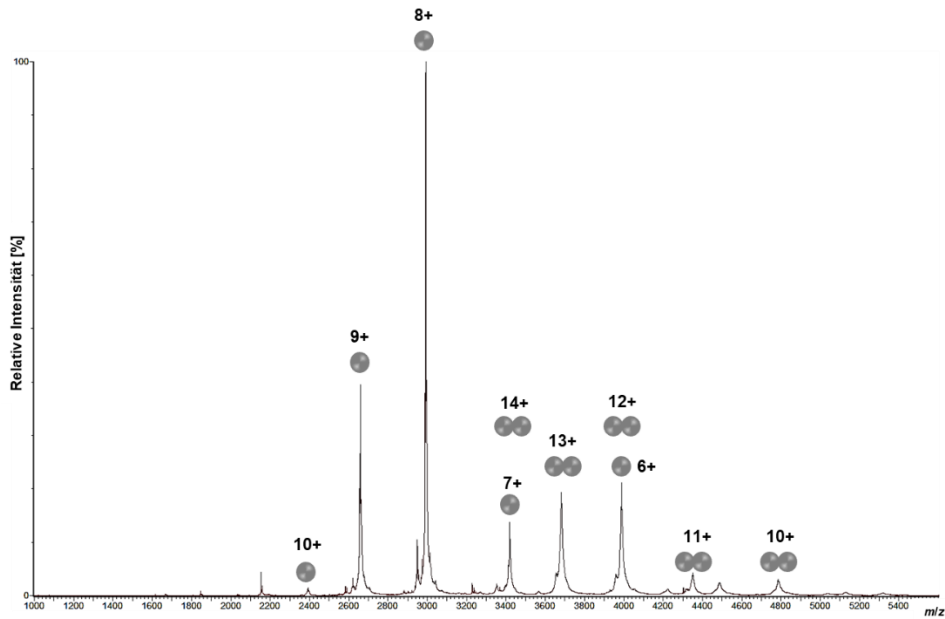
Das dekonvolutierte Massenspektrum der Nano-ESI-Orbitrap-MS-Analyse (siehe 4.5.1) in Abbildung 19 zeigte, dass die nicht-myristoylierte Variante von GCAP-2 vollständig abgetrennt werden konnte, da kein Signal mehr für die monoisotopische Masse von 23.582,7 Da ( $[M+H]^+$ ) von GCAP-2 (1) detektiert werden konnte. GCAP-2 lag ausschließlich myristoyliert (2) vor oder wies zusätzlich eine Carbamoylierung (3) auf, die aufgrund der Solubilisierung mit Harnstoff stattfand. GCAP-2 wurde abschließend mittels nativer Massenspektrometrie charakterisiert (siehe 4.5.5 und Abbildung 20). Es konnte eine überlagerte Verteilung zwischen GCAP-2-Monomer und -Dimer im  $m/z$ -Bereich von 2.000 bis 5.000 identifiziert werden. Bei jedem Ladungszustand sind Signale erkennbar, welche die Bindung von Calciumionen zeigen. Daraus folgt, dass die Calcium-Bindung von GCAP-2 trotz Pufferwechsel erhalten blieben.

Um Vernetzungsexperimente mit photo-reaktiven Aminosäuren zu ermöglichen, wurde der Einbau von Photo-Methionin in GCAP-2 durchgeführt (siehe 4.2.2). Die Expressions- und Reinigungsschritte waren analog zum GCAP-2 ohne Photo-Methionin-Markierung. Zur *E. coli*-Kultur im Minimalmedium wurde vor der Induktion der Expression 30 mg/l Photo-Methionin hinzugefügt.



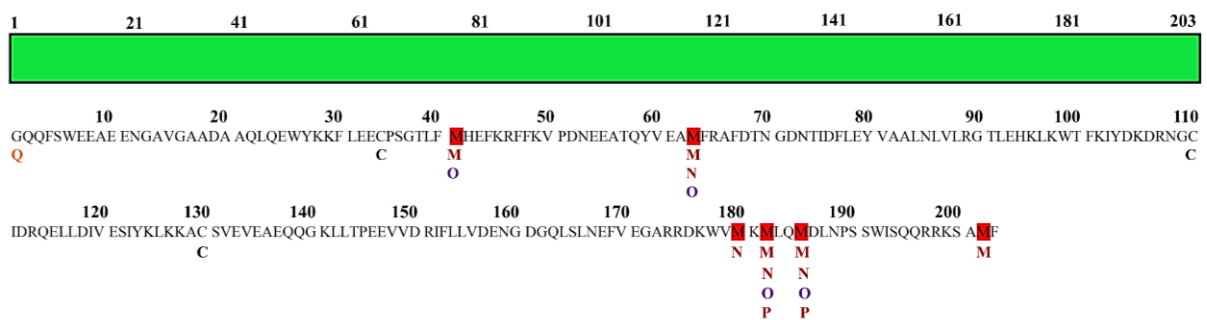
**Abbildung 19:** Massenspektrum der Nano-ESI-Orbitrap-MS-Analyse von GCAP-2. Die dekonvolutierte, monoisotopische Massen  $[M+H]^+$  sind im Massenbereich von  $m/z$  23.550-23.900 dargestellt. 1: kein Signal von GCAP-2 ohne N-terminale Myristoylierung bei  $m/z$  23.582,7 ist sichtbar. 2: GCAP-2 mit N-terminaler Myristoylierung bei  $m/z$  23.792,9. 3: Myristoyliertes GCAP-2 mit einer zusätzlichen Carbamoylierung ( $\Delta m/z$  43) bei  $m/z$  23.835,9.

## Ergebnisse



**Abbildung 20:** Natives Massenspektrum des myristoylierten GCAP-2. GCAP-2 ist mit grauen Kugeln dargestellt, Monomere erscheinen als 6+ bis 10+, Dimere als 10+ bis 14+ geladene Ionen.

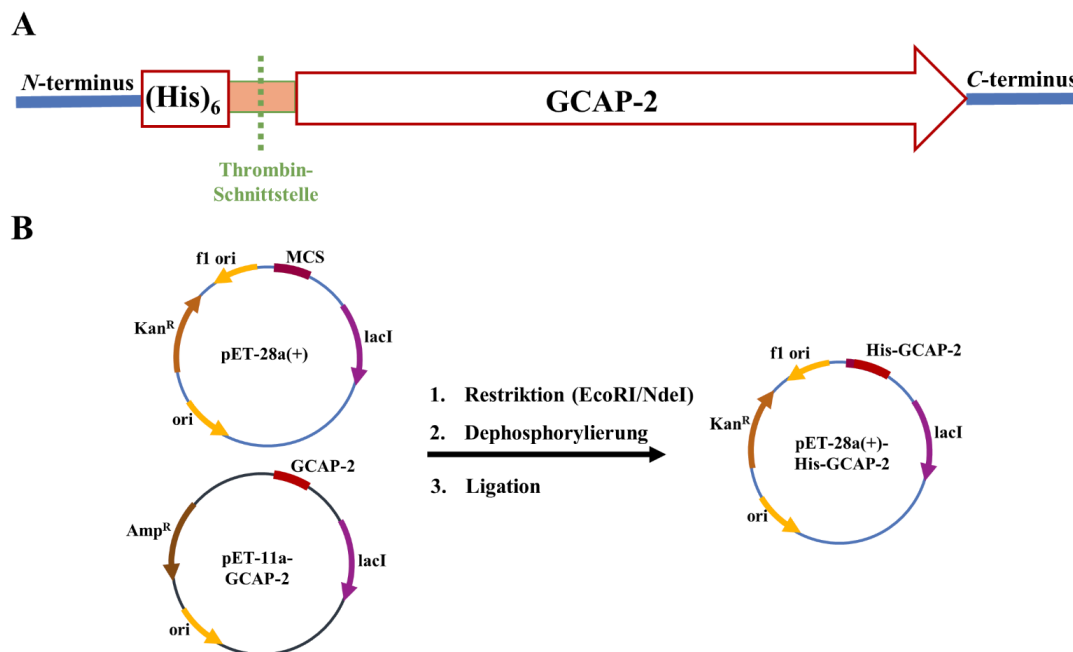
Alle weiteren Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt, um eine vorzeitige Aktivierung von Photo-Methionin zu verhindern. Der Einbau des Photo-Methionins wurde mithilfe einer Peptidfragmentmassen-Fingerprint-Analyse bestätigt (siehe Abbildung 21). Nach der Bestrahlung von GCAP-2 mit UV-A-Licht wurde das intakte Photo-Methionin (N) oder die aktivierte Spezies (M: hydrolysiertes Photo-Methionin, P: mit N<sub>2</sub>-Verlust) an allen möglichen sechs Positionen in GCAP-2 nachgewiesen (siehe Abbildung A 4). GCAP-2 konnte so für die Vernetzungsreaktionen mit Photo-Methionin verwendet werden.



**Abbildung 21:** Identifizierung der Photo-Methionin-Modifikationen in GCAP-2.. Sequenzbereiche wurden massenspektrometrisch bestätigt (100% Sequenzabdeckung). Aminosäuresequenz von GCAP-2 mit identifizierten Modifikationen. C: Carbamidomethylierung des Cysteins, M: hydrolysiertes Photo-Methionin, N: Photo-Methionin, O: oxidiertes Methionin, P: Photo-Methionin mit N<sub>2</sub>-Verlust, Q: N-terminale Myristoylierung des Glycins.

## 5.2 Klonierung, Expression und Reinigung von GCAP-2 mit N-terminalem His-Tag

Zunächst wurde ein Plasmid, welches für GCAP-2 mit einem N-terminalen His-Tag codiert, erstellt (siehe 4.1.3 bis 4.1.7, Abbildung A 5). Dieses Fusionsprotein besteht aus einem sechsfachen (His)<sub>6</sub>-Tag gefolgt von einer Thrombin-Schnittstelle N-terminal an GCAP-2 (siehe Abbildung 22A). Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 22B graphisch dargestellt. Sowohl das Ausgangsplasmid mit dem GCAP-2-Gen (pET-11a) als auch das Zielplasmid (pET-28a(+)) wurden mit den Endonukleasen EcoRI und NdeI erfolgreich gespalten. Beide Restriktionsansätze wurden ohne zusätzliche Reinigung verwendet. Um eine Re-Ligation des GCAP-2-DNA-Inserts mit dem Ausgangsvektor pET-11a zu verhindern, wurde die DNA mithilfe der rekombinanten *shrimp* Alkalischen Phosphatase (rSAP) dephosphoryliert. Anschließend wurden der linearisierte Zielvektor und das GCAP-2-Fragment ligiert. Das generierte Plasmid pET-28a(+)-His-GCAP-2 wurde in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Danach wurde eine 5 ml-LB-Kultur mit einer Einzelkolonie inokuliert, die Plasmid-DNA somit vervielfältigt und nachfolgend isoliert. Mittels Sequenzierung konnte die DNA-Sequenz des gewünschten Zielvektors pET-28a(+)-(His)<sub>6</sub>-GCAP-2 bestätigt werden. Nach der Transformation des Zielvektors in BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen erfolgte die Produktion und Reinigung von (His)<sub>6</sub>-GCAP-2 ohne die Zugabe der Myristinsäure analog bis zur SEC, wie in 5.1 beschrieben.

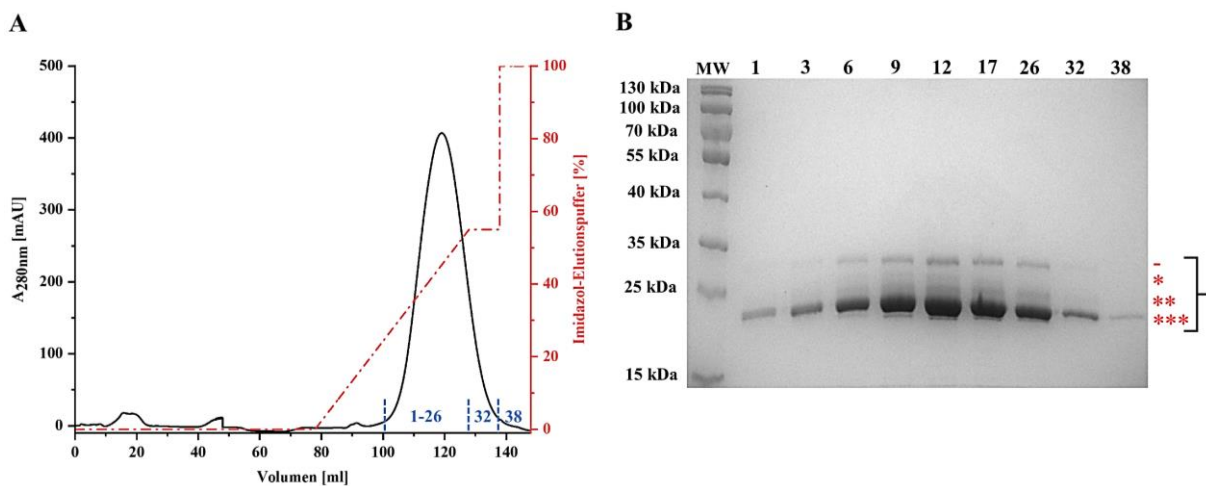


**Abbildung 22: Schematische Darstellung und Klonierungsstrategie des GCAP-2-Konstrukts.** A) Hergestellttes Fusionsprotein bestehend aus N-terminalen sechsfachem (His)<sub>6</sub>-Tag, Linker-Region mit Thrombin-Schnittstelle (Sequenz SSGLVPRGSH) und GCAP-2. B) Klonierungsstrategie für das Plasmid zur Expression des in A) dargestellten Fusionsproteins. Die GCAP-2-Sequenz aus dem pET-11a-GCAP-2-Vektor mit einer Ampicillin-Resistenz (Amp<sup>R</sup>) wurde in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des pET-28a(+)-Vektors mit einer Kanamycin-Resistenz (Kan<sup>R</sup>) kloniert.



## Ergebnisse

Statt der SEC wurde im zweiten Reinigungsschritt eine immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt (siehe 4.3.2.3 und Abbildung 23). GCAP-2 wurde über die Komplexbildung seines (His)<sub>6</sub>-Tags mit den immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen an die Säulenmatrix gebunden. Anschließend wurde mit IMAC-Bindepuffer, einer 1 M NaCl-Lösung und erneut mit dem IMAC-Bindepuffer gewaschen, um Kontaminationen aufgrund von unspezifischen Bindungen an die Säulenmatrix zu entfernen. Die Elution von GCAP-2 erfolgte durch eine Kombination aus einem linearen Imidazolgradienten (Fraktion 1-26) und einem Stufengradienten (Fraktion 32 und 38). Abschließend wurden die GCAP-2 enthaltenden Fraktionen vereinigt, mit Lagerpuffer I gewaschen und in 200 µl-Aliquote (je 95 µM) bei -80 °C gelagert. In Abbildung 23B lässt sich anhand der SDS-PAGE-Analyse von ausgewählten Elutionsfraktionen die erfolgreiche Reinigung verfolgen. Die verschiedenen Proteinsignale geben die unterschiedlichen Ca<sup>2+</sup>-Beladungszustände von GCAP-2 wieder und entsprechen der zuvor bereits beschriebenen Ca<sup>2+</sup>-abhängigen elektrophoretischen Mobilität von GCAP-2 [67], welche die Funktionalität des gereinigten GCAP-2-Proteins bestätigt. In Fraktion 12 sind die vier Zustände deutlich erkennbar. Das stärkste Proteinsignal, welches das geringste apparente Molekulargewicht besitzt, entspricht GCAP-2 mit drei gebundenen Calciumionen (\*\*\*). Die Signale mit steigendem apparentem Molekulargewicht entsprechen dem Protein mit zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen (\*\*), einem Ca<sup>2+</sup>-Ion (\*) und dem Calcium-freien Zustand (-). Verschiedene Ca<sup>2+</sup>-Beladungszustände konnten bereits mittels nativer Massenspektrometrie identifiziert werden (siehe 5.1).



**Abbildung 23: Affinitätschromatographie des GCAP-2-Fusionsproteins.** A) Chromatogramm der IMAC. Die Absorption bei 280 nm sowie der prozentuale Anteil des Imidazol-Elutionspuffers sind dargestellt. B) SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen der IMAC mithilfe eines 12 % igen Polyacrylamid-Gels (Coomassie-Brillantblau-Färbung). Calcium-Beladungszustände von GCAP-2 sind angegeben: \*\*\*: GCAP-2 mit drei Ca<sup>2+</sup>-Ionen, \*\*: mit zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen, \*: mit einem Ca<sup>2+</sup>-Ion und -: GCAP-2 im Calcium-freien Zustand. MW: Molekulargewichtsstandard (molecular weight).

Die Aminosäuresequenz des gereinigten GCAP-2 konnte zudem nach einer Proteolyse in Lösung mit einer massenspektrometrischen Peptidfragmentmassen-Fingerprint-Analyse aufgrund einer Sequenzabdeckung von 88 % bestätigt werden (siehe Abbildung A 7).

### 5.3 Vernetzungsreagenzien mit GCAP-2

Verschiedene Vernetzungsreagenzien (CDI, DAU und Photo-Methionin) wurden an GCAP-2 eingesetzt, um die Vernetzungsstrategien unter optimalen Reaktionsbedingungen für GCAP-2/ROS-GC1-Peptid-Studien anzuwenden. Im Folgenden werden die Ergebnisse für das Amin-reaktive Reagenz CDI (1,1'-Carbonyldiimidazol), das Sulfhydryl-reaktive Reagenz DAU (Diallylurea) und die Carboxy-Reaktivität der Photo-Aminosäure Photo-Methionin erläutert.

#### 5.3.1 Das Reagenz CDI

Das Vernetzungsreagenz CDI verknüpft Amin- bzw. Hydroxygruppen miteinander und weist eine *Spacerlänge* von 2,6 Å auf. Daher kann CDI sehr kurze Distanzen überbrücken [166]. Vorversuche zeigten, dass ein 20-fach molarer Überschuss an CDI zu eingesetzten GCAP-2 für die Vernetzungsreaktionen ausreichend war. Hierbei konnten 19 verschiedene Vernetzungen in der Anwesenheit von Calcium nachgewiesen werden. Für die Identifizierung dieser Vernetzungsprodukte mittels MeroX wird in Abbildung A 8 ein Beispiel für ein CDI-Fragmentationenspektrum zwischen den Peptiden  $_{137}$ [AEQQGKLLTPEEVVDR] $_{152}$  und  $_{81}$ [YVAALNLVLR] $_{90}$  in GCAP-2 gezeigt. Der dazu gehörige Reaktionsmechanismus sowie das Fragmentierungsmuster sind in Abbildung A 1 graphisch dargestellt. In Tabelle 4 sind die vernetzten Aminosäuren und in Tabelle A 1 die dazugehörigen Vernetzungsprodukte zusammengefasst. Fünf der 19 identifizierten Vernetzungen weisen  $C_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$ -Distanzen zwischen 13,9 und 17,4 Å auf. Somit stimmen die ermittelten Distanzen mit der NMR-Struktur des PDB-Eintrages 1JBA [221] überein. Die Aminosäuren S37/T39 und K142 befinden sich in flexiblen *Loop*-Regionen, sodass auch größere Distanzen als die berechneten 17 Å möglich sein könnten. Zudem ist die C-terminale Region (AS 191 bis 204) in der PDB-Struktur aufgrund seiner hohen Flexibilität nicht aufgelöst, so dass die Distanzen der Vernetzungen zu K200/S201 nicht bestimmt werden konnten. Die restlichen neun Vernetzungen lassen sich möglicherweise durch die Struktur des GCAP-2-Dimers erklären, da intermolekulare Vernetzungen zwischen zwei GCAP-2 Monomeren zwischen K46 und K29/30 sowie zwischen K96 und K46 mit Distanzen von 15,4 und 17,3 Å identifiziert worden waren [222].

## Ergebnisse

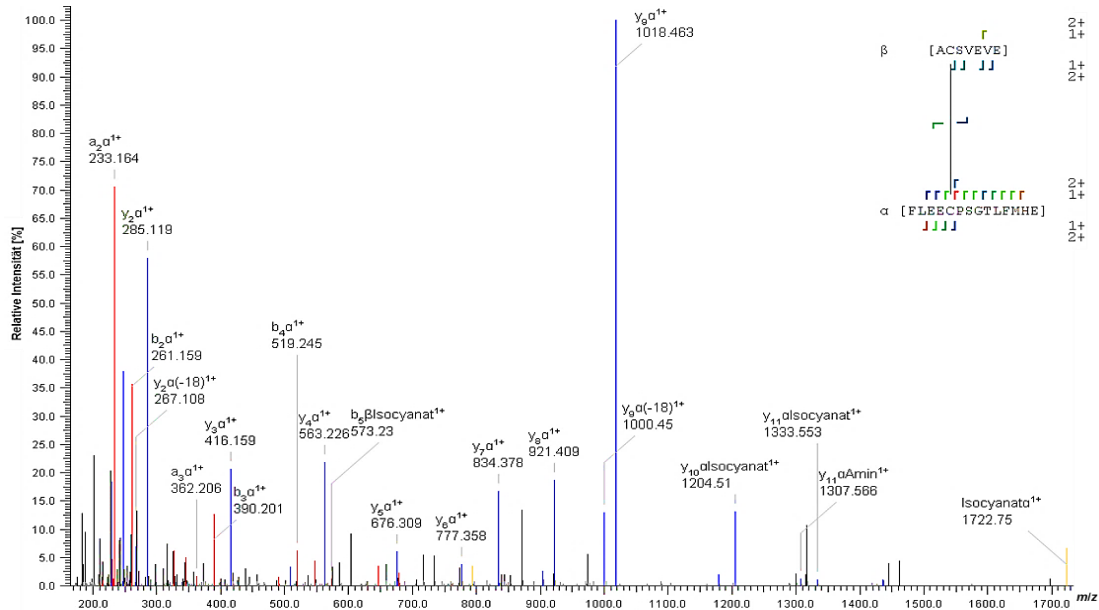
**Tabelle 4: Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit CDI in GCAP-2 im Calcium-beladenen Zustand.** Aufgelistet sind die miteinander vernetzten Aminosäuren in der Anwesenheit von 1 mM CaCl<sub>2</sub> und die jeweils überbrückte C<sub>α</sub>-C<sub>α</sub>-Distanz. Diese wurde anhand der PDB-Struktur 1JBA ermittelt. Bei nicht eindeutiger Zuordnung der Vernetzungsposition sind alle möglichen Aminosäuren angegeben, wobei die hervorgehobene für die Distanzbestimmungen verwendet wurde, x: keine Distanzmessung aufgrund von fehlender Strukturdaten der C-terminalen Region (AS 191 bis 204) möglich.

	Vernetzte Aminosäure 1	Vernetzte Aminosäure 2	C <sub>α</sub> -C <sub>α</sub> Distanz
1	K102	Y60	13,9
2	K128	K142	17,4
3	K128/129	K200/S201	x
4	K128	K46	16,8
5	K128	K50	14,6
6	K128	K96	21,3
7	K128	S37	34,5
8	K200	K30	x
9	K200/S201	K126/128	x
10	K200/S201	S37/T39	x
11	K46	<b>K29/30</b>	19,6
12	K46	K96	21,4
13	K46	<b>K98/T100/K102</b>	23,2
14	K46	Y125/ <b>K126</b>	16,0
15	K96	K200/S201	x
16	K96	S37	30,0
17	<b>K98/K102</b>	S37	30,9
18	K98	K50	24,7
19	Y81	K142	39,9

### 5.3.2 Das Sulfhydryl-reaktive Reagenz DAU

Das DAU-Reagenz vernetzt in Anwesenheit des Radikalstarters Benzophenon und mithilfe von UV-A-Bestrahlung die Thiolgruppen von Cysteinen miteinander (siehe Abbildung A 3) [173]. Da GCAP-2 drei Cysteine besitzt, konnte die Photo-Reaktion von DAU bei GCAP-2 durchgeführt werden. Hierzu wurde GCAP-2 mit einer Konzentration von 10 μM in der Anwesenheit von 1 mM CaCl<sub>2</sub> oder 10 mM EGTA eingesetzt. Es folgte die enzymatische Proteinspaltung und anschließend die massenspektrometrische Analyse der Vernetzungsprodukte. Die Datenanalyse wurde mit MeroX unter Berücksichtigung der Amin- und Isocyanat-Fragmente von DAU durchgeführt (siehe Abbildung A 3). In der Anwesenheit von Calcium konnte ein Vernetzungsprodukt mit dem theoretischen Molekulargewicht [M+H]<sup>+</sup> von 2.515,15 zwischen C35 und C131 identifiziert werden (siehe Abbildung 24).

## Ergebnisse



**Abbildung 24: Fragmentionenspektrum des DAU-Vernetzungsproduktes in GCAP-2.** Vernetzung des Peptides  $\alpha$   $_{31}$ [FLEECPSGTLFMHE] $_{44}$  und des Peptides  $\beta$   $_{130}$ [ACSVVE] $_{136}$ , Signal bei  $m/z$  839,043, Ladungszustand 3+. Die Annotierung erfolgte mit MeroX. Im Massenspektrum sind a- und b-Ionen rot markiert, y-Ionen blau, Fragmentionen der Vernetzung gelb und nicht annotierte Ionen sind schwarz dargestellt. Die Fragmentionen des DAU-Linkers sind entsprechend mit Amin oder Isocyanat beschriftet (siehe Abbildung A 3). Bei den vernetzten Peptiden sind a- und b-Ionen mit  $\perp$ , y-Ionen mit  $\lceil$  und Fragmentionen des Vernetzungsreagens DAU mit  $\dashv$   $\dashv$  markiert. Bei den vernetzten Aminosäuresequenzen korreliert der Farbverlauf der Markierungen von blau nach rot mit einer zunehmenden Signalintensität der Fragmentionen im Massenspektrum.

Die Distanz der intramolekular vernetzten Cysteine betrug 25,2 Å und wurde anhand der PDB-Struktur von GCAP-2 (1JBA) ermittelt. Die Identifizierung dieser Vernetzung nur in der Anwesenheit von Calcium könnte auf die höhere Flexibilität von GCAP-2 im Calcium-freien Zustand zurückgeführt werden. Somit wurde bestätigt, dass durch den Einsatz von DAU für GCAP-2 zusätzliche Strukturinformationen generiert werden können.

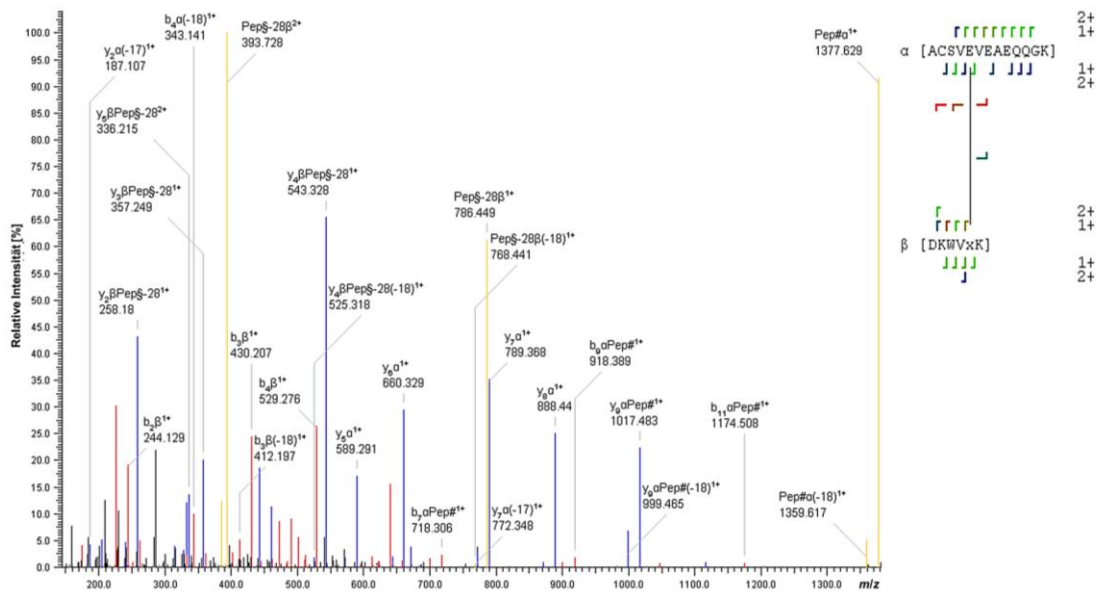
### 5.3.3 Die Photo-Aminosäure Photo-Methionin

Die Photo-Aminosäure Photo-Methionin wurde erfolgreich in GCAP-2 eingebaut, so dass Vernetzungsprodukte zur Ableitung kurzer Distanzinformationen verwendet werden konnten (siehe 1.2.6.2). Um die mit Photo-Methionin markierte GCAP-2-Variante einsetzen zu können, wurde die Reaktivität des eingebauten Photo-Methionins gegenüber Carboxygruppen überprüft [169]. Hierzu wurden 10 µM GCAP-2 in der Anwesenheit von 1 mM CaCl<sub>2</sub> oder 10 mM EGTA einer UV-A-Bestrahlung unterzogen. Nach der enzymatischen Proteolyse in Lösung wurde das Peptidgemisch massenspektrometrisch analysiert. Es wurde angenommen, dass neben einer Reaktion mit allen 20 Aminosäuren über ein Carben-Intermediat, bevorzugt die Reaktion mit

## Ergebnisse

sauren Aminosäuren über ein Diazo-Intermediat erfolgen kann (siehe Abbildung A 2). Hierzu wurde die Datenanalyse mit der Software MeroX durchgeführt, sodass Vernetzungen von Photo-Methionin mit Asparagin- und Glutaminsäure identifiziert werden konnten (siehe 1.2.6.2). Die dabei entstandene Esterbindung ist spaltbar und erzeugt somit ein Muster aus zwei charakteristischen Fragmentionen, welche die Identifizierung der Vernetzungsposition mit Photo-Methionin unterstützen (siehe Abbildung A 2). Die Annotierung eines repräsentativen Massenspektrums mittels MeroX ist in Abbildung 25 dargestellt.

Die potentiellen Vernetzungsprodukte wurden manuell validiert. Unter Berücksichtigung der Spaltbarkeit der Esterbindung konnte mit MeroX für das Photo-Methionin (x) enthaltene Peptid durch den N<sub>2</sub>-Verlust (-28,006 u) und für das zweite vernetzte Peptid ohne Modifikation sowohl die b- als auch die y-Ionen zugeordnet werden (siehe Abbildung 25). Es konnten zehn Vernetzungsprodukte identifiziert werden, bei denen mit MeroX eine zu Photo-Methionin (PM) eindeutige Vernetzungsposition ermittelt werden konnte (siehe Tabelle 5, A 2 und A 3).



**Abbildung 25: Fragmentionenspektrum eines Photo-Methionin-Vernetzungsproduktes von GCAP-2.** Vernetzung des Peptides  $\alpha$  <sub>130</sub>[ACSVEVEAEQQGK]<sub>142</sub> und des Peptides  $\beta$  <sub>177</sub>[DKWVxK]<sub>182</sub>, bei  $m/z$  721,696, Ladungszustand 3+. Die Annotierung erfolgte mit MeroX. Photo-Methionin ist als x dargestellt. In den Massenspektren sind a- und b-Ionen rot markiert, y-Ionen blau, nicht annotierte Ionen schwarz und Fragmentionen der Esterbindung sind gelb dargestellt. Photo-Methionin markiertes Peptid als Pep§ und Peptid mit vernetztem Glutamat als Pep# gekennzeichnet. Bei den vernetzten Peptiden sind a- und b-Ionen mit  $\downarrow$  y-Ionen mit  $\uparrow$  und Fragmentionen der Vernetzung mit  $\leftarrow \rightarrow$  markiert. Bei den vernetzten Aminosäuresequenzen korreliert der Farbverlauf der Markierungen von blau nach rot mit der zunehmenden Signalintensität der Fragmentionen im Massenspektrum.

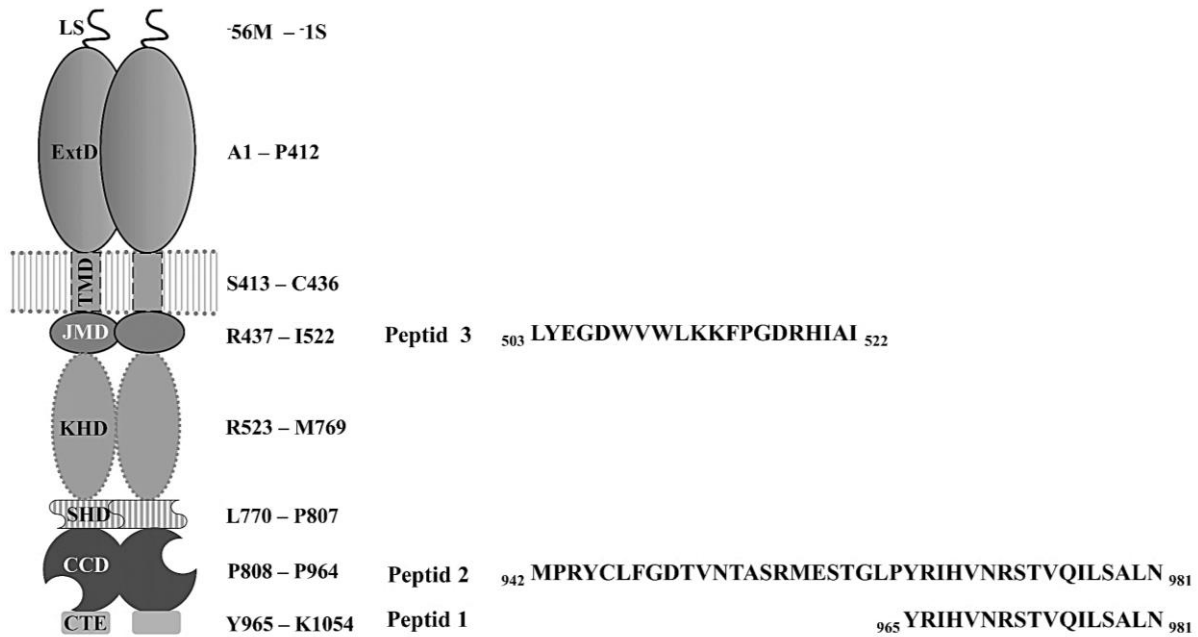
## Ergebnisse

**Tabelle 5: Übersicht der vernetzten Aminosäuren in GCAP-2 mit Photo-Methionin.** Als erste vernetzte Aminosäure ist die Position des Photo-Methionins (PM) in GCAP-2 angegeben. Die eindeutige Identifizierung der vernetzten Aminosäurepositionen erfolgte mit MeroX.

Vernetzte Aminosäure 1	Vernetzte Aminosäure 2	Calcium mit	Calcium ohne
PM181	E147/148		✓
PM203	E134/E136	✓	✓
PM181	E134	✓	✓
PM181	E134/E136	✓	
PM186	E134		✓
PM183	E134		✓
PM64	D53/E55/56	✓	
PM64	D187	✓	
PM183	D187		✓
PM186	D187		✓

### 5.4 Interaktionsstudien zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden

Die Interaktion zwischen der ROS-GC1 und GCAP-1 und -2 während der Phototransduktion ist noch nicht im Detail aufgeklärt. Vor allem die Bindungsregionen von GCAP-1 und -2 bei der ROS-GC1 konnten bisher nicht eindeutig identifiziert werden (siehe 1.1.3). Um die Wechselwirkungen von GCAP-2 mit ROS-GC1 tiefergreifend zu charakterisieren, wurden unterschiedliche Vernetzungsexperimente mit der myristoylierten GCAP-2-Variante und den aus der ROS-GC1 stammenden Peptiden, die mögliche GCAP-Bindemotive umfassen, durchgeführt. Hierzu wurden folgende drei Peptide verwendet, die in Abbildung 26 und Abbildung A 5 dargestellt sind. Peptid 1 (AS 965-981) aus der C-terminalen Verlängerung der ROS-GC1 kam aufgrund der Identifizierung als mögliche Bindestelle für ROS-GC1 zum Einsatz [2, 3]. Um genauere Strukturinformationen zu gewinnen, wurde zusätzlich eine N-terminale Verlängerung von Peptid 1 eingesetzt, die als Peptid 2 (AS 942-981) bezeichnet wird und zusätzlich einen Teil der Kern-katalytischen Domäne (CCD) umfasst. Peptid 2 repräsentiert ein konserviertes Motiv der katalytischen Domäne der Säuger-Guanylatzyklen. Hierbei sind C946, N953 und R957 zur GTP-Erkennung und -Bindung von großer Bedeutung [223, 224, 225].



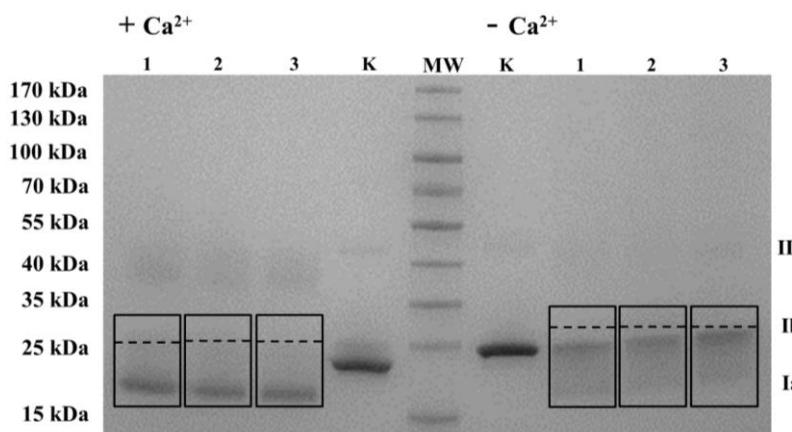
**Abbildung 26: Übersicht der ROS-GC1-Peptide.** Die Nomenklatur und Gliederung der Domänen für das ROS-GC1-Dimer wurden von Duda *et al* [34] übernommen. LS: Leitsequenz, ExtD: extrazelluläre Domäne, TMD: Transmembrandomäne, JMD: Juxtamembrandomäne, KHD: Kinase-Homologie-Domäne, SHD: Signalhelixdomäne, CCD: Kern-katalytische Domäne, CTE: C-terminale Verlängerung. Darstellung der Aminosäuresequenz der drei Peptide aus der Icd. Peptid 1: AS 965-981. Peptid 2: AS 942-981 und Peptid 3: AS 503-522. Die Abbildung wurde nach [226] modifiziert.

Zur Bestimmung einer überlappenden oder getrennten Bindestelle von GCAP-1 und -2 wurde zudem Peptid 3 (AS 503-522) aus der JMD verwendet [4]. Bei der Nummerierung der Aminosäuren in ROS-GC1 nach Duda *et al.* [34] wurden die Aminosäuren (-56M bis -1S) des Signalpeptides (Leitsequenz) in den folgenden Interaktionsstudien nicht berücksichtigt.

#### 5.4.1 Vernetzungen zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden

Für die Vernetzungsstudie zwischen GCAP-2 und den drei ROS-GC1-Peptiden wurden komplementäre Strategien verfolgt, indem Reagenzien mit unterschiedlichen Reaktivitäten und *Spacer*-Längen verwendet wurden. Zunächst wurden die Amin-reaktiven Vernetzungsreagenzien DSBU und CDI (siehe Abbildung 15) eingesetzt, die aufgrund ihrer *Spacer*-Längen von 12,5 und 2,6 Å ähnliche Aminosäureseitenketten in verschiedene Distanzen überbrücken konnten. Des Weiteren wurden UV-induzierte Vernetzungsreaktionen mit Photo-Methionin (PM) durchgeführt, welche bevorzugt mit sauren Aminosäuren in einer Distanz von 8 Å erfolgten (siehe Abbildung A 2). Der Vorteil des zusätzlich verwendeten DAU ist, dass es ausschließlich Cysteine miteinander vernetzt (siehe Abbildung A 3). Die Vernetzungsexperimente zwischen GCAP-2 und den drei ROS-GC1-Peptiden mit DSBU wurden anhand einer SDS-PAGE-Analyse überprüft (siehe Abbildung 27).

## Ergebnisse



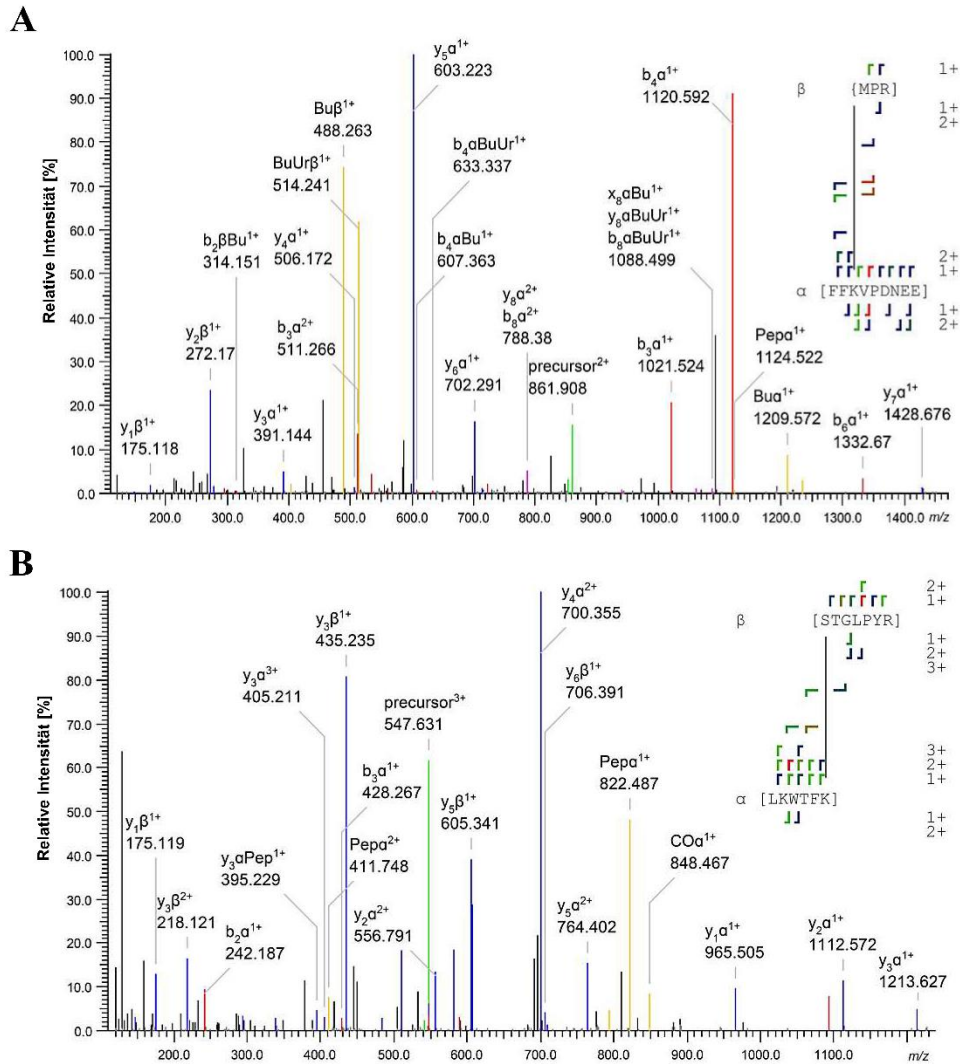
**Abbildung 27: SDS-PAGE-Analyse der DSBU-Vernetzungsreaktionen zwischen GCAP-2 und den drei ROS-GC1-Peptiden.** Die Vernetzungsreaktion wurde mithilfe eines 4-20 %igen Polyacrylamid-Gel (Coomassie-Brilliantblau-Färbung) in der An- (+Ca<sup>2+</sup>) und Abwesenheit (-Ca<sup>2+</sup>) von Calcium analysiert. 1: Peptid 1 (AS 965-981), 2: Peptid 2 (AS 942-981), 3: Peptid 3 (AS 503-522), K: nur GCAP-2, ohne Zugabe von Peptid und DSBU, MW: Molekulargewichtsstandard, Ia: Signale des GCAP-2-Monomers, Ib: des GCAP-2/Peptid-Komplexes (1:1) und II: des GCAP-2-Dimers. Ia und Ib wurden für eine In-Gel-Proteolyse ausgeschnitten und zur MS-Analyse vereint. Die Abbildung wurde modifiziert nach [226].

Hierbei ist die Auftrennung der GCAP-2-Monomere (I) und -Dimere (II) bei 1 mM CaCl<sub>2</sub> (+Ca<sup>2+</sup>) und 10 mM EGTA (-Ca<sup>2+</sup>) zu erkennen. Jedoch war keine klare Trennung des GCAP-2-Monomers (Ia) und des GCAP-2/ROS-GC1-Peptid-Komplexes (1:1) (Ib) möglich, so dass beide Signale für die nachfolgende Proteolyse im Gel vereint wurden. Für die CDI, DAU und Photo-Methionin-Vernetzungsreaktionen wurde jeweils eine Proteinspaltung in Lösung durchgeführt.

Die anschließende Identifizierung der Vernetzungsprodukte mit Massenspektrometrie erfolgte mit der Software MeroX. Hierzu ist exemplarisch in Abbildung 28 die Zuordnung einer DSBU- und einer CDI-Vernetzung zwischen GCAP-2 und dem ROS-GC1-Peptid 2 mittels MeroX abgebildet. In Abbildung 28A ist die Verknüpfung des N-Terminus des Peptides 2 durch DSBU mit K50 von GCAP-2 dargestellt. Abbildung 28B zeigt die Verknüpfung mit CDI zwischen S19/T20 des Peptides 2 und K102 von GCAP-2. In beiden Fällen war eine nahezu vollständige Fragmentierung der vernetzten Peptide nachweisbar, was die eindeutige Zuordnung der vernetzten Aminosäuren erlaubt. Des Weiteren waren die charakteristischen Fragmentationen der jeweiligen Vernetzungsreagenzien zu identifizieren.



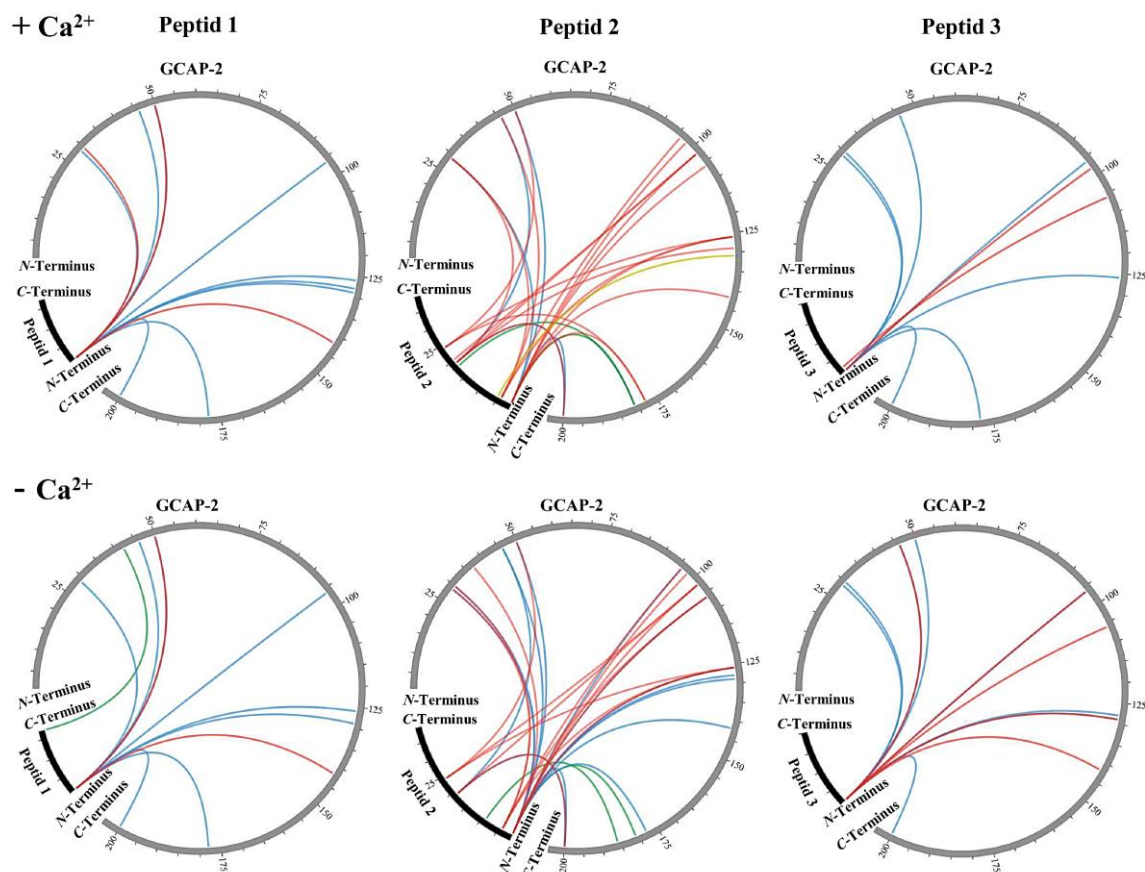
## Ergebnisse



**Abbildung 28: Fragmentationsspektren von Vernetzungsprodukten zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptid 2.** Die Annotierung erfolgte mit MeroX. **A)** Identifizierte DSBU-Vernetzung zwischen N-Terminus des Peptides 2 (AS 1-3) und K50 von GCAP-2 (AS 48-56) durch die Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions  $[M+2H]^{2+}$  mit  $m/z$  861,908. **B)** Identifizierte CDI-Vernetzung zwischen S19/T20 des Peptides 2 (AS 19-25) und K102 von GCAP-2 (AS 97-102) durch die Fragmentierung des dreifach geladenen Vorläuferions  $[M+3H]^{3+}$  bei  $m/z$  547,631. In den Massenspektren sind a- und b-Ionen rot markiert, y-Ionen blau, nicht annotierte Ionen schwarz und Fragmentionen des Vernetzungsreagenz sind gelb dargestellt. Das Vorläuferion ist grün gekennzeichnet. Bei den vernetzten Peptiden sind a- und b-Ionen mit  $\perp$ , y-Ionen mit  $\sqcap$  und Fragmentionen des Vernetzungsreagenz mit  $\llcorner$  markiert. Bei den vernetzten Aminosäuresequenzen korreliert der Farbverlauf der Markierungen von blau nach rot mit einer zunehmenden Signalintensität der Fragmentionen im Massenspektrum. Die Abbildung wurde nach [226] modifiziert.

In Abbildung 29 sind die identifizierten Vernetzungen zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden in zirkulären Plots im Calcium-beladenen ( $+Ca^{2+}$ ) und Calcium-freien ( $-Ca^{2+}$ ) Zustand gegenübergestellt, um die Calcium-abhängigen Unterschiede der Vernetzungen zu veranschaulichen. Die zugehörigen Vernetzungsprodukte sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

## Ergebnisse



**Abbildung 29:** Übersicht der identifizierten Vernetzungen zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden 1, 2 und 3. Die zirkulären Plots wurden mit der Software Circos [193] erstellt. +Ca<sup>2+</sup>: Identifizierte Vernetzungsprodukte in 1 mM Ca<sup>2+</sup> (obere Reihe). -Ca<sup>2+</sup>: Identifizierte Vernetzungsprodukte in 10 mM EGTA (untere Reihe). Vernetzungen mit DSBU sind blau dargestellt, mit CDI rot, mit DAU gelb und mit Photo-Methionin grün. Die Abbildung wurde nach [226] modifiziert.

**Tabelle 6:** Vernetzte Aminosäuren zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden 1, 2 und 3. Vernetzungspositionen bei der Verwendung der Reagenzien DSBU, CDI, DAU und Photo-Methionin (PM) in An- und Abwesenheit von Calcium. Die Übersicht wurde aus [226] modifiziert dargestellt.

	Position 1 ROS-GC1-Peptid	Position 2 GCAP-2	Calcium mit	Calcium ohne
<b>Peptid 1</b>	C-Term	PM42		✓
	N-Term	K126	✓	✓
	N-Term	K128/129	✓	✓
	N-Term	K178	✓	✓
	N-Term	K200	✓	✓
	N-Term	K29/30	✓	✓
	N-Term	K46	✓	✓
	N-Term	K50	✓	✓
	N-Term	K96	✓	✓
	N-Term	K142	✓	✓
<b>Peptid 2</b>	C5	C131	✓	

## Ergebnisse

	D9	PM186		✓
	E18	PM181	✓	
	M1	PM181	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K102	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K106	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K128/129		✓
	<i>N</i> -Term	K142	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K178	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K200	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K29/30	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K46		✓
	<i>N</i> -Term	K50	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K96		✓
	<i>N</i> -Term	K98	✓	✓
	<i>N</i> -Term	S37		✓
	<i>N</i> -Term	Y125/126	✓	✓
	S19	K200	✓	✓
	S19	K46	✓	✓
	S19/T20	K102	✓	✓
	S19/T20	K129	✓	
	S19/T20	K29	✓	
	S19/T20/Y24	K200	✓	✓
	Y24	K102		✓
	Y24	K126	✓	✓
	Y24	K178	✓	
	Y24	K50	✓	✓
	Y4	K106		✓
	Y4	K126	✓	✓
	Y4	K29/30	✓	✓
	Y4	K46	✓	
	Y4	K96/98	✓	✓
<b>Peptid 3</b>	<i>N</i> -Term	K126	✓	
	<i>N</i> -Term	K128/129		✓
	<i>N</i> -Term	K178	✓	
	<i>N</i> -Term	K200	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K29/30	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K46	✓	✓
	<i>N</i> -Term	K50		✓
	<i>N</i> -Term	K96	✓	✓
	<i>N</i> -Term/Y2	K98	✓	
	Y2	K106	✓	✓
	Y2	K142		✓

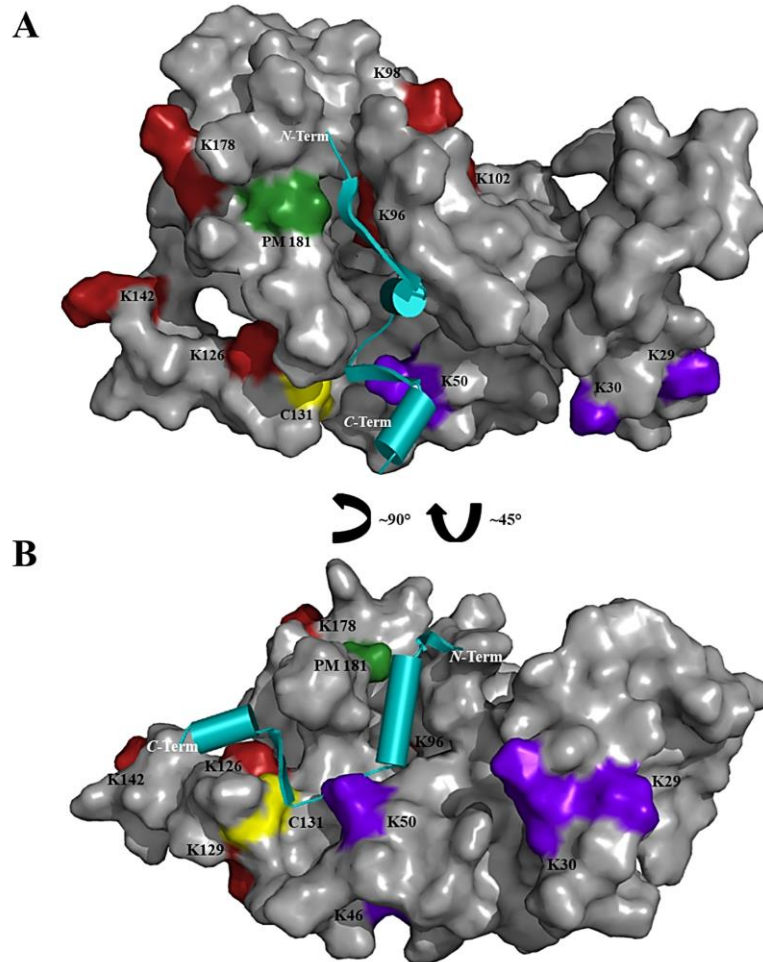
Detaillierte Aufstellungen aller identifizierten Vernetzungsprodukte sind im Anhang in den Tabellen A 4 bis A 7 aufgelistet. Für ROS-GC1-Peptid 1 konnten die Vernetzungen zwischen dem *N*-Terminus und GCAP-2 in der An- und Abwesenheit von Calcium nachgewiesen

## Ergebnisse

werden. Es wurde eine zusätzliche Verknüpfung zwischen Photo-Methionin (PM42) in GCAP-2 und dem C-Terminus von ROS-GC1-Peptid 1 im Calcium-freien Zustand identifiziert. Bei Peptid 2 sind zwei Interaktionsregionen identifizierbar: Die erste umfasst AS 1 bis 9, die zweite AS 18 bis 24. Die Aminosäuresequenz der zweiten Interaktionsstelle stimmt mit der N-terminalen Region des Peptides 1 überein, sodass diese Resultate die Vernetzungsprodukte mit Peptid 1 bestätigten. Insgesamt konnten mit Peptid 2 im Calcium-beladenen und -freien Zustand eine vergleichbare Anzahl an Vernetzungen identifiziert werden. Bei der Analyse war auffällig, dass CDI hauptsächlich in Anwesenheit von Calcium Peptid 2 mit der C-terminalen Hälfte (AS K129 bis K200) von GCAP-2 vernetzte, wohingegen die DSBU-Vernetzungen vermehrt in der Abwesenheit von Calcium identifiziert wurden.

Des Weiteren wurden die Lysine K96, K98, K102, K106 und K126 in GCAP-2 in An- und Abwesenheit von Calcium mit ROS-GC1-Peptid 2 verknüpft und bilden somit eine bedeutende Interaktionsregion. Dies wurde zudem durch Vernetzungen mit Photo-Methionin und DAU in der gleichen Region gestärkt. Die DAU-Vernetzung wurde nur in der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  nachgewiesen. Die Anzahl der identifizierten Vernetzungen mit Peptid 3 war geringer als bei Peptid 2 und vergleichbar im  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen und -freien Zustand. DSBU und CDI reagierten nur mit dem N-Terminus bzw. Y2 des Peptides 3, obwohl Peptid 3 zwei Lysine enthält, die bevorzugt von den Amin-reaktiven Reagenzien vernetzt werden sollten. Es konnten keine Verknüpfungen durch Photo-Methionin zwischen GCAP-2 und Peptid 3 beobachtet werden. Zusammenfassend sind in Abbildung 30 alle Aminosäuren von GCAP-2, die mit Peptid 2 vernetzt wurden, farblich auf der Oberfläche der Struktur des nicht-myristoylierten GCAP-2 im Calcium-beladenen Zustand (PDB-Eintrag: 1JBA) gezeigt. Hierbei wird deutlich, dass einige verknüpfte Aminosäuren eine Vertiefung in GCAP-2 umranden. Diese könnte eine mögliche Interaktionsstelle für ROS-GC1 darstellen. Nach den Homologiemodellen der katalytischen Domäne der Adenylatzyklase [227] (Ratte, Typ II, PDB-Eintrag: 1AWL) und der Guanylatzyklase [223] (Grünalge, PDB-Eintrag: 3ET6) besteht ROS-GC1-Peptid 2 sowohl aus zwei  $\alpha$ -Helices als auch zwei  $\beta$ -Faltblättern. Peptid 2 wurde in die mögliche Interaktionsregion von GCAP-2 platziert (siehe Abbildung 30).

## Ergebnisse

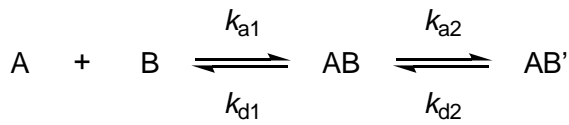


**Abbildung 30: Übersicht der vernetzten Aminosäuren von GCAP-2 mit ROS-GC1-Peptid 2.** A) Vorderansicht. B) Seitenansicht. Auf der Oberfläche des nicht-myristoylierten,  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen GCAP-2 (PDB-Eintrag: 1JBA) sind die vernetzten Aminosäuren farblich wie folgt markiert: mit DSBU und CDI vernetzte Aminosäuren violett, mit CDI vernetzte Aminosäuren rot, mit DAU vernetzte Aminosäuren gelb, mit Photo-Methionin (PM) vernetzte Aminosäuren grün. Das vernetzte K200 von GCAP-2 kann nicht gezeigt werden, da die C-terminale Region von AS 191 bis 204 nicht in der NMR-Struktur aufgelöst ist. ROS-GC1-Peptid 2 (PDB-Eintrag: 1AWL) ist in türkis als Cartoon in der möglichen Interaktionsregion von GCAP-2 dargestellt.

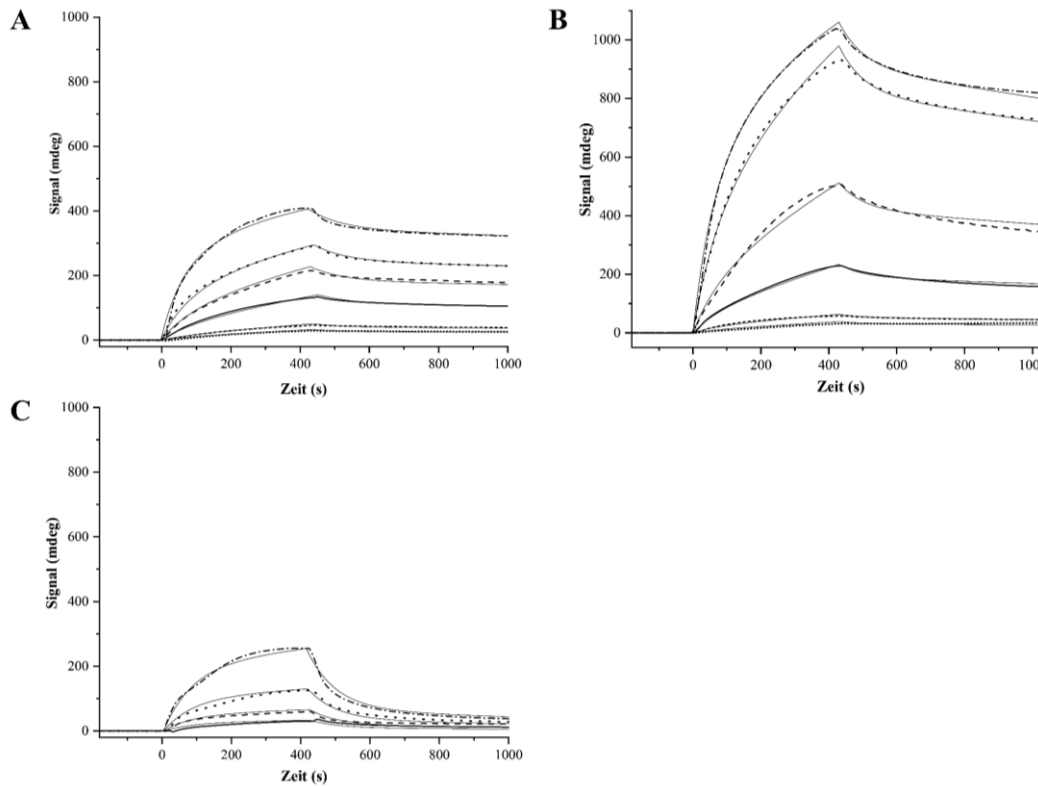
### 5.4.2 Affinität von GCAP-2 zu ROS-GC1-Peptiden

Um die Affinität zwischen GCAP-2 und den drei ROS-GC1-Peptiden zu bestimmen, wurden die  $K_D$ -Werte der drei Protein/Peptid-Komplexe mithilfe der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) bestimmt. Hierzu wurde GCAP-2 auf einen CMD-Sensorchip immobilisiert und Lösungen mit steigenden Peptidkonzentrationen über den Chip geleitet. Die erhaltenen Sensogramme zweier unabhängiger Messungen sind in Abbildung 31 und A 9 dargestellt. Zur kinetischen Analyse wurde ein 1:1-Bindungsmodell verwendet, das eine Konformationsänderung in GCAP-2 nach der Peptidbindung und somit zwei Bindungsereignisse umfasst (siehe Gleichung 5, A: ROS-GC1-Peptid, B: GCAP-2).

## Ergebnisse



(Gleichung 5)



**Abbildung 31: Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden.** A) Messungen mit ROS-GC1-Peptid 1, B) mit ROS-GC1-Peptid 2 und C) mit ROS-GC1-Peptid 3. 5  $\mu\text{M}$  GCAP-2 wurden auf dem CMD-Sensorchip immobilisiert. Die folgenden Peptidkonzentrationen wurden injiziert: 0,5, 1, 5, 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  (Peptid 1 und 2). Bei Peptid 3 wurden ausschließlich Konzentrationen von 5 bis 40  $\mu\text{M}$  injiziert. Die Ausgleichskurven sind als durchgängige Linien dargestellt. Die  $K_D$ -Werte für die Interaktion von GCAP-2 mit Peptid 1 betrug bei dieser Messung  $1,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$  und mit Peptid 2  $3,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . Zwischen GCAP-2 und Peptid 3 war kein  $K_D$ -Wert bestimmbar. Ein weiterer Datensatz ist dem Anhang zu entnehmen (Abbildung A 9). Die Abbildung wurde nach [226] modifiziert.

Da die Bildung des Komplexes zwischen ROS-GC1-Peptid und GCAP-2 ( $AB'$ ) in Gleichung 5 keine Signalveränderung hervorruft, konnte nur ein globaler  $K_D$ -Wert ermittelt werden. Bei den in Abbildung 31 dargestellten Messungen betrug der  $K_D$ -Wert für ROS-GC1-Peptid 1  $1,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ , für ROS-GC1-Peptid 2  $3,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . Gemeinsam mit dem Datensatz in Abbildung A 9 konnte als Mittelwert für Peptid 1 ein  $K_D$ -Wert von  $2,4 \mu\text{M}$  und für Peptid 2 ein  $K_D$ -Wert  $2,0 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Für die Kurven von Peptid 3 war es nicht möglich, ein zuverlässiges Bindungsmodell anzuwenden und somit eine Affinitätskonstante zu bestimmen. Dies deutet auf eine sehr schwache Bindung hin, die mittels SPR nicht detektierbar war. Um die Ergebnisse der SPR-Messungen zu überprüfen, wurde die Interaktion zusätzlich mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Die Auswertung der Fluoreszenz-Daten erfolgte in

## Ergebnisse

Zusammenarbeit mit Dr. Ralph Golbik (Abteilung Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg). Durch Kontrollexperimente wurde ausgeschlossen, dass die Veränderungen der Fluoreszenzintensität während der Messung durch die Eigenfluoreszenz der Tryptophan- und Tyrosinreste in den Peptiden verursacht wurde. Hierzu kamen die Reagenzien N-Acetyl-L-tryptophanamid sowie N-Acetyl-L-tyrosinamid zum Einsatz, da sie die Zusammensetzung und spektroskopischen Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren der Peptide widerspiegeln. Im Vergleich zu diesen Negativkontrollen wiesen nur ROS-GC1-Peptid 1 und 2 eine Fluoreszenzänderung auf, die durch die Bindung an GCAP-2 hervorgerufen wurde (siehe Abbildung A 10). Die Titrationsdaten von Peptid 1 wurden anhand einer Optimumskurve angeglichen, da zunächst eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, gefolgt von einer Abnahme, aufgezeichnet wurde. Dies war auf die Fluoreszenzlöschung beim zweiten Bindeereignis zurückzuführen. Die  $K_D$ -Werte für Peptid 1 betragen  $4,2 \mu\text{M}$  und  $244 \mu\text{M}$ . Für Peptid 2 betrug durch die Extrapolation des Startpunktes der erste  $K_D$ -Wert  $1 \mu\text{M}$ . Ebenfalls war ein zweites Bindungsereignis nachweisbar, für welches ein  $K_D$ -Wert von  $326 \mu\text{M}$  ermittelt wurde. Die durch die Fluoreszenztitration bestimmten  $K_D$ -Werte befanden sich somit in der gleichen Größenordnung wie die SPR-Daten (siehe Tabelle 7). Für die SPR- und Fluoreszenzmessungen wurde die Calciumkonzentration der Puffer mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) durch Dr. Martin Herzberg (Abteilung Molekulare Mikrobiologie, MLU Halle-Wittenberg) bestimmt. Diese betrug  $\sim 2 \mu\text{M}$ .

*Tabelle 7: Ermittelte  $K_D$ -Werte zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden mittels SPR und Fluoreszenzspektroskopie.*

<b>ROS-GC-Peptide</b>	<b>SPR <math>K_D</math>-Wert</b>	<b>Fluoreszenzspektroskopie <math>K_D</math>-Wert</b>
Peptid 1	$2,4 \mu\text{M}$	1. $4,2 \mu\text{M}$ 2. $244 \mu\text{M}$
Peptid 2	$2,0 \mu\text{M}$	1. $1,0 \mu\text{M}$ 2. $326 \mu\text{M}$
Peptid 3	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar

## **5.5 Charakterisierung der humanen ROS-GC1 aus HEK 293-Zelllysaten**

Für die strukturelle Analyse der membranständigen Vollängen-ROS-GC1 wurde die humane ROS-GC1 aus HEK 293 Zelllysaten verwendet. Zunächst wurde die ROS-GC1-Aktivität in der unlöslichen Membranfraktion bestimmt. So wurde sichergestellt, dass die Vernetzung/MS-Experimente im HEK 293-Zelllysaten mit funktionaler ROS-GC1 durchgeführt wurden. Anschließend sollte die Vernetzung/MS-Analyse von ROS-GC1 ohne Reinigung des Proteins durchgeführt werden, um strukturelle Informationen zur ROS-GC1 in der zellulären Umgebung zu gewinnen. Hierzu wird in Kapitel 5.5.2 die Optimierung der Arbeitsschritte zur Identifizierung der ROS-GC1-Peptide aus der komplexen Peptidmischung, die bei der Proteolyse des Zelllysats gebildet wurde, beschrieben.

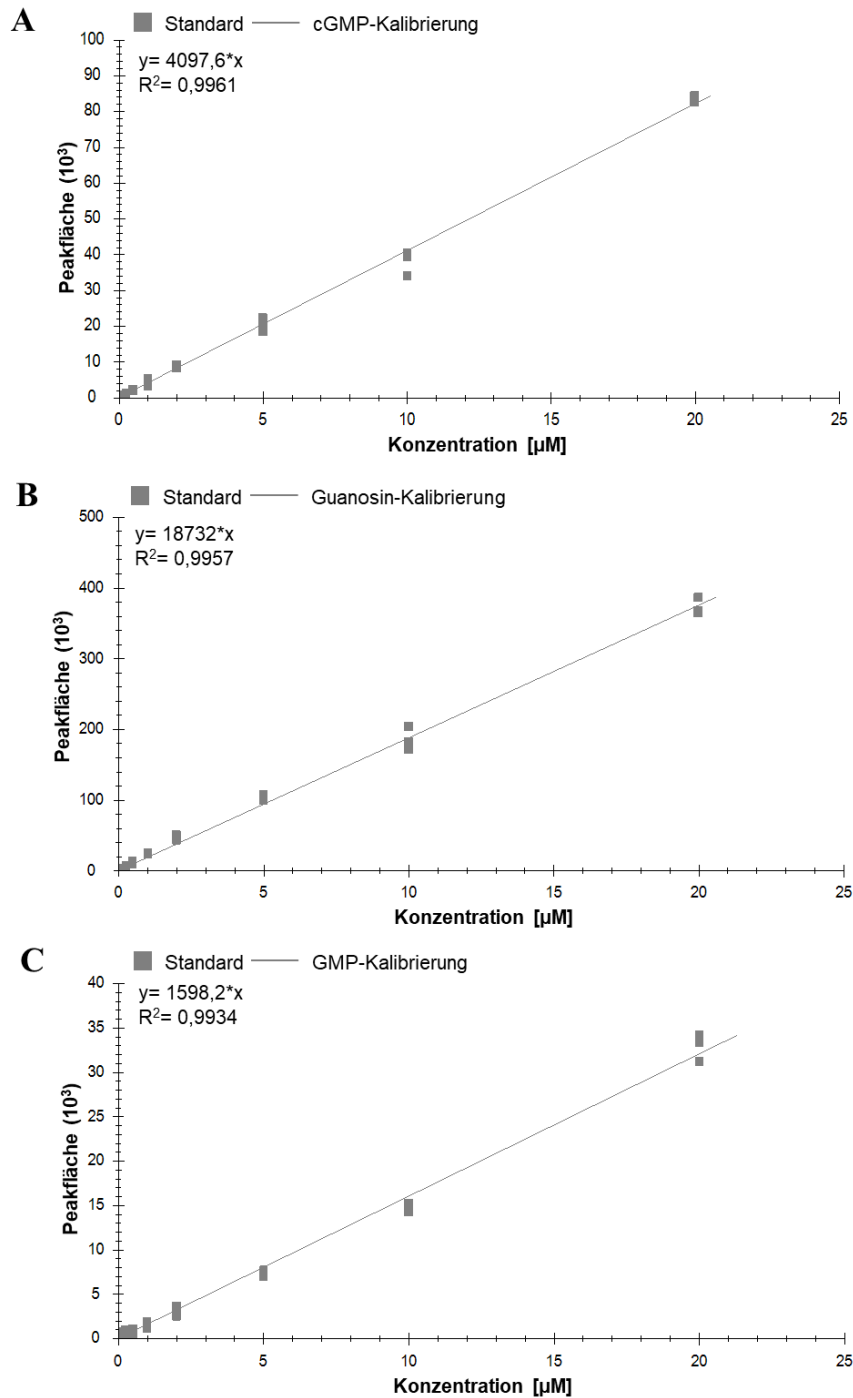
### **5.5.1 Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1 in den HEK 293-Membranen**

Die Überprüfung der ROS-GC1-Aktivität erfolgte durch die Bestimmung des GTP-Umsatzes zu cGMP über massenspektrometrische MRM-Analysen mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, wie in 4.3.11 und 4.5.4 erläutert wird. Hierzu wurden die Vorläuferionen von cGMP, GMP und Guanosin zur Fragmentierung ausgewählt und ein definiertes Fragmention, welches die Base Guanin umfasst, analysiert. Die spezifischen Übergänge der Vorläuferionen in den Massenspektren zu den jeweiligen Fragmentionen sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Durch die Auftragung der Signalintensitäten der Fragmentionen gegen die Retentionszeiten wurden die zugehörigen Chromatogramme der MRM-Analyse erhalten (siehe Abbildung A 13). Die Peakflächen der Signalintensitäten dienen der Konzentrationsbestimmung der gebildeten Metabolite. Zunächst wurden Kalibriergeraden anhand von definierten cGMP-, GMP- und Guanosin-Standards erstellt (siehe Abbildung 32 und Abbildung A 13). Es konnte ein linearer, reproduzierbarer Zusammenhang zwischen den Nukleotid-/Nukleosidkonzentrationen und den ermittelten Peakflächen nachgewiesen werden. Daher konnten die Kalibrierfunktionen in Abbildung 32 zur Konzentrationsbestimmung von cGMP, GMP und Guanosin verwendet werden. Für die Aktivitätsmessungen der ROS-GC1 wurde die Suspension der HEK 293-Membranfraktion eingesetzt (siehe 4.2.3.2).

Durch Zusatz von IBMX in einer Konzentration von 10 mM konnte eine unspezifische Phosphodiesterase (PDE)-Aktivität, die zur Hydrolyse des cGMP führt, verhindert werden. In Kontrollexperimenten war keine Enzymaktivität in der Probe, die zur Bildung von GMP und Guanosin führte, nachweisbar (siehe 4.3.11).



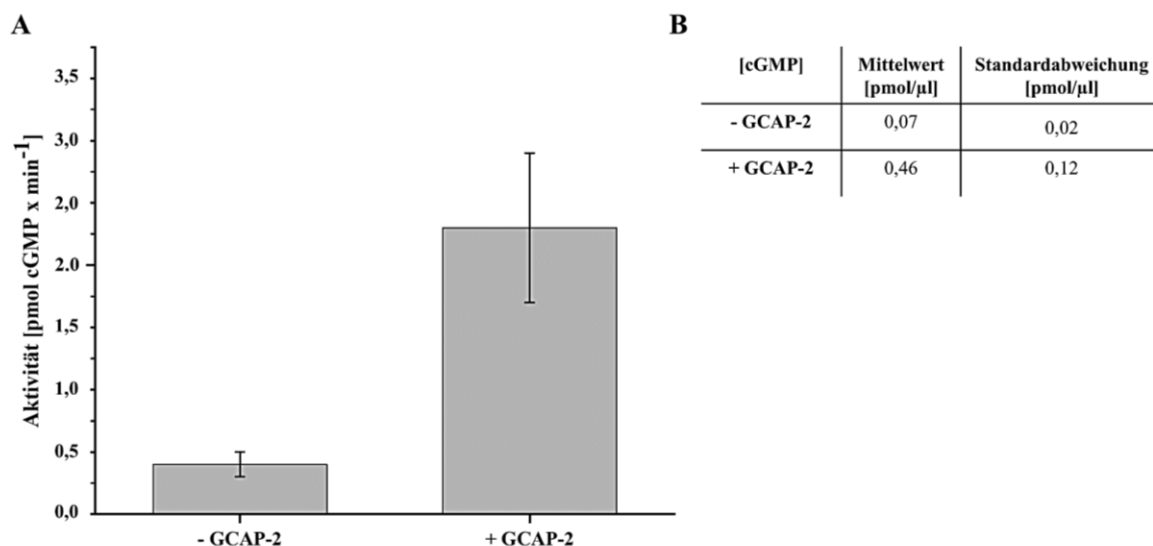
## Ergebnisse



**Abbildung 32: Kalibrierkurven zur Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1.** Die Peakflächen der MRM-Experimente wurde gegen die Konzentration der Nukleotide/-side aufgetragen. **A)** Kalibrierung von cGMP, **B)** von Guanosin und **C)** von GMP im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 20  $\mu\text{M}$ . Es wurde für jede Konzentration eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1 erfolgte anhand der gebildeten cGMP-Menge. Die basale ROS-GC1-Aktivität mit  $0,4 \pm 0,1 \text{ pmol cGMP} \times \text{min}^{-1}$  wurde nach 10 min bestimmt (siehe Abbildung 33). Durch die Zugabe von GCAP-2 wurde die Aktivität auf  $2,3 \pm 0,6 \text{ pmol cGMP} \times \text{min}^{-1}$  gesteigert werden.

## Ergebnisse



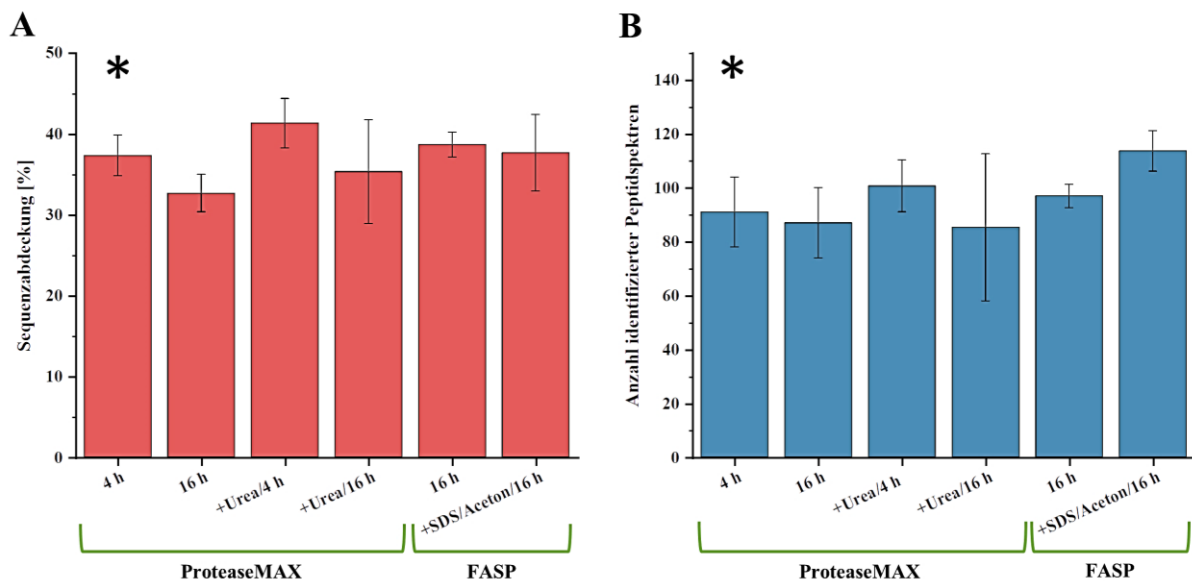
**Abbildung 33:** Aktivitätsbestimmung der humanen ROS-GC1 in HEK 293-Membranfraktion. **A)** ROS-GC1-Aktivitäten (pmol cGMP x min<sup>-1</sup>) und **B)** gebildete cGMP-Konzentrationen. Die ROS-Präparation wurde bei 37°C für 10 min in der Abwesenheit von Calcium und ohne/mit Zugabe von 1 μM GCAP-2 (-/+ ) inkubiert.

### 5.5.2 Optimierung der proteolytischen Spaltung der ROS-GC1

Um die Vernetzungsexperimente durchführen zu können, musste eine effiziente ROS-GC1-Proteolyse aus dem HEK 293-Zelllysat gewährleistet werden. Die Bedingungen zur Proteolyse wurden daher optimiert. Die Resultate der Vorversuche verschiedener Proteolyse-Protokolle sind in Abbildung A 11 dargestellt und wurden anhand der erzielten Sequenzabdeckung (%) sowie der Anzahl identifizierter Peptidspektren (*peptide spectrum matches*, PSMs) für ROS-GC1 beurteilt. Hierbei zeigte sich, dass die Denaturierung mit Harnstoff (*urea*), auch in Kombination mit Guanidiniumchlorid (Gua), wie es für die Spaltung von gereinigten Proteinen verwendet wird (siehe 4.3.13), unzureichend war (siehe Abbildung A 11). Deshalb wurden zusätzlich folgende Protokolle getestet: *Filter-aided sample preparation* (FASP) [191], *surfactant and chaotropic agent-assisted sequential extraction/on-pellet digestion* (SCAD) [192] und das ProteaseMAX-Tensid-Protokoll [205, 206]. Beim SCAD-Protokoll wurde mit dem Einsatz von LysC und Trypsin eine Sequenzabdeckung von maximal 35 % erzielt und die Anzahl der identifizierten PSMs betrug maximal 80. Somit wurde ersichtlich, dass die Kombination zweier Proteasen die Effektivität der Proteolyse im Vergleich zum FASP- und ProteaseMAX-Protokoll nicht steigern konnte. Gegenüber zum SCAD-Ansatz war jedoch der geringere Arbeitsaufwand bei der Probenvorbereitung während des FASP- und ProteaseMAX-Protokolls von Vorteil, so dass diese beiden Protokolle zur weiteren Optimierung der Versuchsbedingungen für die Proteolyse in Lösung der membranständigen ROS-GC1 ausgewählt wurden. Hierbei wurden für das ProteaseMAX-Protokoll Trypsin-Inkubations-

## Ergebnisse

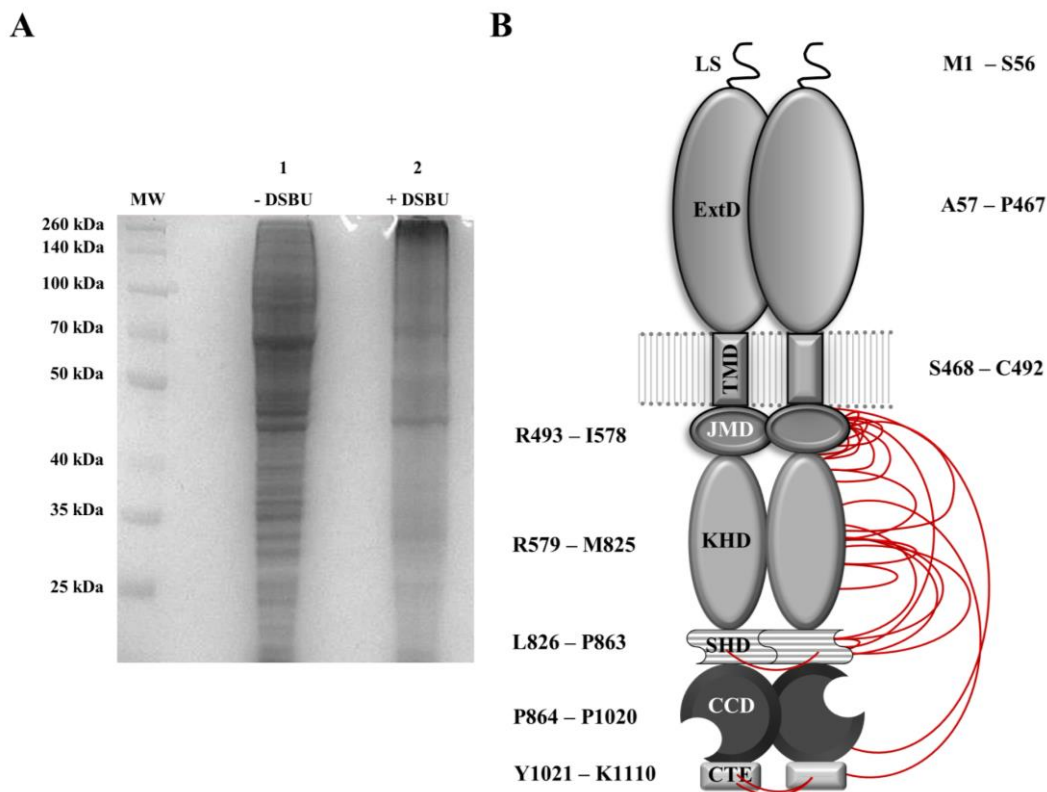
zeiten von vier und 16 Stunden sowie eine zusätzliche Zugabe von 8 M Harnstoff (*Urea*) getestet. Beim FASP-Protokoll wurde überprüft, ob der Einsatz von SDS zur Denaturierung die Effizienz der Proteinspaltung steigern konnte. Abbildung 34 zeigt, dass bei allen Ansätzen vergleichbare Ergebnisse mit Sequenzabdeckungen von etwa 40 % sowie von ~100 identifizierten PSMs erreicht wurden. Eine verlängerte Inkubationszeit als auch die zusätzliche Verwendung von Harnstoff oder SDS trug zu keiner wesentlichen Erhöhung der Sequenzabdeckung sowie der Anzahl an PSMs bei, so dass auf längere Inkubationszeiten sowie zusätzliche Denaturierungsreagenzien verzichtet wurde. Abschließend wurde die Effektivität der Proteolyse für beide Protokollvarianten (ProteaseMAX, FASP) unter den Bedingungen der DSBU-Vernetzungsreaktion in Ab- und Anwesenheit von 0,5 und 1  $\mu$ M GCAP-2 verglichen (siehe Abbildung A 12). Hierbei konnten für die ROS-GC1-Sequenzabdeckung und die Zahl der PSMs vergleichbare Ergebnisse mit beiden Protokollen erzielt werden. Aufgrund des geringeren Zeit- und Arbeitsaufwandes wurde das ProteaseMAX-Protokoll (vier Stunden Inkubationszeit) für die folgenden Vernetzungsexperimente angewendet.



**Abbildung 34: Optimierung der Proteolyse in Lösung für ROS-GC1.** A) Darstellung der prozentualen Sequenzabdeckung (%) von ROS-GC1 und B) die Anzahl der identifizierten Peptidspektren (peptide spectrum matches, PSM) von ROS-GC1. +Urea: zusätzliche Zugabe von Harnstoff zur Denaturierung der Proteine, +SDS/Aceton: zusätzliche Zugabe von SDS mit nachfolgender Acetonfällung der Proteine. \*: verwendetes Protokoll. Die Proteolyse mit Trypsin (Inkubationszeit 4 oder 16 h) erfolgte nach ProteaseMAX Tensid- oder FASP-Protokoll. Analysen wurden in Triplikaten durchgeführt. Detaillierte Protokollbeschreibungen sind 4.3.13.1 zu entnehmen.

### 5.5.3 Chemische Vernetzung zur Strukturanalyse von ROS-GC1

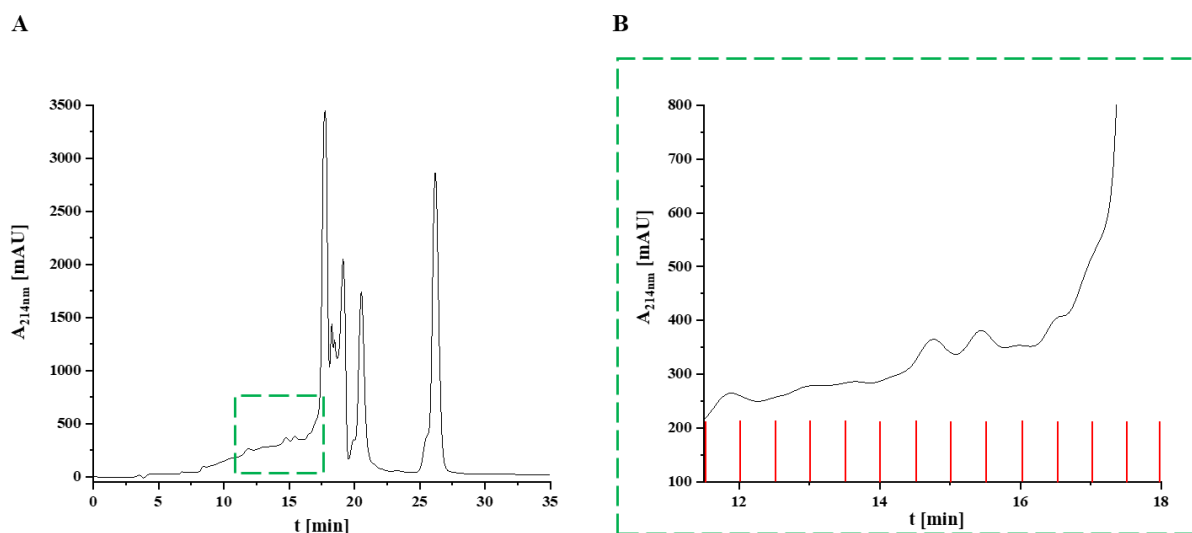
Für die Strukturanalyse von ROS-GC1 wurde das HEK 293-Zelllysats, welches überexprimierte, humane ROS-GC1 enthielt, verwendet (siehe 4.2.3.2). Nach Zugabe von GCAP-2 erfolgte die chemische Vernetzung mit DSBU zunächst in der Abwesenheit von Calcium. Hierfür wurde 1 mM DSBU in seiner nicht-deuterierten Variante oder als äquimolares Gemisch aus nicht-deuterierter und zwölfmal-deuterierter Form (D<sub>0</sub>/D<sub>12</sub>) eingesetzt (siehe 4.4.2). Mithilfe der SDS-PAGE-Analyse (siehe Abbildung 35A) wurde durch die Vernetzung des Zelllysats eine Verschiebung der Proteinsignale in den höher molekularen Bereich sichtbar. Somit konnte gezeigt werden, dass die Vernetzungsreaktion des Zelllysats erfolgreich war. Anschließend wurde die unlösliche Membranfraktion, die ROS-GC1 enthielt, mithilfe eines Zentrifugationsschritts abgetrennt, die Proteinspaltung mithilfe des ProteaseMAX-Protokolls (siehe 5.5.2) durchgeführt und das erhaltene Peptidgemisch massenspektrometrisch analysiert.



**Abbildung 35: Vernetzung mit DSBU von ROS-GC1 im HEK 293-Zelllysats.** SDS-PAGE-Analyse des vernetzten Zelllysats anhand eines 10 %igen Polyacrylamid-Gels (Coomassie-Brilliantblau-Färbung). 1: ohne Zugabe von DSBU, 2: Zugabe von DSBU und MW: Molekulargewicht. **B**) Graphische Übersicht der DSBU-Vernetzungsprodukte in Rot im ROS-GC1-Dimer. Die Gliederung der Domänen für das ROS-GC1-Dimer wurde von Duda et al [34] übernommen und die Darstellung nach [226] modifiziert. LS: Leitsequenz, ExtD: extrazelluläre Domäne, TMD: Transmembrandomäne, JMD: Juxtamembrandomäne, KHD: Kinase-Homologie-Domäne, SHD: Signalhelixdomäne, CCD: Kern-katalytische Domäne, CTE: C-terminale Verlängerung.

## Ergebnisse

Trotz einer zuvor erfolgten Optimierung der Proteolyse (siehe 5.5.2) war es nicht möglich, vernetzte ROS-GC1-Peptide zu identifizieren. Daher wurden zusätzlich die Vernetzungsprodukte, die bei der Proteolyse in Lösung entstanden, mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) angereichert (siehe 4.4.4). Hierbei konnten die Vernetzungsprodukte von den linearen Peptiden abgetrennt und somit die Probenkomplexität reduziert werden (siehe Abbildung 36). Die in Abbildung 36B dargestellten Fraktionen wurden für die nachfolgende LC/MS/MS-Analyse verwendet. Der Anreicherungsschritt in Kombination mit einer zielgerichteten Analyse (siehe 4.5.2), bei der bevorzugt Vernetzungsprodukte der ROS-GC1 zur Fragmentierung ausgewählt wurden, ermöglichte die Identifizierung der gering abundanten ROS-GC1-Vernetzungsprodukte aus dem HEK 293-Zellysat. Da DSBU während der MS/MS-Experimente gespalten wurde, konnten charakteristische Fragmentationen für das Vernetzungsreagenz generiert werden. Dies erleichterte ebenfalls die Identifizierung der ROS-GC1-Vernetzungsprodukte aus der hoch komplexen Peptidmischung und ermöglichte durch die Software MeroX eine vollständig automatische Annotierung der Vernetzungen, welche manuell überprüft wurde. Insgesamt konnten in der LC/MS/MS-Analyse 27 Vernetzungen identifiziert werden, die in Abbildung 35B graphisch abgebildet sowie in Tabelle 8 zusammengefasst sind. Die Nummerierung der humanen und bovinen ROS-GC1 unterscheidet sich in fünf Aminosäuren. Ein Sequenzvergleich der humanen und bovinen ROS-GC1-Varianten ist in Abbildung A 18 dargestellt.



**Abbildung 36:** SEC des Peptidgemisches des HEK 293-Zellysats. A) Chromatogramm zur Abtrennung der mit DSBU vernetzten Peptide nach der Proteolyse in Lösung. Grün markiert ist der Retentionsbereich, der in B) vergrößert dargestellt ist. B) 500 µl-Fractionen, die zwischen 12 und 18 Minuten eluierten, wurden aufgrund ihrer vermutlich enthaltenen Vernetzungsprodukte zur LC/MS/MS-Analyse ausgewählt.

## Ergebnisse

Um die Ergebnisse der Vernetzungsexperimente der humanen ROS-GC1 mit den Resultaten aus den folgenden Kapiteln 5.6 und 5.7 vergleichen zu können, ist in Tabelle 8 die bovine Nummerierung der ROS-GC1 für die Vernetzungsprodukte angegeben. Eine Gegenüberstellung der humanen und bovinen Nummerierung für die ROS-GC1 ist Tabelle A 8 zu entnehmen. Detaillierte Auflistungen aller identifizierten Vernetzungsprodukte sind in Tabelle A 9, A 10 und A 11 dargestellt.

**Tabelle 8: DSBU-Vernetzungen der humanen ROS-GC1.** Auflistung der vernetzten Aminosäurepositionen 1 und 2 sowie die dazugehörigen Domänen, in denen die Aminosäuren lokalisiert sind. Es wurde die Nummerierung der bovinen ROS-GC1 verwendet. Vernetzungen zwischen zwei identischen oder sich überlappenden Aminosäuresequenzen wurden als intermolekulare Vernetzungen zwischen zwei Monomeren betrachtet und sind grau hinterlegt. Die Abkürzungen der Domänen sind in Abbildung 26 und Abbildung 35 beschrieben.

<b>Vernetzte Aminosäureposition 1</b>	<b>Vernetzte Aminosäureposition 2</b>	<b>Vernetzte Domänen</b>
524/525	527	JMD - JMD
527	540	JMD - JMD
527	540/542	JMD - JMD
527	542	JMD - JMD
527	546	JMD - JMD
527	546/549	JMD - JMD
527	549	JMD - JMD
527	546/549/554	JMD - JMD
527	568	JMD - JMD
532	568	JMD - JMD
527	657	JMD - KHD
527	818	JMD - KHD
568	657	JMD - KHD
527	1098	JMD - CTE
642	815	KHD - KHD
657	673	KHD - KHD
657	673/674	KHD - KHD
657	815	KHD - KHD
657	818	KHD - KHD
657	819	KHD - KHD
657	818/819	KHD - KHD
673/674	700	KHD - KHD
815	818	KHD - KHD
588	1098	KHD - CTE
851	853	SHD - SHD
1051	1051	CTE - CTE
1048/1051	1053	CTE - CTE

Abbildung A 14 zeigt exemplarisch ein ausgewähltes Fragmentationenspektrum eines ROS-GC1-Vernetzungsproduktes. Die Mehrzahl der Vernetzungsprodukte konnten in der JMD sowie in der KHD identifiziert werden. In der JMD nahm das K527 eine bedeutende Verknüpfungsposition ein, da es an zehn Verknüpfungen beteiligt war. Hierzu zählten auch zwei weitere Vernetzungen mit den Aminosäuren (K657, K818) in der KHD und eine weitere zur CTE (K1098). In der KHD wurde K657 besonders häufig mit Aminosäuren der JMD und auch innerhalb der KHD vernetzt. Bei den Vernetzungen zwischen K527 (JMD) oder K588 (KHD) und K1098 aus der CTE handelte es sich um Verknüpfungen, die zwischen Aminosäuren in nicht benachbarten Domänen erfolgten. Zusätzlich konnten drei Vernetzungen zwischen identischen oder sich überlappenden Aminosäuresequenzen identifiziert werden, die als intermolekulare Vernetzungsprodukte zwischen zwei Monomeren betrachtet wurden.

### **5.6 Charakterisierung der bovinen ROS-GC1 aus Rinderaugen**

Nach der Strukturanalyse der humanen ROS-GC1, die rekombinant in HEK 293-Zellen exprimiert wurde, erfolgte im nächsten Schritt die Charakterisierung der bovinen ROS-GC1 unter nativen Bedingungen. Hierfür wurde eine Präparation des Sehstäbchenaußensegments (*rod outer segment*, ROS) aus Rinderaugen mit einer Rhodopsin-Konzentration von 3,65 mg/ml verwendet (siehe 4.3.9). Aufgrund seiner hohen Konzentration in der Retina wird Rhodopsin allgemein als interner Vergleich angesehen, so dass die ermittelten ROS-GC1-Konzentration in der Regel auf die vorzufindende Rhodopsin-Konzentration bezogen wird. Im Folgenden wird die Bestimmung der ROS-GC1-Konzentration und -Aktivität sowie die 3D-Strukturbestimmung der ROS-GC1 mithilfe der Vernetzungen beschrieben.

#### **5.6.1 Absolute Quantifizierung der ROS-GC1 in der ROS-Präparation**

Zunächst wurde die absolute Konzentration der ROS-GC1 in der ROS-Präparation bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand von zwei ROS-GC1-Peptiden, die in ihrer Sequenz am C-Terminus ein isotopenmarkiertes Arginin (R, \*) und somit einen Massenunterschied von 10 u zu den nicht-markierten Peptidvarianten aufwiesen. Diese Peptide wurden ausgewählt, da ihre endogenen, nicht-markierten Peptidanaloga in vorherigen Peptidfragmentmassen-Fingerprint-Analysen identifiziert worden waren und ohne weitere Modifikationen vorlagen. Peptid Q1 (AS 162-182, AAGTTAPVVTPAADALYALLR) stammte aus der N-terminalen (ExtD) und Peptid Q2 (AS 1028-1045, STVQILSALNEGFLTEVR) aus der C-terminalen Region (CTE) der ROS-GC1, so dass die Quantifizierung der ROS-GC1 sowohl von der extra- als auch intrazellulären Domäne abgeleitet werden konnte (siehe Abbildung 37A). Die Quantifizierungspeptide wurden vor der Proteolyse zu der zu analysierenden Probe der

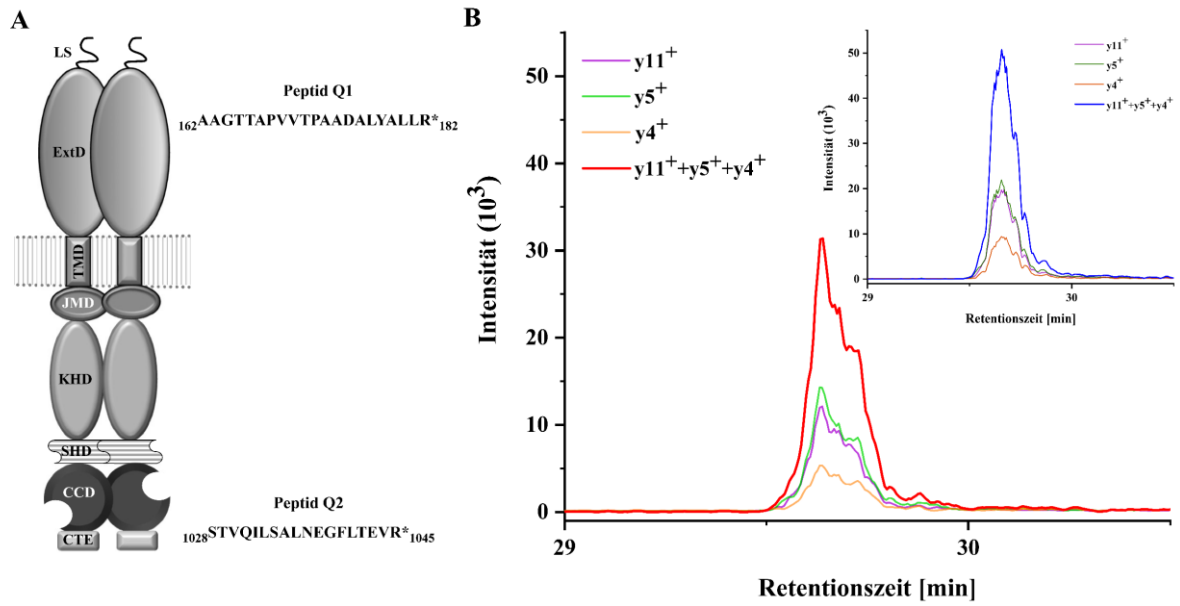
## Ergebnisse

ROS-Präparation hinzugefügt. Die endogenen Peptide wurden durch die Proteolyse der ROS-GC1 gebildet. Das Intensitätsverhältnis zwischen der nicht-markierten und der markierten Peptidvariante wurde durch zwei unabhängige Quantifizierungsstrategien mithilfe der Software Skyline [195, 208] ermittelt und ist im Folgenden beschrieben. Bei der massenspektrometrischen *pseudo*-MRM-Analyse (siehe 1.2.3.3) wurden die dreifach positiv geladenen Vorläuferionen der nicht- und der isotopenmarkierten ROS-GC1-Peptidvarianten im Übersichtsmassenspektrum zur Fragmentierung ausgewählt und die Intensitäten drei entstandener signalintensiver Fragmentationen für die natürliche als auch für die markierte Peptidvariante betrachtet. Die dazugehörigen Fragmentationenspektren sind für die nicht-markierte und markierte Variante des ROS-GC1-Peptides Q1 ( $m/z$ : 681,381 und 684,717) und ROS-GC1-Peptides Q2 ( $m/z$ : 659,693 und 663,029) in Abbildung A 15 und A 16 dargestellt und die zur ROS-GC1-Quantifizierung verwendeten Fragmentationen farblich markiert. Am Beispiel von ROS-GC1-Peptid Q1 wurden die Fragmentationen  $y_4^+$ ,  $y_5^+$  und  $y_{11}^+$  ausgewählt und dessen Signalintensitäten summiert (siehe Abbildung 37B). Durch Auftragung der addierten Signalintensitäten gegen die Retentionszeit wurde für jedes Peptid ein Elutionsprofil erstellt. Die daraus berechneten Peakflächen der MRM-Übergänge von Vorläufer- zu Fragmentationen ( $y_4^+$ ,  $y_5^+$ ,  $y_{11}^+$ ) wurden für die nicht-markierte (rot) und markierte (blau) Q1-Peptidvariante ins Verhältnis gesetzt. Da die isotopenmarkierte Peptidvariante in definierter Konzentration eingesetzt wurde, konnte die Konzentration des endogenen Peptidanalogen und somit auch der ROS-GC1 in der ROS-Präparation ermittelt werden. Infolgedessen konnte im *pseudo*-MRM-Modus anhand Peptid Q1 eine ROS-GC1-Konzentration von  $102 \pm 10$  nmol/l berechnet werden, anhand Peptid Q2 eine Konzentration von  $130 \pm 10$  nmol/l (siehe Abbildung 38).

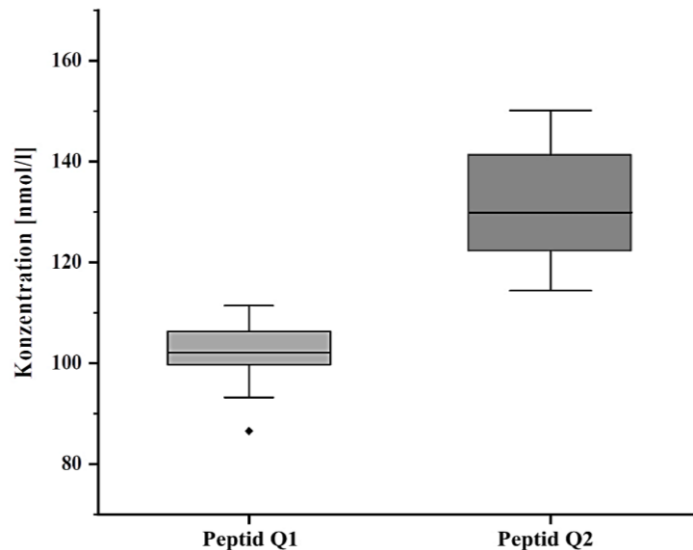
Zur Überprüfung der *pseudo*-MRM-Methode erfolgte zusätzlich die ROS-GC1-Quantifizierung mit einer MS-basierten Strategie. Bei dieser MS-basierten Methode wurden die Peakflächen der extrahierten Ionenchromatogramme (*extracted ion chromatogram*, EIC) betrachtet und das Intensitätsverhältnis bestimmt. Am Beispiel des ROS-GC1-Peptides Q1 wurden die dreifach positiv geladenen Spezies der nicht-markierten Peptidvariante bei  $m/z$  681,382 und der markierten bei  $m/z$  684,717 verwendet (siehe Abbildung A 17). Diese Resultate weisen eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen der MRM-Analyse auf, da hier Konzentrationen von  $101 \pm 10$  nmol/l (Peptid Q1) und  $129 \pm 10$  nmol/l (Peptid Q2) ermittelt wurden (siehe Abbildung A 17). Somit beträgt die ROS-GC1-Konzentration in der ROS-Präparation  $\sim 115$  nmol/l.



## Ergebnisse



**Abbildung 37: Quantifizierungsstrategie der bovinen ROS-GCI in der retinalen ROS-Präparation.** A) Peptid Q1 (AS 162-182) aus der ExtD und Peptid Q2 (AS 1028-1054) aus der CTE jeweils mit einem C-terminalen, isotypenmarkiertem R (\*) dienen zur absoluten Quantifizierung (siehe Nomenklatur in Abbildung 35). B) MRM-Analyse des Peptids Q1 mithilfe der Software Skyline [195, 208]. Für die MRM-Übergänge wurden drei signalintensive Fragmentationen ( $y_{11}^+$ ,  $y_5^+$ ,  $y_4^+$ ) im MS/MS-Spektrum ausgewählt (siehe Abbildung A 15). Die zugehörigen Elutionsprofile der Fragmentationen sind für die nicht-markierte Variante des Peptids Q1 (rot) bei  $m/z$ : 681,382, Ladungszustand 3+ und für das isotypenmarkierte Peptid Q1 (blau) bei  $m/z$ : 684,717, Ladungszustand 3+ dargestellt. Aus dem Verhältnis der Peakflächen des nicht-markierten (rot) und des isotypenmarkierten ROS-GCI-Peptides 1 (blau) wurde die ROS-GCI-Konzentration ermittelt.



**Abbildung 38: Absolute Quantifizierung der ROS-GCI in der ROS-Präparation.** Die Konzentrationen der ROS-GCI-Peptide wurden anhand einer MRM-Methode mit der Software Skyline [196, 209] ermittelt. Die Analysen erfolgten in Triplikaten. Es wurde für Peptid Q1 162AAGTTAPVVTPAADALYALLR182 eine Konzentration von  $102 \pm 10$  nmol/l und für Peptid Q2 1028STVQILSALNEGFLTEVR1045 eine Konzentration von  $130 \pm 10$  nmol/l berechnet. ♦: Wert außerhalb des 1,5 x Interquartilsabstandes.

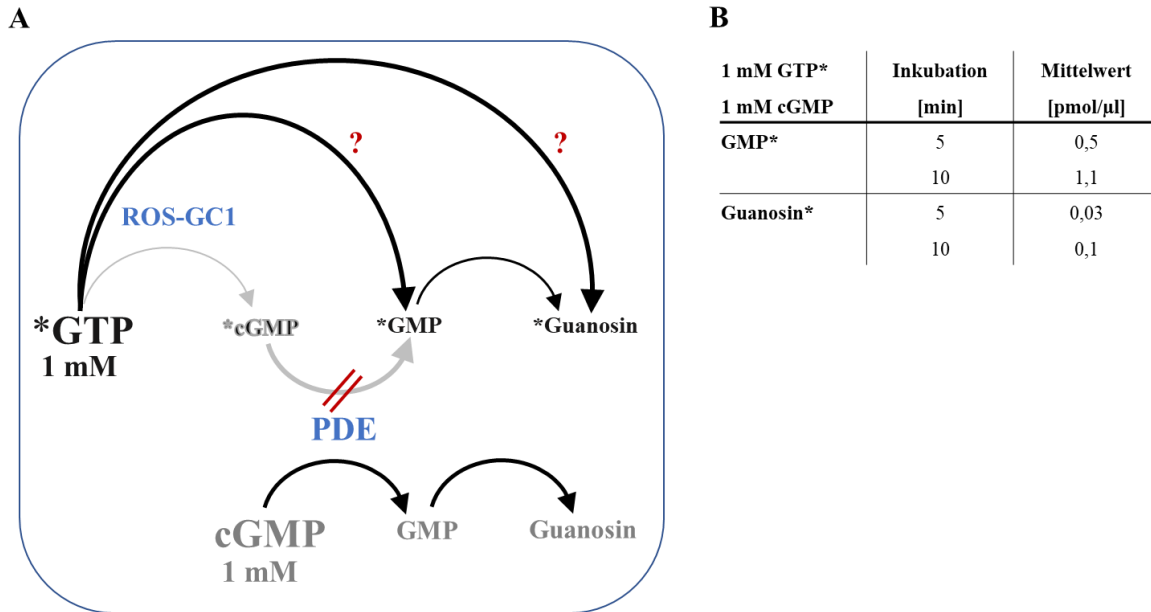
### 5.6.2 Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1 in der ROS-Präparation

Um bei den folgenden Vernetzungsexperimenten für die Strukturaufklärung der ROS-GC1 aktives Protein zu verwenden, erfolgten zuvor Aktivitätsmessungen mit der ROS-GC1 aus der ROS-Präparation. Die Durchführung der Experimente ist in 4.3.11 und 4.5.3 beschrieben. Die gebildeten Mengen an cGMP, GMP und Guanosin wurden durch massenspektrometrische MRM-Analysen (siehe 1.2.3.2) anhand der  $m/z$ -Übergänge von Vorläufer- zu Fragmentionen bestimmt (siehe Tabelle 3). Die Kalibrierungskurven der Nukleotide/-side sind der Abbildung 32 zu entnehmen.

Um die ROS-GC1-Aktivität unter physiologischen Lichtverhältnissen zu bestimmen, wurde die eingesetzte ROS-Präparation, die neben der ROS-GC1 auch GCAP-1 und -2 enthielt, dem Tageslicht ausgesetzt. Dadurch wurde die Signalkaskade der Phototransduktion vollständig aktiviert und das von ROS-GC1 gebildete cGMP wurde von der Phosphodiesterase (PDE) zu GMP abgebaut. Zudem war GMP-Abbau zu Guanosin zu beobachten (siehe Abbildung 39).

Da die Zugabe des PDE-Inhibitors IBMX mit einer Konzentration von 10 mM ausschließlich zu einem verlangsamten cGMP-Abbau durch die PDE führte und diese nicht komplett inhibiert werden konnte, wurden für die vollständige Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1 die bestimmten Konzentrationen an cGMP, GMP und Guanosin addiert. Es wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um die Anteile an gebildetem GMP und Guanosin, die unabhängig von der ROS-GC1-Aktivität und somit von der Signalkaskade der Phototransduktion entstanden waren, zu ermitteln (siehe Abbildung 39A).

Zur Bestimmung der GMP- und Guanosin-Mengen, die direkt aus GTP gebildet wurden, wurden Messungen mit 1 mM isotopenmarkierten  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -GTP (\*) in der Anwesenheit von 1 mM nicht-markierten cGMP durchgeführt. Der hohe Überschuss an nicht-markiertem cGMP verursachte eine Produktinhibierung der ROS-GC1-Aktivität und stellte gleichzeitig die alleinige Substratquelle der PDE dar. Daher müssen die gebildeten Mengen an markierten GMP (\*) und Guanosin (\*) bei gesättigter cGMP-Konzentration der nicht-markierten Variante auf andere Enzymaktivitäten im Hintergrund der ROS-Präparation zurückzuführen sein. Diese gesättigten cGMP-Bedingungen konnten bis zu einer Inkubationszeit von 10 min gewährleistet werden, da in diesem Zeitraum gleichzeitig kein markiertes cGMP (\*) gebildet wurde.

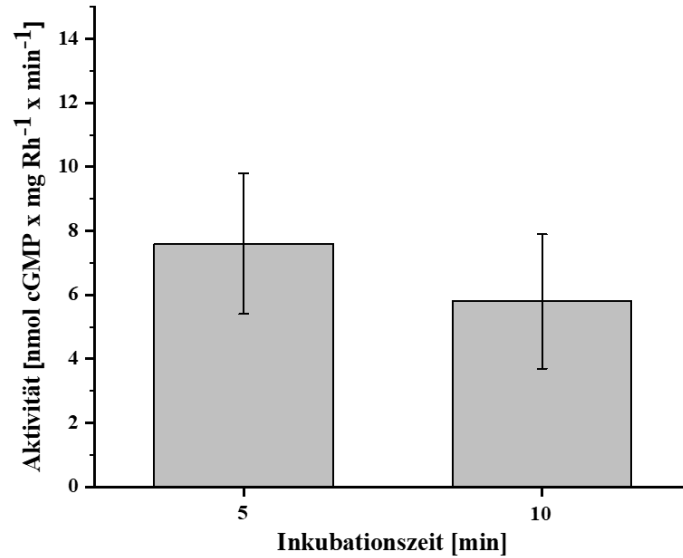


**Abbildung 39: Kontrollexperiment zur Aktivitätsbestimmung der ROS-GC1 in der ROS-Präparation.** A) Übersicht des GTP-Metabolismus in der ROS-Präparation. PDE: Phosphodiesterase, \*: isotope markierte Metabolite (Markierung der Nukleotide und Nukleoside durch  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ ), ?: ROS-GC1-unabhängige Reaktionen, die zur Produktion von \*GMP und \*Guanosin führen. Bestimmung der Menge an \*GMP und \*Guanosin, die aufgrund der enzymatischen Hintergrundaktivität in der ROS-Präparation direkt aus \*GTP gebildet wurden. Hierzu wurde 1 mM \*GTP gemeinsam mit 1 mM nicht-markiertem cGMP eingesetzt. B) Berechnete Konzentrationen an \*GMP und \*Guanosin, die unabhängig von ROS-GC1-Aktivität bei einer Inkubationszeit von 5 und 10 min entstanden. Subtraktion dieser \*GMP- und \*Guanosin-Konzentrationen von den GMP und Guanosin-Konzentrationen, die bei den Experimenten zur Aktivitätsmessung der ROS-GC1 ohne zusätzliche Isotopenmarkierung und Zugabe von cGMP als kompetitives Substrat der PDE gebildet wurden.

Bei einer Inkubationszeit von 5 min lagen die gebildeten GMP-/ Guanosin-Konzentrationen der isotope markierten  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Variante bei  $0,5 \mu\text{M}$  und  $0,03 \mu\text{M}$ . Nach 10-minütiger Inkubationszeit betrug die Konzentration an markiertem GMP  $1,1 \mu\text{M}$ , an markiertem Guanosin  $0,1 \mu\text{M}$  (siehe Abbildung 39B). Es ist ersichtlich, dass nur ein geringer Anteil an GMP und Guanosin in der ROS-Präparation unspezifisch gebildet wurden und zur Bestimmung der cGMP-Konzentration durch ROS-GC1 subtrahiert werden musste (siehe Abbildung 39B). Die berechneten ROS-GC1-Aktivitäten sind in Abbildung 40 dargestellt. Für eine Inkubationszeit von 5 min konnte eine spezifische ROS-GC1-Aktivität in Bezug auf Rhodopsin ( $3,65 \text{ mg/ml}$ ) von  $7,6 \pm 2,2 \text{ nmol cGMP} \times \text{mg Rhodopsin}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ , nach 10-minütiger Inkubationszeit eine Aktivität von  $5,8 \pm 2,1 \text{ nmol cGMP} \times \text{mg Rh}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  berechnet werden (siehe Abbildung 40).

## Ergebnisse

**A**



**B**

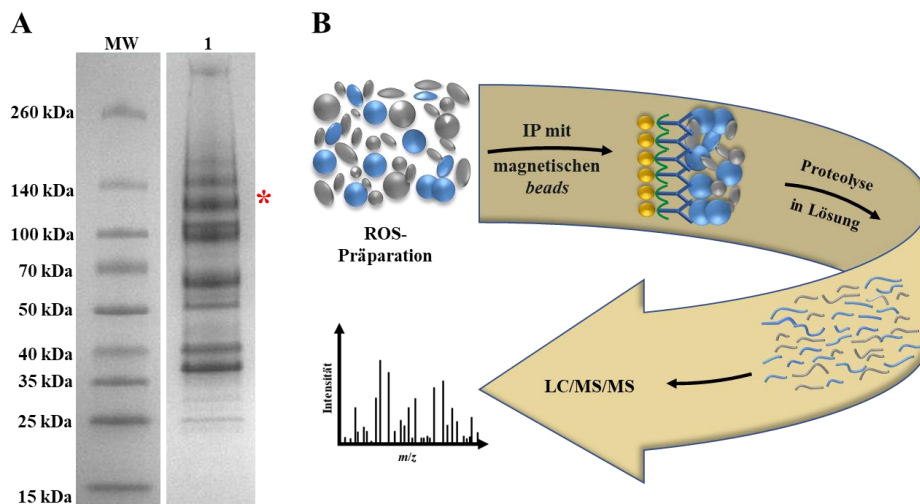
Inkubation [min]	cGMP-Konzentration [pmol/μl]	Spezifische Aktivität [nmol cGMP x min <sup>-1</sup> x mg Rh <sup>-1</sup> ]	Spezifische Aktivität [μmol cGMP x min <sup>-1</sup> x mg ROS-GC1-Peptid Q1 <sup>-1</sup> ]	Spezifische Aktivität [μmol cGMP x min <sup>-1</sup> x mg ROS-GC1-Peptid Q2 <sup>-1</sup> ]
5	2,7	7,6	2,3	1,8
10	4,2	5,8	1,7	1,3

**Abbildung 40: Aktivitätsbestimmung der bovinen ROS-GC1.** Inkubation der ROS-Präparation für 5 min und 10 min bei 37 °C in der Abwesenheit von Calcium. **A)** Bestimmung der ROS-GC1-Aktivität von  $7,6 \pm 2,2$  nmol cGMP x mg Rh<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> (5 min) und  $5,8 \pm 2,1$  nmol cGMP x mg Rh<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> (10 min). **B)** Übersicht der berechneten Mittelwerte für die cGMP-Konzentration sowie der spezifischen Aktivitäten für Rhodopsin (Rh), für ROS-GC1 ermittelt anhand des ROS-GC1-Peptides Q1 und Q2 (siehe 5.6.1). Es wurden Triplikate gemessen.

Mithilfe der Quantifizierungspeptide 1 und 2 wurde die ROS-GC1-Konzentration in der ROS-Präparation bestimmt (siehe 5.6.1). Anhand des ROS-GC1-Peptides Q1 betrug die berechnete ROS-GC1-Konzentration ~102 nmol/l und anhand des ROS-GC1-Peptides Q2 ~130 nmol/l. Somit konnte durch die ermittelten ROS-GC1-Konzentrationen eine spezifische ROS-GC1-Aktivität pro mg ROS-GC1 bestimmt werden. Hieraus ergab sich eine spezifische Aktivität der ROS-GC1 mithilfe des ROS-GC1-Peptides Q1 von  $2,3 \mu\text{mol cGMP x min}^{-1} \text{ x mg ROS-GC1}^{-1}$  (5 min) und  $1,7 \mu\text{mol cGMP x min}^{-1} \text{ x mg ROS-GC1}^{-1}$  (10 min), mithilfe des ROS-GC1-Peptides Q2 von  $1,8 \mu\text{mol cGMP x min}^{-1} \text{ x mg ROS-GC1}^{-1}$  (5 min) und  $1,3 \mu\text{mol cGMP x min}^{-1} \text{ x mg ROS-GC1}^{-1}$  (10 min).

### 5.6.3 Experimentelle Strategie für die ROS-Präparation

Die Verwendung der ROS-Gewebepräparation für die ROS-GC1-Strukturanalyse bietet den Vorteil, Strukturinformationen der nativen ROS-GC1 in ihrer zellulären Umgebung gewinnen zu können. Die ROS-Präparation aus der bovinen Retina ist ein äußerst komplexes Proteingemisch. Es besteht unter anderem auch aus hoch abundanten Proteinkomponenten der Phototransduktion, vor allem dem Rhodopsin (3,65 mg/ml). Anhand der Quantifizierung von ROS-GC1 ( $\sim 0,1 \mu\text{M}$ ) in 5.6.1 wurde deutlich, dass allein Rhodopsin mit einer Konzentration von  $93,6 \mu\text{M}$  in einem fast  $\sim 1000$ -fachen Überschuss zu ROS-GC1 in der ROS-Präparation vorlag. Zwar konnten lineare ROS-GC1-Peptide in dem komplexen Hintergrund der ROS-Präparation nachgewiesen werden, jedoch war die Komplexität der Proteinmischung, veranschaulicht in Abbildung 41A, zu groß, um die Identifizierung der nieder abundanten ROS-GC1-Vernetzungsprodukte direkt zu ermöglichen. Deswegen musste das ROS-GC1 für die folgenden Vernetzungsexperimente und die MS-Analyse angereichert werden (siehe Abbildung 41B). Hierzu erfolgte zunächst eine Solubilisierung der ROS-GC1 im Reaktionspuffer III, gefolgt von einer Immunpräzipitation (IP) mithilfe von magnetischen *beads* (siehe 4.3.10). Die Probenvorbereitung für die *In-Lösungs*-Proteolyse sowie die nachfolgende Proteinspaltung mit Trypsin wurde ohne Elutionsschritt direkt auf den *beads* vollzogen.



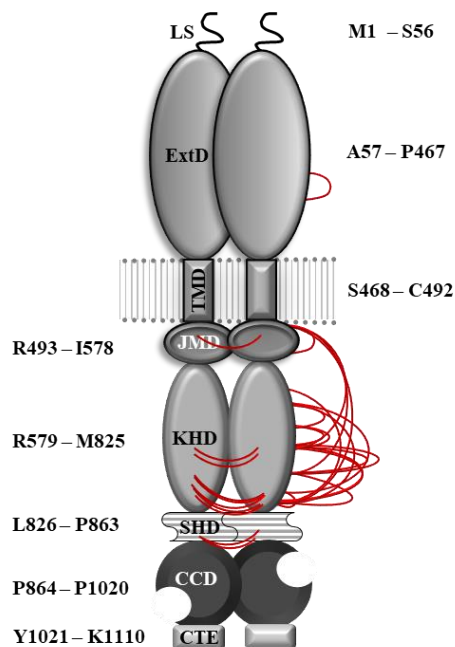
**Abbildung 41: Identifizierung der ROS-GC1 aus der ROS-Präparation.** A) SDS-PAGE-Analyse der ROS-Präparation mithilfe eines 4-20 %igen Polyacrylamid-Gels (Coomassie-Brilliantblau-Färbung). \*Identifizierung der ROS-GC1 nach Proteinspaltung im Gel (apparentes Molekulargewicht von ca. 140 kDa). MW: Molekulargewichtsstandard. B) Anreicherungsstrategie mittels Immunpräzipitation (IP) über einen ROS-GC1-Antikörper mithilfe von magnetischen beads. Die Proteolyse in Lösung erfolgte direkt auf den beads. Der Überstand enthielt die Peptidmischung, die zur ROS-GC1-Identifizierung mittels LC/MS/MS analysiert wurde.

## Ergebnisse

Hierzu wurde das Protokoll zur Proteolyse in Lösung, des zuvor anhand der humanen ROS-GC1 aus dem HEK 293-Zelllysate (siehe 5.5.2) optimiert worden war, für die bovine ROS-GC1 in der ROS-Präparation angewendet. Die Proteinspaltung wurde mit einer Kombination aus dem FASP- und dem ProteaseMAX-Protokollen, wie in 4.3.13.2 beschrieben, durchgeführt [191, 205, 206]. Es zeigte sich, dass durch diesen Anreicherungsschritt die Anzahl der identifizierten PSMs von Rhodopsin (~ 20 PSMs) im Vergleich zu ROS-GC1 (~ 250 PSMs) mit einer Sequenzabdeckung von ca. 40 % deutlich geringer war. Somit war die Anreicherungsstrategie erfolgreich.

### 5.6.4 ROS-GC1 Strukturanalyse mittels chemischer Vernetzung

Für die Strukturanalyse der bovinen ROS-GC1 aus ROS-Präparation wurde ebenfalls das Vernetzungsreagenz DSBU eingesetzt (siehe 4.4.3). Im Gegensatz zur humanen ROS-GC1 (siehe 5.5.3) erfolgten die Arbeitsschritte in umgekehrter Reihenfolge. Zunächst wurde ein Anreicherungsschritt (siehe 4.3.10 und 5.6.3) durchgeführt. Anschließend folgte die chemische Vernetzung der bovinen ROS-GC1 sowie die enzymatische Proteolyse gebunden auf den magnetischen *beads*, bevor die im Überstand enthaltene Peptidmischung mittels LC/MS/MS analysiert wurde. Insgesamt konnten 30 DSBU-Vernetzungsprodukte identifiziert werden (Abbildung 42 und Tabelle 9).



**Abbildung 42:** Übersicht der DSBU-Vernetzungen im bovinen ROS-GC1-Dimer aus ROS-Präparation. Die DSBU-Vernetzungen sind rot dargestellt. Die Gliederung der Domänen für das ROS-GC1-Dimer wurde von Duda et al [34] übernommen und ist an [226] angelehnt. LS: Leitsequenz, ExtD: extrazelluläre Domäne, TMD: Transmembrandomäne, JMD: Juxtamembrandomäne, KHD: Kinase-Homologie-Domäne, SHD: Signalhelixdomäne, CCD: Kern-katalytische Domäne, CTE: C-terminale Verlängerung.

## Ergebnisse

**Tabelle 9: DSBU-Vernetzungen der bovinen ROS-GCI.** Auflistung der vernetzten Aminosäurepositionen 1 und 2 und der dazugehörigen Domänen, in denen die Aminosäuren lokalisiert sind. Vernetzungen zwischen zwei identischen oder sich überlappenden Aminosäuresequenzen wurden als intermolekulare Vernetzungen zwischen zwei Monomeren betrachtet und sind grau hinterlegt. Die Abkürzungen der Domänen sind in Abbildung 42 beschrieben.

Vernetzte Aminosäureposition 1	Vernetzte Aminosäureposition 2	Domänen
308	325	ExtD-ExtD
527	540/542	JMD-JMD
527	686/688	JMD-KHD
527	763	JMD-KHD
527	818	JMD-KHD
642	818	KHD-KHD
657	673/674	KHD-KHD
657	812/815	KHD-KHD
657	815	KHD-KHD
673	686	KHD-KHD
673	688	KHD-KHD
673	686/688	KHD-KHD
673/674	818	KHD-KHD
686	763	KHD-KHD
688	763	KHD-KHD
686/688	763	KHD-KHD
686/688	818	KHD-KHD
763	818	KHD-KHD
811	818	KHD-KHD
527	527	JMD-JMD
686	686	KHD-KHD
686/688	686/688	KHD-KHD
811/812	818	KHD-KHD
812/815	818	KHD-KHD
815	818	KHD-KHD
815	824	KHD-KHD
815	818/824	KHD-KHD
818	818	KHD-KHD
851	853/854	SHD-SHD
851	853	SHD-SHD

Alle mit DSBU identifizierten Vernetzungen sind in Tabelle A 12 und A 13 (-/+ Glutaraldehyd-Fixierung) zusammengefasst. Insgesamt war die KHD an 25 der 30 Vernetzungen beteiligt. Drei Vernetzungsprodukte wurden zwischen der JMD und KHD sowie eine Verknüpfung in der ExtD nachgewiesen. Zusätzlich wurden jeweils zwei Vernetzungen in der JMD und SHD identifiziert. Exemplarisch wird hierzu in Abbildung A 19 ein Fragmentationsspektrum einer identifizierten DSBU-Vernetzung gezeigt.

In der JMD war ein Lysinrest K527 an vier Vernetzungen beteiligt und stellte somit eine wichtige Position dar. In der KHD waren die Vernetzungspositionen K686/T688 sowie K815/818 von großer Bedeutung, da sie jeweils bei acht Vernetzungsprodukten gefunden wurden. Elf weitere Vernetzungen wurden zwischen identischen oder sich überlappenden Aminosäuresequenzen nachgewiesen und daher als intermolekulare Vernetzungsprodukte zwischen zwei Monomeren angesehen. Diese Verknüpfungen befanden sich in der JMD, SHD und vorrangig in der KHD.

### **5.7 Homologie-Modellierung der intrazellulären Domäne der ROS-GC1**

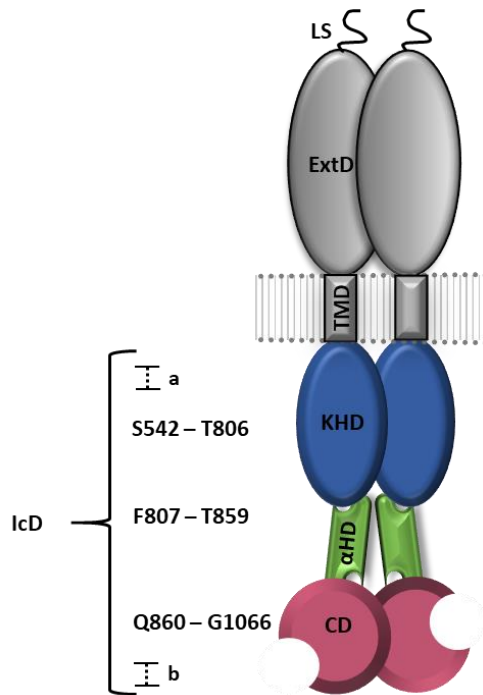
Die erhaltenen DSBU-Vernetzungen von ROS-GC1 aus der ROS-Präparation wurden als Distanzbeschränkungen für die Strukturmodellierung der ROS-GC1 eingesetzt. Da fast ausschließlich Distanzinformationen von der intrazellulären Domäne (IcD) gewonnen wurden, beschränkte sich die Homologie-Modellierung auf die IcD. Die Erstellung des IcD-Modells der ROS-GC1 erfolgte durch Dr. Christian Tüting und Jun.-Prof. Dr. Panagiotis Kastiris (ZIK Halomen, Abteilung Kryoelektronmikroskopie & computerbasierte Strukturbiologie, MLU Halle).

#### **5.7.1 Molekulare Modellierung der intrazellulären Domäne der ROS-GC1**

Die molekulare Modellierung der intrazellulären Domäne (IcD) der ROS-GC1 wurde, wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben, durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Suche nach Strukturvorlagen (Template) homologer Proteine für die ROS-GC1-IcD. Hierzu wurde für die Vorhersage der 3D-Struktur der HHPRED-Server verwendet [210, 211]. Anhand der identifizierten Proteintemplate erfolgte eine neue, vereinfachte Organisation der IcD und Umbenennung der Domänen (siehe Abbildung 43). Für die *N*-terminale Region von AS 493-541 sowie die *C*-terminale Region von AS 1067-1110 der IcD konnten keine geeigneten Templatstrukturen homologer Proteine identifiziert werden. Daher wurde die IcD in folgende drei Domänen unterteilt: Die Kinase-Homologie-Domäne (KHD, AS 542–806), die  $\alpha$ -helikale Domäne ( $\alpha$ HD, AS 807-859) und die katalytische Domäne (CD, AS 841–1066). Dabei waren die KHD und CD über die helikale Linker-Region ( $\alpha$ HD) miteinander verknüpft.



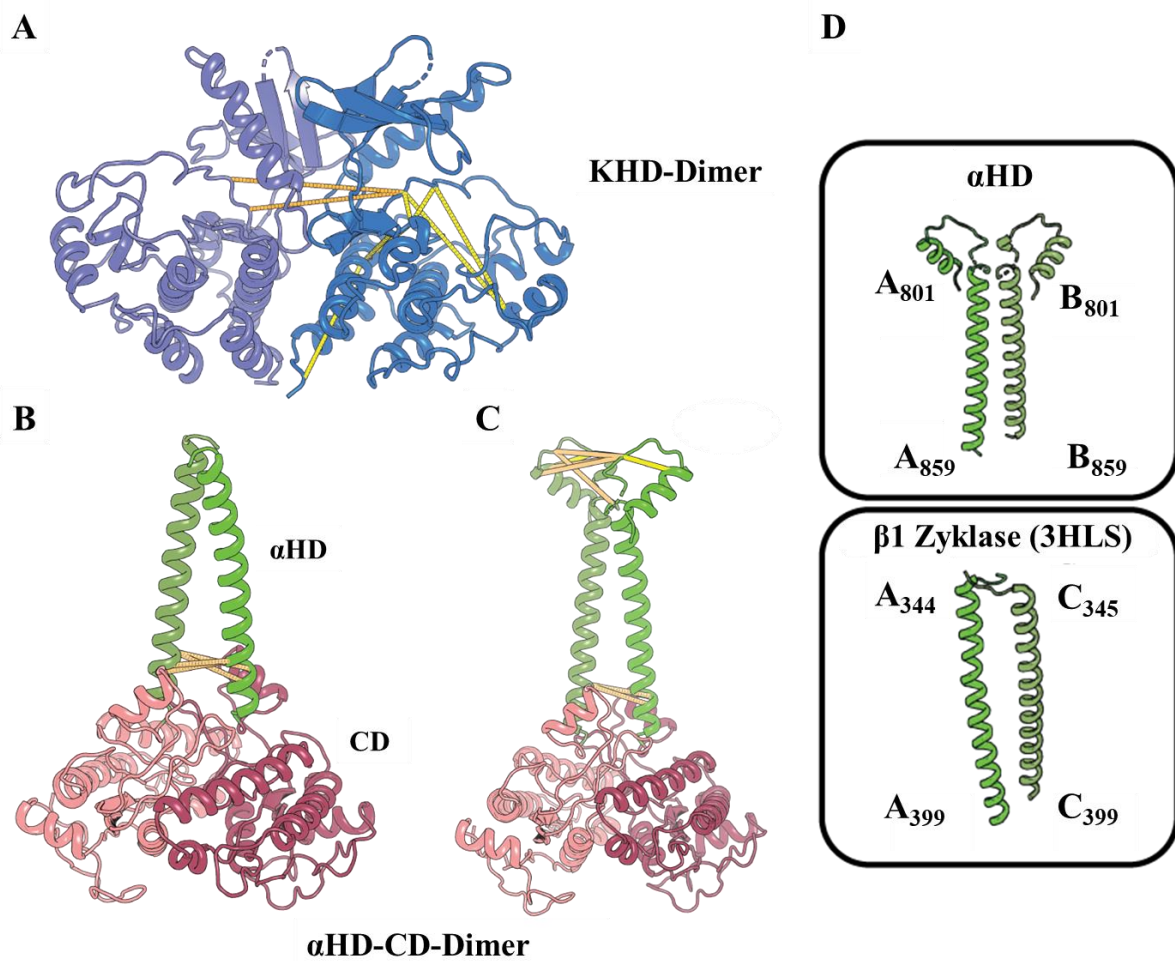
## Ergebnisse



**Abbildung 43: Gliederung der ICD des ROS-GC1 Dimers mithilfe von Homologiemodellen.** Die Gliederung der Domänen für das ROS-GC1-Dimer wurde nach Duda et al [34] angeglichen, die Darstellung ist an [226] angelehnt. LS: Leitsequenz, ExtD: extrazelluläre Domäne, TMD: Transmembrandomäne, KHD: Kinase-Homologie-Domäne, SHD: Signalhelixdomäne, CD: katalytische Domäne. a/b: N- und C-terminale Regionen der ICD, die nicht mit Modellen erfasst werden konnten.

Die KHD-Domäne wies eine hoch konservierte Struktur als Monomer auf. Zur Erstellung eines Dimermodells war die Superimposition des KHD-Monomers nicht möglich, da das generierte Dimermodell nicht mit den identifizierten Vernetzungsprodukten übereinstimmte. Beispielsweise konnten auch bei den Dimerstrukturen der B-Raf Kinase des MAPK-Signalweg-Komplexes (PDB-ID 6Q0J) [228], der Ser/Thr-Kinase Pkna von *M. tuberculosis* (PDB-Eintrag: 4X3F) [229], der Tyr-Kinase c-Abl (PDB-Eintrag: 4XEY) [230] sowie der Ser/Thr-Kinase PBL2 von *A. thaliana* (PDB-Eintrag: 6J5T) [231] unterschiedliche Kontaktflächen zwischen den Monomeren, die das Dimer bildeten, identifiziert werden. Dies deutet daraufhin, dass die Monomere des KHD-Dimers unterschiedliche Anordnungen zueinander annehmen können. Daher erfolgte die Generierung des KHD-Dimermodells mithilfe der DSBU-Vernetzungsprodukte als Distanzbeschränkungen zwischen zwei KHD-Monomeren. Hierbei wurde für den Docking-Prozess die konservierte Struktur des Monomers zweimal eingesetzt. Für die Ausrichtung der beiden KHD-Monomere zueinander wurden die intermolekularen Vernetzungen zwischen AS 527 und 818 verwendet (siehe Tabelle 9). So war ein unbeschränktes, binäres Docking des Modells vom KHD-Monomer möglich, bei dem die maximal überbrückbaren Entfernungen der DSBU-Vernetzungsprodukte von 30 Å eingehalten wurden (siehe Abbildung 44A und Tabelle A 14).

Im Gegensatz zur KHD zeigte sich bei der CD-Domäne, dass nicht nur das Monomer, sondern bereits die Dimerstruktur hoch konserviert vorlag. Als Proteintemplate wurde die Cryo-EM-Struktur der löslichen Guanylatzyklase von *Manduca sexta* (PDB-Eintrag: 6PAS) [217] verwendet, welche zudem *N*-terminal einen Teil der  $\alpha$ HD abdeckte. So konnte die dimere  $\alpha$ HD/CD-Struktur von AS 823 bis 1066 modelliert werden (siehe Abbildung 44B). Die intermolekularen DSBU-Vernetzungen zwischen K851 und K853 sowie K851 und K854 bestätigten das erstellte ROS-GC1-Modell des  $\alpha$ HD/CD-Dimers, da die Vernetzungen  $C_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$ -Distanzen von weniger als 16 Å aufwiesen und somit unterhalb der Distanzbeschränkung von DSBU mit 30 Å lagen (siehe Tabelle A 15).



**Abbildung 44: Modellierungen des KHD- und des  $\alpha$ HD/CD-Dimers der ROS-GC1.** A) Generierung des KHD-Dimers mittels binären HADDOCK-Dockings unter Verwendung der C2-Symmetrie. B) Initiale Dimerstruktur der  $\alpha$ HD/CD. C) Verlängertes Modell des  $\alpha$ HD/CD-Dimers durch Hinzufügen des Helix-Turn-Helix-Motivs am N-Terminus. Validierung des erstellten Modells anhand von sechs Vernetzungsprodukten. Intra- und intermolekulare Vernetzungen sind als gestrichelte Linien gelb und orange eingezeichnet. D) Vergleich der  $\alpha$ HD von der ROS-GC1 und der  $\beta$ 1-Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (3HLS). Beide Strukturen weisen eine helikale Struktur mit N-terminalem Turn auf. A: Monomer 1 und B/C: Monomer 2.

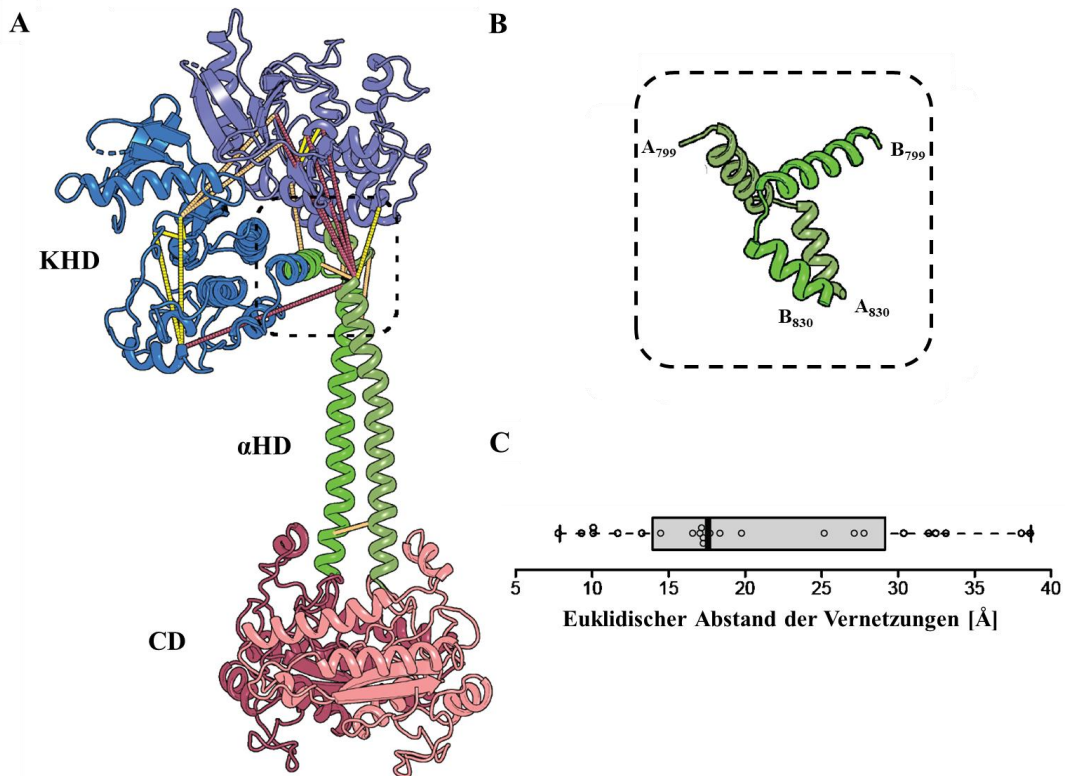
Die  $\alpha$ HD-Region, die die KHD mit CD verknüpft, ist hoch konserviert. Anhand verschiedener Strukturmodelle (PDB-Einträge: 4NEU, 6OKO, 4UYA, 6PAT, 6PAS) zeigte sich, dass die *N*-terminale Region der  $\alpha$ HD ein Helix-*Turn*-Helix-Motiv aufwies, welches besonders flexibel war und unterschiedliche Konformationen einnehmen konnte.

Zur vollständigen Abdeckung der  $\alpha$ HD wurde das Modell der  $\alpha$ HD/CD in Abbildung 44B (PDB-Eintrag: 6PAS) verlängert (AS 800-830, siehe Abbildung 44C). Die ermittelten Abstände einer intramolekularen Vernetzung und fünf intermolekulare Vernetzungen entsprachen dem erstellten Modell des  $\alpha$ HD/CD-Dimers, da sie maximale Distanzen von bis zu 18 Å überbrückten (siehe Abbildung 44C und Tabelle A 15). Die gesamte  $\alpha$ HD-Struktur steht somit aufgrund eines RMSD-Wertes von 7,06 Å mit der bekannten  $\alpha$ HD der  $\beta$ 1-Untereinheit von der löslichen Guanylatzyklase (PDB-Eintrag: 3HLS) in guter Übereinstimmung (siehe Abbildung 44D).

### 5.7.2 Erstellung der 3D-Struktur der ROS-GC1

Beim *C*-Terminus des KHD-Modells und dem *N*-Terminus des  $\alpha$ HD/CD-Modells kam es zu Überschneidung der modellierten Aminosäuresequenzen der ROS-GC1 (siehe 5.7.1). Durch die strukturelle Überlagerung dieses Sequenzbereichs wurden die zwei Homologiemodelle mithilfe von PyMOL und MODELLER verbunden (siehe Abbildung 45A). Nach der finalen Modellierung der ROS-GC1-IcD mit HADDOCK [157, 220, 232] stimmten 79 % (19/24, Tabelle A 15) der beobachteten Abstände der identifizierten Vernetzungen mit dem erstellten Modell überein, da sie die Distanzbeschränkung für DSBU von maximal 30 Å nicht überschritten. Fünf Vernetzungen (K673 x K818, S674 x K818, K686 x K818, K688 x K818 und K763 x K818) konnten dieses Kriterium nicht erfüllen (rot eingezeichnet). Alle fünf Vernetzungsprodukte bestanden aus mindestens einer beteiligten Aminosäure, die im Helix-*Turn*-Helix-Motiv (AS 800-830) der  $\alpha$ -HD lokalisiert war (siehe Abbildung 45B). Mithilfe eines BoxPlots [233] konnte die statistische Distanzverteilung der identifizierten Vernetzungsprodukte dargestellt werden und der Median der überbrückten Distanzen von 15,6 Å ermittelt werden (siehe Abbildung 45C).

## Ergebnisse



**Abbildung 45: Modell der IcD der ROS-GC1.** A) IcD-Modell des ROS-GC1-Dimers. Vernetzungen sind als gestrichelte Linien eingezeichnet, intramolekulare gelb, intermolekulare orange und Verknüpfungen, die oberhalb der Distanzbeschränkung von 30 Å liegen, sind typunabhängig rot markiert. B) Helix-Turn-Helix-Motiv des erstellten IcD-Modells. A: Monomer 1 und B: Monomer 2. C) Statistische Distanzverteilung der Vernetzungen in Å. Die mittlere Distanz der Vernetzungsprodukte beträgt 15,6 Å. Modifiziert nach [234].

## 6 Diskussion

### 6.1 Vernetzungsstrategien

Die chemische Vernetzung in Kombination mit einer massenspektrometrischen Analyse der Vernetzungsprodukte stellt neben der Röntgenkristallographie und der NMR-Spektroskopie eine wertvolle Methode zur Gewinnung von Informationen für die Proteinstrukturaufklärung dar (siehe 1.2.6). Diese Vernetzung/MS-Technik besitzt Vorteile, da sie für geringste Proteinmengen und zur Analyse komplexer Proteinmischungen eingesetzt werden kann. Mithilfe chemischer Vernetzungsreagenzien können funktionelle Gruppen von Aminosäuren miteinander verknüpft und somit Distanzinformationen über die vernetzten Aminosäuren gewonnen werden. Hauptsächlich werden hierbei Lysine kovalent miteinander verbunden, indem sie mit NHS-Estern zur Reaktion gebracht werden [162]. Um umfangreiche Einblicke in Proteinstrukturen zu erhalten, ist die Verwendung von Vernetzungsreagenzien mit unterschiedlichen Reaktivitäten und *Spacer*-Längen unabdinglich. In Bezug auf die jeweilige biologische Fragestellung z.B. für die Charakterisierung von Protein-Interaktionspartnern, können gerichtete Vernetzungsreaktionen an bestimmten Aminosäureseitenketten, die sich in unterschiedlicher räumlicher Entfernung zueinander befinden, zielführend sein.

Um die Auswahl an spezifischen Vernetzungsreagenzien zur Erstellung komplementärer Distanzinformationen zu erweitern, wurden in dieser Arbeit das CDI- und DAU-Reagenz sowie Photo-Methionin verwendet [166, 169, 173]. Alle drei Vernetzungsreagenzien weisen den Vorteil auf, dass sie wie DSBU [163] spaltbar sind und somit während der MS-Analyse Fragmentationen erzeugen, welche die Identifizierung von Vernetzungsprodukten erleichtern (siehe 1.2.6.3). Das Vernetzungsreagenz CDI erwies sich als eine vielversprechende Alternative zum Amin-reaktiven DSBU-Reagenz, da es zum einen Lysine mit Hydroxygruppen von Serinen, Threoninen und Tyrosinen verknüpft und zum anderen aufgrund der Linker-Länge von 2,6 Å sehr kurze Distanzen überbrücken kann. So waren bei acht der 19 identifizierten CDI-Vernetzungsprodukte in GCAP-2 Hydroxygruppen an der Verknüpfung beteiligt. Photo-Methionin konnte zur Überprüfung seiner Carboxy-Reaktivität in GCAP-2 erfolgreich eingebaut werden. Hierfür erwies sich GCAP-2 aufgrund seines hohen Anteils an sauren Aminosäuren (18,2 %) als ein interessantes System, da mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Diazirine des Photo-Methionins mit Glutamin- und Asparaginsäureresten reagieren und so eine Esterbindung ausbilden können. Unter Berücksichtigung der Spaltbarkeit der Esterbindung

konnte die mit Photo-Methionin vernetzten Aminosäuren bei zehn Vernetzungsprodukten eindeutig zugeordnet werden. Im Vergleich zu CDI, DSBU und Photo-Methionin vernetzt DAU ausschließlich Cysteine miteinander und ermöglicht somit die Gewinnung zusätzlicher struktureller Informationen. Die Identifizierung eines Vernetzungsproduktes zwischen C35 und C131 in GCAP-2, welches nur drei Cysteine enthält, bestätigte die Sulfhydryl-Reaktivität von DAU. Das zuvor genannte Vernetzungsprodukt konnte ausschließlich im Calcium-beladenen Zustand von GCAP-2 nachgewiesen werden und deutet somit auf eine Calcium-induzierte Konformationsänderung bei GCAP-2 hin.

### **6.2 Strukturelle Charakterisierung der GCAP-2/ROS-GC1-Peptid-Interaktion**

Der Aktivierungsmechanismus der retinalen Guanylatzyklase (ROS-GC1) durch die Guanylatzyklase-aktivierende Proteine 1 und 2 (GCAP-1 und -2) im Außensegment der Stäbchen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In diesem Zusammenhang ist besonders die Interaktionsfläche in der intrazellulären Domäne (IcD) der ROS-GC1 mit GCAP-1/-2 von großem Interesse. Es besteht die Annahme, dass für die GCAP-2-Bindung entweder die Juxtamembrandomäne (JMD) und Kinase-Homologie-Domäne (KHD) aus der *N*-terminalen oder *C*-terminale Region der katalytischen Domäne (CD) der ROS-GC1 beteiligt ist (siehe 1.1.4). Um die GCAP-2-Bindestelle genauer lokalisieren zu können, wurden Peptid 1 (AS 965-981) und Peptid 2 (AS 942-981) aus der CD und Peptid 3 aus der JMD (AS 503-522) verwendet (siehe Abbildung 26). Zur strukturellen Charakterisierung der Calcium-abhängigen Bindung der ROS-GC1-Peptide an GCAP-2 wurden verschiedene Vernetzungsexperimente in Kombination mit einer massenspektrometrischen Analyse durchgeführt.

Die meisten Vernetzungen wurden zwischen GCAP-2 und dem ROS-GC-Peptid 2 identifiziert, bei dem sich zwei Segmente (AS 1-9 und 18-24) als besonders reaktiv erwiesen. Bei Peptid 2 handelt es sich um eine *N*-terminal verlängerte Variante des Peptides 1. Die *N*-terminalen Vernetzungsprodukte von Peptid 1 sind mit denen des zweiten Segments von Peptid 2 im Einklang und konnten somit bestätigt werden. Bei den identifizierten Vernetzungsprodukten zwischen GCAP-2 und Peptid 2 ist auffällig, dass die unterschiedlichen Vernetzungsreagenzien spezifische ROS-GC1-Peptidregionen mit GCAP-2 in Abhängigkeit der vorhandenen Calciumkonzentration verknüpfen. So konnte eine Mehrzahl von DSBU-Vernetzungen im Calcium-freien Zustand von GCAP-2 identifiziert werden (siehe Abbildung 29). Im Calcium-freien, aktivierenden Zustand weist GCAP-2 eine flexiblere Struktur, vor allem in der *C*-terminalen Region, auf. Diese *C*-terminale Region konnte daher nur durch DSBU aufgrund des langen

*Spacers* von 12,5 Å und der überbrückbaren Distanz von max. 30 Å fixiert werden. Die Beobachtung, dass DSBU aufgrund seiner *Spacer*länge die Stabilisierung flexibler Proteinstrukturen ermöglichte, konnte durch frühere Ergebnisse von BS<sup>2</sup>G-Vernetzungsexperimenten bestätigt werden. BS<sup>2</sup>G weist vergleichbare Charakteristika wie DSBU auf und bildete ebenfalls vermehrt Vernetzungsprodukte im flexiblen, Calcium-freien Zustand von GCAP-2 [3]. Mit CDI wurden hauptsächlich in der Abwesenheit von Calcium Verknüpfungen vor allem mit der *N*-terminalen Region von GCAP-2 (G2-K126) nachgewiesen. Die Länge des *Spacers* von CDI ist mit 2,6 Å deutlich geringer, sodass nur extrem kurze Entfernungen überbrückt werden können. Daher können mit CDI komplementäre Strukturinformationen zu DSBU erzielt werden. Vermutlich ist CDI zu kurz, um Aminosäuren der *C*-terminalen Region aufgrund ihrer hohen Flexibilität zu vernetzen. CDI reagierte Calcium-unabhängig mit fünf Lysinen (K96, K98, K102, K106 und K126) in der ersten  $\alpha$ -Helix des EF-Motivs 4 [221]. Möglicherweise stellen diese Lysinreste eine bedeutende Interaktionsregion von GCAP-2 mit ROS-GC1 dar. Diese Beobachtung wurde durch die Vernetzungen mit Photo-Methionin (PM181/186) und DAU (C131) in der gleichen Region bekräftigt (siehe Abbildung 30). Die DAU-Vernetzung mit Peptid 2 zu C131 in GCAP-2 konnte nur in der Anwesenheit von Calcium identifiziert werden. C131 befindet sich am Anfang der *Loop*-Region zwischen EF-Hand 3 und 4. Ein möglicher Grund könnte sein, dass dieser Bereich an einer Calcium-induzierten Konformationsänderung beteiligt ist, so dass C131 nicht mehr für DAU im Ca<sup>2+</sup>-freien Zustand zugänglich ist. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Resultaten überein, bei denen ebenfalls das Vernetzungsprodukt in GCAP-2 zwischen C35 und C131 nur in der Anwesenheit von Calcium nachweisbar war (siehe 5.3.2 und 6.1).

Die Ergebnisse der ROS-GC-Peptidstudien dieser Arbeit und vorherige Studien ermöglichen erste Einblicke in die komplexen Proteininteraktionen zwischen ROS-GC1 und GCAP-2, um strukturelle Hinweise auf beteiligte Bindungsstellen zu gewinnen [3, 226]. Allerdings wird bei der Verwendung der ROS-GC1-Peptide 1 bis 3 ein artifizieller *N*-Terminus generiert, der eine zusätzliche Reaktionsstelle für Amin-reaktive Vernetzungsreagenzien darstellt. Besonders auffällig ist bei ROS-GC1-Peptid 3, dass ausschließlich DSBU- und CDI-Vernetzungen mit dem *N*-Terminus zu GCAP-2 identifiziert wurden, obwohl zusätzliche Lysine in der Sequenz des Peptides enthalten waren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nur eine sehr schwache oder keine Interaktion zwischen GCAP-2 und der ROS-GC1-Peptid 3 vorliegt. Durch diese Daten kann die Beteiligung der ROS-GC1-Region, aus der Peptid 3 stammte, zwar bei der

Bildung des GCAP-2/ROS-GC1 Komplexes nicht komplett ausgeschlossen werden, jedoch handelt es vermutlich nicht um eine Hauptinteraktionsregion. Gegebenenfalls ist durch eine flexible 3D-IcD-Struktur und die damit hervorgerufene Konformationsänderung der ROS-GC1 eine zusätzliche Bindungsregion im Bereich der JMD möglich.

### 6.3 Affinität zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden

Die Affinitäten zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden wurde mithilfe von SPR und Fluoreszenzspektroskopie ermittelt (siehe Abbildung 31, A 9 und A 10). Aufgrund vorangegangener MS-Studien zwischen GCAP-2 und dem Peptid 1 wurde für die SPR- und Fluoreszenzstudien eine 1:1-Bindung zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden angenommen [3]. Anhand der SPR-Analyse ließ sich für ROS-GC1-Peptid 1 ein mittlerer  $K_D$ -Wert von  $2,4 \mu\text{M}$  und für ROS-GC1-Peptid 2 von  $2,0 \mu\text{M}$  bestimmen. Bei den Fluoreszenzmessungen konnten vergleichbare  $K_D$ -Werte im niederen mikromolaren Bereich mit  $4,2 \mu\text{M}$  für ROS-GC1-Peptid 1 und  $1 \mu\text{M}$  für ROS-GC1-Peptid 2 beobachtet werden. Die Ergebnisse für Peptid 1 und 2 stimmen mit den Erkenntnissen aus vorherigen Studien überein, bei denen zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Fragmenten, welche die Peptide 1 und 2 umfassten,  $K_D$ -Werte von  $\sim 2 \mu\text{M}$  ermittelt werden konnten [2]. Auch stehen die SPR-Daten mit der mittels *Backscattering*-Interferometrie bestimmten Affinität von  $418 \pm 135 \text{ nM}$ , welche zwischen der humanen Vollängen-Variante der ROS-GC1 und GCAP-2 festgestellt wurde, im Einklang [68]. Unter den verwendeten Bedingungen wurde mithilfe von Fluoreszenzspektroskopie eine weitere schwache Bindestelle mit einem zweiten höheren  $K_D$ -Wert (Peptid 1:  $244 \mu\text{M}$ , Peptid 2:  $326 \mu\text{M}$ ) detektiert, die auf eine zweite Interaktionsstelle hindeuten könnte. Daher lässt sich nicht vollständig ausschließen, dass ein zweites Bindungsereignis stattfindet, das in einem ternären 1:2-Komplex aus GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden resultiert. Für ROS-GC1-Peptid 3 konnten keine  $K_D$ -Werte, weder mit SPR noch mit Fluoreszenzspektroskopie, ermittelt werden, was für die Annahme einer schwachen oder fehlenden Bindung zwischen ROS-GC1-Peptid 3 und GCAP-2 spricht. Diese spektroskopischen Beobachtungen finden zusätzlich Bestätigung durch vorherige Experimente, bei denen keine Interaktion zwischen GCAP-2 und der *N*-terminalen Region der ROS-GC1-IcD (AS 496-806), die das Peptid 3 beinhaltet, detektierbar war [68].



#### 6.4 Quantifizierung der ROS-GC1

Bei der Analyse von biologischen Systemen ist es von Interesse, Proteine zu quantifizieren und dessen post-translationale Modifikationen nachzuweisen [136]. Eine zielgerichtete, absolute Quantifizierungsstrategie kann z.B. mithilfe von AQUA-Peptiden [134] erfolgen. Die AQUA-Strategie (*absolute quantification*) beruht auf der Verwendung synthetischer isotopenmarkierter Peptide als interne Standards. Es können auch modifizierte Peptide hergestellt werden, welche zudem eine Quantifizierung von post-translationalen Modifikationen ermöglichen. Wichtig ist zu prüfen, ob das gewählte Peptid einzigartig für das zu quantifizierende Protein ist und ob es in modifizierten Varianten, beispielsweise durch die Oxidation von Methioninen, vorliegen kann. Auch sollte die Zugänglichkeit der Trypsin-Schnittstellen gewährleistet sein. Um eine möglichst genaue Quantifizierung zu garantieren, ist es sinnvoll, mehrere Peptide für das Zielprotein auszuwählen [136]. Aus diesem Grund wurden für ROS-GC1 zwei AQUA-Peptide nach den genannten Kriterien bestimmt. Peptid Q1 stammte aus der *N*-terminalen (ExtD) und Peptid Q2 aus der *C*-terminalen Region (CTE) der ROS-GC1, sodass sowohl der extra- als auch intrazelluläre Bereich zur Quantifizierung herangezogen werden konnten (siehe Abbildung 37A). Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden zwei massenspektrometrische Ansätze angewendet: Eine MS-basierte Methode, bei der das extrahierte Ionenchromatogramm (*extracted ion chromatogram*, EIC) für das natürliche und das synthetisierte Peptid zur Berechnung der Signalintensitäten verwendet wurde [135] und die Analyse im *pseudo*-MRM-Modus, bei dem spezifische Übergänge zwischen Vorläufer- und Fragmentionen betrachtet werden und somit die Selektivität erhöht werden kann [136]. Da unabhängig vom zugesetzten AQUA-Peptid und der angewendeten Strategie nahezu gleiche ROS-GC1-Konzentrationen bestimmt wurden (~100 – 130 nmol/l), konnte mit der AQUA-Methode eine zuverlässige ROS-GC1-Quantifizierung ohne vorherige Proteinreinigung in der ROS-Präparation erfolgen. Die Konzentration an ROS-GC1 wurde häufig im Verhältnis zu Rhodopsin angegeben, welche in der verwendeten ROS-Präparation 93,6  $\mu$ M betrug [61]. Hieraus resultiert ein molares ROS-GC1/Rhodopsin-Verhältnis von 1:940. Um eine genauere Aussage zu diesem Verhältnis treffen zu können, müsste die Konzentration von Rhodopsin ebenfalls mittels AQUA-Strategie bestimmt werden. In vorherigen Studien variierte das molare Verhältnis zwischen ROS-GC1 und Rhodopsin zwischen 1:104 [31], 1:260 [61] und 1:440 [235], wobei die Konzentration u.a. densitometrisch oder mit der Amidoschwarz-Färbung [236] erfolgte. Somit können die Unterschiede in den ROS-GC1/Rhodopsin-Verhältnissen auf die Messmethode, die Qualität der ROS-Präparation

sowie der Verwendung gereinigter Proteine oder nativen ROS-Präparationen zurückgeführt werden. Die AQUA-Methode stellt allerdings einen wesentlich genaueren Ansatz als kolorimetrische/ densitometrische Methoden zur Quantifizierung dar.

### 6.5 Beurteilung der ROS-GC1-Aktivität

Die Funktionalität eines Proteins lässt sich anhand des Nachweises der Enzymaktivität überprüfen. Daher sollte der Umsatz von GTP zu cGMP durch die ROS-GC1 bestimmt werden. Als Grundlage diente der von Koch *et al.* entwickelte Aktivitätstest, bei dem die gebildeten Metabolite mittels HPLC nachgewiesen werden [31, 204]. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde für diese Arbeit der chromatographischen Auftrennung mittels HPLC eine selektive MS-Analyse angeschlossen, die zudem die gleichzeitige Detektion von cGMP, GMP und Guanosin anhand der in Tabelle 3 aufgelisteten Übergänge im MRM-Modus ermöglichte (siehe 4.5.3). Die erhaltenen Kalibriergeraden zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen der injizierten Probenmenge und dem Signalpeak, sodass die etablierte Methode für die Quantifizierung von cGMP, GMP und Guanosin im Bereich von 0,1 bis 20  $\mu\text{M}$  verwendet werden konnte (siehe 5.5.1).

In dieser Arbeit wurden u.a. HEK 293-Zellen eingesetzt, die stabil die humane ROS-GC1-Vollängen-Variante exprimierten. Für die Durchführung der Aktivitätsmessungen wurde die isolierte HEK 293-Membranfraktion eingesetzt [41, 204]. Mögliche Enzyme oder Kontaminationen, die eine unspezifische Aktivität aufweisen, wurden mithilfe eines Waschschrittes von den Membranen abgetrennt, so dass die nicht definierbare Hintergrundaktivität der Probe vernachlässigbar gering war und kein cGMP-Abbau verzeichnet wurde. Aufgrund dessen erfolgte die Aktivitätsbestimmung anhand der gebildeten cGMP-Menge. Durch die Verwendung der sensitiven LC/MS-Methode im MRM-Modus wurde auch die Detektion geringster Mengen ( $\sim 0,1 \mu\text{M}$ ) an cGMP ermöglicht. In dieser Arbeit konnten Aktivitäten für die humane ROS-GC1 in den HEK 293-Zellmembranen im niederen pmol/min-Bereich nachgewiesen werden. Durch Zugabe von bovinem GCAP-2 erfolgte eine fünffache Steigerung der ROS-GC1-Aktivierung. Andere Studien wiesen ebenfalls eine Aktivität der humanen ROS-GC1, die in HEK 293-Zellen exprimiert wurde, anhand gebildeten cGMP-Menge pro Minute nach [41, 237]. Hierbei lag die Basalaktivität der humanen ROS-GC1 in der gleichen Größenordnung. Die unterschiedlichen Datensätze beruhen auf dem gleichen Protokoll zur Probenvorbereitung für die Aktivitätsbestimmung, jedoch können geringe Unterschiede durch die verschiedenen Messmethoden oder der eingesetzten Proteinmenge bzw. aufgrund des

## Diskussion

Anteils an aktivem Protein auftreten. In einer vorherigen Studie konnte die Aktivität durch die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  bovinem GCAP-2 in Abwesenheit von Calcium um das Zehnfache erhöht werden [41]. Die doppelte ROS-GC1-Aktivitätssteigerung kann auf die Verwendung der gesättigten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  statt 1  $\mu\text{M}$  GCAP-2 in dieser Arbeit bei den durchgeführten Aktivitätsbestimmungen (siehe 4.3.11 und 5.5.1) zurückgeführt werden.

Außerdem wurde gezeigt, dass die bovine ROS-GC1 in der ROS-Präparation katalytisch aktiv ist. Hierbei enthielt die eingesetzte ROS-Präparation bereits die GCAP-Proteine zur ROS-GC1-Aktivierung. Es konnte eine Aktivität von  $7,6 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Rh}^{-1}$  bei einer Inkubationszeit von 5 min bestimmt werden (siehe 5.6.2). Diese Ergebnisse entsprechen bereits nachgewiesenen ROS-GC1-Aktivitäten unter Verwendung der unfraktionierten ROS-Präparation, welche  $\sim 7\text{-}15 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Rh}^{-1}$  betragen [46, 61, 204]. Durch die Quantifizierung der ROS-GC1-Konzentration in der ROS-Präparation konnte zudem die spezifische ROS-GC1-Aktivität berechnet werden (siehe 5.6.1 und 6.4), welche in der hier verwendeten ROS-Präparation bei  $\sim 2 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg ROS-GC1}^{-1}$  lag (siehe 5.6.2). Für die gereinigte ROS-GC1 wurde eine spezifische Aktivität von bis zu  $\sim 4 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg ROS-GC1}^{-1}$  publiziert [235]. Dabei wurde darauf hingewiesen, dass die gemessene Aktivität von der Reinigungsdauer sowie der Lagerungszeit abhängig war. Somit waren die spezifischen ROS-GC1-Aktivitäten vergleichbar und unabhängig davon, ob zuvor die Reinigung der ROS-GC1 aus der ROS-Präparation erfolgte.

Besonders hervorzuheben ist, dass alle Aktivitätsmessungen unter nativen Bedingungen durchgeführt wurden und somit auch alle an der Phototransduktion beteiligten Proteine aktiv waren. Von entscheidender Bedeutung war hierbei die Phosphodiesterase (PDE), die cGMP hydrolysiert und deren Zustand nur im Dunkeln inaktiv ist. Aufgrund dessen wurde in vorherigen Studien die ROS-Präparation vor der Lichtzufuhr geschützt, so dass geringe Konzentrationen des PDE-Inhibitor Zaprinast (0,4 mM) ausreichend waren, um die basale PDE-Aktivität zu hemmen und den Abbau von cGMP zu GMP zu verhindern [204]. In dieser Arbeit wurden dagegen die Aktivitätsmessungen, wie in 4.3.11 beschrieben, unter Lichteinstrahlung und nicht in vollständiger Dunkelheit durchgeführt. Folglich hydrolysierte die PDE cGMP zu GMP. Daher war ebenfalls die Bildung von Guanosin aus GMP nachweisbar. Um den Abbau von cGMP zu verhindern, wurde die Konzentration des PDE-Inhibitors IBMX auf 10 mM erhöht, was jedoch ausschließlich den cGMP-Abbau verlangsamte. Die PDE-Aktivität

konnte somit nicht vollständig gehemmt werden. Dies stimmt mit anderen Studienergebnissen zur Testung verschiedener PDE-Inhibitoren überein, bei denen eine effektive PDE-Inhibierung in der intakten ROS-Präparation nicht möglich war [238]. Allerdings konnte durch Kontroll-experimente die unspezifische Hintergrundaktivität in der ROS-Präparation ermittelt werden, welche unabhängig von der ROS-GC1-Aktivität einen GTP-Abbau hervorrief. Zudem konnte bestätigt werden, dass es sich bei cGMP um das Hauptsubstrat für die zusätzlichen Produkte GMP und Guanosin handelte (siehe Abbildung 39). Daher wurden in dieser Arbeit zur Bestimmung des realen Umsatzes von GTP zu cGMP auch die entstandenen GMP- und Guanosin-Konzentrationen berücksichtigt und die ermittelte Hintergrundaktivität subtrahiert. Hierdurch war es möglich, den Aktivitätsassay für die ROS-GC1 unter physiologisch relevanten Bedingungen zu etablieren.

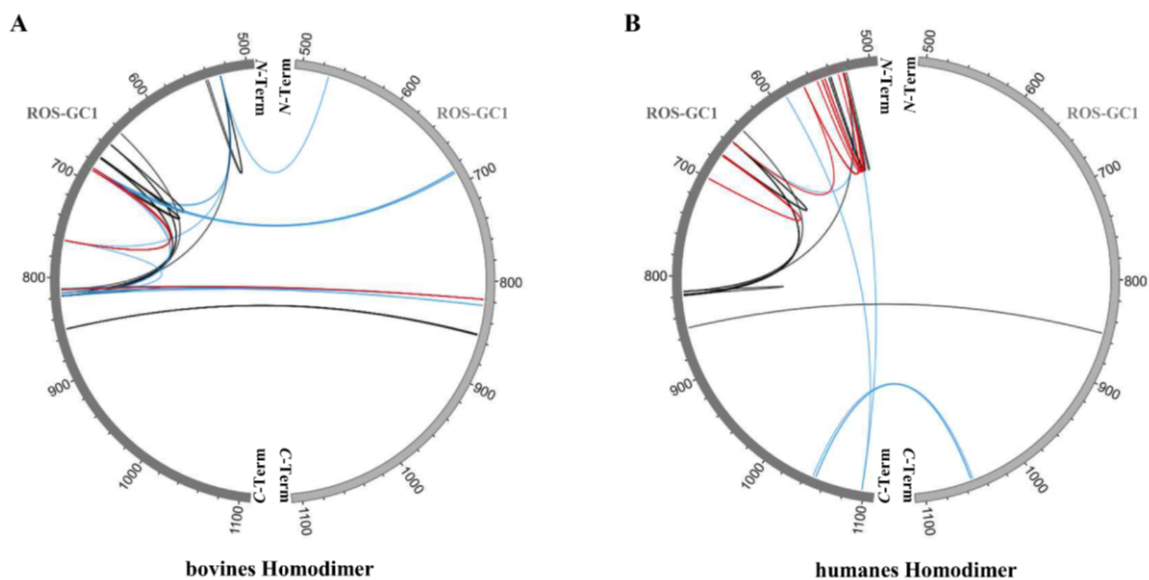
### **6.6 Vergleich verschiedener Anreicherungsstrategien**

In dieser Arbeit wurden 3D-Strukturuntersuchungen der humanen ROS-GC1, exprimiert in HEK 293-Zellen, und der bovinen ROS-GC1 aus einer retinalen ROS-Präparation mittels chemischer Vernetzung in Kombination mit MS durchgeführt (siehe 5.5.3 und 5.6.4). Zur strukturellen Charakterisierung wurde das Vernetzungsreagenz DSBU verwendet. Für die Identifizierung der gering abundanten ROS-GC1-Vernetzungsprodukte wurden zwei Anreicherungsstrategien eingesetzt. Es wurde entweder eine SEC zur Anreicherung vernetzter ROS-GC1-Peptide (1) oder eine IP zur ROS-GC1-Anreicherung (2) angewendet: 1) Beim HEK 293-Zelllysate, das die humane ROS-GC1 enthielt, erfolgte im ersten Schritt die Vernetzungsreaktion und danach die Anreicherung der DSBU-Vernetzungsprodukte mithilfe der SEC (siehe 4.4.4 und 5.5.2). Durch die Abtrennung nicht-vernetzter Peptide war die Identifizierung der Vernetzungsprodukte in ROS-GC1 möglich. 2) Bei der ROS-Präparation war die Herausforderung, dass Rhodopsin in sehr hohem Überschuss enthalten war (siehe 6.4). Die hohe Konzentration an Rhodopsin erschwerte die Identifizierung der nieder abundanten Vernetzungsprodukte in ROS-GC1, da es wahrscheinlich zur Überlagerung von Signalen nicht-vernetzter und vernetzter Peptide kam. Infolgedessen wurde die bovine ROS-GC1 der ROS-Präparation zunächst solubilisiert, mittels IP angereichert und anschließend chemisch vernetzt (siehe 4.3.10 und 5.6.3). Durch die IP-Anreicherung konnte die Anzahl der identifizierten Peptidspektren (*peptide spectrum matches*, PSMs) für Rhodopsin von ca. 400 auf unter 20 PSMs deutlich reduziert werden (siehe 1.2.5). Mit der erfolgreichen Anreicherungsstrategie war eine Identifizierung der ROS-GC1-Vernetzungsprodukte möglich. Bei der Analyse zeigte sich, dass die unabhängig identifizierten Vernetzungen der humanen

## Diskussion

und bovinen ROS-GC1 in hohem Maße übereinstimmten oder komplementäre Strukturinformationen lieferten (siehe Tabelle 8 und 9).

In Abbildung 46 ist der graphische Vergleich der identifizierten Vernetzungsprodukte für bovinen und humanes ROS-GC1-Homodimer dargestellt. Die Vernetzungspositionen, die aufgrund von Unterschieden in der bovinen oder humanen ROS-GC1-Aminosäuresequenz nicht in der anderen Variante möglich waren, wurden aufgelistet. Zehn der identifizierten Vernetzungsprodukte der bovinen ROS-GC1 sind mit 13 humanen ROS-GC1-Vernetzungen vergleichbar (schwarz abgebildet, siehe Abbildung 46A). Vier weitere Vernetzungen in der bovinen ROS-GC1 können bei der humanen ROS-GC1 nicht gebildet werden, da K763 sowie S812 im humanen Protein nicht vorliegen (rot dargestellt). Zusätzlich konnten ergänzende Strukturinformationen anhand von 18 weiterer Vernetzungen, die ausschließlich in der bovinen ROS-GC1 identifiziert wurden, gewonnen werden (blau dargestellt).



**C**

Vernetzungsposition	Sequenzunterschiede	
	bovine	human
<b>S546/549/554</b>	keine Schnittstelle (C-Term) kein S554	✓
<b>K568</b>	keine Schnittstelle (N-Term)	✓
<b>K700</b>	kein K700	✓
<b>K763</b>	✓	kein K763
<b>S812</b>	✓	kein S812

**Abbildung 46:** Vergleich der identifizierten DSBU-Vernetzungen in der bovinen (A) und humanen (B) ROS-GC1. Identifizierte Vernetzungen sind in beiden Varianten schwarz dargestellt, bei der humanen oder bovinen ROS-GC1 blau und in einer ROS-GC1-Variante (hervorgehoben durch Sequenzunterschiede) rot. C) Übersicht der vernetzten Aminosäuren in nur einer ROS-GC1-Variante aufgrund fehlender Trypsin-Spaltstellen oder fehlendem K oder S in der jeweiligen Sequenz.

14 Vernetzungen der humanen ROS-GC1 liefern zusätzliche Strukturinformationen (Abbildung 46B), von denen acht aufgrund von Unterschieden in der Sequenz bei der bovinen ROS-GC1 nicht möglich waren. Humane und bovine ROS-GC1 weisen eine Sequenzübereinstimmung (*sequence identity*) von 87% auf. Die native bovine ROS-GC1 ist nur schwer zugänglich und die Präparation aufwendig. Insgesamt zeigt sich jedoch, dass die humane, in HEK 293-Zellen überexprimierte ROS-GC1 eine vergleichbare 3D-Struktur zur nativen ROS-GC1 aus der ROS-Präparation annimmt. Somit stellen die HEK 293-Zellen ein alternatives Expressionssystem für weitergehende Strukturanalysen dar.

### 6.7 GCAP-2-Bindung

Neben der Identifizierung von DSBU-Vernetzungsprodukten innerhalb der ROS-GC1 sollten strukturelle Informationen zum ROS-GC1/GCAP-2-Komplex gewonnen werden. DSBU-Vernetzungen zwischen ROS-GC1 und GCAP-2 sollten Einblicke in die Interaktionsfläche ermöglichen, um den Aktivierungsmechanismus von ROS-GC1 durch GCAP-2 besser verstehen zu können. In dieser Arbeit konnten zunächst mithilfe der GCAP-2/ROS-GC1-Peptidstudien weitere Hinweise auf mögliche Bindungsmotive erzielt werden (siehe 5.4). Anschließend sollte die Vollängen- ROS-GC1 mit GCAP-2 durch DSBU verknüpft werden. Zur Identifizierung von chemischen Vernetzungen zwischen ROS-GC1 und GCAP-2 wurden als biologische Systeme HEK 293-Zellen sowie ROS-Präparation verwendet (siehe 6.6). In HEK 293-Zellen wurde ROS-GC1 stabil exprimiert. Nach dem Zellaufschluss erfolgte zunächst die Zugabe von GCAP-2 zum Zellysate und anschließend die Vernetzungsreaktion mit DSBU. Für die MS-Analyse der Vernetzungsprodukte wurde die unlösliche Membranfraktion verwendet, die ROS-GC1 enthält. Chemische Verknüpfungen wurden innerhalb von ROS-GC1, als auch innerhalb von GCAP-2 identifiziert. Obwohl keine intermolekularen DSBU-Vernetzungen zwischen ROS-GC1 und GCAP-2 nachweisbar waren, deuten folgende Beobachtungen auf eine Interaktion zwischen ROS-GC1 und GCAP-2 hin: Es konnte sowohl GCAP-2 in der Membranfraktion angereichert werden, als auch eine Aktivitätssteigerung der ROS-GC1 durch GCAP-2 in der Membranfraktion erzielt werden (siehe 5.5.1). Ähnliche Resultate wurden bereits in vorherigen Studien erzielt. Hierbei war die Messung einer erhöhten ROS-GC1-Aktivität durch GCAP-2 mittels Radioimmunassay und chromatographischer Auftrennung der Nukleotide sowie unter Verwendung radioaktiver Markierungen möglich, jedoch ein immunchemischer Komplexnachweis nach der Vernetzungsreaktion nicht detektierbar [41, 42, 239]. Des Weiteren konnten anhand von kinetischen Analysen apparente Bindungsaffinitäten zwischen ROS-GC1 und GCAP-2 im niederen mikromolaren Bereich

## Diskussion

ermittelt werden [18, 67, 69]. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von Vernetzungsprodukten zwischen Vollängen-ROS-GC1 und GCAP-2 ist die schlechte Zugänglichkeit in den Regionen der vernetzten Aminosäuren zwischen ROS-GC1 und GCAP-2. Möglicherweise konnte keine effektive Proteolyse durch Trypsin gewährleistet werden und folglich war die Anzahl der Vernetzungsprodukte zwischen den Interaktionspartnern für die massenspektrometrische Detektion zu gering. Um die Effizienz der Proteinspaltung zu erhöhen, könnte der Einsatz anderer Proteasen getestet werden. Zudem könnte die Verwendung unterschiedlicher Vernetzungsreagenzien mit anderen Reaktivitäten und *Spacer*-Längen erfolgen. Allerdings müssten hierfür zunächst die Versuchsbedingungen zur Vernetzung/MS-Analyse komplexer Proben optimiert und etabliert werden, wie es in dieser Arbeit für die Proteolyse mit Trypsin und DSBU erfolgte (siehe 5.5.2). Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2020 verdeutlicht die Herausforderungen und den bestehenden Entwicklungsbedarf bei Proteom weiten Strukturanalysen von nieder abundanten Proteininteraktionen mittels chemischer Vernetzung und MS-Analyse [240]. Chemische Verknüpfungen wurden bevorzugt in hoch abundanten Proteinen in einem komplexen zellulären Umfeld gebildet. Somit wird nur ein Teil der Proteinnetzwerke bei der Fixierung mit einem Vernetzungsreagenz abgedeckt. Eine Möglichkeit, mehr Interaktionen erfassen zu können, besteht in der Verwendung höherer Überschüsse und in der sukzessiven Zugabe des Vernetzungsreagenz.

Auch konnten keine Vernetzungen zwischen der ROS-GC1 und dem GCAP-2-Protein in der ROS-Präparation, obwohl beide Interaktionspartner unter nativen Bedingungen vorhanden waren, identifiziert werden. Durch externe Zugabe von GCAP-2 wurde die Komplexbildung nicht begünstigt. Auch durch die Zugabe von Glutaraldehyd konnte der möglicherweise sehr empfindliche und transiente Komplex in der ROS-Präparation nicht fixiert werden. Trotz Zugabe von GCAP-2 und des Substrates GTP vor der Glutaraldehyd-Vernetzungsreaktion, welche den aktiven Zustand des Komplexes herstellen und somit dessen Bildung stabilisieren sollte, konnten ausschließlich Vernetzungen innerhalb der ROS-GC1 identifiziert werden. Parallel zu GCAP-2 wurden diese Experimente auch mit GCAP-1 durchgeführt, welche ebenfalls zu keinen Vernetzungen führten. Dies deutet daraufhin, dass unter den verwendeten Bedingungen keine Bindung oder nur eine äußerst transiente Interaktion zwischen ROS-GC1 und den Aktivatoren erfolgte. Aufgrund dessen konnten eventuell zu wenige Interaktionen erfasst werden, was in einer zu gering abundanten Menge an Vernetzungsprodukten zwischen ROS-GC1 und GCAP-2 für die MS-Analyse resultierte. Auf den Komplexnachweis von

ROS-GC1 und GCAP-2 mittels chemischer Vernetzung haben möglicherweise auch weitere biologische Parameter, wie z.B. zusätzliche Proteininteraktionspartner, einen entscheidenden Einfluss. Die Verwendung der ROS-Präparation spiegelt die nativen Bedingungen im Auge relativ gut wider, allerdings sind die hoch komplexen Proteinnetzwerke zur Signalweiterleitung für die Lichanpassung des Auges nur bei lebenden Organismen vollständig funktionsfähig. Zusätzliche Aktivatoren, die für die stabile Komplexbildung von ROS-GC1 und GCAP-2 essentiell sind, wurden möglicherweise noch nicht identifiziert. Eventuell haben weitere Proteine als dritter Bindungspartner oder weitere Transmitter eine vermittelnde Wirkung auf die Bildung des ROS-GC1/GCAP-2-Komplexes, sodass dieser nur in der Anwesenheit der genannten zellulären Komponenten stabil gebildet wird.

### 6.8 Validierung der 3D-Struktur der bovinen ROS-GC1

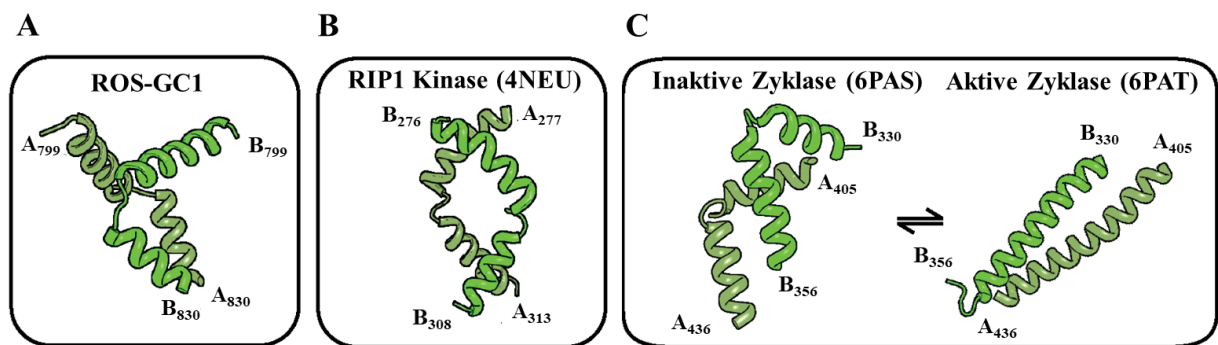
Zur 3D-Strukturcharakterisierung der bovinen ROS-GC1 wurde ein Homologiemodell für die IcD der ROS-GC1 erstellt. Die Modellierung war auf die IcD beschränkt, da bei der ROS-GC1 alle regulatorischen Prozesse intrazellulär erfolgen und somit diese Domäne strukturell von besonderem Interesse ist. Zudem konnten alle DSBU-Vernetzungen im intrazellulären Teil der ROS-GC1 identifiziert werden. Die erhaltenen Distanzinformationen aus den Vernetzungsexperimenten dienen der Validierung des ROS-GC1-Modells. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist keine hochauflösende 3D-Struktur für die nativen ROS-GC1 verfügbar. Vor allem die Gliederung sowie die räumliche Anordnung der intrazellulären Domäne (IcD) wird weiterhin diskutiert. Für *Chlamydomonas reinhardtii* (Grünalge) konnte erstmalig eine Kristallstruktur für die katalytische Domäne einer eukaryotischen, löslichen Guanylatzyklase als Dimer erhalten werden [223]. Sie wurde als Grundlage für ein ROS-GC1-Modell der katalytischen Domäne verwendet [225]. Die erste vollständig aufgelöste Struktur einer Guanylatzyklase wurde Ende 2019 veröffentlicht. Hierbei handelt es sich um die Kryo-EM-Struktur der löslichen Nitrit-Rezeptor-Guanylatzyklase von *Manduca sexta* (Tabakswärmer) in ihrer aktiven und inaktiven Form, die als Proteinvorlage zur ROS-GC1-Modellierung der AS 823 bis 1066 diente [217]. Mithilfe der computerbasierten Strukturbiologie konnte in dieser Arbeit erfolgreich ein vollständiges Modell für die IcD der bovine ROS-GC1, mit Ausnahme der N- und C-terminalen Randregionen (AS 493-541 und AS 1067-1110), erstellt werden (siehe 4.6.2 und 5.7). Dabei kam es zu folgender Gliederung der Subdomänen: KHD (AS 542-806),  $\alpha$ HD (AS 807-859) und CD (AS 860-1066). Die KHD ist über eine  $\alpha$ -helikale Linker-Region ( $\alpha$ HD) mit der CD verbunden. Da noch nicht eindeutig geklärt ist, ob die Funktion dieser Linker-Region in der Dimerisierung der ROS-GC1 [39, 42, 74] oder in der Signalweiterleitung besteht [40, 41, 44],



erfolgte in dieser Arbeit die Umbenennung der Region (AS 807-859) anhand ihrer Struktur in „ $\alpha$ -helikale Domäne ( $\alpha$ HD)“.

Besonders interessant ist das *N*-terminale Helix-Turn-Helix-Motiv der  $\alpha$ HD, das aufgrund seiner Flexibilität Einfluss auf die räumliche Ausrichtung der KHD und CD zueinander hat (siehe Abbildung 47A). Da der *C*-terminale Teil der IcD frei beweglich ist, während der *N*-Terminus in der Membran verankert vorliegt, kann das identifizierte Motiv als molekulares Scharniergelenk fungieren und verschiedene Konformationen der IcD ermöglichen. Dieses charakteristische Motiv ist auch bei Kinasen und weitere Zyklasten nachweisbar (siehe Abbildung 47). So ist beispielsweise bei der löslichen Nitrit-Rezeptor-Guanylatzyklase in dieser Region eine Konformationsänderung von 90° möglich. Dieses Motiv weist in der inaktiven Form (6PAS) eine geknickte, in der aktiven Form (6PAT) eine gestreckte Konformation auf (siehe Abbildung 47C).

Zunächst wurden die identifizierten DSBU-Vernetzungen in der bovinen ROS-GC1 zur Validierung des IcD-Modells betrachtet und die  $C_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$ -Distanzen der vernetzten Aminosäuren bestimmt (siehe Abbildung 45). Da nicht entschieden werden konnte, ob sich die Vernetzungen in einem Monomer (intramolekulare Vernetzungen) oder zwischen zwei Monomeren (intermolekulare Vernetzungen) befinden, wurden jeweils die geringsten Distanzen angegeben (siehe Tabelle A 15). Nur fünf der 24 für die Validierung verwendeten Vernetzungsprodukte überschritten die maximale Distanzbeschränkung von 30 Å für DSBU.



**Abbildung 47:** Charakteristische Konformationen des flexiblen Helix-Turn-Helix-Motivs. A) Modellierter ROS-GC1-Struktur, B) RIP1 Kinase (PDB-Eintrag: 4NEU) und C) inaktive Form (PDB-Eintrag: 6PAS) und aktive Form (PDB-Eintrag: 6PAT) der Nitrit-Rezeptor-Guanylatzyklase, bei der das Helix-Turn-Helix-Motiv eine verlängerte, helikale Konformation einnimmt. A: Monomer 1 und B: Monomer 2. Aminosäurenummerierung am *N*- und *C*-Terminus des Motivs ist angegeben. Modifiziert nach [234].

## Diskussion

Bei allen DSBU-Vernetzungsprodukten, die eine Distanz von mehr als 30 Å überbrückten, waren Aminosäuren, die in der Scharnierregion der  $\alpha$ HD lokalisiert sind, beteiligt. Aufgrund der hohen Flexibilität dieses Helix-*Turn*-Helix-Motiv sind Entfernungen von mehr als 30 Å in der Scharnierregion denkbar. Zudem wiesen drei dieser fünf Vernetzungsprodukte nur eine geringe Abweichung von maximal 1,2 Å auf, was mit der zuvor beschriebenen flexiblen Strukturregion im Einklang steht. Das Modell konnte somit anhand der identifizierten Vernetzungsprodukte der bovinen ROS-GC1 bestätigt werden. Elf der identifizierten Vernetzungsprodukte beinhalten identische oder überlappende Peptide, die somit von zwei Monomeren stammen müssen. Diese Vernetzungsprodukte sind nur durch die Existenz eines ROS-GC-Homodimers in der bovinen Retina erklärbar und könnten ansonsten nicht gebildet werden. Somit konnten sie eindeutig als intermolekulare Vernetzungen klassifiziert werden. Sie stimmen mit Resultaten aus vorherigen Vernetzungsexperimenten in Kombination mit Western-Blot-Analysen überein, bei denen das Homodimer der nativen ROS-GC1 als aktive Form in ROS-Präparationen identifiziert wurde [42].

Zusätzlich wurde das erstellte IcD-Modell anhand der DSBU-Vernetzungsprodukte in der humanen ROS-GC1 überprüft (siehe 5.5.3 und Tabelle A 16). Es konnten nur 14 der 27 Vernetzungsprodukte zur Überprüfung verwendet werden, da bei den verbleibenden 13 Vernetzungsprodukten Aminosäuren, die nicht durch das Modell abdeckt wurden, beteiligt waren. Sechs Vernetzungen der humanen ROS-GC1 aus HEK 293-Zellmembranen stimmen mit dem KHD- und  $\alpha$ HD-Modell überein, da sie Distanzen zwischen 13 und 27 Å überbrücken. Ebenfalls weisen weitere vier intermolekulare Vernetzungen (K851 x K853, K1051 x K1051, K1048 x K1053 und K1051 x K1053) Distanzen zwischen 11 und 29 Å auf. Da die beobachteten Entfernungen 30 Å nicht überschritten, kann anhand dieser Resultate die dimere ROS-GC1-Struktur bestätigt werden.

## Diskussion

Zudem stützten die intermolekularen Vernetzungsprodukte im Bereich von K1048 bis K1053 frühere Ergebnisse [234, 241], da dort bereits im Dimer des bovinen C-terminale Fragments der ROS-GC1 (AS 814-1110) drei identische Vernetzungen (K1051 x K1051, K1048 x K1053 und K1051 x K1053) zwischen den zwei Monomeren identifiziert worden waren [234]. Somit wurde das Ergebnis der Modellierung erneut bekräftigt. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das IcD-Modell im Einklang mit 24 Vernetzungen der bovinen ROS-GC1 und mit 14 Vernetzungen der humanen ROS-GC1 steht, die unabhängig voneinander aus zwei verschiedenen Vernetzungsstrategien und mit zwei unterschiedlichen ROS-GC1-Varianten resultierten.

Auffällig sind die beiden Vernetzungen zwischen K527 x K1098 sowie K588 x K1098, die nicht vom IcD-Modell erfasst werden konnten und ausschließlich in der humanen ROS-GC1 aus den HEK 293-Zellmembranen identifiziert wurden. Hierbei wurden Lysine aus den zwei voneinander entfernten *N*- und *C*-terminalen Regionen der IcD miteinander verknüpft. Dies deutet daraufhin, dass sich KHD und CD in räumlicher Nachbarschaft befanden und die IcD wahrscheinlich als eine geschlossene Struktur vorlag. Diese Konformation ist vergleichbar mit der inaktiven Form der Nitrit-Rezeptor-Guanylatzyklase (6PAS), bei der ebenfalls eine kompaktere Struktur aufgrund des geknickten *Helix-Turn-Helix*-Motivs nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 45).

Da die in HEK 293-Zellen überexprimierte ROS-GC1 eine deutlich geringere Enzymaktivität im Vergleich zur bovinen ROS-GC1-Variante aus der ROS-Präparation aufwies (siehe 6.5), kann davon ausgegangen werden, dass ein geringer Anteil der humanen ROS-GC1 in seiner inaktiven, geschlossenen Form vorlag. Obwohl diese Vernetzungsprodukte bei der bovinen Variante aus der ROS-Präparation nicht identifiziert wurden, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht ausschließen, dass auch die bovine Variante in der kompakteren und inaktiven Konformation vorliegen kann. Die deutlich höhere Aktivität lässt jedoch vermuten, dass die bovine ROS-GC1 hauptsächlich eine aktive, gestreckte Konformation aufweist. Zudem könnte die Zugänglichkeit von K1098 durch die IP-Antikörperbindung an die AS 1086-1107 der ROS-GC1 beeinträchtigt gewesen sein. Deshalb kann wahrscheinlich die hohe Aktivität der bovinen ROS-GC1 und die damit verbundene geringe Population an inaktivem Protein in Kombination mit einer gehinderten Zugänglichkeit von K1098 eine Erklärung für die fehlende Beteiligung von K1098 an Vernetzungsprodukten der bovinen ROS-GC1 sein.

## 7 Ausblick

Für die zukünftige Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung von Fehlfunktionen bei der Phototransduktion wurde in dieser Arbeit die ROS-GC1 strukturell und funktionell charakterisiert. 3D-Strukturinformationen konnten für die ROS-GC1 anhand der identifizierten Vernetzungsprodukte gewonnen werden. Die hieraus abgeleiteten Distanzbeschränkungen zwischen den vernetzten Aminosäuren dienen als Basis für die Erstellung eines Homologie-modells der intrazellulären Domäne der ROS-GC1. Für eine weiterführende und detailliertere 3D-Strukturanalyse der ROS-GC1 könnten komplementäre Distanzinformationen unter Einsatz alternativer Verknüpfungsreagenzien wertvoll sein. Beispielsweise könnten Photo-Leucin und -Methionin direkt in ROS-GC1 in HEK 293-Zellen eingebaut werden. Vorteilhaft ist hierbei, dass die Proteinstruktur nicht beeinträchtigt wird. Die weitere Verwendung des ultrakurzen spaltbaren Vernetzungsreagenz CDI, welches die Strukturanalyse in komplexen Proteinmischungen erleichtert, wäre ebenfalls denkbar. Auch die Kombination verschiedener strukturbioologischer Methoden, wie der Kryo-EM und Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie (IM-MS), könnten zusätzlich Aufschluss liefern, ob die ROS-GC1 unterschiedliche Konformationen im aktiven und inaktiven Zustand und in Abhängigkeit des verwendeten Expressionssystems einnimmt. Anhand der Interaktionsstudien zwischen den ROS-GC1-Peptiden und GCAP-2 konnten umfangreiche Erkenntnisse zu möglichen Kontaktflächen während der Aktivierung der ROS-GC1 erzielt werden. Trotz der Optimierung der Strategien wurden keine Vernetzungsprodukte zwischen Vollängen-ROS-GC1 und GCAP-2 ermittelt. Dies deutet auf ein äußerst komplexes Proteininteraktionssystem bei der Phototransduktion hin. Die Verwendung intakter Photorezeptorzellen oder des gesamten Retina-Gewebes bei weiterführenden Vernetzungsexperimenten könnten für die globale/systemische Analyse der Proteininteraktionen in der Phototransduktion aufschlussreich sein. Eine weitere mögliche Strategie wäre die Anreicherung von bis jetzt unbekanntem Proteinen als potentielle ROS-GC1-Bindungspartner in der Anwesenheit von GCAP-2, abhängig von bestimmten Calcium- und cGMP-Konzentrationen an ROS-GC1 binden. Diese haben möglicherweise einen Einfluss auf eine stabile ROS-GC1/GCAP-2-Komplexbildung und könnten somit entscheidende Erkenntnisse zur Aufklärung des Regulationsmechanismus der ROS-GC1 liefern. Für die globale Analyse der Proteininteraktionen in der Retina ist allerdings ein zusätzlicher Anreicherungsschritt der sehr gering abundanten Vernetzungsprodukte nötig. Dabei könnten Vernetzungsreagenzien zur Anwendung kommen, die über eine weitere funktionelle Gruppe die direkte Anreicherung der Vernetzungsprodukte ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Sharon, D., Wimberg, H., Kinarty, Y., *et al.*, *Genotype-functional-phenotype correlations in photoreceptor guanylate cyclase (GC-E) encoded by GUCY2D*. *Prog Retin Eye Res* 63 (2018) 69-91.
- [2] Duda, T., Fik-Rymarkiewicz, E., Venkataraman, V., *et al.*, *The calcium-sensor guanylate cyclase activating protein type 2 specific site in rod outer segment membrane guanylate cyclase type I*. *Biochemistry* 44 (2005) 7336-7345.
- [3] Pettelkau, J., Schröder, T., Ihling, C.H., *et al.*, *Structural insights into retinal guanylylcyclase-GCAP-2 interaction determined by cross-linking and mass spectrometry*. *Biochemistry* 51 (2012) 4932-4949.
- [4] Lange, C., Duda, T., Beyermann, M., *et al.*, *Regions in vertebrate photoreceptor guanylyl cyclase ROS-GC1 involved in Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation by guanylyl cyclase-activating protein GCAP-1*. *Febs Lett* 460 (1999) 27-31.
- [5] Veleri, S., Lazar, C.H., Chang, B., *et al.*, *Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: Insights from mouse models*. *Dis Model Mech* 8 (2015) 109-129.
- [6] Sung, C.H., und Chuang, J.Z., *The cell biology of vision*. *J Cell Biol* 190 (2010) 953-963.
- [7] Eysel, U., *Signal reception and processing by the retina*. *Der Ophthalmologe* 104 (2007) 79-90.
- [8] Baden, T., Euler, T., und Berens, P., *Understanding the retinal basis of vision across species*. *Nat Rev Neurosci* 21 (2020) 5-20.
- [9] Zhang, K., Zhang, L., und Weinreb, R.N., *Ophthalmic drug discovery: Novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma*. *Nat Rev Drug Discov* 11 (2012) 541-559.
- [10] Pugh Jr, E.N., und Cobbs, W.H., *Visual transduction in vertebrate rods cones: A tale of tow transmitters, calcium and cyclich GMP*. *Vision Res* 26 (1986) 1613-1643.
- [11] Baylor, D.A., Lamb, T.D., und Yau, K.W., *Response of retinal rods to single photons*. *J Physiol* 288 (1979) 613-634.
- [12] O'Brien, D.F., *The chemistry of vision*. *Science* 218 (1982) 961-966.
- [13] Stryer, L., *Cyclic-GMP cascade of vision*. *Annu Rev of Neurosc* 9 (1986) 87-119.

## Literaturverzeichnis

- [14] Yau, K.W., *Phototransduction mechanism in retinal rods and cones, The Friedenwald Lecture*. Invest Ophthalmol Vis Sci 35 (1994) 9-32.
- [15] Müller, F., und Kaupp, U.B., *Signaltransduktion in Sehzellen*. Naturwissenschaften 85 (1998) 49-61.
- [16] Pugh Jr., E.N., und Lamb, T.D., *Phototransduction in vertebrate rods and cones: Molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation*. Handb Biol Phys 3 (2000) 183-255.
- [17] Lamb, T.D., und Pugh Jr., E.N., *Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture*. Invest Ophthalmol Vis Sci 47 (2006) 5137-5152.
- [18] Koch, K.W., und Dell'Orco, D., *Protein and signaling networks in vertebrate photoreceptor cells*. Front Mol Neurosci 8 (2015) 67.
- [19] Cone, R.A., und Cobbs, W.H., *Rhodopsin cycle in the living eye of the rat*. Nature 221 (1969) 820-822.
- [20] Frederiksen, R., Nymark, S., Kolesnikov, A.V., et al., *Rhodopsin kinase and arrestin binding control the decay of photoactivated rhodopsin and dark adaptation of mouse rods*. J Gen Physiol 148 (2016) 1-11.
- [21] Lamb, T.D., und Pugh Jr., E.N., *Dark adaptation and the retinoid cycle of vision*. Prog Retin Eye Res 23 (2004) 307-80.
- [22] Sharma, R.K., und Duda, T., *Membrane guanylate cyclase, a multimodal transduction machine: History, present, and future directions*. Front Mol Neurosci 7 (2014) 1-20.
- [23] Vertessy, B.G., Allerston, C.K., von Delft, F., et al., *Crystal structures of the catalytic domain of human soluble guanylate cyclase*. PLoS One 8 (2013).
- [24] Potter, L.R., *Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases*. Pharmacol Ther 130 (2011) 71-82.
- [25] Kuhn, M., *Molecular physiology of membrane guanylyl cyclase receptors*. Physiol Rev 96 (2016) 751-804.
- [26] Peshenko, I.V., Olshevskaya, E.V., Savchenko, A.B., et al., *Enzymatic properties and regulation of the native isozymes of retinal membrane guanylyl cyclase (RetGC) from mouse photoreceptors*. Biochemistry 50 (2011) 5590-5600.
- [27] Lowe, D.G., Dizhoor, A.M., Liu, K., et al., *Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2*. Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 5535-5539.

## Literaturverzeichnis

- [28] Goraczniak, R., Duda, T., und Sharma, R.K., *Structural and functional characterization of a second subfamily member of the calcium-modulated bovine rod outer segment membrane guanylate cyclase, ROS-GC2*. Biochem Biophys Res Commun 234 (1997) 666–670
- [29] Helten, A., Säftel, W., und Koch, K.W., *Expression level and activity profile of membrane bound guanylate cyclase type 2 in rod outer segments*. J Neurochem 103 (2007) 1439-1446.
- [30] Sharma, R.K., und Duda, T., *Ca<sup>2+</sup>-sensors and ROS-GC: Interlocked sensory transduction elements: A review*. Front Mol Neurosci 5 (2012) 1-20.
- [31] Koch, K.W., *Purification and identification of photoreceptor guanylate cyclase*. J Biol Chem 266 (1991) 8634-8637.
- [32] Margulis, A., Goraczniak, R.M., Duda, T., et al., *Structural and biochemical identity of retinal rod outer segment membrane guanylate cyclase*. Biochem Biophys Res Commun 194 (1993) 855-861.
- [33] Goraczniak, R.M., Duda, T., Sitaramayya, A., et al., *Structural and functional characterization of the rod outer segment membrane guanylate cyclase*. Biochem J 302 (1994) 455-61.
- [34] Duda, T., Pertzev, A., Makino, C.L., et al., *Bicarbonate and Ca<sup>2+</sup> sensing modulators activate photoreceptor ROS-GC1 synergistically*. Front Mol Neurosci 9 (2016) 1-11.
- [35] Shyjan, A.W., de Sauvage, F.J., Gillett, Y.A., et al., *Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase*. Neuron 9 (1992) 727-737.
- [36] Koch, K.W., Duda, T., und Sharma, R.K., *Photoreceptor specific guanylate cyclases in vertebrate phototransduction*. Mol Cell Biochem 230 (2002) 97-106.
- [37] Laura, R.P., Dizhoor, A.M., und Hurley, J.B., *The membrane guanylyl cyclase, retinal guanylyl cyclase-1, is activated through its intracellular domain*. J Biol Chem 271 (1996) 11646–11651.
- [38] Wilson, E.M., und Chinkers, M., *Identification of sequences mediating guanylyl cyclases dimerization*. Biochem 34 (1995) 4696-4701.
- [39] Ramamurthy, V., Tucker, C., Wilkie, S.E., et al., *Interactions within the coiled-coil domain of RetGC-1 guanylyl cyclase are optimized for regulation rather than for high affinity*. J Biol Chem 276 (2001) 26218-26229.

## Literaturverzeichnis

- [40] Saha, S., Biswas, K.H., Kondapalli, C., *et al.*, *The linker region in receptor guanylyl cyclases is a key regulatory module: Mutational analysis of guanylyl cyclase C*. J Biol Chem 284 (2009) 27135-27145.
- [41] Zägel, P., Dell'Orco, D., und Koch, K.W., *The dimerization domain in outer segment guanylate cyclase is a Ca<sup>2+</sup>-sensitive control switch module*. Biochemistry 52 (2013) 5065-5074.
- [42] Yu, H., Olshevskaya, E., Duda, T., *et al.*, *Activation of retinal guanylyl cyclase-1 by Ca<sup>2+</sup>-binding proteins involves its dimerization*. J Biol Chem 274 (1999) 15547–15555.
- [43] Peshenko, I.V., Olshevskaya, E.V., und Dizhoor, A.M., *Dimerization domain of retinal membrane guanylyl cyclase 1 (RetGC1) is an essential part of guanylyl cyclase-activating protein (GCAP) binding interface*. J Biol Chem 290 (2015) 19584-19596.
- [44] Duda, T., Pertzev, A., und Sharma, R.K., *Differential Ca<sup>2+</sup> sensor guanylate cyclase activating protein modes of photoreceptor rod outer segment membrane guanylate cyclase signaling*. Biochemistry 51 (2012) 4650-4657.
- [45] Anantharaman, V., Balaji, S., und Aravind, L., *The signaling helix: A common functional theme in diverse signaling proteins*. Biol Direct 1 (2006) 25.
- [46] Koch, K.W., und Stryer, L., *Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions*. Nature 334 (1988) 64-66.
- [47] Duda, T., Koch, K.W., Venkataraman, V., *et al.*, *Ca<sup>2+</sup> sensor S100β-modulated sites of membrane guanylate cyclase in the photoreceptor-bipolar synapse*. EMBO J 21 (2002) 2547-2556.
- [48] Duda, T., und Koch, K.W., *Retinal diseases linked with photoreceptor guanylate cyclase*. Mol Cell Biochem 230 (2002) 129–138.
- [49] Koch, K.W., Duda, T., und Sharma, R.K., *Ca<sup>2+</sup>-modulated vision-linked ROS-GC guanylate cyclase transduction machinery*. Mol Cell Biochem 334 (2010) 105-115.
- [50] Sato, S., Peshenko, I.V., Olshevskaya, E.V., *et al.*, *GUCY2D cone-rod dystrophy-6 is a "phototransduction disease" triggered by abnormal calcium feedback on retinal membrane guanylyl cyclase* J Neurosci 38 (2018) 2990-3000.
- [51] Perrault, I., Rozet, J.M., Calvas, P., *et al.*, *Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis*. Nat Genet 14 (1996) 461-464.



- [52] Duda, T., Venkataraman, V., Goracznik, R., *et al.*, *Functional consequences of a rod outer segment membrane guanylate cyclase (ROS-GCI) gene mutation linked with Leber's congenital amaurosis*. *Biochemistry* 38 (1999) 509-515.
- [53] Wimberg, H., Lev, D., Yosovich, K., *et al.*, *Photoreceptor guanylate cyclase (GUCY2D) mutations cause retinal dystrophies by severe malfunction of Ca<sup>2+</sup>-dependent cyclic GMP synthesis*. *Front Mol Neurosci* 11 (2018) 348.
- [54] Duda, T., Krishnan, A., Venkataraman, V., *et al.*, *Mutations in the rod outer segment membrane guanylate cyclase in a cone-rod dystrophy cause defects in calcium signaling*. *Biochemistry* 38 (1999) 13912-13919.
- [55] Dizhoor, A.M., Olshevskaya, E.V., Henzel, W.J., *et al.*, *Cloning, sequencing, and expression of a 24-kDa Ca<sup>2+</sup>-binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase*. *J Biol Chem* 270 (1995) 25200-25206.
- [56] Palczewski, K., Subbaraya, I., Gorczyca, W.A., *et al.*, *Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein*. *Neuron* 13 (1994) 395-404.
- [57] Burgoyne, R.D., und Weiss, J.L., *The neuronal calcium sensor family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins*. *Biochem J* 353 (2001) 1-12.
- [58] Lim, S., Peshenko, I., Dizhoor, A., *et al.*, *Effects of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and myristoylation on guanylyl cyclase activating protein 1 structure and stability*. *Biochem* 48 (2009) 850-862.
- [59] Ames, J.B., Dizhoor, A.M., Ikura, M., *et al.*, *Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases*. *J Biol Chem* 274 (1999) 19329-19337.
- [60] Peshenko, I.V., und Dizhoor, A.M., *Activation and inhibition of photoreceptor guanylyl cyclase by guanylyl cyclase activating protein 1 (GCAP-1). The functional role of Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in EF-hand domains*. *J Biol Chem* 282 (2007) 21645–21652.
- [61] Hwang, J.Y., Lange, C., Helten, A., *et al.*, *Regulatory modes of rod outer segment membrane guanylate cyclase differ in catalytic efficiency and Ca<sup>2+</sup>-sensitivity*. *Eur J Biochem* 270 (2003) 3814-3821.
- [62] Stephen, R., Filipek, S., Palczewski, K., *et al.*, *Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of phototransduction*. *Photochem Photobiol* 84 (2008) 903-910.

- [63] Burgoyne, R.D., *Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal  $Ca^{2+}$  signalling*. Nat Rev Neurosci 8 (2007) 182-93.
- [64] Stephen, R., Bereta, G., Golczak, M., *et al.*, *Stabilizing function for myristoyl group revealed by the crystal structure of a neuronal calcium sensor, guanylate cyclase-activating protein 1*. Structure 15 (2007) 1392-1402.
- [65] Olshevskaya, E.V., Hughes, R.E., Hurley, J.B., *et al.*, *Calcium binding, but not a calcium-myristoyl switch, controls the ability of guanylyl cyclase-activating protein GCAP-2 to regulate photoreceptor guanylyl cyclase*. J Biol Chem 272 (1997) 14327-14333.
- [66] Hwang, J.Y., und Koch, K.W., *The myristoylation of the neuronal  $Ca^{2+}$ -sensors guanylate cyclase-activating protein 1 and 2*. Biochim Biophys Acta 1600 (2002) 111-117.
- [67] Hwang, J.Y., und Koch, K.W., *Calcium- and myristoyl-dependent properties of guanylate cyclase-activating protein-1 and protein-2*. Biochemistry 41 (2002) 13021-13028.
- [68] Sulmann, S., Kussrow, A., Bornhop, D.J., *et al.*, *Label-free quantification of calcium-sensor targeting to photoreceptor guanylate cyclase and rhodopsin kinase by backscattering interferometry*. Sci Rep 7 (2017) 45515.
- [69] Peshenko, I.V., Moiseyev, G.P., Olshevskaya, E.V., *et al.*, *Factors that determine  $Ca^{2+}$  sensitivity of photoreceptor guanylyl cyclase. Kinetic analysis of the interaction between the  $Ca^{2+}$ -bound and the  $Ca^{2+}$ -free guanylyl cyclase activating proteins (GCAPs) and recombinant photoreceptor guanylyl cyclase 1 (RetGC-1)*. Biochem 43 (2004) 13796-13804.
- [70] Gray-Keller, M.P., und Detwiler, P.B., *The calcium feedback signal in the phototransduction cascade of vertebrate rods*. Neuron 13 (1994) 849-861.
- [71] Koch, K.W., und Dell'Orco, D., *A calcium-relay mechanism in vertebrate phototransduction*. ACS Chem Neurosci 4 (2013) 909-917.
- [72] Laura, R.P., und Hurley, J.B., *The kinase homology domain of retinal guanylyl cyclases 1 and 2 specifies the affinity and cooperativity of interaction with guanylyl cyclase activating protein-2*. Biochemistry 37 (1998) 11264-11271.
- [73] Sokal, I., Haeseleer, F., Arendt, A., *et al.*, *Identification of a guanylyl cyclase-activating protein-binding site within the catalytic domain of retinal guanylyl cyclase 1*. Biochemistry 38 (1999) 1387-1393.

- [74] Peshenko, I.V., Olshevskaya, E.V., und Dizhoor, A.M., *Evaluating the role of retinal membrane guanylyl cyclase 1 (RetGC1) domains in binding guanylyl cyclase-activating proteins (GCAPs)*. J Biol Chem 290 (2015) 6913-6924.
- [75] Krylov, D.M., und Hurley, J.B., *Identification of proximate regions in a complex of retinal guanylyl cyclase 1 and guanylyl cyclase-activating protein-1 by a novel mass spectrometry-based method*. J Biol Chem 276 (2001) 30648-54.
- [76] Gross, J.H., *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg (2012).
- [77] Aebersold, R., *A mass spectrometric journey into protein and proteome research*. J Am Soc Mass Spectrom Chem 14 (2003) 685-695.
- [78] Karas, M., und Hillenkamp, F., *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.00 daltons*. Anal Chem 60 (1988) 2299-2301.
- [79] Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science 246 (1989) 64-71.
- [80] Kebarle, P., und Verkerk, U.H., *Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now*. Mass Spectrom Rev 28 (2009) 898-917.
- [81] Kebarle, P., und Tang, L., *From ions in solution to ions in the gas phase*. Anal Chem 65 (1993) 972-986.
- [82] Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., et al., *Molecular beams of macroions*. J Chem Phys 49 (1968) 2240-2249.
- [83] Zeleny, J., *Instability of electrified liquid surfaces*. Phys Rev 10 (1917) 1-6.
- [84] Taylor, G.I., *Disintegration of water drops in an electric field*. Proc R Soc Lond Series A. Mathematical and Physical Sciences 280 (1964) 383-397.
- [85] Rayleigh Lord, F.R.S., XX. *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*. Lond Edinb Dubl Phil Mag J Sci 14 (1882) 184-186.
- [86] Gomez, A., und Tang, K., *Charge and fission of droplets in electrostatic sprays*. Phys Fluids 6 (1994) 404-414.
- [87] Mack, L.L., Kralik, P., Rheude, A., et al., *Molecular beams of macroions. II*. J Chem Phys 52 (1970) 4977-4986.
- [88] Iribarne, J.V., und Thomson, B.A., *On the evaporation of small ions from charged droplets*. J Chem Phys 64 (1976) 2287-2294.
- [89] Thomson, B.A., und Iribarne, J.V., *Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure*. J Chem Phys 71 (1979) 4451-4463.

## Literaturverzeichnis

- [90] Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. J Mass Spectrom 35 (2000) 804-817.
- [91] Wolff, M.M., und Stephens, W.E., *A pulsed mass spectrometer with time dispersion*. Rev Sci Instrum 24 (1953) 616-617.
- [92] Mamyrin, B.A., *Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry*. Int J Mass Spectrom Ion Process 131 (1994) 1-19.
- [93] Ioanoviciu, D., *Ion-optical solutions in time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom 9 (1995) 985-997.
- [94] Guilhaus, M., *Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry*. J Mass Spectrom 30 (1995) 1519-1532.
- [95] Dawson, P.H., *Quadrupole mass analyzers: Performance, design and some recent applications*. Mass Spectrom Rev 5 (1986) 1-37.
- [96] Schwartz, J.C., Senko, M.W., und Syka, J.E.P., *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. J Am Soc Mass Spectrom Chem 13 (2002) 659-669.
- [97] Mao, D., und Douglas, D.J., *H/D exchange of gas phase bradykinin ions in a linear quadrupole ion trap*. J Am Soc Mass Spectrom 14 (2003) 85-94.
- [98] Londry, F.A., und Hager, J.W., *Mass selective axial ion ejection from a linear quadrupole ion trap*. J Am Soc Mass Spectrom Chem 14 (2003) 1130-1147.
- [99] Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis*. Anal Chem 72 (2000) 1156-1162.
- [100] Kingdon, K.H., *A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures*. Phys Rev 21 (1923) 408-418.
- [101] Knight, R.D., *Storage of ions from laser-produced plasmas*. Appl Phys Lett 38 (1981) 221-223.
- [102] Scigelova, M., und Makarov, A., *Orbitrap mass analyzer-overview and applications in proteomics*. Proteomics 6 (2006) 16-21.
- [103] Makarov, A., Denisov, E., und Lange, O., *Performance evaluation of a high-field orbitrap mass analyzer*. J Am Soc Mass Spectrom 20 (2009) 1391-1396.
- [104] Olsen, J.V., de Godoy, L.M.F., Li, G., et al., *Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap*. Mol Cell Proteomics 4 (2005) 2010-2021.
- [105] Nolting, D., Malek, R., und Makarov, A., *Ion traps in modern mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev 38 (2019) 150-168.

- [106] Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., *et al.*, *The orbitrap: A new mass spectrometer*. J Mass Spectrom 40 (2005) 430-443.
- [107] Senko, M.W., Remes, P.M., Canterbury, J.D., *et al.*, *Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates*. Anal Chem 85 (2013) 11710-11714.
- [108] Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.P., *et al.*, *Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole orbitrap mass spectrometer*. Mol Cell Proteomics 10 (2011) M111 011015.
- [109] Eliuk, S., und Makarov, A., *Evolution of orbitrap mass spectrometry instrumentation*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif) 8 (2015) 61-80.
- [110] Thomson, B.A., Douglas, D.J., Corr, J.J., *et al.*, *Improved collisionally activated dissociation efficiency and mass resolution on a triple quadrupole mass spectrometer system*. Anal Chem 67 (1995) 1696-1704.
- [111] Mirzaei, H., und Carrasco, M., *Modern proteomics – sample preparation, analysis and practical applications*, Adv Exp Med Biol, Springer, 2016.
- [112] McGilvery, D.C., und Morrison, J.D., *A mass spectrometer for the study of laser-induced photodissociation of ions*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics 28 (1978) 81-92.
- [113] Yost, R.A., und Enke, C.G., *Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer*. J Am Chem Soc 100 (1978) 2274-2275.
- [114] Yost, R.A., und Enke, C.G., *Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation*. Anal Chem 51 (1979) 1251–1264.
- [115] Yost, R.A., und Boyd, R.K., *Tandem mass spectrometry: Quadrupole and hybrid instruments*. Methods Enzymol 193 (1990) 154-200.
- [116] Giles, K., Pringle, S.D., Worthington, K.R., *et al.*, *Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide*. Rapid Commun Mass Spectrom 18 (2004) 2401-14.
- [117] Morris, H.R., Langhorne, J., Berg, M., *et al.*, *High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer*. Rapid Commun Mass Spectrom 10 (1996) 889-896.

- [118] Sobott, F., Hernández, H., McCammon, M.G., *et al.*, *A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies*. *Anal Chem* 74 (2002) 1402-1407.
- [119] Meier, F., Brunner, A.D., Koch, S., *et al.*, *Online parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer*. *Mol Cell Proteomics* 17 (2018) 2534-2545.
- [120] Meier, F., Beck, S., Grassl, N., *et al.*, *Parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF): Multiplying sequencing speed and sensitivity by synchronized scans in a trapped ion mobility device*. *J Proteome Res* 14 (2015) 5378-5387.
- [121] Michelmann, K., Silveira, J.A., Ridgeway, M.E., *et al.*, *Fundamentals of trapped ion mobility spectrometry*. *J Am Soc Mass Spectrom* 26 (2015) 14-24.
- [122] McLafferty, F.W., Kornfeld, R., Haddon, W.F., *et al.*, *Metastable ion characteristics. XXIV. Application of collisional activation spectra to the elucidation of organic ion structures*. *J Am Chem Soc* 95 (1973) 3886-3892.
- [123] Levsen, K., und Schwarz, H., *Collisional activation mass spectrometry—A new probe for determining the Structure of Ions in the Gas Phase*. *Angew Chem Int Ed Engl* 15 (1976) 509-568.
- [124] Roepstorff, P., und Fohlmann, J., *Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides*. *Biomed Mass Spectrom* 11 (1984) 601.
- [125] Biemann, K., *Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure*. *Biomed Environ Mass Spectrom* 16 (1988) 99-111.
- [126] Olsen, J.V., Macek, B., Lange, O., *et al.*, *Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis*. *Nat Methods* 4 (2007) 709-712.
- [127] Syka, J.E., Coon, J.J., Schroeder, M.J., *et al.*, *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 9528-9533.
- [128] Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M., *et al.*, *Quantitative mass spectrometry in proteomics: Critical review update from 2007 to the present*. *Anal Bioanal Chem* 404 (2012) 939-965.
- [129] Washburn, M.P., Wolters, D., und Yates, J.R., *Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology*. *Nat Biotechnol* 19 (2001) 242-247.

- [130] Liu, H., Sadygov, R.G., und Yates, J.R., *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics*. Anal Chem 76 (2004) 4193-4201.
- [131] Asara, J.M., Christofk, H.R., Freemark, L.M., et al., *A label-free quantification method by MS/MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen*. Proteomics 8 (2008) 994-999.
- [132] Ong, S.E., und Mann, M., *A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)*. Nat Protoc 1 (2006) 2650-2660.
- [133] Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyer, H.E., et al., *Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research*. Proteomics 7 (2007) 340-50.
- [134] Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., et al., *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*. Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003) 6940-6945.
- [135] Chahrour, O., Cobice, D., und Malone, J., *Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics*. J Pharm Biomed Anal 113 (2015) 2-20.
- [136] Kettenbach, A.N., Rush, J., und Gerber, S.A., *Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides*. Nat Protoc 6 (2011) 175-186.
- [137] Piersimoni, L., und Sinz, A., *Cross-linking/mass spectrometry at the crossroads*. Anal Bioanal Chem 412 (2020) 5981–5987.
- [138] Faini, M., Stengel, F., und Aebersold, R., *The evolving contribution of mass spectrometry to integrative structural biology*. J Am Soc Mass Spectrom 27 (2016) 966-974.
- [139] Young, M.M., Tang, N., Hempel, J.C., 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 97 (2000) 5802-5806.
- [140] Politis, A., Stengel, F., Hall, Z., et al., *A mass spectrometry-based hybrid method for structural modeling of protein complexes*. Nat Methods 11 (2014) 403-406.
- [141] Chavez, J.D., und Bruce, J.E., *Chemical cross-linking with mass spectrometry: A tool for systems structural biology*. Curr Opin Chem Biol 48 (2019) 8-18.

- [142] Sinz, A., *Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions*. Mass Spectrom Rev 25 (2006) 663-682.
- [143] 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 57 (2018) 6390-6396.
- [144] Sinz, A., *Crosslinking mass spectrometry goes in-tissue*. Cell Syst 6 (2018) 10-12.
- [145] Liu, F., und Heck, A.J., *Interrogating the architecture of protein assemblies and protein interaction networks by cross-linking mass spectrometry*. Curr Opin Struct Biol 35 (2015) 100-108.
- [146] Chavez, J.D., Lee, C.F., Caudal, A., *et al.*, *Chemical crosslinking mass spectrometry analysis of protein conformations and supercomplexes in heart tissue*. Cell Syst 6 (2018) 136-141.e5.
- [147] Schweppe, D.K., Chavez, J.D., Lee, C.F., *et al.*, *Mitochondrial protein interactome elucidated by chemical cross-linking mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A 114 (2017) 1732-1737.
- [148] Rappsilber, J., *The beginning of a beautiful friendship: Cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes*. J Struct Biol 173 (2011) 530-540.
- [149] Rehkamp, A., und Sinz, A., *Chemische Vernetzung in Kombination mit Massenspektrometrie: Eine praktische Anleitung in die Proteinstrukturanalyse*. GIT-Labor-Fachschrift 1-2 (2020) 22-24.
- [150] Herzog, F., Kahraman, A., Boehringer, D., *et al.*, *Structural probing of a protein phosphatase 2A network by chemical cross-linking and mass spectrometry*. Science 337 (2012) 1348-1352.
- [151] Rampler, E., Stranzl, T., Orban-Nemeth, Z., *et al.*, *Comprehensive cross-linking mass spectrometry reveals parallel orientation and flexible conformations of plant HOP2-MND1*. J Proteome Res 14 (2015) 5048-5062.
- [152] Götze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., *et al.*, *StavroX-a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies*. J Am Soc Mass Spectrom 23 (2012) 76-87.



- [153] Götze, M., Pettelkau, J., Fritzsche, R., *et al.*, *Automated assignment of MS/MS cleavable cross-links in protein 3D-structure analysis*. *J Am Soc Mass Spectrom* 26 (2015) 83-97.
- [154] Piotrowski, C., und Sinz, A., *Structural investigation of proteins and protein complexes by chemical cross-linking/mass spectrometry*. in: H. Nakamura, G. Kleywegt, S.K. Burley, und J.L. Markley, (Eds.), *Integrative Structural Biology with Hybrid Methods*, *Adv Exp Med Bio*, 2018, pp. 101-121.
- [155] Merkley, E.D., Rysavy, S., Kahraman, A., *et al.*, *Distance restraints from crosslinking mass spectrometry: Mining a molecular dynamics simulation database to evaluate lysine-lysine distances*. *Protein Sci* 23 (2014) 747-59.
- [156] Hofmann, T., Fischer, A.W., Meiler, J., *et al.*, *Protein structure prediction guided by crosslinking restraints – A systematic evaluation of the impact of the crosslinking spacer length*. *Methods* 89 (2015) 79-90.
- [157] van Zundert, G.C.P., Rodrigues, J., Trellet, M., *et al.*, *The HADDOCK2.2 web server: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes*. *J Mol Biol* 428 (2016) 720-725.
- [158] Tüting, C., Iacobucci, C., Ihling, C.H., *et al.*, *Structural analysis of 70S ribosomes by cross-linking/mass spectrometry reveals conformational plasticity*. *Sci Rep* 10 (2020) 12618.
- [159] Niemeyer, M., Moreno Castillo, E., Ihling, C.H., *et al.*, *Flexibility of intrinsically disordered degrons in AUX/IAA proteins reinforces auxin co-receptor assemblies*. *Nat Commun* 11 (2020) 2277.
- [160] Alley, S.C., Ishmael, F.T., Jones, A.D., *et al.*, *Mapping Protein-Protein Interactions in the Bacteriophage T4 DNA Polymerase Holoenzyme Using a Novel Trifunctional Photo-cross-linking and Affinity Reagent*. *J Am Chem Soc* 122 (2000) 6126-6127.
- [161] Tang, X., und Bruce, J.E., *A new cross-linking strategy: Protein interaction reporter (PIR) technology for protein–protein interaction studies*. *Mol BioSyst* 6 (2010) 939–947.
- [162] Sinz, A., *Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes*. *J Mass Spectrom* 38 (2003) 1225-1237.

- [163] Müller, M.Q., Dreiocker, F., Ihling, C.H., *et al.*, *Cleavable cross-linker for protein structure analysis: Reliable identification of cross-linking products by tandem MS*. *Anal Chem* 82 (2010) 6958-6968.
- [164] Kalkhof, S., und Sinz, A., *Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters*. *Anal Bioanal Chem* 392 (2008) 305-312.
- [165] Mädler, S., Bich, C., Touboul, D., *et al.*, *Chemical cross-linking with NHS esters: A systematic study on amino acid reactivities*. *J Mass Spectrom* 44 (2009) 694-706.
- [166] Hage, C., Iacobucci, C., Rehkamp, A., *et al.*, *The first "zero-length" mass spectrometry-cleavable cross-linker for protein structure analysis*. *Angew Chem Int Ed Engl* 56 (2017) 14551-14555.
- [167] Novák, P., und Kruppa, G.H., *Intra-molecular cross-linking of acidic residues for protein structure studies*. *Eur J Mass Spectrom* 14 (2008) 355-365.
- [168] Leitner, A., Joachimiak, L.A., Unverdorben, P., *et al.*, *Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and protein complexes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (2014) 9455-9460.
- [169] Iacobucci, C., Götze, M., Piotrowski, C., *et al.*, *Carboxyl-photo-reactive MS-cleavable cross-linkers: Unveiling a hidden aspect of diazirine-based reagents*. *Anal Chem* 90 (2018) 2805-2809.
- [170] Suchanek, M., Radzikowska, A., und Thiele, C., *Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells*. *Nat Methods* 2 (2005) 261-267.
- [171] Piotrowski, C., Ihling, C.H., und Sinz, A., *Extending the cross-linking/mass spectrometry strategy: Facile incorporation of photo-activatable amino acids into the model protein calmodulin in Escherichia coli cells*. *Methods* 89 (2015) 121-127.
- [172] Häupl, B., Ihling, C.H., und Sinz, A., *Combining affinity enrichment, cross-linking with photo-amino acids, and mass spectrometry for probing protein kinase D2 interactions*. *Proteomics* 17 (2017) 1-6.
- [173] Iacobucci, C., Piotrowski, C., Rehkamp, A., *et al.*, *The first MS-cleavable, photo-thiol-reactive cross-linker for protein structural studies*. *J Am Soc Mass Spectrom* 30 (2018) 139-148.
- [174] Jackson, V., *Formaldehyde Cross-Linking for Studying Nucleosomal Dynamics*. *Methods* 17 (1999) 125-139.

- [175] Kastner, B., Fischer, N., Golas, M.M., *et al.*, *GraFix: Sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy*. *Nat Methods* 5 (2007) 53-55.
- [176] Subbotin, R.I., und Chait, B.T., *A pipeline for determining protein–protein interactions and proximities in the cellular milieu*. *Mol Cell Proteomics* 13 (2014) 2824-2835.
- [177] Schilling, B., Row, R.H., Gibson, B.W., *et al.*, *MS<sup>2</sup>Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides*. *J Am Soc Mass Spectrom Chem* 14 (2003) 834-850.
- [178] Steigenberger, B., Pieters, R.J., Heck, A.J.R., *et al.*, *PhoX: An IMAC-enrichable cross-linking reagent*. *ACS Cent Sci* 5 (2019) 1514-1522.
- [179] Arlt, C., Götze, M., Ihling, C.H., *et al.*, *Integrated workflow for structural proteomics studies based on cross-linking/mass spectrometry with an MS/MS cleavable cross-linker*. *Anal Chem* 88 (2016) 7930-7937.
- [180] Müller, D.R., Schindler, P., Towbin, H., *et al.*, *Isotope-Tagged Cross-Linking Reagents. A New Tool in Mass Spectrometric Protein Interaction Analysis*. *Anal Chem* 73 (2001) 1927-1934.
- [181] Ihling, C.H., Springorum, P., Iacobucci, C., *et al.*, *The isotope-labeled, MS-cleavable cross-linker disuccinimidyl dibutyric urea for improved cross-linking/mass spectrometry studies*. *J Am Soc Mass Spectrom* 31 (2019) 183-189.
- [182] Sinz, A., Arlt, C., Chorev, D., *et al.*, *Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology*. *Protein Sci* 24 (2015) 1193-11209.
- [183] Hernandez, H., und Robinson, C.V., *Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry*. *Nat Protoc* 2 (2007) 715-726.
- [184] Heck, A.J., *Native mass spectrometry: A bridge between interactomics and structural biology*. *Nat Methods* 5 (2008) 927-933.
- [185] Sharon, M., *How far can we go with structural mass spectrometry of protein complexes?* *J Am Soc Mass Spectrom* 21 (2010) 487-500.
- [186] Koch, K.W., *Biophysical investigation of retinal calcium sensor function*. *Biochim Biophys Acta* 1820 (2012) 1228-33.
- [187] de Mol, N.J., und Fischer, M.J.E., *Surface plasmon resonance: Methods and protocols*. *Methods Mol Biol, Springer Protocols* 627 (2010).

## Literaturverzeichnis

- [188] Kretschmann, E., *Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen*. Z Physik 241 (1971) 313-324.
- [189] Couture, M., Zhao, S.S., und Masson, J.F., *Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics*. Phys Chem Chem Phys 15 (2013) 11190-11216.
- [190] Liedberg, B., Nylander, C., und Lundstrom, I., *Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing* Sens. Actuator A Phys 4 (1983) 299-304.
- [191] Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., et al., *Universal sample preparation method for proteome analysis*. Nat Methods 6 (2009) 359-362.
- [192] Ma, F., Liu, F., Xu, W., et al., *Surfactant and chaotropic agent assisted sequential extraction/on-pellet digestion (SCAD) for enhanced proteomics*. J Proteome Res 17 (2018) 2744-2754.
- [193] Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., et al., *Circos: An information aesthetic for comparative genomics*. Genome Res 19 (2009) 1639-1645.
- [194] Petrotchenko, E.V., und Borchers, C.H., *ICC-CLASS: Isotopically-coded cleavable crosslinking analysis software suite*. BMC Bioinform 11 (2010) 1-10.
- [195] MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., et al., *Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments*. Bioinformatics 26 (2010) 966-968.
- [196] Sambrook, J., und Russell, J.D., *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- [197] Duronio, R.J., Jackson-Machelski, E., Heuckeroth, R.O., et al., *Protein N-myristoylation in Escherichia coli: Reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A 87 (1989) 1506-1510.
- [198] Schröder, T., Lilie, H., und Lange, C., *The myristoylation of guanylate cyclase-activating protein-2 causes an increase in thermodynamic stability in the presence but not in the absence of Ca<sup>2+</sup>*. Protein Sci 20 (2011) 1155-1165.
- [199] Wimberg, H., Janssen-Bienhold, U., und Koch, K.W., *Control of the nucleotide cycle in photoreceptor cell extracts by retinal degeneration protein 3*. Front Mol Neurosci 11 (2018) 52.
- [200] Rudolph, R., und Lilie, H., *In vitro folding of inclusion body proteins*. FASEB J 10 (1996) 49-59.

- [201] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 72 (1976) 248-254
- [202] Schnetkamp, P.P.M., und Daemen, F.J.M., *Isolation and characterization of osmotically sealed bovine rod outer segments*. Methods Enzymol 81 (1982) 110-116.
- [203] Koch, K.W., Lambrecht, H.G., Haberecht, M., *et al.*, *Functional coupling of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells*. EMBO J 13 (1994) 3312-3320.
- [204] Koch, K.W., und Helten, A., *Guanylate cyclase-based signaling in photoreceptors and retina*. in: S.J. Fliesler, und O.G. Kisselev, (Eds.), *Signal transduction in the retina*, CRC Press, 2008, pp. 121-143.
- [205] Pirmoradian, M., Budamgunta, H., Chingin, K., *et al.*, *Rapid and deep human proteome analysis by single-dimension shotgun proteomics*. Mol Cell Proteomics 12 (2013) 3330-3338.
- [206] Culver, B.P., Savas, J.N., Park, S.K., *et al.*, *Proteomic analysis of wild-type and mutant huntingtin-associated proteins in mouse brains identifies unique interactions and involvement in protein synthesis*. J Biol Chem 287 (2012) 21599-21614.
- [207] Adams, K.J., Pratt, B., Bose, N., *et al.*, *Skyline for small molecules: A unifying software package for quantitative metabolomics*. J Proteome Res 19 (2020) 1447-1458.
- [208] Schilling, B., Rardin, M.J., MacLean, B.X., *et al.*, *Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MSI extracted ion chromatograms in skyline: Application to protein acetylation and phosphorylation*. Mol Cell Proteomics 11 (2012) 202-214.
- [209] Götze, M., Iacobucci, C., Ihling, C.H., *et al.*, *A simple cross-linking/mass spectrometry workflow for studying system-wide protein interactions*. Anal Chem 91 (2019) 10236-10244.
- [210] Soding, J., Biegert, A., und Lupas, A.N., *The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction*. Nucleic Acids Res 33 (2005) W244-W248.
- [211] Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.Z., *et al.*, *A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core*. J Mol Biol 430 (2018) 2237-2243.

## Literaturverzeichnis

- [212] Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., *et al.*, *Comparative protein structure modeling using Modeller*. *Curr Protoc Bioinformatics* 54 (2006) 5.6.1-5.6.37.
- [213] Webb, B., und Sali, A., *Comparative protein structure modeling using MODELLER*. *Curr Protoc Bioinformatics* 54 (2017) 5.6.1–5.6.37.
- [214] Harris, P.A., Bandyopadhyay, D., Berger, S.B., *et al.*, *Discovery of small molecule RIP1 kinase inhibitors for the treatment of pathologies associated with necroptosis*. *ACS Med Chem Lett* 4 (2013) 1238-1243.
- [215] Ravala, S.K., Singh, S., Yadav, G.S., *et al.*, *Evidence that phosphorylation of threonine in the GT motif triggers activation of PknA, a eukaryotic-type serine/threonine kinase from Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J* 282 (2015) 1419-1431.
- [216] Wassenaar, T.A., van Dijk, M., Loureiro-Ferreira, N., *et al.*, *WeNMR: Structural biology on the grid*. *J Grid Comput* 10 (2012) 743-767.
- [217] Horst, B.G., Yokom, A.L., Rosenberg, D.J., *et al.*, *Allosteric activation of the nitric oxide receptor soluble guanylate cyclase mapped by cryo-electron microscopy*. *Elife* 8 (2019) e50634.
- [218] Antonova, S.V., Haffke, M., Corradini, E., *et al.*, *Chaperonin CCT checkpoint function in basal transcription factor TFIID assembly*. *Nat Struct Mol Biol* 25 (2018) 1119-1127.
- [219] Kastritis, P.L., und Bonvin, A.M.J.J., *Are scoring functions in protein-protein docking ready to predict interactomes? Clues from a novel binding affinity benchmark*. *J Proteome Res* 9 (2010) 2216–2225.
- [220] Kastritis, P.L., Rodrigues, J.P., Folkers, G.E., *et al.*, *Proteins feel more than they see: Fine-tuning of binding affinity by properties of the non-interacting surface*. *J Mol Biol* 426 (2014) 2632-2652.
- [221] Ames, J.B., Dizhoor, A.M., Ikura, M., *et al.*, *Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases*. *J Biol Chem* 274 (1999) 19329-37.
- [222] Pettelkau, J., Thondorf, I., Theisgen, S., *et al.*, *Structural analysis of guanylyl cyclase-activating protein-2 (GCAP-2) homodimer by stable isotope-labeling, chemical cross-linking, and mass spectrometry*. *J Am Soc Mass Spectrom* 24 (2013) 1969-1979.
- [223] Winger, J.A., Derbyshire, E.R., Lamers, M.H., *et al.*, *The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase*. *BMC Struct Biol* 8 (2008) 42.

- [224] Tucker, C.L., Hurley, J.H., Miller, T.R., *et al.*, *Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 5993-5997.
- [225] Ravichandran, S., Duda, T., Pertzov, A., *et al.*, *Membrane guanylate cyclase catalytic subdomain: Structure and linkage with calcium sensors and bicarbonate*. Front Mol Neurosci 10 (2017) 173.
- [226] Rehkamp, A., Tänzler, D., Iacobucci, C., *et al.*, *Molecular details of retinal guanylyl cyclase I/GCAP-2 interaction*. Front Mol Neurosci 11 (2018) 330.
- [227] Liu, Y., Ruoho, A.E., Rao, V.D., *et al.*, *Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: Modeling and mutational analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997) 13414-13419.
- [228] Park, E., Rawson, S., Li, K., *et al.*, *Architecture of autoinhibited and active BRAF–MEK1–14-3-3 complexes*. Nature 575 (2019) 545-550.
- [229] Wagner, T., Alexandre, M., Duran, R., *et al.*, *The crystal structure of the catalytic domain of the ser/thr kinase PknA from M. tuberculosis shows an Src-like autoinhibited conformation*. Proteins 83 (2015) 982-988.
- [230] Lorenz, S., Deng, P., Hantschel, O., *et al.*, *Crystal structure of an SH2-kinase construct of c-Abl and effect of the SH2 domain on kinase activity*. Biochem J 468 (2015) 283–291.
- [231] Wang, J., Hu, M., Wang, J., *et al.*, *Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity*. Science 364 (2019) 44.
- [232] Karaca, E., Melquiond, A.S., de Vries, S.J., *et al.*, *Building macromolecular assemblies by information-driven docking: Introducing the HADDOCK multibody docking server*. Mol Cell Proteomics 9 (2010) 1784-94.
- [233] Spitzer, M., Wildenhain, J., Rappsilber, J., *et al.*, *BoxPlotR: A web tool for generation of box plots*. Nat Methods 11 (2014) 121-122.
- [234] Rehkamp, A., Tänzler, D., Tüting, C., *et al.*, *First 3D-structural data of full-length guanylyl cyclase I in rod-outer-segment preparation of bovine retina by cross-linking/mass spectrometry*. J Mol Biol Revision (2021).
- [235] Aparicio, J.G., und Applebury, M.L., *The bovine photoreceptor outer segment guanylate cyclase: Purification, kinetic properties, and molecular size*. Protein Expr Purif 6 (1995) 501-511.

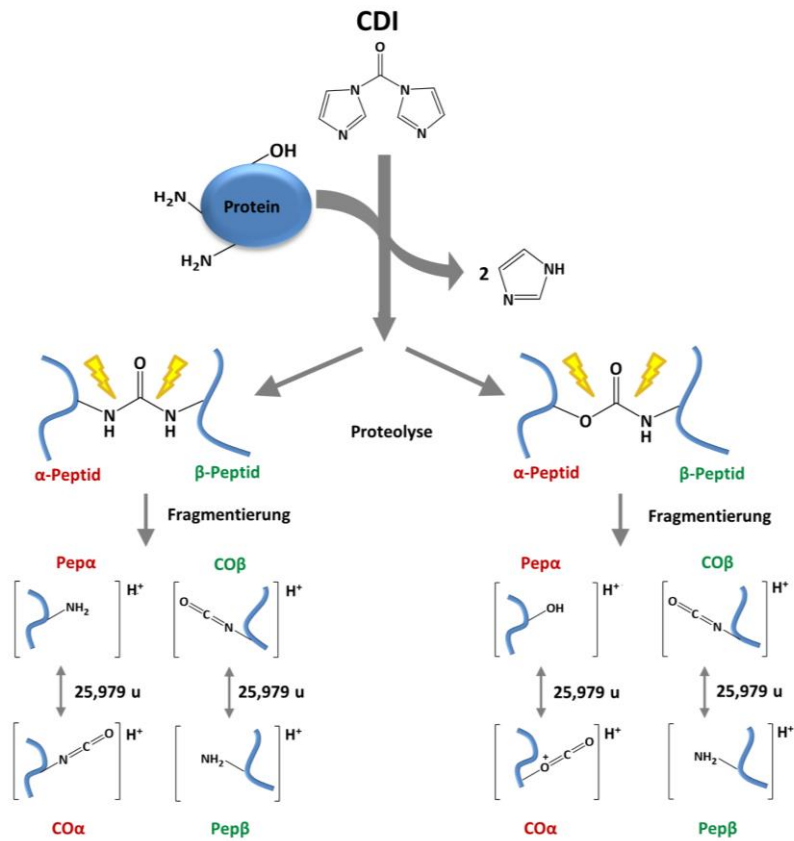
## Literaturverzeichnis

- [236] Kaplan, R.S., und Pedersen, P.L., *Determination of microgram quantities of protein in the presence of miligram levels of lipid with amido black 10B*. Anal Biochem 150 (1985) 97-104.
- [237] Dell’Orco, D., und Dal Cortivo, G., *Normal GCAPs partly compensate for altered cGMP signaling in retinal dystrophies associated with mutations in GUCA1A*. Sci Rep 9 (2019) 20105.
- [238] Zhang, X., Feng, Q., und Cote, R.H., *Efficacy and selectivity of phosphodiesterase-targeted drugs to inhibit photoreceptor phosphodiesterase (PDE6) in retinal photoreceptors*. Invest Ophthalmol Vis Sci 46 (2005) 3060–3066.
- [239] Duda, T., Venkataraman, V., Jankowska, A., *et al.*, *Impairment of the rod outer segment membrane guanylate cyclase dimerization in a cone-rod dystrophy results in defective calcium signaling*. Biochemistry 39 (2000) 12522-12533.
- [240] Fürsch, J., Kammer, K.M., Kreft, S.G., *et al.*, *Proteome-wide structural probing of low-abundant protein interactions by cross-linking mass spectrometry*. Anal Chem 92 (2020) 4016-4022.
- [241] Rehkamp, A., *Studium der Interaktion zwischen der retinalen Guanylatcyclase und GCAP-2*, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2016.



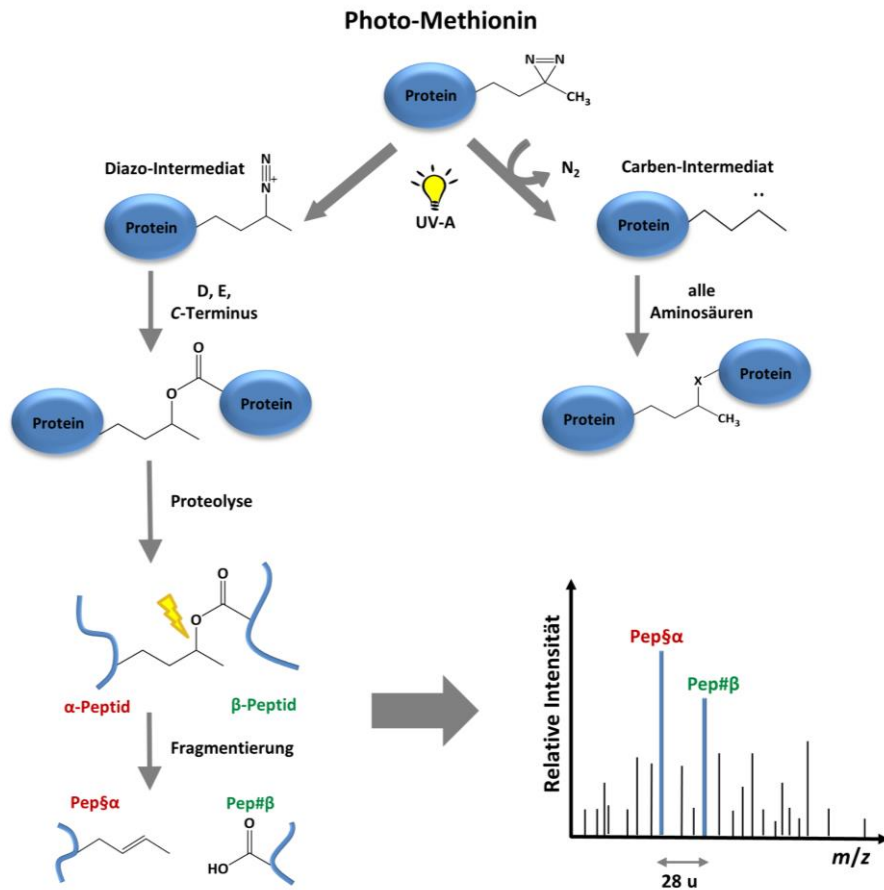
## Literaturverzeichnis

## Anhang



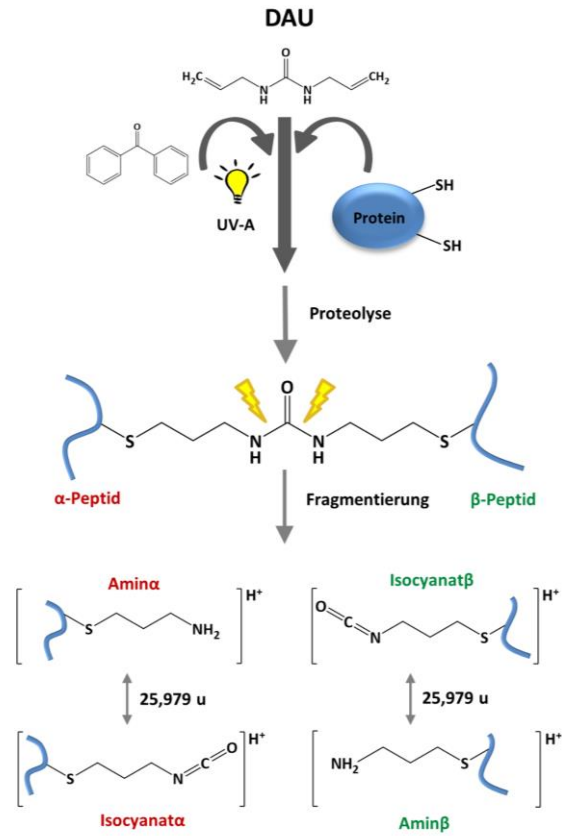
**Abbildung A 1: Reaktivität und Fragmentierungsverhalten des spaltbaren Vernetzungsreagens CDI.** CDI: 1,1'-Carbonyldiimidazol. CDI reagiert mit Amin- bzw. Hydroxygruppen. Die NH-CO- bzw. O-CO-Bindung der CDI-Vernetzung sind spaltbar. CO: Fragmention, das den CDI-Linker umfasst. Pep: nicht-modifiziertes Peptid, das über CDI verknüpft wurde. Die Abbildung wurde nach [166] modifiziert.

## Anhang



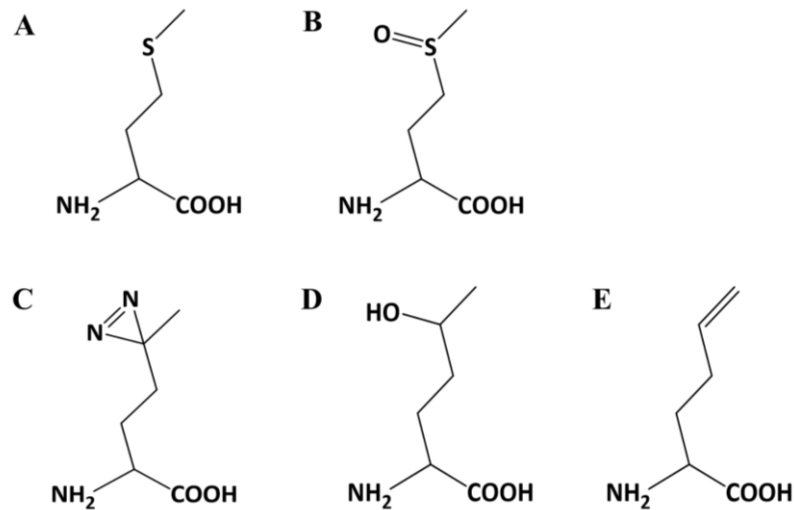
**Abbildung A 2: Reaktionsmechanismus und Fragmentierungsverhalten des Vernetzungsreagenz Photo-Methionin..** Nach der UV-A-Aktivierung kann Photo-Methionin über das Carben-Intermediat eine Vernetzung zu allen Aminosäuren ausbilden. Bei der Reaktion über das Diazo-Intermediat mit sauren Aminosäuren entsteht eine Esterbindung, die in zwei Fragmentationen spaltbar ist. *Pep§*: Peptid mit dem reagierten Photo-Methionin. *Pep#*: Peptid, das die bei der Vernetzung beteiligte saure Aminosäure aufweist. Die Abbildung wurde nach [169] modifiziert.

## Anhang



*Abbildung A 3: Reaktivität und Fragmentierungsverhalten des spaltbaren Vernetzungsreagenz DAU. DAU: Diallylurea. DAU reagiert mit Sulfhydrylgruppen. Die Harnstoffgruppe von DAU ist spaltbar, sodass die als Amin und Isocyanat bezeichneten Fragmentionen für Peptid  $\alpha$  und  $\beta$  entstehen können. Die Abbildung wurde nach [173] modifiziert.*

## Anhang



**Abbildung A 4: Identifizierte Produkte von Methionin und Photo-Methionin.** Angegeben sind die Strukturformel sowie die bei der Proteinidentifizierung im Proteome Discoverer verwendeten Abkürzungen der modifizierten Spezies. **A)** Methionin, **B)** oxidiertes Methionin, Sulfoxid (O), **C)** Photo-Methionin (N), **D)** hydrolysiertes Photo-Methionin (M), **E)** Photo-Methionin mit N<sub>2</sub>-Verlust (P).

### A

#### GCAP-2

10	20	30	40	50
#GQQFSWEEA	EENGAVGAAD	AAQLQEWYKK	FLEECPSGTL	FMHEFKRFFK
60	70	80	90	100
VPDNEEATQY	VEAMFRAFDT	NGDNTIDFLE	YVAALNLVLR	GTLEHKLKW
110	120	130	140	150
FKIYDKDRNG	CIDRQELLDI	VESIYKLLKA	CSVEVEAEQQ	GKLLTPEEVV
160	170	180	190	200
DRIFLLVDEN	GDGQLSLNEF	VEGARRDKWV	MKMLQMDLNP	SSWISQRRK

#### SAMF

# - N-terminale Myristoylierung

M<sub>av</sub>: 23.807,3 Da    M<sub>mono</sub>: 23.791,8664 Da    ε<sub>280nm</sub> = 34950 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

### B

#### (His)<sub>6</sub>-GCAP-2

10	20	30	40	50
HHHHHSSGL	VPRGSHMGQQ	FSWEEAEENG	AVGAADAAQL	QEWYKKFLEE
60	70	80	90	100
CPSGTLFMHE	FKRFFKVPDN	EEATQYVEAM	FRAFDNTNGDN	TIDFLEYVAA
110	120	130	140	150
LNLVLRGTLE	HKLKWTFKIY	DKDRNGCIDR	QELLDIVESI	YKLLKACSV
160	170	180	190	200
VEAEQQGKLL	TPEEVVDRIF	LLVDENGDGQ	LSLNEFVEGA	RRDKWVMKML
210	220			
QMDLNPSSWI	SQQRKSAMF			

\_ - Tag    M<sub>av</sub>: 23.528,4 Da    M<sub>mono</sub>: 23.512,5664 Da    ε<sub>280nm</sub> = 34950 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

### C

#### ROS-GC1-Peptid 1

10	20
YRIHVNRSTV	QILSALN

M<sub>av</sub> = 1984,3 Da  
ε<sub>280nm</sub> = 1490 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

#### ROS-GC1-Peptid 2

10	20
MPRYCLFGDT	VNTASRMEST
30	40
GLPYRIHVNR	STVQILSALN

M<sub>av</sub> = 4513,2 Da  
ε<sub>280nm</sub> = 2980 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

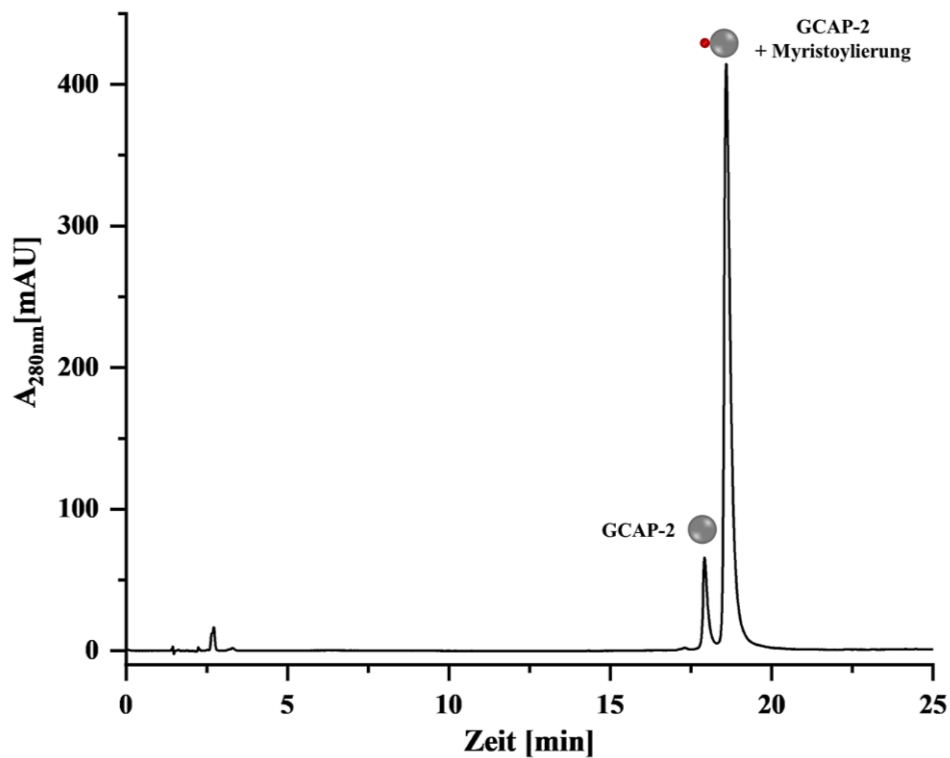
#### ROS-GC1-Peptid 3

10	20
LYEGDVVWLK	KFPGDRHIAI

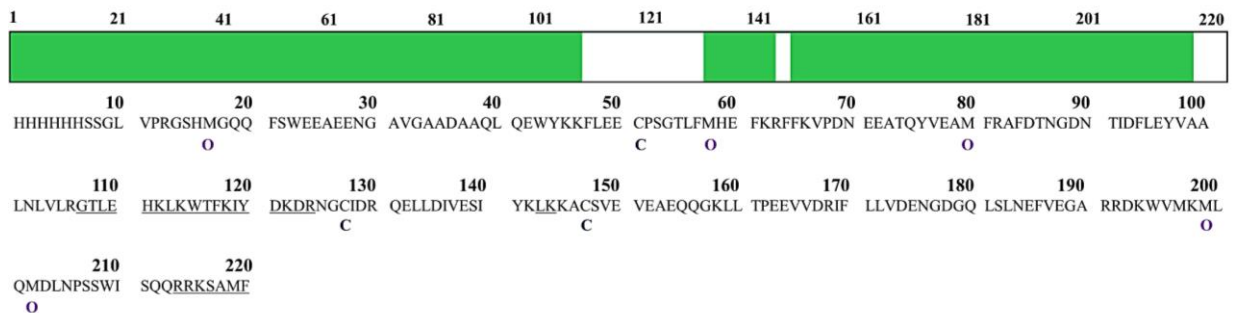
M<sub>av</sub> = 2443,8 Da  
ε<sub>280nm</sub> = 12490 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

**Abbildung A 5: Aminosäuresequenzen der GCAP-2-Varianten und ROS-GC1-Peptide.** Angegeben sind die molekulare Masse und die Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (reduzierte Cysteine). **A)** GCAP-2 mit N-terminaler Myristoylierung, **B)** GCAP-2 mit N-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag. **C)** ROS-GC1-Peptide 1, 2 und 3.

## Anhang

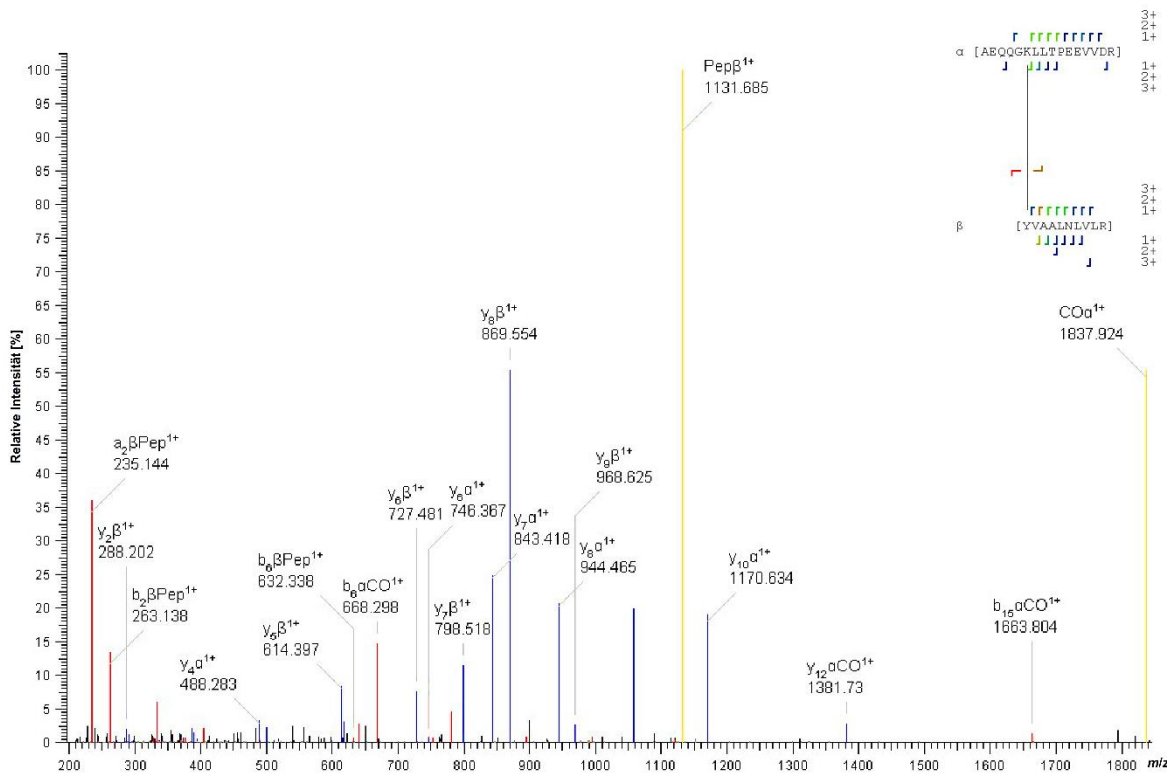


**Abbildung A 6: Trennung der nicht-myristoylierten/myristoylierten GCAP-2-Variante.** GCAP-2 ist als graue Kugel im C18-Umkehrphasen-Chromatogramm dargestellt, die myristoylierte Variante ist zusätzlich mit einer roten Kugel markiert. GCAP-2 ohne Myristoylierung eluiert bei einer Retentionszeit von ~18 min und mit Myristoylierung bei ~19 min. Die Peakfläche der nicht-myristoylierten GCAP-2-Variante beträgt ca. 10 % der Gesamtpeakfläche.



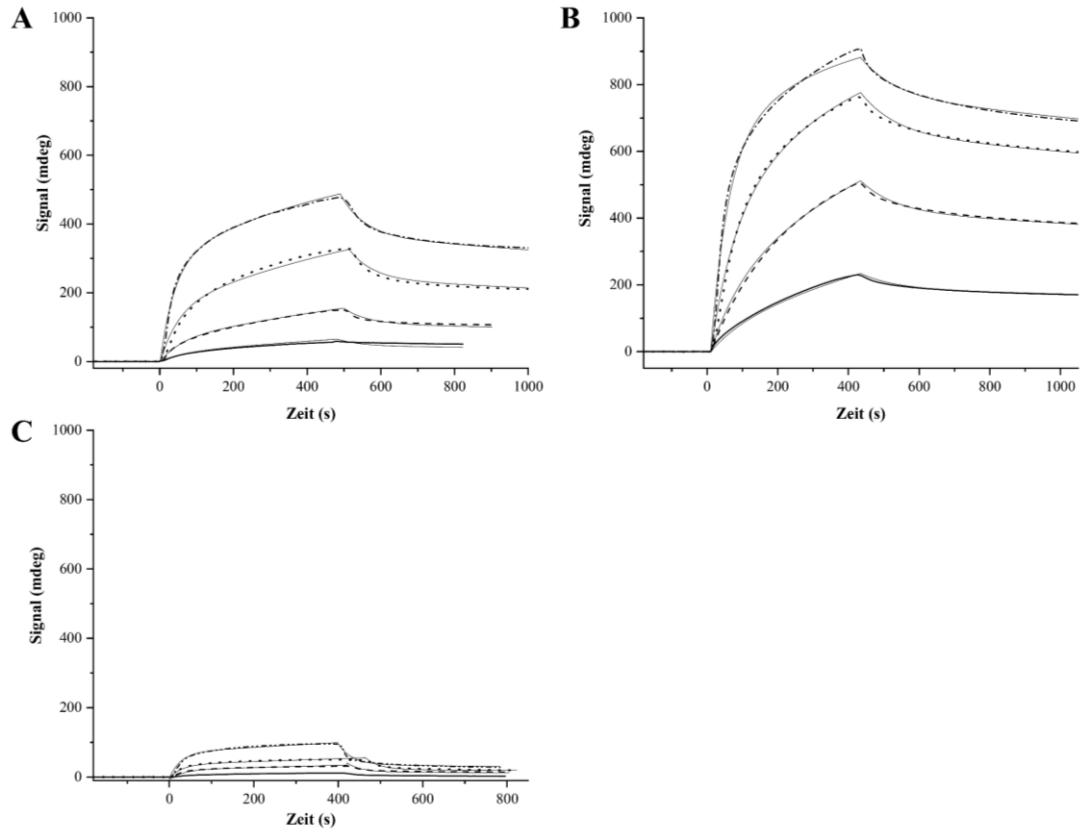
**Abbildung A 7: Identifizierung des gereinigten GCAP-2 mit N-terminalen His-Tag.** Mit der Peptidmassen-Fingerprint-Analyse wurden die grün markierte Sequenzabschnitten nach Proteolyse mit Trypsin bestätigt. Es konnte eine Sequenzabdeckung von 88 % erzielt werden. Unterstrichene Aminosäuresequenzen konnten nicht identifiziert werden. C: Carbamidomethylierung des Cysteins. O: Oxidation von Methioninen.

## Anhang

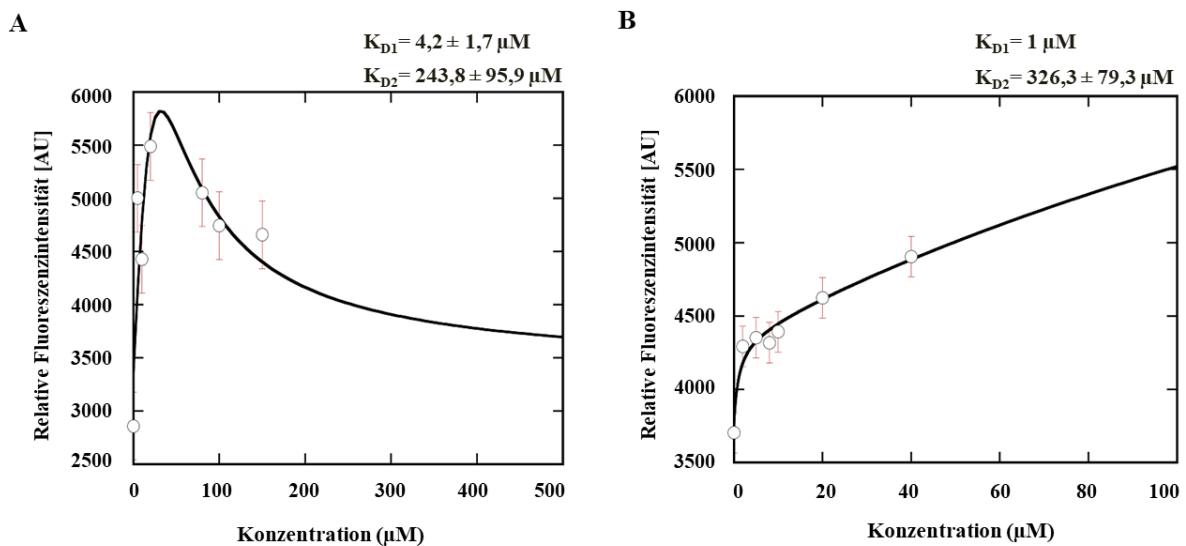


**Abbildung A 8: Fragmentationsspektrum eines CDI-Vernetzungsproduktes in GCAP-2.** Vernetzung des Peptides  $\alpha$   $_{137}$ [AEQQGKLLTPEEVVDR] $_{152}$  und des Peptides  $\beta$   $_{81}$ [YVAALNLVLR] $_{90}$ , Signal bei  $m/z$  990,207, Ladungszustand 3+. Die Annotierung erfolgte mit MeroX. Im Massenspektrum sind a- und b-Ionen rot markiert, y-Ionen blau und Fragmentionen der Vernetzung sind gelb dargestellt. Mit CO ist das Fragmention des CDI-Linkers bezeichnet. Das Peptid ohne Modifikation ist als Pep bezeichnet (siehe Abbildung A 1). Bei den vernetzten Peptiden sind a- und b-Ionen mit  $\downarrow$ , y-Ionen mit  $\uparrow$  und Fragmentionen des Vernetzungsreagens mit  $\dashv$   $\dashv$  markiert. Bei den Aminosäuresequenzen korreliert der Farbverlauf der Markierungen von blau nach rot mit der zunehmenden Signalintensität der Fragmentionen im Massenspektrum.

## Anhang



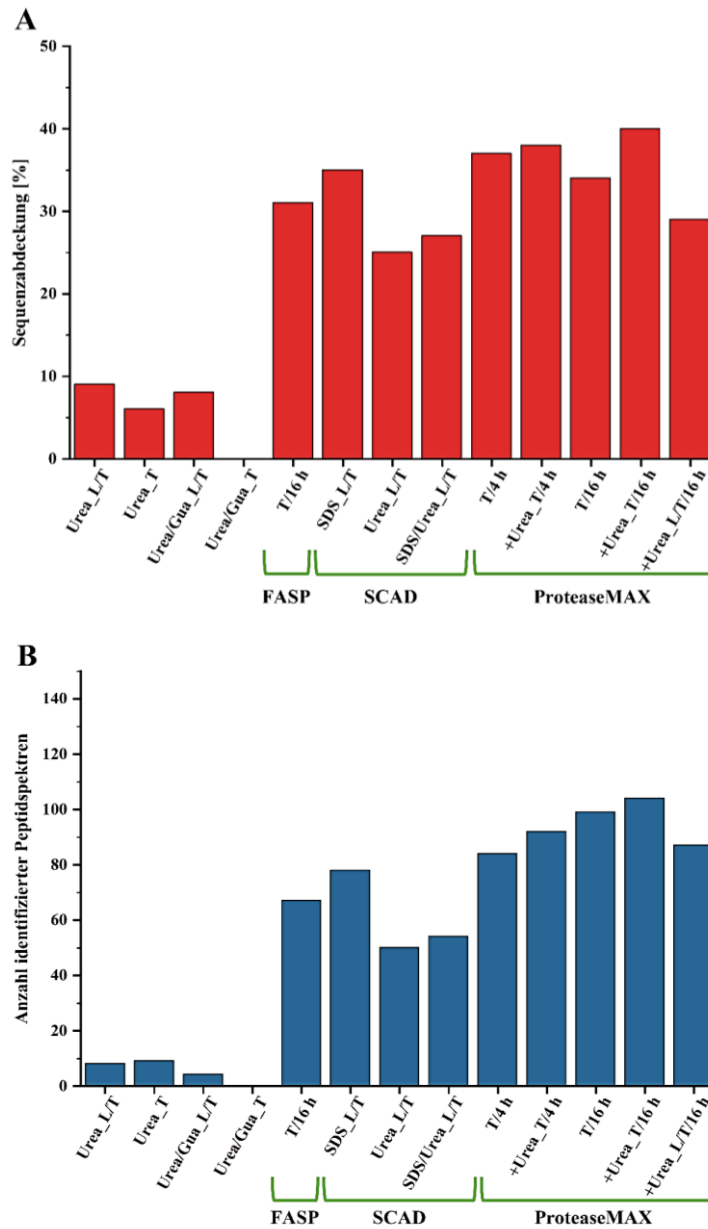
**Abbildung A 9: Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie zwischen GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden.** A) ROS-GC1-Peptid 1, B) ROS-GC1-Peptid 2 und C) ROS-GC1-Peptid 3. Es wurden 5, 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  Peptidkonzentrationen verwendet. Die Ausgleichskurven sind als durchgezogene Linien dargestellt. Der  $K_D$ -Wert für Peptide 1 betrug  $3,6 \pm 2,8 \mu\text{M}$ , für Peptid 2  $987 \pm 278 \text{ nM}$  und für Peptid 3 war dieser nicht bestimmbar. Die Abbildung wurde aus [226] modifiziert dargestellt.



**Abbildung A 10: Fluoreszenzspektroskopie-Messungen mit GCAP-2 und ROS-GC1-Peptiden.** A) ROS-GC1-Peptid 1 und B) ROS-GC1-Peptid 2. Zur Bestimmung der Affinität wurde GCAP-2 mit steigenden Konzentrationen von Peptid 1 und 2 titriert und die Fluoreszenzemission bei 350 nm bestimmt.

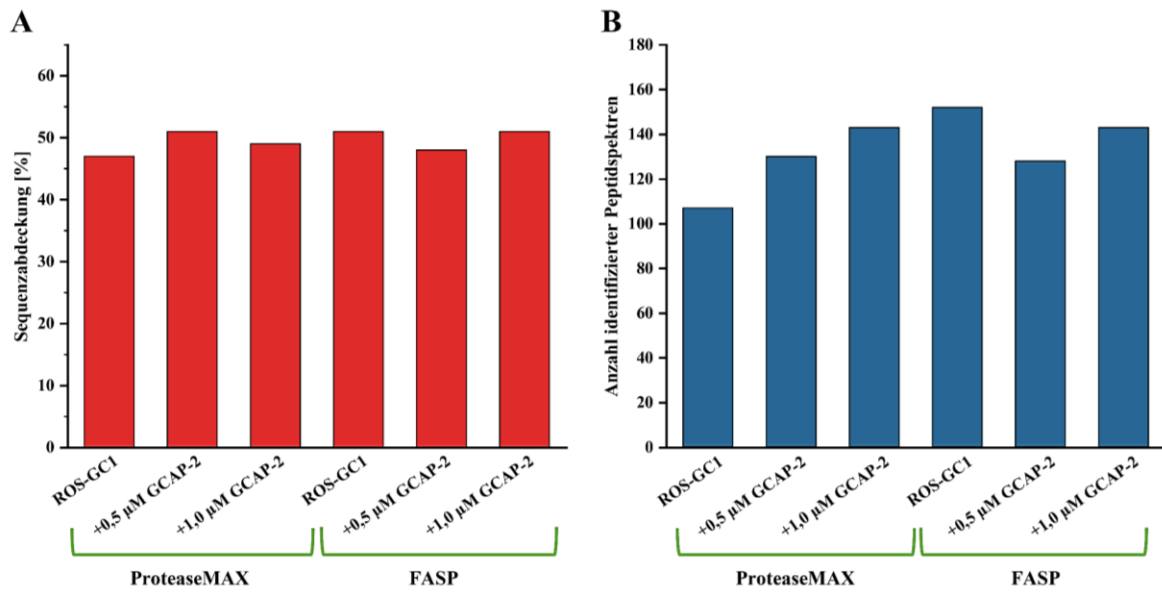


## Anhang

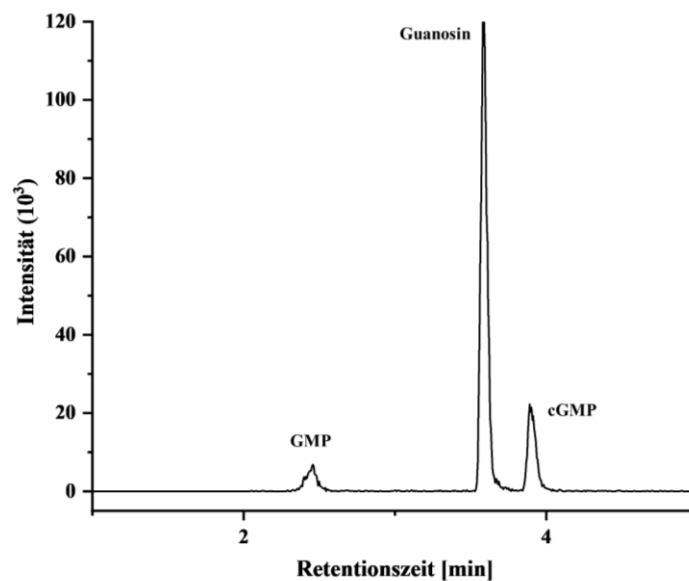


**Abbildung A 11: Optimierung der Proteolyse von ROS-GC1 in Lösung aus dem HEK 293-Zelllysät.** A) Graphische Darstellung der Sequenzabdeckung (%) von ROS-GC1 in Rot und B) Anzahl der identifizierten Peptidspektren (peptide spectrum matches, PSMs) von ROS-GC1 in Blau für die einzelnen Proteolyse-Ansätze. Das FASP-, SCAD- oder ProteaseMAX-Tensid-Protokoll ist in 4.3.13.1 beschrieben. Urea: Harnstoff, Gua: Guanidiniumchlorid. L/T: Die Proteolyse erfolgte mit LysC und Trypsin und T: ausschließlich mit Trypsin für eine Inkubationszeit von 4 oder 16 h.

## Anhang

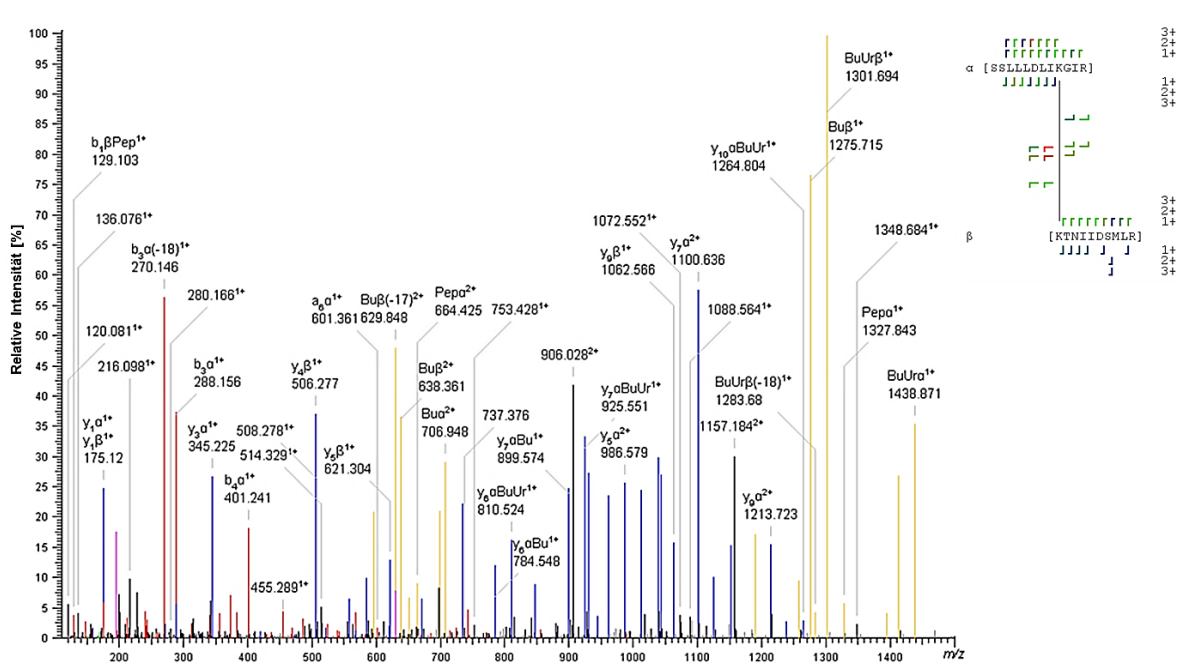


**Abbildung A 12: Identifizierung von ROS-GC1 aus dem HEK 293-Zelllysate nach der DSBU-Vernetzung.** A) Graphische Darstellung der Sequenzabdeckung (%) von ROS-GC1 in Rot und B) Anzahl der identifizierten Peptidspektren (peptide spectrum matches, PSMs) von ROS-GC1 in Blau für die einzelnen Proteolyse-Ansätze. Das ProteaseMAX-Tensid (Inkubationszeit: 4 h) und FASP-Protokoll sind in 4.3.13.1 beschrieben.



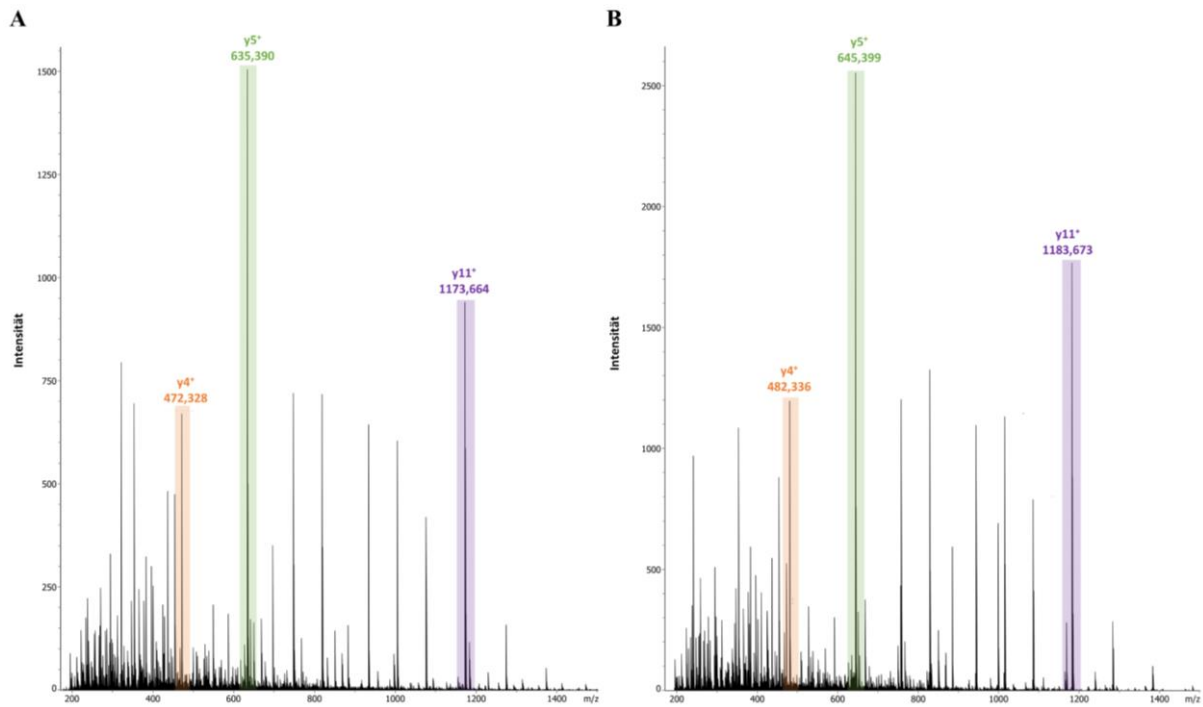
**Abbildung A 13: MRM-Analyse der Nukleotide/-side GMP, cGMP und Guanosin.** Bei der MRM-Analyse am Triple-Quadrupol-Massenspektrometer wurden die Vorläuferionen von GMP ( $m/z$  364,0), cGMP ( $m/z$  346,0) und Guanosin ( $m/z$  284,0) ausgewählt und der Übergang zum spezifischen Fragmention, der Base Guanin bei  $m/z$  152,0, analysiert. Als Beispiel ist das Elutionsprofil für die Nukleotide/-side mit einer Konzentration von 20  $\mu$ M abgebildet. Zur Erstellung der Kalibrierkurven wurden jeweils die Peakfläche der Signalintensitäten von GMP, cGMP und Guanosin gegen die Konzentration der Nukleotide/-side aufgetragen (siehe Abbildung 32).

## Anhang



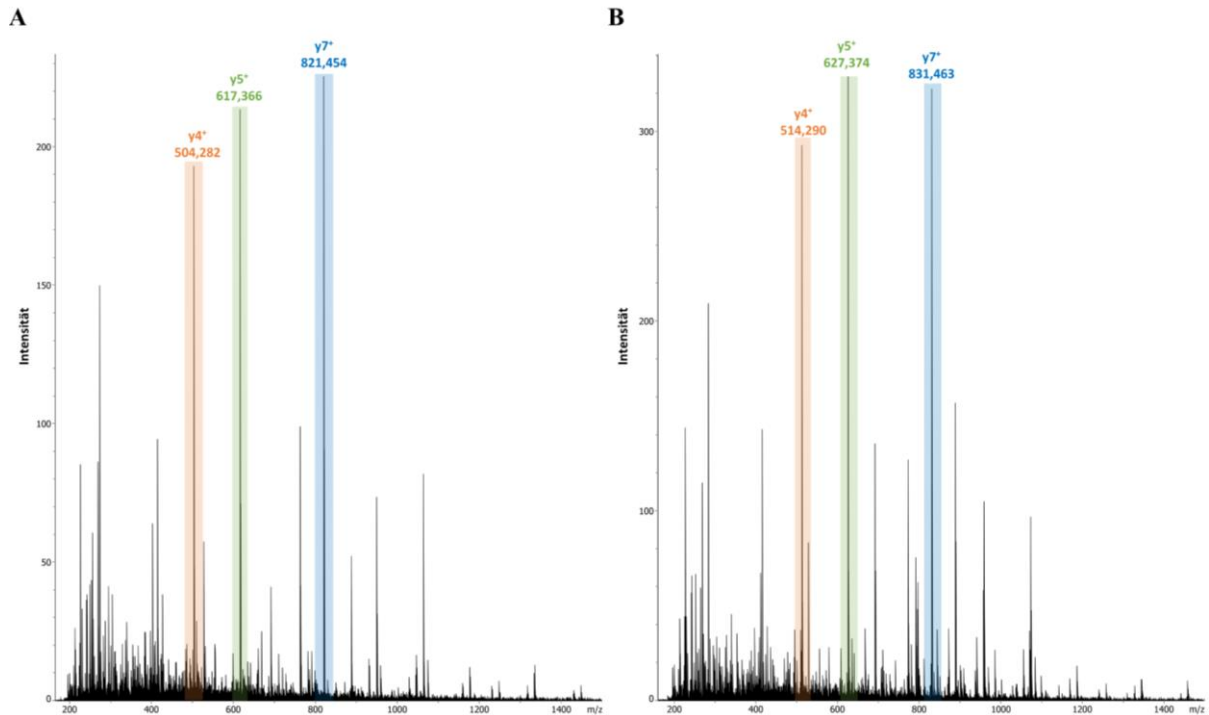
**Abbildung A 14: Fragmentationsspektrum eines DSBU-Vernetzungsproduktes in der humanen ROS-GCI.** Vernetzung des Peptides  $\alpha$   $_{644}$ [SSLLLDLIKGR] $_{655}$  und des Peptides  $\beta$   $_{813}$ [KTNIIDSMLR] $_{822}$  bei  $m/z$  905,196, Ladungszustand 3+. Die Annotierung erfolgte mit MeroX. Im Massenspektrum sind a- und b-Ionen rot markiert, y-Ionen blau und Fragmentionen der Vernetzung (Bu/BuUr/Pep) gelb dargestellt. Bei den vernetzten Peptiden sind a- und b-Ionen mit  $\perp$ , y-Ionen mit  $\lceil$  und Fragmentionen des Vernetzungsreagenz mit  $\lfloor$   $\lrcorner$  markiert. Bei den Aminosäuresequenzen korreliert der Farbverlauf bei den Markierungen von blau nach rot mit der zunehmenden Signalintensität der Fragmentionen im Massenspektrum.

## Anhang

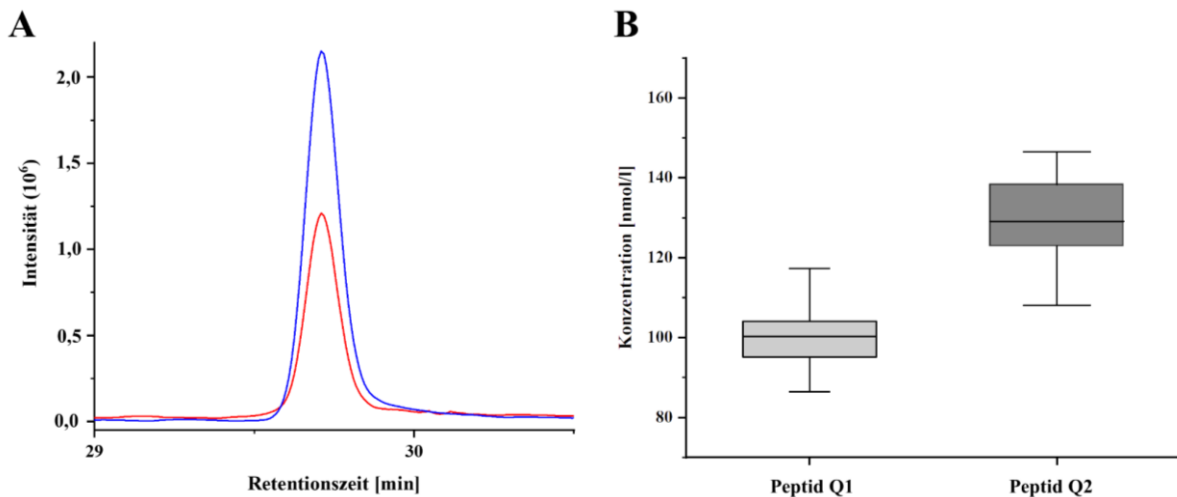


**Abbildung A 15: Fragmentationenspektren des nicht-markierten und markierten ROS-GC1-Peptides Q1.** A) Nicht-markierte ROS-GC1-Peptidvariante Q1 bei  $m/z$  681,381 und B) isotope-markierte ROS-GC1-Peptidvariante Q1 bei  $m/z$  684,717 wurden am timsTOF-Pro-Massenspektrometer fragmentiert. Für die pseudo-MRM-Analyse wurde die Übergänge des Vorläuferions zu den Fragmentionen  $y^{4+}$  (orange),  $y^{5+}$  (grün) und  $y^{11+}$  (violett) ausgewählt und die Signalintensitäten addiert. Die Peakflächen der summierten Signalintensitäten der nicht-markierten Peptidvariante in A und der markierten in B wurden ins Verhältnis zur Quantifizierung der bovinen ROS-GC1 in der ROS-Präparation gesetzt (siehe Abbildung 38).

## Anhang



**Abbildung A 16: Fragmentationenspektren des nicht-markierten und markierten ROS-GC1-Peptides Q2.** A) Nicht-markierte ROS-GC1-Peptidvariante Q2 bei  $m/z$  659,693 und B) isotonenmarkierte ROS-GC1-Peptidvariante Q2 bei  $m/z$  663,029 wurden am timsTOF-Pro-Massenspektrometer fragmentiert. Für die pseudo-MRM-Analyse wurde die Übergänge des Vorläuferions zu den Fragmentionen  $y^{4+}$  (orange),  $y^{5+}$  (grün) und  $y^{7+}$  (blau) ausgewählt und die Signalintensitäten addiert. Die Peakflächen der summierten Signalintensitäten der nicht-markierten Peptidvariante in A und der markierten in B wurden ins Verhältnis gesetzt zur Quantifizierung der bovinen ROS-GC1 in der ROS-Präparation.



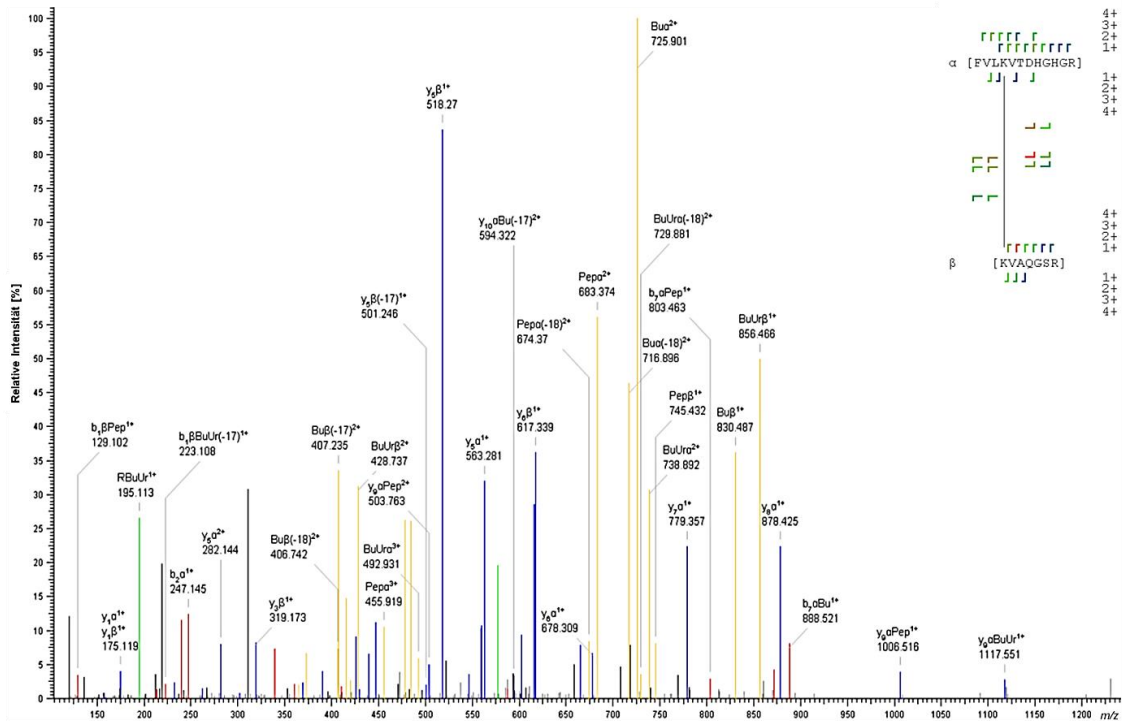
**Abbildung A 17: Quantifizierung von ROS-GC1 in der ROS-Präparation.** A) Zur Konzentrationsberechnung wurde das Verhältnis der Peakflächen zwischen dem nicht-markierten ROS-GC1-Peptid Q1 oder Q2 (rot) und der isotonenmarkierten Peptidvariante (blau) anhand des extrahierten Ionenchromatogramms auf MS-Ebene bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten und die Datenanalyse mit der Software Skyline. B) Für Peptid Q1  ${}_{162}\text{AAGTTPVVTPAADALYALLR}_{182}$  wurde eine Konzentration von  $101 \pm 10$  nmol/l und für Peptid Q2  ${}_{102}\text{STVQILSALNEGFLTEVR}_{1045}$  von  $129 \pm 10$  nmol/l bestimmt.

## Anhang

ROS-GC1_human	MTACARRAGGLPDPGLCGPAWAPSLPRLPRALPRL----PLLLLLLLLQPPALSAVFT	55
ROS-GC1_bovin	MTACTFLAGGLRDPGLCGPTRWAPSPPLPPIPRPRLRLPPLLLLLLPRSVLSAVFT	60
	****: **** *****: **** * ** * * ***** .*****	
ROS-GC1_human	VGVLGPWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNDRPGLAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVS	115
ROS-GC1_bovin	VGVLGPWACDPIFARARPDLAARLAASRLNHAALLEGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVS	120
	*****:*****:***: . * *****	
ROS-GC1_human	SALARVSGLVGPVNPAAACRPAELLAEEAGIALVPWGPCWPTQAEGTTAPAVTPAADALYAL	175
ROS-GC1_bovin	SALTRVSGLVGPVNPAAACRPAELLAQEAGVALVPWGPCGTRAAGTTAPVVTTPAADALYAL	180
	***:*****:*****:***:***** * * ***** .*****	
ROS-GC1_human	LRAFGWARVALVTAPQDLWVEAGRSLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRD	235
ROS-GC1_bovin	LRAFRWAHVALVTAPQDLWVEAGHALSTALRARGLPVALVTSMEPSDLSGAREALRRVQD	240
	**** * *:*****:***** ***** *****:*	
ROS-GC1_human	GPRVTAVIMMHSVLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTHIHALSPGPEALAAL	295
ROS-GC1_bovin	GPRVRAVIMMHSVLLGGEEQRCLLEAAEELGLADGSLVFLPFDTHIHALSPGPDALAVL	300
	**** ***** *****:*****:*****:*****:*** *	
ROS-GC1_human	ANSSQLRRAHDAVLTLRHCPSEGSVLDLRRAQERRELPDLNLQQVSPFLGTIYDAVF	355
ROS-GC1_bovin	ANSSQLRKAHDAVLTLRHCPGGSVRDSLRRAQEHRELPLDLNLQQVSPFLGTIYDSVF	360
	*****:***** ** *****:**** *****:***	
ROS-GC1_human	LLARGVAEAAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGDLGGDEEPPFVLLDTDAAGDRFL	415
ROS-GC1_bovin	LLAGGVARARVAAGGWVSGAAVARHIRDARVPGFCGALGGAEPSFVLLDTDATGDQLF	420
	** ** * * * * * *****:***** ** * * *****:***	
ROS-GC1_human	ATYMLDPARGFSLSAGTRMHFPRGGSAPGDPSCWFDPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVVG	475
ROS-GC1_bovin	ATYVLDPTQGFHFSAGTPVHFPGGGRGPGDPSCWFDPTICNGGVEPSVVFIFGLLVVG	480
	***:***: * * * * * :***: * * .*****: . * * * * * : * * * * * *	
ROS-GC1_human	MGLAGAFLAHYVRHRLHMQMVSVPNKIILTVDDITFLHPHGGTSRKVAQGSRSSLGARS	535
ROS-GC1_bovin	MGLAGAFLAHYCRHRLHMQMVSVPNKIILTVDDITFLHPHGGNSRKVAQGSRTSLAARS	540
	***** *****:*****:***** *****: * * *	
ROS-GC1_human	MSDIRSGPSQHLDSPNIGVYEGDRVWLKFFPGDQHIAIRPATKTAFSKQLQELRHENVALY	595
ROS-GC1_bovin	ISDVRSIHSQLPDYTNIGLYEGDWVWLKFFPGDRHIAIRPATKMAFSKIRELRHENVALY	600
	:*.* *	
ROS-GC1_human	LGLFLARGAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGSQDLQAQREIKLDWMFKSSLLDLIKGIR	655
ROS-GC1_bovin	LGLFLAGGAGPAAPGEGVLAVVSEHCARGSLQDLQAQRIKLDWMFKSSLLDLTKGIR	660
	***** *	
ROS-GC1_human	YLHHRGVAHGRLKSARNICVDGRFVLIKVDHGHGRLLAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLR	715
ROS-GC1_bovin	YLHHRGVAHGRLKSARNICVDGRFVLIKVDHGHGRLLAQKVLPEPPSAEDQLWTAPELLR	720
	*****:*****:*****:***** ***** *****	
ROS-GC1_human	DPALERRGTLAGDVFSLAIIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQVRVSPPLCRPLVSMQD	775
ROS-GC1_bovin	DPVLERRGTLAGDVFSLGIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQVRVSPPLCRPSVSIQD	780
	* *	
ROS-GC1_human	APVECILLMKQCWAEQPELRPSMDHTFDLFKNINKGRKTNIIIDSLRMLQYSSNLEDLI	835
ROS-GC1_bovin	APMECIQMKQCWAEQPELRPSMDRTFELFKSINKGRKMNIIDSLRMLQYSSNLEDLI	840
	* *	
ROS-GC1_human	RERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLVYSDIVGFTTISAM	895
ROS-GC1_bovin	RERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKMGTGTPVEPEYFEVTLVYSDIVGFTTISAM	900
	*****:*****:***** ***** *****	
ROS-GC1_human	SEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDVYKVTIGDAYMVASGLPQRNGRHAAEIANMSLD	955
ROS-GC1_bovin	SEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDVYKVTIGDAYMVASGLPQRNGRHAAEIANMALD	960
	*****:*****:***** ***** *****	
ROS-GC1_human	ILSAVGTFRMRHMEVVPVIRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLP	1015
ROS-GC1_bovin	ILSAVGTFRMRHMEVVPVIRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASAMESTGLP	1020
	*****:*****:***** ***** *****	
ROS-GC1_human	YRIHVNLSTVIGILRALDSGYQVELRGRTELKKGAEEDTFWLVGRRGFNKPICKPPDLQPG	1075
ROS-GC1_bovin	YRIHVNRSTVQILSALNEGFLTEVRGRTELKKGAEETYWLVGRRGFNKPICKPPDLQPG	1080
	***** *	
ROS-GC1_human	SSNHGISLQEIIPERRRLEKARPGQFS--	1103
ROS-GC1_bovin	ASNHGISLHEIPDRRQLEKARPGQFSGK	1110
	:*****:***:***:*****	

**Abbildung A 18: Sequenzvergleich der humanen und bovinen ROS-GC1-Varianten.** Darstellung der Aminosäuresequenzen vom N- zum C-Terminus. Humane ROS-GC1: 1103 AS, 120,06 kDa und bovine ROS-GC1: 1110 AS, 120,37 kDa. Stern: gleiche Aminosäuren in beiden ROS-GC1-Varianten, Doppelpunkt: sehr ähnliche Aminosäuren, Punkt: ähnliche Aminosäuren.

# Anhang



**Abbildung A 19: Fragmentationsspektrum eines DSBU-Vernetzungsproduktes in der bovinen ROS-GCI.** Vernetzung des Peptides  $\alpha$   ${}_{663}\text{[FVLKVTDDHGHGR]}_{694}$  und des Peptides  $\beta$   ${}_{527}\text{[KVAQGSR]}_{533}$  bei  $m/z$  577,317, Ladungszustand 4+. Die Annotierung erfolgte mit MeroX. Im Massenspektrum sind a- und b-Ionen rot markiert, y-Ionen blau und Fragmentionen der Vernetzung (Bu/BuUr/Pep) gelb dargestellt. Bei den vernetzten Peptiden sind a- und b-Ionen mit  $\perp$ , y-Ionen mit  $\lceil$  und Fragmentionen des Vernetzungsreagens mit  $\text{—}$  markiert. Bei den Aminosäuresequenzen korreliert der Farbverlauf bei den Markierungen von blau nach rot mit der zunehmenden Signalintensität der Fragmentionen im Massenspektrum.

## Anhang

**Tabelle A 1: Identifizierte Vernetzungsprodukte in GCAP-2 mit CDI.** Zur Identifizierung der Vernetzungen wurde die Software MeroX verwendet. Angegeben ist der experimentelle  $m/z$ -Wert, das theoretische Molekulargewicht  $[M+H]^+$ , die Ladung  $z$ , die Massenabweichung ( $\Delta m$ ) in ppm sowie die vernetzten Peptide 1 und 2. Die vernetzten Aminosäuren sind hervorgehoben. Falls eine vernetzte Aminosäure nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurden zwei oder drei mögliche Aminosäure angegeben.

<b>m/z</b> <b>exper.</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b> <b>theoret.</b>	<b>z</b>	<b><math>\Delta m</math></b> <b>(ppm)</b>	<b>Vernetztes</b> <b>Peptid 1</b>	<b>Vernetztes</b> <b>Peptid 2</b>
313,543	938,615	3	0,8	127[LKK] <sub>129</sub>	95[HKLK] <sub>98</sub>
329,187	985,548	3	1	45[FKR] <sub>47</sub>	[SIYK]
332,857	996,556	3	0,95	127[LKK] <sub>129</sub>	200[KSAMF] <sub>205</sub>
334,207	1000,608	3	2,68	45[FKR] <sub>47</sub>	95[HKLK] <sub>98</sub>
367,207	1099,606	3	0,88	45[FKR] <sub>47</sub>	27[WYKK] <sub>30</sub>
378,542	1133,612	3	-1,82	95[HKLK] <sub>98</sub>	200[KSAMF] <sub>205</sub>
378,543	1133,614	3	0,16	95[HKLK] <sub>98</sub>	200[KSAMF] <sub>205</sub>
432,277	863,547	2	0,88	127[LKK] <sub>129</sub>	45[FKR] <sub>47</sub>
433,252	1297,743	3	0,75	45[FKR] <sub>47</sub>	97[LKWTfK] <sub>102</sub>
453,916	1359,734	3	-0,18	200[KSAMF] <sub>205</sub>	123[SIYK] <sub>128</sub>
498,781	996,555	2	0,68	127[LKK] <sub>129</sub>	200[KSAMF] <sub>205</sub>
500,807	1000,607	2	1,52	45[FKR] <sub>47</sub>	95[HKLK] <sub>98</sub>
557,059	2225,215	4	0,71	127[LKK] <sub>129</sub>	137[AEQQGKLLTPEEVVDR] <sub>152</sub>
562,519	2247,052	4	-2,17	95[HKLK] <sub>98</sub>	31[FLEEBPSGTLFMHE] <sub>44</sub>
636,803	2544,192	4	-0,85	97[LKWTfK] <sub>102</sub>	31[FLEEBPSGTLFMHE] <sub>44</sub>
698,329	2790,292	4	1,09	99[WTfKIYDKDR] <sub>108</sub>	51[VPDNEEATQYVE] <sub>62</sub>
704,005	2110,002	3	1,57	127[LKK] <sub>129</sub>	31[FLEEBPSGTLFMHE] <sub>44</sub>
743,706	2229,104	3	-1,38	127[LKK] <sub>129</sub>	48[FFKVPDNEEATQYVE] <sub>62</sub>
749,689	2247,054	3	-1,55	95[HKLK] <sub>98</sub>	31[FLEEBPSGTLFMHE] <sub>44</sub>
769,003	2304,995	3	-0,88	200[KSAMF] <sub>205</sub>	31[FLEEBPSGTLFMHE] <sub>44</sub>
811,701	2433,089	3	-1,46	200[KSAMF] <sub>205</sub>	30[KFLEEBPSGTLFMHE] <sub>44</sub>
888,437	2663,298	3	-1,89	97[LKWTfK] <sub>102</sub>	48[FFKVPDNEEATQYVE] <sub>62</sub>
990,207	2968,608	3	-0,78	81[YVAALNLVLR] <sub>90</sub>	137[AEQQGKLLTPEEVVDR] <sub>152</sub>

**Tabelle A 2: Identifizierte Vernetzungsprodukte in GCAP-2 mit Photo-Methionin in der Anwesenheit von Calcium.** Zur Identifizierung der Vernetzungen zwischen Photo-Methionin (x) und Glutamin- und Asparaginsäure wurde die Software MeroX verwendet. Angegeben ist der experimentelle  $m/z$ -Wert, das theoretische Molekulargewicht  $[M+H]^+$ , die Ladung  $z$ , die Massenabweichung ( $\Delta m$ ) in ppm sowie die vernetzten Peptide 1 und 2. Die vernetzten Aminosäuren sind hervorgehoben.

<b>m/z</b> <b>exper.</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b> <b>theoret.</b>	<b>z</b>	<b><math>\Delta m</math></b> <b>(ppm)</b>	<b>Vernetztes</b> <b>Peptid 1</b>	<b>Vernetztes</b> <b>Peptid 2</b>
623,627	1868,869	3	-0,83	201[SAXF] <sub>205</sub>	130[ABSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
666,327	1996,964	3	0,32	201[SAXF] <sub>205</sub>	129[KABSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
666,327	1996,964	3	0,32	200[KSAXF] <sub>205</sub>	130[ABSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
721,696	2163,075	3	-1,06	177[DKWVxK] <sub>182</sub>	130[ACSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
740,702	2220,097	3	-2,41	177[DKWVxK] <sub>182</sub>	130[ABSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
944,942	3776,738	4	1,51	51[VPDNEEATQYVEAxFR] <sub>66</sub>	51[VPDNEEATQYVEAMFR] <sub>66</sub>
1259,588	3776,738	3	2,64	51[VPDNEEATQYVEAxFR] <sub>66</sub>	51[VPDNEEATQYVEAMFR] <sub>66</sub>



## Anhang

**Tabelle A 3: Identifizierte Vernetzungsprodukte in GCAP-2 mit Photo-Methionin in der Abwesenheit von Calcium.** Zur Identifizierung der Vernetzungen zwischen Photo-Methionin (x) und Glutamin- und Asparaginsäure wurde die Software MeroX verwendet. Angegeben ist der experimentelle m/z-Wert, das theoretische Molekulargewicht [M+H]<sup>+</sup>, die Ladung z, die Massenabweichung ( $\Delta m$ ) in ppm sowie die vernetzten Peptide 1 und 2. Die vernetzten Aminosäuren sind hervorgehoben.

m/z exper.	[M+H] <sup>+</sup> theoret.	z	$\Delta m$ (ppm)	Vernetztes Peptid 1	Vernetztes Peptid 2
489,776	1956,08	4	0,33	<sup>177</sup> [DKWVxK] <sub>182</sub>	<sup>143</sup> [LLTPEEVVDR] <sub>152</sub>
623,628	1.868,869	3	-0,17	<sup>201</sup> [SaxF] <sub>205</sub>	<sup>130</sup> [ABSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
666,326	1.996,964	3	-0,85	<sup>200</sup> [KSaxF] <sub>205</sub>	<sup>130</sup> [ABSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
666,326	1.996,964	3	-0,85	<sup>201</sup> [SaxF] <sub>205</sub>	<sup>129</sup> [KABSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
721,696	2.163,075	3	-1,06	<sup>177</sup> [DKWVxK] <sub>182</sub>	<sup>130</sup> [ACSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
837,656	3.347,599	4	1,04	<sup>183</sup> [MLQxDLNPSSWISQQR] <sub>198</sub>	<sup>130</sup> [ABSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
837,656	3.347,599	4	1,04	<sup>183</sup> [xLQMDLNPSSWISQQR] <sub>198</sub>	<sup>130</sup> [ABSVEVEAEQQGK] <sub>142</sub>
1.271,274	3.811,805	3	0,32	<sup>51</sup> [VPDNEEATQYVEAxFR] <sub>66</sub>	<sup>183</sup> [MLQMDLNPSSWISQQR] <sub>198</sub>
1.282,963	3.846,872	3	0,62	<sup>183</sup> [xLQMDLNPSSWISQQR] <sub>198</sub>	<sup>183</sup> [MLQMDLNPSSWISQQR] <sub>198</sub>
1.282,963	3.846,872	3	0,62	<sup>183</sup> [MLQxDLNPSSWISQQR] <sub>198</sub>	<sup>183</sup> [MLQMDLNPSSWISQQR] <sub>198</sub>

**Tabelle A 4: Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit DSBU zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden 1, 2 und 3 in der An- und Abwesenheit von Calcium.**

DSBU	theor. [M+H] <sup>+</sup>	exper. [M+H] <sup>+</sup>	z	ROS-GC1- Peptid	GCAP-2	Calcium mit	Calcium ohne
Peptid 1	921,552	921,551	3	N-Term	K128/129	✓	
	983,542	983,542	3	N-Term	K46	✓	✓
	983,542	983,542	2	N-Term	K46	✓	✓
	1058,611	1058,61	3	N-Term	K96	✓	✓
	1058,611	1058,61	2	N-Term	K96	✓	✓
	1116,551	1116,552	2	N-Term	K200	✓	✓
	1157,61	1157,61	3	N-Term	K29/30	✓	✓
	1157,61	1157,61	2	N-Term	K29/30	✓	
	1272,652	1272,652	3	N-Term	K200	✓	✓
	1272,652	1272,652	2	N-Term	K200		✓
	1284,731	1284,731	3	N-Term	K126	✓	✓
	1284,731	1284,731	2	N-Term	K126	✓	✓
	1355,678	1355,678	3	N-Term	K178	✓	✓
	1355,678	1355,677	2	N-Term	K178		✓
	1454,694	1454,695	2	N-Term	K129	✓	✓
	1657,786	1657,786	2	N-Term	K50	✓	✓
Peptid 2	986,582	986,579	3	N-Term	K128/129		✓
	986,582	986,581	2	N-Term	K128/129		✓
	1048,571	1048,57	3	N-Term	K46		✓
	1123,64	1123,64	2	N-Term	K96		✓
	1134,598	1134,598	2	N-Term	K30		✓
	1139,635	1139,635	3	N-Term	K96		✓
	1181,581	1181,581	2	N-Term	K200	✓	✓
	1222,64	1222,64	2	N-Term	K29/30		✓
	1337,682	1337,681	3	N-Term	K200	✓	✓
	1349,761	1349,76	3	N-Term	K126		✓
	1349,761	1349,762	2	N-Term	K126		✓
	1365,756	1365,753	3	N-Term	K126		✓
	1365,756	1365,756	2	N-Term	K126		✓
	1404,713	1404,713	3	N-Term	K178		✓
	1407,705	1407,703	3	N-Term	K106		✓
	1420,708	1420,707	3	N-Term	K178		✓
	1423,7	1423,699	3	N-Term	K106		✓
	1438,78	1438,781	3	S19	K46	✓	✓
	1477,856	1477,855	4	N-Term	K126		✓
	1477,856	1477,855	3	N-Term	K126		✓
1519,724	1519,722	2	N-Term	K129		✓	
1535,719	1535,719	2	N-Term	K129		✓	
1587,786	1587,784	2	S19	K200	✓	✓	

## Anhang

	1722,816	1722,814	2	N-Term	K50	✓	✓
	2410,239	2410,241	3	N-Term	K142		✓
	1222,64	1222,639	3	N-Term	K29/30	✓	✓
<b>Peptid 3</b>	1007,577	1007,577	2	N-Term	K128/129		✓
	1069,568	1069,568	2	N-Term	K46	✓	✓
	1144,636	1144,636	2	N-Term	K96	✓	✓
	1155,593	1155,593	2	N-Term	K30	✓	✓
	1202,576	1202,576	2	N-Term	K200		✓
	1243,636	1243,636	2	N-Term	K29/30	✓	✓
	1358,677	1358,678	2	N-Term	K200	✓	✓
	1370,757	1370,757	2	N-Term	K126	✓	
	1425,708	1425,708	2	N-Term	K178	✓	
	1540,72	1540,721	2	N-Term	K129		✓
	1743,811	1743,811	2	N-Term	K50		✓

**Tabelle A 5:** Übersicht der identifizierten Vernetzung mit DAU zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptid 2 in der Anwesenheit von Calcium.

DAU	theor. [M+H] <sup>+</sup>	exper. [M+H] <sup>+</sup>	z	ROS-GC1- Peptid	GCAP-2	Calcium mit	Calcium ohne
Peptid 2	2322,074	2322,074	3	C5	C131	✓	

**Tabelle A 6:** Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit Photo-Methionin zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden 1, 2 und 3 in der An- und Abwesenheit von Calcium.

Photo- Methionin	theor. [M+H] <sup>+</sup>	exper. [M+H] <sup>+</sup>	z	ROS-GC1- Peptid	GCAP-2	Calcium mit	Calcium ohne
Peptid 1	2996,507	2996,507	3	C-Term	PM42		✓
Peptid 2	1188,656	1188,657	3	M1	PM181	✓	✓
	1838,947	1838,946	4	E18	PM181	✓	
	1390,602	1390,604	2	D9	PM186		✓

**Tabelle A 7:** Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit CDI zwischen GCAP-2 und den ROS-GC1-Peptiden 1, 2 und 3 in der An- und Abwesenheit von Calcium.

CDI	theor. [M+H] <sup>+</sup>	exper. [M+H] <sup>+</sup>	z	ROS-GC1- Peptid	GCAP-2	Calcium mit	Calcium ohne
Peptid 1	1487,68	1487,68	3	N-Term	K50	✓	✓
	2175,104	2175,106	3	N-Term	K142	✓	✓
	2187,984	2187,984	4	N-Term	K30	✓	
Peptid 2	1179,655	1179,655	3	N-Term	K126	✓	
	1179,655	1179,655	3	N-Term	Y125/K126		✓
	1234,607	1234,608	3	N-Term	K178	✓	
	1237,599	1237,598	3	N-Term	K106	✓	✓
	1250,671	1250,671	3	N-Term	K98	✓	✓
	1401,682	1401,683	3	S19/T20/Y24	K200		✓
	1401,683	1401,683	3	S19/T20	K200	✓	
	1442,743	1442,742	3	S19/T20	K29	✓	
	1569,864	1569,864	3	Y24	K126	✓	✓
	1624,815	1624,815	4	Y24	K178	✓	
	1640,88	1640,879	4	S19/T20	K102	✓	✓
	1640,88	1640,881	3	S19/T20	K102	✓	
	1739,827	1739,831	3	S19/T20	K129	✓	
	1799,89	1799,888	4	N-Term	K102	✓	✓
	1799,89	1799,891	3	N-Term	K102		✓
	1942,918	1942,921	3	Y24	K50	✓	✓
1978,944	1978,947	3	Y4	K46	✓		

## Anhang

	2054,012	2054,013	4	Y4	K96	✓	
	2054,012	2054,014	4	Y4	K96/98		✓
	2064,969	2064,969	3	Y4	K30		✓
	2124,919	2124,918	3	N-Term	S37		✓
	2153,012	2153,012	4	Y4	K29/30	✓	
	2153,012	2153,013	4	Y4	K29		✓
	2153,012	2153,014	3	Y4	K29/30		✓
	2190,094	2190,098	4	S19/T20	K102	✓	
	2190,098	2190,098	4	Y24	K102		✓
	2240,134	2240,134	3	N-Term	K142	✓	
	2280,133	2280,135	4	Y4	K126	✓	✓
	2338,077	2338,079	3	Y4	K106		✓
	2634,236	2634,236	3	Y24	K50		✓
<b>Peptid 3</b>	899,462	899,461	2	N-Term	K46		✓
	974,531	974,531	2	N-Term	K96		✓
	1271,667	1271,668	2	N-Term /Y2	K98	✓	
	1271,667	1271,667	3	N-Term /Y2	K98	✓	
	1370,614	1370,615	2	N-Term	K129	✓	✓
	1790,936	1790,933	3	Y2	K106		✓
	2261,13	2261,131	3	Y2	K142		✓

## Anhang

**Tabelle A 8: DSBU-Vernetzungen in der humanen ROS-GCI.** Gegenüberstellung der bovinen und humanen Nummerierung der Vernetzungspositionen. Auflistung der vernetzten Aminosäurepositionen 1 und 2 sowie die dazugehörigen Domänen, in denen die Aminosäure lokalisiert ist. Vernetzungen zwischen zwei identischen oder sich überlappenden Aminosäuresequenzen wurden als intermolekulare Vernetzungen zwischen zwei Monomeren betrachtet und grau hinterlegt. Die Abkürzungen der Domänen sind in Abbildung 35 und Abbildung 26 beschrieben.

Vernetzte Aminosäureposition 1		Vernetzte Aminosäureposition 2		Domänen
bovine	human	bovine	human	
524/525	519/520	527	522	JMD - JMD
527	522	540	535	JMD - JMD
527	522	540/542	535/537	JMD - JMD
527	522	542	537	JMD - JMD
527	522	546	541	JMD - JMD
527	522	546/549	541/544	JMD - JMD
527	522	549	544	JMD - JMD
527	522	546/549/554	541/544/549	JMD - JMD
527	522	568	563	JMD - JMD
532	527	568	563	JMD - JMD
527	522	657	652	JMD - KHD
527	522	818	813	JMD - KHD
568	563	657	652	JMD - KHD
527	522	1098	1093	JMD - CTE
642	637	815	810	KHD - KHD
657	652	673	668	KHD - KHD
657	652	673/674	668/669	KHD - KHD
657	652	815	810	KHD - KHD
657	652	818	813	KHD - KHD
657	652	819	814	KHD - KHD
657	652	818/819	813/814	KHD - KHD
673/674	668/669	700	695	KHD - KHD
815	810	818	813	KHD - KHD
588	583	1098	1093	KHD - CTE
851	846	853	848	SHD - SHD
1051	1046	1051	1046	CTE - CTE
1048/1051	1043/1046	1053	1048	CTE - CTE

## Anhang

**Tabelle A 9: Übersicht der identifizierten DSBU-Vernetzungen in der humanen ROS-GCI in der Anwesenheit von GCAP-2 von Calcium.** Zur Identifizierung der Vernetzungen wurde die Software MeroX verwendet. Angegeben ist der experimentelle m/z-Wert, das theoretische Molekulargewicht [M+H]<sup>+</sup>, die Ladung z, die Massenabweichung ( $\Delta m$ ) in ppm sowie die vernetzten Peptide 1 und 2. Die vernetzten Aminosäuren sind hervorgehoben. Falls eine vernetzte Aminosäure nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurden alle möglichen Aminosäure angegeben.

m/z exp.	[M+H] <sup>+</sup> theoret.	z	$\Delta m$ (ppm)	Vernetztes Peptid 1	Vernetztes Peptid 2
440,508	1759,007	4	0,76	<sup>1041</sup> [GRTELK <b>GK</b> ] <sub>1048</sub>	<sup>1043</sup> [TELK <b>GK</b> ] <sub>1048</sub>
587,007	1759,007	3	0,22	<sup>1041</sup> [GRTELK <b>GK</b> ] <sub>1048</sub>	<sup>1043</sup> [TELK <b>GK</b> ] <sub>1048</sub>
607,332	3032,628	5	0,94	<sup>503</sup> [IILTVDDITFLHPHG <b>GTSR</b> ] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>
607,334	3032,628	5	4,16	<sup>503</sup> [IILTVDDITFLHPHG <b>GTSR</b> ] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>
1011,548	3032,628	3	0,83	<sup>503</sup> [IILTVDDITFLHPHG <b>GTSR</b> ] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>
522,54	2087,139	4	0,04	<sup>813</sup> [K <b>T</b> NIID <b>SMLR</b> ] <sub>822</sub>	<sup>807</sup> [N <b>I</b> NK <b>G</b> R] <sub>812</sub>
696,385	2087,139	3	0,1	<sup>813</sup> [K <b>T</b> NIID <b>SMLR</b> ] <sub>822</sub>	<sup>807</sup> [N <b>I</b> NK <b>G</b> R] <sub>812</sub>
538,655	1613,945	3	3,93	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>	<sup>1092</sup> [R <b>K</b> LEK] <sub>1096</sub>
538,655	1613,945	3	3,93	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>	<sup>1092</sup> [R <b>K</b> LEK] <sub>1096</sub>
550,286	1648,844	3	0,3	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>	<sup>535</sup> [S <b>M</b> S <b>D</b> I <b>R</b> ] <sub>540</sub>
550,286	1648,844	3	-0,58	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>	<sup>535</sup> [S <b>M</b> S <b>D</b> I <b>R</b> ] <sub>540</sub>
404,243	1613,949	4	0,86	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>	<sup>560</sup> [V <b>W</b> L <b>K</b> K] <sub>564</sub>
538,655	1613,949	3	0,87	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>	<sup>560</sup> [V <b>W</b> L <b>K</b> K] <sub>564</sub>
538,654	1613,949	3	-0,61	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>	<sup>560</sup> [V <b>W</b> L <b>K</b> K] <sub>564</sub>
404,242	1613,949	4	-0,73	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>	<sup>560</sup> [V <b>W</b> L <b>K</b> K] <sub>564</sub>
404,242	1613,949	4	-0,73	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>	<sup>560</sup> [V <b>W</b> L <b>K</b> K] <sub>564</sub>
742,869	2968,451	4	1,01	<sup>541</sup> [S <b>G</b> P <b>S</b> Q <b>H</b> L <b>D</b> S <b>P</b> N <b>I</b> G <b>V</b> Y <b>E</b> G <b>D</b> R] <sub>559</sub>	<sup>522</sup> [K <b>V</b> AQ <b>GSR</b> ] <sub>528</sub>
507,315	2026,238	4	0,73	<sup>644</sup> [S <b>S</b> L <b>L</b> L <b>D</b> L <b>I</b> K <b>G</b> I <b>R</b> ] <sub>655</sub>	<sup>667</sup> [L <b>K</b> S <b>R</b> ] <sub>670</sub>
556,833	2224,314	4	-0,75	<sup>644</sup> [S <b>S</b> L <b>L</b> L <b>D</b> L <b>I</b> K <b>G</b> I <b>R</b> ] <sub>655</sub>	<sup>807</sup> [N <b>I</b> NK <b>G</b> R] <sub>812</sub>
556,834	2224,314	4	0,35	<sup>644</sup> [S <b>S</b> L <b>L</b> L <b>D</b> L <b>I</b> K <b>G</b> I <b>R</b> ] <sub>655</sub>	<sup>807</sup> [N <b>I</b> NK <b>G</b> R] <sub>812</sub>
549,844	2196,348	4	2,99	<sup>644</sup> [S <b>S</b> L <b>L</b> L <b>D</b> L <b>I</b> K <b>G</b> I <b>R</b> ] <sub>655</sub>	<sup>560</sup> [V <b>W</b> L <b>K</b> K] <sub>564</sub>
387,226	1545,885	4	-0,86	<sup>1043</sup> [TELK <b>GK</b> ] <sub>1048</sub>	<sup>1043</sup> [TELK <b>GK</b> ] <sub>1048</sub>

## Anhang

**Tabelle A 10: Übersicht der identifizierten DSBU-Vernetzungen in der humanen ROS-GC1 in der Abwesenheit von GCAP-2 und Calcium.** Zur Identifizierung der Vernetzungen wurde die Software MeroX verwendet. Angegeben ist der experimentelle  $m/z$ -Wert, das theoretische Molekulargewicht  $[M+H]^+$ , die Ladung  $z$ , die Massenabweichung ( $\Delta m$ ) in ppm sowie die vernetzten Peptide 1 und 2. Die vernetzten Aminosäuren sind hervorgehoben. Falls eine vernetzte Aminosäure nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurden alle mögliche Aminosäure angegeben.

$m/z$ exper.	$[M+H]^+$ theoret.	$z$	$\Delta m$ (ppm)	Vernetztes Peptid 1	Vernetztes Peptid 2
538,656	1613,949	3	2,57	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	<sup>560</sup> [VWLKK] <sub>564</sub>
507,316	2026,238	4	1,64	<sup>644</sup> [SSLLLDLIKGR] <sub>655</sub>	<sup>667</sup> [LKSRL] <sub>670</sub>
556,835	2224,314	4	1,89	<sup>644</sup> [SSLLLDLIKGR] <sub>655</sub>	<sup>807</sup> [NINKGR] <sub>812</sub>
567,841	2268,34	4	0,19	<sup>644</sup> [SSLLLDLIKGR] <sub>655</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>
538,655	1613,949	3	0,3	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	<sup>560</sup> [VWLKK] <sub>564</sub>
742,87	2968,451	4	2,74	<sup>541</sup> [SGPSQHLDSPNIGVYEGDR] <sub>559</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>
990,156	2968,451	3	0,98	<sup>541</sup> [SGPSQHLDSPNIGVYEGDR] <sub>559</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>
404,243	1613,949	4	0,56	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	<sup>560</sup> [VWLKK] <sub>564</sub>
840,452	2519,336	3	1,56	<sup>1047</sup> [GKGAEDTFWL VGR] <sub>1059</sub>	<sup>1041</sup> [GRTELKKG] <sub>1048</sub>
493,787	1972,13	4	-0,87	<sup>1041</sup> [GRTELKKG] <sub>1048</sub>	<sup>1041</sup> [GRTELKKG] <sub>1048</sub>
696,386	2087,139	3	1,51	<sup>813</sup> [KTNIIDSMRL] <sub>822</sub>	<sup>807</sup> [NINKGR] <sub>812</sub>
697,031	2089,077	3	0,54	<sup>839</sup> [TEELELEKQK] <sub>848</sub>	<sup>847</sup> [QKTDR] <sub>851</sub>
607,331	3032,628	5	-0,87	<sup>503</sup> [ILTVDDITFLPHGGTSR] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>
493,788	1972,13	4	0,55	<sup>1041</sup> [GRTELKKG] <sub>1048</sub>	<sup>1041</sup> [GRTELKKG] <sub>1048</sub>

**Tabelle A 11: Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit DSBU D<sub>0</sub>/D<sub>12</sub> in der humanen ROS-GC1 in der Anwesenheit von GCAP-2 ohne Calcium.** Zur Identifizierung der Vernetzungen wurde die Software MeroX verwendet. Angegeben ist der experimentelle  $m/z$ -Wert, das theoretische Molekulargewicht  $[M+H]^+$ , die Ladung  $z$ , die Massenabweichung ( $\Delta m$ ) in ppm, die vernetzten Peptide 1 und 2 sowie die identifizierte Variante von DSBU (D<sub>0</sub>-leicht (L), D<sub>12</sub>-schwer (H)). Die vernetzten Aminosäuren sind hervorgehoben. Falls eine vernetzte Aminosäure nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurden alle mögliche Aminosäure angegeben.

$m/z$ exper.	$[M+H]^+$ theoret.	$z$	$\Delta m$ (ppm)	Vernetztes Peptid 1	Vernetztes Peptid 2	
508,29	3044,703	6	0,25	<sup>503</sup> [ILTVDDITFLPHGGTSR] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(H)
607,332	3032,628	5	1,34	<sup>503</sup> [ILTVDDITFLPHGGTSR] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(L)
607,332	3032,628	5	1,64	<sup>503</sup> [ILTVDDITFLPHGGTSR] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(L)
607,333	3032,628	5	2,05	<sup>503</sup> [ILTVDDITFLPHGGTSR] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(L)
607,334	3032,628	5	3,66	<sup>503</sup> [ILTVDDITFLPHGGTSR] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(L)
506,277	3032,628	6	0,21	<sup>503</sup> [ILTVDDITFLPHGGTSR] <sub>521</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(L)
596,913	2980,526	5	2,83	<sup>541</sup> [SGPSQHLDSPNIGVYEGDR] <sub>559</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(H)
745,888	2980,526	4	0,97	<sup>541</sup> [SGPSQHLDSPNIGVYEGDR] <sub>559</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(H)
745,887	2980,526	4	-0,1	<sup>541</sup> [SGPSQHLDSPNIGVYEGDR] <sub>559</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(H)
745,885	2980,526	4	-2,15	<sup>541</sup> [SGPSQHLDSPNIGVYEGDR] <sub>559</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(H)
742,869	2968,451	4	1,42	<sup>541</sup> [SGPSQHLDSPNIGVYEGDR] <sub>559</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(L)
519,072	2073,257	4	3,73	<sup>579</sup> [TAFSKLQELR] <sub>588</sub>	<sup>1092</sup> [RKLEK] <sub>1096</sub>	(H)
519,07	2073,257	4	1,49	<sup>579</sup> [TAFSKLQELR] <sub>588</sub>	<sup>1092</sup> [RKLEK] <sub>1096</sub>	(H)
519,07	2073,257	4	0,9	<sup>579</sup> [TAFSKLQELR] <sub>588</sub>	<sup>1092</sup> [RKLEK] <sub>1096</sub>	(H)
533,547	2131,165	4	1,25	<sup>813</sup> [KTNIIDSMRL] <sub>822</sub>	<sup>522</sup> [KVAQGSR] <sub>528</sub>	(L)
700,412	2099,214	3	3,04	<sup>813</sup> [KTNIIDSMRL] <sub>822</sub>	<sup>807</sup> [NINKGR] <sub>812</sub>	(H)
700,412	2099,214	3	2,77	<sup>813</sup> [KTNIIDSMRL] <sub>822</sub>	<sup>807</sup> [NINKGR] <sub>812</sub>	(H)
700,411	2099,214	3	1,82	<sup>813</sup> [KTNIIDSMRL] <sub>822</sub>	<sup>807</sup> [NINKGR] <sub>812</sub>	(H)

## Anhang

700,411	2099,214	3	1,47	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(H)
696,386	2087,139	3	1,51	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
696,385	2087,139	3	1,24	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
522,541	2087,139	4	1,21	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
522,541	2087,139	4	0,86	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
696,382	2087,139	3	-3,14	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
550,845	2200,357	4	1,36	690[ <b>LLEAQKVLPEPPR</b> ] <sub>702</sub>	667[ <b>LKSR</b> ] <sub>670</sub>	(H)
730,1	2188,281	3	1,9	690[ <b>LLEAQKVLPEPPR</b> ] <sub>702</sub>	667[ <b>LKSR</b> ] <sub>670</sub>	(L)
547,826	2188,281	4	1,2	690[ <b>LLEAQKVLPEPPR</b> ] <sub>702</sub>	667[ <b>LKSR</b> ] <sub>670</sub>	(L)
547,826	2188,281	4	1,2	690[ <b>LLEAQKVLPEPPR</b> ] <sub>702</sub>	667[ <b>LKSR</b> ] <sub>670</sub>	(L)
730,099	2188,281	3	0,81	690[ <b>LLEAQKVLPEPPR</b> ] <sub>702</sub>	667[ <b>LKSR</b> ] <sub>670</sub>	(L)
510,334	2038,314	4	-0,65	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	667[ <b>LKSR</b> ] <sub>670</sub>	(H)
746,137	2236,389	3	3,41	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(H)
746,137	2236,389	3	3,41	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(H)
746,135	2236,389	3	0,79	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(H)
746,135	2236,389	3	1,12	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(H)
746,135	2236,389	3	1,12	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(H)
559,853	2236,389	4	0,29	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(H)
746,133	2236,389	3	-1,5	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(H)
556,836	2224,314	4	4,74	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
742,112	2224,314	3	3,54	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
556,835	2224,314	4	2,54	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
556,835	2224,314	4	1,56	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
742,11	2224,314	3	1,48	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
742,11	2224,314	3	0,99	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
556,834	2224,314	4	0,79	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
556,834	2224,314	4	0,79	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
909,221	2725,64	3	3,26	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(H)
682,168	2725,64	4	3,32	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(H)
682,167	2725,64	4	2,61	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(H)
682,166	2725,64	4	1,53	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(H)
909,219	2725,64	3	1,18	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(H)
905,197	2713,564	3	3,97	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
905,197	2713,564	3	4,04	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
679,148	2713,564	4	2,48	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
905,195	2713,564	3	2,49	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
905,195	2713,564	3	2,02	[644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
679,148	2713,564	4	2,21	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
905,194	2713,564	3	1,61	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
679,147	2713,564	4	0,96	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
905,193	2713,564	3	0,26	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
679,147	2713,564	4	0,33	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(L)
686,164	2741,635	4	-0,54	644[ <b>SSLLLDLIKGR</b> ] <sub>655</sub>	813[ <b>KTNIIDSMLR</b> ] <sub>822</sub>	(H)
702,711	2106,116	3	1,38	635[ <b>EIKLDWMFK</b> ] <sub>643</sub>	807[ <b>NINKGR</b> ] <sub>812</sub>	(L)
407,262	1626,024	4	0,7	522[ <b>KVAQGSR</b> ] <sub>528</sub>	560[ <b>VWLKK</b> ] <sub>564</sub>	(H)
542,68	1626,024	3	0,26	522[ <b>KVAQGSR</b> ] <sub>528</sub>	560[ <b>VWLKK</b> ] <sub>564</sub>	(H)
542,679	1626,024	3	-0,87	522[ <b>KVAQGSR</b> ] <sub>528</sub>	560[ <b>VWLKK</b> ] <sub>564</sub>	(H)
404,243	1613,949	4	-0,05	522[ <b>KVAQGSR</b> ] <sub>528</sub>	560[ <b>VWLKK</b> ] <sub>564</sub>	(L)
538,654	1613,949	3	0,19	522[ <b>KVAQGSR</b> ] <sub>528</sub>	560[ <b>VWLKK</b> ] <sub>564</sub>	(L)
550,286	1648,844	3	-0,25	522[ <b>KVAQGSR</b> ] <sub>528</sub>	535[ <b>SMSDIR</b> ] <sub>540</sub>	(L)
554,312	1660,919	3	1,03	522[ <b>KVAQGSR</b> ] <sub>528</sub>	535[ <b>SMSDIR</b> ] <sub>540</sub>	(H)
395,232	1972,13	5	0,85	1041[ <b>GRTELK GK</b> ] <sub>1048</sub>	1041[ <b>GRTELK GK</b> ] <sub>1048</sub>	(L)

## Anhang

**Tabelle A 12: Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit DSBU in der bovinen ROS-GCI aus der ROS-Präparation in der Abwesenheit von Calcium.** Zur Identifizierung der Vernetzungen wurde die Software MeroX verwendet. Angegeben ist der experimentelle  $m/z$ -Wert, das theoretische Molekulargewicht  $[M+H]^+$ , die Ladung  $z$ , die Massenabweichung ( $\Delta m$ ) in ppm, die vernetzten Peptide 1 und 2. Die vernetzten Aminosäuren sind hervorgehoben. Falls eine vernetzte Aminosäure nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurden alle mögliche Aminosäure angegeben.

$m/z$ exper.	$[M+H]^+$ theoret.	$z$	$\Delta m$ (ppm)	Vernetztes Peptid 1	Vernetztes Peptid 2
659,851	2636,375	4	2,19	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
586,117	2926,555	5	0,94	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>
659,852	2636,375	4	4,32	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
586,117	2926,555	5	0,94	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>
586,117	2926,555	5	0,94	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>
488,599	2926,555	6	0,87	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>
659,85	2636,375	4	1,73	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
488,599	2926,555	6	0,87	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>
661,358	2642,404	4	2,59	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
661,355	2642,404	4	-2,22	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
661,357	2642,404	4	1,29	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
661,358	2642,404	4	2,59	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
661,358	2642,404	4	2,59	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
661,357	2642,404	4	1,02	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
586,117	2926,555	5	1,04	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>
661,358	2642,404	4	2,59	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
661,358	2642,404	4	2,59	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
661,358	2642,404	4	2,59	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
881,475	2642,404	3	2,38	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
881,473	2642,404	3	-0,11	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
661,358	2642,404	4	2,59	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
659,85	2636,375	4	0,62	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
837,94	3348,736	4	0,6	<sup>748</sup> [SAPYAMLELTPEEVV <sup>KR</sup> ] <sub>764</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
837,94	3348,736	4	0,6	<sup>748</sup> [SAPYAMLELTPEEVV <sup>KR</sup> ] <sub>764</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
586,118	2926,555	5	2,19	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>
413,635	2064,146	5	0,29	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>672</sup> [L <sup>KSR</sup> ] <sub>675</sub>
577,318	2306,248	4	0,78	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>527</sup> [K <sup>V</sup> AQ <sup>GS</sup> R] <sub>533</sub>
577,318	2306,248	4	0,78	<sup>683</sup> [FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	<sup>527</sup> [K <sup>V</sup> AQ <sup>GS</sup> R] <sub>533</sub>
837,944	3348,736	4	4,9	<sup>748</sup> [SAPYAMLELTPEEVV <sup>KR</sup> ] <sub>764</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
661,359	2642,404	4	4,43	<sup>806</sup> [TFELFKSINK] <sub>815</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
767,916	3068,65	4	-2,4	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,916	3068,65	4	-2,95	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,916	3068,65	4	-2,4	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,916	3068,65	4	-2,16	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,916	3068,65	4	-2,16	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
837,938	3348,736	4	-1,37	<sup>748</sup> [SAPYAMLELTPEEVV <sup>KR</sup> ] <sub>764</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,917	3068,65	4	-0,73	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,916	3068,65	4	-2,16	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	<sup>806</sup> [TFELFKSINK <sup>KGR</sup> ] <sub>817</sub>	<sup>816</sup> [GR <sup>KMNIIDSMRL</sup> ] <sub>827</sub>
837,938	3348,736	4	-1,37	<sup>748</sup> [SAPYAMLELTPEEVV <sup>KR</sup> ] <sub>764</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>
663,85	2652,37	4	2,81	<sup>818</sup> [KMNIIDSM <sup>L</sup> R] <sub>827</sub>	<sup>818</sup> [KMNIIDSMRL] <sub>827</sub>



## Anhang

732,395	2926,555	4	1,71	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
837,938	3348,736	4	-1,37	748[SAPYAMLELTPEEVVVKR] <sub>764</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
699,572	3493,826	5	1,07	748[SAPYAMLELTPEEVVVKR] <sub>764</sub>	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
697,378	2090,121	3	-1,23	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
699,572	3493,826	5	1,07	748[SAPYAMLELTPEEVVVKR] <sub>764</sub>	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>
697,38	2090,121	3	1,49	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
699,571	3493,826	5	-0,67	748[SAPYAMLELTPEEVVVKR] <sub>764</sub>	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>
767,915	3068,65	4	-3,67	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
697,375	2090,121	3	-4,73	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
661,359	2642,404	4	3,79	806[TFELFKSINK] <sub>815</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
697,379	2090,121	3	0,7	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
767,917	3068,65	4	-0,81	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
640,359	1919,056	3	3,4	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
699,574	3493,826	5	3,96	748[SAPYAMLELTPEEVVVKR] <sub>764</sub>	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>
640,359	1919,056	3	3,4	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
733,107	2197,303	3	2,38	649[SSLLLDLIKIR] <sub>660</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,379	2090,121	3	0,7	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,375	2090,121	3	-4,73	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
676,085	2026,238	3	1,55	649[SSLLLDLIKIR] <sub>660</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
767,914	3068,65	4	-4,7	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
733,109	2197,303	3	4,29	649[SSLLLDLIKIR] <sub>660</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
653,591	2611,344	4	-0,88	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	[DIKLDWMFK]
516,792	2064,146	4	0,6	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
640,36	1919,056	3	4,45	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
516,792	2064,146	4	0,84	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
767,916	3068,65	4	-2,16	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
640,36	1919,056	3	4,35	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
697,379	2090,121	3	0,26	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
676,085	2026,238	3	0,65	649[SSLLLDLIKIR] <sub>660</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
733,107	2197,303	3	2,38	649[SSLLLDLIKIR] <sub>660</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
721,058	2161,158	3	1,32	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
516,792	2064,146	4	0,48	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
516,792	2064,146	4	0,48	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
661,356	2642,404	4	-0,28	806[TFELFKSINK] <sub>815</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
697,379	2090,121	3	0,26	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
640,359	1919,056	3	2,35	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
721,059	2161,158	3	2	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
721,059	2161,158	3	2	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
699,574	3493,826	5	3,96	748[SAPYAMLELTPEEVVVKR] <sub>764</sub>	683[FVLKVTDHGHR] <sub>694</sub>
767,917	3068,65	4	-1,28	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
661,356	2642,404	4	-0,28	806[TFELFKSINK] <sub>815</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
767,918	3068,65	4	0,39	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
702,712	2106,116	3	2,82	818[KmNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
676,083	2026,238	3	-1,34	649[SSLLLDLIKIR] <sub>660</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
676,083	2026,238	3	-1,34	649[SSLLLDLIKIR] <sub>660</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
702,712	2106,116	3	2,82	818[KmNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
640,358	1919,056	3	1,3	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
767,914	3068,65	4	-4,7	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>

## Anhang

516,792	2064,146	4	0,6	683[FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
516,792	2064,146	4	0,6	683[FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
733,105	2197,303	3	-0,96	649[SSLLLDLIKGR] <sub>660</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
699,57	3493,826	5	-1,29	748[SAPYAMLELTPEEVVKKR] <sub>764</sub>	683[FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>
697,379	2090,121	3	0,87	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,379	2090,121	3	0,87	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,376	2090,121	3	-3,07	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
696,125	2781,465	4	4,18	683[FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
719,139	2873,519	4	4,84	748[SAPYAMLELTPEEVVKKR] <sub>764</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
719,138	2873,519	4	3,65	748[SAPYAMLELTPEEVVKKR] <sub>764</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
516,792	2064,146	4	0,37	683[FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
719,139	2873,519	4	4,84	748[SAPYAMLELTPEEVVKKR] <sub>764</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
653,594	2611,344	4	3,7	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	[DIKLDWMFK]
659,85	2636,375	4	0,53	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
601,325	2402,272	4	2,54	308[KAHDAVLTLTR] <sub>318</sub>	[HBPLGGSVR]
697,378	2090,121	3	-1,23	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,376	2090,121	3	-3,07	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
516,792	2064,146	4	0,84	683[FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
653,594	2611,344	4	3,7	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	640[DIKLDWMFK] <sub>648</sub>
697,38	2090,121	3	1,49	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
601,325	2402,272	4	2,13	308[KAHDAVLTLTR] <sub>318</sub>	319[HBPLGGSVR] <sub>325</sub>
697,378	2090,121	3	-1,23	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,376	2090,121	3	-3,07	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,38	2090,121	3	2,1	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
699,57	3493,826	5	-1,29	748[SAPYAMLELTPEEVVKKR] <sub>764</sub>	683[FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>
697,38	2090,121	3	2,1	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
719,134	2873,519	4	-1,36	748[SAPYAMLELTPEEVVKKR] <sub>764</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
601,325	2402,272	4	2,03	308[KAHDAVLTLTR] <sub>318</sub>	319[HBPLGGSVR] <sub>325</sub>
696,122	2781,465	4	-0,12	683[FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>

**Tabelle A 13: Übersicht der identifizierten Vernetzungen mit DSBU in der bovinen ROS-GCI aus der ROS-Präparation in der Abwesenheit von Calcium nach Fixierung mit Glutaraldehyd.** Zur Identifizierung der Vernetzungen wurde die Software MeroX verwendet. Angegeben ist der experimentelle  $m/z$ -Wert, das theoretische Molekulargewicht  $[M+H]^+$ , die Ladung  $z$ , die Massenabweichung ( $\Delta m$ ) in ppm, die vernetzten Peptide 1 und 2. Die vernetzten Aminosäuren sind hervorgehoben. Falls eine vernetzte Aminosäure nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurden alle mögliche Aminosäure angegeben.

$m/z$ exper.	$[M+H]^+$ theoret.	$z$	$\Delta m$ (ppm)	Vernetztes Peptid 1	Vernetztes Peptid 2
659,85	2636,375	4	1,64	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
413,635	2064,146	5	0,36	683[FVLKVTDHGHGR] <sub>694</sub>	672[LKSR] <sub>675</sub>
879,464	2636,375	3	1,09	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
881,474	2642,404	3	1,34	806[TFELFKSINK] <sub>815</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
837,94	3348,736	4	1,04	748[SAPYAMLELTPEEVVKKR] <sub>764</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
697,03	2089,077	3	-0,16	844[TEELELEKQK] <sub>853</sub>	852[QKTDR] <sub>856</sub>
697,031	2089,077	3	0,89	844[TEELELEKQK] <sub>853</sub>	852[QKTDR] <sub>856</sub>
697,379	2090,121	3	1,14	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
767,916	3068,65	4	-1,84	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
562,651	1685,941	3	-0,59	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
697,379	2090,121	3	1,14	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,032	2089,077	3	1,59	844[TEELELEKQK] <sub>853</sub>	852[QKTDR] <sub>856</sub>
539,629	1616,871	3	0,1	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>	540[SISDVR] <sub>545</sub>
837,94	3348,736	4	1,04	748[SAPYAMLELTPEEVVKKR] <sub>764</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>

## Anhang

837,943	3348,736	4	3,88	748[SAPYAMLELTPEEVVKR] <sub>764</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
697,379	2090,121	3	1,05	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,379	2090,121	3	1,05	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
879,464	2636,375	3	0,46	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
697,379	2090,121	3	0,09	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,38	2090,121	3	1,57	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,379	2090,121	3	0,35	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,38	2090,121	3	1,57	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
539,629	1616,871	3	0,1	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>	540[SISDVR] <sub>545</sub>
697,031	2089,077	3	0,8	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	852[QKTDR] <sub>856</sub>
697,378	2090,121	3	0	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
767,917	3068,65	4	-1,2	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
837,943	3348,736	4	3,88	748[SAPYAMLELTPEEVVKR] <sub>764</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
562,652	1685,941	3	0,5	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
697,03	2089,077	3	-0,16	844[TEELELEKQK] <sub>853</sub>	852[QKTDR] <sub>856</sub>
697,38	2090,121	3	1,84	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
697,38	2090,121	3	1,84	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
562,652	1685,941	3	0,93	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
767,917	3068,65	4	-1,68	806[TFELFKSINKGR] <sub>817</sub>	816[GRKMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
792,079	2374,221	3	0,41	842[ERTEELELEKQK] <sub>853</sub>	852[QKTDR] <sub>856</sub>
523,287	2090,121	4	1,92	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
661,357	2642,404	4	0,46	806[TFELFKSINKGR] <sub>815</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
562,652	1685,941	3	0,06	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
562,652	1685,941	3	0,06	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
562,652	1685,941	3	0,93	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
879,464	2636,375	3	0,46	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
697,378	2090,121	3	0	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
562,652	1685,941	3	0,5	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>	527[KVAQGSR] <sub>533</sub>
697,032	2089,077	3	1,59	844[TEELELEKQK] <sub>853</sub>	852[QKTDR] <sub>856</sub>
697,031	2089,077	3	0,8	844[TEELELEKQK] <sub>853</sub>	852[QKTDR] <sub>856</sub>
697,031	2089,077	3	0,89	844[TEELELEKQK] <sub>853</sub>	852[QKTDR] <sub>856</sub>
523,284	2090,121	4	-2,75	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	812[SINKGR] <sub>817</sub>
879,464	2636,375	3	0,32	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>
879,464	2636,375	3	0,32	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>	818[KMNIIDSMMLR] <sub>827</sub>

## Anhang

**Tabelle A 14: HADDOCK-Statistik für das C2-binäre Docking der ROS-GCI-KHD.**

Parameters	
HADDOCK Score (a.u.)	-194,7 ± 0,7
Clustergröße (N)	200
RSMD der energieärmsten Struktur (Å)	0,5 ± 0,3
Van-der-Waals-Energie (kcal x mol <sup>-1</sup> )	-95,9 ± 5,0
Elektrostatische Energie (kcal x mol <sup>-1</sup> )	-323,6 ± 26,5
Desolvatisierungsenergie (kcal x mol <sup>-1</sup> )	-46,8 ± 3,7
Restraints violation energy (a.u.)	126,7 ± 23,19
Verdeckte Oberfläche ( <i>Buried surface area</i> , Å <sup>2</sup> )	3027,9 ± 97,6

**Tabelle A 15: C<sub>α</sub>-C<sub>α</sub>-Distanzen der DSBU-Vernetzungen der bovinen ROS-GCI im ROS-GCI-IcD-Modell.** Unter Berücksichtigung aller möglichen Vernetzungskombinationen innerhalb des ROS-GCI-Monomers A oder B (A-A, B-B) und zwischen Monomeren A und B (A-B, B-A) ist die Verknüpfung mit der geringsten Distanz angegeben. Die angegebene Distanz wurde mit dem euklidischen Abstand zwischen den C<sub>α</sub>-Atomen der beteiligten Aminosäuren berechnet. Vernetzungen, die die Distanzbeschränkung von 30 Å überschreiten, sind grau hinterlegt.

	Monomer/ Position 1	Monomer/ Position 2	Euklidischer Abstand [Å]	Kategorisierung (C <sub>α</sub> -C <sub>α</sub> -Distanz < 30 Å)
1	A/642	A/818	15,27	✓
2	A/657	A/673	15,82	✓
3	A/657	A/674	12,6	✓
4	A/657	B/815	15,38	✓
5	A/657	B/815	15,38	✓
6	B/673	B/686	5,91	✓
7	B/673	B/688	7,43	✓
8	A/673	A/818	31,23	x
9	A/674	A/818	30,1	x
10	B/686	B/763	25,24	✓
11	B/688	B/763	23,28	✓
12	A/686	A/818	30,56	x
13	A/688	A/818	36,15	x
14	B/763	A/818	36,73	x
15	A/811	B/818	8,2	✓
16	A/686	B/686	25,88	✓
17	B/686	A/688	28,47	✓
18	A/811	B/818	8,2	✓
19	A/812	B/818	9,8	✓
20	B/815	A/818	17,88	✓
21	A/815	B/824	16,47	✓
22	A/818	B/818	14,69	✓
23	A/851	B/853	11,37	✓
24	A/851	B/854	15,17	✓

## Anhang

**Tabelle A 16:**  $C_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$ -Distanzen der DSBU-Vernetzungen der humanen ROS-GCI im ROS-GCI-IcD-Modell. Unter Berücksichtigung aller möglichen Vernetzungskombinationen innerhalb des ROS-GCI-Monomers A oder B (A-A, B-B) und zwischen Monomeren A und B (A-B, B-A) ist die Verknüpfung mit der geringsten Distanz angegeben. Die angegebene Distanz wurde mit dem euklidischen Abstand zwischen den  $C_{\alpha}$ -Atomen der beteiligten Aminosäuren berechnet.

	<b>Monomer/ Position 1</b>	<b>Monomer/ Position 2</b>	<b>Euklidischer Abstand [Å]</b>	<b>Kategorisierung (<math>C_{\alpha}</math>-<math>C_{\alpha}</math>-Distanz &lt; 30 Å)</b>
1	A/568	A/657	27,29	✓
2	B/642	B/815	10,76	✓
3	A/657	A/673	15,82	✓
4	A/657	A/674	12,6	✓
5	A/657	B/815	15,38	✓
6	B/657	A/818	21,13	✓
7	B/657	A/819	19,64	✓
8	A/673	A/700	25,35	✓
9	A/674	A/700	26,12	✓
10	B/815	A/818	17,88	✓
11	A/851	B/853	11,37	✓
12	A/1051	B/1051	24,43	✓
13	A/1048	A/1053	28,47	✓
14	A/1051	B/1053	22,41	✓

### **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Andrea Sinz bedanken, dass sie mir die Promotion in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Ein besonderer Dank gilt ihr für die stetige Unterstützung, das Vertrauen in ein eigenständiges, wissenschaftliches Arbeiten und die offene Diskussionsbereitschaft. Auch für die Förderung meiner persönlichen Weiterentwicklung durch die Teilnahme an Konferenzen sowie das Präsentieren von Vorträgen bin ich ihr dankbar.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Gary Sawers und Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Zudem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch für die Bereitstellung der ROS-Präparation sowie seine Offenheit und Bereitschaft zum wissenschaftlichen Austausch. Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Daniel Huster und Prof. Dr. Teresa Duda für die Bereitstellung der GCAP-1 und -2-Plasmide sowie Prof. Dr. Daniele Dell'Orco und Dr. Giuditta Dal Cortivo für die Zurverfügungstellung der HEK293-Zellen transfiziert mit ROS-GC1-Plasmid. Auch möchte ich Dr. Cordelia Schiene-Fischer für die Einführung in die Thematik und Bereitstellung der Zellkultur danken.

Vor allem möchte ich mich bei Jun.-Prof. Dr. Panagiotis Kastiris und Dr. Christian Tüting für die gute und aufschlussreiche Zusammenarbeit bedanken. Die Modellierung der intrazellulären Domäne der ROS-GC1 trug sehr zum Erfolg dieser Arbeit bei. Auch bedanke ich mich bei Prof. Dr. Elisabeth Schwarz für ihre fachliche Unterstützung. Ebenfalls danke ich PD Dr. Ralph Golbik für die Unterstützung bei den Experimenten der Fluoreszenzspektroskopie und Dr. Martin Herzberg für die ICP-MS-Bestimmung der Calciumkonzentration. Außerdem möchte ich Dr. Michael Götze für die Bereitstellung der StavroX- und MeroX-Software sowie die Hilfestellung und Weiterentwicklung bei Anwenderproblemen danken.

Zusätzlich möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die ich kennengelernt habe, bedanken. Ich danke Dr. Christian Ihling und Dr. Christian Arlt für die Einführung in die Nutzung verschiedener Massenspektrometer. Besonders möchte ich Dr. Marc Kipping für seine offene und interessierte Art bei Problemstellungen sowie für die sehr angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit danken. Dirk Tänzler danke ich für die

## Danksagung

freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die praktische Einarbeitung und stetige Hilfsbereitschaft. Frau Herbrich-Peters und Frau Mann danke ich sehr für ihr allzeit offenes Ohr, ihre freundliche und hilfsbereite Art und die angenehme Praktikumszeit. Claudio, Christoph, Jana, Christine, Björn und Konny danke ich dafür, dass sie den Alltag in der Uni erleichtert haben sowie für ihre freudige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen Problemen und Fragestellungen. Danke sage ich auch für die geselligen Veranstaltungen und aufheiternden Momente. Zudem danke ich Christine für das Korrekturlesen der Arbeit, die Diskussionsrunden mit und ohne Kaffee sowie die Kreativität zum Pharmafasching.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden, die mich während der ganzen Zeit, vor allem emotional, unterstützt haben. Sie haben dafür gesorgt, die Zeit neben der Promotion zu verschönern und den benötigten Ausgleich zu schaffen. So habe ich auch die schwierigen Zeiten meistern können. Vielen Dank dafür.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und meiner Schwester für ihre umfassende Hilfe, Unterstützung und Geduld in vielfältigster Art und Weise bedanken. Für ihr stetiges Vertrauen bin ich sehr dankbar.

## Publikationen und Tagungsbeiträge

### Originalarbeiten

**Rehkamp A.**, Tänzler D., Tüting C., Kastritis P. L., Iacobucci C., Ihling C. H., Kipping M., Koch K. W., Sinz A., First 3D-Structural Data of Full-length Guanylyl Cyclase 1 in Rod-Outer-Segment Preparation of Bovine Retina by Cross-linking/Mass spectrometry. (2021) *J. Mol. Biol.* (Revision)

Dal Cortivo G., Marino V., Iacobucci C., Vallone R., Arlt C., **Rehkamp A.**, Sinz A. & Dell'Orco D., Oligomeric state, hydrodynamic properties and target recognition of human Calcium and Integrin Binding protein 2 (CIB2). *Sci Rep.* 9, 15058 (2019).

**Rehkamp A.**, Tänzler D., Iacobucci C., Golbik R.P., Ihling C.H., Sinz A., Molecular Details of Retinal Guanylyl Cyclase 1/GCAP-2 Interaction. *Front Mol Neurosci.* 11, 330 (2018).

Iacobucci C., Piotrowski C., **Rehkamp A.**, Ihling C.H., Sinz A., The First MS-Cleavable, Photo-Thiol-Reactive Cross-Linker for Protein Structural Studies. *JASMS.* 30: 139-148 (2018).

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

Hage C., Iacobucci C., **Rehkamp A.**, Arlt C., Sinz A., The First Zero-Length Mass Spectrometry-Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 56:14551-14555 (2017).

### Übersichtsartikel

**Rehkamp A.** und Sinz A., Chemische Vernetzung in Kombination mit Massenspektrometrie: Eine praktische Anleitung für die Proteinstrukturanalyse. *GIT Labor-Fachzeitschrift* (2/2020).



**Vorträge**

“Structural Insights into the Retinal Guanylyl Cyclase 1 by Cross-linking/Mass Spectrometry & Molecular Modelling”

9<sup>th</sup> Symposium on Structural Proteomics, Göttingen, 2019

“Structural Insights into the Retinal Guanylyl Cyclase 1 by Cross-linking/Mass Spectrometry & Molecular Modelling”

1<sup>st</sup> Fall Meeting, DGMS Young Scientists, Hünfeld, 2019

“Retinal Guanylyl Cyclase 1/GCAP-2 Interaction Studied by Cross-Linking/Mass Spectrometry“

Pharma-Research Day, Institut für Pharmazie, Halle, 2019

“Retinal Guanylyl Cyclase 1/GCAP-2 Interaction Studied by Cross-Linking/Mass Spectrometry“

52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Rostock, 2019

**Kurzvorträge**

“Interaction studies between catalytic domain of ROS-GC and GCAP-2“

Neuronal Calcium Sensors in Health and Disease, Delmenhorst, 2016

“Structural insights into retinal guanylyl cyclase-GCAP-2 interaction determined by cross-linking and mass spectrometry“

6<sup>th</sup> Symposium on Structural Proteomics, Dortmund, 2016

**Poster**

“Structural Insights into the Retinal Guanylyl Cyclase 1 by Cross-linking/Mass Spectrometry & Molecular Modelling”

53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Münster, 2020

“Structural Insights into Retinal Guanylyl Cyclase/GCAP-2 Interaction by Cross-linking/Mass Spectrometry“

1<sup>st</sup> Joint French/German Mass Spectrometry Conference, Saarbrücken, 2018

51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie

“Structural insights into Retinal Guanylyl Cyclase-GCAP-2 Interaction determined by Cross-linking and Mass Spectrometry“

7<sup>th</sup> Symposium on Structural Proteomics, Wien, 2017

“Structural Insights into Retinal Guanylyl Cyclase/GCAP-2 Interaction by Cross-linking and Mass Spectrometry“

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

“Interaction studies between catalytic domain of ROS-GC and GCAP-2“

Neuronal Calcium Sensors in Health and Disease, Delmenhorst, 2016

“Structural Insights into Retinal Guanylyl Cyclase-GCAP-2 Interaction determined by Cross-linking and Mass Spectrometry“

6<sup>th</sup> Symposium on Structural Proteomics, Dortmund, 2016

## Selbständigkeitserklärung

### **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt und auch nicht veröffentlicht. Ich habe vor dieser Arbeit keine andere Promotionsarbeit eingereicht.

Halle (Saale), 09.02.2021

Anne Rehkamp

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Geburtsdatum, -ort 06.05.1992, Ankum  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Hochschulausbildung

11/2016 – 12/2020 Wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Doktorandin  
„*Strukturelle Charakterisierung der retinalen Guanylatzyklase 1*“, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

03/2016 – 09/2016 Masterarbeit  
„*Studium der Interaktion zwischen der retinalen Guanylatzyklase und GCAP-2*“, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

06/2015 – 11/2015 Wissenschaftliche Hilfskraft  
„*Genotypisierung von Arabidopsis thaliana Mutanten*“, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2014 – 09/2016 Master of Science, Biochemie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

06/2014 – 09/2014 Bachelorarbeit  
„*Untersuchungen zum eisenabhängigen Wurzelwachstum unter Phosphatmangelbedingungen und Expressionsanalyse von ‚Low Phosphate Root 2‘ in Arabidopsis thaliana*“, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abteilung Molekulare Signalverarbeitung

## Lebenslauf

10/2011 – 09/2014

Bachelor of Science, Biochemie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### **Schulausbildung**

07/2011

Abitur, Gymnasium Bersenbrück

Halle (Saale), 09.02.2021

Anne Rehkamp