

Identifizierung von Protein-Protein- Interaktionen und strukturelle Charakterisierung der humanen Proteinkinase D2 mittels Massenspektrometrie-basierter Methoden



Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn

Dipl.-Biol. Björn Häupl

geboren am 15.03.1985 in Meiningen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andrea Sinz
2. Prof. Dr. Elisabeth Schwarz
3. Prof. Dr. Katrin Marcus (Ruhr-Universität Bochum)

Datum der öffentlichen Verteidigung:

23.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XII
Zusammenfassung	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Proteinkinase D.....	5
1.1.1 Klassifizierung und Struktur-Funktionsbeziehungen.....	5
1.1.2 Aktivierung und Phosphorylierung	7
1.1.3 Subzelluläre Lokalisierung.....	9
1.1.4 Die Rolle der Proteinkinase D am Golgi-Apparat	10
1.2 Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen.....	15
1.3 Chemische und photoinduzierte Vernetzung von Proteinen	16
1.3.1 Reaktivität von Vernetzungsreagenzien.....	18
1.3.1.1 Chemische Vernetzung mittels aminreaktiver Reagenzien.....	18
1.3.1.2 Photoinduzierte Vernetzung mittels Photo-Aminosäuren	19
1.4 Massenspektrometrie zur Analytik von Biomolekülen	20
1.4.1 Elektrospray-Ionisation	21
1.4.2 Orbitrap Fusion-Hybridmassenspektrometer	23
1.4.2.1 Orbitrap.....	25
1.4.2.2 Lineare Ionenfalle.....	27
1.5 Massenspektrometrie-basierte Protein- und Peptidanalytik	28
1.5.1 Quantitative Massenspektrometrie-basierte Proteinanalyse.....	30
1.5.1.1 Proteinquantifizierung durch Isotopenmarkierung.....	30
1.5.1.2 Markierungsfreie Proteinquantifizierung	32
1.5.2 Massenspektrometrische Analyse von Vernetzungsprodukten.....	33
1.6 Zielstellung der Arbeit	37
2 Material.....	39
2.1 Chemikalien	39
2.2 Zellsysteme	40
2.3 Nährmedien und Reagenzien für die Zellkultur	41
2.4 Proteine / Enzyme	41
2.5 Pufferlösungen und Fließmittel für die Chromatographie.....	42
2.6 Komplettsysteme (Kits)	43
2.7 Verbrauchsmaterial.....	44
2.8 Geräte.....	44

2.9 Elektronische Datenverarbeitung.....	46
3 Methoden	48
3.1 Zellbiologische Methoden	48
3.1.1 Expression der humanen Proteinkinase D2 als GST-Fusionsprotein in Sf-21-Insektenzellen	48
3.1.2 Kultivierung der HeLa-Zelllinie.....	49
3.1.2.1 Zellkultur für die subzelluläre Fraktionierung	49
3.1.2.2 Einbau photoaktivierbarer Aminosäuren in HeLa-Zellen	50
3.2 Proteinbiochemische Methoden.....	50
3.2.1 Bearbeitung des zellulären Ausgangsmaterials und Proteinextraktion.....	50
3.2.1.1 Zellaufschluss für die Isolierung des GST-PKD2- Fusionsproteins aus Sf-21-Insektenzellen	50
3.2.1.2 Subzelluläre Fraktionierung von HeLa-Zellen und Anreicherung der Golgi-Apparat-Fraktion.....	51
3.2.1.3 Gewinnung der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion aus HeLa-Zellen.....	51
3.2.1.4 Proteinextraktion für Proteomanalysen von subzellulären Fraktionen und die Analyse des Einbaus der Photo-Aminosäuren	52
3.2.2 Flüssigkeitschromatographische Reinigung des GST-PKD2- Fusionsproteins aus Sf-21-Zelllysaten	52
3.2.2.1 GST-Affinitätschromatographie von Sf-21-Zelllysaten.....	52
3.2.2.2 Anionenaustausch-Chromatographie des Eluats der GST- Affinitätschromatographie.....	53
3.2.3 Entfernung der GST-Affinitätsmarkierung des GST-PKD2- Fusionsproteins.....	53
3.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität des GST-PKD2-Fusionsproteins.....	54
3.2.5 Aktivierung der Photo-Aminosäuren	54
3.2.6 Affinitätsanreicherung und Vernetzung von PKD2- Interaktionspartnern	55
3.2.7 Chemische Vernetzung der PKD2	56
3.3 Bioanalytische Methoden	57
3.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	57
3.3.2 Gelelektrophoretische Trennung und Färbung der Proteine	57
3.3.3 Enzymatische Spaltung von Proteinen für die massen- spektrometrische Analyse	58
3.3.3.1 Spaltung von Proteinen in einer Polyacrylamid-Gelmatrix.....	58
3.3.3.2 Proteinspaltung in Lösung.....	59
3.3.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie	59
3.4 Bioinformatische Methoden	61
3.4.1 Identifizierung und markierungsfreie Quantifizierung von Proteinen aus massenspektrometrischen Rohdaten	61

3.4.2	Annotation identifizierter Proteine der subzellulären Fraktionierung.....	63
3.4.3	Einbau der Photo-Aminosäuren	63
3.4.4	Analyse und statistische Auswertung von Quantifizierungsdaten	64
3.4.5	Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen	64
3.4.6	Analyse der chemischen Vernetzung der PKD2	65
4	Ergebnisse.....	66
4.1	Charakterisierung des GST-PKD2-Fusionsproteins.....	66
4.1.1	Rekombinante Expression und Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins.....	66
4.1.2	Entfernung der GST-Affinitätsmarkierung des GST-PKD2-Fusionsproteins.....	67
4.1.3	Qualitative Analyse der Enzymaktivität des GST-PKD2-Fusionsproteins.....	70
4.2	Methodenentwicklung zur Anreicherung und Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern mittels Vernetzung und Massenspektrometrie	72
4.3	Subzelluläre Fraktionierung und Golgi-Apparat-Anreicherung.....	74
4.4	Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern aus der zytosolischen Fraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion	77
4.4.1	PKD2-Interaktionspartner aus der zytosolischen Fraktion	79
4.4.2	PKD2-Interaktionspartner aus der Golgi-Apparat-Fraktion	83
4.5	Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion.....	87
4.5.1	Einbau der Photo-Aminosäuren in HeLa-Zellen.....	88
4.5.2	Aktivierung der Photo-Aminosäuren	89
4.5.3	Identifizierung und statistische Analyse angereicherter Proteine aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion.....	90
4.6	Netzwerk identifizierter PKD2-Interaktionspartner	94
4.7	Chemische Vernetzung zur strukturellen Charakterisierung der humanen PKD2.....	96
5	Diskussion.....	102
5.1	Expression und Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins	102
5.2	Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern	102
5.2.1	Gewinnung subzellulärer Fraktionen aus HeLa-Zellen	103
5.2.2	Einbau von Photo-Methionin und Photo-Leucin in HeLa-Zellen.....	103
5.2.3	Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern mittels Affinitätsanreicherung, Vernetzung und massenspektrometrischer Analyse.....	104
5.3	Charakterisierung der mittels Vernetzung identifizierten PKD2-Interaktionspartner	108
5.3.1	Identifizierte PKD2-Interaktionspartner mit direkten oder abgeleiteten funktionellen Zusammenhängen zur PKD	109
5.3.1.1	Arp2/3-Proteinkomplex	109
5.3.1.2	14-3-3-Proteinfamilie	111

5.3.1.3	Proteinphosphatase 2A	111
5.3.1.4	Glykogensynthase-Kinase-Proteinfamilie	111
5.3.1.5	Casein-Kinase-Proteinfamilie.....	112
5.3.1.6	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	112
5.3.1.7	Tubuline.....	113
5.3.2	Identifizierte PKD2-Interaktionspartner mit bisher unbekanntem funktionellen Bezug zur PKD	113
5.3.2.1	Interaktionspartner mit Bedeutung für den zellulären Transport.....	113
5.3.2.2	Interaktionspartner mit Bedeutung für die zelluläre Signaltransduktion.....	114
5.3.2.3	Interaktionspartner mit Bedeutung für die Zellproliferation	115
5.3.2.4	Lipidbindende Interaktionspartner	115
5.3.2.5	Interaktionspartner der Chaperon-Proteinfamilie.....	116
5.3.2.6	Proteinmodifizierende Interaktionspartner	116
5.3.2.7	Nicht klassifizierte Interaktionspartner	116
5.4	Strukturelle Charakterisierung der PKD2 mittels chemischer Vernetzung	118
5.5	Ausblick	121
	Literaturverzeichnis	122
	Anhang	XIII
	Publikationen	XLI
	Lebenslauf	XLIII
	Danksagung	XLIV
	Eidesstattliche Erklärung	XLVI

Abkürzungsverzeichnis

Die abgekürzte Bezeichnung proteinogener Aminosäuren im Einbuchstabencode entspricht den Nomenklaturempfehlungen der IUPAC-IUBMB-Kommission.

2DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
Å	Ångström
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AE	Affinitätsanreicherung (<i>affinity enrichment</i>)
AP	Affinitätsreinigung (<i>affinity purification</i>)
API	Atmosphärendruck-Ionisation
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQUA	Absolute Proteinquantifizierung
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
BS ² G	Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat
Bu	γ-Aminobuttersäure-Fragment des BuUrBu-Reagenzes
BuUrBu	4-{3-[3-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yloxycarbonyl)-propyl]-ureido}butansäure 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-ester
CERT	Ceramid-Transferprotein
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision-induced dissociation</i>)
CK	Casein-Kinase
Co-IP	Coimmunopräzipitation
CRD	Cystein-reiche Domäne
CRM	Modell des geladenen Rückstands (<i>charged residue model</i>)
DAG	Diacylglycerol
DDM	N-Dodecyl-β-D-maltosid
DIGE	Differentielle Gelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

DMEM-LM	DMEM ohne Leucin (L) und Methionin (M)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHI	Elektrohydrodynamische Ionisation
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETD	Elektronentransferdissoziation
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
FDR	Rate falsch-positiver Zuordnungen (<i>false discovery rate</i>)
FKS	Fötales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FT	Fourier-Transformation
FTICR	Fourier-Transformation-Ionenzyklotronresonanz
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HCD	CID mit erhöhter Kollisionsenergie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HF	<i>High field</i>
IAA	Iodacetamid
ICAT	<i>Isotope-coded affinity tag</i>
ICPL	<i>Isotope-coded protein labeling</i>
IEM	Modell der Ionenverdampfung (<i>ion evaporation model</i>)
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IRM	<i>Ion routing</i> -Multipol
iTRAQ	<i>Isobaric tags for absolute and relative quantification</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC/MS	Massenspektrometrie/Flüssigkeitschromatographie-Kopplung
LFQ	Markierungsfreie Proteinquantifizierung (<i>label-free quantification</i>)
LTQ	Lineare Ionenfalle

<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDCK	<i>Madine Darby Canine Kidney</i>
MGF	<i>Mascot generic format</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NCE	Normalisierte Kollisionsenergie (<i>normalized collision energy</i>)
NES	Nukleäres Exportsignal
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NLS	Nukleäre Lokalisierungssequenz
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NPF	<i>Nucleation promoting factor</i>
OSBP	Oxysterol-bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PH	Pleckstrin-Homologie
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PI4KIII β	Phosphatidylinositol-4-kinase III β
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PPI	Protein-Protein-Interaktionen
PSM	<i>Peptide spectral match</i>
RF	Radiofrequenz
RMSD	Mittlere quadratische Abweichung (<i>root-mean-square deviation</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SILAC	<i>Stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TAP	Tandem-Affinitätsreinigung
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin

TFA	Trifluoressigsäure
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TIC	Totalionenstrom (<i>total ion current</i>)
TMT	<i>tandem mass tags</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ur	Harnstoff-Fragment des BuUrBu-Reagenzes
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
XL	Vernetzung (<i>cross-linking</i>)
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid-System

Abbildungsverzeichnis

Hauptteil

Abbildung 1:	Domänenstruktur der Proteinkinase D	7
Abbildung 2:	Subzelluläre Lokalisierung der Proteinkinase D	10
Abbildung 3:	Funktion der Proteinkinase D am <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk.....	13
Abbildung 4:	Interaktion der Proteinkinase D2 und ADP-Ribosylierungsfaktor 1 am <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk.....	14
Abbildung 5:	Chemische Struktur von Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat und Reaktionsschema von Sulfo-NHS-Estern mit primären Aminogruppen in Proteinen.....	19
Abbildung 6:	Chemische Strukturen der Photo-Aminosäuren und Reaktionsschema der photoinduzierten Proteinvernetzung mit Diazirinen	20
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des ESI-Prozesses	22
Abbildung 8:	Aufbau des Orbitrap Fusion-Hybridmassenspektrometers.....	24
Abbildung 9:	Schema der C-Trap-Orbitrap-Anordnung	26
Abbildung 10:	Schematische Darstellung einer linearen Quadrupol-Ionenfalle	27
Abbildung 11:	Nomenklatur von Peptidfragmentationen	29
Abbildung 12:	Klassifizierung von vernetzten Peptiden aus der enzymatischen Spaltung vernetzter Proteine bzw. Proteinkomplexe.....	34
Abbildung 13:	Chemische Struktur des CID-spaltbaren BuUrBu-Reagenzes und Analyse der Vernetzungsprodukte.....	36
Abbildung 14:	SDS-PAGE-Analyse der Isolierung des GST-PKD2-Fusionsproteins aus Sf-21-Insektenzellen.....	67
Abbildung 15:	SDS-PAGE-Analyse der proteolytischen Entfernung der GST- Affinitätsmarkierung des GST-PKD2-Fusionsproteins	68
Abbildung 16:	SDS-PAGE-Analyse der Abtrennung markierungsfreier PKD2 mittels GST-Affinitätschromatographie	69
Abbildung 17:	Qualitative Analyse der Enzymaktivität des GST-PKD2- Fusionsproteins.....	71
Abbildung 18:	Analytische Strategie zur Anreicherung, Fixierung und Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern.....	73
Abbildung 19:	Zuordnung identifizierter Proteine des Homogenats und der subzellulären Fraktionen von HeLa-Zellen zu einzelnen Zellkompartimenten.....	75
Abbildung 20:	Repräsentative Golgi-Apparat-Proteine im Homogenat und in subzellulären Fraktionen von HeLa-Zellen	76
Abbildung 21:	SDS-PAGE-Analyse der Affinitätsanreicherung und chemischen Vernetzung von PKD2-Interaktionspartnern.....	78

Abbildung 22: Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Anreicherungs- experimenten mit GST-PKD2 und der zytosolischen Fraktion.....	80
Abbildung 23: Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine aus der zytosolischen Fraktion.....	81
Abbildung 24: Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Anreicherungs- experimenten mit GST-PKD2 und der Golgi-Apparat-Fraktion.....	84
Abbildung 25: Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine aus der Golgi-Apparat-Fraktion.....	85
Abbildung 26: Analytische Strategie zur Affinitätsanreicherung und photo- induzierten Vernetzung von PKD2-Interaktionspartnern.....	87
Abbildung 27: Einbau von Photo-Methionin und Photo-Leucin in Proteine von HeLa-Zellen.....	89
Abbildung 28: Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Anreicherungs- experimenten mit GST-PKD2 und der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion.....	91
Abbildung 29: Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine aus der photoaffinitäts-markierten Proteinfraktion.....	92
Abbildung 30: Netzwerk identifizierter Protein-Interaktionspartner der Proteinkinase D2	95
Abbildung 31: SDS-PAGE-Analyse der Vernetzung von PKD2 mit dem aminreaktiven BuUrBu-Reagenz.....	96
Abbildung 32: Fragmentionenspektren zur Identifizierung intra- und inter- molekularer BuUrBu-Vernetzungsprodukte der PKD2	99
Abbildung 33: Grafische Darstellung intra- und intermolekularer PKD2-Vernetzungen	100
Abbildung 34: Markierungsfreie Quantifizierung signifikant angereicherter Proteine der photoinduzierten Vernetzung.....	106
Abbildung 35: Klassifizierung vernetzungsspezifisch angereicherter Proteine	109

Anhang

Abbildung A1:	Grafische Darstellung der Sequenzabdeckung identifizierter Proteine	XIII
Abbildung A2:	Anreicherung der Golgi-Apparat-Fraktion	XIV
Abbildung A3:	Verteilung von LFQ-Intensitätswerten am Beispiel des Vergleichs der vernetzten PKD2-Probe und der Matrix-Kontrollprobe der zytosolischen Fraktion.....	XIV
Abbildung A4:	Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Kontrollexperimenten mit der zytosolischen Fraktion und Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine	XV
Abbildung A5:	Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Kontrollexperimenten mit der Golgi-Apparat-Fraktion und Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine	XVI
Abbildung A6:	Abhängigkeit des Aktivierungsgrades der Diazirine in Photo-Aminosäuren von der UV-A-Bestrahlungsdosis.....	XVII
Abbildung A7:	Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Kontroll-experimenten mit der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction und Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine	XVIII
Abbildung A8:	FASTA-Annotation und Sequenz der humanen Proteinkinase D2	XIX
Abbildung A9:	Bändermodell eines PKD2-Strukturmodells.....	XX
Abbildung A10:	Intramolekulare Vernetzungen in einem Bändermodell des mittels der I-TASSER-Software erstellten PKD2-Strukturmodells.....	XX
Abbildung A11:	α - α -Abstände der identifizierten Vernetzungen zwischen Lysin im vorhergesagten PKD2-Strukturmodell.....	XXI
Abbildung A12:	Fragmentationenspektren zur Identifizierung intra- und inter-molekularer Vernetzungen der PKD2	XXII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probenübersicht der durchgeführten Anreicherungsexperimente	56
Tabelle 2: Extinktionskoeffizienten für die Berechnung von Proteinkonzentrationen	57
Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE.....	58
Tabelle 4: Verwendete LC/MS/MS-Methoden	61
Tabelle 5: Elektronische Datenverarbeitung und Parameter zur Prozessierung massenspektrometrischer Rohdaten.....	62
Tabelle 6: Ergebnisse der Proteinidentifizierung vor und nach der Abspaltung der GST-Markierung des kommerziellen GST-PKD2-Fusionsproteins.....	69
Tabelle 7: Identifizierung und Statistik der mittels aminreaktiver Vernetzung aus der zytosolischen Fraktion angereicherten Proteine	82
Tabelle 8: Identifizierung und Statistik der mittels aminreaktiver Vernetzung aus der Golgi-Apparat-Fraktion angereicherten Proteine	86
Tabelle 9: Identifizierung und Statistik der mittels photoinduzierter Vernetzung aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion angereicherten Proteine	93
Tabelle 10: Intra- und intermolekulare PKD2-Vernetzungsprodukte	97

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Identifizierung von Interaktionspartnern sowie die strukturelle Charakterisierung der humanen Proteinkinase D2 (PKD2) mittels Methoden, die auf der Vernetzung von Proteinen und der nachfolgenden Analyse mittels Massenspektrometrie (MS) basieren.

Zur Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern wurde eine analytische Strategie etabliert, welche die Affinitätsanreicherung und kovalente Fixierung der Protein-Bindungspartner durch aminreaktive oder photoinduzierte Vernetzung mit der massenspektrometrischen Analyse zur Proteinidentifizierung und -quantifizierung kombiniert. Die Anreicherung erfolgte aus komplexen biologischen Proben, die aus HeLa-Zellkulturen gewonnen und mittels MS-basierter Proteomanalysen charakterisiert wurden. Für aminreaktive Vernetzungsexperimente wurden die zytosolische Fraktion und die Golgi-Apparat-Fraktion genutzt. Die Identifizierung der Proteine in den subzellulären Fraktionen und deren Annotation anhand ihrer subzellulären Lokalisierung zeigte eine definierte, fraktionsspezifische Anreicherung. Somit ermöglichte die Verwendung der subzellulären Fraktionen eine analytische Fokussierung auf diese angereicherten Proteinpopulationen und die Identifizierung potentieller zytosolischer und Golgi-Apparat-assoziiierter PKD2-Interaktionspartner. Die identifizierten Protein-Bindungspartner ermöglichten Rückschlüsse auf die Rolle der PKD2 am Golgi-Apparat bzw. dem *trans*-Golgi-Netzwerk, sowie auf assoziierte Wechselwirkungen mit zytosolischen Effektorproteinen. Neben der aminreaktiven Vernetzung von PKD2-bindenden Proteinen wurden komplementäre Informationen mittels photoinduzierter Vernetzung von PKD2-Interaktionspartnern erhalten. Dazu erfolgte der Einbau der Photo-Aminosäuren Photo-Methionin und Photo-Leucin in die Proteine von HeLa-Zellkulturen. Die lösliche, photoaffinitätsmarkierte Proteinfraction wurde als biologisches Ausgangsmaterial für die Identifizierung von PKD2-Bindungspartnern verwendet.

Nach der Affinitätsanreicherung und Vernetzung wurden massenspektrometrische Analysen zur Identifizierung und Quantifizierung von PKD2-Interaktionspartnern durchgeführt. Die statistische Analyse der Signalintensitäten der markierungsfreien Proteinquantifizierung resultierte in der Identifizierung von insgesamt 39 Proteinen, deren Anreicherung aufgrund der aminreaktiven bzw. photoinduzierten Vernetzung

erfolgte. Die identifizierten PKD2-Interaktionspartner wiesen im Einklang mit der Vielfältigkeit PKD-abhängiger Signaltransduktionswege eine breite funktionelle Heterogenität auf und deckten verschiedene zelluläre Lokalisationen ab, wobei das Zytosol und der Zellkern dominierten. Für eine Reihe der identifizierten Protein-Bindungspartner wurden bereits direkte funktionelle Zusammenhänge zur PKD bzw. zu assoziierten PKD-Protein-Interaktionen beschrieben. Zusätzlich erfolgte die Identifizierung verschiedener, bisher noch nicht beschriebener PKD2-Protein-Interaktionen, die zukünftig zur Aufklärung der PKD2-abhängigen Signalwege beitragen könnten. Hervorzuheben sind dabei der sieben Untereinheiten umfassende Arp2/3-Proteinkomplex und der heterotetramere AP-2-Komplex, von denen alle sieben bzw. drei Untereinheiten nach der aminreaktiven bzw. photoinduzierten Vernetzung angereichert wurden. Diese Proteinkomplexe sind an der dynamischen Assemblierung des Zytoskeletts sowie der Regulation des zellulären Vesikeltransportes beteiligt. Ihre Identifizierung als PKD2-Interaktionspartner unterstreicht die bedeutende Funktion der PKD2 für diese zellulären Prozesse.

Aufgrund der begrenzten Datenlage zur Proteinstruktur von PKD2, deren Kenntnis die Grundlage für die Ableitung von Struktur-Funktionsbeziehungen der PKD2 mit den hier identifizierten Protein-Interaktionspartnern darstellt, war ein weiterer Aspekt dieser Arbeit, durch chemische Proteinvernetzung und massenspektrometrische Analyse der Vernetzungsprodukte molekulare Distanzbeschränkungen innerhalb der PKD2 zu erhalten. Vernetzungsexperimente mit dem MS-spaltbaren, aminreaktiven BuUrBu-Reagenz, massenspektrometrische Analysen und die bioinformatische Auswertung der Reaktionsprodukte führten zur Identifizierung von 34 intramolekularen sowie vier intermolekularen Vernetzungsprodukten im Monomer bzw. Homodimer von PKD2. Diese lieferten Distanzbeschränkungen, welche die Erstellung von PKD2-Strukturmodellen bzw. die Validierung bereits vorhandener Modelle erlauben. Ein mittels der I-TASSER-Anwendung automatisch erstelltes Strukturmodell der PKD2 erfüllte allerdings einen Großteil der identifizierten intramolekularen Distanzbeschränkungen nicht. Daher stellt dieses initiale Modell vermutlich keine repräsentative Proteinstruktur der humanen PKD2 dar. Dennoch können die hier erhaltenen Distanzbeschränkungen für die manuelle bioinformatische Erstellung verbesserter PKD2-Proteinstrukturmodelle bzw. deren Validierung genutzt werden.

Summary

In this thesis, protein interaction partners of human protein kinase D2 (PKD2) were identified and PKD2 was structurally characterized using cross-linking/mass spectrometry (MS) approaches.

In order to identify PKD2 interaction partners, an analytical strategy was established, combining the affinity enrichment and the covalent fixation of protein binding partners by amine-reactive or photo-induced cross-linking and MS analysis. For amine-reactive cross-linking experiments between PKD2 and protein interaction partners, the cytosolic and the Golgi apparatus subfractions of HeLa cells were utilized. The initial identification of proteins in the subcellular fractions and annotation according to their subcellular localization showed a fraction-specific enrichment. Thus, the use of subcellular fractions allowed focusing on these enriched protein populations and the identification of potential cytosolic and Golgi apparatus-associated protein interaction partners of PKD2. The PKD2 binding partners identified will give insights into the role of PKD2 at the Golgi apparatus and the *trans*-Golgi network, as well as PKD2 interactions associated with cytosolic effector proteins. To gain complementary information on PKD2 interaction partners, the analytical strategy was extended towards photo-induced cross-linking. For this, the photo-amino acids photo-methionine and photo-leucine were incorporated into proteins in HeLa cell cultures and the soluble, photo affinity-labeled protein fraction was used to identify PKD2 binding partners. The incorporation rates of the photo-amino acids were determined via proteome analyses of the photo affinity-labeled protein fraction.

After the affinity enrichment and the amine-reactive or photo-induced cross-linking experiments, MS analyses were conducted to identify and quantify PKD2 interaction partners. The statistical analysis of signal intensities from label-free protein quantification led to the overall identification of 39 proteins that were specifically enriched upon amine-reactive and photo-induced cross-linking. The PKD2 interaction partners identified exhibit a broad functional heterogeneity, reflecting the variety of PKD signaling and covering multiple cellular localizations. The cytosol and the nucleus were found to be the dominating locations of PKD2 binding partners identified in this work. For several protein interaction partners identified, direct functional relationships to PKD or PKD-associated proteins have already been described. Moreover, PKD2

protein interactions were identified, which have not been described so far and can be expected to facilitate the elucidation of the mechanisms how PKD2 is involved in cellular signaling processes. The identification of all seven subunits of the Arp2/3 protein complex and three subunits of the heterotetrameric AP-2 complex as PKD2 interaction partners is of special importance. The Arp2/3 and AP-2 protein complexes are involved in the dynamic assembly of the cytoskeleton as well as in the regulation of cellular vesicle transport. Therefore, their identification as PKD2 binding partners implicates important functions of PKD2 regarding these cellular processes.

Due to the limited availability of structural data of PKD2, which is crucial for establishing structure-function relationships between PKD2 and the protein interaction partners identified herein, an additional aspect of this work was to derive distance constraints within PKD2 using chemical cross-linking and MS. Cross-linking experiments were conducted with the amine-reactive, MS-cleavable BuUrBu reagent. MS analyses and bioinformatics studies led to the identification of 34 intramolecular and four intermolecular cross-linked products of PKD2 in the monomer and in the homodimer, respectively. These results deliver distance information that will aid in generating PKD2 structural models and in validating existing models. Applying the distance constraints to a model of PKD2 that had been generated automatically using the I-TASSER application revealed that a large number of intramolecular distance constraints were not satisfied. Thus, this initial model does probably not depict a representative structural model of human PKD2. Nevertheless, the distance constraints obtained in this work could be used to manually generate or to validate improved structural models of PKD2.

1 Einleitung

1.1 Proteinkinase D

Die humane Proteinkinase D (PKD) gehört zur Familie der Proteinkinase C (PKC)-assoziierten Calmodulin-abhängigen Serin/Threonin-Kinasen. Sie erfüllt bei vielen zellulären Funktionen eine wichtige Rolle, beispielsweise für die Zellproliferation und -motilität, den zellulären Vesikeltransport oder die dynamische Assemblierung des Zytoskeletts [1-3]. Einhergehend mit der Aufklärung der Rolle von PKD in zellulären Prozessen wurden bisher eine Reihe von Protein-Protein-Interaktionen bzw. Substrate der PKD charakterisiert. So wurde im Zusammenhang mit der Zellproliferation die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade durch eine PKD-abhängige Phosphorylierung der MAPK beschrieben [4]. Die Bedeutung der PKD für die Zellmotilität wurde erstmals in neuronalen Zellen durch die Identifizierung von Kidins220 (Kinase-D-interagierendes Substrat mit einem Molekulargewicht von 220 kDa) als Interaktionspartner belegt, dem ersten identifizierten physiologischen PKD-Substrat [5]. Die PKD beeinflusst die Zellmotilität und -migration außerdem durch die Regulation der zytoskeletalen Dynamik, die unter anderem für zelluläre Transportvorgänge von Bedeutung ist. Ein in diesem Zusammenhang identifizierter PKD-Interaktionspartner ist das Aktin-modifizierende Protein Cortactin [6, 7].

Basierend auf ihrer vielfältigen Einbindung in verschiedene Signaltransduktionswege sind die PKD-Isoformen an zellulären Prozessen beteiligt, die auch pathologisch relevant sind. Daher ist die Aufklärung der Funktionen von PKD für die klinische Forschung von großem Interesse [8].

1.1.1 Klassifizierung und Struktur-Funktionsbeziehungen

Die humane PKD-Familie umfasst drei Isoformen: PKD1 (Genname: *PRKD1*, UniProt-Eintrag: Q15139), PKD2 (Genname: *PRKD2*, UniProt-Eintrag: Q9BZL6) und PKD3 (Genname: *PRKD3*, UniProt-Eintrag: O94806) [9]. PKD1 stellt die zuerst charakterisierte und am intensivsten studierte Variante dar [10]. In Folgestudien wurden PKD3 [11] und PKD2 [12] als weitere Mitglieder der PKD-Proteinfamilie identifiziert. Ursprünglich erfolgte die Klassifizierung von PKD1 und PKD3 als neue Untergruppe

der PKC-Familie (PKC μ bzw. PKC ν). Jedoch zeigte sich, dass die Ähnlichkeit zwischen PKD und PKC auf die Homologie der Diacylglycerol (DAG)-bindenden C1-Domäne beschränkt ist, während PKD im Gegensatz zu PKC keine Calcium-sensitive C2-Domäne aufweist und nur eine niedrige Homologie zwischen den konservierten Kinasedomänen besteht. Die Aufklärung dieser Unterschiede führte zur Definition von PKD als neue Untergruppe der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen [13].

Die Isoformen der PKD-Familie weisen eine einheitliche modulare Domänenstruktur auf, die in Abbildung 1 am Beispiel von PKD2 als Zielprotein der vorliegenden Arbeit dargestellt ist. Der *N*-terminale regulatorische Sequenzbereich umfasst eine Cysteinreiche Domäne (CRD) mit zwei Zinkfinger-Subdomänen (C1a und C1b) sowie eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne. Im *C*-terminalen katalytischen Sequenzbereich befindet sich die Kinasedomäne. Während die Funktion der katalytischen Domäne in der Kinaseaktivität zur Serin/Threonin-Phosphorylierung spezifischer Substrate besteht, erfolgt über die *N*-terminalen Domänen die Regulation der Enzymaktivität. Die Deletion der CRD oder der PH-Domäne bzw. des vollständigen regulatorischen Sequenzbereiches führt zur maximalen Aktivierung der Enzymaktivität, was einen inhibitorischen Effekt und somit die Feinsteuerung der PKD-Aktivität durch diese Domänen belegt [14, 15]. Dabei erfüllen die Subdomänen der CRD verschiedene Funktionen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zu Phorbolestern als strukturelle Analoga von DAG charakterisiert wurden [16]. Die C1a-Subdomäne bindet Phorbolster mit niedriger Affinität und ist für die Aktivierung der Enzymaktivität essentiell, reguliert aber nicht die zelluläre Translokation der PKD [16]. Die Bindung von Phorbolestern durch die C1b-Subdomäne hingegen erfolgt mit hoher Affinität und beeinflusst die Proteintranslokation, jedoch nicht die Enzymaktivität [16]. Diese Beobachtungen unterstreichen zudem die duale Rolle von DAG für die Aktivierung und zelluläre Lokalisierung der PKD.

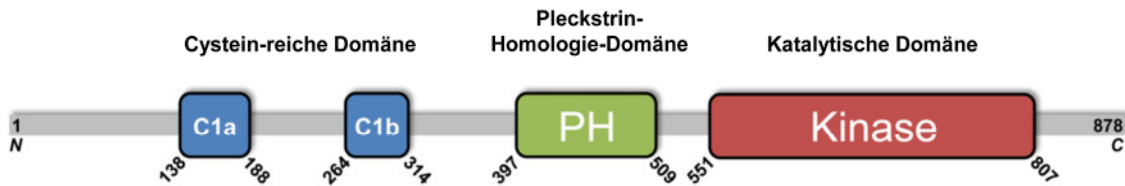


Abbildung 1: Domänenstruktur der Proteinkinase D

Die drei Isoformen der Proteinkinase D (PKD)-Familie (PKD1, PKD2, PKD3) teilen eine modulare Domänenstruktur, die am Beispiel von PKD2 schematisch gezeigt ist. Der regulatorische *N*-terminale Sequenzbereich umfasst eine Cystein-reiche Domäne (CRD) mit zwei Zinkfinger-Subdomänen (C1a und C1b) und eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne. Im *C*-terminalen katalytischen Sequenzbereich befindet sich die Kinasedomäne. Abbildung nach [2].

Bisherige Untersuchungen zur Charakterisierung der PKD-Proteinfamilie haben zu einem guten Verständnis ihrer Domänenstruktur und den darauf basierenden funktionellen Eigenschaften geführt. Allerdings existieren bis heute nur wenige Informationen zur dreidimensionalen Proteinstruktur der PKD-Isoformen, die zur Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und Konformationsänderungen beitragen können. Für die humane PKD2 enthält die Proteinstrukturdatenbank (PDB, <http://www.rscb.org>) [17] bisher ausschließlich Röntgenkristallographie-Daten eines Phosphopeptids (Aminosäuren 526 bis 534), das an den humanen Haupthistokompatibilitätskomplex gebunden ist (Einträge 3BGM, 4NNX und 4NNY), sowie Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie-Daten zur PH-Domäne der PKD2 (Eintrag 2COA).

1.1.2 Aktivierung und Phosphorylierung

Die Aktivierung der PKD beruht auf verschiedenen zellulären Prozessen. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus besteht in der Aufhebung der Autoinhibition der Enzymaktivität [18]. Dies kann durch die Interaktion von Kinasen der PKC-Familie mit der PH-Domäne induziert werden, wobei Serin-Seitenketten in der Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne der PKD transphosphoryliert werden [19]. Diese sind zum Beispiel S-744 / S-748 der PKD1 [20] und S-706 / S-710 der PKD2 [21]. Die gezielte Mutagenese der jeweiligen Aminosäuren führt zum Verlust der katalytischen Aktivität beim Austausch zu Alanin [22] sowie zu konstitutiver bzw. gesteigerter basaler Enzymaktivität beim Austausch zu Glutaminsäure [23].

Die vorgelagerten Prozesse der PKC-abhängigen Aktivierung der PKD basieren auf dem *Second-messenger*-Prinzip. Zunächst binden extrazelluläre Signalmoleküle,

beispielsweise Wachstumsfaktoren oder Agonisten von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), wie Neurotransmitter und Hormone, an ihre Rezeptoren, was zur nachgeschalteten Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt [24, 25]. Bei den T- und B-Zellen des Immunsystems erfolgt dies über die Aktivierung des T- bzw. B-Zell-Rezeptors [26]. Die aktive PLC induziert an der zytosolischen Seite der Plasmamembran die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die sekundären Botenstoffe DAG und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃). Die Bindung von DAG an die C1-Domäne der PKC bewirkt deren Aktivierung, wodurch die aktivierende Phosphorylierung der PKD induziert wird. Zusätzlich zur DAG-abhängigen Signalkaskade kann die Aktivierung der PKD über die direkte Bindung von Gβγ-Untereinheiten der G-Proteine an die PH-Domäne erfolgen, wie es bei der Regulation der PKD-Aktivität am Golgi-Apparat der Fall ist [27]. Eine dritte Möglichkeit der Aktivierung besteht während der Induktion der Apoptose durch genotoxische Substanzen. Dabei kommt es zur Caspase-3-vermittelten Proteolyse der PKD und die katalytische Domäne wird von den regulatorischen Domänen getrennt, was die maximale Enzymaktivität der PKD induziert [28].

Neben den Phosphorylierungen in der Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne wurden in verschiedenen Studien weitere Phosphorylierungsstellen der PKD beschrieben, die *in vivo* für deren Aktivierung und Regulation von Bedeutung sind. Für die humane PKD2 wurde in Magenkarzinomzellen eine Phosphorylierung des Serins an Position 244 durch die Casein-Kinase (CK) I D/E identifiziert, die zusammen mit den Serin-Phosphorylierungen in der Aktivierungsschleife die nukleäre Lokalisierung der Kinase bewirkt [29]. Die ebenfalls in Magenkarzinomzellen detektierte Phosphorylierung des Serins an Position 876 beruht auf der Autophosphorylierungsaktivität der PKD2 und korreliert mit dem Aktivierungsstatus der Kinase [21]. Zusätzlich zu den beschriebenen Serin-Phosphorylierungen wurden Phosphorylierungen von Tyrosin-Seitenketten identifiziert. Die Modifikation des Tyrosins an Position 438 wird in Zelllinien der chronischen myeloischen Leukämie konstitutiv durch die Bcr-Abl-Tyrosin-Kinase induziert und vermittelt die Aktivierung des NF-κB-Signalweges unter oxidativem Stress [30]. Weitere Phosphorylierungsstellen an Serinen und Tyrosinen der humanen PKD2, deren funktionelle Bedeutung noch nicht aufgeklärt ist, wurden in großangelegten MS-basierten Studien zur proteomweiten Analyse der Proteinphosphorylierung identifiziert [31-33].

1.1.3 Subzelluläre Lokalisierung

In Abhängigkeit spezifischer Stimuli werden die PKD-Isoformen zu verschiedenen subzellulären Kompartimenten transloziert, wobei die intrazelluläre Verteilung der PKD von Interaktionen der regulatorischen Domänen mit anderen zellulären Komponenten abhängt (Abbildung 2). Aufgrund dieser Abhängigkeit besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Lokalisierung von PKD und der Regulation der Enzymaktivität, wie zuvor für die Rolle von DAG skizziert wurde.

Der Großteil der PKD liegt zytoplasmatisch vor, während weitere Anteile an der Plasmamembran, im Zellkern, am Golgi-Apparat oder in den Mitochondrien lokalisiert sind [9]. Die Verteilung der PKD zwischen den Kompartimenten beruht auf der unterschiedlichen Affinität der beiden CRD-Subdomänen (C1a und C1b) für die Bindung von Membranlipiden. Für die initiale Aktivierung – zum Beispiel durch mitogene Stimuli, die Aktivierung von GPCR oder durch Phorbol ester-Bindung – kann die im Zytoplasma lokalisierte, inaktive PKD an die Plasmamembran rekrutiert werden, wobei die Interaktion über die C1b-Subdomäne der CRD vermittelt wird [34, 35]. Dort erfolgt über die PLC-DAG-PKC-Kaskade die Aktivierung der PKD, welche daraufhin von der Plasmamembran dissoziiert. Nach der Relokation ins Zytoplasma akkumuliert die aktive PKD zunächst im Zellkern – bei der humanen PKD2 beruht dies auf der Phosphorylierung durch CK I [29]. Da die PKD-Isoformen in ihren regulatorischen Domänen sowohl eine nukleäre Lokalisierungssequenz als auch ein nukleäres Exportsignal aufweisen, kann die aktive PKD zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern wechselseitig transloziert werden [36, 37]. Die Akkumulation der PKD2 im Nukleus wird dabei nicht durch einen gesteigerten Import, sondern durch die intranukleäre Blockierung des Exports reguliert [29]. Neben der nukleären Lokalisierung wurde die Assoziation der PKD mit Komponenten des mitotischen Apparates beschrieben [38].

Die Rekrutierung zum Golgi-Apparat bzw. *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), wo die PKD an der Bildung von Transportvesikeln beteiligt ist [39, 40], erfolgt durch die Interaktion der C1a-Subdomäne der CRD mit der TGN-Membran und wird somit über die lokale Produktion von DAG reguliert [41, 42]. Im Gegensatz zu anderen Proteinen ist diese Membranassoziation der PKD für die Translokation an die Plasmamembran und die Lokalisierung am Golgi-Apparat unabhängig von der PH-Domäne.

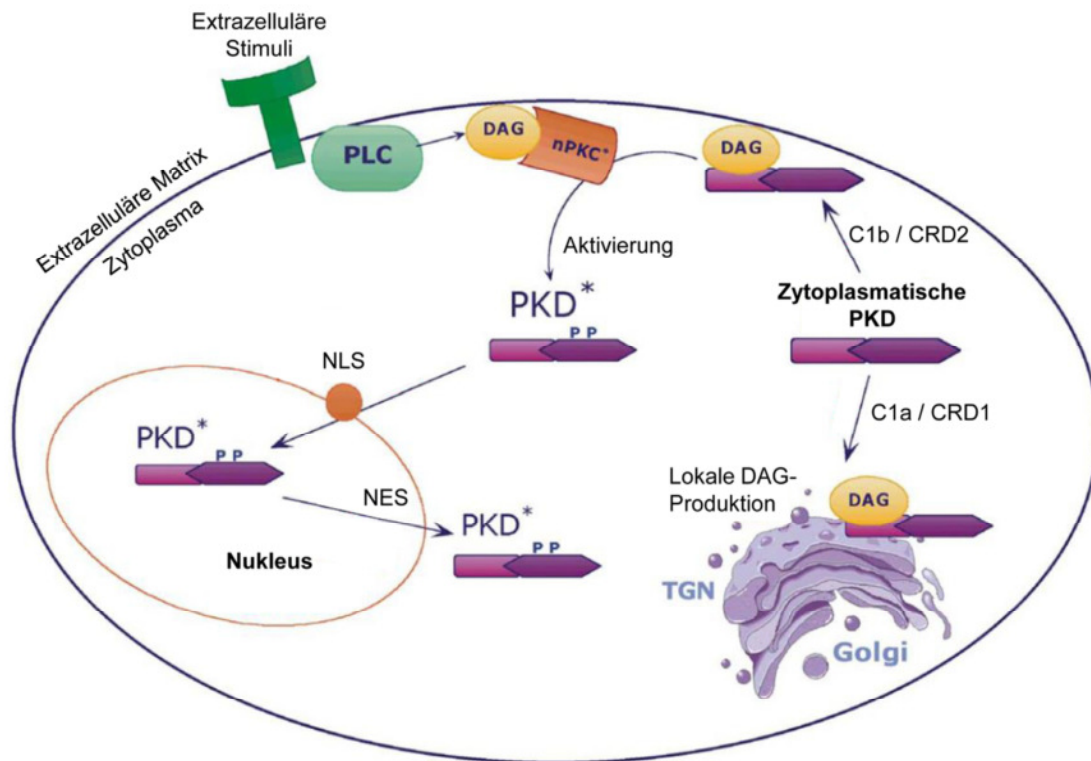


Abbildung 2: Subzelluläre Lokalisierung der Proteinkinase D

Der Großteil der Proteinkinase D (PKD) liegt inaktiv im Zytoplasma vor. Externe Stimuli bewirken die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), deren Aktivität zur Produktion von Diacylglycerol (DAG) führt. Die zytosomatische PKD wird an die Plasmamembran transloziert und bindet über die zweite Subdomäne der Cystein-reichen Domäne (C1b / CRD2) an DAG, das außerdem Isoformen der Proteinkinase C (PKC)-Familie aktiviert. Die Phosphorylierung durch PKC vermittelt die Aktivierung der PKD (PKD*). Die aktivierte PKD kann durch eine nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) und ein nukleäres Exportsignal (NES) zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma pendeln. Daneben wird über die lokale Produktion von DAG am Golgi-Apparat die Translokation zytosomatischer PKD zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) vermittelt, wo diese über die erste Subdomäne der CRD (C1a / CRD1) an DAG bindet. nPKC: *novel* PKC. Abbildung nach [9].

In Bezug auf die mitochondriale Lokalisierung wurde die PKD als Vermittler der zellulären Antwort auf oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) identifiziert [43]. Dabei ist die PKD an der Regulation der Mangan-abhängigen Superoxid-Dismutase zur Detoxifizierung mitochondrialer ROS beteiligt [44].

1.1.4 Die Rolle der Proteinkinase D am Golgi-Apparat

Eine bedeutende Rolle der PKD besteht für die Bildung von Transportvesikeln am Golgi-Apparat [40]. So führt die Inaktivierung der PKD in HeLa-Zellen zu einer Veränderung der Morphologie der TGN-Membran hin zu tubulären Strukturen, anstelle

der Abschnürung sekretorischer Vesikel zum Transport an die Plasmamembran. Dabei sind die PKD-Isoformen unterschiedlich am Vesikeltransport beteiligt [45]. In unpolarierten HeLa-Zellen führt die Inaktivierung der Kinasedomäne der PKD1 und PKD2 am TGN zur Akkumulation von Frachtproteinen für den Transport zur Plasmamembran, während andere zelluläre Transportvorgänge nicht beeinflusst werden. In polarisierten MDCK-Zellen (*Madin Darby Canine Kidney*) bewirkt der Verlust der Kinaseaktivität vermutlich eine Blockade basolateraler Transportvorgänge, was in der Einschleusung basolateraler Frachtproteine in den apikalen Transportweg resultiert. Diese Beobachtungen weisen auf die PKD-abhängige Regulation von Transportvorgängen spezifischer Frachtproteine mit basolateralen Sortierungssignalen hin, während der apikale Transport PKD-unabhängig vermittelt wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein siRNA-vermitteltes Ausschalten der PKD-Expression Transportvorgänge am TGN inhibiert, während konstitutiv aktive PKD eine effektive Vesikelbildung bewirkt [46].

Im Zusammenhang mit der Vesikelabschnürung am TGN wird die Aktivität der PKD2 und PKD3 in homo- oder heterodimerer Form diskutiert [46]. Dabei wurde in einer kürzlich publizierten Studie für die drei PKD-Isoformen durch Deletionsmutagenese eine 92 Aminosäuren umfassende, konservierte Dimerisierungsdomäne N-terminal der C1a-Domäne eingegrenzt [47]. Einige der Vesikelbildung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden in zellbiologischen Studien analysiert. Ein erstes Modell für den Prozess der Vesikelabschnürung beschreibt die Assemblierung einer komplexen molekularen Maschinerie, welche die Modifikation der TGN-Membran und die Ausbildung von Membrantubuli als Vesikelvorläufer vermittelt (Abbildung 3) [48]. Dabei wird die PKD zusammen mit weiteren potentiellen Effektoren der Vesikelbildung durch die lokale Produktion von DAG über die erste Subdomäne der CRD an die TGN-Membran rekrutiert. Die Aktivierung der Kinase erfolgt durch die Interaktion mit G $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen [27]. Diese wurden in Folgestudien als $\beta 1\gamma 2$ und $\beta 3\gamma 2$ identifiziert und interagieren am TGN mit der spezifischen PKC-Isoform PKC η [49]. Die aktivierte PKD phosphoryliert Phosphatidylinositol-4-kinase III β (PI4KIII β), wodurch deren Lipidkinaseaktivität stimuliert wird [50]. Eine zusätzliche Stabilisierung der Lipidkinaseaktivität erfolgt durch die nachgeschaltete Bindung von 14-3-3-Proteinen, welche die PKD-abhängige Serin-Phosphorylierung der PI4KIII β an Position 294 von der Aktivität proximaler Phosphatasen abschirmen [51].

Weitere an der Membranmodifikation zur Vesikelabschnürung beteiligte Substrate der PKD umfassen das Ceramid-Transferprotein (CERT) [52] und das Oxysterol-bindende Protein (OSBP) [53]. CERT vermittelt den vesikelunabhängigen Transport von Ceramiden aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) an die Membran des Golgi-Apparates [54]. Einerseits fließen die transportierten Ceramide in die lokale Produktion von Sphingomyelin und DAG ein, wodurch die Rekrutierung und Aktivierung der PKD begünstigt wird. Andererseits führt die PKD-abhängige Serin-Phosphorylierung von CERT an Position 132 zur Verringerung der Substrataffinität zu Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI(4)P), dessen Produktion durch die Lipidkinaseaktivität der PI4KIII β vorangetrieben wird, und somit zur Inhibition der Ceramid-Transferaktivität. Diese PKD-abhängige negative Rückkopplungsschleife stellt den kontinuierlichen Lipidtransfer zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat sicher und fungiert als Schnittstelle der Regulation des sekretorischen Transports und der Lipidbiogenese [52]. Die Regulation der Ceramid-Transferaktivität kann zudem über die Interaktion von CERT und OSBP erfolgen. Dabei fungiert die PKD-vermittelte Phosphorylierung ebenfalls als negativer Regulationsmechanismus, da sie die Verdrängung von OSBP von der Golgi-Apparat-Membran induziert [53].

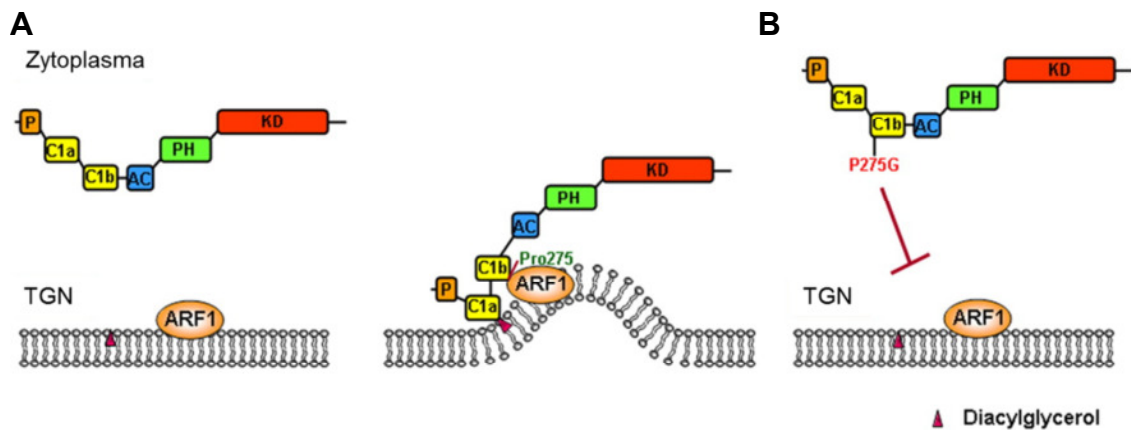


Abbildung 4: Interaktion der Proteinkinase D2 und ADP-Ribosylierungsfaktor 1 am *trans*-Golgi-Netzwerk

A) ADP-Ribosylierungsfaktor 1 (ARF1) agiert über die Interaktion mit der C1b-Domäne der zytoplasmatischen Proteinkinase D2 (PKD2) als Gerüstprotein für die Rekrutierung von PKD2 an die Membran des *trans*-Golgi-Netzwerkes (TGN). Am TGN interagiert PKD2 über die C1a-Domäne mit DAG und induziert die Modifikation der Membran zur Abschnürung von Transportvesikeln. **B)** Die Aminosäure Prolin-275 innerhalb der C1b-Domäne ist kritisch für die ARF1-Interaktion. Der Austausch zu Glycin führt zum Verlust der PKD2/ARF1-Interaktion und der Translokation der PKD2 an das TGN. Abbildung nach [55].

Im Zusammenhang mit der Sekretion von Metalloproteinasen wurde kürzlich die Erweiterung des PKD2/ARF1-Komplexes um weitere Effektorproteine beschrieben [56]. Das entwickelte Modell schlägt die initiale Bindung inaktiver zytoplasmatischer PKD2 durch das ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliche Protein 1 (ARL1) vor, wodurch ARL1 zum TGN rekrutiert wird. Dabei erfolgen die Korekrutierung von Arfaptin 2, dessen Aktivität die Deformation der TGN-Membran induziert, sowie die Aktivierung der PKD2 zur Modifikation der lokalen Lipidumgebung für die Vesikelabschnürung.

Obwohl die beschriebenen Studien bedeutende Fortschritte für die Aufklärung der Beteiligung der PKD an den Prozessen des zellulären Transports aufzeigen, sind die zugrunde liegenden komplexen Interaktionsprozesse nur ansatzweise verstanden [48]. Dies betrifft insbesondere den Vorgang der Ablösung der Transportvesikel am TGN durch das Zusammenspiel der PKD mit spezifischen Effektorproteinen.

1.2 Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen

Interaktionen zwischen Proteinen sind maßgeblich an zellulären Prozessen, wie der Signaltransduktion, intrazellulären Transportvorgängen oder dem Metabolismus, beteiligt [57]. Für die Gesamtheit der regulatorischen, funktionellen und strukturellen molekularen Wechselwirkungen, einschließlich der Protein-Protein-Interaktionen (PPI), hat sich der Begriff des „Interaktoms“ etabliert [58]. Die Analyse binärer Interaktionen und von Multiproteinkomplexen, bis hin zu weitverzweigten Interaktionsnetzwerken oder einer umfassenden Charakterisierung des „Interaktoms“, ermöglicht das Verständnis fundamentaler zellbiochemischer Zusammenhänge sowie der Ätiologie assoziierter pathologischer Prozesse [59-61].

Die Grundlage der meisten PPI sind nichtkovalente Wechselwirkungen, wobei zwischen stabilen und transienten Interaktionen unterschieden wird [62, 63]. Stabile und hochaffine Interaktionen treten in Proteinkomplexen auf, die dauerhaft bzw. über längere Zeiträume in zelluläre Prozesse involviert sind, häufig mit strukturellen Funktionen. Transiente Interaktionen von kurzer Dauer und oft mit niedriger Affinität finden sich beispielsweise zwischen Proteinen der zellulären Signaltransduktion und regulieren die Feinsteuerung von deren Funktionen [64].

Zur Aufklärung von PPI wurde eine Vielzahl methodischer Ansätze entwickelt, die auf biochemischen und biophysikalischen Techniken beruhen [65]. Klassische Methoden umfassen den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H) oder *Pulldown*-Experimente wie die Coimmunopräzipitation (Co-IP). Vor allem Methoden, die weniger auf die Validierung vermuteter Interaktionen als auf die Identifizierung unbekannter Interaktionspartner im Hochdurchsatzverfahren abzielen (z. B. Co-IP), profitieren von der Kombination mit der Massenspektrometrie (MS) als leistungsfähigem Verfahren der Proteinidentifizierung [66]. Darauf basierend wurden Techniken der Interaktionsanalyse entwickelt, welche die MS als Kernmethode zur Hochdurchsatz-Proteinidentifizierung nutzen, zum Beispiel die Affinitätsreinigung bzw. Affinitätsanreicherung in Kombination mit MS (AP-MS / AE-MS) [67, 68] und die Tandem-Affinitätsreinigung (TAP) [69].

Trotz des immensen Beitrags der klassischen Methoden zur Charakterisierung von PPI weisen diese eine Reihe von Nachteilen auf. So sind immunbasierte Methoden von der Verfügbarkeit spezifischer Antikörper abhängig (Co-IP). Techniken, die mit komplexen Mischungen, wie Zellysaten, arbeiten, sind anfällig für die potentielle falsch-positive Identifizierung hochabundanter Proteine als Interaktionspartner

(*Pulldown*-Experimente) [70]. Um diesem Problem zu begegnen, werden mehrere Waschschrte in den experimentellen Ablauf integriert, was zum Verlust von schwach affinen und transienten Interaktionspartnern fñhren kann. Eine alternative Technik zur Identifizierung von PPI bietet die chemische bzw. photoinduzierte Vernetzung von Proteinen mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse [71]. Die Kombination dieser Verfahren mit Techniken der Affinitätsanreicherung bietet ein großes Potential zur erfolgreichen Identifizierung von Interaktionspartnern spezifischer Zielproteine aus komplexen biologischen Proben.

1.3 Chemische und photoinduzierte Vernetzung von Proteinen

Die chemische oder photoinduzierte Proteinvernetzung in Kombination mit MS hat sich in den letzten Jahrzehnten als eine leistungsfähige Methode zur Analyse von PPI bzw. Protein-Interaktionsnetzwerken etabliert [71]. Die Technik ermöglicht die Einführung kovalenter Bindungen zwischen interagierenden Proteinen, wodurch auch transiente und schwach affine PPI stabilisiert und für die Analyse zugänglich werden. Bei der Interaktionsanalyse aus komplexen Mischungen, zum Beispiel in Kombination mit Affinitätschromatographie, erlaubt die kovalente Fixierung der Proteine intensive Waschschrte zur Entfernung hochabundanter Proteine, die oftmals als unspezifische Interaktionspartner detektiert werden [70, 72].

Die chemische Vernetzung führte *in vitro* zur Aufklärung von Interaktionen innerhalb von Proteinkomplexen, bis hin zur Darstellung komplexer Interaktionsnetzwerke [73-78]. Darüber hinaus fokussierten sich weitergehende Untersuchungen auf die Vernetzung von Interaktionspartnern im zellulären Milieu bzw. in lebenden Zellen [79-81]. Solche Ansätze erscheinen hinsichtlich ihrer biologischen Aussagekraft *in-vitro*-Studien mit rekombinanten Proteinen und Zelllysaten oder zellulären Fraktionen überlegen, stellen aber aufgrund der hohen Probenkomplexität und der hohen dynamischen Breite nativer Proteinmengen noch immer große experimentelle und analytische Herausforderungen dar. Zudem erfordern sie eine effiziente zelluläre Internalisierung der Vernetzungsreagenzien.

Ein vielversprechender Ansatz zur PPI-Analyse ist der unspezifische Einbau photoaktivierbarer Aminosäuren (bzw. Photo-Aminosäuren) während der Proteinbiosynthese in Zellkulturen. In einer grundlegenden Studie wurden die photoaktivierbaren Aminosäuren Photo-Methionin und Photo-Leucin, die eine

Vernetzung durch UV-A-Bestrahlung ermöglichen, in Proteine eingebaut [82]. Als Vorteil gegenüber ähnlichen Studien, in denen ein zielgerichteter Einbau photoaktivierbarer Aminosäuren in *Escherichia coli* realisiert wurde [83], erwies sich der erfolgreiche Einbau von Photo-Methionin und Photo-Leucin anstelle der natürlichen Varianten, ohne eine genetische Modifikation der zellulären Translationsmaschinerie durchführen zu müssen. Die Studie belegte zudem, dass der Einbau die Zellviabilität und Proteinfunktion nicht beeinträchtigt. Der Einbau der Photo-Aminosäuren wurde in Folgearbeiten weiterentwickelt, beispielsweise für strukturelle Proteinanalysen in Zellkulturen [84] sowie für die Strukturaufklärung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen nach dem Einbau von Photo-Methionin und Photo-Leucin während der rekombinanten Expression [85, 86].

Neben der kovalenten Fixierung zur Stabilisierung und Anreicherung von Protein-Interaktionspartnern ist die Proteinvernetzung für die Analytik der Proteinkonformation und der Interaktionsflächen interagierender Proteine von großem Interesse [87]. Da Vernetzungsreagenzien eine definierte maximale Distanz überbrücken, ergeben sich aus der Identifizierung vernetzter Peptide bzw. den Aminosäurepositionen definierte Distanzbeschränkungen innerhalb der dreidimensionalen Proteinstruktur. Somit liefern Vernetzungsexperimente niederaufgelöste strukturelle Informationen, die in die Validierung bzw. Erstellung von Proteinmodellen einfließen können [88-91]. Die Kombination aus Proteinvernetzung und MS bietet Vorteile gegenüber den etablierten hochauflösenden Methoden der Strukturaufklärung, wie der Röntgenkristallographie oder der NMR-Spektroskopie, da diese hohe Proteinmengen sowie oftmals die Analyse unter nichtphysiologischen Bedingungen erfordern [73]. Darüber hinaus ist die Vernetzungsanalyse von der Größe der untersuchten Proteine entkoppelt, da die Ableitung von Distanzbeschränkungen in der Regel auf Peptidebene erfolgt.

1.3.1 Reaktivität von Vernetzungsreagenzien

Die grundlegende Einteilung von Vernetzungsreagenzien erfolgt anhand ihrer Reaktivität [92], wobei die Verbindungen meistens zwei funktionelle Gruppen für die Vernetzung aufweisen (bifunktionell). Diese können identisch (homobifunktionell) oder unterschiedlich (heterobifunktionell) sein. Darüber hinaus enthalten einige Vernetzungsreagenzien eine dritte reaktive Gruppe (trifunktionell), beispielsweise eine Biotin-Gruppe zur Affinitätsanreicherung von Vernetzungsprodukten. Die Nutzbarkeit der Vernetzungsreagenzien basiert auf der Reaktivität verschiedener funktioneller Gruppen innerhalb von Proteinen, zum Beispiel von Aminogruppen oder freien Thiolgruppen [79].

1.3.1.1 Chemische Vernetzung mittels aminreaktiver Reagenzien

Eine häufig genutzte Anwendung ist die Reaktion aminreaktiver Vernetzungsreagenzien, wie Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (BS²G), die auf *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ethern bzw. Sulfo-NHS-Ethern basieren (Abbildung 5-A). Diese reagieren bei physiologischem pH-Wert mit primären Aminen, wie der ϵ -Aminogruppe von Lysin-Seitenketten oder dem Protein-*N*-Terminus (Abbildung 5-B). Dabei entstehen unter Freisetzung von NHS stabile Amidbindungen, die durch einen *Spacer* definierter Länge miteinander verknüpft sind. Darüber hinaus reagieren NHS-Ester auch mit Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin [93, 94]. Zur verlässlichen massenspektrometrischen Identifizierung von Vernetzungsprodukten anhand ihrer charakteristischen Isotopenmuster wird BS²G oftmals als äquimolare Mischung einer nicht deuterierten (D₀) und einer vierfach deuterierten Variante (D₄) verwendet (Abbildung 5-A).

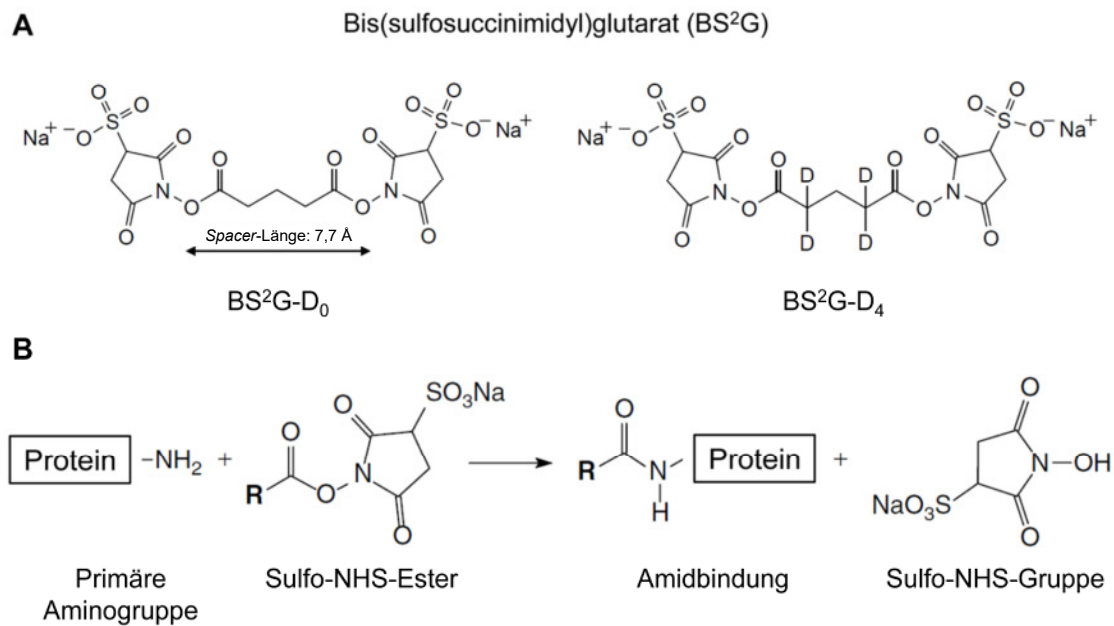


Abbildung 5: Chemische Struktur von Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat und Reaktionsschema von Sulfo-NHS-Estern mit primären Aminogruppen in Proteinen

A) Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (BS²G) besteht aus zwei Sulfo-NHS-Estern, die über einen *Spacer* mit einer Länge von 7,7 Å miteinander verknüpft sind. Gezeigt sind die nicht deuterierte (D₀) und die vierfach deuterierte (D₄) Variante von BS²G. **B)** Sulfo-NHS-Ester reagieren unter Bildung von Amidbindungen und Freisetzung der Sulfo-NHS-Gruppen mit primären Aminogruppen in Proteinen (ϵ -Aminogruppe von Lysin-Seitenketten und Protein-*N*-Terminus). Abbildung nach [95].

1.3.1.2 Photoinduzierte Vernetzung mittels Photo-Aminosäuren

Alternativ zur spezifischen Vernetzung reaktiver Gruppen bieten photoaktivierbare Reagenzien die Möglichkeit einer ungerichteten Biokonjugation [79]. Eine solche Anwendung ist der unspezifische Einbau photoaktivierbarer Aminosäuren (Photo-Methionin und Photo-Leucin) während der Proteinbiosynthese in Zellkulturen [82] (Abschnitt 1.3). Im Gegensatz zu ihren natürlichen Varianten weisen diese Aminosäuren eine Diazirin-Gruppe auf (Abbildung 6-A). Durch die Bestrahlung mit UV-A-Licht mit einer Wellenlänge von ~ 365 nm erfolgt die Bildung eines reaktiven Carbens, das sich über sein freies Elektronenpaar in C-H- oder C-Heteroatom-Bindungen einfügen kann (Abbildung 6-B). Daneben können Alkohole und Alkene gebildet werden [96]. Aufgrund der hohen Reaktivität des Carbens ist die Anzahl möglicher Vernetzungen erhöht, jedoch läuft die Reaktion gleichzeitig räumlich („*zero-length*“) und zeitlich gut kontrollierbar ab. Somit kann die photoinduzierte Vernetzung zur Ableitung komplementärer oder erweiterter Strukturinformationen im Vergleich zu spezifischen Vernetzungen genutzt werden. Bei der Verwendung der photoaktivierbaren Varianten von Methionin und Leucin ergibt sich zudem der Vorteil, dass diese in

hydrophobe Proteinregionen eingebaut werden können. Dies ist komplementär zur Verwendung aminreaktiver Reagenzien, die mit hydrophilen Bereichen in Proteinen reagieren.

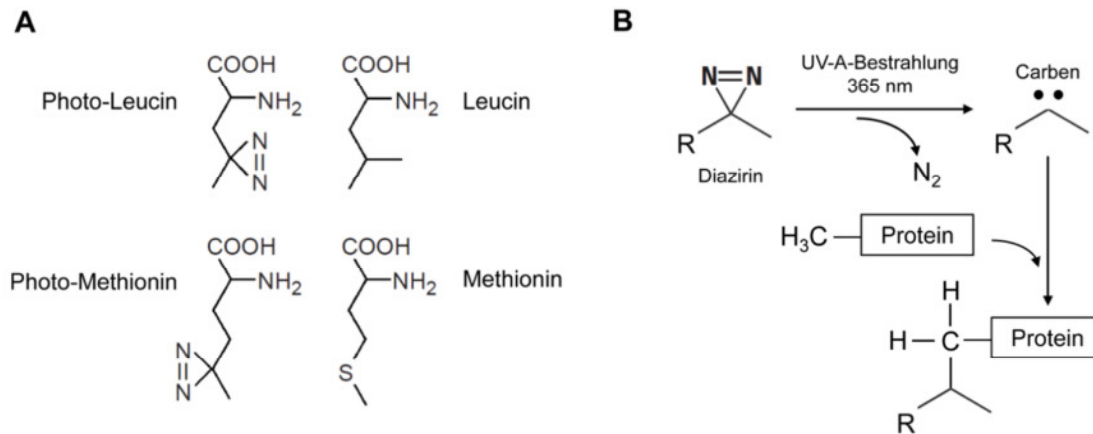


Abbildung 6: Chemische Strukturen der Photo-Aminosäuren und Reaktionsschema der photoinduzierten Proteinvernetzung mit Diazirinen

A) Photo-Leucin und Photo-Methionin im Vergleich zu Leucin und Methionin, Abbildung nach [82].
B) Diazirine bilden durch UV-A-Bestrahlung unter Abspaltung von Stickstoff hochreaktive Carbene, die sich in C-H- und C-Heteroatom-Bindungen von Proteinen einfügen können. Abbildung nach [79, 92].

1.4 Massenspektrometrie zur Analytik von Biomolekülen

Die Massenspektrometrie (MS) stellt ein vielfältig einsetzbares, analytisches Verfahren zur Charakterisierung organischer und anorganischer Verbindungen dar [97]. Mittels MS werden die Massen von Atomen bzw. Molekülen analysiert, oftmals in Kombination mit einer Fragmentierung ausgewählter Ionen und einer Massenanalyse der Fragmente (Tandem-Massenspektrometrie bzw. MS/MS). Das grundlegende Prinzip der MS, die Bildung von Ionen und deren Trennung nach Masse-zu-Ladungsverhältnissen (m/z), wird dabei in einer Vielzahl technischer Umsetzungen verfolgt. Spezifische Voraussetzungen für den Aufbau eines Massenspektrometers umfassen eine Ionenquelle zur Überführung des Analyten in die Gasphase, einen Massenanalysator zur Trennung der Ionen anhand ihrer m/z -Werte im Hochvakuum und ein Detektionssystem [97]. Für die Analyse von Biomolekülen, wie Proteinen bzw. Peptiden, ergeben sich spezielle Anforderungen an die massenspektrometrische Analyse. Dies betrifft insbesondere die Ionenerzeugung, da die makromolekularen Verbindungen zunächst intakt in die Gasphase überführt werden müssen. Einen wesentlichen Beitrag zum technologischen Fortschritt leistete die Entwicklung sogenannter „sanfter“

Ionisierungsmethoden. Diese umfassen die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) [98-100] und die Elektrospray-Ionisation (ESI) [101], die sich als Methoden für die Analytik von Biopolymeren etabliert haben [102].

Die in dieser Arbeit eingesetzte ESI-Technik sowie das verwendete Hybrid-Massenspektrometer werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

1.4.1 Elektrospray-Ionisation

Die Entwicklung der ESI ist eng mit der Etablierung von Methoden verknüpft, die eine direkte und kontinuierliche Überführung von Analyten aus der flüssigen Phase in die Gasphase und deren anschließende Massenanalyse erlauben, insbesondere der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC/MS) [103, 104]. Die Möglichkeit des direkten Probentransfers ergab sich erstmals durch die Entwicklung der Atmosphärendruck-Ionisation (API) [105]. Parallel erfolgte durch die Arbeiten von M. Dole [106] und J. B. Fenn [101, 107, 108] die Entwicklung von ESI – basierend auf dem Prinzip der elektrohydrodynamischen Ionisation (EHI) [109], bei der im Gegensatz zur ESI die Analytlösung nicht unter Atmosphärendruck versprüht wird.

Die Sprühkapillare einer ESI-Quelle fungiert als Elektrode mit einem Hochspannungspotential von 3-5 kV gegenüber einer Gegenelektrode. Durch die Passage des elektrischen Potentials wird der Flüssigkeitsstrom in ein Aerosol elektrisch geladener Tröpfchen zerstäubt (Abbildung 7). Dabei wirkt auf die Probenlösung beim Verlassen der Sprühkapillare ein elektrisches Feld von ca. 10^6 V/m. Dies führt zur Ladungstrennung in der Lösung und zu einer konischen Verformung des Meniskus der austretenden Flüssigkeit, wodurch eine Erhöhung der Feldstärke an der Spitze des Konus induziert wird [110]. Bei Erreichen einer kritischen Feldstärke wird der sogenannte Taylor-Konus ausgebildet [111] und ein Flüssigkeitsstrahl emittiert, sobald die elektrostatischen Wechselwirkungen die Oberflächenspannung der Flüssigkeit übersteigen [112]. Dieser Konusstrahl (*cone jet*) trägt eine hohe Dichte an Ladungsträgern und zerfällt in eine Vielzahl von Mikrotröpfchen. Aufgrund von Coulomb-Abstoßungen driften diese geladenen Tröpfchen auseinander und bilden eine Spraywolke. Mit steigender Desolvatisierung der Tröpfchen nimmt die Ladungsdichte an deren Oberfläche kontinuierlich zu, bis die elektrostatischen Wechselwirkungen die Oberflächenspannung übersteigen (Rayleigh-Limit) und die Tröpfchen in wiederum kleinere Tröpfchen zerfallen [113]. Dabei werden die Tröpfchen aufgrund ihrer

die Ladungsdichte durch räumliche Annäherung der Ladungsträger zu. Da die Größe des umhüllten Analyten konstant bleibt, korreliert dessen räumliche Ausdehnung mit dem Ladungszustand entsprechender Ionen. Dementsprechend werden für entfaltete Zustände globulärer Proteine höhere Ladungszustände als für gefaltete Proteine beobachtet [120]. Das CRM wird für große Moleküle postuliert, während für die Ionisierung kleinerer Moleküle die Erklärung nach dem IEM herangezogen wird [117].

Eine bedeutende Weiterentwicklung der ESI stellt die Etablierung der Nano-ESI dar [121, 122]. Bei dieser handelt es sich um eine technische Miniaturisierung der ESI mit dem Einsatz wesentlich engerer Borosilikatglas-Kapillaren anstelle konventioneller Sprühnadeln. Die Nano-ESI-Kapillaren weisen Öffnungsdurchmesser von 1-4 μm sowie ein Volumen weniger Mikroliter auf und erlauben die Bildung eines stabilen Elektrosprays bereits bei Flussraten von 20 nl/min, im Gegensatz zu einigen Mikrolitern pro Minute bei konventioneller ESI [97]. Dabei ist die Tröpfchengröße des versprühten Aerosols im Vergleich zur konventionellen ESI ca. 100- bis 1000-fach reduziert (≤ 200 nm). Die Methode erlaubt einen sehr geringen Probenverbrauch, die Anwendung vergleichsweise niedriger Spannungen von ~ 1 kV für den Ionisationsprozess und eine Erhöhung der Ionisierungseffizienz [121].

1.4.2 Orbitrap Fusion-Hybridmassenspektrometer

Die Analyse der mittels ESI bzw. Nano-ESI gebildeten Ionen wird im folgenden Abschnitt anhand des für die vorliegende Arbeit genutzten Hybridmassenspektrometers (Orbitrap Fusion Tribrid, Thermo Fisher Scientific) [123, 124] beschrieben, dessen Aufbau in Abbildung 8 schematisch dargestellt ist.

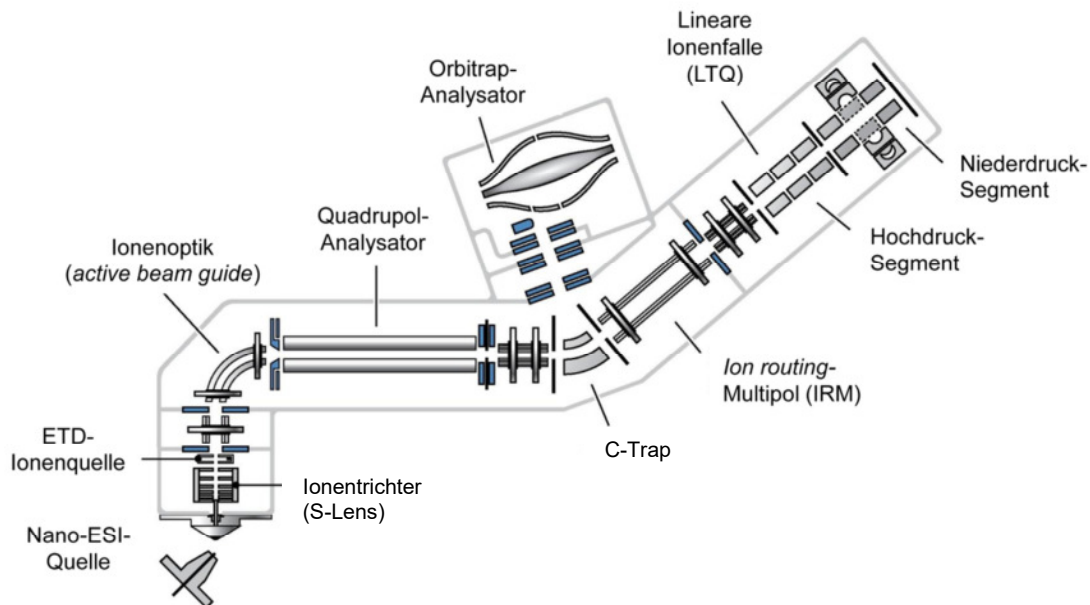


Abbildung 8: Aufbau des Orbitrap Fusion-Hybridmassenspektrometers

Abbildung nach [124].

Die Hybridanordnung vereint mehrere Massenanalytoren (Quadrupol, lineare Ionenfalle und Orbitrap-Analysator) [124-126] in einem Gerät, was vielfältige Modi und Kombinationen der Massenanalyse sowie Tandem-Massenspektrometrie erlaubt [127]. Ein mögliches analytisches Szenario ist die hochauflösende Massenanalyse (Orbitrap-Analysator) von Vorläuferionen als erster Stufe (MS) und nachfolgender Fragmentierung ausgewählter Ionen sowie der Massenanalyse der Fragmentionen (MS/MS). Dabei kann die Analyse der Fragmentionen hochauflösend (Orbitrap) oder niederauflösend (lineare Ionenfalle) erfolgen. Nach dem Verlassen der Nano-ESI-Quelle und Fokussierung über einen Ionentrichter (S-Lens) werden die Ionen über sequentiell angeordnete Multipole in den Quadrupol-Analysator transferiert. Dieser arbeitet zunächst im Radiofrequenz (RF-only)-Modus und somit nicht massenselektiv, weshalb die gesamte Ionenpopulation über die C-Trap in den Orbitrap-Analysator injiziert wird. Dort erfolgt die hochauflösende Massenanalyse von Vorläuferionen (*survey scan*), welche anschließend für Fragmentierungsexperimente selektiert werden können, beispielsweise die Ionen mit den intensivsten Signalen innerhalb eines definierten Messzeitraums. Die anhand ihrer m/z -Werte ausgewählten Vorläuferionen werden über den Quadrupol-Analysator, der nun durch zusätzliches Anlegen einer Gleichstromspannung als Massenfilter fungiert, für die Fragmentierung aus dem Totalionenstrom (TIC) isoliert. Für eine resonanzabhängige kollisionsinduzierte

Dissoziation (CID) [128] erfolgt über die C-Trap und den *ion routing*-Multipol (IRM) der Ionen transfer in die lineare Ionenfalle (LTQ), wo durch Kollision mit einem inerten Stoßgas (z. B. Helium) die Fragmentierung der Vorläuferionen induziert wird. Deren Massenanalyse erfolgt entweder hochauflösend nach Überführung in den Orbitrap-Analysator oder niederauflösend in der LTQ, die über einen separaten Detektor verfügt, jedoch mit höherer Geschwindigkeit und Sensitivität. Für Fragmentierungsexperimente mittels Elektronentransferdissoziation (ETD) werden Fluoranthren-Radikalanionen aus der ETD-Ionenquelle in das Hochrucksegment der LTQ transferiert [129]. Dort erfolgt der Elektronentransfer auf Analyt-Kationen, der ihre Fragmentierung induziert. Für kollisionsinduzierte Dissoziation mit erhöhter Kollisionsenergie (HCD / *beam-type* CID) [130] werden die Vorläuferionen aus der C-Trap unter Anlegen einer erhöhten Spannung in den IRM transferiert, wo die Fragmentierung durch Kollisionen mit dem Stoßgas erfolgt. Anschließend können die Fragmentionen in die C-Trap überführt und zur Massenanalyse in die Orbitrap injiziert werden.

1.4.2.1 Orbitrap

Die Entwicklung des Orbitrap-Analysators gilt als wichtige Neuerung auf dem Gebiet der MS [131], da die Technik erstmals Leistungsdaten bezüglich Auflösungsvermögen und exakter Massenanalyse im Bereich der Fourier-Transformation-Ionenzyklotronresonanz (FTICR)-Technologie erreichte, ohne jedoch von deren Nachteilen betroffen zu sein [132]. So lassen sich Orbitraps wesentlich kostengünstiger und platzsparender betreiben als FTICR-Geräte, was hauptsächlich in ihrer Unabhängigkeit von hohen Feldstärken supraleitender Magnete begründet liegt. Dennoch handelt es sich bei beiden Techniken um Ionenfallen, bei denen die m/z -Analyse durch Fourier-Transformation detektierter Ionenbewegungen erfolgt [133].

Der Einsatz des Orbitrap-Analysators erfolgt in Kombination mit einer weiteren Neuentwicklung in Form eines gekrümmten RF-Quadrupols, der C-Trap (Abbildung 9 bzw. Abbildung 8) [134]. Bei dem verwendeten Orbitrap Fusion-Massenspektrometer werden die Ionen aus dem Quadrupol-Massenfilter oder dem IRM in der C-Trap gesammelt, bevor sie in die Orbitrap injiziert werden. Dabei werden die Ionen durch Stoßkühlung mit Stickstoff gekühlt und akkumulieren aufgrund der Elektrodenkrümmung im Zentrum der C-Trap. Anschließend werden die Ionen durch Hochspannungsimpulse als Ionenpakete verschiedener m/z -Werte orthogonal

ausgeworfen und mit kinetischen Energien von ca. 1,3 keV auf konvergierenden Bahnen in den Orbitrap-Analysator injiziert [133].

Die Orbitrap selbst besteht aus einer spindelförmigen Zentralelektrode und einer zweiteiligen äußeren Elektrode mit zylindrischem Querschnitt (Abbildung 9). Diese Anordnung wurde von A. Makarov entwickelt und basiert auf dem Konzept der Kingdon-Falle bzw. deren Weiterentwicklung durch R. D. Knight [135].

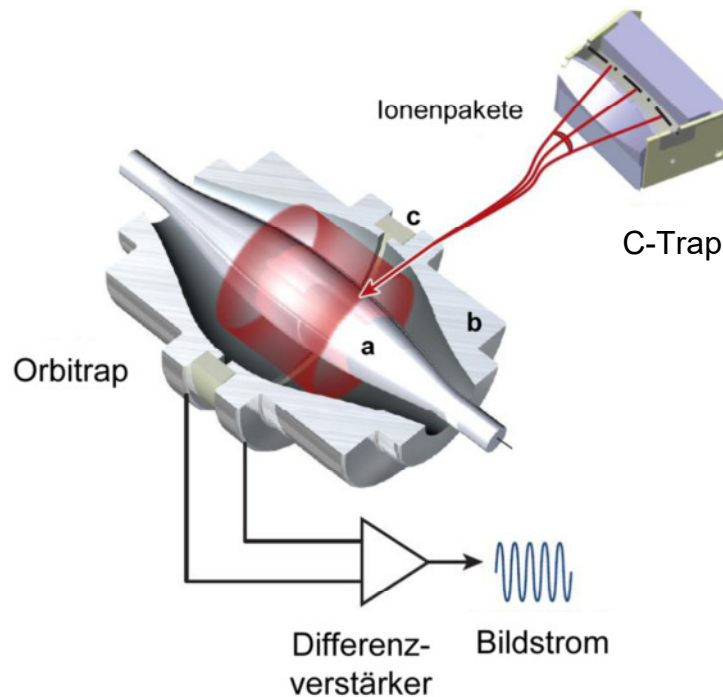


Abbildung 9: Schema der C-Trap-Orbitrap-Anordnung

Ionenpakete werden aus der C-Trap in die Orbitrap injiziert und gelangen auf stabile Umlaufbahnen um die Zentralelektrode (a). An den Segmenten der äußeren Elektrode (b), die durch einen Keramikring (c) voneinander isoliert sind, erfolgt die Bildstromdetektion der axialen Schwingungen. Deren Signale werden mittels Fourier-Transformation in m/z -Werte umgewandelt. Abbildung nach [124].

Die Ionenpakete erreichen die Orbitrap versetzt zur Äquatorialebene der Elektroden, wobei die Zentralelektrode der Ultra-HF (*high field*)-Variante der Orbitrap Fusion mit einer Spannung von 5 kV relativ zur äußeren Elektrode betrieben wird [136]. Aufgrund der komplexen Geometrie des elektrischen Feldes werden die Ionenpakete auf stabile rotierende und axiale Bahnen um die Zentralelektrode gezwungen [135]. Die Frequenz der axialen Schwingungen eines Ions (ω) ist dabei von dessen m/z -Wert abhängig und verhält sich nach Gleichung I, wobei k eine Gerätekonstante darstellt.

Gleichung I:
$$\omega = \sqrt{k \left(\frac{m}{z} \right)}$$

Mittels Bildstromdetektion an den voneinander isolierten Segmenten der äußeren Elektrode lässt sich die Oszillationsfrequenz ω bestimmen, wobei sich für verschiedene m/z -Werte definierte Sinuswellen ergeben. Diese werden durch schnelle Fourier-Transformation in diskrete m/z -Messwerte umgewandelt.

1.4.2.2 Lineare Ionenfalle

Bei der linearen Ionenfalle handelt es sich um einen dreiteilig segmentierten Quadrupol mit Detektor (Abbildung 10) [137], der Ionen durch eine RF-Spannung zunächst in radialer Richtung speichert. Durch Gleichspannungspotentiale an den äußeren Segmenten werden eingefangene Ionen am Verlassen des Quadrupols gehindert, was eine axiale Ionenspeicherung im Mittelsegment ermöglicht.

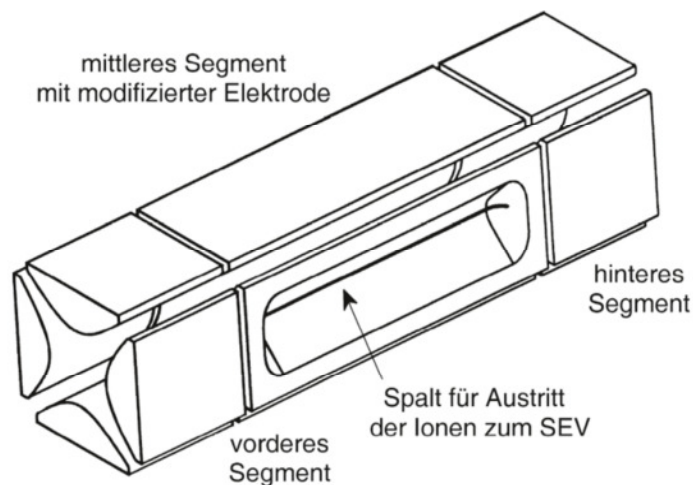


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer linearen Quadrupol-Ionenfalle
SEV: Sekundärionenvervielfacher, Abbildung nach [97, 137].

Die gespeicherte Ionenwolke wird durch Stoßkühlung mit Inertgas gekühlt und axial fokussiert. Zur Isolierung, Anregung und den Auswurf selektierter Ionen werden zusätzliche Wechselspannungspotentiale angelegt. Der Auswurf gespeicherter Ionen kann axial oder radial erfolgen. Für den axialen Ausstoß, beispielsweise zur Weiterleitung in die Orbitrap nach Fragmentierungsexperimenten, wird an den äußeren Elektroden eine zusätzliche Wechselspannung angelegt [138]. Der radiale Auswurf der

Ionen zur Detektion erfolgt durch Modulation der RF-Spannung über seitliche Öffnungen eines der Quadrupol-Elektrodenpaare auf Konversionsdynoden [137], deren herausgeschlagene Elektronen zur Signalverstärkung auf einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) treffen.

Die im Orbitrap-Fusion-Massenspektrometer verwendete LTQ weist zudem die Aufteilung des Mittelsegments in Kompartimente mit verschiedenen Drücken auf, die durch eine Transferoptik getrennt sind (Abbildung 8) [139]. Diese Anordnung ermöglicht eine optimierte Ionenspeicherung und -fragmentierung im Hochdrucksegment ($\sim 7 \times 10^{-3}$ mbar), während im Niederdrucksegment ($\sim 5 \times 10^{-4}$ mbar), das mit dem Detektor verbunden ist, die Massenanalyse mit verbessertem Auflösungsvermögen und erhöhter Geschwindigkeit erfolgt.

1.5 Massenspektrometrie-basierte Protein- und Peptidanalytik

Die Anwendung der MS zur Analytik isolierter Proteine sowie komplexer Proteinmischungen und Proteome umfasst vielfältige Fragestellungen, wie die Identifizierung von Proteinen, die Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen und die Quantifizierung von Proteinen [140]. Dabei kann die methodische Herangehensweise einerseits über die Analyse und Fragmentierung intakter Proteine erfolgen (*top-down*) [141]. Andererseits werden meist Strategien eingesetzt, bei denen Proteine zunächst durch spezifische Proteasen in Peptide gespalten werden (*bottom-up*) [142]. Bereits auf Peptidebene kann durch die alleinige Bestimmung der Peptidmassen und den Vergleich mit theoretischen Werten die Identifizierung eines Proteins möglich sein (Peptidmassen-*Fingerprint*) [143]. Allerdings gilt dies hauptsächlich für homogene Proben, denn mit zunehmender Heterogenität steigt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten isobarer Moleküle mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz, deren eindeutige Zuordnung unmöglich ist [144]. Hier kommt die Peptidsequenzierung mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) zum Einsatz, denn die Massen bzw. Massendifferenzen der erzeugten Fragmentionen erlauben Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz des jeweiligen Peptid-Vorläuferions [145]. In Abhängigkeit von der verwendeten Fragmentierungsmethode werden unterschiedliche Bindungen des Proteinrückgrats bevorzugt gespalten und es entstehen verschiedene Fragmentionen, deren Nomenklatur in Abbildung 11 dargestellt ist.

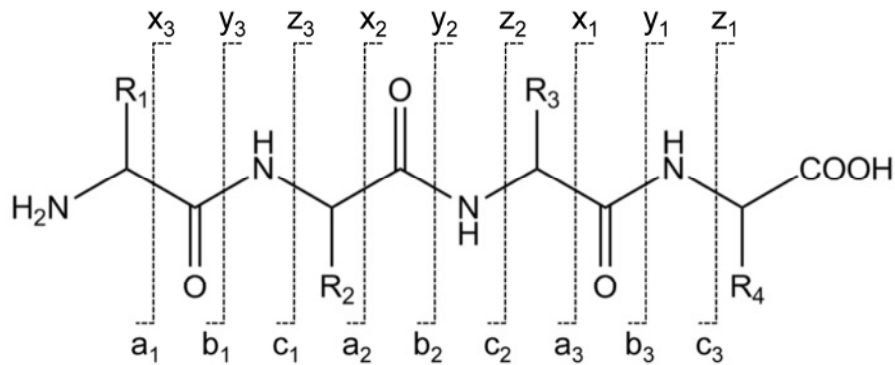


Abbildung 11: Nomenklatur von Peptidfragmentionen

Tandem-Massenspektrometrie-Experimente (MS/MS) führen zur Spaltung von Bindungen des Proteinrückgrats. Verbleibt die Ladung am N-terminalen Fragment, werden a-, b- und c-Ionen detektiert. Verbleibt die Ladung am C-terminalen Fragment erfolgt die Detektion korrespondierender x-, y- und z-Ionen. Die Nomenklatur basiert auf den Vorschlägen von P. Roepstorff, J. Fohlmann und K. Biemann [146, 147].

Die häufig genutzte Methode der Fragmentierung durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID bzw. HCD) führt zur Spaltung der Peptidbindung und zur Bildung von b- und y-Fragmentionen [148]. Bei der Fragmentierung durch ETD, die insbesondere für die Analyse großer und/oder mehrfach geladener Ionen genutzt wird, kommt es zur bevorzugten Spaltung der N-C α -Bindung und somit zur Bildung von c- und z-Fragmentionen [149].

MS/MS-Experimente ermöglichen die Ableitung von Sequenzinformationen, was die eindeutige Zuordnung der Aminosäuresequenz für die Proteinidentifizierung erlaubt. Dazu werden die experimentellen Daten mit proprietären oder frei verfügbaren Software-Anwendungen über spezialisierte Suchalgorithmen (z. B. Mascot, Sequest, Andromeda) mit Proteinsequenzdatenbanken (z. B. UniProt) abgeglichen [150-153]. Die Identifizierung von Proteinen aus homogenen oder komplexen Proben bildet die Grundlage der meisten MS-basierten Strategien zur Proteinanalytik. Darüber hinaus spielt die weitere Charakterisierung von Proteinen eine bedeutende Rolle, beispielsweise die Analyse posttranslationaler Modifikationen [140]. Von großer Bedeutung ist zudem die vergleichende Quantifizierung identifizierter Proteine, da sie die Beschreibung dynamischer Prozesse ermöglicht [154].

1.5.1 Quantitative Massenspektrometrie-basierte Proteinanalyse

Die klassischen Methoden zur Quantifizierung auf Proteomebene, wie die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) [155], erlauben die Analyse einer Vielzahl von Proteinspezies aus komplexen Proben mit guter Sensitivität. Allerdings sind diese Methoden von der massenspektrometrischen Analyse entkoppelt und erreichen erst in Kombination mit dieser einen Hochdurchsatzcharakter durch Korrelation der gelbasierten Quantifizierungsdaten mit den MS-basierten Identifizierungsdaten [156]. In der Regel bestehen allerdings Limitierungen bezüglich der Auflösung niedrig abundanter Proteine sowie von Membranproteinen. Zudem erfordern die Methoden einen vergleichsweise hohen experimentellen Aufwand, der sich negativ auf die Reproduzierbarkeit auswirken kann. Trotz methodischer Weiterentwicklungen, wie immobilisierten pH-Gradienten [157] oder der fluoreszenzbasierten differentiellen Gelelektrophorese (DIGE) [158], führen diese technischen Einschränkungen zu einer zunehmenden Dominanz hochentwickelter LC/MS/MS-basierter Quantifizierungsstrategien [159]. Diese ermöglichen durch direkte Kopplung der flüssigkeitschromatographischen Trennung proteolytischer Peptide mit der massenspektrometrischen Analyse eine Quantifizierung auf Peptidebene bei simultaner Datenaufnahme zur Proteinidentifizierung. Die verwendeten Methoden lassen sich dabei in zwei Hauptgruppen unterteilen: Die Quantifizierung durch Isotopenmarkierung und die markierungsfreie Quantifizierung [154].

1.5.1.1 Proteinquantifizierung durch Isotopenmarkierung

Die Etablierung der stabilen Isotopenmarkierung zur vergleichenden Peptid- und Proteinquantifizierung beruht auf der Tatsache, dass isotopenmarkierte und natürliche Peptidvarianten zwar unterschiedliche Massen haben, aber weitgehend identische physikochemische Eigenschaften aufweisen und sich somit während der LC/MS/MS-Analyse gleich verhalten. Dies ermöglicht den direkten quantitativen Vergleich der Peptidsignalintensitäten auf MS-Ebene [154]. Die Einführung von Isotopenmarkierungen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, wobei die Verfahren i) auf der Zugabe externer Standards, ii) metabolischer Markierung oder iii) chemischer Markierung beruhen.

Die Zugabe einer definierten Menge eines synthetischen, isotopenmarkierten Peptids zu einer proteolytischen Mischung natürlicher Peptide ermöglicht die absolute Quantifizierung des endogenen Peptids bzw. Proteins anhand der detektierten

Signalintensitäten beider Varianten mittels MS (AQUA, *absolute quantification of proteins*) [160]. Allerdings erlaubt die Methode eine Quantifizierung nur eines oder weniger bekannter Proteine (*targeted approach*).

Eine verbreitete Methode der proteomweiten metabolischen Markierung ist der Einbau isotopenmarkierter Aminosäuren während der Zellkultivierung (SILAC, *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) [161]. Eine SILAC-Variante beruht auf der Supplementierung des Kulturmediums mit ^{13}C -markierten Varianten der Aminosäuren Lysin und Arginin, wodurch nach der tryptischen Proteolyse ein Großteil der Peptide mindestens eine markierte Aminosäure für den relativen quantitativen Vergleich zur unmarkierten Probe enthält [162, 163].

Die Methoden der chemischen Markierung umfassen Techniken, bei denen die Isotopenmarkierung nach der Biosynthese in Peptide bzw. Proteine eingeführt wird. Reaktionsstellen für die Derivatisierung können zum Beispiel Cystein-Seitenketten für den Einbau isotopenmarkierter Biotingruppen sein (ICAT, *isotope-coded affinity tags*) [164]. Weit verbreitet ist zudem die Einführung von Markierungen am *N*-Terminus sowie der ϵ -Aminogruppe von Lysin-Seitenketten mittels spezifischer Konjugation über NHS-Ester. Ein Beispiel für eine solche Methode mit Quantifizierung auf MS-Ebene ist die ICPL-Technik (*isotope-coded protein labeling*) [165].

Eine Sonderstellung ergibt sich für Methoden der isobaren Isotopenmarkierung, bei denen Peptide unterschiedlich markierter Proben im Massenspektrum identische Massen aufweisen. Die Markierungen können nach Fragmentierungsexperimenten aufgrund der Freisetzung spezifischer Reporterionen auf MS/MS-Ebene unterschieden und für die Quantifizierung genutzt werden. Häufig verwendete Methoden, die auf dieser Technik basieren, sind iTRAQ (*isobaric tags for absolute and relative quantification*) [166] und TMT (*tandem mass tags*) [167].

Ein Vorteil der Quantifizierung mittels Isotopenmarkierung ist die Möglichkeit der Multiplexierung, was mit einer sehr guten Robustheit und Reproduzierbarkeit einhergeht. Dem stehen die notwendige Probenmanipulation und der vergleichsweise hohe Kostenaufwand gegenüber.

1.5.1.2 Markierungsfreie Proteinquantifizierung

Markierungsfreie Ansätze zur relativen Proteinquantifizierung (LFQ, *label-free quantification*) können unabhängig vom Einbau stabiler Isotopenmarkierungen realisiert werden [154]. Eine Variante beruht auf der Quantifizierung der Anzahl der Fragmentationsspektren der identifizierten Peptide eines Proteins (PSM, *peptide spectral matches*), die mit der Proteinhäufigkeit korreliert (*spectral counting*) [168]. In einem weiteren Ansatz erfolgt die Quantifizierung von Peptidsignalintensitäten auf MS-Ebene. Dazu werden in den extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC) von Peptiden die MS-Signalintensitäten über den zeitlichen Verlauf des chromatographischen Elutionsprofils integriert [169]. Die relative Quantifizierung erfolgt anschließend durch den Vergleich der Gesamtsignalintensitäten einzelner Proteine. Diese Methode bietet Vorteile, vor allem in Kombination mit hochauflösender MS, wie der Orbitrap-Technologie, da diese eine zuverlässige Bestimmung der EIC von Peptiden und eine hohe Robustheit gegenüber Überlagerungen benachbarter Peptidsignale ermöglicht. Zusätzliche Probenmanipulationen sind nicht notwendig, wodurch nahezu jede Art von Ausgangsmaterial für die quantitative Analyse zugänglich wird. Ein weiterer Vorteil ist die theoretisch unbegrenzte Probenzahl, die mit vergleichsweise geringem Kostenaufwand bearbeitet werden kann. Nachteilig hingegen ist die fehlende Multiplexfähigkeit, welche die getrennte LC/MS/MS-Analyse aller Proben eines Datensatzes notwendig macht. Dies wiederum erfordert ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit der experimentellen Bedingungen und eine robuste LC/MS/MS-Technologie [154]. Zur Erhöhung der Toleranz gegenüber unvermeidbaren experimentellen und analytischen Variationen wurden spezielle Algorithmen zur Analyse von LFQ-Daten entwickelt. Eine dieser Fragestellungen betrifft die Normalisierung der Gesamtpeptidintensitäten im Vergleich mehrerer Proben. Bei der in dieser Arbeit genutzten Software MaxLFQ [170], einem Modul der MaxQuant-Software [171], erfolgt die Normalisierung nicht getrennt für einzelne Proben, sondern wird nach der Prozessierung aller Proben auf den gesamten Datensatz angewendet (*delayed normalization*). Die Normalisierungsfaktoren werden dabei aus der datensatzspezifischen Population von Proteinen mit unveränderten Quantifizierungsdaten abgeleitet. Eine weitere Optimierung ist die Ableitung von Quantifizierungsdaten für den Vergleich zwischen mehreren Proben auf Peptidebene, da bereits EIC-Quotienten ein Maß unterschiedlicher Proteinhäufigkeiten liefern. Diese Daten fließen in die Berechnung ein (*extraction of maximum peptide ratio information*).

Zur Maximierung quantitativer Informationen kann die MaxQuant-Software zudem die Überlagerung einzelner LC/MS/MS-Analysen eines Datensatzes integrieren (*match between runs*). Dies ermöglicht die Übertragung von Proteinidentifizierungen einer Analyse auf quantifizierte, aber nicht identifizierte Signale (*features*) einer anderen Analyse anhand der Zuordnung der Retentionszeit und Masse der Peptid-Vorläuferionen.

Unabhängig vom Modus der Proteinquantifizierung ist für die Bewertung der Quantifizierungsdaten eine zuverlässige statistische Analyse zur Extraktion unterschiedlicher Proteinhäufigkeiten aus dem Vergleich mehrerer Proben von großer Bedeutung [172]. Diese Möglichkeit besteht im Vergleich von biologischen und technischen Replikaten mittels einer t-Test-Analyse.

1.5.2 Massenspektrometrische Analyse von Vernetzungsprodukten

Ein häufig genutzter Ansatz zur Identifizierung von Vernetzungsprodukten besteht in der initialen proteolytischen Spaltung vernetzter Proteine, also einer klassischen *Bottom-up*-Strategie. Diese kann nach der Vernetzung der Proteine direkt in der Lösung oder nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgen. Durch die Proteolyse ergeben sich verschiedene Möglichkeiten für vernetzte Peptide [87, 173], deren Klassifizierung in Abbildung 12 dargestellt ist. Dabei hat sich die durch Schilling *et al.* vorgeschlagene Nomenklatur in Typ 0-, Typ 1- und Typ 2-Vernetzungsprodukte allerdings nicht einheitlich durchgesetzt.

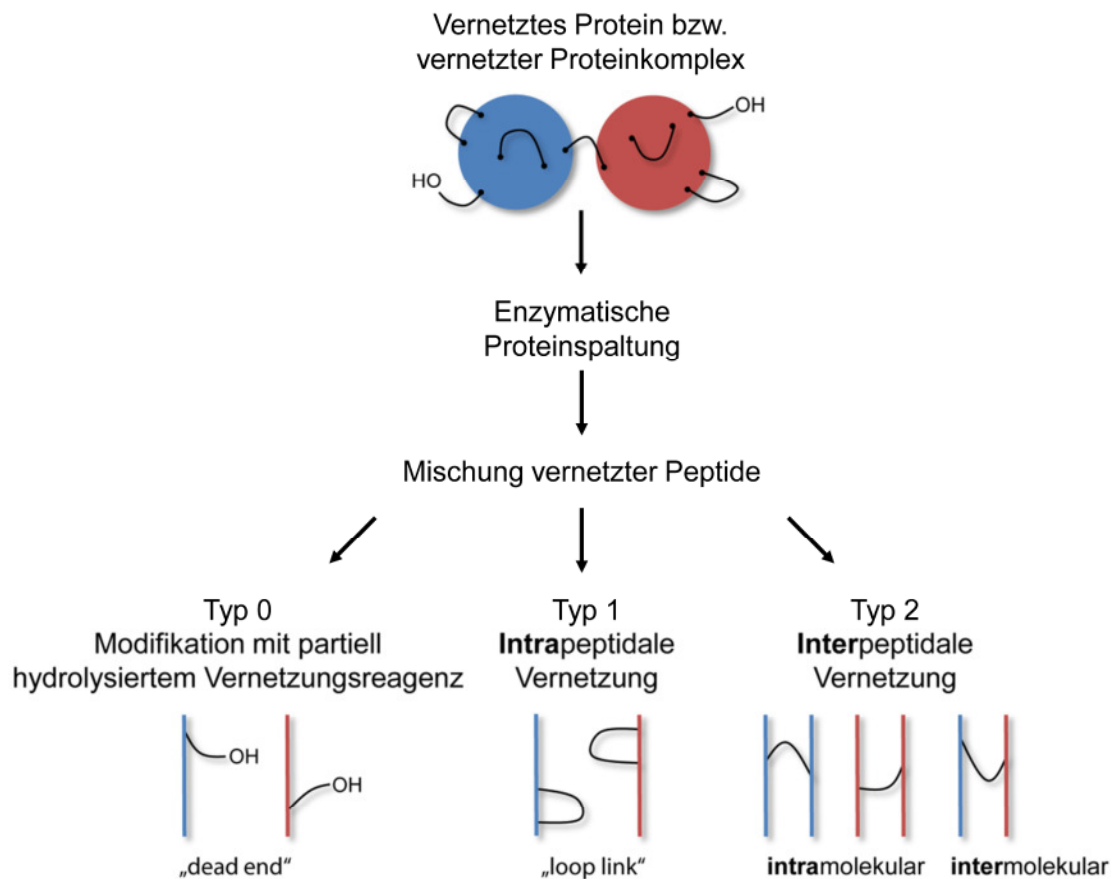


Abbildung 12: Klassifizierung von vernetzten Peptiden aus der enzymatischen Spaltung vernetzter Proteine bzw. Proteinkomplexe

Abbildung nach [87, 173].

Während Typ 0-Vernetzungsprodukte Rückschlüsse auf Sequenzbereiche der lösungsmittelzugänglichen Bereiche des Proteins erlauben, sind insbesondere Typ 2-Vernetzungsprodukte für die Ableitung von Distanzbeschränkungen für die Strukturaufklärung von Bedeutung. Im Gegensatz zu Typ 1-Vernetzungen ermöglichen diese die räumliche Zuordnung auch weit voneinander entfernter Sequenzbereiche eines Proteins. Dabei wird das beteiligte Peptid mit dem größeren Molekulargewicht als α -Peptid und das kleinere als β -Peptid bezeichnet [173].

Die automatische Identifizierung von Vernetzungsprodukten erfolgt durch den Abgleich von MS/MS-Daten mit bekannten Proteinsequenzen. Hierfür wurden in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Algorithmen bzw. Softwarelösungen entwickelt, beispielsweise StavroX [174], MeroX [175], xQuest [176], XlinkX [177] oder pLink [178]. In den komplexen Peptidmischungen aus Vernetzungsexperimenten steht die geringe Häufigkeit vernetzter Peptide einem hohen Anteil unmodifizierter Peptide gegenüber [176]. Trotz optimierter massenspektrometrischer Methoden zur Selektion

und Fragmentierung möglichst vieler Vorläuferionen wird dadurch in vielen Fällen die Identifizierung von Vernetzungsprodukten aufgrund fehlender MS/MS-Daten verhindert. Etablierte Methoden zur Begegnung dieser Problematik bestehen in der Anreicherung von Vernetzungsprodukten, zum Beispiel mittels der Affinitätsanreicherung über Biotin-Gruppen trifunktioneller Reagenzien [179] oder durch Kationenaustausch- und Größenausschluss-Chromatographie [176, 180, 181].

Weiterhin wurde die zuverlässige Identifizierung von Vernetzungsprodukten durch den Einsatz isotopenmarkierter und/oder fragmentierbarer Vernetzungsreagenzien optimiert [182-185]. Ein Beispiel für MS-fragmentierbare Reagenzien ist 4-{3-[3-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yloxycarbonyl)-propyl]-ureido}butansäure 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-ester (BuUrBu). Dieses aminreaktive Vernetzungsreagenz mit einer *Spacer*-Länge von 12,5 Å begünstigt die Identifizierung von Vernetzungsprodukten, da zusätzlich zur Sequenzinformation reagenzspezifische Reporterionen berücksichtigt werden (Abbildung 13) [175, 186, 187]. Das BuUrBu-Reagenz besteht aus zwei NHS-gekoppelten γ -Aminobuttersäure-Molekülen („Bu“), die über einen CID-spaltbaren Harnstoff-Rest („Ur“) verknüpft sind. Bei einer Typ 0-Vernetzung führt die Fragmentierung zu Peptidfragmenten mit Massendifferenzen von 129 u (entsprechend „BuUr“) und 103 u (entsprechend „Bu“), weshalb aufgrund der Symmetrie von BuUrBu im Fragmentionenspektrum ein charakteristisches Doppelsignal (+85 u und +111 u) mit einer Differenz von 26 u detektiert wird. Folglich wird dieses Doppelsignal bei einer interpeptidalen Typ 2-Vernetzung für die beiden beteiligten Peptide detektiert (Abbildung 13).

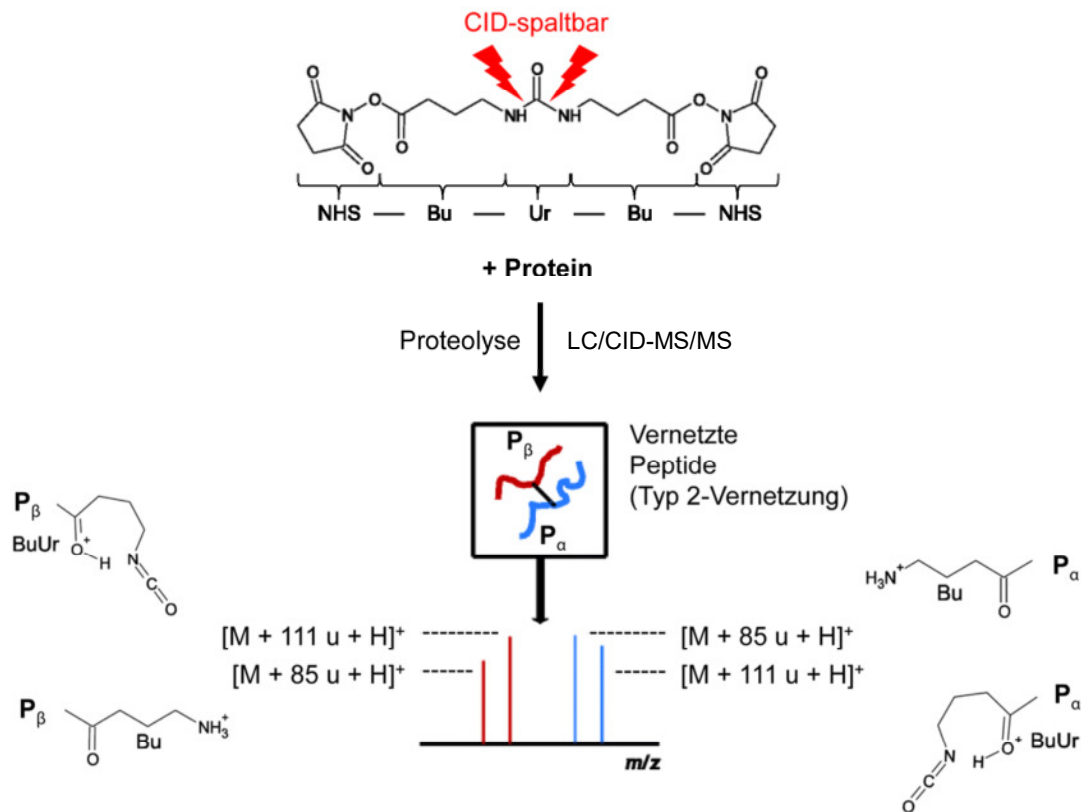


Abbildung 13: Chemische Struktur des CID-spaltbaren BuUrBu-Reagenzes und Analyse der Vernetzungsprodukte

Das BuUrBu-Reagenz besteht aus zwei NHS-gekoppelten γ -Aminobuttersäure-Molekülen („Bu“), die über einen CID-spaltbaren Harnstoff-Rest („Ur“) verknüpft sind. Nach der Proteinvernetzungsreaktion erfolgt die Proteolyse und LC/MS/MS-Analyse mit CID-Fragmentierung der Vorläuferionen. Interpeptidale Typ 2-Vernetzungsprodukte zeigen in ihren Fragmentionenspektren zwei charakteristische Doppelsignale (+85 u und +111 u) mit Abständen von 26 u. Abbildung nach [175].

Neben der verbesserten Identifizierung einzelner Vernetzungsprodukte kann diese spezifische Fragmentierung zur automatischen Identifizierung von Vernetzungsprodukten genutzt werden. Durch Vorfiltern der MS/MS-Daten nach Spektren, welche die charakteristischen Doppelsignalmuster enthalten, kann der Suchraum für die Identifizierung von Vernetzungsprodukten deutlich reduziert werden. In der MeroX-Software ist diese Funktion als RISE-Modus (*reporter ion scan event*) implementiert [187].

1.6 Zielstellung der Arbeit

Proteinkinase D ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt [8]. So wurde für die Bildung und Abspaltung von Vesikeln des intrazellulären Transports an der TGN-Membran des Golgi-Apparates eine wichtige Rolle von PKD2 beschrieben [45]. Dabei konnten viele molekulare Zusammenhänge und Protein-Protein-Interaktionen bereits mittels zellbiologischer Analysen aufgeklärt werden [55, 56]. Darüber hinaus wurde ein komplexes Interaktionsnetzwerk Golgi-Apparat-assoziiierter Membranproteine und -lipide sowie zytosolischer Effektorproteine als Modell zur Vesikelbildung postuliert, dessen Komponenten und funktionelle Beziehungen noch nicht aufgeklärt sind [48]. Zur Aufklärung der zugrunde liegenden Protein-Protein-Interaktionen sollten in dieser Arbeit Interaktionspartner der humanen PKD2 aus subzellulären Fraktionen humaner Zellen identifiziert werden. Voraussetzung dafür war die Etablierung analytischer Strategien, die auf einer Kombination von Affinitätsanreicherung, Proteinvernetzung und MS-basierter quantitativer Proteomik beruhen sollten.

Aufgrund der begrenzten Datenlage zur Proteinstruktur der PKD2 war die Ableitung von Daten zur dreidimensionalen Struktur der PKD2 mittels chemischer Vernetzung und massenspektrometrischer Analyse der Vernetzungsprodukte ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Die erhaltenen Strukturinformationen sollen als Grundlage für die bioinformatische Modellierung von PKD2-Strukturen dienen, welche für die Ableitung von Struktur-Funktionsbeziehungen der PKD2 herangezogen werden können.

Anhand dieser Fragestellungen gliedert sich die vorliegende Arbeit in folgende Teilabschnitte:

1) Expression und Reinigung eines GST-Fusionsproteins der humanen PKD2

Die humane PKD2 sollte in einem geeigneten Zellsystem als GST-Fusionsprotein exprimiert und chromatographisch gereinigt werden. Im Hinblick auf die folgenden Protein-Protein-Interaktionsanalysen und die Strukturaufklärung der PKD2 sollte die Enzymaktivität des gereinigten Proteins nachgewiesen werden.

2) Gewinnung und Charakterisierung subzellulärer Fraktionen für die PKD2-Interaktionsanalyse

Für die Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern der PKD2 mittels aminreaktiver Proteinvernetzung war die Gewinnung der zytosolischen Fraktion sowie der Golgi-Apparat-Fraktion aus Homogenaten von HeLa-Zellen mittels subzellulärer Fraktionierung ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Zur Affinitätsanreicherung von PKD2-Proteinkomplexen in Kombination mit nachfolgender photoinduzierbarer Vernetzung sollte der Einbau von Photo-Aminosäuren in Proteine in HeLa-Zellen erfolgen und das lösliche, photoaffinitätsmarkierte Zelllysat gewonnen werden. Zudem sollten die Effektivität der Zellfraktionierung und der Einbau der Photo-Aminosäuren in Proteine der HeLa-Zellen mittels MS-basierter Proteomanalysen untersucht werden.

3) Identifizierung von PKD2-Protein-Interaktionspartnern

Ein zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer analytischen Strategie zur Affinitätsanreicherung von PKD2-Interaktionspartnern aus subzellulären Fraktionen von HeLa-Zellen und deren kovalente Fixierung mittels aminreaktiver bzw. photoinduzierbarer Vernetzung. Die Zuordnung der massenspektrometrisch als PKD2-Interaktionspartner identifizierten Proteine sollte auf einer markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) basieren. Dazu sollten vergleichende statistische Analysen der LFQ-Intensitäten von Proteinen aus vernetzten und unernetzten PKD2-Proben sowie entsprechenden Kontrollproben durchgeführt werden.

4) Ableitung von Distanzbeschränkungen zur strukturellen Charakterisierung der PKD2

Die Ableitung von Distanzbeschränkungen innerhalb der PKD2 mittels der Kombination aus Proteinvernetzung und massenspektrometrischer Analyse war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Hierfür sollte PKD2 chemisch vernetzt werden und nach einer Proteolyse mittels Tandem-Massenspektrometrie die Identifizierung vernetzter Peptide erfolgen. Die erhaltenen Distanzbeschränkungen sollten zur Erstellung bzw. Validierung dreidimensionaler Strukturmodelle der PKD2 verwendet werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Aceton	VWR
Acetonitril (ACN)	VWR
Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 40 % (w/v)	Roth
Adenosindiphosphat (ADP)	Promega
Adenosintriphosphat (ATP)	Promega
Ameisensäure (FA)	Sigma-Aldrich
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	Roth
Coomassie-Brillantblau G-250	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Essigsäure	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Glutathion, reduziert (GSH)	Roth
Glycerin	Roth
Harnstoff	Roth
Iodacetamid (IAA)	Applichem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Methanol	VWR
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Grüssing

Bezeichnung	Hersteller
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
<i>N</i> -Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Roth
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	VWR
Saccharose	VWR
Salzsäure (HCl)	Grüssing
Salzsäure, 100 mM	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth
Triton X-100	Roth
β -Mercaptoethanol	Roth

Vernetzungsreagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
4-{3-[3-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yloxycarbonyl)-propyl]-ureido}butansäure 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-ester (BuUrBu)	PD Dr. M. Schäfer, Universität zu Köln
Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (BS ² G)-D ₀ /D ₄	Thermo Fisher Scientific
Photo-Leucin	Thermo Fisher Scientific
Photo-Methionin	Thermo Fisher Scientific

2.2 Zellsysteme

Zellsystem	Bezugsquelle
HeLa-Zellen (<i>Homo sapiens</i>)	Dr. Cordelia Schiene-Fischer, Institut für Biochemie, MLU Halle-Wittenberg
Sf-21-Insektenzellen (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	Prof. Dr. Elmar Wahle, Institut für Biochemie, MLU Halle-Wittenberg

2.3 Nährmedien und Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Biochrom
DMEM-LM (DMEM ohne Leucin und Methionin)	Thermo Fisher Scientific
Ex-Cell, serumfreies Insektenzellkulturmedium	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom
FKS, dialysiert	Thermo Fisher Scientific
<i>Grace's</i> Insektenzellkulturmedium	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Biochrom
Trypsin/EDTA; 0,05 % (w/v) / 0,02 % (w/v) in PBS	Biochrom

2.4 Proteine / Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific
CREBtide	Enzo Life Sciences
Endoproteinase Glu-C, <i>sequencing grade</i> 0,5 µg/µl; rekonstituiert in Wasser	Promega
Glutathion-S-Transferase (GST)	Thermo Fisher Scientific
Humane Proteinkinase D2 (PKD2), GST-Fusionsprotein	Carna Biosciences
3C-Protease des humanen Rhinovirus (GST-Fusionsprotein), <i>PreScission</i>	GE Healthcare
Porcines Trypsin, <i>sequencing grade</i> 0,5 µg/µl; rekonstituiert in 1 mM HCl	Promega

2.5 Pufferlösungen und Fließmittel für die Chromatographie

Bezeichnung	Zusammensetzung
Denaturierungslösung	400 mM Ammoniumbicarbonat 8 M Harnstoff
Fraktionierungspuffer	20 mM HEPES / NaOH (pH 7,5) 250 mM Saccharose
Gradientenpuffer I II III	20 mM HEPES / NaOH (pH 7,5) mit 2,3 M Saccharose 1,2 M Saccharose 0,8 M Saccharose
PKD2-Puffer	10 % (v/v) Glycerol 50 mM HEPES / NaOH (pH 7,5) 2 mM MgCl ₂ 150 mM NaCl 1 mM TCEP
Solubilisierungspuffer	5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 100 mM HEPES 4 % (w/v) SDS
Fixierlösung	10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol
Färbelösung A B	5 % (w/v) Coomassie-Brillantblau G-250 20 % (w/v) Ammoniumsulfat 2 % (v/v) <i>ortho</i> -Phosphorsäure

Chromatographische Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins

Fließmittel I	5 % (v/v) Glycerol 2 mM MgCl ₂ 150 mM NaCl 10 mM TCEP 50 mM TRIS / HCl (pH 7,5)
---------------	--

Bezeichnung	Zusammensetzung
Fließmittel II	s. Fließmittel I 20 mM Glutathion ohne NaCl
Fließmittel III	s. Fließmittel I ohne NaCl
Fließmittel IV	s. Fließmittel I 50 mM HEPES / NaOH (pH 7,5) ohne TRIS
Fließmittel V	s. Fließmittel IV 1 M NaCl

2.6 Komplettsysteme (Kits)

System / Anwendung	Bezeichnung und Hersteller
Glutathion-Sepharose-Matrix	4B, GE Healthcare
Gradientengele, 4-20 % Polyacrylamid	Bio-Rad
Kinase-Aktivitätstest	ADP-Glo, Promega
Laemmli-Probenpuffer	Bio-Rad
Molekulargewichtsstandard (SDS-PAGE)	PageRuler prestained (10-170 kDa), Thermo Fisher Scientific Spectra BR (10-260 kDa), Thermo Fisher Scientific
Proteaseinhibitoren-Mix	cOmplete (EDTA-frei), Roche
Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	Bio-Rad
Proteinkonzentrationsbestimmung, Bicinchoninsäure (BCA)-Methode	Thermo Fisher Scientific

2.7 Verbrauchsmaterial

Artikel	Bezeichnung und Hersteller
Anionenaustauscher-Sepharose-Säulen	HiTrap Q HP (1 ml), GE Healthcare
Glutathion-Sepharose-Säulen	GSTrap FF (1 ml), GE Healthcare
Reaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2 ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten	VWR
Sterilfilter	Filtropur S, Sarstedt
Ultrazentrifugationsröhrchen (8,9 / 38,5 ml)	OptiSeal / Ultra-Clear thick-wall, Beckman Coulter
Zellkulturflaschen und -schalen	VWR
Zellschaber	Falcon, Corning
Zentrifugationssäulen (0,5 ml)	Pierce Screw Cap, Thermo Fisher Scientific
Zentrifugationsfiltereinheiten (0,5 ml / Molekulargewichtsausschluss ≤ 30 kDa)	Amicon Ultra, Merck Millipore
Zentrifugenröhrchen (15 / 50 ml)	Greiner Bio-One

2.8 Geräte

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Analysenwaage	LE225D, Sartorius
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific
Flüssigkeitschromatographiesysteme	ÄKTA FPLC und ÄKTA Prime, GE Healthcare
Geldokumentationssystem	Gel Doc XR, Bio-Rad
Gelelektrophoresesystem	Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad
Gewebehomogenisator	Dounce, Wheaton
Magnetrührer	SLR, Schott Instruments
Mikroskop	Leica Microsystems
pH-Meter	pH 211, HANNA Instruments

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Photometer	V-630, Jasco
Plattenlesegerät	Polarstar Galaxy, BMG Labtech Fluostar Optima (Lumineszenz), BMG Labtech
Rotationsschüttler	Eigenbau (Herr D. Reese, MLU Halle-Wittenberg)
Sicherheitswerkbank	HeraSafe KS, Thermo Fisher Scientific
Standzentrifuge, kühlbar	Avanti J-20 XP, Beckman Coulter
Taumelschüttler	SSL4, Stuart
Thermoschüttler	Biometra TS1, Analytik Jena
Tischzentrifuge, kühlbar	5415 R / 8504 R, Eppendorf
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner, VWR
Ultraschallhomogenisator	Vibra Cell 75185, Sonics
Ultrazentrifuge	Optima L-90K, Beckman Coulter Rotoren: SW28, 90Ti
UV-Bestrahlungskammer	Eigenbau (Prof. Dr. H.-H. Rüttinger, MLU Halle-Wittenberg)
Vakuumkonzentrator	Savant SPD 1010 SpeedVac, Thermo Fisher Scientific

LC/MS-System

Komponente	Bezeichnung und Hersteller
Nano-HPLC-System	Dionex Ultimate 3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific
RP-C8-Vorsäule	Acclaim PepMap (300 μm \times 5 mm, 5 μm , 100 Å), Thermo Fisher Scientific
RP-C18-Trennsäule	Acclaim PepMap (75 μm \times 250 mm, 2 μm , 100 Å), Thermo Fisher Scientific
Nano-ESI-Ionenquelle	Nanospray Flex, Thermo Fisher Scientific
Massenspektrometer	Orbitrap Fusion Tribrid, Thermo Fisher Scientific

2.9 Elektronische Datenverarbeitung

Anwendung	Bezeichnung und Entwickler
Steuerung der ÄKTA FPLC-Systeme	UNICORN, GE Healthcare
Geldokumentation	Quantity One, Bio-Rad
Steuerung des HPLC-Systems	Chromeleon, Thermo Fisher Scientific
Steuerung des Massenspektrometers	Orbitrap Fusion Tune, Thermo Fisher Scientific
Steuerung der HPLC/MS-Kopplung, Aufnahme und Analyse massenspektrometrischer Rohdaten	Xcalibur (Version 4.0.27.13), Thermo Fisher Scientific
Prozessierung massenspektrometrischer Rohdaten / Proteinidentifizierung	Proteome Discoverer (Version 1.4.1.14), Thermo Fisher Scientific MaxQuant (Version 1.5.2.8), Prof. Dr. Jürgen Cox, Max-Planck-Institut Martinsried
Markierungsfreie Proteinquantifizierung	MaxQuant (MaxLFQ)
Statistische Auswertung und Visualisierung von Quantifizierungsdaten	Perseus (Version 1.5.1.6), Prof. Dr. Jürgen Cox
Erstellung von Venn-Diagrammen	Venny (Version 2.0), Juan Carlos Oliveros (http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny)
GO-Datenbanksuche	AmiGO-Datenbank / AmiGO Slimmer (Version 1.8), Gene Ontology-Konsortium (http://amigo1.geneontology.org/cgi-bin/amigo/slimmer)
Visualisierung von Protein-Protein- Interaktionen	Cytoscape (Version 3.3.0), Cytoscape-Konsortium
Analyse publizierter Protein-Protein- Interaktionen	BioGRID-Datenbank (Version 3.4) (http://thebiogrid.org)
Identifizierung von Vernetzungsprodukten	MeroX (Version 1.6.0), Dr. Michael Götze, Institut für Biochemie, MLU Halle-Wittenberg
Visualisierung von Vernetzungen	xVis, Dr. Franz Herzog, LMU München (https://xvis.genzentrum.lmu.de)

Automatische Erstellung von
Proteinstrukturmodellen

I-TASSER, Yang Zhang, University of
Michigan
([https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/
I-TASSER](https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER))

Analyse von Proteinstrukturen

PyMol (Version 0.99), DeLano Scientific

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt.

3.1.1 Expression der humanen Proteinkinase D2 als GST-Fusionsprotein in Sf-21-Insektenzellen

Die Arbeiten zur Expression des GST-PKD2-Fusionsproteins in Baculovirus-infizierten Sf-21-Insektenzellen erfolgten im Zellkulturlabor der Abteilung von Prof. Dr. Elmar Wahle am Institut für Biochemie der MLU Halle-Wittenberg.

Die Sf-21-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) wurden als adhärente Kulturen in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² in 15 ml *Grace's* Insektenzellkulturmedium mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) bei 25 °C bis zur Konfluenz inkubiert. Für die Infektion mit Baculoviren erfolgte die Überführung der Zellen in 30 ml serumfreies Ex-Cell-Kulturmedium, wobei die Kulturen im Verhältnis 1:3 (v/v) verdünnt und in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² bis zur Konfluenz expandiert wurden. Anschließend wurde durch Überführung der Zellen in Glaskolben und Inkubation bei 25 °C in einem Schüttelinkubator eine Suspensionskultur induziert. Nach drei Tagen wurde durch Auszählen von vier Großquadraten einer Zählkammer die Zellzahl bestimmt, die Kultur durch Verdünnung mit Kulturmedium auf eine Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen / ml justiert und weiter inkubiert. Dieser Vorgang wurde zur Expansion der Zellkultur auf ein Volumen von ~ 400 ml wiederholt. Anschließend wurde die Kultur mit einer Suspension von Baculoviren, die das Konstrukt zur Expression des GST-PKD2-Fusionsproteins trugen, infiziert (Multiplizität der Infektion, *multiplicity of infection* – MOI = 2). Dazu wurde die Gesamtzellzahl der Kultur berechnet und das benötigte Volumen an Baculovirus-Suspension entsprechend deren *plaque forming units* (PFU)-Konzentration zugegeben. Anschließend wurde die Kultur auf 1 x 10⁶ Zellen / ml verdünnt und für weitere drei Tage inkubiert. Zur weiteren Verarbeitung wurde die Zellsuspension in Zentrifugenbecher überführt und bei 500 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände des Kulturmediums wurde die sedimentierte Zellmasse in

phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet entweder direkt für den Zellaufschluss und die chromatographische Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins verwendet oder zur Lagerung bei -20 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.1.2 Kultivierung der HeLa-Zelllinie

Die Arbeiten zur Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgten im Zellkulturlabor von Frau Dr. Cordelia Schiene-Fischer am Institut für Biochemie der MLU Halle-Wittenberg.

Die Zellen wurden in 30 ml *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10 % (v/v) FKS in Standard-Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % (v/v). Nach einer Kultivierungszeit von 3-4 d wurde das Medium erneuert. Bei Erreichen der Konfluenz erfolgte die Subkultivierung der Zellen, wozu das Medium abgesaugt und mit 10 ml vorgewärmter PBS gespült wurde. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung wurde bis zur Ablösung der Zellen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellkultur in vorgewärmtem DMEM resuspendiert, im Verhältnis 1:10 (v/v) oder 1:20 (v/v) mit DMEM verdünnt und in neue Flaschen überführt.

3.1.2.1 Zellkultur für die subzelluläre Fraktionierung

Konfluente HeLa-Zellkulturen wurden in Zellkulturschalen mit einer Wachstumsfläche von 150 cm² subkultiviert und in 20 ml DMEM bis zu einer Zelldichte von 80-90 % inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden 5 ml vorgekühlte PBS zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und resuspendiert. Die Suspensionen wurden in Zentrifugenröhrchen vereint und die Zellen durch Zentrifugation bei 500 x g und 4 °C für 5 min sedimentiert. Anschließend wurde die gesamte Zellmasse durch zweimalige Resuspension in 50 ml vorgekühlter PBS und Zentrifugation gewaschen. Die Zellen wurden in vorgekühltem und mit Proteaseinhibitoren versetztem Fraktionierungspuffer im Verhältnis 1:5 (v/v) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

3.1.2.2 Einbau photoaktivierbarer Aminosäuren in HeLa-Zellen

Konfluente HeLa-Zellkulturen wurden in Zellkulturschalen mit einer Wachstumsfläche von 150 cm² subkultiviert und bis zu einer Zelldichte von 70-80 % in 20 ml DMEM inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellkulturen wurden zweimal mit 10 ml vorgewärmter PBS gespült. Anschließend wurden 20 ml sterilfiltriertes und vorgewärmtes Medium (DMEM-LM) mit 10 % (v/v) dialysiertem FKS, 2 mM Photo-Methionin und 4 mM Photo-Leucin zugegeben. Die Zellen wurden für 24 h bis zu einer Zelldichte von ca. 90 % inkubiert und anschließend wie in Abschnitt 3.1.2.1 beschrieben verarbeitet. Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Zellmasse in 1 ml PBS je eingesetzter Zellkulturschale resuspendiert und in Volumina zu 1 ml auf Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, der Überstand verworfen sowie die Zellmasse in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

Alle proteinbiochemischen Methoden wurden, sofern nicht anders beschrieben, im Eisbad bzw. bei 4 °C durchgeführt.

3.2.1 Bearbeitung des zellulären Ausgangsmaterials und Proteinextraktion

3.2.1.1 Zellaufschluss für die Isolierung des GST-PKD2-Fusionsproteins aus Sf-21-Insektenzellen

Die Zellmasse aus der Baculovirus-vermittelten Expression des GST-PKD2-Fusionsproteins in Sf-21-Insektenzellen (Abschnitt 3.1.1) wurde aufgetaut und im Verhältnis 1:5 (v/v) in PKD2-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in einem vorgekühlten Gewebehomogenisator homogenisiert. Nach der Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1 % (v/v) wurde das Homogenat für eine Stunde auf einem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend bei 20 000 x g für 1 h zentrifugiert. Das überständige Lysat wurde direkt für die chromatographische Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins verwendet.

3.2.1.2 Subzelluläre Fraktionierung von HeLa-Zellen und Anreicherung der Golgi-Apparat-Fraktion

Die HeLa-Zellsuspension wurde aufgetaut und in einem vorgekühlten Gewebehomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde zur Sedimentation von Zellkernen und intakten Zellen bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert. Der postnukleäre Überstand (PNS) wurde durch Zentrifugation bei 100 000 x g für 1 h in die zytosolische Fraktion (Überstand) und die Membranfraktion (Sediment) aufgetrennt. Die zytosolische Fraktion wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Die Membranfraktion wurde zur weiteren Bearbeitung in 6 ml Fraktionierungspuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Anreicherung der Golgi-Apparat-Fraktion, basierend auf einem publizierten Anreicherungsprotokoll [188]. Dazu wurde die resuspendierte Membranfraktion mit 6 ml Gradientenpuffer I gemischt und in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Durch sequentielle Überschichtung mit 14 ml Gradientenpuffer II und 8 ml Gradientenpuffer III wurde ein diskontinuierlicher Saccharose-Dichtegradient erzeugt, der bei 100 000 x g für 2,5 h zentrifugiert wurde. Die an der Grenzfläche zwischen Gradientenpuffer II und III angereicherte Golgi-Apparat-Fraktion wurde mit einer Kanüle in einem Gesamtvolumen von 2 ml abgenommen. Anschließend wurde das Extrakt in einem Verhältnis von 1:4 (v/v) mit 20 mM HEPES (pH 7,5) verdünnt und bei 100 000 x g für 1 h zentrifugiert. Das sedimentierte Material wurde in 1 ml Fraktionierungspuffer mit 0,1 % (w/v) DDM aufgenommen, auf einem Rotationsschüttler für 1 h inkubiert und bei 16 000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3 Gewinnung der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction aus HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellkulturen wurden nach dem Einbau von Photo-Methionin und Photo-Leucin (Abschnitt 3.1.2.2) in 500 µl PBS mit Proteaseinhibitoren pro Zellkulturschale resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch drei Ultraschallstöße mit einer Leistungsamplitude von 40 % und einer Dauer von 5 s. Zwischen den Einzelstößen wurde die Probe für 5 min im Eisbad gekühlt. Anschließend wurde bei 16 000 x g für 30 min zentrifugiert und der Überstand, welcher die lösliche, photoaffinitätsmarkierte Proteinfraction enthielt, abgenommen.

3.2.1.4 Proteinextraktion für Proteomanalysen von subzellulären Fraktionen und die Analyse des Einbaus der Photo-Aminosäuren

Die Proben des Homogenats sowie subzellulärer Fraktionen von HeLa-Zellen (PNS, zytosolische Fraktion, Membranfraktion, Golgi-Apparat-Fraktion) bzw. von photoaffinitätsmarkierten HeLa-Zellen, die in PBS resuspendiert waren, wurden im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Solubilisierungspuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch einen Ultraschallstoß für 2 s mit einer Leistungsamplitude von 40 % homogenisiert und bei 16 000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und einer Proteinpräzipitation mit Aceton unterzogen. Dazu wurden die Proben im Verhältnis 1:4 (v/v) mit eisgekühltem Aceton versetzt und für 16 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde bei 16 000 x g für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das sedimentierte Präzipitat getrocknet. Die gefällten Proteine wurden in Denaturierungslösung resuspendiert und für 10 min in einem Ultraschallbad homogenisiert. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung (Abschnitt 3.3.1) wurden die Proben mit Denaturierungslösung auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und einer Proteinspaltung in der Lösung mit Trypsin unterzogen (Abschnitt 3.3.3.2).

3.2.2 Flüssigkeitschromatographische Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins aus Sf-21-Zelllysaten

Alle Arbeitsschritte erfolgten an ÄKTA-Chromatographiesystemen mit kommerziell erhältlichen Chromatographiesäulen. Die Isolation des GST-PKD2-Fusionsproteins basierte auf einem zweistufigen Protokoll aus GST-Affinitätschromatographie und nachfolgender Anionenaustausch-Chromatographie. Ausgewählte Fraktionen der chromatographischen Schritte wurden mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.2) analysiert.

3.2.2.1 GST-Affinitätschromatographie von Sf-21-Zelllysaten

Lysate von Sf-21-Zellen wurden bei einer Flussrate von 0,05 ml/min über eine Probenschleife auf eine Glutathion-Sepharose-Säule (GSTrap FF, 1 ml) geleitet, die zuvor mit fünf Säulenvolumina Fließmittel I äquilibriert worden war. Anschließend wurde das Säulenmaterial bei einer Flussrate von 1 ml/min mit mindestens zehn Säulenvolumina Fließmittel I gewaschen bzw. bis das Signal des UV-Detektors die ursprüngliche Basislinie erreicht hatte. Die Elution des gebundenen GST-PKD2-

Fusionsproteins erfolgte durch Inkubation mit Fließmittel II bei einer Flussrate von 0,05 ml/min.

3.2.2.2 Anionenaustausch-Chromatographie des Eluats der GST-Affinitätschromatographie

Die Eluatfraktionen der GST-Affinitätschromatographie, welche das GST-PKD2-Fusionsprotein enthielten, wurden vereint und bei einer Flussrate von 1 ml/min über eine Probenschleife auf eine Anionenaustauscher-Sepharose-Säule (HiTrap Q HP, 1 ml) geladen, die zuvor mit fünf Säulenvolumina Fließmittel III äquilibriert worden war. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit mindestens zehn Säulenvolumina Fließmittel III bzw. bis zum Erreichen der ursprünglichen UV-Basislinie gewaschen und der Austausch des Fließmittels auf Fließmittel IV durchgeführt. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch Inkubation mit Fließmittel V bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Eluatfraktionen, welche homogenes GST-PKD2-Fusionsprotein enthielten, wurden vereint und mit Zentrifugationsfiltereinheiten (0,5 ml / Molekulargewichtsausschluss ≤ 30 kDa) bei 14 000 x g konzentriert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (Abschnitt 3.3.1) wurden die Proteinlösungen aliquotiert und zur Lagerung bei -20 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.3 Entfernung der GST-Affinitätsmarkierung des GST-PKD2-Fusionsproteins

Die GST-Affinitätsmarkierung des PKD2-Fusionsproteins wurde durch Inkubation mit der 3C-Protease des humanen Rhinovirus (*PreScission*) und anschließender GST-Affinitätschromatographie entfernt. Dazu wurde GST-PKD2 im Eisbad für 16 h mit 0,02 U oder 0,2 U Protease je Mikrogramm Fusionsprotein inkubiert. Anschließend wurde die Probe in verschließbaren Zentrifugationssäulen (0,5 ml) für 1 h mit 50 µg Glutathion-Sepharose-Matrix inkubiert, die zuvor durch dreimalige Resuspension in 400 µl PKD2-Puffer und Zentrifugation bei 500 x g für 2 min äquilibriert worden war. Die Durchflussfraktion wurde aufgefangen und die Matrix dreimal mit 100 µl PKD2-Puffer gespült. Die enzymatische Spaltung und die chromatographische Trennung wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abschnitt 3.3.2) und Fraktionen, die PKD2 enthielten, wurden vereint. Bei Verwendung des kommerziellen GST-PKD2-Fusionsproteins wurde anschließend ein Austausch der Pufferlösung durchgeführt. Dazu

wurde die Proteinlösung mit Zentrifugationsfiltereinheiten (0,5 ml / Molekulargewichtsausschluss ≤ 30 kDa) bei 14 000 x g für 15 min konzentriert und im Verhältnis 1:5 (v/v) mit PKD2-Puffer verdünnt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Anschließend wurde die PKD2-Lösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität des GST-PKD2-Fusionsproteins

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität von GST-PKD2 wurde ein lumineszenzbasiertes Testsystem im Mikrotiterplatten-Format verwendet und nach Herstellervorgaben eingesetzt. Das System beruhte auf der Quantifizierung von Adenosindiphosphat (ADP) aus der Kinasereaktion.

Für den Aktivitätstest wurde eine Lösung hergestellt, die 200 ng GST-PKD2 enthielt, und diese in acht Verdünnungsschritten konsekutiv im Verhältnis 1:1 (v/v) mit PKD2-Puffer verdünnt. Anschließend erfolgte für jede zu analysierende Kinase menge aus der Verdünnungsreihe die Zugabe des Substrats (synthetisches Peptid CREBtide) in einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sowie von ATP in einer Konzentration von 25 μM . Die Reaktionsmischungen wurden für 1 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze gemäß den Herstellervorgaben bearbeitet und die Lumineszenzintensitäten an einem Plattenlesegerät analysiert (Integrationszeit: 0,25 s). Für Kontrollexperimente wurden entweder 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ CREBtide (Negativkontrolle) oder 25 μM ATP (PKD2-Autophosphorylierung) zugegeben.

3.2.5 Aktivierung der Photo-Aminosäuren

Die photoaktivierbaren Aminosäuren Photo-Methionin und Photo-Leucin wurden in einer Konzentration von je 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 1 ml PBS gelöst und in Aliquots zu je 50 μl aufgeteilt. Die Ansätze wurden anschließend mit UV-A-Licht bestrahlt ($\lambda_{\text{max}} = 360$ nm), wobei in Intervallen Proben entnommen und deren Absorption bei einer Wellenlänge von 345 nm an einem UV-Spektrometer bestimmt wurde. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden prozentual auf den Ausgangswert ohne Bestrahlung (= 100 %) bezogen und gegen die Bestrahlungsdosis aufgetragen.

3.2.6 Affinitätsanreicherung und Vernetzung von PKD2-Interaktionspartnern

Die Anreicherung von PKD2-Interaktionspartnern erfolgte in verschließbaren Zentrifugationssäulen (0,5 ml) bei 500 x g für 2 min. Die Proben der einzelnen Schritte der Anreicherungsexperimente wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abschnitt 3.3.2). Zunächst wurden 20 µg einer Glutathion-Sepharose-Matrix durch dreimalige Resuspension in 400 µl PKD2-Puffer äquilibriert. Anschließend wurden 20 µg (Anreicherung aus der zytosolischen Fraktion), 10 µg (Anreicherung aus der Golgi-Apparat-Fraktion) oder 5 µg (Anreicherung aus der photoaffinitätsmarkierten Fraktion) des GST-PKD2-Fusionsproteins durch Inkubation für 1 h auf einem Rotationsschüttler an die Affinitätsmatrix gebunden. Für die GST- und Matrix-Kontrollproben wurde die äquimolare Menge GST bzw. das entsprechende Volumen an PKD2-Puffer eingesetzt. Danach wurde die Affinitätsmatrix auf einem Rotationsschüttler für 2 h mit 800 µl der zytosolischen Fraktion, 100 µl der Golgi-Apparat-Fraktion oder 200 µl der photoaffinitätsmarkierten Fraktion inkubiert. Die Vernetzung interagierender Proteine wurde in den Proben der zytosolischen Fraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion durch Inkubation mit 5 mM des aminreaktiven Vernetzungsreagenzes BS²G-D₀/D₄ (Stammlösung in DMSO) für 2 h durchgeführt. Kontrollproben ohne Vernetzungsreagenz wurden mit einem äquivalenten Volumen DMSO behandelt. Die Vernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von Ammoniumbicarbonat-Lösung in einer Endkonzentration von 20 mM und Inkubation für 15 min gestoppt. Für die Proben der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion wurde die Vernetzung durch UV-A-Bestrahlung mit einer Dosis von 8000 mJ/cm² induziert. Nach den Vernetzungsreaktionen wurde die Affinitätsmatrix dreimal in 400 µl PKD2-Puffer mit 500 mM NaCl resuspendiert und gewaschen. Die Proben wurden anschließend in 40 µl Denaturierungslösung aufgenommen, bei 37 °C und 400 Upm für 15 min inkubiert und einer Proteinspaltung in der Lösung mit Glu-C und Trypsin unterzogen (Abschnitt 3.3.3.2).

Eine Übersicht der durchgeführten Anreicherungsexperimente ist in Tabelle 1 gezeigt. Alle Versuche wurden als biologische Replikate (unabhängige Zellkultur und subzelluläre Fraktionierung) durchgeführt. Die Matrix-Kontrollproben ohne Vernetzungsreagenz sowie alle GST-PKD2-Proben wurden als Triplikate analysiert. Die Analyse der vernetzten Matrix-Kontrollproben sowie der GST-Kontrollproben mit oder ohne Vernetzungsreagenz erfolgte in Triplikaten (Golgi-Apparat-Fraktion,

photoaffinitätsmarkierte Proteinfraktion) oder Duplikaten (zytosolische Fraktion). Zudem wurden jeweils zwei technische Replikate durchgeführt.

Tabelle 1: Probenübersicht der durchgeführten Anreicherungsexperimente

GST: Glutathion-S-Transferase, PKD2: Proteinkinase D2, XL: aminreaktive Vernetzung, Z: zytosolische Fraktion, G: Golgi-Apparat-Fraktion, UV: photoinduzierte Vernetzung, P: photoaffinitätsmarkierte Proteinfraktion

Probe	GST-PKD2	GST	Fraktion	Vernetzung	Reaktivität	Status
Matrix	-	-	Z / G	-	/	Kontrollprobe
Matrix-XL	-	-	Z / G	+	aminreaktiv	Kontrollprobe
GST	-	+	Z / G	-	/	Kontrollprobe
GST-XL	-	+	Z / G	+	aminreaktiv	Kontrollprobe
PKD2	+	-	Z / G	-	/	Kontrollprobe
PKD2-XL	+	-	Z / G	+	aminreaktiv	Identifizierung PKD2-Interaktions- partner
Matrix	-	-	P	-	/	Kontrollprobe
Matrix-UV	-	-	P	+	photoinduziert	Kontrollprobe
GST	-	+	P	-	/	Kontrollprobe
GST-UV	-	+	P	+	photoinduziert	Kontrollprobe
PKD2	+	-	P	-	/	Kontrollprobe
PKD2-UV	+	-	P	+	photoinduziert	Identifizierung PKD2-Interaktions- partner

3.2.7 Chemische Vernetzung der PKD2

Eine Stammlösung der PKD2 wurde mit PKD2-Puffer auf eine Konzentration von 10 μM eingestellt. Anschließend wurde das Vernetzungsreagenz BuUrBu in einem 100-fachen molaren Überschuss in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben (Konzentration der Stammlösung: 30 mM in DMSO), während Kontrollproben mit dem entsprechenden Volumen DMSO behandelt wurden. Die Proben wurden für 2 h inkubiert und die Reaktion wurde durch 15-minütige Inkubation mit Ammoniumbicarbonat (Endkonzentration 20 mM) abgestoppt. Nach der Vernetzungsreaktion wurden die Proben mittels SDS-PAGE analysiert (Abschnitt 3.3.2). Für die massenspektrometrische Analyse erfolgte eine Proteinspaltung in der Gelmatrix mit Glu-C und Trypsin (Abschnitt 3.3.3.1).

3.3 Bioanalytische Methoden

3.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen komplexer Proben erfolgte mittels Bradford- oder Bicinchoninsäure (BCA)-Testsystemen [189, 190] nach Herstellervorgaben in Mikrotiterplatten. Zur Erstellung von Kalibriergeraden wurden definierte Konzentrationen an bovinem Serumalbumin (BSA) verwendet. Die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch die Messung der Absorption in einem Plattenlesegerät bei Wellenlängen von 595 nm (Bradford-Test) oder 570 nm (BCA-Test). Alle Kalibrier- und Probelösungen wurden als Triplikate analysiert. Die Proteinkonzentration in Proben mit einem gereinigten Protein wurde mittels photometrischer Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz anhand des molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins (Tabelle 2).

Tabelle 2: Extinktionskoeffizienten für die Berechnung von Proteinkonzentrationen

Die Werte wurden basierend auf der Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins mit der ProtParam-Anwendung des *Swiss Institute of Bioinformatics* berechnet (<http://web.expasy.org/protparam>).

Protein	Molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in Wasser (Cysteine reduziert)
GST-PKD2	121265 M ⁻¹ cm ⁻¹
PKD2	78155 M ⁻¹ cm ⁻¹

3.3.2 Gelelektrophoretische Trennung und Färbung der Proteine

Die Trennung von Proteinen anhand ihrer apparenten Molekulargewichte erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE [191]. Dazu wurden Proteinlösungen und Laemmli-Probenpuffer [191], der mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol supplementiert war, im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf SDS-Polyacrylamidgele aus Sammelgel und Trenngel unterschiedlicher Acrylamidkonzentration (Tabelle 3) oder kommerziell erhältliche Gradientengele (4-20 % Acrylamid) aufgetragen. Nach der Elektrophorese bei 180 V wurden die aufgetrennten Proteine nach der *Blue-Silver*-Methode [192] mit kolloidalem Coomassie-Brillantblau G-250 angefärbt. Dazu wurden die Gele zunächst für 1 h bei

Raumtemperatur in Fixierlösung inkubiert und anschließend zweimal in Wasser gewaschen. Anschließend wurde eine Mischung aus den Färbelösungen A und B im Verhältnis 1:50 (v/v) zugegeben und die Gele wurden für 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Gelhintergrund wurde durch Spülen mit Wasser entfärbt. Danach erfolgte die Dokumentation der Gele mit einem Geldokumentationssystem.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE

Komponente	Sammelgel	Trenngel	
		8 %	10 %
40 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	650 µl	2000 µl	2500 µl
1,5 M TRIS / HCl (pH 8,8)	-	2500 µl	2500 µl
0,5 M TRIS / HCl (pH 6,8)	1250 µl	-	-
Wasser	3000 µl	5340 µl	4840 µl
10 % (w/v) SDS	50 µl	100 µl	100 µl
10 % (w/v) APS	25 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

3.3.3 Enzymatische Spaltung von Proteinen für die massenspektrometrische Analyse

Zur Minimierung des Eintrags von Keratin und anderen Kontaminanten wurden die Arbeitsschritte zur Proteinspaltung für die massenspektrometrische Analyse (Abschnitt 3.3.4) an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt.

3.3.3.1 Spaltung von Proteinen in einer Polyacrylamid-Gelmatrix

Die enzymatische Spaltung von Proteinen in der Polyacrylamid-Gelmatrix erfolgte gemäß eines publizierten Protokolls [193]. Dazu wurden angefärbte Proteinbanden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, zerkleinert und in Reaktionsgefäße überführt. Nach einem 10-minütigen Waschschrift mit 500 µl Acetonitril (ACN) wurde zur Reduktion von Cystin-Brücken mit 50 µl einer 10 mM Dithiothreitol (DTT)-Lösung für 30 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut mit ACN gewaschen. Zur Alkylierung freier Thiolgruppen erfolgte die Zugabe von 50 µl einer 55 mM Iodacetamid (IAA)-Lösung für 20 min bei 25 °C unter Lichtausschluss. Nach einem weiteren Waschschrift mit ACN wurden die Gelstücke durch Inkubation mit 100 µl

eines 1:1 (v/v)-Gemisches aus ACN und 100 mM (w/v) Ammoniumbicarbonat vollständig entfärbt und erneut mit ACN gewaschen. Anschließend erfolgten abhängig vom Gelvolumen die Zugabe von maximal 40 µl Enzymlösung in einem Enzym-zu-Substrat-Verhältnis von 1:50 (w/w) und eine Inkubation für 2 h bei 4 °C. Zur proteolytischen Spaltung mit Trypsin wurden die Proben anschließend für 16 h bei 37 °C inkubiert. Für eine kombinierte Spaltung wurde zunächst für 16 h bei 37 °C mit Endoproteinase Glu-C inkubiert, anschließend Trypsin zugegeben und die Inkubation für weitere 4 h bei 37 °C fortgesetzt. Zur Extraktion der proteolytischen Peptide aus der Gelmatrix wurde ein 1:2 (v/v)-Gemisch aus 5 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) und ACN zugegeben (zweifaches Volumen des Reaktionsansatzes), bei 37 °C für 15 min geschüttelt und der Vorgang nach Abnahme des Überstandes wiederholt. Die vereinigten Peptidextrakte wurden in einem Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von ca. 10-20 µl konzentriert und sofort für die LC/MS-Analyse eingesetzt.

3.3.3.2 Proteinspaltung in Lösung

In Denaturierungslösung resuspendierte Proteinproben wurden mit 10 mM DTT für 30 min bei 37 °C reduziert und mit 55 mM IAA unter Lichtausschluss für 20 min bei 25 °C alkyliert. Anschließend wurden die Proben im Verhältnis 1:10 (v/v) mit Wasser verdünnt und in einem Enzym-zu-Substrat-Verhältnis von 1:50 (w/w) der enzymatischen Spaltung unterzogen. Diese erfolgte entweder mit Trypsin für 16 h bei 37 °C oder mit einer Kombination von Glu-C für 16 h und Trypsin für 4 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Proben mit TFA auf einen pH-Wert von ca. 2 eingestellt, im Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von ca. 10-20 µl konzentriert und sofort für die LC/MS-Analyse verwendet.

3.3.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Die Analyse von Peptidlösungen erfolgte in LC/MS/MS-Experimenten an einem Nano-HPLC-System, das über eine Nano-ESI-Quelle an ein Orbitrap Fusion-Massenspektrometer gekoppelt war.

Die Proben wurden über das Nano-HPLC-System bei einer Flussrate von 30 µl/min auf eine RP-C8-Vorsäule geladen und für 15 min mit 0,1 % TFA (v/v) gewaschen. Anschließend wurden die Peptide von der Vorsäule eluiert und auf einer RP-C18-Säule

getrennt, die zuvor mit Fließmittel A (0,1 % (v/v) Ameisensäure) äquilibriert worden war. Die Elution der Peptide erfolgte bei einer Flussrate von 300 nl/min mit einem linearen Gradienten von Fließmittel A nach Laufmittel B (0,08 % (v/v) Ameisensäure in ACN) auf 35 % (v/v). Die eluierenden Peptide wurden über die Nano-ESI-Quelle in das Massenspektrometer transferiert und analysiert. Dabei wurden unterschiedliche Kombinationen von Fragmentierungsmethoden und Massenanalysatoren genutzt. Die Parameter der verwendeten LC/MS/MS-Methoden sind in Tabelle 4 aufgeführt. In allen Experimenten wurden zunächst im Orbitrap-Analysator mit einem Zeitabstand von 5 s im m/z -Bereich 300 bis 1500 hochaufgelöste Massenspektren aufgenommen ($R = 120000$ bei m/z 200). Innerhalb des Zeitfensters wurden die Ionen mit den höchsten Signalintensitäten (≥ 5000 Counts) und Ladungszuständen ≥ 2 im Quadrupol-Massenfilter für MS/MS-Experimente ausgewählt (Isolationsfenster 2 Th), in der LTQ (CID / ETD) oder dem IRM (HCD) fragmentiert und die Fragmentionen in der Orbitrap ($R = 15000$ bei m/z 200) oder der LTQ analysiert. Bereits analysierte Vorläuferionen wurden für 60 s von einer erneuten Fragmentierung ausgeschlossen (*dynamic exclusion*).

Tabelle 4: Verwendete LC/MS/MS-Methoden

Zur massenspektrometrischen Analyse von Peptidgemischen aus den durchgeführten Versuchsreihen wurden unterschiedliche LC/MS/MS-Methoden verwendet. Für die Kombination aus CID- und ETD-Fragmentierung (*) zur Analyse von subzellulären Proteinfractionen aus HeLa-Zellen wurde folgendes datenabhängiges Fragmentierungsschema verwendet: ETD-Fragmentierung erfolgte für Vorläuferionen der Ladungszustände 3⁺ (*m/z* 300-650), 4⁺ (*m/z* 300-900), 5⁺ (*m/z* 300-950) und 6-8⁺, CID-Fragmentierung für Vorläuferionen der Ladungszustände 2⁺, 3⁺ (*m/z* 650-1200), 4⁺ (*m/z* 900-1200) und 5⁺ (*m/z* 950-1200) [194]. XL: Vernetzung, AS: Aminosäuren

	LC/MS/MS-Experiment		
	Identifizierung / Vernetzung gereinigte Proteine	Affinitätsanreicherung-XL aminreaktiv / photoreaktiv	Fraktionierung / Einbau Photo-AS
LC-Gradient	30 min / 90 min	300 min / 180 min	300 min
Analyse der Vorläuferionen	Orbitrap	Orbitrap	Orbitrap
Max. Injektions- zeit [ms]	50 ms	50 ms	50 ms
Analyse der Fragmentionen	Orbitrap	LTQ / Orbitrap	LTQ / Orbitrap
Fragmentierung	HCD / <i>stepped</i> -HCD	CID / HCD	*CID, ETD / HCD
Normalisierte Kollisionsenergie (NCE)	35 % / 35 ± 5 %	35 % / 27 %	35 % / 27 %
Max. Injektions- zeit [ms]	200	50 / 200	50, 100 / 200

3.4 Bioinformatische Methoden

3.4.1 Identifizierung und markierungsfreie Quantifizierung von Proteinen aus massenspektrometrischen Rohdaten

Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden mit den Programmen Proteome Discoverer oder MaxQuant prozessiert. Die Proteinidentifizierung erfolgte durch einen Abgleich der experimentellen MS- und MS/MS-Daten mit Proteindatenbanken, wobei verschiedene Suchmaschinen mit unterschiedlichen Einstellungen genutzt wurden. Die Validierung identifizierter Peptide erfolgte durch eine Vergleichssuche mit reversen bzw. randomisierten Aminosäuresequenzen aus den Datenbanken (*Decoy*-Analyse). Eine Zusammenstellung der Parameter zur Prozessierung der MS-Daten ist in Tabelle 5 aufgeführt. Bei Analysen mit der MaxQuant-Software erfolgte zudem eine Identifizierung häufig auftretender Kontaminanten mit der integrierten Kontaminanten-Datenbank (245 Einträge).

Für die markierungsfreie Proteinquantifizierung (LFQ) bei Anreicherungsexperimenten wurden in den Einstellungen der MaxQuant-Software zusätzlich die Optionen „MaxLFQ“ (LFQ-Algorithmus) und „*match between runs*“ (Überlagerung individueller LC-Analysen) aktiviert.

Zur Analyse von Vernetzungsexperimenten (MeroX-Software, Abschnitt 3.4.6) erfolgte der Export von Signallisten der prozessierten Massenspektren im *Mascot generic format* (MGF).

Tabelle 5: Elektronische Datenverarbeitung und Parameter zur Prozessierung massenspektrometrischer Rohdaten

AS: Aminosäuren, FDR: Rate falsch-positiver Zuordnungen (*false discovery rate*)

	Proteinidentifizierung		
	Identifizierung / Vernetzung Einzelprotein	Subzelluläre Fraktionierung	Einbau Photo-AS / Affinitätsanreicherung
Programm	Proteome Discoverer	Proteome Discoverer	MaxQuant [171]
Suchmaschine	Mascot [150]	Sequest HT [151]	Andromeda [152]
Datenbank	Intern (323 Einträge)	UniProt Human [153] (Stand 10.02.2015, 20222 Einträge)	UniProt Human (Stand 10.02.2015, 20222 Einträge)
Δm Vorläuferionen	≤ 10 ppm	≤ 10 ppm	$\leq 4,5$ ppm
Δm Fragmentionen	≤ 10 mmu	$\leq 0,6$ Da	≤ 20 ppm (Orbitrap) / $\leq 0,5$ Da (LTQ)
Proteolytisches Enzym	Trypsin / Glu-C + Trypsin	Trypsin	Trypsin / Glu-C + Trypsin
Verpasste Spaltstellen	≤ 3	≤ 3	≤ 3
Konstante Modifikationen	Cystein-Carbamidomethylierung	Cystein-Carbamidomethylierung	Cystein-Carbamidomethylierung
Variable Modifikationen	Methionin-Oxidation	Methionin-Oxidation	Methionin-Oxidation Photo-Methionin / Photo-Leucin (intaktes Diazirin, Alkohol, Alken)
Validierung	FDR ≤ 1 %	Percolator [195], FDR ≤ 1 % / ≤ 5 % (streng / erweitert)	FDR ≤ 1 %

3.4.2 Annotation identifizierter Proteine der subzellulären Fraktionierung

Die aus den subzellulären Fraktionen identifizierten Proteine wurden mit der *Gene-Ontology* (GO)-Datenbank [196] gemäß ihrer zellulären Lokalisierung annotiert. Dazu wurde die Datenbank mit der AmiGO-Slimmer-Software [197] anhand der UniProt-Datenbankkennungen von Proteinen, die mit mindestens zwei Peptiden mittlerer Konfidenz identifiziert wurden, durchsucht. Dabei wurden die folgenden einheitlichen Kennungen für die zelluläre Lokalisierung der Proteine verwendet:

GO:0005634	Zellkern	GO:0005829	Zytosol
GO:0005739	Mitochondrium	GO:0005840	Ribosom
GO:0005783	Endoplasmatisches Retikulum	GO:0005856	Zytoskelett
GO:0005794	Golgi-Apparat	GO:0005886	Plasmamembran

3.4.3 Einbau der Photo-Aminosäuren

Der Einbau der Photo-Aminosäuren in HeLa-Zellen wurde mittels der Perseus-Software [172] auf Peptidebene analysiert. Dazu wurde die „*evidence*“-Datei der MaxQuant-Software genutzt, die Informationen zu allen Peptididentifizierungen enthält. Nach der Entfernung potentieller falsch-positiver Zuordnungen und von Peptiden, die zu bekannten Kontaminanten gehören, wurde die Datenmatrix einzeln nach folgenden Peptidspezies gefiltert: i) unmodifizierte Peptide, ii) Peptide mit intaktem Photo-Methionin oder Photo-Leucin bzw. deren Reaktionsprodukte (Alkohol, Alken) und iii) Peptide mit oxidiertem Methionin. In jeder gefilterten Datenmatrix wurden identische Peptide, die zu unterschiedlichen Messzeitpunkten oder mit unterschiedlichen modifizierten Positionen identifiziert wurden, kombiniert und die Peptidintensitäten addiert. Anschließend wurden die Listen unmodifizierter und modifizierter Peptide überlagert, wobei die Intensitätswerte separat gehalten wurden. Die resultierende Datenmatrix enthielt Intensitätswerte der unmodifizierten und modifizierten Varianten aller Peptide, welche addiert und miteinander verglichen wurden. Dabei erfolgte eine Normierung anhand der Gesamtpeptidintensitäten.

3.4.4 Analyse und statistische Auswertung von Quantifizierungsdaten

Die mit der MaxQuant-Software gewonnenen Quantifizierungsdaten wurden mit der Perseus-Software analysiert. Die in der „*proteinGroups*“-Datei gespeicherten LFQ-Intensitäten der identifizierten Proteine wurden für einen paarweisen Vergleich jeder Probe zur Matrix-Kontrolle ohne Vernetzung als Expressionswerte in eine Datenmatrix geladen. Proteine, deren Identifizierung ausschließlich anhand modifizierter Peptide erfolgte, sowie potentiell falsch-positiv identifizierte Proteine und Identifizierungen aus der Kontaminanten-Datenbank wurden verworfen. Anschließend wurden die LFQ-Intensitäten logarithmiert und die Replikate jeder Probe gruppiert. Die Gruppierungen wurden nach Proteinen mit mindestens vier (biologische Duplikate) oder sechs (biologische Triplikate) validen Expressionswerten gefiltert. Nach der Filterung fehlende Intensitätswerte wurden basierend auf der Datenstruktur der Gesamtmatrix gemäß einer Normalverteilung berechnet, was den statistischen Vergleich der Proben ermöglichte. Dazu wurde mit einer t-Test-Statistik (Signifikanzschwelle $p \leq 0,01$) ein Vergleich der LFQ-Intensitäten der Probengruppen durchgeführt. Zur Darstellung signifikanter Unterschiede wurden die logarithmierten Quotienten der gemittelten LFQ-Intensitäten beider Gruppen gegen die negativ logarithmierten p -Werte aufgetragen.

Überlappungen identifizierter Proteine mit signifikanten LFQ-Intensitätsunterschieden zwischen den paarweisen Vergleichen wurden mittels Venn-Diagrammen zugeordnet [198].

In den Proben signifikant angereicherte Proteine wurden nach folgenden Identifizierungs- und Quantifizierungsdaten gefiltert: Für die Zuordnung wurden eine Identifizierung anhand mindestens zweier Peptide in jedem Analysereplikat und ein LFQ-Intensitätsquotient ≥ 2 zugrunde gelegt.

3.4.5 Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen

Die grafische Darstellung der Protein-Protein-Interaktionen erfolgte mit der Cytoscape-Software [199]. Dazu wurde jeder Protein-Interaktionspartner als Knotenpunkt, der mit dem Gennamen annotiert wurde, definiert und über Verbindungslinien, deren Länge mit dem spezifischen Anreicherungsfaktor korreliert wurde, in Bezug zu PKD2 gebracht. Zusätzlich wurden Interaktionen zwischen identifizierten Proteinen aus der BioGRID-Interaktionsdatenbank [200] integriert, indem deren Genbezeichnungen mit „*Osprey*

custom network“-Dateien aus der Datenbank verglichen wurden, die bereits bekannte Protein-Interaktionsdaten enthielten.

3.4.6 Analyse der chemischen Vernetzung der PKD2

Zur Identifizierung vernetzter Peptide der PKD2 wurden Signallisten (MGF-Format) prozessierter massenspektrometrischer Rohdaten mit der MeroX-Software [175] verarbeitet. Dazu wurden die entsprechenden MGF-Dateien sowie die Aminosäuresequenz der PKD2 (FASTA-Format) geladen und ein Abgleich der theoretischen Vernetzungsprodukte mit den experimentell erhaltenen MS- und MS/MS-Daten durchgeführt. Für die Zuordnung der Signale von Vorläufer- und Fragmentionen wurden eine maximale Massenabweichung von 10 ppm sowie ein spektrales Signal-zu-Rausch-Verhältnis ≥ 2 zugelassen. Trypsin und Glu-C wurden als proteolytische Enzyme festgelegt. Bei einer minimal zulässigen Peptidlänge von drei Aminosäuren wurde die maximale Anzahl verpasster Schnittstellen auf drei beschränkt. Berücksichtigte Proteinmodifikationen umfassten die Carbamidomethylierung von Cystein (konstant) und die Oxidation von Methionin (variabel). Als Vernetzungsreagenz wurde BuUrBu (Abbildung 13) ausgewählt und die Vernetzung zwischen zwei Lysinen bzw. zwischen Lysin und Serin, Threonin, Tyrosin oder dem Protein-N-Terminus berücksichtigt. Für eine sichere Identifizierung von Vernetzungsprodukten wurde zudem die Zuordnung beider BuUrBu-Fragmente an beiden beteiligten Vernetzungsstellen vorausgesetzt (RISE-Modus, Abschnitt 1.5.2). Die identifizierten Vernetzungsprodukte wurden durch eine Vergleichssuche mit der randomisierten Aminosäuresequenz der PKD2 validiert, wobei eine Rate falsch-positiver Zuordnungen (FDR) von maximal 5 % toleriert wurde. Die grafische Darstellung der verknüpften Aminosäurepositionen der PKD2-Sequenz erfolgte mit der xVis-Software [201].

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des GST-PKD2-Fusionsproteins

4.1.1 Rekombinante Expression und Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins

In ersten Versuchen zur Expression des GST-PKD2-Fusionsproteins wurde dieses in *Escherichia-coli*-Zellen des Stammes BL21-DE3 exprimiert. Dabei zeigten sowohl die SDS-PAGE-Analyse als auch die massenspektrometrische Proteinidentifizierung die Synthese des Fusionsproteins. Allerdings konnte trotz variierender experimenteller Bedingungen (Kulturmedium, Temperatur, Kultivierungszeit) keine effiziente Expression des GST-PKD2-Fusionsproteins in löslicher Form induziert werden. Vielmehr wurde das Fusionsprotein überwiegend in der unlöslichen Proteinfraction detektiert. Infolge dieser Ergebnisse wurde zu einem eukaryotischen Expressionssystem in Sf-21-Insektzellen gewechselt. Zur rekombinanten Expression der humanen PKD2 wurden die Sf-21-Insektzellen mit Baculoviren infiziert, die ein Konstrukt für die Expression eines GST-PKD2-Fusionsproteins trugen. Nach Inkubation der infizierten Zellen zur intrazellulären Anreicherung des Fusionsproteins wurden die Zellkulturen lysiert und das GST-PKD2-Fusionsprotein wurde in einem zweistufigen chromatographischen Verfahren aus dem Zelllysat isoliert. Im ersten Isolierungsschritt erfolgte eine GST-Affinitätschromatographie, aus deren Eluat in einem zweiten Reinigungsschritt mittels Anionenaustauschchromatographie das GST-PKD2-Fusionsprotein erhalten wurde.

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte in den Eluatfraktionen der GST-Affinitätschromatographie (Abbildung 14-A) die Reinigung von GST-PKD2 (Spuren 2-4) aus dem Zelllysat (Spur L), wobei deren apparentes Molekulargewicht mit ~ 130 kDa gut mit dem theoretischen Molekulargewicht (~ 124 kDa) übereinstimmte. Zudem wurde freies GST erhalten (Spuren 2-5, ~ 25 kDa). Nach dem zweiten Reinigungsschritt wurde in den Eluatfraktionen der Anionenaustauschchromatographie (Abbildung 14-B) homogenes GST-PKD2-Fusionsprotein angereichert (Spuren 1-5), während freies GST ausschließlich in der Durchfluss- und Waschfraktion detektierbar war (Spuren DF, W).

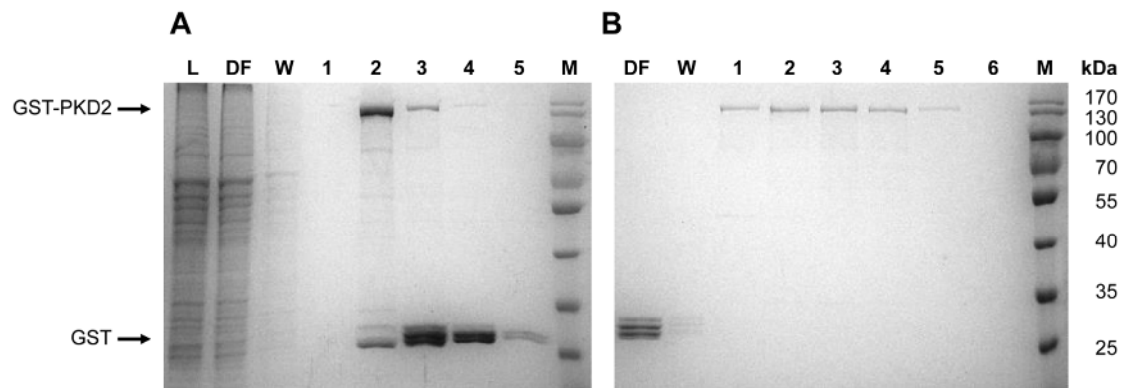


Abbildung 14: SDS-PAGE-Analyse der Isolierung des GST-PKD2-Fusionsproteins aus Sf-21-Insektenzellen

Proteine aus Fraktionen der **(A)** GST-Affinitätschromatographie und **(B)** Anionenaustausch-Chromatographie zur Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins wurden in Polyacrylamid-Gelen (8 %-ige Trenngele) getrennt und mit Coomassie-Brillantblau G-250 gefärbt. L: Zelllysate, DF: Durchflussfraktion, W: Waschfraktion, 1-6: Eluatfraktionen, M: Molekulargewichtsstandard

4.1.2 Entfernung der GST-Affinitätsmarkierung des GST-PKD2-Fusionsproteins

Zur Entfernung der GST-Affinitätsmarkierung des gereinigten Fusionsproteins wurde GST-PKD2 mit der 3C-Protease des humanen Rhinovirus inkubiert, die als GST-Fusionsprotein vorlag (*PreScission*-Protease). Die Trennung der in der resultierenden Mischung vorhandenen Komponenten (GST-PKD2, markierungsfreie PKD2, freies GST, Protease-Fusionsprotein) erfolgte mittels GST-Affinitätschromatographie.

Die Analyse der proteolytischen Spaltung des isolierten GST-PKD2-Fusionsproteins mittels SDS-PAGE (Abbildung 15-A) zeigte keine effektive Abspaltung der Affinitätsmarkierung über einen Inkubationszeitraum von 16 Stunden. Im Vergleich zur Kontrollprobe ohne Protease (Spur K) wurden in den Proben, welche die Protease (~ 46 kDa) enthielten (Spuren 4 h-16 h), vergleichsweise schwache Signale detektiert, die bei einem apparenten Molekulargewicht von ~ 120 kDa markierungsfreier PKD2 (theoretisches Molekulargewicht ~ 97 kDa) und freiem GST entsprachen. Dennoch war das dominante Proteinsignal das intakte GST-PKD2-Fusionsprotein. Zudem wurde in den behandelten Proben gegenüber der Kontrollprobe erhöhte Proteindegradation beobachtet. Zum Vergleich wurde die Protease-Spaltung mit kommerziellem GST-PKD2-Fusionsprotein wiederholt. Die Analyse der entsprechenden Einzelfraktionen (Abbildung 15-B) zeigte die vollständige Spaltung des GST-PKD2-Fusionsproteins innerhalb einer Inkubationszeit von zwei Stunden, unabhängig von der eingesetzten

Proteasemenge. Gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe (Spur K) wurden in den Proben mit der Protease (Spuren 2 h-16 h) ausschließlich die Proteinsignale markierungsfreier PKD2 sowie des freien GST und des Protease-Fusionsproteins detektiert. Des Weiteren zeigte die Analyse keine Hinweise auf Proteindegradation während der Inkubation.

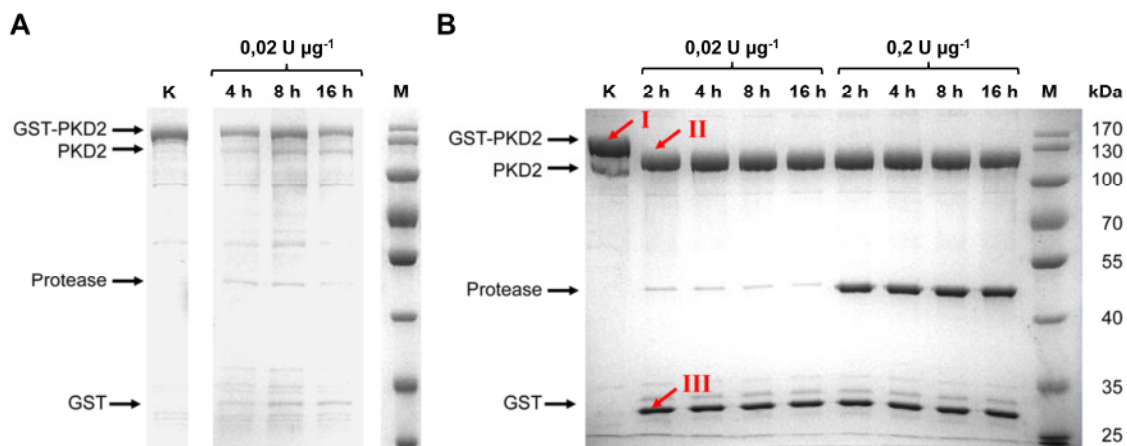


Abbildung 15: SDS-PAGE-Analyse der proteolytischen Entfernung der GST-Affinitätsmarkierung des GST-PKD2-Fusionsproteins

Proteinfraktionen der GST-Abspaltung des (A) gereinigten und (B) kommerziellen GST-PKD2-Fusionsproteins wurden in Polyacrylamid-Gelen (8 %-ige Trenngele) getrennt. Die Proteinfärbung erfolgte mit Coomassie-Brillantblau G-250. Für die Analyse wurden Proben unterschiedlicher Inkubationszeiten bei 4 °C (2 h bis 16 h) mit 0,02 oder 0,2 U der 3C-Protease des humanen Rhinovirus je Mikrogramm Fusionsprotein eingesetzt. Die markierten Proteinbanden (I: GST-PKD2-Fusionsprotein, II: PKD2, III: GST) wurden für die massenspektrometrische Identifizierung einer proteolytischen Spaltung in der Gelmatrix unterzogen. K: Kontrolle (unbehandeltes GST-PKD2-Fusionsprotein), M: Molekulargewichtsstandard

Nach der erfolgreichen proteolytischen Entfernung der GST-Markierung des kommerziellen GST-PKD2-Fusionsproteins erfolgte die Trennung der markierungsfreien PKD2 und freiem GST mittels GST-Affinitätschromatographie (Abbildung 16). Die SDS-PAGE-Analyse zeigte die Abtrennung der PKD2 (Spur 2) aus der Ausgangsmischung nach der Protease-Behandlung (Spur 1), während GST und das Protease-Fusionsprotein an der Affinitätsmatrix zurückgehalten wurden (Spuren 3 und 4).

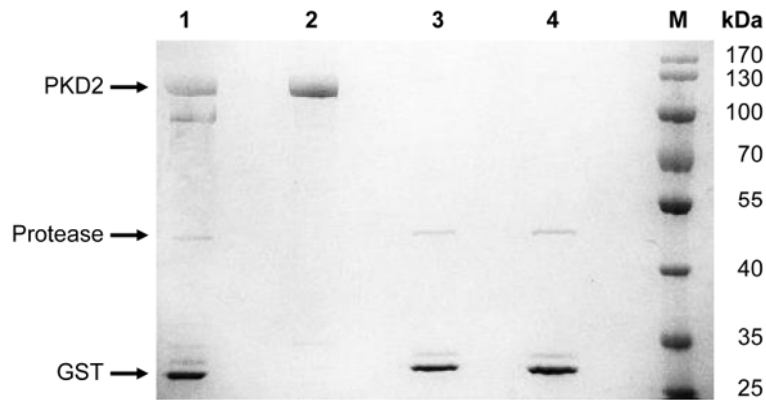


Abbildung 16: SDS-PAGE-Analyse der Abtrennung markierungsfreier PKD2 mittels GST-Affinitätschromatographie

Proteinfractionen der GST-Affinitätschromatographie nach Abspaltung der GST-Affinitätsmarkierung des GST-PKD2-Fusionsproteins wurden in einem Polyacrylamid-Gel (8 %-iges Trenngel) getrennt. Die Färbung der getrennten Proteine erfolgte mit Coomassie-Brillantblau G-250. 1: Ausgangsmischung nach Behandlung mit der Protease, 2: Durchflussfraktion, 3: Elutionsfraktion, 4: Affinitätsmatrix, M: Molekulargewichtsstandard

Zur Identifizierung der Proteine vor bzw. nach der Abspaltung der GST-Affinitätsmarkierung des kommerziellen GST-PKD2-Fusionsproteins erfolgten die Proteinspaltung in der Gelmatrix sowie die LC/MS/MS-Analyse der extrahierten Peptidgemische. Die Identifizierungsergebnisse der markierten Proteinsignale (Abbildung 15, I-III) sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Ergebnisse der Proteinidentifizierung vor und nach der Abspaltung der GST-Markierung des kommerziellen GST-PKD2-Fusionsproteins

Markierte Proteinsignale (Abbildung 15, I-III) wurden einer Proteinspaltung in der Polyacrylamid-Gelmatrix unterzogen. Die resultierenden Peptidgemische wurden extrahiert, mittels LC/MS/MS analysiert und die massenspektrometrischen Daten zur Proteinidentifizierung verwendet. MW_{theo} : theoretisches Molekulargewicht

Protein-signal	Identifiziertes Protein	UniProt-Eintrag	Spezies	Peptide	Sequenz-abdeckung	MW_{theo} [kDa]
I	GST-PKD2	-	-	169	73 %	~ 124
II	PKD2	Q9BZL6	<i>Homo sapiens</i>	158	81 %	~ 97
III	GST	P08515	<i>Schistosoma japonicum</i>	102	100 %	~ 25

Die Identifizierung bestätigte die verlässliche Zuordnung der anhand ihrer apparenten Molekulargewichte in der SDS-PAGE-Analyse erwarteten Proteine. Sowohl das GST-PKD2-Fusionsprotein (I) und die nach dessen GST-Abspaltung getrennt vorliegenden

Proteine PKD2 (II) und GST (III) wurden erfolgreich identifiziert. Eine grafische Darstellung der durch die identifizierten Peptide abgedeckten Sequenzbereiche der Proteine kann dem Anhang entnommen werden (Abbildung A1) und zeigt mit Ausnahme des Prolin-reichen *N*-Terminus der PKD2 eine gleichmäßig verteilte Sequenzabdeckung.

4.1.3 Qualitative Analyse der Enzymaktivität des GST-PKD2-Fusionsproteins

Die enzymatische Aktivität des gereinigten sowie kommerziellen GST-PKD2-Fusionsproteins wurde mit einem lumineszenzbasierten Kinase-Aktivitätstest bestimmt (Abbildung 17).

Für das gereinigte Fusionsprotein (Abbildung 17-A) wurde für die ATP-positive Probe im Gegensatz zur ATP-negativen Kontrollprobe mit Zunahme der eingesetzten Menge an GST-PKD2 eine deutlich ansteigende Intensität der Lumineszenz detektiert. Diese beruht auf der Phosphorylierung des eingesetzten Substrates, dem synthetischen CREBtide-Peptid. Zudem zeigte der Enzymaktivitätstest, dass bereits in der Probe, zu der ATP, aber kein Substrat zugegeben wurde, ein geringfügiger Anstieg der Lumineszenz erfolgte. Diese Beobachtung resultiert wahrscheinlich aus der Autophosphorylierungsaktivität der Kinase.

Trotz der hier nachgewiesenen Enzymaktivität des im Rahmen dieser Arbeit exprimierten und gereinigten GST-PKD2-Fusionsproteins, führte dessen Unzugänglichkeit für die enzymatische Abspaltung der GST-Markierung zu der Entscheidung, alle nachfolgenden Experimente mit dem kommerziellen GST-PKD2-Fusionsprotein durchzuführen. Im Hinblick auf die nachfolgenden Anreicherungs- und Vernetzungsexperimente wurde die Enzymaktivität des unvernetzten sowie mit BS²G vernetzten kommerziellen GST-PKD2-Fusionsproteins bestimmt (Abbildung 17-B). Der Aktivitätstest zeigte im Gegensatz zur ATP-negativen Kontrollprobe einen deutlichen Anstieg der Lumineszenz sowohl für die Proben des unbehandelten als auch des vernetzten Fusionsproteins.

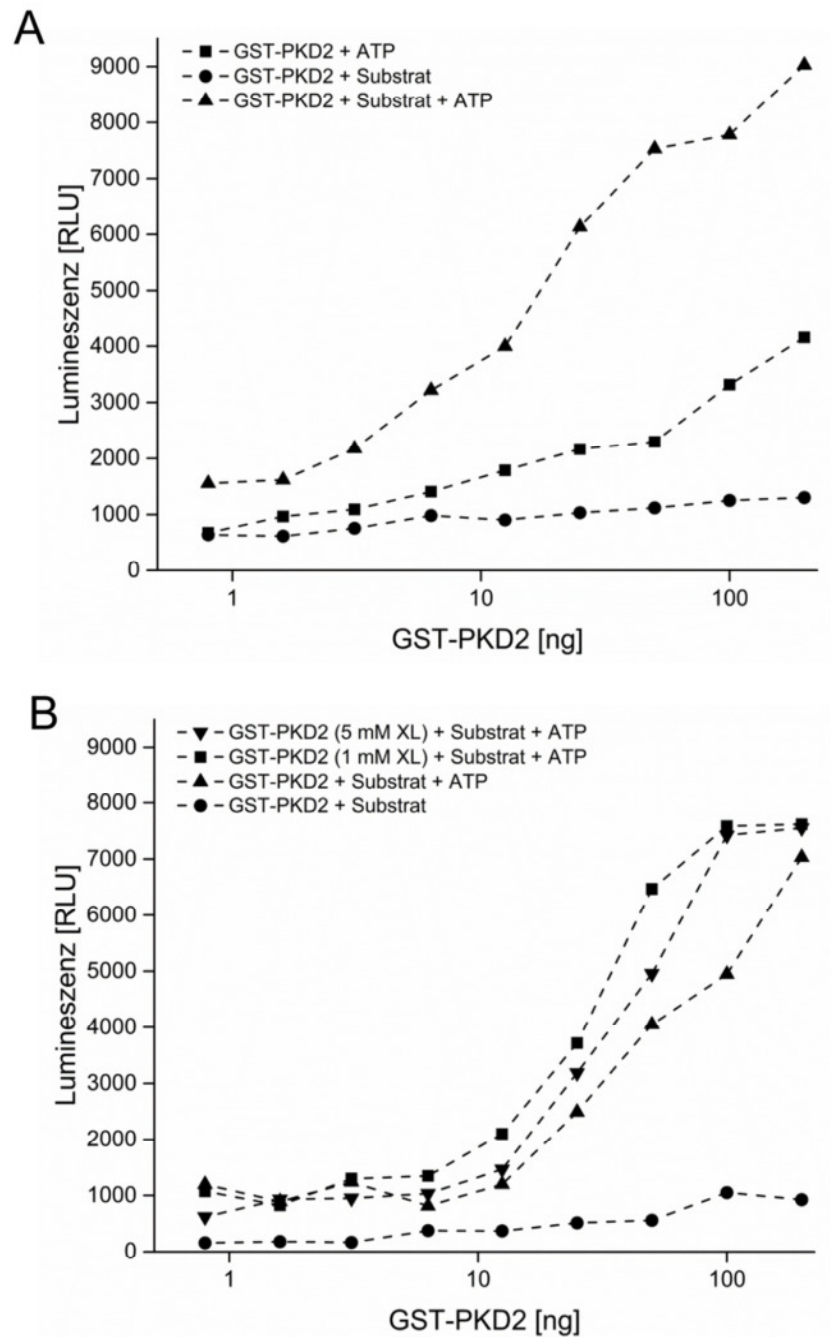


Abbildung 17: Qualitative Analyse der Enzymaktivität des GST-PKD2-Fusionsproteins

Zur qualitativen Bestimmung der Enzymaktivität des (A) gereinigten und (B) kommerziellen, unvernetzten bzw. mit BS²G vernetzten GST-PKD2-Fusionsproteins wurde ein lumineszenzbasierter Kinaseaktivitätstest nach den Herstellervorgaben durchgeführt (Promega ADP-Glo). Dazu wurde eine Lösung, die 200 ng GST-PKD2 enthielt, in acht Verdünnungsschritten konsekutiv im Verhältnis 1:1 (v/v) mit PKD2-Puffer verdünnt. Anschließend erfolgte für jede Probe der Verdünnungsreihe die Zugabe von 0,2 µg/µl des Substrates CREBtide und 25 µM ATP (GST-PKD2 + Substrat + ATP), 25 µM ATP (GST-PKD2 + ATP) oder 0,2 µg/µl CREBtide (GST-PKD2 + Substrat). Zur Analyse des Einflusses der chemischen Vernetzung (XL) wurde GST-PKD2 zuvor für 2 h im Eisbad mit 1 mM bzw. 5 mM des aminreaktiven Vernetzungsreagenzes BS²G (Stammlösung in DMSO) behandelt. Die Kinase-Reaktionsansätze wurden für 1 h bei 25 °C inkubiert und anschließend nach Herstellervorgaben bearbeitet. Die Detektion der Lumineszenzintensität erfolgte an einem Plattenlesegerät (Integrationszeit: 0,25 s). RLU: relative Lichtintensität (*relative light units*)

4.2 Methodenentwicklung zur Anreicherung und Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern mittels Vernetzung und Massenspektrometrie

Zur Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern der humanen PKD2 wurde ein Protokoll etabliert, das auf der Immobilisierung des GST-PKD2-Fusionsproteins und anschließender Affinitätsanreicherung potentieller Protein-Bindungspartner basierte. Die experimentellen Schritte des in dieser Arbeit entwickelten Protokolls sind in Abbildung 18 dargestellt.

Die Affinitätsanreicherung der PKD2-Bindungspartner erfolgte aus der zytosolischen Fraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion von HeLa-Zellen. Um auch schwach affine bzw. transiente Interaktionen zu erhalten, wurden die Protein-Bindungspartner vor dem Waschen der Affinitätsmatrix durch chemische Vernetzung mit dem aminreaktiven Vernetzungsreagenz BS²G kovalent fixiert. In einer Kombination mit markierungsfreier Proteinquantifizierung (LFQ) und der vergleichenden statistischen Analyse der LFQ-Intensitäten erlaubte dies die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen, die in konventionellen Anreicherungsexperimenten nicht detektiert werden konnten. Die Zuordnung von Proteinen als PKD2-Interaktionspartner beruhte dabei auf ihrer Anreicherung im Vergleich zur unspezifischen Bindung von Proteinen an die Affinitätsmatrix.

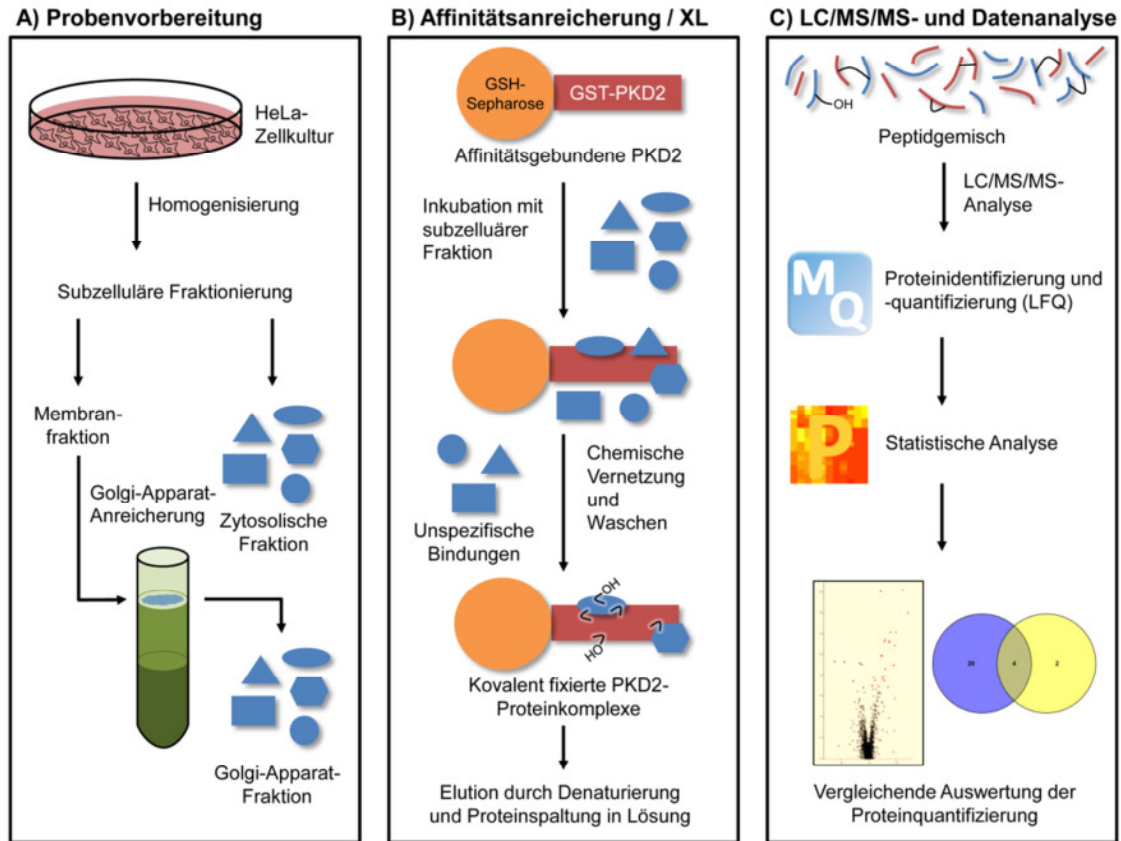


Abbildung 18: Analytische Strategie zur Anreicherung, Fixierung und Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern

(A) Durch subzelluläre Fraktionierung wurden aus HeLa-Zellkulturen die zytosolische und die Golgi-Apparat-Fraktion gewonnen. (B) An die Affinitätsmatrix gebundenes GST-PKD2-Fusionsprotein wurde mit der zytosolischen oder der Golgi-Apparat-Fraktion inkubiert und Protein-Interaktionen wurden durch chemische Vernetzung mit dem aminreaktiven Vernetzungsreagenz BS²G kovalent fixiert. Nach der Entfernung unspezifischer Protein-Bindungspartner wurden die fixierten PKD2-Proteinkomplexe denaturiert und einer enzymatischen Proteinspaltung in der Lösung unterzogen. (C) Die resultierenden Peptidgemische wurden mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert. Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden zur Proteinidentifizierung und markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) mit der MaxQuant-Software verarbeitet. Die statistische Analyse zum Vergleich der LFQ-Intensitäten angereicherter Proteine erfolgte mit der Perseus-Software. XL: Vernetzung

Alle Analysenreplikate jedes Anreicherungsexperimentes wurden mit der MaxQuant-Software simultan verarbeitet, wobei neben den Proben des GST-PKD2-Fusionsproteins mit oder ohne Vernetzung zusätzlich Matrix- und GST-Kontrollproben analysiert wurden. Die Matrix-Kontrollprobe ohne Vernetzung umfasste alle identifizierten Proteine, die unspezifisch an die Affinitätsmatrix binden, und diente als Vergleichsreferenz für die anderen Proben zur Identifizierung angereicherter Proteine. Zusätzlich wurde eine Matrix-Kontrollprobe nach der Vernetzung analysiert. Diese ermöglichte die Detektion von Proteinen, die unspezifisch mit der Affinitätsmatrix

vernetzt wurden, eventuell durch Reaktion mit der α -Aminogruppe des immobilisierten Glutathions. Zur Identifizierung von Interaktionen des GST-PKD2-Fusionsproteins über die GST-Affinitätsmarkierung wurden außerdem GST-Kontrollproben mit oder ohne Vernetzung analysiert.

4.3 Subzelluläre Fraktionierung und Golgi-Apparat-Anreicherung

Als Ausgangsmaterial für Anreicherungsexperimente zur Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern wurden subzelluläre Fraktionen von HeLa-Zellen verwendet. Die Fraktionen wurden im Verlauf eines Versuchsprotokolls gewonnen, welches in der Anreicherung der Golgi-Apparat-Fraktion resultierte (Abbildung A2, Anhang).

Zur Überprüfung der Effektivität der subzellulären Fraktionierung von HeLa-Zellhomogenaten wurden Proben des Ausgangshomogenates, des postnukleären Überstandes, der zytosolischen Fraktion, der Membranfraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion einer Proteomanalyse unterzogen. Nach einer enzymatischen Proteinspaltung wurden die Proben mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert. Identifizierte Proteine wurden über die GO-Datenbank anhand ihrer zellulären Lokalisierung annotiert. Für die einzelnen Fraktionierungsschritte wurde in drei unabhängigen biologischen Replikatexperimenten die folgende Anzahl an Proteinen identifiziert: 2682 ± 148 (Homogenat), 2631 ± 40 (postnukleärer Überstand), 2155 ± 96 (zytosolische Fraktion), 2581 ± 162 (Membranfraktion) und 2195 ± 376 (Golgi-Apparat-Fraktion).¹ Die fraktionsabhängige Zuordnung von Proteinen gemäß ihrer GO-Annotation ist in Abbildung 19 dargestellt.

¹ Die massenspektrometrischen Rohdaten sind unter der Kennung **PXD003917** über das ProteomeXchange-Konsortium in der PRIDE-Datenbank hinterlegt [202, 203]. Für detaillierte Daten der Proteinidentifizierung siehe Tabelle S1 in [204].

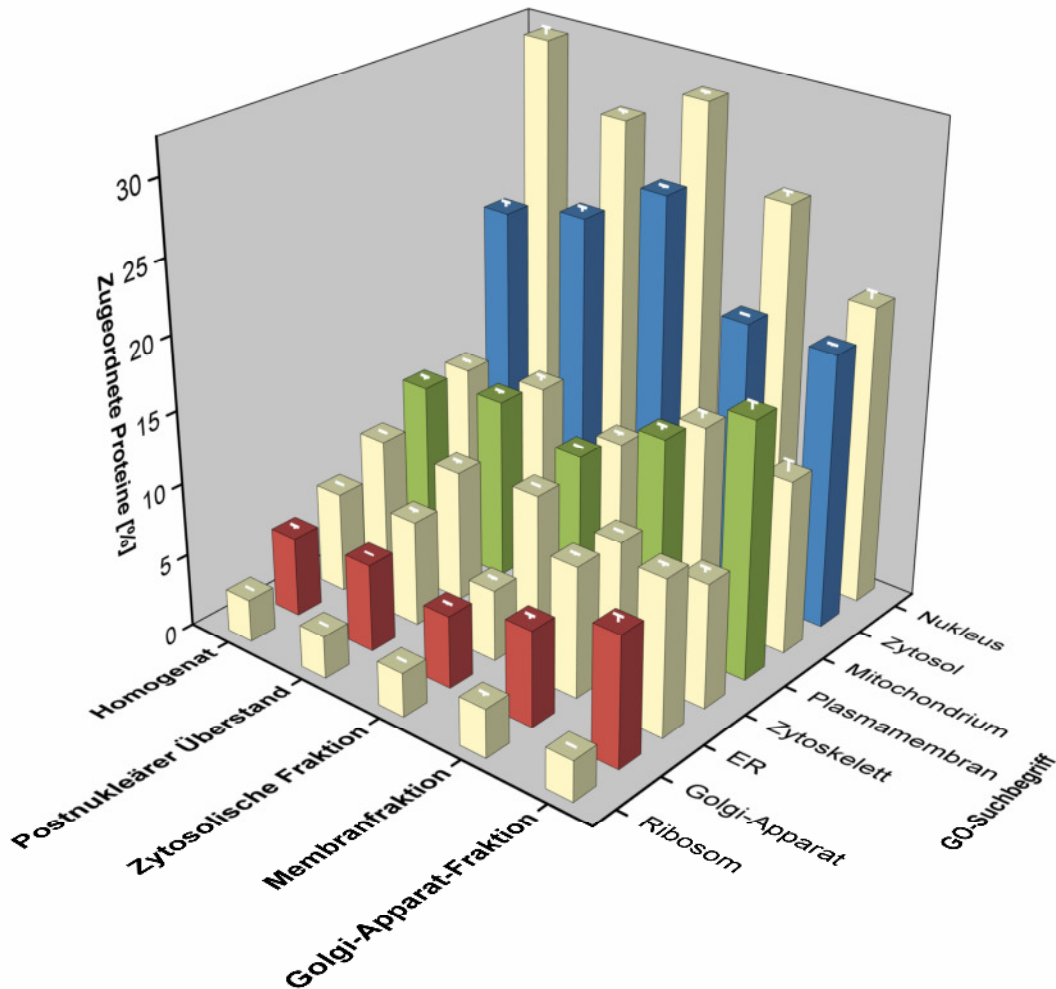


Abbildung 19: Zuordnung identifizierter Proteine des Homogenats und der subzellulären Fraktionen von HeLa-Zellen zu einzelnen Zellkompartimenten

Proben des Homogenats und der subzellulären Fraktionen von HeLa-Zellen wurden proteolytisch gespalten und die Peptidgemische mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert. Die Proteine wurden durch Verarbeitung der massenspektrometrischen Rohdaten identifiziert und mit GO-Suchbegriffen einzelner Zellkompartimente annotiert. Die Analyse zeigt die gemittelten Zuordnungsraten identifizierter Proteine aus drei unabhängigen Zellkultur- und Fraktionierungsexperimenten. ER: Endoplasmatisches Retikulum, GO: *gene annotation*

Die Proteomanalyse zeigte, dass sich die Zuordnung identifizierter Proteine zum Golgi-Apparat im Verlauf der Fraktionierung von ca. 5 % im Homogenat auf ca. 9 % in der Golgi-Apparat-Fraktion nahezu verdoppelte. Eine ähnliche Tendenz wurde bei Zuordnungen zum Endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran deutlich. Hingegen blieb die Zuordnungsrate der identifizierten Proteine zum Ribosom, Zytoskelett und Mitochondrium annähernd konstant. Außerdem wurde für alle untersuchten Fraktionen ein vergleichsweise hoher Anteil von Zuordnungen zum Zellkern und zum Zytosol detektiert. Die Analyse zeigte zudem, dass die Zuordnung zu

diesen beiden Zellkompartimenten im Fraktionierungsverlauf tendenziell abnahm, während die Zuordnung zu membranösen Zellkomponenten anstieg (Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Plasmamembran). Insgesamt wurde die höchste Zahl an Proteinen des Golgi-Apparat in der Golgi-Apparat-Fraktion und des Zytosols in der zytosolischen Fraktion detektiert. Zusätzlich wurde die Effizienz der Golgi-Apparat-Anreicherung anhand der Häufigkeit kompartimentspezifischer Proteine überprüft (Abbildung 20). Dazu wurden aus den MS-Daten die PSM-Werte der repräsentativen Golgi-Apparat-Proteine β -1,4-Galaktosyltransferase (B4GALT1) und Giantin (GOLGB1) extrahiert. Die Analyse zeigte für beide Proteine eine signifikant gestiegene Häufigkeit in der Golgi-Apparat-Fraktion relativ zum Ausgangshomogenat.

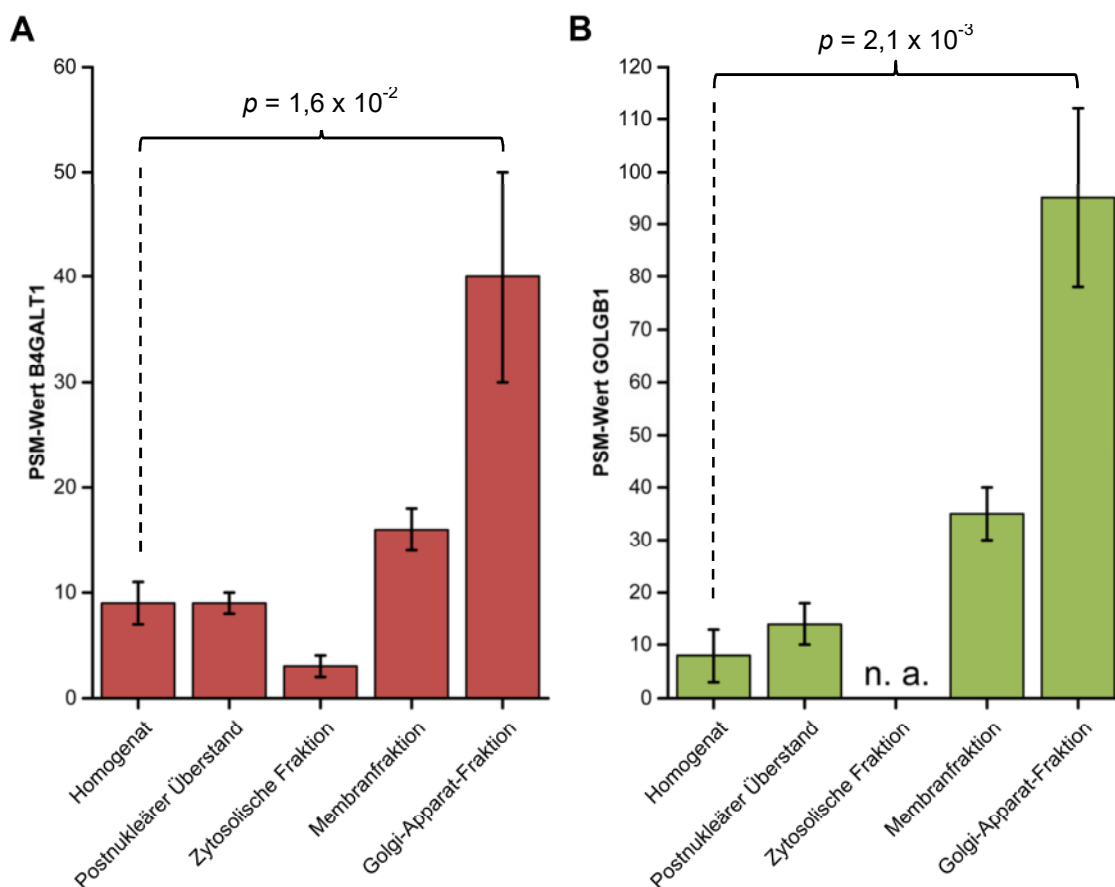


Abbildung 20: Repräsentative Golgi-Apparat-Proteine im Homogenat und in subzellulären Fraktionen von HeLa-Zellen

Die Häufigkeit der Golgi-Apparat-Proteine (A) β -1,4-Galaktosyltransferase 1 (B4GALT1) und (B) Giantin (GOLGB1) im Homogenat und in subzellulären Fraktionen von HeLa-Zellen wurde nach der Proteinidentifizierung aus massenspektrometrischen Rohdaten durch Extraktion der Anzahl zugeordneter MS/MS-Spektren (PSM) bestimmt. Die Analyse zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Zellkultur- und Fraktionierungsexperimenten. Die Berechnung des Signifikanzwertes der unterschiedlichen Häufigkeit zwischen Homogenat und Golgi-Apparat-Fraktion erfolgte durch eine t-Test-Analyse. n. a.: nicht auswertbar

4.4 Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern aus der zytosolischen Fraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion

Die Experimente zur Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern wurden gemäß Abbildung 18 durchgeführt, wobei eine SDS-PAGE-Analyse der Einzelschritte der Affinitätsanreicherung aus der zytosolischen Fraktion (Abbildung 21-A) und der Golgi-Apparat-Fraktion (Abbildung 21-B) von HeLa-Zellen erfolgte. In der ersten Durchflussfraktion wurden keine Signale für die Matrix- und GST-Kontrollproben (DF1, Spuren 1-4) sowie schwache Proteinbanden in den GST-PKD2-Proben (DF1, Spuren 5-6) erhalten, wobei das apparente Molekulargewicht des Fusionsproteins mit ~ 140 kDa vom theoretischen Wert abwich (~ 124 kDa). In Verbindung mit den Signalen von GST (AM, Spuren 3-4) und GST-PKD2 (AM, Spuren 5-6) in den Proben des Eluats von der Affinitätsmatrix zeigt dies die effiziente Bindung von GST und GST-PKD2 mit einem nur geringen Durchfluss ungebundenen Proteins. In den Durchflussfraktionen nach der Vernetzungsreaktion wurden komplexe Proteinsignale der eingesetzten subzellulären Fraktionen detektiert, die aufgrund ihrer Homogenität von Probe zu Probe reproduzierbare experimentelle Bedingungen bestätigen. Im Vergleich zu den Kontrollproben ohne Vernetzung (DF-XL, Spuren 1, 3, 5) zeigte die Analyse der vernetzten Proben (DF-XL, Spuren 2, 4, 6) Signale im hohen Molekulargewichtsbereich, was für eine erfolgreiche Vernetzungsreaktion spricht. Während nach dem ersten Waschschrift (W1) in allen Durchflussfraktionen Proteinsignale detektierbar waren, konnte der unspezifische Proteinbackground nach dem dritten Waschschrift (W3) bis unter die Nachweisgrenze der Färbung mit Coomassie-Brillantblau reduziert werden. In der vernetzten GST-PKD2-Probe (AM, Spur 6) zeigte die Analyse des Eluats von der Affinitätsmatrix im Vergleich zur Probe ohne Vernetzung (AM, Spur 5) eine Verschiebung zu Signalen im Bereich höherer Molekulargewichte. Dieses Resultat deutet auf die Fixierung von PKD2-Proteinkomplexen an der Affinitätsmatrix durch die chemische Vernetzung hin.

Im Gegensatz zur Golgi-Apparat-Fraktion wurde für alle Proben der zytosolischen Fraktion (Abbildung 21-A) die Bindung von freiem, intrinsischen GST der HeLa-Zellen an die Affinitätsmatrix beobachtet, welches zudem die Signale des eingesetzten GST bei ~ 25 kDa in den GST-Kontrollproben überlagerte (AM, Spuren 3-4).

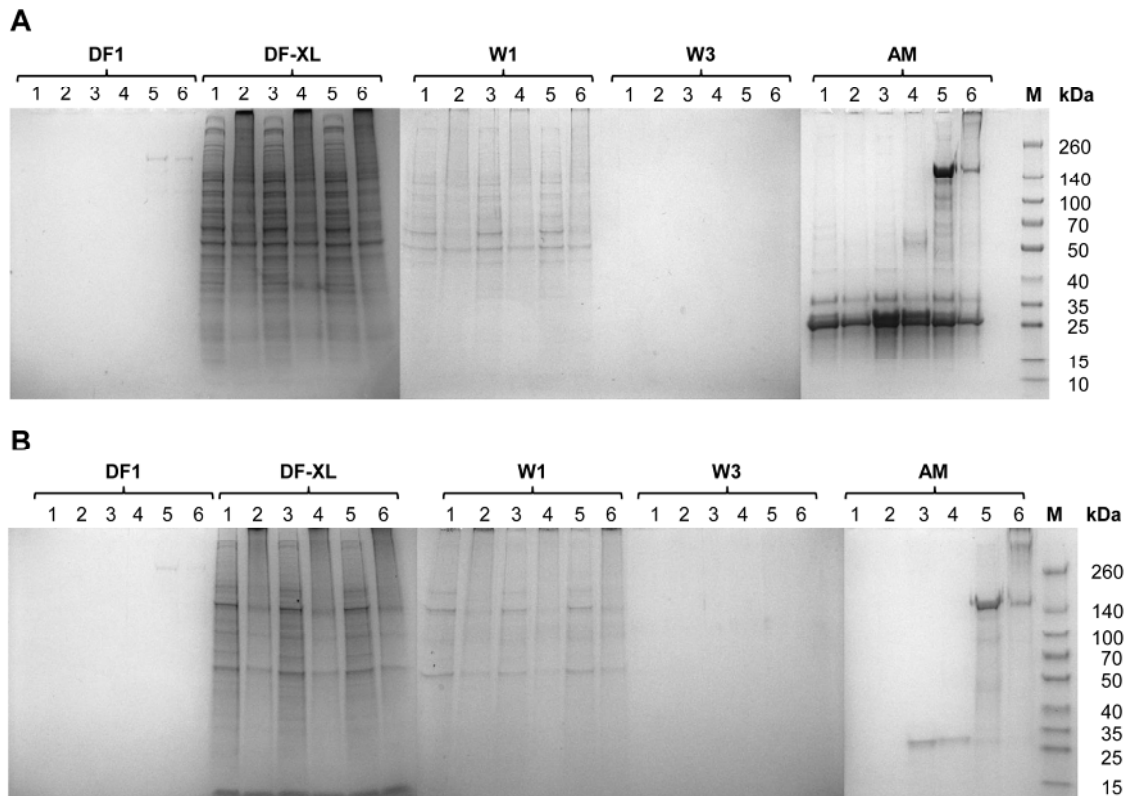


Abbildung 21: SDS-PAGE-Analyse der Affinitätsanreicherung und chemischen Vernetzung von PKD2-Interaktionspartnern

Proben der Einzelschritte zur Affinitätsanreicherung und chemischen Vernetzung von PKD2-Interaktionspartnern aus **(A)** der zytosolischen Fraktion und **(B)** der Golgi-Apparat-Fraktion von HeLa-Zellen wurden in Polyacrylamid-Gradientengelen (4-20 %) aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie-Brillantblau G250 gefärbt. DF1: Durchfluss nach Bindung von GST-PKD2 bzw. Kontrollproben, DF-XL: Durchfluss nach Inkubation mit zellulärer Fraktion und chemischer Vernetzung, W1: erste Waschfraktion, W3: dritte Waschfraktion, AM: Eluat von der Affinitätsmatrix, 1: Matrix-Kontrolle, 2: Matrix-Kontrolle mit Vernetzung, 3: GST-Kontrolle, 4: GST-Kontrolle mit Vernetzung, 5: GST-PKD2, 6: GST-PKD2 mit Vernetzung, M: Molekulargewichtsstandard

Nach der Affinitätsanreicherung wurden die Proben einer Proteinspaltung in der Lösung unterzogen und mittels LC/MS/MS analysiert. Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden zur Proteinidentifizierung und markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) mit der MaxQuant-Software verarbeitet. Nach der Datenfilterung zur Entfernung von Proteinen, deren Identifizierung aus der Datenbank möglicher Kontaminanten erfolgte, und von potentiell falsch-positiv identifizierten Proteinen, wurden aus der zytosolischen Fraktion 2413 und aus der Golgi-Apparat-Fraktion 1425 Proteine mit quantitativen

Informationen identifiziert.² Mittels einer t-Test-Analyse erfolgte die Zuordnung signifikant unterschiedlicher Proteinhäufigkeiten, basierend auf dem Vergleich der LFQ-Intensitäten zur Matrix-Kontrollprobe ohne Vernetzung (Signifikanzschwelle $p \leq 0,01$). Proteine mit unvollständigen Quantifizierungsdaten in beiden verglichenen Replikatgruppen wurden vor der Analyse entfernt. In den Kontrollproben angereicherte Proteine wurden als unspezifische Bindungspartner klassifiziert und daher als PKD2-Interaktionspartner ausgeschlossen. Die Normalverteilung der LFQ-Intensitäten identifizierter Proteine sowie nachträglich berechneter LFQ-Werte (Abschnitt 3.4.4) ist im Anhang anhand der Replikatgruppen der vernetzten PKD2-Probe und der Matrix-Kontrollprobe für die Anreicherung aus der zytosolischen Fraktion beispielhaft dargestellt (Abbildung A3).

4.4.1 PKD2-Interaktionspartner aus der zytosolischen Fraktion

Vor der Datenfilterung für die Zuordnung von PKD2-Bindungspartnern wurde in der zytosolischen Fraktion – einschließlich der PKD2 selbst – für 24 Proteine eine Anreicherung in den vernetzten PKD2-Proben detektiert, in den unvernetzten PKD2-Proben jedoch nur für 6 Proteine. Somit konnte durch den Vernetzungsschritt die Identifizierung potentieller PKD2-Interaktionspartner vierfach gesteigert werden. Die Ergebnisse der Anreicherungsexperimente sind in Abbildung 22 grafisch dargestellt, wobei das Zielprotein sowie die nach der Überlappungsanalyse zu den Kontrollproben und Datenfilterung als PKD2-Bindungspartner klassifizierten Proteine mit ihren Gennamen annotiert sind (Anreicherungsfaktor ≥ 2 und Identifizierung anhand ≥ 2 Peptiden). Außerdem wurden 10 Proteine in den vernetzten GST-Kontrollproben, 14 in den GST-Kontrollproben ohne Vernetzung und drei in den vernetzten Matrix-Kontrollproben angereichert (Abbildung A4-A, Anhang).

² Die massenspektrometrischen Rohdaten sind unter den Kennungen **PXD003909** (zytosolische Fraktion) und **PXD003913** (Golgi-Apparat-Fraktion) über das ProteomeXchange-Konsortium in der PRIDE-Datenbank hinterlegt [202, 203]. Für detaillierte Daten der Proteinidentifizierung und markierungsfreien Quantifizierung sowie Fragmentationenspektren von Identifizierungen anhand nur eines zugeordneten Peptids siehe Tabelle S2 und Abbildungen S4 bzw. S5 in [204].

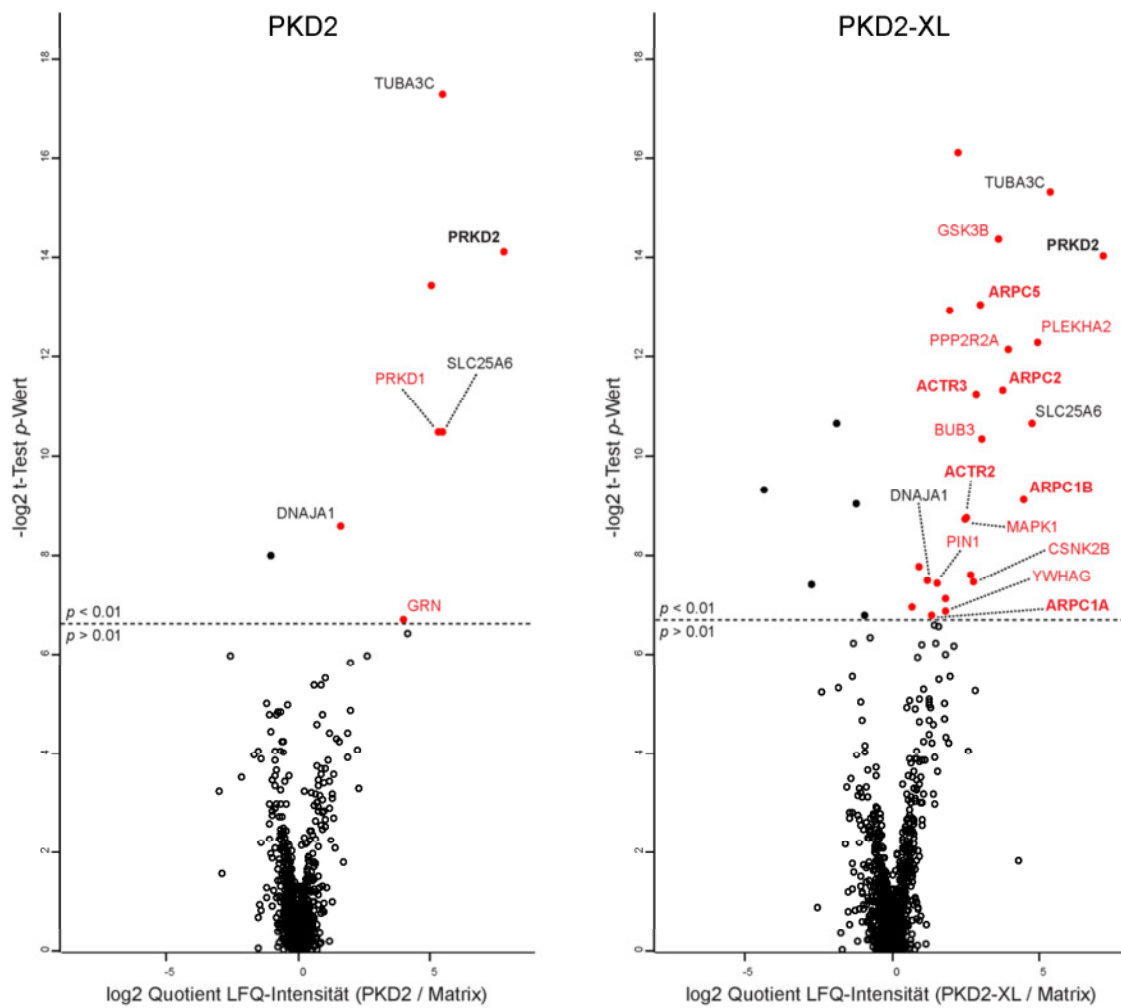


Abbildung 22: Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Anreicherungsexperimenten mit GST-PKD2 und der zytosolischen Fraktion

Die LFQ-Intensitäten von Proteinen, deren Anreicherung in Vernetzungsexperimenten (PKD2-XL) oder dem konventionellen Pulldown-Experiment (PKD2) erfolgte, wurden mittels einer t-Test-Analyse statistisch ausgewertet. Die logarithmierten Expressionsquotienten (PKD2-XL / PKD2) wurden gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte aufgetragen. Signifikant regulierte Proteine ($p \leq 0,01$) sind als rote und schwarze Punkte dargestellt, die den unregulierten Proteinen gegenüberstehen (schwarze Kreise). Angereicherte Proteine, die den Kriterien der Datenfilterung (Identifizierung anhand ≥ 2 Peptiden und Anreicherungsfaktor ≥ 2) entsprechen, sind mit ihren Gennamen annotiert (rote Schrift). Hervorgehobene Annotationen repräsentieren Untereinheiten des Arp2/3-Proteinkomplexes. Überlappende Anreicherungen zwischen beiden Experimenten sind in schwarzer Schrift annotiert, wobei das Zielprotein (PKD2/PRKD2) hervorgehoben ist. Die Analyse schließt Daten aus drei unabhängigen biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten ein.

Für die Zuordnung unspezifischer PKD2-Interaktionspartner wurden Überschneidungen zu angereicherten Proteinen der paarweisen Vergleiche aus den Matrix- und GST-Kontrollproben ermittelt (Abbildung 23-A / Abbildung A4-B, Anhang). Dabei wurden keine Überlappungen mit der vernetzten PKD2-Probe bzw. ein gemeinsames

angereichertes Protein im Vergleich der unvernetzten PKD2-Probe zur unvernetzten GST-Kontrollprobe detektiert (Protein ELYS, AHCTF1). In der vernetzten und der unvernetzten PKD2-Probe wurden vier Proteine gleichermaßen angereichert: das Zielprotein Proteinkinase D2 (PRKD2), Alpha-Tubulin 2 (TUBA3C), ADP/ATP-Translokase 3 (SLC25A6) und Humanes DnaJ-Protein 2 (DNAJA1). Die Mehrheit von 20 angereicherten Proteinen wurde allerdings ausschließlich in der vernetzten PKD2-Probe identifiziert (Abbildung 23-B).

Die Überlappungsanalyse und Datenfilterung der Proteine (Anreicherungsfaktor ≥ 2 und Identifizierung anhand ≥ 2 Peptiden) führte zur Klassifizierung von 14 Proteinen als vernetzungsspezifisch angereicherte PKD2-Interaktionspartner aus der zytosolischen Fraktion (Tabelle 7, Abbildung 22).

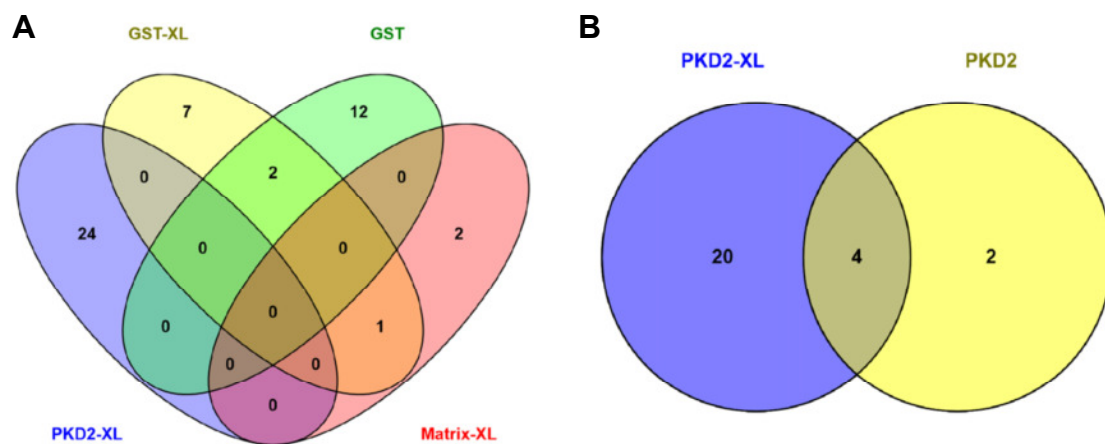


Abbildung 23: Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine aus der zytosolischen Fraktion

A) Darstellung der Überlappung von angereicherten Proteinen aus PKD2-Vernetzungsexperimenten (PKD2-XL) und den vernetzten (GST-XL, Matrix-XL) sowie den unvernetzten (GST) Kontrollproben. **B)** Überlappung zwischen PKD2-XL und dem Pulldown-Experiment ohne Vernetzung (PKD2), nachdem aus beiden Datensätzen potentielle unspezifische Protein-Bindungspartner entfernt wurden.

Tabelle 7: Identifizierung und Statistik der mittels aminreaktiver Vernetzung aus der zytosolischen Fraktion angereicherten Proteine

Proteinkomplexe aus Affinitätsanreicherungsexperimenten mit aminreaktiver Vernetzung wurden einer Proteinspaltung in Lösung unterzogen und die Peptidgemische mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert. Die Proteinidentifizierung und markierungsfreie Quantifizierung (LFQ) erfolgte mit der MaxQuant-Software. Die LFQ-Intensitäten aus drei biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten wurden mit der Perseus-Software durch eine t-Test-Analyse statistisch ausgewertet. Als Signifikanzschwelle wurde ein p -Wert $\leq 0,01$ festgelegt. Die Anreicherungsfaktoren (AF) sind als Quotienten der Mittelwerte der LFQ-Intensitäten zwischen der vernetzten PKD2-Probe und der Matrix-Kontrollprobe angegeben. Die Identifizierungsdaten stellen Mittelwerte aller Replikatanalysen dar. Die Daten wurden zusätzlich nach Proteinen mit einem Anreicherungsfaktor ≥ 2 und einer Zuordnung von ≥ 2 Peptiden in jeder Replikatanalyse gefiltert. *Verhältnis: eindeutig / gesamt

UniProt-Eintrag	Proteinname (eng.)	Gename	AF	t-Test p -Wert	Peptide*	Sequenzabdeckung [%]
Q9HB19	<i>Pleckstrin homology domain-containing family A member 2</i>	<i>PLEKHA2</i>	30,4	2,0E-04	9 / 9	32
O15143	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B</i>	<i>ARPC1B</i>	22,0	1,8E-03	9 / 10	33
P63151	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform</i>	<i>PPP2R2A</i>	15,5	2,2E-04	8 / 14	35
O15144	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 2</i>	<i>ARPC2</i>	13,3	3,9E-04	8 / 8	31
P49841	<i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i>	<i>GSK3B</i>	12,3	4,7E-05	4 / 5	21
O43684	<i>Mitotic checkpoint protein BUB3</i>	<i>BUB3</i>	8,2	7,7E-04	8 / 8	31
O15511	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 5</i>	<i>ARPC5</i>	8,0	1,2E-04	4 / 4	27
P61158	<i>Actin-related protein 3</i>	<i>ACTR3</i>	7,2	4,1E-04	14 / 14	48
P67870	<i>Casein kinase II subunit beta</i>	<i>CSNK2B</i>	6,8	5,6E-03	4 / 4	19
P61160	<i>Actin-related protein 2</i>	<i>ACTR2</i>	5,8	2,3E-03	11 / 11	30
P28482	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	<i>MAPK1</i>	5,6	2,3E-03	4 / 4	15
P61981	<i>14-3-3 protein gamma</i>	<i>YWHAG</i>	3,6	8,5E-03	8 / 14	48
Q13526	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1</i>	<i>PINI</i>	2,9	5,7E-03	2 / 2	23
Q92747	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A</i>	<i>ARPC1A</i>	2,6	8,9E-03	2 / 3	16

Die Auswertung der signifikant angereicherten Proteine zeigt die Identifizierung von fünf Untereinheiten des sieben Untereinheiten umfassenden Arp2/3-Proteinkomplexes (ARPC1B, ARPC2, ARPC5, ACTR3, ACTR2) sowie ARPC1A, einer Untereinheit, die anstelle von ARPC1B im Arp2/3-Komplex auftreten kann. Zudem wurde mit ARPC4 (UniProt-Eintrag: P59998) eine weitere Arp2/3-Untereinheit als signifikant angereichert detektiert (Anreicherungsfaktor = 4,7 / t-Test p -Wert = $1,4 \times 10^{-5}$), die jedoch in einem der sechs Replikatexperimente mit nur einem zugeordneten Peptid identifiziert werden konnte und deshalb von der Auflistung in Tabelle 7 ausgeschlossen wurde. Die Identifizierung der ARPC4-Untereinheit erfolgte im Mittel aller Replikatanalysen mit vier eindeutig zugeordneten Peptiden und einer Sequenzabdeckung von 21 %.

Unter Verwendung einer niedrigeren Signifikanzschwelle für die t-Test-Analyse ($p \leq 0,05$) wurde zusätzlich die Anreicherung der Arp2/3-Untereinheiten ARPC3 (Anreicherungsfaktor = 7,0 und $p = 2,6 \times 10^{-2}$) sowie ARPC5L (Anreicherungsfaktor = 3,0 und $p = 1,1 \times 10^{-2}$) gefunden, wobei ARPC5L (UniProt-Eintrag: Q9BPX5) anstelle von ARPC5 im Arp2/3-Komplex vorhanden sein kann. Die ARPC3-Untereinheit (UniProt-Eintrag: O15145) wurde durchschnittlich mit drei eindeutig zugeordneten Peptiden und einer Sequenzabdeckung von 18 % identifiziert. Für die ARPC5L-Untereinheit erfolgte die Identifizierung im Durchschnitt aller Replikate mit vier eindeutig zugeordneten Peptiden und einer Sequenzabdeckung von 36 %.

Somit konnten durch die aminreaktive Vernetzung der gesamte Arp2/3-Proteinkomplex sowie zwei assoziierte Proteine aus der zytosolischen Fraktion angereichert werden und der Arp2/3-Komplex wurde als potentieller PKD2-Interaktionspartner identifiziert.

4.4.2 PKD2-Interaktionspartner aus der Golgi-Apparat-Fraktion

Analog zur Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern aus der zytosolischen Fraktion wurden gemäß der etablierten analytischen Strategie (Abbildung 18) Affinitätsanreicherungs- und Vernetzungsexperimente mit dem GST-PKD2-Fusionsprotein und der Golgi-Apparat-Fraktion durchgeführt. Diese führten zur Identifizierung von 103 Proteinen, die vor der Datenfilterung in den vernetzten PKD2-Proben signifikant angereichert waren, im Vergleich zu 76 angereicherten Proteinen in den PKD2-Proben ohne Vernetzung (Abbildung 24). Zudem wurden 43 angereicherte Proteine in der vernetzten GST-Kontrollprobe, vier in der unernetzten GST-

Kontrollprobe und 46 in der vernetzten Matrix-Kontrollprobe identifiziert (Abbildung A5-A, Anhang).

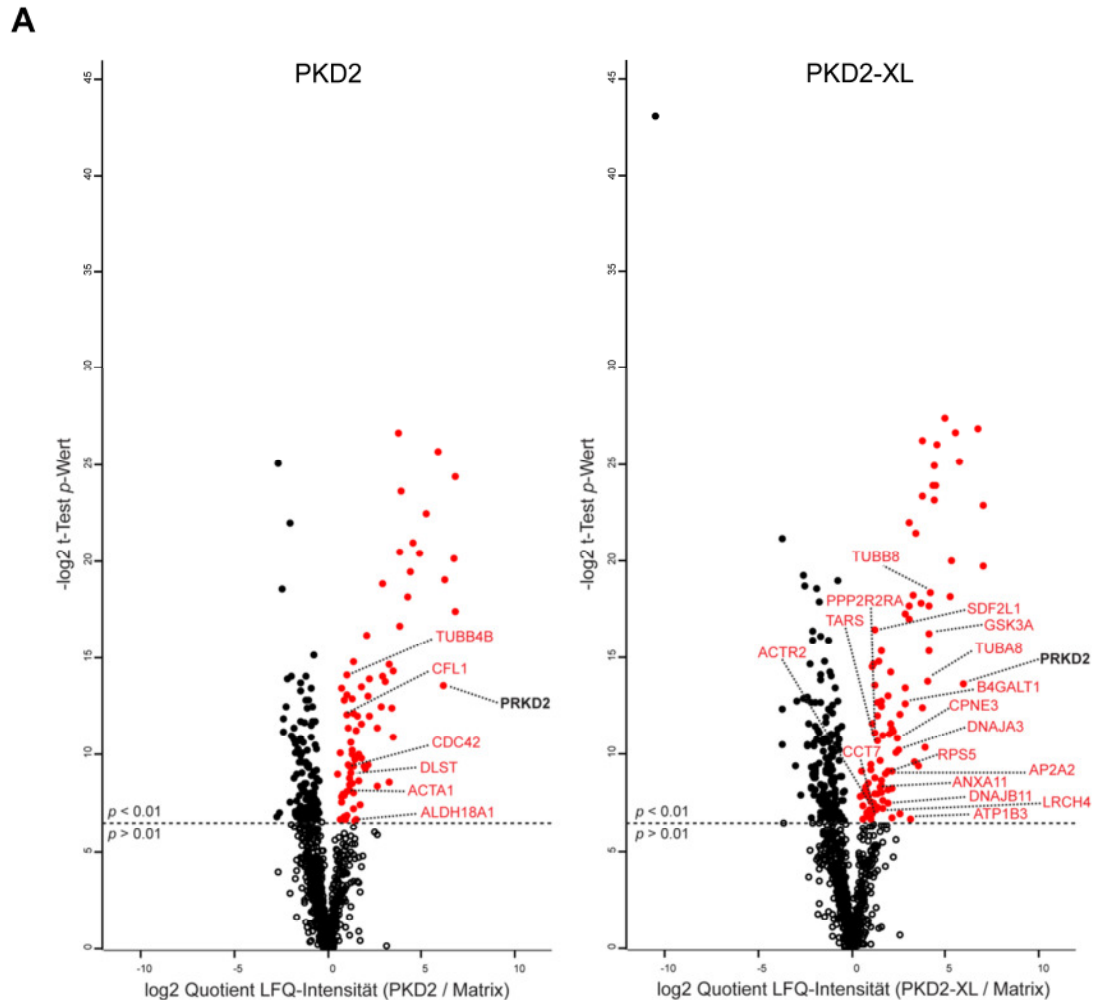


Abbildung 24: Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Anreicherungsexperimenten mit GST-PKD2 und der Golgi-Apparat-Fraktion

Die LFQ-Intensitäten von Proteinen, deren Anreicherung in Vernetzungsexperimenten (PKD2-XL) oder dem konventionellen Pulldown-Experiment (PKD2) erfolgten, wurden mittels einer t-Test-Analyse statistisch ausgewertet. Die logarithmierten Expressionsquotienten (PKD2-XL / PKD2) wurden gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte aufgetragen. Signifikant regulierte Proteine ($p \leq 0,01$) sind als rote und schwarze Punkte dargestellt, die den unregulierten Proteinen gegenüberstehen (schwarze Kreise). Angereicherte Proteine, die den Kriterien der Datenfilterung (Identifizierung anhand ≥ 2 Peptiden und Anreicherungsfaktor ≥ 2) entsprechen, sind mit ihren Gennamen annotiert (rote Schrift). Überlappende Anreicherungen zwischen beiden Experimenten sind in schwarzer Schrift annotiert, wobei das Zielprotein (PKD2/PRKD2) hervorgehoben ist. Die Analyse schließt Daten aus drei unabhängigen biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten ein.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Anreicherung aus der zytosolischen Fraktion zeigte die Analyse mehrere überlappende Identifizierungen zwischen den vernetzten sowie unvernetzten PKD2-Proben und den Matrix- und GST-Kontrollproben (Abbildung 25-A / Abbildung A5-B, Anhang). Die gemeinsamen Proteine wurden als unspezifische Bindungspartner klassifiziert. Dennoch wurde die Mehrheit angereicherter Proteine in den PKD2-Proben identifiziert, wobei deren Anzahl in der vernetzten Probe erhöht war. Insgesamt wurden 40 Proteine ausschließlich in der vernetzten PKD2-Probe, 22 in der unvernetzten PKD2-Probe und 46 überlappende Proteine identifiziert (Abbildung 25-B). Die Überlappungsanalyse und Datenfilterung der Proteine (Anreicherungsfaktor ≥ 2 und Identifizierung anhand ≥ 2 Peptiden) führte zur Klassifizierung von 17 Proteinen als vernetzungsspezifisch angereicherte PKD2-Interaktionspartner aus der Golgi-Apparat-Fraktion (Tabelle 8, Abbildung 24).

Die Ergebnisse zeigen die Anreicherung der Untereinheit ACTR2 des Arp2/3-Proteinkomplexes, der 55 kDa großen, regulatorischen Untereinheit B der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A (PPP2R2A) und der Glykogensynthase 3-Proteinfamilie (GSK3), die bereits aus der zytosolischen Fraktion in Anreicherungsexperimenten mit aminreaktiver Vernetzung identifiziert wurden.

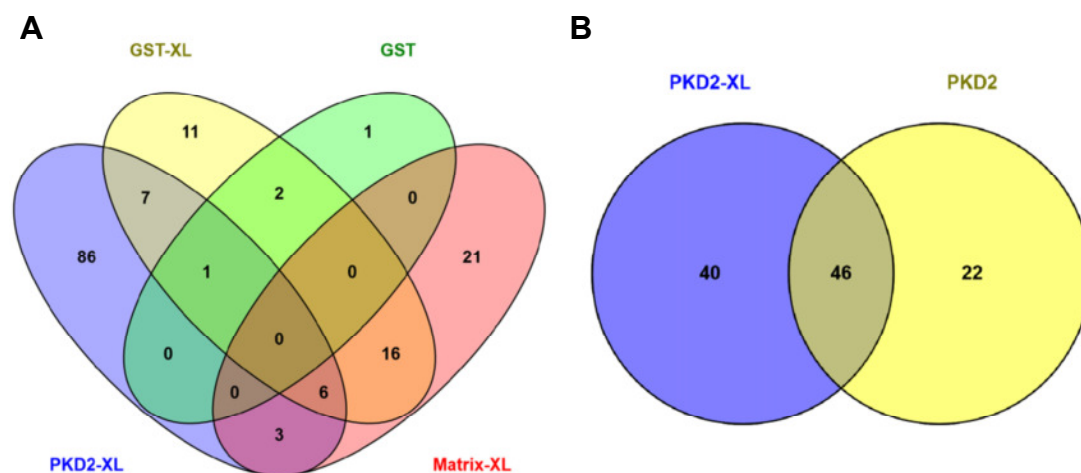


Abbildung 25: Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine aus der Golgi-Apparat-Fraktion

A) Darstellung der Überlappung von angereicherten Proteinen aus PKD2-Vernetzungsexperimenten (PKD2-XL) und den vernetzten (GST-XL, Matrix-XL) sowie den unvernetzten (GST) Kontrollproben. **B)** Überlappung zwischen PKD2-XL und dem Pulldown-Experiment ohne Vernetzung (PKD2), nachdem aus beiden Datensätzen potentielle unspezifische Protein-Bindungspartner entfernt wurden.

Tabelle 8: Identifizierung und Statistik der mittels aminreaktiver Vernetzung aus der Golgi-Apparat-Fraktion angereicherten Proteine

Proteinkomplexe aus Affinitätsanreicherungsexperimenten mit aminreaktiver Vernetzung wurden einer Proteinspaltung in Lösung unterzogen und die Peptidgemische mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert. Die Proteinidentifizierung und markierungsfreie Quantifizierung (LFQ) erfolgte mit der MaxQuant-Software. Die LFQ-Intensitäten aus drei biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten wurden mit der Perseus-Software durch eine t-Test-Analyse statistisch ausgewertet. Als Signifikanzschwelle wurde ein p -Wert $\leq 0,01$ festgelegt. Die Anreicherungsfaktoren (AF) sind als Quotienten der Mittelwerte der LFQ-Intensitäten zwischen der vernetzten PKD2-Probe und der Matrix-Kontrollprobe angegeben. Die Identifizierungsdaten stellen Mittelwerte aller Replikatanalysen dar. Die Daten wurden zusätzlich nach Proteinen mit einem Anreicherungsfaktor ≥ 2 und einer Zuordnung von ≥ 2 Peptiden in jeder Replikatanalyse gefiltert. *Verhältnis: eindeutig / gesamt

UniProt-Eintrag	Proteinname (eng.)	Gencode	AF	t-Test p -Wert	Peptide*	Sequenzabdeckung [%]
Q3ZCM7	<i>Tubulin beta-8 chain</i>	<i>TUBB8</i>	18,8	3,0E-06	3 / 9	22
P49840	<i>Glycogen synthase kinase-3 alpha</i>	<i>GSK3A</i>	17,9	1,3E-05	3 / 4	16
Q9NY65	<i>Tubulin alpha-8 chain</i>	<i>TUBA8</i>	17,1	7,0E-05	2 / 13	39
P54709	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3</i>	<i>ATP1B3</i>	8,9	9,8E-03	4 / 4	22
P15291	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 1</i>	<i>B4GALT1</i>	7,4	1,6E-04	4 / 4	17
Q96EY1	<i>DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochond.</i>	<i>DNAJA3</i>	5,7	8,3E-04	3 / 3	8
O75131	<i>Copine-3</i>	<i>CPNE3</i>	5,4	5,5E-04	6 / 6	14
O94973	<i>AP-2 complex subunit alpha-2</i>	<i>AP2A2</i>	4,4	1,8E-03	2 / 5	7
P46782	<i>40S ribosomal protein S5</i>	<i>RPS5</i>	3,9	1,7E-03	5 / 5	29
Q9UBS4	<i>DnaJ homolog subfamily B member 11</i>	<i>DNAJB11</i>	3,8	5,4E-03	4 / 4	13
O75427	<i>Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein</i>	<i>LRCH4</i>	3,1	6,6E-03	3 / 3	6
P50995	<i>Annexin A11</i>	<i>ANXA11</i>	2,8	3,1E-03	3 / 3	7
P26639	<i>Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	<i>TARS</i>	2,5	5,8E-04	3 / 3	7
P63151	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform</i>	<i>PPP2R2A</i>	2,4	4,5E-04	3 / 3	10
Q9HCN8	<i>Stromal cell-derived factor 2-like protein 1</i>	<i>SDF2L1</i>	2,3	1,1E-05	4 / 4	32
Q99832	<i>T-complex protein 1 subunit eta</i>	<i>CCT7</i>	2,2	8,0E-03	5 / 5	17
P61160/-2	<i>Actin-related protein 2</i>	<i>ACTR2</i>	2,1	5,3E-03	4 / 4	15

4.5 Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion

Das Protokoll zur Affinitätsanreicherung (Abbildung 18) wurde für die Fixierung von Protein-Protein-Interaktionen nach dem Einbau von Photo-Aminosäuren modifiziert (Abbildung 26). Die alternative Strategie beruht auf dem Einbau von Photo-Methionin und Photo-Leucin in HeLa-Zellen, aus denen anschließend eine photoaffinitätsmarkierte Proteinfraktion für die Affinitätsanreicherung gewonnen wurde. Die experimentellen Schritte wurden analog dem bereits beschriebenen Protokoll zur aminreaktiven Vernetzung durchgeführt, jedoch erfolgte die kovalente Fixierung von PKD2-Interaktionspartnern durch Aktivierung der Photo-Aminosäuren mit UV-A-Bestrahlung.

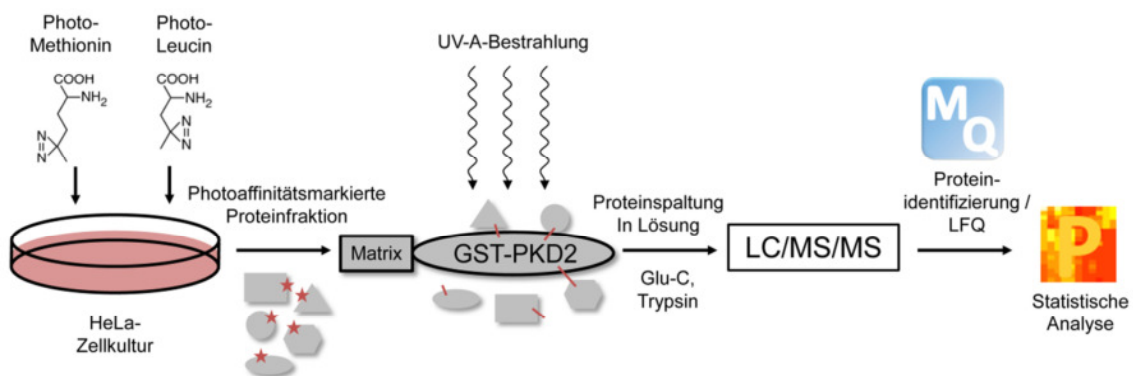


Abbildung 26: Analytische Strategie zur Affinitätsanreicherung und photoinduzierten Vernetzung von PKD2-Interaktionspartnern

Die photoaktivierbaren Aminosäuren Photo-Methionin und Photo-Leucin wurden unspezifisch in die Proteine von HeLa-Zellkulturen eingebaut. Anschließend wurde die photoaffinitätsmarkierte, lösliche Proteinfraktion gewonnen. Nach der Inkubation des an das Säulenmaterial gebundenen GST-PKD2-Fusionsproteins mit der Proteinfraktion wurden die Proteinkomplexe durch Aktivierung der Diazirine der Photo-Aminosäuren mittels UV-A-Bestrahlung kovalent fixiert. Anschließend wurde die Affinitätsmatrix gewaschen, die PKD2-Proteinkomplexe wurden einer Proteinspaltung in der Lösung unterzogen und die Proben mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert. Nach der Identifizierung und markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) der Proteine mit der MaxQuant-Software (MQ) erfolgte die vergleichende statistische Analyse der LFQ-Intensitäten für die Zuordnung signifikant angereicherter Proteine mit der Perseus-Software (P).

4.5.1 Einbau der Photo-Aminosäuren in HeLa-Zellen

Der Einbau der photoaktivierbaren Aminosäuren Photo-Methionin und Photo-Leucin in HeLa-Zellkulturen wurde auf Peptidebene untersucht. Dazu wurden Zellextrakte aus drei unabhängigen Experimenten einer Proteomanalyse unterzogen, die zur Identifizierung von 3439 ± 85 Proteinen mit 26511 ± 1330 Peptiden führte.³ Anschließend wurden die identifizierten Peptide gemäß ihrer Modifikation mit den Photo-Aminosäuren analysiert (Abbildung 27).

Der Vergleich von Peptiden, die mit den Photo-Aminosäuren modifiziert wurden, und ihren unmodifizierten Varianten ergab eine mittlere Einbaurrate von $\sim 17\%$ für Photo-Methionin und $\sim 6\%$ für Photo-Leucin. Im Vergleich zu allen identifizierten Peptiden, die Methionin oder Leucin enthielten, wurde eine mittlere Einbaurrate von $\sim 8,4\%$ für Photo-Methionin und $\sim 0,5\%$ für Photo-Leucin beobachtet. Bezogen auf alle identifizierten Peptide wurde eine Gesamteinbaurrate von $\sim 1,7\%$ ermittelt, wobei die Anteile von Photo-Methionin und Photo-Leucin $\sim 1,3\%$ bzw. $\sim 0,4\%$ betragen. Die Analyse zeigte eine Präferenz des Einbaus von Photo-Methionin gegenüber Photo-Leucin. Dabei war der Einbau von Photo-Methionin in Bezug auf unmodifizierte Peptidvarianten bzw. alle identifizierten Peptide ungefähr verdreifacht. Im Vergleich zu Peptiden, welche die natürlichen Varianten der Photo-Aminosäuren enthielten, wurde ein ~ 17 -fach erhöhter Einbau von Photo-Methionin beobachtet.

³ Die massenspektrometrischen Rohdaten sind unter der Kennung **PXD005346** über das ProteomeXchange-Konsortium in der PRIDE-Datenbank hinterlegt [202, 203]. Für detaillierte Daten der Proteinidentifizierung und Fragmentationsspektren von Identifizierungen anhand nur eines zugeordneten Peptids siehe Tabelle S1 und Abbildung S1 in [205].

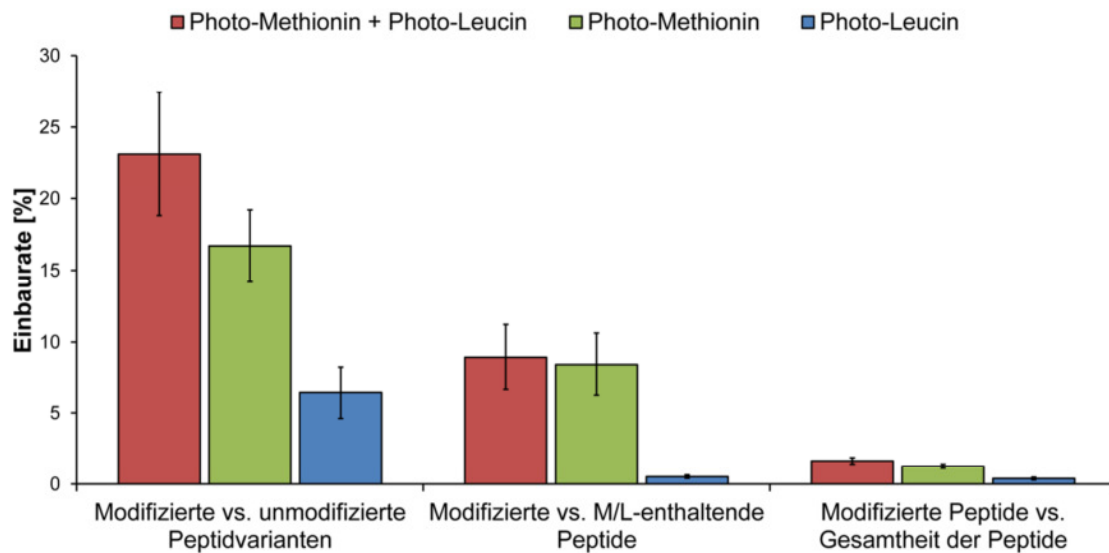


Abbildung 27: Einbau von Photo-Methionin und Photo-Leucin in Proteine von HeLa-Zellen

Lysate von HeLa-Zellen wurden nach dem Einbau der Photo-Aminosäuren in drei unabhängigen Replikatexperimenten einer Proteomanalyse unterzogen. Dazu wurde eine Proteinspaltung in Lösung mit Trypsin und eine Analyse der Peptidgemische mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS durchgeführt. Nach der Proteinidentifizierung mit der MaxQuant-Software wurden die Einbauraten der Photo-Aminosäuren mit der Perseus-Software auf Peptidebene bestimmt. Dazu wurden die Intensitäten von Peptiden, die mit Photo-Methionin oder Photo-Leucin modifiziert waren, mit den Intensitäten ihrer unmodifizierten Varianten verglichen. Zudem erfolgten Vergleiche zu allen Peptiden, die Methionin oder Leucin enthalten, sowie zur Gesamtheit der identifizierten Peptide.

4.5.2 Aktivierung der Photo-Aminosäuren

Die Absorptionsmessung bei 345 nm für intakte Diazirine in den Photo-Aminosäuren nach Bestrahlung mit steigender UV-A-Dosis zeigte für Photo-Methionin und Photo-Leucin bei einer Bestrahlungsenergie von $\sim 4000 \text{ mJ cm}^{-2}$ eine Halbierung des Ausgangswertes (Abbildung A6, Anhang). Im weiteren Verlauf erfolgte die Erhöhung der UV-A-Bestrahlungsdosis auf $11.000 \text{ mJ cm}^{-2}$, wobei die Abnahme der Absorption intakter Diazirine auf $\leq 20 \%$ detektiert wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für die Anreicherungsexperimente eine UV-A-Bestrahlungsdosis von 8000 mJ cm^{-2} festgelegt.

4.5.3 Identifizierung und statistische Analyse angereicherter Proteine aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion

Die Prozessierung der massenspektrometrischen Rohdaten führte nach der Entfernung von Proteinen, deren Identifizierung aus der Datenbank möglicher Kontaminanten erfolgte, und von potentiell falsch-positiv identifizierten Proteinen zur Identifizierung von 2817 Proteinen, die in allen simultan bearbeiteten Proben quantitativ erfasst werden konnten.⁴ Nach dem Ausschluss von Proteinen mit unvollständigen Quantifizierungsdaten in den jeweils paarweise verglichenen Replikatgruppen wurden vor der Datenfilterung 39 angereicherte Proteine in den vernetzten PKD2-Proben detektiert (Abbildung 28). In der PKD2-Probe ohne Vernetzung erfolgte die Identifizierung von 38 angereicherten Proteinen.

In den vernetzten GST-Kontrollproben wurden 15 und in den vernetzten Matrix-Kontrollproben 10 angereicherte Proteine identifiziert. Keine signifikante Proteinanreicherung erfolgte in den GST-Kontrollproben ohne Vernetzung (Abbildung A7-A, Anhang).

⁴ Die massenspektrometrischen Rohdaten sind unter der Kennung **PXD005349** über das ProteomeXchange-Konsortium in der PRIDE-Datenbank hinterlegt [202, 203]. Für detaillierte Daten der Proteinidentifizierung und markierungsfreien Quantifizierung sowie Fragmentationenspektren von Identifizierungen anhand nur eines zugeordneten Peptids siehe Tabelle S2 und Abbildung S3 in [205].

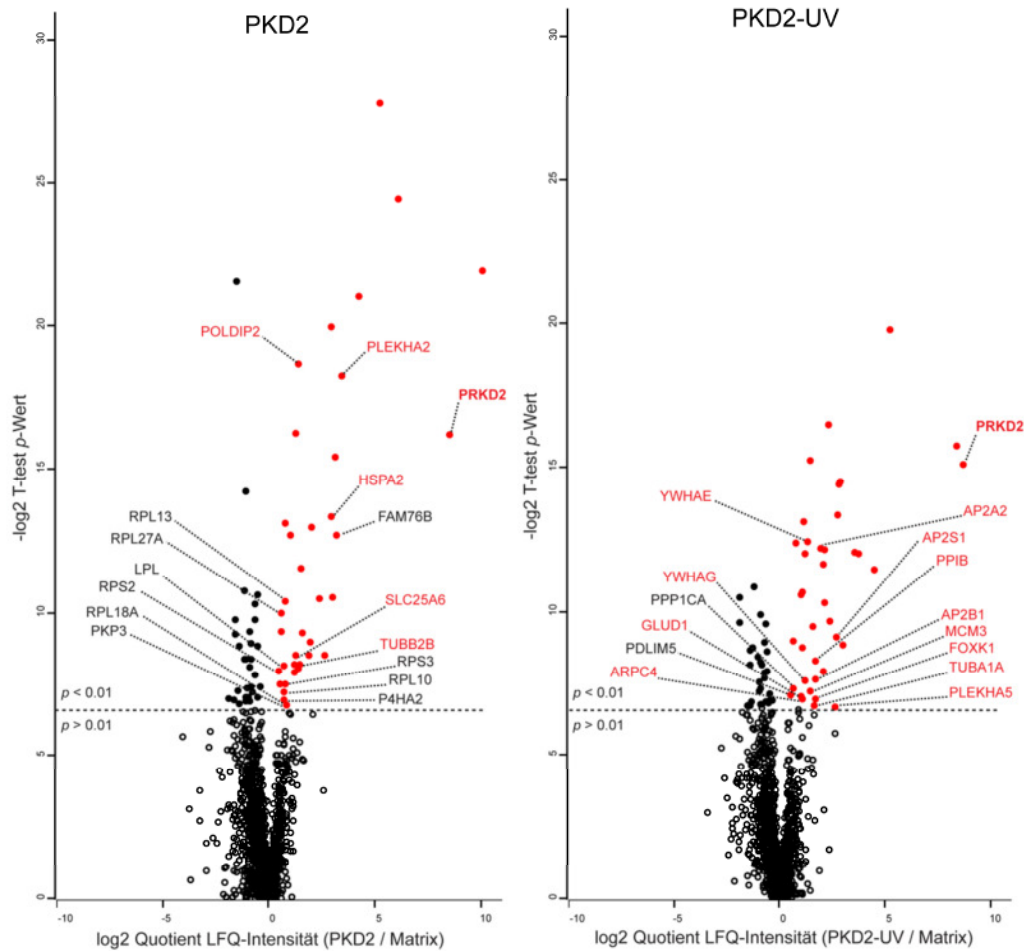


Abbildung 28: Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Anreicherungsexperimenten mit GST-PKD2 und der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction

Die LFQ-Intensitäten von Proteinen, deren Anreicherung in Vernetzungsexperimenten (PKD2-UV) oder dem konventionellen Pulldown-Experiment (PKD2) erfolgte, wurden mittels einer t-Test-Analyse statistisch ausgewertet. Die logarithmierten Expressionsquotienten (PKD2-UV / PKD2) wurden gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte aufgetragen. Signifikant regulierte Proteine ($p \leq 0,01$) sind als rote und schwarze Punkte dargestellt, die den unregulierten Proteinen gegenüberstehen (schwarze Kreise). Angereicherte Proteine, die den Kriterien der Datenfilterung (Identifizierung anhand ≥ 2 Peptiden und Anreicherungsfaktor ≥ 2) entsprechen, sind mit ihren Gennamen annotiert (rote Schrift), wobei das Zielprotein (PKD2/PRKD2) hervorgehoben ist. Signifikant angereicherte Proteine mit einem Anreicherungsfaktor ≤ 2 sind in schwarzer Schrift annotiert. Die Analyse schließt Daten aus drei unabhängigen biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten ein.

In den Kontrollproben angereicherte Proteine wurden durch eine Überlappungsanalyse als potentielle unspezifische Bindungspartner aus den Datensätzen der PKD2-Proben entfernt. Für die vernetzten PKD2-Proben wurden insgesamt sechs überlappende Proteinidentifizierungen zu den vernetzten GST- und Matrix-Kontrollproben detektiert (Abbildung 29-A), während die unbestrahlten PKD2-Proben insgesamt vier Überlappungen zeigten (Abbildung A7-B, Anhang). Zudem wurden die angereicherten Proteine der vernetzten und unbestrahlten PKD2-Proben verglichen. Die Analyse zeigte

16 ausschließlich in den vernetzten Proben angereicherte Proteine, 17 Identifizierungen ausschließlich in den unbestrahlten Proben sowie eine Schnittmenge von 17 Proteinen für beide experimentellen Bedingungen (Abbildung 29-B).

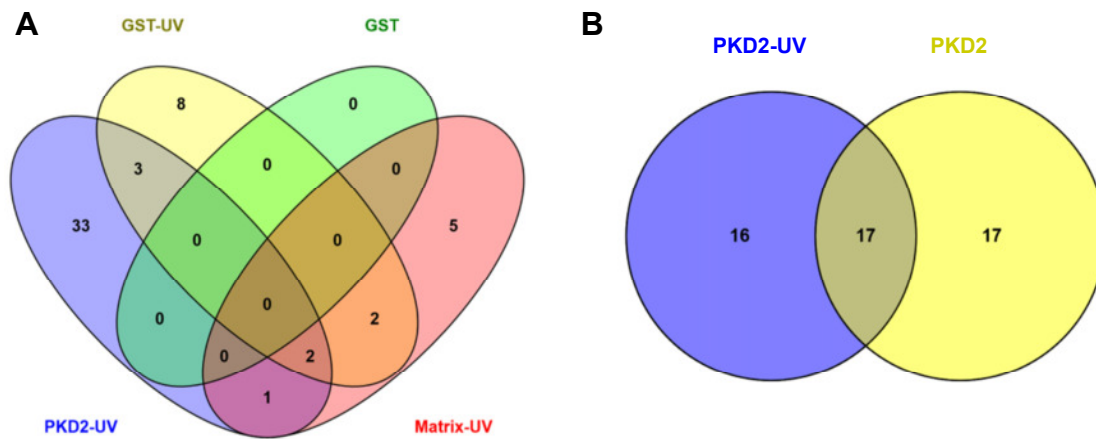


Abbildung 29: Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction

A) Darstellung der Überlappung von angereicherten Proteinen aus PKD2-Vernetzungsexperimenten (PKD2-UV) und den vernetzten (GST-XL, Matrix-XL) sowie den unvernetzten (GST) Kontrollproben. **B)** Überlappung zwischen PKD2-UV und dem Pulldown-Experiment ohne Vernetzung (PKD2), nachdem aus beiden Datensätzen potentielle unspezifische Protein-Bindungspartner entfernt wurden.

Die Überlappungsanalyse und Datenfilterung der Proteine (Anreicherungsfaktor ≥ 2 und Identifizierung anhand ≥ 2 Peptiden) führte zur Klassifizierung von 12 Proteinen als vernetzungsspezifisch angereicherte PKD2-Interaktionspartner aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction (Tabelle 9, Abbildung 28).

Die Ergebnisse zeigen, dass neben der zytosolischen Fraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion auch aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction eine Komponente des Arp2/3-Proteinkomplexes (Untereinheit ARPC4) angereichert werden konnte.

Tabelle 9: Identifizierung und Statistik der mittels photoinduzierter Vernetzung aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction angereicherten Proteine

Proteinkomplexe aus Affinitätsanreicherungs experimenten mit photoinduzierter Vernetzung (Photo-Methionin und Photo-Leucin) wurden einer Proteinspaltung in Lösung unterzogen und die Peptidgemische mittels nano-HPLC/nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert. Die Identifizierung und markierungsfreie Quantifizierung (LFQ) erfolgte mit der MaxQuant-Software. LFQ-Intensitäten aus drei biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten wurden mit der Perseus-Software durch eine t-Test-Analyse statistisch ausgewertet. Als Signifikanzschwelle wurde ein p -Wert $\leq 0,01$ festgelegt. Die Anreicherungsfaktoren (AF) sind als Quotienten der Mittelwerte der LFQ-Intensitäten zwischen der UV-A-bestrahlten PKD2-Probe und der Matrix-Kontrollprobe angegeben. Die Identifizierungsdaten stellen Mittelwerte aller Replikatanalysen dar. Die Daten wurden zusätzlich nach Proteinen mit einem Anreicherungsfaktor ≥ 2 und mindestens zwei identifizierten Peptiden in jeder Replikatanalyse gefiltert. *Verhältnis: eindeutig / gesamt

UniProt-Eintrag	Proteinname (eng.)	Genname	AF	t-Test p-Wert	Peptide*	Sequenz-abdeckung [%]
P53680	<i>AP-2 complex subunit sigma</i>	<i>AP2S1</i>	6,5	1,8E-03	2 / 2	8
Q9HAU0	<i>Pleckstrin homology domain-containing family A member 5</i>	<i>PLEKHA5</i>	6,1	9,9E-03	11 / 11	12
O94973	<i>AP-2 complex subunit alpha-2</i>	<i>AP2A2</i>	3,9	2,2E-04	1 / 5	8
P63010	<i>AP-2 complex subunit beta</i>	<i>AP2B1</i>	3,3	5,0E-03	12 / 17	21
P23284	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	<i>PPIB</i>	3,2	3,3E-03	8 / 8	43
P85037	<i>Forkhead box protein K1</i>	<i>FOXK1</i>	3,2	8,2E-03	5 / 5	8
Q71U36	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	<i>TUBA1A</i>	3,1	9,6E-03	0 / 47	76
P25205	<i>DNA replication licensing factor MCM3</i>	<i>MCM3</i>	2,7	6,8E-03	25 / 25	30
P62258	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	<i>YWHAE</i>	2,6	1,8E-04	10 / 14	38
P61981	<i>14-3-3 protein gamma</i>	<i>YWHAG</i>	2,3	5,1E-03	11 / 18	66
P59998	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 4</i>	<i>ARPC4</i>	2,1	8,2E-03	3 / 3	11
P00367	<i>Glutamate dehydrogenase 1</i>	<i>GLUD1</i>	2,1	7,5E-03	11 / 11	20

4.6 Netzwerk identifizierter PKD2-Interaktionspartner

Die Analyse der durch aminreaktive bzw. photoinduzierte Vernetzung angereicherten PKD2-Interaktionspartner zeigte in allen durchgeführten Experimenten (zytosolische Fraktion, Golgi-Apparat-Fraktion und photoaffinitätsmarkierte Proteinfraktion) eine vergleichbare Anzahl identifizierter PKD2-Bindungspartner (15 / 17 / 12). Dabei grenzten sich die Proteinidentifizierungen aus den individuellen Fraktionen voneinander ab. Aus der zytosolischen Fraktion konnten elf, aus der Golgi-Apparat-Fraktion vierzehn und aus der photoaffinitätsmarkierten Fraktion neun Proteine spezifisch identifiziert werden. Zudem wurde die Anreicherung bestimmter Proteine aus mehreren Fraktionen beobachtet. Dies wurde insbesondere bei Identifizierungen von Untereinheiten des Arp2/3-Proteinkomplexes deutlich, die sowohl in der zytosolischen Fraktion als auch der Golgi-Apparat-Fraktion (ACTR2) bzw. der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion (ARPC4) erfolgten. Zudem wurde jeweils ein weiterer PKD2-Interaktionspartner in der zytosolischen Fraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion (PPP2R2A), der zytosolischen Fraktion und der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion (14-3-3-Protein γ , YWHAG) sowie der Golgi-Apparat-Fraktion und der photoaffinitätsmarkierten Fraktion (AP2A2-Untereinheit des Adapterprotein-komplexes 2) identifiziert. Der Vergleich mit Daten aus der BioGRID-Datenbank zeigte bereits bekannte Protein-Protein-Interaktionen zwischen den angereicherten PKD2-Interaktionspartnern, sodass sich insgesamt das folgende PKD2-Protein-Interaktionsnetzwerk ergibt (Abbildung 30).

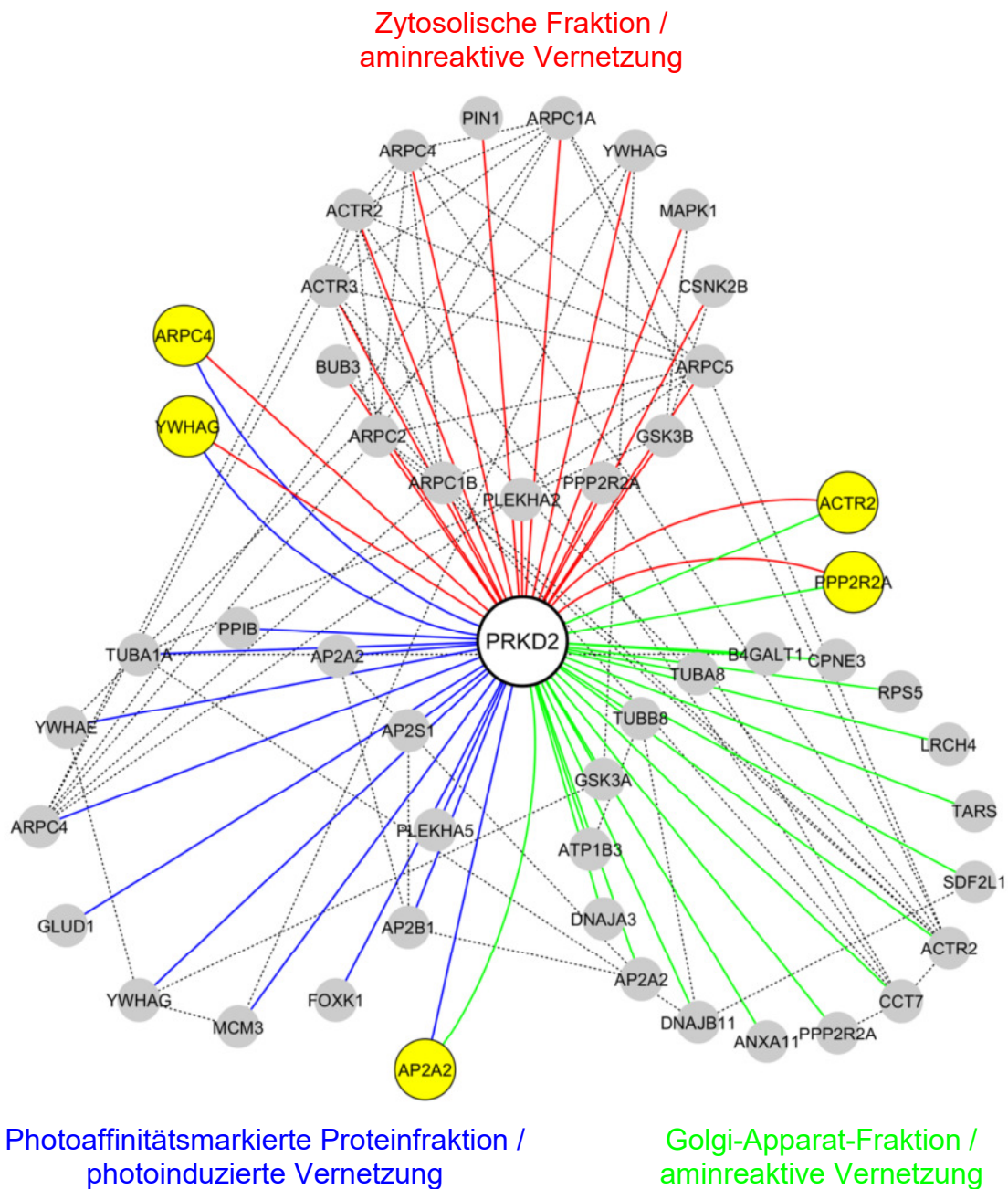


Abbildung 30: Netzwerk identifizierter Protein-Interaktionspartner der Proteinkinase D2

Identifizierte Proteine aus Anreicherungs- und Vernetzungsexperimenten mit der zytosolischen Fraktion (rot), der Golgi-Apparat-Fraktion (grün) sowie der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction (blau), die aus HeLa-Zellen gewonnen wurden, und das Zielprotein PKD2 (PRKD2) wurden mit der Cytoscape-Software [199] als Knotenpunkte zueinander in Beziehung gesetzt, die mit den Gennamen annotiert wurden. Die Abstände zum Zielprotein repräsentieren die normierten spezifischen Anreicherungsfaktoren, wobei ein geringerer Abstand einer stärkeren Anreicherung entspricht. In verschiedenen Fraktionen angereicherte Proteine wurden separat hervorgehoben (gelb). Für die Analyse wurden Proteine mit einer signifikanten Anreicherung ($p \leq 0,01$) im Vergleich zur jeweiligen Matrix-Kontrollprobe ohne Vernetzung in Betracht gezogen, die mit einem Anreicherungsfaktor ≥ 2 und mindestens zwei Peptiden je Replikatanalyse identifiziert wurden. Zudem wurde die Anreicherung der ARPC4-Untereinheit des Arp2/3-Komplexes aus der zytosolischen Fraktion berücksichtigt (Abschnitt 4.4.1). Bereits publizierte Interaktionen (schwarze, unterbrochene Linien) sind anhand eines Datenabgleichs mit der BioGRID-Datenbank [200] dargestellt.

4.7 Chemische Vernetzung zur strukturellen Charakterisierung der humanen PKD2

Neben Vernetzungsexperimenten zur Anreicherung und Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern wurde die chemische Vernetzung zur Ableitung struktureller Informationen der PKD2 genutzt. Dazu wurde das kommerzielle GST-PKD2-Fusionsprotein zur Entfernung der GST-Markierung proteolytisch gespalten und die GST-freie PKD2 mit dem aminreaktiven Vernetzungsreagenz BuUrBu inkubiert.

Die SDS-PAGE-Analyse der Vernetzungsreaktion (Abbildung 31) zeigte für die vernetzte Probe im Vergleich zur Kontrollprobe diffuse Signale, die für eine intra- und intermolekulare Vernetzung von PKD2 sprechen. Dabei wurden Signale der monomeren Form von PKD2 sowie des PKD2-Dimers [46, 47] detektiert, während in der Kontrollprobe der monomere Zustand dominierte.

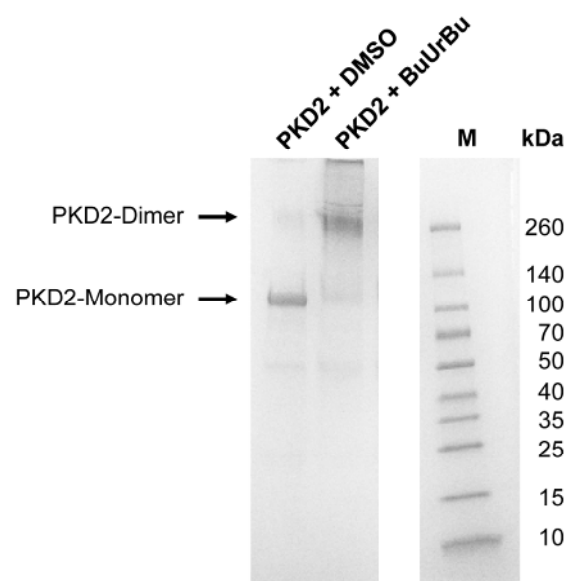


Abbildung 31: SDS-PAGE-Analyse der Vernetzung von PKD2 mit dem aminreaktiven BuUrBu-Reagenz

PKD2 wurde mit einem 100-fachen molaren Überschuss des chemischen Vernetzungsreagenzes BuUrBu für 2 h bei 4 °C inkubiert (PKD2 + BuUrBu). Eine Kontrollprobe wurde mit dem äquivalenten Volumen DMSO behandelt und analog bearbeitet (PKD2 + DMSO). Nach dem Abstoppen der Reaktion mit Ammoniumbicarbonat (Endkonzentration 20 mM) wurden die Proben auf ein Polyacrylamid-Gradientengel (4-20 %) aufgetragen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Färbung der aufgetrennten Proteine erfolgte mit Coomassie-Brillantblau G-250. Die Pfeilmarkierungen verweisen auf die Proteinbanden monomeres und dimeres PKD2, die für eine Proteinspaltung in der Gelmatrix mit Glu-C und Trypsin eingesetzt wurden. M: Molekulargewichtsstandard

Zur Identifizierung der Vernetzungsstellen innerhalb des PKD2-Monomers bzw. PKD2-Homodimers wurden die entsprechenden Gelbanden ausgeschnitten. Nach einer proteolytischen Spaltung in der Gelmatrix wurden die Peptidgemische extrahiert und mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert. Die Auswertung der massenspektrometrischen Rohdaten mit Hilfe der MeroX-Software führte zur Identifizierung von 34 intramolekularen Vernetzungen für das PKD2-Monomer. Mit 28 zugeordneten Vernetzungsprodukten handelte es sich dabei größtenteils um Vernetzungen zwischen Lysinen. Zudem wurden vier Vernetzungen zwischen identischen oder überlappenden Peptiden für das PKD2-Dimer gefunden. Eine Zusammenfassung der identifizierten Vernetzungsprodukte ist in Tabelle 10 gezeigt.

Tabelle 10: Intra- und intermolekulare PKD2-Vernetzungsprodukte

PKD2 wurde mit dem aminreaktiven Vernetzungsreagenz BuUrBu inkubiert und die Proben nach der Reaktion mittels SDS-PAGE analysiert. Proteinbanden des vernetzten PKD2-Monomers und PKD2-Dimers wurden in der Gelmatrix enzymatisch gespalten und die resultierenden Peptidgemische mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS analysiert. Zur Analyse der Vernetzungsprodukte wurden die massenspektrometrischen Rohdaten mit der Proteome Discoverer-Software (Proteinidentifizierung und Export von Signallisten) sowie der MeroX-Software (Identifizierung vernetzter Peptide) verarbeitet. Zugeordnete Vernetzungsprodukte sind mit den beteiligten Positionen innerhalb der PKD2-Aminosäuresequenz (Abbildung A7, Anhang) und ihren Massen angegeben. Fragmentationsspektren der hervorgehobenen Vernetzungsprodukte sind in Abbildung 32 gezeigt. *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, *z*: Ladungszustand

Position 1	Position 2	<i>m/z</i>	<i>z</i>	[M+H] ⁺ experimentell	[M+H] ⁺ theoretisch	Δ <i>m</i> [ppm]
Intramolekulare Vernetzungen (PKD2-Monomer)						
K-178	K-572	509,744	4 ⁺	2035,953	2035,955	0,72
K-178	K-590	775,357	3 ⁺	2324,055	2324,055	0,25
K-260	K-622	665,058	3 ⁺	1993,159	1993,159	0,23
K-283	K-304	519,961	3 ⁺	1557,867	1557,868	0,69
K-283	K-580	561,685	3 ⁺	1683,041	1683,041	0,21
K-283	K-622	559,345	3 ⁺	1676,019	1676,018	0,69
K-283	K-822	458,602	3 ⁺	1373,791	1373,793	1,59
K-286	K-304	635,021	3 ⁺	1903,048	1903,048	0,12
K-286	K-572	501,644	3 ⁺	1502,916	1502,917	0,27
K-286	K-590	597,677	3 ⁺	1791,016	1791,016	0,04
K-296	K-304	731,675	3 ⁺	2193,011	2193,011	0,18
K-296	K-590	694,332	3 ⁺	2080,980	2080,978	0,44
K-299	K-572	588,947	3 ⁺	1764,826	1764,827	0,39

Position 1	Position 2	<i>m/z</i>	<i>z</i>	[M+H] ⁺ experimentell	[M+H] ⁺ theoretisch	Δ <i>m</i> [ppm]
K-304	S-387	581,974	3 ⁺	1743,907	1743,907	0,18
K-304	K-572	508,273	4 ⁺	2030,070	2030,071	0,52
K-304	K-580	681,698	3 ⁺	2043,080	2043,080	0,09
K-304	K-590	602,630	3 ⁺	1805,875	1805,875	0,14
K-304	K-622	679,357	3 ⁺	2036,057	2036,057	0,08
K-304	K-705	531,940	3 ⁺	1593,806	1593,807	0,55
K-304	K-822	578,615	3 ⁺	1733,831	1733,832	0,56
S-387	K-622	621,357	3 ⁺	1862,056	1862,057	0,31
T-392	K-572	561,648	3 ⁺	1682,929	1682,930	0,36
T-392	K-590	486,916	3 ⁺	1458,733	1458,734	0,28
T-392	K-622	563,643	3 ⁺	1688,915	1688,915	0,18
K-410	K-572	558,547	4 ⁺	2231,168	2231,168	0,07
K-415	K-572	401,224	4 ⁺	1601,876	1601,877	0,81
K-572	K-580	548,321	3 ⁺	1642,948	1642,949	0,27
K-572	K-584	467,284	3 ⁺	1399,837	1399,838	0,44
K-580	K-590	734,083	3 ⁺	2200,234	2200,234	0,16
K-580	K-705	711,076	3⁺	2131,212	2131,212	0,06
K-584	K-622	640,045	3 ⁺	1918,119	1918,119	0,13
K-590	K-622	642,012	3 ⁺	1924,022	1924,025	1,47
K-590	K-705	741,391	2 ⁺	1481,774	1481,775	0,46
S-593	K-590	724,381	2 ⁺	1447,754	1447,754	0,20
Intermolekulare Vernetzungen (PKD2-Dimer)						
K-304	K-304	639,974	3⁺	1917,908	1917,907	0,20
K-572	K-572	543,984	3 ⁺	1629,939	1629,939	0,38
K-590	K-590	565,286	3 ⁺	1693,843	1693,843	0,34
K-705	K-705	475,940	3 ⁺	1425,807	1425,807	0,44

Ausgewählte Fragmentationenspektren von intra- und intermolekularen PKD2-Vernetzungsprodukten sind in Abbildung 32 exemplarisch dargestellt und zeigen die Zuordnung beider Fragmente des BuUrBu-Reagenzes für die beteiligten Peptide sowie die Ableitung der Aminosäuresequenzen durch die Zuordnung der Fragmentationen. Die eindeutige Zuordnung von intermolekularen Vernetzungsprodukten beruhte auf der Identifizierung identischer vernetzter Peptide, da nur dies die Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularen Vernetzungen innerhalb des PKD2-Dimers erlaubte.

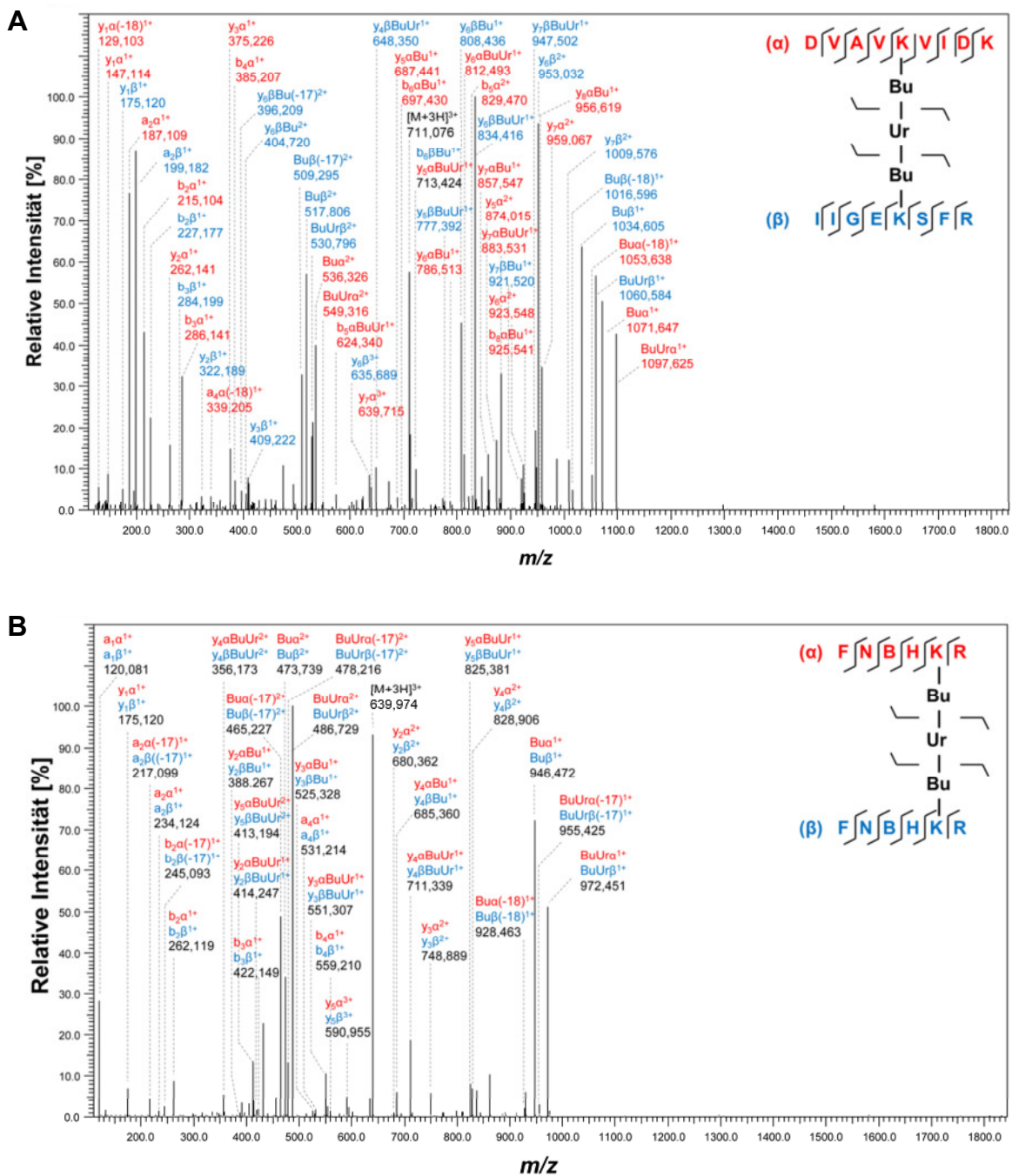


Abbildung 32: Fragmentationsspektren zur Identifizierung intra- und intermolekularer BuUrBu-Vernetzungsprodukte der PKD2

Vorläuferionen wurden im Quadrupol-Massenfilter selektiert, mittels *stepped*-HCD im IRM fragmentiert und die Fragmentionen im Orbitrap-Analysator analysiert. Die Signale der Fragmentationsspektren wurden entsprechend ihrer Zugehörigkeit zum α -Peptid (rot) oder β -Peptid (blau) annotiert. Annotationen ohne Farbmarkierung repräsentieren Signale der Vorläuferionen (schwarz). **A**) Fragmentationsspektrum eines intramolekularen PKD2-Vernetzungsprodukts zwischen den Aminosäuren (AS) K-580 und K-705 der Peptide DVAVKVIDK (AS 576-584) und IIGKSFR (AS 701-708). Das dreifach geladene Vorläuferion wurde bei m/z 711,076 detektiert (Tabelle 10). **B**) Fragmentationsspektrum eines intermolekularen PKD2-Vernetzungsprodukts zwischen den Peptiden FNBHKR (AS 300-305) an der Aminosäureposition K-304. Das dreifach geladene Vorläuferion wurde bei m/z 639,974 detektiert (Tabelle 10). B: carbamidomethyliertes Cystein, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Fragmentationenspektren aller weiteren identifizierten Vernetzungsprodukte können dem Anhang entnommen werden (Abbildung A11). Die identifizierten Vernetzungen wurden mittels der xVis-Software grafisch dargestellt (Abbildung 33).

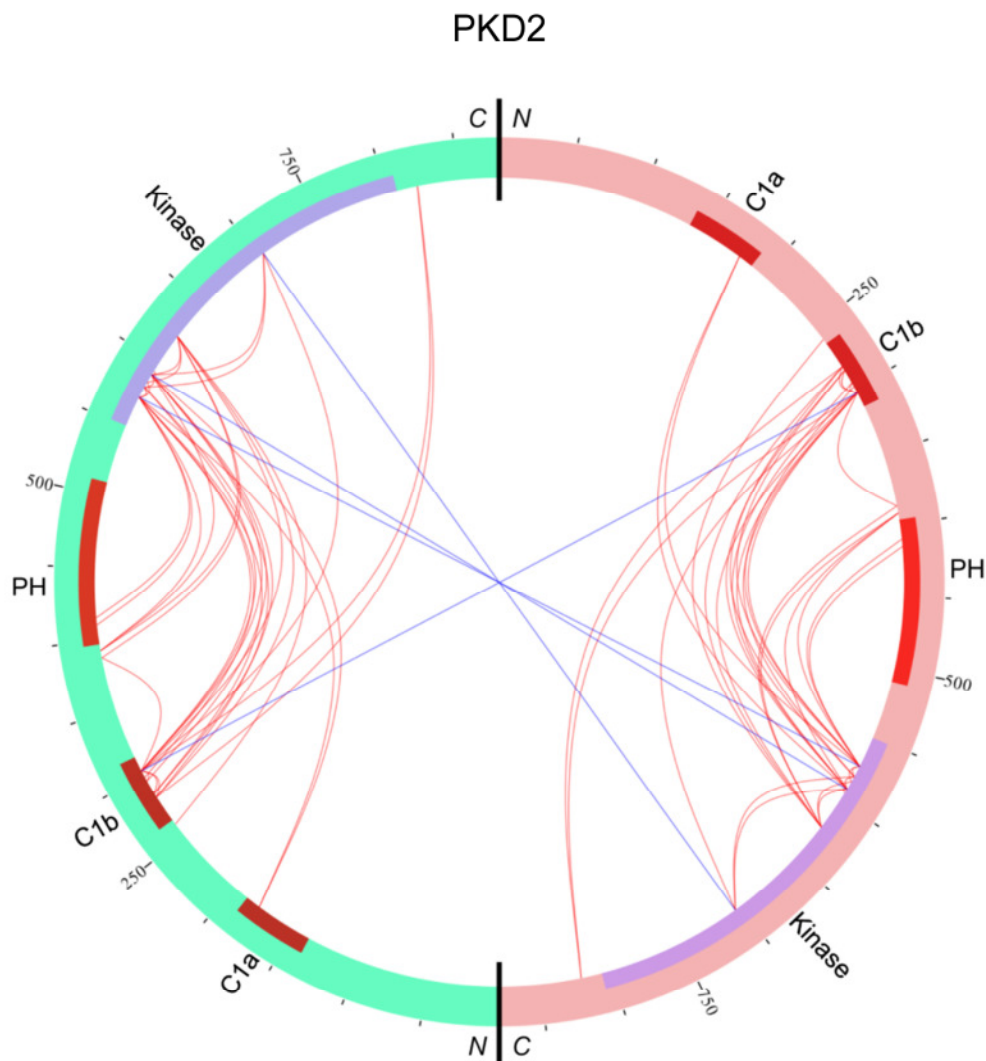


Abbildung 33: Grafische Darstellung intra- und intermolekularer PKD2-Vernetzungen

Intramolekulare (rot) und intermolekulare (blau) PKD2-Vernetzungsprodukte wurden über die verknüpften Positionen der Aminosäuresequenz mit der xVis-Software dargestellt. Die in der UniProt-Datenbank hinterlegte Domänenstruktur der humanen PKD2 wurde der Darstellung zugrunde gelegt (Eintrag Q9BZL6).

Die Visualisierung zeigte, dass die identifizierten Vernetzungen hauptsächlich in der zentralen Region der PKD2 zu finden sind. Dabei wurde eine Präferenz für intramolekulare Vernetzungen zum *N*-terminalen Bereich der katalytischen Kinasedomäne und zur C1b-Domäne deutlich, in geringerem Maße auch zur C1a-Domäne und zur Pleckstrin-Homologie-Domäne. Zusätzlich zu einer einzelnen Vernetzung zwischen C1b-Domänen im PKD2-Dimer wurden drei der identifizierten intermolekularen Vernetzungen der Kinasedomäne zugeordnet.

Die Identifizierung der intra- und intermolekularen Vernetzungen der PKD2 lieferte somit Distanzbeschränkungen, die für die Validierung bzw. Erstellung von Proteinmodellen des Monomers und des Dimers der PKD2 herangezogen werden können. Aufgrund der Verwendung des BuUrBu-Reagenzes mit einer *Spacer*-Länge von 12,5 Å kann dabei ein maximaler $C\alpha$ - $C\alpha$ -Abstand vernetzter Lysine von 35 Å zugrunde gelegt werden.

5 Diskussion

5.1 Expression und Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins

Die Experimente zur Expression der humanen PKD2 als GST-PKD2-Fusionsprotein in *Escherichia coli* zeigten, dass das Fusionsprotein größtenteils in der unlöslichen Proteinfraction erhalten wurde (Abschnitt 4.1.1). Möglicherweise lässt sich dieses Ergebnis auf eine fehlerhafte Proteinfaltung bei der Überproduktion oder eine unzureichende Löslichkeitsvermittlung durch die GST-Markierung zurückführen, wodurch das Fusionsprotein in aggregierter Form in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) eingelagert wurde [206]. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde von der Expression des GST-PKD2-Fusionsproteins in *E. coli* abgesehen und zu einem eukaryotischen Expressionssystem in Sf-21-Insektenzellen gewechselt, die mit Baculoviren infiziert wurden. Die Umsetzung dieser Strategie führte zur erfolgreichen Expression und Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins mit nachweisbarer Enzymaktivität (Abschnitt 4.1.3). Allerdings zeigte sich während der Entfernung der GST-Markierung, dass im Gegensatz zum kommerziellen GST-PKD2-Fusionsprotein keine effektive Proteolyse durch die *PreScission*-Protease induziert werden konnte. Möglicherweise liegt eine veränderte Konformation des gereinigten Fusionsproteins im *N*-terminalen Sequenzbereich vor, die mit einer eingeschränkten Zugänglichkeit für die Protease einhergeht. Um artifiziellen Resultaten aufgrund der potentiell fehlerhaften Konformation des gereinigten Proteins vorzubeugen, wurden alle nachfolgenden Interaktionsanalysen und Experimente zur strukturellen Charakterisierung mit dem kommerziellen GST-PKD2-Fusionsprotein durchgeführt.

5.2 Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern

Die Anreicherung und aminreaktive Vernetzung von PKD2-Interaktionspartnern erfolgte aus subzellulären Fraktionen von HeLa-Zellen, der zytosolischen Fraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion. Diese stellten das biologische Ausgangsmaterial für die Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern der PKD2 dar, deren Charakterisierung zur Aufklärung der Prozesse der Vesikelbildung für den basolateralen zellulären Transport beitragen kann.

5.2.1 Gewinnung subzellulärer Fraktionen aus HeLa-Zellen

Eine qualitative Proteomanalyse der subzellulären Fraktionen zeigte die Anreicherung spezifischer Proteine, was im Vergleich zur Nutzung von Gesamtzelllysaten für die PKD2-Protein-Interaktionsanalysen aus der zytosolischen Fraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion vorteilhaft war. Anhand der Identifizierung von Proteinen anderer Kompartimente in diesen Fraktionen (Abschnitt 4.3) wurden allerdings auch die Limitierungen der genutzten Methode zur subzellulären Fraktionierung deutlich [207, 208]. Diese beruhen auf der technisch nahezu unvermeidbaren unvollständigen Trennung einzelner Fraktionen und einer oftmals nicht auf ein einzelnes Kompartiment beschränkten Lokalisierung identifizierter Proteine. In quantitativer Hinsicht wurde die Anreicherung der Golgi-Apparat-Fraktion durch die Anreicherung der spezifischen Markerproteine β -1,4-Galaktosyltransferase 1 und Giantin im Vergleich zum Gesamtzelllysat validiert (Abschnitt 4.3).

5.2.2 Einbau von Photo-Methionin und Photo-Leucin in HeLa-Zellen

Zur zusätzlichen Identifizierung weiterer PKD2-Interaktionspartner – deren kovalente Fixierung möglicherweise von räumlich eng benachbarten Interaktionsflächen abhängt oder in Proteinregionen stattfindet, die eine der aminreaktiven Vernetzung komplementäre Reaktivität erfordern – wurde eine mit Photo-Methionin und Photo-Leucin markierte Proteinfraction verwendet. Diese wurde aus HeLa-Zellen gewonnen. Die quantitative Auswertung des Einbaus der Photo-Aminosäuren auf Basis der MS-Signalintensitäten modifizierter Peptide zeigte eine Gesamteinbaurrate von $\sim 23\%$ (Abschnitt 4.5.1). Dieser Wert liegt geringfügig unterhalb der Werte, die in vorangegangenen Studien erzielt wurden [85, 209]. Dabei ist zu erwähnen, dass in der vorliegenden Arbeit der proteomweite Einbau analysiert wurde, während vergleichbare Studien meist auf einzelne rekombinante Proteine abzielten. Die MS-Analyse überexprimierter rekombinanter Proteine erlaubt einen erleichterten analytischen Zugang aufgrund der erhöhten Proteinhäufigkeit. Daher erscheint die Gegenüberstellung zunächst nicht angemessen, aber die aus den modifizierten Peptiden abgeleitete Einbaurrate der Photo-Aminosäuren sollte einen geeigneten Vergleichswert darstellen, da sie den globalen Einbau in alle identifizierten Peptide bzw. Proteine einer Zelle widerspiegelt. Ein vergleichbares Experiment wurde in einer Studie zum Einbau der Photo-Aminosäuren von Suchanek *et al.* durchgeführt. Die Autoren nutzten einen

Radioaktivitätsassay zur Ableitung eines globalen Einbaus von Photo-Methionin von 0,7 % in eukaryotischen Zellen (COS7-Zelllinie) [82], im Vergleich zu ~ 1,3 % in dieser Arbeit. Die hier ermittelte Einbaurrate befindet sich somit in einer vergleichbaren Größenordnung. Die geringfügig höhere Einbaurrate in der vorliegenden Arbeit lässt sich vermutlich durch den begrenzten Umfang der Proteomanalyse erklären, während die Radioaktivitätsmessung eine globale Detektion erlaubt. Der Unterschied könnte aber auch auf dem anderen hier verwendeten eukaryotischen Zellsystem beruhen (HeLa-Zelllinie). Im Einklang mit einer vorangegangenen Studie zum Einbau der Photo-Aminosäuren [91] zeigte die Analyse der Einbauraten eine deutliche Präferenz für Photo-Methionin gegenüber Photo-Leucin. Somit korreliert das häufigere Vorkommen von Leucin im humanen Proteom offenbar nicht mit dem Einbau der photoaktivierbaren Variante. Die Normierung der Einbauraten auf die natürlich vorkommenden Anteile der Aminosäuren im humanen Proteom (2,13 % für Methionin und 9,97 % für Leucin) [210] resultierte in einer Verringerung der Unterschiede für die Analyse der modifizierten (Quotient M/L ~ 0,6) bzw. aller identifizierten Peptide (Quotient M/L ~ 0,7). Dennoch wurde im Vergleich zu allen Peptiden, die Methionin und/oder Leucin enthielten, weiterhin eine Präferenz des Einbaus von Photo-Methionin deutlich (Quotient M/L ~ 3,6).

Basierend auf den Experimenten zur Diazirin-Aktivierung von Photo-Methionin und Photo-Leucin (Abschnitt 4.5.2) wurde eine UV-A-Bestrahlungsdosis von 8000 mJ cm^{-2} für die photoinduzierte Vernetzung verwendet. Dieser Wert stellt einen Kompromiss zwischen einem möglichst hohen Aktivierungsgrad der Photo-Aminosäuren und einer praktikablen Bestrahlungsdauer dar. Zudem erwies er sich bereits in vorangegangenen Studien für die Aktivierung von Photo-Methionin und Photo-Leucin als geeignet [85, 96, 209].

5.2.3 Identifizierung von PKD2-Interaktionspartnern mittels Affinitätsanreicherung, Vernetzung und massenspektrometrischer Analyse

Die Kombination aus Affinitätsanreicherung, aminreaktiver bzw. photoinduzierter Vernetzung und nachfolgender MS-Analyse führte zur Identifizierung von insgesamt 39 signifikant angereicherten PKD2-Interaktionspartnern (Abschnitt 4.6). Neben der Identifizierung potentieller Protein-Bindungspartner in den GST-PKD2-Proben ohne Vernetzung sowie überlappender Identifizierungen aus den Kontrollen erfolgten in allen

vernetzten GST-PKD2-Proben Protein-Identifizierungen, die spezifisch auf die aminreaktive oder photoinduzierte Vernetzung zurückzuführen sind. Dabei wurden potentielle unspezifische Protein-Interaktionen durch vergleichende Analysen mit den Kontrollproben ausgeschlossen.

Die spezifische Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern der PKD2 unterstreicht die Effektivität der markierungsfreien Proteinquantifizierung und der statistischen Datenanalyse, die auf dem Hintergrund unregulierter identifizierter Proteine basierte [68]. Die verwendete Strategie wurde zudem durch die qualitativ sowie quantitativ reproduzierbare Anreicherung des Zielproteins PKD2 in allen Analysen validiert.

In den Experimenten mit der zytosolischen Fraktion und der Golgi-Apparat-Fraktion von HeLa-Zellen ermöglichte die aminreaktive Vernetzung eine erhebliche Steigerung der Anzahl identifizierter potentieller PKD2-Interaktionspartner (Abschnitt 4.4.1 und Abschnitt 4.4.2), während diese Steigerung bei den photoinduzierten Vernetzungen nicht der Fall war (Abschnitt 4.5.3). Jedoch zeigte deren quantitative Analyse interessanterweise eine signifikant verringerte Gesamt-LFQ-Intensität in den mittels UV-Bestrahlung vernetzten Proben (Abbildung 34). Darüber hinaus wurde in allen Analysen eine geringere Häufigkeit der vernetzungsspezifisch signifikant angereicherten Proteine im Vergleich zu hochabundanten Proteinen beobachtet. Auffällig ist die Anreicherung von Proteinen in der aminreaktiv vernetzten Golgi-Apparat-Fraktion, die mitunter im Kontext unspezifischer Bindungen an Affinitätsmatrizes erwähnt werden [72]. Dazu zählen Tubulin (TUBB8, TUBA8), Chaperone (DNAJA3, DNAJB11, CCT7) und ribosomale Proteine (RPS5). Diese Proteine sollten jedoch zunächst *bona fide* als Protein-Interaktionspartner von PKD2 klassifiziert werden, weil die durchgeführten Kontrollexperimente eine effektive Filterung potentieller unspezifischer Protein-Interaktionen ermöglichten. Interessanterweise wurde in den Experimenten mit der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion ausschließlich ohne UV-A-Bestrahlung eine Anreicherung ribosomaler Proteine und Chaperone beobachtet, die in den vernetzten Proben nicht auftrat (Abbildung 28). Somit ist denkbar, dass die spezifische Anreicherung und kovalente Fixierung von Protein-Interaktionspartnern möglicherweise mit der Verdrängung potentieller unspezifischer Wechselwirkungen einhergehen könnte. Die Ergebnisse lassen insgesamt auf die Robustheit der Vernetzungsexperimente gegenüber der Interferenz mit hochabundanten Proteinen schließen, deren Identifizierung als

Interaktionspartner häufig auf unspezifischen Wechselwirkungen beruht [70, 72]. Außerdem verdeutlichen sie das Potential der Affinitätsanreicherung in Kombination mit aminreaktiver oder photoinduzierter Vernetzung bezüglich der verbesserten Identifizierung niedrig abundanter oder transienter Protein-Interaktionspartner.

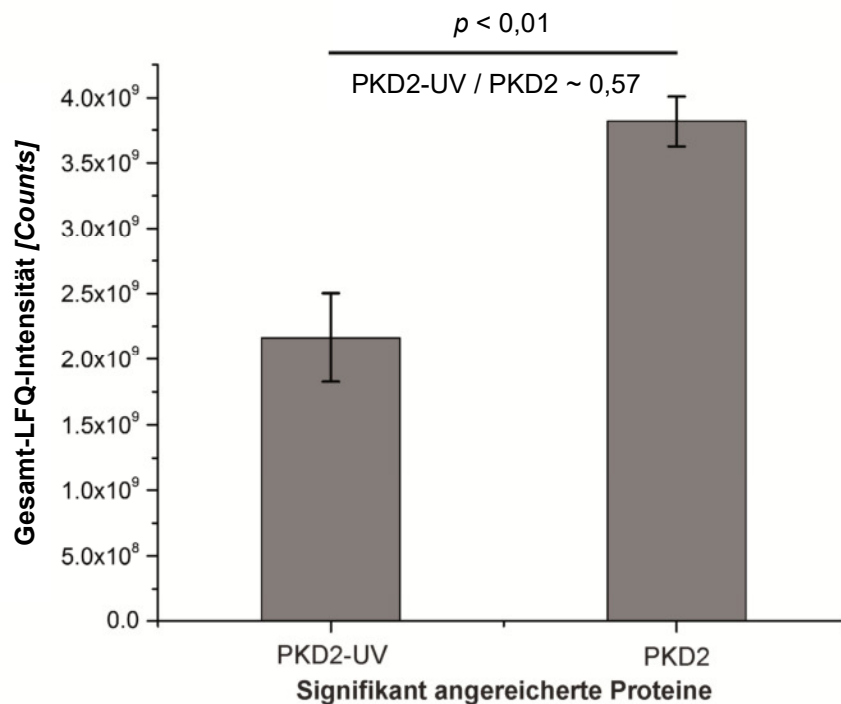


Abbildung 34: Markierungsfreie Quantifizierung signifikant angereicherter Proteine der photoinduzierten Vernetzung

Signalintensitäten signifikant angereicherter Proteine mit (PKD2-UV) oder ohne (PKD2) photoinduzierte Vernetzung wurden addiert und verglichen. Die t-Test-Analyse zeigte eine signifikant verringerte Gesamt-LFQ-Intensität in den mit UV-A-Licht bestrahlten Proben ($p \leq 0,01$). Die Analyse schließt Ergebnisse aus drei unabhängigen biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten ein. Die Intensitätswerte wurden jeweils auf die Anzahl identifizierter Proteine normiert.

Der Vergleich der aminreaktiven und photoinduzierten Vernetzungsexperimente zeigt sowohl überlappende als auch spezifische Identifizierungen potentieller PKD2-Interaktionspartner (Abschnitt 4.6). Hervorzuheben ist die unterschiedliche Anreicherung von Untereinheiten der Proteinkomplexe Arp2/3 und AP-2, welche an der dynamischen Assemblierung des Zytoskeletts bzw. der Regulation des zellulären Vesikeltransports beteiligt sind [211, 212]. Interessanterweise erfolgte für beide Proteinkomplexe die Anreicherung und Identifizierung jeweils einer Untereinheit sowohl nach aminreaktiver als auch photoinduzierter Vernetzung, nämlich ARPC4 (zytosolische Fraktion und photoaffinitätsmarkierte Proteinfraction) und AP2A2 (Golgi-Apparat-Fraktion und photoaffinitätsmarkierte Proteinfraction). Weitere Komponenten

der Proteinkomplexe wurden dagegen nur für eine der beiden Vernetzungsmethoden identifiziert. So erfolgte in den aminreaktiven Vernetzungsexperimenten die Identifizierung weiterer sechs Untereinheiten des sieben Untereinheiten umfassenden Arp2/3-Komplexes, während mit der photoinduzierten Vernetzung zwei weitere Untereinheiten des heterotetrameren AP-2-Komplexes identifiziert wurden. Aufgrund der komplementären Anreicherung von ARPC4 wäre denkbar, dass diese Untereinheit möglicherweise eine wichtige Rolle für die PKD2-Arp2/3-Interaktion spielt. Dabei nähern sich die Interaktionsflächen vermutlich sowohl für die aminreaktive als auch die photoinduzierte Vernetzung hinreichend an, während dies bei den übrigen Arp2/3-Untereinheiten für die photoinduzierte Vernetzung nicht der Fall sein könnte. Deren Identifizierung könnte nach diesem Modell der ARPC4-vermittelten Interaktion folglich auf einer Ko-Anreicherung und kovalenten Fixierung des gesamten Arp2/3-Proteinkomplexes durch die aminreaktive Vernetzung beruhen.

Im Gegensatz dazu konnte für den AP-2-Komplex neben der Identifizierung der AP2A2-Untereinheit keine weitere Fixierung von Untereinheiten durch die aminreaktive Vernetzung detektiert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der Zugänglichkeit des Proteinkomplexes für die aminreaktive Vernetzung, welche nur für die aus der Golgi-Apparat-Fraktion identifizierte AP2A2-Untereinheit gegeben sein könnte. Die zusätzliche Anreicherung der weiteren AP-2-Untereinheiten durch die photoinduzierte Vernetzung korreliert mit den komplementären Spezifitäten der verwendeten Vernetzungsreagenzien. Während der AP-2-Komplex membranassoziiert vorliegt und daher eventuell nur begrenzt einer aminreaktiven Vernetzung zugänglich ist, handelt es sich bei Arp2/3 um einen zytoplasmatischen Proteinkomplex, der sowohl für die aminreaktive als auch die photoinduzierte Vernetzung zugänglich sein kann.

Neben der räumlichen Nähe der Interaktionsflächen hängt die Vernetzung von Proteinen durch die Photo-Aminosäuren von deren effizientem Einbau in einzelne Proteine ab und steht somit in engem Zusammenhang zur Dynamik der Proteinbiosynthese. Interessanterweise weist die ARPC4-Untereinheit des Arp2/3-Komplexes im Vergleich zu den anderen Untereinheiten den höchsten Anteil an Methionin und Leucin auf. Daher ist für diese Untereinheit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des effizienten Einbaus von Photo-Methionin und Photo-Leucin denkbar.

Prinzipiell deutet die vernetzungsspezifische Anreicherung von PKD2-Interaktionspartnern aufgrund der vorgegebenen intermolekularen Distanzbeschränkungen auf eine kovalente Fixierung direkter, binärer PKD2-Protein-

Interaktionen hin. Wie für den Arp2/3-Komplex bereits ausgeführt, besteht allerdings auch die Möglichkeit der Fixierung von Mehrpunktinteraktionen. Die endgültige Bestätigung einer Protein-Protein-Interaktion besteht daher in der direkten massenspektrometrischen Identifizierung intermolekularer Vernetzungsprodukte zwischen Peptiden der PKD2 und eines Protein-Interaktionspartners. Es wurde allerdings deutlich, dass zum jetzigen Zeitpunkt die bioinformatische Auswertung aufgrund der hohen Probenkomplexität nicht praktikabel ist. Dies beruht insbesondere auf der ungerichteten Reaktivität der Photo-Aminosäuren, welche die Anzahl der möglichen Vernetzungsprodukte stark erhöht. Ein weiterer Einflussfaktor ist die bereits diskutierte oftmals niedrige Abundanz der angereicherten Interaktionspartner, welche die Identifizierung der direkt verknüpften Peptide zusätzlich erschwert [176]. Dennoch liefert die hier durchgeführte Anreicherung und Vernetzung potentieller PKD2-Interaktionspartner aus subzellulären Proteinfractionen wichtige Informationen zu Interaktionsnetzwerken der PKD2. Diese bilden die Grundlage für weiterführende Studien zur strukturellen Aufklärung einzelner PKD2-Interaktionen, beispielsweise mit rekombinanten Zielproteinen.

Auf die biologische Relevanz der identifizierten PKD2-Interaktionspartner soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

5.3 Charakterisierung der mittels Vernetzung identifizierten PKD2-Interaktionspartner

In Übereinstimmung mit der Vielfältigkeit PKD-abhängiger Signaltransduktion [8] zeigen die in dieser Arbeit identifizierten PKD2-Interaktionspartner eine breite funktionelle Heterogenität (Abbildung 35). Damit einhergehend, und vermutlich auch als Konsequenz der bereits diskutierten Limitierungen der subzellulären Fraktionierung, weisen die identifizierten PKD2-Bindungspartner multiple zelluläre Lokalisationen auf. Dies wiederum korreliert mit der stimulusabhängigen variablen Lokalisierung der PKD-Isoformen (Zytosol, Plasmamembran, Golgi-Apparat, Nukleus, Mitochondrium) [9]. Trotz der nachgewiesenen Anreicherung von Proteinen des Golgi-Apparates (Abschnitt 4.3), zeigte die GO-Analyse potentieller PKD2-Interaktionspartner mit β -1,4-Galaktosyltransferase 1 nur ein Protein aus der Golgi-Apparat-Fraktion, das dem Golgi-Apparat direkt zugeordnet ist. Die Mehrheit der aus den verschiedenen Fraktionen angereicherten Proteine ist im Zytosol oder dem Zellkern lokalisiert. Für die

zytoplasmatischen Protein-Interaktionspartner schließt dies jedoch nicht deren Beteiligung an PKD2-vermittelten Golgi-Apparat-Interaktionen aus.

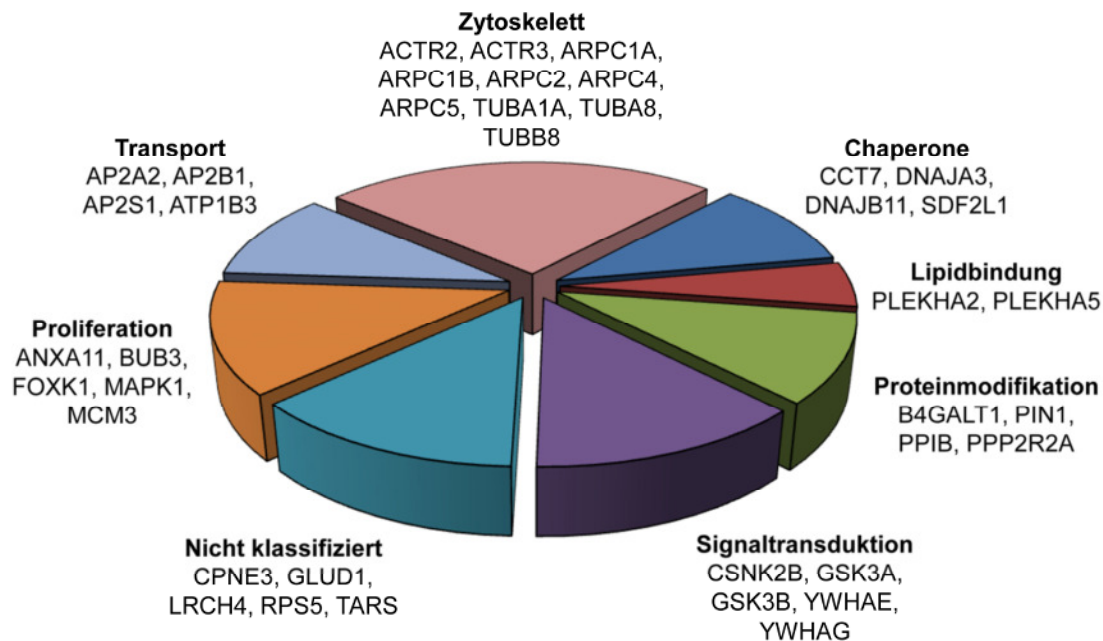


Abbildung 35: Klassifizierung vernetzungsspezifisch angereicherter Proteine

Die Zuordnung der identifizierten Proteine (Tabellen 7-9 bzw. Abschnitt 4.6) zu den jeweiligen Schlüsselwörtern erfolgte anhand von Informationen aus der UniProt-Datenbank.

5.3.1 Identifizierte PKD2-Interaktionspartner mit direkten oder abgeleiteten funktionellen Zusammenhängen zur PKD

Für einige der in dieser Arbeit identifizierten Protein-Interaktionspartner der PKD2 wurden in publizierten Studien bereits direkte funktionelle Zusammenhänge mit PKD-Isoformen aufgeklärt bzw. assoziierte PKD-Protein-Interaktionen beschrieben, die funktionelle Rückschlüsse ermöglichen.

5.3.1.1 Arp2/3-Proteinkomplex

Für den Arp2/3-Komplex wurden aus der zytosolischen Fraktion alle sieben Untereinheiten und aus der Golgi-Apparat-Fraktion sowie der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction jeweils eine Untereinheit (ACTR2 bzw. ARPC4) vernetzungsspezifisch angereichert. Der Komplex ist an der Steuerung der Aktin-Modifikation beteiligt, indem der Arp2/3-Regulator Cortactin durch die PKD phosphoryliert wird [7]. Die assoziierten Prozesse sind für die dynamische Assemblierung des Zytoskeletts sowie die zielgerichtete Zellmotilität durch Ausbildung von Lamellipodien von Bedeutung [213].

Eine Relevanz für die Vesikelbildung wird vermutet [214]. Zudem wird die Beteiligung von Cortactin an den Prozessen der Vesikelabspaltung am Golgi-Apparat diskutiert, indem Proteine, welche die lokale Aktin-Matrix modifizieren, reguliert werden [215, 216]. Cortactin kolokalisiert zur Induktion der Aktin-Polymerisierung mit dem Arp2/3-Komplex, während die Phosphorylierung durch PKD an Serin-298 von Cortactin ein Motiv zur Bindung von 14-3-3-Proteinen erzeugt [7]. Interessanterweise konnte Cortactin in der vorliegenden Arbeit weder durch konventionelle Anreicherungsexperimente, noch in Verbindung mit chemischer oder photoinduzierter Vernetzung angereichert werden. Die vernetzungsspezifische Anreicherung des Arp2/3-Komplexes deutet hingegen auf dessen direkte Interaktion mit der PKD2 hin. Die Kombination des regulierenden Einflusses von nukleationsfördernden Faktoren (NPF, *nucleation promoting factors*), wie Cortactin, und der Notwendigkeit einer Phosphorylierung zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes wurde bereits diskutiert [217]. Insofern lässt eine direkte Interaktion zwischen der PKD2 und dem Arp2/3-Komplex vermutlich auf eine komplexe PKD2-abhängige Regulationsmaschinerie schließen, welche die NPF-Rekrutierung und die Induktion der Nukleationsaktivität durch Phosphorylierung einschließt.

Nach momentanem Kenntnisstand sind bislang keine Informationen zu einem direkten funktionalen Zusammenhang zwischen PKD2 und dem Arp2/3-Komplex verfügbar, weshalb die vorliegende Arbeit erstmals Hinweise auf eine direkte Protein-Protein-Interaktion liefert. Interessanterweise wurde PKD2 kürzlich in einer noch unpublizierten, aber in der BioGRID-Datenbank hinterlegten, proteomweiten AP-MS-Interaktionsanalyse mit der ARPC5-Untereinheit des Arp2/3-Komplexes als Zielprotein identifiziert [218]. Zudem wurde in einer SILAC-Analyse des Phosphoproteoms zytotoxischer T-Zellen die signifikante Herabregulation der ARPC1B-Phosphorylierung in PKD2-defizienten Zellen detektiert [219]. Dabei ist bemerkenswert, dass ARPC1B in der vorliegenden Studie eines der am stärksten angereicherten Proteine bzw. die am stärksten angereicherte Untereinheit des Arp2/3-Komplexes aus der zytosolischen Fraktion darstellt (Tabelle 7 bzw. Abschnitt 4.6). Im Gegensatz zur bereits diskutierten potentiellen Interaktion der PKD2 über die ARPC4-Untereinheit sprächen diese Ergebnisse für ARPC1B als Schnittstelle der PKD2-Arp2/3-Interaktion. In einer weiteren quantitativen Phosphorylierungsstudie mittels SILAC konnte in HEK-293-Zellen keine Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von ARPC1B im Vergleich zwischen konstitutiv aktiver und Kinase-defizienter PKD

detektiert werden [220]. Da sich diese Studie jedoch auf die Isoform PKD1 bezieht, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der bereits diskutierten Studien eine isoformspezifische Interaktion der PKD2 mit dem Arp2/3-Komplex an.

5.3.1.2 14-3-3-Proteinfamilie

Mit 14-3-3-Protein γ (YWHAG) und 14-3-3-Protein ϵ (YWHAE) wurden zwei Vertreter der 14-3-3-Proteinfamilie als PKD2-Interaktionspartner identifiziert. Da 14-3-3-Proteine in eine Vielzahl zellulärer Prozesse eingebunden sind [221], erscheint neben der Regulation der Phosphorylierung von Cortactin auch eine Cortactin-unabhängige direkte Interaktion mit PKD2 plausibel. Am Golgi-Apparat wurde ein Multiproteinkomplex beschrieben, in dem YWHAG-Dimere als Adapter zwischen membranständiger PI4KIII β und der Maschinerie zur Abspaltung von Transportvesikeln fungieren [222]. Die Stabilisierung des Komplexes erfolgt durch die Phosphorylierung der PI4KIII β durch PKD, wodurch die Bindung von 14-3-3-Proteinen ermöglicht und die Lipidkinaseaktivität stimuliert wird [50].

5.3.1.3 Proteinphosphatase 2A

Dem stabilisierenden Effekt der PKD-PI4KIII β -Interaktion wirkt die Aktivität der Proteinphosphatase 2A (PP2A) entgegen [51]. Die α -Isoform der 55 kDa großen regulatorischen Untereinheit B der PP2A (PPP2R2A) wurde sowohl aus der zytosolischen Fraktion als auch der Golgi-Apparat-Fraktion als PKD2-Interaktionspartner identifiziert. Die beschriebenen Ergebnisse weisen auf direkte Interaktionen zwischen der PKD2 und 14-3-3-Proteinen sowie PP2A als regulatorischen Proteinkomplexen hin. Allerdings konnte PI4KIII β in keinem der analysierten Datensätze identifiziert werden, weshalb nicht unterschieden werden kann, ob die Anreicherung auf einer direkten funktionalen Beziehung zwischen der PKD2 und PI4KIII β beruht, oder ob weitere Interaktionen innerhalb der Signaltransduktion über 14-3-3-Proteine vermittelt werden. Zudem besteht die Möglichkeit einer Interaktion zwischen der PKD2 und PP2A, die von 14-3-3-Proteinen unabhängig ist.

5.3.1.4 Glykogensynthase-Kinase-Proteinfamilie

Die signifikante Anreicherung der Glykogensynthase-Kinase 3- β (GSK3B) aus der zytosolischen Fraktion deutet auf eine Interaktion mit der PKD2 hin. Diese Wechselwirkung wurde im Kontext der Morphogenese endothelialer Zellen bereits als

direkte Interaktion aufgeklärt [223]. Dabei vermittelt die PKD-abhängige Phosphorylierung der GSK3B eine negative Regulation der GSK3B-Aktivität, wodurch die Kollagen-1-abhängige Zellmorphogenese und Angiogenese vorangetrieben wird [224]. In der betreffenden Studie wurde allerdings nicht zwischen einzelnen PKD-Isoformen unterschieden. Insofern lassen die vorliegenden Ergebnisse auf die Beteiligung zumindest der PKD2 schließen.

5.3.1.5 Casein-Kinase-Proteinfamilie

Die vernetzungsspezifische Anreicherung der β -Untereinheit der Casein-Kinase 2 (CSNK2B) aus der zytosolischen Fraktion lässt auf eine direkte Interaktion zwischen der PKD2 und Casein-Kinase II (CK2) schließen. Ein Zusammenhang zwischen PKD und CK2 wurde bereits im Zusammenhang der Assemblierung des COP9-Signalsoms (CSN) beschrieben, das an der Neddylierung/Ubiquitinierung von Proteinen und somit an der proteasomalen Regulation der Proteinstabilität beteiligt ist [225]. Dabei werden PKD und CK2 durch CSN rekrutiert und regulieren durch die Phosphorylierung diverser Substrate die Ausbildung von Ubiquitin-Konjugaten. Darüber hinaus interagiert PKD2 mit Casein-Kinase 1 (CK1), einem weiteren Vertreter der CK-Familie [29]. Diese Interaktion beeinflusst über die Phosphorylierung durch CK1 die nukleäre Lokalisierung und Substratspezifität aktiver PKD2. Insofern ist für die CSN-vermittelte Regulation der Proteinstabilität eine Modulation der PKD2-Aktivität durch CK2 denkbar.

5.3.1.6 Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Für PKD1 wurde der aktivierende Einfluss auf die Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MAPK1 bzw. ERK2) durch Phosphorylierung beschrieben [4]. Da MAPK1 in der vorliegenden Arbeit als zytosolischer Interaktionspartner der PKD2 identifiziert wurde, ist außerdem von einer Beteiligung der PKD2-Isoform an zellproliferationsfördernden Prozessen auszugehen, die über den MAPK-Signalweg vermittelt werden.

Interessanterweise wurde zudem bereits ein Zusammenhang zwischen der MAPK-abhängigen Induktion der Mitose und der PKD-vermittelten Organisation des Golgi-Apparates hergestellt [226]. Die siRNA-induzierte Inaktivierung der PKD2 (und PKD1) führt in HeLa-Zellen zu einem Zellzyklusarrest und verhindert den Eintritt in die Mitose. Die Inhibition der PKD verursacht während der Mitose außerdem die

Blockierung der Aktivität der MAPK, was mit einer Inhibition der mitotischen Fragmentierung des Golgi-Apparates einhergeht [226].

Somit ergibt sich für PKD vermutlich eine wichtige Rolle an der Schnittstelle zwischen der Induktion proliferativer Prozesse und der damit verbundenen Modifikation der Golgi-Apparat-Membran in Vorbereitung der Zellteilung.

5.3.1.7 Tubuline

Die Identifizierung von Tubulinen als PKD2-Interaktionspartner erfolgte sowohl aus der Golgi-Apparat-Fraktion (TUBB8, TUBA8) als auch der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion (TUBA1A), interessanterweise jedoch nicht aus der zytosolischen Fraktion. Dabei gehörten die Tubuline zu den am stärksten angereicherten identifizierten Proteinen aus der Golgi-Apparat-Fraktion (Tabelle 8 bzw. Abschnitt 4.6). Diese Beobachtung korreliert mit der fundamentalen Bedeutung der Mikrotubuli für die strukturelle Integrität des Golgi-Apparates [227] und der Beobachtung, dass zu deren Erhaltung die Aktivität der PKD zur Vesikelbildung am Golgi-Apparat durch das mikrotubuläre Zytoskelett reguliert wird [228]. So konnte gezeigt werden, dass die Fragmentierung des Golgi-Apparates aufgrund der Inhibition der Polymerisation von Mikrotubuli durch die Behandlung mit Nocodazol [229] zu einer lokalen Aktivierung der PKD führt, wobei die zugrunde liegenden molekularen Zusammenhänge noch nicht vollständig verstanden sind. In dieser Hinsicht liefert die vorliegende Arbeit Hinweise auf eine mögliche direkte Interaktion zwischen Tubulinen und PKD2.

5.3.2 Identifizierte PKD2-Interaktionspartner mit bisher unbekanntem funktionellen Bezug zur PKD

Neben den bereits diskutierten Protein-Interaktionspartnern wurde in der vorliegenden Arbeit eine Reihe bisher noch unbeschriebener PKD2-Protein-Interaktionen identifiziert, die zur weiteren Aufklärung der Einbindung von PKD2 in verschiedene zelluläre Signalwege beitragen können.

5.3.2.1 Interaktionspartner mit Bedeutung für den zellulären Transport

Die Identifizierung von drei Untereinheiten des heterotetrameren Adapterproteinkomplexes 2 (AP-2) aus der Golgi-Apparat-Fraktion (AP2A2) und der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion (AP2A2, AP2B1, AP2S1) weisen auf dessen

Interaktion mit PKD2 hin. Der AP-2-Komplex ist über verschiedene Prozesse des Membrantransports an der intrazellulären Verteilung von Frachtproteinen über Transportvesikel beteiligt [230]. Als Bestandteil der Hüllproteine dieser Vesikel spielt AP-2 für die Clathrin-abhängige Endozytose extrazellulärer Proteine eine wichtige Rolle [231]. Dabei fungiert AP-2 als Adapter zwischen der Clathrin-Hülle der Transportvesikel und Lipiden bzw. Proteinen der Zielmembranen. Darüber hinaus wird eine Rolle von AP-2 bei dem durch ARF6 vermittelten Clathrin-unabhängigen post-endozytotischen Vesikeltransport diskutiert [232]. Neben der Aktivität zur Vesikelbildung am TGN deutet eine Interaktion zwischen AP-2 und der PKD2 möglicherweise auf deren funktionelle Beteiligung an der Bildung endozytotischer Transportvesikel hin.

Die Identifizierung einer Untereinheit der Natrium/Kalium-transportierenden ATPase (ATP1B3) aus der Golgi-Apparat-Fraktion lässt neben der Beteiligung der PKD2 am intrazellulären Proteintransport auch auf eine Rolle im Ionen-transport schließen. Interessanterweise wurde für die TGN-ständige Kupfer-transportierende ATPase 2 (ATP7B) bereits ein funktioneller Zusammenhang beschrieben, indem die durch PKD vermittelte Phosphorylierung von ATP7B deren Translokation reguliert [233].

5.3.2.2 Interaktionspartner mit Bedeutung für die zelluläre Signaltransduktion

Neben dem bereits diskutierten Zusammenhang mit 14-3-3-Protein γ (YWHAG) für die Vesikelbildung am Golgi-Apparat, deutet die zusätzliche vernetzungsspezifische Anreicherung des 14-3-3-Proteins ϵ (YWHAE) aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion auf regulatorische Protein-Interaktionen von PKD2 in der komplexen Phosphoserin- und Phosphothreonin-abhängigen Signaltransduktion über 14-3-3-Proteine hin. Dabei korreliert deren multiple Einbindung in zelluläre Prozesse [234] mit der heterogenen PKD-vermittelten Signaltransduktion.

Die Identifizierung der Glykogensynthase-Kinase 3- β (GSK3B) als direktem PKD2-Interaktionspartner wird durch die Anreicherung der Glykogensynthase-Kinase 3- α (GSK3A) aus der Golgi-Apparat-Fraktion ergänzt. Im Bezug zur Rolle der PKD2 am Golgi-Apparat wurde interessanterweise bereits eine Funktion Golgi-assoziiierter GSK3B zur Sortierung von Frachtproteinen am TGN beschrieben [235]. Die hier

erzielten Ergebnisse deuten insofern auch auf eine potentielle Beteiligung der GSK3A hin.

5.3.2.3 Interaktionspartner mit Bedeutung für die Zellproliferation

Mit den nukleären Proteinen Annexin A11 (ANXA11), Mitose-*Checkpoint*-Protein BUB3 (BUB3), *Forkhead-Box*-Protein K1 (FOXK1) und DNA-Replikations-*Licensing*-Faktor MCM3 (MCM3) wurde eine Reihe PKD2-Interaktionspartner identifiziert, die in zellproliferative Prozesse involviert sind und neben MAPK1 weitere entsprechende Protein-Interaktionen der PKD2 andeuten. Die identifizierten Protein-Interaktionspartner sind differentiell in den Zellzyklus eingebunden. Während FOXK1 als Transkriptionsfaktor agiert [236], ist MCM3 als Komponente des MCM-Helicase-Komplexes an der Regulation der DNA-Replikation beteiligt [237]. BUB3 fungiert als Stabilisator der Teilungsspindel und vermittelt die Regulation der Anlagerung von Mikrotubuli an die Kinetochore [238]. Die Aktivität von ANXA11 wird in der Terminalphase der Zellteilung induziert [239].

Im Hinblick auf mitotische Prozesse wurde bereits die Aktivierung und Lokalisierung der PKD in Assoziation mit Komponenten des Mitose-Apparates beschrieben [38]. Daher liefert die vernetzungsspezifische Anreicherung der hier identifizierten nukleären Proteine weitere Hinweise auf zugrunde liegende PKD2-Protein-Interaktionen.

5.3.2.4 Lipidbindende Interaktionspartner

Lipidbindende Proteine der PH-Domänen-enthaltenden Familie A (PLEKHA) wurden aus der zytosolischen Fraktion (PLEKHA2) und der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction (PLEKHA5) als PKD2-Interaktionspartner identifiziert. Diese Proteine binden stimulusabhängig spezifisch an Membranlipide und sind möglicherweise an der Rekrutierung anderer Proteine an die Plasmamembran beteiligt [240]. Die vorliegenden Ergebnisse könnten somit auf eine Rolle von PLEKHA2/5 bei der Membranrekrutierung der PKD2 hindeuten, beispielsweise bei ihrer PKC-vermittelten Aktivierung. Interessanterweise wurde PLEKHA2 in einer Analyse des Phosphoproteoms PKD2-defizienter zytotoxischer T-Zellen als potentielles Substrat der PKD2 identifiziert [219] und stellt eines der hier am stärksten angereicherten Proteine bzw. das am stärksten angereicherte Protein der zytosolischen Fraktion dar (Tabelle 7 bzw. Abschnitt 4.6).

5.3.2.5 Interaktionspartner der Chaperon-Proteinfamilie

Wie bereits diskutiert (Abschnitt 5.2.3), wurden Chaperone ausschließlich aus der Golgi-Apparat-Fraktion als PKD2-Interaktionspartner identifiziert. Dabei handelt es sich um die η -Untereinheit des T-Komplex-Proteins 1 (CCT7), das Mitglied 3 der Unterfamilie A DnaJ-homologer Proteine (DNAJA3), das Mitglied 11 der Unterfamilie B DnaJ-homologer Proteine (DNAJB11) und das aus Stromazellen stammendem Faktor 2-ähnliche Protein 1 (SDF2L1). Die Analyse der subzellulären Fraktionierung zeigte in der Golgi-Apparat-Fraktion parallel zur Anreicherung von Golgi-Apparat-Proteinen auch einen Anstieg der dem ER zugeordneten Proteine (Abschnitt 4.3), was mit einer Anreicherung von Chaperonen korrelieren könnte. Aufgrund der Effektivität der hier verwendeten Strategie zum Ausschluss potentieller unspezifischer Protein-Bindungspartner, ist dennoch von der Validität der angereicherten Chaperone als spezifische PKD2-Interaktionspartner auszugehen.

5.3.2.6 Proteinmodifizierende Interaktionspartner

Proteinmodifizierende PKD2-Interaktionspartner wurden aus der zytosolischen Fraktion (Peptidyl-prolyl-*cis-trans*-isomerase NIMA-interagierendes Protein 1, PIN1), der Golgi-Apparat-Fraktion (γ -1,4-Galaktosyltransferase 1, B4GALT1) und der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion (Peptidyl-prolyl-*cis-trans*-isomerase B, PPIB) identifiziert.

Mit PIN1 und PPIB erfolgte die Identifizierung zweier Vertreter der Peptidyl-prolyl-*cis-trans*-isomerasen. Insbesondere PIN1 ist an der Regulation spezifisch phosphorylierter Substrate [241] und der Modulation des MAPK-Signalwegs durch Desphosphorylierung von RAF1 beteiligt [242].

B4GALT1 repräsentiert ein dem Golgi-Apparat zugeordnetes Protein und ist ein Effektor der Proteinglykosylierung. Es wurde eine signalabhängige Translokation von B4GALT1 am TGN beschrieben, deren molekulare Grundlagen noch nicht aufgeklärt sind [243].

5.3.2.7 Nicht klassifizierte Interaktionspartner

Weitere hier identifizierte PKD2-Interaktionspartner umfassen Copin 3 (CPNE3), das Leucin-reiche Repetitionen und Calponin-Homologiedomäne enthaltende Protein 4 (LRCH4), das 40S-ribosomale Protein S5 (RPS5) und die Threonin-tRNA-Ligase

(TARS) aus der Golgi-Apparat-Fraktion sowie Glutamat-Dehydrogenase 1 (GLUD1) aus der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraktion.

CPNE3 ist ein Vertreter der Copin-Proteinfamilie, die an der Bildung sekretorischer Vesikel und am Membrantransport beteiligt ist [244]. Für LRCH4, einem bisher nur wenig untersuchten Protein, wurde eine Phosphorylierung während der Mitose beschrieben [31]. Für RPS5 wurde beobachtet, dass PKC-Isoformen in die phosphorylierungsabhängige Regulation der S6-Kinase ribosomaler Proteine eingebunden sind [245]. Bezüglich der Proteinfamilie der t-RNA-Synthetasen, mit TARS als identifiziertem Vertreter, zeigen Studien neben der Hauptfunktion bei der Proteinbiosynthese zunehmend nicht-kanonische Funktionen, beispielsweise in der Signaltransduktion [246]. Die Glutamat-Dehydrogenase GLUD1 ist am mitochondrialen Metabolismus beteiligt [247].

5.4 Strukturelle Charakterisierung der PKD2 mittels chemischer Vernetzung

Aufgrund der begrenzten Datenlage zur dreidimensionalen Proteinstruktur der PKD2 stellen Vernetzungsexperimente mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse eine vielversprechende Herangehensweise zur Ableitung räumlicher Strukturinformationen dar.

Die Auswertung der Vernetzungsexperimente der PKD2 mit BuUrBu und anschließender LC/MS/MS-Analyse führte zur Identifizierung von 34 intramolekularen Vernetzungsprodukten (Tabelle 10). Diese liefern erstmals Distanzinformationen zwischen einzelnen Aminosäurepositionen der PKD2, die zur Aufklärung der räumlichen Anordnung der Domänenstruktur dienen können. Auffallend ist dabei eine Häufung der identifizierten BuUrBu-Vernetzungsprodukte im *N*-terminalen Bereich der Kinasedomäne, ausgehend von der C1b-Domäne und der *N*-terminalen Region der PH-Domäne (Abbildung 33). Interessanterweise umfasst der vernetzte Bereich der katalytischen Domäne vorhergesagte Bereiche der vermuteten ATP-Bindung, während die Vernetzungen zur PH-Domäne auf deren räumliche Annäherung an die Kinasedomäne hindeuten. Somit spiegeln diese Ergebnisse möglicherweise eine Konformation der PKD2 wider, die mit der Regulation der Kinase-Autoinhibition durch die PH-Domäne einhergeht [18]. Auch die einzelne Vernetzungsstelle im zentralen Bereich der Kinasedomäne (K-705) ist in diesem Zusammenhang interessant. In räumlicher Nähe befinden sich die Aminosäuren, die zur Aufhebung der PH-vermittelten Autoinhibition phosphoryliert werden (S-706 / S-710) [21]. Daher lässt die Identifizierung von Vernetzungsprodukten auch hier auf eine Annäherung des regulatorischen Sequenzbereiches an die Kinasedomäne zur Steuerung der Autoinhibition schließen. Eine Annäherung der regulatorischen PKD2-Domänen wiederum korreliert mit der bevorzugten Vernetzung der C1a- und C1b-Domäne und der Kinasedomäne.

Die BuUrBu-Vernetzungsprodukte wurden vor allem in der zentralen Proteinregion gefunden, während in den *N*- und *C*-terminalen Sequenzbereichen der PKD2 keine Vernetzungen identifiziert werden konnten. Eine mögliche Erklärung wäre die Unzugänglichkeit dieser Regionen für das aminreaktive BuUrBu-Vernetzungsreagenz. Insofern könnte die Verwendung von Reagenzien unterschiedlicher Spezifitäten zur Ableitung weiterer Distanzinformationen beitragen. Bereits durchgeführte erste Experimente mit sulfhydryl-, carboxyl- und photoaktivierbaren Vernetzungsreagenzien

fürten zunächst zu keiner weiteren Identifizierung von Vernetzungsprodukten, könnten aber in Folgestudien mit systematischer Variation der experimentellen Bedingungen weiterverfolgt werden.

Neben den intramolekularen PKD2-Vernetzungen wurden vier intermolekulare Vernetzungen für das PKD2-Dimer identifiziert (Tabelle 10). Ein Vernetzungsprodukt wurde zwischen den C1b-Domänen von PKD2-Monomeren gefunden, während drei Vernetzungen die Kinasedomäne betreffen. Für endogene PKD2- und PKD3-Dimere wurde in HeLa-Zellen bereits eine regulierende Rolle für die Bildung und Abspaltung von Transportvesikeln am TGN diskutiert [46]. Allerdings sind die entsprechenden Struktur-Funktions-Untersuchungen noch wenig fortgeschritten, da die strukturelle Charakterisierung homo- und heteromultimerer PKD-Komplexe deren Grundlage darstellt. Im Sequenzbereich der kürzlich eingegrenzten Dimerisierungsdomäne der drei PKD-Isoformen *N*-terminal der C1a-Domäne [47] wurden für die PKD2 in der vorliegenden Arbeit keine Vernetzungsprodukte identifiziert. Dennoch unterstützt die intermolekulare Vernetzung der C1b-Domäne das Modell, dass die PKD2-Dimerisierung über den *N*-terminalen Sequenzbereich vermittelt wird. Darüber hinaus geht die Dimerisierung offenbar mit der räumlichen Annäherung der Kinasedomänen der PKD2-Monomere einher. Bei den vorliegenden Vernetzungsdaten der dimeren PKD2 ist zu erwähnen, dass diese ausschließlich auf der Identifizierung gleicher oder überlappender vernetzter Peptide basieren, da ansonsten keine Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularen Vernetzungsprodukten möglich ist. Dies erschwert die Identifizierung intermolekularer Vernetzungsprodukte erheblich. Zur Weiterführung der Analyse der PKD2-Dimerisierung mittels Vernetzungsexperimenten könnte daher die Verwendung äquimolarer Mischungen isotope markierter und unmarkierter rekombinanter PKD2 in Betracht gezogen werden (z. B. $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). Dies würde nach der Proteolyse des vernetzten Proteins und einer LC/MS/MS-Analyse die Unterscheidung intramolekularer Vernetzungen innerhalb eines Monomers (Duplett-Signale) und intermolekularer Vernetzungen zwischen zwei Monomeren (Triplett/Quadruplett-Signale) in den Massenspektren erlauben [248, 249].

Die hier abgeleiteten intramolekularen Distanzbeschränkungen wurden weiterführend zur Evaluierung eines PKD2-Strukturmodells verwendet, dessen Erstellung mittels der I-TASSER-Software erfolgte (Abbildung A9, Anhang). Der I-TASSER-Server ermöglicht die automatische sequenzbasierte Vorhersage von Proteinstrukturen anhand der Identifizierung struktureller Vorlagen aus der

Proteindatenbank (PDB) durch Faltungserkennung (*fold recognition / protein threading*) [250-252]. Die Bewertung der erstellten Modelle basiert dabei auf einem eigenen Gütemaß, dem *C-Score*. Dieser wird anhand der Qualität der Überlagerungen zwischen der Zielsequenz und den Vorlagen sowie der Konvergenz der Vielzahl simulierter Modelle berechnet und korreliert mit der mittleren quadratischen Abweichung (RMSD, *root-mean-square deviation*) bzw. dem dazugehörigen *TM-Score* zwischen zwei Strukturen.

Die Analyse der Distanzen der 28 identifizierten Vernetzungen zwischen Lysinen in der durch den Algorithmus am besten bewerteten PKD2-Struktur mit der PyMol-Software (Abbildung A10, Anhang) zeigte eine gleichmäßige Verteilung der $C\alpha$ - $C\alpha$ -Abstände zwischen 6 Å und 67 Å (Abbildung A11, Anhang). Wird für BuUrBu als maximale Vernetzungsdistanz zwischen Lysinen ein euklidischer $C\alpha$ - $C\alpha$ -Abstand von 35 Å zugrunde gelegt, wurden 13 Vernetzungen (~ 46 %) identifiziert, welche diese Distanzbeschränkung erfüllten, während 15 zugeordnete Distanzen (~ 54 %) diesen Maximalwert überstiegen. Die Ergebnisse erweisen sich als widersprüchlich gegenüber Studien zur Ableitung von Distanzbeschränkungen mittels Vernetzung und MS, in denen die Strukturen bekannter Proteine untersucht wurden. Diese Studien zeigten, dass aufgrund gegebener Flexibilität auch $C\alpha$ - $C\alpha$ -Abstände zwischen Lysinen oberhalb der reagenzspezifischen maximalen Vernetzungsdistanz auftreten, die Mehrheit der detektierten Abstände (> 80 %) aber deutlich unterhalb der Maximaldistanz liegt [89, 253]. So konnte beobachtet werden, dass für das aminreaktive Vernetzungsreagenz Disuccinimidylsuberat bzw. Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (DSS / BS³), dessen theoretischer maximaler $C\alpha$ - $C\alpha$ -Abstand ca. 24 Å beträgt, die meisten identifizierten Vernetzungsprodukte zwischen Lysinen einen Abstand zwischen den $C\alpha$ -Atomen von ca. 15 Å aufweisen [253]. Daher kann für das mittels der I-TASSER-Software automatisch erzeugte Proteinstrukturmodell vermutlich nicht von einem repräsentativen Modell der PKD2-Struktur ausgegangen werden. Unabhängig davon können die hier gewonnenen Distanzbeschränkungen in Folgeprojekten für die manuelle bioinformatische Erstellung von PKD2-Proteinstrukturmodellen bzw. deren Validierung genutzt werden.

5.5 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit etablierten analytischen Strategien ermöglichten die Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern der humanen PKD2 und sind wahrscheinlich generell für andere Protein-Protein-Interaktionsanalysen anwendbar. Für die PKD2-Interaktionsanalysen ergeben sich verschiedene Gesichtspunkte, die als Grundlagen für weiterführende Studien dienen können. Über die Identifizierung der PKD2-Interaktionspartner hinausgehend wäre der nächste Schritt die Aufklärung der Interaktionsregionen zwischen PKD2 und den Protein-Bindungspartnern. Zur vereinfachten Zuordnung der Vernetzungsprodukte könnten folgende Ansätze genutzt werden: i) die Verwendung eines CID-spaltbaren Vernetzungsreagenzes, zum Beispiel BuUrBu ii) die weitere Reduzierung der Probenkomplexität, zum Beispiel durch eine Trennung der subzellulären Fraktionen mittels Größenausschluss-Chromatographie, iii) die Anreicherung der Vernetzungsprodukte mittels Kationenaustausch- oder Größenausschluss-Chromatographie oder iv) der Einsatz trifunktioneller Vernetzungsreagenzien zur Affinitätsanreicherung von Vernetzungsprodukten. Die Anwendung dieser Methoden bzw. deren Kombination könnte in Verbindung mit hochauflösender Massenspektrometrie erlauben, Vernetzungsprodukte aus den komplexen Proben der Affinitätsanreicherung eindeutig zu identifizieren. Daneben können zur Charakterisierung der Interaktionsflächen in PKD2-Proteinkomplexen Vernetzungsexperimente mit rekombinanten Proteinen durchgeführt werden. Die so erhaltenen Distanzinformationen können zur Erstellung dreidimensionaler Strukturmodelle der PKD2-Proteinkomplexe und somit zur Ableitung von Struktur-Funktionsbeziehungen dienen. Weiterhin wäre eine Ergebnisvalidierung durch orthogonale Methoden der Protein-Protein-Interaktionsanalyse von Interesse, wie beispielsweise der analytischen Ultrazentrifugation oder dem Förster-Resonanzenergietransfer gereinigter PKD2-Proteinkomplexe. Zudem wäre die Analyse der identifizierten Protein-Protein-Interaktionen im zellulären System von Bedeutung, insbesondere in Bezug auf die PKD2-Interaktionspartner des zellulären Transports (Arp2/3 und AP-2). Die hier gewonnenen Erkenntnisse zur Struktur der PKD2 könnten durch komplementäre Informationen aus Vernetzungsexperimenten mit Reagenzien unterschiedlicher Spezifität erweitert und für die manuelle bioinformatische Erstellung eines Protein-Strukturmodells der PKD2 herangezogen werden. Dieses wäre die Grundlage für weiterführende strukturelle Analysen der hier identifizierten PKD2-Protein-Interaktionen.

Literaturverzeichnis

- [1] Van Lint, J., Rykx, A., Maeda, Y., Vantus, T., Sturany, S., Malhotra, V., Vandenheede, J. R., Seufferlein, T., *Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move*. Trends Cell Biol 2002, 12, 193-200.
- [2] Rozengurt, E., Rey, O., Waldron, R. T., *Protein kinase D signaling*. J Biol Chem 2005, 280, 13205-13208.
- [3] Olayioye, M. A., Barisic, S., Hausser, A., *Multi-level control of actin dynamics by protein kinase D*. Cell Signal 2013, 25, 1739-1747.
- [4] Hausser, A., Storz, P., Hubner, S., Braendlin, I., Martinez-Moya, M., Link, G., Johannes, F. J., *Protein kinase C mu selectively activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p42 pathway*. FEBS Lett 2001, 492, 39-44.
- [5] Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchell, M. P., Naven, T. J., Rozengurt, E., Schiavo, G., *Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D*. J Biol Chem 2000, 275, 40048-40056.
- [6] Eiseler, T., Schmid, M. A., Topbas, F., Pfizenmaier, K., Hausser, A., *PKD is recruited to sites of actin remodelling at the leading edge and negatively regulates cell migration*. FEBS Lett 2007, 581, 4279-4287.
- [7] Eiseler, T., Hausser, A., De Kimpe, L., Van Lint, J., Pfizenmaier, K., *Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cortactin*. J Biol Chem 2010, 285, 18672-18683.
- [8] Rozengurt, E., *Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease*. Physiology (Bethesda) 2011, 26, 23-33.
- [9] Rykx, A., De Kimpe, L., Mikhalap, S., Vantus, T., Seufferlein, T., Vandenheede, J. R., Van Lint, J., *Protein kinase D: a family affair*. FEBS Lett 2003, 546, 81-86.
- [10] Johannes, F. J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., Pfizenmaier, K., *PKC α is a novel, atypical member of the protein kinase C family*. J Biol Chem 1994, 269, 6140-6148.
- [11] Hayashi, A., Seki, N., Hattori, A., Kozuma, S., Saito, T., *PKC ν , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ* . Biochim Biophys Acta 1999, 1450, 99-106.
- [12] Sturany, S., Van Lint, J., Muller, F., Wilda, M., Hameister, H., Hocker, M., Brey, A., Gern, U., Vandenheede, J., Gress, T., Adler, G., Seufferlein, T., *Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases*. J Biol Chem 2001, 276, 3310-3318.
- [13] Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., *The protein kinase complement of the human genome*. Science 2002, 298, 1912-1934.
- [14] Iglesias, T., Rozengurt, E., *Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain*. J Biol Chem 1998, 273, 410-416.
- [15] Iglesias, T., Rozengurt, E., *Protein kinase D activation by deletion of its cysteine-rich motifs*. FEBS Lett 1999, 454, 53-56.

- [16] Iglesias, T., Matthews, S., Rozengurt, E., *Dissimilar phorbol ester binding properties of the individual cysteine-rich motifs of protein kinase D*. FEBS Lett 1998, 437, 19-23.
- [17] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E., *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Res 2000, 28, 235-242.
- [18] Waldron, R. T., Rozengurt, E., *Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain*. J Biol Chem 2003, 278, 154-163.
- [19] Iglesias, T., Waldron, R. T., Rozengurt, E., *Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation*. J Biol Chem 1998, 273, 27662-27667.
- [20] Waldron, R. T., Rey, O., Iglesias, T., Tugal, T., Cantrell, D., Rozengurt, E., *Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo*. J Biol Chem 2001, 276, 32606-32615.
- [21] Sturany, S., Van Lint, J., Gilchrist, A., Vandenheede, J. R., Adler, G., Seufferlein, T., *Mechanism of activation of protein kinase D2(PKD2) by the CCK(B)/gastrin receptor*. J Biol Chem 2002, 277, 29431-29436.
- [22] Matthews, S. A., Navarro, M. N., Sinclair, L. V., Emslie, E., Feijoo-Carnero, C., Cantrell, D. A., *Unique functions for protein kinase D1 and protein kinase D2 in mammalian cells*. Biochem J 2010, 432, 153-163.
- [23] Armacki, M., Joodi, G., Nimmagadda, S. C., de Kimpe, L., Pusapati, G. V., Vandoninck, S., Van Lint, J., Illing, A., Seufferlein, T., *A novel splice variant of calcium and integrin-binding protein 1 mediates protein kinase D2-stimulated tumour growth by regulating angiogenesis*. Oncogene 2014, 33, 1167-1180.
- [24] Van Lint, J., Ni, Y., Valius, M., Merlevede, W., Vandenheede, J. R., *Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of phospholipase Cgamma and protein kinase C*. J Biol Chem 1998, 273, 7038-7043.
- [25] Yuan, J., Slice, L., Walsh, J. H., Rozengurt, E., *Activation of protein kinase D by signaling through the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G(q)*. J Biol Chem 2000, 275, 2157-2164.
- [26] Matthews, S. A., Rozengurt, E., Cantrell, D., *Protein kinase D. A selective target for antigen receptors and a downstream target for protein kinase C in lymphocytes*. J Exp Med 2000, 191, 2075-2082.
- [27] Jamora, C., Yamanouye, N., Van Lint, J., Laudenslager, J., Vandenheede, J. R., Faulkner, D. J., Malhotra, V., *Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D*. Cell 1999, 98, 59-68.
- [28] Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F. J., Kufe, D., Datta, R., *Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents*. J Biol Chem 2000, 275, 18476-18481.
- [29] von Blume, J., Knippschild, U., Dequiedt, F., Giamas, G., Beck, A., Auer, A., Van Lint, J., Adler, G., Seufferlein, T., *Phosphorylation at Ser244 by CKI determines nuclear localization and substrate targeting of PKD2*. EMBO J 2007, 26, 4619-4633.
- [30] Mihailovic, T., Marx, M., Auer, A., Van Lint, J., Schmid, M., Weber, C., Seufferlein, T., *Protein kinase D2 mediates activation of nuclear factor kappaB by Bcr-Abl in Bcr-Abl+ human myeloid leukemia cells*. Cancer Res 2004, 64, 8939-8944.

- [31] Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J., Gygi, S. P., *A quantitative atlas of mitotic phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A 2008, *105*, 10762-10767.
- [32] Oppermann, F. S., Gnad, F., Olsen, J. V., Hornberger, R., Greff, Z., Keri, G., Mann, M., Daub, H., *Large-scale proteomics analysis of the human kinome*. Mol Cell Proteomics 2009, *8*, 1751-1764.
- [33] Zhou, H., Di Palma, S., Preisinger, C., Peng, M., Polat, A. N., Heck, A. J., Mohammed, S., *Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome*. J Proteome Res 2013, *12*, 260-271.
- [34] Matthews, S. A., Iglesias, T., Rozengurt, E., Cantrell, D., *Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD)*. EMBO J 2000, *19*, 2935-2945.
- [35] Rey, O., Young, S. H., Cantrell, D., Rozengurt, E., *Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C*. J Biol Chem 2001, *276*, 32616-32626.
- [36] Rey, O., Sinnett-Smith, J., Zhukova, E., Rozengurt, E., *Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G protein-coupled receptor activation*. J Biol Chem 2001, *276*, 49228-49235.
- [37] Auer, A., von Blume, J., Sturany, S., von Wichert, G., Van Lint, J., Vandenheede, J., Adler, G., Seufferlein, T., *Role of the regulatory domain of protein kinase D2 in phorbol ester binding, catalytic activity, and nucleocytoplasmic shuttling*. Mol Biol Cell 2005, *16*, 4375-4385.
- [38] Papazyan, R., Doche, M., Waldron, R. T., Rozengurt, E., Moyer, M. P., Rey, O., *Protein kinase D isozymes activation and localization during mitosis*. Exp Cell Res 2008, *314*, 3057-3068.
- [39] Prestle, J., Pfizenmaier, K., Brenner, J., Johannes, F. J., *Protein kinase C mu is located at the Golgi compartment*. J Cell Biol 1996, *134*, 1401-1410.
- [40] Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J., Malhotra, V., *Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network*. Cell 2001, *104*, 409-420.
- [41] Maeda, Y., Beznoussenko, G. V., Van Lint, J., Mironov, A. A., Malhotra, V., *Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain*. EMBO J 2001, *20*, 5982-5990.
- [42] Baron, C. L., Malhotra, V., *Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane*. Science 2002, *295*, 325-328.
- [43] Storz, P., *Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D*. Trends Cell Biol 2007, *17*, 13-18.
- [44] Storz, P., Doppler, H., Toker, A., *Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell Biol 2005, *25*, 8520-8530.
- [45] Yeaman, C., Ayala, M. I., Wright, J. R., Bard, F., Bossard, C., Ang, A., Maeda, Y., Seufferlein, T., Mellman, I., Nelson, W. J., Malhotra, V., *Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network*. Nat Cell Biol 2004, *6*, 106-112.
- [46] Bossard, C., Bresson, D., Polishchuk, R. S., Malhotra, V., *Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN*. J Cell Biol 2007, *179*, 1123-1131.
- [47] Aicart-Ramos, C., He, S. D., Land, M., Rubin, C. S., *A Novel Conserved Domain Mediates Dimerization of Protein Kinase D (PKD) Isoforms: DIMERIZATION IS ESSENTIAL FOR PKD-DEPENDENT REGULATION OF SECRETION AND INNATE IMMUNITY*. J Biol Chem 2016, *291*, 23516-23531.

- [48] Bankaitis, V. A., *Cell biology. Slick recruitment to the Golgi*. Science 2002, 295, 290-291.
- [49] Diaz Anel, A. M., Malhotra, V., *PKC ϵ is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus*. J Cell Biol 2005, 169, 83-91.
- [50] Hausser, A., Storz, P., Martens, S., Link, G., Toker, A., Pfizenmaier, K., *Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex*. Nat Cell Biol 2005, 7, 880-886.
- [51] Hausser, A., Link, G., Hoene, M., Russo, C., Selchow, O., Pfizenmaier, K., *Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III beta protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity*. J Cell Sci 2006, 119, 3613-3621.
- [52] Fugmann, T., Hausser, A., Schoffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., Olayioye, M. A., *Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein*. J Cell Biol 2007, 178, 15-22.
- [53] Nhek, S., Ngo, M., Yang, X., Ng, M. M., Field, S. J., Asara, J. M., Ridgway, N. D., Toker, A., *Regulation of oxysterol-binding protein Golgi localization through protein kinase D-mediated phosphorylation*. Mol Biol Cell 2010, 21, 2327-2337.
- [54] Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., Hanada, K., *Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT*. J Biol Chem 2006, 281, 30279-30288.
- [55] Pusapati, G. V., Krndija, D., Armacki, M., von Wichert, G., von Blume, J., Malhotra, V., Adler, G., Seufferlein, T., *Role of the second cysteine-rich domain and Pro275 in protein kinase D2 interaction with ADP-ribosylation factor 1, trans-Golgi network recruitment, and protein transport*. Mol Biol Cell 2010, 21, 1011-1022.
- [56] Eiseler, T., Wille, C., Koehler, C., Illing, A., Seufferlein, T., *Protein Kinase D2 Assembles a Multiprotein Complex at the Trans-Golgi Network to Regulate Matrix Metalloproteinase Secretion*. J Biol Chem 2016, 291, 462-477.
- [57] Braun, P., Gingras, A. C., *History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks*. Proteomics 2012, 12, 1478-1498.
- [58] Sanchez, C., Lachaize, C., Janody, F., Bellon, B., Roder, L., Euzenat, J., Rechenmann, F., Jacq, B., *Grasping at molecular interactions and genetic networks in Drosophila melanogaster using FlyNets, an Internet database*. Nucleic Acids Res 1999, 27, 89-94.
- [59] Stumpf, M. P., Thorne, T., de Silva, E., Stewart, R., An, H. J., Lappe, M., Wiuf, C., *Estimating the size of the human interactome*. Proc Natl Acad Sci U S A 2008, 105, 6959-6964.
- [60] De Las Rivas, J., Fontanillo, C., *Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks*. PLoS Comput Biol 2010, 6, e1000807.
- [61] Lage, K., *Protein-protein interactions and genetic diseases: The interactome*. Biochim Biophys Acta 2014, 1842, 1971-1980.
- [62] Ofran, Y., Rost, B., *Analysing six types of protein-protein interfaces*. J Mol Biol 2003, 325, 377-387.
- [63] Jones, S., Thornton, J. M., *Principles of protein-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A 1996, 93, 13-20.
- [64] Westermarck, J., Ivaska, J., Corthals, G. L., *Identification of protein interactions involved in cellular signaling*. Mol Cell Proteomics 2013, 12, 1752-1763.

- [65] Lottspeich, F., Engels, J. W., (Hrsg.), *Bioanalytik*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg 2012.
- [66] Moresco, J. J., Carvalho, P. C., Yates, J. R., 3rd, *Identifying components of protein complexes in C. elegans using co-immunoprecipitation and mass spectrometry*. J Proteomics 2010, 73, 2198-2204.
- [67] Huttlin, E. L., Ting, L., Bruckner, R. J., Gebreab, F., Gygi, M. P., Szpyt, J., Tam, S., Zarraga, G., Colby, G., Baltier, K., Dong, R., Guarani, V., Vaites, L. P., Ordureau, A., Rad, R., Erickson, B. K., Wuhr, M., Chick, J., Zhai, B., Kolippakkam, D., Mintseris, J., Obar, R. A., Harris, T., Artavanis-Tsakonas, S., Sowa, M. E., De Camilli, P., Paulo, J. A., Harper, J. W., Gygi, S. P., *The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome*. Cell 2015, 162, 425-440.
- [68] Keilhauer, E. C., Hein, M. Y., Mann, M., *Accurate protein complex retrieval by affinity enrichment mass spectrometry (AE-MS) rather than affinity purification mass spectrometry (AP-MS)*. Mol Cell Proteomics 2015, 14, 120-135.
- [69] Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Seraphin, B., *A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration*. Nat Biotechnol 1999, 17, 1030-1032.
- [70] LaCava, J., Molloy, K. R., Taylor, M. S., Domanski, M., Chait, B. T., Rout, M. P., *Affinity proteomics to study endogenous protein complexes: pointers, pitfalls, preferences and perspectives*. Biotechniques 2015, 58, 103-119.
- [71] Sinz, A., *The advancement of chemical cross-linking and mass spectrometry for structural proteomics: from single proteins to protein interaction networks*. Expert Rev Proteomics 2014, 11, 733-743.
- [72] Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F. M., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H., Lamond, A., *Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes*. J Cell Biol 2008, 183, 223-239.
- [73] Young, M. M., Tang, N., Hempel, J. C., Oshiro, C. M., Taylor, E. W., Kuntz, I. D., Gibson, B. W., Dollinger, G., *High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A 2000, 97, 5802-5806.
- [74] Chen, Z. A., Jawhari, A., Fischer, L., Buchen, C., Tahir, S., Kamenski, T., Rasmussen, M., Lariviere, L., Bukowski-Wills, J. C., Nilges, M., Cramer, P., Rappsilber, J., *Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry*. EMBO J 2010, 29, 717-726.
- [75] Kalisman, N., Adams, C. M., Levitt, M., *Subunit order of eukaryotic TRiC/CCT chaperonin by cross-linking, mass spectrometry, and combinatorial homology modeling*. Proc Natl Acad Sci U S A 2012, 109, 2884-2889.
- [76] Herzog, F., Kahraman, A., Boehringer, D., Mak, R., Bracher, A., Walzthoeni, T., Leitner, A., Beck, M., Hartl, F. U., Ban, N., Malmstrom, L., Aebersold, R., *Structural probing of a protein phosphatase 2A network by chemical cross-linking and mass spectrometry*. Science 2012, 337, 1348-1352.
- [77] Leitner, A., Joachimiak, L. A., Bracher, A., Monkemeyer, L., Walzthoeni, T., Chen, B., Pechmann, S., Holmes, S., Cong, Y., Ma, B., Ludtke, S., Chiu, W., Hartl, F. U., Aebersold, R., Frydman, J., *The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT*. Structure 2012, 20, 814-825.
- [78] Zorn, M., Ihling, C. H., Golbik, R., Sawers, R. G., Sinz, A., *Mapping cell envelope and periplasm protein interactions of Escherichia coli respiratory formate dehydrogenases by chemical cross-linking and mass spectrometry*. J Proteome Res 2014, 13, 5524-5535.

- [79] Sinz, A., *Investigation of protein-protein interactions in living cells by chemical crosslinking and mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem 2010, 397, 3433-3440.
- [80] Chavez, J. D., Weisbrod, C. R., Zheng, C., Eng, J. K., Bruce, J. E., *Protein interactions, post-translational modifications and topologies in human cells*. Mol Cell Proteomics 2013, 12, 1451-1467.
- [81] Subbotin, R. I., Chait, B. T., *A pipeline for determining protein-protein interactions and proximities in the cellular milieu*. Mol Cell Proteomics 2014, 13, 2824-2835.
- [82] Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C., *Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells*. Nat Methods 2005, 2, 261-267.
- [83] Ryu, Y., Schultz, P. G., *Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in Escherichia coli*. Nat Methods 2006, 3, 263-265.
- [84] Hetu, P. O., Ouellet, M., Falgoutyret, J. P., Ramachandran, C., Robichaud, J., Zamboni, R., Riendeau, D., *Photo-crosslinking of proteins in intact cells reveals a dimeric structure of cyclooxygenase-2 and an inhibitor-sensitive oligomeric structure of microsomal prostaglandin E2 synthase-1*. Arch Biochem Biophys 2008, 477, 155-162.
- [85] Piotrowski, C., Ihling, C. H., 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 2015, 89, 121-127.
- [86] Jecmen, T., Ptackova, R., Cerna, V., Dracinska, H., Hodek, P., Stiborova, M., Hudecek, J., Sulc, M., *Photo-initiated crosslinking extends mapping of the protein-protein interface to membrane-embedded portions of cytochromes P450 2B4 and b(5)*. Methods 2015, 89, 128-137.
- [87] Sinz, A., *Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes*. J Mass Spectrom 2003, 38, 1225-1237.
- [88] Mouradov, D., King, G., Ross, I. L., Forwood, J. K., Hume, D. A., Sinz, A., Martin, J. L., Kobe, B., Huber, T., *Protein structure determination using a combination of cross-linking, mass spectrometry, and molecular modeling*. Methods Mol Biol 2008, 426, 459-474.
- [89] Kahraman, A., Herzog, F., Leitner, A., Rosenberger, G., Aebersold, R., Malmstrom, L., *Cross-link guided molecular modeling with ROSETTA*. PLoS One 2013, 8, e73411.
- [90] Hofmann, T., Fischer, A. W., Meiler, J., Kalkhof, S., *Protein structure prediction guided by crosslinking restraints--A systematic evaluation of the impact of the crosslinking spacer length*. Methods 2015, 89, 79-90.
- [91] Lössl, P., Sinz, A., *Combining Amine-Reactive Cross-Linkers and Photo-Reactive Amino Acids for 3D-Structure Analysis of Proteins and Protein Complexes*. Methods Mol Biol 2016, 1394, 109-127.
- [92] Hermanson, G. T., *Bioconjugate techniques*, Academic Press, San Diego 1996.
- [93] Kalkhof, S., Sinz, A., *Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters*. Anal Bioanal Chem 2008, 392, 305-312.
- [94] Madler, S., Bich, C., Touboul, D., Zenobi, R., *Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities*. J Mass Spectrom 2009, 44, 694-706.
- [95] Sinz, A., *Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions*. Mass Spectrom Rev 2006, 25, 663-682.
- [96] Kölbl, K., Ihling, C. H., Sinz, A., *Analysis of peptide secondary structures by photoactivatable amino acid analogues*. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51, 12602-12605.

- [97] Gross, J. H., *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*, Springer Spektrum, Heidelberg 2013.
- [98] Karas, M., Bachmann, D., Hillenkamp, F., *Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet-Laser Desorption Mass-Spectrometry of Organic-Molecules*. *Anal Chem* 1985, *57*, 2935-2939.
- [99] Karas, M., Hillenkamp, F., *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. *Anal Chem* 1988, *60*, 2299-2301.
- [100] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T., *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Rapid Commun in Mass Spectrom* 1988, *2*, 151-153.
- [101] Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S., Whitehouse, C., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. *Science* 1989, *246*, 64-71.
- [102] Cole, R. B. (Hrsg.), *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, Second Edition*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2010.
- [103] Horning, E. C., Carroll, D. I., Dzidic, I., Haegele, K. D., Horning, M. G., Stillwell, R. N., *Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream*. *J Chromatogr Sci* 1974, *12*, 725-729.
- [104] Abian, J., *The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry* 1999, *34*, 157-168.
- [105] Horning, E. C., Horning, M. G., Carroll, D. I., Dzidic, I., Stillwell, R. N., *New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure*. *Anal Chem* 1973, *45*, 936-943.
- [106] Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. B., *Molecular Beams of Macroions*. *J Chem Phys* 1968, *49*, 2240-2249.
- [107] Yamashita, M., Fenn, J. B., *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*. *Journal Phys Chem* 1984, *88*, 4451-4459.
- [108] Fenn, J. B., *Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture)*. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003, *42*, 3871-3894.
- [109] Simons, D. S., Colby, B. N., Evans, C. A., *Electrohydrodynamic ionization mass spectrometry - the ionization of liquid glycerol and non-volatile organic solutes*. *Int J Mass Spectrom* 1974, *15*, 291-302.
- [110] Zeleny, J., *Instability of Electrified Liquid Surfaces*. *Physical Review* 1917, *10*, 1-6.
- [111] Taylor, G., *Disintegration of Water Drops in an Electric Field*. *Proc R Soc A* 1964, *280*, 383-397.
- [112] Wilm, M. S., Mann, M., *Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?* *Int J Mass Spectrom* 1994, *136*, 167-180.
- [113] Rayleigh, L., *XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*. *Philos Mag* 1882, *14*, 184-186.
- [114] Gomez, A., Tang, K., *Charge and fission of droplets in electrostatic sprays*. *Phys Fluids* 1994, *6*, 404-414.

- [115] Duft, D., Achtzehn, T., Muller, R., Huber, B. A., Leisner, T., *Coulomb fission: Rayleigh jets from levitated microdroplets*. Nature 2003, 421, 128.
- [116] Kebarle, P., Tang, L., *From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry*. Anal Chem 2008, 65, 972A-986A.
- [117] Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A. D., Vahidi, S., *Unraveling the mechanism of electrospray ionization*. Anal Chem 2013, 85, 2-9.
- [118] Iribarne, J. V., Thomson, B. A., *On the evaporation of small ions from charged droplets*. J Chem Phys 1976, 64, 2287-2294.
- [119] Thomson, B. A., Iribarne, J. V., *Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure*. J Chem Phys 1979, 71, 4451-4463.
- [120] Chowdhury, S. K., Katta, V., Chait, B. T., *Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry*. J Am Chem Soc 1990, 112, 9012-9013.
- [121] Wilm, M., Mann, M., *Analytical properties of the nanoelectrospray ion source*. Anal Chem 1996, 68, 1-8.
- [122] Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M., *Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry*. Nature 1996, 379, 466-469.
- [123] Senko, M. W., Remes, P. M., Canterbury, J. D., Mathur, R., Song, Q., Eliuk, S. M., Mullen, C., Earley, L., Hardman, M., Blethrow, J. D., Bui, H., Specht, A., Lange, O., Denisov, E., Makarov, A., Horning, S., Zabrouskov, V., *Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates*. Anal Chem 2013, 85, 11710-11714.
- [124] Eliuk, S., Makarov, A., *Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif) 2015, 8, 61-80.
- [125] Douglas, D. J., *Linear quadrupoles in mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev 2009, 28, 937-960.
- [126] March, R. E., *Quadrupole ion traps*. Mass Spectrom Rev 2009, 28, 961-989.
- [127] Glish, G. L., Burinsky, D. J., *Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom 2008, 19, 161-172.
- [128] McLafferty, F. W., Bente, P. F., Kornfeld, R., Tsai, S.-C., Howe, I., *Collisional activation spectra of organic ions*. J Mass Spectrom 1995, 30, 797-806.
- [129] McAlister, G. C., Phanstiel, D., Good, D. M., Berggren, W. T., Coon, J. J., *Implementation of electron-transfer dissociation on a hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer*. Anal Chem 2007, 79, 3525-3534.
- [130] Olsen, J. V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S., Mann, M., *Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis*. Nat Methods 2007, 4, 709-712.
- [131] Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom 2005, 40, 430-443.
- [132] Scigelova, M., Makarov, A., *Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics*. Proteomics 2006, 6 Suppl 2, 16-21.
- [133] Perry, R. H., Cooks, R. G., Noll, R. J., *Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications*. Mass Spectrom Rev 2008, 27, 661-699.

- [134] Olsen, J. V., de Godoy, L. M., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., Mann, M., *Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap*. Mol Cell Proteomics 2005, 4, 2010-2021.
- [135] Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Anal Chem 2000, 72, 1156-1162.
- [136] Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., *Performance evaluation of a high-field Orbitrap mass analyzer*. J Am Soc Mass Spectrom 2009, 20, 1391-1396.
- [137] Schwartz, J. C., Senko, M. W., Syka, J. E., *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. J Am Soc Mass Spectrom 2002, 13, 659-669.
- [138] Hager, J. W., *A new linear ion trap mass spectrometer*. Rapid Commun Mass Spectrom 2002, 16, 512-526.
- [139] Olsen, J. V., Schwartz, J. C., Griep-Raming, J., Nielsen, M. L., Damoc, E., Denisov, E., Lange, O., Remes, P., Taylor, D., Splendore, M., Wouters, E. R., Senko, M., Makarov, A., Mann, M., Horning, S., *A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed*. Mol Cell Proteomics 2009, 8, 2759-2769.
- [140] Aebersold, R., Mann, M., *Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function*. Nature 2016, 537, 347-355.
- [141] Catherman, A. D., Skinner, O. S., Kelleher, N. L., *Top Down proteomics: facts and perspectives*. Biochem Biophys Res Commun 2014, 445, 683-693.
- [142] Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., Yates, J. R., 3rd, *Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics*. Chem Rev 2013, 113, 2343-2394.
- [143] Pappin, D. J., Hojrup, P., Bleasby, A. J., *Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting*. Curr Biol 1993, 3, 327-332.
- [144] Aebersold, R., Goodlett, D. R., *Mass spectrometry in proteomics*. Chem Rev 2001, 101, 269-295.
- [145] Mann, M., Wilm, M., *Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags*. Anal Chem 1994, 66, 4390-4399.
- [146] Roepstorff, P., Fohlman, J., *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biomed Mass Spectrom 1984, 11, 601.
- [147] Biemann, K., *Mass spectrometry of peptides and proteins*. Annu Rev Biochem 1992, 61, 977-1010.
- [148] Mitchell Wells, J., McLuckey, S. A., *Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins*. Methods Enzymol 2005, 402, 148-185.
- [149] Syka, J. E., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004, 101, 9528-9533.
- [150] Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. S., *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis 1999, 20, 3551-3567.
- [151] Eng, J. K., McCormack, A. L., Yates, J. R., *An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database*. J Am Soc Mass Spectrom 1994, 5, 976-989.

- [152] Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., Mann, M., *Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment*. J Proteome Res 2011, 10, 1794-1805.
- [153] The UniProt Consortium, *UniProt: the universal protein knowledgebase*. Nucleic Acids Res 2017, 45, D158-D169.
- [154] Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M., Kuster, B., *Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present*. Anal Bioanal Chem 2012, 404, 939-965.
- [155] O'Farrell, P. H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem 1975, 250, 4007-4021.
- [156] Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B., *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*. Anal Bioanal Chem 2007, 389, 1017-1031.
- [157] Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis 2000, 21, 1037-1053.
- [158] Ünlü, M., Morgan, M. E., Minden, J. S., *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. Electrophoresis 1997, 18, 2071-2077.
- [159] Fournier, M. L., Gilmore, J. M., Martin-Brown, S. A., Washburn, M. P., *Multidimensional separations-based shotgun proteomics*. Chem Rev 2007, 107, 3654-3686.
- [160] Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., Gygi, S. P., *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100, 6940-6945.
- [161] Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M., *Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics*. Mol Cell Proteomics 2002, 1, 376-386.
- [162] Ibarrola, N., Kalume, D. E., Gronborg, M., Iwahori, A., Pandey, A., *A proteomic approach for quantitation of phosphorylation using stable isotope labeling in cell culture*. Anal Chem 2003, 75, 6043-6049.
- [163] Olsen, J. V., Ong, S. E., Mann, M., *Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues*. Mol Cell Proteomics 2004, 3, 608-614.
- [164] Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. Nat Biotech 1999, 17, 994-999.
- [165] Schmidt, A., Kellermann, J., Lottspeich, F., *A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels*. Proteomics 2005, 5, 4-15.
- [166] Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E., Warscheid, B., *Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research*. Proteomics 2007, 7, 340-350.
- [167] Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Hamon, C., *Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS*. Anal Chem 2003, 75, 1895-1904.
- [168] Liu, H., Sadygov, R. G., Yates, J. R., 3rd, *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics*. Anal Chem 2004, 76, 4193-4201.

- [169] Chelius, D., Bondarenko, P. V., *Quantitative Profiling of Proteins in Complex Mixtures Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry*. J Proteome Res 2002, 1, 317-323.
- [170] Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M., *Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ*. Mol Cell Proteomics 2014, 13, 2513-2526.
- [171] Cox, J., Mann, M., *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol 2008, 26, 1367-1372.
- [172] Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J., *The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data*. Nat Methods 2016, 13, 731-740.
- [173] Schilling, B., Row, R. H., Gibson, B. W., Guo, X., Young, M. M., *MS2Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides*. J Am Soc Mass Spectrom 2003, 14, 834-850.
- [174] Götze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., Bosse, K., Ihling, C. H., Krauth, F., Fritzsche, R., Kuhn, U., Sinz, A., *StavroX--a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies*. J Am Soc Mass Spectrom 2012, 23, 76-87.
- [175] Götze, M., Pettelkau, J., Fritzsche, R., Ihling, C. H., Schafer, M., Sinz, A., *Automated assignment of MS/MS cleavable cross-links in protein 3D-structure analysis*. J Am Soc Mass Spectrom 2015, 26, 83-97.
- [176] Rinner, O., Seebacher, J., Walzthoeni, T., Mueller, L. N., Beck, M., Schmidt, A., Mueller, M., Aebersold, R., *Identification of cross-linked peptides from large sequence databases*. Nat Methods 2008, 5, 315-318.
- [177] Liu, F., Rijkers, D. T., Post, H., Heck, A. J., *Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry*. Nat Methods 2015, 12, 1179-1184.
- [178] Yang, B., Wu, Y. J., Zhu, M., Fan, S. B., Lin, J., Zhang, K., Li, S., Chi, H., Li, Y. X., Chen, H. F., Luo, S. K., Ding, Y. H., Wang, L. H., Hao, Z., Xiu, L. Y., Chen, S., Ye, K., He, S. M., Dong, M. Q., *Identification of cross-linked peptides from complex samples*. Nat Methods 2012, 9, 904-906.
- [179] Sinz, A., Kalkhof, S., Ihling, C., *Mapping protein interfaces by a trifunctional cross-linker combined with MALDI-TOF and ESI-FTICR mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom 2005, 16, 1921-1931.
- [180] Schmidt, R., Sinz, A., *Improved single-step enrichment methods of cross-linked products for protein structure analysis and protein interaction mapping*. Anal Bioanal Chem 2017, 409, 2393-2400.
- [181] Leitner, A., Reischl, R., Walzthoeni, T., Herzog, F., Bohn, S., Forster, F., Aebersold, R., *Expanding the chemical cross-linking toolbox by the use of multiple proteases and enrichment by size exclusion chromatography*. Mol Cell Proteomics 2012, 11, M111 014126.
- [182] Müller, D. R., Schindler, P., Towbin, H., Wirth, U., Voshol, H., Hoving, S., Steinmetz, M. O., *Isotope-tagged cross-linking reagents. A new tool in mass spectrometric protein interaction analysis*. Anal Chem 2001, 73, 1927-1934.
- [183] Pearson, K. M., Pannell, L. K., Fales, H. M., *Intramolecular cross-linking experiments on cytochrome c and ribonuclease A using an isotope multiplet method*. Rapid Commun Mass Spectrom 2002, 16, 149-159.

- [184] Kalkhof, S., Ihling, C., Mechtler, K., Sinz, A., *Chemical cross-linking and high-performance Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for protein interaction analysis: application to a calmodulin/target peptide complex*. *Anal Chem* 2005, 77, 495-503.
- [185] Sinz, A., *Divide and conquer: cleavable cross-linkers to study protein conformation and protein-protein interactions*. *Anal Bioanal Chem* 2017, 409, 33-44.
- [186] Müller, M. Q., Dreiocker, F., Ihling, C. H., Schäfer, M., Sinz, A., *Cleavable cross-linker for protein structure analysis: reliable identification of cross-linking products by tandem MS*. *Anal Chem* 2010, 82, 6958-6968.
- [187] Arlt, C., Götze, M., Ihling, C. H., Hage, C., Schäfer, M., Sinz, A., *Integrated Workflow for Structural Proteomics Studies Based on Cross-Linking/Mass Spectrometry with an MS/MS Cleavable Cross-Linker*. *Anal Chem* 2016, 88, 7930-7937.
- [188] Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A., Rothman, J. E., *Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine*. *Cell* 1984, 39, 405-416.
- [189] 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* 1976, 72, 248-254.
- [190] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem* 1985, 150, 76-85.
- [191] Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- [192] Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P. G., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. *Electrophoresis* 2004, 25, 1327-1333.
- [193] Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., Mann, M., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. *Nat Protoc* 2006, 1, 2856-2860.
- [194] Swaney, D. L., McAlister, G. C., Coon, J. J., *Decision tree-driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics*. *Nat Methods* 2008, 5, 959-964.
- [195] Kall, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S., MacCoss, M. J., *Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets*. *Nat Methods* 2007, 4, 923-925.
- [196] Huntley, R. P., Sawford, T., Mutowo-Meullenet, P., Shypitsyna, A., Bonilla, C., Martin, M. J., O'Donovan, C., *The GOA database: gene Ontology annotation updates for 2015*. *Nucleic Acids Res* 2015, 43, D1057-1063.
- [197] Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C. J., Shu, S., Marshall, B., Lewis, S., Ami, G. O. H., Web Presence Working, G., *AmiGO: online access to ontology and annotation data*. *Bioinformatics* 2009, 25, 288-289.
- [198] Oliveros, J. C., *Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams*. 2007-2015.
- [199] Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks*. *Genome Res* 2003, 13, 2498-2504.
- [200] Stark, C., Breitkreutz, B. J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., Tyers, M., *BioGRID: a general repository for interaction datasets*. *Nucleic Acids Res* 2006, 34, D535-539.

- [201] Grimm, M., Zimniak, T., Kahraman, A., Herzog, F., *xVis: a web server for the schematic visualization and interpretation of crosslink-derived spatial restraints*. Nucleic Acids Res 2015, 43, W362-369.
- [202] Vizcaino, J. A., Deutsch, E. W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Rios, D., Dianes, J. A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P. A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., Gatto, L., Campos, A., Chalkley, R. J., Kraus, H. J., Albar, J. P., Martinez-Bartolome, S., Apweiler, R., Omenn, G. S., Martens, L., Jones, A. R., Hermjakob, H., *ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination*. Nat Biotechnol 2014, 32, 223-226.
- [203] Vizcaino, J. A., Csordas, A., del-Toro, N., Dianes, J. A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q. W., Wang, R., Hermjakob, H., *2016 update of the PRIDE database and its related tools*. Nucleic Acids Res 2016, 44, D447-456.
- [204] Häupl, B., Ihling, C. H., Sinz, A., *Protein Interaction Network of Human Protein Kinase D2 Revealed by Chemical Cross-Linking/Mass Spectrometry*. J Proteome Res 2016, 15, 3686-3699.
- [205] Häupl, B., Ihling, C. H., Sinz, A., *Combining affinity enrichment, cross-linking with photo-amino acids, and mass spectrometry for probing protein kinase D2 interactions*. Proteomics 2017.
- [206] Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A., *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*. Front Microbiol 2014, 5, 172.
- [207] Andersen, J. S., Mann, M., *Organellar proteomics: turning inventories into insights*. EMBO Rep 2006, 7, 874-879.
- [208] Drissi, R., Dubois, M. L., Boisvert, F. M., *Proteomics methods for subcellular proteome analysis*. FEBS J 2013, 280, 5626-5634.
- [209] Lössl, P., Kölbl, K., Tänzler, D., Nannemann, D., Ihling, C. H., Keller, M. V., Schneider, M., Zaucke, F., Meiler, J., Sinz, A., *Analysis of nidogen-1/laminin gamma1 interaction by cross-linking, mass spectrometry, and computational modeling reveals multiple binding modes*. PLoS One 2014, 9, e112886.
- [210] Kozłowski, L. P., *Proteome-pI: proteome isoelectric point database*. Nucleic Acids Res 2017, 45, D1112-D1116.
- [211] May, R. C., *The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton*. Cell Mol Life Sci 2001, 58, 1607-1626.
- [212] Traub, L. M., *Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection*. J Cell Biol 2003, 163, 203-208.
- [213] Weed, S. A., Karginov, A. V., Schafer, D. A., Weaver, A. M., Kinley, A. W., Cooper, J. A., Parsons, J. T., *Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex*. J Cell Biol 2000, 151, 29-40.
- [214] Goley, E. D., Welch, M. D., *The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age*. Nat Rev Mol Cell Biol 2006, 7, 713-726.
- [215] Cao, H., Weller, S., Orth, J. D., Chen, J., Huang, B., Chen, J. L., Stamnes, M., McNiven, M. A., *Actin and Arp1-dependent recruitment of a cortactin-dynamamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport*. Nat Cell Biol 2005, 7, 483-492.
- [216] Clark, E. S., Whigham, A. S., Yarbrough, W. G., Weaver, A. M., *Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia*. Cancer Res 2007, 67, 4227-4235.

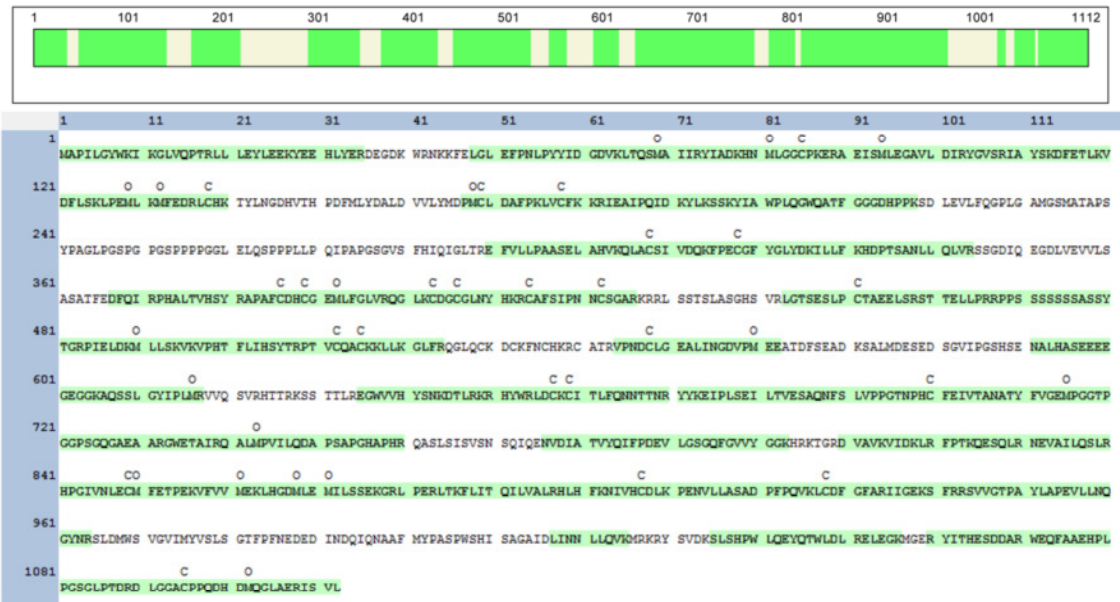
- [217] LeClaire, L. L., Rana, M., Baumgartner, M., Barber, D. L., *The Nck-interacting kinase NIK increases Arp2/3 complex activity by phosphorylating the Arp2 subunit*. J Cell Biol 2015, 208, 161-170.
- [218] Huttlin, E. L., Ting, L., Bruckner, R. J., Paulo, J. A., Gygi, M. P., Rad, R., Kolippakkam, D., Szpyt, J., Zarraga, G., Tam, S., Gebreab, F., Colby, G., Pontano-Vaites, L., Obar, R. A., Guarani-Pereira, V., Harris, T., Artavanis-Tsakonas, S., Sowa, M. E., Harper, J. W., Gygi, S. P., *The BioPlex Network of Human Protein Interactions: Additional Unpublished AP-MS Results (Pre-Publication)*.
- [219] Navarro, M. N., Goebel, J., Hukelmann, J. L., Cantrell, D. A., *Quantitative phosphoproteomics of cytotoxic T cells to reveal protein kinase d 2 regulated networks*. Mol Cell Proteomics 2014, 13, 3544-3557.
- [220] Franz-Wachtel, M., Eisler, S. A., Krug, K., Wahl, S., Carpy, A., Nordheim, A., Pfizenmaier, K., Hausser, A., Macek, B., *Global detection of protein kinase D-dependent phosphorylation events in nocodazole-treated human cells*. Mol Cell Proteomics 2012, 11, 160-170.
- [221] Freeman, A. K., Morrison, D. K., *14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression*. Semin Cell Dev Biol 2011, 22, 681-687.
- [222] Valente, C., Turacchio, G., Mariggio, S., Pagliuso, A., Gaibisso, R., Di Tullio, G., Santoro, M., Formiggini, F., Spano, S., Piccini, D., Polishchuk, R. S., Colanzi, A., Luini, A., Corda, D., *A 14-3-3gamma dimer-based scaffold bridges CtBP1-S/BARS to PI(4)KIIIbeta to regulate post-Golgi carrier formation*. Nat Cell Biol 2012, 14, 343-354.
- [223] Shin, S., Wolgamott, L., Yoon, S. O., *Regulation of endothelial cell morphogenesis by the protein kinase D (PKD)/glycogen synthase kinase 3 (GSK3)beta pathway*. Am J Physiol Cell Physiol 2012, 303, C743-756.
- [224] Whelan, M. C., Senger, D. R., *Collagen I initiates endothelial cell morphogenesis by inducing actin polymerization through suppression of cyclic AMP and protein kinase A*. J Biol Chem 2003, 278, 327-334.
- [225] Uhle, S., Medalia, O., Waldron, R., Dumdey, R., Henklein, P., Bech-Otschir, D., Huang, X., Berse, M., Sperling, J., Schade, R., Dubiel, W., *Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome*. EMBO J 2003, 22, 1302-1312.
- [226] Kienzle, C., Eisler, S. A., Villeneuve, J., Brummer, T., Olayioye, M. A., Hausser, A., *PKD controls mitotic Golgi complex fragmentation through a Raf-MEK1 pathway*. Mol Biol Cell 2013, 24, 222-233.
- [227] Barr, F. A., Egerer, J., *Golgi positioning: are we looking at the right MAP?* J Cell Biol 2005, 168, 993-998.
- [228] Fuchs, Y. F., Eisler, S. A., Link, G., Schlicker, O., Bunt, G., Pfizenmaier, K., Hausser, A., *A Golgi PKD activity reporter reveals a crucial role of PKD in nocodazole-induced Golgi dispersal*. Traffic 2009, 10, 858-867.
- [229] Cole, N. B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J., Lippincott-Schwartz, J., *Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites*. Mol Biol Cell 1996, 7, 631-650.
- [230] Nakatsu, F., Ohno, H., *Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network*. Cell Struct Funct 2003, 28, 419-429.
- [231] Owen, D. J., Collins, B. M., Evans, P. R., *Adaptors for clathrin coats: structure and function*. Annu Rev Cell Dev Biol 2004, 20, 153-191.

- [232] Lau, A. W., Chou, M. M., *The adaptor complex AP-2 regulates post-endocytic trafficking through the non-clathrin Arf6-dependent endocytic pathway*. J Cell Sci 2008, 121, 4008-4017.
- [233] Pilankatta, R., Lewis, D., Inesi, G., *Involvement of protein kinase D in expression and trafficking of ATP7B (copper ATPase)*. J Biol Chem 2011, 286, 7389-7396.
- [234] Aghazadeh, Y., Papadopoulos, V., *The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development*. Drug Discov Today 2016, 21, 278-287.
- [235] Adachi, A., Kano, F., Tsuboi, T., Fujita, M., Maeda, Y., Murata, M., *Golgi-associated GSK3beta regulates the sorting process of post-Golgi membrane trafficking*. J Cell Sci 2010, 123, 3215-3225.
- [236] Wang, W., Li, X., Lee, M., Jun, S., Aziz, K. E., Feng, L., Tran, M. K., Li, N., McCrea, P. D., Park, J. I., Chen, J., *FOXKs promote Wnt/beta-catenin signaling by translocating DVL into the nucleus*. Dev Cell 2015, 32, 707-718.
- [237] Tsuji, T., Ficarro, S. B., Jiang, W., *Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells*. Mol Biol Cell 2006, 17, 4459-4472.
- [238] Logarinho, E., Resende, T., Torres, C., Bousbaa, H., *The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments*. Mol Biol Cell 2008, 19, 1798-1813.
- [239] Tomas, A., Futter, C., Moss, S. E., *Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis*. J Cell Biol 2004, 165, 813-822.
- [240] Costantini, J. L., Cheung, S. M., Hou, S., Li, H., Kung, S. K., Johnston, J. B., Wilkins, J. A., Gibson, S. B., Marshall, A. J., *TAPP2 links phosphoinositide 3-kinase signaling to B-cell adhesion through interaction with the cytoskeletal protein utrophin: expression of a novel cell adhesion-promoting complex in B-cell leukemia*. Blood 2009, 114, 4703-4712.
- [241] Lee, T. H., Chen, C. H., Suizu, F., Huang, P., Schiene-Fischer, C., Daum, S., Zhang, Y. J., Goate, A., Chen, R. H., Zhou, X. Z., Lu, K. P., *Death-associated protein kinase 1 phosphorylates Pin1 and inhibits its prolyl isomerase activity and cellular function*. Mol Cell 2011, 42, 147-159.
- [242] Dougherty, M. K., Muller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P., Morrison, D. K., *Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation*. Mol Cell 2005, 17, 215-224.
- [243] Schaub, B. E., Berger, B., Berger, E. G., Rohrer, J., *Transition of galactosyltransferase 1 from trans-Golgi cisterna to the trans-Golgi network is signal mediated*. Mol Biol Cell 2006, 17, 5153-5162.
- [244] Creutz, C. E., Tomsig, J. L., Snyder, S. L., Gautier, M. C., Skouri, F., Beisson, J., Cohen, J., *The copines, a novel class of C2 domain-containing, calcium-dependent, phospholipid-binding proteins conserved from Paramecium to humans*. J Biol Chem 1998, 273, 1393-1402.
- [245] Valovka, T., Verdier, F., Cramer, R., Zhyvoloup, A., Fenton, T., Rebholz, H., Wang, M. L., Gzhegotsky, M., Lutsyk, A., Matsuka, G., Filonenko, V., Wang, L., Proud, C. G., Parker, P. J., Gout, I. T., *Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase beta11 and regulates its subcellular localization*. Mol Cell Biol 2003, 23, 852-863.
- [246] Pang, Y. L., Poruri, K., Martinis, S. A., *tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond*. Wiley Interdiscip Rev RNA 2014, 5, 461-480.

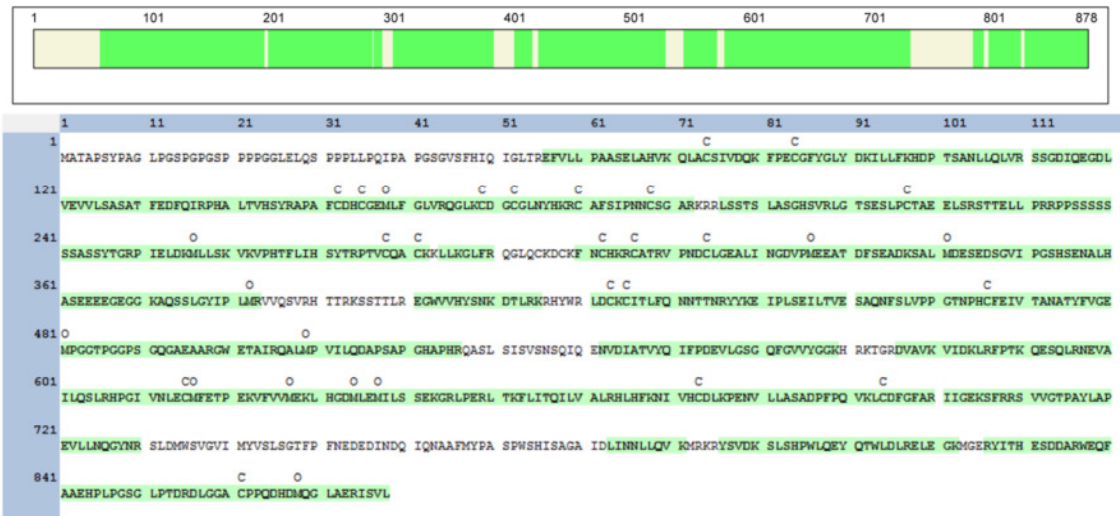
- [247] Fang, J., Hsu, B. Y., MacMullen, C. M., Poncz, M., Smith, T. J., Stanley, C. A., *Expression, purification and characterization of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations*. *Biochem J* 2002, 363, 81-87.
- [248] Taverner, T., Hall, N. E., O'Hair, R. A., Simpson, R. J., *Characterization of an antagonist interleukin-6 dimer by stable isotope labeling, cross-linking, and mass spectrometry*. *J Biol Chem* 2002, 277, 46487-46492.
- [249] Merkley, E. D., Baker, E. S., Crowell, K. L., Orton, D. J., Taverner, T., Ansong, C., Ibrahim, Y. M., Burnet, M. C., Cort, J. R., Anderson, G. A., Smith, R. D., Adkins, J. N., *Mixed-isotope labeling with LC-IMS-MS for characterization of protein-protein interactions by chemical cross-linking*. *J Am Soc Mass Spectrom* 2013, 24, 444-449.
- [250] Zhang, Y., *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. *BMC Bioinformatics* 2008, 9, 40.
- [251] Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. *Nat Protoc* 2010, 5, 725-738.
- [252] Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., *The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction*. *Nat Methods* 2015, 12, 7-8.
- [253] Merkley, E. D., Rysavy, S., Kahraman, A., Hafen, R. P., Daggett, V., Adkins, J. N., *Distance restraints from crosslinking mass spectrometry: mining a molecular dynamics simulation database to evaluate lysine-lysine distances*. *Protein Sci* 2014, 23, 747-759.

Anhang

I: GST-PKD2



II: PKD2



III: GST

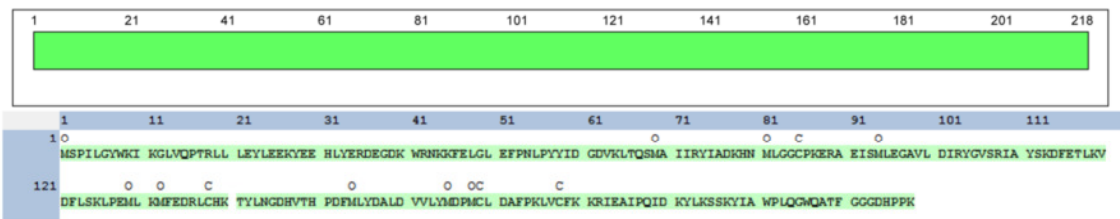


Abbildung A1: Grafische Darstellung der Sequenzabdeckung identifizierter Proteine

Die grünen Markierungen zeigen die Abdeckung der Aminosäuresequenzen der Proteine durch die identifizierten Peptide (Tabelle 6). Die Darstellungen wurden der Proteome Discoverer-Software entnommen. O: Methionin-Oxidation, C: Cystein-Carbamidomethylierung

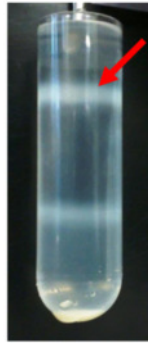


Abbildung A2: Anreicherung der Golgi-Apparat-Fraktion

Die Membranfraktion aus HeLa-Zellhomogenaten wurde zur Anreicherung von Golgi-Apparat-Komponenten mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Die Golgi-Apparat-Fraktion befindet sich an der oberen Grenzfläche des diskontinuierlichen Gradienten (Pfeilmarkierung).

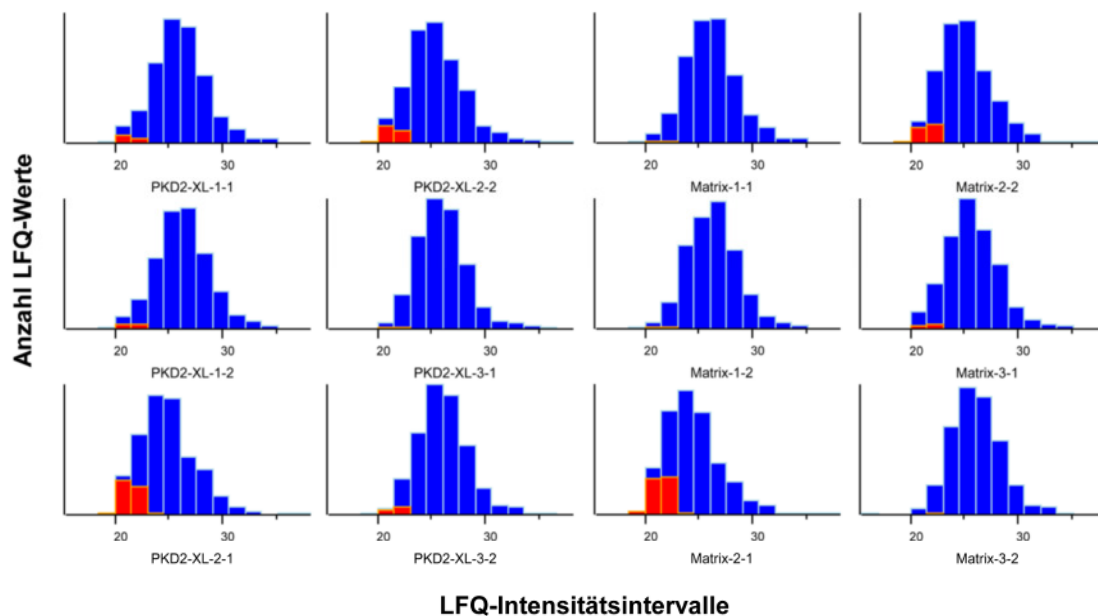


Abbildung A3: Verteilung von LFQ-Intensitätswerten am Beispiel des Vergleichs der vernetzten PKD2-Probe und der Matrix-Kontrollprobe der zytosolischen Fraktion

Verteilung der LFQ-Intensitäten identifizierter Proteine (blau) sowie auf der Normalverteilung basierend nachträglich berechneter fehlender Intensitätswerte (rot). Die Abbildung zeigt die Replikatgruppen der vernetzten PKD2-Probe (PKD2-XL) und der Matrix-Kontrollprobe (Matrix) aus Anreicherungsexperimenten mit der zytosolischen Fraktion. Die Daten wurden mittels der Perseus-Software extrahiert und visualisiert und schließen Ergebnisse aus drei biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten ein.

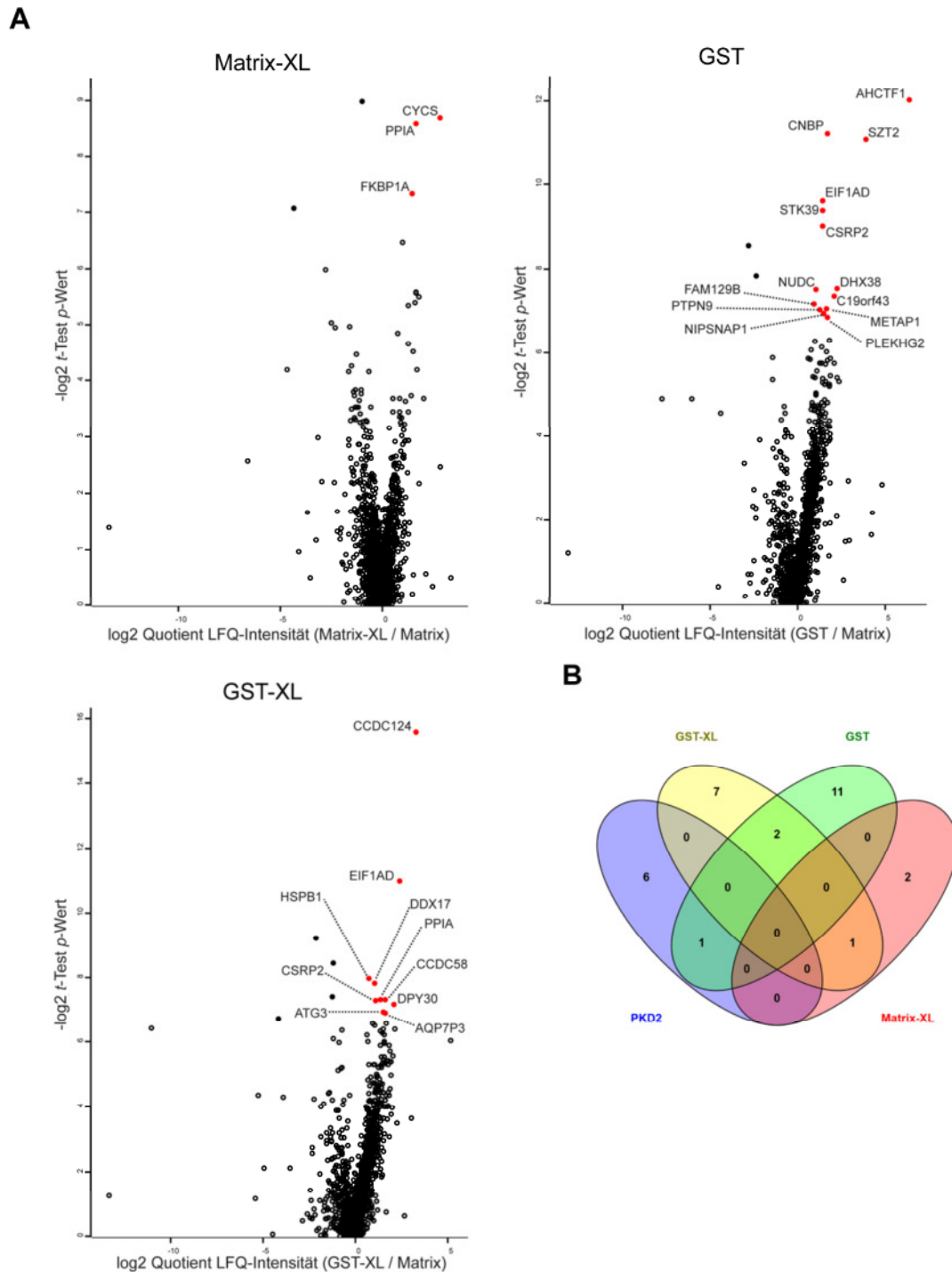


Abbildung A4: Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Kontrolleexperimenten mit der zytosolischen Fraktion und Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine

A) LFQ-Intensitäten von Proteinen, deren Identifizierung in den vernetzten Matrix-Kontrollproben (Matrix-XL), den GST-Kontrollproben (GST) und den vernetzten GST-Kontrollproben (GST-XL) erfolgte, wurden durch eine t-Test-Analyse statistisch ausgewertet. Die logarithmierten Expressionsquotienten wurden gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte aufgetragen. Signifikant regulierte Proteine ($p \leq 0,01$) sind als rote und schwarze Punkte dargestellt, die den unregulierten Proteinen gegenüberstehen (schwarze Kreise). Angereicherte Proteine wurden mit ihren Gennamen annotiert. Die Analyse schließt Daten aus drei unabhängigen biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten ein. **B)** Darstellung der Überlappung angereicherter Proteine aus den PKD2-Kontrollexperimenten ohne Vernetzung (PKD2) und den vernetzten (GST-XL, Matrix-XL) sowie unvernetzten (GST) Kontrollproben mittels Venn-Diagrammen.

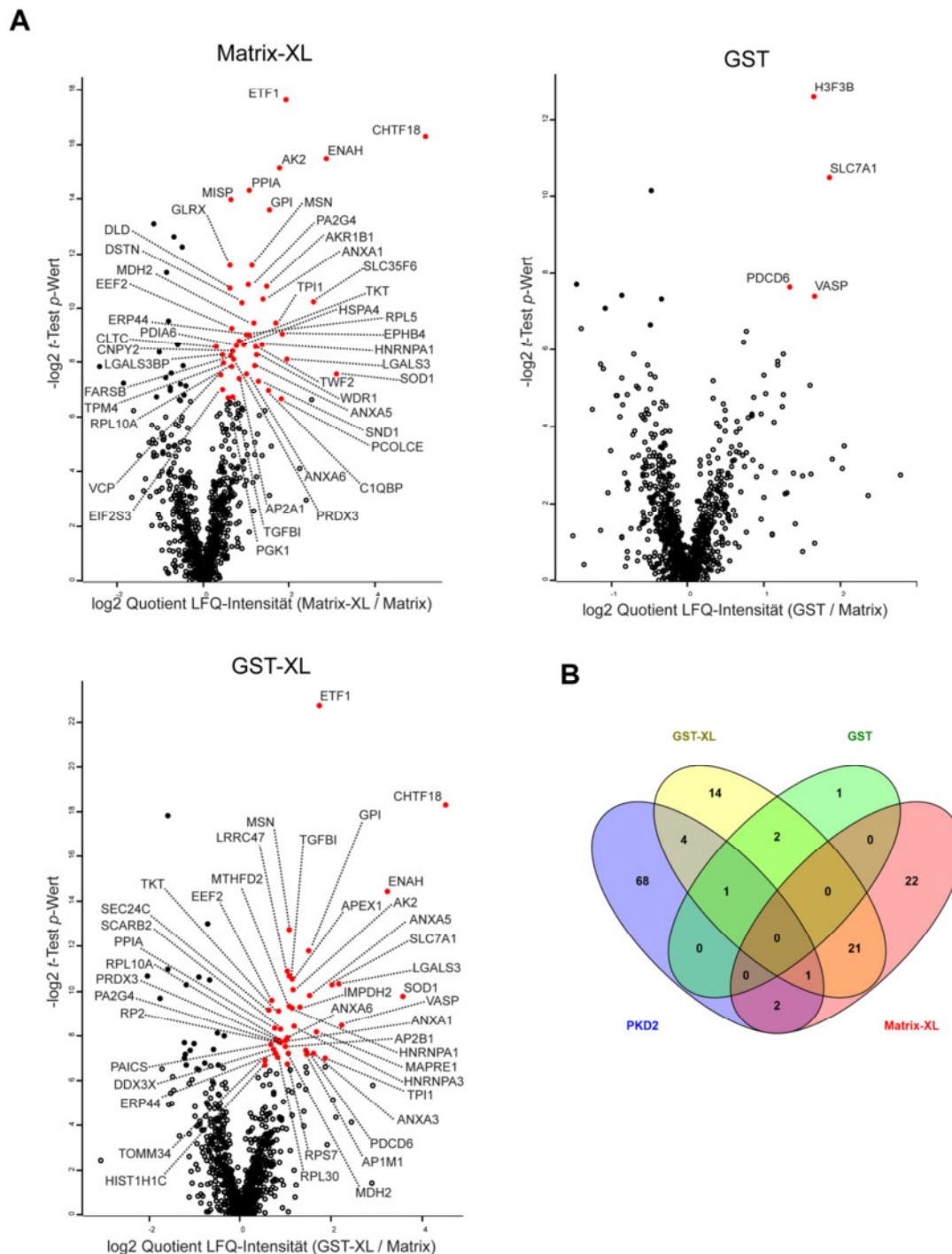


Abbildung A5: Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Kontrolleexperimenten mit der Golgi-Apparat-Fraktion und Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine

A) LFQ-Intensitäten von Proteinen, deren Identifizierung aus den vernetzten Matrix-Kontrollproben (Matrix-XL), den GST-Kontrollproben (GST) und den vernetzten GST-Kontrollproben (GST-XL) erfolgte, wurden durch eine t-Test-Analyse statistisch ausgewertet. Die logarithmierten Expressionsquotienten wurden gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte aufgetragen. Signifikant regulierte Proteine ($p \leq 0,01$) sind als rote und schwarze Punkte dargestellt, die den unregulierten Proteinen gegenüberstehen (schwarze Kreise). Angereicherte Proteine wurden mit ihren Gennamen annotiert. Die Analyse schließt Daten aus drei unabhängigen biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten ein. **B)** Darstellung der Überlappung angereicherter Proteine aus den PKD2-Kontrollexperimenten ohne Vernetzung (PKD2) und den vernetzten (GST-XL, Matrix-XL) sowie unvernetzten (GST) Kontrollproben mittels Venn-Diagrammen.

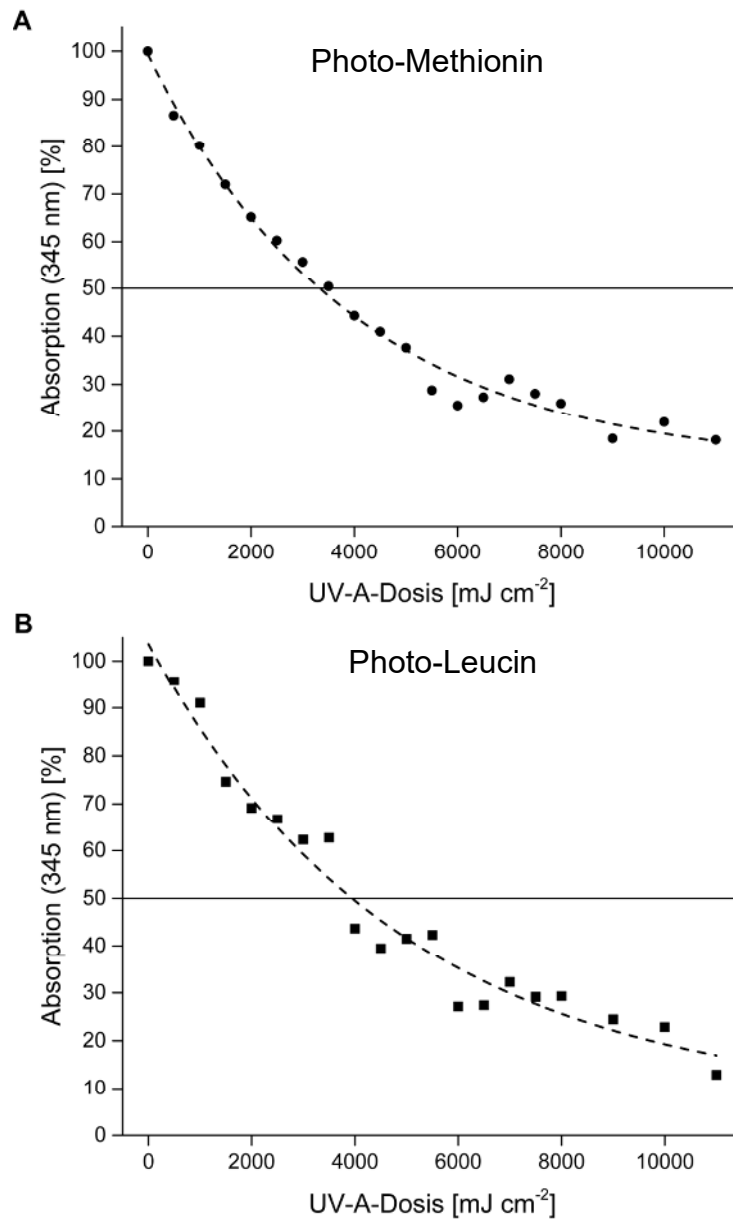


Abbildung A6: Abhängigkeit des Aktivierungsgrades der Diazirine in Photo-Aminosäuren von der UV-A-Bestrahlungsdosis

Die photoaktivierbaren Aminosäuren **A)** Photo-Methionin und **B)** Photo-Leucin wurden in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS gelöst und in $50 \mu\text{l}$ -Aliquots in einer UV-A-Bestrahlungskammer inkubiert. In Intervallen wurden Proben entnommen und deren UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 345 nm (intaktes Diazirin) bestimmt.

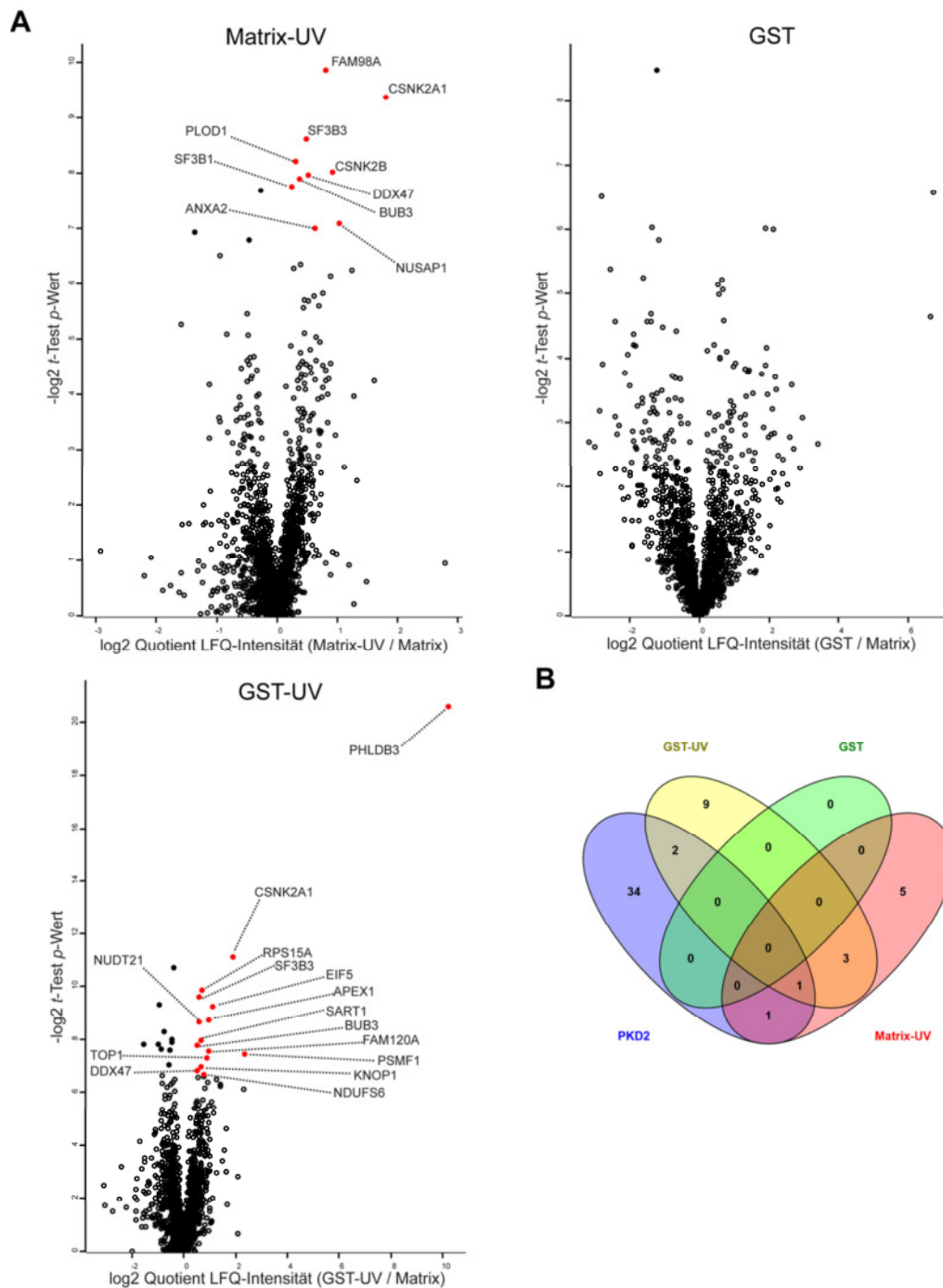


Abbildung A7: Statistische Analyse der Quantifizierungsdaten aus Kontrollexperimenten mit der photoaffinitätsmarkierten Proteinfraction und Überlappungsanalyse signifikant angereicherter Proteine

A) LFQ-Intensitäten von Proteinen, deren Identifizierung in den vernetzten Matrix-Kontrollproben (Matrix-UV), den GST-Kontrollproben (GST) und den vernetzten GST-Kontrollproben (GST-UV) erfolgte, wurden durch eine t-Test-Analyse statistisch ausgewertet. Die logarithmierten Expressionsquotienten wurden gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte aufgetragen. Signifikant regulierte Proteine ($p \leq 0,01$) sind als rote und schwarze Punkte dargestellt, die den unregulierten Proteinen gegenüberstehen (schwarze Kreise). Angereicherte Proteine wurden mit ihren Gennamen annotiert. Die Analyse schließt Daten aus drei unabhängigen biologischen Replikatexperimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten ein. **B)** Darstellung der Überlappung angereicherter Proteine aus den PKD2-Kontrollexperimenten ohne Vernetzung (PKD2) und den vernetzten (GST-UV, Matrix-UV) sowie unvernetzten (GST) Kontrollproben mittels Venn-Diagrammen.

Humane Proteinkinase D2 (*PRKD2*), UniProt-Eintrag: Q9BZL6,

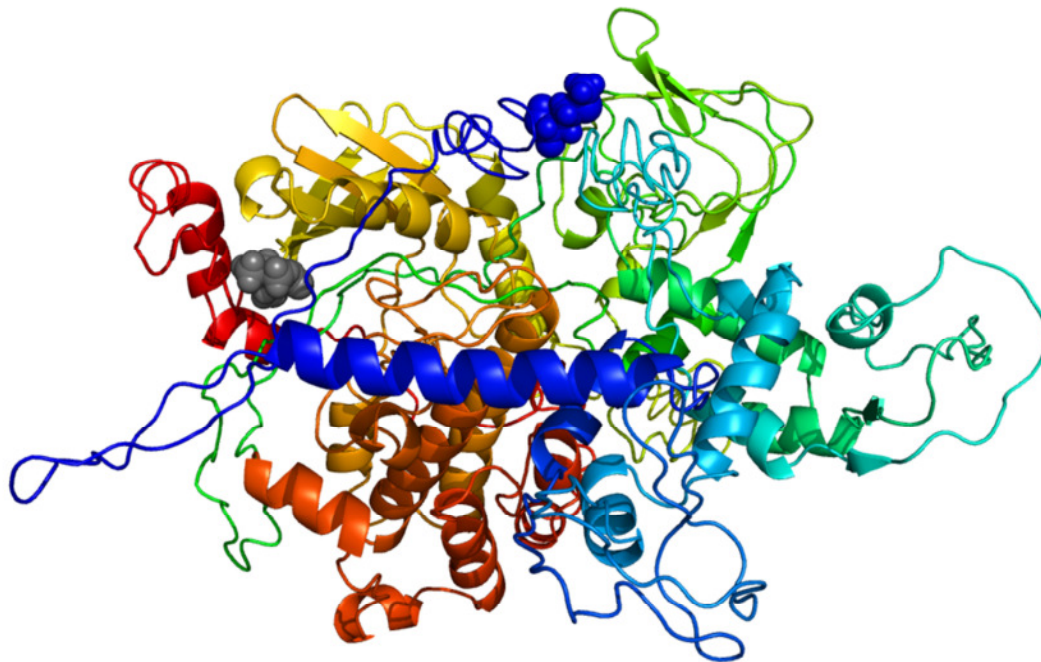
Länge: 878 Aminosäuren, Molekulargewicht: 96,75 kDa

```
>sp|Q9BZL6|KPCD2_HUMAN Serine/threonine-protein kinase D2 OS=Homo
sapiens GN=PRKD2 PE=1 SV=2
```

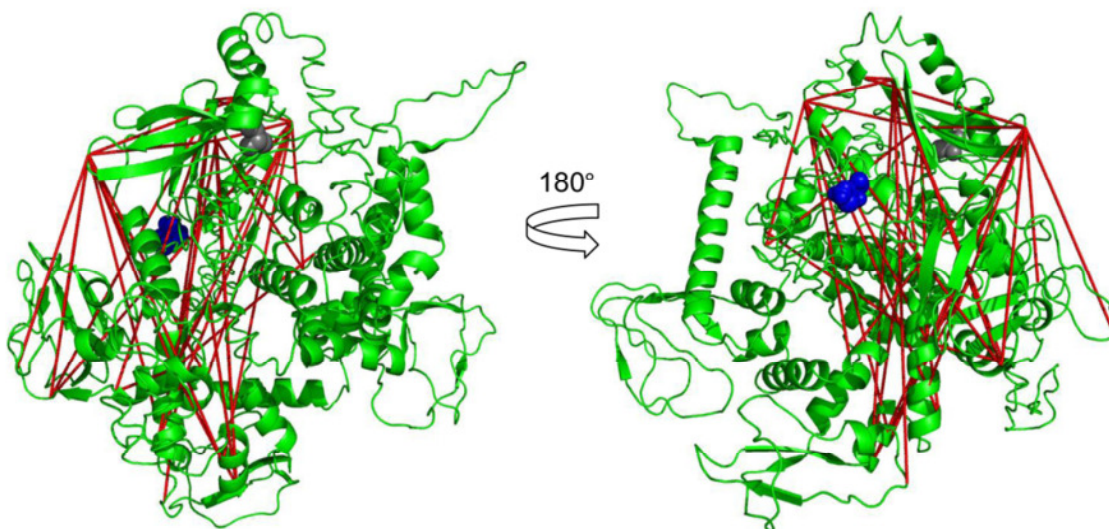
```

      10      20      30      40      50
MATAPSYFAG LPGSPGPGSP PPPGGLELQS PPPLLPQIPA PGSGVSFHIQ
      60      70      80      90     100
IGLTRELVLL PAASELAHVK QLACSIVDQK FPECGFYGLY DKILLFKHDP
      110     120     130     140     150
TSANLLQLVR SSGDIQEGDL VEVVLSASAT FEDFQIRPHA LTVHSYRAPA
      160     170     180     190     200
FCDHCGEMLF GLVRQGLKCD GCGLNYHKRC AFSIPNNCSG ARKRRLSSTS
      210     220     230     240     250
LASGHSVRLG TSESLPCTAE ELSRSTTELL PRRPPSSSSS SSASSYTGRP
      260     270     280     290     300
IELDKMLLSK VKVPHTFLIH SYTRPTVCQA CKKLLKGLFR QGLQCKDCKF
      310     320     330     340     350
NCHKRCATRV PNDCLGEALI NGDVPMEEAT DFSEADKSAL MDESEDSGVI
      360     370     380     390     400
PGSHSENALH ASEEEEEGEGG KAQSSLGYIP LMRVVQSVRH TTRKSSTTLR
      410     420     430     440     450
EGWVVHYSNK DTLRKRHYWR LDCKCITLFQ NNTTNRYYKE IPLSEILTVE
      460     470     480     490     500
SAQNFSLVPP GTNPHCFEIV TANATYFVGE MPGGTPGGPS GQGAEAARGW
      510     520     530     540     550
ETAIRQALMP VILQDAPSAP GHAPHRQASL SISVSNSQIQ ENVDIATVYQ
      560     570     580     590     600
IFPDEVLGSG QFGVVYGGKH RKTGRDVAVK VIDKLRFPK QESQLRNEVA
      610     620     630     640     650
ILQSLRHPGI VNLECMFETP EKVFVMEKL HGDMLEMILS SEKGRLPERL
      660     670     680     690     700
TKFLITQILV ALRHLHFKNI VHCDLKPENV LLASADPPFQ VKLCDFGFAR
      710     720     730     740     750
IIGKSFRRS VVGTPAYLAP EVLLNQGYNR SLDMWSVGVI MYVSLSGTFP
      760     770     780     790     800
FNEDEDINDQ IQNAAFMYPA SPWSHISAGA IDLINLLQV KMRKRYSDVK
      810     820     830     840     850
SLSHPWLQEY QTWLDLRELE GKMGERYITH ESDDVRWEQF AAEHPLPGSG
      860     870
LPTDRDLGGA CPPQDHDMQG LAERISVL
```

Abbildung A8: FASTA-Annotation und Sequenz der humanen Proteinkinase D2

**Abbildung A9: Bändermodell eines PKD2-Strukturmodells**

Die Aminosäuresequenz der PKD2 wurde zur Erstellung von Strukturmodellen der PKD2 mit der I-TASSER-Software prozessiert. Die Abbildung zeigt das durch den Algorithmus am besten bewertete homologiebasierte Strukturmodell (C-Score = -1,73 / TM-Score $\sim 0,5 \pm 0,15$ / RMSD $\sim 12,9 \pm 4,2$ Å). Die N-terminalen (blau) und C-terminalen (grau) Aminosäuren sind als Kalottenmodelle dargestellt. RMSD: mittlere quadratische Abweichung (*root-mean-square deviation*)

**Abbildung A10: Intramolekulare Vernetzungen in einem Bändermodell des mittels der I-TASSER-Software erstellten PKD2-Strukturmodells**

Identifizierte Vernetzungen wurden mit der PyMol-Software als Vektoren zwischen den α -Atomen beteiligter Aminosäurepositionen visualisiert. Zudem erfolgte die Bestimmung der jeweiligen α - α -Abstände. Die N-terminalen (blau) und C-terminalen (grau) Aminosäuren sind als Kalottenmodelle dargestellt.

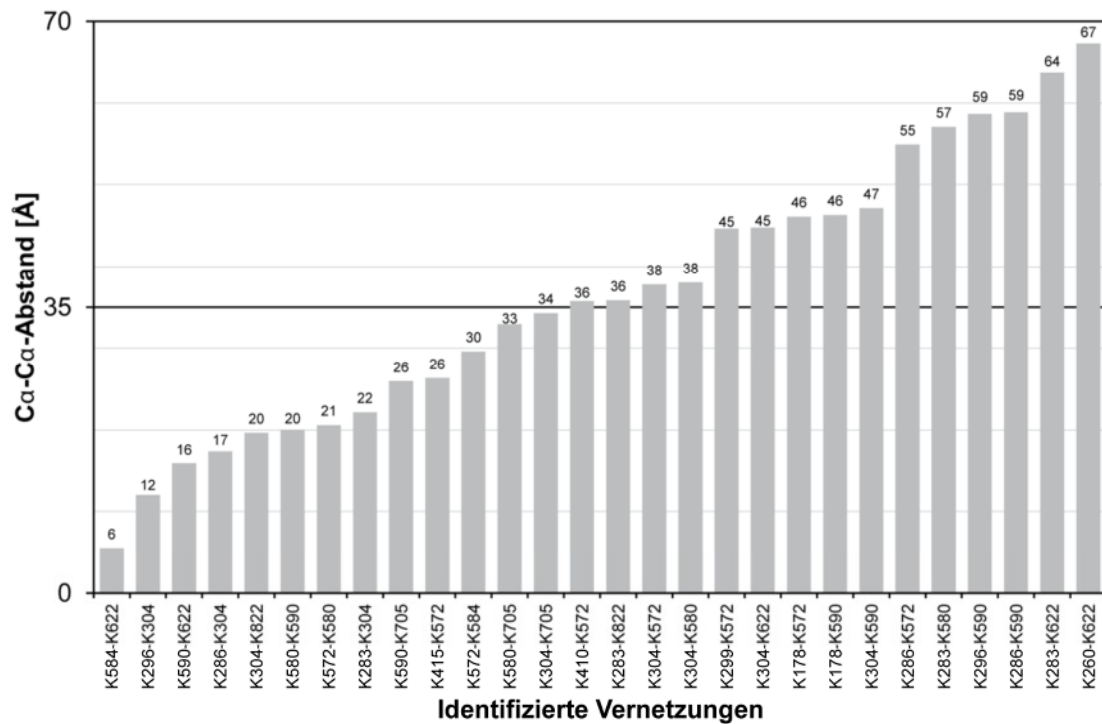
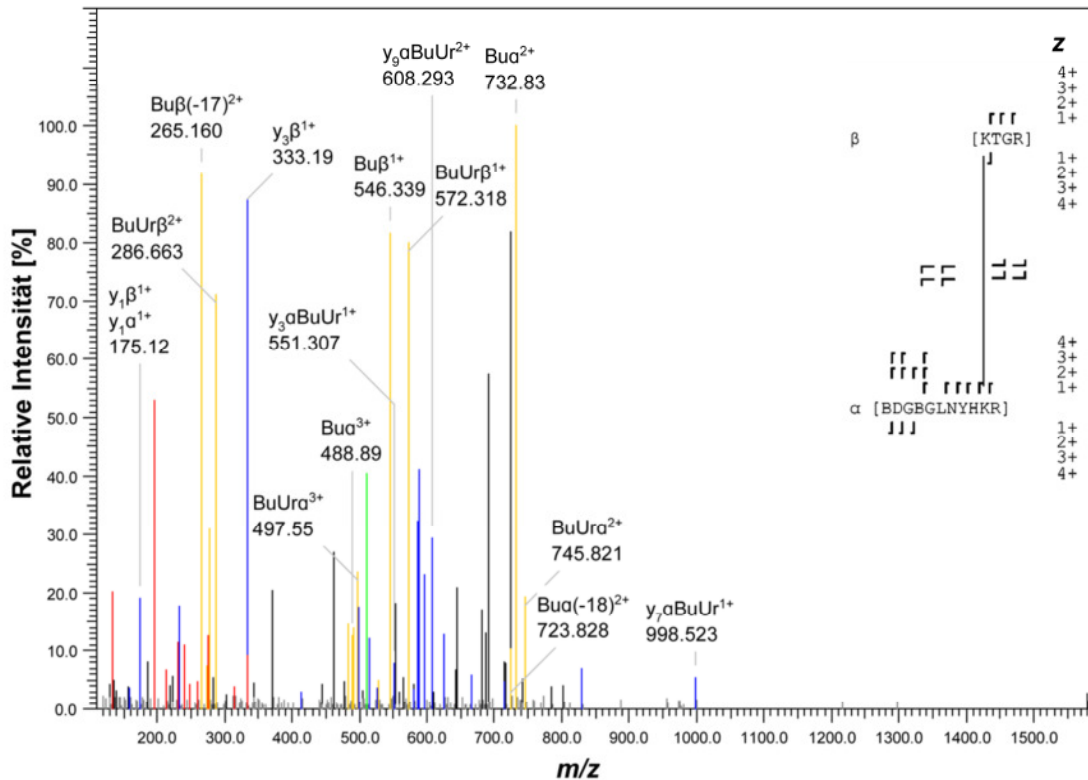


Abbildung A11: Ca-Cα-Abstände der identifizierten Vernetzungen zwischen Lysinen im vorhergesagten PKD2-Strukturmodell

Das mittels der I-TASSER-Software automatisch erstellte PKD2-Proteinstrukturmodell wurde für die Analyse der Distanzbeschränkungen aus chemischen Vernetzungsexperimenten verwendet. Dazu wurden mit der PyMol-Software die Ca-Cα-Abstände zwischen vernetzten Lysinen bestimmt.

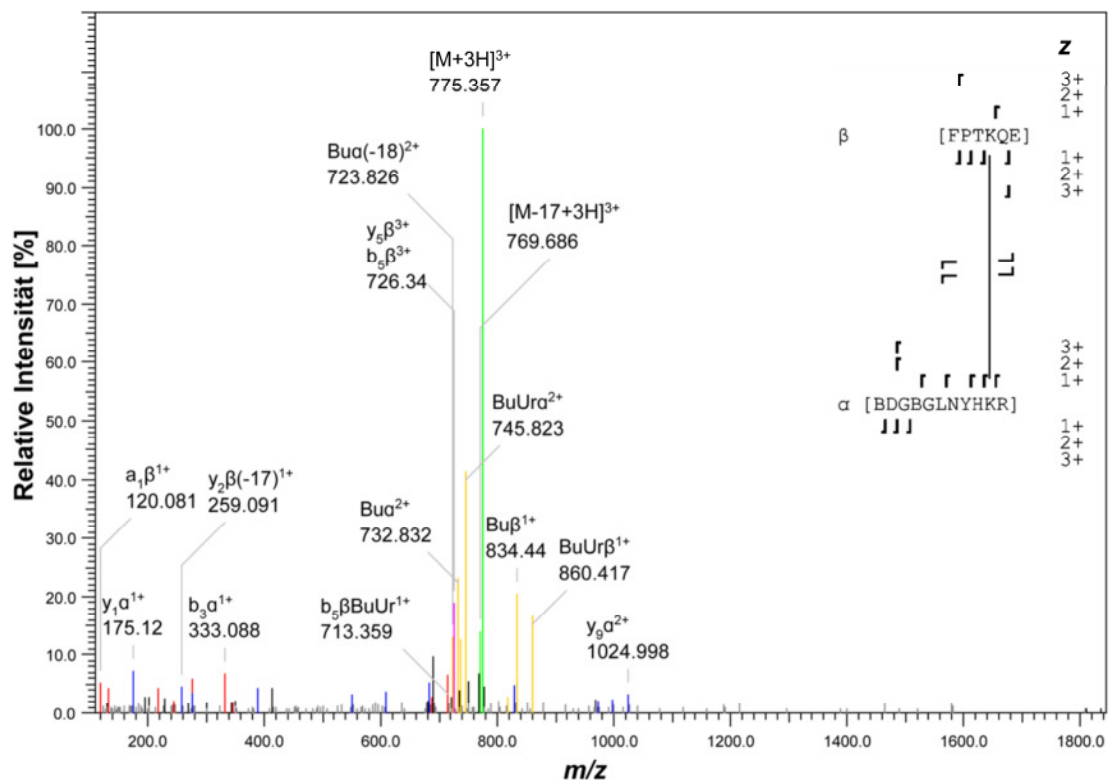
Abbildung A12: Fragmentionenspektren zur Identifizierung intra- und intermolekularer Vernetzungen der PKD2

Vorläuferionen der Vernetzungsprodukte wurden im Quadrupol-Massenfilter des Orbitrap Fusion-Hybridmassenspektrometers selektiert, mittels *stepped*-HCD im IRM fragmentiert und die Fragmentionen in der Orbitrap analysiert. Die Fragmentionenspektren sind analog der Reihenfolge in Tabelle 10 unter Angabe der beteiligten Peptide (α / β), der vernetzten Aminosäurepositionen und der Massen der Vernetzungsprodukte dargestellt. Die Signale der Fragmentionenspektren wurden mittels der MeroX-Software wie folgt annotiert. rot: a- bzw. b-Ionen, blau: y-Ionen, grün: Vorläuferionen, gelb: Fragmente des BuUrBu-Vernetzungsreagenzes. m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, z : Ladungszustand



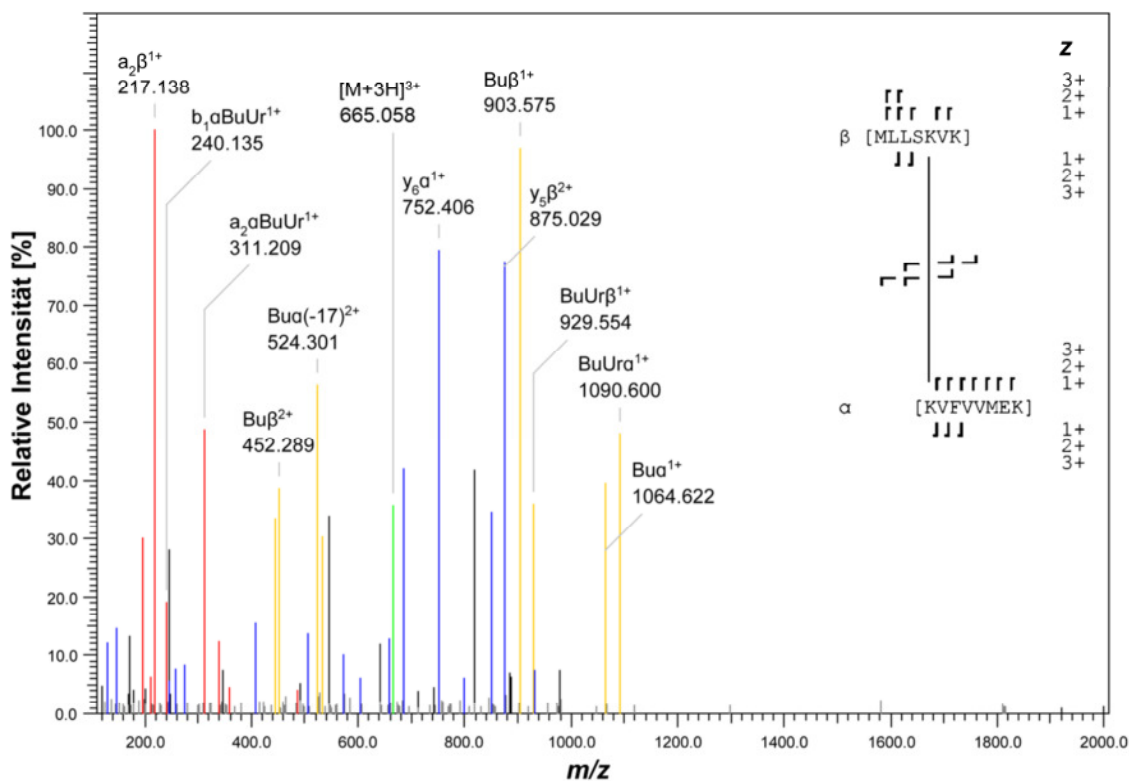
K178-K572 Vorläuferion: m/z 509,744 / $z = 4^+$ /

$$[\text{M}+\text{H}]_{\text{exp}}^+ = 2035,953 / [\text{M}+\text{H}]_{\text{theo}}^+ = 2035,955 / \Delta m = 0,72 \text{ ppm}$$



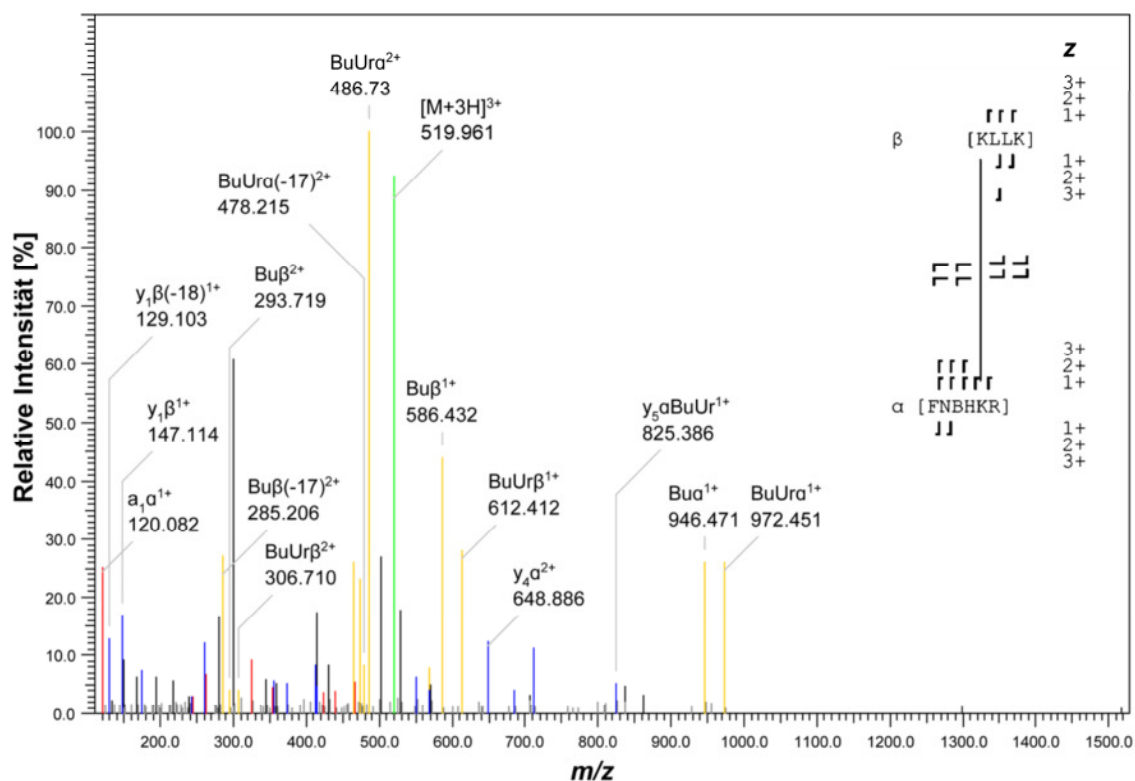
K178-K590 Vorläuferion: m/z 775,357 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 2324,055 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 2324,055 / \Delta m = 0,25 \text{ ppm}$$



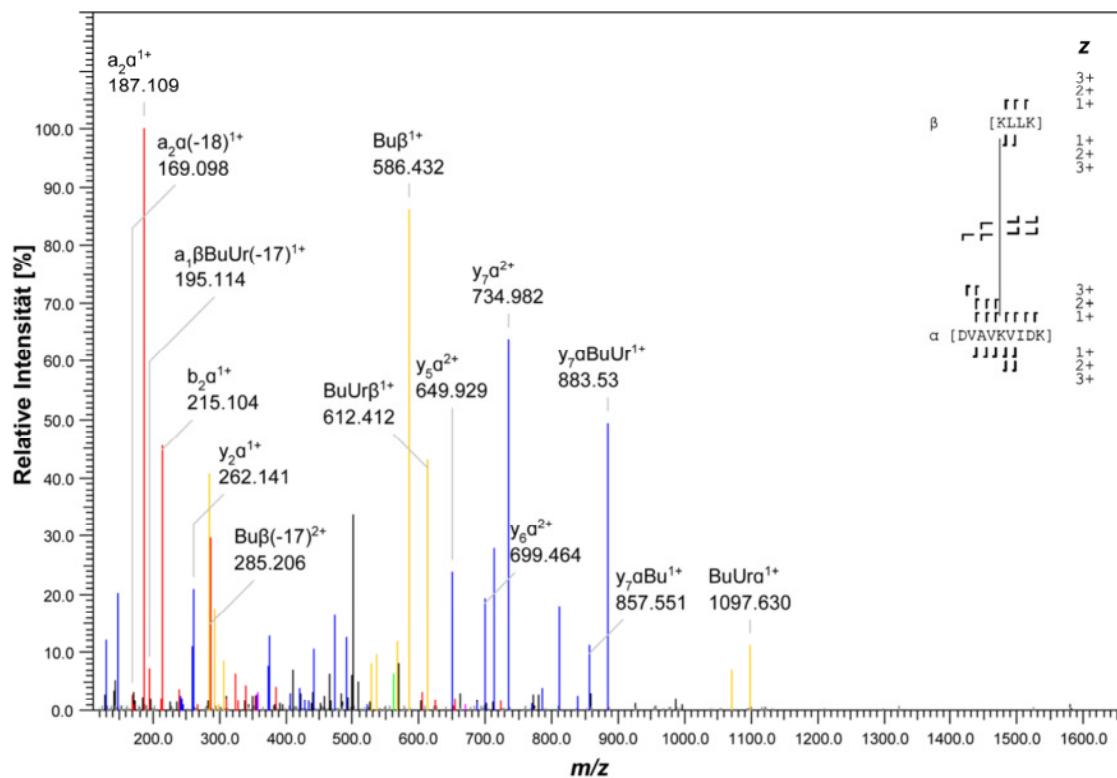
K260-K622 Vorläuferion: m/z 665,058 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1993,159 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1993,159 / \Delta m = 0,23 \text{ ppm}$$



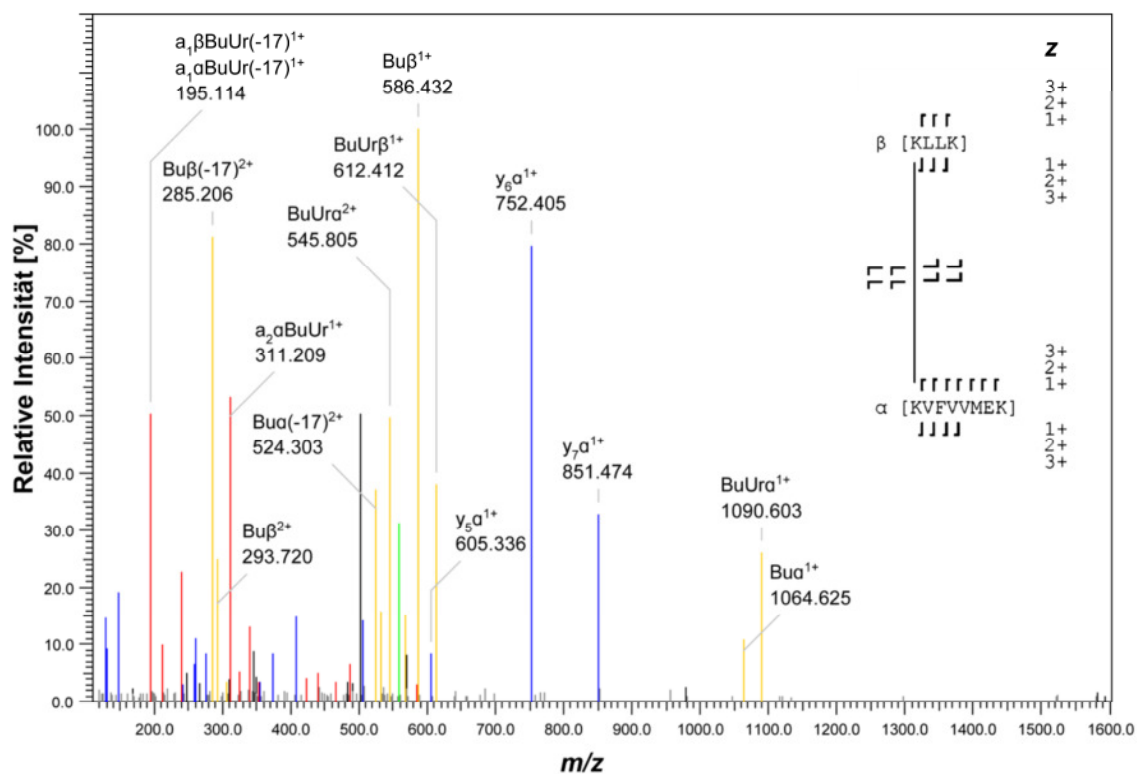
K283-K304 Vorläuferion: m/z 519,961 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1557,867 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1557,868 / \Delta m = 0,69 \text{ ppm}$$



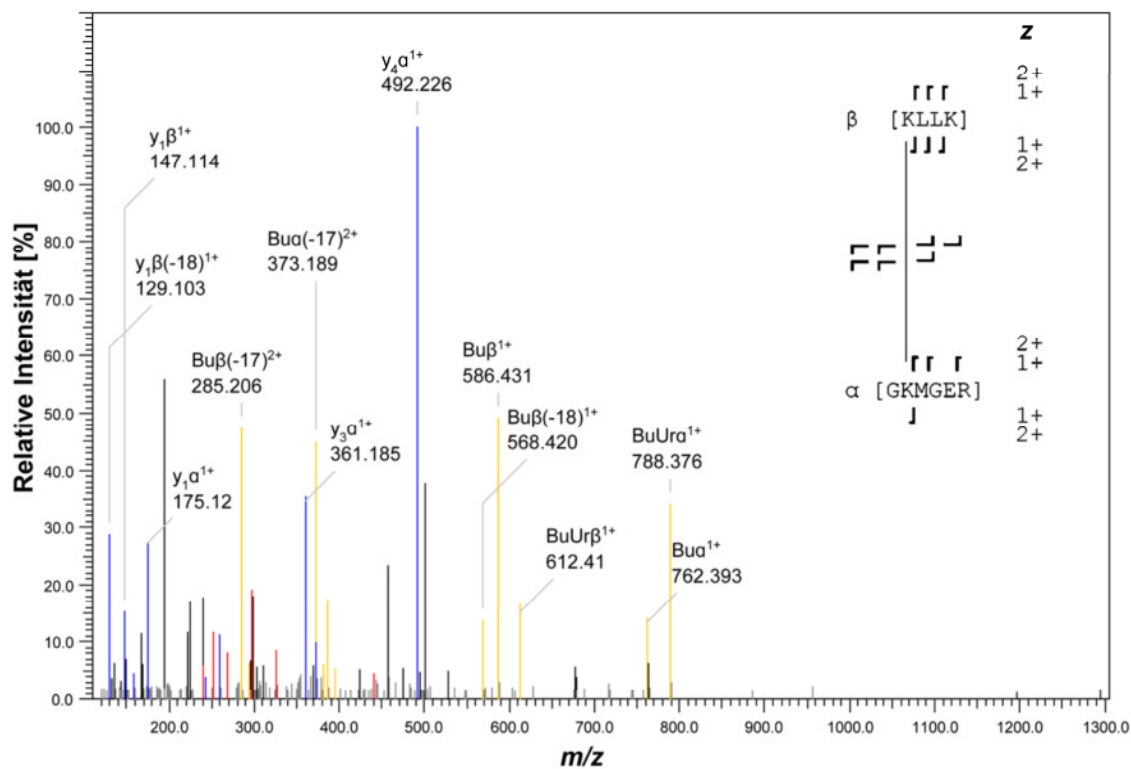
K283-K580 Vorläuferion: m/z 561,685 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1683,041 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1683,041 / \Delta m = 0,21 \text{ ppm}$$



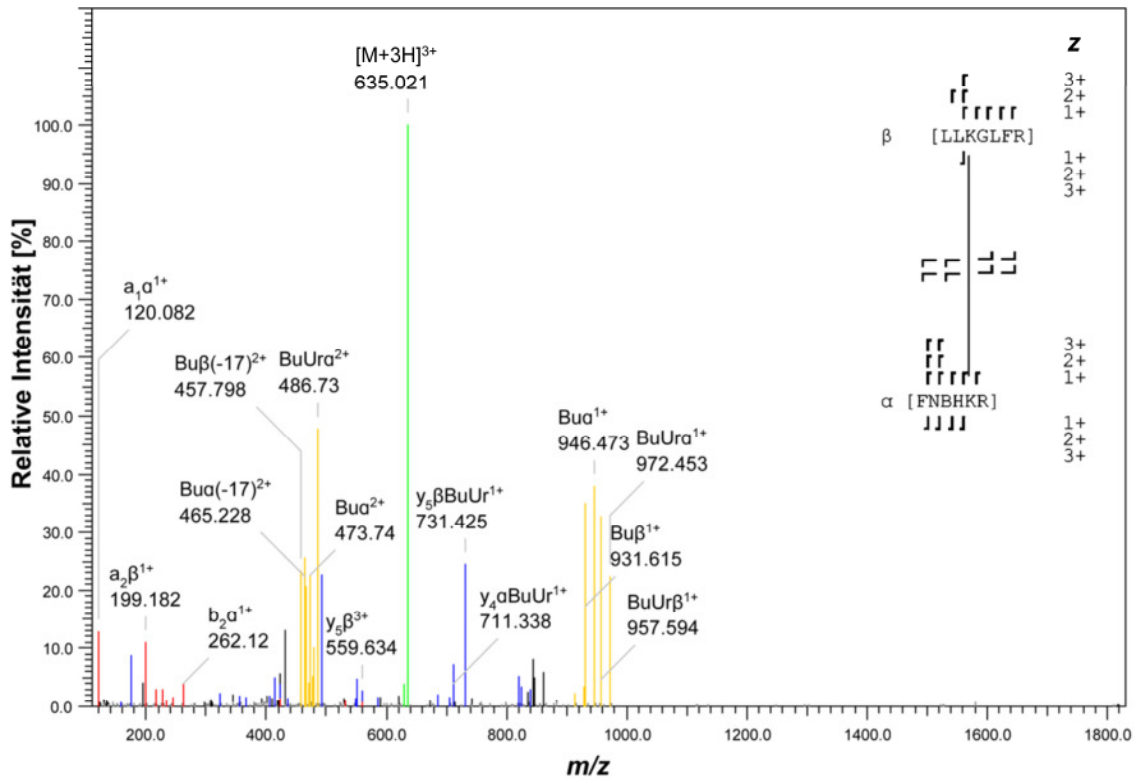
K283-K622 Vorläuferion: m/z 559,345 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1676,019 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1676,018 / \Delta m = 0,69 \text{ ppm}$$



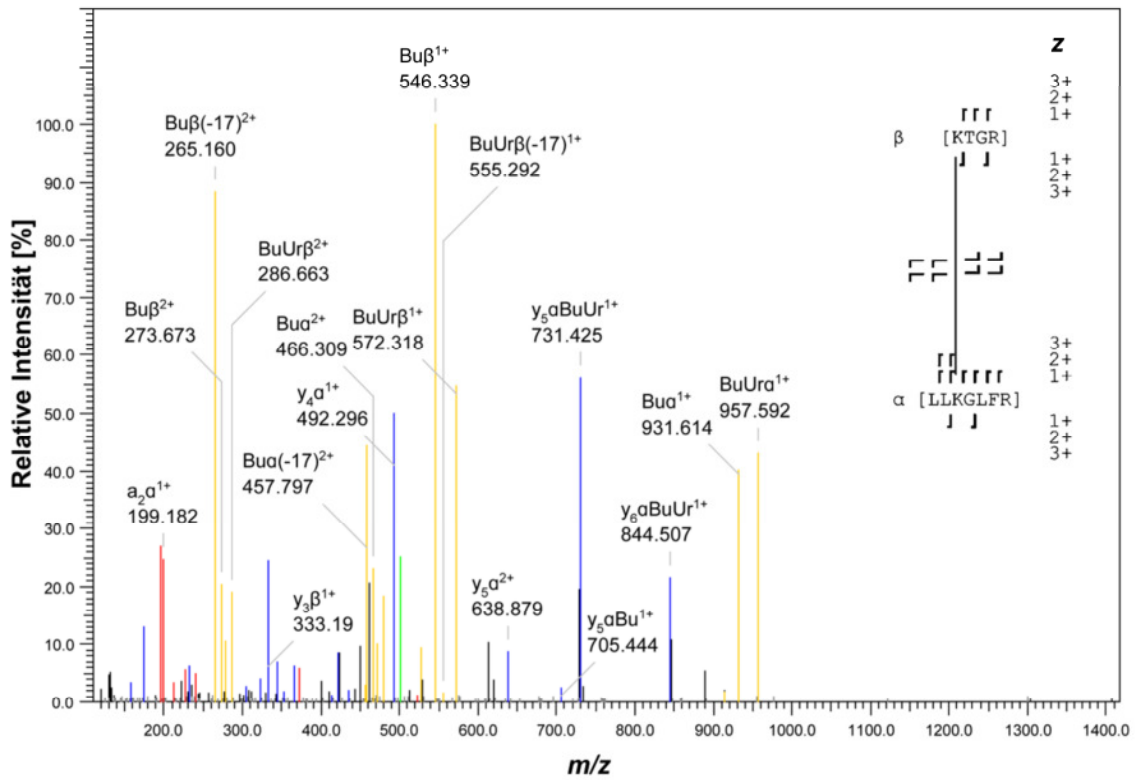
K283-K822 Vorläuferion: m/z 458,602 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1373,791 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1373,793 / \Delta m = 1,59 \text{ ppm}$$



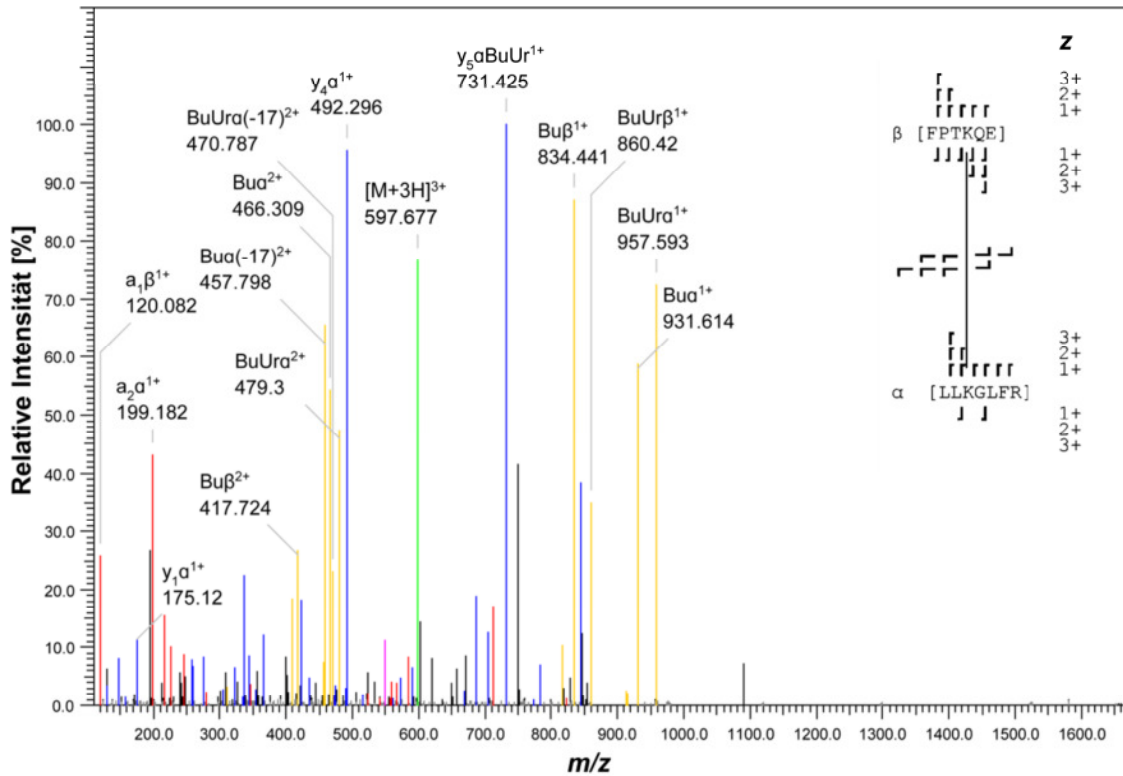
K286-K304 Vorläuferion: m/z 635,021 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1903,048 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1903,048 / \Delta m = 0,12 \text{ ppm}$$



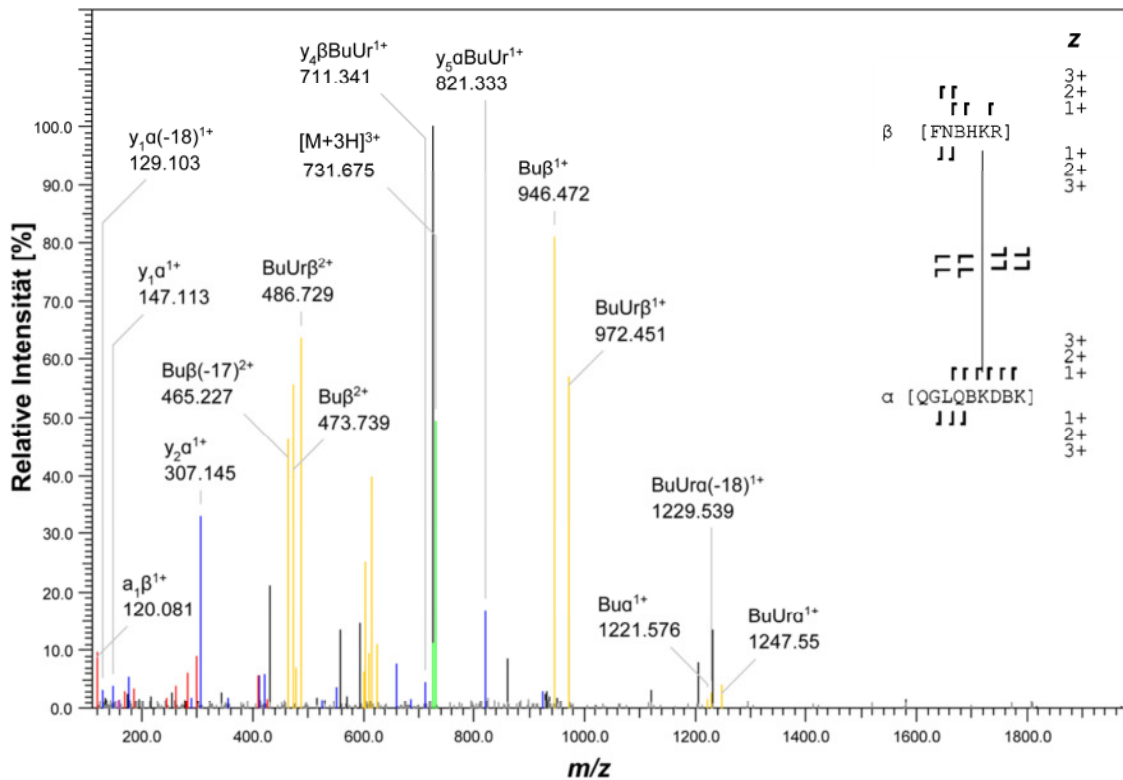
K286-K572 Vorläuferion: m/z 501,644 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1502,916 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1502,917 / \Delta m = 0,27 \text{ ppm}$$



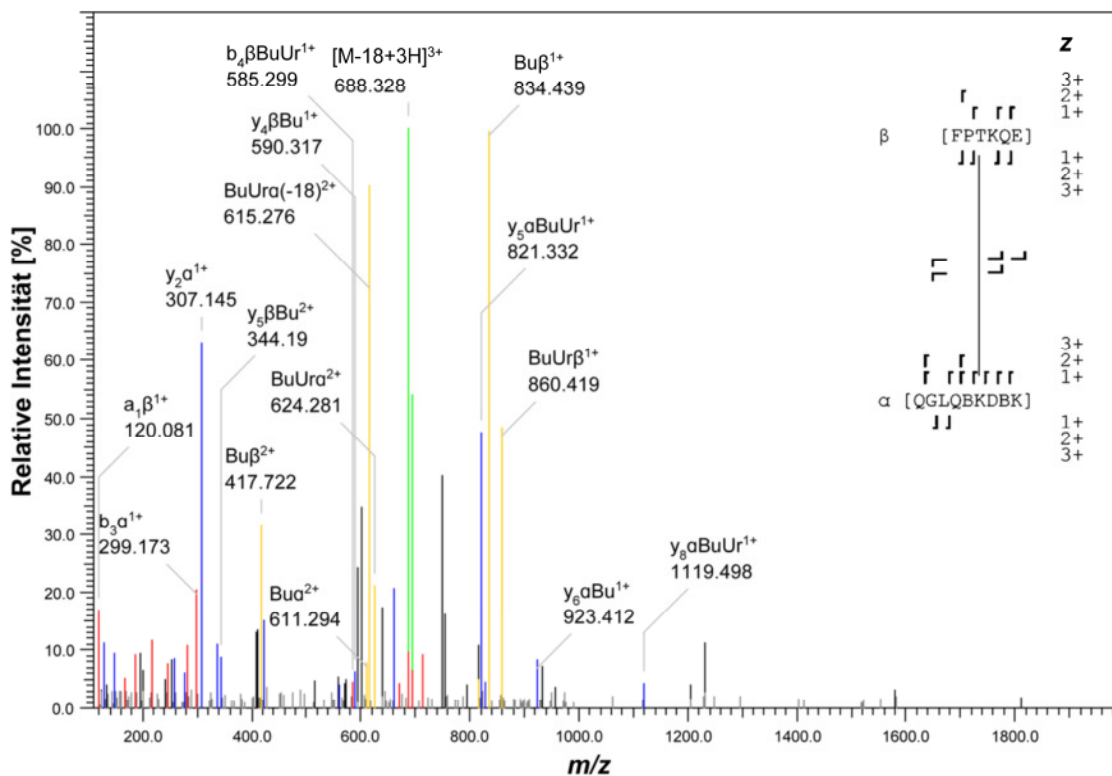
K286-K590 Vorläuferion: m/z 597,677 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1791,016 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1791,016 / \Delta m = 0,04 \text{ ppm}$$



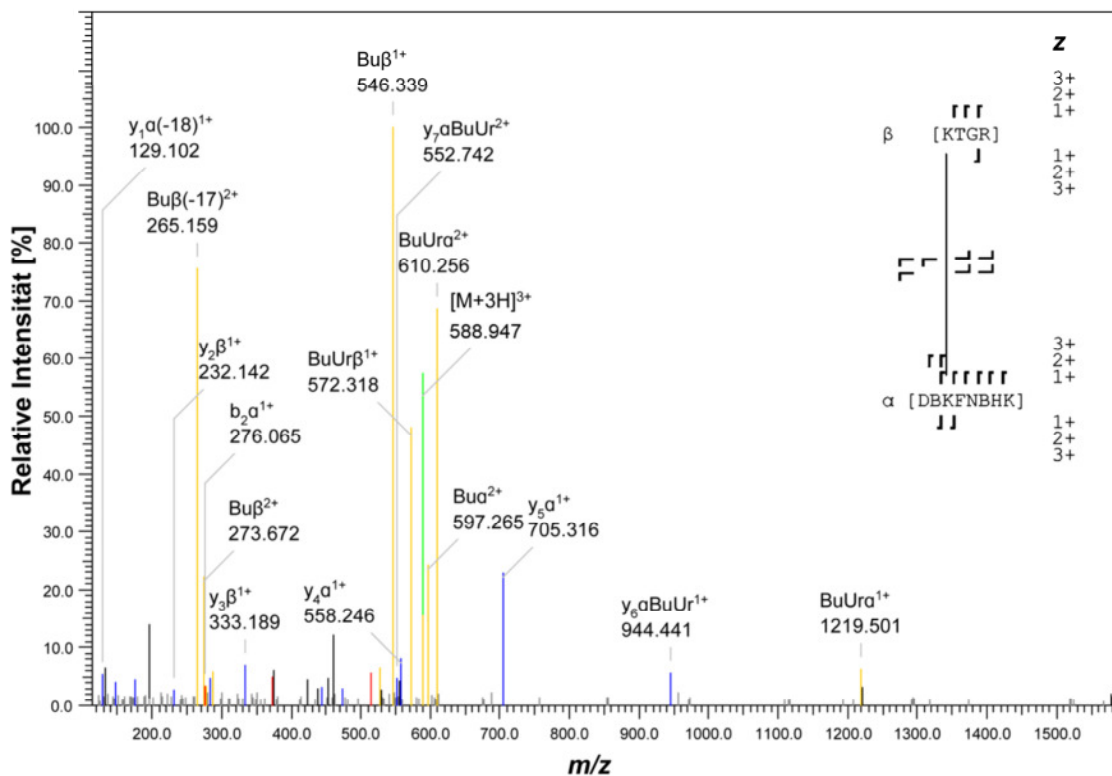
K296-K304 Vorläuferion: m/z 731,675 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 2193,011 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 2193,011 / \Delta m = 0,18 \text{ ppm}$$



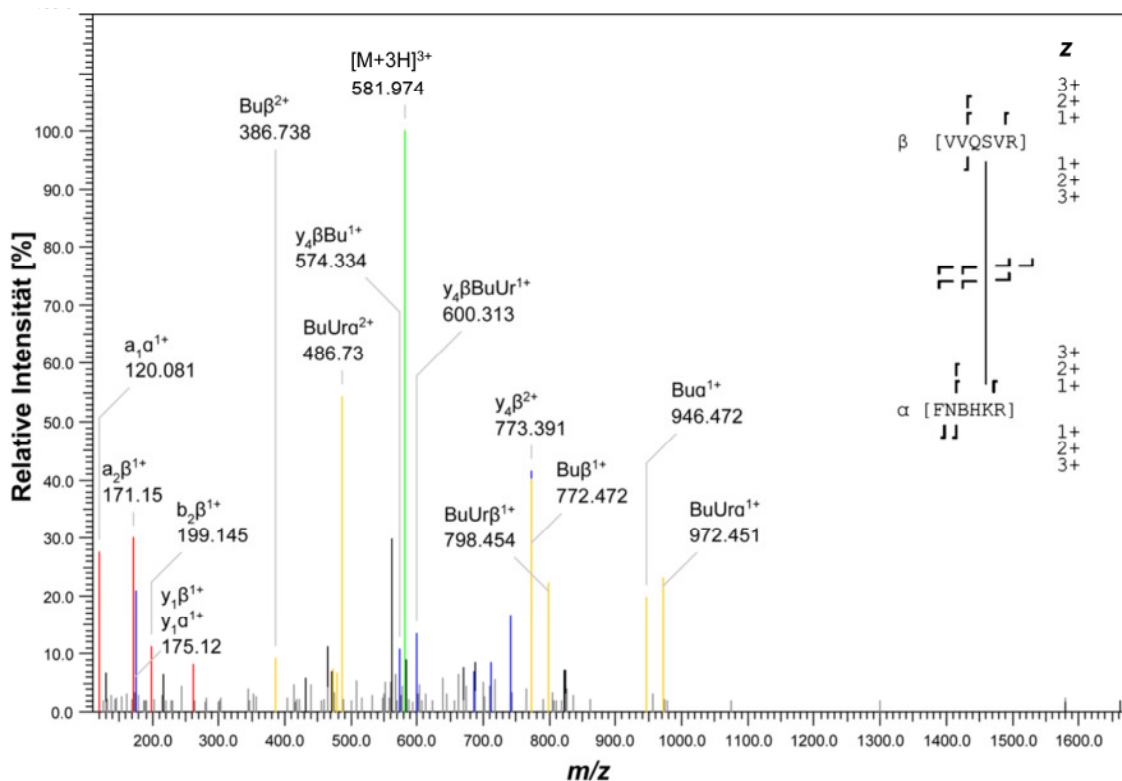
K296-K590 Vorläuferion: m/z 694,332 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 2080,980 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 2080,978 / \Delta m = 0,44 \text{ ppm}$$



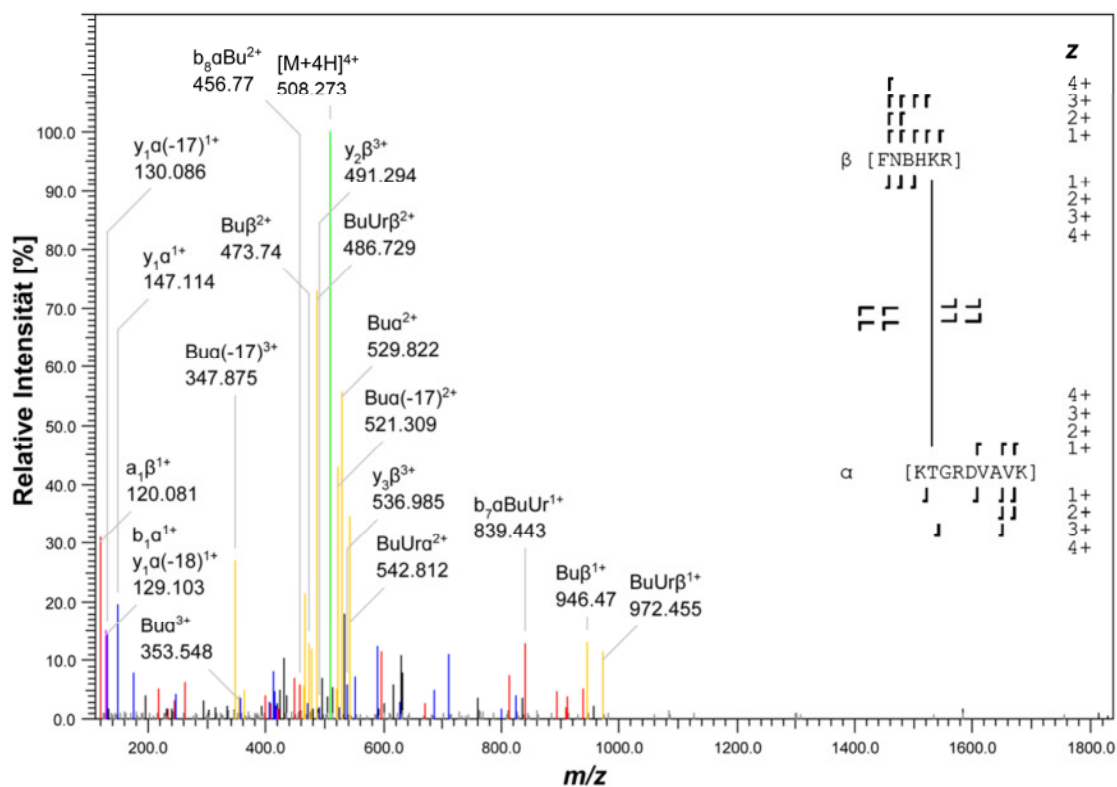
K299-K572 Vorläuferion: m/z 588,947 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1764,826 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1764,827 / \Delta m = 0,39 \text{ ppm}$$



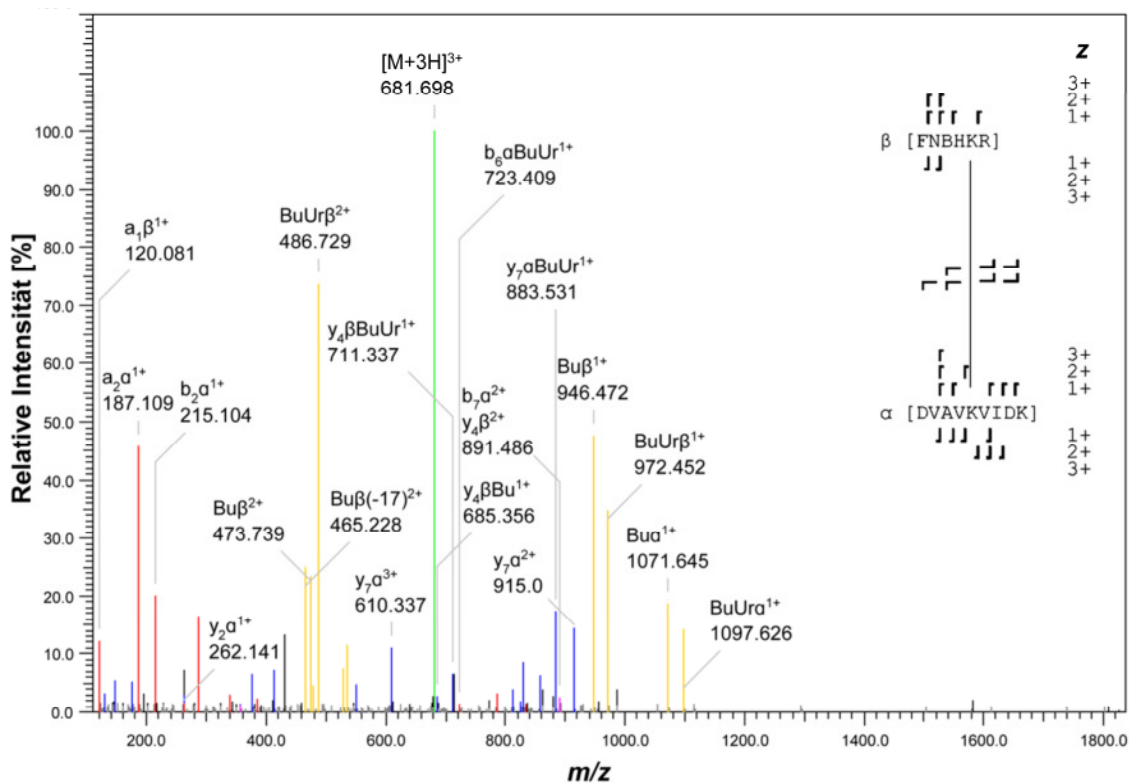
K304-S387 Vorläuferion: m/z 581,974 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1743,907 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1743,907 / \Delta m = 0,18 \text{ ppm}$$



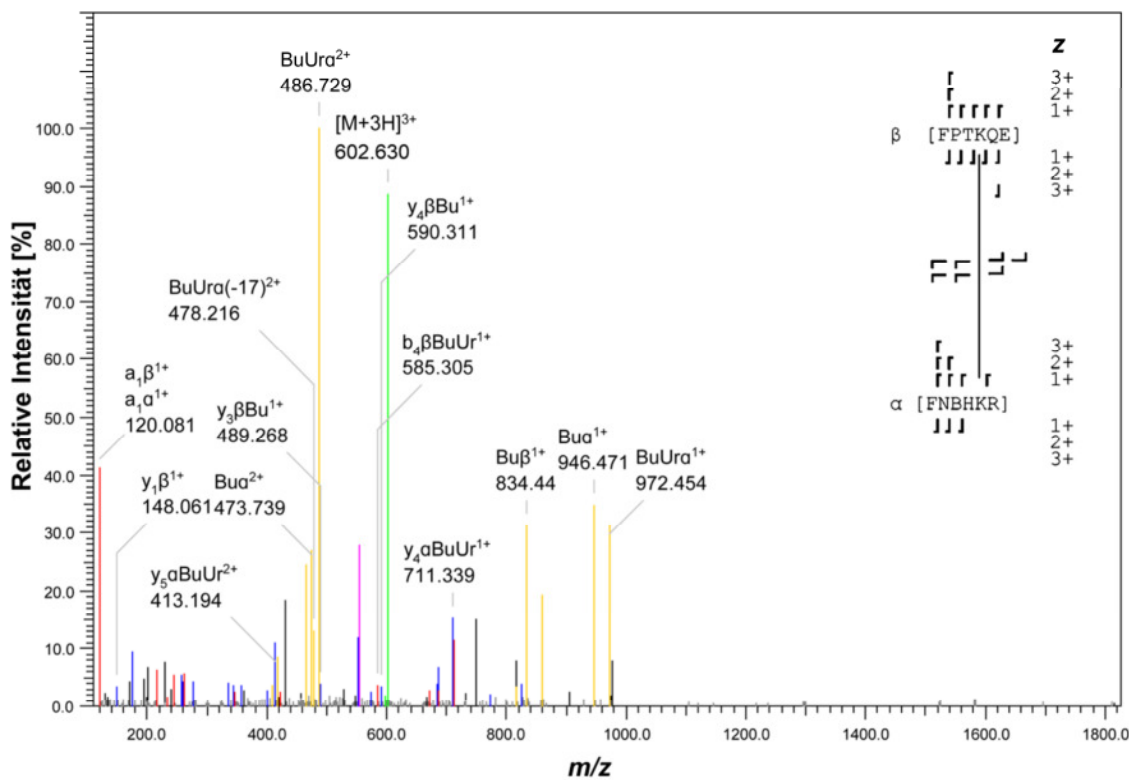
K304-K572 Vorläuferion: m/z 508,273 / $z = 4^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 2030,070 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 2030,071 / \Delta m = 0,52 \text{ ppm}$$



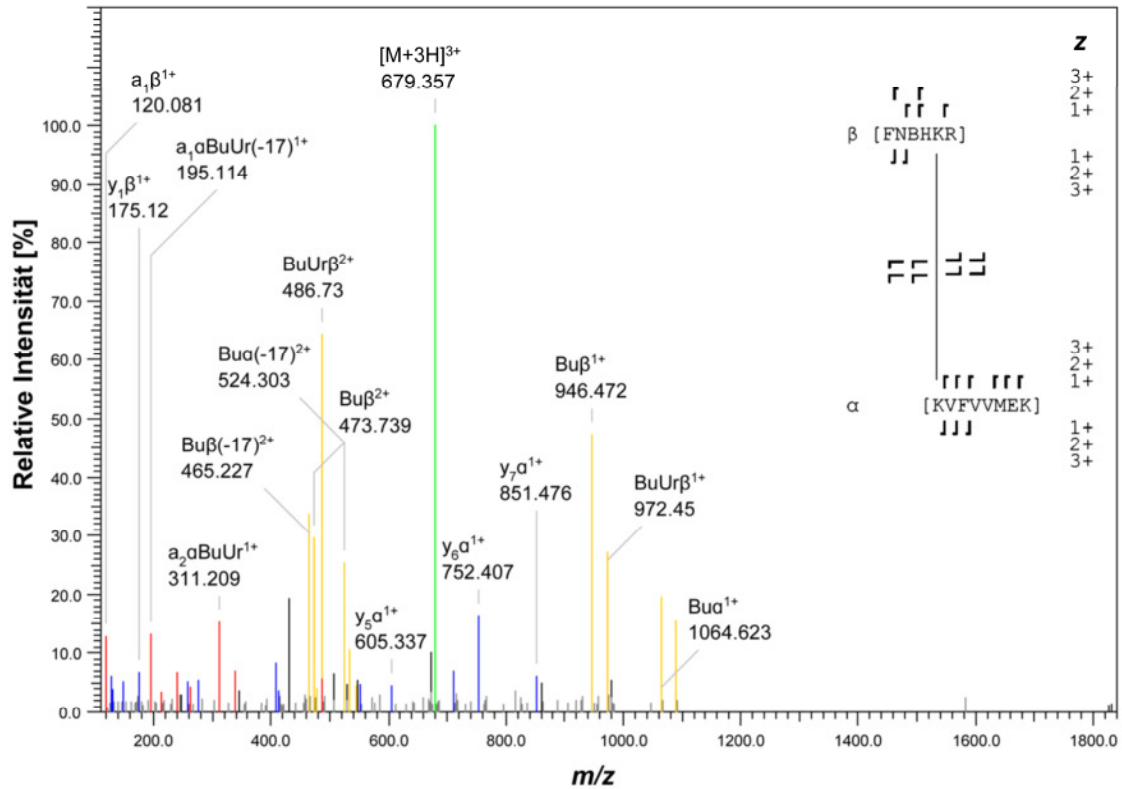
K304-K580 Vorläuferion: m/z 681,698 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 2043,080 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 2043,080 / \Delta m = 0,09 \text{ ppm}$$



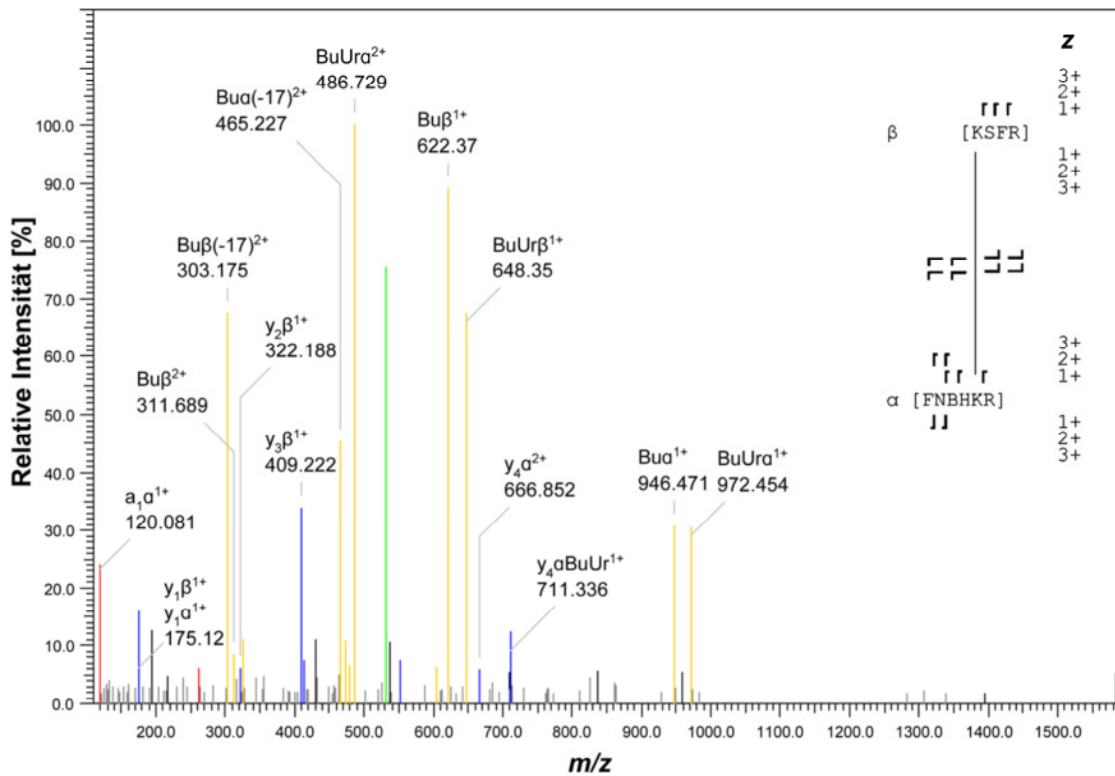
K304-K590 Vorläuferion: m/z 602,630 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1805,875 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1805,875 / \Delta m = 0,14 \text{ ppm}$$



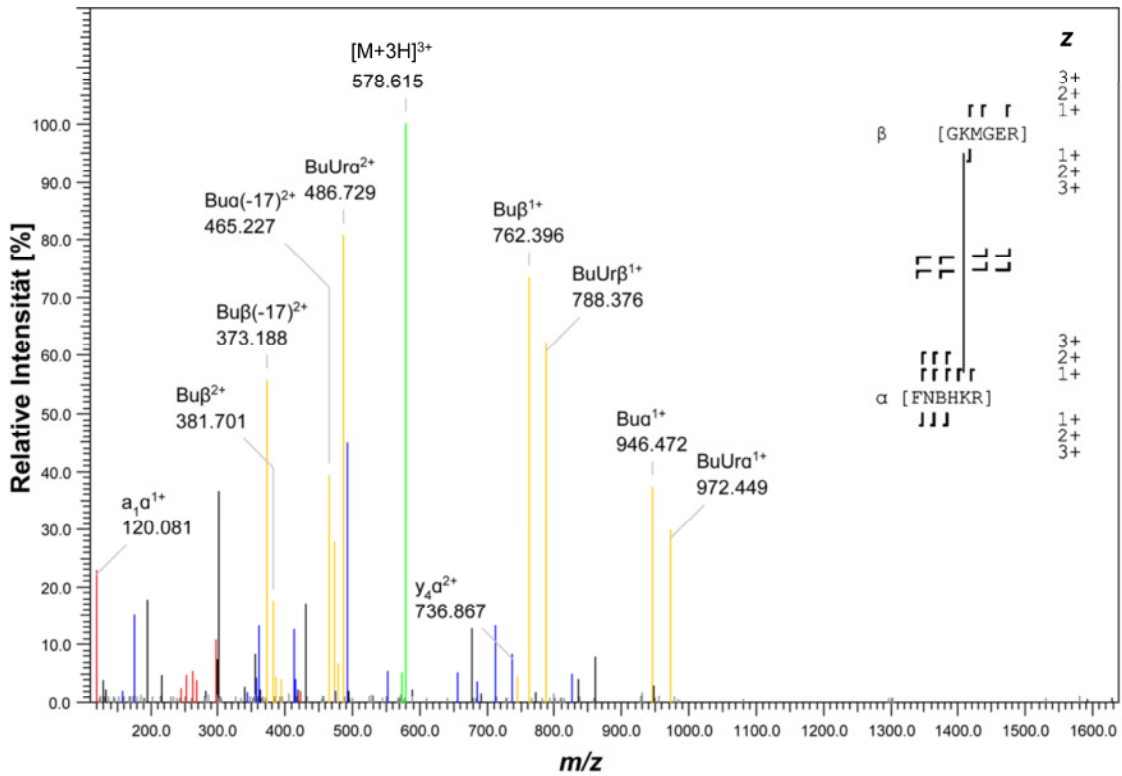
K304-K622 Vorläuferion: m/z 679,357 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]_{\text{exp}}^+ = 2036,057 / [M+H]_{\text{theo}}^+ = 2036,057 / \Delta m = 0,08 \text{ ppm}$$



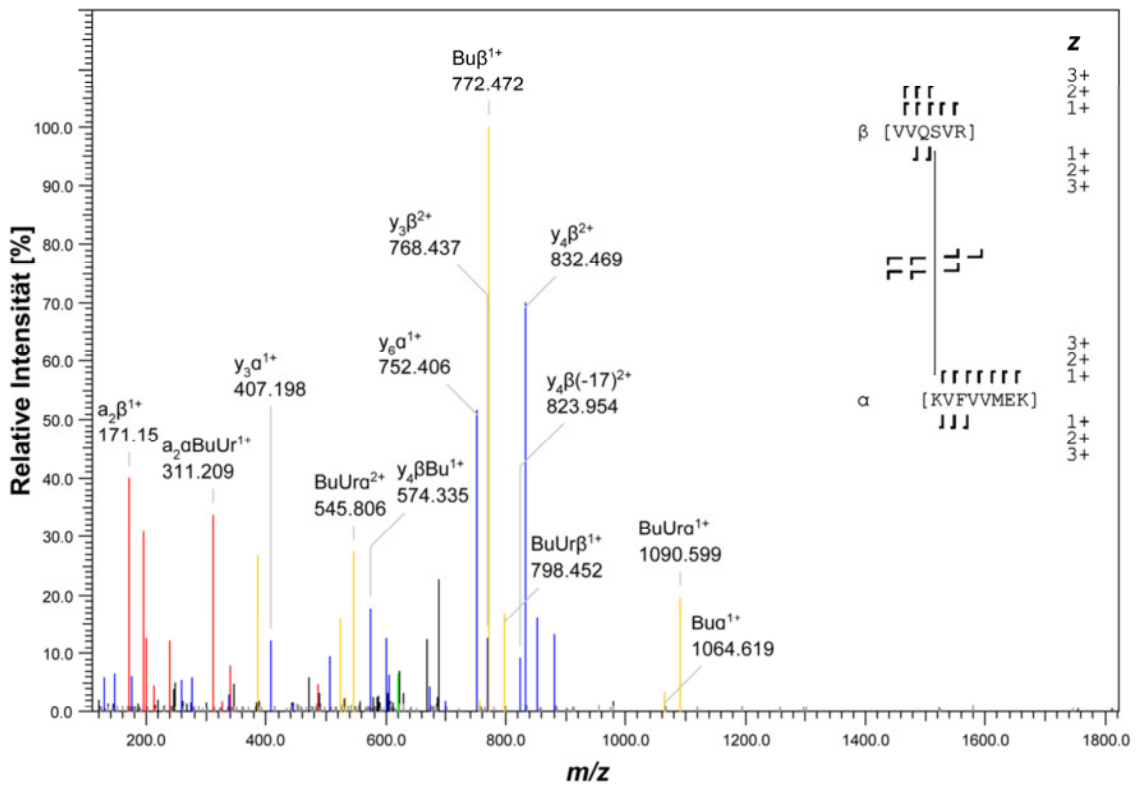
K304-K705 Vorläuferion: m/z 531,940 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]_{\text{exp}}^+ = 1593,806 / [M+H]_{\text{theo}}^+ = 1593,807 / \Delta m = 0,55 \text{ ppm}$$



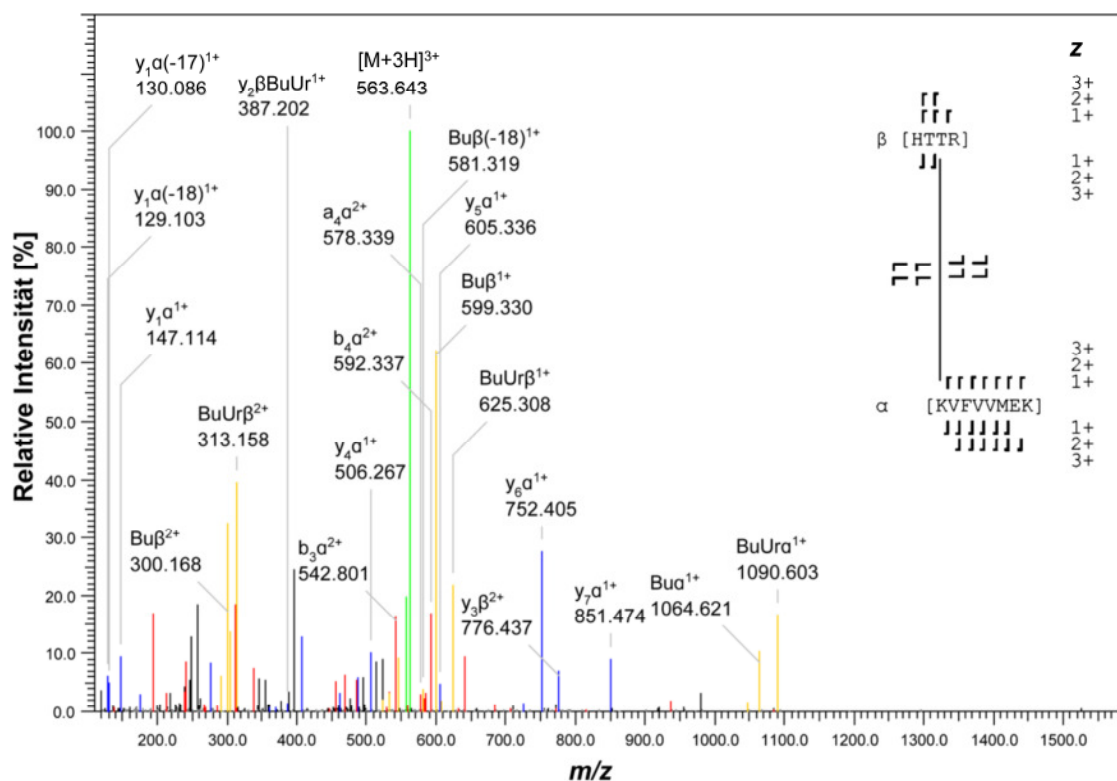
K304-K822 Vorläuferion: m/z 578,615 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1733,831 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1733,832 / \Delta m = 0,56 \text{ ppm}$$



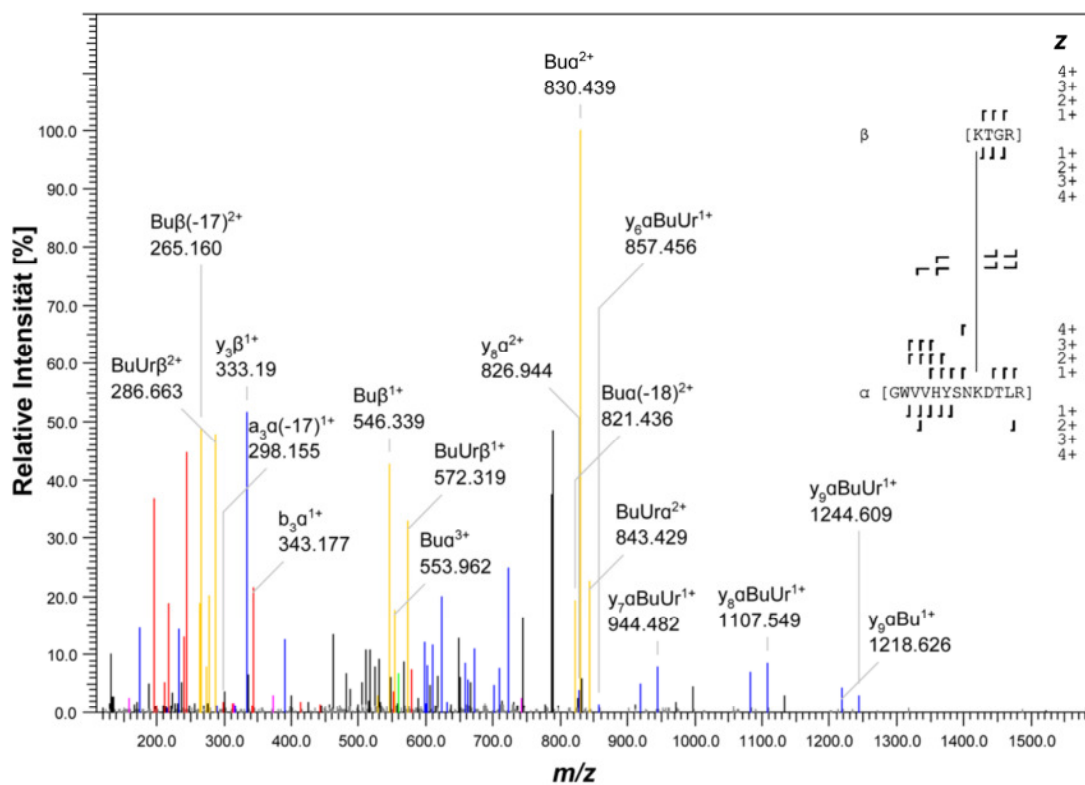
S387-K622 Vorläuferion: m/z 621,357 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1862,056 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1862,057 / \Delta m = 0,31 \text{ ppm}$$



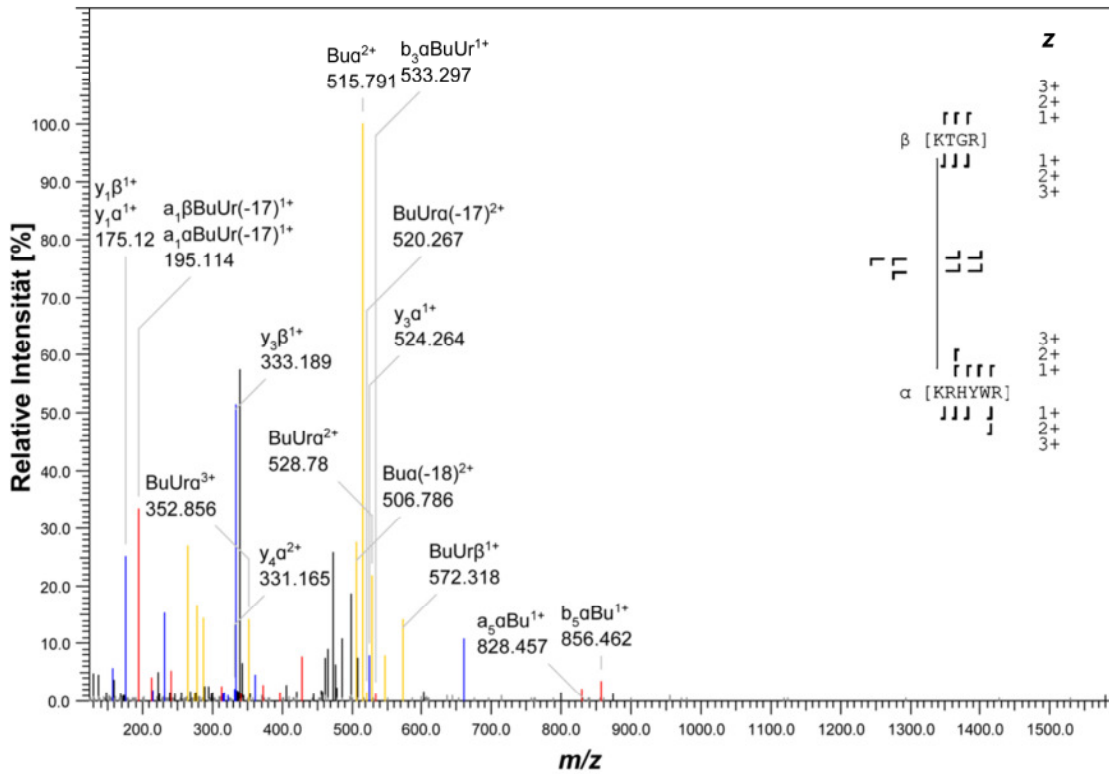
T392-K622 Vorläuferion: m/z 563,643 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1688,915 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1688,915 / \Delta m = 0,18 \text{ ppm}$$



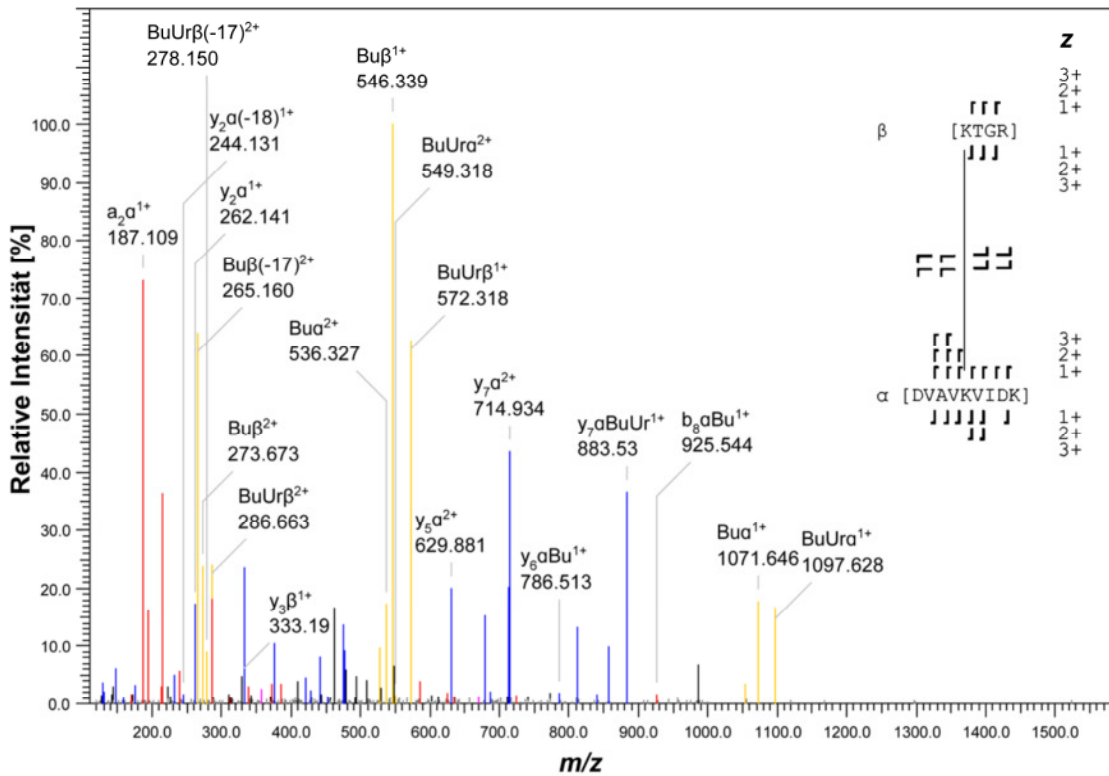
K410-K572 Vorläuferion: m/z 558,547 / $z = 4^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 2231,168 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 2231,168 / \Delta m = 0,07 \text{ ppm}$$



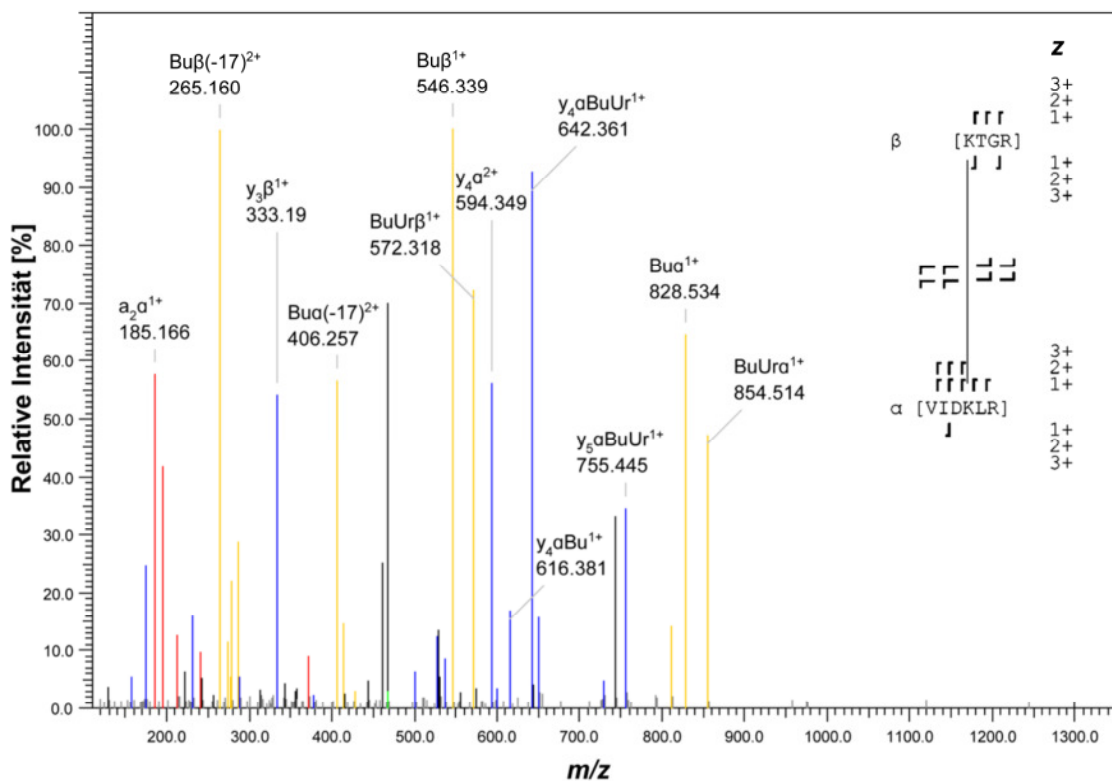
K415-K572 Vorläuferion: m/z 401,224 / $z = 4^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1601,876 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1601,877 / \Delta m = 0,81 \text{ ppm}$$



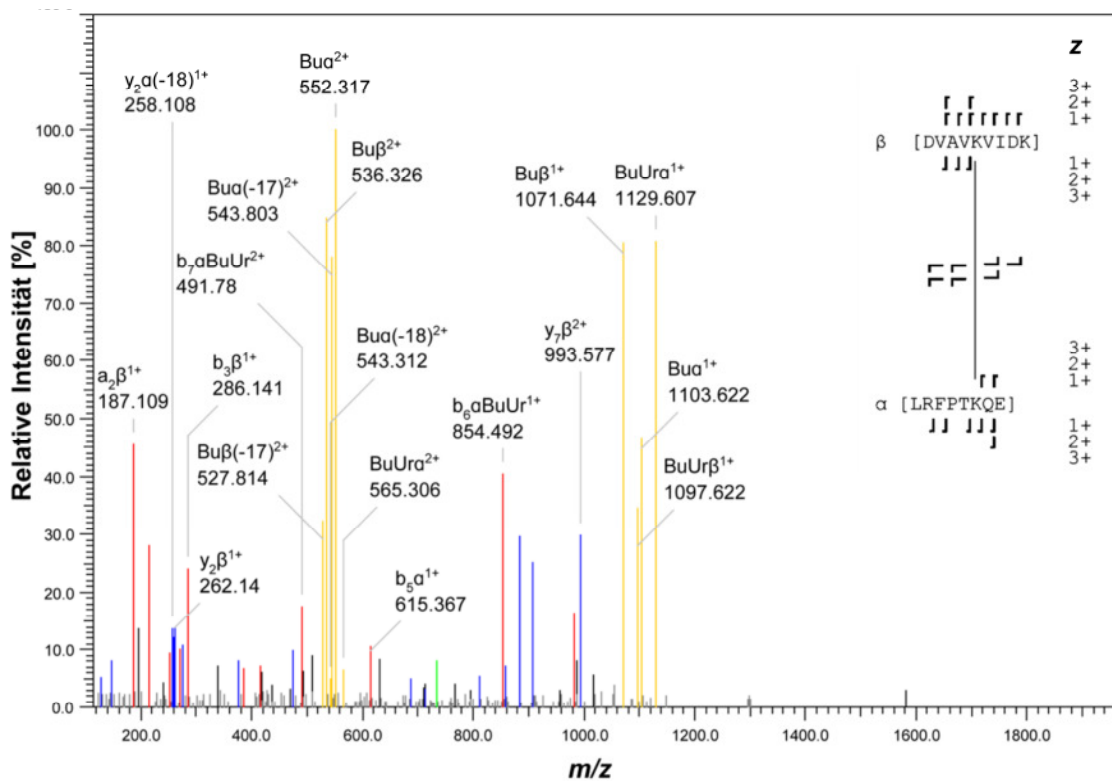
K572-K580 Vorläuferion: m/z 548,321 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1642,948 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1642,949 / \Delta m = 0,27 \text{ ppm}$$



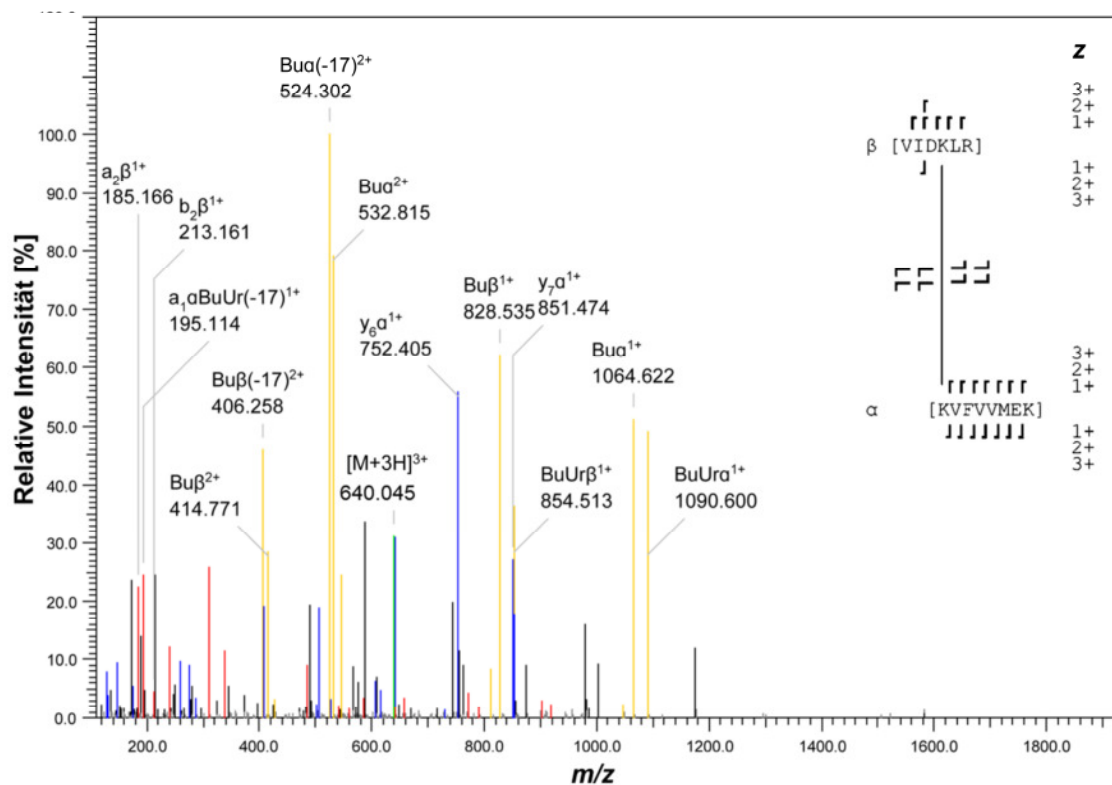
K572-K584 Vorläuferion: m/z 467,284 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1399,837 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1399,838 / \Delta m = 0,44 \text{ ppm}$$



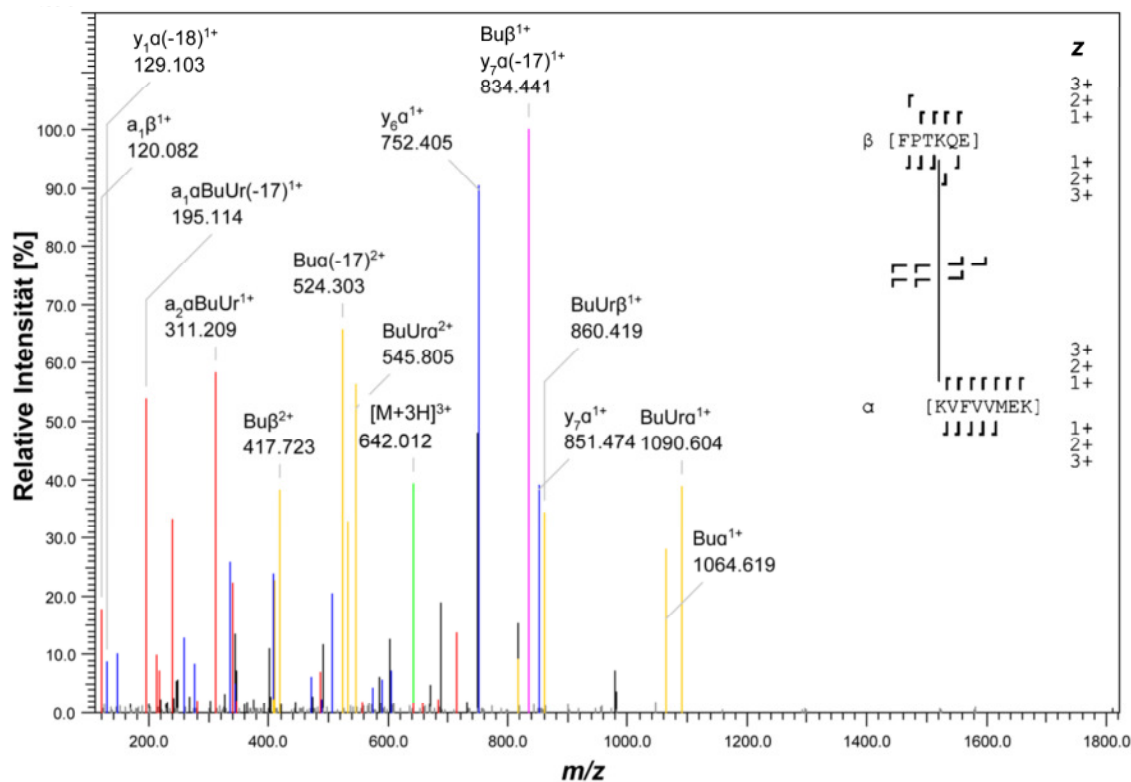
K580-K590 Vorläuferion: m/z 734,083 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 2200,234 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 2200,234 / \Delta m = 0,16 \text{ ppm}$$



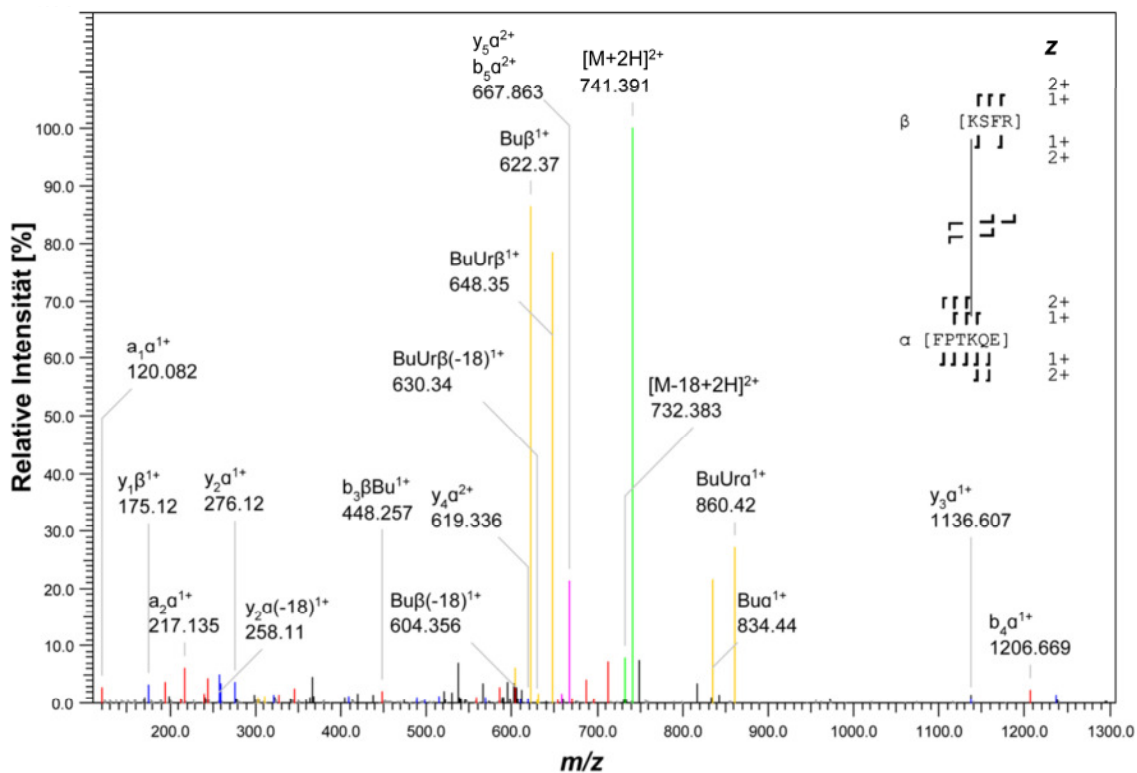
K584-K622 Vorläuferion: m/z 640,045 / $z = 3^+$ /

$$[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{exp}} = 1918,119 / [\text{M}+\text{H}]^+_{\text{theo}} = 1918,119 / \Delta m = 0,13 \text{ ppm}$$



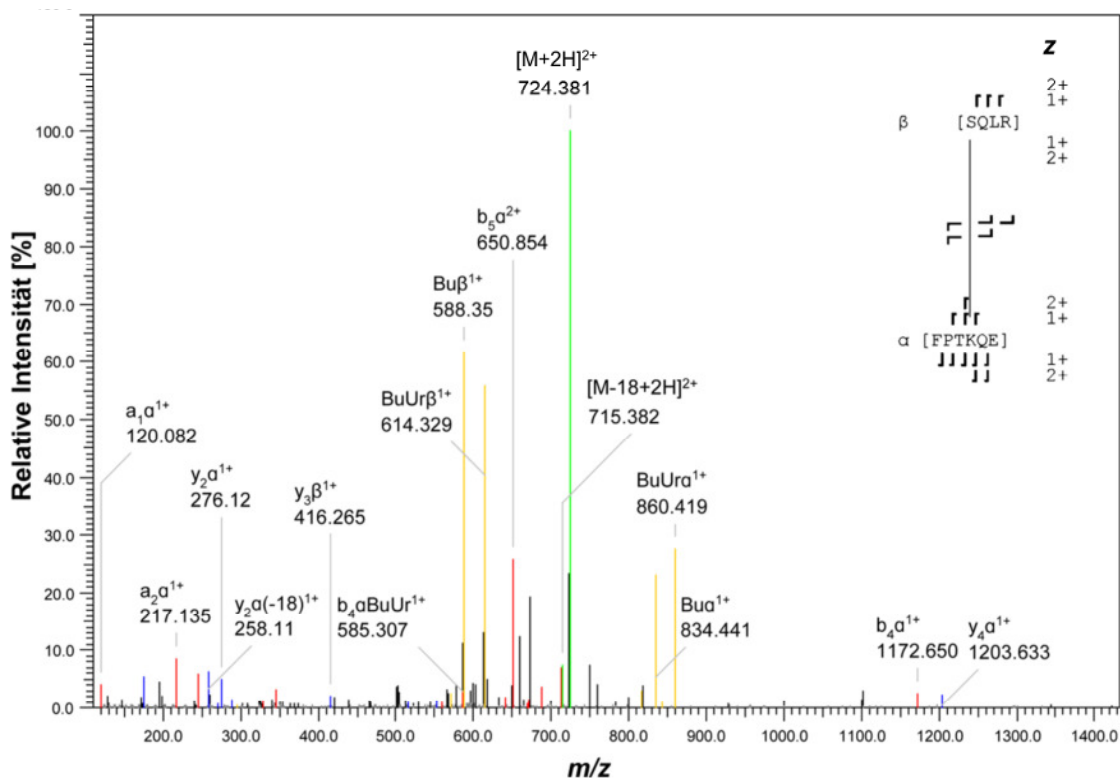
K590-K622 Vorläuferion: m/z 642,012 / $z = 3^+$ /

$$[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{exp}} = 1924,022 / [\text{M}+\text{H}]^+_{\text{theo}} = 1924,025 / \Delta m = 1,47 \text{ ppm}$$



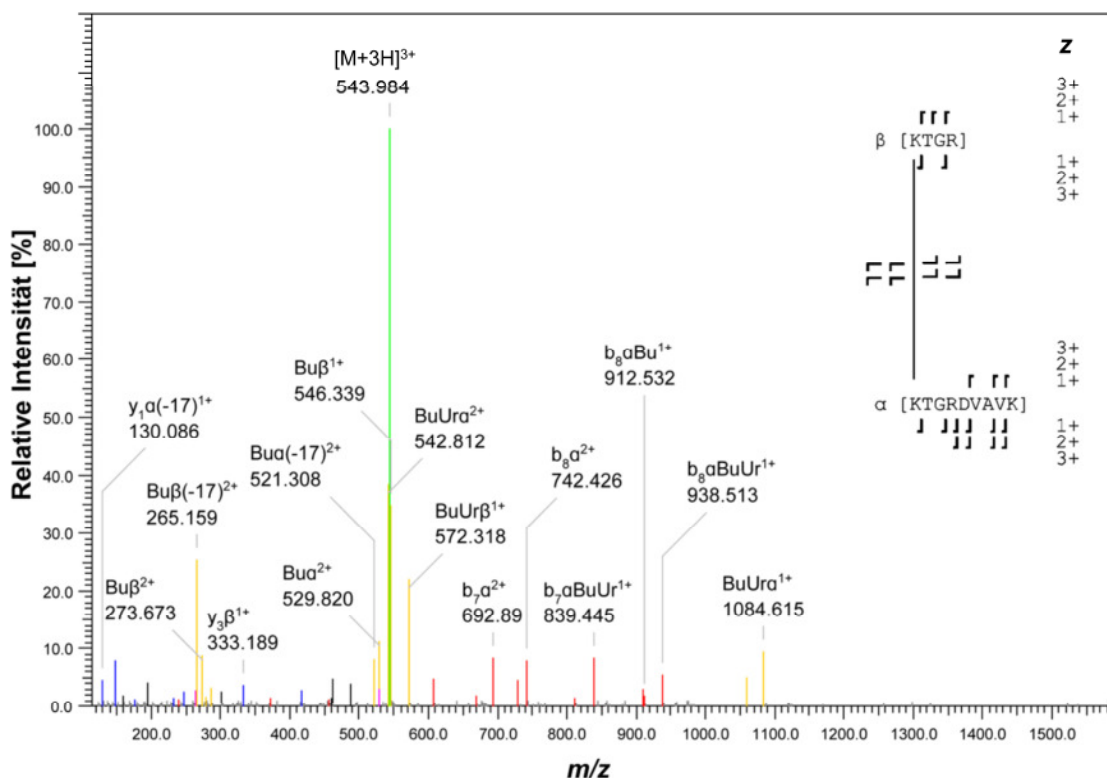
K590-K705 Vorläuferion: m/z 741,391 / $z = 2^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1481,774 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1481,775 / \Delta m = 0,46 \text{ ppm}$$



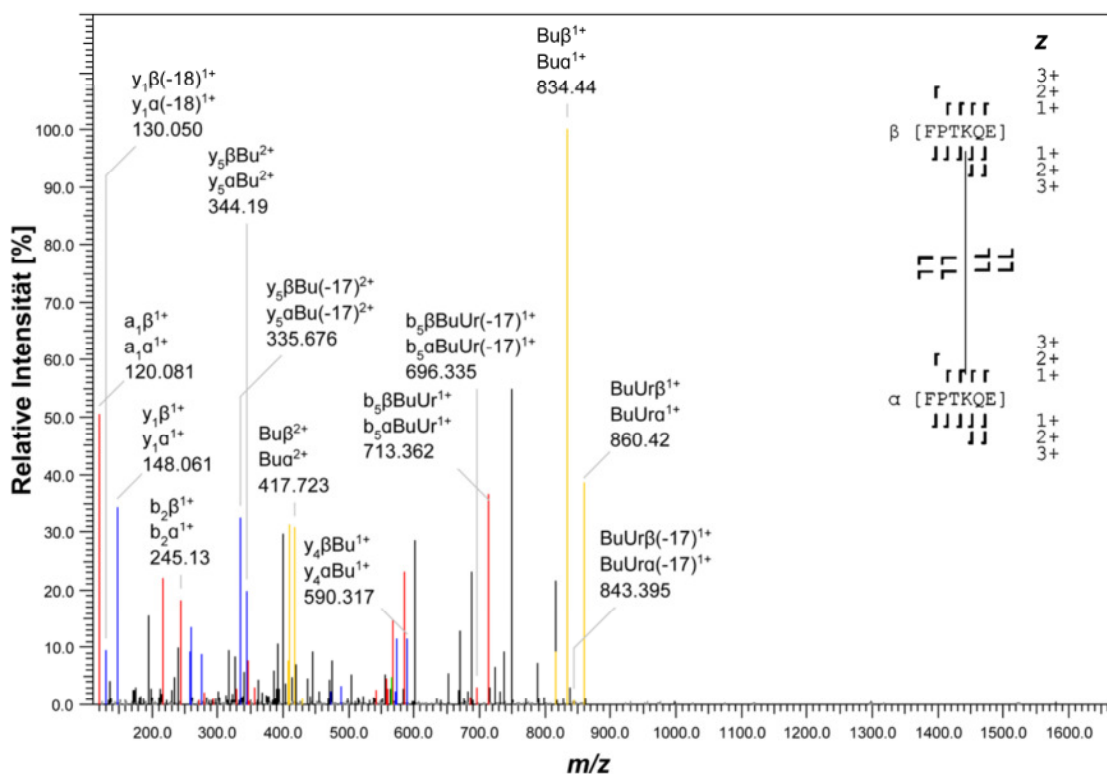
S593-K590 Vorläuferion: m/z 724,381 / $z = 2^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1447,754 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1447,754 / \Delta m = 0,20 \text{ ppm}$$



K572-K572 Vorläuferion: m/z 543,984 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1629,939 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1629,939 / \Delta m = 0,38 \text{ ppm}$$



K590-K590 Vorläuferion: m/z 565,286 / $z = 3^+$ /

$$[M+H]^+_{\text{exp}} = 1693,843 / [M+H]^+_{\text{theo}} = 1693,843 / \Delta m = 0,34 \text{ ppm}$$

Publikationen

Originalarbeiten

Häupl, B., Ihling, C. H., Sinz, A., *Combining affinity enrichment, cross-linking with photo-amino acids, and mass spectrometry for probing protein kinase D2 interactions.* Proteomics 2017, DOI: 10.1002/pmic.201600459.

Häupl, B., Ihling, C. H., Sinz, A., *Protein Interaction Network of Human Protein Kinase D2 Revealed by Chemical Cross-Linking/Mass Spectrometry.* J Proteome Res 2016, 15, 3686-3699.

Vortrag

Häupl, B., *Characterization of Protein Kinase D2 Complexes at the trans-Golgi Network.* „Spring Meeting“ des DFG-Graduiertenkollegs 1026, 23.02.2013, Meißen.

Posterbeiträge

Häupl, B., Ihling, C. H., Sinz, A., *Characterization of Human Protein Kinase D2 Complexes by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry.* 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 28.02.-02.03.2016, Hamburg.

Häupl, B., Ihling, C. H., Sinz, A., *Characterization of Human Protein Kinase D2 Complexes by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry.* „5th Symposium on Structural Proteomics“, 19.-20.11.2015, Halle (Saale).

Häupl, B., Tänzler, D., Ihling, C. H., Sinz, A., *Structural Analysis of Protein Kinase D2 by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry.* 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 01.-04.03.2015, Wuppertal.

Häupl, B., Becher, A., Temme, C., Seufferlein, T., Sinz, A., *Characterization of Protein Kinase D2 Complexes at the trans-Golgi Network*. 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 02.-05.03.2014, Frankfurt am Main.

Häupl, B., Becher, A., Temme, C., Seufferlein, T., Sinz, A., *Characterization of Protein Kinase D2 Complexes at the trans-Golgi Network*. „3rd International Meeting“ des DFG-Graduiertenkollegs 1026, 04.-06.11.2013, Halle (Saale).

Häupl, B., Temme, C., Seufferlein, T., Sinz, A., *Characterization of Protein Kinase D2 Complexes at the trans-Golgi Network*. 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 10.-13.03.2013, Berlin.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 15.03.1985
Geburtsort: Meiningen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang / Promotion

Seit Oktober 2017 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Deutschen Konsortium für
Translationalen Krebsforschung (DKTK) des Deutschen
Krebsforschungszentrums (DKFZ),
Standort: Universitätsklinikum Frankfurt am Main

Dezember 2012 bis Doktorand am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-
Dezember 2016 Universität Halle-Wittenberg,
Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik
(Leitung: Prof. Dr. Andrea Sinz)

Bis Dezember 2014 Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs 1026

Januar 2011 bis Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische
Oktober 2012 Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Studium und Schulbildung

Oktober 2004 bis Diplom-Studiengang Biologie an der Martin-Luther-Universität
Dezember 2010 Halle-Wittenberg
– Diplomarbeit am Institut für Medizinische Immunologie:
„Komparative Gesamt- und Membranproteomanalysen zur
Charakterisierung der Sphäroidkultivierung als in vitro-
Modell der Tumorprogression humaner Kolonkarzinom-
Zelllinien“

1995 bis 2003 Gymnasium Georgianum Hildburghausen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei meinem Promotionsvorhaben begleitet und unterstützt haben, beruflich sowie privat.

An erster Stelle gilt mein größter Dank Frau Prof. Dr. Andrea Sinz für die großartige Möglichkeit, diese spannende Thematik als Mitglied ihrer Arbeitsgruppe zu bearbeiten, für das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie ihren Anteil an meiner fachlichen und persönlichen Weiterentwicklung. Und insbesondere dafür, dass mir ihre Tür bei allen Fragen und Anliegen wissenschaftlicher sowie organisatorischer Natur jederzeit offen stand.

Bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Schwarz und Frau Prof. Dr. Katrin Marcus bedanke ich mich vielmals für die Anfertigung des Zweit- bzw. Drittgutachtens sowie das damit verbundene Interesse an meinem Promotionsprojekt.

Weiterhin danke ich dem DFG-Graduiertenkolleg 1026 für die Gewährung meines Stipendiums zum Start der Promotion, sowie allen seinen Mitgliedern für die interessanten wissenschaftlichen Einblicke zu Seminaren und Tagungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Seufferlein und seiner Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Ulm möchte ich mich für die Projektkooperation und den Einblick in ihr Labor bedanken. Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Alexander Becher für das vertraut machen mit der Golgi-Apparat-Präparation.

Herrn Prof. Dr. Elmar Wahle vom Institut für Biochemie der MLU Halle-Wittenberg danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Zellkulturlabors seiner Arbeitsgruppe und insbesondere Frau Dr. Claudia Temme für ihre Unterstützung bei der Baculovirus-vermittelten Expression und Reinigung des GST-PKD2-Fusionsproteins.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Cordelia Schiene-Fischer vom Institut für Biochemie der MLU Halle-Wittenberg für die freundliche Überlassung ihres Labors zur Kultivierung humaner Zelllinien.

Ein großes Dankeschön gebührt außerdem allen aktuellen und ehemaligen Mitstreitern der AG Sinz sowie Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie, die ich während meiner Promotionszeit kennenlernen durfte, für die kollegiale, respektvolle und fruchtbare Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Christian Ihling für die Unterstützung bei allen massenspektrometrischen Fragestellungen, Herrn Dr. Jens Pettelkau für die Einführung in die Auswertung von Proteinvernetzungen und

Herrn Dr. Michael Zorn für die Einführung in die Proteinreinigung mittels ÄKTA-Chromatographiesystemen. Zudem möchte ich mich besonders bei Michael und Christine für die Vielzahl aufschlussreicher wissenschaftlicher und kurzweiliger sonstiger Diskussionen sowie für das Lektorat des Manuskripts meiner Dissertation herzlich bedanken.

Mein größter persönlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen großartigen Eltern Jutta und Helmut, für ihre fortwährende und bedingungslose Unterstützung, sowie Anika für ihren unermüdlichen und liebevollen Rückhalt.

Zudem danke ich meinen Freunden, besonders Jens, Michael und Christine, für ihr Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und den einen oder anderen hilfreichen Ratschlag.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich nicht bereits vergebliche Promotionsversuche unternommen habe und die Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung bereits einer anderen Fakultät vorgelegt habe.
