

# Massenspektrometrische Untersuchungen am Guanylatcyclase-aktivierenden Protein-2

Dissertation

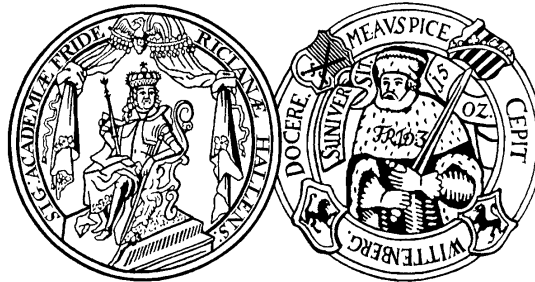
zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**



von Jens Pettelkau

geboren am 10.02.1984 in Halle/Saale

GutachterInnen:

1. Prof. Dr. habil. Andrea Sinz
2. Prof. Dr. habil. Birgit Dräger
3. Prof. Dr. habil. Michael W. Linscheid

verteidigt am 23. Januar 2015, Halle (Saale)



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Grundlagen.....</b>	<b>7</b>
1.1 Biologische Grundlagen.....	7
1.1.1 Die Verarbeitung eines Lichtreizes in den Stäbchen und Zapfen der Retina.....	8
1.1.2 Die Guanylatcyclase-aktivierenden Proteine.....	9
1.1.3 Die retinale Guanylatcyclase und ihre Interaktion mit GCAP.....	10
1.1.4 Calmodulin (CaM) und die Skelettmuskel-Myosin-leichte-Ketten-Kinase (skMLCK).....	14
1.2 Massenspektrometrische Grundlagen .....	15
1.2.1 Ionisierungsmethoden.....	15
1.2.2 Massenanalysatoren.....	19
1.2.3 Fragmentierungsmethoden .....	26
1.3 Protein-Strukturanalysen mittels chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie.....	27
1.3.1 Prinzip der chemischen Quervernetzung und die Identifizierung der Quervernetzungsprodukte.....	28
1.3.2 Quervernetzungsreagenzien.....	30
1.3.3 Identifizierung der Quervernetzungsprodukte.....	34
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>37</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>38</b>
3.1 Material .....	38
3.1.1 Chemikalien.....	38
3.1.2 Verwendete Lösungen und Fließmittel.....	39
3.1.3 Peptide und Proteine .....	40

3.1.4	Geräte .....	41
3.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	42
3.1.6	Software .....	43
3.2	Methoden .....	45
3.2.1	Pufferwechsel mittels Filtration .....	45
3.2.2	Chemische Quervernetzungsexperimente .....	45
3.2.3	Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
3.2.4	Enzymatische Proteolyse .....	47
3.2.5	Massenspektrometrische Methoden .....	50
3.2.6	Organisch-präparative Methoden.....	54
3.3	Zusätzlich verwendete Methoden .....	60
3.3.1	Circular Dichroismus (CD)-Analyse des GC-Peptids 1.....	60
3.3.2	Erstellung des Strukturmodells des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes .....	60
3.3.3	Chromatographische Trennung der D- und L-Bpa-Peptide .....	61
3.3.4	Größenausschlusschromatographie zur Analyse des GCAP-2-Homodimers .....	61
3.3.5	Analytische Ultrazentrifugation (AUC).....	62
3.3.6	Erstellung des GCAP-2-Homodimer-Strukturmodells .....	62
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
4.1	Quervernetzungsexperimente zwischen Peptiden der retinalen Guanylatcyclase (ROS-GC) und dem Guanylatcyclase-aktivierenden Protein-2 (GCAP-2) .....	64
4.1.1	Quervernetzungsexperimente zwischen dem GC-Peptid 1 und GCAP-2.....	65
4.1.2	Quervernetzungsexperimente zwischen dem GC-Peptid 2 und GCAP-2.....	76
4.2	Quervernetzungsexperimente mit <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -markiertem <i>p</i> -Benzoylphenylalanin (Bpa) .	79
4.2.1	Nachweis der Enantiomerenreinheit des <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -markierten Bpa .....	79
4.2.2	Interaktion zwischen Calmodulin und M13 (skMLCK-Peptid).....	80
4.2.3	Quervernetzungsexperimente zwischen GCAP-2 und dem isotoopenmarkierten GC-Photo-Peptid 3 .....	91
4.2.4	Charakteristische Fragmentierung der Quervernetzungsprodukte mit Bpa.....	94
4.3	Homodimerisierung von GCAP-2 .....	99
4.3.1	Massenspektrometrische Identifizierung der intermolekularen Quervernetzungsprodukte im GCAP-2-Homodimer anhand charakteristischer Isotoopenmuster .....	101

4.3.2	Identifizierung der quervernetzten Kontaktstellen zwischen den GCAP-2-Monomeren.....	104
4.3.3	Identifizierung charakteristischer Fragmentionen .....	107
4.3.4	Erstellung eines Strukturmodells des GCAP-2-Homodimers .....	108
4.4	Identifizierung von Quervernetzungsprodukten mit einem Harnstoff-basierten Quervernetzungsreagenz .....	111
4.4.1	Automatisierte Identifizierung von GCAP-2-Quervernetzungsprodukten nach Reaktion mit dem Harnstoff-Reagenz .....	112
4.4.2	Ladungsabhängige CID-Fragmentierung der interpeptidalen Quervernetzungsprodukte.....	117
4.4.3	CID-Fragmentierung intrapeptidaler Quervernetzungsprodukte.....	119
4.4.4	Analyse der Quervernetzungsprodukte mittels Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie.....	121
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>124</b>
5.1	Potential der unterschiedlichen Quervernetzungsstrategien für die Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen .....	124
5.2	Strukturelle Analysen an GCAP-2 und GCAP-2/ROS-GC-Peptidkomplexen .....	127
5.2.1	GCAP-2/GC-Peptid-Interaktionen .....	127
5.2.2	GCAP-2-Homodimer.....	129
5.3	Charakteristische Fragmentierung von Bpa-Quervernetzungsprodukten.....	130
5.4	Ladungsabhängige Fragmentierung des Harnstoff-Reagenzes .....	131
5.5	Grenzen der analytischen Strategie .....	132
<b>6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>135</b>
	<b>Literaturreferenzen .....</b>	<b>XVII</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>XXIX</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>CXIII</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>CXV</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>CXVII</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>CXVIII</b>

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1</b>	Darstellung des Auges mit einer Vergrößerung der Retina.....	7
<b>Abb. 2</b>	Darstellung der Stäbchenzellen ( <i>rods</i> ) und Illustration der Signalverarbeitung.....	9
<b>Abb. 3</b>	Strukturvergleich der GCAP-Isoformen.....	10
<b>Abb. 4</b>	Schematischer Aufbau der retinalen Guanylatcyclase (ROS-GC 1).....	11
<b>Abb. 5</b>	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Aktivierung der ROS-GC durch GCAP-1 und GCAP-2.....	13
<b>Abb. 6</b>	Struktur des Calmodulins und des CaM/M13-Peptid Komplexes.....	14
<b>Abb. 7</b>	Darstellung der MALDI.....	16
<b>Abb. 8</b>	Schematische Darstellung einer ESI-Quelle.....	17
<b>Abb. 9</b>	Darstellung der Prozesse bei der Elektrospray-Ionisierung.....	18
<b>Abb. 10</b>	Schematische Darstellung eines linearen TOF-Analysators.....	20
<b>Abb. 11</b>	Schematische Darstellung des MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers.....	21
<b>Abb. 12</b>	Orbitrap-Massenanalysator.....	22
<b>Abb. 13</b>	Quadrupol-Massenfilter.....	23
<b>Abb. 14</b>	Segmentierte lineare Ionenfalle.....	24
<b>Abb. 15</b>	LITQ-Orbitrap XL Hybridmassenspektrometers.....	25
<b>Abb. 16</b>	Orbitrap Fusion Tribrid-Hybridmassenspektrometers.....	25
<b>Abb. 17</b>	Fragmentierungsschema am Beispiel eines Tripeptids.....	27
<b>Abb. 18</b>	Strukturanalyse von Proteinkomplexen.....	30
<b>Abb. 19</b>	Darstellung der Reaktion von BS <sup>2</sup> G.....	32
<b>Abb. 20</b>	Reaktionsschema von Photo-Leucin.....	33
<b>Abb. 21</b>	Reaktionsschema von <i>p</i> -Benzoylphenylalanin.....	33
<b>Abb. 22</b>	Nomenklatur von Quervernetzungsprodukten.....	35
<b>Abb. 23</b>	Strategien zur verbesserten Identifizierung von Quervernetzungsprodukten.....	36
<b>Abb. 24</b>	Aminosäuresequenz des GCAP-2 und Bindungsmotiven aus der ROS-GC 1.....	65
<b>Abb. 25</b>	Massenspektrometrische Analyse des intakten Komplexes aus GCAP-2 und GC-Peptid 1 nach chemischer Quervernetzung mit BS <sup>2</sup> G.....	66
<b>Abb. 26</b>	Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der GCAP-2/GC-Peptid 1 Quervernetzungsansätze mit BS <sup>2</sup> G.....	67
<b>Abb. 27</b>	NMR-Struktur des nicht-myristoylierten GCAP-2 mit identifizierten Quervernetzungen.....	69
<b>Abb. 28</b>	Massenspektrometrische Identifizierung eines BS <sup>2</sup> G-Quervernetzungsprodukts zwischen GCAP-2 und GC-Peptid 1.....	70

<b>Abb. 29</b> Massenspektrometrische Analyse der intakten Komplexe zwischen GCAP-2 und den GC-Photo-Peptiden 1a und b.....	72
<b>Abb. 30</b> Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1a.....	72
<b>Abb. 31</b> NMR-Struktur des nicht-myristoylierten GCAP-2 und identifizierte Quervernetzungen mit den GC-Photo-Peptiden 1a und 1b.....	74
<b>Abb. 32</b> CID-Fragmentationenmassenspektrum eines Quervernetzungsprodukts zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1b.....	75
<b>Abb. 33</b> Strukturmodell des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes.....	76
<b>Abb. 34</b> Massenspektrometrische MALDI-TOF-MS-Analyse der intakten Komplexe aus GCAP-2 und GC-Peptid 2.....	77
<b>Abb. 35</b> CID-Fragmentationenmassenspektrum eines quervernetzten Produkts zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 2a.....	78
<b>Abb. 36</b> Chromatographische Trennung der D- und L-Bpa-M13 Peptide.....	80
<b>Abb. 37</b> Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Reaktionsansätze zwischen CaM und Bpa-M13.....	81
<b>Abb. 38</b> Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS-Analyse des intakten CaM/Bpa-M13-Komplexes.....	82
<b>Abb. 39</b> Identifizierung eines Quervernetzungsprodukts zwischen CaM und Bpa-M13.....	84
<b>Abb. 40</b> NMR-Struktur des CaM/M13-Komplexes.....	85
<b>Abb. 41</b> Bestimmung der Bindungsmodi aus den extrahierten Ionenchromatogrammen.....	86
<b>Abb. 42</b> CID-Fragmentierung des intakten CaM/M13-Komplexes.....	88
<b>Abb. 43</b> ETD-Fragmentierung des intakten CaM/M13-Komplexes.....	90
<b>Abb. 44</b> Identifizierung eines Quervernetzungsproduktes zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 3.....	93
<b>Abb. 45</b> CID-Fragmentationenmassenspektren eines Quervernetzungsproduktes zwischen CaM und Bpa-M13.....	95
<b>Abb. 46</b> CID-Fragmentationenmassenspektren eines Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa und einem <i>N</i> -terminalen Methionin.....	97
<b>Abb. 47</b> CID-Fragmentationenmassenspektren eines Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa und einem oxidierten Methionin.....	98
<b>Abb. 48</b> Hypothese der Fragmentierung der Bpa-Quervernetzungsprodukte zu <i>N</i> -terminalen und oxidierten Methioninen.....	99
<b>Abb. 49</b> Größenausschlusschromatographie des GCAP-2.....	100

<b>Abb. 50</b> Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Reaktionsansätze zwischen $^{14}\text{N}$ -GCAP-2 und $^{15}\text{N}$ -markiertem GCAP-2 .....	102
<b>Abb. 51</b> Massenspektren der Quervernetzungsprodukte mit charakteristischen Isotopenmustern.....	103
<b>Abb. 52</b> Identifizierung einer intermolekularen Quervernetzung des $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2-Homodimers .....	105
<b>Abb. 53</b> Struktur der charakteristischen Fragmentationen von Quervernetzungsprodukten von NHS-Estern.....	108
<b>Abb. 54</b> Modell des GCAP-2-Homodimers im $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand .....	110
<b>Abb. 55</b> Schema zur CID-Fragmentierung der Quervernetzungsprodukte des Harnstoff-Reagenzes.....	112
<b>Abb. 56</b> CID-Fragmentationenmassenspektren eines mit partiell hydrolysiertem Harnstoff-Reagenz modifizierten GCAP-2-Peptids .....	114
<b>Abb. 57</b> CID-Fragmentationenmassenspektren eines interpeptidalen Quervernetzungsproduktes des GCAP-2 zwischen Lys-29 und Lys-46 .....	116
<b>Abb. 58</b> CID-Fragmentationenmassenspektren eines GCAP-2-Quervernetzungsproduktes zwischen Lys-178 und Lys-200 .....	118
<b>Abb. 59</b> MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenmassenspektrum eines mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifizierten GCAP-2 Peptids.....	122
<b>Abb. 60</b> MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenmassenspektrum eines interpeptidalen Quervernetzungsproduktes des GCAP-2.....	123



## Abbildungsverzeichnis - Anhang

<b>Abb.-A 1</b>	Sequenzen und Massen der verwendeten Proteine und Peptide.....	XXIX
<b>Abb.-A 2</b>	Ergebnis der PSIPRED- und BHAGEERATH-Strukturvorhersage .....	XXX
<b>Abb.-A 3</b>	CD-spektroskopische Untersuchungen des GC-Peptids 1.....	XXX
<b>Abb.-A 4</b>	Gelelektrophoretische Trennung der quervernetzten Proben zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 3 .....	XXXI
<b>Abb.-A 5</b>	CID-Fragmentationenmassenspektren eines Quervernetzungsprodukts zwischen Met-144/145 des CaM und Bpa-4 des Bpa-M13.....	XXXII
<b>Abb.-A 6</b>	CID-Fragmentationenmassenspektren eines Quervernetzungsprodukts zwischen Bpa und einem <i>N</i> -terminalen Methionin .....	XXXIV
<b>Abb.-A 7</b>	CID-Fragmentationenmassenspektren eines Quervernetzungsprodukts zwischen Bpa und einem oxidierten Methionin .....	XXXV
<b>Abb.-A 8</b>	Identifizierung einer intermolekularen Quervernetzung zwischen Lys-29/30 und Lys-29/30 des Ca <sup>2+</sup> -gebundenen GCAP-2-Homodimer .....	XXXVI
<b>Abb.-A 9</b>	Identifizierung einer intermolekularen Quervernetzung zwischen Lys-50 und Lys-200 des Ca <sup>2+</sup> -freien GCAP-2-Homodimer .....	XXXVII
<b>Abb.-A 10</b>	Vergleich der NMR-Struktur des nicht-myristoylierten GCAP-2 im Ca <sup>2+</sup> -gebundenen Zustand mit den identifizierten Quervernetzungen des Harnstoff-Reagenzes.....	XXXVIII
<b>Abb.-A 11</b>	CID-Fragmentationenmassenspektren eines GCAP-2 Quervernetzungsprodukts des Harnstoff-Reagenzes von zwei aufeinander folgenden Peptiden .....	XXXIX
<b>Abb.-A 12</b>	CID-Fragmentationenmassenspektren eines GCAP-2 Quervernetzungsprodukts des Harnstoff-Reagenzes zwischen Lys-126 und Lys-29 .....	XL
<b>Abb.-A 13</b>	CID-Fragmentationenmassenspektren eines GCAP-2 Quervernetzungsprodukts des Harnstoff-Reagenzes.....	XLI
<b>Abb.-A 14</b>	CID-Fragmentationenmassenspektren verschiedener intrapeptidal vernetzter GCAP-2 Peptide des Harnstoff-Reagenzes .....	XLII
<b>Abb.-A 15</b>	MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenmassenspektrum eines interpeptidalen Quervernetzungsprodukts des Harnstoff-Reagenzes innerhalb des GCAP-2 ..	XLIII

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1** Intermolekulare Quervernetzungsprodukte der GCAP-2-Homodimere ..... 107

## Tabellenverzeichnis - Anhang

**Tabelle-A 1** Identifizierte GC-Peptide ..... XLIV

**Tabelle-A 2** Intramolekulare Quervernetzungsprodukte des GCAP-2 innerhalb des  
GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes ..... XLV

**Tabelle-A 3** Peptide modifiziert mit einem partiell hydrolysierten BS<sup>2</sup>G-Molekül..... XLVIII

**Tabelle-A 4** BS<sup>2</sup>G-Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und GC-Peptid 1..... L

**Tabelle-A 5** Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1a..... LII

**Tabelle-A 6** Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1b..... LV

**Tabelle-A 7** Distanzen innerhalb des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes.....LIX

**Tabelle-A 8** Intermolekulare Quervernetzungsprodukte des CaM/Bpa-M13-  
Komplexes identifiziert aus Gelbande I ..... LX

**Tabelle-A 9** Intermolekulare Quervernetzungsprodukte des CaM/Bpa-M13-  
Komplexes identifiziert aus Gelbande II.....LXIV

**Tabelle-A 10** Intermolekulare Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und  
dem GC-Photo-Peptid 3 nach Reaktion in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> ..... LXXVIII

**Tabelle-A 11** Intermolekulare Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und  
dem GC-Photo-Peptid 3 nach Reaktion in Gegenwart von EGTA .....LXXIX

**Tabelle-A 12** Intermolekulare Quervernetzungsprodukte des GCAP-2-Homodimers  
in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> ..... LXXX

**Tabelle-A 13** Intermolekulare Quervernetzungsprodukte des GCAP-2-Homodimers  
in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> .....LXXXII

**Tabelle-A 14** Identifizierte GCAP-2-Peptide modifiziert mit einem partiell  
hydrolysierten Harnstoff-Reagenz (CaCl<sub>2</sub>) ..... LXXXVI

**Tabelle-A 15** Identifizierte GCAP-2-Peptide modifiziert mit einem partiell  
hydrolysierten Harnstoff-Reagenz (EGTA) .....LXXXVII

**Tabelle-A 16** Identifizierte Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem  
Harnstoff-Reagenz in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> ..... LXXXIX

**Tabelle-A 17** Identifizierte Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem  
Harnstoff-Reagenz in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> ..... XCVII

<b>Tabelle-A 18</b> Potentielle intrapeptidal vernetzte Peptid-Kandidaten.....	CV
<b>Tabelle-A 19</b> MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte GCAP-2-Peptide modifiziert mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz (CaCl <sub>2</sub> ) .....	CVII
<b>Tabelle-A 20</b> MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte GCAP-2-Peptide modifiziert mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz (EGTA) .....	CVIII
<b>Tabelle-A 21</b> MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Gegenwart von Ca <sup>2+</sup> .....	CIX
<b>Tabelle-A 22</b> MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Abwesenheit von Ca <sup>2+</sup> .....	CX
<b>Tabelle-A 23</b> MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte intrapeptidale Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Gegenwart von Ca <sup>2+</sup> .....	CXI
<b>Tabelle-A 24</b> MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte intrapeptidale Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Abwesenheit von Ca <sup>2+</sup> .....	CXII

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AGC	automatische Verstärkungsregelung ( <i>automatic gain control</i> )
AIBN	Azobisisobutyronitril
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
arom.	aromatisch
AS	Aminosäure
AUC	analytische Ultrazentrifugation
ber.	berechnet
Bpa	<i>p</i> -Benzoylphenylalanin
BS <sup>2</sup> G	Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat
BS <sup>3</sup>	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
CaM	Calmodulin
CCD	katalytische Domäne ( <i>catalytic core domain</i> )
CD	Circular-Dichroismus
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation ( <i>collision-induced dissociation</i> )
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CRM	<i>charged residue model</i>
CTE	C-terminale Erweiterung
DC	Dünnschichtchromatographie
DD	Dimerisierungsdomäne
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI	Elektrosprayionisierung
ETD	Elektronentransfer-Dissoziation ( <i>electron transfer dissociation</i> )
EtOH	Ethanol
exp.	experimentell

Ext D	extrazelluläre Domäne
FA	Ameisensäure ( <i>formic acid</i> )
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FTICR	Fourier-Transformation-Ionencyclotronresonanz
GCAP	Guanylatcyclase-aktivierendes Protein
GC	Guanylatcyclase
GDP	Guanosindiphosphat
gef.	gefunden
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
HCD	<i>higher-energy collisional dissociation</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
IAA	Iodacetamid
IEM	<i>ion evaporation model</i>
ISD	<i>in-source decay</i>
JMD	Juxtamembrandomäne
KHD	Kinase-Homologie-Domäne
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
LDI	Laserdesorption/Ionisierung
LID	Laserinduzierte Dissoziation ( <i>laser-induced dissociation</i> )
LIFT	<i>laser-induced fragmentation technique</i> (Bruker Daltonik)
LTQ	lineare Ionenfalle (Markenname Thermo Fisher Scientific)
LIT	lineare Ionenfalle ( <i>linear ion trap</i> )
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
MD	Molekulardynamik
MeOH	Methanol
M	Molekulargewicht
$M_{\text{mono}}$	monoisotopisches Molekulargewicht
$M_{\text{av}}$	durchschnittliches Molekulargewicht
MGF	<i>mascot generic format</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

m/m	Masse pro Masse
MS	Massenspektrometrie; Massenspektrometer
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
m/v	Masse pro Volumen
myr	myristoyliert
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCS	neuronaler Calcium-Sensor
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
n.i.	nicht identifiziert
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
ONE	olfaktorisches Neuroepithel ( <i>olfactory neuroepithelium</i> )
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ph	Phenyl-Rest
ppm	<i>parts-per-million</i>
PSD	<i>post-source decay</i>
RGC	Rezeptor-Guanylatcyclase
RF	Radiofrequenz
ROS	Außensegment der Seesinneszellen ( <i>rod-outer-segment</i> )
pI	isoelektrischer Punkt
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rel. Int.	relative Intensität
RF	Radiofrequenz
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SHD	Signal-übertragende Helix-Domäne
skMLCK	Skelettmuskel-Myosin-leichte-Ketten-Kinase ( <i>skeletal muscle myosin light-chain kinase</i> )
SNAP	<i>sophisticated numerical annotation procedure</i>
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis ( <i>signal-to-noise ratio</i> )
Sulfo-NHS	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure

TFE	Trifluorethanol
Th	Thomson (alternative Einheit zu $m/z$ )
theor.	theoretisch
TIC	Totalionenstrom ( <i>total ion current</i> )
TIS	<i>timed ion selector</i>
TLC	Dünnschichtchromatographie ( <i>thin layer chromatography</i> )
TM	Transmembranhelix
TOF	<i>time-of-flight</i>
u	atomare Masseneinheit
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
z	Ladungszahl

### Proteinogene Aminosäuren

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

**Modifizierte und artifizielle Aminosäuren werden in dieser Arbeit folgendermaßen definiert:**

**Modifizierte Aminosäuren**

oxidiertes Methionin	Met <sub>ox</sub> .	m
carbamidomethyliertes Cystein		B

**Artifizielle Aminosäuren**

Photo-Leucin	Photo-Leu	U
<i>p</i> -Benzoylphenylalanin	Bpa	X
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> - <i>p</i> -Benzoylphenylalanin		J



### Zusammenfassung

Die Kombination aus chemischer Quervernetzung in Verbindung mit hochauflösender Massenspektrometrie ist ein alternativer Ansatz zur strukturellen Charakterisierung von Proteinen und Proteinkomplexen. Dabei werden über chemische Reagenzien kovalente Bindungen innerhalb der Proteine und zwischen den Interaktionspartnern eingeführt. Diese Verknüpfungen dienen als molekulares Maß und ermöglichen die Bestimmung der Abstände zwischen den vernetzten Resten.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Interaktion zwischen den Guanylatcyclase-aktivierenden Proteinen (GCAPs) und ihrem Zielprotein, der retinalen Guanylatcyclase (ROS-GC), ist bei der Verarbeitung von Lichtreizen in den Sehsinneszellen der Retina beteiligt. Störungen dieser Interaktion sind mit verschiedenen Formen der Retinopathie assoziiert. Für die Entwicklung möglicher Zielstrukturen zur Behandlung dieser Fehlfunktionen ist eine strukturelle Charakterisierung dieser Wechselwirkung unerlässlich.

Die Interaktionen zwischen dem myristoylierten GCAP-2 und zwei potentiellen Bindungsmotiven aus der C-terminalen Erweiterung (GC-Peptid 1, AS 965-981) und der Juxtamembrandomäne (GC-Peptid 2, AS 503-522) der ROS-GC 1 wurden mit verschiedenen Quervernetzungstrategien untersucht. Erste Quervernetzungsexperimente mit dem aminreaktiven Quervernetzungsreagenz  $\text{BS}^2\text{G}$  (Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat) bestätigten eine Komplexbildung mit GC-Peptid 1 sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ . Intramolekulare Vernetzungen innerhalb des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen myristoylierten GCAP-2 bestätigten eine ähnliche Struktur des Proteins im Komplex im Vergleich mit der bekannten NMR-Struktur des unmyristoylierten GCAP-2. Quervernetzungen zwischen GCAP-2 und GC-Peptid 1 ließen keine Unterscheidung zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Komplex zu. Die Verwendung zweier GC-Photo-Peptid 1-Varianten, in denen Val-5 oder Leu-13, gegen die photoreaktive Aminosäure Photo-Leucin ausgetauscht wurde, erlaubte eine Differenzierung der Komplexe. Im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand wurden charakteristische Vernetzungen zu GCAP-2 identifiziert, die zusammen mit den  $\text{BS}^2\text{G}$ -Quervernetzungen die Berechnung eines ersten Strukturmodells des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes ermöglichten. Die große Anzahl verschiedener Quervernetzungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand sind auf eine unspezifische Bindung des Peptids oder eine starke Konformationsänderung des GCAP-2 zurückzuführen.

Die Bildung eines Komplexes mit GCAP-2 wurde auch für GC-Peptid 2 bestätigt. Allerdings konnten keine Quervernetzungsprodukte mit BS<sup>2</sup>G identifiziert werden. Quervernetzungsexperimente mit GC-Peptid 2 nach Austausch von Trp-6 oder Trp-8 gegen die photoreaktive Aminosäure Benzoylphenylalanin (Bpa) ermöglichten zwar die Identifizierung potentieller Quervernetzungen mit GCAP-2, Fragmentionenmassenspektren dieser Produkte waren aber hauptsächlich durch Neutralverluste des Vorläuferions gekennzeichnet und konnten deshalb nicht zweifelsfrei bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine sechsfach <sup>13</sup>C-markierte Variante des Bpa synthetisiert, die eine zusätzliche Bestätigung der Quervernetzungsprodukte anhand der charakteristischen Isotopenmuster erlaubte. Als Modellsystem zur Etablierung der Strategie diente der strukturell gut charakterisierte Komplex aus Calmodulin (CaM) und dem M13-Bindungspeptid aus der Skelettmuskel-Myosin-leichte-Ketten-Kinase (skMLCK), in dem Trp-4 gegen nicht markiertes Bpa oder <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-markiertes Bpa ausgetauscht wurde. Die erhaltenen Quervernetzungsprodukte konnten anhand der  $\delta$  u-Abstände im Massenspektrum bestätigt werden. Die Identifizierung der exakten Verknüpfungsstelle gelang durch Vergleich der Fragmentionenmassenspektren und anhand der charakteristischen Massendifferenzen der Fragmentionen. Die Quervernetzungsprodukte lieferten Hinweise auf zwei Orientierungen des Peptids an CaM, die bekannte antiparallele Bindung und eine alternative Orientierung des Peptids. Die Analyse des intakten Komplexes mittels CID (*collision-induced dissociation*) und ETD (*electron transfer dissociation*) und eine semiquantitative Evaluierung anhand der extrahierten Ionenchromatogramme der Quervernetzungsprodukte bestätigten die antiparallele Orientierung und verifizierten diese als Hauptprodukt.

Anschließend wurde die Strategie auf das hier untersuchte biologische System aus GCAP-2 und ROS-GC angewendet. Quervernetzungsexperimente zwischen GCAP-2 und dem GC-Photo-Peptid 3, welches dem *N*-terminal um sechs Aminosäuren verlängerten Bindungsmotiv aus der *C*-terminalen Erweiterung (AS 959-981) der ROS-GC 1 entspricht, bestätigten eine identische Vernetzung in An- und Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> und somit einen charakteristischen Interaktionsbereich des GCAP-2.

Die Verwendung des isotopenmarkierten Bpa ermöglichte zusätzlich die Identifizierung charakteristischer Fragmentionen nach CID-Fragmentierung von Bpa-Quervernetzungsprodukten zu *N*-terminal im verknüpften Peptid lokalisierten Methioninen und oxidierten Methionen. Diese konnten als zusätzliche Bestätigung dieser Produkte genutzt werden. Die CID-Fragmentierung führte dabei zur Spaltung einer Bindung zwischen den verknüpften Peptiden und zur Identifizierung sowohl des Bpa-Peptids mit einem

charakteristischen Massenverlust von 2 u, als auch des Gegenpeptids mit einem Massenverlust von 16 u bei Anwesenheit eines *N*-terminalen Methionins. Ein zusätzlicher Massenverlust von 48 u wurde bei Anwesenheit eines oxidierten Methionins beobachtet.

Nach Betrachtung der GCAP-2/GC-Peptid-Komplexe wurde anschließend auch GCAP-2 selbst strukturell genauer analysiert. In einer vorherigen Studie war eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Dimerisierung des GCAP-2 beschrieben worden. Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie und analytischer Ultrazentrifugation des GCAP-2 unter vergleichbaren Bedingungen widerlegten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Dimerisierung. Quervernetzungsexperimente mit  $\text{BS}^2\text{G}$  unter Verwendung von nicht markiertem GCAP-2 und komplett  $^{15}\text{N}$ -markiertem GCAP-2 bestätigten die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Dimerisierung und bestätigten intermolekulare Quervernetzungen zwischen den einzelnen GCAP-2-Monomeren anhand charakteristischer Isotopenmuster. Zusätzlich konnten bei einigen Quervernetzungsprodukten charakteristische Fragmentationen bestätigt werden, die bei der Verwendung von NHS-Esterreagenzien wie  $\text{BS}^2\text{G}$  auftreten können und als potentielle Markerionen beschrieben worden waren. Eine stärkere Vernetzung des GCAP-2 im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand lässt eine höhere Flexibilität bzw. eine Konformationsänderung vermuten. Intermolekulare Quervernetzungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen GCAP-2-Homodimers ermöglichten die Verifizierung verschiedener Dimermodelle, die durch computergestützte Modellierung auf Grundlage der bekannten NMR-Struktur des GCAP-2-Monomers erstellt wurden. Das favorisierte Modell repräsentiert einen ersten Strukturvorschlag für das GCAP-2-Homodimer.

In einem weiteren Experiment wurde die Struktur des GCAP-2-Monomers durch Vernetzung mit einem aminreaktiven CID-MS/MS-spaltbaren Harnstoff-Reagenz analysiert. Dieses ermöglicht die Identifizierung und Unterscheidung verschiedener Quervernetzungsprodukte anhand charakteristischer 26 u-Dublett-Signale. Dies ermöglichte die automatisierte Identifizierung und Annotierung der Produkte mithilfe der MeroX-Software. Problematisch für die automatische Auswertung war allerdings die ladungsabhängige Fragmentierung der Quervernetzungsprodukte. Der Vergleich von MALDI-TOF/TOF-MS/MS- und ESI-CID-MS/MS-Analysen zeigte, dass eine verlässliche Identifizierung nur bei zweifach geladenen Ionen möglich war. Bei einer abweichenden Ladung des Vorläuferions wurden weniger, nur schwach abundante oder gar keine Dublettsignale detektiert. Auch bei intrapeptidal vernetzten Produkten zeigte sich sequenzabhängig eine Abweichung von der postulierten Fragmentierung. Die identifizierten Quervernetzungen bestätigten vergleichbare Strukturen des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen myristoylierten und unmyristoylierten GCAP-2 sowie eine höhere Flexibilität bzw. eine Konformationsänderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2.

## Summary

The combination of chemical cross-linking and high-resolution mass spectrometry presents an alternative approach for the structural characterization of proteins and protein complexes where covalent bonds are introduced by a chemical reagent into proteins and between interaction partners. These cross-links serve as molecular rulers and allow determining distances between cross-linked residues.

The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent interaction between guanylyl cyclase-activating proteins (GCAPs) and their target protein, the retinal guanylyl cyclase (ROS-GC), is involved in processing light stimuli within the visual sensory cells of the retina. Malfunction of this interaction is associated with different kinds of retinopathies. The structural characterization of this interaction is crucial for the development of potential lead structures for treating such malfunctions.

The interaction between myristoylated GCAP-2 and two potential binding motifs derived from the C-terminal extension (GC peptide 1, aa 965-981) and the juxtamembrane domain (GC peptide 2, aa 503-522) of ROS-GC 1 were investigated by different cross-linking strategies. Complex formation with GC peptide 1 was confirmed by initial cross-linking experiments with the amine-reactive cross-linker BS<sup>2</sup>G (bis(sulfosuccinimidyl)glutarate), both in the presence and absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Intramolecular cross-links within  $\text{Ca}^{2+}$ -bound myristoylated GCAP-2 confirmed a structure of the protein within the complex similar to the already known NMR-structure of non-myristoylated GCAP-2. Cross-links between GCAP-2 and GC peptide 1 did not allow differentiating  $\text{Ca}^{2+}$ -bound and  $\text{Ca}^{2+}$ -free complexes. The application of two GC photo-peptide variants, in which Val-5 or Leu-13 was exchanged for the photo-reactive amino acid photo-leucine, enabled the differentiation of these complexes. In the  $\text{Ca}^{2+}$ -bound state, characteristic cross-links were identified with GCAP-2, which together with BS<sup>2</sup>G cross-links, allowed calculating of an initial structural model of the GCAP-2/GC peptide 1 complex. In the  $\text{Ca}^{2+}$ -free state, the large number of diverse cross-links might be caused by unspecific binding of the GC peptide or a strong conformational change of GCAP-2.

Complex formation with GCAP-2 was also confirmed for GC peptide 2. However, no cross-links could be identified with BS<sup>2</sup>G. After exchanging Trp-6 or Trp-8 for the photo-reactive amino acid benzoylphenylalanine (Bpa) cross-linking experiments with GC peptide 2 allowed the identification of potential cross-links with GCAP-2, but fragment ion mass spectra were dominated by constant neutral losses of the precursor ion. Therefore, cross-links could not be unambiguously confirmed.

Therefore a six-times  $^{13}\text{C}$ -labeled variant of Bpa was synthesized, which allowed confirming the cross-linked products based on their characteristic isotope patterns. For establishing this strategy, the structurally well characterized complex between calmodulin (CaM) and the M13 peptide, derived from skeletal muscle myosin light-chain kinase, in which Trp-4 was exchanged for non-labeled or  $^{13}\text{C}_6$ -labeled Bpa, served as a model system. Cross-linked products were confirmed by 6-u patterns within the mass spectra. Identification of the exact cross-linked site was accomplished by a comparison of fragment ion mass spectra and the characteristic mass differences of the fragment ions. The cross-linked products obtained confirmed two orientations of the peptide, the known antiparallel binding mode and an alternative orientation of the peptide. Analysis of the intact complexes by CID (collision-induced dissociation) and ETD (electron transfer dissociation) and a semiquantitative evaluation based on the extracted ion chromatograms of the cross-linked products confirmed the antiparallel orientation and verified it as main component.

Subsequently, this strategy was applied to the biological system of GCAP-2 and ROS-GC studied herein. Cross-linking experiments between GCAP-2 and GC photo-peptide 3, representing the binding motif derived from the C-terminal extension, which is N-terminally elongated by six amino acids (aa 959-981), confirmed identical cross-linked products both in the presence and absence of  $\text{Ca}^{2+}$  and hints a characteristic interface within GCAP-2.

The application of isotope-labeled Bpa additionally allowed the identification of characteristic fragment ions after CID fragmentation of Bpa cross-links to N-terminally located methionines or oxidized methionines within the cross-linked peptides. These serve as an additional confirmation of the cross-linked products. CID fragmentation resulted in the cleavage of a bond between the cross-linked peptides and in the identification of the Bpa peptide with a characteristic constant neutral loss of 2-u. The presence of its counterpart was indicated by a 16-u loss in case of an N-terminal methionine or an additional 48-u loss in case of an oxidized methionine.

After having carefully inspected the GCAP-2/GC peptide complexes, GCAP-2 was analyzed in more detail. In a previous study, a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent dimerization of GCAP-2 had been described. Size exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation experiments using comparable conditions revealed however a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent homodimerization. Cross-linking experiments with BS<sup>2</sup>G using non-labeled GCAP-2 and fully  $^{15}\text{N}$ -labeled GCAP-2 confirmed a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent dimerization and enabled the verification of intermolecular cross-links between the GCAP-2 monomers based on their characteristic isotope patterns. For a number of cross-linked products, characteristic fragment ions were observed, which are

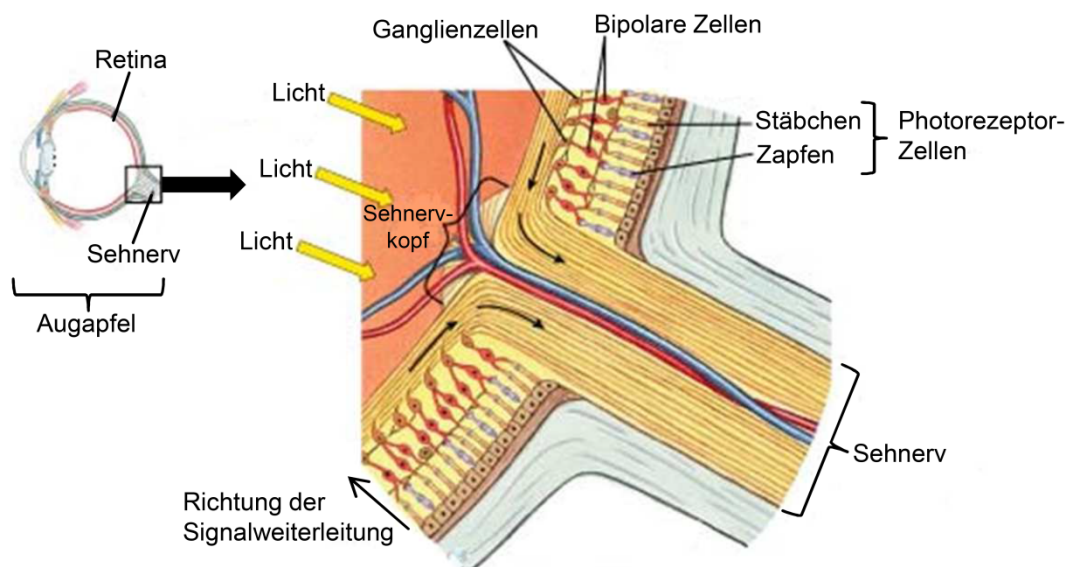
created by NHS esters, such as BS<sup>2</sup>G, and which had been described previously as potential marker ions. Extensive cross-linking of GCAP-2 in its Ca<sup>2+</sup>-free state is conceivably caused by a higher flexibility or a conformational change. Intermolecular cross-links of the Ca<sup>2+</sup>-bound GCAP-2 homodimer allowed verifying different dimer models, created by computer-based modeling based on the known NMR structure of the GCAP-2 monomer. The favored model represents the first structure proposed for the GCAP-2 homodimer.

Additionally, the structure of the GCAP-2 monomer was analyzed by cross-linking with an amine-reactive CID-MS/MS cleavable urea-reagent. That reagent facilitates the identification and discrimination of different cross-linked products on the basis of characteristic 26-u doublet signals, allowing an automated identification and annotation of these products by the MeroX software. However, the charge-dependent fragmentation of the cross-linked products proved challenging for an automated data analysis. The comparison of MALDI-TOF/TOF-MS/MS and ESI-CID-MS/MS data revealed that cross-links were only identified reliably for doubly charged precursor ions. CID fragmentation of differently charged precursor ions produced less, low abundant or no doublet signals at all. Also, a sequence dependent fragmentation was observed for intrapeptidal cross-linked products. The identified cross-links confirmed comparable structures of Ca<sup>2+</sup>-bound myristoylated and non-myristoylated GCAP-2, indicating a higher flexibility or a conformational change of Ca<sup>2+</sup>-free GCAP-2.

# 1 Grundlagen

## 1.1 Biologische Grundlagen

Für die meisten Lebewesen spielt Licht eine entscheidende Rolle, da es als Energiequelle dient und es ihnen ermöglicht, ihre Umgebung optisch wahrzunehmen. Diese Lichtreize müssen für die weitere Verarbeitung in eine für den Organismus nutzbare Form konvertiert werden. Bei Vertebraten sind spezielle Sinneszellen für die Farbwahrnehmung und Anpassung an die vorhandenen Lichtverhältnisse verantwortlich. Diese befinden sich in der Retina, der sogenannten Netzhaut, im Inneren unseres Auges (*Abb. 1*). Man unterscheidet anhand ihrer Form Stäbchen (engl. *rods*), welche hauptsächlich für das Hell-Dunkel-Sehen verantwortlich sind und Zapfen (engl. *cones*), die es zusätzlich ermöglichen, Farben zu erkennen und zu unterscheiden [1, 2]. Diese Zellen befinden sich an der Rückseite der Retina, deren weitere Zellschichten erst von den Photonen durchdrungen werden müssen, bevor sie in den Außensegmenten der Stäbchen und Zapfen detektiert werden können. Die Verarbeitung des Lichtreizes erfolgt über ein Zusammenspiel verschiedener Proteine, die den Ein- und Ausstrom von Signalmolekülen regulieren. Ganz entscheidend ist hierbei die Beteiligung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und des zyklischen Guanosinmonophosphats [3]. Die Reizweiterleitung erfolgt mit Hilfe elektrischer Signale über die Ganglienzellen und die Nervenfasern zum Gehirn [1, 2].



*Abb. 1 Darstellung des Auges (links) mit einer Vergrößerung der Retina im Bereich des Sehnervs (rechts). (Abbildung auf Grundlage von [4])*

### 1.1.1 Die Verarbeitung eines Lichtreizes in den Stäbchen und Zapfen der Retina

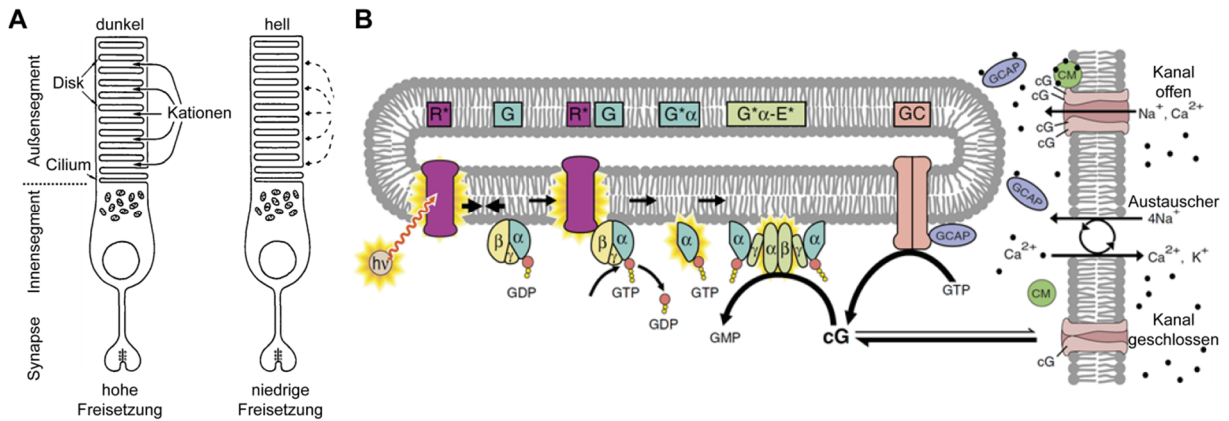
Die Außensegmente der Stäbchen und Zapfen sind durch innere Membraneinstülpungen und Hohlräume gekennzeichnet, die von den sogenannten Diskmembranen umgeben sind (*Abb. 2 A*). In diesen Bereichen findet die eigentliche Phototransduktion statt [1, 2, 5].

Für den initialen Schritt ist das in den Diskmembranen befindliche Rhodopsin entscheidend, ein mit 11-cis-Retinal modifiziertes Membranprotein. Die mit einem Lichtreiz eindringenden Photonen führen zu einer Isomerisierung des 11-cis-Retinal zum all-trans-Retinal und in der Folge zu einer Konformationsänderung des Rhodopsins [5] (*Abb. 2 B*). Das angeregte Rhodopsin aktiviert das heterotrimere G-Protein Transducin. Nach Austausch von GDP gegen GTP dissoziiert es und aktiviert über seine  $\alpha$ -Untereinheit eine Phosphodiesterase. Die sinkende intrazelluläre cGMP-Konzentration führt zum Verschluss von cGMP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Kanälen. Ein zusätzlicher  $\text{K}^{+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom über einen cGMP-unabhängigen  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -Austauscher führt zur Abnahme der intrazellulären Kationenkonzentration und zu einer Hyperpolarisation der Membran. Dadurch wird die Transmitterausschüttung an den Synapsen moduliert [1, 2, 5].

Für die Anpassung an die verschiedenen Lichtverhältnisse ist eine genaue Einstellung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration notwendig. Ist eine weitere Absenkung der intrazellulären Kationenkonzentration notwendig, kann diese Signalkaskade durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Aktivierung des Recoverin verlängert werden. Recoverin ist in der Lage, die Rhodopsinkinase zu inhibieren und hält so die Aktivität des Rhodopsins aufrecht [6].

Um den Dunkelzustand der Zellen wieder herzustellen und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu erhöhen, ist die Öffnung der cGMP-abhängigen Kationenkanäle essentiell. Das dafür benötigte cGMP wird durch die in den Diskmembranen vorhandene retinale Guanylatcyclase (ROS-GC) synthetisiert [2, 7, 8]. Bei einer niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird die ROS-GC durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Guanylatcyclase-aktivierenden Proteine (GCAPs) aktiviert und synthetisiert verstärkt cGMP aus GTP. Die Rezeptoren und die Reizweiterleitung können so den entsprechenden Lichtverhältnissen angepasst werden. GCAPs spielen hierbei eine entscheidende Rolle.





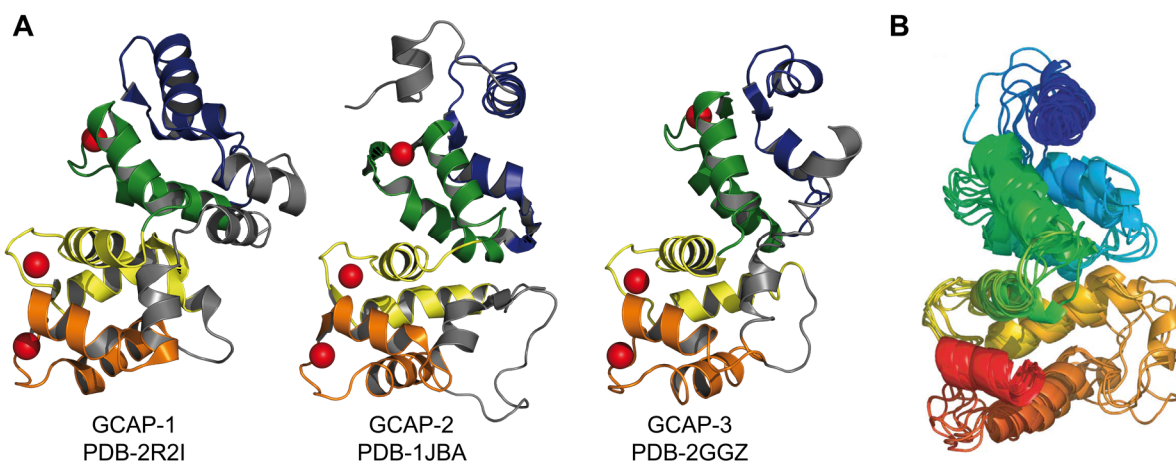
**Abb. 2 A: Darstellung der Stäbchenzellen (rods)** (Abbildung aus Yau et al. [1]); **B: Illustration der Signalverarbeitung nach einem Lichtreiz**; R\*: aktiviertes Rhodopsin; G: Transducin; G\* $\alpha$ :  $\alpha$ -Untereinheit; G\* $\alpha$ -E: aktivierter Phosphodiesterasekomplex; GC: retinale Guanylatcyclase; cG: zyklisches Guanosinmonophosphat; CM: Calmodulin (Abbildung aus [5])

### 1.1.2 Die Guanylatcyclase-aktivierenden Proteine

Die Guanylatcyclase-aktivierenden Proteine (GCAPs) sind  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerte regulatorische Proteine, die zur Familie der neuronalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor (NCS) Proteine gehören [9]. Es sind verschiedene Isoformen bekannt, wobei GCAP-1 [10] und GCAP-2 [11] bei fast allen Säugetierarten vorkommen. Diese beiden Isoformen wurden sowohl in Zapfenzellen, als auch in Stäbchenzellen identifiziert. Eine dritte Isoform GCAP-3 [12] wurde in Menschen und Fischen nachgewiesen, allerdings kommt sie beim Menschen ausschließlich in den Zapfenzellen vor. Weitere GCAP-Isoformen wurden in der Retina von Zebrafischen und Kugelfischen gefunden [13].

Alle GCAP-Isoformen besitzen vier sogenannte EF-Handmotive, die sich aus einer strukturellen Abfolge von  $\alpha$ -Helix-Loop- $\alpha$ -Helix zusammensetzen. In den Loop-Regionen werden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch mehrere saure Aminosäureseitenketten komplexiert [9, 13]. Im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand können diese auch von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen besetzt werden [14, 15]. Diese Bindungsmotive zählen zu den konserviertesten Regionen unter den GCAP-Isoformen. Eine Gemeinsamkeit aller NCS-Proteine ist ein inaktives EF-Handmotiv 1, welches nicht in der Lage ist,  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden [9, 16, 17]. GCAPs können daher bis zu drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in ihren EF-Handmotiven 2-4 komplexieren. Andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteine, wie Calmodulin (CaM) und Recoverin, besitzen ebenfalls vier EF-Handmotive, wobei Calmodulin (kein NCS-Protein) bis zu vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden kann. Recoverin hingegen kann als Mitglied der NCS-Familie nur zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in EF-Handmotiv 2 und 3 binden [9]. Die Proteine der NCS-Familie, wie Recoverin und GCAPs, besitzen im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem Zustand ähnliche, kompakte Strukturen (Abb. 3) [9, 18-20]. Im Gegensatz dazu ist im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen CaM die zentrale Helix gestreckt und es hat eine hantelförmige Struktur [9, 21]. Eine weitere Besonderheit der NCS-

Proteine ist eine *N*-terminale Acylierung [9]. Häufig handelt es sich dabei um eine Myristinsäuregruppe [22]. Die Funktion dieser Modifikation ist nicht für alle NCS-Proteine geklärt. Für Recoverin wurde ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger „*myristoyl-switch*“ beschrieben, bei dem es in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  zur Exposition der sonst im Inneren des Proteins verborgenen Myristoylkette und dadurch zur Membranassoziation kommt [13, 23, 24]. Für die GCAP-Proteine ist die Funktion der *N*-terminalen Myristoylierung nicht vollständig geklärt, ein „*myristoyl-switch*“ ist aber unwahrscheinlich [22]. Bei GCAP-1 ist die Myristoylgruppe im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand im Inneren verborgen, was auch für das  $\text{Ca}^{2+}$ -freie GCAP-1 vermutet wird [19]. Sie ist für die vollständige Aktivierung der ROS-GC entscheidend [7, 19, 25, 26]. Die Myristoylgruppe des GCAP-2 ist sowohl in Anwesenheit als auch im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand exponiert [27, 28] und scheint keine größere Bedeutung für die Aktivierung des Zielproteins zu besitzen [7, 22]. Isolierte GCAPs sind lösliche Proteine. In Gegenwart der ROS-GC sind sie dagegen ständig an ihr Zielprotein assoziiert [29].



**Abb. 3 Strukturvergleich der GCAP-Isoformen.** **A:** Die Abbildung zeigt von links nach rechts die Kristallstruktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen myristoylierten GCAP-1 (Huhn) [19], die Lösungsstruktur (NMR-Struktur) des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen unmyristoylierten GCAP-2 (Rind) [18] und die Kristallstruktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen unmyristoylierten GCAP-3 (Mensch) [20]. Die Einträge der Proteindatenbank (PDB) sind angegeben.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen: rote Kugeln; EF-Handmotiv 1: blau; EF-Handmotiv 2: grün; EF-Handmotiv 3: gelb; EF-Handmotiv 4: orange; **B:** Überlagerte Strukturen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindepoteine: GCAP-2, GCAP-3, Recoverin, Neurocalcin, Calcineurin,  $\text{Ca}^{2+}$ -Integrin-Bindeprotein und Frequenin. *N*-Termini: blau; *C*-Termini: rot (Abbildung aus [20]).

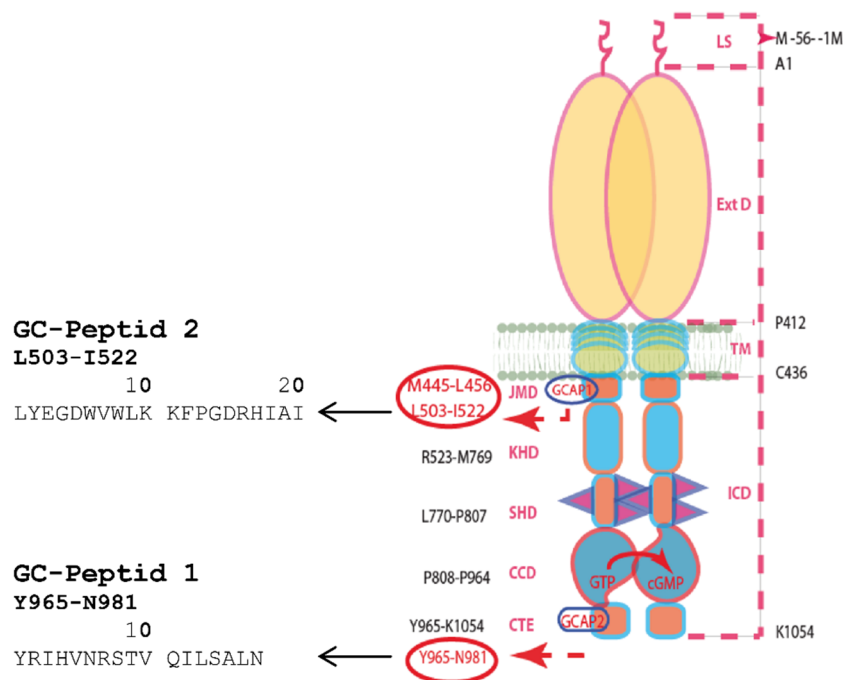
### 1.1.3 Die retinale Guanylatcyclase und ihre Interaktion mit GCAP

Bei den Guanylatcyclasen (GC) handelt es sich um Rezeptorenzyme, welche für die Bildung von cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) aus GTP (Guanosintriphosphat) verantwortlich sind. cGMP dient als Signalmolekül und ist an der Regulation verschiedener Prozesse beteiligt [7]. Es existieren sowohl lösliche als auch membrangebundene GCs [7]. Ein Beispiel für die lösliche Form ist die NO-abhängige GC, welche an der Dilatation der Gefäße und somit der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist [30]. Die Familie der

membrangebundenen GCs kann man in zwei weitere Untergruppen unterteilen, die Peptid-Hormon-gesteuerten Rezeptor-Guanylatcyclasen (RGC) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerten ROS (*rod outer segment*)-GCs [7]. Eine Gemeinsamkeit dieser Familie ist die Membranbindung durch eine einzige Transmembranhelix. Zu den Rezeptor-Guanylatcyclasen zählen die ANP (atriales natriuretisches Peptid)- und CNP (C-Typ natriuretisches Peptid)-gesteuerten RGCs sowie RGCs, die durch Hitze-stabile Enterotoxine von *Escherichia coli* aktiviert werden (STa (*heat-stable enterotoxin*)-RGC [31-33]). Diese werden durch Bindung der entsprechenden Peptid-Hormone auf ihrer extrazellulären Seite aktiviert [7].

Die Gruppe der ROS-GCs besteht aus ROS-GC 1 und ROS-GC 2, welche an der Regulation des Sehprozesses beteiligt sind und an ihrer intrazellulären Seite aktiviert werden [34]. Eine Mischform ist die ONE (*olfactory neuroepithelium*)-GC, welche sowohl auf der extrazellulären Seite, als auch intrazellulär aktiviert werden kann und an der Übertragung von Geruchsreizen beteiligt ist [7].

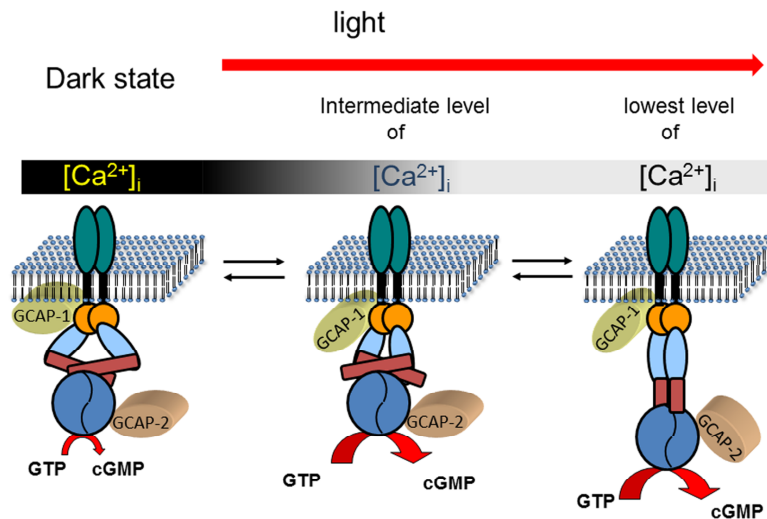
ROS-GCs sind aus etwa 1100 Aminosäuren bestehende Multidomänenproteine und liegen in ihrer aktiven Form als Homodimer vor [29, 34-36] (Abb. 4).



**Abb. 4** Schematischer Aufbau der retinalen Guanylatcyclase (ROS-GC 1). ROS-GC 1 setzt sich aus einer extrazellulären Domäne (Ext D), einer einzigen Transmembranhelix (TM) und einer intrazellulären Domäne (ICD) zusammen. Das N-terminale Signalpeptid (LS) wird posttranslational entfernt. Der intrazelluläre Teil lässt sich nochmals in eine an die Membran assoziierte Juxtamembrandomäne (JMD), eine Kinase-Homologie-Domäne (KHD), eine Dimerisierungsregion bzw. Signal-übertragende Helix-Domäne (SHD), eine katalytische Domäne (CCD) und deren C-terminale Erweiterung (CTE) unterteilen. Die Aminosäurebereiche sind links und rechts der Domänen angegeben und die Bindungsregionen von GCAP-1 und GCAP-2 rot umkreist. Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide sind mit ihren Aminosäuresequenzen angegeben (modifizierte Abbildung nach Duda et al. [29]).

Die zwei Isoformen ROS-GC 1 und ROS-GC 2 sind in den Diskmembranen der Außensegmente der Seesinneszellen zu finden und sind durch einen negativen Feedback-Mechanismus indirekt an der Einstellung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beteiligt [7, 8, 34, 37]. Sie werden auf ihrer intrazellulären Seite durch die GCAPs reguliert, welche für die eigentliche Detektion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verantwortlich sind. Beide ROS-GC-Isoformen werden von GCAP-1 und 2 aktiviert, wobei GCAP-1 die ROS-GC 1 stärker aktiviert als ROS-GC 2 [37]. GCAP-2 hingegen aktiviert beide ROS-GC-Isoformen mit der gleichen Intensität [37]. Der genaue Ablauf der GCAP/GC-Interaktion ist bisher nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass es durch den Verlust der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu einem Konformationswechsel im Bereich der Zentralhelix der GCAPs kommt. Dies könnte zu einer relativen Reorientierung zweier struktureller Domänen mit jeweils einem Paar von EF-Handmotiven und dadurch zu einer Änderung der GC-Aktivität führen [13]. Für GCAP-2 wird ein weiteres Modell vermutet, bei dem es durch eine Dimerisierung des GCAP selbst zur Aktivierung des ROS-GC-Dimers kommt [38]. GCAP-1 aktiviert sein Zielprotein allerdings als Monomer [39].

Die verschiedenen GCAP-Isoformen zeigen ein unterschiedliches Aktivierungsprofil und aktivieren die ROS-GCs bei unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten (*Abb. 5*). GCAP-1 ist für die initiale Antwort durch Aktivierung der ROS-GC 1 zu einem früheren Zeitpunkt und bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen verantwortlich [8]. Die Aktivierung erfolgt auch schon bei geringeren Lichtintensitäten. GCAP-2 ist für die Aktivierung in der nachfolgenden Phase verantwortlich und aktiviert die ROS-GC bei niedrigeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen als GCAP-1 und erst bei einer stärkeren Lichtintensität. Die absoluten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen unterscheiden sich für die Regulation in unterschiedlichen Spezies. Für in HEK-Zellen exprimierte ROS-GC 1 erfolgte eine halbmaximale Aktivierung durch GCAP-1 bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 700-1000 nM ( $\text{IC}_{50}$ -Werte) und bei Konzentrationen von 100-200 nM ( $\text{IC}_{50}$ -Werte) durch GCAP-2 [8]. Die Aktivierung von ROS-GC 2 durch GCAP-1 fand ebenfalls bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen statt als durch GCAP-2 ( $\text{IC}_{50}$ -Werte von 306 nM und 46 nM) [8].



**Abb. 5**  $Ca^{2+}$ -abhängige Aktivierung der ROS-GC durch GCAP-1 und GCAP-2. GCAP-1 und 2 sind sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$  an die ROS-GC gebunden. Dies ermöglicht eine schnelle Antwort auf  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderungen. Durch Abfall der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration dissoziiert das  $Ca^{2+}$  zuerst von GCAP-1. Dies führt zu einer Konformationsänderung des GCAP-1 und in der Folge zur Aktivierung der ROS-GC. Fällt die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration noch weiter ab, geht auch GCAP-2 in den aktivierenden Modus über (Abbildung von Koch und Dell'Orco [8]).

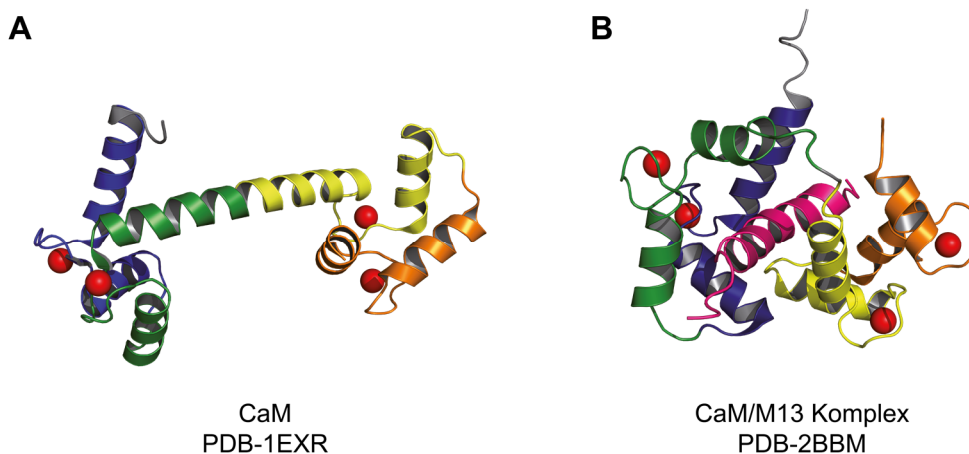
Nicht nur die Aktivierungsprofile, sondern auch die Interaktionsstellen von GCAP-1 und GCAP-2 unterscheiden sich [29]. Die Aktivierung durch GCAP-1 erfolgt hierbei von der N-terminalen Seite der intrazellulären Domäne der ROS-GC (Abb. 4). Es sind insgesamt vier Bindungsstellen bekannt [8], zwei im Bereich der Juxtamembrandomäne [40] und zwei in der benachbarten Kinase-Homologie-Domäne [41]. GCAP-2 aktiviert die ROS-GC von der entgegengesetzten C-terminalen Seite im Bereich der C-terminalen Extension der katalytischen Domäne [36] (Abb. 4). Die C-terminale Aktivierung ist einzigartig für GCAP-2 und wurde bisher bei keiner anderen membrangebundenen GC beobachtet [29].

Mutationen im Bereich der Bindungsregionen der ROS-GC und den GCAP-Proteinen werden mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Eine bekannte Punktmutation, die zum Austausch F514S im Bereich einer GCAP-1-Bindungsregion innerhalb der ROS-GC führt, wurde als eine Ursache für die Lebersche kongenitale Amaurose identifiziert [42]. Dadurch kommt es zum Ausfall der  $Ca^{2+}$ -gesteuerten Regulation durch GCAP-1 [43]. Verschiedene Mutationen des GCAP-1-Gens, vor allem im Bereich der EF-Handmotive 3 und 4 des Proteins, führen zu einer veränderten Sensitivität gegenüber  $Ca^{2+}$  und somit zu einem veränderten Aktivierungsprofil [8, 44-49]. Eine sehr seltene Mutation wurde ebenfalls im codierenden Gen für das GCAP-2 gefunden und ist mit der Erkrankung Renitis pigmentosa assoziiert [50].

### 1.1.4 Calmodulin (CaM) und die Skelettmuskel-Myosin-leichte-Ketten-Kinase (skMLCK)

Bei dem  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Protein Calmodulin (CaM) handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes EF-Handprotein, das an einer Vielzahl verschiedener Signaltransduktionswege beteiligt ist. Diese sind unter anderem an der Muskelkontraktion, der Zellproliferation sowie der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt. CaM wurde erstmals 1970 als Aktivator einer Phosphodiesterase beschrieben [51, 52]. Seitdem wurden mehr als 300 verschiedene Zielproteine identifiziert [53], darunter die Skelettmuskel-Myosin-leichte-Ketten-Kinase (skMLCK). Die CaM-vermittelte Aktivierung der skMLCK erfolgt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und führt zur Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins [54, 55]. Diese Interaktion spielt eine zentrale Rolle bei der Muskelkontraktion [55]. Laut Blumenthal *et al.* ist ein Peptid (M13) aus der C-terminalen Region der skMLCK das minimale CaM-Bindungsmotiv [56]. Die mittels NMR ermittelte Lösungsstruktur des CaM/skMLCK-Peptid-Komplexes bestätigte eine starke Konformationsänderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen CaM nach Bindung des Zielpeptids (Abb. 6) [57]. CaM umschließt das Zielpeptid und nimmt eine im Vergleich zum freien  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen CaM kompaktere Struktur an. Das Peptid ist im Komplex mit dem C-Terminus zur zentralen Helix des CaM orientiert, was als sogenannte antiparallele Orientierung bezeichnet wird [57].

Aufgrund der strukturell sehr gut charakterisierten Interaktion des M13-Peptids mit CaM wurde es in dieser Arbeit als Modellsystem zur Etablierung einer analytischen Strategie verwendet.



**Abb. 6** **A:** Röntgenkristallstruktur des Calmodulins (Pantoffeltierchen) im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand [21]; **B:** Lösungsstruktur (NMR-Struktur) des CaM/M13-Peptid Komplexes im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand (CaM aus der schwarzbäuchigen Fruchtfliege) [57]. Einträge der Proteindatenbank (PDB) sind angegeben.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen: rote Kugeln; EF-Handmotiv 1: blau; EF-Handmotiv 2: grün; EF-Handmotiv 3: gelb; EF-Handmotiv 4: orange.

## 1.2 Massenspektrometrische Grundlagen

Die Massenspektrometrie (MS) ist heutzutage ein unverzichtbares analytisches Werkzeug in allen naturwissenschaftlichen Bereichen. Grundsätzliches Ziel dabei ist die Identifizierung einer Verbindung anhand der Molekül- bzw. Atommassen ihrer Bestandteile [58]. Das Grundprinzip der Massenspektrometrie liegt in der Erzeugung von Ionen aus anorganischen oder organischen Substanzen mittels geeigneter Methoden, deren Überführung in die Gasphase und der anschließenden Trennung nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung [58]. Die Erzeugung der Ionen kann im Vakuum oder unter Atmosphärendruck stattfinden, während die Trennung anhand ihrer  $m/z$ -Verhältnisse im Vakuum erfolgt.

Die MALDI (Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisierung) zählt neben der heute am häufigsten eingesetzten Elektrospray-Ionisierung (ESI) zu den sanften Ionisierungsmethoden, die für die Analyse von Makromolekülen, wie Peptiden oder Proteinen, eingesetzt werden. Beide werden im Folgenden zusammen mit den in dieser Arbeit verwendeten Analysatoren genauer beleuchtet.

### 1.2.1 Ionisierungsmethoden

#### 1.2.1.1 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung (MALDI)

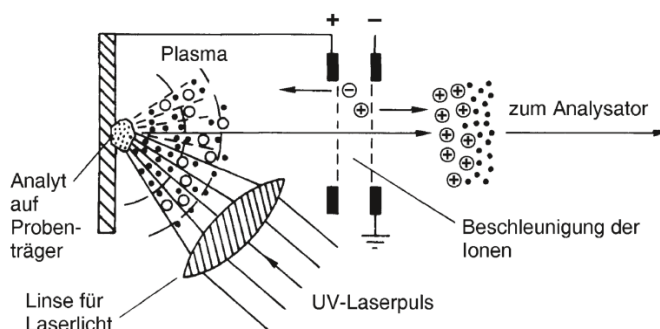
Bei der MALDI erfolgt die Anregung durch Laserbestrahlung mit UV- oder IR-Lasern. Die Ionisierung mittels Laserdesorption (LDI) ist hierbei ein schon seit den 1960er Jahren bekanntes Prinzip [59]. Die Schwierigkeiten bei der Ionisierung labiler Substanzen mittels LDI waren die punktuell auftretenden hohen Temperaturen und Ionisierungsenergien. Die MALDI-Technik wurde von Michael Karas und Franz Hillenkamp entwickelt. Sie zeigten, dass durch Kokristallisierung von Analytmolekülen mit einer im UV-Bereich des Lasers absorbierenden organischen Matrix nicht flüchtige Substanzen effektiv und ohne starke Fragmentierung ionisiert werden können [60, 61]. Dies wurde in späteren Arbeiten auch für große Proteine bestätigt [62, 63].

Prinzipiell wird der Analyt für die Ionisierung mit einem Überschuss (1:1000 – 1:10000) einer geeigneten Matrix auf einem metallischen Probenhalter kokristallisiert und dieser in die MALDI-Quelle eingebracht [64]. Die Ionisierung erfolgt durch Laserbeschuss des Kokristallisats im Vakuum. Der genaue Vorgang der Ionisierung ist allerdings bis heute nicht abschließend geklärt. In Folge eines kurzen Laserpulses kommt es zur plötzlichen Desorption eines Teils des Feststoffkristallisats und zur Bildung einer sogenannten Desorptionswolke. Für

die Ionisierung kommen mehrere Möglichkeiten in Frage [65]. Zum einen kann es nach Anregung der Matrixmoleküle zur Übertragung eines Protons auf die Analytmoleküle kommen. Zum anderen wird bei Verwendung saurer Lösungsmittel die Desorption zuvor gebildeter protonierter Analytmoleküle diskutiert. Zusätzlich kann es bei absorbierenden Analytmolekülen auch zur direkten Photoionisierung und zur Bildung von Radikalkationen bzw. -anionen kommen. Die Beschleunigung der entstandenen Ionen erfolgt durch Anlegen einer elektrischen Spannung [58].

Für die Ionisierung mittels MALDI werden meist Laser im UV-Bereich mit Pulszeiten von 3-10 ns verwendet [58]. Es handelt sich dabei um Stickstofflaser mit einer Emission bei 337 nm oder Nd:YAG-Feststofflaser mit einer Wellenlänge von 355 nm [66, 67]. Für eine effektive Ionisierung sind eine homogene Kristallisation und die Wahl einer geeigneten Matrix entscheidend. Die Probenpräparation erfolgt dazu beispielsweise mit der *dried-droplet* Methode. Dabei wird die Analytlösung mit einer Matrixlösung in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch vor dem Auftragen oder direkt auf dem metallischen Probenteller gemischt und getrocknet. Für die Ionisierung von Proteinen haben sich Sinapinsäure [68] und 2,5-Dihydroxybenzoesäure [69] bzw. deren Derivate (z.B. Super-DHB [70]) als geeignete Matrices herausgestellt. Die Analyse von Peptiden erfolgt meist mit  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure [71].

Aufgrund der gepulsten Freisetzung der Ionen aus der MALDI-Quelle ist die Verbindung mit einem Flugzeitanalysator (TOF, *time-of-flight*) eine optimale Kombination.



**Abb. 7 Darstellung der MALDI.** Durch einen kurzen Laserpuls werden Matrix- und Probenmoleküle angeregt und desorbiert. Dies führt zur Ionisierung der Matrix und der Probenmoleküle. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung werden die erzeugten Ionen beschleunigt (Abbildung aus [58]).

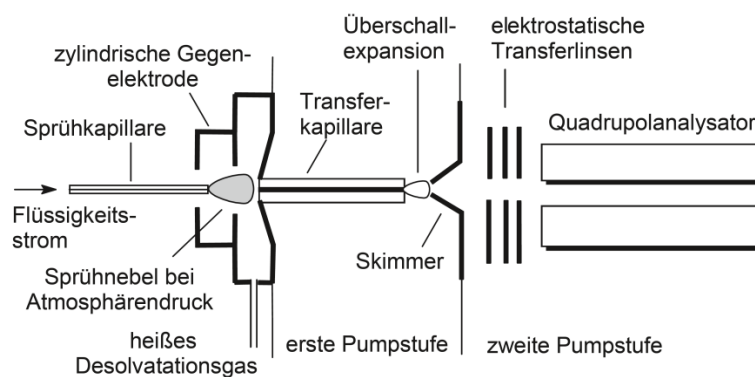
### 1.2.1.2 Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Die heute am häufigsten eingesetzte Methode besonders für die massenspektrometrische Analyse nicht flüchtiger Biomoleküle ist die Elektrospray-Ionisierung (ESI). Es handelt sich um eine der wenigen Methoden, bei der die Ionisierung bei Atmosphärendruck erfolgt.



Aufgrund ihres kontinuierlichen Charakters wird sie idealerweise in Kombination mit flüssigkeitschromatographischen Methoden eingesetzt.

Die heute bekannte Methode der ESI wurde bereits 1968 von Dole beschrieben [72]. Für seine in den achtziger Jahren entwickelte Methode zur Kombination der ESI mit der Massenspektrometrie [73] erhielt John Fenn 2002 den Nobelpreis für Chemie. Der schematische Aufbau der damaligen ESI-Quelle ist in *Abb. 8* gezeigt.



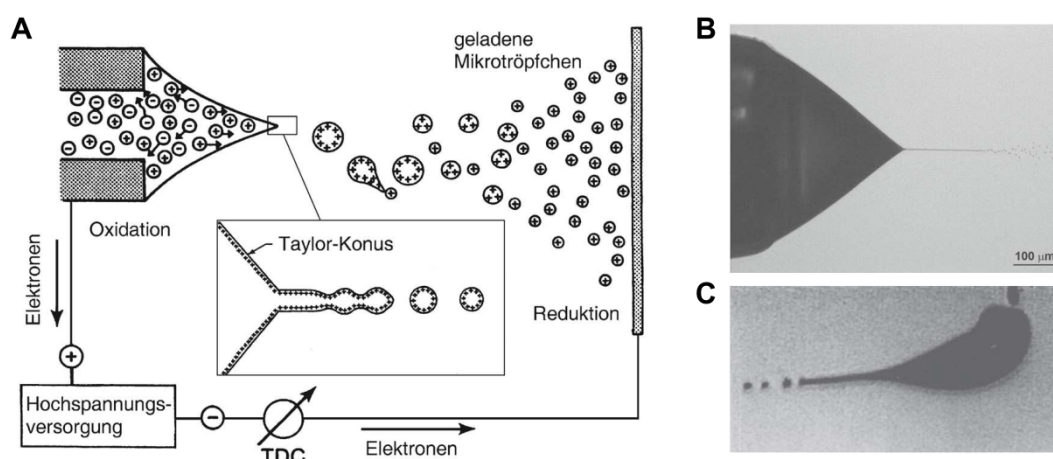
**Abb. 8** Schematische Darstellung einer ESI-Quelle. Die Analytlösung wird über eine Kapillare zum Eingang des Massenspektrometers geführt und am Ende durch Anlegen einer elektrischen Spannung versprüht. Das Lösungsmittel wird mit Unterstützung eines heißen Trockengasstroms verdampft und die desolvatisierten Ionen gelangen ins Massenspektrometer. In der ersten Pumpstufe werden das eindringende Trockengas sowie restliche Lösungsmittelmoleküle entfernt und die Ionen gelangen über den Skimmer und verschiedene Transferlinsen in den Massenanalysator (Abbildung nach [58, 73]).

Prinzipiell ist für die Ionisierung mittels ESI nahezu jedes flüchtige Lösungsmittel geeignet. Bei Standard-Flußraten von 5-20  $\mu\text{l}/\text{min}$  (Normalfluß-ESI) wird eine Kapillarspannung von 3-4 kV angelegt. Dabei ist für eine effektive Desolvatisierung ein höherer Anteil an flüchtigen organischen Lösungsmitteln notwendig. Beim Nano-Elektrospray ist auch die Verwendung polarer Lösungsmittel, wie reinem Wasser, möglich [74]. Unter Verwendung sehr enger Sprühkapillaren und einer Sprühspannung von 0,7-2,0 kV kann schon bei geringen Fließgeschwindigkeiten von 20-50  $\text{nl}/\text{min}$  ein stabiles Spray erreicht werden. Durch den geringen Fluß wird ein sehr feines Spray mit sehr viel kleineren Primärtröpfchen erzeugt (100-1000-fach kleiner als bei Normalfluß-ESI), was die zusätzliche Verwendung eines Trockengasstroms unnötig macht [75]. Dies führt zu einer verbesserten Empfindlichkeit und einem geringeren Probenverbrauch.

Eine Voraussetzung für die ESI ist das Vorhandensein von Analytionen in der Probenlösung, da Ionen nicht aktiv erzeugt werden [58]. Das Anlegen der Kapillarspannung führt zur Ladungstrennung innerhalb der Lösung. Fungiert der Eingang des Massenspektrometers als Kathode und die zuführende Kapillare als Anode, wandern die negativ geladenen Ionen zur Kapillarwand und die positiv geladenen Ionen innerhalb der

Flüssigkeit in Richtung Massenspektrometer. Dadurch bildet sich an der Kapillaröffnung ein Flüssigkeitskonus, der sogenannte Taylor-Konus (Abb. 9 A und B) [76]. Die zunehmende Feldstärke an der Konusspitze führt nach Überwinden der Oberflächenspannung zur Emission eines feinen Flüssigkeitsstrahls. Durch die hohe Ladungsdichte am Ende des Strahls zerfällt dieser in kleine Tröpfchen [77]. Die gleichartig geladenen Tröpfchen driften aufgrund der Coulomb-Abstoßung auseinander und es entsteht ein feines Spray.

Die Flüssigkeit der mikrometergroßen Tröpfchen verdampft und die Dichte gleichartiger Ladungen innerhalb der Tröpfchen nimmt weiter zu. Übersteigt die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung des Lösungsmittels, zerfallen die Tröpfchen bei Erreichen des sogenannten Rayleigh-Limits [78] in kleinere Mikrotröpfchen. Ursächlich dafür sind die auftretenden Fliehkräfte, die zu einer Deformation der Tröpfchenform und somit zu einer inhomogenen Ladungsverteilung führen. An Bereichen höherer Ladungsdichte schnüren sich noch kleinere Tröpfchen ab (Abb. 9 C) [79-81].



**Abb. 9 Darstellung der Prozesse bei der Elektrospray-Ionisierung.** A: Schematische Darstellung des ESI-Prozesses von der Bildung des Taylorkonus, der Abschnürung der Mikrotröpfchen und der weiteren Abschnürung kleinerer Mikrotröpfchen von den Primärtröpfchen (Abbildung aus [58] nach [79]). B: Mikroaufnahme des Taylorkonus, dem austretenden Strahl und dem Zerfall in kleine Tröpfchen (Abbildung aus [58] nach [77]). C: Schattenaufnahme eines deformierten Tröpfchens und den sich abschnürenden Mikro/Nanotröpfchen (Abbildung nach [80]).

Die Bildung der freien Ionen wird durch zwei verschiedene Modelle erklärt. Das Modell des geladenen Rückstands (CRM, *charged residue model*) geht von immer kleiner werdenden Tröpfchen aus, die letztendlich nur ein einziges Molekül enthalten [72, 82]. Nach Verlust der restlichen Lösungsmittelmoleküle werden die verbliebenen Ladungen auf das Analytmolekül übertragen. Je nach Anzahl der verbliebenen Ladungen kann so das Auftreten niedrig geladener Spezies großer Moleküle erklärt werden.

Das Modell der Ionenverdampfung (IEM, *ion evaporation model*) postuliert die Verdampfung einzelner Ionen von der Oberfläche hochgeladener Mikrotröpfchen [83, 84].

Dieses Modell geht davon aus, dass größere Moleküle entsprechend ihrer Oberfläche mehr Ladungen erhalten als kleine globuläre Moleküle. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Proteine in entfalteter Form meist höhere Ladungen tragen als in der nativen gefalteten Form.

## 1.2.2 Massenanalytoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridmassenspektrometer setzen sich aus einer Reihe verschiedener Massenanalytoren zusammen, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

### 1.2.2.1 Der Flugzeit-Analysator

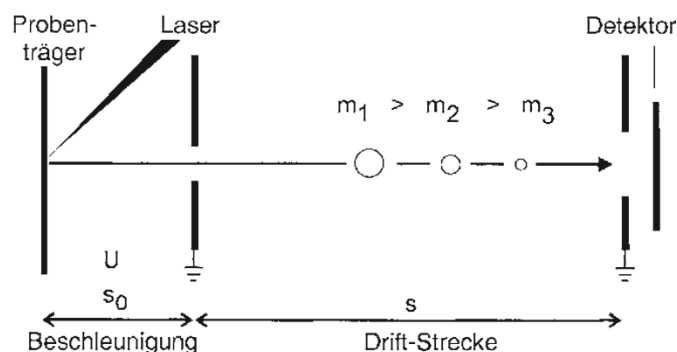
Das Prinzip der Flugzeitanalytoren (TOF, *time-of-flight*) wird schon seit den 1940er Jahren genutzt [85]. Dabei werden Ionen mithilfe eines elektrischen Feldes auf eine bestimmte kinetische Energie beschleunigt und gelangen dann in ein feldfreies Flugrohr. Der folgende physikalische Zusammenhang zwischen der elektrischen und der kinetischen Energie (Gl. 1.1) beschreibt die getrennte Detektion von Ionen mit unterschiedlichen  $m_i/z$ -Verhältnissen anhand ihrer Flugzeit (Gl. 1.2). Dabei entspricht  $s$  der bekannten Länge des Flugrohrs,  $U$  der angelegten Beschleunigungsspannung,  $e$  der Elementarladung,  $z$  der Ladungszahl,  $m_i$  der zu bestimmenden Masse des Ions und  $t$  der für das Durchfliegen der feldfreien Driftstrecke benötigten Zeit (Gl. 1.3).

$$E_{el} = ezU = \frac{1}{2} m_i v^2 = E_{kin} \quad \text{Gl. 1.1}$$

$$t = \frac{s}{v} \quad \text{Gl. 1.2.}$$

$$\frac{m_i}{z} = \frac{2 e U t^2}{s^2} \quad \text{Gl. 1.3}$$

Nach Beschleunigung der Ionen mit einer bestimmten Beschleunigungsspannung sollten diese beim Erreichen der feldfreien Region identische kinetische Energien besitzen und so entsprechend ihrer Masse zu unterschiedlichen Zeiten am Detektor eintreffen. Der schematische Aufbau eines linearen TOF-Analysators mit einer MALDI-Quelle ist in *Abb. 10* gezeigt.

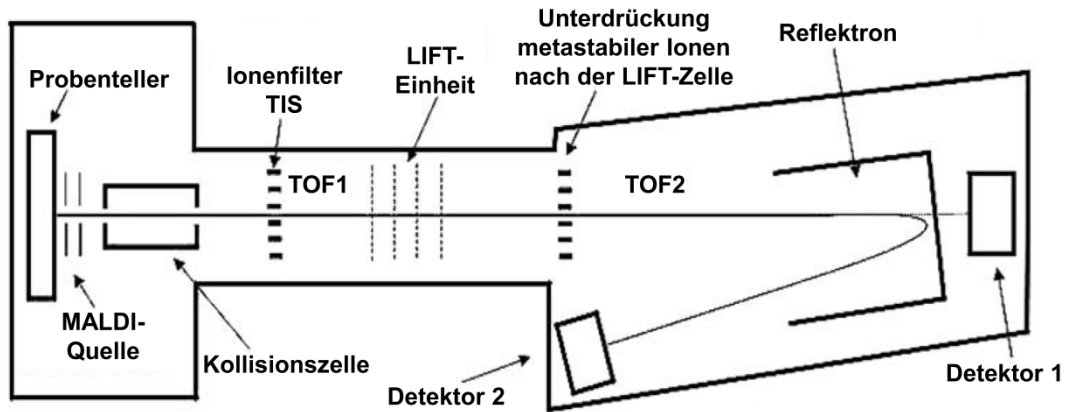


**Abb. 10 Schematische Darstellung eines linearen TOF-Analysators [58].** Nach Ionisierung durch einen kurzen Laserpuls werden die Ionen mit der Spannung  $U$  beschleunigt, gelangen dann in die feldfreie Driftstrecke und kommen dann entsprechend ihrer  $m/z$ -Verhältnisse zu unterschiedlichen Zeiten am Detektor an.

Bei den heutigen TOF-Analysatoren werden die mittels MALDI gepulst entstehenden Ionen verzögert extrahiert [86, 87]. Die Extraktionsspannung wird erst ca. 200 ns nach Beendigung des Laserpulses eingeschaltet, so dass die Desorption abgeschlossen ist [58]. Die entstandene Ionenwolke wird dann durch plötzliches Anlegen der Spannung beschleunigt und gelangt gleichzeitig in den feldfreien Raum. Bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie werden sehr hohe Beschleunigungsspannungen verwendet (10-30 kV), um die wegen des Laserpulses schon anfänglich hohe kinetische Energie der Ionen zu kompensieren [87].

Eine weitere Verbesserung der Auflösung wird durch Verwendung eines Reflektrons erreicht [88]. Das Reflektron setzt sich aus einer Reihe ringförmiger Elektroden zusammen und kann als eine Art Ionenspiegel betrachtet werden (Abb. 11). Die Ionen gelangen in das Reflektronfeld, werden abgebremst und entgegen ihrer ursprünglichen Bewegungsrichtung aus dem Reflektron ausgestoßen. Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis dringen je nach Höhe ihrer kinetischen Energie unterschiedlich tief in das Reflektronfeld ein. Dabei werden leicht unterschiedliche Flugbahnen und kinetische Energien identischer Ionenspezies korrigiert, so dass sie zur gleichen Zeit am Detektor ankommen.

Mit heutigen sogenannten TOF/TOF-Geräten sind zusätzlich auch tandemmassenspektrometrische Fragmentierungsexperimente möglich. Eine seit längerem bekannte MALDI-Fragmentierungstechnik, *in-source decay* (ISD), beruht auf der Fragmentierung des Analyten in der Quelle durch höhere Laserenergie. Eine weitere, *post-source decay* (PSD) genannte Technik nutzt den Zerfall metastabiler Ionen in der feldfreien Flugbahn. Bei der von der Firma Bruker Daltonik entwickelten, als LID (*laser-induced dissociation*) bezeichneten Methode, die in dieser Arbeit genutzt wurde, werden Fragmentierungen der Vorläuferionen durch eine erhöhte Laserenergie und Erhöhung der sogenannten Laserfluenz erzielt [89]. Dabei treten bei Peptiden hauptsächlich b- und y-Fragmentionen und teilweise auch a-Fragmentionen auf.

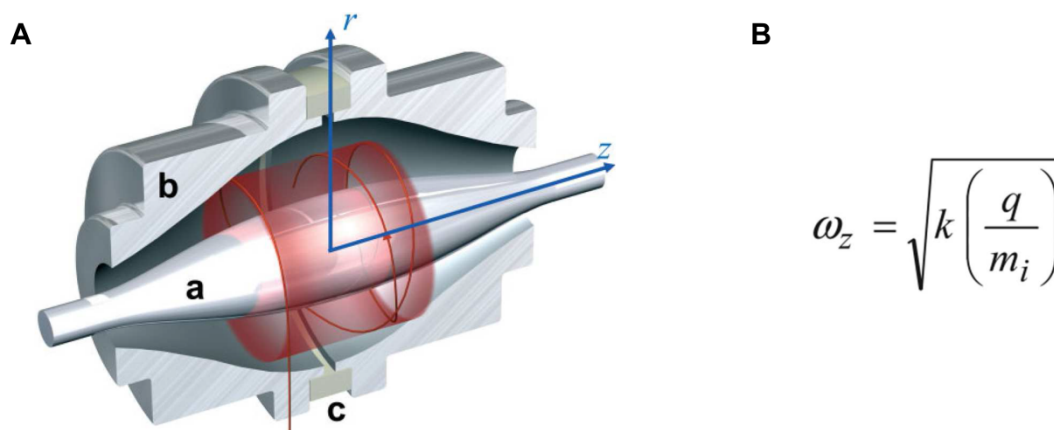


**Abb. 11 Schematische Darstellung des MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers mit LIFT-Funktion und Reflektion.** Bei LID führt die erhöhte Laserfluenz zu einer größeren Anzahl von Vorläuferionen und in der Folge auch der auftretenden Fragmentionen. Durch eine niedrigere Beschleunigungsspannung von ca. 8 kV bleibt aufgrund der langsameren Geschwindigkeit mehr Zeit für die Entstehung von Fragmentionen. Die Fragmentionen fliegen zusammen mit ihren Vorläuferionen als Ionenfamilie durch den feldfreien Raum 1 (TOF1) zur LIFT-Einheit. Auf dem Weg erfolgt die Selektion der gewünschten Ionenfamilie durch einen timed ion selector (TIS). In einem ersten Bereich der LIFT-Einheit werden die Ionen der Familie auf ein gemeinsames Potential angehoben und durch ein zweites Elektrodengitter fokussiert. Durch Absenken der Elektrodenspannung gelangen sie in den dritten Bereich der LIFT-Zelle und werden dort auf Maximalgeschwindigkeit in Richtung des zweiten feldfreien Raums beschleunigt. Am Detektor 2 werden die Ionen entsprechend ihres  $m/z$ -Verhältnisses zeitlich getrennt erfasst (Abbildung nach [89]).

### 1.2.2.2 Der Orbitrap-Massenanalysator

Der von Alexander Makarov entwickelte und seit 2005 von der Firma Thermo Fisher Scientific vertriebene Orbitrap-Massenanalysator [90, 91] ermöglicht die massenspektrometrische Analyse von Ionen mit einer hohen Genauigkeit und Sensitivität. Das Prinzip, Ionen auf Kreisbahnen um eine in z-Richtung ausgedehnte Zentralelektrode einzufangen, die von einer Zylinder-förmigen und an beiden Enden verschlossenen Außenelektrode umgeben ist, war schon 1923 von Kingdon beschrieben worden [92]. Knight entwickelte dieses Prinzip weiter. Er veränderte die Form der Außenelektrode so, dass der Radius von der Mitte zu den Außenseiten abnahm [93]. Mit dieser sogenannten idealen Kingdon-Falle konnte man Ionen speichern und gezielt zu einem Detektor weiterleiten, aber keine  $m/z$ -Verhältnisse bestimmen [91]. Makarov nutzte dieses Prinzip und entwickelte die heute bekannte Orbitrap, die sich aus einer spindelförmigen Zentralelektrode und einer in der Mitte geteilten fassförmigen Außenelektrode zusammensetzt [90] (Abb. 12 A). An der Zentralelektrode liegt ein Potential von ca. 3,5 kV an, während beide Außenelektrodenhälften auf Grundpotential geerdet sind [94]. Gelangen die zu analysierenden Ionen tangential zur Zentralelektrode in das als quadrologarithmisch bezeichnete Feld der Orbitrap, bewegen sie sich auf stabilen Kreisbahnen um die spindelförmige Zentralelektrode. Sie rotieren aufgrund der Form des statischen elektrischen Feldes nicht nur um die zentrale Elektrode, sondern zusätzlich periodisch entlang ihrer z-Achse. Durch diese Bewegung (z-Achse) wird in den

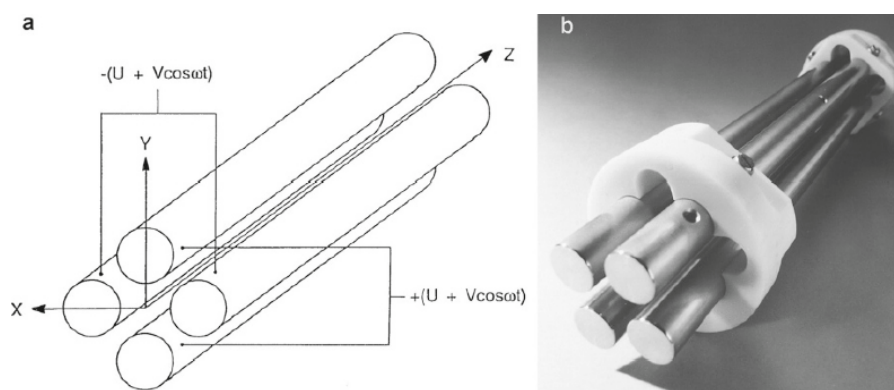
beiden Außenelektroden ein Bildstrom induziert. Die Oszillationsfrequenz entlang der z-Achse ist unabhängig von der initialen Energie der Ionen und indirekt proportional zur Quadratwurzel des  $m/z$ -Verhältnisses [90]. Mithilfe einer schnellen Fourier-Transformation lassen sich so die exakten  $m/z$ -Verhältnisse der zu analysierenden Ionen bestimmen (Gleichung, *Abb. 12 B*).



**Abb. 12 Orbitrap-Massenanalysator.** **A:** Innenansicht des Orbitrap-Massenanalysators: (a) spindelförmige Zentralkammer; (b) faßförmige Außenelektrode; (c) Keramikisolierung zwischen den Hälften der Außenelektrode.  $r$  und  $z$  bezeichnen die zylindrischen Koordinaten (Abbildung aus [95]). **B:** Die Oszillationsfrequenz entlang der  $z$ -Achse ( $\omega_z$ ) ist indirekt proportional zur Quadratwurzel des Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/q$ ) eines Ions.  $k$ : Konstante für die Krümmung des elektrischen Feldes.

### 1.2.2.3 Linearer Quadrupol-Massenfilter

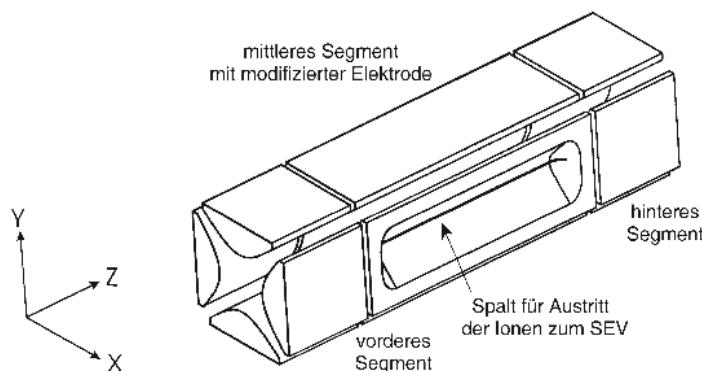
Lineare Quadrupol-Massenfilter werden entweder als reine Transferoptiken zur gerichteten Führung der Ionen in Massenspektrometern eingesetzt oder entsprechend ihrem Namen als Massenfilter. Sie setzen sich aus vier quadratisch um eine Längsachse angeordneten hyperbolischen oder zylindrischen Stabelektroden zusammen (*Abb. 13*) [58]. Die sich gegenüberliegenden Elektroden besitzen jeweils das gleiche, aus einer Gleich- und Wechselstromkomponente bestehende, Potential. Dadurch wechseln sich die auf ein Ion einwirkenden anziehenden und abstoßenden Kräfte in  $x$ - und  $y$ -Richtung ab. Das auftretende quadrupolare Feld kann mithilfe der *Mathieuschen* Gleichungen [96] beschrieben werden [58]. Bei einer bestimmten Gleichstrom- und Wechselstromspannung mit einer definierten Frequenz können nur Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Wertes bzw.  $m/z$ -Bereiches den Quadrupol auf stabilen Bahnen in  $z$ -Richtung passieren, andere bewegen sich radial heraus oder prallen gegen die Stabelektroden. Ohne eine zusätzliche Gleichstromkomponente wirkt der Quadrupol als reine Ionenferroptik für einen breiten  $m/z$ -Bereich (Radiofrequenz (RF-*only*)-Modus) [58].



**Abb. 13 Quadrupol-Massenfilter.** (a) Schematische Darstellung mit eingezeichneten Koordinaten und den anliegenden Wechselspannungen ( $V$ ) und Gleichspannungen ( $U$ ); (b) Foto eines Quadrupol-Massenfilters der Firma Waters (Abbildungen aus [58]).

#### 1.2.2.4 Lineare Ionenfalle

Die linearen Ionenfallen (LIT) in den hier verwendeten Hybridmassenspektrometern bestehen aus einem Quadrupol mit hyperbolischen Elektrodenstäben, die in drei Bereiche segmentiert sind. Gelangen Ionen in das Wechselspannungsfeld des Quadrupols, werden sie durch Stoßkühlung verlangsamt [97]. Bei Anlegen einer Gleichspannung an beiden Außensegmenten (*Trapping*-Elektroden) des Quadrupols wird ein zusätzliches *Trapping*potential erzeugt und Ionen im Inneren des Quadrupols eingefangen [98]. So können Ionen akkumuliert und gespeichert werden. Wird die anliegende Gleichspannung an den äußeren Segmenten auf eine Wechselspannung umgestellt, können die gespeicherten Ionenpakete gezielt in axialer ( $z$ -) Richtung (*Abb. 14*) ausgeworfen werden. Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Wertes können auch isoliert oder massenselektiv ausgeworfen werden. Dazu wird eine zusätzliche Wechselspannung an den Außensegmenten angelegt, deren Frequenz der radialen Frequenz der Ionen eines  $m/z$ -Wertes entspricht [99]. Diese bewegen sich dadurch in axialer ( $z$ -) Richtung aus der LIT heraus. Alternativ ist es mit den hier verwendeten segmentierten LITs möglich, Ionen eines  $m/z$ -Wertes auch radial (*Abb. 14*,  $x$ -Richtung) auszuwerfen. Dafür werden die im Inneren der LIT befindlichen Ionen durch eine zusätzliche Wechselspannung an den zentralen ( $x$ -)Stabelektroden massenselektiv angeregt und durch die in den Elektroden befindlichen Öffnungen in  $x$ -Richtung nach außen auf einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) gelenkt [100]. Eine solche LIT kann auch als isolierter Massenanalysator verwendet werden.



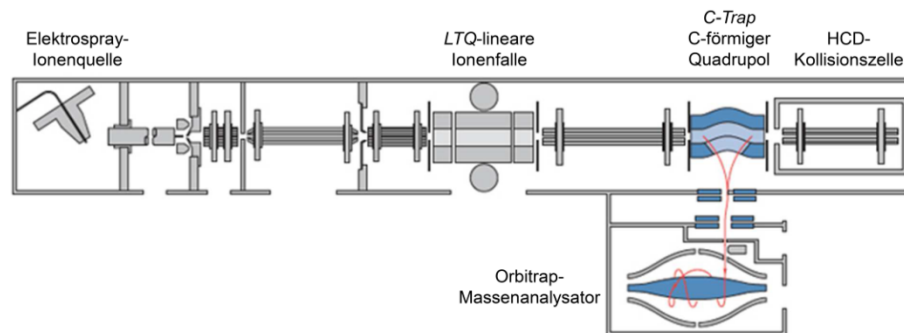
**Abb. 14 Segmentierte lineare Ionenfalle.** Ionen werden im RF-Feld des mittleren Segments radial gespeichert. Durch ein stärkeres Feld am Anfang und Ende der Falle wird ein Trappingfeld erzeugt, was ein axiales Verlassen der Ionen verhindert. Ionen können massenselektiv sowohl axial (*z*-Achse), als auch radial (*x*-Achse) ausgeworfen werden. SEV: Sekundärelektronenvervielfacher (Abbildung aus [58] nach [100]).

### 1.2.2.5 Hybridgeräte

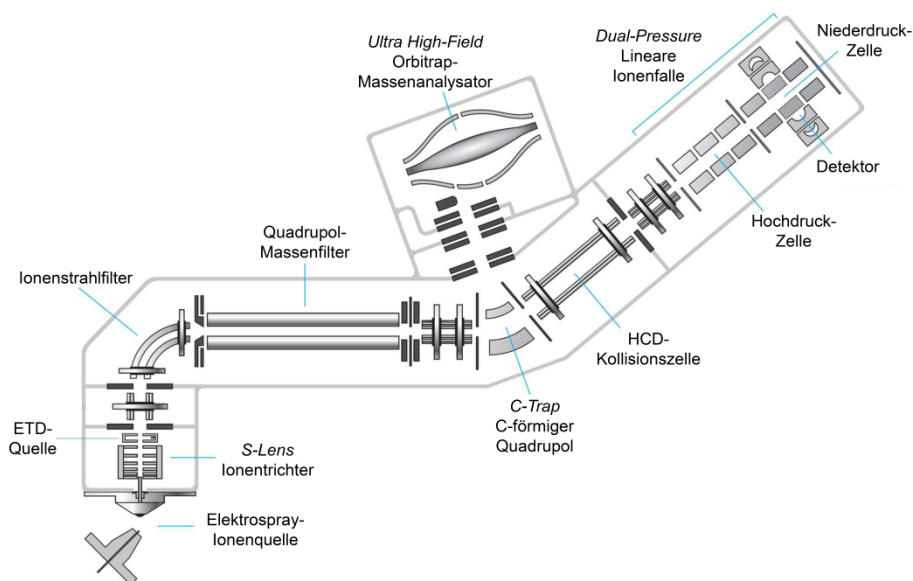
Eines der frühen kommerziell erhältlichen Orbitrap-Massenspektrometer ist das in dieser Arbeit verwendete Hybridgerät LTQ-Orbitrap XL (Abb. 15) [94]. Die Ionisierung erfolgte hier über eine Nano-ESI Quelle. Die Ionen gelangen nach Passieren der Transferkapillare und des Skimmers über verschiedene Iontentransferoptiken in die lineare Ionenfalle. Hier wird über kurze *Prescans* der Totalionenstrom (TIC) bestimmt und die Füllzeit der Falle automatisch angepasst (AGC, *automatic gain control*) [94]. Dies verhindert ein Überfüllen der linearen Ionenfalle (hier: LTQ) und daraus folgende Raum-Ladungseffekte, die zu einer verringerten Auflösung und Massengenauigkeit führen können. Nach Akkumulation einer bestimmten Anzahl von Ionen können diese entweder direkt in der LTQ mit einer niedrigen Auflösung, aber hohen Sensitivität analysiert werden oder die Ionen gelangen nach axialem Auswurf über einen Transfermultipol in den C-förmigen RF-Quadrupol (*C-Trap*). Dort werden sie durch Stoßkühlung bei niedrigem Stickstoffpartialdruck abgebremst und im Zentrum der *C-Trap* konzentriert. Über einen kurzen Hochspannungspuls werden die Ionen ausgestoßen und in die Orbitrap injiziert [94]. Während der Injektion wird das anziehende Potential der Zentralelektrode verringert. Entscheidend dabei sind der Injektionswinkel, eine sehr kurze Injektionszeit und die leicht seitlich verschobene Injektion in die Orbitrap. An der Zentralelektrode liegt anschließend ein anziehendes Potential von ca. -3,5 kV (Positivionenmodus) an und die Ionen gelangen auf die erforderliche Kreisbahn um die Zentralelektrode. Sie oszillieren außerdem entlang der *z*-Achse (Abb. 12 A). Für die Aufzeichnung eines ausreichend langen Transienten ist im Bereich der Orbitrap ein Hochvakuum von ca.  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  mbar erforderlich [94]. Die Analyse der Ionen kann mit einer Auflösung von bis zu 100.000 bei *m/z* 400 erfolgen und bei interner Kalibrierung mit einer Massengenauigkeit von  $\leq 3$  ppm.



Bei dem neu entwickelten Orbitrap Fusion Tribrid-Gerät (*Abb. 16*) wird für eine verbesserte Transmission der Ionen anstatt eines Skimmers ein Ionentrichter (*S-Lens*) verwendet [101]. Im darauf folgenden gebogenen Transferquadrupol werden Neutralteilchen effektiv abgetrennt und nur geladene Moleküle in den Quadrupol-Massenfilter geführt. Hier können Ionen eines  $m/z$ -Wertes isoliert oder alle Ionen in der RF-Konfiguration hindurchgeleitet werden. Die Ionen werden zuerst in der HCD (*higher-energy collisional dissociation*)-Zelle gesammelt und können dann entweder über die *C-Trap* in die Orbitrap geführt und analysiert werden oder gelangen in die zweizellige lineare Ionenfalle. Die Orbitrap ist im Vergleich mit dem Orbitrap-Analysator im LTQ-Orbitrap XL-Gerät insgesamt kleiner mit einer verhältnismäßig dickeren inneren Elektrode. Durch das stärkere elektrische Feld in der sogenannten *High-Field* Orbitrap von bis zu 5 kV kann hier eine Auflösung von bis zu 400.000 bei  $m/z$  200 und bei vergleichbarer Auflösung schnellere Analysenzeiten gegenüber den vorherigen Orbitrap-Massenanalysatoren erreicht werden [101]. Der niedrigere Druck in der linearen Ionenfalle verbessert ebenfalls die Auflösung und erlaubt schnellere Analysenzeiten.



**Abb. 15** Schematischer Aufbau des LTQ-Orbitrap XL Hybridmassenspektrometers (*planetorbitrap.com*).



**Abb. 16** Schematischer Aufbau des Orbitrap Fusion Tribrid-Hybridmassenspektrometers (*Thermo Fisher Scientific-Product Specifications-Broschüre 2013, Abbildung nach [101]*).

### 1.2.3 Fragmentierungsmethoden

In dieser Arbeit wurden verschiedene Fragmentierungsexperimente durchgeführt. Für die sogenannte kollisionsinduzierte Fragmentierung (CID, *collision-induced dissociation*) [102, 103] werden die in der linearen Ionenfalle isolierten und gespeicherten Ionen angeregt. Nach Zufuhr eines Inertgases (z.B. He, Ar oder N<sub>2</sub>) kommt es zu Kollisionen zwischen den angeregten Ionen und den Inertgasmolekülen. Die schwächsten Bindungen im Molekül, d.h. bei Peptiden die Peptidbindung, brechen dabei zuerst. Die entstandenen Fragmentionen können entweder direkt in der linearen Ionenfalle (LIT) oder nach Überführung in der Orbitrap analysiert werden. Bei der zweizelligen Ionenfalle erfolgen die Fragmentierung in der Hochdruckzelle und die Detektion der Fragmentionen in der benachbarten Niederdruck-Zelle. Dies ermöglicht eine höhere Auflösung bei der Analyse der Fragmentionen.

Eine weitere Möglichkeit einer etwas höher energetischen Fragmentierung ist durch Aktivierung mittels HCD (*higher-energy collisional dissociation*) möglich [104]. Dafür werden die Ionen in einen an die *C-Trap* angrenzenden RF-Multipol überführt und durch einen starken Radiofrequenzpuls angeregt. Kollisionen mit vorhandenen Stickstoffmolekülen führen zu vergleichbaren Fragmentierungen, wie unter CID-Bedingungen. Bei dem LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer kann die Detektion der erzeugten Fragmentionen ausschließlich in der Orbitrap erfolgen. Die veränderte Anordnung der Analysatoren bei dem Orbitrap Fusion Tribrid-Gerät ermöglicht die Detektion der Fragmentionen sowohl in der Orbitrap als auch in der linearen Ionenfalle. Sowohl bei CID als auch bei HCD werden bei der Fragmentierung von Proteinen oder Peptiden hauptsächlich die Peptidbindungen zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem benachbarten Stickstoffatom gespalten. Je nach Verbleib der Ladung können *N*-terminale *b*-Ionen und *C*-terminale *y*-Ionen entstehen (*Abb. 17*). HCD eignet sich dabei besonders für die Analyse der Lokalisierung posttranslationaler Modifikationen, wie Phosphorylierungen, da diese trotz höherer Energie erhalten bleiben [104].

Bei Verwendung des Orbitrap Fusion Tribrid-Hybridmassenspektrometers ist zusätzlich eine durch Übertragung niederenergetischer Elektronen verursachte Fragmentierung möglich (ETD, *electron transfer dissociation*) [101, 105]. In einer direkt hinter der *S-Lens* lokalisierten Reaktionskammer wird über ein starkes elektrisches Feld ein Elektron von zugeführtem Stickstoff auf das sublimierte Fluoranthren übertragen. Nach Isolierung und Speicherung der interessierenden Ionenspezies in der linearen Ionenfalle wird das erzeugte Fluoranthren-Radikalanion ebenfalls in die lineare Ionenfalle überführt und das niederenergetische Elektron auf das zu analysierende Molekülion übertragen. Bei Fragmentierung von Proteinen und

Peptiden werden dadurch Spaltungen zwischen dem an der Peptidbindung beteiligten Amidstickstoff und dem folgenden C $\alpha$ -Atom hervorgerufen, wodurch N-terminale c-Fragmentationen und C-terminale z-Radikalfragmentationen entstehen (Abb. 17). Zusätzlich ist durch Fragmentierung der Seitenketten eine Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin möglich. Posttranslationale Modifikationen bleiben größtenteils erhalten, worin die Stärke dieser Fragmentierungsmethode liegt.

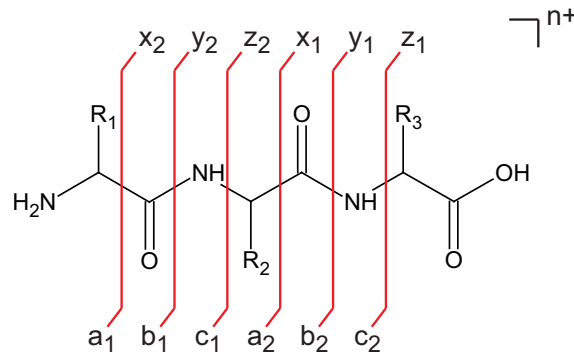


Abb. 17 Fragmentierungsschema am Beispiel eines Tripeptids mit den auftretenden Fragmentationen unter Verwendung der Nomenklatur nach Roepstorff und Biemann [106, 107].

### 1.3 Protein-Strukturanalysen mittels chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins hängt eng mit dessen Funktion und seinen Interaktionen mit anderen Proteinen zusammen [108]. Strukturelle Veränderungen können entscheidend für den Ablauf eines physiologischen Vorgangs sein. Für ein detailliertes Verständnis der molekularen Zusammenhänge ist deshalb auch eine genaue Charakterisierung der 3D-Strukturen bzw. der strukturellen Veränderungen von Proteinen und deren Komplexen essentiell.

Zur Untersuchung von Proteinstrukturen und Proteininteraktionen werden verschiedene spektroskopische, kalorimetrische, chromatographische sowie massenspektrometrische Methoden eingesetzt. Eine genaue strukturelle Charakterisierung wird häufig mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie durchgeführt [109, 110]. Die erhaltenen Daten können zur Erstellung hochaufgelöster dreidimensionaler Proteinstrukturen genutzt werden. Allerdings sind für diese Messungen große Proteinmengen und hohe Konzentrationen notwendig, was ihre Anwendung auf bestimmte Systeme begrenzt [111].

Die strukturelle Untersuchung mittels chemischer Quervernetzung in Kombination mit der Massenspektrometrie stellt eine Alternative zu den klassischen Methoden dar [108, 111, 112]. Die Reaktionen können in Lösung bei annähernd physiologischen Konzentrationen und pH-

Bedingungen durchgeführt werden. Dabei ist die Größe der interessierenden Proteinkomplexe theoretisch unbegrenzt, es werden geringe Mengen an Analyt benötigt und es kann schnell ein riesiger Datensatz generiert werden [108]. Die Ergebnisse können dann zur Erstellung niederaufgelöster Protein-3D-Strukturmodelle genutzt werden. Dies wurde an sehr großen Proteinkomplexen, wie dem 1-MDa TRiC/CCT Chaperonin-Komplex [113, 114], der sich aus 16 Untereinheiten zusammensetzt, und dem 670-kDa RNA-Polymerase II-TFIIF-Komplex [115] gezeigt.

### **1.3.1 Prinzip der chemischen Quervernetzung und die Identifizierung der Quervernetzungsprodukte**

Bei der chemischen Quervernetzung von Proteinen oder Proteinkomplexen werden über ein chemisches Reagenz kovalente Bindungen zwischen verschiedenen Aminosäureresten eingeführt. Dies kann direkt zwischen zwei benachbarten Aminosäureseitenketten als sogenannte Nulllängen-Vernetzung oder durch Einführen eines Abstandshalters (*Spacer*) erfolgen. Das Protein bzw. der Komplex wird dadurch in einer bestimmten Konformation fixiert. Entsprechend der Primärstruktur der verwendeten Proteine, deren Größe und der zu lösenden Fragestellung muss dafür ein passendes Quervernetzungsreagenz gewählt werden. Die Reagenzien können hinsichtlich der maximal überbrückbaren Distanz, der Reaktivität sowie der Funktionalität variieren [108, 111]. Sehr wichtig für die Auswahl des Reagenzes ist auch, ob primär strukturelle Informationen von Interesse sind oder nach unbekanntem Interaktionspartnern gesucht werden soll.

Zu Beginn müssen die Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Konzentration des Quervernetzungsreagenzes, der Reaktionszeit, den pH-Bedingungen und der Temperatur optimiert werden. Ziel ist dabei, das Protein bzw. dessen Komplex ausreichend zu vernetzen, aber keine Reaktionsartefakte durch zu starke Vernetzung zu erzeugen [108]. Nach erfolgter Reaktion wird die Komplexbildung massenspektrometrisch überprüft.

Die Untersuchung der quervernetzten Komplexe kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Eine der populärsten Strategien ist die sogenannte „*bottom-up*“-Analyse (Abb. 18). Dazu werden nach gelelektrophoretischer Trennung (SDS-PAGE) die Banden des Komplexes aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend werden die Proteine mit einer oder mehreren geeigneten Proteasen proteolytisch im Gel gespalten [108]. Dies kann alternativ auch direkt in Lösung erfolgen. Durch die Wahl der richtigen Protease sollten gut zu analysierende und definierte Produkte im Massenbereich zwischen 1000-3000 u erhalten werden. Aufgrund der spezifischen Spaltung nach Lysin und Arginin und der daraus resultierenden potentiellen Ladung am C-

Terminus wird am häufigsten die Protease Trypsin verwendet. Bei der Reaktion mit aminreaktiven Reagenzien kann dies aufgrund der Vernetzung von Lysinseitenketten vermehrt zu Fehlschnittstellen führen, weshalb die Verwendung einer zweiten Protease oft vorteilhaft ist.

Die erhaltenen Peptidmischungen sind sehr komplex und bestehen hauptsächlich aus linearen Peptiden und einem kleinen Anteil quervernetzter Produkte. Eine chromatographische Trennung ist deshalb für die massenspektrometrische Identifizierung essentiell. Die erhaltenen massenspektrometrischen Daten werden mit einer Liste *in-silico* erzeugter Quervernetzungsprodukte abgeglichen und identifizierte Produkte über ihre Fragmentationmassenspektren bestätigt.

Die massenspektrometrische Analyse intakter Proteine oder Proteinkomplexe („*top-down*“-Analytik) stellt einen zweiten vielversprechenden Ansatz dar [108] (*Abb. 18*). Ein sehr hohes Auflösungsvermögen ist dabei eine Voraussetzung für die Analyse großer Komplexe und begrenzte den Einsatz dieser Methode bisher im Wesentlichen auf FTICR (Fourier-Transformation-Ionencyclotronresonanz)-Massenspektrometer. Mit der Entwicklung des Orbitrap-Massenanalysators wird dieser Ansatz auch für ein breiteres Anwenderfeld interessant. Dabei wird der intakte Proteinkomplex ohne vorherige proteolytische Spaltung ionisiert und in die Gasphase überführt. Über einen Massenfilter werden die Ionen des Komplexes in der Gasphase isoliert und anschließend fragmentiert. Die Identifizierung der exakten Vernetzungsstellen erfordert eine leistungsfähige Fragmentierungsmethode zur Sequenzierung des Komplexes. Die Entwicklung der ETD-Fragmentierung war dabei ein entscheidender Schritt. Die Analyse der komplexen Fragmentationenspektren setzt zusätzlich eine leistungsstarke Software voraus. In der Arbeitsgruppe von Neil Kelleher wurde für die Analyse posttranslatinaler Modifikationen eine leistungsstarke Software entwickelt [116, 117]. Für die Analyse von quervernetzten Proteinen ist allerdings immer noch eine zeitaufwendige manuelle Auswertung notwendig. Trotz des großen Potentials der „*top-down*“-Methode hängt deren Erfolg von einer effektiven Überführung großer Komplexe in die Gasphase und deren ausreichende Fragmentierung zur genauen Bestimmung der exakten Quervernetzungsstellen ab, was ihre Anwendung bisher begrenzt.

Nach Identifizierung der exakten Vernetzungsstellen können die erhaltenen Distanzbeschränkungen für die Computer-gestützte Berechnung niederaufgelöster Proteinstrukturmodelle, z.B. mit Rosetta [118], genutzt werden.

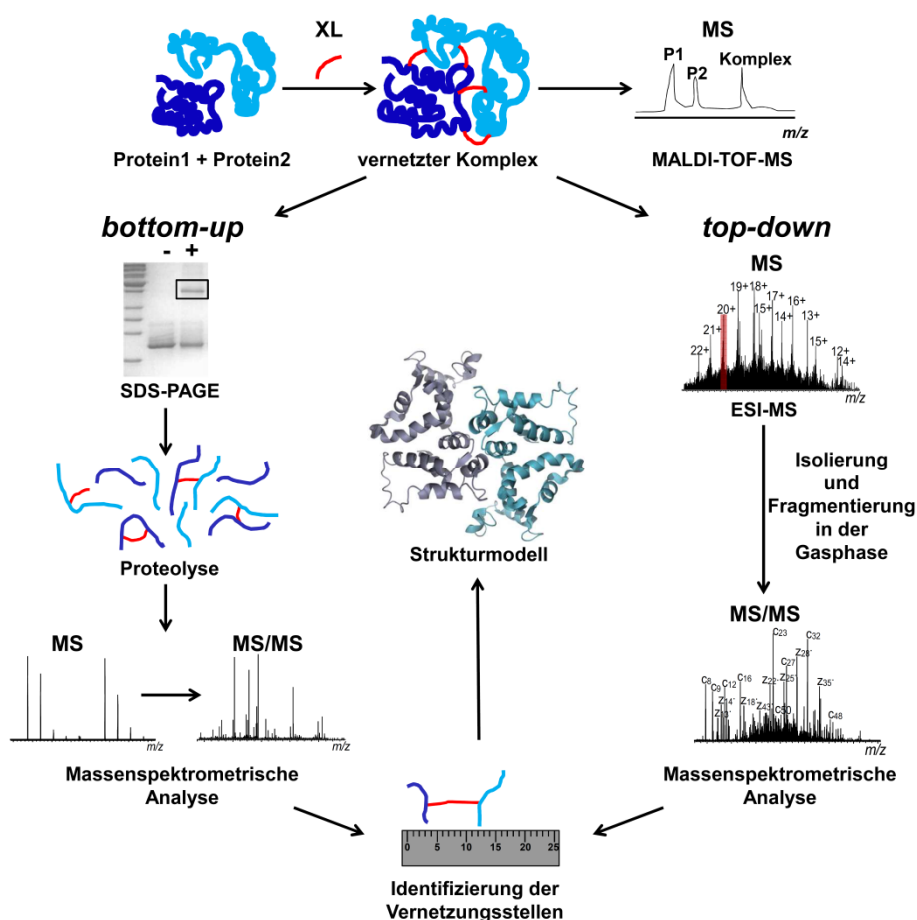


Abb. 18 Schematische Darstellung der Strukturanalyse von Proteinkomplexen mittels chemischer Quervernetzung und massenspektrometrischer Analyse unter Verwendung der „bottom-up“-Strategie (links) und der „top-down“-Strategie (rechts) zur Erstellung eines Strukturmodells.

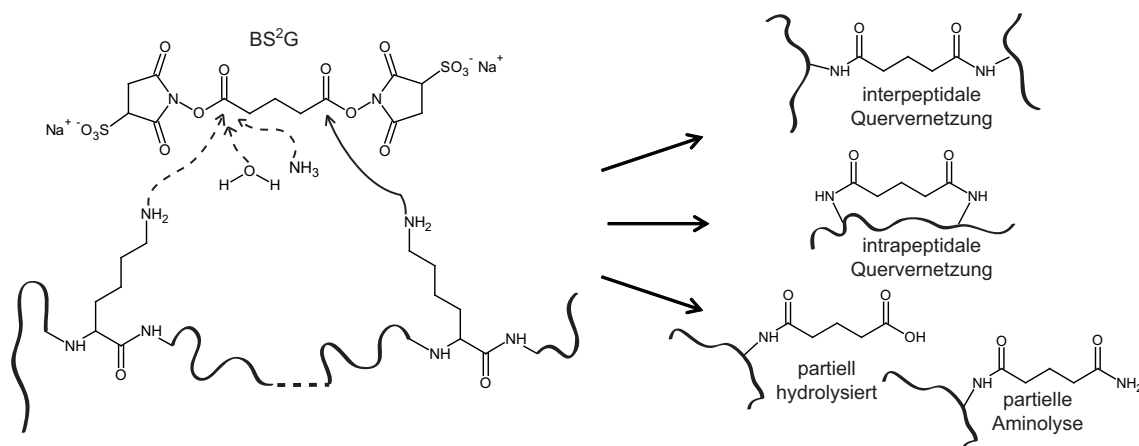
### 1.3.2 Quervernetzungsreagenzien

Für die strukturelle Analyse von Proteinkomplexen und der Identifizierung von Interaktionspartnern wurde während der letzten Jahrzehnte eine Vielzahl verschiedener Quervernetzungsreagenzien entwickelt, von denen einige kommerziell erhältlich sind. Hinsichtlich ihrer Reaktivität werden hauptsächlich spezifische Reagenzien (amin- oder sulfhydrylreaktiv) und unspezifische Reagenzien (z.B. Formaldehyd) sowie solche mit photoaktivierbaren Gruppen unterschieden [108, 111, 119]. Als homobifunktionelle Reagenzien werden meist symmetrische Moleküle mit zwei identischen reaktiven Gruppen eingesetzt. Heterobifunktionelle Reagenzien tragen verschiedene reaktive Gruppen und können in einer konzertierten oder in einer Stufenreaktion verwendet werden. Bei einer zweistufigen Reaktion wird ein Molekül modifiziert und das überschüssige Reagenz entfernt, bevor der potentielle Interaktionspartner hinzugegeben und die zweite Reaktion initiiert wird [119]. Trifunktionelle Reagenzien bestehen häufig aus einem heterobifunktionellen Reagenz, welches mit einem Affinitätsanker, wie Biotin, gekoppelt ist, der zur Anreicherung der

Quervernetzungsprodukte genutzt werden kann [120]. Eine Sonderstellung nehmen die sogenannten Nulllängenreagenzien wie Carbodiimide ein, die in Kombination mit Sulfo-NHS zur direkten Vernetzung von Carboxylgruppen der Glutamat- und Aspartat-Seitenketten und den primären Aminen der Lysine genutzt werden [119].

### 1.3.2.1 Homobifunktionelle aminreaktive Quervernetzungsreagenzien

Zu den verbreitetsten Reagenzien gehören aminreaktive *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester und deren wasserlösliche Sulfonsäurederivate (*N*-Hydroxysulfosuccinimid, *Sulfo*-NHS), die als Natrium-Salze zum Einsatz kommen. Prominente Beispiele sind die NHS-Ester-Derivate von Dicarbonsäuren, wie Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (BS<sup>2</sup>G) als Derivat der Glutarsäure und Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) als Derivat der Suberinsäure [121]. Diese reagieren hauptsächlich mit den primären Amingruppen der Lysinseitenketten sowie der Protein-*N*-Termini (*Abb. 19*). Dabei führt der nukleophile Angriff des primären aliphatischenamins über einen S<sub>N</sub>2-Mechanismus zur Bildung einer stabilen Amidbindung. Nur wenn sich zwei Lysinseitenketten (bzw. *N*-Termini) in ausreichender, durch den Abstandshalter des verwendeten Reagenzes überbrückbarer, räumlicher Nähe zueinander befinden, ist eine Reaktion beider NHS-Ester Funktionen möglich und beide Reste werden kovalent miteinander vernetzt. Liegen die verknüpften Reste nach proteolytischer Spaltung innerhalb eines Peptids oder in verschiedenen Peptiden, werden diese Produkte als intrapeptidale bzw. interpeptidale Quervernetzungen bezeichnet. Wenn sich im entsprechenden Abstand kein zweiter Reaktionspartner befindet, kann nach erfolgter Reaktion auf einer Seite des Reagenzes durch Hydrolyse des zweiten NHS-Esters die freie Carbonsäure entstehen (*Abb. 19*). In der Literatur wird dies auch als „*monolink*“ oder „*dead-end crosslink*“ bezeichnet [122, 123]. Die Reaktionen werden meist über Zugabe von aminhaltigen Substanzen, wie (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) oder Ammoniumhydrogencarbonat gestoppt, wodurch auch Aminolyseprodukte beobachtet werden [124]. Die Modifikation dieser Lysine gibt Aufschluss über deren Zugänglichkeit. Neben den Reaktionen mit primären aliphatischen Aminen sind auch Reaktionen mit Hydroxylfunktionen von Serin, Threonin und Tyrosin möglich, die zur Bildung von kovalenten Esterbindungen führen [125, 126]. Die Anwesenheit von Histidin in der Nähe der Reaktionsstelle scheint dies zu katalysieren [125].



**Abb. 19** Darstellung der Reaktion des aminreaktiven homobifunktionellen Quervernetzungsreagens  $BS^2G$  und der potentiellen Reaktionsprodukte.

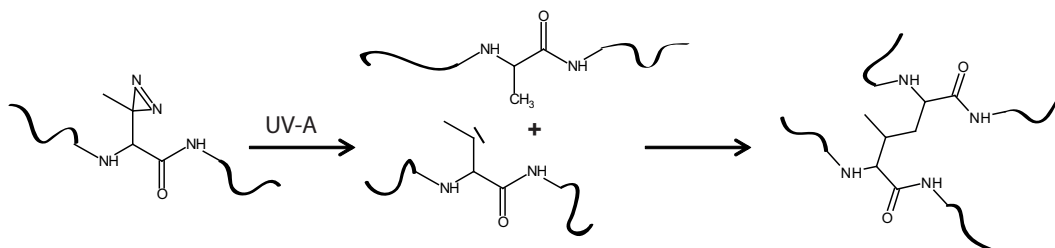
### 1.3.2.2 Photoaktivierbare Quervernetzungsreagenzien

Für eine Vernetzung verschiedener Aminosäuren werden häufig photoaktivierbare Reagenzien mit unspezifischer Reaktivität eingesetzt. Diese sollten bei Umgebungslicht und den verschiedenen Pufferbedingungen stabil und in einem UV-Bereich aktivierbar sein, der nicht zur Zerstörung der zu untersuchenden Biomoleküle führt (UV-A) [108]. Als photoreaktive Gruppen werden Arylazide, Diazirine (Abb. 20) oder Benzophenone (Abb. 21) verwendet, die bei Wellenlängen von ca. 360 nm angeregt werden können [108]. Sie finden unter anderem in heterobifunktionellen Quervernetzungsreagenzien Verwendung, die noch eine zweite, meist aminreaktive Gruppe tragen [127, 128]. Nach Markierung eines Proteins kann in einem zweiten Schritt gezielt die Photoreaktion zur Vernetzung mit Bindungspartnern gestartet werden.

Zusätzlich kommen photoreaktive Aminosäuren zum Einsatz. Diese können zum einen unter Verwendung spezieller t-RNA bei der rekombinanten Proteinbiosynthese gerichtet in das Zielprotein eingeführt werden [129, 130] oder werden unspezifisch nach Zugabe zu einem depletierten Nährmedium inkorporiert [131]. Für Interaktionsstudien zwischen Peptiden und Proteinen können Photo-Aminosäuren auch synthetisch in die zu untersuchenden Peptide eingebaut werden [132-135]. Ein Vorteil dieser Photo-Aminosäuren ist neben ihrer breiten Reaktivität auch die kurze überbrückbare Distanz zu den potentiellen Reaktionspartnern. Solche Aminosäuren werden deshalb auch als Nullängen-Reagenz betrachtet. Photo-Leucin und Photo-Methionin besitzen einen Diazirinring (Abb. 20) und werden anstelle der entsprechenden natürlichen Aminosäuren eingebaut. UV-A-Aktivierung führt zur Abspaltung des Stickstoffs, wodurch ein reaktives Carben entsteht. Carbene können C-H-Bindungen angreifen und eine stabile C-C-Bindung mit dem Interaktionspartner ausbilden [136]. Weiterhin

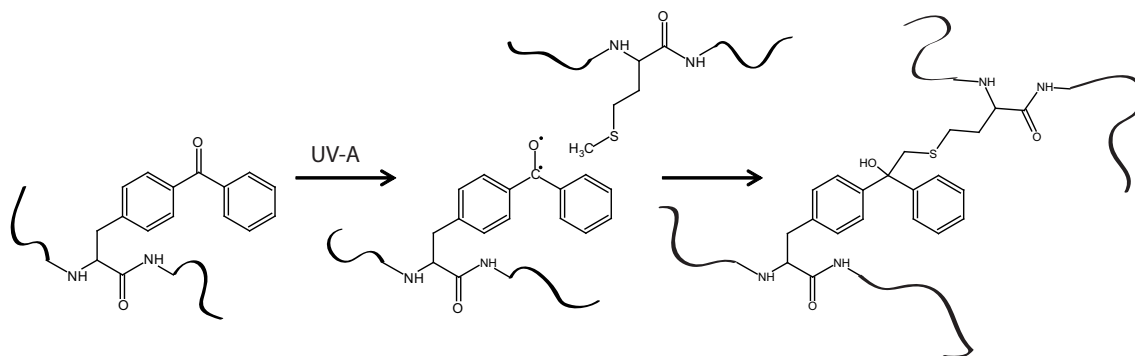


sind aufgrund des elektrophilen Charakters des Carbens auch Reaktionen mit Heteroatomen möglich, die freie Elektronenpaare besitzen [136]. Dies kann zu unerwünschten Nebenreaktionen mit Lösungsmittelmolekülen wie Wasser und Alkohol führen [137]. Weitere Reaktionen sind die Umlagerung zu inerten linearen Diazoisomeren oder nach  $N_2$ -Verlust zum Alkenprodukt [136].



**Abb. 20** Reaktionsschema eines mit Photo-Leucin markierten Peptids nach Bestrahlung mit UV-A-Licht am Beispiel des Alanins.

Eine weitere photoreaktive Aminosäure ist das *p*-Benzoylphenylalanin (Abb. 21), welches zunehmend für Protein/Peptid- und Protein/Protein-Interaktionsstudien verwendet wird [130, 132, 135, 138]. Die Benzophenon-Gruppe dieser Aminosäure ist ausreichend stabil gegenüber Umgebungslicht und den bei der Peptidsynthese vorhandenen Bedingungen. Nach Aktivierung bildet sich ein Diradikal, welches hauptsächlich mit C-H-Gruppen reagiert. Das Sauerstoffradikal abstrahiert dabei ein Wasserstoffatom und es kommt in der Folge zur Ausbildung einer stabilen C-C-Bindung [136, 139]. Trotz der Reaktionsmöglichkeit mit jeder C-H-Gruppe zeigt sich eine Präferenz von Benzophenonen für die Reaktion mit C-H-Bindungen, die Heteroatomen benachbart sind. Dies wurde im besonderen Maße für Methionin beobachtet [134, 140-142]. Vorteil der Benzophenone gegenüber den Diazirinen ist die Reversibilität der Radikalbildung, sowie die fehlende Reaktivität gegenüber polaren Lösungsmitteln [132, 139].



**Abb. 21** Reaktionsschema eines mit *p*-Benzoylphenylalanin markierten Peptids nach Bestrahlung mit UV-A-Licht am Beispiel des Methionins.

### 1.3.3 Identifizierung der Quervernetzungsprodukte

Die sichere Identifizierung der Quervernetzungsprodukte stellt immer noch die größte Herausforderung für eine breite Anwendung der Technik dar. Das liegt zum einen an der meist niedrigen Abundanz der Produkte und den komplexen Fragmentationenspektren. Diese sind bedeutend komplexer als bei Fragmentierung linearer Peptide, da Fragmente beider Peptide erhalten werden. Bei der Verwendung von unspezifischen Reagenzien müssen zudem verschiedene Verknüpfungsstellen einbezogen werden. Für eine eindeutige Zuordnung der Fragmentationen wurde von Schilling *et al.* [143] eine angepasste Nomenklatur vorgeschlagen, die auch in dieser Arbeit Verwendung findet (*Abb. 22*).

Für eine zeiteffiziente Analyse ist eine Computer-gestützte Auswertestrategie unerlässlich. Dies führte zur Entwicklung zahlreicher Softwarelösungen [144-151]. Einige, wie z.B. GPMAW [144], nutzen ausschließlich die Massen der Vorläuferionen zur Identifizierung der Quervernetzungsprodukte, was eine zusätzliche manuelle Annotierung der Fragmentationenspektren notwendig macht. Andere Programme, wie die unter anderem in dieser Arbeit verwendete StavroX-Software [151], nutzen zusätzlich die Informationen der Fragmentationenspektren und lassen die Suche mit zusätzlichen variablen und statischen Modifikationen zu. Unabhängig davon, für welche Software man sich entscheidet, eine verlässliche Identifizierung der Produkte erfordert immer eine zusätzliche manuelle Kontrolle der Daten.

Für eine vereinfachte Analyse werden beispielsweise stabile Isotopenmarkierungen verwendet. Potentielle Kandidaten können anhand charakteristischer Isotopenmuster im Übersichtsmassenspektrum herausgefiltert und durch Vergleich der beiden Fragmentationenspektren bestätigt werden (*Abb. 23*). Eine der populärsten Methoden sieht die Verwendung von Isotopen-markierten Quervernetzungsreagenzien vor (*Abb. 23 A*). Deuterierungen finden weit verbreitete Anwendung, wie zum Beispiel bei den weitverbreiteten Reagenzien BS<sup>2</sup>G und BS<sup>3</sup>, die in einer 1:1-Mischung aus nicht-deuterierter und vierfach-deuterierter Form eingesetzt werden [121]. Die Detektion der Massendifferenz von 4 u kann bei höher geladenen Produkten aufgrund der Überlagerung der Isotopenmuster erschwert sein, weshalb auch stärker deuterierte Reagenzien wie DSS-D<sub>0</sub>/D<sub>12</sub> [122] und Bpa-D<sub>11</sub> [152] Verwendung finden. Der Nachteil dieser Reagenzien ist die unterschiedliche Elution von deuterierten (frühere Elution) und nicht deuterierten Reaktionsprodukten bei der Umkehrphasen-chromatographischen Trennung. Dies verursacht eine zeitlich verschobene Detektion der deuterierten und nicht-deuterierten Spezies [126]. Eine Alternative bietet die

Markierung mit  $^{13}\text{C}$ -Atomen, da diese keinen Einfluss auf die Retentionszeit haben.  $^{13}\text{C}$ -markierte Reagenzien kommen aufgrund des höheren Preises seltener zum Einsatz, stellen aber gegenüber Deuterierungen die elegantere Lösung dar.

Zur Untersuchung von Proteinkomplexen, die sich aus ähnlichen oder identischen Untereinheiten zusammensetzen, ist eine stabile Markierung der Proteine selbst notwendig (Abb. 23 B). Dieser Ansatz wurde von Taverner *et al.* [153] für die Untersuchung des Interleukin-6-Homodimers entwickelt, wobei eine 1:1-Mischung aus nicht-markiertem und  $^{15}\text{N}$ -markiertem Protein verwendet wurde. Die daraus folgenden verschiedenen Kombinationen aus  $^{14}\text{N}$ -Peptiden und  $^{15}\text{N}$ -Peptiden bei intramolekularen und intermolekularen Quervernetzungen ermöglicht eine Unterscheidung anhand der Isotopenmuster.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz liegt in der Verwendung von CID-MS/MS-spaltbaren Quervernetzungsreagenzien (Abb. 23 C). Dabei werden durch niederenergetische Fragmentierung charakteristische Fragmentationen bzw. konstante Neutralverluste erzeugt, anhand derer Quervernetzungsprodukte eindeutig identifiziert werden können [154-156]. Eines der ersten Reagenzien war das von Back *et al.* [157] vorgestellte BID (N-Benzyliminodiacetylhydroxysuccinimid), welches nach Fragmentierung eine Identifizierung anhand des entstehenden Tropyliumions bei  $m/z$  91 erlaubte. Die Verfolgung dieses Ansatzes führte zur Entwicklung weiterer Reagenzien [155, 156, 158-163]. Ein viel versprechender Kandidat ist das in dieser Arbeit verwendete Harnstoff-basierte Quervernetzungsreagenz [163]. Der symmetrische Aufbau des aminreaktiven NHS-Esters erlaubt eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Quervernetzungsprodukten (intrapeptidal, interpeptidal und partiell hydrolysiert) anhand charakteristischer Fragmentationen und Dublett-Signale. Das Auftreten dieser charakteristischen Fragmentationen bietet die Möglichkeit einer automatisierten Filterung und Identifizierung der Quervernetzungsprodukte.

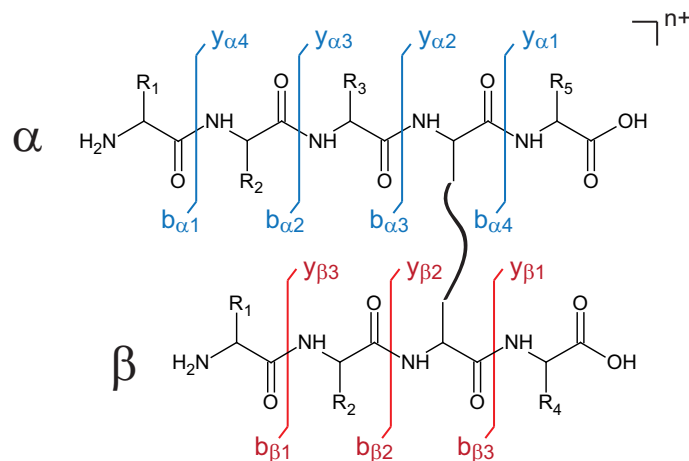
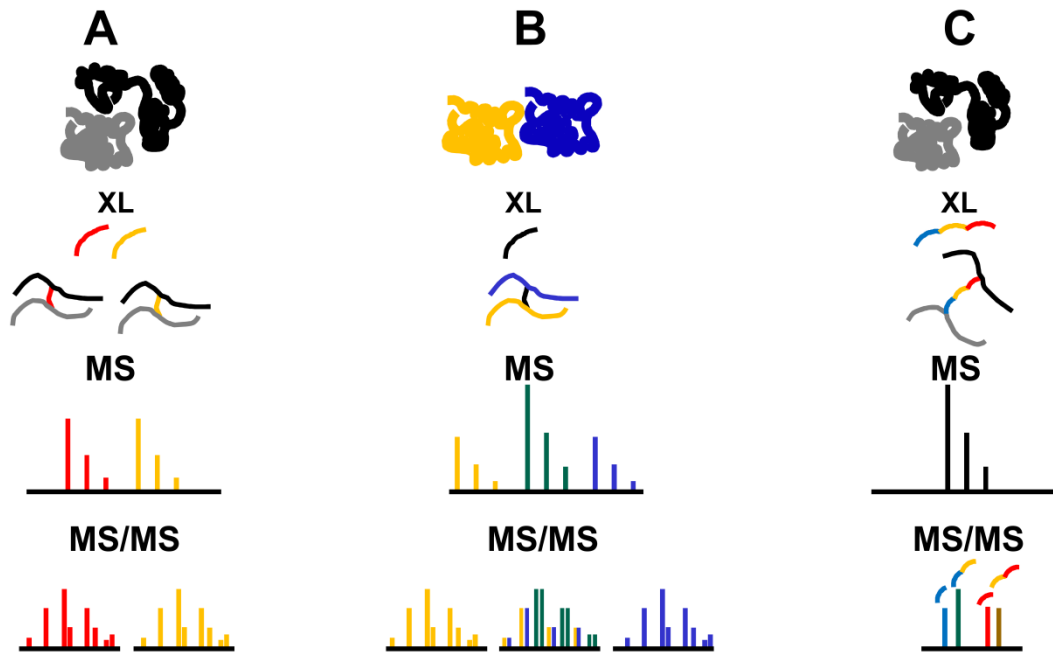


Abb. 22 Nomenklatur von Quervernetzungsprodukten nach Schilling *et al.* [143].



**Abb. 23 Strategien zur verbesserten Identifizierung von Quervernetzungsprodukten.** Verwendung von **A:** isotonenmarkierten Quervernetzungsreagenzien; **B:** isotonenmarkierten Proteinen; **C:** MS/MS-spaltbaren Quervernetzungsreagenzien.

## 2 Zielstellung

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Interaktion zwischen der retinalen Guanylatcyclase (ROS-GC 1) und dem Guanylatcyclase-aktivierenden Protein 2 (GCAP-2) in den Sehsinneszellen der Retina ist entscheidend für die Anpassung des Auges an verschiedene Lichtverhältnisse. Bisher existiert lediglich eine NMR-Struktur des unmyristoylierten GCAP-2 im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand. Es sind weder für ROS-GC 1, noch für deren Interaktion mit GCAP-2 strukturelle Daten verfügbar. Für die Entwicklung möglicher Therapien zur Behandlung von Fehlfunktionen der ROS-GC 1/GCAP-2-Interaktion sind ein detailliertes Verständnis der Wechselwirkungen und deren strukturelle Charakterisierung von essentieller Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe verschiedener Quervernetzungsexperimente und nachfolgender massenspektrometrischer Analysen der Quervernetzungsprodukte erste strukturelle Erkenntnisse sowohl über die Interaktion zwischen myristoyliertem GCAP-2 und ROS-GC 1, als auch über das myristoylierte GCAP-2 selbst, im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand zu gewinnen. Auf Grundlage vorhergehender Untersuchungen sollten daher Quervernetzungsexperimente mit bekannten und potentiellen Bindungspeptiden der ROS-GC 1 und GCAP-2 zur Erstellung von Strukturmodellen genutzt werden. Zur Charakterisierung dieser Protein-Peptid-Komplexe war die Anwendung photoaktivierbarer Aminosäuren zur Identifizierung räumlich naher Interaktionsbereiche geplant. Aufgrund der unspezifischen Reaktion dieser Reagenzien und der verringerten Fragmentierungseffizienz der Quervernetzungsprodukte sollte eine  $^{13}\text{C}$ -markierte Variante des *p*-Benzoylphenylalanins (Bpa) zu einer verlässlicheren Identifizierung der erhaltenen Quervernetzungsprodukte führen. Zur strukturellen Charakterisierung einer postulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Homodimersierung des GCAP-2 sollten Quervernetzungsexperimente unter Verwendung von nicht-markiertem und vollständig  $^{15}\text{N}$ -markiertem GCAP-2 durchgeführt werden, die die massenspektrometrische Identifizierung von intermolekularen Quervernetzungsprodukten ermöglichen. Ziel war die Erstellung eines Strukturmodells für ein solches GCAP-2-Homodimer. Am Beispiel des GCAP-2 sollte weiterhin ein MS/MS-spaltbares Harnstoff-basiertes Quervernetzungsreagenz hinsichtlich seiner breiten Anwendbarkeit zur automatisierten Auswertung von Quervernetzungsprodukten untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Aceton		Roth
Acetonitril	ACN	Merck Millipore
Acrylamid/Bisacrylamid		Merck Millipore
<i>N</i> -Acetyldiethylmalonsäureester		Sigma Aldrich
Ameisensäure	FA	Sigma Aldrich
Ammoniumdihydrogenphosphat	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat	APS	Sigma Aldrich
Ammoniumsulfat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
Azobis(isobutyronitril)	AIBN	Sigma Aldrich
Benzol ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -markiert)		Euriso-Top
Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat	BS <sup>2</sup> G	Thermo Fisher Scientific
Bradfordkonzentrat Protein Assay		Bio-Rad
<i>N</i> -Bromsuccinimid	NBS	Sigma Aldrich
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	Sigma
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	Roth
Citronensäure		Roth
Cobaltchlorid	CoCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Coomassie-Brilliant-Blue G250		Sigma Aldrich
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure	HCCA	Bruker Daltonik
Dichlormethan	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Roth
2,5-Dihydroxybenzoesäure	DHB	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma Aldrich
Dioxan		Roth
Dithiothreitol	DTT	Sigma Aldrich
Essigsäure	AcOH	Roth
Ethanol	EtOH	Merck Millipore
Iodacetamid	IAA	Sigma Aldrich

Kaliumchlorid	KCl	Roth
Kaliumhydroxid	KOH	Grüssing
Kaliumiodid	KI	Roth
Laemmli-Probenpuffer		Bio-Rad
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Roth
Methanol	MeOH	Merck Millipore
$\beta$ -Mercaptoethanol		Sigma Aldrich
Natriumchlorid	NaCl	Grüssing
Natriumdodecylsulfat	SDS	Bio-Rad
Natriumhydroxid	NaOH	Grüssing
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Grüssing
Natriumsulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Grüssing
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
Rotiphorese 10x SDS-PAGE		Roth
Salzsäure	HCl	Grüssing, Sigma Aldrich
Schwefelkohlenstoff	CS <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Sinapinsäure		Sigma Aldrich
Super-DHB (Mischung aus DHB und Methoxy-DHB)		Sigma Aldrich
Tetrachlorkohlenstoff	CCl <sub>4</sub>	Grüssing
Tetramethylethylendiamin	TEMED	Fluka
Toluol		Grüssing
<i>p</i> -Toluoylchlorid		Sigma Aldrich
Trifluoressigsäure	TFA	Sigma Aldrich
Trifluorethanol	TFE	Fluka

### 3.1.2 Verwendete Lösungen und Fließmittel

Alle Lösungen wurden mit hochreinem entionisiertem *MilliQ*-H<sub>2</sub>O hergestellt.

#### 3.1.2.1 Lösungen für die Gelelektrophorese

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung:	10 % (m/v) APS in H <sub>2</sub> O
Färbelösung A:	5 % (m/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250 in H <sub>2</sub> O
Färbelösung B:	2 % (m/v) <i>ortho</i> -Phosphorsäure, 10 % (m/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O

Fixierlösung:	40 % (v/v) Methanol/ 10 % (v/v) Essigsäure in H <sub>2</sub> O
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung:	10 % (m/v) SDS in H <sub>2</sub> O
Tris-HCl-Pufferlösung:	1,5 M Tris-HCl in H <sub>2</sub> O (pH 8,8) 0,5 M Tris-HCl in H <sub>2</sub> O (pH 6,8)

### 3.1.2.2 Lösungen für die enzymatische Proteolyse

Denaturierungslösung:	8 M Harnstoff/ 400 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O
Extraktionslösung A:	47,5 % (v/v) ACN/ 5 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O
Extraktionslösung B:	5 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O/ACN (1:2)
Proteolysepuffer:	25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O
Reduktionslösung:	10 mM DTT in 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
TFA-Lösung:	10 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O
Alkylierungslösung:	55 mM Iodacetamid in 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
Waschlösung A:	50 % (v/v) ACN in H <sub>2</sub> O
Waschlösung B:	100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O
Waschlösung C:	50 % (v/v) ACN/ 50 % (v/v) 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>

### 3.1.2.3 Nano-HPLC-Fließmittel

Fließmittel A:	5 % (v/v) ACN/ 0,1 % (v/v) FA in H <sub>2</sub> O
Fließmittel B:	80 % (v/v) ACN/ 0,08 % (v/v) FA in H <sub>2</sub> O
Fließmittel C:	5 % (v/v) ACN/ 0,05 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O
Fließmittel D:	80 % (v/v) ACN/ 0,04 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O

### 3.1.2.4 Matrix-Lösungen

TA 33:	33 % (v/v) ACN/ 0,1 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O
TA 50:	50 % (v/v) ACN/ 0,1 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O
TA 90:	90 % (v/v) ACN/ 0,1 % (v/v) TFA/ 1 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O

### 3.1.3 Peptide und Proteine

Calmodulin (CaM; Rind)	Calbiochem
Endoproteinase AspN, <i>sequencing grade</i>	Promega
Endoproteinase GluC, <i>sequencing grade</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> V8)	Promega



GC-Peptid 1 (4.1.1.1), GC-Peptid 2 (Kapitel 4.1.2) und GC-Photo-Peptide 2a und 2b (Bpa-Peptide; Kapitel 4.1.2)	Dr. Sven Rothemund, IZKF Leipzig
GC-Photo-Peptide 1a und 1b (Photo-Leu; Kapitel 4.1.1.2)	Thermo Fisher Scientific
GC Photo-Peptid 3 (Bpa-Peptide; Kapitel 4.2.3) und skMLCK-Peptid ((Bpa)-M13; Kapitel 4.2.2)	Dr. Olaf Jahn, MPI Göttingen
Guanylatcyclase-aktivierendes Protein 2 (GCAP-2, Rind)	Dr. Thomas Schröder, Institut für Biochemie, MLU Halle-Wittenberg
Guanylatcyclase-aktivierendes Protein 2 (GCAP-2, Rind) <sup>15</sup> N-markiert (Kapitel 4.3)	Dr. Stephan Theisgen, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig
<i>Peptide Calibration Standard</i>	Bruker Daltonik
<i>Protein Calibration Standard II</i>	Bruker Daltonik
Trypsin, <i>sequencing grade</i> (Rind)	Roche
Trypsin, <i>sequencing grade</i> (Schwein)	Promega

### 3.1.4 Geräte

#### 3.1.4.1 Laborgeräte

Analysenwaage LE225D	Sartorius
Elektrophorese System Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Geldokumentationsgerät Molecular Imager Gel Doc XR+ System	Bio-Rad
Magnetrührer R3T	mLw
Magnetrührer M21/1	Framo
pH-Meter PH211	Hanna Instruments
Pipetten (2,5 – 1000 µl)	Eppendorf und VWR
Plattformschüttler Titramax 101	Heidolph
Reinstwasseranlage TKA Pacific	Thermo Electron LED
Reinstwasseranlage DirectQ5	Millipore
Rotationsverdampfer	Heidolph
Sicherheitswerkbank Polaris 48	Steril
Sicherheitswerkbank Herasafe KS 12	Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer Ultraspec 100 pro	GE Healthcare
Thermomixer HLC HTMR-133	HLC-Biotech

Thermomixer HLC MKR10	HLC-Biotech
Thermomixer TS 1	Biometra
Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner	VWR
Vakuumkonzentrator miVac Duo	Genevac
Vakuumkonzentrator Savant SPD1010	Thermo Fisher Scientific
Vortexmixer 7-2020	neoLab
Wiegetisch See-saw rocker SSL4	Stuart
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifugen MiniSpin Plus	Eppendorf
Zentrifuge Minizentrifuge	Kisker Biotech

#### 3.1.4.2 HPLC-Systeme

UltiMate Nano-HPLC-System	Thermo Fisher Scientific
UltiMate 3000 Nano-HPLC-System	Thermo Fisher Scientific
Vorsäulen:	
Acclaim PepMap (C18, 100 µm x 20 mm, 5 µm, 100 Å)	Thermo Fisher Scientific
Acclaim PepMap (C18, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å)	Thermo Fisher Scientific
Trennsäulen:	
Acclaim PepMap (C18, 75 µm x 150 mm, 3 µm, 100 Å)	Thermo Fisher Scientific

#### 3.1.4.3 Massenspektrometer

LTQ-Orbitrap XL Hybrid-Massenspektrometer mit Nano-ESI-Quelle	Thermo Fisher Scientific Proxeon
Ultraflex III MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer	Bruker Daltonik
Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer mit Nano-ESI-Quelle Nanospray Flex	Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific

#### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

DC Kieselgel 60 F254 TLC-Platten	Merck Millipore
Borosilikatglasemitter ES380	Thermo Fisher Scientific
Mikroreaktionsgefäße (0,5 - 2,0 ml)	Eppendorf
Falconröhrchen 15 ml; 50 ml	Greiner bio-one
Pipettenspitzen (10 µl – 1000 µl)	Eppendorf

Plastikküvetten	VWR
Quarzküvette Hellma QS 105.204	Hellma
Zentrifugationsfilter Ultra-0,5 ml Ultracel, 10 kDa-Membran	Merck Millipore
Zentrifugationsfilter Ultra-15 ml Ultracel, 10 kDa-Membran	Merck Millipore
Zentrifugationsfilter Ultra-15 ml Ultracel, 3 kDa-Membran	Merck Millipore
ZipTip-Pipettenspitzen (mit C4- und C18-Material)	Merck Millipore

### 3.1.6 Software

#### **Chromeleon (Version 6.8; Thermo Fisher Scientific)**

Software zur Steuerung des HPLC-Systems am LTQ-Orbitrap XL-MS

#### **flexAnalysis (Version 3.3; Bruker Daltonik)**

Software zur Prozessierung, Bearbeitung und Auswertung von Massenspektren

#### **flexControl (Version 3.3; Bruker Daltonik)**

Software zur Steuerung und Aufnahme von Massenspektren am MALDI-TOF/TOF-MS

#### **GPMAW (Versionen 8.1-9.0; Lighthouse Data)**

Software zur Vorhersage von proteolytischen Spaltprodukten, Erstellung von Fragmentenlisten für Peptide und zum Abgleich von massenspektrometrischen Daten zur Identifizierung von Quervernetzungsprodukten

#### **HyStar (Version 3.2; Bruker Daltonik)**

Software zur Steuerung von HPLC-Systemen und Aufnahme von Chromatogrammen

#### **MeroX (Versionen 1.1 – 1.3.4; Michael Götze)**

Software zur Identifizierung und Auswertung chemischer Quervernetzungsprodukte bei Verwendung CID-MS/MS-spaltbarer Vernetzungsreagenzien

#### **MS-Produkt (ProteinProspector Version 5.10.15; University of California)**

*Online*-Software (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) zur Berechnung von Fragmentenmassenlisten und zur Auswertung massenspektrometrischer Daten

#### **Proteome Discoverer (Versionen 1.3 – 1.4; Thermo Fisher Scientific)**

Software zur Auswertung und Prozessierung von massenspektrometrischen Daten und zur Durchführung von Mascot-Datenbank-Analysen

#### **ProtParam (Expasy, [www.expasy.org](http://www.expasy.org))**

Software zur Berechnung von pI-Werten und Extinktionskoeffizienten von Proteinen

#### **Pymol (Version 0.99; DeLano Scientific LLC)**

Software zur Visualisierung dreidimensionaler Proteinstrukturen

**Quantity One 1-D Analysis Software (Version 4.6.2; Bio-Rad)**

Software zur Steuerung des Geldokumentationsgeräts Molecular Imager Gel Doc XR+ System (Bio-Rad)

**StavroX (Versionen 1.7 - 3.2; Michael Götze [151])**

Software zur Identifizierung und Auswertung von chemischen Quervernetzungsprodukten aus massenspektrometrischen Daten

**Xcalibur (Version 2.0.7 - 2.2; Thermo Fisher Scientific)**

Software zur Datenaufnahme und Prozessierung am LTQ-Orbitrap XL-MS; mit DCMSLink (Thermo Fisher Scientific) zur Koordination der Kommunikation zwischen HPLC und Massenspektrometer

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Pufferwechsel mittels Filtration

Für den Wechsel des Puffersystems von Proteinlösungen wurden Zentrifugationsfilter mit einem Volumen von 0,5 ml und einem Molekulargewichtsausschluss von 10 kDa verwendet. Für die Zentrifugationsschritte wurde eine Kühlzentrifuge verwendet. Die Filter wurden zweimal mit 100 µl des entsprechenden Puffers gewaschen (4°C, 13.000 rcf, 15-20 min). Die Proteinlösung wurde in die Filtrationseinheiten pipettiert und diese, abhängig vom Volumen, für 30-45 min bis auf ein Volumen von  $\approx 20$  µl konzentriert (4°C, 13.000 rcf). Diese Lösung wurde 3x mit je 50 µl des entsprechenden Puffers versetzt und nochmals konzentriert (10 min, 15 min, 30 min, 4°C, 13.000 rcf). Die Filtereinheiten wurden umgedreht in neue Zentrifugationsgefäße platziert und die Proteinlösung durch Zentrifugation für 10 min bei 4.000 rcf und 4°C in die neuen Gefäße überführt. Die Proteinlösung wurde mit dem neuen Puffer auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und die Konzentration mittels UV-Absorptionsmessung bei 280 nm oder mit Hilfe der Bradfordmethode [164] nach Herstellerangaben bestimmt.

### 3.2.2 Chemische Quervernetzungsexperimente

#### 3.2.2.1 Allgemeine Probenvorbereitung der Quervernetzungsexperimente

Für die Quervernetzungsexperimente erfolgte ein Pufferaustausch des rekombinant in *Escherichia coli* hergestellten GCAP-2 mittels Filtrationseinheiten (Kapitel 3.2.1) zu 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,5). CaM wurde direkt in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) gelöst. Die verwendeten Peptide wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration wurde mittels UV-Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Vorbereitete Aliquote der Peptide und Proteine wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bzw. -20°C gelagert. Die gewünschten Konzentrationen der Proteine und Peptide wurden vor Durchführung der Reaktion eingestellt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reaktionsansätze folgendermaßen vorbereitet: Die Proteinlösungen von GCAP-2 bzw. CaM wurden auf eine Konzentration von 10 µM in 20 mM HEPES (pH 7,5) eingestellt und mit 10 mM EGTA bzw. 1 mM CaCl<sub>2</sub> für 10 min inkubiert. Im Falle der Quervernetzungsexperimente der Proteine mit Bindungspeptiden erfolgte anschließend die Zugabe der Peptide zu den jeweiligen Ansätzen und eine Inkubation für weitere 30 min. Die Quervernetzungsreagenzien wurden direkt vor Zugabe in DMSO gelöst.

Als Kontrolle diente jeweils eine Probe, der nur die entsprechende Menge DMSO zugesetzt wurde. Bei Verwendung von aminreaktiven Reagenzien wurden die Reaktionen durch Zusatz von  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung (Endkonzentration von 20 mM) gestoppt.

Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proben wurden nach erfolgter Reaktion entweder sofort weiter verwendet oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### **3.2.2.2 Reaktionen mit homobifunktionellen aminreaktiven Quervernetzungsreagenzien**

#### **3.2.2.2.1 Intermolekulare Quervernetzungsexperimente zwischen GCAP-2 und den GC-Peptiden**

Die Probenvorbereitung erfolgte, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben. Die verwendeten Peptide wurden in Konzentrationen von  $30\ \mu\text{M}$  (GC-Peptid 1) bzw.  $10\ \mu\text{M}$  (GC-Peptid 2) eingesetzt. Nach erfolgter 30-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe einer 1:1 Stammlösung aus nicht-deuteriertem  $\text{BS}^2\text{G-}D_0$  und vierfach-deuteriertem  $\text{BS}^2\text{G-}D_4$  ( $\text{BS}^2\text{G-}$  Gesamtkonzentration von 1 mM) gestartet. Aliquote wurden nach 30 min und 60 min entnommen und die Reaktion wurde mit  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gestoppt.

Für die Messung der intakten Protein-Peptid-Komplexe mittels Nano-ESI-Orbitrap-MS wurden die Reaktionen mit  $\text{BS}^2\text{G-}D_0$  durchgeführt und die Peptide in einer Konzentration von  $100\ \mu\text{M}$  eingesetzt.

#### **3.2.2.2.2 Intramolekulare Quervernetzungsexperimente mit GCAP-2 und dem Harnstoff-Reagenz**

Die Ansätze wurden wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben mit GCAP-2 vorbereitet. Nach Inkubation mit  $\text{CaCl}_2$  bzw. EGTA erfolgte die Zugabe des Harnstoff-Reagenzes (Endkonzentration von 1 mM) und die Reaktionen wurden nach 30 und 60 min mit  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gestoppt.

#### **3.2.2.2.3 Intermolekulare Quervernetzungsexperimente zwischen GCAP-2 und $^{15}\text{N}$ -markiertem GCAP-2**

Abweichend von der in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Methode wurde eine  $20\ \mu\text{M}$  Lösung aus nicht-markiertem und  $^{15}\text{N}$ -markiertem GCAP-2 (je  $10\ \mu\text{M}$ ) in 20 mM HEPES-Puffer mit zusätzlich 50 mM KCl, 10 mM NaCl und 10 mM  $\text{MgCl}_2$  eingesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation in Gegenwart von 0,3 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. 0,4 mM EGTA wurde die Reaktion durch

Zugabe von BS<sup>2</sup>G-*D*<sub>0</sub> (Endkonzentration von 2 mM) gestartet. Nach 60 min wurde die Reaktion mit NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> beendet.

### **3.2.2.3 Chemische Quervernetzungsexperimente mit photoreaktive Aminosäuren enthaltenden Peptiden**

Die Reaktionsansätze der Proteine (GCAP-2 bzw. CaM) wurden in braunen Mikroreaktionsgefäßen, geschützt vor direkter Lichteinwirkung, vorbereitet (Kapitel 3.2.2.1). Die Konzentration der verwendeten Peptide betrug 10 µM, außer für das GC-Photo-Peptid 3, welches in einer 20 µM Konzentration einer 1:1-Mischung aus <sup>12</sup>C- und <sup>13</sup>C-Bpa markierten Peptiden eingesetzt wurde. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsansätze in transparente Mikroreaktionsgefäße überführt und mit 4 J/cm<sup>2</sup> bzw. 8 J/cm<sup>2</sup> UV-A Licht bestrahlt. Unbestrahlte Proben dienten als Kontrolle.

### **3.2.3 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Durchführung eindimensionaler gelelektrophoretischer Trennungen von Proteinen und Quervernetzungsprodukten mittels SDS-PAGE wurde das Mini-Protean Tetra Cell Elektrophorese-System von Bio-Rad verwendet. Die Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele (15 % Trenn- und 5 % Sammelgel) erfolgte anhand etablierter Methoden. Die Gele wurden entweder sofort verwendet oder bis zu zwei Wochen im Kühlschrank gelagert.

Proteinlösungen wurden gegebenenfalls mit einem Vakuumkonzentrator konzentriert, 1:1 (v/v) mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und für ca. 5 min bei 95°C erhitzt [165]. Das Gel wurde mit max. 20 µl pro Proben tasche beladen. Die Trennung erfolgte für 15 min bei 100 V und ca. 40 min bei 200 V bzw. bis der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff das Ende des Gels erreichte.

Nach der Trennung wurde das Gel von den Gelplatten gelöst und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Gel wurde für ca. 60 min in Fixierlösung geschüttelt. Die Fixierlösung wurde entfernt und das Gel wurde zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit Färbelösung (2 % (v/v) A in B (Kapitel 3.1.2.1)) versetzt und über Nacht inkubiert. Entfärbt wurde das Gel durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O [166].

Zur Dokumentation wurde das Gel mit einem Geldokumentationsgerät fotografiert.

### **3.2.4 Enzymatische Proteolyse**

Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind in Kapitel 3.1.2.2 aufgeführt.

### 3.2.4.1 Enzymatische *In-Gel-Proteolyse*

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Arbeitsschritte an einer Sicherheitswerkbank unter Verwendung eines Thermomixers bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das mittels Coomassie-Blau gefärbte Gel wurde auf eine Glasplatte gelegt und interessierende Gelbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelbanden wurden in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerschnitten und in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße überführt. Für die Proteolyse der im Gel enthaltenen Proteine und Proteinkomplexe wurden verschiedene Protokolle (Protokoll 1 [167] und Protokoll 2 [168]) verwendet.

#### 3.2.4.1.1 Protokoll 1

Die Gelstückchen wurden zunächst in 100 µl H<sub>2</sub>O für 10 min geschüttelt. Anschließend wurden sie zweimal in 100 µl Waschlösung A für jeweils 10 min und einmal in 80 µl ACN für 5 min geschüttelt. Die Überstände wurden nach jedem Schritt entfernt. Es wurden 80 µl Waschlösung B hinzugegeben und für 5 min geschüttelt, bevor 80 µl ACN ergänzt wurden und für weitere 10 min geschüttelt wurde. Der gesamte Überstand wurde verworfen und die Gelstückchen wurden für 25 min in einem Vakuumkonzentrator getrocknet.

Die trockenen Gelstückchen wurden zur Reduktion der Disulfidbrücken mit 80 µl Reduktionslösung versetzt und für 45 min bei 56°C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und durch 80 µl Alkylierungslösung ersetzt. Die Alkylierung erfolgte für 30 min im Dunkeln. Nach Entfernen des Überstandes wurden erneut 80 µl Waschlösung B hinzugegeben, für 5 min geschüttelt, bevor 80 µl ACN ergänzt und für weitere 10 min geschüttelt wurde. Der Überstand wurde entfernt und die Gelstückchen wurden nochmals getrocknet.

Die Proteolyse erfolgte mit einer Kombination der Endoproteinasen GluC und Trypsin. Vorbereitete Protease-Aliquote (2 µl einer Lösung (0,5 µg/µl) in 1 mM HCl) wurden mit Proteolysepuffer verdünnt. Zuerst erfolgte die Zugabe der GluC-Lösung auf Eis (Enzym zu Proteinverhältnis ca. 1:15 (m/m)). Nach 15-minütiger Inkubation wurde die gleiche Menge Trypsin hinzugefügt und für weitere 15 min inkubiert. Anschließend wurde Proteolysepuffer ergänzt, bis die Gelstückchen vollständig bedeckt waren. Die Proteolyse erfolgte über Nacht bei 30°C. Durch Zugabe von 50 µl Extraktionslösung A wurde die Proteolyse gestoppt und die Ansätze wurden für 10 min geschüttelt. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde zweimal mit je 50 µl Extraktionslösung A wiederholt und die Überstände wurden vereinigt. Anschließend wurde das organische Lösungsmittel im



Vakuumpkonzentrator entfernt und die Lösung auf ein für die LC/MS-Analyse adäquates Volumen von maximal 100 µl reduziert.

### 3.2.4.1.2 Protokoll 2

Protokoll 2A: Die Gelstückchen wurden mit 500 µl ACN versetzt und 10 min geschüttelt. Der Überstand wurde entfernt und durch 50 µl Reduktionslösung ersetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 56°C wurden 500 µl ACN ergänzt und für 10 min geschüttelt. Der Überstand wurde verworfen, die Gelstückchen mit 50 µl Alkylierungslösung versetzt und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden 100 µl Waschlösung C zugegeben und für 10-30 min geschüttelt, bis die Gelstückchen vollständig entfärbt waren. Anschließend wurden 500 µl ACN ergänzt, 10 min geschüttelt und der gesamte Überstand entfernt.

Protokoll 2B: Für Cystein-freie Proteine wurden die Gelstückchen zunächst in 500 µl ACN für 10 min geschüttelt und der Überstand entfernt. Anschließend wurden sie in 100 µl Waschlösung C für 20 min geschüttelt. Es wurden 500 µl ACN ergänzt, 10 min geschüttelt und der gesamte Überstand entfernt. Der zweite Schritt wurde einmal wiederholt.

Die Proteolyse nach Protokoll 2 erfolgte entweder unter Verwendung einer Kombination der Endoproteinasen GluC und Trypsin oder AspN und Trypsin mit einem Enzym:Protein-Verhältnis von ca. 1:12-1:15 (m/m). Die entsprechenden Proteasen wurden mit Proteolysepuffer verdünnt (0,025 µg/µl). Die Zugabe der Protease-Lösungen und die Inkubation erfolgten auf Eis. Zuerst wurde eine entsprechende Menge GluC bzw. AspN-Lösung auf die Gelstückchen pipettiert und für 30 min inkubiert. Dann wurde die gleiche Menge Trypsin hinzugegeben und erneut für 30 min inkubiert. Anschließend wurde Proteolysepuffer ergänzt, bis die Gelstückchen bedeckt waren und für weitere 30-60 min inkubiert. Gegebenenfalls wurde anschließend Proteolysepuffer ergänzt und die Ansätze wurden bei 30°C über Nacht inkubiert.

Für die Extraktion der Peptide wurde das doppelte Volumen des Ansatzes an Extraktionslösung B hinzugefügt und für 15 min bei 37°C geschüttelt. Die Überstände wurden in neue Mikroreaktionsgefäße überführt und der Extraktionsschritt wurde mit 100 µl Extraktionslösung B wiederholt. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuumpkonzentrator auf ein für die LC/MS-Analyse adäquates Volumen von maximal 100 µl reduziert.

### 3.2.4.2 Enzymatische *In-Lösungs*-Proteolyse

Zur Fällung der Proteine wurde die Lösung mit dem 20-fachen Volumen eiskalten Acetons versetzt und für 10 min geschüttelt. Danach wurde der Ansatz bei 14.100 rcf für 8 min

zentrifugiert und für 1 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine bei  $0^{\circ}\text{C}$  mit 16.100 rcf für 40 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet mit 25  $\mu\text{l}$  Denaturierungslösung für 15 min im Ultraschallbad resolubilisiert. Der Ansatz wurde mit 165  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und 5  $\mu\text{l}$  der in  $\text{H}_2\text{O}$  gelösten Endoproteinase AspN hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bevor 5  $\mu\text{l}$  einer Trypsin-Lösung ergänzt wurden. Das Enzym zu Protein-Verhältnis betrug jeweils ca. 1:30 (m/m). Der Ansatz wurde über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zum Schluss wurde die Proteolyse durch Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  TFA-Lösung gestoppt.

### 3.2.5 Massenspektrometrische Methoden

#### 3.2.5.1 Probenvorbereitung

Für die massenspektrometrische Analyse von Proben ohne vorherige chromatographische Trennung wurden die Analytlösungen gegebenenfalls entsalzt. Für das Entsalzen wurden ZipTip-Pipettenspitzen, gefüllt mit C4-Umkehrphasenmaterial für Proteine bzw. C18-Umkehrphasenmaterial für Peptide den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Konzentrierte Lösungen wurden gegebenenfalls vor den Messungen verdünnt.

#### 3.2.5.2 Nano-ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie

Für die Ionisierung mittels Nano-ESI wurden, mit 5-10  $\mu\text{l}$  der Analytlösung befüllte, Palladium/Gold-beschichtete Borosilikatglasemitter verwendet. Massenspektren am LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer wurden im Positivionenmodus in verschiedenen Massenbereichen bei einer Auflösung von  $R = 60.000$  bis  $100.000$  bei  $m/z$  400 im Orbitrap-Massenanalysator oder niederaufgelöst in der linearen Ionenfalle (LTQ) detektiert. Interessierende Ionen wurden gegebenenfalls in der LTQ isoliert und dort mittels Kollisions-induzierter Dissoziation (CID), bei variierenden normierten Kollisionsenergien, fragmentiert. Entstandene Fragmentionen wurden entweder im Orbitrap-Massenanalysator oder in der linearen Ionenfalle analysiert.

Für die *top down*-Analyse der intakten CaM/M13 Komplexe wurden die Massenspektren ebenfalls im Positivionenmodus am Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer gemessen. Die interessierenden Ionenspezies wurden im Quadrupol mit einem Isolationsfenster von 2 Th isoliert und in der LTQ gesammelt. Die Fragmentierung erfolgte in der LTQ mittels CID unter Verwendung variierender normierter Kollisionsenergien bis zu 35. Für die Fragmentierung mittels Elektrontransfer-Dissoziation (ETD) wurden die Radikalanionen des Fluoranthens als Elektronenüberträger in die LTQ geleitet und Reaktionszeiten von 3 bis 10 ms verwendet. Die

Fragmentationenmassenspektren wurden in verschiedenen Massenbereichen bei einer Auflösung von  $R = 240.000$  bei  $m/z$  200 im Orbitrap-Massenanalysator detektiert.

### 3.2.5.3 Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie

Komplexe Peptidlösungen wurden vor der massenspektrometrischen Analyse mittels Nano-HPLC chromatographisch getrennt.

Die Analytlösungen wurden mit einem automatischen Probengeber in eine Probenschleife überführt und auf eine 5 mm-Vorsäule mit C18-Material aufgetragen. Die Proben wurden durch 15- bis 30-minütiges Waschen mit 0,1 % (v/v) TFA bei einer Flußrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  entsalzt. Anschließend wurden die Proben mit 100 % (v/v) Fließmittel A und einer Flußrate von 300  $\text{nl}/\text{min}$  auf eine 15 cm-Trennsäule eluiert und mit einem linearen Fließmittelgradienten über 60 bis 180 min von 0 % (v/v) Fließmittel B auf 40 % (v/v) B aufgetrennt (siehe Kapitel 3.1.2.3). Sehr hydrophobe Peptide wurden bei 100 % (v/v) B über 11 bis 30 min eluiert, bevor das System für 15 min mit 100 % (v/v) A äquilibriert wurde. Die Trennung der Peptide wurde durch Detektion der UV-Absorption bei 214 nm verfolgt.

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte, bis auf die Waschphase, über den gesamten Zeitraum. Für die LC/MS-Analysen wurden Übersichtsmassenspektren in einem Massenbereich von  $m/z$  350-2000 bei einer Auflösung von  $R = 60.000$  bei  $m/z$  400 registriert. Datenabhängig wurden nach jedem Übersichtsscan die fünf höchsten Signale einzeln mit einem Massenfenster von 2 Th in der LTQ isoliert und bei einer normierten Fragmentierungsenergie von 35 mittels CID fragmentiert. Die Detektion der Fragmentationen erfolgte in der LTQ. Für die Erfassung eines größeren dynamischen  $m/z$ -Bereichs, wurden bereits fragmentierte Signale automatisch auf eine Ausschlussliste gesetzt und für 120 s nicht fragmentiert.

### 3.2.5.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für die Analyse von intakten Proteinen und Proteinkomplexen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden die Proben, wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben, entsalzt.

Die Analyten wurden mit Sinapinsäure oder Super-DHB als Matrix auf einer MALDI-Probenplatte präpariert. Für die Präparation mit Sinapinsäure wurde die Dünnschichtmethode verwendet. Hierfür wurde eine gesättigte Sinapinsäurelösung in Ethanol auf einem Probenplatz verteilt und so eine dünne Matrixschicht erzeugt. Eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure in TA 33 (Kapitel 3.1.2.4) wurde 1:1 (v/v) mit Analytlösung vermischt und davon wurde 1  $\mu\text{l}$  auf die Matrixschicht pipettiert.

Bei der Präparation mit Super-DHB wurde eine 50 mg/ml-Lösung der Matrix in TA 50 (Kapitel 3.1.2.4) 1:1 mit Analytlösung gemischt und davon wurde 1 µl auf einen Probenplatz pipettiert.

Für die externe Kalibrierung wurde der Proteinstandard 2 von Bruker Daltonik verwendet, der sechs Massen zwischen 11.991 und 66430 u umfasst. Hierfür wurde die Kalibrierlösung auf gleiche Weise wie die Analytlösung auf einen benachbarten Probenplatz präpariert.

Die Spektren wurden im linearen Messmodus in einem Massenbereich von  $m/z$  5.000-100.000 im Positivionenmodus aufgenommen. 2000 Einzelspektren (entsprechend 2000 Laserschüssen) wurden zu einem Einzelmassenspektrum akkumuliert.

### 3.2.5.5 Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Komplexe Peptidproben wurden über ein Nano-HPLC-System chromatographisch getrennt. Hierzu wurden die Analytlösungen mittels eines automatischen Probengebers in eine Probenschleife überführt und auf eine C18-Vorsäule aufgetragen. Die Proben wurden durch 15-minütiges Waschen mit 0,1 % (v/v) TFA bei einer Flussrate von 20 µl/min entsalzt. Anschließend wurden die Peptide auf eine mit Fließmittel C äquilibrierte C18-Trennsäule eluiert und über einen Fließmittelgradienten bei einer Flussrate von 300 nl/min aufgetrennt (siehe Kapitel 3.1.2.3): In 90 min von 0 % D auf 40 % (v/v) D, in 1 min auf 100 % D, 11 min mit 100 % D, in 1 min auf 0 % (v/v) D entsprechend 100 % C und 10 min bei 100 % C. 18 s-Fractionen wurden über einen Probenroboter automatisch mit 1,1 µl einer HCCA-Lösung (0,8 mg/ml in TA 90, Kapitel 3.1.2.4) vermischt und auf einen Probenplatz einer MALDI *AnchorChip*-Probenplatte pipettiert.

Nach erfolgter Trennung wurde der Peptidstandard (*Bruker Peptide Calibration Standard II*), der sieben Peptide der Massen zwischen 1046,5418 u ( $[M+H]^+$ , Angiotensin II) und 3147,4710 u ( $[M+H]^+$ , Somatostatin) umfasst, für die externe Kalibrierung manuell auf die Probenplatte aufgebracht und die Peptide im Positivionenmodus mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Das Gerät wurde für eine höhere Auflösung im Reflektormodus verwendet. Für ein Übersichtsmassenspektrum im Massenbereich von  $m/z$  800-5000 wurde in Schritten von 250 Laserschüssen ein Spektrum akkumuliert, welches automatisch auf die erreichte Auflösung (mindestens  $R = 7500$ ) und Intensität (Eingabe: „*low intensity*“) überprüft wurde. Bei Erfüllung dieser Kriterien wurden insgesamt bis zu 1500 Laserschüsse akkumuliert. Zur Ermittlung der monoisotopischen Ionenmassen wurde der SNAP (*sophisticated numerical annotation procedure*)-Algorithmus verwendet. Pro Übersichtsmassenspektrum für jede Fraktion wurden automatisch bis zu 20 Vorläuferionensignale mit einem Signal-zu-Rausch (S/N)-Verhältnis von

$S/N \geq 15$  für die Fragmentierung mittels LID (*laser-induced dissociation*) ausgewählt. Dabei wurden Signale, die in einem Fenster von 50 ppm in bis zu vier Fraktionen auftraten, zusammengefasst und jeweils aus der Fraktion mit der höchsten Intensität für die Fragmentierung ausgewählt.

Für die Detektion des isolierten Vorläuferions wurden bis zu 2040 Laser-Schüsse in 170 Schuss-Schritten akkumuliert bzw. bis ein  $S/N$ -Verhältnis von 30 erreicht wurde. Anschließend wurde für die Fragmentierung die Laserenergie erhöht und bis zu maximal 3200 Laserschüsse wurden in 200 Schuss-Schritten zu einem Spektrum akkumuliert bzw. bis mindestens 10 Fragmentationensignale ein  $S/N$ -Verhältnis von  $\geq 10$  erreicht hatten.

### 3.2.5.6 Identifizierung der Quervernetzungsprodukte

Für die Analyse und Identifizierung von quervernetzten Produkten wurden sowohl die Software StavroX [151] als auch GPMAW (*General Protein Mass Analysis for Windows*) [144] verwendet. Aus den Rohdaten wurden sowohl mit Hilfe von flexAnalysis (MALDI-TOF/TOF-MS) bzw. dem Proteome Discoverer (LTQ-Orbitrap XL-MS) MGF (*Mascot generic format*)-Dateien erstellt als auch Massenlisten im Excel-Format extrahiert. Die experimentell bestimmten Massen wurden mit einer Liste theoretischer Quervernetzungsprodukte abgeglichen und die Fragmentationenspektren möglicher Treffer manuell verifiziert. Der Abgleich erfolgte mit einer Massenabweichung von 3-5 ppm (LTQ-Orbitrap XL-MS) bzw. 50 ppm (MALDI-TOF/TOF-MS) für die Vorläuferionen und einer Differenz von 0,8 Th (LTQ-Orbitrap XL-MS) bzw. 1 Da (MALDI-TOF/TOF-MS) für die Fragmentationen. Zusätzlich wurden mögliche Modifikationen, wie die Oxidation von Methionin und die Carbamidomethylierung von Cysteinen, angenommen. Für die proteolytische Spaltung mit Trypsin wurde die C-terminale Spaltung nach Lysin und Arginin und für die zusätzliche Verwendung von GluC bzw. AspN die C-terminale Spaltung nach bzw. die N-terminale Spaltung vor Asparaginsäure und Glutaminsäure beachtet. Bis zu acht Fehlschnittstellen (GPMAW) bzw. drei Fehlschnittstellen pro proteolytischer Spaltstelle (StavroX) wurden akzeptiert. Je nach verwendetem Quervernetzungsreagenz wurden für aminreaktive Reagenzien hauptsächlich die Seitenketten von Lysinen und den N-Termini der Proteine als potentielle Reaktionsstellen betrachtet. Bei einigen Analysen wurden auch Reaktionen mit Serin, Threonin und Tyrosin in Betracht gezogen. Bei Verwendung von photoreaktiven Quervernetzungsreagenzien wurden alle Aminosäurereste als Reaktionsstellen akzeptiert.

Wenn isotoopenmarkierte Reagenzien bzw. Proteine verwendet wurden, erfolgte bei potentiellen Quervernetzungsprodukten eine zusätzliche Kontrolle auf charakteristische Isotopenmuster.

### 3.2.6 Organisch-präparative Methoden

#### 3.2.6.1 Substanzcharakterisierung

##### 3.2.6.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Kontrolle der Reaktionen und Überprüfung der Umsetzung wurden die Reaktionsmischungen und Ausgangsstoffe dünnschichtchromatographisch untersucht. Dafür wurden die jeweiligen Probelösungen mittels Glaskapillaren punktförmig auf mit Kieselgel beschichtete DC-Aluminiumplatten aufgetragen und mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen (z.B. Chloroform/Methanol, Chloroform/Ethylacetat, Toluol) getrennt. Die DC-Platten wurden nach dem Trocknen unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm ausgewertet.

##### 3.2.6.1.2 ESI-Massenspektrometrie

Für die Aufnahme der Massenspektren wurden 5-10  $\mu$ l der Probelösungen in einen Metallbeschichteten Borosilikat-Glasemitter gefüllt und an der Nano-ESI Ionenquelle eines LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometers befestigt. Zur Ionisierung wurde eine Sprayspannung von 1,3-1,5 kV gewählt und die Temperatur der Transferkapillare zwischen 80 und 200°C eingestellt. Die Detektion der Massenspektren erfolgte für variierende  $m/z$ -Bereiche im Orbitrap-Massenanalysator bei einer Auflösung von  $R = 100.000$  bei  $m/z$  400.

##### 3.2.6.1.3 NMR-Spektroskopie

Zur Messung von NMR-Spektren wurden 10-30 mg der Substanzen in den angegebenen deuterierten Lösungsmitteln ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) gelöst. Die Detektion der Spektren erfolgte entweder an einem Varian Gemini 2000 NMR-Spektrometer mit einer Arbeitsfrequenz von 400 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) bzw. 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR) oder an einem Varian Inova 500 NMR-Spektrometer mit einer Frequenz von 500 MHz bzw. 125 MHz. Als interner Standard dienten die Signale der verwendeten Lösungsmittel.

### 3.2.6.2 Synthese des $^{13}\text{C}_6$ -markierten *N*-Fmoc-*L*-*p*-Benzoylphenylalanin

#### 3.2.6.2.1 Darstellung des 4-Methylbenzophenon (**1**)

Diese Synthese basierte auf einer Vorschrift von Lichtin *et al.* [169].  $^{13}\text{C}_6$ -markiertes Benzol (2,09 g, 24,86 mmol) wurde zu einer Suspension aus  $\text{AlCl}_3$  (8,03 g, 60,22 mM) in 14,5 ml  $\text{CS}_2$  gegeben. Danach wurde mittels Tropftrichter, unter Eiskühlung und ständigem Rühren, *p*-Toluoylchlorid (4,44 g, 28,72 mmol) über 30 min hinzuge tropft und anschließend bei Raumtemperatur weiter gerührt. Nach 16 h wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und 40 ml einer eiskalten wässrigen HCl-Lösung (10 % (m/m)) wurden hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether (1x 40 ml, 2x 30 ml) extrahiert. Nachfolgend wurden die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit je 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (5 % (m/m)) und NaCl-Lösung (gesättigt) gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, bis ein leicht gelbliches Öl zurückblieb. Dieses Rohprodukt wurde mittels  $\text{CHCl}_3$  über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt und das gewünschte Produkt (**1**) als farbloser Feststoff (3,24 g, 16,02 mmol) erhalten.

Aussehen: farbloser kristalliner Feststoff

Ausbeute: 64 %

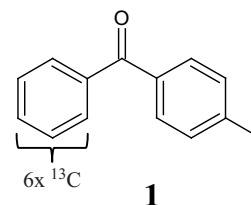
Summenformel:  $^{13}\text{C}_6\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_1$

Exakte Masse: 202,10894 g/mol

ESI-MS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  gef./ ber.: 203,1162/ 203,1162

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$ [ppm] (400 MHz, 27°C,  $\text{CDCl}_3$ ) = 2,44 [s, 3H;  $-\text{CH}_3$ ]; 7,28 [d,  $^3J(\text{H},\text{H}) = 8,0$ , 2H;  $-\text{COPhH}(3, 5)\text{CH}_3$ ]; 7,45-7,49 [m, 2H;  $-\text{COPhH}(3', 5')$ ]; 7,55-7,59 [m, 1H;  $-\text{COPhH}(4')$ ]; 7,73 [d,  $^3J(\text{H},\text{H}) = 8,1$ , 2H;  $-\text{COPhH}(2, 6)\text{CH}_3$ ]; 7,77-7,79 [m, 2H;  $-\text{COPhH}(2', 6')$ ]

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$ [ppm] (100 MHz, 27°C,  $\text{CDCl}_3$ ) = 21,64 [s, 1C;  $-\text{CH}_3$ ]; 127,46-130,51 [m, 6C;  $\text{Ph}(C(2', 3', 5', 6'))\text{COPh}(C(2, 6))\text{CH}_3$ ]; 131,56-132,73 [m, 3C;  $\text{Ph}(C(4'))\text{COPh}(C(3, 5))\text{CH}_3$ ]; 134,82-134,96 [m, 1C;  $-\text{COPh}(C(I))\text{CH}_3$ ]; 137,34-138,55 [m, 1C;  $-\text{COPh}(C(I'))$ ]; 143,20 [s, 1C;  $-\text{COPh}(C(4))\text{CH}_3$ ]; 196,17-196,78 [m, 1C;  $-\text{CO}-$ ]



#### 3.2.6.2.2 Darstellung des 4-(Brommethyl)benzophenon (**2**)

Diese Synthese basierte auf den Vorschriften von Lamos *et al.* [170] und Wilkins *et al.* [152]. Zu einer Lösung von **1** (3,12 g, 15,43 mmol) in 60 ml  $\text{CCl}_4$  wurden *N*-Bromsuccinimid (NBS; 3,16 g, 17,74 mmol) und Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN; 120 mg, 0,73 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 6 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die abgekühlte Reaktionsmischung filtriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das erhaltene rot-

braune Öl wurde anschließend mittels Toluol über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt, wobei 4-(Brommethyl)benzophenon (**2**) als weißer Feststoff (2,69 g, 9,57 mmol) erhalten wurde.

Aussehen: weißer kristalliner Feststoff

Ausbeute: 62 %

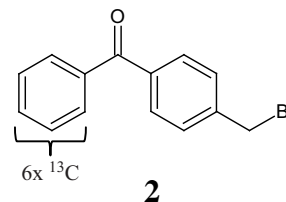
Summenformel:  $^{13}\text{C}_6\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_1\text{Br}$

Exakte Masse (ber.):  $^{79}\text{Br}$ : 280,01946 g/mol

$^{81}\text{Br}$ : 282,01741 g/mol

ESI-MS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  gef./ ber.:  $^{79}\text{Br}$ : 281,0265/ 281,0267

$^{81}\text{Br}$ : 283,0244/ 283,0247



$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$ [ppm] (500 MHz, 27°C,  $\text{CDCl}_3$ ) = 4,54 [s, 2H;  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ]; 7,46-7,52 [m, 4H;  $-\text{PhH}(3, 5)\text{COPhH}(3', 5')$ ]; 7,58-7,61 [m, 1H;  $-\text{COPhH}(4')$ ]; 7,78-7,80 [m, 4H;  $-\text{PhH}(2, 6)\text{COPhH}(2', 6')$ ]

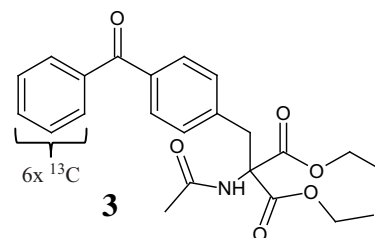
$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$ [ppm] (125 MHz, 27°C,  $\text{CDCl}_3$ ) = 32,25 [s, 1C;  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ]; 127,77-130,54 [m, 8C;  $\text{Ph}(C(2', 3', 5', 6'))\text{COPh}(C(2, 3, 5, 6))\text{CH}_3$ ]; 132,08-133,02 [m, 1C;  $\text{Ph}(C(4'))\text{CO}-$ ]; 136,88-137,85 [m, 2C;  $\text{Ph}(C(1'))\text{COPh}(C(1))-$ ]; 142,08 [s, 1C;  $-\text{COPh}(C(4))\text{CH}_3$ ]

### 3.2.6.2.3 Darstellung von Diethyl-(4-benzophenonyl)methylacetamidomalonat (**3**)

Dieser Syntheseschritt orientierte sich an den Vorschriften von Hsiao *et al.* [171] und Wilkins *et al.* [152]. Diethylacetamidomalonat (3,33 g, 15,31 mmol) wurde in 15 ml Ethanol (*gradient grade*) gelöst und zu 14 ml einer frisch hergestellten Lösung von Natriumethanolat (470 mg Natrium gelöst in 20 ml Ethanol) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 2,5 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde **2** (2,69 g, 9,57 mmol) unter Wärmezufuhr in 50 ml Ethanol gelöst und nach Zugabe einer Spatelspitze KI langsam zum Reaktionsgemisch getropft. Die Mischung wurde auf einem Ölbad für 22 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden jeweils 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und Ethylacetat ergänzt und beide Phasen voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}$  (2x 50 ml) gewaschen, anschließend über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum verblieb ein weißgelbes festes Rohprodukt, welches im Anschluss säulenchromatographisch mit einem  $\text{CHCl}_3$ /Ethylacetat-Gradienten steigender Polarität gereinigt wurde. Diethyl-(4-benzophenonyl)methylacetamidomalonat (**3**) wurde als weißer Feststoff (3,01 g, 7,21 mmol) erhalten.



Aussehen:	weißer Feststoff
Ausbeute:	75 %
Summenformel:	$^{13}\text{C}_6\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{N}_1$
Exakte Masse (ber.):	417,18832 g/mol
ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ gef./ ber.:	418,1956/ 418,1956

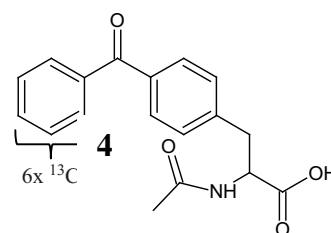


$^1\text{H-NMR}$ :	$\delta$ [ppm] (400 MHz, 27°C, $\text{CDCl}_3$ ) = 1,30 [t, $^3J(\text{H,H}) = 7,1$ Hz, 6H; $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ]; 2,03 [s, 3H; $-\text{COCH}_3$ ]; 3,75 [s, 2H; $-\text{PhCH}_2-$ ]; 4,22-4,34 [m, 4H; $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ]; 6,56 [s, 1H; $-\text{CONH}-$ ]; 7,13 [d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8,2$ , 2H; $-\text{COPhH}(3, 5)-$ ]; 7,46-7,50 [m, 2H; $-\text{COPhH}(3', 5')-$ ]; 7,56-7,60 [m, 1H; $-\text{COPhH}(4')-$ ]; 7,72 [d, 2H $^3J(\text{H,H}) = 8,3$ , 2H; $-\text{COPhH}(2, 6)-$ ]; 7,76-7,78 [m, 2H; $-\text{COPhH}(2', 6')$ ]
$^{13}\text{C-NMR}$ :	$\delta$ [ppm] (100 MHz, 27°C, $\text{CDCl}_3$ ) = 14,02 [s, 2C; $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ]; 23,06 [s, 1C; $-\text{COCH}_3$ ]; 37,76 [s, 1C; $-\text{PhCH}_2-$ ]; 62,84 [s, 2C; $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ]; 67,03 [s, 1C; $-\text{NHC}(\text{CO}-)\text{CH}_2$ ]; 127,55-130,52 [m, 8C; $-\text{Ph}(\text{C}(2, 3, 5))\text{COPh}(\text{C}(2', 3', 5'))$ ]; 131,81-132,97 [m, 2C; $-\text{COPh}(\text{C}(4'))$ ]; 136,12-136,55 [m, 1C; $-\text{COPh}(\text{C}(1))\text{CH}_3$ ]; 136,94-138,14 [m, 1C, $-\text{COPh}(\text{C}(1'))$ ]; 140,32 [s, 1C; $-\text{COPh}(\text{C}(4))-$ ]; 167,29 [s, 2C; $-\text{COO}-$ ]; 169,18 [s, 1C; $-\text{COCH}_3$ ]

#### 3.2.6.2.4 Darstellung von *N*-Acetyl-DL-*p*-Benzoylphenylalanin (**4**)

Die Synthese orientierte sich grob an der Vorschrift von Lin *et al.* [172]. Eine Lösung von KOH (1,45 g) in 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  wurde unter Rühren über 5 min zu einer Suspension von **3** (3,01 g, 7,21 mmol) in 60 ml einer Mischung, bestehend aus Ethanol (*gradient grade*, 40 ml) und  $\text{H}_2\text{O}$  (20 ml), getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Alkohol im Vakuum entfernt und die verbleibende wässrige Phase nacheinander mit jeweils 30 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und  $\text{CHCl}_3$  gewaschen. Danach wurde die wässrige Phase mit einer wässrigen HCl-Lösung (2 M) auf pH 2-3 angesäuert und zweimal mit je 75 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende gelblich-weiße Feststoff wurde über einen  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Methanol Gradienten steigender Polarität chromatographisch gereinigt und das Produkt (**4**) als weißer Feststoff (1,74 g, 5,48 mmol) erhalten.

Aussehen:	weißer Feststoff
Ausbeute:	76,0 %
Summenformel:	$^{13}\text{C}_6\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_1$
Exakte Masse (ber.):	317,13589 g/mol
ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ gef./ ber.:	318,1433/ 318,1432



$^1\text{H-NMR}$ :	$\delta$ [ppm] (400 MHz, 27°C, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) = 1,88 [s, 3H; $-\text{COCH}_3$ ]; 3,01-3,36 [m, 2H; $-\text{CH}_2-$ ]; 4,61 [dd, $^3J_1 = 8,5$ , $^3J_2 = 5,0$ , 1H; $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$ ]; 7,36 [d, $^3J(\text{H,H}) = 8,2$ , 2H; $-\text{COPhH}(3, 5)-$ ]; 7,40-7,47 [m, 2H; $-\text{COPhH}(3', 5')-$ ]; 7,55-7,65 [m, 5H; $-\text{PhH}(2, 6)\text{COPhH}(2', 4', 6')$ ]
--------------------	--

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ [ppm] (100 MHz, 27°C, CD<sub>3</sub>OD) = 22,79 [s, 1C; -CH<sub>3</sub>]; 38,90 [s, 1C; -CH<sub>2</sub>-]; 57,13 [s, 1C; -CH-]; 128,74-131,49 [m, 8C; Ph(C(2', 3', 5', 6'))COPh(C(2, 3, 5, 6))CH<sub>3</sub>]; 133,10-134,24 [m, 1C; -COPh(C(4'))]; 136,78-136,91 (136,85) [m(d), (<sup>2</sup>J = 13,3 Hz), 1C; -COPh(C(I))CH<sub>2</sub>]; 138,30-139,49 [m, 1C; -COPh(C(I'))]; 145,29 [s, 1C; -COPh(C(4))CH<sub>2</sub>]; 173,16 [s, 1C; -COCH<sub>3</sub>]; 179,19 [s, 1C; -COOH]; 197,95-198,56 [m; 1C; -PhCOPh]

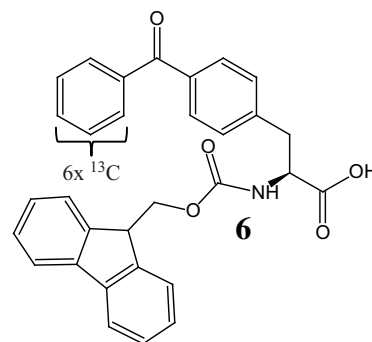
### 3.2.6.2.5 Darstellung von L-p-Benzoylphenylalanin (5)

Diese Synthese basierte auf Angaben von Oba *et al.* [173] und Ross *et al.* [174]. **4** (1,5 g, 4,73 mmol) wurde in 35 ml H<sub>2</sub>O suspendiert und der pH-Wert mit wässriger NaOH-Lösung (2 M) auf pH 7-8 eingestellt. Zum Starten der Reaktion wurde eine filtrierte Lösung aus Acylase I (*Aspergillus melleus*; 246 mg) und CoCl<sub>2</sub> (4,6 mg) in 15 ml H<sub>2</sub>O zum Reaktionsgemisch gegeben und bei 37°C geschwenkt. Nach zwei Tagen wurden 5 ml einer Lösung aus Acylase I (60 mg) und CoCl<sub>2</sub> (1 mg) ergänzt und einen weiteren Tag inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Suspension mit NaOH-Lösung auf ca. pH 12-13 eingestellt, bis alle ungelösten Rückstände vollständig in Lösung gingen. Die Lösung wurde zweimal durch Zentrifugationsfilter mit einem Molekulargewichtsausschluss von 10 kDa und einmal durch einen Zentrifugationsfilter mit einem Molekulargewichtsausschluss von 3 kDa gefiltert. Danach wurde die Lösung mit wässriger HCl-Lösung (1 M) auf pH 7-8 eingestellt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der schwach-gelbe Feststoff (**5**) wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

### 3.2.6.2.6 Darstellung von N-Fmoc-L-p-Benzoylphenylalanin (6)

Diese Synthese basierte auf Vorschriften von Chen *et al.* [175] und Brimble *et al.* [176]. Das Rohprodukt (**5**) wurde in 25 ml einer wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> (528 mg) suspendiert. Eine Lösung von N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid (NHS-Fmoc; 529 mg, 1,57 mmol) in 15 ml Dioxan wurde unter ständigem Rühren über 10 min zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Danach wurden 15 ml Dioxan zum Reaktionsansatz ergänzt und dieser bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 h wurden 5 ml einer Lösung von NHS-Fmoc (271 mg) in Dioxan ergänzt und weitere 5 h gerührt. Das Dioxan wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Phase mit einer wässrigen Zitronensäurelösung (20 % (m/m)) auf ca. pH 2 angesäuert. Anschließend wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit einem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Methanol-Gradienten über Kieselgel chromatographiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum blieb das Endprodukt (**6**) als weißer Feststoff (970 mg, 1,95 mmol) zurück.

Aussehen: weißer Feststoff  
 Ausbeute: nach Stufen 5 und 6: 41,2 %  
 (von max. 50 %)  
 Summenformel:  $^{13}\text{C}_6\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}_1$   
 Exakte Masse (ber.): 497,19340 g/mol  
 ESI-MS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  gef./ ber.: 498,2001/ 498,2007



$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ [ppm] (400 MHz, 27°C,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) = 2,99-3,28 [m, 2H; -PhCH<sub>2</sub>-]; 4,04-4,14 [m, 3H; -OCH<sub>2</sub>CH-]; 4,3-4,34 [-NHCH(COOH)-]; 6,96-6,95 [m, 2H; -NHCH(COOH)-]; 7.20-7,89 [m, 17H; *arom.H*]

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$ [ppm] (100 MHz, 27°C,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) = 37,42 [s, 1C; -PhCH<sub>2</sub>-]; 46,59 [s, 1C; -OCH<sub>2</sub>CH-]; 56,28 [s, 1C; -NHC(COOH)-]; 65,16 [s, 1C; -OCH<sub>2</sub>CH-]; 119,92-119,95 [m, 2C; Fluoren(C(4, 5))]; 124,95-125,14 [m, 2C; Fluoren(C(1, 8))]; 126,86-126,88 [m, 2C; -Ph(C(2, 6))CH<sub>2</sub>-]; 127,41-129,82 [m, 10C; -Ph(C(3, 5))COPh(C(2', 3', 5', 6'))]; Fluoren(C(2, 3, 6, 7)); 131,13-132,78 [m, 1C; -COPh(C(4'))]; 134,42-134,56 [m, 1C; -COPh(C(1))CH<sub>2</sub>-]; 136,61-137,78 [m, 1C; -COPh(C(1'))]; 140,54-140,57 [m, 2C; Fluoren(C(4a, 4b))]; 143,71-143,72 [m, 2C; Fluoren(C(9a, 8a))]; 144,60 [s, 1C; -COPh(C(4))CH<sub>2</sub>-]; 155,29 [s, 1C; -NHCOO-]; 195,01-195,69 [m, 1C; -PhCOPh]

### 3.3 Zusätzlich verwendete Methoden

Die hier aufgeführten Untersuchungen lieferten zusätzliche Ergebnisse ([133, 177]) und waren für die Bestätigung der eigenen Resultate notwendig.

#### 3.3.1 Circular Dichroismus (CD)-Analyse des GC-Peptids 1

Die CD-Messungen wurden von Dr. Knut Köbel durchgeführt. Es wurden Stammlösungen (146  $\mu\text{M}$ ) des GC-Peptids 1 in  $\text{H}_2\text{O}$  und 60 % (v/v) TFE hergestellt und in verschiedenen Verhältnissen gemischt, so dass TFE-Konzentrationen von 0-60 % (v/v) erhalten wurden. Gegebenenfalls wurde mit einer 1 M Stammlösung von  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,5) eine Konzentration von 25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,5) eingestellt. Die Fern-UV-CD Spektren der Lösungen wurden in einer 0,5 mm Quarzküvette an einem J-810 Spectropolarimeter (Jasco) aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 4°C, im Bereich von 260 nm bis 180 nm mit einer Messgeschwindigkeit von 20 nm/min, Abstände der Datenpunkte von 0,1 nm, Antwortzeiten von 4 s und Bandweiten von 1 nm. Je nach Signalintensität wurde der Durchschnitt aus 10-20 Spektren berechnet. Die Rohspektren wurden auf die Peptidbindungskonzentration ( $[\Theta]_{\text{MRW}}$ ) normalisiert.

#### 3.3.2 Erstellung des Strukturmodells des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes

Das Strukturmodell des GCAP-2/GC Peptid 1-Komplexes wurde durch Dipl.-Biochem. Björn Olausson erstellt. Für die Erstellung des Modells wurde das GC-Peptid 1 manuell in die NMR-Struktur des GCAP-2 (PDB-Eintrag 1JBA [18]) platziert. PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) wurde zur Vorhersage der Sekundärstruktur des GC-Peptids verwendet. Mittels der NAMD-Software [178] (CVS-2011-11-16) und dem CHARMM27 [179] *all-atom*-Kraftfeld wurde eine Molekulardynamik (MD)-Simulation in explizitem Wasser in einer würfelförmigen Box mit einer Seitenlänge von 78 Å durchgeführt. Dafür wurde der Protein-Peptid-Komplex neutralisiert und unter Verwendung des TIP3P-Wassermodells in 0,15 M  $\text{CaCl}_2$  solvatisiert. Die Bindung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den EF-Handmotiven des GCAP-2 wurde dabei beibehalten. Die Simulation erfolgte unter Verwendung periodischer Randbedingungen. Weitreichende elektrostatische Wechselwirkungen wurden mit Hilfe des *particle mesh* Ewald-Verfahrens [180] mit einer Gitterweite von 1 Å für die schnelle Fourier-Transformation berechnet. Für die nichtbindenden Wechselwirkungen wurde eine Distanz von 15 Å verwendet. Bindungen zu Wasserstoffatomen wurden mit dem SHAKE-Algorithmus [181] auf ihre Gleichgewichts-bindungslänge festgelegt, wodurch der Zeitschritt der Simulation

auf 2 fs erhöht werden konnte. Das System wurde in 10.000 Schritten minimiert und bei konstantem Volumen (NVT-Ensemble) bei 303 K für 1 ns äquilibriumiert. Während des Produktionslaufs wurden der Druck und die Temperatur mit Hilfe der Nose-Hoover-Langevin-Druckkontrolle [182, 183] konstant bei 1 bar und 303 K gehalten (NTP-Ensemble). Für die ersten 10 ns der Simulation wurden Distanzbeschränkungen für bestimmte Aminosäuren eingestellt. Für alle verwendeten Quervernetzungen wurde eine untere Begrenzung von 0 Å angenommen, mit einem unteren Limit von 1 Å. Die obere Begrenzung für Quervernetzungen, die mittels BS<sup>2</sup>G erhalten wurden, wurde auf 19 Å festgesetzt, mit einem Limit von 18 Å. Für die Quervernetzungen mittels Photo-Leucin wurde die Begrenzung auf 10 Å und ein Limit von 9 Å verwendet. Eine begrenzende Kraft wurde in 1 ns-Intervallen stufenweise erhöht (20, 50, 100 und 200 kcal/mol) und für 6 ns auf der höchsten Stufe gehalten.

### 3.3.3 Chromatographische Trennung der D- und L-Bpa-Peptide

Die chromatographische Trennung der Bpa-Peptide wurde von Dr. Olaf Jahn und Lars van Werven durchgeführt (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen). <sup>12</sup>C-D-Bpa-M13 und <sup>12</sup>C-L-Bpa-M13 wurden mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung einer Vydac C4-Trennsäule (250 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å) untersucht. Die Trennung der Bpa-M13 Peptide erfolgte mit einem linearen Fließmittelgradienten von 25-40 % **b** in 80 min, unter Verwendung der Fließmittel **a** (0,1 % (v/v) TFA in Wasser) und **b** (80 % ACN, 0,1 % TFA (v/v) in Wasser). Die präparative Trennung der Peptide erfolgte unter identischen Bedingungen mit einer Vydac C4-Trennsäule (250 x 22 mm, 10 µm, 300 Å). Die Bpa-GC-Peptide (<sup>12</sup>C- und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-GC-Photo-Peptid 3) wurden erst präparativ mittels linearem Fließmittelgradienten von 30-55 % **b** in 100 min gereinigt. Anschließend wurden sie bei identischem Fließmittelgradienten unter Verwendung einer Vydac C18-Trennsäule (250 x 10 mm, 5 µm, 300 Å) und den Fließmitteln **c** (0,1 % (v/v) FA in Wasser) und **d** (80 % ACN, 0,1 % FA (v/v) in Wasser) erneut chromatographiert.

### 3.3.4 Größenausschlusschromatographie zur Analyse des GCAP-2-Homodimers

Die größenausschlusschromatographischen Untersuchungen wurden von Dipl.-Biochem. Christian Arlt durchgeführt. Für die Analyse wurden 300 µl einer 30 µM GCAP-2-Lösung in 20 mM HEPES (pH 7,5), 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,3 mM CaCl<sub>2</sub> bzw. 0,4 mM EGTA verwendet. Als Fließmittel dienten die jeweiligen Puffer. Für die Trennung wurden 300 µl dieser Lösungen verwendet. Die Trennung erfolgte für 120 min an einem FPLC-System (ÄKTA fplc, GE Healthcare) mit einer Größenausschlussäule (HiLoad 16/600

Superdex 75 pg, GE Healthcare) und einer Flussrate von 1 ml/min. Die Kalibrierung wurde mit 1 ml einer Mischung aus Dextranblau (2.000.000 u, 1 mg/ml), Rinderserumalbumin (66.400 u, 7 mg/ml), Ovalbumin (43.000 u, 7 mg/ml), Chymotrypsinogen A (25.000 u, 3 mg/ml) und Ribonuklease A (13.700 u, 10 mg/ml) durchgeführt.

### 3.3.5 Analytische Ultrazentrifugation (AUC)

Die Analysen mittels analytischer Ultrazentrifugation (AUC) erfolgten durch PD Dr. Hauke Lilie (Institut für Biochemie/Biotechnologie der MLU Halle-Wittenberg). Für die AUC-Messungen wurde eine Beckman XL-A Zentrifuge (Beckman Coulter) mit einem AN50Ti-Rotor und Doppelsektorzellen verwendet. Das Sedimentationsgleichgewicht wurde bei 16.000 rpm, 20°C und 280 nm beobachtet. Hierfür wurde eine 10 µM Lösung aus <sup>14</sup>N-GCAP-2 oder <sup>15</sup>N-GCAP-2 in den gleichen Puffern hergestellt, wie sie für die Quervernetzungsreaktionen (Kapitel 3.2.2.2.3) und die Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.3.4) verwendet wurden. Die Sedimentationsgeschwindigkeiten von <sup>14</sup>N-GCAP-2 (0,025-2 mg/ml) wurden in Gegenwart von 0,3 mM CaCl<sub>2</sub> untersucht. Die Analyse erfolgte bei 40.000 rpm, 20°C und wurde bei 230 nm und 280 nm verfolgt. Die Daten wurden mittels der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software ausgewertet. Die Abhängigkeit des apparenten s-Wertes von der Proteinkonzentration wurde unter Annahme eines Monomer/Dimer-Gleichgewichts mittels nichtlinearer Regression [184] angepasst.

### 3.3.6 Erstellung des GCAP-2-Homodimer-Strukturmodells

Die Erstellung des Modells für das GCAP-2-Homodimer erfolgte durch PD Dr. Iris Thondorf (Institut für Biochemie/Biotechnologie der MLU Halle-Wittenberg). Die Struktur von monomerem GCAP-2 wurde mittels NMR-Spektroskopie gelöst und 22 verschiedene Modellstrukturen unter dem PDB-Eintrag 1JBA abgelegt [18]. Diese Modelle wurden mit Hilfe des ResProx-Server [185] evaluiert und eine Auflösung von 3,5 bis 5,2 Å im Vergleich zu Röntgenkristallstrukturen vorhergesagt. Von den Modellen mit der höchsten vorhergesagten Auflösung wurde das Modell 1 aus der Struktur 1JBA für die weiteren Untersuchungen verwendet. Mittels der im MOE (*molecular operating environment*)-Programm [186] implementierten Funktionen Protonate3D und LigX wurde das Modell verfeinert. Das betraf die Protonierung der Proteinseitenketten, die korrekte Anordnung der Asparagin-, Glutamin- und Histidin-Seitenketten. Eine Kraftfeld-Minimierung bis zu einem RMS-Gradient von 0,01 kcal/mol/Å schloss sich an. Mit einer Reihe verschiedener Protein-Protein-Docking Server (Hex [187], ClusPro [188], GRAMM-X [189], ZDOCK [190], SwarmDock [191], PatchDock

[192], HADDOCK [193]) wurden ausgehend von der verfeinerten Struktur GCAP-2-Homodimer-Modelle generiert. Hierzu wurden, falls möglich, Standardeinstellungen verwendet. Die so erhaltenen 93 Modelle wurden im Hinblick auf intermolekulare Lysin-C $\alpha$ -C $\alpha$ -Abstände gefiltert (oberer Grenzwert 25 Å). Es wurden nur Modelle in Betracht gezogen, bei denen die vernetzten Lysine auf der Oberfläche des Homodimers lagen. Modelle, bei denen die Lysine im Inneren der Struktur eingebettet waren, wurden aussortiert. Dabei wurden aus den 93 Modellen nur zwei ermittelt, die diese Kriterien erfüllten. Diese zwei Modelle (Ergebnisse der HADDOCK und PatchDock Server) wurden einer MD-Simulation mit dem AMBER12-Programm [194] unterzogen. Hierfür wurden Ca<sup>2+</sup>-Ionen manuell an die Position im Modell platziert, die denen im GCAP-2-Monomer entsprachen. Das Programm Leap wurde für die Implementierung des ff12SB-Kraftfelds und zur Solvatisierung des Systems mit einer stumpfoktaedrischen Box von TIP3P Molekülen verwendet. Zum System wurden 18 Na<sup>+</sup>-Ionen addiert, um eine Neutralisation zu erreichen. Die MD-Simulation selbst wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: (1) 5000 Minimierungsschritte, (2) Erwärmung des Systems von 100 auf 300 K in 10 ps unter Verwendung starker Rückgratbeschränkungen von 5,0 kcal/mol, (3) drei Äquilibrationläufe bei konstantem Druck von 1 bar und konstanter Temperatur von 300 K (NPT-Ensemble) für 100 ps unter Verwendung von Rückgratbeschränkungen von 2 kcal/mol, 0,5 kcal/mol bzw. 0,1 kcal/mol, (4) NPT-Äquilibration ohne Beschränkungen für 1,1 ns, (5) endgültige Simulation von 20 ns für das HADDOCK-Modell und von 74,8 ns für das PatchDock-Modell.

## 4 Ergebnisse

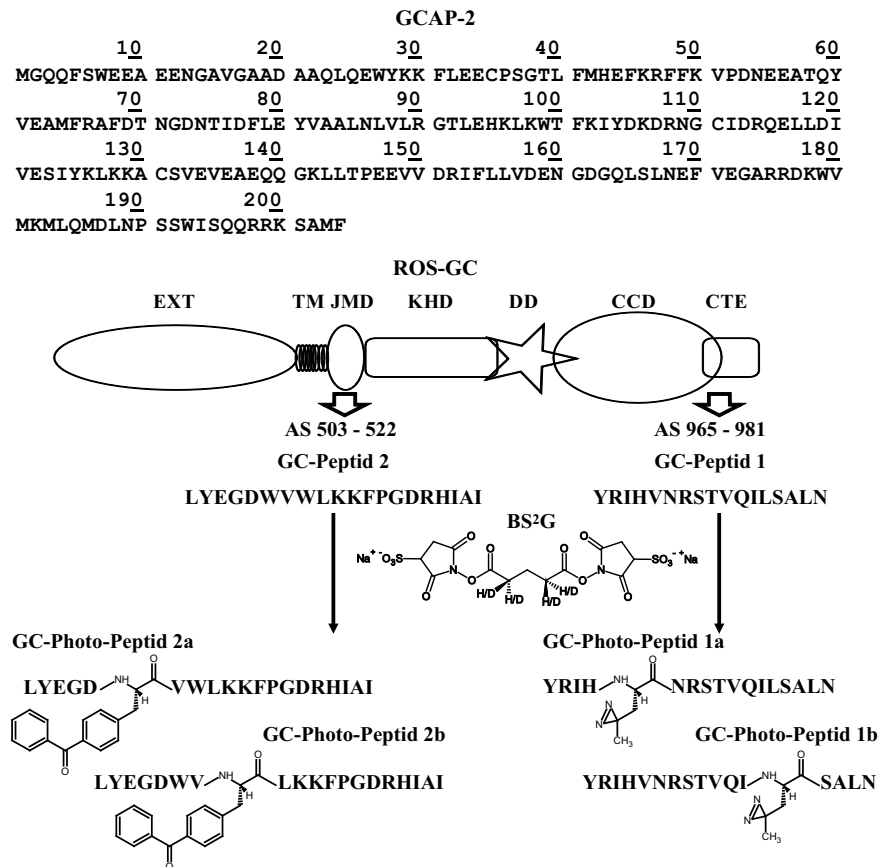
### 4.1 Quervernetzungsexperimente zwischen Peptiden der retinalen Guanylatcyclase (ROS-GC) und dem Guanylatcyclase-aktivierenden Protein-2 (GCAP-2)

Für ein tiefergehendes Verständnis der Interaktion zwischen dem myristoylierten GCAP-2 und seinem Bindungspartner der retinalen Guanylatcyclase (ROS-GC) sollte diese strukturell untersucht werden. Bisher existieren nur NMR-Strukturdaten für das nicht-myristoylierte GCAP-2-Monomer im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand (PDB-Eintrag 1JBA [18]) und keine strukturellen Daten des Komplexes aus GCAP-2 und ROS-GC 1.

In vorhergehenden biochemischen Untersuchungen zur GCAP/ROS-GC-Interaktion war eine potentielle Bindungsregion für die Bindung des GCAP-2 an der C-terminalen Erweiterung der katalytischen Domäne der ROS-GC identifiziert worden (*Abb. 4* und *Abb. 24*) [36]. Ein weiteres potentielles Bindungsmotiv aus der juxtamembranären Domäne wurde als GCAP-1-Bindungsmotiv postuliert [40], zur möglichen Interaktion mit GCAP-2 existieren allerdings bisher keine Daten. Diese, hier als GC-Peptid 1 und GC-Peptid 2 bezeichneten, Regionen der ROS-GC sollten für erste strukturelle Untersuchungen mit GCAP-2 genutzt werden. Dabei sollte die Bindung und somit die Interaktion des GC-Peptid 1 an GCAP-2 bestätigt und weiterhin eine mögliche Interaktion von GCAP-2 mit GC-Peptid 2 untersucht werden. Für eine strukturelle Charakterisierung des myristoylierten GCAP-2-Proteins im Komplex mit den potentiellen Bindungspeptiden der ROS-GC und der strukturellen Charakterisierung der Interaktionsflächen der Komplexe wurden zuerst Experimente mit dem aminreaktiven Quervernetzungsreagenz  $\text{BS}^2\text{G}$  in An- und Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt (*Abb. 24*). Als mögliche Reaktionsstellen im GC-Peptid 1 stehen der N-Terminus sowie die Hydroxygruppen des Tyr-1, Ser-8, Thr-9 und Ser-14 zur Verfügung. Aufgrund der Länge des  $\text{BS}^2\text{G}$ -Reagenzes von ca. 7,7 Å können weiter entfernte Interaktionsregionen im Komplex ermittelt werden. Zieht man die Länge der Aminosäureseitenketten und die Flexibilität des  $\text{BS}^2\text{G}$  sowie der Aminosäureseitenketten in Betracht können  $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ -Abstände von 19-25 Å überbrückt werden. Für eine strukturelle Charakterisierung räumlich näherer Interaktionsflächen im Komplex wurden jeweils zwei Varianten der Peptide mit den photoreaktiven Aminosäuren Photo-Leucin (GC Photo-Peptid 1a und b) und *p*-Benzoylphenylalanin (GC Photo-Peptid 2a und b) verwendet und die Komplexbildung mit GCAP-2 untersucht (*Abb. 24*). Die daraus gewonnenen



Erkenntnisse sollten zur Erstellung erster Strukturmodelle für die Interaktion zwischen GCAP-2 und dessen potentiellen Bindungsmotiven der ROS-GC dienen.



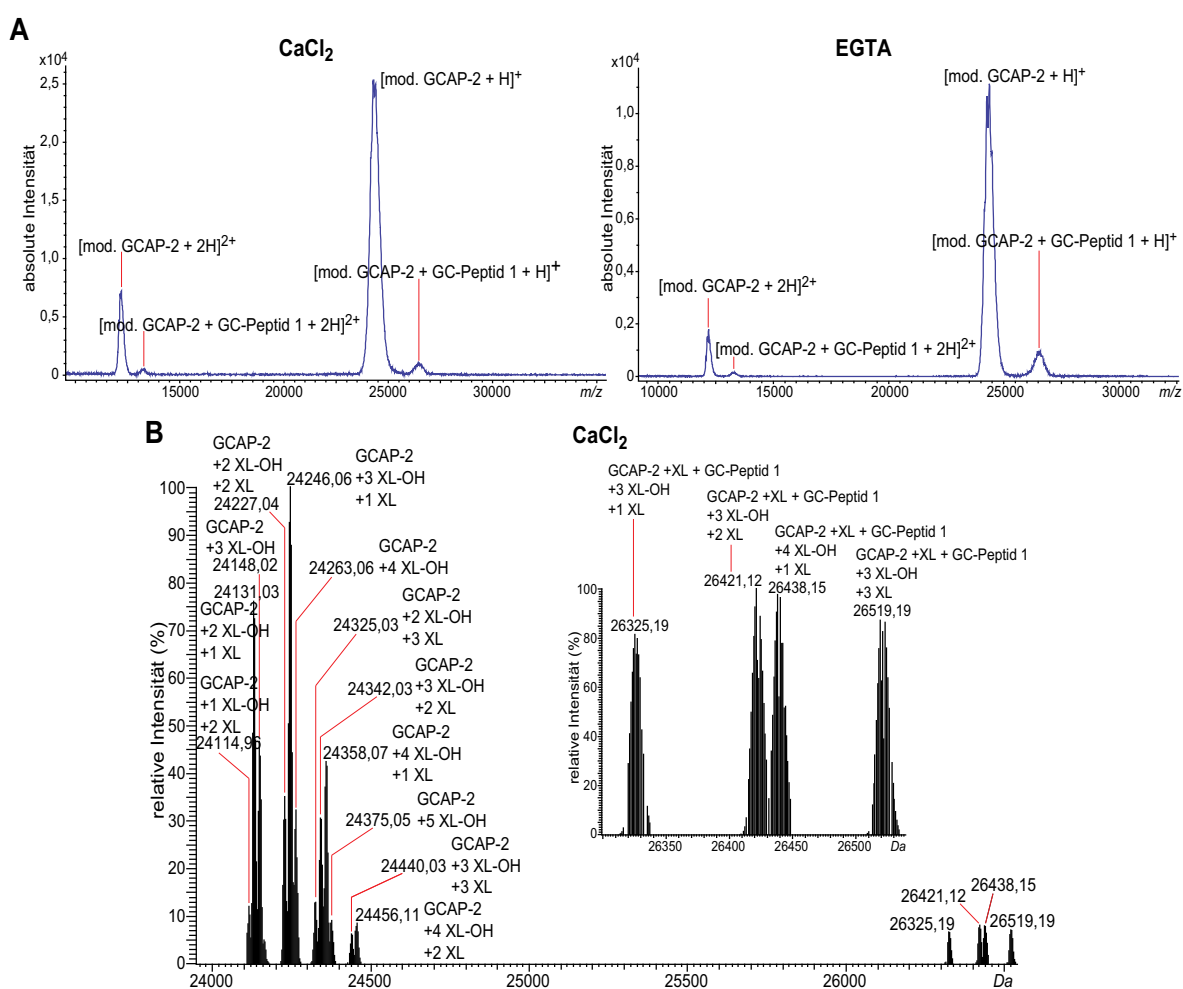
**Abb. 24** Aminosäuresequenz des GCAP-2 und den Bindungsmotiven der retinalen Guanylatcyclase (ROS-GC). GCAP-2 besteht aus 204 Aminosäuren, wobei das Start-Methionin abgespalten wird und Gly-2 posttranslational mit einer Myristinsäurekette modifiziert wird. Die verwendeten Peptide stammen aus der intrazellulären juxtamembranären Domäne (JMD) und der C-terminalen Extension (CTE) der katalytischen Domäne (CCD). ROS-GC: EXT: extrazelluläre Domäne; TM: Transmembranhelix; JMD: juxtamembranäre Domäne; KHD: Kinase-homologie-Domäne; DD: potentielle Dimerisierungsregion; CCD: katalytische Domäne; CTE: C-terminale Erweiterung; BS<sup>2</sup>G: Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat.

#### 4.1.1 Quervernetzungsexperimente zwischen dem GC-Peptid 1 und GCAP-2

##### 4.1.1.1 Quervernetzungsexperimente mit BS<sup>2</sup>G

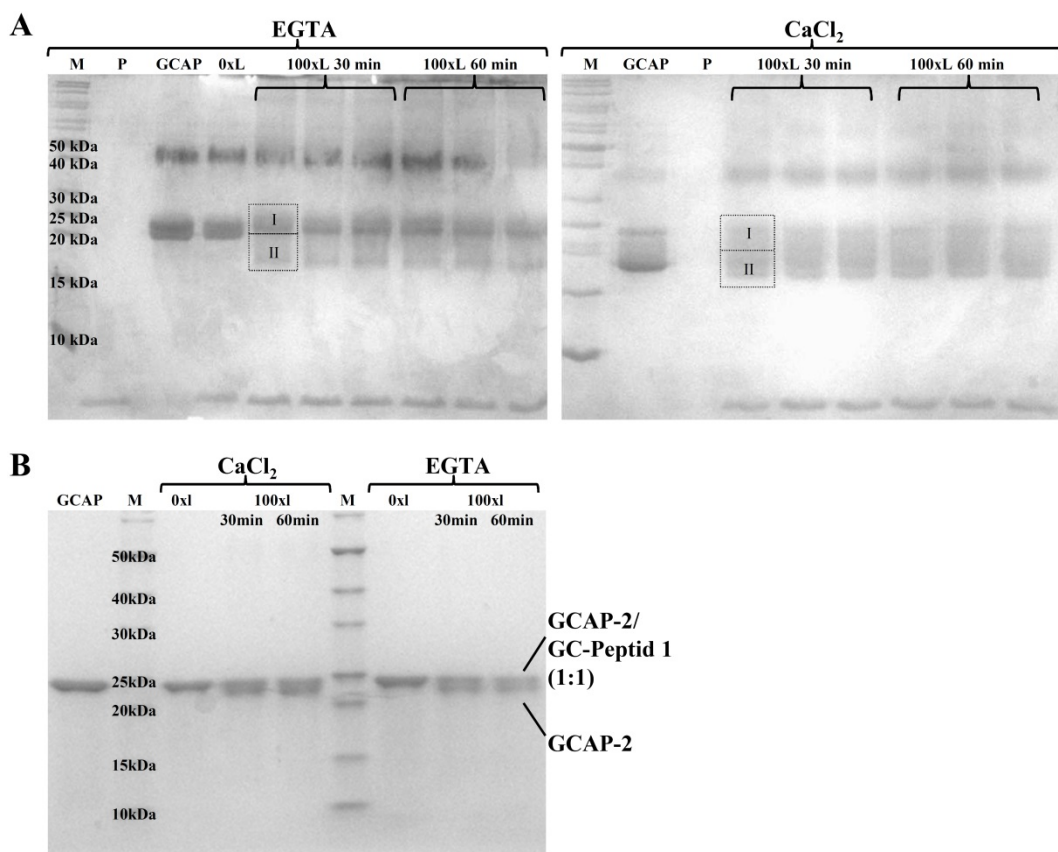
Die Interaktion zwischen dem Bindungsmotiv GC-Peptid 1 aus der C-terminalen Erweiterung der ROS-GC (AS 965-981) [36] und dem myristoylierten GCAP-2 wurde sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> untersucht (Abb. 24; Abb.-A 1). Hierfür wurde GCAP-2 in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> bzw. 10 mM EGTA mit dem Peptid inkubiert und beide Partner wurden durch Zugabe des homobifunktionellen aminreaktiven Reagenz BS<sup>2</sup>G quervernetzt. Um später die massenspektrometrische Identifizierung der Quervernetzungsprodukte zu erleichtern, wurde das Reagenz als 1:1-Gemisch in nicht-deuterierter und vierfach-deuterierter Form verwendet. Die Bildung des Komplexes sowie

dessen Stöchiometrie wurde anschließend massenspektrometrisch untersucht. Die Analyse beider Reaktionsansätze mittels MALDI-TOF-MS zeigt breite, hochabundante Signale des BS<sup>2</sup>G-modifizierten GCAP-2 sowie weniger intensive Signale des GCAP-2/GC-Peptid (1:1)-Komplexes der einfach und zweifach geladenen Ionen (Abb. 25 A). Mit Hilfe des hochauflösenden Orbitrap-Massenanalysators konnte die genaue Zusammensetzung der Modifikationen, sowohl des GCAP-2-Monomers als auch des GCAP-2/GC-Peptid 1-Heterodimers ermittelt werden (Abb. 25 B). Das GCAP-2-Monomer trug drei bis sechs Modifizierungen durch partiell hydrolysierte und/oder intramolekulare Quervernetzungen. Der GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplex wurde zusätzlich zur intermolekularen Quervernetzung vier- bis sechsfach modifiziert.



**Abb. 25 Massenspektrometrische Analyse des intakten Komplexes aus GCAP-2 und GC-Peptid 1 nach chemischer Quervernetzung mit BS<sup>2</sup>G.** (A) MALDI-TOF-MS der BS<sup>2</sup>G-Reaktionsansätze nach 30-minütiger Reaktionszeit mit 1 mM BS<sup>2</sup>G zwischen GCAP-2 (23807,3 u; 10 μM) und GC-Peptid 1 (1983,3 u; 30 μM) in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> (links) und 10 mM EGTA (rechts); mod.GCAP-2: GCAP-2 modifiziert mit intramolekular gebundenen und partiell hydrolysierten BS<sup>2</sup>G-Molekülen. (B) Dekonvolviertes Massenspektrum (Nano-ESI-MS; [M+H]<sup>+</sup>) eines Reaktionsansatzes mit 10 μM GCAP-2 (23807,3 u) und 100 μM GC-Peptid 1 (1983,3 u) nach 30 min Reaktionszeit mit 1 mM BS<sup>2</sup>G-D<sub>0</sub> und 1 mM CaCl<sub>2</sub>; XL: Modifizierung mit intra/intermolekular gebundenem BS<sup>2</sup>G-D<sub>0</sub> (+96 u); XL-OH: Modifizierung durch partiell hydrolysiertes BS<sup>2</sup>G-D<sub>0</sub> (+114 u).

Die Reaktionsansätze wurden nach Bestätigung der Komplexbildung mittels eindimensionaler Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert und mit einer nicht quervernetzten Probe verglichen (Abb. 26). Das freie GCAP-2 (23,8 kDa) wurde in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  im Bereich von 20 bis 25 kDa detektiert. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  zeigte sich auf Grund unterschiedlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -beladener Zustände des GCAP-2 eine veränderte elektrophoretische Mobilität. Nach erfolgter Quervernetzungsreaktion migrierten diese Banden auf Grund der Modifizierungen durch das  $\text{BS}^2\text{G}$ -Reagenz im Vergleich zu den unmodifizierten Proteinbanden breiter und diffuser. Durch die unzureichende Auftrennung in 15 %-ige SDS-Polyacrylamid-Gelen, konnte keine getrennte Protein/Peptid-Komplexbande detektiert werden (Abb. 26 A). Die Reaktionsansätze wurden deshalb entsalzt und erneut mittels eines Gradientengels analysiert. In beiden Reaktionsansätzen (1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10 mM EGTA) konnten auf diese Weise zwei Spezies in Form getrennter Banden für GCAP-2 und den 1:1 (GCAP-2/GC-Peptid 1)-Komplex im Bereich von ca. 25 kDa detektiert werden (Abb. 26 B).



**Abb. 26 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der GCAP-2/GC-Peptid 1-Quervernetzungsansätze mit  $\text{BS}^2\text{G}$  ( $10 \mu\text{M}$  GCAP-2/ $30 \mu\text{M}$  GC-Peptid 1, 30 min bzw. 60 min Reaktionszeit, 1 mM  $\text{BS}^2\text{G}$ ;  $20 \mu\text{l}$  pro Bande). (A) 15 %-ige SDS-Polyacrylamidgele zur Trennung der Reaktionsansätze mit 10 mM EGTA (links) bzw. 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (rechts). (B) 4-20 %-iges SDS-Polyacrylamidgel der Reaktionsansätze nach Pufferwechsel zu EGTA. I und II: ausgeschnittene Gelbanden; M: Molekulargewichtsmarker; GCAP: GCAP-2, Kontrolle; P: GC-Peptid 1, Kontrolle; 0xL: Reaktionsansatz ohne  $\text{BS}^2\text{G}$ ; 100xL: Reaktionsansatz mit 1 mM  $\text{BS}^2\text{G}$**

Nach Bestätigung der Bildung des 1:1-Komplexes zwischen GCAP-2 und GC-Peptid 1 erfolgte die Identifizierung der exakten Verknüpfungspunkte auf Peptidebene. Hierfür wurden die diffusen Gelbanden der quervernetzten Proben in zwei Teilen ausgeschnitten (*Abb. 26 A*, Bereiche I und II). Die Proteine wurden mit einer Kombination aus GluC und Trypsin im Gel gespalten (Kapitel 3.2.4.1). Anschließend wurden die Peptidgemische mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS analysiert (Kapitel 3.2.5.3). In allen ausgeschnittenen Banden wurde GCAP-2 nachgewiesen. Das GC-Peptid 1 wurde im Gelbandenbereich I sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  identifiziert. Für die EGTA-enthaltenden Proben wurde es auch im Bereich der Bande II detektiert (*Abb. 26 A* und *Tabelle-A 1*). Dies bestätigte die Bildung des Komplexes unter beiden Reaktionsbedingungen. Die Identifizierung des GC-Peptids auch im unteren Bereich (II) der Gelbande ist vermutlich durch die unzureichende gelelektrophoretische Auftrennung zu erklären.

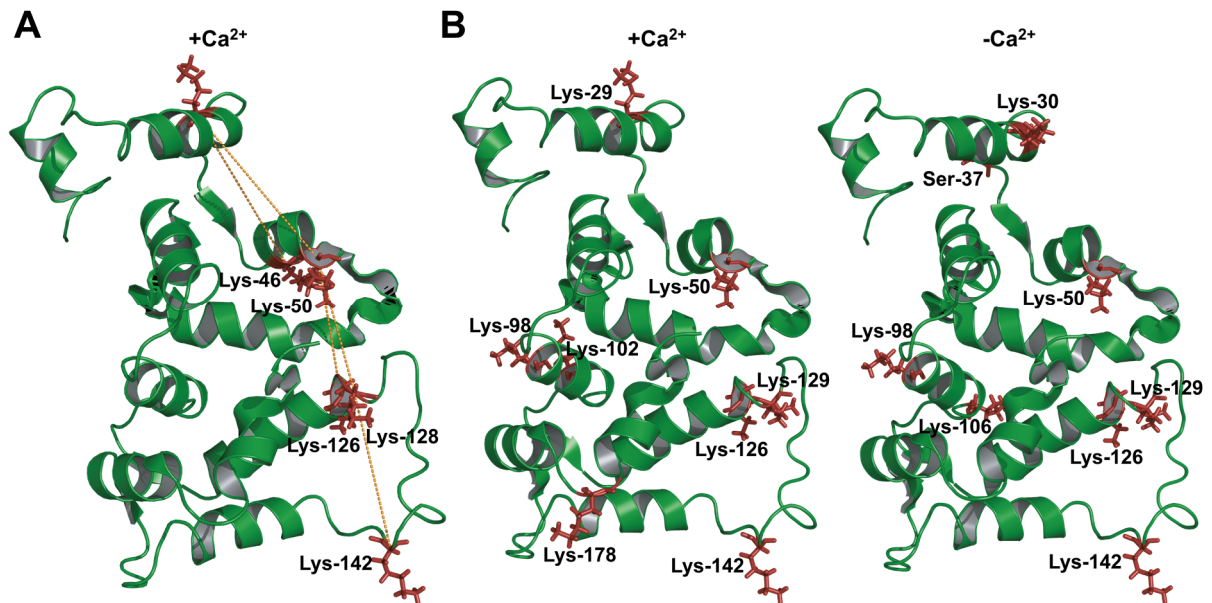
Im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand des GCAP-2/GCAP-Peptid-Komplexes wurden mehrere intramolekulare Quervernetzungen innerhalb des myristoylierten GCAP-2-Proteins identifiziert, die mit der publizierten NMR-Struktur des nicht-myristoylierten GCAP-2 im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand (PDB-Eintrag 1JBA [18]) in Einklang stehen (*Abb. 27 A*; *Tabelle-A 2*). Das spricht für eine vergleichbare Struktur des myristoylierten GCAP-2, auch im Komplex mit dem GC-Peptid. Weitere zehn intramolekulare Vernetzungen zwischen dem C-terminal lokalisierten Lys-200 und den Lysininen an den Positionen 29, 30, 46, 50, 96, 126, 128, 129, 142 und 178 deuten auf eine hohe Flexibilität des C-terminalen Bereichs von GCAP-2 hin. Dieser Bereich (AS 191 bis 204) ist in der bekannten NMR-Struktur nicht aufgelöst. Im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand wurden lediglich drei äquivalente Quervernetzungen zwischen dem in der NMR-Struktur nicht aufgelösten Lys-200 und den Lysininen an Positionen 46 und 50 einerseits, sowie zwischen Lys-29 und Lys-46 identifiziert (*Tabelle-A 2*). Das könnte auf eine veränderte Flexibilität bzw. eine veränderte Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2 hindeuten.

Zusätzlich wurde in GCAP-2 eine große Anzahl von Lysininen mit partiell hydrolysierten  $\text{BS}^2\text{G}$ -Molekülen modifiziert (*Tabelle-A 3*). Diese Produkte weisen auf die Lösungsmittelzugänglichkeit exponierter Lysinseitenketten hin. Ein Unterschied zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen Zustand des GCAP-2 wurde nicht festgestellt.

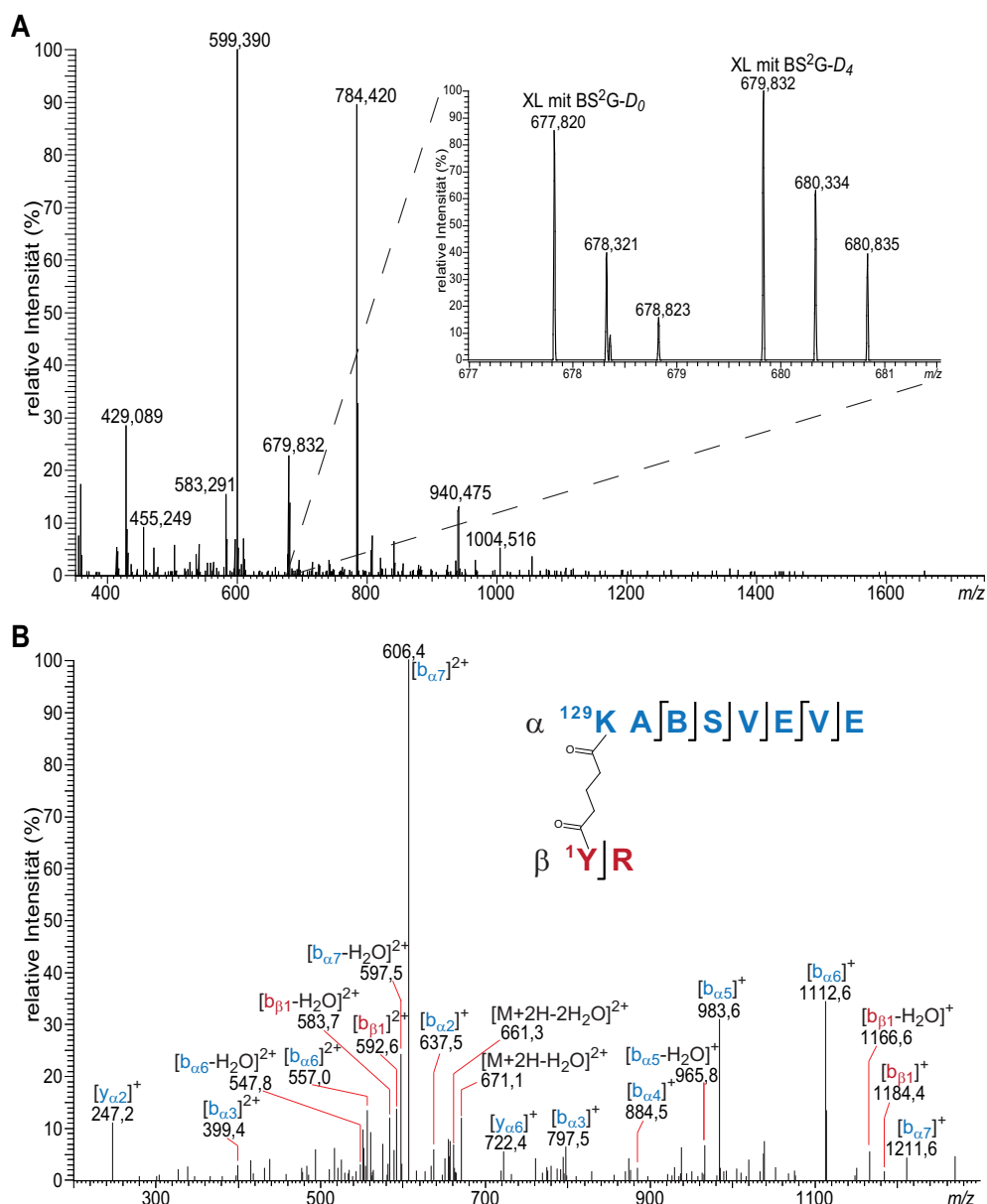
Im Komplex aus GCAP-2/GCAP-Peptid 1 wurden sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  sechs übereinstimmende intermolekulare Quervernetzungen identifiziert (*Abb. 27*; *Tabelle-A 4*). Die Vernetzung erfolgte jeweils zwischen dem N-terminalen Tyr-1 des GC-Peptids 1 und verschiedenen Lysininen des GCAP-2. Ein repräsentatives Vorläuferionenmassenspektrum und Fragmentionenmassenspektrum eines solchen

Quervernetzungsprodukts werden in *Abb. 28* gezeigt. Die Identifizierung der Quervernetzung zwischen Lys-129 des GCAP-2 und Tyr-1 des GC-Peptids 1 erfolgte zunächst anhand des Isotopenmusters der doppelt geladenen Ionen bei  $m/z$  677,820 und  $m/z$  679,832 mit einer Massendifferenz von 2 Th (entsprechend 4 u) im Vorläuferionenmassenspektrum (*Abb. 28 A*). Die exakte Lokalisierung der Quervernetzung wurde anhand der Zuordnung der zugehörigen Fragmentationen im Fragmentionenmassenspektrum bestimmt (*Abb. 28 B*).

Drei intermolekulare Vernetzungen zwischen Tyr-1 des GC-Peptid 1 und den Lysin 29, 102 und 178 des GCAP-2, wurden im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand identifiziert (*Abb. 27 B*). Spezifisch für den  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand waren dagegen intermolekulare Vernetzungen zwischen Tyr-1 des GC-Peptids 1 und Lys-106, Lys-30 und Ser-37 des GCAP-2. Eindeutige Unterschiede zwischen den Strukturen der  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Komplexe ergaben sich aus diesen Ergebnissen jedoch nicht (*Abb. 27 B*).



**Abb. 27** Vergleich der NMR-Struktur des nicht-myristoylierten GCAP-2 im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand (PDB-Eintrag: 1JBA [18]) mit den identifizierten Quervernetzungen. **A:** Mit BS<sup>2</sup>G intramolekular quervernetzte Lysine im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand sind mit orangenen Linien (Ca-Ca-Distanzen) verbunden und als rote Stäbchen hervorgehoben (Ca-Ca-Distanzen: Lys<sup>29</sup> – Lys<sup>46</sup>: 19,68 Å; Lys<sup>29</sup> – Lys<sup>50</sup>: 20,50 Å; Lys<sup>50</sup> – Lys<sup>126</sup>: 16,05 Å; Lys<sup>50</sup> – Lys<sup>128</sup>: 15,10 Å; Lys<sup>128</sup> – Lys<sup>142</sup>: 17,08 Å); **B:** Mit Tyr-1 des GC-Peptids 1 quervernetzte Lysine sind als rote Stäbchen hervorgehoben; links: in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; rechts: in Gegenwart von 10 mM EGTA.



**Abb. 28** Massenspektrometrische Identifizierung eines BS<sup>2</sup>G-Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-129 des GCAP-2 und Tyr-1 des GC-Peptids 1 (Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS). 10 μM GCAP-2 und 30 μM GC-Peptid 1 wurden mit 1 mM BS<sup>2</sup>G in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> für 60 min quervernetzt, gelelektrophoretisch getrennt und nach proteolytischer Spaltung massenspektrometrisch analysiert. (A) Übersichtsmassenspektrum bei einer Elutionszeit von 51,8 min: Der Ausschnitt des Massenspektrums zeigt das charakteristische D<sub>0</sub>/D<sub>4</sub>-Isotopenmuster des identifizierten Quervernetzungsprodukts als doppelt geladene Spezies. (B) Fragmentationenspektrum nach CID-Fragmentierung des doppelt geladenen Vorläuferions bei m/z 679,832. Fragmentionen des α-Peptids sind in blau dargestellt und Fragmentionen des β-Peptids in rot. B: carbamidomethyliertes Cystein. Die Nomenklatur orientiert sich an [143].

Aus den Ergebnissen der BS<sup>2</sup>G-Experimente lassen sich näherungsweise Rückschlüsse auf die Lage des N-terminalen Bereichs des GC-Peptids 1 ziehen. Eine eindeutige Unterscheidung beider Komplexe (mit/ohne Ca<sup>2+</sup>) ist allerdings nicht möglich. Weiterhin lässt sich auf eine ähnliche Konformation des Ca<sup>2+</sup>-gebundenen myristoylierten GCAP-2 im Komplex mit dem GC-Peptid 1 im Vergleich zum unmyristoylierten GCAP-2-Monomer schließen. Eine geänderte Struktur des Ca<sup>2+</sup>-freien GCAP-2 im Komplex wird vermutet, lässt sich jedoch nicht

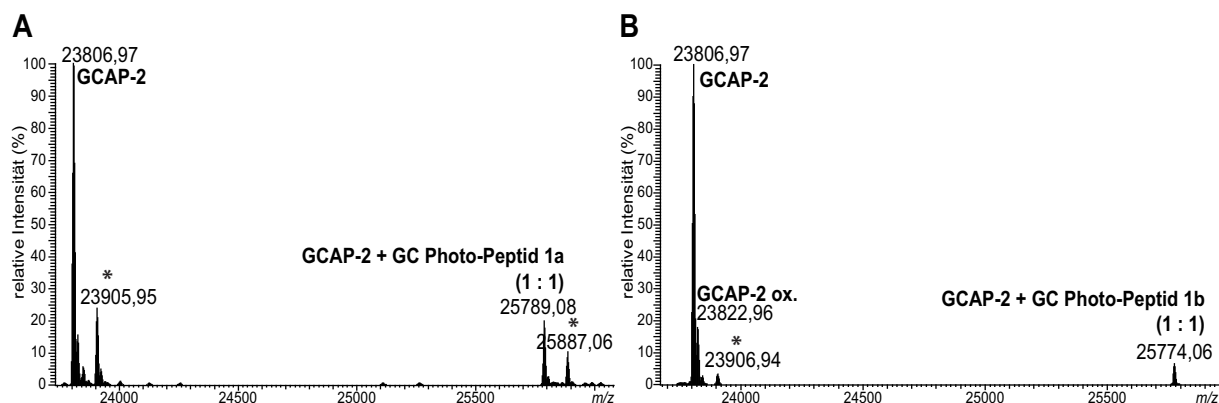
eindeutig bestätigen. Weiterhin wurde durch die Daten eine ausgesprochen hohe Flexibilität des C-terminalen Bereichs des GCAP-2 gezeigt. Für eine genauere strukturelle Charakterisierung der Komplexe waren deshalb weitere Experimente erforderlich.

#### **4.1.1.2 Quervernetzungsexperimente zwischen den Photo-Leucin-markierten GC-Photo-Peptiden 1a und 1b und GCAP-2**

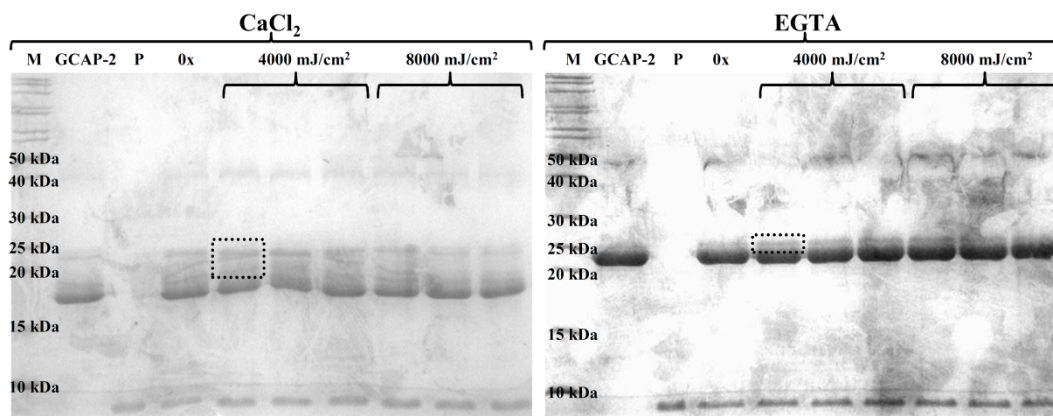
Eine genaue Charakterisierung des Komplexes zwischen GCAP-2 und dem GC-Peptid 1 sowie der Unterschiede zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem und -freien Zustand waren allein anhand der Ergebnisse der BS<sup>2</sup>G-Experimente nicht möglich. Deshalb wurden weitere Experimente mit zwei GC-Peptid 1-Varianten durchgeführt, bei denen entweder Val-5 (GC-Photo-Peptid 1a; *Abb. 24*) oder Leu-13 (GC-Photo-Peptid 1b; *Abb. 24*) gegen die photoreaktive Aminosäure Photo-Leucin ausgetauscht wurde. Dies ermöglichte die Identifizierung potentieller Kontaktstellen zwischen GCAP-2 und zwei definierten Resten innerhalb des GC-Peptides 1. Wegen des im Vergleich zu BS<sup>2</sup>G kürzeren überbrückbaren Abstandes und der möglichen Reaktion mit vielen verschiedenen Aminosäureseitenketten konnten mit diesen modifizierten Peptiden direkte Kontakte im Komplex mit GCAP-2 ermittelt werden.

Nach erfolgter Photoreaktion (Kapitel 3.2.2.3) wurde die Komplexbildung massenspektrometrisch untersucht. Die Analyse der Reaktionsgemische bestätigte die Komplexbildung beider GC-Photo-Peptide mit GCAP-2 (repräsentativ sind die Ansätze ohne  $\text{Ca}^{2+}$  in *Abb. 29* dargestellt).

Die Reaktionsansätze wurden nach Bestätigung der Komplexbildung ebenfalls mittels eindimensionaler Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand konnte für keine der beiden Photo-Peptid-Varianten eine getrennte Protein/Peptid-Komplexbande detektiert werden (*Abb. 30*, links GC Photo-Peptid 1a). Nach Trennung des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Reaktionsgemisches war sowohl für das GC-Photo-Peptid 1a (*Abb. 30*, rechts) als auch das GC-Photo-Peptid 1b eine schwache Bande bei 25 kDa für einen GCAP-2/GC-Peptid (1:1)-Komplex erkennbar. Die schwache Bande im Bereich des Komplexes vor der Bestrahlung ist durch eine Reaktion aufgrund von Umgebungslicht zu erklären.



**Abb. 29 Massenspektrometrische Analyse der intakten Komplexe zwischen GCAP-2 und den GC-Photo-Peptiden 1a und b (NanoESI-LTQ-Orbitrap-MS).** A: Dekonvolutiertes Massenspektrum ( $[M+H]^+$ ) des Reaktionsansatzes mit  $10 \mu\text{M}$  GCAP-2 ( $23807,3 \text{ u}$ ) und  $100 \mu\text{M}$  GC-Photo-Peptid 1a ( $2009,3 \text{ u}$ ) nach Bestrahlung mit  $4000 \text{ mJ/cm}^2$ , in Gegenwart von  $10 \text{ mM}$  EGTA. B: Dekonvolutiertes Massenspektrum ( $[M+H]^+$ ) des Reaktionsansatzes mit  $10 \mu\text{M}$  GCAP-2 ( $23807,3 \text{ u}$ ) und  $100 \mu\text{M}$  GC-Photo-Peptid 1b ( $1995,3 \text{ u}$ ) nach Bestrahlung mit  $4000 \text{ mJ/cm}^2$ , in Gegenwart von  $10 \text{ mM}$  EGTA. \* Der Stern zeigt ein mögliche Phosphorsäureaddukte des GCAP-2 bzw. GCAP-2/GCAP-Photo-Peptid 1-Komplexes.



**Abb. 30 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1a.** Die Trennung der Reaktionsgemische ( $10 \mu\text{M}$  GCAP-2/GCAP-Photo-Peptid 1a, Bestrahlung bei  $4000$  und  $8000 \text{ mJ/cm}^2$ ;  $20 \mu\text{l}$  pro Bande) erfolgte mit  $15\%$ -igen SDS-Polyacrylamidgelen nach Reaktion in Gegenwart von  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  (links) bzw.  $10 \text{ mM}$  EGTA (rechts). Die gestrichelten Rechtecke markieren die ausgeschnittenen Gelbereiche. M: Molekulargewichtsmarker; GCAP-2: GCAP-2, Kontrolle; P: GC-Photo-Peptid 1a, Kontrolle; 0x: Reaktionsansatz vor Bestrahlung.

Zur Ermittlung der genauen Kontaktstellen wurden die Banden der GCAP-2/GCAP-Photo-Peptid-Komplexe ausgeschnitten und proteolytisch gespalten. Nach LC/MS-Analyse der erhaltenen Peptidgemische konnte die Anwesenheit des jeweiligen Photo-Peptids in den Gelbanden bestätigt werden (Tabelle-A 1).

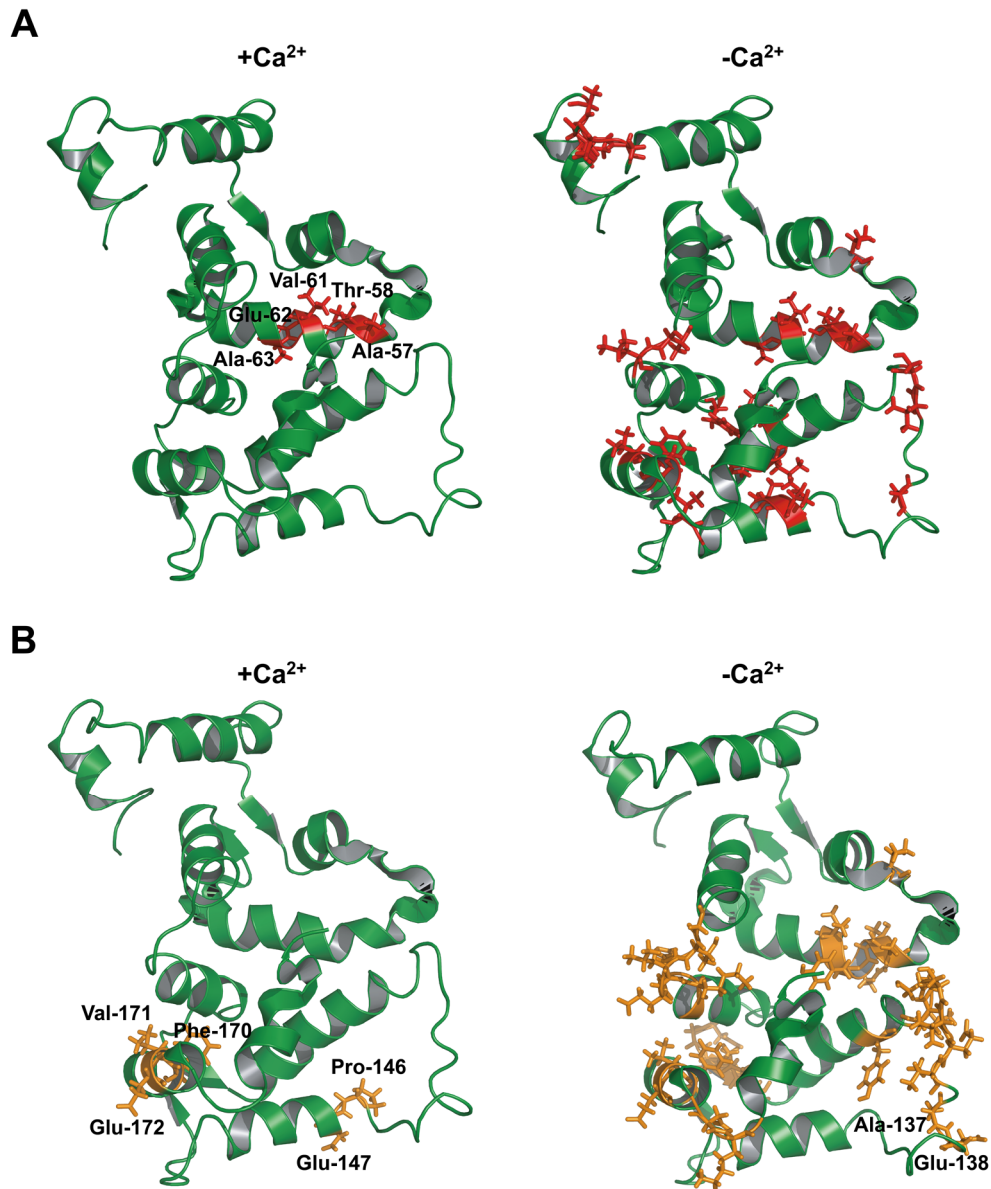
In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  wurden insgesamt fünf verschiedene intermolekulare Quervernetzungen identifiziert: zwei zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1a und drei zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1b (Abb. 31 A; Tabelle-A 5 und Tabelle-A 6). Das Photo-Leu-5 des GC-Photo-Peptids 1a wurde entweder mit Val-61, Glu-62 oder Ala-63 vernetzt, welche sich innerhalb der  $\alpha$ -Helix am Anfang des EF-Handmotivs 2 befinden (Abb. 31 A; linke Struktur). Eine genauere Eingrenzung der Reaktionsstelle war nicht



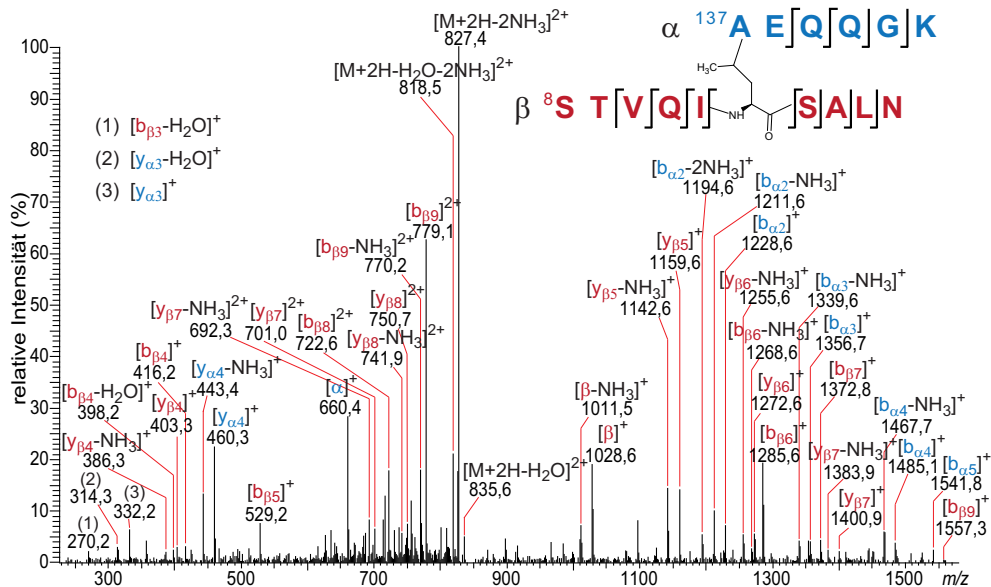
zweifelsfrei möglich, der Großteil der zugeordneten Fragmentationen deutete aber auf Val-61 hin. Als zweiter Kontakt des Photo-Leu-5 des GC-Photo-Peptids 1a wurde Ala-57 oder Thr-58 identifiziert. Beide befinden sich in unmittelbarer Nähe auf der gleichen  $\alpha$ -Helix des EF-Handmotivs (*Abb. 31 A*; linke Struktur). Die Qualität der entsprechenden Spektren ließ jedoch keine zweifelsfreie Identifizierung des Produktes zu, so dass dieser Vernetzungspunkt nicht für die spätere Erstellung des Modells verwendet wurde.

Das GC-Photo-Peptid 1b, bei dem Leu-13 gegen Photo-Leucin ausgetauscht wurde, wurde mit dem C-terminalen Phe-204, den Aminosäuren Phe-170 – Glu-172 innerhalb der zweiten Helix des vierten EF-Handmotivs sowie mit den Aminosäuren Pro-146 und Glu-147 am Beginn des vierten EF-Handmotivs vernetzt (*Abb. 31 B*; linke Struktur). Diese Reste sind in der 3D-Struktur des freien GCAP-2 (PDB 1JBA [18]) weit voneinander entfernt, was auf eine größere Konformationsänderung des GCAP-2 hinweist. Rückschlüsse über eine Konformationsänderung der C-terminalen Region lassen sich hieraus allerdings nicht ziehen, da die 14 C-terminalen Aminosäuren innerhalb der GCAP-2 NMR-Struktur nicht aufgelöst sind. Die Vernetzung zwischen Photo-Leu-13 mit Phe-204 konnte deshalb auch nicht in das Strukturmodell einbezogen werden. Die übrigen identifizierten Kontaktstellen innerhalb des aufgelösten Bereichs des GCAP-2 wurden für die Erstellung eines Modells des  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen Komplexes aus GCAP-2 und GC-Peptid 1 verwendet.

Nach Quervernetzungsreaktion in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  wurde ein zweifach geladenes Signal bei  $m/z$  844,453 als quervernetztes Produkt aus Photo-Leu-13 des GC-Photo-Peptids 1b und Ala-137 bzw. Glu-138 des GCAP-2 identifiziert (*Abb. 32*). Diese Reste befinden sich in der *Loop*-Region zwischen dem dritten und vierten EF-Handmotiv des GCAP-2 (*Abb. 31 B*; rechte Struktur). Insgesamt wurde im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand eine Vielzahl quervernetzter Produkte zwischen beiden GC-Photo-Peptiden 1a und b und verschiedensten Aminosäuren des GCAP-2 identifiziert (*Tabelle-A 5* und *Tabelle-A 6*). Im Gegensatz zum  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen Komplex sind diese Bindungsstellen über die gesamte GCAP-2 Struktur verteilt und können keiner spezifischen Bindung zugeordnet werden (*Abb. 31*). Mögliche Erklärungen dafür sind eine extrem flexible Konformation des Komplexes im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand, eine starke strukturelle Änderung der GCAP-2-Struktur oder eine unspezifische Bindung des Peptids an das  $\text{Ca}^{2+}$ -freie GCAP-2. Dadurch bedingt und wegen der fehlenden Informationen über die 3D-Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2, konnten diese Daten nicht zur Erstellung eines Modells genutzt werden.



**Abb. 31** NMR-Struktur des nicht-myristoylierten GCAP-2 im Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Zustand (PDB-Eintrag 1JBA [18]). **A:** Mit GC-Photo-Peptid 1a quervernetzte Aminosäuren des GCAP-2 sind als rote Stäbchen hervorgehoben. **B:** Mit GC Photo-Peptid 1b quervernetzte Aminosäuren des GCAP-2 sind als orangene Stäbchen hervorgehoben. +Ca<sup>2+</sup>: Ergebnisse des Ca<sup>2+</sup>-beladenen Komplex (1 mM CaCl<sub>2</sub>); -Ca<sup>2+</sup>: Ergebnisse des Ca<sup>2+</sup>-freien Komplex (10 mM EGTA).



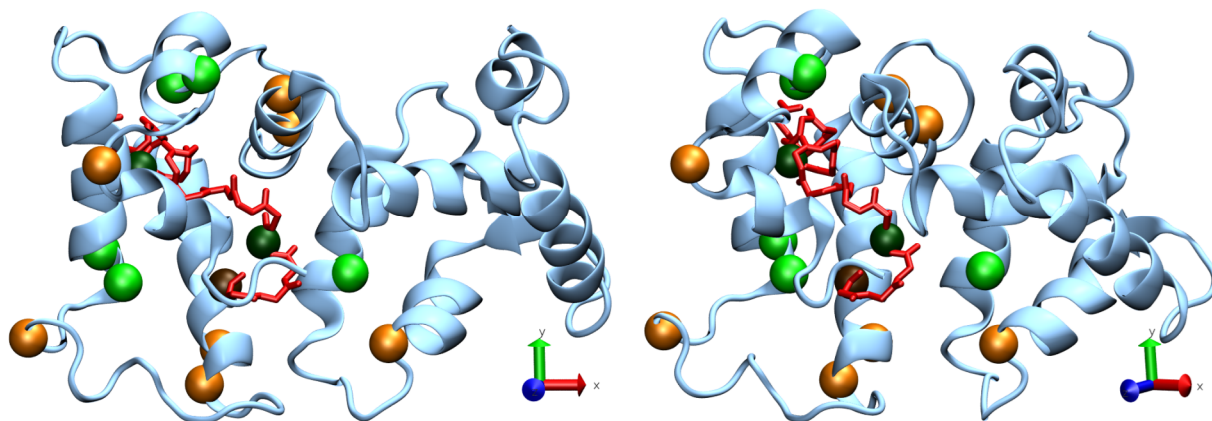
**Abb. 32** CID-Fragmentationenspektrum eines Quervernetzungsprodukts zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1b. Das Quervernetzungsprodukt zwischen Ala-137 oder Glu-138 des GCAP-2 und Photo-Leu-13 des GC-Photo-Peptids 1b wurde nach Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS-Analyse eines Reaktionsansatzes (4000 mJ/cm<sup>2</sup>; 10 mM EGTA; Retentionszeit 39,8 min) in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> nach CID-Fragmentierung eines zweifach geladenen Vorläuferions bei m/z 844,453 identifiziert. Fragmente des GCAP-2 Peptids sind in blau dargestellt und die Fragmente des GC-Photo-Peptid 1b in rot.  $\alpha$ -Peptid: GCAP-2-Peptid;  $\beta$ -Peptid: GC-Photo-Peptid 2a.

#### 4.1.1.3 Struktur des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes

Die Erstellung eines Strukturmodells des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes (Kapitel 3.3.2) im Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Zustand erfolgte durch Herrn Dipl.-Biochem. Björn Olausson. Hierfür fehlten jedoch noch Informationen über die Konformation des GC-Peptids 1. Erste Informationen zur Sekundärstruktur des Peptids wurden durch Vorhersagen mittels PSIPRED (v3.3, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) und BHAGEERATH ([www.scfbio-iitd.res.in/bhageerath/index.jsp](http://www.scfbio-iitd.res.in/bhageerath/index.jsp)) gewonnen. Beide Vorhersagen stimmten hinsichtlich einer partiell  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur (C-terminale Hälfte) des Peptids überein (Abb.-A 2). Diese theoretischen Erkenntnisse konnten mittels CD (Circulardichroismus)-spektroskopischer Analysen (Kapitel 3.3.1) durch Herrn Dr. Knut Kölbl bestätigt werden. Während die Fern-UV-CD-Spektren des Peptids in wässriger Lösung sogenannte *random-coil*-Charakteristika aufwiesen, zeigten sich in Anwesenheit steigender TFE-Konzentrationen die für  $\alpha$ -helikale Strukturen typischen Signale bei 190 nm, 208 nm und 222 nm. Anhand der Amplituden nach Sättigung des Signals konnte in Übereinstimmung mit den theoretischen Vorhersagen ein  $\alpha$ -helikaler Anteil von ca. 50 % abgeschätzt werden (Abb.-A 3).

Zur Erstellung des Modells wurden die mittels BS<sup>2</sup>G ermittelten Distanzbeschränkungen zwischen dem N-Terminus des GC-Peptid 1 und den Lysinen 50, 98, 102, 126, 129, 142 und 178 verwendet und eine maximale C $\alpha$ -C $\alpha$ -Distanz von 19 Å angenommen. Für die Reaktion

mit dem Photo-Leucin in Position 5 (Val-5) wurde als wahrscheinlichste Bindungsstelle Val-61 des GCAP-2 gewählt. Als Kontaktstellen für Photo-Leu-13 (Leu-13) dienten Pro-146, Glu-147, Phe-170 und Val-171 des GCAP-2. Als maximale C $\alpha$ -C $\alpha$ -Distanz für die Vernetzung mit Photo-Leucin wurden 9 Å angenommen. Zur Erstellung des Modells wurde zunächst eine MD-Simulation durchgeführt, während der für die ersten 10 ns eine zusätzliche Energie für die Einhaltung der angegebenen Distanzbeschränkungen angewendet wurde. Anschließend wurde diese Energie entfernt und die Struktur für weitere 20 ns verfolgt, um die relaxierte Struktur zu ermitteln. Diese sollte der natürlichen Struktur des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes am ähnlichsten sein. Dabei wurden die festgelegten Distanzbeschränkungen zu Glu-147, Phe-170 und Val-171 überschritten. Diese Verletzungen der Distanzbeschränkung konnten jedoch vernachlässigt werden, wenn man die in diesen Bereichen der GCAP-2-Struktur inhärenten Fluktuationen akzeptiert. Bei den übrigen Vernetzungen wurden die Distanzbeschränkungen eingehalten (Tabelle-A 7). Die anhand der vorgegebenen Beschränkungen wahrscheinlichste Struktur wird in Abb. 33 gezeigt. Die vorhergesagte partiell  $\alpha$ -helikale Struktur des GC-Peptids 1 ist nach der Simulation auch im Komplex zu erkennen. Dieses Modell stellt den ersten Strukturvorschlag für den Komplex zwischen GCAP-2 und dem Bindungsmotiv aus der retinalen Guanylatcyclase dar.



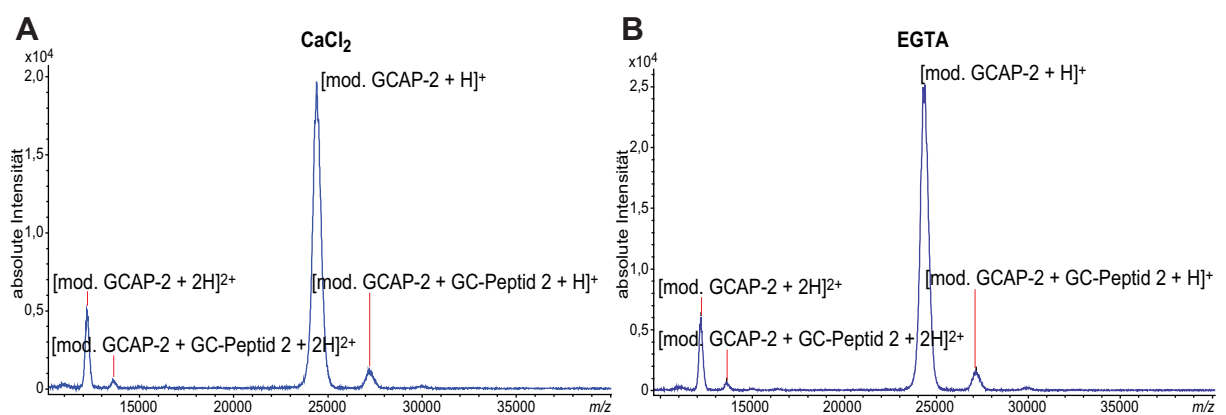
**Abb. 33 Strukturmodell des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes im Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Zustand.** Das Rückgrat des GC-Peptids 1 ist in rot dargestellt. Die für die Erstellung des Modells verwendeten Kontaktstellen nach Reaktion mit BS<sup>2</sup>G sind als orangene Kugeln dargestellt. Die verwendeten Vernetzungen mit den GC-Photo-Peptiden sind als hellgrüne Kugeln hervorgehoben. Die braune Kugel am Rückgrat des GC-Peptids 1 stellt das vernetzte Tyrosin 1 dar und die dunkelgrünen Kugeln jeweils das Photo-Leucin an Positionen 5 und 13.

#### 4.1.2 Quervernetzungsexperimente zwischen dem GC-Peptid 2 und GCAP-2

Das GC-Peptid 2 repräsentiert einen Abschnitt aus der juxtamembranären Domäne der ROS-GC (AS 503-522; Abb.-A 1), für den eine GCAP-1-Bindung postuliert wurde [40].

Um eine vermutete Interaktion mit GCAP-2 zu bestätigen, wurde die Bildung des Komplexes aus GCAP-2 und GC-Peptid 2 in An- und Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> untersucht.

Zuerst wurde die Interaktion ebenfalls mit dem homobifunktionellen Reagenz BS<sup>2</sup>G analysiert. Die nach der Reaktion erhaltenen Proben wurden vor der proteolytischen Spaltung massenspektrometrisch analysiert. Vergleichbar mit den Ergebnissen des GC-Peptid 1, wurden sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> abundante Signale des mit mehreren BS<sup>2</sup>G-Molekülen modifizierten GCAP-2 und weniger abundante Signale des 1:1-Komplexes aus GCAP-2 und GC-Peptid 2 identifiziert (Abb. 34). Nach erfolgter proteolytischer *In-Gel*-Spaltung mittels GluC und Trypsin wurde das GC-Peptid in den potentiellen Komplexbanden massenspektrometrisch nachgewiesen, was die Bildung des Komplexes bestätigte. Allerdings konnten, auch nach intensiver Analyse der generierten Daten, weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>, quervernetzte Produkte zwischen GCAP-2 und dem GC-Peptid 2 identifiziert werden. Deshalb wurden, analog zu den vorherigen Experimenten, zwei Varianten des Peptids verwendet, in denen entweder Trp-6 (GC-Photo-Peptid 2a) oder Trp-8 (GC-Photo-Peptid 2b) gegen die photoreaktive Aminosäure *p*-Benzoylphenylalanin (Bpa) ausgetauscht wurde (Abb. 24; Abb.-A 1). Bei der anschließenden gelelektrophoretischen Trennung der in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> bestrahlten Proben wurde mit beiden Peptidvarianten eine schwache Bande auf Höhe des Protein-Peptid-Komplexes detektiert (analog Abb. 30). In Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> war auf Grund des veränderten Laufverhaltens des GCAP-2 im Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Zustand keine separate Komplexbande zu erkennen. Jedoch konnte das jeweilige GC-Photo-Peptid nach proteolytischer Spaltung für beide Reaktionsbedingungen massenspektrometrisch nachgewiesen werden, so dass die Bildung des Komplexes aus GCAP-2 und den Photo-Peptiden bestätigt wurde.



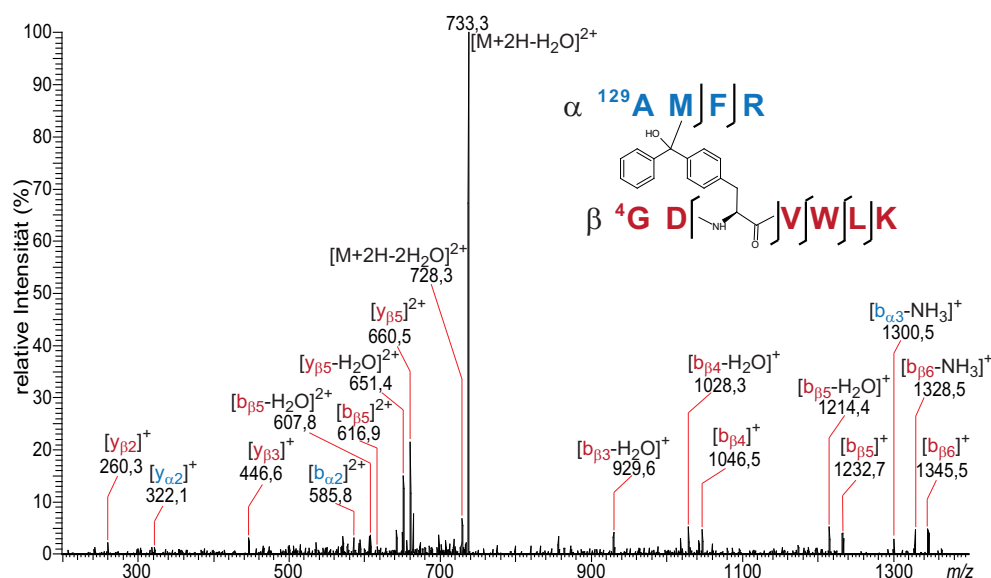
**Abb. 34** Massenspektrometrische MALDI-TOF-MS-Analyse der intakten Komplexe aus GCAP-2 und GC-Peptid 2. Analyse der Reaktionsansätze nach 60-minütiger Reaktion zwischen 10  $\mu$ M GCAP-2 und 10  $\mu$ M GC-Peptid 2 mit 1 mM BS<sup>2</sup>G **A**: in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> und **B**: in Gegenwart von 10 mM EGTA. mod. GCAP-2: GCAP-2 modifiziert mit intramolekular gebundenen und partiell hydrolysierten BS<sup>2</sup>G-Molekülen.

Nach Reaktion des GC-Photo-Peptids 2a, in dem Trp-6 gegen Bpa ausgetauscht wurde, mit GCAP-2 wurde sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> ein Vernetzungsprodukt

zwischen Ala-63 oder Met-64 des GCAP-2 und Bpa-6 des GC-Photo-Peptids 2a identifiziert (Abb. 35). Da Bpa bevorzugt mit der endständigen Methylgruppe von Met reagiert [132], ist eine Vernetzung mit Met-64 deutlich wahrscheinlicher. Eine potentielle zweite Vernetzung von Bpa-6 mit Met-181 wurde ausschließlich in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  registriert.

Für das GC-Photo-Peptid 2b wurde eine Vernetzung zwischen Bpa-8 des Peptids und Met-64 des GCAP-2 im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand, nicht jedoch in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  detektiert. Dies ist vergleichbar mit den Daten für den  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand (Kapitel 4.1.1.2) und deutet ebenfalls auf eine höhere Flexibilität des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2 hin.

Die Analyse der Bpa-Vernetzungsprodukte gestaltete sich schwierig und war oft nicht eindeutig, da die CID-Fragmentierung dieser Produkte zu ausgeprägten  $\text{H}_2\text{O}$ -Neutralverlusten der Vorläuferionen führte. Diese Signale waren oft sehr dominant im Gegensatz zu den sehr viel weniger abundanten Signalen der Fragmentationen des Peptidrückgrats. Ein vergleichsweise gut auswertbares Beispiel wird in Abb. 35 gezeigt. Potentielle weitere Kandidaten konnten aufgrund ihrer schlechten Spektrenqualität nicht eindeutig identifiziert werden, weshalb die Erstellung eines Modells für den Komplex zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptiden 2a und 2b nicht möglich war.



**Abb. 35** CID-Fragmentationenspektrum eines quervernetzten Produkts zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 2a. Das Quervernetzungsprodukt zwischen Ala-63 oder Met-64 des GCAP-2 und Bpa-6 des GC-Photo-Peptid 2a wurde nach Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS-Analyse eines Reaktionsansatzes ( $8000 \text{ mJ/cm}^2$ ;  $10 \text{ mM EGTA}$ ; Retentionszeit  $84,0 \text{ min}$ ) in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  nach CID-Fragmentierung eines zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z 746,376$  identifiziert. Fragmente des GCAP-2-Peptids sind in blau dargestellt und die Fragmente des GC Photo-Peptids 2a in rot.  $\alpha$ -Peptid: GCAP-2-Peptid;  $\beta$ -Peptid: GC-Photo-Peptid 2a.

## 4.2 Quervernetzungsexperimente mit $^{13}\text{C}_6$ -markiertem *p*-Benzoylphenylalanin (Bpa)

Für eine zuverlässige Identifizierung von Quervernetzungsprodukten mit Bpa-markierten Peptiden oder Proteinen war auf Grund der oft uneffektiven Fragmentierung eine zusätzliche Bestätigung der Produkte notwendig. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist eine verlässlichere Identifizierung von Vernetzungsprodukten durch Verwendung stabiler Isotopenmarkierungen mit Hilfe des daraus resultierenden charakteristischen Isotopenmusters möglich. Die häufig genutzte Deuterierung von Reagenzien, wie unter anderem bei  $\text{BS}^2\text{G-}D_0/D_4$  und  $\text{BS}^3\text{-}D_0/D_4$  [121] verwendet, ist eine etablierte Methode. Mit zunehmendem Deuterierungsgrad kann dies aber während der chromatographischen Trennung zu deutlichen Unterschieden der Retention deuterierter und nicht-deuterierter Spezies in der Umkehrphasenchromatographie führen. Eine Markierung mittels  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff beeinflusst die Retentionszeit dagegen nicht.

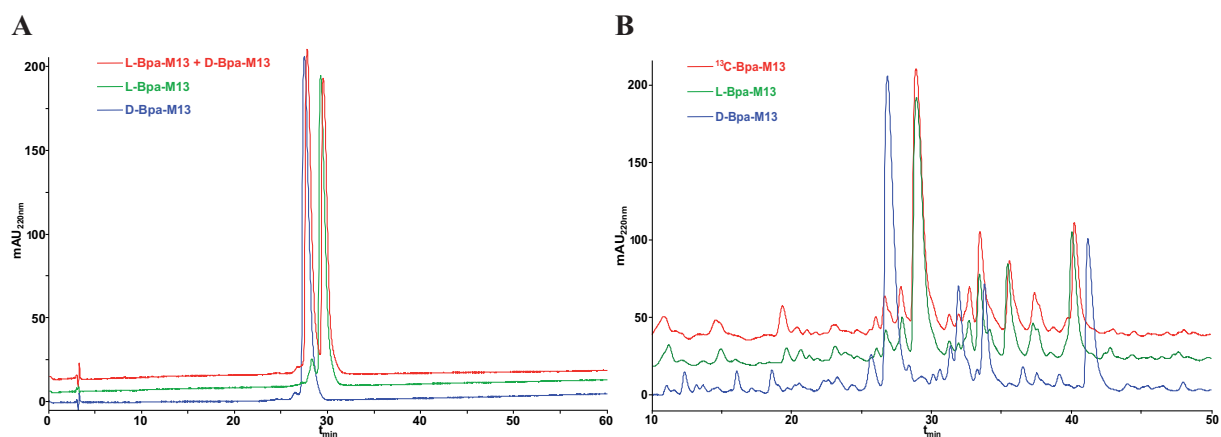
Zur verbesserten Identifizierung der Quervernetzungsprodukte nach Reaktion mit Photopeptiden wurde im Rahmen dieser Arbeit eine sechsfach  $^{13}\text{C}$ -markierte, Fmoc-geschützte Variante des *p*-Benzoylphenylalanins (Bpa), ausgehend von Benzol- $^{13}\text{C}_6$ , synthetisiert (Kapitel 3.2.6.2).

Die Verbindung wurde für die Synthese zweier modifizierter Bpa-Peptide verwendet. Dies war zum einen das M13-Peptid, ein 26-Aminosäure-Peptid aus der Skelettmuskel Myosin-leicht-Ketten-Kinase (skMLCK) und ein 23-Aminosäure-Peptid aus der retinalen Guanylatcyclase (GC-Photo-Peptid 3).

### 4.2.1 Nachweis der Enantiomerenreinheit des $^{13}\text{C}_6$ -markierten Bpa

Bei der Verwendung von artifiziellen Aminosäuren ist es von Bedeutung, dass diese ähnliche Eigenschaften wie die ausgetauschte Aminosäure besitzen. Hydrophobizität, Größe, aber vor allem die Chiralität sollten hierbei vergleichbar sein. Die Enantiomerenreinheit des synthetisierten  $^{13}\text{C}_6$ -markierten Bpa wurde wegen der begrenzten Substanzmenge nach Einbau in das M13-Peptid überprüft. Als Standard wurde das als Modell dienende M13-Peptid jeweils mit kommerziell erhältlichem D- und L-Bpa synthetisiert und gereinigt. Ausgetauscht wurde hierbei das Tryptophan an Position 4 (*Abb.-A 1*). Die Peptide wurden jeweils einzeln und als Mischung mittels HPLC analysiert. Bei der Trennung eluierte D-Bpa-M13 bei einer Retentionszeit von 27,75 min (Maximum), während L-Bpa-M13 ca. 1,7 min später bei 29,48 min eluierte. Aufgrund der fast vollständigen Trennung waren beide Spezies eindeutig unterscheidbar (*Abb. 36 A*). Anschließend wurde M13 mit dem selbst synthetisierten  $^{13}\text{C}_6$ -

markierten *N*-Fmoc-L-Bpa hergestellt. Bei der präparativen Trennung der Syntheserohprodukte wurden für das nicht markierte L-Bpa-M13 und das  $^{13}\text{C}_6$ -markierte Bpa-M13 identische Elutionsprofile detektiert, welche sich eindeutig vom Elutionsprofil des D-Bpa-M13 unterschieden (*Abb. 36 B*). Es konnte also von einem Enantiomeren-reinen  $^{13}\text{C}_6$ -markierten *N*-Fmoc-L-Bpa Syntheseprodukt ausgegangen werden.



**Abb. 36 Chromatographische (RP-HPLC) Trennung der D- und L-Bpa-M13 Peptide.** **A:** Das Chromatogramm zeigt das Elutionsprofil des nicht-markierten D-Bpa-M13 in blau, des nicht-markierten L-Bpa-M13 in grün und das der Peptidmischung in rot. **B:** Das Chromatogramm zeigt die Elutionsprofile der Syntheserohprodukte des nicht-markierten D-Bpa-M13 in blau, des nicht-markierten L-Bpa-M13 in grün und des  $^{13}\text{C}_6$ -markierten L-Bpa in rot.

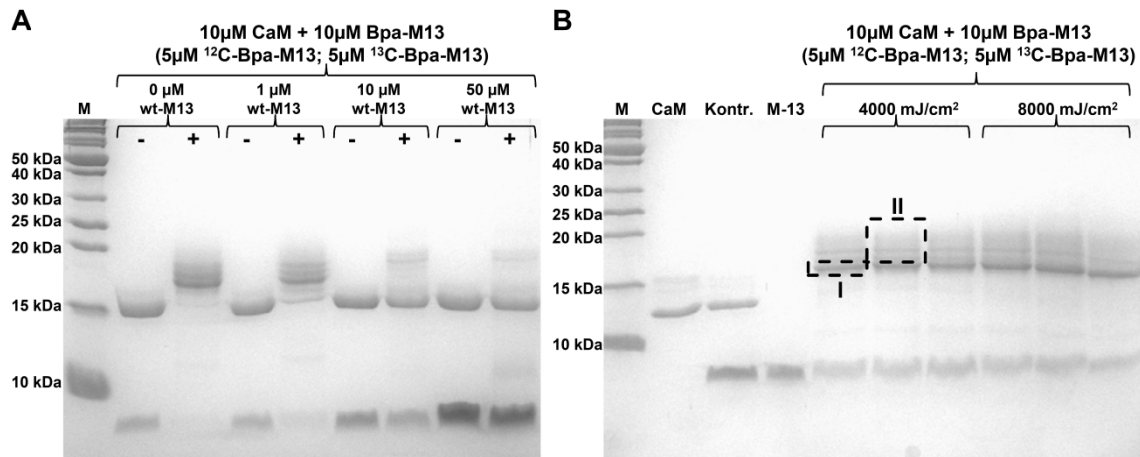
#### 4.2.2 Interaktion zwischen Calmodulin und M13 (skMLCK-Peptid)

Zur Etablierung der Strategie diente ein bereits bekanntes Modellsystem, die Interaktion zwischen CaM und dem M13-Peptid, einem bekannten CaM-Bindungsmotiv aus skMLCK [56]. Die Struktur dieses Komplexes wurde bereits mittels NMR-spektroskopischer Methoden aufgeklärt [57] und zeigt eine antiparallele Bindung des M13 an CaM, bei der der *C*-Terminus des Peptids mit der Zentralhelix des CaM interagiert. Für die Quervernetzungsexperimente wurde Trp-4 des M13 gegen  $^{12}\text{C}$ -Bpa bzw.  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa ausgetauscht und die Peptide in einer 1:1-Mischung aus  $^{12}\text{C}$ -Bpa-M13 und  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa-M13 eingesetzt (Kapitel 3.2.2.3; *Abb.-A 1*).

Um die spezifische Bindung der Bpa-Peptide nachzuweisen, wurde die Vernetzungsreaktion in Gegenwart steigender Konzentrationen des Wildtyppeptides (wt-M13) durchgeführt und die Reaktionsansätze wurden mittels eindimensionaler Gelelektrophorese analysiert (*Abb. 37 A*). Als Kontrolle dienten die nicht-bestrahlten Proben. Vor der Photoreaktion wurde das CaM als abundante Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 15 kDa detektiert, wobei auf Grund unterschiedlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung eine weitere verschmierte Bande des CaM bei ca. 16 kDa erkennbar war. Nach Bestrahlung zeigten sich diffuse Komplexbanden im Bereich von 17-19 kDa. Mit steigender wt-M13-Konzentration

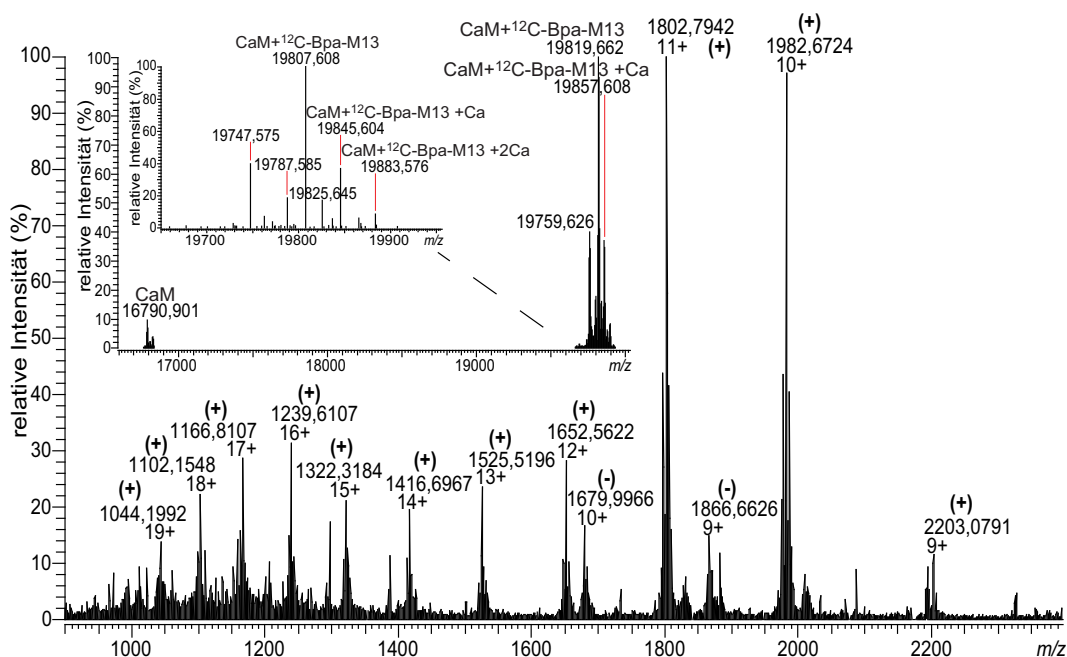


nahm die Intensität der Komplexbande ab, während die des freien CaM zunahm. Bei einem Konzentrationsverhältnis des wt-M13 zu Bpa-M13 von 1:1 war nur noch ein geringer Anteil an Komplex sichtbar. Die Konkurrenz des Bpa-M13 durch das wt-M13 um die Bindung an CaM bestätigte einen vergleichbaren Bindungsmodus. Allerdings war selbst bei einem fünffachen Überschuss des wt-M13 noch eine schwache Bande bei ca. 19 kDa für den Komplex sichtbar.



**Abb. 37 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Reaktionsansätze zwischen CaM und Bpa-M13.** Die Trennung der Reaktionsansätze mit 10  $\mu\text{M}$  CaM und 10  $\mu\text{M}$  Bpa-M13 (je 5  $\mu\text{M}$   $^{12}\text{C}$ -Bpa-M13 und  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa-M13; 20  $\mu\text{l}$  pro Bande) erfolgte mit 15%-igen Polyacrylamidgelen. **A:** Trennung der Reaktionsansätze mit steigender Konzentration des Wildtyp-M13 (wt-M13) vor (-) und nach (+) Bestrahlung mit UV-A-Licht (8000  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ); **B:** Trennung der Reaktionsansätze nach UV-A-Bestrahlung mit 4000 und 8000  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  für die spätere massenspektrometrische Analyse. Die gestrichelten Rechtecke markieren die ausgeschnittenen Gelbandenbereiche; M: Molekulargewichtsmarker; CaM: CaM, Kontrolle; M13: Bpa-M13, Kontrolle; Kontr.: Reaktionsansatz vor Bestrahlung.

Bei der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse des Reaktionsgemisches wurde ein gering abundantes Signal für das freie CaM ( $m/z$  16790,901) und ein abundantes Signal für den CaM/M13 (1:1)-Komplex ( $m/z$  19819,662) im dekonvoluierten Massenspektrum der quervernetzten Probe detektiert (Abb. 38). Nach Bestätigung der Bildung des Komplexes und einer dem wt-M13 vergleichbaren Bindung des Bpa-M13 wurde der Komplex mittels *bottom-up* und *top-down*-Analyse genauer untersucht.



**Abb. 38 Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS-Analyse des intakten CaM/Bpa-M13-Komplexes im Massenbereich  $m/z$  900-2400** ((+): Signale des CaM/Bpa-M13-Komplexes; (-): Signale des CaM). Das eingefügte Massenspektrum zeigt die dekonvolutierten Signale ( $[M+H]^+$ ). Das Signal bei  $m/z$  19759,626 konnte nicht zugeordnet werden. Die Vergrößerung zeigt die dekonvolutierten monoisotopischen Signale ( $[M_{mono}+H]^+$ ) des CaM/Bpa-M13-Komplexes mit gebundenen  $Ca^{2+}$ -Ionen. Die Signale bei  $m/z$  19747,575,  $m/z$  19787,585 und  $m/z$  19825,645 konnten nicht zugeordnet werden.

#### 4.2.2.1 Identifizierung der Vernetzungsstellen im CaM/M13-Komplex

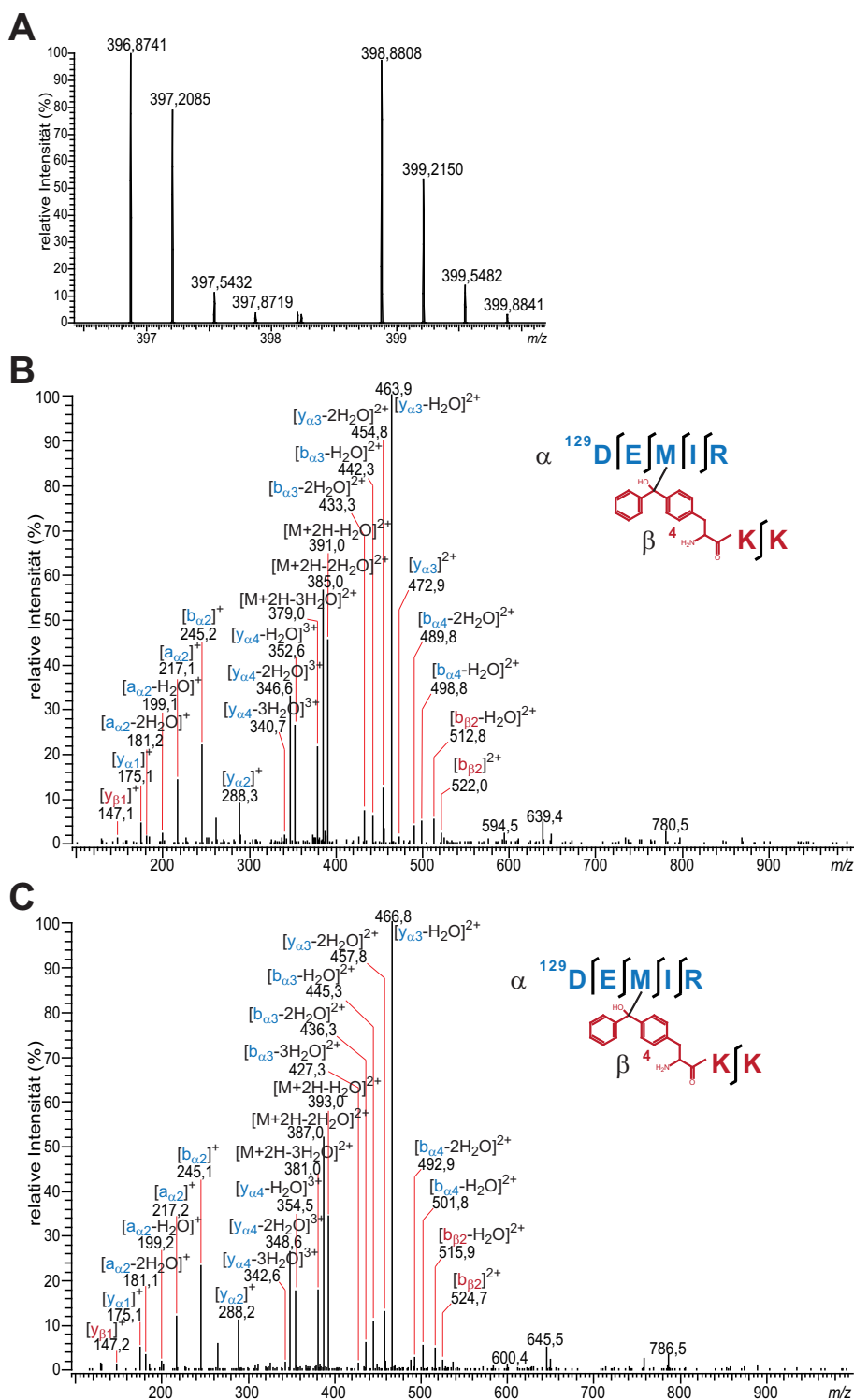
Zur Untersuchung der Interaktionsstellen auf Peptidebene wurden die markierten Bereiche des Geles ausgeschnitten (I und II, *Abb. 37 B*) und der Proteinkomplex proteolytisch mit einer Kombination aus AspN und Trypsin im Gel gespalten. Die Peptidgemische wurden per Nano-HPLC aufgetrennt und mittels Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS analysiert.

Die erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurden nach potentiellen Quervernetzungsprodukten durchsucht. Hierbei wurden Kandidaten nur als identifiziert akzeptiert, wenn das charakteristische Isotopenmuster in den Vorläuferionenmassenspektren erkennbar war. Beide Fragmentionenmassenspektren des Vorläuferionenpaares mussten vorhanden sein und äquivalente Fragmentionmuster mit den charakteristischen Massenunterschieden zeigen. Im Folgenden werden das nicht markierte  $^{12}C$ -Bpa als „X“ und das  $^{13}C_6$ -markierte Bpa als „J“ bezeichnet.

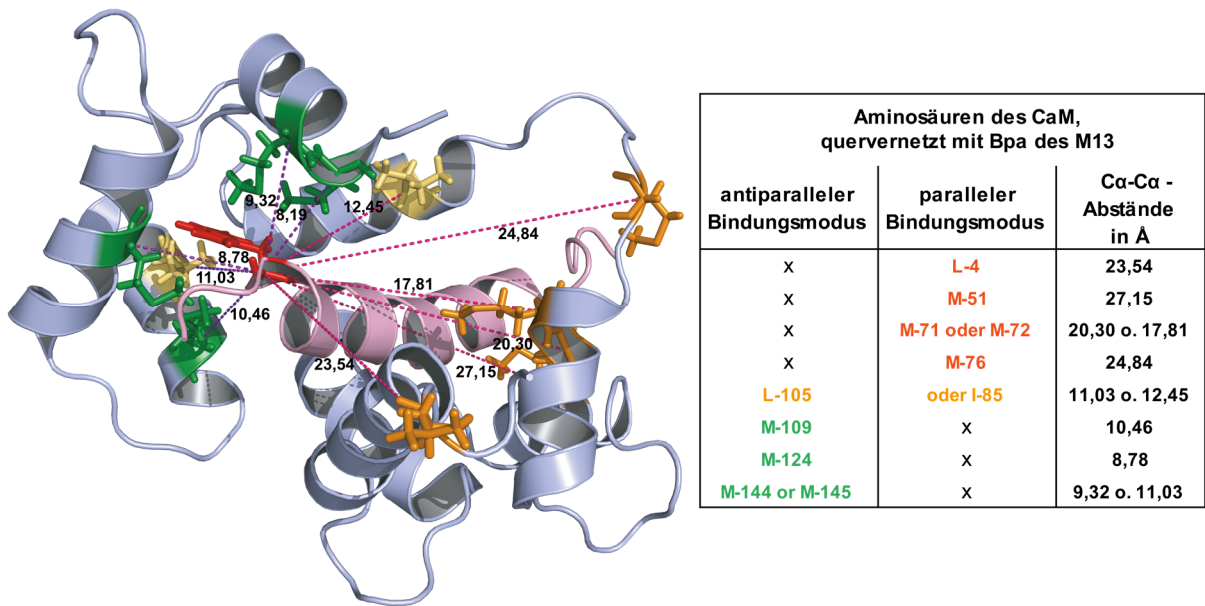
Ein repräsentatives Beispiel stellt das Quervernetzungsprodukt zwischen Met-124 (DEMIR) des CaM und Bpa-4 (XKK bzw. JKK) des M13-Peptids dar. Dieses wurde als dreifach geladenes Produkt mit einer charakteristischen Massendifferenz von 2 Th (entsprechend 6 u) zwischen dem Vernetzungsprodukt der  $^{12}C$ -Bpa-Spezies ( $m/z$  396,8741) und der  $^{13}C_6$ -Bpa-Spezies ( $m/z$  398,8808) detektiert (*Abb. 39 A*). Beim Vergleich der zugehörigen

Fragmentionenmassenspektren beider Vorläuferionen sind die identischen Fragmentierungsmuster und die charakteristischen Massendifferenzen zwischen den Bpa-enthaltenden Fragmentionen erkennbar (*Abb. 39 B und C*). Das zweifach geladene  $y_{\alpha 3}$ -Ion wurde mit einfachem und zweifachem Wasserverlust bei  $m/z$  463,9 und 454,8 im Spektrum der  $^{12}\text{C}$ -Spezies identifiziert und mit einer charakteristischen Verschiebung von 3 Th (entsprechend 6 Da) bei  $m/z$  466,8 und 457,8 im Spektrum der  $^{13}\text{C}_6$ -Spezies identifiziert. Anhand der Tatsache, dass zum Beispiel die identifizierten  $[\text{b}_{\alpha 3}\text{-H}_2\text{O}]^{2+}$ - und  $[\text{b}_{\alpha 3}\text{-2H}_2\text{O}]^{2+}$ -Fragmentionen die charakteristische Massendifferenz aufweisen ( $^{12}\text{C}$ -Spezies:  $m/z$  463,9 und 454,8;  $^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  466,8 und 457,8), nicht aber das  $[\text{b}_{\alpha 2}]^+$ -Ion ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  245,2/245,1), konnte die Vernetzungsstelle auf Met-124 eingegrenzt werden. Das wird auch durch die entsprechenden  $y_{\alpha 3}$ - und  $y_{\alpha 2}$ -Fragmentionen bestätigt.

Insgesamt wurden acht verschiedene Quervernetzungen innerhalb des CaM/M13-Komplexes identifiziert (*Abb. 40; Tabelle-A 8 und Tabelle-A 9*). Drei Quervernetzungen zwischen Bpa-4 des M13-Peptides und den Methioninen an Positionen 109, 124 und 144/145 des CaM, welche im Einklang mit der bekannten antiparallelen Orientierung des Peptides im Komplex stehen (*Abb. 40*), wurden sowohl im Gelbandenbereich I als auch im Gelbandenbereich II (*Abb. 37 B*) des Komplexes detektiert. Vier Quervernetzungen zu Leu-4, Met-51, Met-71/72 und Met-76 des CaM wurden hauptsächlich in Proben des oberen Komplexbandenbereichs II identifiziert. Diese Quervernetzungen sind nur mit einer vom bekannten Bindungsmodus abweichenden parallelen Orientierung zu erklären (*Abb. 40*). Ein weiteres Quervernetzungsprodukt aus Bpa-4 (XKK bzw. JKK) und entweder Leu-105 (ELR) oder Ile-85 (EIR) lässt aufgrund des isobaren Charakters der beiden Aminosäuren keine Unterscheidung zu (*Abb. 40*).



**Abb. 39** Identifizierung eines Quervernetzungsprodukts zwischen CaM und Bpa-M13. Das Vernetzungsprodukt zwischen Met-124 des CaM (10  $\mu$ M) und Bpa-4 des Bpa-M13 (15  $\mu$ M; je 7,5  $\mu$ M  $^{12}$ C- und  $^{13}$ C<sub>6</sub>-Bpa-M13) wurde in einer mit 4000 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten Probe der unteren Gelbande I (Abb. 37 B) identifiziert. **A:** Der Ausschnitt eines Massenspektrums zeigt das charakteristische Isotopenmuster der dreifach geladenen Spezies des nicht-markierten und  $^{13}$ C<sub>6</sub>-markierten Produkts. **B:** CID-Fragmentationenmassenspektrum nach Fragmentierung des Vorläuferions bei m/z 396,8741; **C:** CID-Fragmentationenmassenspektrum nach Fragmentierung des Vorläuferions bei m/z 398,8808. Die Fragmentationen des CaM-Peptids sind in blau dargestellt und die Fragmentationen des Bpa-M13 in rot. Die Fragmentationen bei m/z 594,5, 639,4 und 780,5 in Spektrum B und die zugehörigen Fragmentationen bei m/z 600,4, 645,5 und 686,5 in Spektrum C enthalten offensichtlich Bpa, konnten jedoch nicht zugeordnet werden.



**Abb. 40** NMR-Struktur des CaM/M13-Komplexes (PDB-Eintrag: 2BBM [57]). CaM ist hellblau und M13 lila dargestellt. Die mit einer antiparallelen Orientierung des M13 übereinstimmenden Quervernetzungsprodukte sind als grüne Stäbchen und die zugehörigen Ca-Ca-Distanzen als blaue Linien dargestellt. Produkte, die auf eine abweichende/parallele Orientierung deuten, sind als orangebraune Stäbchen und zugehörige Ca-Ca-Distanzen als magentafarbene Linien dargestellt. Das Produkt, welches entweder Ile<sup>85</sup> oder Leu<sup>105</sup> zugeordnet werden kann, ist gelborange hervorgehoben. Ca-Ca-Distanzen (in Angström) sind in der Struktur und in der Tabelle aufgeführt.

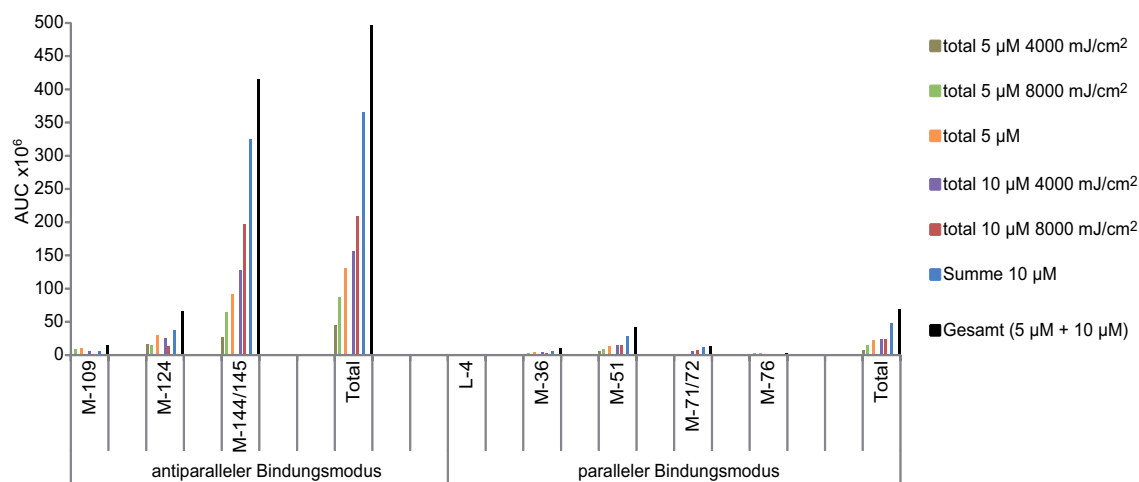
#### 4.2.2.2 Quantitative Einschätzung der Bindungsmodi

Die identifizierten Quervernetzungen sind mit zwei verschiedenen Bindungsmodi des M13-Peptides im Komplex mit CaM erklärbar, von denen allerdings nur die antiparallele Orientierung mit der veröffentlichten 3D-Struktur übereinstimmt (PDB-Eintrag: 2BBM [57]). Aufgrund der unterschiedlich stark gefärbten Gelbandenbereiche I und II (Abb. 37 B) und den darin identifizierten Produkten ist eine bevorzugte antiparallele Orientierung des M13-Peptides im Komplex mit CaM zu vermuten. Wie bereits beschrieben, wurden die mit dem antiparallelen Bindungsmodus übereinstimmenden Quervernetzungen in beiden Bandenbereichen identifiziert, abweichende Produkte jedoch nur im weniger intensiv gefärbten oberen Bandenbereich II.

Um die eventuelle Dominanz einer der Bindungsmodi einschätzen zu können, wurden die Quervernetzungsexperimente je dreimal mit einer Protein/Peptidkonzentration von je 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  (1:1, CaM:M13) wiederholt und die Komplexe in Lösung mit AspN und Trypsin gespalten. Nach der LC/MS/MS-Analyse wurden die potentiellen Quervernetzungsprodukte identifiziert. Anschließend wurden die Integrale der extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) der Vorläuferionen bestimmt, die durch ein charakteristisches Isotopenmuster und Fragmentationmassenspektren für beide Spezies (<sup>12</sup>C-Bpa und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Bpa) bestätigt wurden. Zusätzlich einbezogen wurden alle Ladungszustände dieser Produkte, für die auch ein

charakteristisches Isotopenmuster und mindestens ein Fragmentionenmassenspektrum einer Spezies ( $^{12}\text{C}$ -Bpa oder  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa) detektiert wurden. Danach wurden die Integrale der EIC der einzelnen Kandidaten und zusätzlich die aller Kandidaten für einen bestimmten Bindungsmodus addiert.

Die Ergebnisse bestätigten die vorherigen Vermutungen. Nach Vergleich der Gesamtsummen für beide Bindungsmodi wurde ein siebenfach höherer Wert der integrierten EICs der Kandidaten für den antiparallelen Bindungsmodus im Vergleich zum parallelen Bindungsmodus ermittelt (Verhältnis 7,22:1). Die Verhältnisse variieren zwischen  $\approx 6:1$  (6,03:1;  $5\ \mu\text{M}$ ,  $8000\ \text{mJ}/\text{cm}^2$ ) und  $\approx 9:1$  (8,70:1;  $10\ \mu\text{M}$ ,  $8000\ \text{mJ}/\text{cm}^2$ ). Das Quervernetzungsprodukt von Bpa-4 des M13 und Met-144/145 des CaM, welches einer antiparallelen Orientierung des M13 entspricht, war in allen Proben am höchsten abundant. Diese Ergebnisse konnten aber nur für eine grobe Einschätzung genutzt werden, da die Signalintensität eines Quervernetzungsproduktes nicht nur von der Menge, sondern auch von dessen Ionisierbarkeit abhängt (Abb. 41).



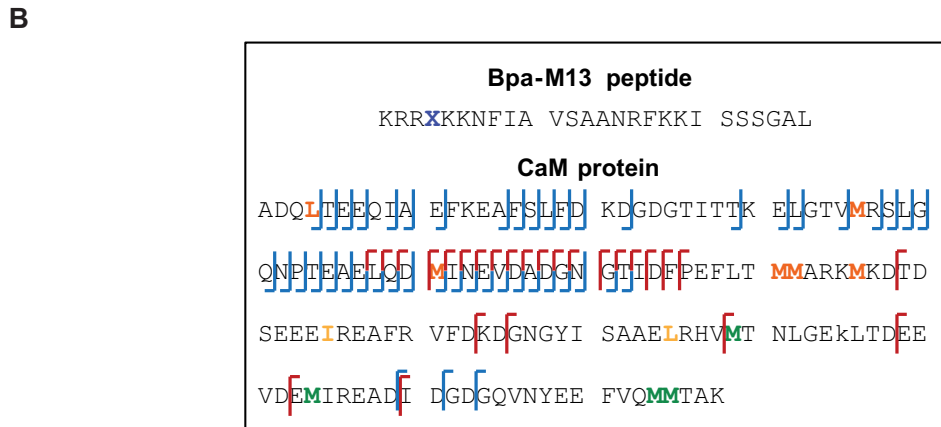
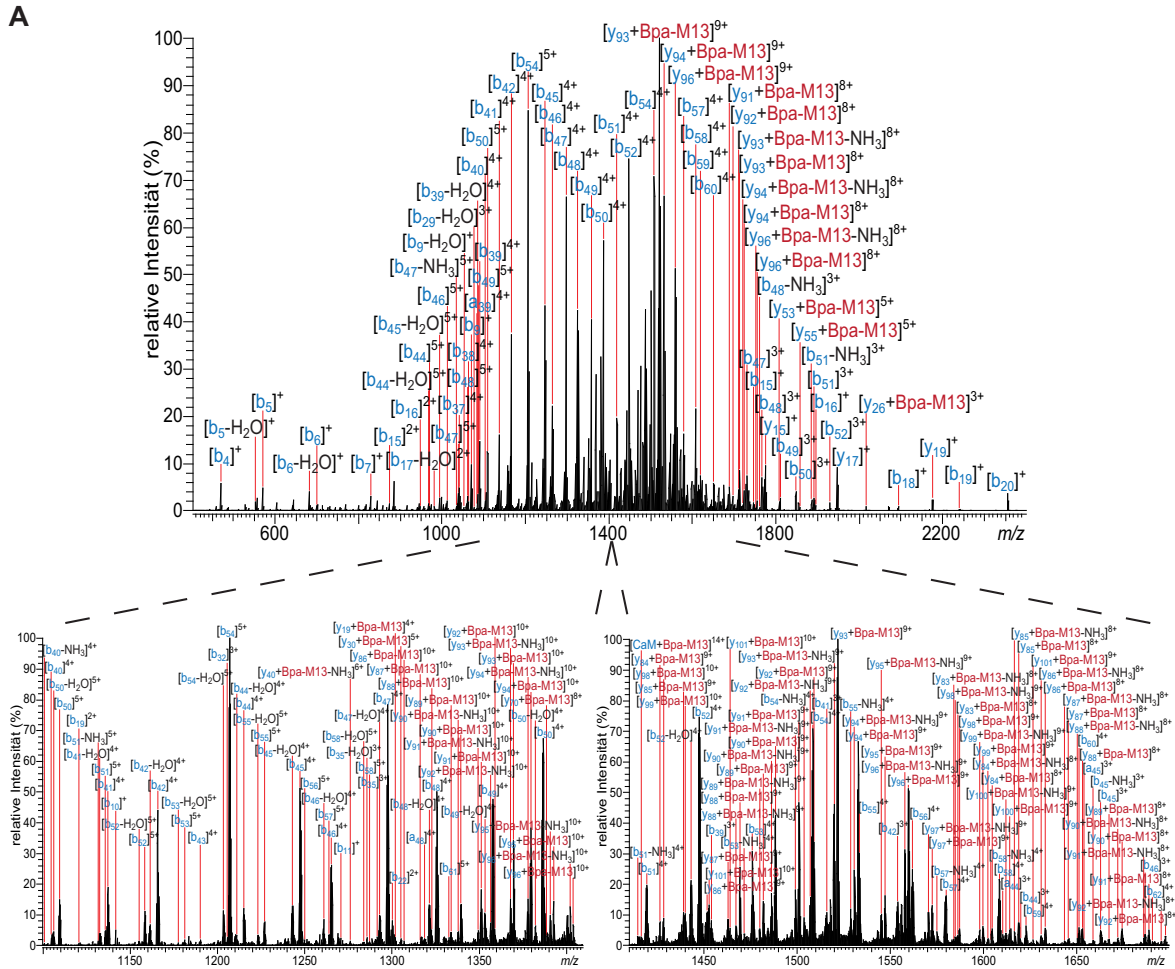
**Abb. 41 Bestimmung der Bindungsmodi aus den extrahierten Ionenchromatogrammen der Quervernetzungsprodukte.** Das Säulendiagramm zeigt die addierten Integrale der extrahierten Ionenchromatogramme der identifizierten Quervernetzungsprodukte nach proteolytischer Spaltung (in Lösung) der Reaktionsansätze ( $3 \times 5\ \mu\text{M}$  CaM und  $5\ \mu\text{M}$  Bpa-M13 (je  $2,5\ \mu\text{M}$   $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa-M13);  $3 \times 10\ \mu\text{M}$  CaM und  $10\ \mu\text{M}$  Bpa-M13 (je  $5\ \mu\text{M}$   $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa-M13)). Die Flächenverhältnisse von antiparalleler zu paralleler Bindung betragen für:  $3 \times 5\ \mu\text{M}$  CaM/Bpa-M13 **A**: 6,34:1; **B**: 6,03:1; **A+B**: 6,13:1 und für  $3 \times 10\ \mu\text{M}$  CaM/Bpa-M13; **A**: 6,68:1; **B**: 8,70:1; **A+B**: 7,71:1 (**A**:  $4000\ \text{mJ}/\text{cm}^2$ ; **B**:  $8000\ \text{mJ}/\text{cm}^2$ ).

#### 4.2.2.3 Top-down-Analyse des CaM/M13-Komplexes

Zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse wurde der intakte CaM/M13-Komplex mittels CID- und ETD-Fragmentierung analysiert.

Nach CID-Fragmentierung einer 14-fach positiv geladenen Spezies des intakten CaM/M13-Komplexes bei  $m/z$  1416,6188 (Abb. 42) konnten 43 Fragmentionen unmodifizierten N-terminalen b-Ionen ( $b_4$  bis  $b_{62}$ ) des CaM zugeordnet werden. Alle b-

Fragmentationen schließen eine Bindung von Bpa-4 des M13 an Leu-4 des CaM aus. 26 dieser b-Fragmentationen (b<sub>37</sub>-b<sub>56</sub>) schließen das Met-36 und 12 b-Fragmentationen das Met-51 als potentielle Bindungsstelle im CaM aus. Zusätzlich wurden drei C-terminale y-Fragmentationen (y<sub>15</sub>, y<sub>17</sub>, y<sub>19</sub>) des CaM identifiziert, die gegen eine Bindung des Bpa an Met-144/145 sprechen. Diese widersprechen einer Bindung an Leu-105, Met-109 und Met-124 nicht und sind somit trotzdem in Übereinstimmung mit dem bekannten antiparallelen Bindungsmodus. Für den CaM/Bpa-M13-Komplex konnten insgesamt 26 C-terminale y-Fragmentationen des CaM identifiziert werden, die mit dem M13-Peptid vernetzt vorliegen und ebenfalls den antiparallelen Bindungsmodus unterstützen. Sechs dieser Fragmentationen zwischen y<sub>19</sub>+Bpa-M13 und y<sub>55</sub>+Bpa-M13 passen dabei ausschließlich zur bekannten antiparallelen Bindung des M13 an CaM. Das y<sub>19</sub>+Bpa-M13-Ion unterstützt im Gegensatz zu den unmodifizierten y<sub>15</sub>, y<sub>17</sub>, y<sub>19</sub>-Ionen nur eine Bindung an Met-144/145. Somit ist von einer gemischten Population des Komplexes mit einer antiparallelen Orientierung des M13 auszugehen, mit einer hauptsächlichlichen Bindung des Bpa-4 an Met-109, Met-124 und Met-144/145.



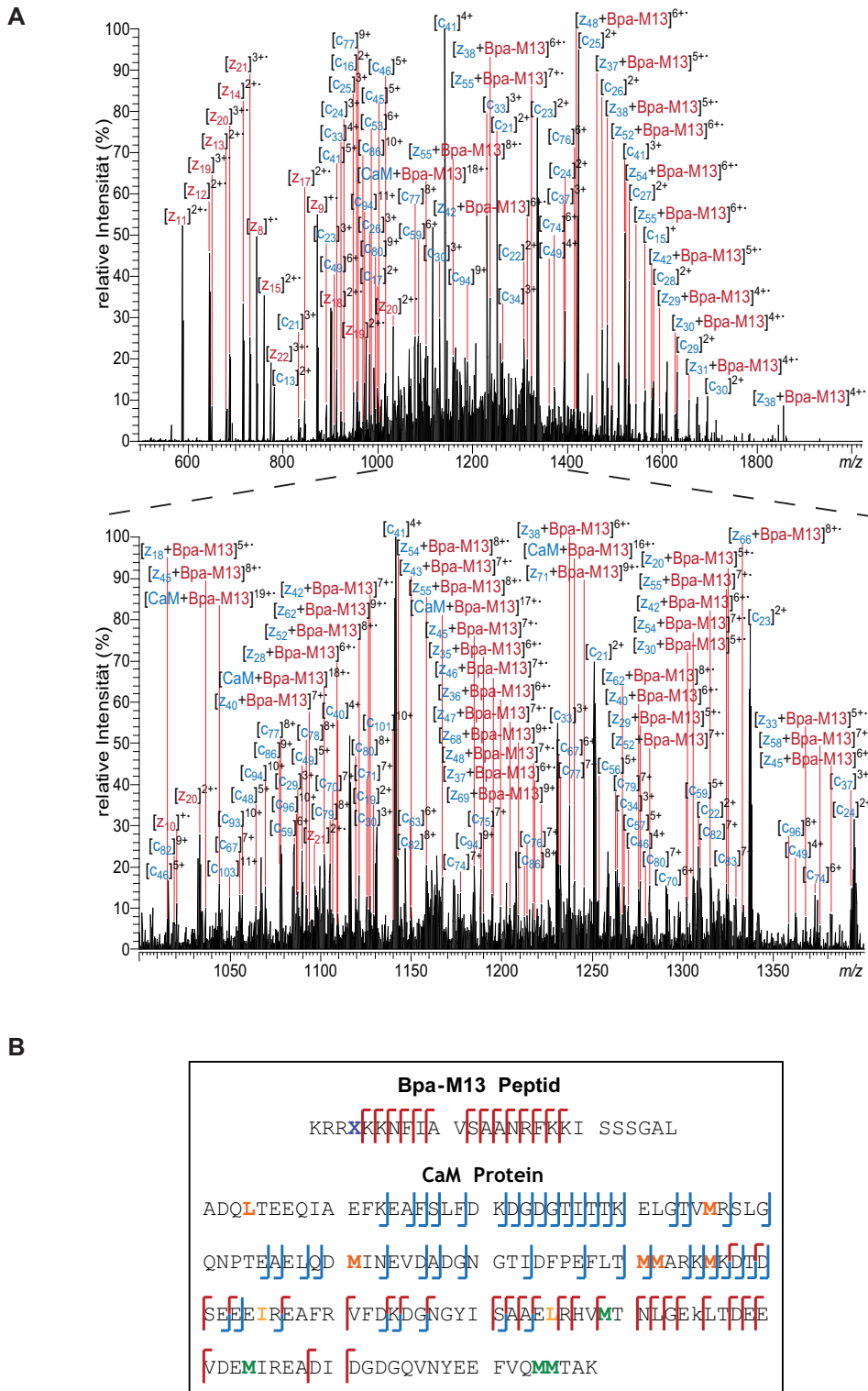
**Abb. 42 CID-Fragmentierung des intakten CaM/M13-Komplexes.** **A:** (Oben) Das Fragmentenmassenspektrum nach CID-Fragmentierung eines 14-fach positiv geladenen Vorläuferions des Komplexes ( $m/z$  1416,6188; normalisierte Kollisionsenergie: 28) wird im Massenbereich von  $m/z$  400-2400 gezeigt. (Unten) Ausschnitte des Fragmentenmassenspektrums im Bereich von  $m/z$  1100-1410 (links) und  $m/z$  1410-1700 (rechts) sind vergrößert gezeigt. Fragmente des CaM sind in blau dargestellt und Fragmente des CaM/M13-Komplexes in blau und rot. **B:** Es sind die Aminosäuresequenzen des M13 und des CaM mit den identifizierten Fragmentierungsstellen dargestellt. Unmodifizierte Fragmente des CaM sind in blau gezeigt und CaM-Fragmente, die mit dem Bpa-M13 modifiziert vorliegen, sind rot gekennzeichnet. Identifizierte Quervernetzungsstellen, die dem parallelen Bindungsmodus entsprechen, sind orange markiert und Kontaktstellen des M13 im antiparallelen Bindungsmodus in grün. Ile-85 und Leu-105 sind gelb, das Bpa-4 (X) blau markiert.



Für eine detailliertere Charakterisierung des intakten CaM/M13-Komplexes war eine Fragmentierung über einen größeren Bereich des CaM notwendig. Dies wurde durch ETD-Fragmentierung des Komplexes erreicht (Abb. 43). Nach Fragmentierung einer 20-fach positiv geladenen Spezies des Komplexes ( $m/z$  991,9342; 3 ms Reaktionszeit) konnten 14 Fragmente einer C-terminalen z-Ionenreihe ( $z_8$  und  $z_{22}$ ) des Bpa-M13-Peptides zugeordnet werden. Vom N-terminalen Teil des CaM wurden insgesamt 46 unmodifizierte c-Fragmentationen identifiziert ( $c_{13}$ - $c_{103}$ ), die alle Leu-4 als potentielle Bindungsstelle ausschließen. Neunundzwanzig Fragmentationen ( $c_{37}$ - $c_{103}$ ) schließen Met-36, 23 Fragmentationen ( $c_{53}$ - $c_{103}$ ) Met-51, 16 Fragmentationen ( $c_{71}$ - $c_{103}$ ) Met-71, 15 Fragmentationen ( $c_{74}$ - $c_{103}$ ) Met-72 und 13 Fragmentationen ( $c_{76}$ - $c_{103}$ ) Met-76 als Bindungsstelle aus. Alle potentiellen Bindungsstellen (Leu-4; Met-36; Met-51; Met-71/72; Met-76 und Ile-85), die für einen parallelen Bindungsmodus stehen, werden von insgesamt sechs N-terminalen c-Fragmentationen ( $c_{86}$ ,  $c_{93}$ ,  $c_{94}$ ,  $c_{96}$ ,  $c_{101}$  und  $c_{103}$ ) ausgeschlossen. Zusätzlich wurden insgesamt 27 C-terminale z-Fragmentationen im Bereich zwischen  $z_{18}$  und  $z_{71}$  des CaM identifiziert, die mit Bpa-M13 modifiziert wurden und eindeutig den antiparallelen Bindungsmodus favorisieren.

Diese Ergebnisse wurden nach CID- und ETD-Fragmentierung weiterer Ladungszustände des intakten CaM/M13-Komplexes bestätigt. Insgesamt konnte weder nach CID-Fragmentierung noch nach ETD-Fragmentierung ein einziges Fragmentation detektiert werden, welches eine parallele Orientierung des M13-Peptides unterstützt und eine antiparallele Bindung des Bpa-M13 ausschließt. Die mittels CID erzielten Ergebnisse deuten auf eine gemischte Spezies hin, bei der eine Bindung des Bpa an unterschiedliche Methionine des CaM im antiparallelen Bindungsmodus zu vermuten ist. Die Fragmentierung mittels ETD zeigte ausschließlich Fragmente, die einen antiparallelen Bindungsmodus und Met-124 und Met-144/145 als hauptsächliche Kontaktstellen des Bpa bestätigten. Die Ergebnisse der *top-down*-Experimente und die Resultate der integrierten EIC zeigten, dass es sich bei dem parallelen Bindungsmodus zwischen CaM und M13 um ein niederabundantes Nebenprodukt der Reaktion handeln muss, welches klar vom hauptsächlichen antiparallelen Bindungsmodus abgegrenzt werden kann.

# Ergebnisse



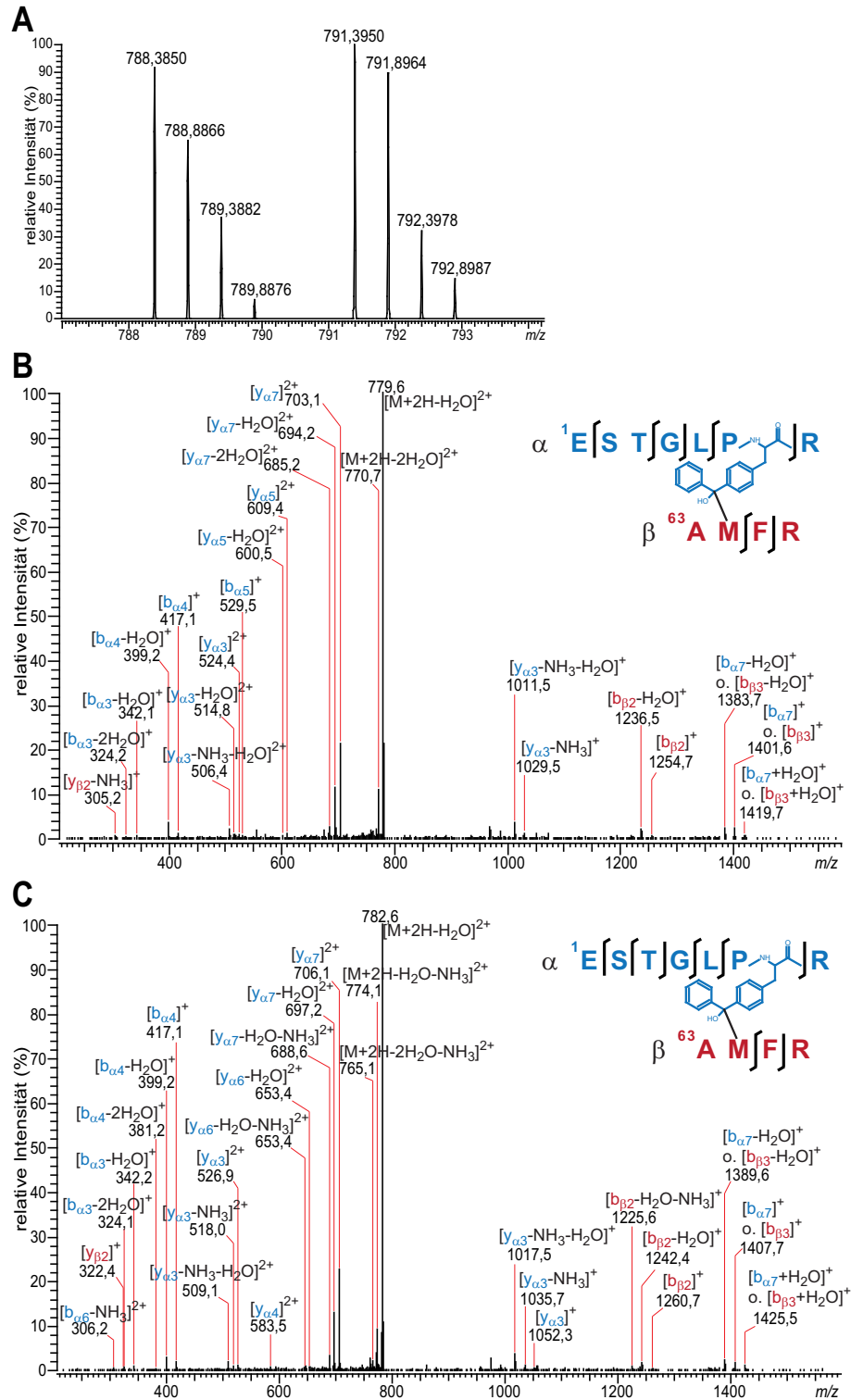
**Abb. 43 ETD-Fragmentierung des intakten CaM/M13 Komplexes.** **A:** (Oben) Das Fragmentenmassenspektrum nach ETD-Fragmentierung eines 20-fach positiv geladenen Vorläuferions des Komplexes ( $m/z$  991,9342; 3 ms ETD-Reaktionszeit) wird im Massenbereich von  $m/z$  500-2000 gezeigt. (Unten) Der Ausschnitt des Fragmentenmassenspektrums im Bereich von  $m/z$  1000-1400 ist vergrößert gezeigt. Fragmente des CaM sind in blau dargestellt, Fragmente des Bpa-M13 in rot und Fragmente des CaM/M13-Komplexes in blau und rot. **B:** Es sind die Aminosäuresequenzen des M13 und des CaM mit den identifizierten Fragmentierungsstellen dargestellt. Unmodifizierte Fragmente des CaM sind in blau gezeigt und Fragmente des Bpa-M13, sowie CaM-Fragmente, die mit dem Bpa-M13 modifiziert vorliegen, sind rot gekennzeichnet. Identifizierte Quervernetzungsstellen, die dem parallelen Bindungsmodus entsprechen, sind orange markiert und Kontaktstellen des M13 im antiparallelen Bindungsmodus in grün. Ile-85 und Leu-105 sind gelb, das Bpa-4 (X) blau markiert.

### 4.2.3 Quervernetzungsexperimente zwischen GCAP-2 und dem isotopenmarkierten GC-Photo-Peptid 3

Nach Bestätigung der grundsätzlichen Anwendbarkeit der  $^{13}\text{C}$ -Markierung für eine verlässlichere Identifizierung von Bpa-Quervernetzungsprodukten, wurde diese Methode auf das in dieser Arbeit untersuchte biologische System des GCAP-2 und der ROS-GC angewendet. Hierfür wurde das in Kapitel 4.1.1 beschriebene GCAP-2-Bindungsmotiv aus der C-terminalen Extension der ROS-GC, GC-Peptid 1 [36] (*Abb. 24*), als Vorlage verwendet und ein N-terminal um sechs Aminosäuren verlängertes und acetyliertes Peptid aus 23 Aminosäuren synthetisiert. Im Peptid wurde die größte hydrophobe Aminosäure, das Tyrosin an Position 7, gegen nicht-markiertes und  $^{13}\text{C}_6$ -markiertes Bpa ausgetauscht (GC-Photo-Peptid 3, *Abb.-A 1*). Nach der Quervernetzungsreaktion in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und anschließender gelelektrophoretischer Trennung war bei ca. 25 kDa auf Höhe des möglichen GCAP-2/Peptid-Komplexes eine schwache Bande erkennbar (*Abb.-A 4*). Der größte Teil des GCAP-2 wurde nicht quervernetzt. Vergleichbar mit den vorherigen Quervernetzungsexperimenten zwischen GCAP-2 und den verschiedenen Bindungspeptiden konnte auch für diesen Komplex im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand keine getrennte Bande für einen potentiellen Protein/Peptid (1:1)-Komplex detektiert werden. Dieser wurde möglicherweise durch die verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen Zustände des GCAP-2 überdeckt (siehe Kapitel 4.1.1.2 und 4.1.2).

Für eine detaillierte Analyse der potentiellen Quervernetzungsprodukte wurden die jeweiligen Gelbanden in zwei Teilen ausgeschnitten (siehe *Abb.-A 4*), entsprechend des Protokolls (Kapitel 3.2.4.1.2) mit GluC und Trypsin im Gel gespalten und nach chromatographischer Trennung massenspektrometrisch analysiert. Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  wurde das GC-Photo-Peptid 3 fast ausschließlich in den oberen Gelbanden I identifiziert. Wie zuvor in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben, wurden anschließend die Quervernetzungsprodukte identifiziert. Ein repräsentatives Beispiel für das Quervernetzungsprodukt von Bpa-7 des GC-Photo-Peptid 3 (AS 1-8, ESTGLPXR bzw. ESTGLPJR) und Met-64 des GCAP-2 (AS 63-66, AMFR) wird in *Abb. 44* gezeigt. Dieses Produkt wurde sowohl in An- als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  gefunden, jedoch ausschließlich in den Extrakten der oberen Gelbanden (*Abb.-A 4*). Die Signale der doppelt geladenen Spezies ( $^{12}\text{C}$ -Spezies:  $m/z$  788,3850;  $^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  791,3950) zeigten die charakteristische Massendifferenz von 3 Th (entsprechend 6 Da; *Abb. 44 A*). Die zugehörigen Fragmentationenspektren zeigten äquivalente Fragmentierungsmuster und die zu erwartenden charakteristischen Massenunterschiede (*Abb. 44 B und C*). Beispielsweise wurde

das  $[b_{\beta 2}]^+$ -Fragmentation mit einem zusätzlichen  $H_2O$ -Verlust bei  $m/z$  1254,7 und 1236,5 ( $^{12}C$ -Spezies) und mit der entsprechenden Massendifferenz von 6 u bei  $m/z$  1260,7 und 1242,4 ( $^{13}C_6$ -Spezies) identifiziert. Anhand dieser Fragmente konnte die potentielle Reaktionsstelle auf Ala-63 und Met-64 des GCAP-2 eingegrenzt werden. Aufgrund der bekannten Präferenz des Bpa für Methionin als Reaktionspartner [142] ist Met-64 die wahrscheinlichere Kontaktstelle. Die Vernetzung von Bpa-7 des GC-Photo-Peptids 3 und Met-64 des GCAP-2 wurde sowohl im  $Ca^{2+}$ -gebundenen als auch im  $Ca^{2+}$ -freien Zustand als einzige Reaktionsstelle ermittelt. Dies spricht für eine definierte Interaktion zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 3.



**Abb. 44 Identifizierung eines Quervernetzungsproduktes zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 3.** Das Vernetzungsprodukt zwischen Bpa-7 des GC-Photo-Peptids 3 (20  $\mu$ M; je 10  $\mu$ M <sup>12</sup>C- und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Bpa-Peptid) und Met-64 des GCAP-2 (10  $\mu$ M) wurde in einer bestrahlten Probe (8000 mJ/cm<sup>2</sup>) mit Ca<sup>2+</sup> der oberen Gelbande (Abb.-A 4) identifiziert. **A:** Der Ausschnitt des Massenspektrums zeigt das charakteristische Isotopenmuster der zweifach geladenen Spezies des nicht-markierten und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-markierten Produkts. **B:** Fragmentenmassenspektrum nach CID-Fragmentierung des Vorläuferions bei m/z 788,3850; **C:** Fragmentenmassenspektrum nach CID-Fragmentierung des Vorläuferions bei m/z 791,3950. Die Fragmentionen des GC-Photo-Peptids 3 sind in blau dargestellt und die Fragmentionen des GCAP-2-Peptids in rot.

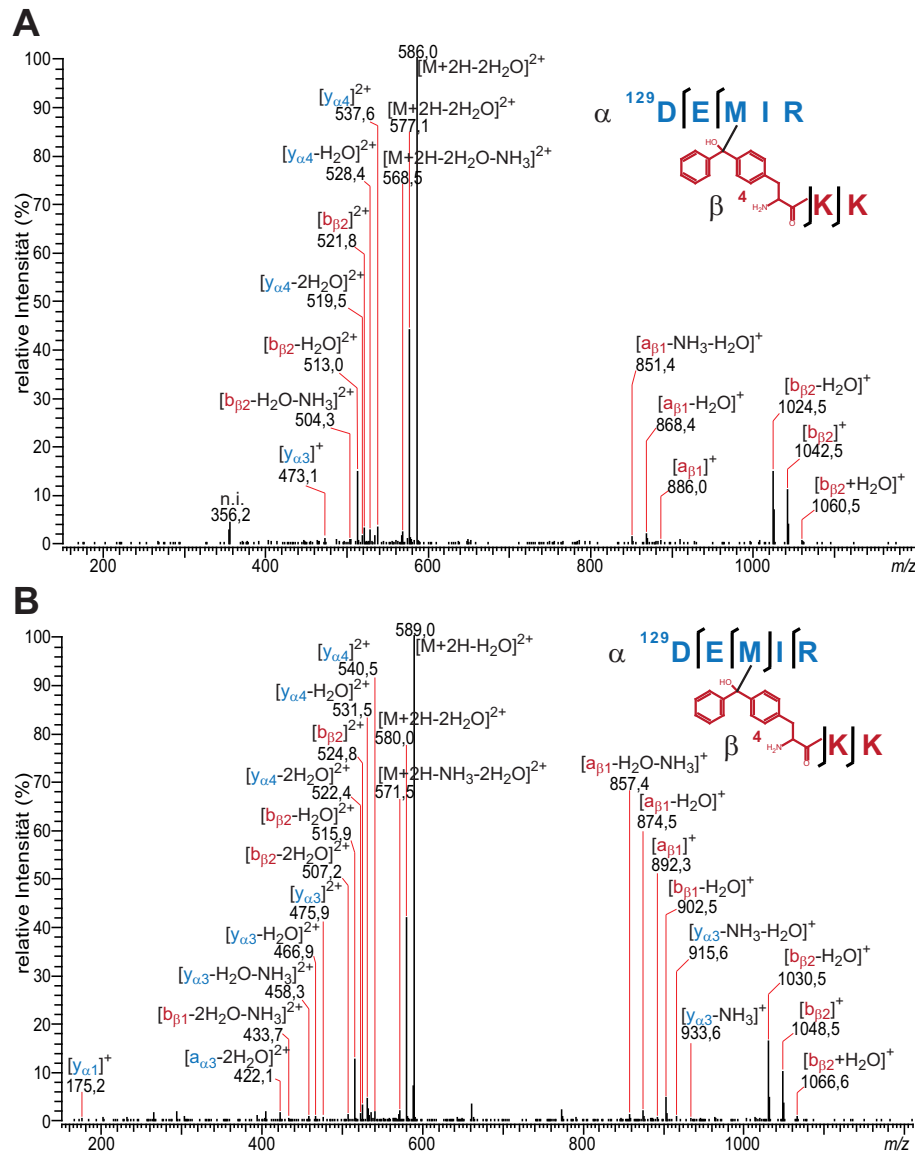
#### 4.2.4 Charakteristische Fragmentierung der Quervernetzungsprodukte mit Bpa

Wie schon bei anderen Peptiden (Kapitel 4.1.2) beobachtet, zeigen Bpa-Quervernetzungsprodukte ein spezielles Fragmentierungsverhalten. Dies bestätigte sich bei den Experimenten mit GC-Photo-Peptid 3.

Nach CID-Fragmentierung der Bpa-Quervernetzungsprodukte wurden hauptsächlich Fragmentationen mit starken Neutralverlusten zugeordnet. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Wasserverluste. Im Großteil der Fragmentationenmassenspektren wurden die intensivsten Signale als einfache oder mehrfache Neutralverluste des Vorläuferions selbst identifiziert. Ein initialer Wasserverlust ist hierbei durch den Verlust der Hydroxylfunktion des zentralen Kohlenstoffatoms der Benzophenonseitenkette zu erklären. Weitere Wasserverluste können von sauren Aminosäuren, wie Glutaminsäure und Asparaginsäure stammen. Diese kommen auf Grund der Verwendung der Proteasen GluC und AspN in den meisten Quervernetzungsprodukten vor. Weiterhin fragmentierte das Peptidrückgrat vieler Vernetzungsprodukte abhängig vom Ladungszustand sehr ineffizient.

Als Beispiel dienen hier die CID-Fragmentationenmassenspektren des Vernetzungsproduktes von Met-124 des CaM und Bpa-4 des M13-Peptids (*Abb. 39* und *Abb. 45*). Die Fragmentierung der dreifach geladenen Spezies (*Abb. 39*) führte zu ausgeprägten Neutralverlusten der Vorläuferionen ( $^{12}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  391,0, 385,0 und 379,0;  $^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  393,0, 397,0 und 391,0) sowie der Fragmentationen des Peptidrückgrats; beide sind als abundante Signale in den Fragmentationenmassenspektren erkennbar. In den Fragmentationenmassenspektren der zweifach geladenen Spezies (*Abb. 45*) wurden ebenfalls hoch-abundante Neutralverluste der Vorläuferionen ( $^{12}\text{C}$ -Spezies:  $m/z$  586,0, 577,1 und 568,5;  $^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  589,0, 580,0 und 571,5) beobachtet. Die Signale der Fragmentationen des Peptidrückgrats waren in diesen Spektren jedoch nur von geringer Intensität.

Dieser, wie auch weitere Fälle (ein weiteres Beispiel ist in *Abb.-A 5* dargestellt) verdeutlichen, dass eine zusätzliche Isotopenmarkierung essentiell für eine zweifelsfreie Identifizierung der Quervernetzungsprodukte sowie der exakten Kontaktstellen ist.



**Abb. 45** CID-Fragmentationenspektren eines Quervernetzungsproduktes zwischen CaM und Bpa-M13. Das Quervernetzungsprodukt zwischen Met-124 des CaM (10  $\mu\text{M}$ ) und Bpa-4 des Bpa-M13 (15  $\mu\text{M}$ ; je 7,5  $\mu\text{M}$   $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa-M13) wurde in einer UV-bestrahlten Probe (4000  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) der unteren Gelbande I (Abb. 37 B) identifiziert. Es entspricht dem zweifach geladenen Produkt aus Abb. 39. **A:** CID-Fragmentationenspektrogramm nach Fragmentierung des Vorläuferions bei  $m/z$  594,8076. Das Signal bei  $m/z$  356,2 konnte nicht zugeordnet werden (n.i.). **B:** CID-Fragmentationenspektrogramm nach Fragmentierung des Vorläuferions bei  $m/z$  597,8177. Die Fragmentionen des CaM-Peptids sind in blau dargestellt und die Fragmentionen des Bpa-M13 in rot.

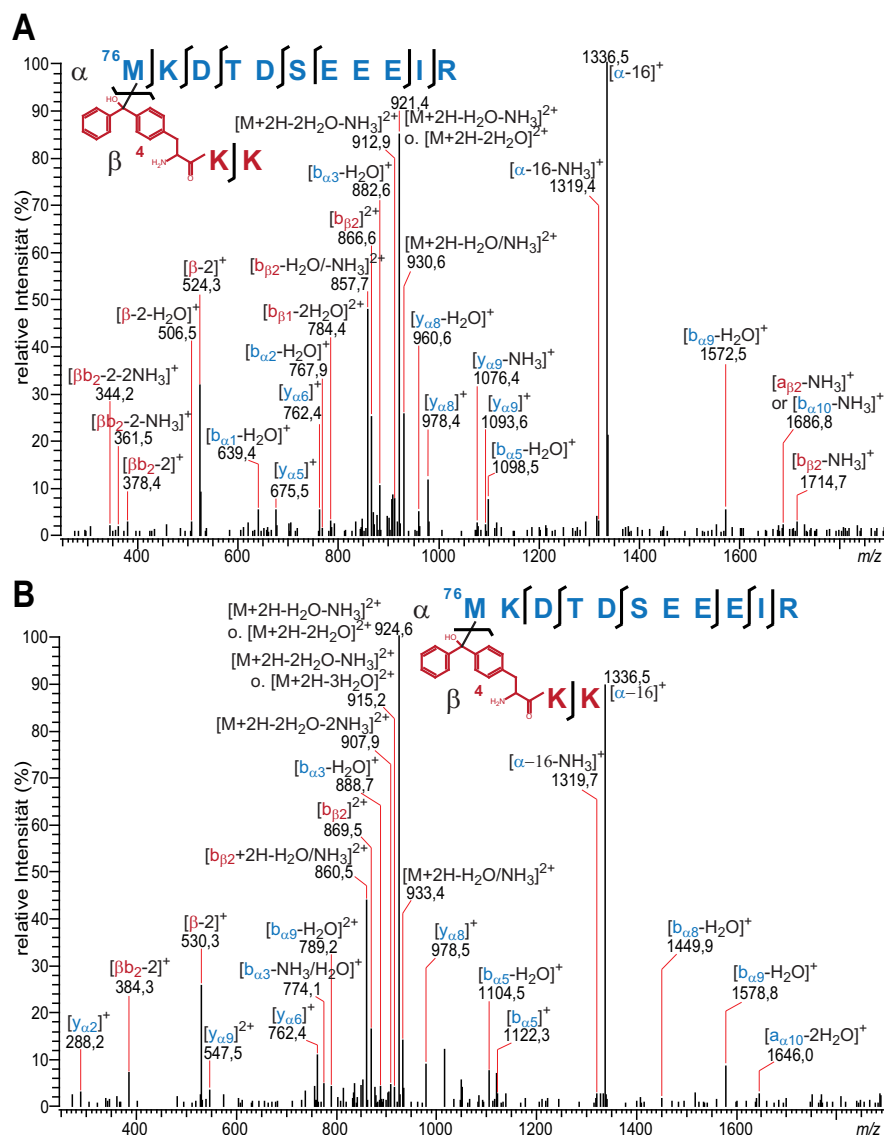
#### 4.2.4.1 Fragmentierung von Bpa-Quervernetzungsprodukten zu N-terminalen und oxidierten Methioninen

Neben dem generellen Auftreten dominanter Neutralverluste bei Bpa-Quervernetzungsprodukten zeigten einige Produkte ein außergewöhnliches Fragmentierungsverhalten.

Die Fragmentierung der zweifach geladenen Signale ( $^{12}\text{C}$ -Spezies:  $m/z$  939,4514;  $^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  942,4613) eines Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-4 des M13 ( $\beta$ -Peptid: XKK und JKK) und dem N-terminalen Met-76 des CaM-Peptids ( $\alpha$ -Peptid:

MKDTDSEEEIR) führte zu spezifischen Fragmentationen, die nur durch den Bruch der neu entstandenen Bindung zwischen Bpa und Met erklärbar sind (*Abb. 46*). Den einfach geladenen Signalen der  $^{12}\text{C}$ -Spezies bei  $m/z$  524,3 und 378,4 und  $^{13}\text{C}_6$ -Spezies bei  $m/z$  530,3 und 384,3 konnten nur das isolierte  $\beta$ -Peptid und das  $b_2$ -Fragmentation das  $\beta$ -Peptids mit einem Massenverlust von 2 u zugeordnet werden. Die Beteiligung des Bpa wurde durch die auftretende Massendifferenz bestätigt. Ein weiteres Signal bei  $m/z$  1336,5 in den Spektren beider Spezies wurde als das  $\alpha$ -Peptid mit einem Massenverlust von 16 u identifiziert. Dieser Verlust von 16 u ist höchstwahrscheinlich durch den Verlust der terminalen Methylgruppe des Methionins und der Bildung eines Thioaldehyds zu erklären. Die Fragmentierung eines weiteren Quervernetzungsprodukts (zweifach geladene Signale,  $^{12}\text{C}$ -Spezies:  $m/z$  402,2277;  $^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  405,2378) ebenfalls zwischen Bpa-4 und Met-76 (Peptid: MK) bestätigten diese Ergebnisse (*Abb.-A 6*). Die *N*-terminale Position des Methionins in dem vernetzten Peptid scheint hierbei entscheidend zu sein, da derartige Fragmentationen nicht in CID-Fragmentationmassenspektren eines vergleichbaren Produktes mit zusätzlichem *N*-terminalen Lysin (Peptid: KMKDTDSEEEIR) beobachtet werden konnten.



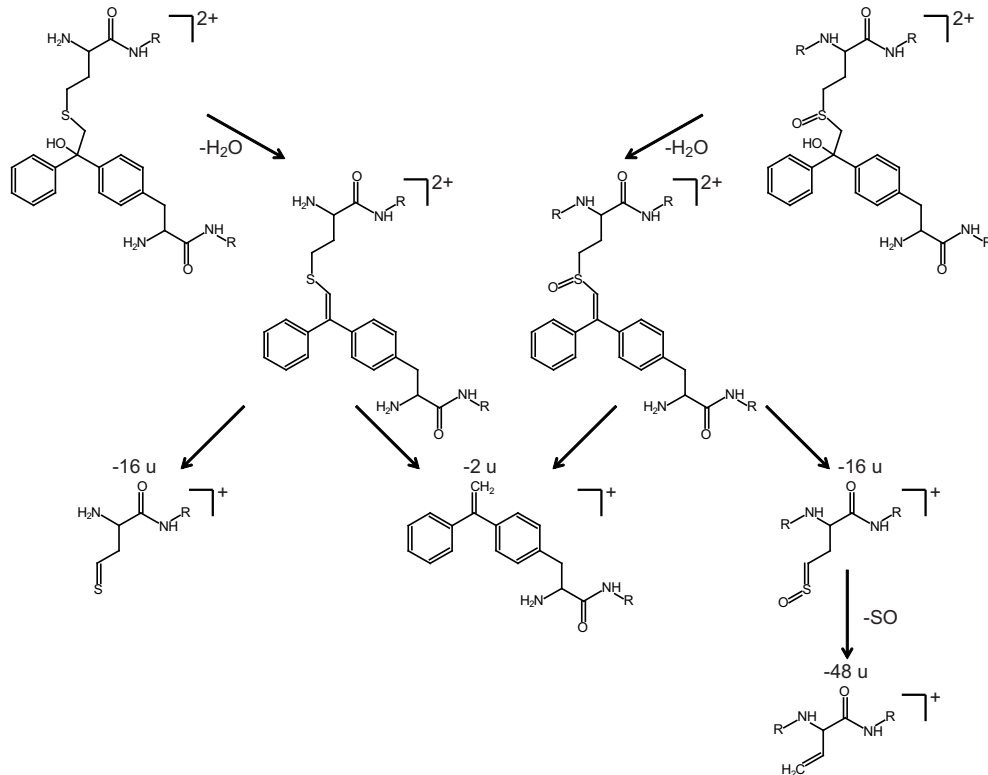


**Abb. 46** CID-Fragmentationenmassenspektren eines Quervernetzungsproduktes zwischen *Bpa* und einem N-terminalen Methionin. Das Quervernetzungsprodukt zwischen Met-76 des CaM (10  $\mu$ M) und *Bpa*-4 des *Bpa*-M13 (15  $\mu$ M; je 7,5  $\mu$ M  $^{12}$ C- und  $^{13}$ C<sub>6</sub>-*Bpa*-M13) wurde in einer UV-bestrahlten Probe (8000 mJ/cm<sup>2</sup>) der Gelbande II (Abb. 37 B) identifiziert. CID-Fragmentationenmassenspektrum des Produkts mit **A**  $^{12}$ C-*Bpa*-M13 nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  939,4514 und **B**  $^{13}$ C<sub>6</sub>-*Bpa*-M13 nach Fragmentierung des Vorläuferions bei  $m/z$  942,4613. Die Fragmente des CaM-Peptids sind in blau dargestellt und die des *Bpa*-M13 in rot. Die charakteristischen Fragmentationen sind mit  $\alpha$ -16,  $\beta$ -2,  $\beta$ <sub>2</sub>-2 bezeichnet.

Ähnliches wurde nach Fragmentierung von Quervernetzungsprodukten mit oxidierten Methioninen beobachtet. Die Fragmentierung der doppelt geladenen Spezies eines Quervernetzungsproduktes aus Met<sub>ox</sub>-124 des CaM und *Bpa*-4 des M13-Peptids (Abb. 47,  $^{12}$ C-Spezies:  $m/z$  702,8449;  $^{13}$ C<sub>6</sub>-Spezies:  $m/z$  705,8547) führte zu einem Signal eines einfach geladenen Ions bei  $m/z$  863,3 ( $^{13}$ C<sub>6</sub>-Spezies:  $m/z$  863,4) und wurde dem Met<sub>ox</sub>-Peptid mit einem Verlust von 16 u zugeordnet. Der potentielle Verlust der Methylgruppe resultiert wahrscheinlich in der Bildung einer Sulfin-Struktur (Abb. 48). Ein weiteres Signal eines einfach geladenen Ions bei  $m/z$  815,5 in beiden Spektren (Massendifferenz von 48 u) ist durch den zusätzlichen Verlust von Schwefelmonoxid zu erklären. Auch die bereits bekannten



Diese charakteristische Fragmentierung wurde ausschließlich bei Quervernetzungsprodukten mit *N*-terminalen und oxidierten Methioninen beobachtet und könnte für die Identifizierung solcher Produkte genutzt werden. Der Vorschlag eines potentiellen Fragmentierungsweges ist in *Abb. 48* dargestellt.



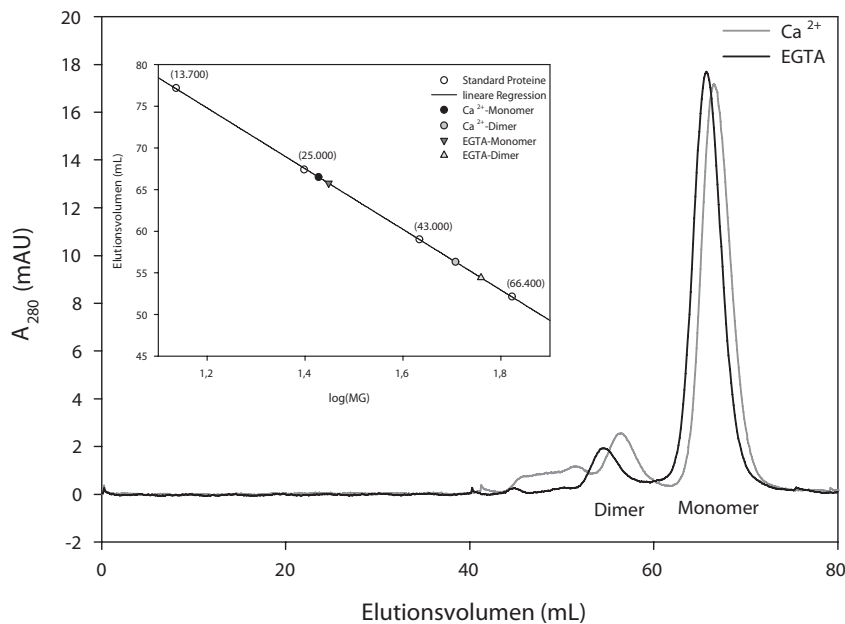
**Abb. 48** Hypothese der Fragmentierung der Bpa-Quervernetzungsprodukte zu *N*-terminalen und oxidierten Methioninen. Die Fragmentierung könnte mit einem initialen H<sub>2</sub>O-Verlust beginnen, vermutlich durch Verlust der Hydroxylfunktion vom zentralen C-Atom des Benzophenons. In der Folge wird wahrscheinlich die Bindung zwischen dem Schwefel und dem C<sub>5</sub>-Atom des Methionins gespalten. Dies würde den Verlust von 2 u des Bpa-Peptids und den Verlust von 16 u des Methionin-haltigen Peptids erklären.

### 4.3 Homodimerisierung von GCAP-2

Frühere Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie von Olshevskaya *et al.* legten eine Homodimerisierung des GCAP-2 im Ca<sup>2+</sup>-freien Zustand nahe [38]. In Anwesenheit von 400 μM EGTA war ein 1:1-Verhältnis zwischen Monomer und Dimer beobachtet worden, während in Anwesenheit von 300 μM CaCl<sub>2</sub> nahezu kein GCAP-2-Dimer detektierbar war. Die Reversibilität der Dimerisierung nach Zugabe bzw. Entfernen des Ca<sup>2+</sup> ließ einen Ca<sup>2+</sup>-regulierten Mechanismus vermuten [38].

Auf Grund fehlender Strukturinformationen über das GCAP-2-Homodimer und die mögliche Bedeutung für die Aktivierung der ROS-GC, sollte in dieser Arbeit die Dimerisierung massenspektrometrisch mittels chemischer Quervernetzung untersucht werden.

Zunächst wurden die Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie unter vergleichbaren Bedingungen, wie in [38] beschrieben, wiederholt. Die Durchführung erfolgte durch Dipl.-Biochem. Christian Arlt. Im Gegensatz zu den veröffentlichten Ergebnissen [38] wurde kein Unterschied der Homodimerbildung zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand des GCAP-2 festgestellt (Abb. 49). Unter beiden Bedingungen wurde ein deutlich höherer Anteil von GCAP-2-Monomer gegenüber GCAP-2-Homodimer sowie ein geringer Anteil von GCAP-2-Oligomeren detektiert. Nach Vergleich beider Elutionsprofile, wurde sogar ein etwas höherer Anteil an GCAP-2-Homodimer im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand registriert. Die Schlussfolgerung war daher, dass die GCAP-2-Dimerisierung ein  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger Vorgang ist.



**Abb. 49 Größenausschlusschromatographie des GCAP-2.** Das Chromatogramm zeigt den Verlauf der UV-Absorption der Größenausschlusschromatographie einer GCAP-2 Probe ( $10\ \mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von  $0,3\ \text{mM}\ \text{CaCl}_2$  (graues Profil) und  $0,4\ \text{mM}\ \text{EGTA}$  (schwarzes Profil). Im eingefügten Koordinatensystem ist die Kalibriergerade dargestellt.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Dimerisierung zusätzlich mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation (AUC) untersucht. Diese Experimente wurden von PD Dr. Hauke Lilie (Institut für Biochemie/Biotechnologie) durchgeführt. Die Bestimmung des Sedimentationsgleichgewichts einer  $10\ \mu\text{M}$  Lösung von GCAP-2 zeigte hauptsächlich monomeres GCAP-2, sowohl im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien, als auch im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand. Ein kleiner, aber signifikanter Anteil des GCAP-2-Homodimers an der Gesamtspezies wurde in beiden Proben detektiert. Dabei wurde in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  ein etwas höherer Anteil an GCAP-2-Dimer von 30 %, verglichen mit 20 % in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ , registriert. Dies

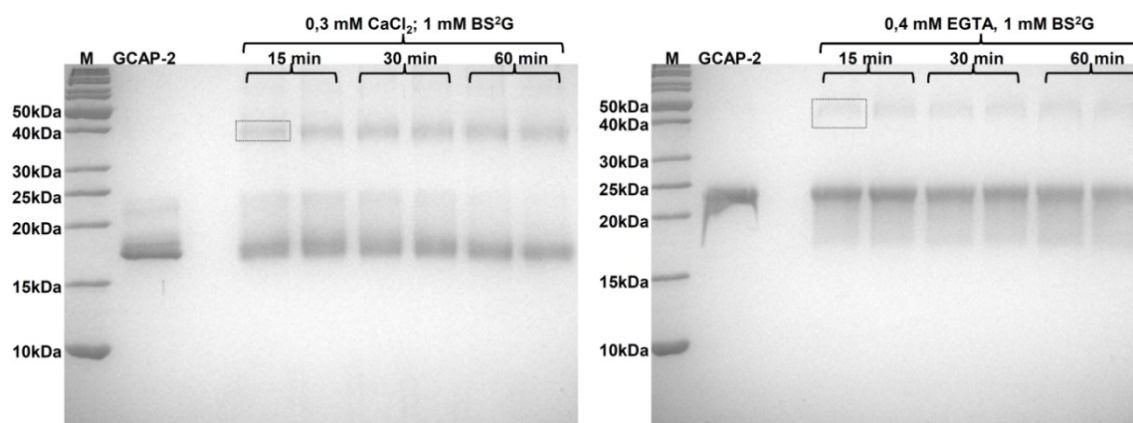
bestätigte die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie. Die Analyse der konzentrationsabhängigen Sedimentationsgeschwindigkeit des GCAP-2 in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  bestätigte ein Gleichgewicht zwischen Monomer und Homodimer. Die resultierende Dissoziationskonstante betrug  $52 \mu\text{M}$  ( $K_D$ -Wert). Entsprechend dieser Ergebnisse scheint die Homodimerisierung des GCAP-2 ein  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger, thermodynamisch kontrollierter Vorgang zu sein.

#### **4.3.1 Massenspektrometrische Identifizierung der intermolekularen Quervernetzungsprodukte im GCAP-2-Homodimer anhand charakteristischer Isotopenmuster**

Die Quervernetzungsexperimente zur Untersuchung des GCAP-2-Homodimers wurden mit Hilfe des homobifunktionellen aminreaktiven Quervernetzungsreagenz  $\text{BS}^2\text{G-}D_0$  durchgeführt. Zur Unterscheidung intra- und intermolekularer Quervernetzungen in Homodimeren ist die Verwendung isotoopenmarkierter Proteine unumgänglich. Die Experimente wurden deshalb mit einer äquimolaren Mischung aus unmarkiertem  $^{14}\text{N}$ -GCAP-2 und  $^{15}\text{N}$ -markiertem GCAP-2 in Gegenwart von  $300 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  bzw.  $400 \mu\text{M}$  EGTA durchgeführt (Kapitel 3.2.2.2.3).

Nach erfolgter Quervernetzungsreaktion wurden die Reaktionsmischungen mittels eindimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt (*Abb. 50*). Übereinstimmend mit der Größenausschlusschromatographie und der analytischen Ultrazentrifugation wurde sowohl in An- als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  ein deutlich höherer Anteil an monomeren GCAP-2 (Bande bei 18-24 kDa) gegenüber dem GCAP-2-Homodimer (Bande bei ca. 40-50 kDa) beobachtet. Die Banden des GCAP-2-Homodimers wurden anschließend ausgeschnitten und die Proteinkomplexe mittels GluC und Trypsin im Gel gespalten. Für die Identifizierung der Quervernetzungsprodukte wurden die *N*-Termini der Proteine sowie die Seitenketten von Lysinen als reaktive Gruppen beachtet. Mögliche Reaktionen mit Hydroxylfunktionen von Serinen, Threoninen oder Tyrosinen wurden nicht betrachtet, da in den vorherigen Experimenten mit GCAP-2 und GC-Peptid 1 fast ausschließlich Lysine als Reaktionspartner innerhalb des GCAP-2 identifiziert wurden.

## Ergebnisse



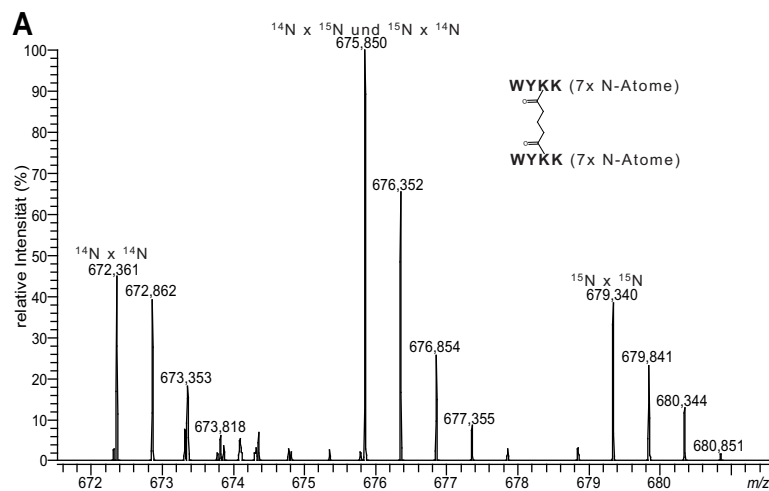
**Abb. 50 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Reaktionsansätze zwischen  $^{14}\text{N}$ -GCAP-2 und  $^{15}\text{N}$ -markiertem GCAP-2.** Die Trennung der Reaktionsansätze mit je  $10\ \mu\text{M}$  GCAP-2 (je  $5\ \mu\text{M}$   $^{14}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertem GCAP-2;  $20\ \mu\text{l}$  pro Bande) nach Reaktion mit  $1\ \text{mM}$  BS $^2$ G in Gegenwart von  $0,3\ \text{mM}$  CaCl $_2$  (links) und  $0,4\ \text{mM}$  EGTA (rechts) erfolgte mit 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen. Die GCAP-2-Homodimerbanden sind mit Rechtecken hervorgehoben und die Reaktionszeiten sind jeweils angegeben. M: Proteingewichtsmarker; GCAP-2: Probe ohne Zusatz von BS $^2$ G.

Die Verwendung einer Mischung aus  $^{15}\text{N}$ -markierten und nicht-markierten Proteinen und die damit möglichen Kombinationen unterschiedlich Isotopen-markierter Peptide ermöglichte die Unterscheidung intra- und intermolekularer Quervernetzungen anhand charakteristischer Isotopenmuster. Bei intramolekularen Quervernetzungen sind nur zwei Kombinationen aus reinen  $^{14}\text{N}$ - oder  $^{15}\text{N}$ -Peptiden möglich. Bei intermolekular vernetzten Produkten sind dagegen Kombinationen aus  $^{14}\text{N}$ -Peptid 1 mit  $^{14}\text{N}$ -Peptid 2,  $^{14}\text{N}$ -Peptid 1 mit  $^{15}\text{N}$ -Peptid 2,  $^{15}\text{N}$ -Peptid 1 mit  $^{14}\text{N}$ -Peptid 2 und  $^{15}\text{N}$ -Peptid 1 mit  $^{15}\text{N}$ -Peptid 2 möglich. Wenn ein Quervernetzungsprodukt aus zwei identischen Peptiden besteht, kann dies nur von einer intermolekularen Vernetzung zweier verschiedener Untereinheiten herrühren.

In *Abb. 51 A* wird das Vorläuferionenmassenspektrum eines doppelt geladenen Quervernetzungsproduktes aus zwei identischen GCAP-2-Peptiden (AS: WYKK) gezeigt. Das Signal der gemischten Spezies ( $m/z$  675,850) hat ungefähr die doppelte Intensität der Signale der reinen  $^{14}\text{N}$ -Spezies ( $m/z$  672,361) und  $^{15}\text{N}$ -Spezies ( $m/z$  679,340). Die Massendifferenz von 7 Th ( $z=2$ , entsprechend 14 u) zwischen den reinen  $^{14}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Spezies entspricht der Gesamtanzahl von vierzehn Stickstoffatomen aus beiden Peptiden. Zwischen der gemischten  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Spezies und den isotopenreinen Spezies tritt dementsprechend eine Differenz von 3,5 Th ( $z=2$ , entsprechend 7 u) auf. Solche Intensitätsverhältnisse sind auch bei intermolekularen Quervernetzungen aus verschiedenen Peptiden mit gleicher Anzahl von Stickstoffatomen zu erwarten. In *Abb. 51 B* ist das Vorläuferionenmassenspektrum eines doppelt geladenen Quervernetzungsproduktes zwischen den GCAP-2-Peptiden WYKK und FKR (jeweils 7x N) dargestellt. Die Intensität des Signals der gemischten  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Spezies bei  $m/z$  588,816 ist allerdings niedriger als die Signale der isotopenreinen Spezies bei  $m/z$  585,327

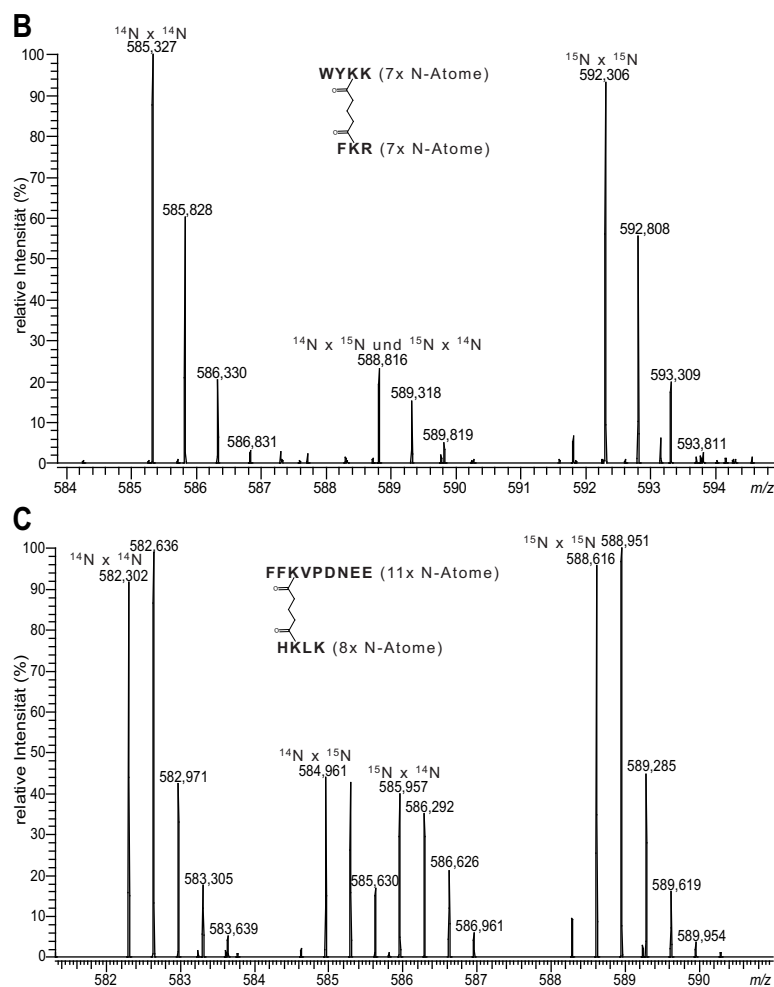
( $^{14}\text{N}$ ) und  $m/z$  592,306 ( $^{15}\text{N}$ ). Somit tritt diese Quervernetzung auch innerhalb der einzelnen Untereinheiten auf, was zur Erhöhung der Signalintensität der reinen Isotopenspezies führt. Bei Vernetzung zweier Peptide mit unterschiedlicher Anzahl von Stickstoffatomen sind zwei unterschiedliche Signale der zwei gemischten Spezies zu erwarten ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ). Bei einer ausschließlich intermolekularen Vernetzung würden die Signale der reinen sowie der gemischten Spezies die gleichen Intensitäten aufweisen. Ein solches Quervernetzungsprodukt der Peptide FFKVPDNEE mit elf Stickstoffatomen und HKLK mit acht Stickstoffatomen, ist in *Abb. 51 C* dargestellt. Die Massendifferenz von  $\approx 6,3$  Th ( $z=3$ , entsprechend 19 u) zwischen den Signalen der dreifach geladenen Ionen der reinen Spezies bei  $m/z$  582,302 ( $^{14}\text{N}$ ) und 588,616 ( $^{15}\text{N}$ ) gibt die Gesamtanzahl der Stickstoffatome wieder. Die entsprechenden Signale der beiden gemischten Spezies bei  $m/z$  584,961 ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ) und 585,957 ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) unterscheiden sich um  $\approx 1$  Th ( $z=3$ , entsprechend 3 u), was der Differenz von drei Stickstoffatomen zwischen beiden Peptiden entspricht. Da dieses Produkt offensichtlich auch innerhalb der beiden GCAP-2-Monomere auftritt, beträgt die Intensität der Signale der gemischten Spezies nur ungefähr die Hälfte der Signale der reinen Spezies.

Die Identifizierung und Charakterisierung der Quervernetzungsprodukte erfolgte zusätzlich auf Grundlage der zugehörigen Fragmentionenmassenspektren nach CID-Fragmentierung.



**Abb. 51 Massenspektren der Quervernetzungsprodukte mit charakteristischen Isotopenmustern.** Die charakteristischen Isotopenmuster aufgrund der Verwendung von  $^{14}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertem GCAP-2 hängen von der Anzahl der vorhandenen Stickstoffatome ab. **A:** Massenspektrum eines Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-29/30 und Lys-29/30 zweier identischer Peptide mit der gleichen Anzahl an Stickstoffatomen (zweifach geladenene Ionen); **B:** Massenspektrum eines Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-29/30 und Lys-46 zwischen zwei verschiedenen Peptiden mit gleicher Anzahl an Stickstoffatomen (zweifach geladenene Ionen); **C:** Massenspektrum eines Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-50 und Lys-96 zwischen zwei Peptiden mit unterschiedlicher Anzahl an Stickstoffatomen (dreifach geladenene Ionen).

Abb. 51-Fortsetzung



### 4.3.2 Identifizierung der quervernetzten Kontaktstellen zwischen den GCAP-2-Monomeren

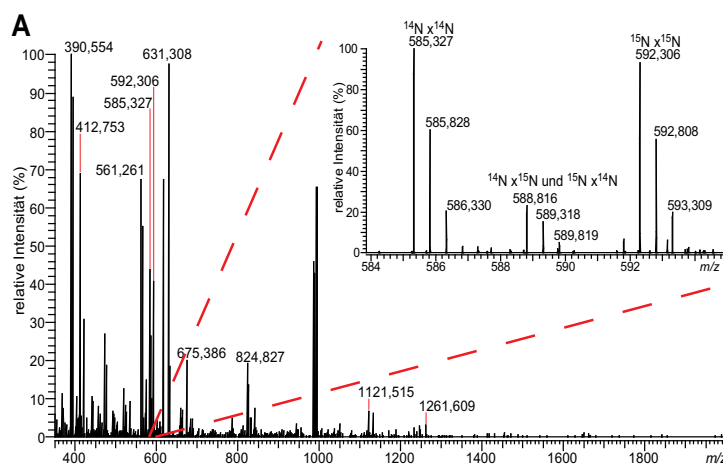
Um die exakten Kontaktstellen zwischen den quervernetzten GCAP-2-Untereinheiten zu ermitteln, wurden neben den Isotopenmustern der Vorläuferionenmassenspektren auch die zugehörigen Fragmentionenmassenspektren verglichen. Dabei wurden nur Kandidaten akzeptiert, bei denen die abundanten Signale in den Fragmentionenmassenspektren der gemischten Isotopenspezies ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  bzw.  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) zuzuordnen waren.

Ein charakteristisches Beispiel für ein Quervernetzungsprodukt, welches sowohl im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen als auch im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand auftrat, ist die Vernetzung zwischen Lys-29 (oder Lys-30) des  $\alpha$ -Peptids WYKK und Lys-46 des  $\beta$ -Peptids FKR. Dieses Quervernetzungsprodukt wurde anhand des charakteristischen Isotopenmusters im Vorläuferionenmassenspektrum seiner zweifach geladenen Spezies, bestehend aus den Signalen bei  $m/z$  585,327 ( $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ ),  $m/z$  588,816 ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) und  $m/z$  592,306 ( $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ ) identifiziert (Abb. 52 A). Die Fragmentierung der zweifach geladenen Vorläuferionen bei  $m/z$  585,327 ( $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) und



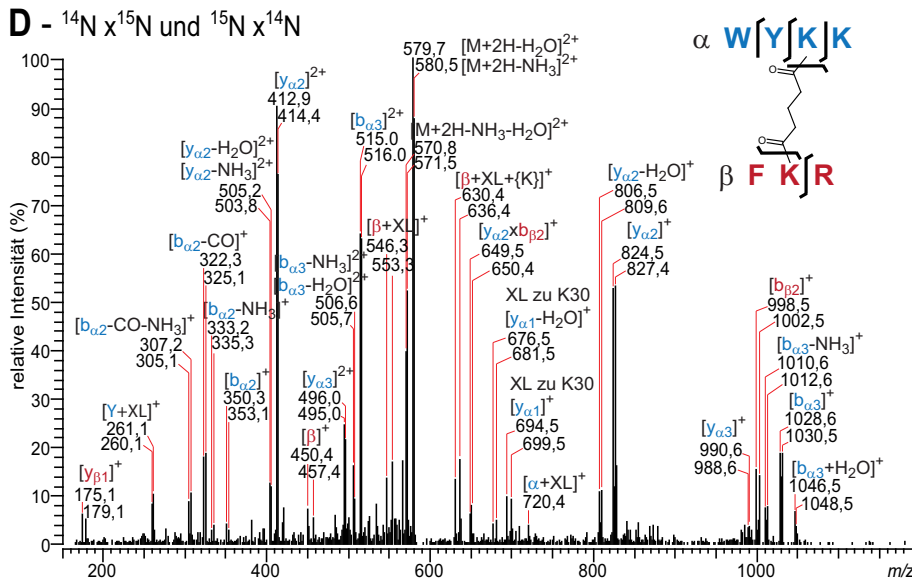
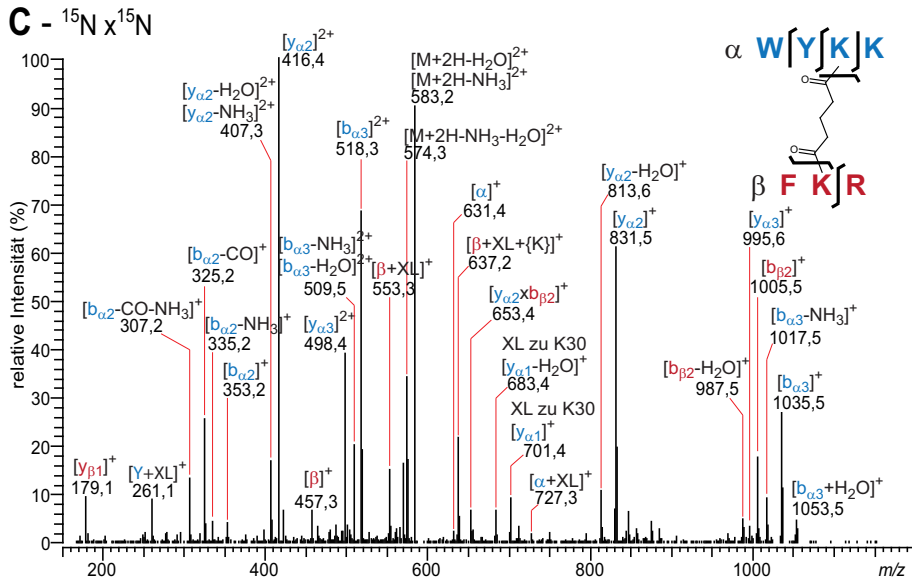
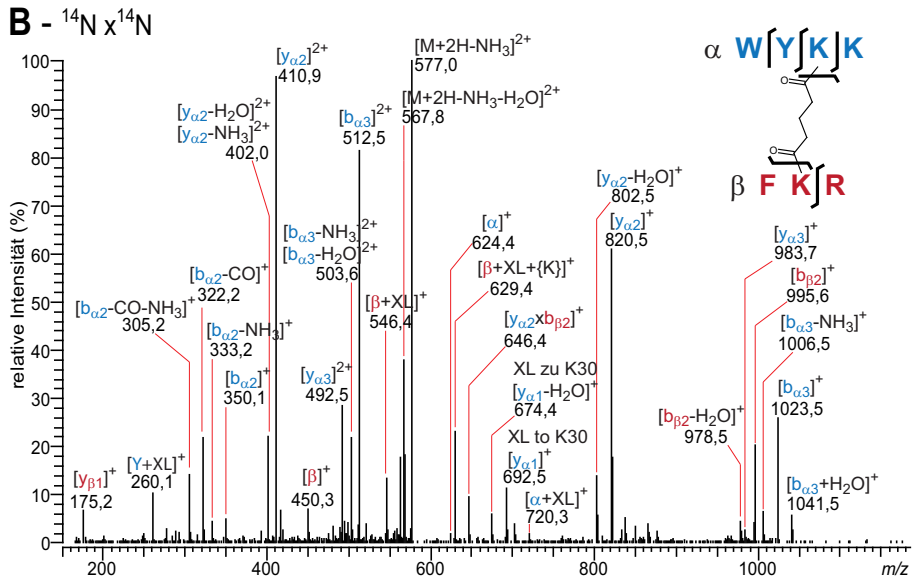
$m/z$  592,306 ( $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ ) führte jeweils zu identischen Fragmentierungsmustern und charakteristischen Massendifferenzen identischer Fragmentionen, entsprechend der Anzahl, der in den Fragmenten vorkommenden Stickstoffatomen (Abb. 52 B und C). Beispielsweise weisen die  $[\text{y}_{\alpha 2}]^+$ -Fragmentationen zwischen den Fragmentionenmassenspektren der  $^{14}\text{N}$ -Spezies ( $m/z$  820,5) und  $^{15}\text{N}$ -Spezies ( $m/z$  831,5) eine Massendifferenz von 11 u auf. Dies ist auf die Beteiligung von insgesamt elf Stickstoffatomen aus den jeweiligen Aminosäuresequenzen zurückzuführen.

Die Fragmentierung des Vorläuferions der gemischten Spezies bei  $m/z$  588,816 ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) belegt eindeutig, dass es sich um eine intermolekulare Quervernetzung handelt (Abb. 52 D). Wegen der wechselseitigen Beteiligung von  $^{14}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Peptiden treten die Signale der Fragmentionen als Dubletts auf. Die Signale des zuvor erwähnten  $[\text{y}_{\alpha 2}]^+$ -Fragmentations der gemischten Spezies sind bei  $m/z$  824,5 und 827,4 zu finden. Der Unterschied von 4 u und 7 u zu dem Signal der  $^{14}\text{N}$ -Spezies bei  $m/z$  820,5 entspricht genau der erwarteten Beteiligung von vier  $^{15}\text{N}$ -Stickstoffatomen aus dem  $\alpha$ -Peptidfragment (KK  $\rightarrow$  4 x N) und sieben aus dem  $\beta$ -Peptid (FKR  $\rightarrow$  7 x N). Weitere Beispiele für die Identifizierung von intermolekularen Quervernetzungsprodukten, unter anderem zwischen Lys-29 und Lys-29 (oder Lys-30) zweier identischer Aminosäuresequenzen (WYKK x WYKK) und dem Quervernetzungsprodukt zwischen Lys-50 ( $\alpha$ -Peptid: FFKVPDNEE) und Lys-200 ( $\beta$ -Peptid: KSAMF) mit einer unterschiedlichen Anzahl der beteiligten Stickstoffatome beider Peptidsequenzen sind im Anhang dargestellt (Abb.-A 8 und Abb.-A 9).



**Abb. 52 Identifizierung einer intermolekularen Quervernetzung zwischen Lys-29/30 und Lys-46 des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2 Homodimers** (20  $\mu\text{M}$  GCAP-2; je 10  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{N}$ - u.  $^{15}\text{N}$ -GCAP-2; 0,4 mM EGTA; 2 mM  $\text{BS}^2\text{G}$ ; 60 min Reaktionszeit). **A:** Übersichtsmassenspektrum bei einer Retentionszeit von 30,2 min: In der Vergrößerung ist das charakteristische Isotopenmuster durch die Verwendung des  $^{15}\text{N}$ -markierten GCAP-2 zu erkennen. **B:** Fragmentenmassenspektrum des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  585,327 ( $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Spezies); **C:** Fragmentenmassenspektrum des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  592,306 ( $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Spezies); **D:** Fragmentenmassenspektrum des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  588,816 ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Spezies u.  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Spezies); Die Fragmentionen des  $\alpha$ -Peptids (WYKK) sind in blau und die des  $\beta$ -Peptids (FKR) in rot dargestellt. Die charakteristischen Fragmente des  $\text{BS}^2\text{G}$  sind mit „+XL+{K}“ und „+XL“ markiert (Abb. 53).

Abb. 52-Fortsetzung



Im Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Zustand des GCAP-2-Homodimers konnten insgesamt vier, im Ca<sup>2+</sup>-freien Zustand insgesamt sieben intermolekulare Quervernetzungen identifiziert werden (Tabelle 1, Tabelle-A 12 und Tabelle-A 13). Davon waren drei Interaktionsstellen für beide Zustände identisch. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen der Vernetzungsexperimente mit GCAP-2 und den GC-Peptiden ist die stärker ausgeprägte Vernetzung im Ca<sup>2+</sup>-freien Homodimer auf eine höhere Flexibilität bzw. eine umfassende Konformationsänderung zurückzuführen.

Auf Grundlage der vier identifizierten Quervernetzungen in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> wurde ein Strukturmodell des GCAP-2-Homodimers erstellt.

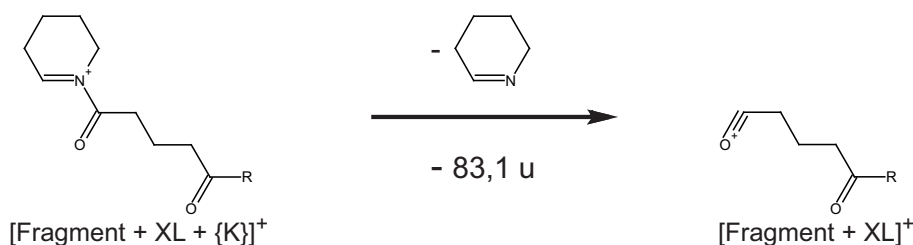
**Tabelle 1** Intermolekulare Quervernetzungsprodukte der GCAP-2-Homodimere. m: oxidiertes Methionin

Quervernetzungen zwischen GCAP-2-Monomeren	+/- Ca <sup>2+</sup>	Aminosäuresequenzen
K-96 x K-46	+	α <sup>095</sup> HKLK β <sup>045</sup> FKR
K-96 x K-46	-	α <sup>095</sup> HKLK β <sup>045</sup> FKR
K-96 x K-96	-	α <sup>095</sup> HKLK β <sup>095</sup> HKLK
K-29(30) x K-46	+	α <sup>027</sup> WYKK β <sup>045</sup> FKR
K-29(30) x K-46	-	α <sup>027</sup> WYKK β <sup>045</sup> FKR
K-29(30) x K-29(30)	+	α <sup>027</sup> WYKK β <sup>027</sup> WYKK
K-126 x K-200	-	α <sup>123</sup> SIYKLK β <sup>200</sup> KSAmF
K-46 x K-50	-	α <sup>048</sup> FFKVPDNEE β <sup>045</sup> FKR
K-50 x K-96	+	α <sup>048</sup> FFKVPDNEE β <sup>095</sup> HKLK
K-50 x K-96	-	α <sup>048</sup> FFKVPDNEE β <sup>095</sup> HKLK
K-50 x K-200	-	α <sup>048</sup> FFKVPDNEE β <sup>200</sup> KSAMF
K-50 x K-200	-	α <sup>048</sup> FFKVPDNEE β <sup>200</sup> KSAmF

### 4.3.3 Identifizierung charakteristischer Fragmentionen

Für die Fragmentierung von Quervernetzungsprodukten, die durch Reaktion mit aminreaktiven NHS-Estern, wie zum Beispiel BS<sup>2</sup>G, entstanden sind, wurden in vorhergehenden Untersuchungen charakteristische Fragmentionen beobachtet [195]. Von Santos *et al.* [195] wurde eine Fragmentierung solcher Quervernetzungsprodukte unter CID-Bedingungen beschrieben. Dabei kann es zum gleichzeitigen Bruch der einem quervernetzten

Lysin benachbarten Bindungen kommen und zusätzlich zu einem Verlust von CO und NH<sub>3</sub>. Es entsteht ein Tetrahydropyridiniumion, welches über das Vernetzungsreagenz an ein Peptid bzw. ein Fragment geknüpft ist. Weiterhin wurde ein zusätzlicher Massenverlust von  $\approx 83$  u registriert, der dem Verlust des Tetrahydropyridinrings entspricht (Abb. 53 [195]).



**Abb. 53** Strukturen der charakteristischen Fragmentationen von Quervernetzungsprodukten von NHS-Estern. Die Fragmente des Tetrahydropyridiniumions sind in den Massenspektren als „+XL+{K}“ und die des Reagenzfragments mit „+XL“ beschrieben.

Durch die Verwendung der stabil-isotopenmarkierten Proteine konnten diese Produkte eindeutig in einigen der erhaltenen Fragmentationenspektren nachgewiesen werden. Für das Vernetzungsprodukt zwischen Lys-29/30 des Peptids WYKK und Lys-46 von FKR wurden diese Produkte bei  $m/z$  629,4 und nach dem Verlust von  $\approx 83$  u bei  $m/z$  546,4 im Fragmentationenspektrum der reinen <sup>14</sup>N-Spezies und zusätzlich bei  $m/z$  637,2 und 553,3 im Spektrum der <sup>15</sup>N-Spezies detektiert. Bei der gemischten Spezies wurden die entsprechenden Fragmentationen bei  $m/z$  630,4 und 636,4 und nach Verlust von  $\approx 83$  u bei  $m/z$  546,3 und 553,3 identifiziert. Die gleichen Fragmentationen wurden ebenfalls im Fragmentationenspektrum der gemischten Spezies des Vernetzungsprodukts zwischen den Lys-29/30 (WYKK x WYKK) beobachtet.

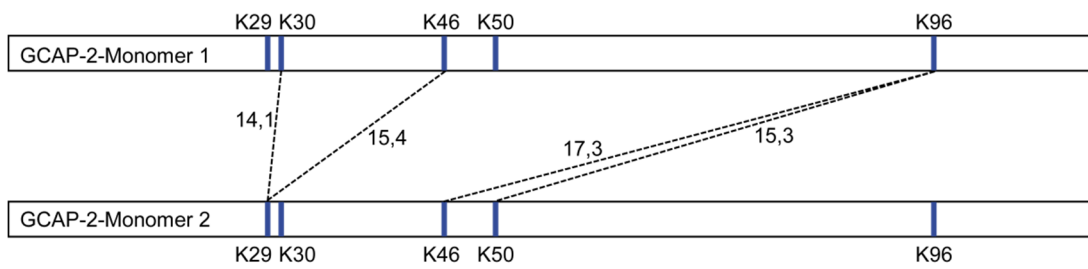
Interessanterweise wurden diese charakteristischen Fragmente nicht in den Fragmentationenspektren des Produkts zwischen Lys-50 und Lys-200 (FFKVPDNEE x KSAMF) identifiziert. Wahrscheinlich waren bei diesem Produkt andere Fragmentierungsstellen bevorzugt. Die spezifischen Fragmente wurden bevorzugt in Fragmentationenspektren von niedermolekularen Vernetzungsprodukten gefunden.

#### 4.3.4 Erstellung eines Strukturmodells des GCAP-2-Homodimers

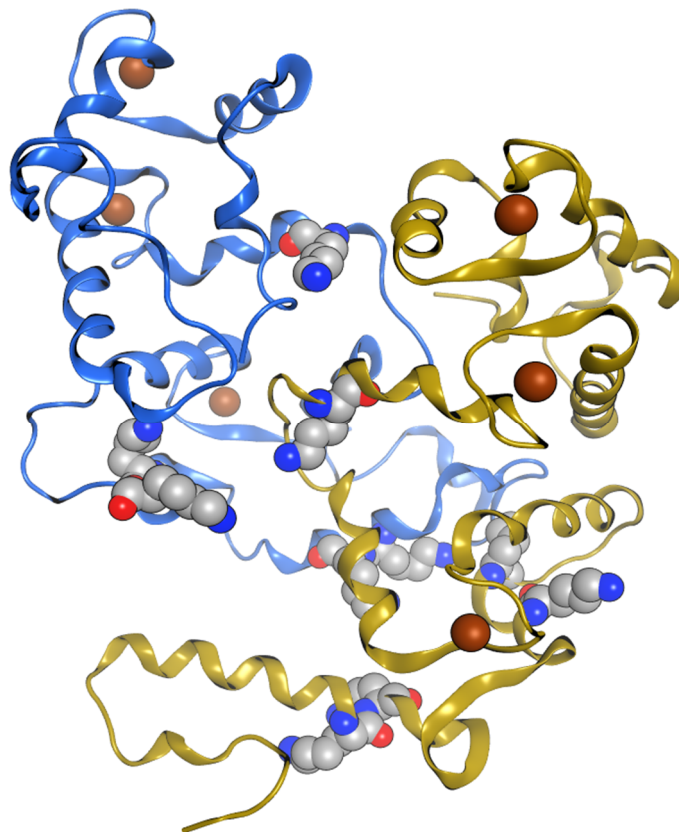
Die vier identifizierten intermolekularen Quervernetzungen flossen in die Berechnung eines Strukturmodells des Ca<sup>2+</sup>-gebundenen GCAP-2-Homodimers ein. Die Erstellung des Modells wurde von PD Dr. Iris Thondorf (Institut für Biochemie/Biotechnologie) durchgeführt. Das Modell wurde mit Hilfe von Protein-Protein-Docking-Experimenten, gefolgt von MD-Simulationen erstellt. Hierzu wurde eine passende Struktur des GCAP-2-Monomers im Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Zustand, welche durch Ames *et al.* mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmt

wurde [18], an verschiedene *Docking-Server* übermittelt und mögliche Anordnungen wurden berechnet. Die erhaltenen *Docking-Modelle* wurden unter Berücksichtigung der identifizierten Quervernetzungen gefiltert. Von den 93 erhaltenen Modellen erfüllten nur zwei die vorgegebenen Distanzbeschränkungen von maximal 25 Å für die C $\alpha$ -C $\alpha$ -Abstände der verknüpften Lysine. Diese zwei Modelle wurden einer MD-Simulation unterzogen (Kapitel 3.3.6). Während der Simulation stellte sich eines der Modelle als vergleichsweise instabil heraus. Deshalb wurde dieses Modell von der weiteren Berechnung ausgeschlossen. Das verbleibende, mittels *Docking* auf dem PatchDock-*Server* erhaltene, Modell zeigte eine stabile Konformation während der Simulation. Größere Fluktuationen wurden nur in als strukturell ungeordnet beschriebenen Bereichen [18], wie dem N-Terminus, den Bereichen zwischen den EF-Hand-Motiven 3 und 4 (AS 123-143) und Helices 2 und 3 (AS 18-35 und 41-53) beobachtet. Die relativen Positionen dieser beiden Helices waren dabei entscheidend hinsichtlich der Quervernetzung zwischen Lys-29/30 und Lys-46. Die C $\alpha$ -C $\alpha$ -Abstände lagen im Bereich von 14,1-17,3 Å und erfüllten somit alle die vorgegebene maximale Begrenzung von 25 Å (*Abb. 54 A*). Das erhaltene Modell ist in *Abb. 54 B* gezeigt. Dieses Modell stellt den ersten Strukturvorschlag für den GCAP-2-Homodimerkomplex in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> dar.

**A**



**B**



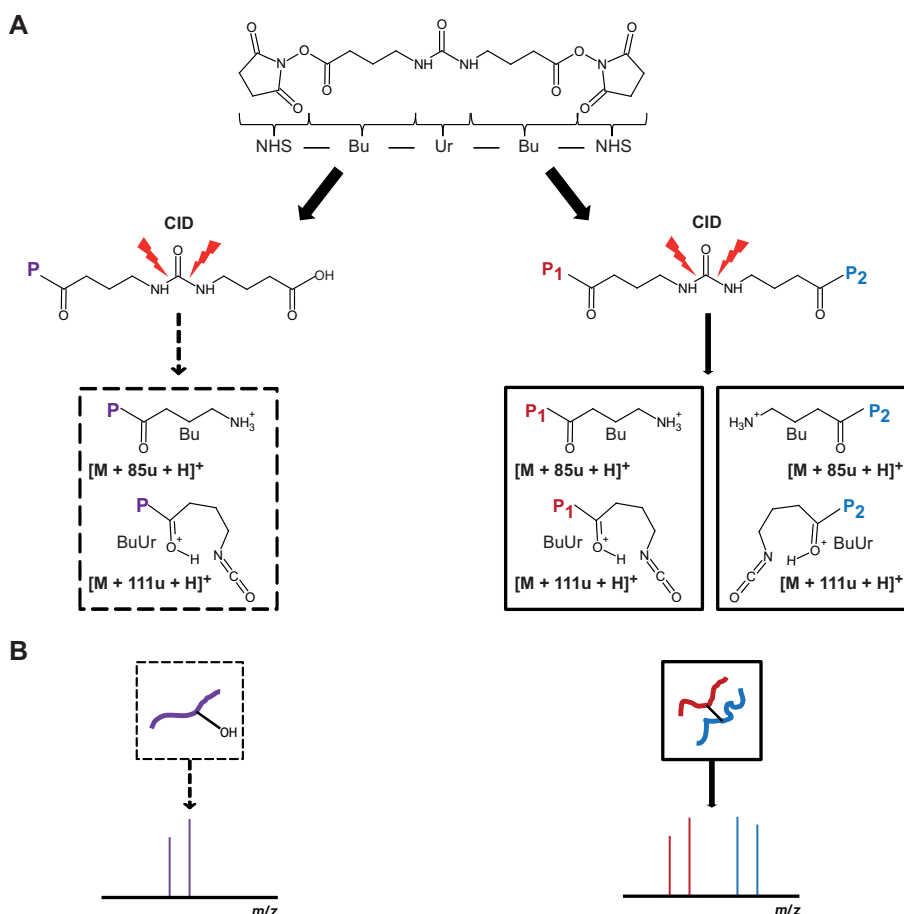
**Abb. 54 Modell des GCAP-2-Homodimers im Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Zustand.** **A:** Schematische Darstellung der quervernetzten Lysine mit den zugehörigen Ca-Ca-Distanzen in Angström. Es ist nur der Teil des GCAP-2 gezeigt, in dem die Quervernetzungen im Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Zustand identifiziert wurden. **B:** Die Struktur (zeitlich gemittelt) des Ca<sup>2+</sup>-beladenen GCAP-2-Homodimermodells: Die Monomere sind in blau und gelb gezeigt. Die vernetzten Lysine sind als Kalottenmodell (Kohlenstoff: grau; Stickstoff: blau; Sauerstoff: rot) und die Ca<sup>2+</sup>-Ionen als braune Kugeln hervorgehoben.

#### 4.4 Identifizierung von Quervernetzungsprodukten mit einem Harnstoff-basierten Quervernetzungsreagenz

Die größte Schwierigkeit bei der massenspektrometrischen Analyse quervernetzter Proteinkomplexe besteht in der verlässlichen Identifizierung der Quervernetzungsprodukte aus einer komplexen Mischung verschiedenster Peptidspezies. Eine Möglichkeit der vereinfachten Identifizierung ist die Verwendung von isotopenmarkierten Reagenzien bzw. Proteinen, wie in den vorhergehenden Experimenten gezeigt wurde. Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung von Quervernetzungsreagenzien, welche nach niederenergetischer CID-Fragmentierung charakteristische Fragmentationen erzeugen, an Hand derer die Produkte identifiziert werden können.

In unserer Arbeitsgruppe wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Mathias Schäfer (Universität zu Köln) ein CID-spaltbares Harnstoff-basiertes Quervernetzungsreagenz („Harnstoff-Reagenz“) entwickelt, welches auf Grund seiner charakteristischen Fragmentierung die Identifizierung und Unterscheidung verschiedener Quervernetzungsprodukte erlaubt [163]. Dieses Harnstoff-Reagenz besteht aus zwei mit *N*-Hydroxysuccinimid veresterten  $\gamma$ -Aminobuttersäuremolekülen, die über eine zentrale Harnstoffgruppe verknüpft sind (*Abb. 55*). Es reagiert bevorzugt mit Aminogruppen von Lysinseitenketten und den Protein-*N*-Termini. Wie bei anderen NHS-Estern sind zusätzlich Reaktionen mit Serinen, Threoninen und Tyrosinen möglich [125, 126]. Der Abstand zwischen den beiden reaktiven Gruppen beträgt 12,5 Å [163]; damit ist das Harnstoff-Reagenz länger als BS<sup>2</sup>G (7,7 Å) und etwa vergleichbar mit BS<sup>3</sup> (11,4 Å).

Bei Peptiden, die mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifiziert wurden, führt die CID-Fragmentierung zu charakteristischen Neutralverlusten von 129 u (Abspaltung von 1,3-Oxazepan-2,7-dion) und 103 u (Abspaltung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure). Im Fragmentationenmassenspektrum äußert sich dies in zwei Signalen (Dublett) mit einem charakteristischen Massenunterschied von 26 u [163, 196] (*Abb. 55*). Die Fragmentierung eines Produktes zweier interpeptidal verknüpfter Peptide resultiert in zwei Dublett-Signalen, jeweils mit einem charakteristischen Massenunterschied von 26 u, entsprechend  $[M + 85 \text{ u} + \text{H}]^+$  und  $[M + 111 \text{ u} + \text{H}]^+$  für beide Peptide [163, 196] (*Abb. 55*).



**Abb. 55 Schema zur CID-Fragmentierung der Quervernetzungsprodukte des Harnstoff-Reagenzes. A:** Dargestellt sind das Harnstoff-Reagenz und dessen Reaktionsprodukte. Links: Produkte die mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifiziert sind und dessen zu erwartende Fragmente; rechts: ein interpeptidales Quervernetzungsprodukt und dessen zu erwartende Fragmente. NHS: N-Hydroxysuccinimid; Bu:  $\gamma$ -Aminobuttersäure; Ur: Harnstoff-Gruppe; BuUr: Isocyanatfragment. **B:** Theoretische Dublett-Fragmentierungsmuster in den CID-Fragmentierungsmassenspektren nach Fragmentierung der Produkte, die mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifiziert sind (links) und nach Fragmentierung eines interpeptidalen Quervernetzungsproduktes (rechts).

#### 4.4.1 Automatisierte Identifizierung von GCAP-2-Quervernetzungsprodukten nach Reaktion mit dem Harnstoff-Reagenz

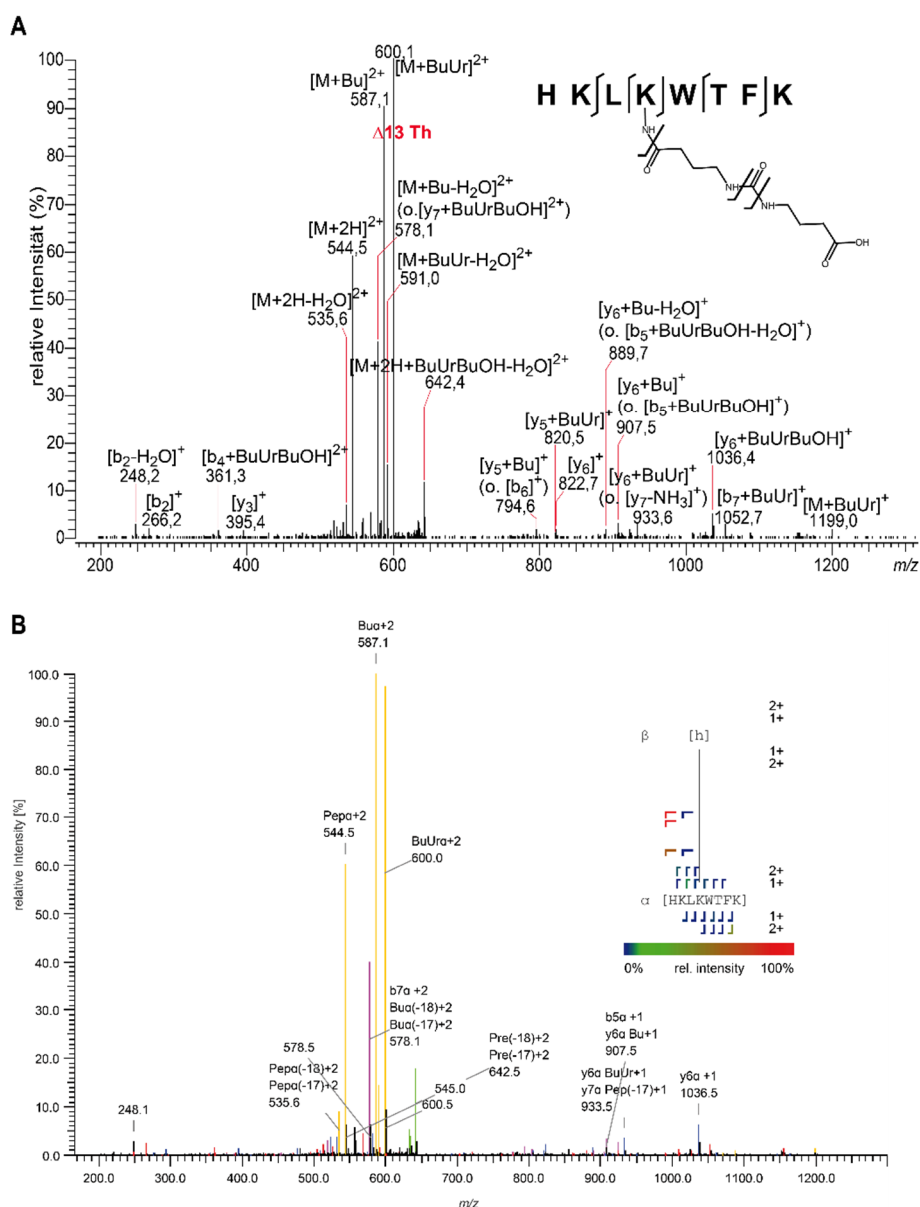
Kürzlich wurde von Dipl.-Biochem. Michael Götze (AG Wahle, Institut für Biochemie/Biotechnologie) in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe ein Programm namens „MeroX“ entwickelt. Dieses Programm ermöglicht die automatisierte Identifizierung und Annotierung von Quervernetzungsprodukten, die aus der Reaktion mit CID-spaltbaren Reagenzien hervorgehen. Die Einschätzung (*scoring*) eines Kandidaten hinsichtlich seiner Richtigkeit beruht hauptsächlich auf der charakteristischen Fragmentierung des Reagenzes und im geringeren Maße auf der des Peptidrückgrats. Eine Unterscheidung von vernetzten und nicht vernetzten Produkten sollte daher an Hand des *Scores* möglich sein. Die Berechnung des *Scores* erfolgt durch einen komplexen Algorithmus, der theoretische Fragmentationen des



Quervernetzungsreagenzes und der Peptide mit den tatsächlich gemessenen Signalen vergleicht. Dabei gehen neben den Intensitäten ebenso die Wahrscheinlichkeiten der jeweiligen Fragmentierung in den Score ein. Die Fragmente des Quervernetzungsreagenzes werden insgesamt stärker gewichtet. Für die Bestimmung zufälliger Ergebnisse werden die Spektren mit künstlich erzeugten Spektren verglichen in denen die Signale um  $n \times 1,9$  u ( $n = -2 - +2$ ) verschoben sind, was in die Berechnung des Scores mit einfließt.

Für die Entwicklung und Testung des Programms wurden Quervernetzungsreaktionen mit GCAP-2 und dem Harnstoff-Reagenz durchgeführt (Kapitel 3.2.2.2.2). Nach gelelektrophoretischer Trennung wurden die Banden auf Höhe des Monomers ausgeschnitten und mittels GluC und Trypsin im Gel gespalten (Kapitel 3.2.4.1.2). Die erhaltenen Proben wurden nach HPLC-Trennung direkt massenspektrometrisch analysiert (Kapitel 3.2.5.3). Anschließend wurden die Daten nach möglichen Quervernetzungsprodukten durchsucht und die zugehörigen Fragmentenmassenspektren manuell analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit denen einer automatisierten Suche mit MeroX verglichen.

In Übereinstimmung mit den manuell ermittelten Ergebnissen wurden durch MeroX im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen GCAP-2 insgesamt 12 mit partiell hydrolysiertem Harnstoff-Reagenz modifizierte Reste identifiziert (Tabelle-A 14). Ein weiteres modifiziertes Peptid (insgesamt 13) wurde im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2 ermittelt (Tabelle-A 15). In Abb. 56 ist beispielhaft die manuelle Annotation neben der automatischen Annotation durch MeroX gezeigt. Die Fragmentenmassenspektren nach Fragmentierung des zweifach geladenen GCAP-2-Peptids (HKLKWTFK;  $m/z$  651,3719), welches an Lys-98 modifiziert wurde, erlauben eine eindeutige Zuordnung. Die charakteristischen Fragmente des Harnstoff-Reagenzes wurden bei  $m/z$  600,1 (Addukt mit BuUr-Fragment, +111 u) und  $m/z$  587,1 (Addukt mit Bu-Fragment, +85 u) als doppelt geladene Signale mit einer Massendifferenz von 13 Th (entsprechend 26 u), sowohl manuell (Abb. 56 A), als auch automatisch durch MeroX (Abb. 56 B) zugeordnet. Die Fragmentierung des Harnstoff-Reagenzes führte zu den intensivsten Signalen im Spektrum. Durch Abspaltung des gesamten Harnstoff-Reagenzes wurde ein zusätzliches Signal bei  $m/z$  544,5 beobachtet. Mithilfe von MeroX wurden sowohl die charakteristischen Fragmenten des Harnstoff-Reagenzes als auch die Fragmenten des Peptidrückgrats automatisch erkannt und annotiert. Der durch die Software berechnete Score von 184 ermöglichte eine eindeutige Identifizierung dieses Kandidaten.



**Abb. 56** CID-Fragmentationenmassenspektren eines mit partiell hydrolysiertem Harnstoff-Reagenz modifizierten GCAP-2-Peptids. Das GCAP-2-Peptid (AS 95-102), welches an Lys-98 mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz-Molekül modifiziert ist, wurde nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  651,3719 in einer LC/MS-Analyse bei einer Retentionszeit von 49,6 min detektiert (Probe mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 min Reaktionszeit). **A:** Manuell annotiertes Fragmentationenmassenspektrum;  $M$  entspricht hierbei der Masse des unmodifizierten Peptids. **B:** Automatisch durch MeroX annotiertes Fragmentationenmassenspektrum. Das „h“ repräsentiert ein partiell hydrolysiertes Harnstoff-Reagenz in MeroX. Die charakteristischen mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifizierten Fragmente werden als „+Bu“ bzw. „Bua“ bezeichnet, die mit dem Isocyanatmolekül modifizierten als „+BuUr“ bzw. „BuUra“. Die Modifikation mit dem gesamten, unfragmentierten Reagenz-Molekül wird mit „+BuUrBuOH“ bezeichnet.

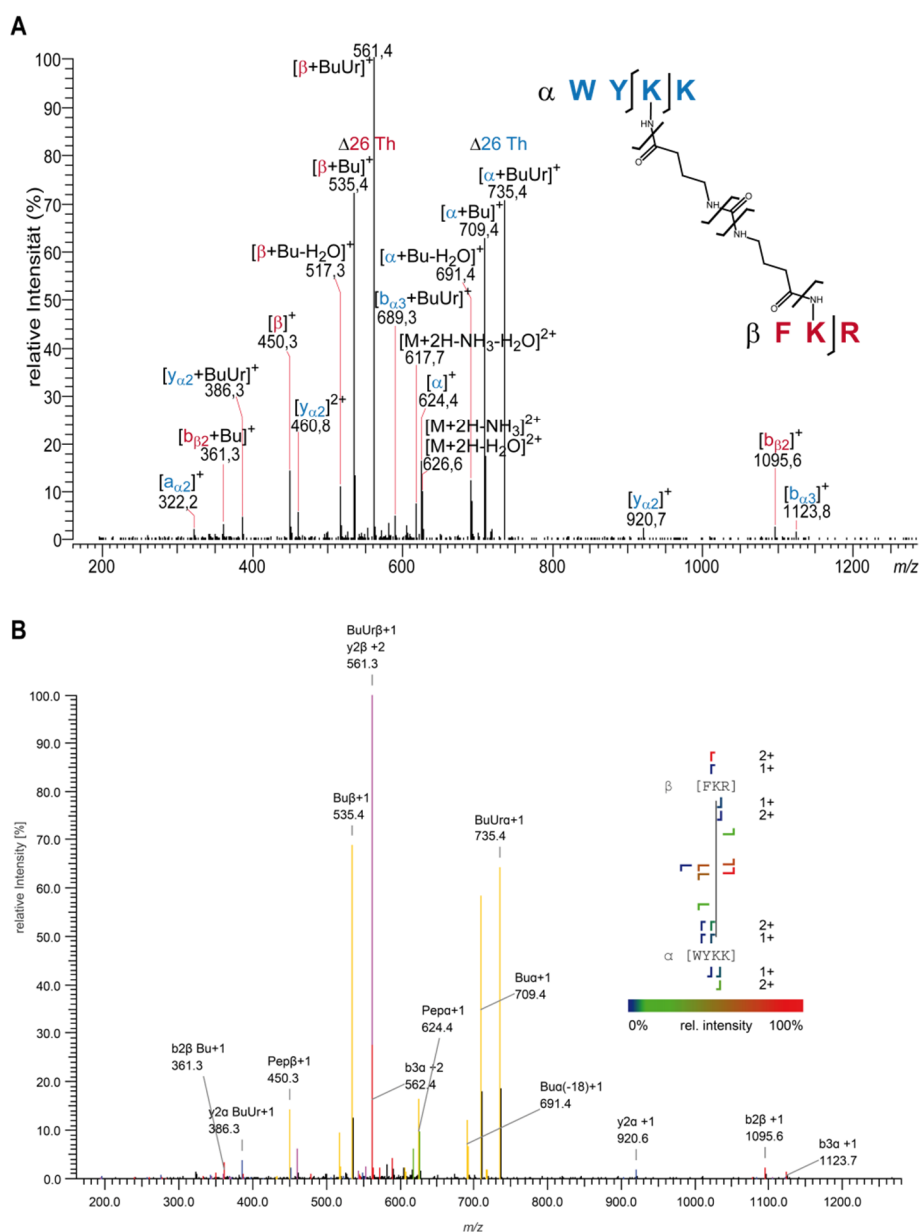
Interpeptidal quervernetzte Peptide können anhand zweier charakteristischer Signaldubletts identifiziert werden. Bei der Analyse einer  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Probe des quervernetzten GCAP-2-Monomers wurde ein Quervernetzungsprodukt zwischen Lys-29 ( $\alpha$ -Peptid WYKK) und Lys-46 ( $\beta$ -Peptid FKR) identifiziert. Die Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  635,3586 resultierte in zwei abundanten Dubletts, jedes mit einer Massendifferenz von 26 u (Abb. 57). Die mit dem Harnstoff-Reagenz modifizierten Fragmente

des  $\alpha$ -Peptids wurden als einfach geladene Signale bei  $m/z$  709,4 ( $[M_{\alpha}+Bu]^+$ ) und  $m/z$  735,4 ( $[M_{\alpha}+BuUr]^+$ ) detektiert. Die Signale des korrespondierenden Fragmentionenpaares  $[M_{\beta}+Bu]^+$  und  $[M_{\beta}+BuUr]^+$  des  $\beta$ -Peptides wurden bei  $m/z$  709,4 und 735,4 identifiziert. Analog zu den Fragmenten des modifizierten GCAP-2-Peptids wurden auch nach Fragmentierung des interpeptidal quervernetzten Produktes die Signale beider Einzelpeptide als einfach geladene Spezies bei  $m/z$  691,4 ( $\alpha$ -Peptid) und  $m/z$  450,3 ( $\beta$ -Peptid) beobachtet.

Die verbliebenen Signale geringerer Intensität wurden sowohl manuell wie auch automatisiert durch MeroX Fragmenten des Peptidrückgrats zugeordnet. Bei Vergleich des manuell annotierten Spektrums mit dem von MeroX annotierten zeigte sich eine vergleichbar gute Zuordnung. Kleinere Unterschiede wie die fehlende Zuordnung des  $[a_{\alpha 2}]^+$ -Fragmentions im MeroX-Spektrum ist mit den verwendeten Suchparametern zu erklären. Das identifizierte Produkt erhielt einen *Score* von 83.

Insgesamt konnten 29 interpeptidale Quervernetzungen im  $Ca^{2+}$ -gebundenen und 37 im  $Ca^{2+}$ -freien GCAP-2-Monomer ermittelt werden (*Tabelle-A 16* und *Tabelle-A 17*). Alle Produkte wurden von MeroX automatisch identifiziert und korrekt annotiert. Die zeitaufwendige manuelle Berechnung und Zuordnung der Fragmentionen kann in Zukunft somit deutlich vereinfacht werden.

Wie bereits erwähnt, beruht das Scoring von MeroX auf der charakteristischen Fragmentierung des Harnstoff-Reagenzes und sollte daher relativ verlässlich die Unterscheidung zwischen falsch positiven und wahren Quervernetzungen erlauben. Für die hier durchgeführten Analysen wurde ab einem *Score* von  $\geq 48$  kein falsch positiver Kandidat detektiert.



**Abb. 57** CID-Fragmentationenmassenspektren eines interpeptidalen Quervernetzungsproduktes des GCAP-2 zwischen Lys-29 und Lys-46. Das Quervernetzungsprodukt zwischen Lys-29 und Lys-46 des GCAP-2 wurde nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  635,3581 in einer LC/MS-Analyse bei einer Retentionszeit von 36,6 min detektiert (Probe mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 min Reaktionszeit). **A:** Manuell annotiertes Fragmentationenmassenspektrum;  $M$  entspricht hierbei der Masse des gesamten Quervernetzungsproduktes; Fragmente des  $\alpha$ -Peptids sind in blau und die des  $\beta$ -Peptids in rot dargestellt. **B:** Automatisch durch MeroX annotiertes Fragmentationenmassenspektrum; die charakteristischen mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifizierte Fragmente werden als „+Bu“ bzw. „Bu $\alpha$ “ bezeichnet, die mit dem Isocyanatmolekül modifizierte als „+BuUr“ bzw. „BuUr $\alpha$ “. Zusätzliche Fragmentationen der reinen Peptide werden als „ $\alpha$ “ bzw. „Pep $\alpha$ “ und „ $\beta$ “ bzw. „Pep $\beta$ “ bezeichnet.

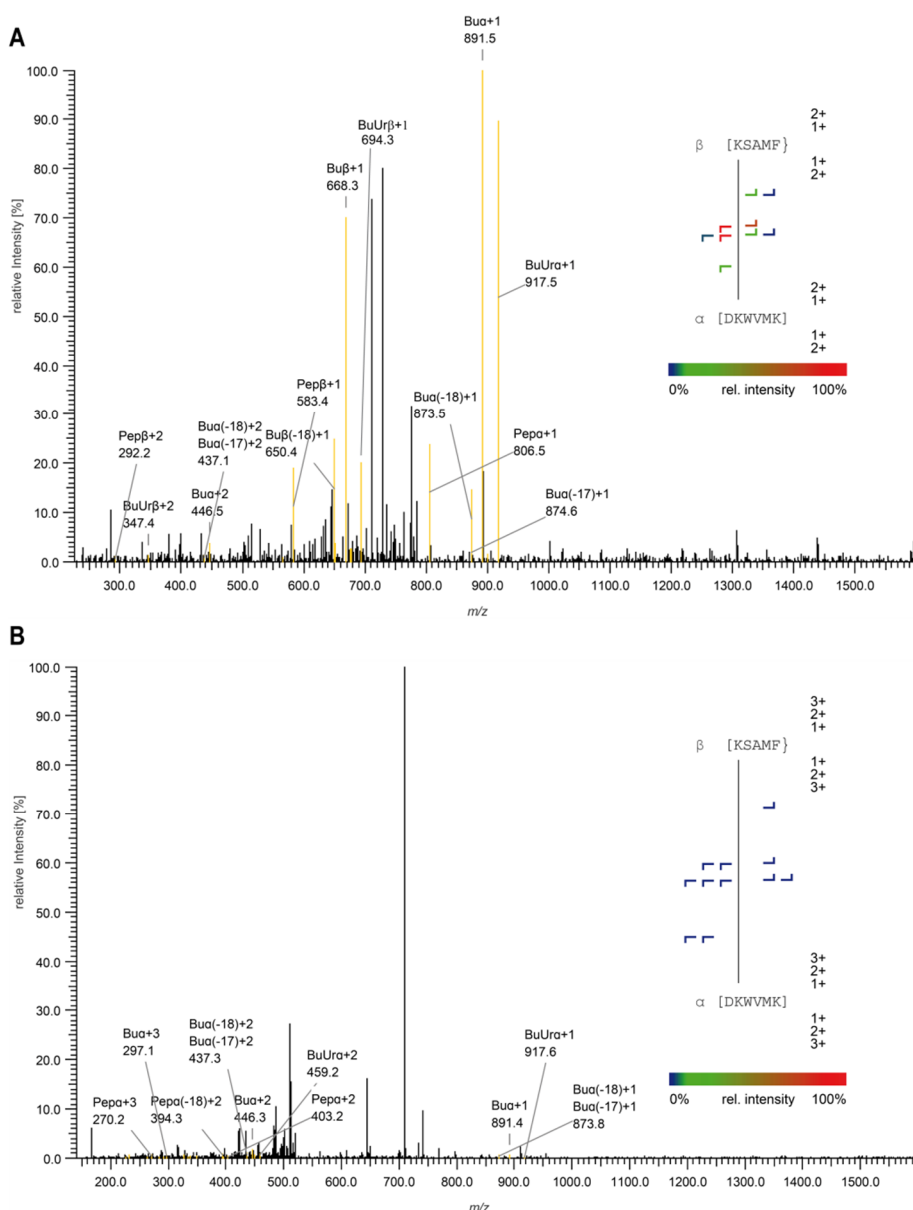
Laut der bekannten 3D-Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen GCAP-2 betragen die  $\text{C}_\alpha$ - $\text{C}_\alpha$ -Abstände fast aller im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand ermittelten Quervernetzungsprodukte weniger als 27 Å (Abb.-A 10 A). Dies stimmt mit der für Produkte des vergleichbaren Quervernetzungsreagenz  $\text{BS}^3$  bestimmten maximalen Distanz von 27,4 Å überein [115]. Einzige Ausnahme war die Vernetzung von Lys-29 und Lys-128. Unter den 22 NMR-Strukturen (PDB-Eintrag: 1JBA

[18]) variierten die  $C_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$ -Abstände dieser beiden Aminosäuren zwischen 31 Å und 35 Å. In Anbetracht der größeren Länge des Harnstoff-Reagenzes von 12,5 Å (BS<sup>3</sup> 11,4 Å) und einer gewissen Flexibilität des GCAP-2 ist dies jedoch akzeptabel. Die stärkere Vernetzung des  $Ca^{2+}$ -freien GCAP-2 mit mehreren  $C_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$ -Distanzen  $> 30$  Å deutet auf eine erhöhte Flexibilität und stimmt mit den bisherigen Ergebnissen überein (*Abb.-A 10 B*).

#### 4.4.2 Ladungsabhängige CID-Fragmentierung der interpeptidalen Quervernetzungsprodukte

Bei der Analyse der Quervernetzungsprodukte ergaben sich Hinweise auf einen ladungsabhängigen CID-Fragmentierungsmechanismus des Harnstoff-Reagenzes selbst. Auftreten und vor allem Intensität der typischen Fragmente des Harnstoff-Reagenzes unterschieden sich teilweise deutlich in Abhängigkeit vom Ladungszustand der fragmentierten Vorläuferionen. Die Fragmentierung zweifach geladener Quervernetzungsprodukte resultierte meist in abundanten Signalen der für das Harnstoff-Reagenz spezifischen Fragmentionen und entsprechend hohen *Scores*. Nach CID-Fragmentierung höher geladener Produkte ( $z \geq 3$ ) waren häufig weniger abundante oder teilweise keine Signale für die Harnstoff-Reagenz-spezifischen Fragmentionen erkennbar.

Beispielsweise wurden nach Fragmentierung eines zweifach geladenen Quervernetzungsprodukts ( $m/z$  792,8996) zwischen Lys-178 ( $\alpha$ -Peptid: DKWVMK) und Lys-200 ( $\beta$ -Peptid: KSAMF) des GCAP-2 abundante Signale für die Reagenz-spezifischen Fragmentionen beobachtet (*Abb. 58*). Die relativen Intensitäten der Signale des  $\alpha$ -Peptids betragen 100,0 % ( $[M_{\alpha}+Bu]^{+}$ ,  $m/z$  891,5) und 89,8 % ( $[M_{\alpha}+BuUr]^{+}$ ,  $m/z$  917,5) und derer des  $\beta$ -Peptids 70,1 % ( $[M_{\beta}+Bu]^{+}$ ,  $m/z$  668,3) und 20,0 % ( $[M_{\beta}+BuUr]^{+}$ ,  $m/z$  694,3). Dagegen wurden die betreffenden Fragmentionen nach CID-Fragmentierung der dreifach geladenen Spezies ( $m/z$  528,9352) mit einer sehr viel geringeren Intensität detektiert. Das intensivste Signal dieser Fragmentionen wurde bei  $m/z$  446,2 ( $[M_{\alpha}+Bu]^{+}$ ) mit einer relativen Intensität von 1,7 % und die der anderen Reagenz-spezifischen Fragmentionen mit einer relativen Intensität von  $< 1$  % bestimmt.



**Abb. 58** CID-Fragmentenmassenspektren eines GCAP-2-Quervernetzungsproduktes zwischen Lys-178 und Lys-200. Die automatische Annotation durch MeroX wird gezeigt. **A:** Fragmentenmassenspektrum nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  792,8996; **B:** Fragmentenmassenspektrum nach Fragmentierung des dreifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  528,9352; Die Fragmentenmassenspektren wurden während einer LC/MS-Analyse eines Reaktionsansatzes in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (30 min Reaktionszeit) bei 63,3-63,5 min detektiert. Die charakteristischen mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifizierten Fragmente werden als „Bua“ bezeichnet, die mit dem Isocyanatmolekül modifizierten als „BuUra“. Zusätzliche Fragmenten der beiden Peptide werden als „Pepa“ und „Pepβ“ bezeichnet. Die nicht annotierten Signale stammen von Fragmenten des Peptidrückgrats, die zur Verbesserung der Übersichtlichkeit hier nicht annotiert wurden.

Die Fragmentierung eines Quervernetzungsproduktes zweier in der GCAP-2-Sequenz aufeinanderfolgenden Peptide zwischen Lys-126 ( $\beta$ -Peptid: SIYKLLK) und Lys-129 ( $\alpha$ -Peptid: KABSVEVE) ergab ein ähnliches Bild (Abb.-A 11). Nach Fragmentierung der zweifach geladenen Spezies bei  $m/z$  934,4962 wurde das Fragmentenmassenspektrum durch die Signale der Reagenz-spezifischen Fragmenten dominiert. Das Produkt erhielt einen entsprechend hohen MeroX-Score von 54 und konnte damit eindeutig als wahres

interpeptidales Quervernetzungsprodukt bestätigt werden. Die Fragmentierung des dreifach geladenen Vorläuferions ( $m/z$  623,3329) führte zu Reagenz-spezifischen Fragmentionen mit einer relativen Intensität von weniger als 1 %. Aufgrund des entsprechend niedrigen MeroX-Scores von 7 und einer vergleichbar guten Zuordnung der Fragmentionen war eine Unterscheidung des Kandidaten von dem entsprechenden linearen Peptid mit einer Modifizierung durch ein partiell hydrolysiertes Harnstoff-Reagenz (MeroX-Score 20) nicht mehr möglich.

Die beschriebene Tendenz einer bevorzugten Fragmentierung des Peptidrückgrats trat sehr häufig, aber nicht durchgehend auf (weitere Beispiele siehe *Abb.-A 12* und *Abb.-A 13*). Nach genauerer Betrachtung der jeweils vernetzten Peptide lässt sich ein Zusammenhang zwischen der ladungsabhängigen Fragmentierung der Quervernetzungsprodukte und deren Peptidsequenzen vermuten. Die bevorzugte Spaltung des Peptidrückgrats wurde überwiegend für Produkte beobachtet, die bezogen auf die Nettoladung weniger freie basische Aminosäurereste beinhalten. Waren dagegen viele freie basische Aminosäurereste im Vergleich zur Nettoladung vorhanden, traten auch nach CID-Fragmentierung höher geladener Quervernetzungsprodukte ( $z \geq 3$ ) vermehrt abundante Reagenz-spezifische Fragmentionen auf. Da das vermehrte Auftreten von freien basischen Aminosäuren mit einer stärkeren lokalen Immobilisierung der vorhandenen Protonen einhergeht, scheint die Mobilität der Protonen eine entscheidende Rolle für die Fragmentierung der Quervernetzungsprodukte zu spielen.

Für die Verwendung des Harnstoff-Reagenzes sind zur sicheren Identifizierung von Quervernetzungsprodukten proteolytische Produkte mit mehreren basischen Resten und niedriger Ladung ( $z < 3$ ) vorteilhaft. Dies kann zum einen durch die Wahl der verwendeten Protease und zum anderen durch Verwendung einer Kombination aus verschiedenen Proteasen erreicht werden, was zu kleineren proteolytischen Produkten mit einer tendenziell niedrigeren Ladung führt.

#### **4.4.3 CID-Fragmentierung intrapeptidaler Quervernetzungsprodukte**

Für die zweifelsfreie Identifizierung der interpeptidalen Quervernetzungsprodukte ist die Unterscheidung von proteolytischen Spaltprodukten mit intrapeptidaler Vernetzung zweier Aminosäurereste essentiell. Die CID-Fragmentierung dieser Produkte führt durch eine Eliminierung von  $\gamma$ -Butyrolactam hauptsächlich zu einem dominanten Neutralverlust von 85 u [163]. Das zu erwartende abundante Signal für  $[M + nH - 85 u]^{n+}$  sollte somit eine Unterscheidung zu anderen Quervernetzungsprodukten (partiell hydrolysiertes Reagenz und interpeptidale Vernetzung) des Harnstoff-Reagenzes ermöglichen.

Bei der Analyse der mit dem Harnstoff-Reagenz quervernetzten GCAP-2-Proben wurden teilweise abweichende Fragmentierungen beobachtet. Nach Vergleich der CID-Fragmentenmassenspektren jeweils gleichgeladener (hier doppelt geladener) intrapeptidaler Quervernetzungsprodukte mit verschiedenen Aminosäuresequenzen (*Tabelle-A 18*), scheint auch hier ein Zusammenhang zwischen der Mobilität der vorhandenen Protonen und dem bevorzugten Fragmentierungsweg vorzuliegen.

Bei Peptiden mit mehreren basischen Resten, bei denen die Protonen lokal gebunden (nicht mobil) sind, wurde nach Fragmentierung hauptsächlich der erwartete Verlust von  $\gamma$ -Butyrolactam ( $[M + nH - 85 u]^{n+}$ ) beobachtet. Als Beispiel dient das intrapeptidale Quervernetzungsprodukt zwischen Lys-96 und Lys-98 des GCAP-2 (HKLKWTFK). Nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions ( $m/z$  642,3669) wurde der zweifach geladene Basispeak ( $m/z$  600,1) dem Vorläuferion nach Verlust des  $\gamma$ -Butyrolactam (-85 u) zugeordnet. Fragmentionen des Peptidrückgrats wurden dagegen nur mit geringer Intensität detektiert (*Abb.-A 14 A*).

Gleiches wurde nach CID-Fragmentierung intrapeptidal vernetzter Peptide mit basischen und sauren Aminosäuren, aber überwiegend basischen Eigenschaften beobachtet.

Dagegen wurde bei intrapeptidal vernetzten Peptiden, die mehrere saure und wenige bis keine basischen Aminosäuren enthalten, der entsprechende Neutralverlust gar nicht oder nur mit sehr niedriger Intensität beobachtet. Dies ist am Beispiel des intrapeptidalen Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-129 und Ser-132 (KABSVEVE) zu erkennen. Nach CID-Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions ( $m/z$  559,2634) wurden hauptsächlich Spaltungen des Peptidrückgrats beobachtet. Das Signal für den entsprechenden Neutralverlust des Vorläuferions war dagegen nicht detektierbar (*Abb.-A 14 B*). Gleiches galt für das Peptid DKWVMKMLQMD. Bei diesem Produkt waren die zwei einzigen basischen Reste (Lys-178 und Lys-182) vernetzt und standen somit nicht mehr für die Immobilisierung der Protonen zur Verfügung.

Die uneinheitliche und sequenzabhängige Fragmentierung der intrapeptidalen Quervernetzungsprodukte (siehe auch *Abb.-A 14 C*) erschwerte zum einen die zweifelsfreie Identifizierung dieser Produkte und zum anderen eine eindeutige Zuordnung der vernetzten Aminosäurereste.

Aufgrund der abweichenden Fragmentierung gegenüber den anderen Quervernetzungsprodukten des Harnstoff-Reagenzes (partiell hydrolysiertes Reagenz und interpeptidale Vernetzung) war aber dennoch eine Unterscheidung möglich.



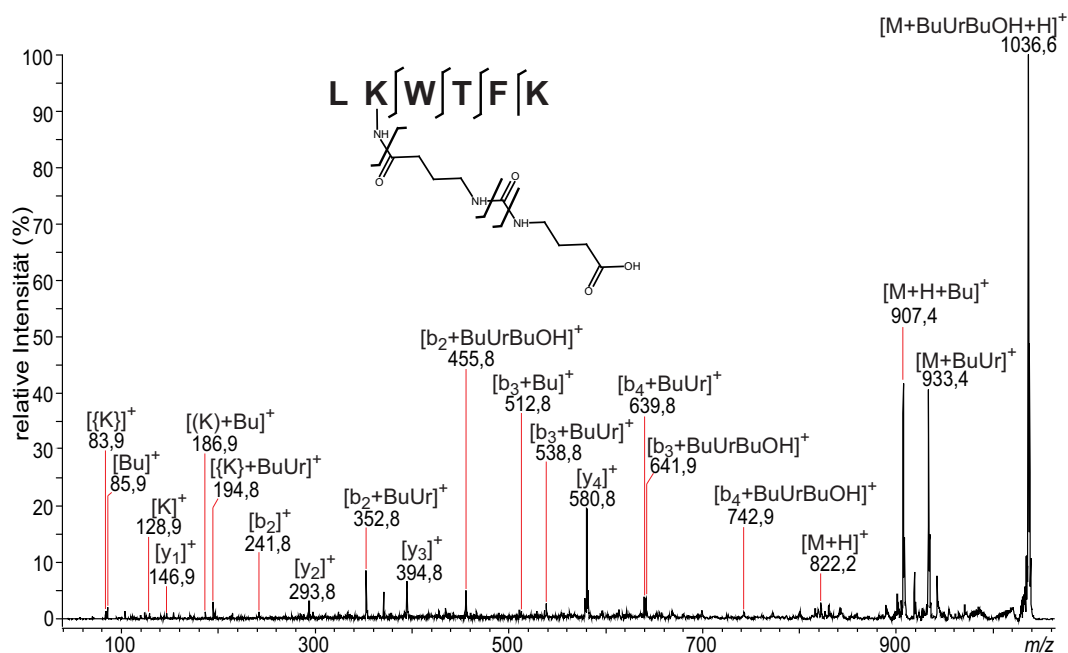
#### 4.4.4 Analyse der Quervernetzungsprodukte mittels Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse von Quervernetzungsprodukten des Harnstoff-Reagenzes wurde ursprünglich die Ionisierung mittels MALDI favorisiert [163, 197]. Bei der Ionisierung mittels MALDI entstehen bevorzugt einfach geladene Vorläuferionen. Da jedes Peptid mindestens eine basische Gruppe am *N*-Terminus sowie, im Falle tryptischer Peptide, eine weitere am *C*-Terminus enthält, ist eine lokale Bindung des Protons und damit die Fragmentierung am Reagenz-Molekül selbst wahrscheinlich.

Ergänzend zu den LC/ESI-MS-Analysen wurden deshalb die Quervernetzungsprodukte des Harnstoff-Reagenzes zusätzlich mit LC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie untersucht.

*Abb. 59* zeigt beispielhaft das Fragmentenmassenspektrum eines an Lys-98 mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifizierten GCAP-2 Peptids (LKWTFK). Nach Fragmentierung des einfach geladenen Vorläuferions ( $m/z$  1036,589) wurden neben dem Basispeak des Vorläuferions die Reagenz-spezifischen Fragmentationen als zweithöchste Signale bei  $m/z$  907,4 und 933,4 mit einer charakteristischen Massendifferenz von 26 u beobachtet.

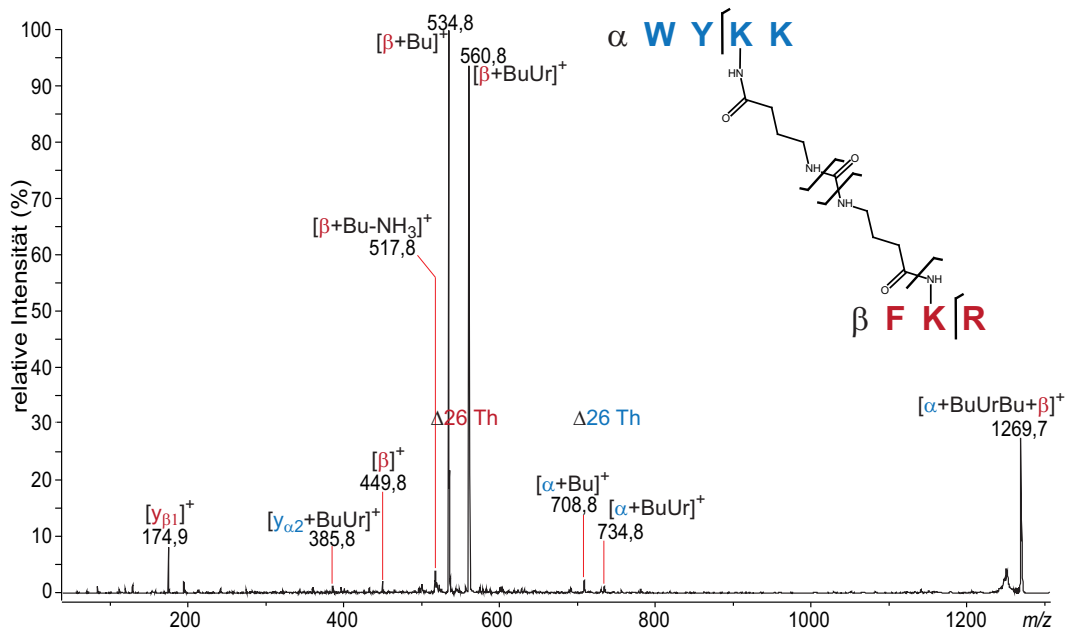
Insgesamt wurden sieben Lysine im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und sechs Lysine im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen GCAP-2 als mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifizierte Aminosäuren identifiziert (*Tabelle-A 19* und *Tabelle-A 20*). Die ermittelten Reaktionsstellen stimmen mit denen der LC/ESI-MS/MS-Analyse überein.



**Abb. 59 MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenmassenspektrum eines mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifizierten GCAP-2-Peptids.** Das GCAP-2-Peptid (AS 97-102), welches an Lys-98 modifiziert ist, wurde nach Fragmentierung des einfach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  1036,589 während der Analyse einer Probe mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 30 min Reaktionszeit detektiert.  $M$  entspricht der Masse des unmodifizierten Peptids. Die charakteristischen mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifizierten Fragmente werden als „+Bu“ bezeichnet, die mit dem Isocyanatmolekül modifizierten als „+BuUr“. Die Modifikation mit dem gesamten, unfragmentierten Reagenz-Molekül wird mit „+BuUrBuOH“ bezeichnet. Fragmente, die mit einem Tetrahydropyridiniumion modifiziert vorliegen, sind mit {K} gekennzeichnet (siehe Abb. 53).

Verglichen mit der LC/ESI-MS/MS-Analyse wurde bei den Messungen mittels LC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS nur ein Bruchteil der zuvor identifizierten interpeptidalen Quervernetzungen gefunden. Lediglich sieben Quervernetzungen wurden jeweils im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand ermittelt. Diese stimmten mit denen der LC/ESI-MS/MS-Analyse überein.

Auffällig war, dass nach Fragmentierung dieser Quervernetzungsprodukte häufig nur ein abundantes Dublett für eines der Peptide beobachtet wurde. Das Dublett des zweiten Peptids wurde nur mit sehr geringer Intensität oder gar nicht detektiert. In Abb. 60 ist das Fragmentationenmassenspektrum des Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-29/30 ( $\alpha$ -Peptid: WYKK) und Lys-46 ( $\beta$ -Peptid: FKR) des GCAP-2 gezeigt. Nach Fragmentierung des einfach geladenen Vorläuferions ( $m/z$  1269,698) wurden dominante Dublett-Signale bei  $m/z$  534,8 ( $[\text{M}_\beta+\text{Bu}]^+$ , 100 % rel. Int.) und 560,8 ( $[\text{M}_\beta+\text{BuUr}]^+$ , 93,5 % rel. Int.) für das  $\beta$ -Peptid detektiert. Die komplementären Fragmentationen des  $\alpha$ -Peptid konnten nur mit sehr geringen Intensitäten bei  $m/z$  708,8 ( $[\text{M}_\alpha+\text{BuUr}]^+$ , 2,2 % rel. Int.) und 734,8 ( $[\text{M}_\beta+\text{BuUr}]^+$ , 1,3 % rel. Int.) detektiert werden.



**Abb. 60 MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenmassenspektrum eines interpeptidalen Quervernetzungsprodukts des GCAP-2.** Das Quervernetzungsprodukt zwischen Lys-29/30 und Lys-46 des GCAP-2 wurde nach Fragmentierung des einfach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  1269,698 während der Analyse einer Probe mit 10 mM EGTA und 30 min Reaktionszeit detektiert. Fragmente des  $\alpha$ -Peptids sind in blau und die des  $\beta$ -Peptids in rot dargestellt. Die charakteristischen, mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifizierten Fragmente werden als „+Bu“ bezeichnet, die mit dem Isocyanatmolekül modifizierten als „+BuUr“.

Weiterhin wurden jeweils vier Produkte intrapeptidaler Quervernetzungen ( $\pm$ -Ca<sup>2+</sup>) identifiziert, welche alle durch einen markanten 85 u-Verlust und wenige zusätzliche Fragmentationen im Fragmentationenspektrum gekennzeichnet waren.

Insgesamt zeigte sich, dass für eine verlässliche Identifizierung interpeptidal vernetzter Produkte, welche die wichtigsten Informationen zur strukturellen Analyse von Proteinstrukturen liefern, zweifach positiv geladene Vorläuferionen optimal sind.

Die Ionisierung mittels ESI scheint insgesamt für die Analyse der Quervernetzungsprodukte sehr gut geeignet und liefert zudem detaillierte Informationen über die exakten Reaktionsstellen innerhalb der vernetzten Peptide.

## 5 Diskussion

### 5.1 Potential der unterschiedlichen Quervernetzungsstrategien für die Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen

Die Kombination aus chemischer Quervernetzung und hochauflösender Massenspektrometrie der erhaltenen Produkte ist eine leistungsstarke alternative Methode zur Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen in Lösung. Dabei ist es möglich, auch transiente Interaktionen zu erfassen und dynamische Strukturänderungen zu untersuchen. Besonders vorteilhaft sind die im Vergleich zu anderen Strukturanalysen geringen Proteinmengen, die benötigt werden, und die theoretisch unbegrenzte Größe der zu untersuchenden Proteinkomplexe. Neben den bereits erwähnten Komplexen des 1-MDa TRiC/CCT Chaperonin [113, 114] und der 670-kDa RNA-Polymerase II-TFIIF [115] wurde kürzlich die Struktur der 1,6-MDa 39S-Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms mit einer Kombination aus Kryoelektronenmikroskopie und chemischen Quervernetzungsexperimenten aufgeklärt [198]. Auch die Analyse ganzer Proteinnetzwerke ist mittels Quervernetzung und MS möglich [199].

Durch Verwendung von Quervernetzungsreagenzien mit unterschiedlichen Längen und Reaktivitäten lassen sich komplementäre Resultate gewinnen, die in der Kombination zur Erstellung aussagekräftiger 3D-Strukturmodelle genutzt werden können.

Mit Hilfe homobifunktioneller aminreaktiver Reagenzien, wie BS<sup>2</sup>G, lassen sich in relativ kurzer Zeit (Minuten) und unter physiologischen pH-Bedingungen Quervernetzungen zwischen Lysinseitenketten einführen und Proteinstrukturen fixieren. Aufgrund der Flexibilität der Aminosäureseitenketten und des Reagenzes selbst, werden anstatt der N<sub>ε</sub>-N<sub>ε</sub>-Abstände häufig die C<sub>α</sub>-C<sub>α</sub>-Abstände angegeben. Unter Berücksichtigung der Länge des BS<sup>2</sup>G (7,7 Å) und der der Lysinseitenketten (6-6,5 Å) sowie einer gewissen Flexibilität von Reagenz und Protein können C<sub>α</sub>-C<sub>α</sub>-Distanzen von maximal 25 Å angenommen werden [132]. Bei längeren Reagenzien, wie dem in dieser Arbeit verwendeten Harnstoff-Reagenz (12,5 Å [163]), sind demnach Abstände bis ca. 29 Å möglich. Solche Reagenzien eignen sich deshalb besonders für die Untersuchung von Proteinkomplexen, in denen größere Abstände zwischen verschiedenen Domänen bestimmt werden sollen, wie dem hier untersuchten Homodimer des GCAP-2 (Kapitel 4.3). Bei kleineren Proteinkomplexen ist deren Potential aufgrund der geringen Auflösung begrenzt. Dies wird am Beispiel des GCAP-2/GC-Peptid-Komplexes deutlich, bei dem anhand der Quervernetzungen mit BS<sup>2</sup>G keine Unterscheidung zwischen dem Ca<sup>2+</sup>-gebundenen und freien Zustand möglich ist (Kapitel 4.1.1.1; *Abb. 27 B*).

Für die Bestimmung sehr kurzer Abstände innerhalb von Proteinkomplexen hat sich die Verwendung kurzer photoreaktiver Reagenzien bewährt. Die weniger spezifische Reaktion der photoreaktiven Gruppe ist in diesem Fall vorteilhaft, da es die Wahrscheinlichkeit einer Vernetzung erhöht und die Reaktion mit hydrophoben Resten ermöglicht. Photoreaktive Aminosäuren ermöglichen die Vernetzung einer bestimmten Region und somit eine relativ genaue Positionsbestimmung. Die erfolgreiche Anwendung zur Bestimmung von Sekundärstrukturen kurzer Peptide wurde gezeigt [200]. Die Kombination aus chemischer Quervernetzung und Photoaffinitätsmarkierung wurde erfolgreich für die Untersuchung des Komplexes aus CaM und einem Munc13-Bindungspeptid verwendet [132]. Eine vergleichbare Strategie kam in dieser Arbeit zur Analyse der GCAP-2/GC-Peptid-Komplexe zum Einsatz. Die Verwendung von Photo-Leu ermöglichte in dieser Arbeit eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Zuständen des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes (Kapitel 4.1.1.2; *Abb. 31*).

Bei den Analysen werden die Konzentrationen der Vernetzungsreagenzien und die Reaktionsbedingungen so angepasst, dass eine ausreichende Vernetzung der Proteine erreicht wird, ohne Artefakte zu erzeugen. Die verschiedenen Spezies werden meist mittels SDS-PAGE getrennt. Die Extraktion der vernetzten Proteolyseprodukte ist im Allgemeinen unvollständig [108]. Daher und aufgrund ihrer geringen Konzentration weisen sie in den Massenspektren meist eine geringe Intensität auf.

Deshalb erfolgte bei den LC/MS-Analysen im LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer lediglich die Detektion der Vorläuferionenmassenspektren hochaufgelöst im Orbitrap-Analysator, die Detektion der Fragmentionenmassenspektren wegen der höheren Sensitivität jedoch in der linearen Ionenfalle. Niederaufgelöste Fragmentionenmassenspektren lassen aufgrund der geringeren Massengenauigkeit häufig die Zuordnung mehrerer Fragmente für ein Signal zu. Die zweifelsfreie Identifizierung von Quervernetzungsprodukten anhand von Vorläuferionenmasse und nieder aufgelösten Fragmentionenmassen ist darum bei der Analyse komplexer Peptidmischungen problematisch.

In dieser Arbeit kamen verschiedene Strategien zur verbesserten Identifizierung von Quervernetzungsprodukten zum Einsatz (*Abb. 23*). Die Verwendung isotoopenmarkierter Reagenzien ist hierbei eine gut etablierte Möglichkeit [121, 122, 199]. Bei der Analyse der GCAP-2/GC-Peptid-Komplexe ermöglichte die Verwendung einer 1:1-Mischung des nicht-deuterierten und vierfach-deuterierten BS<sup>2</sup>G die Identifizierung potentieller Quervernetzungsprodukte anhand ihrer charakteristischen Isotopenmuster im Übersichtsmassenspektrum (siehe *Abb. 28*). Noch bedeutsamer ist die Isotopenmarkierung photoreaktiver Aminosäuren. Die zwar sterisch aussagekräftige, dafür aber hinsichtlich der

verknüpften Reste unspezifische Reaktion führt zu entsprechend komplexen Datensätzen. Weiterhin führt die Fragmentierung der Quervernetzungsprodukte von Bpa mittels CID häufig zu niedrig abundanten Fragmentationen (Kapitel 4.1.2 und 4.2.4). Mithilfe einer 1:1-Mischung aus nicht-markierten und sechsfach  $^{13}\text{C}$ -markierten Bpa-Peptiden wurde eine vereinfachte Identifizierung der Quervernetzungsprodukte anhand der Isotopenmuster erreicht (z.B. *Abb. 39* und *Abb. 44*). Der Vergleich der Fragmentationenmassenspektren der einzelnen Spezies ermöglichte die verlässliche Identifizierung der exakten Reaktionsstellen, da auch niedrig abundante Fragmentationen anhand ihrer charakteristischen Massendifferenz identifiziert werden konnten. Die Isotopenmarkierung ließ ebenfalls die Identifizierung bisher unbekannter Fragmentationen zu, die anhand der Massendifferenzen den quervernetzten Peptiden zugeordnet werden konnten.

Eine weitere, erfolgreich in dieser Arbeit verwendete Methode stellt die Verwendung von isotopenmarkierten Proteinen zur Analyse von Homodimeren dar (Kapitel 4.3) [153, 201]. Die resultierenden Isotopenmuster der verknüpften Peptide erlaubten eine eindeutige Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularen Quervernetzungen (Kapitel 4.3.1, *Abb. 51*) sowie die exakte Identifizierung der jeweiligen Interaktionsstellen (Kapitel 4.3.2). Zusätzlich konnten damit charakteristische Fragmentationen, die bei der Verwendung von NHS-Esterreagenzien auftreten können [195], bestätigt werden (Kapitel 4.3.3).

Trotz der verbesserten Identifizierung ist gerade bei der Verwendung von homobifunktionellen Reagenzien, wie  $\text{BS}^2\text{G-D}_0/\text{D}_4$ , nicht immer eine eindeutige Unterscheidung der verschiedenen Quervernetzungsprodukte möglich. Alle Produkte (interpeptidal, intrapeptidal und partiell hydrolysiert) zeigen ein charakteristisches Isotopenmuster, lassen bei isobaren Spezies aber nicht immer eine eindeutige Differenzierung anhand der Fragmentationenmassenspektren zu. Das CID-MS/MS-spaltbare Harnstoff-Reagenz ermöglicht eine Unterscheidung der Quervernetzungsprodukte anhand der charakteristischen Spaltung an der zentralen Harnstoff-Gruppe [163]. Typisch für partiell hydrolysierte Produkte ist ein einzelnes 26 u-Dublett im Fragmentationenmassenspektrum (*Abb. 55* und *Abb. 56*). Im Gegensatz dazu zeigen Spektren interpeptidaler Quervernetzungen zwei getrennte 26 u-Dubletts (*Abb. 55* und *Abb. 57*). Diese Spaltprodukte treten zuverlässig nach Fragmentierung von zweifach geladenen Produkten auf und lassen eine zuverlässige automatisierte Identifizierung mit der eigens dafür entwickelten MeroX-Software zu (Kapitel 4.4.1).

## 5.2 Strukturelle Analysen an GCAP-2 und GCAP-2/ROS-GC-Peptidkomplexen

### 5.2.1 GCAP-2/GC-Peptid-Interaktionen

Bisher existieren keine hochauflösenden dreidimensionalen Strukturdaten von ROS-GC 1 bzw. des Komplexes aus GCAP-2 und ROS-GC 1. Lediglich eine Lösungsstruktur des nicht myristoylierten  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen GCAP-2 wurde mittels NMR ermittelt (PDB-Eintrag 1JBA [18]). Die Struktur des myristoylierten GCAP-2 konnte aufgrund der niedrigen Löslichkeit bisher nicht bestimmt werden [18]. Zur Gewinnung erster struktureller Informationen wurden sowohl das isolierte myristoylierte GCAP-2 als auch Komplexe aus myristoyliertem GCAP-2 und zwei potentiellen GCAP-2-Bindungspeptiden der ROS-GC 1 analysiert. Die Interaktion eines potentiellen Bindungsmotivs aus der C-terminalen Erweiterung der ROS-GC (GC-Peptid 1) mit GCAP-2 wurde in einer vorangegangenen Studie über Oberflächenplasmonresonanz-spektroskopische Untersuchungen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  nachgewiesen und ein  $K_D$ -Wert von ca.  $1,9 \mu\text{M}$  bestimmt [36]. Für GC-Peptid 2 aus der Juxtamembrandomäne der ROS-GC 1 gibt es bisher nur Hinweise auf eine Interaktion mit GCAP-1 [40].

Distanzinformationen bezüglich der GCAP-2/GC-Peptid-Komplexe im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand wurden mittels BS<sup>2</sup>G-Vernetzung gewonnen. Chemische Quervernetzungen mithilfe des Harnstoff-Reagenzes lieferten äquivalente Informationen über das freie  $\text{Ca}^{2+}$ -beladene GCAP-2. Beide stimmen weitgehend mit der vorhandenen NMR-Struktur des unmyristoylierten GCAP-2 überein. Dies deutet auf eine vergleichbare Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen myristoylierten GCAP-2 sowohl im isolierten Zustand als auch im Komplex mit dem GC-Peptid 1. Da die Myristoylierung für die Aktivierung und Bindung der ROS-GC nicht essenziell ist [22], war dies vermutet worden [18]. Die wenigen intramolekularen Quervernetzungen mit BS<sup>2</sup>G im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand des Komplexes ließen keine eindeutige strukturelle Differenzierung zu. Dagegen impliziert die generell stärkere und diverse Vernetzung des isolierten GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz, besonders im Bereich der N-terminalen Helix der EF-Hand 1, aufgrund mehrerer längerer Distanzen eine Konformationsänderung bzw. eine hohe Flexibilität. Dies passt zu der Beobachtung, dass Cys-35 im *Loop*-Bereich der EF-Hand 1 im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand leichter zugänglich ist als im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen [28]. NMR-Analysen des unmyristoylierten,  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2 ergaben breite und schlecht aufgelöste Signale, die typisch für entfaltete oder aggregierte Proteine sind [18]. CD-spektroskopische Analysen wiesen allerdings auf eine geordnete Struktur mit einem

helikalen Anteil von 60 % hin [18] und belegten eine Konformationsänderung zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2 [202]. Das veränderte Migrationsverhalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und gebundenen GCAP-2 bei den SDS-PAGE-Analysen ist aus der Literatur bekannt [11, 28] und wurde auch hier beobachtet und ist wahrscheinlich auf stabile Reststrukturen zurückzuführen, die charakteristisch für den jeweiligen Zustand sind.

Bei den massenspektrometrischen Analysen der Protein/Peptid-Interaktionen wurde eine Komplexbildung von GCAP-2 sowohl mit GC-Peptid 1 als auch mit GC-Peptid 2 in An- und Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  bestätigt. Aufgrund der Länge des  $\text{BS}^2\text{G}$ -Reagenzes und der damit verbundenen geringen strukturellen Aussagekraft war eine exakte Charakterisierung dieser Komplexe nicht möglich. Dies gelang erst mithilfe der Photo-Leu-markierten Peptide aus der C-terminalen Erweiterung der ROS-GC. Die Ergebnisse deuten auf definierte Interaktionsstellen der beiden Peptidvarianten (GC-Photo-Peptid 1a und b) im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand hin und ermöglichten unter Verwendung der  $\text{BS}^2\text{G}$ -Quervernetzungen die Berechnung eines 3D-Strukturmodells (*Abb. 33*) auf Grundlage der bekannten NMR-Struktur (PDB-Eintrag 1JBA [18]). Dies sind die ersten strukturellen Daten dieses Komplexes, die erste strukturelle Einblicke hinsichtlich der Orientierung der Bindungsregion aus ROS-GC 1 und der Interaktionsfläche des GCAP-2 ermöglichen. Aussagen über den Gesamtkomplex aus ROS-GC 1 und GCAP-2 sind damit allerdings nicht möglich. Aufbauend auf diesem Modell sind weiterführende Studien mit einzelnen Domänen der ROS-GC bzw. dem Gesamtprotein möglich. Die Quervernetzungen der Photopeptide im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand zeigten hingegen keine definierte Interaktion. Die über das gesamte GCAP-2-Molekül verteilten Quervernetzungen ließen keine Eingrenzung der Interaktionsfläche oder Rückschlüsse auf die Orientierung des Peptids zu. Dies könnte entweder auf eine unspezifische Bindung des Peptids im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand oder eine globale Konformationsänderung des GCAP-2 hindeuten.

Die Analysen mit dem um N-terminal sechs Reste verlängerten GC-Photo-Peptid 3 in An- und Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  ergaben eine spezifische Interaktion von Bpa-7 mit Met-64 des GCAP-2. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass sich ein definierter Komplex im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand erst bei Verwendung längerer Peptide bzw. ganzer Domänen bildet. So unterscheidet sich die Interaktion zwischen CaM und Bindepeptiden der Munc13-Proteine je nach Länge des eingesetzten Peptides [132, 203]. Für strukturelle Einblicke in die Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2/ROS-GC-Komplexes sind deshalb Studien mit größeren Domänen unerlässlich.

Bei den Untersuchungen mit GC-Peptid 2 aus der Juxtamembrandomäne der ROS-GC 1 wurde mithilfe von  $\text{BS}^2\text{G}$  zwar der intakte Protein/Peptid-Komplex nachgewiesen, nach



proteolytischer Spaltung konnten aber keine quervernetzten Produkte identifiziert werden (Kapitel 4.1.2). Eventuell wurden kaum Quervernetzungsprodukte gebildet, so dass sie bei der LC/MS-Analyse nicht detektiert wurden. Möglich ist auch, dass die Produkte zu klein oder zu groß waren, was die massenspektrometrische Analyse erschwerte. Während der SDS-PAGE-Analyse der GCAP-2/GC-Photo-Peptid 2a und b-Komplexe wurden die Peptide in den untersuchten Gelbanden nachgewiesen und bestätigten die Komplexbildung (Abb. 24). Aufgrund der fehlenden Isotopenmarkierung und der ineffizienten Fragmentierung der Bpa-Quervernetzungsprodukte konnte nur eine Quervernetzung im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand zwischen GC-Photo-Peptid 2a und Met-64 des GCAP-2 sicher identifiziert werden, was einen ähnlichen Interaktionsbereich wie GC-Photo-Peptid 3 vermuten lässt. Die beiden im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Komplex identifizierten Verknüpfungsstellen unterstützen die Annahme unterschiedlicher Konformationen. Eine Interaktion des GC-Peptids 2 wurde zwar bestätigt, da die erhaltenen Produkte jedoch nicht zweifelsfrei charakterisierbar waren, war die Erstellung von Strukturmodellen auf dieser Basis nicht sinnvoll.

Grundsätzlich ist die Bindung dieses aus der Juxtamembrandomäne von ROS-GC 1 abgeleiteten Peptides an GCAP-2 eher unerwartet. Bisherigen Studien zufolge bindet und aktiviert GCAP-2 sein Zielprotein ROS-GC 1 an der C-terminalen katalytischen Domäne (Abb. 5). Die Bindung und Aktivierung an die Juxtamembrandomäne der ROS-GC 1 wurde nur für GCAP-1 nachgewiesen [29, 36]. Ein postuliertes gemeinsames Bindungsmotiv von GCAP-1 und 2 aus der katalytischen Domäne [204] unterstützt die Vermutung einer vergleichbaren Wechselwirkung der isolierten Bindungsmotive mit beiden GCAP-Isoformen, ohne jedoch eine *in vivo*-Bedeutung aufzuweisen. Für eine Bestätigung dieser Hypothese wären aber sowohl Interaktionsstudien zwischen GCAP-1 und den verschiedenen Peptiden, als auch Interaktionsstudien zwischen den GCAP-Isoformen und der gesamten ROS-GC notwendig.

### 5.2.2 GCAP-2-Homodimer

Größenausschlusschromatographische Untersuchungen von Olshevskaya *et al.* hatten eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Dimerisierung des GCAP-2 gezeigt, die möglicherweise bedeutend für die Aktivierung der ROS-GC sein könnte [38]. Auf diesen Grundlagen erfolgte die Analyse der Homodimerisierung von GCAP-2 in dieser Arbeit.

Hier durchgeführte Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie und analytischer Ultrazentrifugation lassen allerdings vermuten, dass die Dimerisierung des GCAP-2  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig ist. Gelelektrophoretische Analysen nach chemischer Quervernetzung mit BS<sup>2</sup>G bestätigen dies. Die in dieser Arbeit verwendeten nicht-markierten

und  $^{15}\text{N}$ -markierten GCAP-2-Varianten verhielten sich bei diesen Analysen identisch. Aufgrund der Vernetzung von mit nicht-markiertem und  $^{15}\text{N}$ -markiertem Protein durch BS<sup>2</sup>G war eine eindeutige Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularer Quervernetzungen möglich. Die unterschiedlich starke Vernetzung der Homodimere in An- (4 Vernetzungen) und Abwesenheit (7 Vernetzungen) von  $\text{Ca}^{2+}$  könnte auf verschiedene Strukturen hindeuten. In Anbetracht der offensichtlich unterschiedlichen Konformationen der GCAP-2-Monomere [18, 28, 202] ist dies auch wahrscheinlich. Drei der identifizierten Vernetzungen stimmen allerdings für beide Komplexe überein und könnten zumindest darauf hindeuten, dass sich ein Teil der interagierenden Flächen gleicht.

Auf Grundlage der bekannten NMR-Struktur (PDB-Eintrag 1JBA [18]) konnte für den  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand des GCAP-2-Homodimers ein 3D-Strukturmodell berechnet werden (Abb. 54). Da dies der erste Strukturvorschlag für diesen Komplex ist, belegt diese Studie das Potential der Kombination aus Computer-gestützter Modellierung und chemischer Quervernetzung. Aus einer Vielzahl möglicher berechneter Modelle konnten durch zusätzliche Distanzbeschränkungen zwei Modelle isoliert werden, von denen sich nur eines als thermodynamisch stabil erwies (Kapitel 4.3.4).

Die Bedeutung der Homodimerisierung für die Aktivierung der ROS-GC 1 ist allerdings fraglich, da z.B. die strukturell ähnliche Isoform GCAP-1 ihr Zielprotein als Monomer aktiviert [39]. Zur eindeutigen Klärung sind weiterführende Untersuchungen des gesamten Komplexes aus ROS-GC 1 und GCAP-2 notwendig.

### **5.3 Charakteristische Fragmentierung von Bpa- Quervernetzungsprodukten**

Zusätzlich zu abundanten Neutralverlusten in den Fragmentionenmassenspektren aller Bpa-Quervernetzungsprodukte kam es bei der kollisionsinduzierten Dissoziation von Vernetzungsprodukten aus Bpa mit *N*-terminalen Methioninen bzw. oxidierten Methioninen zu weiteren charakteristischen Fragmentierungen (Kapitel 4.2.4.1). Die dabei auftretenden Fragmentionen nach Spaltung der neu gebildeten kovalenten Bindung entsprechen den einzelnen Peptiden. Mithilfe der Isotopenmarkierung und der damit verbundenen charakteristischen Massendifferenz von 6 u zwischen beiden Isotopenspezies konnte der Bruch der kovalenten Quervernetzung bestätigt werden: Sowohl die Bpa-Peptide (2 u-Verlust) als auch die jeweiligen Met-Peptide (*N*-terminales Met: 16 u-Verlust, oxidiertes Met: 16 u und 48 u-Verluste) wurden zweifelsfrei identifiziert. Der Fragmentierungsweg ist noch nicht geklärt, die auftretenden Fragmente würden aber mit dem in Abb. 48 vorgestellten

hypothetischen Mechanismus erklärbar sein. Demzufolge käme es nach dem initialen Wasserverlust zur Spaltung der Bindung zwischen dem Schwefelatom und der mit dem Benzophenon verknüpften Methylengruppe. Die Beteiligung des Bpa und die Position bzw. der Oxidationsstatus des vernetzten Methionins ist hierbei anscheinend ein entscheidender Faktor.

Fragmentionen, die dem Bpa-Peptid nach Spaltung der Vernetzungsstelle und dem Verlust von 2 u entsprechen, wurden bereits bei Untersuchungen von Quervernetzungsprodukten des Munc13/CaM-Komplexes mittels MALDI-TOF/TOF-MS beobachtet [203]. Untersuchungen des TIM23-Komplexes bestätigten diese Beobachtung [138]. In beiden Studien traten diese Fragmentierungen unabhängig vom Oxidationsstatus oder der Position des Methionins auf. Beobachtet wurde allerdings nur das Bpa-Peptid. Dies lässt einen möglichen Zusammenhang zwischen der Fragmentierungsenergie und dem generellen Auftreten dieser Fragmentionen vermuten.

Ein weiteres Fragmention bei Quervernetzungsprodukten zu oxidierten Methioninen entspricht der Masse des Vorläuferions mit einer Massendifferenz von 64 u. Dies lässt sich mit dem Verlust von  $\text{CH}_4\text{SO}$  erklären. Ein solcher Verlust wurde bisher vorwiegend bei der MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse von linearen Peptiden mit oxidierten Methioninen [205], teilweise aber auch in CID-Experimenten beobachtet [206]. Dieses Produkt ist aufgrund der Bindung des Bpa zur terminalen Methylgruppe des Methionins [132] bei Verlust von  $\text{CH}_4\text{SO}$  mit einer Umlagerung und der Neubildung einer Bindung erklärbar.

Für eine mögliche Nutzung dieser charakteristischen Fragmentionen als Indikatoren zur Identifizierung von Bpa-Met-Vernetzungsprodukten wären weitere systematische Studien dieser Vernetzungsprodukte hinsichtlich der Fragmentierungsmethode und benötigten Energie unerlässlich.

#### **5.4 Ladungsabhängige Fragmentierung des Harnstoff-Reagenzes**

Die Verwendung des CID-MS/MS-spaltbaren Harnstoff-Reagenzes ist eine potentielle Alternative zu den gängigen, nicht-spaltbaren homobifunktionellen Reagenzien. Verschiedene Quervernetzungsprodukte können dabei anhand einer unterschiedlichen Anzahl an 26 u-Dublettsignalen differenziert werden (*Abb. 55*) [163].

Die festgestellte ladungsabhängige Fragmentierung des Harnstoff-Reagenzes stellt jedoch eine Hürde für dessen erfolgreiche Anwendung dar. Nach Vergleich der Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-MS-Analysen, bei denen hauptsächlich einfach geladene Ionen auftreten, und ESI-LTQ-Orbitrap-MS-Analysen, bei denen meist mehrfach geladene Ionen detektiert werden, zeigte sich, dass eine Vorläuferionenladung von 2+ optimal für eine verlässliche

Identifizierung anhand der Reagenz-spezifischen Fragmentionen ist. Bei höher geladenen Vorläuferionen überwiegt häufig die Fragmentierung des Peptidrückgrats, wodurch die Detektion der Produkte anhand charakteristischer Fragmentionen erschwert wird und der Vorteil dieses Ansatzes verloren geht (Kapitel 4.4.2). Aufgrund der beiden *N*-Termini sowie den basischen Resten an den *C*-Termini tryptischer Spaltprodukte sind Quervernetzungsprodukte tendenziell höher geladen, was den Einsatz dieser Strategie limitiert. Nach Fragmentierung einfach geladener Vorläuferionen von interpeptidal vernetzten Produkten, wie sie bei den MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Analysen vorkommen, wurde meist nur ein abundantes 26 u-Dublett eines der Peptide beobachtet. Auch dies erschwert eine eindeutige Identifizierung besonders bei einer automatisierten Suche. Die Mobilität der Protonen ist hierbei entscheidend, da bevorzugte Fragmentierungen bei CID und LID von den verknüpften Resten und der Ladung abhängig sind [207]. Bei lokaler Bindung des Protons werden zuerst die labilsten Bindungen gespalten, in diesem Fall die Bindungen der Harnstoffgruppe des Reagenzes. Ist ein mobiles Proton vorhanden, wird die zur Spaltung benötigte Energie erniedrigt, was in der vermehrten Fragmentierung des Peptidrückgrats resultiert [208]. Bei der Verwendung der MALDI verbleibt die einzige Ladung nach Fragmentierung auf dem stärker basischen Peptid, was das Auftreten eines dominanten Dubletts erklärt.

Die unterschiedliche Fragmentierung der intrapeptidalen Produkte lässt sich so ebenfalls begründen. Die verstärkte Fragmentierung des Peptidrückgrats zeigt sich bei Produkten, bei denen die basischen Reste aufgrund der Verknüpfung nicht für die Immobilisierung der Protonen zur Verfügung stehen. Sind zusätzlich noch saure Aminosäuren im Peptid enthalten, kann dies auch bei freien basischen Resten zu einer stärkeren Fragmentierung des Rückgrats führen, da die Übertragung eines Protons der Säurefunktion möglich ist [208]. Dies führt zu uneinheitlichen Fragmentierungen, was die Identifizierung dieser Produkte erschweren kann.

## 5.5 Grenzen der analytischen Strategie

Chemische Quervernetzung in Verbindung mit hochauflösender Massenspektrometrie und den in dieser Arbeit verwendeten Strategien zur vereinfachten und zuverlässigen Identifizierung der Quervernetzungsprodukte bieten ein enormes Potential für die Analyse von Proteinen und ihrer Komplexe. Die Methode ist allerdings nicht in der Lage, die etablierten hochauflösenden Methoden der Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie zu ersetzen. Wie in dieser Arbeit deutlich wurde, ist die erreichbare Auflösung begrenzt. Mit Reagenzien, wie dem verwendeten BS<sup>2</sup>G, können aufgrund der großen überbrückbaren Distanzen nur niederaufgelöste Strukturdaten erhalten werden. Gerade bei dem hier untersuchten, relativ

kleinen Protein GCAP-2 ist deren Nutzen deshalb begrenzt. Aber auch bei Verwendung von Photoaminosäuren lassen sich nur Distanzen im Bereich von mehreren Angström bestimmen. Keiner der beiden Ansätze liefert Informationen über die Orientierung der vernetzten bzw. benachbarten Aminosäureseitenketten. Eine atomare Auflösung ist mit beiden Ansätzen also unerreichbar.

Probleme können auch durch die verwendeten Reagenzien selbst auftreten, da die Fixierung der Seitenketten auch bei vorsichtigem Einsatz des Vernetzungsreagenzes das Faltungs-/Entfaltungs- bzw. das Assoziations-/Dissoziationsgleichgewicht verschiebt. Zudem verringern große unnatürliche hydrophobe Aminosäuren, wie Bpa, die Löslichkeit von Peptiden und Proteinen.

Bei ordnungsgemäßer Anwendung werden die untersuchten Proteine oft nur zu einem kleinen Teil quervernetzt. Die Quervernetzungsprodukte sind deshalb oft niedrig abundant und können bei ungünstigen chromatographischen Bedingungen von den abundanten linearen Peptiden der Proteine überlagert werden. Dies erschwert deren massenspektrometrische Identifizierung. Trotz der Vorteile der Isotopenmarkierung für die vereinfachte Identifizierung, kann dies aufgrund der Aufteilung der Gesamtintensität auf die beteiligten Isotopenspezies bei sehr niedrig abundanten Produkten eine erschwerte Identifizierung zur Folge haben. Die Quervernetzung kann die Effizienz der proteolytischen Spaltung beeinflussen und so vermehrt zu Fehlschnittstellen führen, was die Komplexität der Proben erhöht. Die Verwendung mehrerer Proteasen führt zwar zu kleineren Proteolyseprodukten, erhöht aber aufgrund weiterer möglicher Schnittstellen ebenfalls die Komplexität der Proben.

Durch die Quervernetzung der Peptide wird auch deren Fragmentierung beeinflusst. Im Falle der Bpa-Quervernetzungsprodukte führt die Fragmentierung, ähnlich wie bei Phosphopeptiden, hauptsächlich zu dominanten Neutraverlusten des Vorläuferions, nicht aber zur Spaltung des Peptidrückgrats. Die schwache Fragmentierung erschwert in der Folge die eindeutige Identifizierung der Produkte bzw. die Bestimmung der vernetzten Aminosäure.

Nach erfolgreicher massenspektrometrischer Analyse ist eine Computer-gestützte Auswertung zur Bewältigung der riesigen Datensätze essentiell. Gängige Softwarelösungen, wie das hier verwendete StavroX, erlauben eine automatisierte Identifizierung der Quervernetzungsprodukte durch Abgleich der Massen von Vorläufer- und zugehörigen Fragmentationen mit *in-silico* erzeugten Daten. Der auf Übereinstimmung von theoretischen und identifizierten Signalen beruhende *Score* sollte im Idealfall eine schnelle Auswertung erlauben. Selbst bei kleinen Proteinsystemen, wie dem hier untersuchten GCAP-2, kommt es trotz des Vorliegens von Daten mit hoher Massengenauigkeit aufgrund der vielen möglichen Produkte

häufig zu Mehrfachzuordnungen. Bei niederaufgelösten Fragmentionendaten sind auch häufig Mehrfachzuordnungen der Fragmentionen möglich, was die Berechnung eines verlässlichen *Scores* erschwert. Gerade bei der Verwendung mehrerer Proteasen und der Bildung unspezifischer Quervernetzungsprodukte ist eine Unterscheidung anhand des *Scores* häufig nicht möglich. Deshalb ist in vielen Fällen eine zeitaufwendige manuelle Kontrolle der erhaltenen Daten unerlässlich.

Peptide stellen aufgrund ihrer überschaubaren Größe häufig den Startpunkt für strukturelle Analysen unbekannter Protein-Systeme dar. In den hier durchgeführten Analysen wurde versucht, durch Peptidinteraktionsstudien erste strukturelle Erkenntnisse über die Interaktion des GCAP-2 mit der ROS-GC 1 zu erhalten. Im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand konnte für das GC-Peptid 1 ein erstes Modell zur Interaktion mit GCAP-2 erstellt werden. Die Ergebnisse ermöglichen aber lediglich die Bestimmung der Orientierung des Peptids am GCAP-2 und dem potentiellen Interaktionsbereich. Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Komplex blieb der Erkenntnisgewinn vermutlich aufgrund der hohen Flexibilität gering. Dies zeigt, dass für weitere strukturelle Untersuchungen des ROS-GC/GCAP-2-Komplexes die Verwendung größerer Domänen bzw. der Vollängen-ROS-GC notwendig ist.

## 6 Ausblick

Die Strukturanalyse der GCAP-2/GC-Peptid-Komplexe erbrachte erste Anhaltspunkte bezüglich der Orientierung und der interagierenden Region des GCAP-2 an die ROS-GC 1 im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand. Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand sind die Ergebnisse allerdings nicht eindeutig. Die Aussagekraft dieser Peptidbindungsstudien ist insgesamt begrenzt. Geplante Interaktionsstudien mit größeren Domänen der ROS-GC 1 werden in Zukunft sowohl im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen als auch im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand zu einer genaueren Charakterisierung der ROS-GC/GCAP-Komplexe führen. Der Einbau von photo-reaktiven Aminosäuren, z.B. in den identifizierten Interaktionsbereichen des GCAP-2 sowie der ROS-GC 1 werden die Identifizierung räumlich naher Kontaktstellen zwischen beiden Interaktionspartnern und so die Erstellung detaillierter Strukturmodelle ermöglichen. Die Verwendung isotoopenmarkierter Proteine oder photo-reaktiver Aminosäuren sind für diese Analysen essentiell, um ein Herausfiltern der Quervernetzungsprodukte aus komplexeren Datensätzen zu ermöglichen. Zum Nachweis einer *in-vivo*-Relevanz der resultierenden Strukturmodelle sollten zukünftig auch Vernetzungsexperimente nach Einführung von unnatürlichen Aminosäuren zwischen der membrangebundenen ROS-GC und den GCAPs direkt in Zellen angestrebt werden.

Durch die enorme instrumentelle Entwicklung der Massenspektrometern hinsichtlich ihrer Massengenauigkeit, Massenauflösung und hohen Sensitivität werden zukünftig nur noch hochaufgelöste Fragmentationendaten Verwendung finden. Dies ist bei den hochkomplexen Mischungen großer quervernetzter Proteinkomplexe trotz der Isotoopenmarkierung notwendig und wird die Verlässlichkeit der Resultate erhöhen. Weitere Entwicklungen im Bereich der Datenauswertungssoftware hinsichtlich der Erkennung von Isotoopenmustern in Fragmentationenspektrum quervernetzter Peptide und deren Bewertung bezüglich der Ladung und Isotoopenverteilung wird die Verlässlichkeit des *Scorings* verbessern und zukünftig vollautomatische Quervernetzungsanalysen erlauben. Eine schnelle und standardisierte Überprüfung der korrekten Faltung von beispielsweise monoklonalen Antikörpern und anderen therapeutisch relevanten Proteinen wird möglich sein, was für die pharmazeutische Forschung und Analytik von großem Interesse ist.





## Literaturreferenzen

1. Yau, K.W.: Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **35**, 9-32 (1994)
2. Kolb, H., R., N., Fernandez, E., B., J.: Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. Webbook Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center (1995-2014)
3. Pugh, E.N., Lamb, T.D.: Cyclic-GMP and calcium - The internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate photoreceptors. Vision Res. **30**, 1923-1948 (1990)
4. Pearson Education:  
wps.prenhall.com/hss\_wade\_psychology\_8/30/7715/1975149.cw/content/index.html
5. Pugh, E.N., Jr, Lamb, T.D.: Chapter 5: Phototransduction in vertebrate rods and cones: Molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation. Stavenga, D.G., de Grip, W.J., Pugh, E.N., Jr (Ed.) In: Handbook of Biological Physics, 183-255, Elsevier Science B.V. (2000)
6. Chen, C.-K., Inglese, J., Lefkowitz, R.J., Hurley, J.B.: Ca-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. J. Biol. Chem. **270**, 18060-18066 (1995)
7. Sharma, R.K.: Membrane guanylate cyclase is a beautiful signal transduction machine: overview. Mol. Cell. Biochem. **334**, 3-36 (2010)
8. Koch, K.W., Dell'Orco, D.: A calcium-relay mechanism in vertebrate phototransduction. ACS Chem. Neurosci. **4**, 909-917 (2013)
9. Burgoyne, R.D.: Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup> signalling. Nat. Rev. Neurosci. **8**, 182-193 (2007)
10. Gorczyca, W.A., Graykeller, M.P., Detwiler, P.B., Palczewski, K.: Purification and physiological evaluation of a guanylate-cyclase activating protein from retinal rods. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**, 4014-4018 (1994)
11. Gorczyca, W.A., Polans, A.S., Surgucheva, I.G., Subbaraya, I., Baehr, W., Palczewski, K.: Guanylyl cyclase-activating protein - a calcium-sensitive regulator of phototransduction. J. Biol. Chem. **270**, 22029-22036 (1995)
12. Haeseleer, F., Sokal, I., Li, N., Pettenati, M., Rao, N., Bronson, D., Wechter, R., Baehr, W., Palczewski, K.: Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily. J. Biol. Chem. **274**, 6526-6535 (1999)
13. Palczewski, K., Sokal, I., Baehr, W.: Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity. Biochem. Biophys. Res. Commun. **322**, 1123-1130 (2004)
14. Peshenko, I.V., Dizhoor, A.M.: Guanylyl cyclase-activating proteins (GCAPs) are Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> sensors - Implications for photoreceptor guanylyl cyclase (RetGC) regulation in mammalian photoreceptors. J. Biol. Chem. **279**, 16903-16906 (2004)
15. Lim, S., Peshenko, I., Dizhoor, A., Ames, J.B.: Effects of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Myristoylation on Guanylyl Cyclase Activating Protein 1 Structure and Stability. Biochemistry **48**, 850-862 (2009)
16. Dizhoor, A.M., Hurley, J.B.: Regulation of photoreceptor membrane guanylyl cyclases by guanylyl cyclase activator proteins. Methods **19**, 521-531 (1999)
17. Haeseleer, F., Imanishi, Y., Sokal, I., Filipek, S., Palczewski, K.: Calcium-binding proteins: Intracellular sensors from the calmodulin superfamily. Biochem. Biophys. Res. Commun. **290**, 615-623 (2002)

18. Ames, J.B., Dizhoor, A.M., Ikura, M., Palczewski, K., Stryer, L.: Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **274**, 19329-19337 (1999)
19. Stephen, R., Bereta, G., Golczak, M., Palczewski, K., Sousa, M.C.: Stabilizing function for myristoyl group revealed by the crystal structure of a neuronal calcium sensor, guanylate cyclase-activating protein 1. *Structure* **15**, 1392-1402 (2007)
20. Stephen, R., Palczewski, K., Sousa, M.C.: The crystal structure of GCAP3 suggests molecular mechanism of GCAP-linked cone dystrophies. *J. Mol. Biol.* **359**, 266-275 (2006)
21. Wilson, M.A., Brunger, A.T.: The 1.0 angstrom crystal structure of Ca<sup>2+</sup>-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity. *J. Mol. Biol.* **301**, 1237-1256 (2000)
22. Olshevskaya, E.V., Hughes, R.E., Hurley, J.B., Dizhoor, A.M.: Calcium binding, but not a calcium-myristoyl switch, controls the ability of guanylyl cyclase-activating protein GCAP-2 to regulate photoreceptor guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **272**, 14327-14333 (1997)
23. Ames, J.B., Ishima, R., Tanaka, T., Gordon, J.I., Stryer, L., Ikura, M.: Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature* **389**, 198-202 (1997)
24. Zozulya, S., Stryer, L.: Calcium-myristoyl protein switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 11569-11573 (1992)
25. Hwang, J.Y., Koch, K.W.: Calcium- and myristoyl-dependent properties of guanylate cyclase-activating protein-1 and protein-2. *Biochemistry* **41**, 13021-13028 (2002)
26. Hwang, J.Y., Koch, K.W.: The myristoylation of the neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensors guanylate cyclase-activating protein 1 and 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1600**, 111-117 (2002)
27. Ihling, C.H., Schröder, T., Pettelkau, J., Tischer, A., Lange, C., Sinz, A.: Accessibilities of N-terminal myristoyl chain and cysteines in guanylyl cyclase-activating protein-2 (GCAP-2) studied by covalent labeling and mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28**, 835-838 (2014)
28. Helten, A., Koch, K.-W.: Calcium-dependent conformational changes in guanylate cyclase-activating protein 2 monitored by cysteine accessibility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 687-692 (2007)
29. Duda, T., Pertzev, A., Sharma, R.K.: Differential Ca<sup>2+</sup> sensor guanylate cyclase activating protein modes of photoreceptor rod outer segment membrane guanylate cyclase signaling. *Biochemistry* **51**, 4650-4657 (2012)
30. Nelson, D., Cox, M.: *Lehninger Biochemie*. ISBN 978-3540418139, Springer-Verlag, Berlin (2001)
31. Epstein, S.A., Giannella, R.A., Brandwein, H.J.: Activation of guanylate cyclase by E. coli heat-stable enterotoxin (STa): Modulation by NAD and pertussis toxin. *FEBS Lett.* **203**, 44-48 (1986)
32. Crane, J.K., Wehner, M.S., Bolen, E.J., Sando, J.J., Linden, J., Guerrant, R.L., Sears, C.L.: Regulation of intestinal guanylate-cyclase by the heat-stable enterotoxin of escherichia-coli (STa) and protein-kinase-C. *Infect. Immun.* **60**, 5004-5012 (1992)
33. Rao, M.C.: Toxins which activate guanylate-cyclase - heat-stable enterotoxins. *Ciba Found. Symp.* **112**, 74-93 (1985)
34. Yang, R.B., Garbers, D.L.: Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers. *J. Biol. Chem.* **272**, 13738-13742 (1997)
35. Yu, H., Olshevskaya, E., Duda, T., Seno, K., Hayashi, F., Sharma, R.K., Dizhoor, A.M., Yamazaki, A.: Activation of retinal guanylyl cyclase-1 by Ca<sup>2+</sup>-binding proteins involves its dimerization. *J. Biol. Chem.* **274**, 15547-15555 (1999)

36. Duda, T., Fik-Rymarkiewicz, E., Venkataraman, V., Krishnan, R., Koch, K.W., Sharma, R.K.: The calcium-sensor guanylate cyclase activating protein type 2 specific site in rod outer segment membrane guanylate cyclase type 1. *Biochemistry* **44**, 7336-7345 (2005)
37. Hisatomi, O., Tokunaga, F.: Molecular evolution of proteins involved in vertebrate phototransduction. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* **133**, 509-522 (2002)
38. Olshevskaya, E.V., Ermilov, A.N., Dizhoor, A.M.: Dimerization of guanylyl cyclase-activating protein and a mechanism of photoreceptor guanylyl cyclase activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 25583-25587 (1999)
39. Hwang, J.Y., Schlesinger, R., Koch, K.W.: Irregular dimerization of guanylate cyclase-activating protein 1 mutants causes loss of target activation. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3785-3793 (2004)
40. Lange, C., Duda, T., Beyermann, M., Sharma, R.K., Koch, K.W.: Regions in vertebrate photoreceptor guanylyl cyclase ROS-GC1 involved in Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation by guanylyl cyclase-activating protein GCAP-1. *FEBS Lett.* **460**, 27-31 (1999)
41. Krylov, D.M., Hurley, J.B.: Identification of proximate regions in a complex of retinal guanylyl cyclase 1 and guanylyl cyclase-activating protein-1 by a novel mass spectrometry-based method. *J. Biol. Chem.* **276**, 30648-30654 (2001)
42. Perrault, I., Rozet, J.M., Calvas, P., Gerber, S., Camuzat, A., Dollfus, H., Chatelin, S., Souied, E., Ghazi, I., Leowski, C., Bonnemaïson, M., LePaslier, D., Frezal, J., Dufier, J.L., Pittler, S., Munnich, A., Kaplan, J.: Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nature Genet.* **14**, 461-464 (1996)
43. Duda, T., Venkataraman, V., Goraczniak, R., Lange, C., Koch, K.W., Sharma, R.K.: Functional consequences of a rod outer segment membrane guanylate cyclase (ROS-GC1) gene mutation linked with Leber's congenital amaurosis. *Biochemistry* **38**, 509-515 (1999)
44. Sokal, I., Li, N., Surgucheva, I., Warren, M.J., Payne, A.M., Bhattacharya, S.S., Baehr, W., Palczewski, K.: GCAP1(Y99C) mutant is constitutively active in autosomal dominant cone dystrophy. *Mol. Cell.* **2**, 129-133 (1998)
45. Kitiratschky, V.B.D., Behnen, P., Kellner, U., Heckenlively, J.R., Zrenner, E., Jagle, H., Kohl, S., Wissinger, B., Koch, K.W.: Mutations in the GUCA1A gene involved in hereditary cone dystrophies impair calcium-mediated regulation of guanylate cyclase. *Hum. Mutat.* **30**, E782-E796 (2009)
46. Jiang, L., Wheaton, D., Bereta, G., Zhang, K., Palczewski, K., Birch, D.G., Baehr, W.: A novel GCAP1(N104K) mutation in EF-hand 3 (EF3) linked to autosomal dominant cone dystrophy. *Vision Res.* **48**, 2425-2432 (2008)
47. Nishiguchi, K.M., Sokal, I., Yang, L.L., Roychowdhury, N., Palczewski, K., Berson, E.L., Dryja, M.P., Baehr, W.: A novel mutation (I143NT) in guanylate cyclase-activating protein 1 (GCAP1) associated with autosomal dominant cone degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 3863-3870 (2004)
48. Sokal, I., Dupps, W.J., Grassi, M.A., Brown, J., Affatigato, L.M., Roychowdhury, N., Yang, L.L., Filipek, S., Palczewski, K., Stone, E.M., Baehr, W.: A novel GCAP1 missense mutation (L151F) in a large family with autosomal dominant cone-rod dystrophy (adCORD). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 1124-1132 (2005)
49. Wilkie, S.E., Li, Y., Deery, E.C., Newbold, R.J., Garibaldi, D., Bateman, J.B., Zhang, H., Lin, W., Zack, D.J., Bhattacharya, S.S., Warren, M.J., Hunt, D.M., Zhang, K.: Identification and functional consequences of a new mutation (E155G) in the gene for GCAP1 that causes autosomal dominant cone dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 471-480 (2001)
50. Sato, M., Nakazawa, M., Usui, T., Tanimoto, N., Abe, H., Ohguro, H.: Mutations in the gene coding for guanylate cyclase-activating protein 2 (GUCA1B gene) in patients with autosomal dominant retinal dystrophies. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **243**, 235-242 (2005)

51. Cheung, W.Y.: Cyclic 3,5-nucleotide phosphodiesterase: Demonstration of an activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 533-& (1970)
52. Kakiuchi, S., Yamazaki, R.: Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain - studies on cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase (III). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 1104-& (1970)
53. Ikura, M., Ames, J.B.: Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: Two ways to promote multifunctionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1159-1164 (2006)
54. Krueger, J.K., Bishop, N.A., Blumenthal, D.K., Zhi, G., Stull, J.T., Trewhella, J.: Small-angle scattering studies of the Ca<sup>2+</sup>-dependence of calmodulin-myosin light chain kinase interactions. *Biophys. J.* **74**, A349-A349 (1998)
55. Stull, J.T., Kamm, K.E., Vandenboom, R.: Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **510**, 120-128 (2011)
56. Blumenthal, D.K., Takio, K., Edelman, A.M., Charbonneau, H., Titani, K., Walsh, K.A., Krebs, E.G.: Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal-muscle myosin light chain kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 3187-3191 (1985)
57. Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B., Bax, A.: Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* **256**, 632-638 (1992)
58. Gross, J.H.: *Massenspektrometrie-Ein Lehrbuch*. ISBN 978-3-8274-2980-3, Springer, Berlin Heidelberg (2013)
59. Fenner, N.C., Daly, N.R.: Laser used for mass analysis. *Rev. Sci. Instrum.* **37**, 1068-& (1966)
60. Karas, M., Bachmann, D., Hillenkamp, F.: Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet-laser desorption mass-spectrometry of organic-molecules. *Anal. Chem.* **57**, 2935-2939 (1985)
61. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F.: Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **78**, 53-68 (1987)
62. Karas, M., Hillenkamp, F.: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301 (1988)
63. Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, A., Hillenkamp, F.: Laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 dalton. *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **28**, 760-761 (1989)
64. Medina, N., Huthfahre, T., Westman, A., Sundqvist, B.U.R.: Matrix-assisted laser-desorption - dependence of the threshold fluence on analyte concentration. *Org. Mass Spectrom.* **29**, 207-209 (1994)
65. Knochenmuss, R., Zenobi, R.: MALDI ionization: The role of in-plume processes. *Chem. Rev.* **103**, 441-452 (2003)
66. Nordhoff, E., Ingendoh, A., Cramer, R., Overberg, A., Stahl, B., Karas, M., Hillenkamp, F., Crain, P.F.: Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of nucleic-acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6**, 771-776 (1992)
67. Beavis, R.C., Chait, B.T.: Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**, 436-9 (1989)
68. Beavis, R.C., Chait, B.T.: Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**, 432-5 (1989)
69. Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F.: 2,5-Dihydroxybenzoic acid - a new matrix for laser desorption ionization mass-spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **111**, 89-102 (1991)

70. Karas, M., Ehring, H., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., Hillenkamp, F., Grehl, M., Krebs, B.: Matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Org. Mass Spectrom.* **28**, 1476-1481 (1993)
71. Beavis, R.C., Chaudhary, T., Chait, B.T.: Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass-spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **27**, 156-158 (1992)
72. Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L.: Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240-& (1968)
73. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M.: Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71 (1989)
74. Wilm, M.S., Mann, M.: Electrospray and Taylor-cone theory, Doles beam of macromolecules at last. *International Journal of Mass Spectrometry* **136**, 167-180 (1994)
75. Wilm, M., Mann, M.: Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **68**, 1-8 (1996)
76. Taylor, G.: Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. Lond. A Math. Phys. Sci.* **280**, 383-397 (1964)
77. Nemes, P., Marginean, I., Vertes, A.: Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays. *Anal. Chem.* **79**, 3105-3116 (2007)
78. Rayleigh, L.: On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. London, Edinburgh, Dublin *Phil. Mag. J. Sci.* **14**, 184-186 (1882)
79. Kebarle, P., Tang, L.: From ions in solution to ions in the gas-phase - the mechanism of electrospray mass-spectrometry. *Anal. Chem.* **65**, A972-A986 (1993)
80. Gomez, A., Tang, K.Q.: Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Phys. Fluids* **6**, 404-414 (1994)
81. Konermann, L.: A simple model for the disintegration of highly charged solvent droplets during electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **20**, 496-506 (2009)
82. Mack, L.L., Kralik, P., Rheude, A., Dole, M.: Molecular beams of macroions. 2. *J. Chem. Phys.* **52**, 4977-4986 (1970)
83. Iribarne, J.V., Thomson, B.A.: Evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **64**, 2287-2294 (1976)
84. Thomson, B.A., Iribarne, J.V.: Field-induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric-pressure. *J. Chem. Phys.* **71**, 4451-4463 (1979)
85. Stephens, W.E.: A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Phys. Rev.* **69**, 691-691 (1946)
86. Vestal, M.L., Juhasz, P., Martin, S.A.: Delayed extraction matrix-assisted laser-desorption time-of-flight mass-spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1044-1050 (1995)
87. Brown, R.S., Lennon, J.J.: Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser-desorption ionization linear time-of-flight mass-spectrometer. *Anal. Chem.* **67**, 1998-2003 (1995)
88. Mamyrin, B.A.: Laser-assisted reflectron time-of-flight mass-spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **131**, 1-19 (1994)
89. Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A.: A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 952-965 (2003)

90. Makarov, A.: Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156-1162 (2000)
91. Hu, Q.Z., Noll, R.J., Li, H.Y., Makarov, A., Hardman, M., Cooks, R.G.: The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **40**, 430-443 (2005)
92. Kingdon, K.H.: A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. *Phys. Rev.* **21**, 408-418 (1923)
93. Knight, R.D.: Storage of ions from laser-produced plasmas. *Appl. Phys. Lett.* **38**, 221-223 (1981)
94. Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Baischun, W., Lange, O., Strupat, K., Horning, S.: Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 2113-2120 (2006)
95. Scigelova, M., Makarov, A.: Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* **6 Suppl 2**, 16-21 (2006)
96. Mathieu, É.: Mémoire sur le mouvement vibratoire d'une membrane de forme elliptique. *Journal de Mathématiques Pures et Appliquées* 137-203 (1868)
97. Tolmachev, A.V., Udseth, H.R., Smith, R.D.: Radial stratification of ions as a function of mass to charge ratio in collisional cooling radio frequency multipoles used as ion guides or ion traps. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1907-1913 (2000)
98. Mao, D.M., Douglas, D.J.: H/D exchange of gas phase bradykinin ions in a linear quadrupole ion trap. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **14**, 85-94 (2003)
99. Londry, F.A., Hager, J.W.: Mass selective axial ion ejection from a linear quadrupole ion trap. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **14**, 1130-1147 (2003)
100. Schwartz, J.C., Senko, M.W., Syka, J.E.P.: A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **13**, 659-669 (2002)
101. Senko, M.W., Remes, P.M., Canterbury, J.D., Mathur, R., Song, Q.Y., 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.* **85**, 11710-11714 (2013)
102. McLaffer, F.W., Bente, P.F., Kornfeld, R., Tsai, S.C., Howe, I.: Collisional activation spectra of organic ions. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 2120-2129 (1973)
103. Levsen, K., Schwarz, H.: Collisional activation mass-spectrometry - New probe for determining structure of ions in gas-phase. *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **15**, 509-519 (1976)
104. Olsen, J.V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S., Mann, M.: Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat. Methods* **4**, 709-712 (2007)
105. Syka, J.E.P., 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.* **101**, 9528-9533 (2004)
106. Roepstorff, P., Fohlman, J.: Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601-601 (1984)
107. Biemann, K.: Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biol. Mass Spectrom.* **16**, 99-111 (1988)
108. Sinz, A.: Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 663-682 (2006)

109. Marion, D.: An introduction to biological NMR spectroscopy. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3006-3025 (2013)
110. Garman, E.F.: Developments in X-ray crystallographic structure determination of biological macromolecules. *Science* **343**, 1102-1108 (2014)
111. Sinz, A.: Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J. Mass Spectrom.* **38**, 1225-1237 (2003)
112. 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.* **97**, 5802-5806 (2000)
113. 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.* **109**, 2884-2889 (2012)
114. Leitner, A., Joachimiak, Lukasz A., Bracher, A., Mönkemeyer, 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* **20**, 814-825 (2012)
115. 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.* **29**, 717-726 (2010)
116. LeDuc, R.D., Taylor, G.K., Kim, Y.B., Januszyk, T.E., Bynum, L.H., Sola, J.V., Garavelli, J.S., Kelleher, N.L.: ProSight PTM: an integrated environment for protein identification and characterization by top-down mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* **32**, W340-W345 (2004)
117. Zamdborg, L., LeDuc, R.D., Glowacz, K.J., Kim, Y.B., Viswanathan, V., Spaulding, I.T., Early, B.P., Bluhm, E.J., Babai, S., Kelleher, N.L.: ProSight PTM 2.0: improved protein identification and characterization for top down mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* **35**, W701-W706 (2007)
118. Simons, K.T., Bonneau, R., Ruczinski, I., Baker, D.: Ab initio protein structure prediction of CASP III targets using ROSETTA. *Proteins* 171-176 (1999)
119. Hermanson, G.T.: *Bioconjugate Techniques*. ISBN 978-0-12-382239-0, Elsevier LTD, Oxford (2013)
120. Trester-Zedlitz, M., Kamada, K., Burley, S.K., Fenyó, D., Chait, B.T., Muir, T.W.: A modular cross-linking approach for exploring protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2416-2425 (2003)
121. 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.* **73**, 1927-1934 (2001)
122. Seebacher, J., Mallick, P., Zhang, N., Eddes, J.S., Aebersold, R., Gelb, M.H.: Protein cross-linking analysis using mass spectrometry, isotope-coded cross-linkers, and integrated computational data processing. *J. Proteome Res.* **5**, 2270-2282 (2006)
123. Petrotchenko, E.V., Serpa, J.J., Borchers, C.H.: An isotopically coded CID-cleavable biotinylated cross-linker for structural proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, (2011)
124. Swaim, C., Smith, J., Smith, D.: Unexpected products from the reaction of the synthetic cross-linker 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), DTSSP with peptides. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **15**, 736-749 (2004)
125. Mädler, S., Bich, C., Touboul, D., Zenobi, R.: Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. *J. Mass Spectrom.* **44**, 694-706 (2009)

126. Kalkhof, S., Sinz, A.: Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**, 305-312 (2008)
127. Krauth, F., Ihling, C.H., Rüttinger, H.H., Sinz, A.: Heterobifunctional isotope-labeled amine-reactive photo-cross-linker for structural investigation of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight and electrospray ionization LTQ-Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 2811-2818 (2009)
128. Gomes, A.F., Gozzo, F.C.: Chemical cross-linking with a diazirine photoactivatable cross-linker investigated by MALDI- and ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **45**, 892-899 (2010)
129. Xie, J., Schultz, P.G.: A chemical toolkit for proteins - an expanded genetic code. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 775-782 (2006)
130. Schwarz, R., Tänzler, D., Ihling, C.H., Müller, M.Q., Kölbl, K., Sinz, A.: Monitoring conformational changes in peroxisome proliferator-activated receptor alpha by a genetically encoded photoamino acid, cross-linking, and mass spectrometry. *J. Med. Chem.* **56**, 4252-4263 (2013)
131. Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C.: Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **2**, 261-267 (2005)
132. Dimova, K., Kalkhof, S., Pottratz, I., Ihling, C., Rodriguez-Castaneda, F., Liepold, T., Griesinger, C., Brose, N., Sinz, A., Jahn, O.: Structural Insights into the Calmodulin-Munc13 Interaction Obtained by Cross-Linking and Mass Spectrometry. *Biochemistry* **48**, 5908-5921 (2009)
133. Pettelkau, J., Schröder, T., Ihling, C.H., Olausson, B.E.S., Kölbl, K., Lange, C., Sinz, A.: Structural insights into retinal guanylylcyclase-GCAP-2 interaction determined by cross-linking and mass spectrometry. *Biochemistry* **51**, 4932-4949 (2012)
134. Jahn, O., Eckart, K., Brauns, O., Tezval, H., Spiess, J.: The binding protein of corticotropin-releasing factor: Ligand-binding site and subunit structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 12055-12060 (2002)
135. O'Neil, K.T., Ericksonviitanen, S., Degrado, W.F.: Photolabeling of calmodulin with basic, amphiphilic alpha-helical peptides containing para-benzoylphenylalanine. *J. Biol. Chem.* **264**, 14571-14578 (1989)
136. Brunner, J.: New photolabeling and cross-linking methods. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 483-514 (1993)
137. Weber, P.J.A., Beck-Sickinger, A.G.: Comparison of the photochemical behavior of four different photoactivatable probes. *J. Pept. Res.* **49**, 375-383 (1997)
138. Schulz, C., Lytovchenko, O., Melin, J., Chacinska, A., Guiard, B., Neumann, P., Ficner, R., Jahn, O., Schmidt, B., Rehling, P.: Tim50's presequence receptor domain is essential for signal driven transport across the TIM23 complex. *J. Cell Biol.* **195**, 643-656 (2011)
139. Dorman, G., Prestwich, G.D.: Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* **33**, 5661-5673 (1994)
140. Kage, R., Leeman, S.E., Krause, J.E., Costello, C.E., Boyd, N.D.: Identification of methionine as the site of covalent attachment of a p-benzoyl-phenylalanine-containing analogue of Substance P on the Substance P (NK-1) Receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 25797-25800 (1996)
141. Sachon, E., Bolbach, G., Lavielle, S., Karoyan, P., Sagan, S.: Met174 side chain is the site of photoinsertion of a substance P competitive peptide antagonist photoreactive in position 8. *FEBS Lett.* **544**, 45-49 (2003)
142. Wittelsberger, A., Thomas, B.E., Mierke, D.F., Rosenblatt, M.: Methionine acts as a "magnet" in photoaffinity crosslinking experiments. *FEBS Lett.* **580**, 1872-1876 (2006)



143. 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.* **14**, 834-850 (2003)
144. Peri, S., Steen, H., Pandey, A.: GPMAW - a software tool for analyzing proteins and peptides. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 687-689 (2001)
145. de Koning, L.J., Kasper, P.T., Back, J.W., Nessen, M.A., Vanrobaeys, F., Van Beeumen, J., Gherardi, E., de Koster, C.G., de Jong, L.: Computer-assisted mass spectrometric analysis of naturally occurring and artificially introduced cross-links in proteins and protein complexes. *FEBS Journal* **273**, 281-291 (2006)
146. Rinner, O., Seebacher, J., Walzthoeni, T., Mueller, L., Beck, M., Schmidt, A., Mueller, M., Aebersold, R.: Identification of cross-linked peptides from large sequence databases. *Nat. Meth.* **5**, 315-318 (2008)
147. Du, X., Chowdhury, S.M., Manes, N.P., Wu, S., Mayer, M.U., Adkins, J.N., Anderson, G.A., Smith, R.D.: Xlink-Identifier: An automated data analysis platform for confident identifications of chemically cross-linked peptides using tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **10**, 923-931 (2011)
148. Panchaud, A., Singh, P., Shaffer, S.A., Goodlett, D.R.: xComb: A cross-linked peptide database approach to protein-protein interaction analysis. *J. Proteome Res.* **9**, 2508-2515 (2010)
149. Chu, F., Baker, P.R., Burlingame, A.L., Chalkley, R.J.: Finding chimeras: a bioinformatics strategy for identification of cross-linked peptides. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 25-31 (2010)
150. Petrotchenko, E.V., Borchers, C.H.: ICC-CLASS: isotopically-coded cleavable crosslinking analysis software suite. *BMC Bioinformatics* **11**, (2010)
151. Götze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., Bosse, K., Ihling, C., Krauth, F., Fritzsche, R., Kühn, U., Sinz, A.: StavroX—A software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **23**, 76-87 (2012)
152. Wilkins, B.J., Daggett, K.A., Cropp, T.A.: Peptide mass fingerprinting using isotopically encoded photo-crosslinking amino acids. *Mol. Biosyst.* **4**, 934-936 (2008)
153. Taverner, T., Hall, N.E., O'Hair, R.A.J., Simpson, R.J.: Characterization of an antagonist interleukin-6 dimer by stable isotope labeling, cross-linking, and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **277**, 46487-46492 (2002)
154. Soderblom, E.J., Goshe, M.B.: Collision-induced dissociative chemical cross-linking reagents and methodology: Applications to protein structural characterization using tandem mass spectrometry analysis. *Anal. Chem.* **78**, 8059-8068 (2006)
155. Kao, A., Chiu, C.-I., Vellucci, D., Yang, Y., Patel, V.R., Guan, S., Randall, A., Baldi, P., Rychnovsky, S.D., Huang, L.: Development of a novel cross-linking strategy for fast and accurate identification of cross-linked peptides of protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, (2011)
156. Tang, X., Munske, G.R., Siems, W.F., Bruce, J.E.: Mass spectrometry identifiable cross-linking strategy for studying protein-protein interactions. *Anal. Chem.* **77**, 311-318 (2004)
157. Back, J.W., Hartog, A.F., Dekker, H.L., Muijsers, A., Koning, L.J., Jong, L.: A new crosslinker for mass spectrometric analysis of the quaternary structure of protein complexes. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **12**, 222-227 (2001)
158. Soderblom, E.J., Bobay, B.G., Cavanagh, J., Goshe, M.B.: Tandem mass spectrometry acquisition approaches to enhance identification of protein-protein interactions using low-energy collision-induced dissociative chemical crosslinking reagents. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3395-3408 (2007)
159. Dreiocker, F., Müller, M.Q., Sinz, A., Schäfer, M.: Collision-induced dissociative chemical cross-linking reagent for protein structure characterization: applied Edman chemistry in the gas phase. *J. Mass Spectrom.* **45**, 178-189 (2010)

160. Müller, M.Q., Dreiocker, F., Ihling, C.H., Schäfer, M., Sinz, A.: Fragmentation behavior of a thiourea-based reagent for protein structure analysis by collision-induced dissociative chemical cross-linking. *J. Mass Spectrom.* **45**, 880-891 (2010)
161. Lauber, M.A., Reilly, J.P.: Novel amidinating cross-linker for facilitating analyses of protein structures and interactions. *Anal. Chem.* **82**, 7736-7743 (2010)
162. He, Y., Lauber, M., Reilly, J.: Unique fragmentation of singly charged DEST cross-linked peptides. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **23**, 1046-1052 (2012)
163. 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.* **82**, 6958-6968 (2010)
164. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)
165. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-& (1970)
166. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.: Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric-focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262 (1988)
167. Jensen, O.N., Shevchenko, A., Mann, M.: Protein analysis by mass spectrometry. Creighton, T., E. (Ed.) In: *Protein Structure, A Practical Approach*, 48, Oxford University Press (1997)
168. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M.: In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856-2860 (2006)
169. Lichtin, N.N., Lewis, E.S., Price, E., Johnson, R.R.: Ionization equilibria of mono-p-methyl and mono-trideuteriomethyl trityl chloride in liquid sulfur dioxide. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4520-4523 (1959)
170. Lamos, S.M., Krusemark, C.J., McGee, C.J., Scalf, M., Smith, L.M., Belshaw, P.J.: Mixed isotope photoaffinity reagents for identification of small-molecule targets by mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4329-4333 (2006)
171. Hsiao, C.-N., Leanna, M.R., Bhagavatula, L., De Lara, E., Zydowsky, T.M., Horrom, B.W., Morton, H.E.: Synthesis of N-(Tert-butoxycarbonyl)-3-(4-thiazolyl)-L-alanine. *Synth. Commun.* **20**, 3507-3517 (1990)
172. Lin, Y.A., Chalker, J.M., Floyd, N., Bernardes, G.J.L., Davis, B.G.: Allyl sulfides are privileged substrates in aqueous cross-metathesis: application to site-selective protein modification. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9642-9643 (2008)
173. Oba, M., Ueno, R., Fukuoka, M., Kainosho, M., Nishiyama, K.: Synthesis of L-threo- 1-C-13,2,3-H-2(2) amino-acid and L-erythro- 1-C-13,2,3-H-2(2) amino-acid - novel probes for conformational-analysis of peptide side-chains. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* 1603-1609 (1995)
174. Ross, F.C., Botting, N.P., Leeson, P.D.: Synthesis of 2S-[2-2H]-kynurenine and use in kinetic isotope effect studies with kynureninase. *Tetrahedron* **53**, 15761-15770 (1997)
175. Chen, Y.T., Xie, J., Seto, C.T.: Peptidic  $\alpha$ -ketocarboxylic acids and sulfonamides as inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *J. Org. Chem.* **68**, 4123-4125 (2003)
176. Brimble, M.A., Kowalczyk, R., Harris, P.W.R., Dunbar, P.R., Muir, V.J.: Synthesis of fluorescein-labelled O-mannosylated peptides as components for synthetic vaccines: comparison of two synthetic strategies. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 112-121 (2008)

177. Pettelkau, J., Thondorf, I., Theisgen, S., Lilie, H., Schröder, T., Arlt, C., Ihling, C.H., Sinz, A.: Structural analysis of guanylyl cyclase-activating protein-2 (GCAP-2) homodimer by stable isotope-labeling, chemical cross-linking, and mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **24**, 1969-1979 (2013)
178. Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L., Schulten, K.: Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781-1802 (2005)
179. MacKerell, A.D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F.T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Reiher, W.E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J.C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M.: All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586-3616 (1998)
180. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L.G.: A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577-8593 (1995)
181. Ryckaert, J.P., Ciccotti, G., Berendsen, H.J.C.: Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - molecular-dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327-341 (1977)
182. Martyna, G.J., Tobias, D.J., Klein, M.L.: Constant-pressure molecular-dynamics algorithms. *J. Chem. Phys.* **101**, 4177-4189 (1994)
183. Feller, S.E., Zhang, Y.H., Pastor, R.W., Brooks, B.R.: Constant-pressure molecular-dynamics simulation - the langevin piston method. *J. Chem. Phys.* **103**, 4613-4621 (1995)
184. Luther, M.A., Cai, G.Z., Lee, J.C.: Thermodynamics of dimer and tetramer formations in rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochemistry* **25**, 7931-7937 (1986)
185. Berjanskii, M., Zhou, J.J., Liang, Y.J., Lin, G.H., Wishart, D.S.: Resolution-by-proxy: a simple measure for assessing and comparing the overall quality of NMR protein structures. *J. Biomol. NMR* **53**, 167-180 (2012)
186. Molecular operating environment, Chemical Computing Group Inc.: Montreal, Canada (2010)
187. Macindoe, G., Mavridis, L., Venkatraman, V., Devignes, M.D., Ritchie, D.W.: HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors. *Nucleic Acids Res.* **38**, W445-W449 (2010)
188. Comeau, S.R., Gatchell, D.W., Vajda, S., Camacho, C.J.: ClusPro: An automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* **20**, 45-50 (2004)
189. Tovchigrechko, A., Vakser, I.A.: GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* **34**, W310-W314 (2006)
190. Pierce, B.G., Hourai, Y., Weng, Z.P.: Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. *Plos One* **6**, (2011)
191. Torchala, M., Moal, I.H., Chaleil, R.A.G., Fernandez-Recio, J., Bates, P.A.: SwarmDock: a server for flexible protein-protein docking. *Bioinformatics* **29**, 807-809 (2013)
192. Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., Wolfson, H.J.: PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res.* **33**, W363-W367 (2005)
193. De Vries, S.J., van Dijk, M., Bonvin, A.: The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nat. Protoc.* **5**, 883-897 (2010)
194. Case, D.A., Darden, T. A., Cheatham III, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Roberts, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails, J., Goetz, A. W., Kolossváry, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Wolf, R. M., Liu, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.-J., Cui, G., Roe, D. R., Mathews, D.

- H., Seetin, M. G., Salomon-Ferrer, R., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A. and Kollman, P. A.: AMBER 12. University of California, San Francisco (2012)
195. Santos, L.F.A., Iglesias, A.H., Gozzo, F.C.: Fragmentation features of intermolecular cross-linked peptides using N-hydroxy-succinimide esters by MALDI- and ESI-MS/MS for use in structural proteomics. *J. Mass Spectrom.* **46**, 742-750 (2011)
196. Falvo, F., Fiebig, L., Dreiocker, F., Wang, R., Armentrout, P.B., Schäfer, M.: Fragmentation reactions of thiourea- and urea-compounds examined by tandem MS-, energy-resolved CID experiments, and theory. *International Journal of Mass Spectrometry* **330**, 124-133 (2012)
197. Müller, M.Q., Zeiser, J.J., Dreiocker, F., Pich, A., Schäfer, M., Sinz, A.: A universal matrix-assisted laser desorption/ionization cleavable cross-linker for protein structure analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 155-161 (2011)
198. Greber, B.J., Boehringer, D., Leitner, A., Bieri, P., Voigts-Hoffmann, F., Erzberger, J.P., Leibundgut, M., Aebersold, R., Ban, N.: Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature* **505**, 515-+ (2014)
199. Herzog, F., Kahraman, A., Boehringer, D., Mak, R., Bracher, A., Walzthoeni, T., Leitner, A., Beck, M., Hartl, F.-U., Ban, N., Malmström, L., Aebersold, R.: Structural probing of a protein phosphatase 2A network by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Science* **337**, 1348-1352 (2012)
200. Kölbel, K., Ihling, C.H., Sinz, A.: Analysis of peptide secondary structures by photoactivatable amino acid analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 12602-12605 (2012)
201. 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.* **24**, 444-449 (2013)
202. Hughes, R.E., Brzovic, P.S., Dizhoor, A.M., Klevit, R.E., Hurley, J.B.: Ca<sup>2+</sup>-dependent conformational changes in bovine GCAP-2. *Protein Sci.* **7**, 2675-2680 (1998)
203. Rodriguez-Castaneda, F., Maestre-Martinez, M., Coudevylle, N., Dimova, K., Junge, H., Lipstein, N., Lee, D., Becker, S., Brose, N., Jahn, O., Carlomagno, T., Griesinger, C.: Modular architecture of Munc13/calmodulin complexes: dual regulation by Ca<sup>2+</sup> and possible function in short-term synaptic plasticity. *EMBO J.* **29**, 680-691 (2010)
204. Sokal, I., Haeseleer, F., Arendt, A., Adman, E.T., Hargrave, P.A., Palczewski, K.: Identification of a guanylyl cyclase-activating protein-binding site within the catalytic domain of retinal guanylyl cyclase 1. *Biochemistry* **38**, 1387-1393 (1999)
205. Hillenkamp, F., Peter-Katalinic, J.: MALDI MS. ISBN 978-3-527-33331-8, Wiley-VCH, Weinheim (2013)
206. Reid, G.E., Roberts, K.D., Kapp, E.A., Simpson, R.J.: Statistical and mechanistic approaches to understanding the gas-phase fragmentation behavior of methionine sulfoxide containing peptides. *J. Proteome Res.* **3**, 751-759 (2004)
207. Frank, A.M.: Predicting intensity ranks of peptide fragment ions. *J. Proteome Res.* **8**, 2226-2240 (2009)
208. Wysocki, V.H., Tsapralis, G., Smith, L.L., Brechi, L.A.: Special feature: Commentary - mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1399-1406 (2000)

## Anhang

### GCAP-2

	10	20	30	40	50	60	70
Myr-	GQQFSWEEA	EENGAVGAAD	AAQLQEWYKK	FLEECPSGTL	FMHEFKRFEK	VPDNEEATQY	VEAMFRAFDT
	80	90	100	110	120	130	140
	NGDNTIDFLE	YVAALNLVLR	GTLEHKLKWT	FKIYDKDRNG	CIDRQELLDI	VESIYKLLKA	CSVEVEAEQQ
	150	160	170	180	190	200	204
	GKLLTPPEEV	DRIFLLVDEN	GDGQLSLNEF	VEGARDKQWV	MKMLQMDLNP	SSWISQQRRK	SAMF

Myr- N-terminal myristoyliert

C<sub>1068</sub> H<sub>1649</sub> O<sub>321</sub> N<sub>278</sub> S<sub>9</sub>  
M<sub>av.</sub> 23807,3 Da; M<sub>mono.</sub> 23791,8664 Da

### Calmodulin (CaM)

	10	20	30	40	50	60	70
Acetyl-	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD	KDGDGTTTK	ELGTVMRSLG	QNPTEAELQD	MINEVDADGN	GTIDFPEFLT
	80	90	100	110	120	130	140
	MMARKMKDTD	SEEEIREAFR	VFDKDGNGYI	SAAELRHVMT	NLGEKLTDEE	VDEMIREADI	DGDGQVNYEE
	148						
	FVQMMTAK						

Acetyl- N-terminal acetyliert  
**k**- Lysin trimethyliert

C<sub>719</sub> H<sub>1129</sub> O<sub>256</sub> N<sub>188</sub> S<sub>9</sub>  
M<sub>av.</sub> 16791,3 Da; M<sub>mono.</sub> 16780,8591 Da

### GC-Peptid 1

10  
YRIHVNRSTV QILSALN-NH<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub>- C-terminal amidiert

C<sub>87</sub> H<sub>147</sub> O<sub>24</sub> N<sub>29</sub>  
M<sub>av.</sub> 1983,3 Da  
M<sub>mono.</sub> 1982,1174 Da

### GC-Photo-Peptid 1a

10  
YRIH **U** NRSTV QILSALN-NH<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub>- C-terminal amidiert  
**U**- Photo-Leu (C<sub>5</sub> H<sub>7</sub> N<sub>3</sub> O<sub>1</sub>)

C<sub>87</sub> H<sub>145</sub> O<sub>24</sub> N<sub>31</sub>  
M<sub>av.</sub> 2009,3 Da  
M<sub>mono.</sub> 2008,1079 Da

### GC-Photo-Peptid 1b

10  
YRIHVNRSTV **QI U** SALN-NH<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub>- C-terminal amidiert  
**U**- Photo-Leu (C<sub>5</sub> H<sub>7</sub> N<sub>3</sub> O<sub>1</sub>)

C<sub>86</sub> H<sub>143</sub> O<sub>24</sub> N<sub>31</sub>  
M<sub>av.</sub> 1995,3 Da  
M<sub>mono.</sub> 1994,0922 Da

### GC-Peptid 2

10 20  
LYEGDWVWLK KFPGRDHIAI-NH<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub>- C-terminal amidiert

C<sub>118</sub> H<sub>172</sub> O<sub>27</sub> N<sub>30</sub>  
M<sub>av.</sub> 2442,9 Da  
M<sub>mono.</sub> 2441,3008 Da

### GC-Photo-Peptid 2a

10 20  
LYEGD **X** VWLK KFPGRDHIAI-NH<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub>- C-terminal amidiert  
**X**- <sup>12</sup>C-Bpa (C<sub>16</sub> H<sub>13</sub> N<sub>1</sub> O<sub>2</sub>)

C<sub>123</sub> H<sub>175</sub> O<sub>28</sub> N<sub>29</sub>  
M<sub>av.</sub> 2507,9 Da  
M<sub>mono.</sub> 2506,3161 Da

### GC-Photo-Peptid 2b

10 20  
LYEGDWV **X** LK KFPGRDHIAI-NH<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub>- C-terminal amidiert  
**X**- <sup>12</sup>C-Bpa (C<sub>16</sub> H<sub>13</sub> N<sub>1</sub> O<sub>2</sub>)

C<sub>123</sub> H<sub>175</sub> O<sub>28</sub> N<sub>29</sub>  
M<sub>av.</sub> 2507,9 Da  
M<sub>mono.</sub> 2506,3161 Da

### GC-Photo-Peptid 3

10 20  
Acetyl-ESTGLP **X** RIH VNRSTVQILS ALN-NH<sub>2</sub>  
Acetyl-ESTGLP **J** RIH VNRSTVQILS ALN-NH<sub>2</sub>

Acetyl- N-terminal acetyliert  
NH<sub>2</sub>- C-terminal amidiert  
**X**- <sup>12</sup>C-Bpa (C<sub>16</sub> H<sub>13</sub> N<sub>1</sub> O<sub>2</sub>)  
**J**- <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Bpa (<sup>13</sup>C<sub>6</sub> C<sub>10</sub> H<sub>13</sub> N<sub>1</sub> O<sub>2</sub>)

C<sub>121</sub> H<sub>193</sub> O<sub>35</sub> N<sub>35</sub>  
M<sub>av.</sub> 2698,1 Da  
M<sub>mono.</sub> 2696,4398 Da

<sup>13</sup>C<sub>6</sub> C<sub>115</sub> H<sub>193</sub> O<sub>35</sub> N<sub>35</sub>  
M<sub>av.</sub> 2704,1 Da  
M<sub>mono.</sub> 2702,4600 Da

### skMLCK-Peptid (M13)

10 20  
KRR **W** KKNFIA VSAANRFKKI SSSGAL-NH<sub>2</sub>  
KRR **X** KKNFIA VSAANRFKKI SSSGAL-NH<sub>2</sub>  
KRR **J** KKNFIA VSAANRFKKI SSSGAL-NH<sub>2</sub>

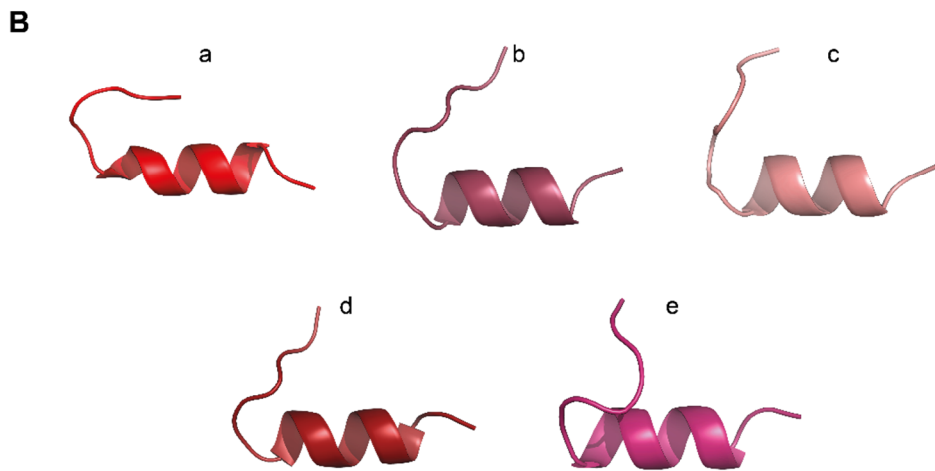
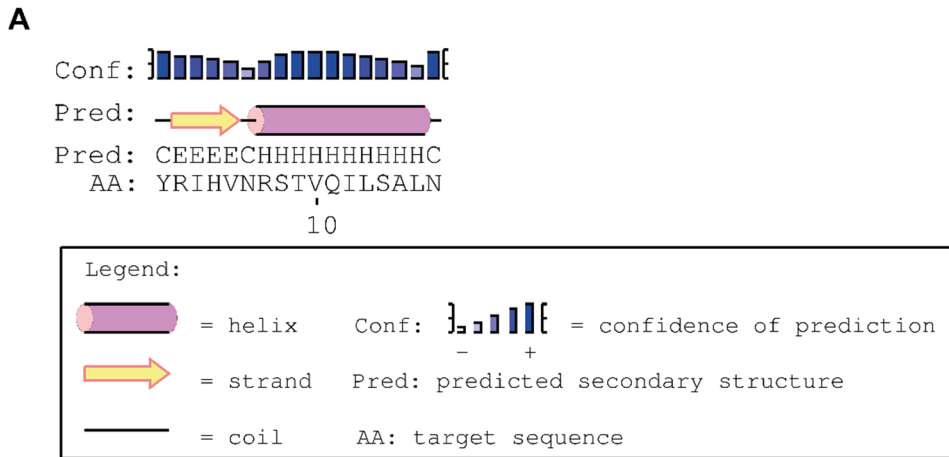
NH<sub>2</sub>- C-terminal amidiert  
**W**- Trp (Wildtyp)  
**X**- <sup>12</sup>C-Bpa (C<sub>16</sub> H<sub>13</sub> N<sub>1</sub> O<sub>2</sub>)  
**J**- <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Bpa (<sup>13</sup>C<sub>6</sub> C<sub>10</sub> H<sub>13</sub> N<sub>1</sub> O<sub>2</sub>)

C<sub>134</sub> H<sub>224</sub> O<sub>32</sub> N<sub>44</sub>  
M<sub>av.</sub> 2963,6 Da  
M<sub>mono.</sub> 2961,7253 Da

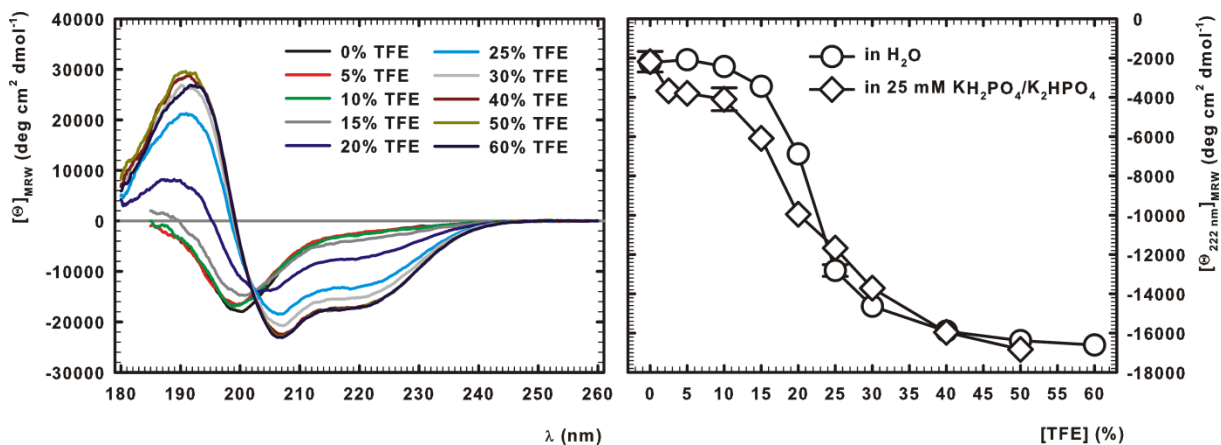
C<sub>139</sub> H<sub>227</sub> O<sub>33</sub> N<sub>43</sub>  
M<sub>av.</sub> 3028,6 Da  
M<sub>mono.</sub> 3026,7406 Da

<sup>13</sup>C<sub>6</sub> C<sub>133</sub> H<sub>227</sub> O<sub>33</sub> N<sub>43</sub>  
M<sub>av.</sub> 3034,6 Da  
M<sub>mono.</sub> 3032,7608 Da

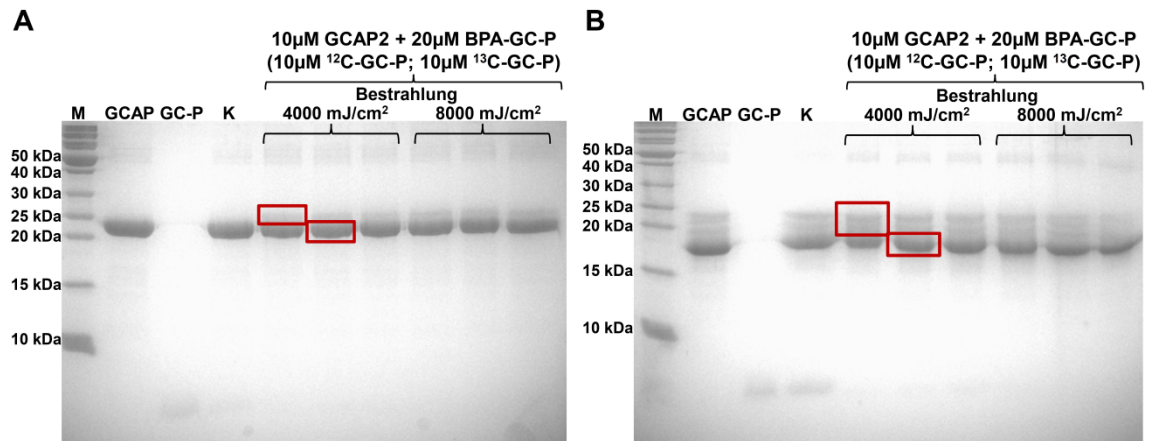
Abb.-A 1 Sequenzen und Massen der verwendeten Proteine und Peptide



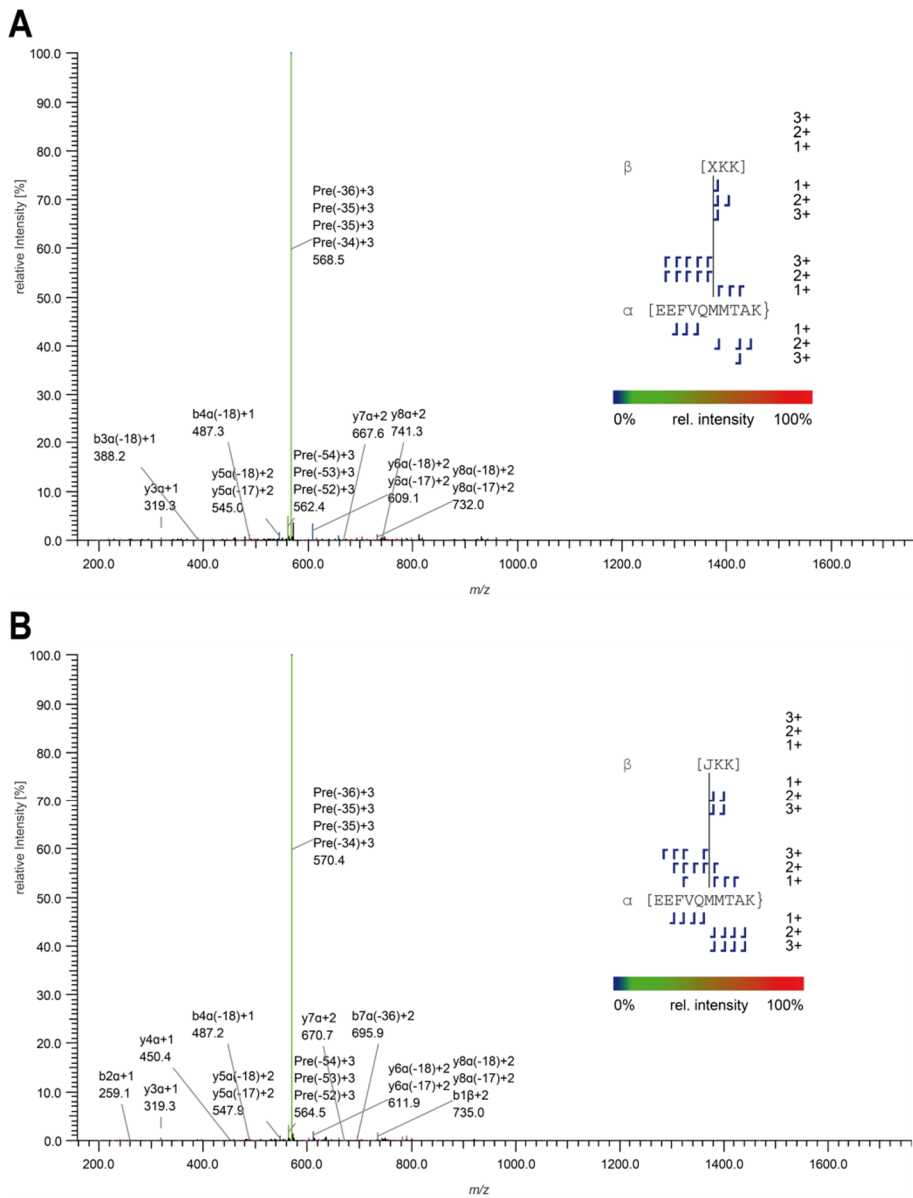
**Abb.-A 2** A: Ergebnis der PSIPRED-Strukturvorhersage für das GC-Peptid 1; B: Modelle (a-e) der BHAGEERATH-Strukturvorhersage für das GC-Peptid 1



**Abb.-A 3** CD-spektroskopische Untersuchungen des GC-Peptids 1. CD-Spektren wurden in H<sub>2</sub>O und 25 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) mit steigenden Trifluorethanol (TFE)-Konzentrationen aufgenommen. Die Maxima bei einer Wellenlänge von ~190 nm und die zwei Minima bei ~208 und ~220 nm deuten auf eine helikale Sekundärstruktur des GC-Peptids 1 hin.



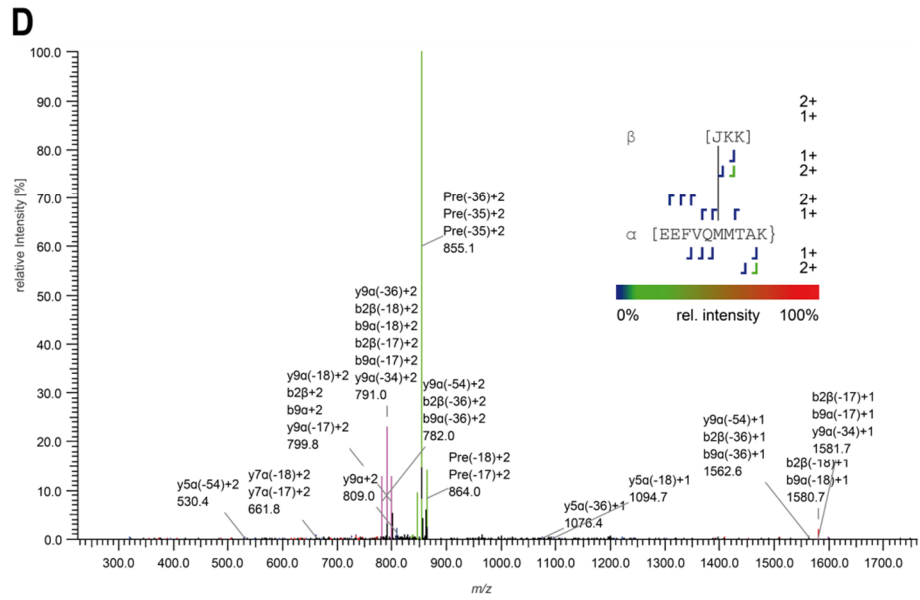
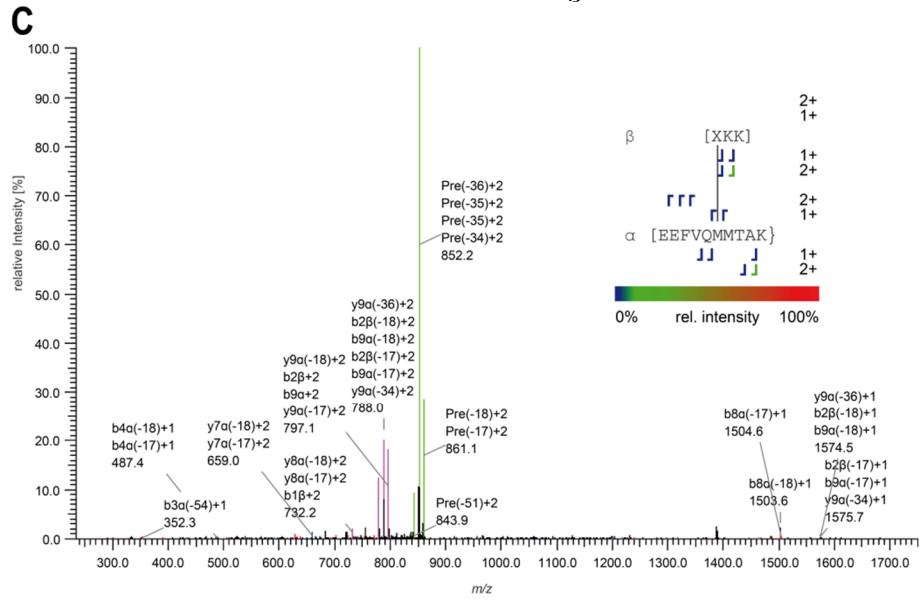
**Abb.-A 4 Gelelektrophoretische Trennung der quervernetzten Proben zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 3.** A: Trennung der Reaktionsansätze mit 10 mM EGTA; B: Trennung der Reaktionsansätze mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>. M: Molekulargewichtsmarker; GCAP: GCAP-2, Kontrolle; GC-P: GC-Photo-Peptid 3, Kontrolle; K: Reaktionsansatz vor Bestrahlung; rote Rechtecke markieren die ausgeschnittenen Gelbandenbereiche.

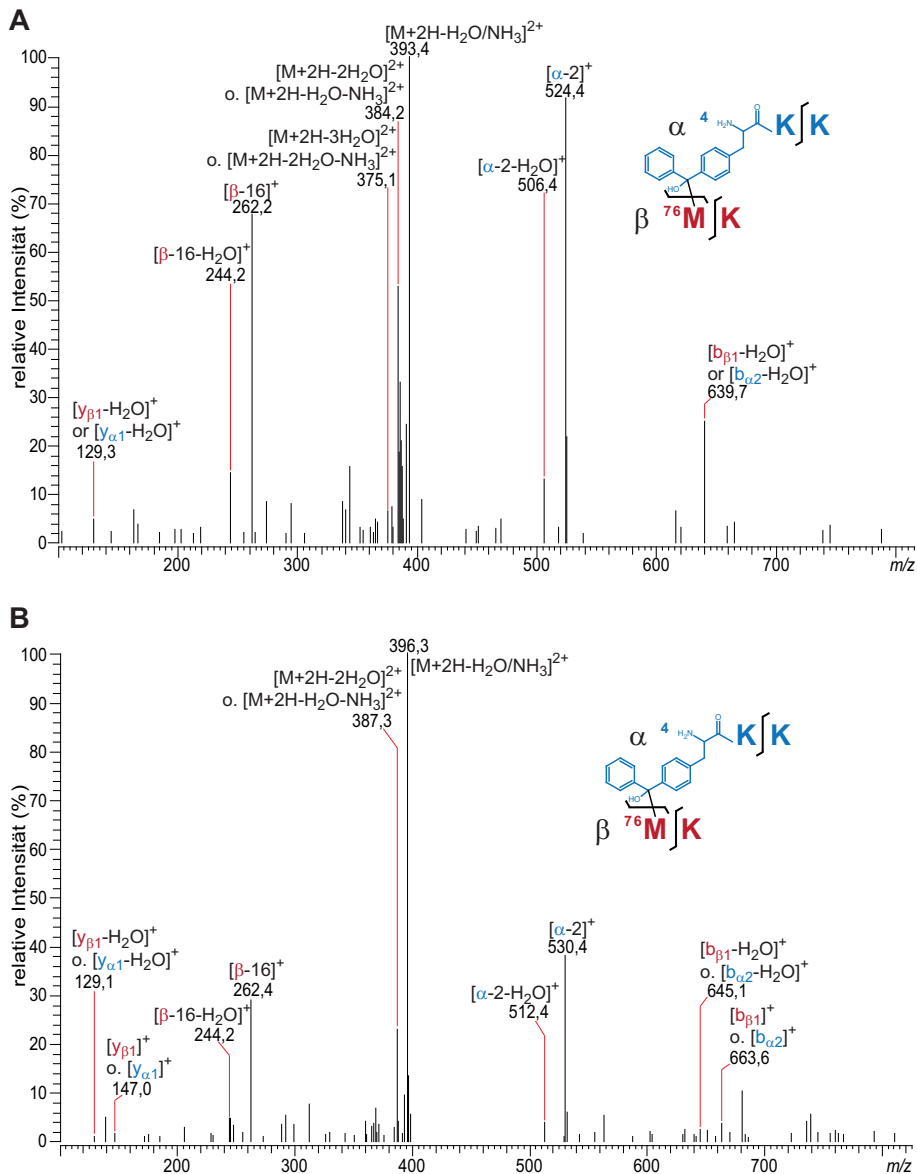


**Abb.-A 5** CID-Fragmentenmassenspektren eines Quervernetzungsprodukts zwischen Met-144/145 des CaM und Bpa-4 des Bpa-M13. Die automatische Annotation durch StavroX ist dargestellt. Das Quervernetzungsprodukt wurde in einer Probe der Gelbande I (Abb. 37B) eines Reaktionsansatzes (10  $\mu$ M CaM; 15  $\mu$ M Bpa-M13 (je 7.5  $\mu$ M  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa-M13) nach Bestrahlung mit 4000 mJ/cm<sup>2</sup> identifiziert. In der Abbildung sind die Fragmentenmassenspektren der dreifach geladenen Vorläuferionen bei **A**  $m/z$  580,2895 ( $^{12}\text{C}$ -Spezies) und **B**  $m/z$  582,2962 ( $^{13}\text{C}_6$ -Spezies) und die Fragmentenmassenspektren der zweifach geladenen Vorläuferionen bei **C**  $m/z$  869,9311 ( $^{12}\text{C}$ -Spezies) und **D** 872,9411 ( $^{13}\text{C}_6$ -Spezies) dargestellt. Die Neutralverluste der Vorläuferionen (Pre) sind in grün hervorgehoben (Verluste: -17=-NH<sub>3</sub>; -18=-H<sub>2</sub>O; -34=-2xNH<sub>3</sub>; -35=-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O; -36=-2xH<sub>2</sub>O).



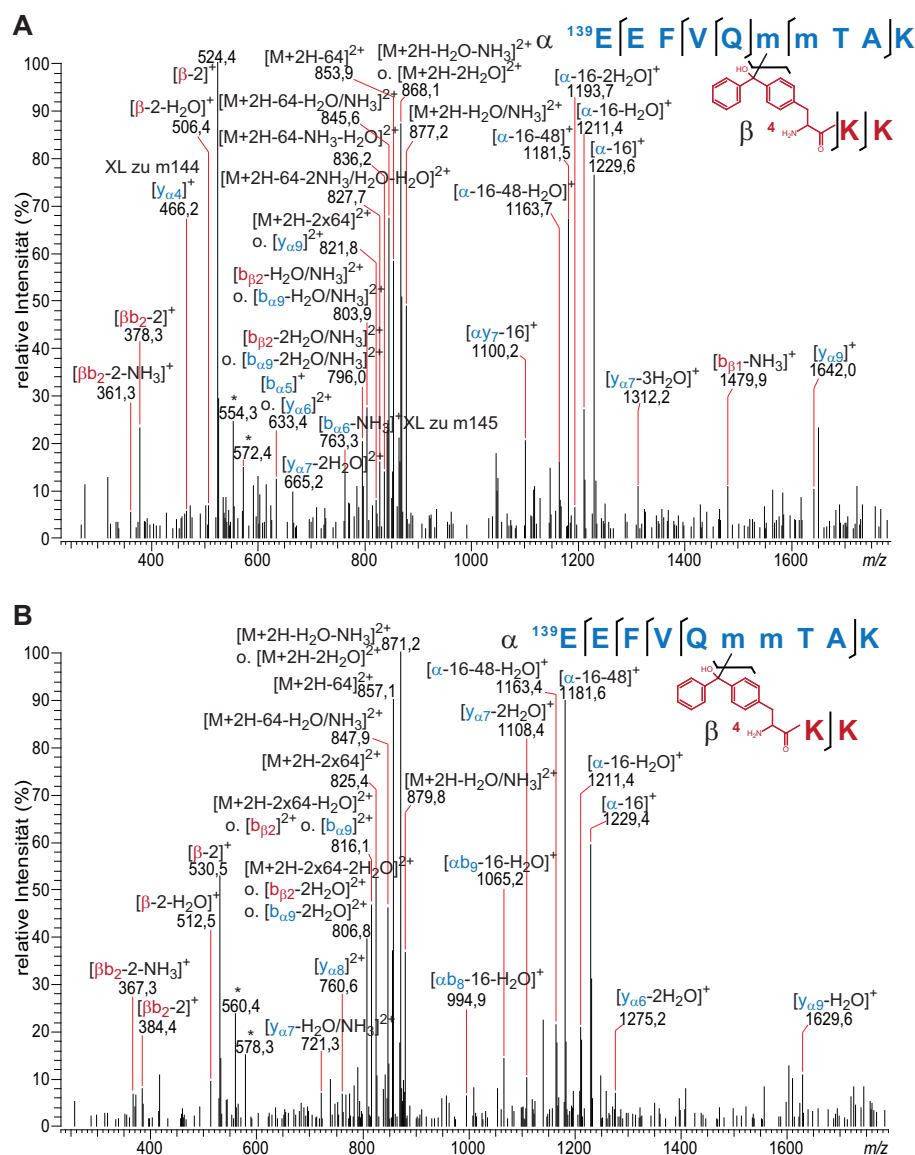
Abb.-A 5-Fortsetzung





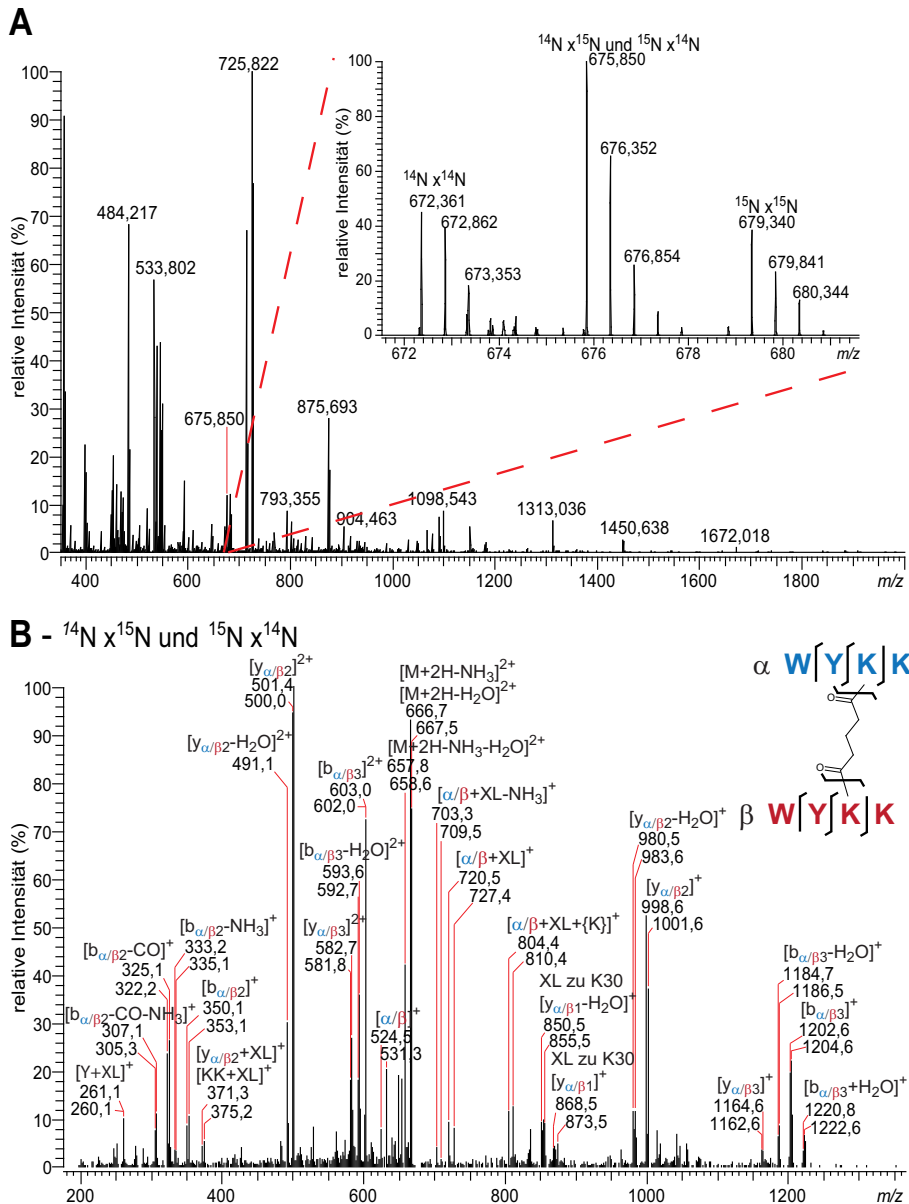
**Abb.-A 6** CID-Fragmentenmassenspektren eines Quervernetzungsprodukts zwischen Bpa und einem N-terminalen Methionin. Das Quervernetzungsprodukt zwischen Met-76 des CaM (10  $\mu$ M) und dem Bpa-4 des Bpa-M13 (15  $\mu$ M; je 7,5  $\mu$ M  $^{12}C$ - und  $^{13}C_6$ -Bpa-M13) wurde in einer UV-bestrahlten Probe (8000 mJ/cm<sup>2</sup>) der Gelbande II (Abb. 37 B) identifiziert. Fragmentenmassenspektrum des Produkts mit A  $^{12}C$ -Bpa-M13 nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  402,2277 und B  $^{13}C_6$ -Bpa-M13 nach Fragmentierung des Vorläuferions bei  $m/z$  405,2378; Die Fragmente des M13-Peptids sind in blau dargestellt und die des CaM-Peptids in rot. Die charakteristischen Fragmentationen sind als  $\alpha$ -2,  $\beta$ -16 dargestellt.

Die Fragmentierung der Vorläuferionen eines Quervernetzungsprodukts (Signale zweifach geladener Ionen bei  $m/z$  402,2277 ( $^{12}C$ -Spezies) und  $m/z$  405,2378 ( $^{13}C_6$ -Spezies)) ebenfalls zwischen Bpa-4 und Met-76 (Peptid: MK) bestätigten diese Ergebnisse. Die Fragmentationen des Bpa-Peptids wurden mit dem Verlust von 2 u und einem zusätzlichen H<sub>2</sub>O-Verlust bei  $m/z$  524,4 und 506,4 ( $^{13}C_6$ -Spezies:  $m/z$  530,4 und 512,4) detektiert, während das Met-haltige Peptid mit einem Verlust von 16 u und einem H<sub>2</sub>O-Verlust bei  $m/z$  262,2 und 244,2 ( $^{13}C_6$ -Spezies:  $m/z$  262,4 und 244,2) detektiert wurde.



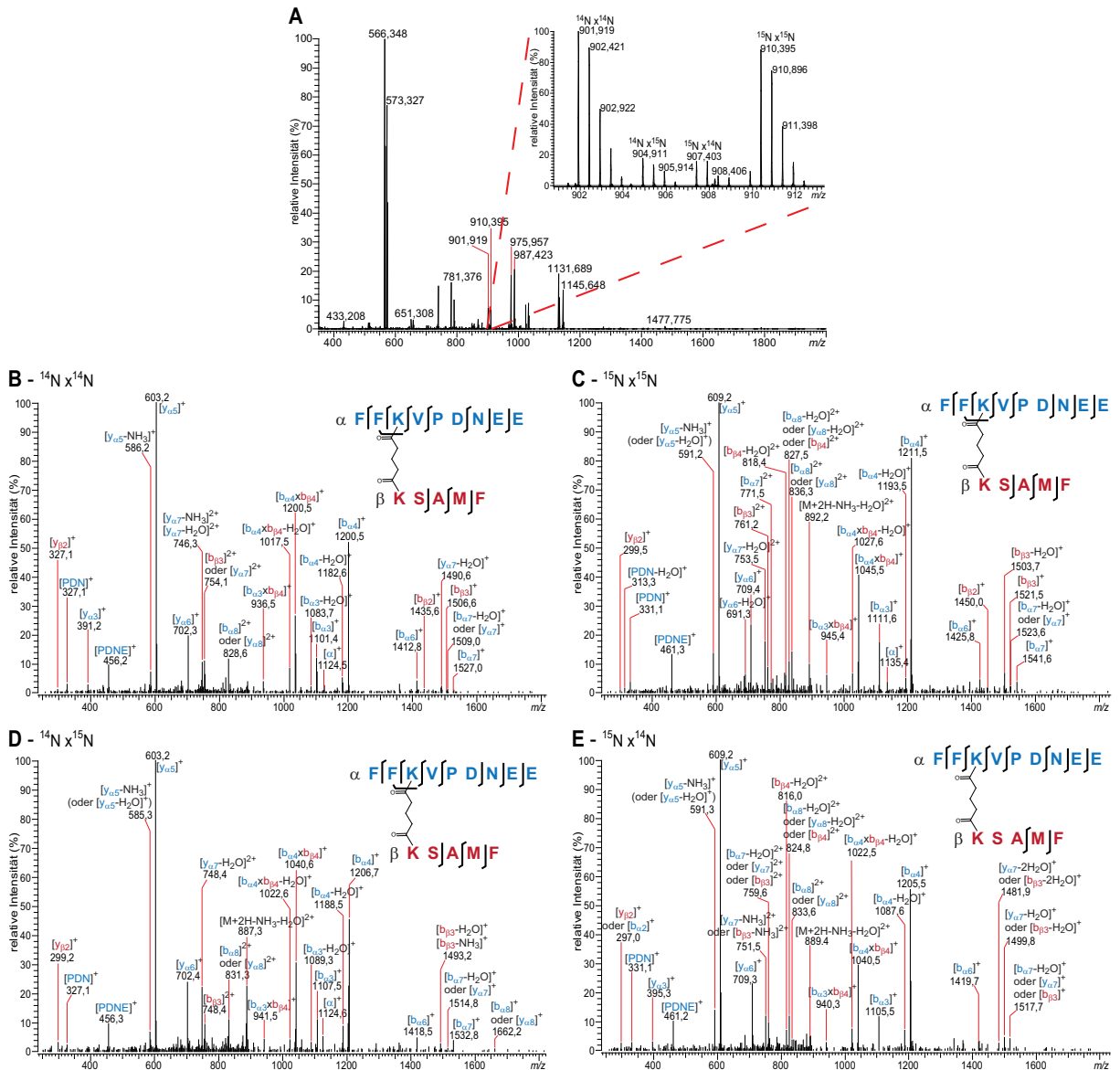
**Abb.-A 7** CID-Fragmentenmassenspektren eines Quervernetzungsprodukts zwischen Bpa und einem oxidierten Methionin. Das Quervernetzungsprodukt zwischen Met<sub>ox</sub>(m)-144/145 des CaM (10  $\mu\text{M}$ ) und dem Bpa-4 des Bpa-M13 (15  $\mu\text{M}$ ; je 7,5  $\mu\text{M}$   $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa-M13) wurde in einer UV-bestrahlten Probe (8000  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) der Gelbande II (Abb. 37 B) identifiziert. Fragmentenmassenspektrum des Produkts mit **A**:  $^{12}\text{C}$ -Bpa-M13 nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  885,9257 und **B**: mit  $^{13}\text{C}_6$ -Bpa-M13 nach Fragmentierung des Vorläuferions bei  $m/z$  888,9362; Die Fragmente des CaM-Peptids sind in blau dargestellt und die des Bpa-M13 in rot. Die charakteristischen Fragmentationen sind als  $\alpha$ -16,  $\alpha$ -16-48,  $\beta$ -2,  $\beta\beta$ -2, und M+2H-64 dargestellt. \*Die Fragmente bei  $m/z$  554,3 und 572,4 (**A**) und bei  $m/z$  560,4 und 578,3 (**B**) enthalten auf Grund des charakteristischen Massenunterschieds von jeweils 6 u offensichtlich Bpa, konnten aber keinem Fragment zugeordnet werden.

Charakteristischen Fragmente wurden nach Fragmentierung der doppelt geladenen Spezies ( $^{12}\text{C}$ -Spezies:  $m/z$  885,9257;  $^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  888,9362) eines Quervernetzungsproduktes zwischen Met<sub>ox</sub>-144/145 des CaM und dem Bpa-4 des M13 bestätigt. Die Signale bei  $m/z$  1229,6 und 1181,5 ( $^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  1229,4 und 1181,6) bestätigten den Verlust von 16 u und zusätzlich von 48 u für das Met<sub>ox</sub>-haltige Peptid, während die Signale bei  $m/z$  524,4 und 378,3 ( $^{13}\text{C}_6$ -Spezies:  $m/z$  530,5 und 384,4) die Signale für das Bpa-Peptid bestätigten. Der Neutralverlust von 64 u ist als doppelt geladene Signale bei  $m/z$  853,9 ( $^{12}\text{C}$ -Spezies) und  $m/z$  857,1 ( $^{13}\text{C}_6$ -Spezies) zu finden.



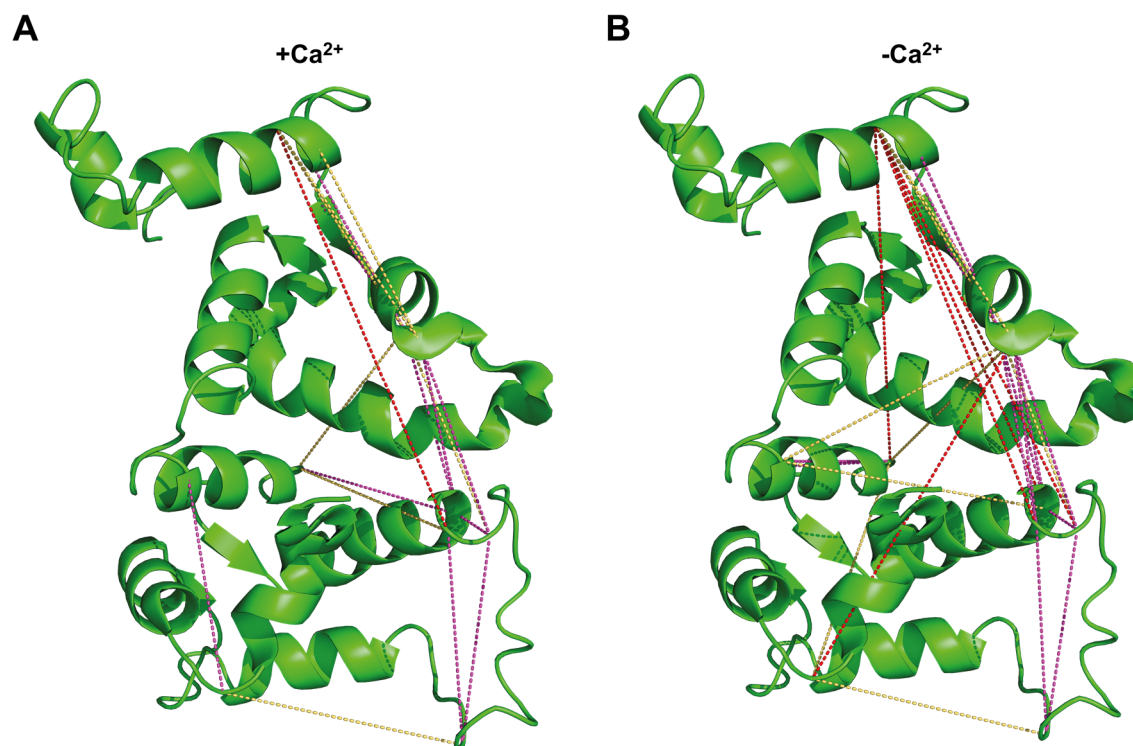
**Abb.-A 8** Identifizierung einer intermolekularen Quervernetzung zwischen Lys-29/30 und Lys-29/30 des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen GCAP-2-Homodimer (20  $\mu\text{M}$  GCAP-2 (je 10  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{N}$ - u.  $^{15}\text{N}$ -GCAP-2; 0,3 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 2 mM  $\text{BS}^2\text{G}$ ; 60 min Reaktion) **A**: Übersichtsmassenspektrum bei einer Retentionszeit von 32,9 min: In der Vergrößerung ist das charakteristische Isotopenmuster durch die Verwendung des  $^{14}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}$ -markierten GCAP-2 zu erkennen. **B**: Fragmentationmassenspektrum des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  675,850 ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Spezies u.  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Spezies); Da die Fragmentationen jeweils von einem identischen Peptid stammen (AS: WYKK) können diese nicht eindeutig einem Partner zugeordnet werden und sind deshalb mit  $\alpha$  und  $\beta$  beschriftet. Die charakteristischen Fragmente des  $\text{BS}^2\text{G}$  sind mit „+XL+{K}“ und „+XL“ markiert (Abb. 53).

Das Quervernetzungsprodukt zwischen Lys-29 und Lys-29 (oder Lys-30), wurde ausschließlich in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  detektiert. Das Produkt konnte ebenfalls durch das charakteristische Isotopenmuster der Signale bei  $m/z$  672,351,  $m/z$  675,850 und  $m/z$  679,340 bestätigt werden. Da zwei identische Peptide miteinander verknüpft sind, handelte es sich hierbei eindeutig um ein intermolekulares Quervernetzungsprodukt. Die Analyse des Fragmentationmassenspektrums der gemischten Spezies zeigte, dass mehrere Reaktionsstellen möglich sind. Während die meisten Fragmente das Lys-29 als Reaktionsstelle identifizierten, deuteten die Signale bei  $m/z$  868,5 und 873,5 zusammen mit dem dazugehörigen Wasserverlust bei  $m/z$  850,5 und 855,5 auf Lys-30 hin. Auch in diesem Spektrum weisen Signale bei  $m/z$  260,1 und 261,1 auf eine Modifizierung des Tyr-28 hin.

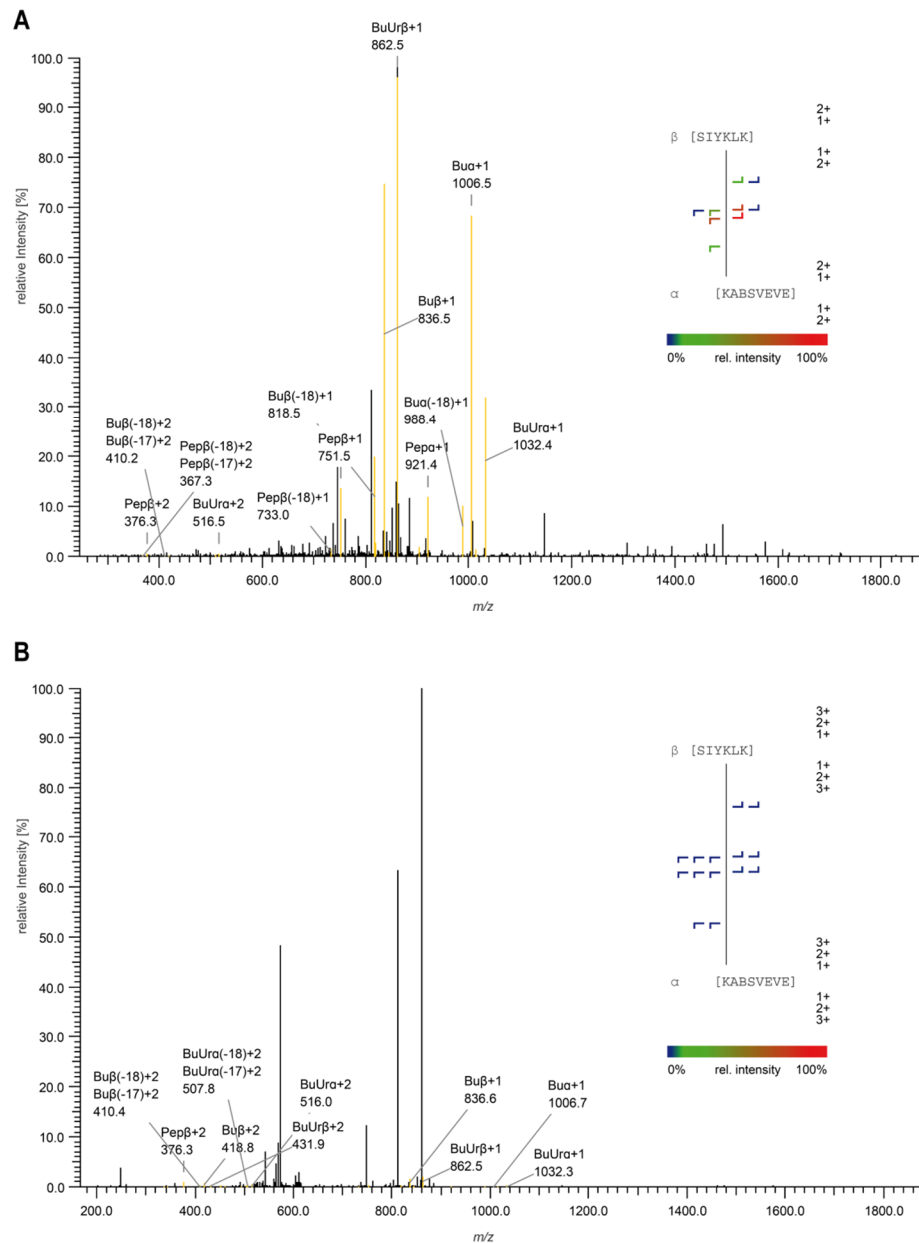


**Abb.-A 9 Identifizierung einer intermolekularen Quervernetzung zwischen Lys-50 und Lys-200 des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien GCAP-2-Homodimer (20  $\mu\text{M}$  GCAP-2 (je 10  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{N}$ - u.  $^{15}\text{N}$ -GCAP-2; 0,4 mM EGTA; 2 mM BS $^2$ G; 60 min Reaktion) A:** Übersichtsmassenspektrum bei einer Retentionszeit von 69,8 min: In der Vergrößerung ist das charakteristische Isotopenmuster durch die Verwendung des  $^{14}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}$ -markierten GCAP-2 zu erkennen. **B:** Fragmentenmassenspektrum des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  901,919 ( $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Spezies); **C:** Fragmentenmassenspektrum des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  910,395 ( $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Spezies); **D:** Fragmentenmassenspektrum des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  904,911 ( $\alpha$ -Peptid:  $^{14}\text{N}$ -GCAP-2;  $\beta$ -Peptid:  $^{15}\text{N}$ -GCAP-2); **E:** Fragmentenmassenspektrum des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  907,403 ( $\alpha$ -Peptid:  $^{15}\text{N}$ -GCAP-2;  $\beta$ -Peptid:  $^{14}\text{N}$ -GCAP-2); Die Fragmentationen des  $\alpha$ -Peptids (FFKVPDNEE) sind in blau und die des  $\beta$ -Peptids (KSAMF) in rot dargestellt.

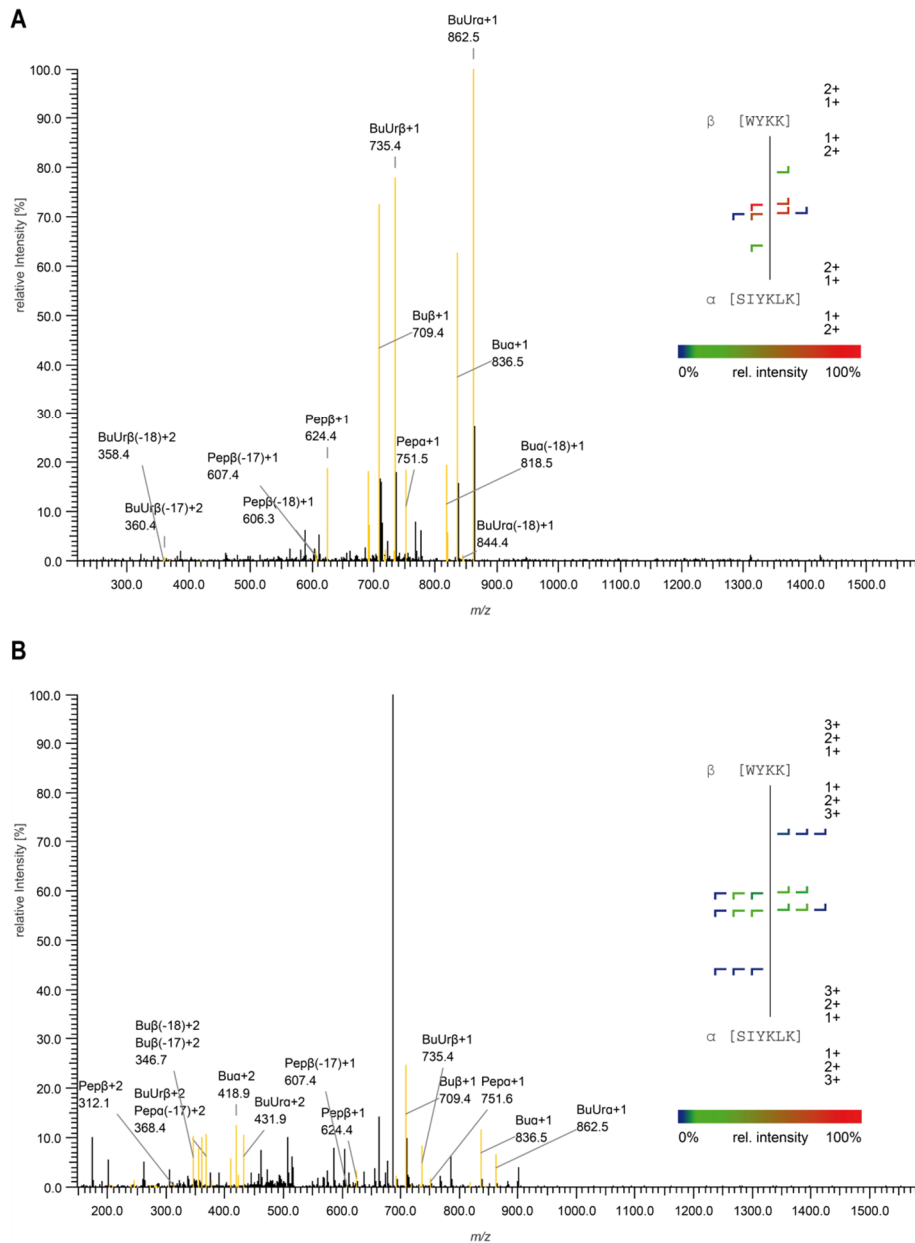
Ausschließlich in der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Probe wurde ein Quervernetzungsprodukt zwischen Lys-50 und Lys-200 identifiziert. Auf Grundlage des Isotopenmusters aus den Signalen der zweifach geladenen Ionen bei  $m/z$  901,919 und 910,393 der reinen  $^{14}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotopenspezies und vor allen den Signalen der gemischten Isotopenspezies bei  $m/z$  904,911 ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Spezies) und  $m/z$  907,403 ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Spezies) konnte dies eindeutig als intermolekulares Quervernetzungsprodukt zwischen zwei GCAP-2 Molekülen bestimmt werden. Auf Grund der getrennten Fragmentenmassenspektren für jede der vier möglichen Spezies war eine eindeutige Bestimmung der einzelnen Fragmentationen möglich. Das  $[b_{04}]^+$ -Fragmentation wurde bei  $m/z$  1200,5 und 1211,5 ( $^{14}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Spezies) in den Spektren der reinen Isotopenspezies und zusätzlich bei  $m/z$  1206,7 und 1205,5 ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Spezies) in den einzelnen Spektren der gemischten Spezies identifiziert.



**Abb.-A 10** Vergleich der NMR-Struktur des nicht-myristoylierten GCAP-2  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen Zustand (PDB-Eintrag: 1JBA [18]) mit den identifizierten Quervernetzungen des Harnstoff-Reagenzes. Intramolekulare Quervernetzungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand (A) und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand (B) sind mit magentafarbenen Linien für Ca-Ca-Distanzen  $< 20 \text{ \AA}$ , mit gelben Linien für Ca-Ca-Distanzen  $< 27 \text{ \AA}$  und mit roten Linien für Ca-Ca-Distanzen  $> 30 \text{ \AA}$  verbunden (Distanzen beziehen sich auf alle 22 Strukturen des PDB-Eintrags 1JBA).



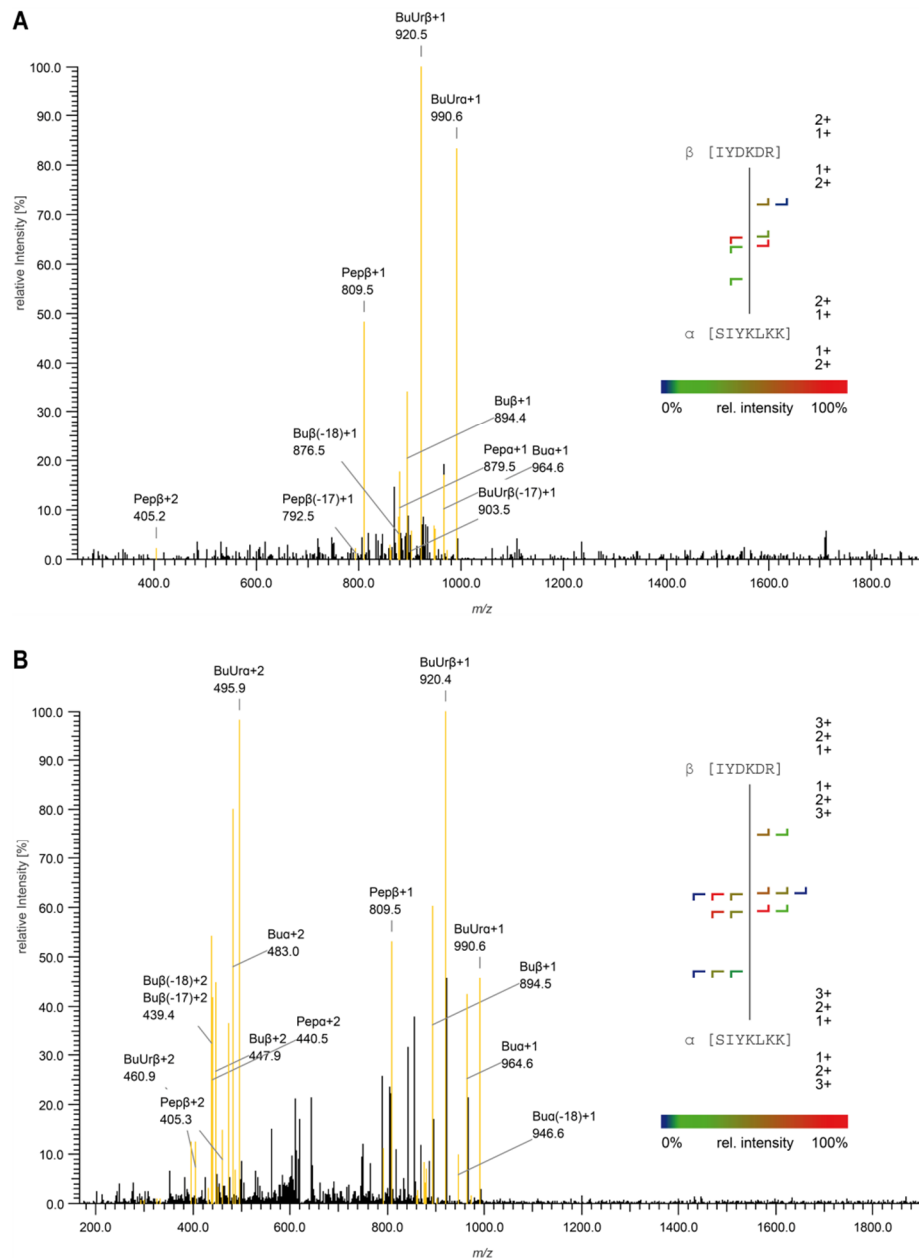
**Abb.-A 11** CID-Fragmentationmassenspektren eines GCAP-2 Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-126 und Lys-129 von zwei aufeinander folgenden Peptiden. Darstellung der automatischen Annotierung durch MeroX. **A:** CID-Fragmentationmassenspektrum nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  934,4962; **B:** CID-Fragmentationmassenspektrum nach Fragmentierung des dreifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  623,3329; Die Fragmentationmassenspektren wurden während einer LC/MS-Analyse eines Reaktionsansatzes in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 30 min Reaktionszeit bei 59,4-59,5 min detektiert. Die charakteristischen, mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifizierten Fragmente werden als „Bua“ bezeichnet, die mit dem Isocyanatmolekül modifizierten als „BuUra“. Zusätzliche Fragmentationen der Peptide werden als „Pepα“ und „Pepβ“ bezeichnet. Die nicht annotierten Signale stammen von Fragmentationen des Peptidrückgrats, die zur Verbesserung der Übersichtlichkeit nicht annotiert wurden.



**Abb.-A 12 CID-Fragmentationenspektren eines GCAP-2 Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-126 und Lys-29.** Darstellung der automatischen Annotierung durch MeroX. **A:** CID-Fragmentationenspektrum nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  785,9537; **B:** CID-Fragmentationenspektrum nach Fragmentierung des dreifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  524,3046; Die Fragmentationenspektren wurden während einer LC/MS-Analyse eines Reaktionsansatzes in Gegenwart von 10 mM EGTA und 30 min Reaktionszeit bei 49,3-49,4 min detektiert. Die charakteristischen, mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifizierten Fragmente werden als „Bua“ bezeichnet, die mit dem Isocyanatmolekül modifizierten als „BuUra“. Zusätzliche Fragmentationen der Peptide werden als „Pepα“ und „Pepβ“ bezeichnet. Die nicht annotierten Signale stammen von Fragmentationen des Peptidrückgrats, die zur Verbesserung der Übersichtlichkeit nicht annotiert wurden.

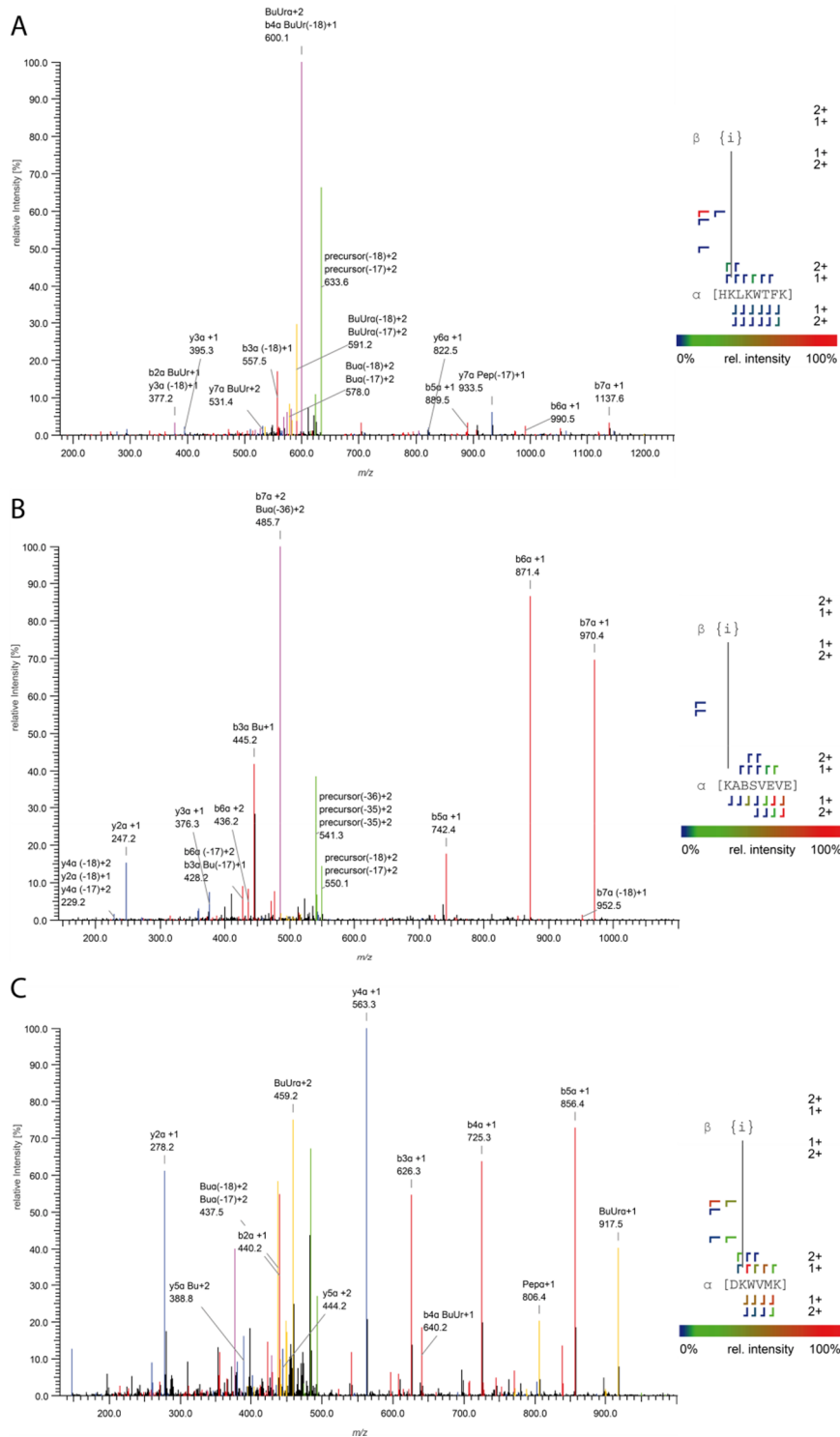
Beim Vergleich der Fragmentationenspektren eines Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-29 ( $\beta$ -Peptid: WYKK) und Lys-126 ( $\alpha$ -Peptid: SIYKLLK) wurden die Reagenz-spezifischen Signale im Spektrum der zweifach geladenen Spezies ( $m/z$  785,9537) mit einer hohen relativen Intensität beobachtet (MeroX-Score 97). Die entsprechenden Signale im Spektrum der dreifach geladenen Spezies ( $m/z$  524,3046) waren weniger intensiv, aber deutlich zu erkennen (MeroX-Score 18).



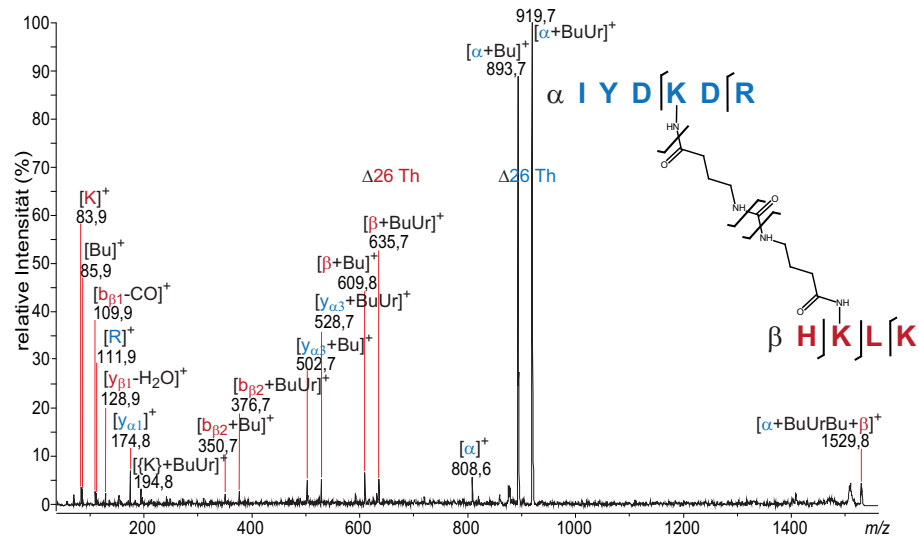


**Abb.-A 13 CID-Fragmentenmassenspektren eines GCAP-2 Quervernetzungsprodukts zwischen Lys-126 und Lys-106.** Darstellung der automatischen Annotierung durch MeroX. **A:** CID-Fragmentenmassenspektrum nach Fragmentierung des zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  942,5339; **B:** CID-Fragmentenmassenspektrum nach Fragmentierung des dreifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  628,6912; Die Fragmentenmassenspektren wurden während einer LC/MS-Analyse eines Reaktionsansatzes in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (30 min Reaktionszeit) bei 40,4-40,5 min detektiert. Die charakteristischen, mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifizierte Fragmente werden als „Bua“ bezeichnet, die mit dem Isocyanatmolekül modifizierte als „BuUra“. Zusätzliche Fragmenten der Peptide werden als „Pepa“ und „Pep $\beta$ “ bezeichnet. Die nicht annotierten Signale stammen von Fragmenten des Peptidrückgrats, die zur Verbesserung der Übersichtlichkeit nicht annotiert wurden.

Bei einem Quervernetzungsprodukt zwischen Lys-106 ( $\beta$ -Peptid: IYDKDR) und Lys-126 bzw. Lys-128 ( $\alpha$ -Peptid: SIYKLLKK) stellen die Reagenz-spezifischen Fragmenten die intensivsten Signale sowohl im Spektrum der zweifach geladenen Spezies ( $m/z$  942,5339), als auch im Spektrum der dreifach geladenen Spezies ( $m/z$  628,6912) dar.



**Abb.-A 14 CID-Fragmentenmassenspektren verschiedener intrapeptidally vernetzter GCAP-2 Peptide.** Darstellung der automatischen Annotierung durch MeroX. **A:** CID-Fragmentenmassenspektrum eines zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  642,3669, welches als intrapeptidale Vernetzung zwischen Lys-96 und Lys-98 identifiziert wurde; **B:** CID-Fragmentenmassenspektrum eines zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  559,2634, welches als intrapeptidale Vernetzung zwischen Lys-129 und Ser-132 identifiziert wurde; **C:** CID-Fragmentenmassenspektrum eines zweifach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  501,7573, welches als intrapeptidale Vernetzung zwischen Lys-178 und Lys-182 identifiziert wurde. Die Fragmentenmassenspektren wurden während einer LC/MS-Analyse eines Reaktionsansatzes in Gegenwart von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  und 30 min Reaktionszeit detektiert. Die charakteristischen Fragmenten, welche mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifiziert wurden, sind mit „Bu $\alpha$ “, „Bu $\beta$ “ und „+Bu“ und die mit einem Isocyanatmolekül modifizierten als „BuUra“, „BuUr $\beta$ “ und „+BuUr“ markiert und in gelb dargestellt. Zusätzliche Fragmenten der Peptide sind als „Pepa“ und „Pep $\beta$ “ bezeichnet. Fragmente ohne Zusatz (+Bu oder +BuUr) enthalten je nach Position das gesamte Reagenzfragment bzw. keine Modifikation.



**Abb.-A 15 MALDI-TOF/TOF-Fragmentenmassenspektrum eines interpeptidalen Quervernetzungsprodukts innerhalb des GCAP-2.** Das Quervernetzungsprodukt zwischen Lys-106 und Lys-96 des GCAP-2 wurde nach Fragmentierung des einfach geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  1529,841 während der Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF Analyse einer Probe mit 10 mM EGTA (30 min Reaktionszeit) detektiert. Fragmente des  $\alpha$ -Peptids sind in blau und die des  $\beta$ -Peptids in rot dargestellt. Die charakteristischen Fragmente, welche mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure modifiziert wurden, sind als „+Bu“ und die mit einem Isocyanatmolekül modifizierten als „+BuUr“ dargestellt.

Tabelle-A 1 Identifizierte GC-Peptide

Peptid	<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	+/- Ca <sup>2+</sup>	AS Sequenzen
GC-Peptid 1	1044,605	1044,605	1	0	+	<sup>8</sup> STVQILSALN
	522,806	1044,605	2	0	-	<sup>8</sup> STVQILSALN
	832,486	1663,960	2	+3	+	<sup>3</sup> IHVNRSTVQILSALN
GC-Photo-Peptid 1	522,806	1044,605	2	0	+	<sup>8</sup> STVQILSALN
	522,806	1044,605	2	-1	-	<sup>8</sup> STVQILSALN
GC-Photo-Peptid 2	479,272	957,538	2	-1	+	<sup>1</sup> YRIHVNR
	479,272	957,538	2	-1	-	<sup>1</sup> YRIHVNR

## Anhang

**Tabelle-A 2 Intramolekulare Quervernetzungsprodukte des GCAP-2 innerhalb des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	vernetzte AS von GCAP-2	+/- Ca <sup>2+</sup>	AS Sequenzen	Fragmente
535,816	1070,622	2	3,1	K-200 x K-128	+	α <sup>200</sup> KSAMF β <sup>128</sup> LKK	b <sub>a2</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> ; y <sub>a1</sub> ; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a3</sub> -H <sub>2</sub> O; b <sub>β2</sub>
566,811	1132,612	2	2,2	K-200 x K-46	+	α <sup>200</sup> KSAMF β <sup>045</sup> FKR	b <sub>a1</sub> ; b <sub>a2</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> o. y <sub>β2</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a4</sub> -NH <sub>3</sub> ; y <sub>β1</sub> ; y <sub>β2</sub>
566,810	1132,612	2	-0,2	K-200 x K-46	-	α <sup>200</sup> KSAMF β <sup>045</sup> FKR	b <sub>a2</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> o. y <sub>β2</sub> -H <sub>2</sub> O; b <sub>a4</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a3</sub> -H <sub>2</sub> O o. y <sub>β1</sub> ; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a4</sub> -NH <sub>3</sub> o. y <sub>a4</sub> -H <sub>2</sub> O; b <sub>β1</sub> ; y <sub>β2</sub>
587,340	1173,672	2	1,4	K-29 (K-30) x K46	+	α <sup>027</sup> WYKK β <sup>045</sup> FKR	b <sub>a2</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a2</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub>
587,339	1173,672	2	0,0	K-29 (K-30) x K46	-	α <sup>027</sup> WYKK β <sup>045</sup> FKR	b <sub>a2</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> o. b <sub>a2</sub> ; y <sub>β2</sub> Alternative K-30: b <sub>a3</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>a1</sub>
604,345	1207,681	2	2,4	K-200 x K-96	+	α <sup>200</sup> KSAMF β <sup>095</sup> HKLK	b <sub>a2</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> ; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a4</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β3</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ; y <sub>β2</sub>
644,860	1288,713	2	-0,4	K-200 x K-46	-	α <sup>199</sup> RKSAMF β <sup>045</sup> FKR	b <sub>a2</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a5</sub> -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a5</sub> -H <sub>2</sub> O o. b <sub>β2</sub> ; b <sub>β2</sub> -NH <sub>3</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> -NH <sub>3</sub> o. b <sub>a5</sub>
653,845	1306,680	2	2,3	K-200 x K-29	+	α <sup>200</sup> KSAMF β <sup>027</sup> WYKK	b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> o. b <sub>β3</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>a2</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β3</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> -H <sub>2</sub> O o. b <sub>a2</sub>
661,843	1322,675	2	2,0	K-200 x K-29	+	α <sup>200</sup> KSAMF β <sup>027</sup> WYKK	b <sub>a2</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> o. b <sub>β3</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a4</sub> ; b <sub>β3</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub> -H <sub>2</sub> O
717,406	1433,801	2	2,8	K-126 x K-200	+	α <sup>123</sup> SIYKLLK β <sup>200</sup> KSAMF	b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a5</sub> ; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a4</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β4</sub> o. b <sub>a5</sub> -H <sub>2</sub> O
752,879	1504,748	2	2,5	K-178 x K-200	+	α <sup>177</sup> DKWVMK β <sup>200</sup> KSAMF	b <sub>a2</sub> -NH <sub>3</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a5</sub> ; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a4</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β4</sub> o. b <sub>a5</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β4</sub> - H <sub>2</sub> O
806,434	1611,857	2	2,3	K-50 x K-128	+	α <sup>048</sup> FFKVPDNEE β <sup>128</sup> LKK	b <sub>a2</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a7</sub> ; y <sub>a2</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a4</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a7</sub> o. b <sub>a7</sub> -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; b <sub>β2</sub> o. b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub>
810,385	1619,759	2	2,5	K-129 x K-200	+	α <sup>129</sup> KABSVEVE β <sup>200</sup> KSAMF	b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a7</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a6</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β4</sub> o. b <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>β2</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>β4</sub>
903,934	1806,856	2	2,6	K-50 x K-200	+	α <sup>048</sup> FFKVPDNEE β <sup>200</sup> KSAMF	b <sub>a3</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub> ; y <sub>a2</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a4</sub> ; y <sub>a5</sub> o. b <sub>a4</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a7</sub> o. b <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O; b <sub>β1</sub> -NH <sub>3</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β4</sub> o. b <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O o. y <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β4</sub>

## Anhang

**Tabelle-A 2 Fortsetzung**

903,932	1806,856	2	0,2	K-50 x K-200	-	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEE}$ $\beta^{200}\text{KSAMF}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a5}; b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}$ o. $y_{a8}; b_{a8}\text{-H}_2\text{O}$ o. $y_{a8}\text{-H}_2\text{O}$ o. $b_{\beta4}; y_{a2}$ o. $b_{\beta2}\text{-H}_2\text{O}; y_{a2}\text{-H}_2\text{O}; y_{a3}; y_{a5}$ o. $b_{a4}; y_{a6}; y_{a7}$ o. $b_{a7}\text{-H}_2\text{O}; y_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ o. $b_{\beta3}\text{-NH}_3; b_{\beta1}\text{-NH}_3; b_{\beta2}; b_{\beta3}; b_{\beta4}\text{-H}_2\text{O}; y_{\beta2}; y_{\beta4}\text{-NH}_3$
911,931	1822,851	2	2,3	K-50 x K-200	+	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEE}$ $\beta^{200}\text{KSAMF}$	$b_{a3}\text{-NH}_3; b_{a4}; b_{a6}\text{-NH}_3; b_{a7}; y_{a3}; y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}$ o. $b_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}; y_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ o. $b_{\beta3}; y_{a8}$ o. $b_{a8}; b_{\beta1}\text{-NH}_3; b_{\beta2}; b_{\beta3}\text{-H}_2\text{O}; b_{\beta4}$ o. $b_{a8}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ o. $y_{a8}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}; y_{\beta4}$
911,929	1822,851	2	-0,2	K-50 x K-200	-	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEE}$ $\beta^{200}\text{KSAMF}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}$ o. $y_{a8}; b_{a8}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ o. $y_{a8}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ o. $b_{\beta4}; y_{a3}; y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}\text{-H}_2\text{O}$ o. $b_{\beta3}; b_{\beta1}\text{-NH}_3; b_{\beta2}\text{-NH}_3; b_{\beta3}\text{-H}_2\text{O};$
924,464	1847,915	2	2,6	K-50 x K-29	+	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEE}$ $\beta^{027}\text{WYKK}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}$ o. $y_{a8}; y_{a3}; y_{a5}; y_{a6}; b_{\beta3}; y_{\beta2}$
981,983	1962,957	2	1,1	K-50 x K-200	+	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEE}$ $\beta^{199}\text{RKSAMF}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}$ o. $y_{a8}; y_{a3}; y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}$ o. $b_{a7}\text{-H}_2\text{O}; y_{a7}\text{-H}_2\text{O}$ o. $b_{\beta4}; b_{\beta3}; b_{\beta5}$ o. $b_{a8}\text{-NH}_3/\text{NH}_3; y_{\beta4}\text{-NH}_3$
988,025	1975,036	2	3,0	K-50 x K-126	+	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEE}$ $\beta^{123}\text{SIYKLK}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a7}\text{-NH}_3$ o. $y_{a7}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}\text{-NH}_3; y_{a8}$ o. $b_{a8}$ o. $b_{\beta5}; y_{\beta4}\text{-NH}_3$
767,100	2299,281	3	2,1	K-142 x K-128	+	$\alpha^{137}\text{AEQQGKLLTPEEVVDR}$ $\beta^{127}\text{LKK}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a5}; b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}; b_{a9}; b_{a9}$ o. $y_{a6}\text{-NH}_3$ o. $y_{\beta2}; b_{a11}\text{-H}_2\text{O}; b_{a12}; b_{a15}; y_{a3}; y_{a5}\text{-NH}_3; y_{a6}; y_{a7}; y_{a8}; y_{a9}; y_{a10}; y_{a12}; y_{a13}\text{-H}_2\text{O}; y_{a14}; b_{\beta2}\text{-NH}_3$
832,100	2494,280	3	2,2	K-142 x K-200	+	$\alpha^{137}\text{AEQQGKLLTPEEVVDR}$ $\beta^{200}\text{KSAMF}$	$b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}$ o. $b_{\beta4}; b_{a8}\text{-NH}_3; b_{a9}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}; b_{a10}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3; b_{a10}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ o. $y_{a10}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3; b_{a11}\text{-H}_2\text{O}; b_{a12}; b_{a13}$ o. $b_{\beta2}\text{-H}_2\text{O}; b_{a13}\text{-NH}_3; b_{a14}; b_{a15}; y_{a3}; y_{a4}; y_{a5}\text{-H}_2\text{O}; y_{a6}; y_{a7}; y_{a8}; y_{a9}; y_{a10}; y_{a11}; y_{a13}\text{-NH}_3; y_{a14}; y_{a15}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}; b_{\beta1}; b_{\beta2}; b_{\beta3}; y_{\beta2}; y_{\beta4}$
1249,593	2498,173	2	1,8	K-50 x K-200	+	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEEATQYVE}$ $\beta^{200}\text{KSAMF}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a5}\text{-H}_2\text{O}; b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}; b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}; b_{a12}; b_{a13}; b_{a14}$ o. $y_{a14}; y_{a3}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a7}; y_{a8}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3; y_{a10}; y_{a11}; y_{a12}; y_{a13}; y_{a13}\text{-H}_2\text{O}$ o. $b_{\beta3}\text{-NH}_3; y_{a14}\text{-NH}_3$ o. $b_{a14}\text{-NH}_3$ o. $b_{\beta4}; y_{\beta4}$
833,396	2498,173	3	0,3	K-50 x K-200	-	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEEATQYVE}$ $\beta^{200}\text{KSAMF}$	$b_{a4}; b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}; b_{a12}; b_{a12}$ o. $y_{a12}; b_{a13}; b_{a14}$ o. $y_{a14}; b_{a14}\text{-H}_2\text{O}$ o. $y_{a14}\text{-H}_2\text{O}$ o. $b_{\beta4}; y_{a2}; y_{a3}; y_{a6}$ o. $b_{\beta2}; y_{a11}; y_{a12}; y_{a13}$ o. $b_{\beta2}; y_{\beta2}$
1249,590	2498,173	2	-0,1	K-50 x K-200	-	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEEATQYVE}$ $\beta^{200}\text{KSAMF}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}; b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}; b_{a12}; b_{a13}; b_{a14}$ o. $y_{a14}; b_{a14}\text{-H}_2\text{O}$ o. $y_{a14}\text{-H}_2\text{O}$ o. $b_{\beta4}; y_{a3}; y_{a4}; y_{a5}$ o. $y_{a11}\text{-NH}_3; y_{a5}\text{-H}_2\text{O}; y_{a6}; y_{a8}; y_{a9}; y_{a11}; y_{a12}; b_{\beta3}; b_{\beta3}\text{-NH}_3$ o. $y_{a13}\text{-H}_2\text{O}; b_{\beta4}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3; y_{\beta4}$

## Anhang

**Tabelle-A 2 Fortsetzung**

836,394	2507,159	3	2,8	K-30 x K-200	+	$\alpha$ <sup>030</sup> KFLEEBPSGTLFMHE $\beta$ <sup>200</sup> KSAMF	$b_{a2}; b_{a3}$ o. $b_{\beta2}; b_{a4}; b_{a5}; b_{a6}; b_{a9}$ -H <sub>2</sub> O; $b_{a11}; b_{a14}; b_{a14}$ -H <sub>2</sub> O o. $b_{\beta4}; y_{a2}; y_{a3}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}$ -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; $y_{a8}; y_{a9}; y_{a9}$ o. $b_{\beta1}$ -NH <sub>3</sub> ; $y_{a10}; y_{a11}; y_{a12}; y_{a13}; y_{a13}$ o. $b_{\beta4}$ -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; $b_{\beta2}$ -NH <sub>3</sub> ; $b_{\beta3}; y_{\beta2}$
1257,590	2514,168	2	1,7	K-50 x K-200	+	$\alpha$ <sup>048</sup> FFKVDPNEEATQYVE $\beta$ <sup>200</sup> KSAMF	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a5}; b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}$ o. $y_{a7}; b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}; b_{a12}; b_{a13}; b_{a14}$ o. $y_{a14}; b_{a14}$ -H <sub>2</sub> O o. $y_{a14}$ -H <sub>2</sub> O o. $b_{\beta4}; y_{a3}; y_{a5}$ o. $y_{a11}$ -NH <sub>3</sub> ; $y_{a6}; y_{a8}$ -H <sub>2</sub> O; $y_{a11}; y_{a12}; y_{a13}; y_{a13}$ -H <sub>2</sub> O o. $b_{\beta3}; b_{\beta3}$ -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; $b_{\beta4}$ -H <sub>2</sub> O
1257,588	2514,168	2	0,2	K-50 x K-200	-	$\alpha$ <sup>048</sup> FFKVDPNEEATQYVE $\beta$ <sup>200</sup> KSAMF	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}; b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}; b_{a12}; b_{a13}; b_{a14}$ o. $y_{a14}; b_{a14}$ -H <sub>2</sub> O o. $y_{a14}$ -H <sub>2</sub> O o. $b_{\beta4}; y_{a4}; y_{a5}$ o. $y_{a11}$ -NH <sub>3</sub> ; $y_{a6}; y_{a7}$ -H <sub>2</sub> O; $y_{a9}; y_{a10}; y_{a11}; y_{a12}; y_{a13}; y_{a13}$ -H <sub>2</sub> O o. $b_{\beta3}; y_{\beta3}; y_{\beta4}$
1135,228	3403,661	3	2,8	K-178 x K-200	+	$\alpha$ <sup>177</sup> DKWVMKMLQMDLNPSSWISQQR $\beta$ <sup>200</sup> KSAMF	$b_{a2}; b_{a6}; b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}; b_{a12}; b_{a13}; b_{a15}; b_{a16}; b_{a17}; b_{a18}; b_{a19}; b_{a20}; b_{a21}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}; y_{a8}$ o. $b_{a19}; y_{a9}; y_{a9}$ o. $y_{a18}$ -NH <sub>3</sub> ; $y_{a10}; y_{a10}$ o. $y_{a15}; y_{a12}; y_{a13}; y_{a17}$ o. $b_{\beta3}$ -NH <sub>3</sub> ; $b_{\beta3}$ -NH <sub>3</sub> ; $b_{\beta4}$

## Anhang

**Tabelle-A 3** Peptide modifiziert mit einem partiell hydrolysierten BS<sup>2</sup>G-Molekül

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	<i>z</i>	$\Delta m$ (ppm)	+/-Ca <sup>2+</sup>	modifizierte AS	AS Sequenzen
701,348	701,354	1	1	+	K-200	<sup>200</sup> kSAMF
435,267	869,534	2	-0,84	-	K-126	<sup>123</sup> SIYkLK
435,268	869,534	2	1,67	+	K-126	<sup>123</sup> SIYkLK
462,744	924,486	2	1,34	+	K-178	<sup>177</sup> DkWVMK
470,741	940,475	2	0,69	+	K-178	<sup>177</sup> DkWVmK
470,776	940,550	2	0,86	+	K-98	<sup>097</sup> LkWTFK
470,775	940,550	2	-0,82	-	K-98	<sup>097</sup> LkWTFK
499,316	997,629	2	1,23	+	K-126	<sup>123</sup> SIYkLKK
499,315	997,629	2	0,11	-	K-126	<sup>123</sup> SIYkLKK
540,795	1080,587	2	0,79	+	K-178	<sup>176</sup> RDkWVMK
540,794	1080,587	2	-0,32	-	K-178	<sup>176</sup> RDkWVMK
548,792	1096,576	2	0,05	+	K-178	<sup>176</sup> RDkWVmK
558,344	1115,692	2	1,42	+	K-126; K-128	<sup>123</sup> SIkLkK
558,343	1115,692	2	-0,17	-	K-126; K-128	<sup>123</sup> SIkLkK
609,822	1218,641	2	2,75	+	K-102	<sup>099</sup> WTFkIYDK
621,795	1242,583	2	-0,41	-	K-50	<sup>048</sup> FFkVPDNEE
662,383	1323,767	2	2,77	+	K-96; K-98	<sup>095</sup> HkLkWTFK
662,381	1323,767	2	-0,25	-	K-96; K-98	<sup>095</sup> HkLkWTFK
730,413	1459,820	2	3,44	+	(K-98); K-102	<sup>097</sup> LKWTFkIYDK
745,386	1489,769	2	1,46	+	K-102; (K-106)	<sup>099</sup> WTFkIYDKDR
745,385	1489,769	2	0,15	-	K-102; (K-106)	<sup>099</sup> WTFkIYDKDR
772,420	1543,840	2	-0,98	+	K-126 o. K-128 o. K-129	<sup>123</sup> SIYkLKKABSVE
772,421	1543,840	2	0,21	-	K-126 o. K-128 o. K-129	<sup>123</sup> SIYkLKKABSVE
789,441	1577,883	2	2,84	+	K-98; K-102	<sup>097</sup> LkWTFkIYDK
804,413	1607,832	2	-0,28	-	K-102; K-106	<sup>099</sup> WTFkIYdkDR
837,429	1673,853	2	2,34	+	K-46 o. K-50	<sup>045</sup> FkRFFKVPDNEE
837,428	1673,853	2	0,3	-	K-46 o. K-50	<sup>045</sup> FkRFFKVPDNEE
840,907	1680,811	2	1,05	+	K-129	<sup>129</sup> kABSVEVEAEQQGK
865,469	1729,933	2	2,31	+	K-142	<sup>139</sup> QQGkLLTPEEVVDR
865,467	1729,933	2	0,2	-	K-142	<sup>139</sup> QQGkLLTPEEVVDR
577,653	1730,948	3	2,47	+	(K-98) o. K-102 o. K-106	<sup>097</sup> LKWTFkIYDKDR
886,478	1771,951	2	2,53	+	K-126 o. K-128 o. K-129	<sup>123</sup> SIYkLKKABSVEVE

\*k: modifiziertes Lysin



## Anhang

**Tabelle-A 3 Fortsetzung**

886,476	1771,951	2	0,09	-	K-126 o. K-128 o. K-129	<sup>123</sup> SIYkLKKABSVEVE
925,005	1849,011	2	2,63	+	K-98; K-102; (K-106)	<sup>097</sup> LkWTFkIYDKDR
925,004	1849,011	2	1,16	-	K-98; K-102; (K-106)	<sup>097</sup> LkWTFkIYDKDR
617,006	1849,011	3	3,20	+	K-98; K-102; (K-106)	<sup>097</sup> LkWTFkIYDKDR
617,005	1849,011	3	0,49	-	K-98; K-102; (K-106)	<sup>097</sup> LkWTFkIYDKDR
965,508	1930,013	2	1,35	+	K-142	<sup>137</sup> AEQQGkLLTPEEVVDR
965,507	1930,013	2	0,13	-	K-142	<sup>137</sup> AEQQGkLLTPEEVVDR
644,007	1930,013	3	0,33	-	K-142	<sup>137</sup> AEQQGkLLTPEEVVDR
967,455	1933,907	2	1,37	+	K-50	<sup>048</sup> FFkVPDNEEATQYVE
967,454	1933,907	2	-0,05	-	K-50	<sup>048</sup> FFkVPDNEEATQYVE
971,949	1942,893	2	1,94	+	K-30	<sup>030</sup> kFLEEBPSGTLFMHE
971,947	1942,893	2	0,00	-	K-30	<sup>030</sup> kFLEEBPSGTLFMHE
979,946	1958,887	2	2,15	+	K-30	<sup>030</sup> kFLEEBPSGTLFmHE
979,945	1958,887	2	1,03	-	K-30	<sup>030</sup> kFLEEBPSGTLFmHE
986,518	1972,031	2	2,31	+	K-126 o. K-128 o. K-129	<sup>123</sup> SIYkLKKABSVEVEAE
986,516	1972,031	2	-0,01	-	K-126 o. K-128 o. K-129	<sup>123</sup> SIYkLKKABSVEVEAE
705,391	2114,164	3	3,14	+	(K-96); K-98; K-102; (K-106)	<sup>095</sup> HKLkWTFkIYDKDR
1079,563	2158,124	2	0,81	+	K-142	<sup>135</sup> VEAEQQGkLLTPEEVVDR
1079,563	2158,124	2	0,36	-	K-142	<sup>135</sup> VEAEQQGkLLTPEEVVDR
749,359	2246,062	3	2,59	+	K-46	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFMHEFkR
749,357	2246,062	3	0,13	-	K-46	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFMHEFkR
1183,089	2365,171	2	2,44	+	K-46 o. K-50	<sup>045</sup> FkRFFKVPDNEEATQYVE
1183,087	2365,171	2	0,51	-	K-46 o. K-50	<sup>045</sup> FkRFFKVPDNEEATQYVE
789,063	2365,171	3	3,53	+	K-46 o. K-50	<sup>045</sup> FkRFFKVPDNEEATQYVE
789,060	2365,171	3	0,54	-	K-46 o. K-50	<sup>045</sup> FkRFFKVPDNEEATQYVE
1220,078	2439,154	2	0,70	+	K-50	<sup>048</sup> FFkVPDNEEATQYVEAMFR
1298,635	2596,272	2	-1,58	+	K-182	<sup>179</sup> WVMkMLQMDLNPSSWISQQR
866,094	2596,272	3	1,11	+	K-182	<sup>179</sup> WVMkMLQMDLNPSSWISQQR
902,116	2704,335	3	2,19	+	K-142	<sup>130</sup> ABSVEVEAEQQGkLLTPEEVVDR
944,815	2832,430	3	2,18	+	K-129 o. K-142	<sup>129</sup> kABSVEVEAEQQGkLLTPEEVVDR
1420,197	2839,394	2	-0,75	+	K-178 o. K-182	<sup>177</sup> DkWVMKMLQMDLNPSSWISQQR
947,135	2839,394	3	0,44	+	K-178 o. K-182	<sup>177</sup> DkWVMKMLQMDLNPSSWISQQR

\*k: modifiziertes Lysin

Anhang

Tabelle-A 4 BS<sup>2</sup>G-Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und GC-Peptid 1

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	vernetzte AS von GCAP-2	+/-Ca <sup>2+</sup>	AS Sequenzen	Fragmente
510,759	1020,512	2	-0,5	K-200	-	α <sup>200</sup> KSAMF β <sup>001</sup> YR	b <sub>α1</sub> -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; b <sub>α2</sub> ; b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>β1</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>β1</sub>
518,757	1036,507	2	-0,4	K-200	+	α <sup>200</sup> KSAmF β <sup>001</sup> YR	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>β1</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub>
531,291	1061,572	2	3,3	K-29	+	α <sup>027</sup> WYKK β <sup>001</sup> YR	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α3</sub> ; b <sub>β1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>β1</sub>
588,812	1176,613	2	2,5	K-200	+	α <sup>199</sup> RKSAMF β <sup>001</sup> YR	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; b <sub>β1</sub> ; y <sub>α5</sub> ; y <sub>β1</sub>
594,850	1188,692	2	0,0	K-126	-	α <sup>123</sup> SIYKLK β <sup>001</sup> YR	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; b <sub>β1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>β1</sub>
594,851	1188,692	2	2,8	K-126	+	α <sup>123</sup> SIYKLK β <sup>001</sup> YR	b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; b <sub>β1</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>β1</sub>
622,327	1243,644	2	2,6	K-178	+	α <sup>177</sup> DKWVMK β <sup>001</sup> YR	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α5</sub>
623,822	1246,636	2	-0,0	K-106	-	α <sup>103</sup> IYDKDR β <sup>001</sup> YR	b <sub>α5</sub> o. b <sub>β1</sub> ; y <sub>α1</sub> o. y <sub>β1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub>
630,358	1259,708	2	0,1	K-98	-	α <sup>097</sup> LKWTFK β <sup>001</sup> YR	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; b <sub>β1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub>
630,360	1259,708	2	3,1	K-98	+	α <sup>097</sup> LKWTFK β <sup>001</sup> YR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; b <sub>β1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub>
679,832	1358,656	2	0,3	K-129	-	α <sup>129</sup> KABSVEVE β <sup>001</sup> YR	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; b <sub>α6</sub> ; b <sub>α7</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α6</sub>
679,832	1358,656	2	0,7	K-129	+	α <sup>129</sup> KABSVEVE β <sup>001</sup> YR	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α3</sub> ; b <sub>α5</sub> ; b <sub>α6</sub> ; b <sub>α7</sub> ; y <sub>α2</sub>
467,255	1399,745	3	3,3	K-178	+	α <sup>176</sup> RDKWVMK β <sup>001</sup> YR	b <sub>α1</sub> o. y <sub>β1</sub> -H <sub>2</sub> O; b <sub>α2</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; b <sub>α6</sub> ; b <sub>β1</sub> o. y <sub>α6</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α5</sub> ; y <sub>α6</sub>

## Anhang

**Tabelle-A 4 Fortsetzung**

781,378	1561,747	2	0,4	K-50	-	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEE}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a5}; b_{a6}; b_{a7}; y_{a3}; y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}$
781,380	1561,747	2	3,1	K-50	+	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEE}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a2}; b_{a3}; b_{a6}; b_{a7}; b_{\beta 1}; y_{a3}; y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}$
603,649	1808,927	3	3,3	K-102	+	$\alpha^{099}\text{WTFKIYDKDR}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a4}; b_{a7}; y_{a1}; y_{a2}; y_{a3}$ o. $b_{a4}\text{-NH}_3; b_{a9}$ o. $b_{\beta 1}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a8}; b_{a7}$
711,991	2133,956	3	0,6	S-37	-	$\alpha^{031}\text{FLEEBPSGTLFMHE}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a2}; b_{a3}; b_{a6}; b_{a9}; b_{a13}$ o. $y_{a13}; y_{a2}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a9}; y_{a10}; y_{a11}; y_{a12}$
1125,090	2249,171	2	0,2	K-142	-	$\alpha^{137}\text{AEQQGKLLTPEEVVDR}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a7}; b_{a8}; b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}; b_{a12}; b_{a14}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a7}; y_{a8}; y_{a10}; y_{a12}; y_{a14}$
1125,092	2249,171	2	2,9	K-142	+	$\alpha^{137}\text{AEQQGKLLTPEEVVDR}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a6}; b_{a7}; b_{a8}; b_{a9}; b_{a11}; b_{a13}; b_{a14}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a8}; y_{a11}; y_{a14}; y_{a15}\text{-H}_2\text{O}$
750,396	2249,171	3	0,5	K-142	-	$\alpha^{137}\text{AEQQGKLLTPEEVVDR}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a7}; b_{a8}; b_{a9}; y_{a7}; y_{a8}; y_{a9}; y_{a10}; y_{a12}$
750,398	2249,171	3	3,3	K-142	+	$\alpha^{137}\text{AEQQGKLLTPEEVVDR}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a3}; b_{a7}; b_{a8}; b_{a9}; y_{a7}; y_{a8}; y_{a9}; y_{a10}; y_{a11}; y_{a12}; y_{a13}; y_{a14}$
1127,037	2253,065	2	0,5	K-50	-	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEEATQYVE}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a3}; b_{a4}; b_{a8}; b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}; b_{a12}; b_{a13}; b_{a14}$ o. $y_{a14}; y_{a3}; y_{a11}; y_{a12}$
754,689	2262,051	3	0,9	K-30	-	$\alpha^{030}\text{KFLEEBPSGTLFMHE}$ $\beta^{001}\text{YR}$	$b_{a4}; b_{a5}; b_{a6}; b_{a8}; b_{a11}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a9}; y_{a10}; y_{a11}$

Anhang

Tabelle-A 5 Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1a

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	vernetzte AS von GCAP-2	+/-Ca <sup>2+</sup>	AS Sequenzen	Fragmente
545,777	1090,546	2	-0,3	F-204	-	α <sup>201</sup> SAMF β <sup>003</sup> IHUNR	b <sub>α3</sub> -H <sub>2</sub> O o. y <sub>β2</sub> -NH <sub>3</sub> ; y <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub> ; y <sub>β4</sub> ; β
432,565	1295,682	3	-0,3	A-137; E-138	-	α <sup>137</sup> AEQQGK β <sup>003</sup> IHUNR	b <sub>α5</sub> ; y <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α4</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub> ; y <sub>β4</sub> ; α; β
648,344	1295,682	2	-0,1	A-137; E-138	-	α <sup>137</sup> AEQQGK β <sup>003</sup> IHUNR	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α5</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β4</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub> ; y <sub>β4</sub> ; α; β
438,574	1313,707	3	-0,4	F-170; V-171; alternative: A-174	-	α <sup>170</sup> FVEGAR β <sup>003</sup> IHUNR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; y <sub>α1</sub> o. y <sub>β1</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α5</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub> ; y <sub>β4</sub> ; α; β Alternative A-174: y <sub>α4</sub>
440,577	1319,718	3	-0,7	G-91; T-92; L-93; Alternativen E-94-K-96 L-93-K-96	-	α <sup>091</sup> GTLEHK β <sup>003</sup> IHUNR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; y <sub>α1</sub> ; y <sub>α4</sub> o. y <sub>β3</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β4</sub> ; y <sub>β3</sub> ; y <sub>β4</sub> ; β Alternative E-94-K-96: b <sub>α3</sub> Alternative L-93-K-96: y <sub>α4</sub>
668,883	1336,758	2	0,3	I-120; Alternativen V-121-E-122 L-117-D-119	-	α <sup>117</sup> LLDIVE β <sup>003</sup> IHUNR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> o. y <sub>α4</sub> -H <sub>2</sub> O; b <sub>α5</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α5</sub> o. y <sub>β4</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β4</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub> ; α; β Alternativen V-121-E-122: y <sub>α2</sub> -H <sub>2</sub> O; L-117-D-119: b <sub>α3</sub>
714,849	1428,690	2	0,1	V-133 – E-134; Alternativen E-134 - E-136	-	α <sup>130</sup> ABSVEVE β <sup>003</sup> IHUNR	b <sub>α5</sub> ; b <sub>α6</sub> ; y <sub>α5</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β4</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub> ; y <sub>β4</sub> ; α; β Alternative E134-E136: y <sub>α3</sub>
482,260	1444,766	3	-0,5	Y-104	-	α <sup>103</sup> IYDKDR β <sup>003</sup> IHUNR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α5</sub> ; y <sub>α1</sub> o. y <sub>β1</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α5</sub> o. y <sub>β4</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub>

## Anhang

**Tabelle-A 5 Fortsetzung**

742,417	1483,827	2	0,3	V-157; D-158	-	$\alpha^{153}\text{IFLLVDE}$ $\beta^{003}\text{IHUNR}$	$b_{a2}; b_{a3}; b_{a4}; b_{a6}; y_{a3}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a6}; b_{\beta2}; b_{\beta3}; b_{\beta4};$ $y_{\beta2}; y_{\beta3}; \beta$
587,296	1759,876	3	-0,9	V-51	-	$\alpha^{048}\text{FFKVPDNEE}$ $\beta^{003}\text{IHUNR}$	$b_{a2}; b_{a3}; b_{a4}; b_{a5}\text{-NH}_3; b_{a8}$ o. $y_{a8}; y_{a4}; y_{a4}\text{-NH}_3$ o. $y_{a7}$ o. $b_{a7}\text{-NH}_3$ o. $b_{a7}\text{-H}_2\text{O}; y_{a6}; y_{a7}; b_{\beta2}; b_{\beta4}\text{-}$ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}; y_{\beta3}; y_{\beta4}; \alpha; \beta$
602,667	1805,987	3	-0,3	E-148; V-149	-	$\alpha^{143}\text{LLTPEEVVDR}$ $\beta^{003}\text{IHUNR}$	$b_{a2}; b_{a3}; b_{a7}; b_{a9}$ o. $b_{\beta4}; y_{a1}$ o. $y_{\beta1}; y_{a6}\text{-NH}_3; y_{a7};$ $y_{a8}; y_{\beta2}; y_{\beta3}$
617,649	1850,933	3	-0,5	A-63	-	$\alpha^{057}\text{ATQYVEAMFR}$ $\beta^{003}\text{IHUNR}$	$b_{a3}; y_{a1}$ o. $y_{\beta1}; y_{a3}; y_{a4}; y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}; y_{a8}; b_{\beta2}; y_{\beta3};$ $y_{\beta4}; \alpha; \beta$
617,649	1850,933	3	-0,4	V-61; (E-62-A-63)	+	$\alpha^{057}\text{ATQYVEAMFR}$ $\beta^{003}\text{IHUNR}$	$b_{a4}; b_{a5}; b_{a6}; b_{a7}; y_{a3}; y_{\beta4}; y_{a5}\text{-NH}_3$ o. $\beta; y_{a6}; y_{a7};$ $y_{a8}; y_{a9}; b_{\beta2}; y_{\beta3}; y_{\beta4}; \alpha$ Alternativen E-62-A-63: $y_{a5}$
622,981	1866,928	3	-0,3	E-62 – R-66	-	$\alpha^{057}\text{ATQYVEAmFR}$ $\beta^{003}\text{IHUNR}$	$y_{a5}; y_{a6}; y_{a7}; y_{a8}; y_{a9}; b_{\beta2}; b_{\beta3}; y_{\beta2}; y_{\beta3}; y_{\beta4}; \alpha; \beta$
638,346	1913,024	3	-0,6	Q-115-D-119	-	$\alpha^{115}\text{QELLDIVE}$ $\beta^{003}\text{YRIHUNR}$	$b_{a5}; b_{a6}; b_{a7}; y_{a2}; b_{\beta6}; y_{\beta6}$ o. $b_{a7}\text{-NH}_3$
676,993	2028,962	3	0,7	T-58; Q-59	-	$\alpha^{051}\text{VPDNEEATQYVE}$ $\beta^{003}\text{IHUNR}$	$b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}$ o. $y_{a5}\text{-H}_2\text{O}; y_{a5}\text{-NH}_3; y_{a7}\text{-NH}_3; y_{a9};$ $y_{a10}; y_{a11}; b_{\beta2}; b_{\beta3}; b_{\beta4}; y_{\beta2}; y_{\beta3}; y_{a4}\text{-H}_2\text{O}$
676,992	2028,962	3	0,2	A-57; T-58	+	$\alpha^{051}\text{VPDNEEATQYVE}$ $\beta^{003}\text{IHUNR}$	$b_{a4}; b_{a9}; b_{a10}; b_{a11}$ o. $y_{a5}\text{-H}_2\text{O}; y_{a4}; y_{a6}\text{-NH}_3; y_{a10};$ $y_{a11}; b_{\beta4}$

## Anhang

**Tabelle-A 5 Fortsetzung**

690,673	2070,003	3	0,4	A-137 – Q-140	-	$\alpha$ <sup>130</sup> ABSVEVEAEQQGK $\beta$ <sup>003</sup> IHUNR	$b_{\alpha 2}; b_{\alpha 3}$ o. $\beta; b_{\alpha 11}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 7}; y_{\alpha 8}; y_{\alpha 9}; y_{\alpha 10}; y_{\alpha 11}; y_{\beta 3};$ $\alpha$
760,372	2279,101	3	0,2	A-10 – V-16	-	$\alpha$ <sup>010</sup> AEENGAVGAADAAQLQE $\beta$ <sup>003</sup> IHUNR	$b_{\alpha 7}; b_{\alpha 11}; b_{\alpha 12}; b_{\alpha 13}; b_{\beta 14}; b_{\alpha 15}; b_{\beta 16}; y_{\alpha 2}; y_{\alpha 3}; y_{\alpha 5}$ o. $b_{\alpha 13}$

## Anhang

**Tabelle-A 6 Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und GC-Photo-Peptid 1b**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δm (ppm)	vernetzte AS des GCAP-2	+/- Ca <sup>2+</sup>	Aminosäuresequenzen	Identifizierte Fragmentionen
645,357	1289,706	2	0,5	D-177; K-178	-	α <sup>177</sup> DK β <sup>008</sup> STVQIUSALN	b <sub>β3</sub> ; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β5</sub> ; b <sub>β6</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β8</sub> ; b <sub>β9</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β4</sub> ; y <sub>β5</sub> ; y <sub>β6</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β8</sub> ; α; b <sub>β8</sub> -NH <sub>3</sub> o. β
741,885	1482,762	2	0,1	F-204	-	α <sup>201</sup> SAMF β <sup>008</sup> STVQIUSALN	b <sub>α3</sub> ; y <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; b <sub>β3</sub> -H <sub>2</sub> O; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β5</sub> ; b <sub>β6</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β8</sub> ; b <sub>β9</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β4</sub> ; y <sub>β5</sub> ; y <sub>β6</sub> ; α; β
741,885	1482,762	2	0,4	F-204	+	α <sup>201</sup> SAMF β <sup>008</sup> STVQIUSALN	b <sub>α3</sub> ; y <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β5</sub> ; b <sub>β6</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β8</sub> ; b <sub>β9</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β4</sub> ; y <sub>β5</sub> ; y <sub>β6</sub> ; α; β
749,882	1498,757	2	0	F-204	+	α <sup>201</sup> SAmF β <sup>008</sup> STVQIUSALN	b <sub>α3</sub> ; y <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; b <sub>β5</sub> ; b <sub>β6</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β8</sub> ; b <sub>β9</sub> ; y <sub>β4</sub> ; y <sub>β5</sub> ; y <sub>β6</sub> ; y <sub>β7</sub> ; α; β
768,391	1535,773	2	0,6	V-133	-	α <sup>130</sup> ACSVE β <sup>008</sup> STVQIUSALN	b <sub>α4</sub> ; y <sub>α2</sub> o. b <sub>β8</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>α2</sub> -NH <sub>3</sub> ; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β5</sub> ; b <sub>β6</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β8</sub> ; b <sub>β9</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β4</sub> ; y <sub>β5</sub> ; y <sub>β6</sub> ; y <sub>β7</sub>
769,433	1537,858	2	-0,1	Y-125	-	α <sup>123</sup> SIYK β <sup>008</sup> STVQIUSALN	b <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β5</sub> ; b <sub>β6</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β8</sub> ; y <sub>β2</sub> -NH <sub>3</sub> ; y <sub>β4</sub> ; y <sub>β5</sub> ; y <sub>β6</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β8</sub> ; α
844,453	1687,897	2	0,5	A-137; E-138	-	α <sup>137</sup> AEQQGK β <sup>008</sup> STVQIUSALN	b <sub>α2</sub> ; b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; b <sub>β3</sub> -H <sub>2</sub> O; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β5</sub> ; b <sub>β6</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β8</sub> ; b <sub>β9</sub> ; y <sub>β4</sub> ; y <sub>β5</sub> ; y <sub>β6</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β8</sub> ; α; β

## Anhang

**Tabelle-A 6 Fortsetzung**

568,961	1704,870	3	-0,6	C-111-I-112; Alternativen N-109 - C-111;	-	$\alpha^{109}\text{NGCIDR}$ $\beta^{008}\text{STVQIUSALN}$	$b_{\alpha 5}$ o. $y_{\alpha 4}$ o. $b_{\beta 5}\text{-H}_2\text{O}$ ; $y_{\alpha 1}$ ; $y_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 5}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ ; $b_{\beta 2}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $b_{\beta 5}$ ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 7}$ ; $b_{\beta 8}$ ; $b_{\beta 9}$ o. $y_{\alpha 5}\text{-NH}_3$ ; $y_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 4}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $y_{\beta 7}$ ; $y_{\beta 8}$ o. $y_{\alpha 4}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ ; $\beta$ ; Alternativen N-109-C-111: $b_{\alpha 3}$
852,939	1704,870	2	0,5	G-110 - I-112; Alternativen- N-09 - C-111	-	$\alpha^{109}\text{NGCIDR}$ $\beta^{008}\text{STVQIUSALN}$	$b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $b_{\beta 3}\text{-H}_2\text{O}$ ; $b_{\beta 4}$ ; $b_{\beta 5}$ ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 8}$ ; $b_{\beta 9}$ o. $y_{\alpha 5}\text{-NH}_3$ ; $y_{\beta 4}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $y_{\beta 7}$ ; $y_{\beta 8}$ o. $y_{\alpha 4}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ Alternativen N-109-C-111: $b_{\alpha 3}$
569,312	1705,923	3	-0,7	V-171-E-172	-	$\alpha^{170}\text{FVEGAR}$ $\beta^{008}\text{STVQIUSALN}$	$b_{\alpha 3}\text{-NH}_3$ ; $b_{\alpha 4}$ o. $b_{\beta 8}$ ; $y_{\alpha 1}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 5}\text{-NH}_3$ o. $\beta$ ; $b_{\beta 2}$ ; $b_{\beta 3}\text{-H}_2\text{O}$ ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 7}$ ; $b_{\beta 9}$ ; $y_{\beta 2}\text{-NH}_3$ o. $y_{\alpha 2}\text{-H}_2\text{O}$ ; $y_{\beta 4}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $y_{\beta 7}$ ; $y_{\beta 8}$ ; $y_{\beta 9}$ ; $\alpha$ ; $\beta$
853,465	1705,923	2	0	V-171 - E-172	-	$\alpha^{170}\text{FVEGAR}$ $\beta^{008}\text{STVQIUSALN}$	$b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 5}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $b_{\beta 4}$ ; $b_{\beta 5}$ ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 7}$ ; $b_{\beta 8}$ ; $b_{\beta 9}$ ; $y_{\beta 3}$ ; $y_{\beta 4}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $y_{\beta 7}$ ; $y_{\beta 9}$ ; $\alpha$ ; $\beta$
853,466	1705,923	2	0,5	F-170 - E-172	+	$\alpha^{170}\text{FVEGAR}$ $\beta^{008}\text{STVQIUSALN}$	$b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $b_{\beta 3}\text{-H}_2\text{O}$ ; $b_{\beta 4}$ ; $b_{\beta 5}$ ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 8}$ ; $b_{\beta 9}$ ; $y_{\beta 4}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $y_{\beta 7}$ ; $\alpha$ ; $\beta$
569,312	1705,923	3	-0,3	F-170	+	$\alpha^{170}\text{FVEGAR}$ $\beta^{008}\text{STVQIUSALN}$	$y_{\alpha 1}$ ; $y_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 5}\text{-NH}_3$ o. $\beta$ ; $b_{\beta 2}$ ; $b_{\beta 3}\text{-H}_2\text{O}$ ; $b_{\beta 4}$ ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; $b_{\beta 8}$ ; $b_{\beta 9}$ ; $y_{\beta 4}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $y_{\beta 7}$ ; $y_{\beta 8}$ ; $\alpha$ ; $\beta+\text{H}_2\text{O}$
571,316	1711,934	3	-1,0	L-93	-	$\alpha^{091}\text{GTLEHK}$ $\beta^{008}\text{STVQIUSALN}$	$b_{\alpha 3}\text{-H}_2\text{O}$ o. $y_{\beta 6}\text{-NH}_3$ ; $b_{\alpha 5}$ o. $b_{\beta 9}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ ; $y_{\alpha 4}\text{-H}_2\text{O}$ o. $b_{\beta 5}\text{-NH}_3$ ; $b_{\beta 2}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 8}$ ; $b_{\beta 9}$ ; $y_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $y_{\beta 7}$ ; $y_{\beta 8}$ ; $y_{\beta 9}\text{-NH}_3$
856,471	1711,934	2	0,3	L-93 – E-94	-	$\alpha^{091}\text{GTLEHK}$ $\beta^{008}\text{STVQIUSALN}$	$b_{\alpha 4}\text{-NH}_3$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $b_{\beta 4}$ ; $b_{\beta 5}$ ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 7}$ ; $b_{\beta 8}$ ; $b_{\beta 9}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}\text{-NH}_3$ ; $y_{\beta 7}$ ; $y_{\beta 8}$ ; $\alpha$ ; $\beta$



## Anhang

**Tabelle-A 6 Fortsetzung**

865,434	1729,860	2	0,5	V-51	-	$\alpha^{051}$ VPDNEE $\beta^{008}$ STVQIUSALN	$b_{\alpha 3}; b_{\alpha 5}; y_{\alpha 5}; b_{\beta 3}-H_2O; b_{\beta 4}; b_{\beta 5}; b_{\beta 6}; b_{\beta 7}; b_{\beta 8}; b_{\beta 9}; y_{\beta 4}; y_{\beta 5}; y_{\beta 6}; y_{\beta 7}; y_{\beta 8}; \alpha; \beta$
869,455	1737,902	2	0,2	T-58	-	$\alpha^{057}$ ATQYVE $\beta^{008}$ STVQIUSALN	$b_{\alpha 2}; b_{\alpha 3}; b_{\alpha 4}; b_{\alpha 5}-NH_3; y_{\alpha 2}; y_{\alpha 3}-H_2O; y_{\alpha 5}; b_{\beta 5}; b_{\beta 6}; b_{\beta 7}-NH_3/H_2O; b_{\beta 8}-H_2O; b_{\beta 9}; y_{\beta 3}; y_{\beta 4}; y_{\beta 5}; y_{\beta 6}; y_{\beta 7}-NH_3/H_2O; y_{\beta 8}; y_{\beta 9}; \alpha$
882,446	1763,884	2	0,6	V-133; Alternativen E-134 – V-135; A-130 – C-131	-	$\alpha^{130}$ ACSVEVE $\beta^{008}$ STVQIUSALN	$b_{\alpha 4}; b_{\alpha 5}; b_{\alpha 6}; y_{\alpha 2}; y_{\alpha 3}; y_{\alpha 4}-NH_3; y_{\alpha 5}; b_{\beta 3}; b_{\beta 5}; b_{\beta 6}; b_{\beta 7}; b_{\beta 8}; b_{\beta 9}; y_{\beta 3}; y_{\beta 4}; y_{\beta 5}; y_{\beta 6}; y_{\beta 7}-NH_3; y_{\beta 8}; y_{\beta 9}-NH_3; \alpha; \text{Alternativen: E-134 – V-135 } y_{\alpha 3}-NH_3; \text{A-130 – C-131 } b_{\alpha 2}; y_{\alpha 5}$
631,331	1891,979	3	-0,6	K-129 – C-131 Alternativen A-130 – C-131	-	$\alpha^{129}$ KACSVEVE $\beta^{008}$ STVQIUSALN	$b_{\alpha 3}; b_{\alpha 5}; b_{\alpha 6}; b_{\alpha 7}; y_{\alpha 2}; y_{\alpha 3}; b_{\beta 3}; b_{\beta 4}-H_2O; b_{\beta 5} \text{ o. } y_{\beta 7}-H_2O; b_{\beta 7}; b_{\beta 8}-H_2O \text{ o. } b_{\alpha 6}-NH_3/H_2O; b_{\beta 9}; y_{\beta 2}; y_{\beta 4}; y_{\beta 5}; y_{\beta 6}; y_{\beta 7}; y_{\beta 8}; \alpha \text{ o. } b_{\alpha 7}-NH_3; \text{alternative A-130 – C-131: } y_{\alpha 7}-H_2O$
946,494	1891,979	2	0,0	K-129 – C-131 Alternative C-131	-	$\alpha^{129}$ KACSVEVE $\beta^{008}$ STVQIUSALN	$b_{\alpha 3}; b_{\alpha 4}; b_{\alpha 5}; b_{\alpha 6}; b_{\alpha 7}; y_{\alpha 3}; y_{\alpha 5}; b_{\beta 3}; b_{\beta 5}; b_{\beta 6}; b_{\beta 7}-NH_3; b_{\beta 8}; b_{\beta 9}; y_{\beta 3}; y_{\beta 4}; y_{\beta 5}; y_{\beta 6}; y_{\beta 7}; y_{\beta 8}-NH_3; \alpha \text{ o. } b_{\alpha 7}-NH_3/H_2O; \text{alternative C-131: } y_{\alpha 6}; y_{\alpha 7}-H_2O$
639,341	1916,008	3	0,7	A-137 Alternativen V135 – E-136;	-	$\alpha^{135}$ VEAEQQGK $\beta^{008}$ STVQIUSALN	$b_{\alpha 3}-H_2O; b_{\alpha 6} \text{ o. } y_{\beta 8}-NH_3 \text{ o. } y_{\alpha 5}-H_2O; b_{\alpha 6}-NH_3/H_2O; b_{\alpha 7}-H_2O; y_{\alpha 2}; y_{\alpha 3}; y_{\alpha 4}; y_{\alpha 5} \text{ o. } b_{\beta 9}-NH_3/H_2O; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 7}; b_{\beta 3}; b_{\beta 6}; b_{\beta 7}; b_{\beta 8} \text{ o. } y_{\alpha 6}-NH_3; b_{\beta 8}-NH_3/H_2O; b_{\beta 9}; y_{\beta 2}; y_{\beta 4}-NH_3; y_{\beta 5}; y_{\beta 6}; y_{\beta 7}; y_{\beta 8}; y_{\beta 9}; \alpha; \beta-NH_3; \text{alternative V135 – E-134: } b_{\alpha 2}$
654,661	1961,971	3	-1,3	N-109; G-110	-	$\alpha^{109}$ NGCIDRQE $\beta^{008}$ STVQIUSALN	$b_{\alpha 2} \text{ o. } b_{\alpha 7}-NH_3; b_{\alpha 3}-NH_3/H_2O; b_{\alpha 4} \text{ o. } y_{\beta 5}-H_2O; b_{\alpha 5} \text{ o. } y_{\beta 6}-NH_3; b_{\alpha 5}-H_2O; b_{\alpha 7} \text{ o. } b_{\beta 9}-NH_3; b_{\alpha 7}-NH_3/H_2O; y_{\alpha 2}-H_2O; y_{\alpha 3}; y_{\alpha 4}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 7}-NH_3 \text{ o. } b_{\beta 9}; b_{\beta 3}-H_2O; b_{\beta 5} \text{ o. } y_{\alpha 4}-H_2O; b_{\beta 6}; b_{\beta 8}; y_{\beta 2}-NH_3; y_{\beta 4}; y_{\beta 5}; y_{\beta 6}; y_{\beta 7}; y_{\beta 8}; y_{\beta 9}; \beta$
981,490	1961,971	2	0,6	N-109; G-110	-	$\alpha^{109}$ NGCIDRQE $\beta^{008}$ STVQIUSALN	$b_{\alpha 2}-H_2O; b_{\alpha 3}; b_{\alpha 4} \text{ o. } y_{\beta 5}-H_2O; b_{\alpha 4}-NH_3; b_{\alpha 5}; b_{\alpha 6}; b_{\alpha 7}; y_{\alpha 3}; y_{\alpha 4}; y_{\alpha 5}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 7}; b_{\beta 4}-H_2O; b_{\beta 6}; b_{\beta 7}; b_{\beta 8}; b_{\beta 9} \text{ o. } y_{\alpha 7}-NH_3/H_2O; y_{\beta 3}-NH_3; y_{\beta 4}; y_{\beta 5}; y_{\beta 6}; y_{\beta 8}; y_{\beta 9}$

## Anhang

**Tabelle-A 6 Fortsetzung**

673,669	2018,992	3	-0,4	N-109; G-110	-	$\alpha$ <sup>109</sup> NGBIDRQE $\beta$ <sup>008</sup> STVQIUSALN	$b_{\alpha 2}$ -NH <sub>3</sub> o. $b_{\beta 8}$ ; $b_{\alpha 4}$ o. $y_{\beta 5}$ -NH <sub>3</sub> ; $b_{\alpha 5}$ -H <sub>2</sub> O; $b_{\alpha 6}$ -NH <sub>3</sub> ; $b_{\alpha 7}$ o. $b_{\beta 9}$ -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; $b_{\alpha 7}$ -H <sub>2</sub> O; $y_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 5}$ -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; $y_{\alpha 7}$ -NH <sub>3</sub> o. $b_{\beta 9}$ ; $b_{\beta 5}$ -NH <sub>3</sub> ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 7}$ ; $b_{\beta 8}$ ; $y_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 4}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $y_{\beta 7}$ ; $y_{\beta 8}$ ; $y_{\beta 9}$ ; $\alpha$ ; $\beta$ -NH <sub>3</sub>
733,406	2198,203	3	-0,6	E-147 (P-146)	+	$\alpha$ <sup>143</sup> LLTPEEVVDR $\beta$ <sup>008</sup> STVQIUSALN	$b_{\alpha 2}$ o. $y_{\beta 2}$ -H <sub>2</sub> O; $b_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 6}$ -H <sub>2</sub> O; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 9}$ -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O o. $b_{\beta 9}$ ; $b_{\beta 6}$ ; $b_{\beta 8}$ o. $y_{\alpha 8}$ -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ; $b_{\beta 9}$ -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $y_{\beta 7}$ ; $y_{\beta 8}$ ; $y_{\beta 9}$ ; $\alpha$ ; $\beta$
1211,094	2421,178	2	1,0	V-51 Alternativen E-55; E-56; E-62	-	$\alpha$ <sup>051</sup> VPDNEEATQYVE $\beta$ <sup>008</sup> STVQIUSALN	$b_{\alpha 1}$ -NH <sub>3</sub> ; $b_{\alpha 3}$ -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 10}$ o. $b_{\beta 8}$ ; $b_{\alpha 11}$ -NH <sub>3</sub> ; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $b_{\beta 7}$ ; ( $b_{\beta 8}$ ); $b_{\beta 9}$ ; $y_{\beta 4}$ ; $y_{\beta 5}$ ; $y_{\beta 6}$ ; $\alpha$ ; $\beta$ ; Alternativen E-55: $y_{\alpha 8}$ ; E-56: $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; E-62: $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 10}$ -H <sub>2</sub> O; $b_{\alpha 11}$

Tabelle-A 7 Distanzen innerhalb des GCAP-2/GC-Peptid 1-Komplexes

Quervernetzungsprodukte BS <sup>2</sup> G (max. Distanz 19Å)						Quervernetzungsprodukte Photo-Leu Peptide (max. Distanz 9Å)					
Peptid (C $\alpha$ )	GCAP- 2 (C $\alpha$ )	Min. Å	Max. Å	Mittl.	Std.	Peptid (C $\alpha$ )	GCAP- 2 (C $\alpha$ )	Min. Å	Max. Å	Mittl.	Std.
Tyr-1	Lys-50	14,57	21,48	18,14	1,03	Val-5	Val-61	6,41	11,00	8,59	0,60
	Lys-98	15,02	22,97	18,35	1,06	Leu-13	Pro- 146	3,72	11,63	7,80	1,02
	Lys- 102	15,12	22,83	18,33	0,95		Glu- 147	5,96	14,30	9,82	1,12
	Lys- 126	9,00	13,93	11,72	0,77		Phe- 170	6,72	12,16	10,28	0,67
	Lys- 129	8,27	13,75	10,41	0,7		Val-171	7,92	13,35	11,53	0,68
	Lys- 142	12,39	18,85	15,62	0,89						
	Lys- 178	15,04	19,38	16,79	0,6						

Anhang

Tabelle-A 8 Intermolekulare Quervernetzungsprodukte des CaM/Bpa-M13-Komplexes identifiziert aus der unteren Gelbande I (Abb. 37 B)

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δm (ppm)	Quervernetzte AS des CaM/Bpa-M13 Komplexes	Aminosäuresequenzen	Identifizierte Fragmentionen
530,7601	1060,5132	2	-0,31	M-124 x X-4	α <sup>122</sup> DEMIR β <sup>004</sup> XK	b <sub>a4</sub> or a <sub>β1</sub> ; y <sub>a4</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a2</sub> ; b <sub>β1</sub>
533,7699	1066,5333	2	-0,82	M-124 x J-4	α <sup>122</sup> DEMIR β <sup>004</sup> JK	b <sub>a4</sub> or a <sub>β1</sub> ; y <sub>a4</sub> ; y <sub>a2</sub> ; b <sub>β1</sub>
396,8741	1188,6081	3	-0,47	M-124 x X-4	α <sup>122</sup> DEMIR β <sup>004</sup> XKK	b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; a <sub>a2</sub> ; y <sub>a4</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a1</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub>
594,8076	1188,6081	2	-0,21	M-124 x X-4	α <sup>122</sup> DEMIR β <sup>004</sup> XKK	y <sub>a4</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub>β2</sub> ; a <sub>β1</sub>
398,8808	1194,6283	3	-0,49	M-124 x J-4	α <sup>122</sup> DEMIR β <sup>004</sup> JKK	b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; a <sub>a2</sub> ; y <sub>a4</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a2</sub> ; y <sub>a1</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub>
597,8176	1194,6283	2	-0,22	M-124 x J-4	α <sup>122</sup> DEMIR β <sup>004</sup> JKK	a <sub>a3</sub> ; y <sub>a4</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a1</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β1</sub> ; a <sub>β1</sub>
694,8475	1388,6878	2	-0,17	M-124 x X-4	α <sup>122</sup> DEMIREA β <sup>004</sup> XKK	b <sub>a5</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; b <sub>β2</sub> ; b <sub>β1</sub>
465,5739	1394,7080	3	-0,52	M-124 x J-4	α <sup>122</sup> DEMIREA β <sup>004</sup> JKK	b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; a <sub>a2</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a4</sub> ; b <sub>β2</sub>
697,8579	1394,7080	2	0,31	M-124 x J-4	α <sup>122</sup> DEMIREA β <sup>004</sup> JKK	b <sub>a6</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; b <sub>β2</sub>

Anhang

Tabelle-A 8 Fortsetzung

805,8837	1610,7593	2	0,47	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMMTAK}$ $\beta^{004}\text{XK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$
539,5978	1616,7794	3	-0,31	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMMTAK}$ $\beta^{004}\text{JK}$	$b_{a7}$ ; $b_{a6}$ (M144); $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $a_{a4}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a4}$ (M144); $y_{a3}$ ; $y_{a2}$
808,8936	1616,7794	2	0,27	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMMTAK}$ $\beta^{004}\text{JK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$
580,2895	1738,8543	3	0,24	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMMTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$
869,9311	1738,8543	2	0,33	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMMTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ (M144); $b_{a4}$ ; $y_{a8}$ or $b_{\beta 1}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$
582,2962	1738,8543	3	-0,19	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMMTAK}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a4}$ (M144); $y_{a3}$
872,9411	1738,8543	2	0,24	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMMTAK}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$
585,6209	1754,8492	3	-0,68	M-144 (or M-145) x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMmTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ (M144); $b_{a4}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a8}$ or $b_{\beta 1}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a4}$ (M144)
585,6209	1754,8492	3	-0,68	M-144 (or M-145) x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmMTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ (M144); $b_{a4}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a8}$ or $b_{\beta 1}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a4}$ (M144)
877,9288	1754,8492	2	0,68	M-144 (or M-145) x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMmTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a6}$ (M144); $y_{a8}$ or $b_{\beta 1}$ ; $y_{a5}$

Anhang

**Tabelle-A 8 Fortsetzung**

877,9288	1754,8492	2	0,68	M-144 (or M-145) x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmMTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a6}$ (M144); $y_{a8}$ or $b_{\beta 1}$ ; $y_{a5}$
587,6277	1760,8693	3	-0,44	M-144 (or M-145) x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMmTAK}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ (M144); $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a4}$ (M144); $y_{a3}$ ; $y_{a2}$
587,6277	1760,8693	3	-0,44	M-144 (or M-145) x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmMTAK}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ (M144); $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a4}$ (M144); $y_{a3}$ ; $y_{a2}$
880,9388	1760,8693	2	0,56	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMmTAK}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $y_{a8}$ or $b_{\beta 1}$ ; $y_{a7}$
880,9388	1760,8693	2	0,56	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmMTAK}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $y_{a8}$ or $b_{\beta 1}$ ; $y_{a7}$
628,3124	1982,9230	3	-0,23	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMAR}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a10}$ ; $b_{a9}$ or $y_{a9}$ ; $b_{a8}$ or $y_{a8}$ ; $b_{a7}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a8}$ or $y_{a4}$ ; $y_{a7}$
628,3124	1982,9230	3	-0,23	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMARK}$ $\beta^{004}\text{XK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{a8}$ or $y_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ or $y_{a4}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ or $y_{a5}$ ; $y_{a7}$
944,9767	1988,9432	2	1,55	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMAR}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a10}$ ; $b_{a9}$ or $y_{a9}$ ; $b_{a7}$ ; $y_{a10}$ ; $b_{\beta 2}$
944,9767	1988,9432	2	1,55	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMARK}$ $\beta^{004}\text{JK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{a7}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a10}$

## Anhang

**Tabelle-A 8 Fortsetzung**

805,7171	2415,1359	3	0,38	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{133}\text{DGQVNYEEFVQMMTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a15}$ or $b_{\beta2}$ ; $b_{a13}$ or $y_{a13}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ or $y_{a3}$ ; $y_{a15}$ ; $y_{a14}$ ; $y_{a12}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a4}(\text{M144})$ ; $y_{a3}$
807,7234	2421,1561	3	-0,03	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha^{133}\text{DGQVNYEEFVQMMTAK}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a15}$ or $b_{\beta2}$ ; $b_{a14}$ or $y_{a8}$ ; $b_{a13}$ or $y_{a13}$ ; $b_{a12}$ ; $b_{a11}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ or $y_{a3}$ ; $y_{a15}$ ; $y_{a14}$ ; $y_{a13}$ ; $y_{a12}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a6}$
928,1403	2782,4055	3	0,33	X-4 x M-144 or M-145	$\alpha^{004}\text{XKKNFIAVSAANR}$ $\beta^{139}\text{EEFVQMMTAK}$	$b_{a10}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $b_{\beta9}$ or $y_{\beta9}$ ; $b_{\beta8}$ ; $b_{\beta7}$ ; $y_{\beta8}$ ; $y_{\beta7}$ ; $y_{\beta6}$ ; $y_{\beta5}$
930,1477	2788,4256	3	1,06	J-4 x M-144 or M-145	$\alpha^{004}\text{JKKNFIAVSAANR}$ $\beta^{139}\text{EEFVQMMTAK}$	$b_{a10}$ ; $b_{a9}$ or $b_{\beta6}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $b_{\beta9}$ or $y_{\beta9}$ ; $y_{\beta8}$

Anhang

**Tabelle-A 9** Intermolekulare Quervernetzungsprodukte des CaM/Bpa-M13-Komplexes identifiziert aus der oberen Gelbande II (Abb. 37 B)

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	Quervernetzte AS des CaM/Bpa-M13 Komplexes	Aminosäuresequenzen	Identifizierte Fragmentionen
402,2277	803,4484	2	-0,48	X-4 x M-76	α <sup>004</sup> XKK β <sup>076</sup> MK	b <sub>α2</sub> or b <sub>β1</sub> ; y <sub>α1</sub> or y <sub>β1</sub> ; α-2; β-16
405,2378	809,4685	2	-0,16	J-4 x M-76	α <sup>004</sup> JKK β <sup>066</sup> MK	b <sub>α2</sub> or b <sub>β1</sub> ; y <sub>α1</sub> or y <sub>β1</sub> ; α-2; β-16
466,2752	931,5434	2	-0,37	X-4 x M-76	α <sup>004</sup> XKK β <sup>075</sup> KMK	b <sub>α2</sub> or b <sub>β2</sub> ; b <sub>α1</sub> ; y <sub>α1</sub> or y <sub>β1</sub> ; y <sub>β2</sub>
469,2851	937,5635	2	-0,61	J-4 x M-76	α <sup>004</sup> JKK β <sup>075</sup> KMK	b <sub>α2</sub> or b <sub>β2</sub> ; b <sub>α1</sub> ; y <sub>α1</sub> or y <sub>β1</sub> ; y <sub>β2</sub>
471,7739	942,5407	2	-0,30	X-4 x L-105	α <sup>004</sup> XKK β <sup>104</sup> ELR	b <sub>α2</sub> or y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; b <sub>α1</sub> ; y <sub>α1</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub>
471,7739	942,5407	2	-0,30	X-4 x I-85	α <sup>004</sup> XKK β <sup>084</sup> EIR	b <sub>α2</sub> or y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; b <sub>α1</sub> ; y <sub>α1</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub>
474,7838	948,5609	2	-0,48	J-4 x L-105	α <sup>004</sup> JKK β <sup>104</sup> ELR	b <sub>α2</sub> or y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; b <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α1</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub>
474,7838	948,5609	2	-0,48	J-4 x I-85	α <sup>004</sup> JKK β <sup>084</sup> EIR	b <sub>α2</sub> or y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; b <sub>α1</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α1</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub>
530,7600	1060,5132	2	-0,54	M-124 x X-4	α <sup>122</sup> DEMIR β <sup>004</sup> XK	b <sub>α4</sub> ; b <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α3</sub> ; b <sub>β1</sub>



Anhang

Tabelle-A 9 Fortsetzung

533,7700	1066,5333	2	-0,62	M-124 x J-4	$\alpha^{122}$ DEMIR $\beta^{004}$ JK	$b_{a4}; b_{a3}; y_{a4}; y_{a3}; b_{\beta 1}$
559,2652	1117,5234	2	-0,27	M-51 x X-4	$\alpha^{050}$ DMINEV $\beta^{004}$ XK	$b_{a5}; b_{a4}; b_{a2}; y_{a4}; b_{\beta 1}$
562,2754	1123,5436	2	-0,04	M-51 x J-4	$\alpha^{050}$ DMINEV $\beta^{004}$ JK	$b_{a5}; b_{a4}; b_{a3}; b_{a2}; y_{a4}; y_{a3}; b_{\beta 1}$
396,8739	1188,6081	3	-0,85	M-124 x X-4	$\alpha^{122}$ DEMIR $\beta^{004}$ XKK	$b_{a4}; b_{a3}; b_{a2}; a_{a2}; y_{a4}; y_{a3}; y_{a2}; y_{a1}; b_{\beta 2}; y_{\beta 1}$
594,8077	1188,6081	2	-0,04	M-124 x X-4	$\alpha^{122}$ DEMIR $\beta^{004}$ XKK	$a_{a4}; b_{a2}; y_{a4}; y_{a3}; y_{a2}; b_{\beta 2}; a_{\beta 1}$
398,8809	1194,6283	3	0,21	M-124 x J-4	$\alpha^{122}$ DEMIR $\beta^{004}$ JKK	$b_{a4}; b_{a3}; b_{a2}; a_{a2}; y_{a4}; y_{a3}; y_{a2}; y_{a1}; b_{\beta 2}; y_{\beta 1}$
597,8176	1194,6283	2	-0,30	M-124 x J-4	$\alpha^{122}$ DEMIR $\beta^{004}$ JKK	$b_{a3}; y_{a4}; y_{a3}; b_{\beta 2}; b_{\beta 1}; y_{\beta 2}$
602,8054	1204,6031	2	0,33	M-124 x X-4	$\alpha^{122}$ DEmIR $\beta^{004}$ XKK	$y_{a2}; b_{\beta 2}; \alpha-16; \alpha-16-48; \beta-2; b_{\beta 2-2}$
404,2124	1210,6232	3	-0,41	M-124 x J-4	$\alpha^{122}$ DEmIR $\beta^{004}$ JKK	$b_{a3}; b_{a2}; a_{a2}; y_{a3}; \alpha-16; \beta-2$
605,8152	1210,6232	2	-0,01	M-124 x J-4	$\alpha^{122}$ DEmIR $\beta^{004}$ JKK	$b_{a4}$ or $a_{\beta 2}; b_{a2}; y_{a2}; b_{\beta 2}; a_{\beta 1}; \alpha-16; \alpha-16-48; \beta-2; b_{\beta 2-2}$

Anhang

Tabelle-A 9 Fortsetzung

631,3106	1261,6133	2	0,41	m-51 x X-4	$\alpha^{50}\text{DmINEV}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a5}; b_{a4}; b_{a3}; y_{a5}; y_{a4}; y_{a3}; b_{\beta 2}; \alpha-16; \alpha-16-48; b_{a5-16}; \beta-2; b_{\beta 2-2}$
634,3203	1267,6334	2	0,12	m-51 x J-4	$\alpha^{50}\text{DmINEV}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a5}; b_{a3}; y_{a5}; y_{a4}; y_{a3}; \alpha-16; \alpha-16-48; b_{a5-16}; \beta-2; b_{\beta 2-2}$
448,9074	1344,7093	3	-1,32	X-4 x M-124	$\alpha^{122}\text{DEMIR}$ $\beta^{003}\text{RXKK}$	$b_{a4}$ or $y_{\beta 3}; b_{a3}; y_{a4}; y_{a3}; y_{a1}; b_{\beta 3}; b_{\beta 2}; y_{\beta 1}$
450,9142	1350,7294	3	-1,06	J-4 x M-124	$\alpha^{122}\text{DEMIR}$ $\beta^{003}\text{RJKK}$	$b_{a3}; b_{a2}; y_{a4}; y_{a3}; y_{a2}; b_{\beta 3}; b_{\beta 2}; y_{\beta 1}$
675,8678	1350,7294	2	-0,79	J-4 x M-124	$\alpha^{122}\text{DEMIR}$ $\beta^{003}\text{RJKK}$	$b_{a4}$ or $y_{\beta 3}; b_{a3}; b_{a2}; y_{a4}; y_{a3}; b_{\beta 3}; b_{\beta 2}$
463,5672	1388,6878	3	-0,65	M-124 x X-4	$\alpha^{122}\text{DEMIREA}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a6}; b_{a5}; b_{a4}; b_{a3}; y_{a6}; y_{a5}; y_{a4}; y_{a3}$
694,8477	1388,6878	2	0,13	M-124 x X-4	$\alpha^{122}\text{DEMIREA}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a6}; b_{a5}; y_{a6}; y_{a5}; y_{a3}; b_{\beta 2}$
465,5739	1394,7080	3	-0,63	M-124 x J-4	$\alpha^{122}\text{DEMIREA}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a6}; b_{a5}; b_{a4}; b_{a3}; b_{a2}; y_{a6}; y_{a5}; y_{a4}; y_{a3}; y_{a2}; b_{\beta 2}$
697,8576	1394,7080	2	-0,02	M-124 x J-4	$\alpha^{122}\text{DEMIREA}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a6}; b_{a4}; b_{a3}; y_{a6}; y_{a5}; y_{a3}; b_{\beta 2}$
468,8987	1404,6828	3	-0,98	M-124 x X-4	$\alpha^{122}\text{DEmIREA}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a6}; b_{a4}; b_{a3}; b_{a2}$ or $y_{a4}; y_{a6}; y_{a5}; y_{a4}; y_{a3}; b_{\beta 2}; \alpha-16; \alpha-16-48; \beta-2$

Anhang

**Tabelle-A 9 Fortsetzung**

702,8449	1404,6828	2	-0,15	M-124 x X-4	$\alpha$ <sup>122</sup> DEmIREA $\beta$ <sup>004</sup> XKK	$b_{\alpha 4}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 5}; y_{\alpha 4}; y_{\alpha 3}; b_{\beta 2}; \alpha$ -16; $\alpha$ -16-48; $\beta$ -2; $b_{\beta 2}$ -2; M-64
705,8547	1410,7029	2	-0,50	M-124 x J-4	$\alpha$ <sup>122</sup> DEmIREA $\beta$ <sup>004</sup> JKK	$b_{\alpha 6}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 4}; b_{\beta 2}; b_{\beta 1}; \alpha$ -16; $\alpha$ -16-48; $\beta$ -2; $b_{\beta 2}$ -2; M-64
786,4012	1571,7952	2	0,00	L-4 x K-4	$\alpha$ <sup>002</sup> DQLTEEQIA $\beta$ <sup>004</sup> XKK	$b_{\alpha 8}; b_{\alpha 7}; b_{\alpha 6}; b_{\alpha 5}; b_{\alpha 4}; b_{\alpha 3}; b_{\alpha 3}$ or $y_{\alpha 4}; b_{\alpha 2}; y_{\alpha 8}; y_{\alpha 7}; y_{\alpha 5}; y_{\alpha 3}; b_{\beta 2}$
789,4116	1577,8153	2	0,35	L-4 x J-4	$\alpha$ <sup>002</sup> DQLTEEQIA $\beta$ <sup>004</sup> JKK	$b_{\alpha 8}; b_{\alpha 7}; b_{\alpha 6}; b_{\alpha 5}; b_{\alpha 4}; b_{\alpha 3}; y_{\alpha 8}; y_{\alpha 7}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 4}; y_{\alpha 3}; b_{\beta 2}$
805,8835	1610,7593	2	0,24	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQMMTAK $\beta$ <sup>004</sup> XK	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 1}; b_{\alpha 8}; b_{\alpha 7}; b_{\alpha 6}$ (M144); $b_{\alpha 4}; y_{\alpha 9}; y_{\alpha 8}; y_{\alpha 7}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 5}$
539,5975	1616,7793	3	-0,85	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQMMTAK $\beta$ <sup>004</sup> JK	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 1}; b_{\alpha 8}; b_{\alpha 6}$ (M144); $b_{\alpha 5}; b_{\alpha 4}; b_{\alpha 3}; b_{\alpha 2}; y_{\alpha 9}; y_{\alpha 8}; y_{\alpha 7}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 5}; y_{\alpha 3}$
808,8932	1616,7793	2	-0,21	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQMMTAK $\beta$ <sup>004</sup> JK	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 1}; b_{\alpha 7}; b_{\alpha 3}; y_{\alpha 8}; y_{\alpha 6}$
542,9221	1626,7542	3	-1,49	M-144 (or M-145) x X-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQMmTAK $\beta$ <sup>004</sup> XK	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 1}; b_{\alpha 8}; b_{\alpha 7}; b_{\alpha 6}$ (M144); $b_{\alpha 5}; b_{\alpha 4}; b_{\alpha 3}$ -H <sub>2</sub> O or $b_{\alpha 6}; b_{\alpha 2}; y_{\alpha 8}; y_{\alpha 7}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 5}; y_{\alpha 4}$ (M144); $y_{\alpha 3}; y_{\alpha 2}$
542,9221	1626,7542	3	-1,49	M-144 (or M-145) x X-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQmMTAK $\beta$ <sup>004</sup> XK	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 1}; b_{\alpha 8}; b_{\alpha 7}; b_{\alpha 6}$ (M144); $b_{\alpha 5}; b_{\alpha 4}; b_{\alpha 3}$ or $b_{\alpha 6}; b_{\alpha 2}; y_{\alpha 8}; y_{\alpha 7}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 5}; y_{\alpha 4}$ (M144); $y_{\alpha 3}; y_{\alpha 2}$
813,8810	1626,7542	2	0,32	(M-144) or M-145 x X-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQMmTAK $\beta$ <sup>004</sup> XK	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 1}; b_{\alpha 8}; b_{\alpha 6}$ (M145); $b_{\alpha 4}; b_{\alpha 3}; b_{\alpha 2}; y_{\alpha 8}; y_{\alpha 6}; y_{\alpha 5}$

## Anhang

**Tabelle-A 9 Fortsetzung**

813,8810	1626,7542	2	0,32	(M-144) or M-145 x X-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQmMTAK $\beta$ <sup>004</sup> XK	b <sub>a9</sub> or b <sub><math>\beta</math>1</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a6</sub> (M145); b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub>
816,8908	1632,7744	2	0,03	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQMmTAK $\beta$ <sup>004</sup> JK	b <sub>a9</sub> or b <sub><math>\beta</math>1</sub> ; b <sub>a6</sub> (M144); b <sub>a6</sub> (M145); b <sub>a3</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub>
816,8908	1632,7744	2	0,03	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQmMTAK $\beta$ <sup>004</sup> JK	b <sub>a9</sub> or b <sub><math>\beta</math>1</sub> ; b <sub>a6</sub> (M144); b <sub>a6</sub> (M145); b <sub>a3</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub>
561,3042	1681,8987	3	-0,36	M-109 x X-4	$\alpha$ <sup>107</sup> HVMTNLGEkLT $\beta$ <sup>004</sup> XK	b <sub>a10</sub> or y <sub>a10</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a4</sub> ; b <sub><math>\beta</math>1</sub>
841,4525	1681,8987	2	-0,66	M-109 x X-4	$\alpha$ <sup>107</sup> HVMTNLGEkLT $\beta$ <sup>004</sup> XK	b <sub>a10</sub> or y <sub>a10</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> ; b <sub><math>\beta</math>1</sub>
563,3106	1687,9189	3	-0,98	M-109 x J-4	$\alpha$ <sup>107</sup> HVMTNLGEkLT $\beta$ <sup>004</sup> JK	b <sub>a10</sub> or y <sub>a10</sub> ; b <sub>a9</sub> ; b <sub>a5</sub> or y <sub>a9</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> or b <sub><math>\beta</math>1</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub>
844,4628	1687,9189	2	-0,28	M-109 x J-4	$\alpha$ <sup>107</sup> HVMTNLGEkLT $\beta$ <sup>004</sup> JK	b <sub>a10</sub> or y <sub>a10</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a3</sub> or b <sub><math>\beta</math>1</sub> ; y <sub>a9</sub>
580,2895	1738,8543	3	0,04	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQMMTAK $\beta$ <sup>004</sup> XKK	b <sub>a9</sub> or b <sub><math>\beta</math>2</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> (M144); b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a4</sub> (M144); y <sub>a2</sub>
869,9311	1738,8543	2	0,36	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQMMTAK $\beta$ <sup>004</sup> XKK	b <sub>a9</sub> or b <sub><math>\beta</math>2</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a5</sub> ; b <sub><math>\beta</math>1</sub>
582,2962	1744,8744	3	-0,24	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha$ <sup>139</sup> EEFVQMMTAK $\beta$ <sup>004</sup> JKK	b <sub>a9</sub> or b <sub><math>\beta</math>2</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> (M144); b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a4</sub> (M144); y <sub>a3</sub>

Anhang

Tabelle-A 9 Fortsetzung

872,9410	1744,8744	2	0,19	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMmTAK}$ $\beta^{004}\text{JJK}$	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 3}$
877,9178	1754,8281	2	0,12	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMAR}$ $\beta^{004}\text{XK}$	$b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M71) or $y_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ or $b_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $b_{\beta 1}$
880,9276	1760,8482	2	-0,17	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMAR}$ $\beta^{004}\text{JK}$	$b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M71) or $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 9}$ or $b_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $b_{\beta 1}$
585,6213	1754,8492	3	0,06	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMmTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ (M144); $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ (M144); $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\beta 2}$
585,6213	1754,8492	3	0,06	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmMTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ (M144); $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ (M144); $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\beta 2}$
877,9282	1754,8492	2	-0,09	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMmTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ (M145); $b_{\alpha 5}$ or $y_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 4}$ or $y_{\alpha 4}$ (M145); $b_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$
877,9282	1754,8492	2	-0,09	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmMTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ (M145); $b_{\alpha 5}$ or $y_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 4}$ or $y_{\alpha 4}$ (M145); $b_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$
587,6276	1760,8693	3	-0,63	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMmTAK}$ $\beta^{004}\text{JJK}$	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ (M144); $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ (M144); $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ (M144); $y_{\alpha 3}$
587,6276	1760,8693	3	-0,63	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmMTAK}$ $\beta^{004}\text{JJK}$	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ (M144); $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ (M144); $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ (M144); $y_{\alpha 3}$
880,9384	1760,8693	2	0,07	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQMmTAK}$ $\beta^{004}\text{JJK}$	$b_{\alpha 9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 4}$ (M144); $y_{\alpha 3}$

Anhang

**Tabelle-A 9 Fortsetzung**

880,9384	1760,8693	2	0,07	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmMTAK}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a4}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a4}$ (M144); $y_{a3}$
590,9526	1770,8441	3	-0,40	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmmTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{a3}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $\alpha$ -16; $\alpha$ -16-48; $y_{a6}$ -16; $\beta$ -2
885,9257	1770,8441	2	0,06	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmmTAK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $\alpha$ -16; $\alpha$ -16-48; $\beta$ -2; $b_{\beta 2}$ -2: MH-64
888,9362	1776,8642	2	0,55	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha^{139}\text{EEFVQmmTAK}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}$ or $b_{\beta 2}$ ; $\alpha$ -16; $\alpha$ -16-48; $\beta$ -2; $b_{\beta 2}$ -2: MH-64
453,2531	1809,9937	4	-1,84	M-109 x X-4	$\alpha^{107}\text{HVMTNLGEkLT}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a10}$ or $y_{a10}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a4}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a4}$
604,0031	1809,9937	3	0,50	M-109 x X-4	$\alpha^{107}\text{HVMTNLGEkLT}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a10}$ or $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a4}$ ; $b_{\beta 2}$
905,5007	1809,9937	2	0,23	M-109 x X-4	$\alpha^{107}\text{HVMTNLGEkLT}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a10}$ or $y_{a10}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $b_{\beta 2}$
606,0091	1816,0138	3	-0,60	M-109 x X-4	$\alpha^{107}\text{HVMTNLGEkLT}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a10}$ or $y_{a10}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a9}$ or $y_{a7}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a6}$ ; $b_{\beta 2}$
908,5105	1816,0138	2	-0,03	M-109 x X-4	$\alpha^{107}\text{HVMTNLGEkLT}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a10}$ or $y_{a10}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $b_{\beta 2}$
626,6364	1877,8950	3	-0,15	M-76 x X-4	$\alpha^{076}\text{MKDTSDEEEIR}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a9}$ ; $b_{a5}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a2}$ ; $b_{\beta 2}$ ; $\alpha$ -16; $\beta$ -2; $b_{\beta 2}$ -2

## Anhang

**Tabelle-A 9 Fortsetzung**

939,4514	1877,8950	2	0,35	M-76 x X-4	$\alpha^{076}\text{MKDTSDEEEIR}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a10}; b_{a9}; b_{a3}$ or $y_{a10}; b_{a5}; b_{a3}; y_{a9}; y_{a8}; y_{a6}; y_{a5}; b_{\beta2}; \alpha\text{-16}; \beta\text{-2}; b_{\beta2\text{-2}}$
628,6432	1883,9151	3	-0,05	M-76 x J-4	$\alpha^{076}\text{MKDTSDEEEIR}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}; b_{a5}; y_{a9}; y_{a8}; y_{a7}$ or $b_{\beta2}; y_{a6}; y_{a2}; b_{\beta2}; \alpha\text{-16}; \beta\text{-2}; b_{\beta2\text{-2}}$
942,4613	1883,9151	2	0,11	M-76 x J-4	$\alpha^{076}\text{MKDTSDEEEIR}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a9}; b_{a7}; b_{a5}; b_{a3}; y_{a9}; y_{a8}; y_{a7}$ or $b_{\beta2}; y_{a6}; b_{\beta2}; \alpha\text{-16}; \beta\text{-2}; b_{\beta2\text{-2}}$
628,3126	1882,9230	3	0,28	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMAR}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a10}; b_{a9}$ or $y_{a9}; b_{a8}$ or $y_{a8}; b_{a7}$ or $b_{\beta2}; b_{a6}; b_{a5}; b_{a4}; b_{a2}; b_{a2}$ or $y_{a2}; y_{a10}; y_{a8}$ or $y_{a4}; y_{a3}; b_{\beta2}$
628,3126	1882,9230	3	0,28	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMARK}$ $\beta^{004}\text{XK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta1}; b_{a9}; b_{a6}; b_{a5}; b_{a4}; b_{a3}; b_{a2}; y_{a11}; y_{a10}; y_{a9}; y_{a8}; y_{a7}; y_{a6}; y_{a5}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ or $y_{a9}; y_{a4}$ (M144); $y_{a3}$
941,9655	1882,9230	2	0,40	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMAR}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a10}; b_{a9}$ or $y_{a9}; b_{a8}$ (M144); $b_{a6}; b_{a5}; y_{a10}; y_{a7}; y_{a6}; y_{a5}; y_{a4}; y_{a3}$ (M144); $b_{\beta2}$
941,9655	1882,9230	2	0,40	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMARK}$ $\beta^{004}\text{XK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta1}; b_{a10}; b_{a9}; b_{a8}$ (M144) or $y_{a8}; b_{a5}; b_{a4}; y_{a11}; y_{a10}; y_{a8}; y_{a7}; y_{a6}; y_{a5}$
630,3189	1888,9432	3	-0,57	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMAR}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a10}; b_{a9}$ or $y_{a9}; b_{a8}$ or $y_{a8}; b_{a7}; b_{a6}; b_{a2}; a_{a2}; y_{a10}; y_{a7}; y_{a6}; y_{a5}$ or $b_{a10}; y_{a4}; y_{a3}; b_{\beta2}$
630,3189	1888,9432	3	-0,57	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMARK}$ $\beta^{004}\text{JK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta1}; b_{a2}; y_{a11}; y_{a10}; y_{a9}; y_{a8}; y_{a6}; y_{a5}; y_{a4}$ (M144); $y_{a3}$ or $y_{a6}$
944,9757	1888,9432	2	0,50	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMMAR}$ $\beta^{004}\text{JKK}$	$b_{a10}; b_{a9}$ or $y_{a9}; b_{a6}; b_{a5}; y_{a10}; y_{a7}; y_{a6}; y_{a5}; y_{a4}; b_{\beta2}$

Anhang

Tabelle-A 9 Fortsetzung

944,9757	1888,9432	2	0,50	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTMMARK $\beta^{004}$ JK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{\alpha 6}$ or $b_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$
633,6438	1898,9179	3	-0,61	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMAR $\beta^{004}$ XKK	$b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ or $y_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M144); $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $a_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 3}$ (M144); $y_{\alpha 3}$ (m145); $b_{\beta 2}$
633,6438	1898,9179	3	-0,61	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMAR $\beta^{004}$ XKK	$b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ or $y_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $a_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 3}$ (M145); $b_{\beta 2}$
633,6438	1898,9179	3	-0,61	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMARK $\beta^{004}$ XK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M144); $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $a_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $a_{\alpha 2}$ or $y_{\alpha 4}$ (M144); $y_{\alpha 4}$ (m145); $y_{\alpha 3}$ or $b_{\alpha 6}$
633,6438	1898,9179	3	-0,61	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMARK $\beta^{004}$ XK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M144) or $y_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $a_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $a_{\alpha 2}$ or $y_{\alpha 4}$ (m144); $y_{\alpha 4}$ (M145); $y_{\alpha 3}$ or $b_{\alpha 6}$
949,9625	1898,9179	2	-0,10	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMAR $\beta^{004}$ XKK	$b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M144); $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ or $b_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 3}$ (M144); $y_{\alpha 3}$ (m145); $b_{\beta 2}$
949,9625	1898,9179	2	-0,10	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMAR $\beta^{004}$ XKK	$b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M144); $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ or $b_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 3}$ (m144); $b_{\beta 2}$
949,9625	1898,9179	2	-0,10	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMARK $\beta^{004}$ XK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M144); $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ (m145); $y_{\alpha 4}$ (M144)
949,9625	1898,9179	2	-0,10	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMARK $\beta^{004}$ XK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M144); $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 4}$ (M144)
635,6506	1904,9381	3	-0,38	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMAR $\beta^{004}$ JKK	$b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ or $y_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M144); $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $a_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 3}$ (M144); $b_{\beta 2}$



Anhang

Tabelle-A 9 Fortsetzung

635,6506	1904,9381	3	-0,38	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTmMAR}$ $\beta^{004}\text{JJK}$	$b_{a10}; b_{a9}$ or $y_{a9}; b_{a8}$ (M144); $b_{a7}; b_{a6}; b_{a5}; b_{a4}; b_{a3}; b_{a2}; a_{a2};$ $y_{a10}; y_{a9}; y_{a8}; y_{a7}; y_{a6}; y_{a5}; y_{a3}$ (M144); $b_{\beta 2}$
635,6506	1904,9381	3	-0,38	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMmARK}$ $\beta^{004}\text{JK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta 1}; b_{a9}; b_{a6}$ or $b_{a9}; b_{a4}; b_{a3}; b_{a2}; b_{a4}; b_{a2}; y_{a11}; y_{a10};$ $y_{a9}; y_{a8}; y_{a7}; y_{a5}; a_{a2}$ or $y_{a4}$ (M144)
635,6506	1904,9381	3	-0,38	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMmARK}$ $\beta^{004}\text{JK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta 1}; b_{a9}; b_{a6}$ or $b_{a9}; b_{a4}; b_{a3}; b_{a2}; b_{a4}; b_{a2}; y_{a11}; y_{a10};$ $y_{a9}; y_{a8}; y_{a7}; y_{a5}; a_{a2}$ or $y_{a4}$ (M144)
952,9728	1904,9381	2	0,17	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTmMAR}$ $\beta^{004}\text{JJK}$	$b_{a10}; b_{a9}$ or $y_{a9}; b_{a8}$ (M144); $b_{a4}; y_{a10}; y_{a9}; y_{a7}; y_{a6}; y_{a5};$ $y_{a4}; y_{a3}$ (M144); $b_{\beta 2}$
952,9728	1904,9381	2	0,17	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTmMAR}$ $\beta^{004}\text{JJK}$	$b_{a10}; b_{a9}$ or $y_{a9}; b_{a8}$ (M144); $b_{a4}; y_{a10}; y_{a9}; y_{a7}; y_{a6}; y_{a5};$ $y_{a4}; y_{a3}$ (M144); $b_{\beta 2}$
952,9728	1904,9381	2	0,17	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMmARK}$ $\beta^{004}\text{JK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta 1}; b_{a9}; b_{a8}$ (M144); $b_{a45}; y_{a11}; y_{a10}; y_{a9}; y_{a8}; y_{a7};$ $y_{a6}; y_{a5}; y_{a4}$ (m145); $y_{a4}$ (M144)
952,9728	1904,9381	2	0,17	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}\text{DFPEFLTMmARK}$ $\beta^{004}\text{JK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta 1}; b_{a9}; b_{a8}$ (M144); $b_{a45}; y_{a11}; y_{a10}; y_{a9}; y_{a8}; y_{a7};$ $y_{a6}; y_{a5}; y_{a4}$ (m145); $y_{a4}$ (M144)
659,3384	1976,0011	3	-0,23	L-4 x X-4	$\alpha^{002}\text{DQLTEEQIAEFK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta 2}; b_{a10}$ or $b_{\beta 1}; b_{a9}; b_{a8}; b_{a7}; b_{a4}; b_{a3}; b_{a3}$ or $y_{a7};$ $y_{a11}; y_{a10}; y_{a9}$ or $b_{a5}; y_{a8}; y_{a2}$
988,5043	1976,0011	2	0,08	L-4 x X-4	$\alpha^{002}\text{DQLTEEQIAEFK}$ $\beta^{004}\text{XKK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta 2}; b_{a10}; b_{a10}$ or $b_{\beta 1}; b_{a8}; b_{a7}; b_{a5}$ or $y_{a9}; y_{a11}; y_{a10};$ $y_{a6}; y_{a4}; y_{a2}$
661,3452	1982,0213	3	0,00	L-4 x J-4	$\alpha^{002}\text{DQLTEEQIAEFK}$ $\beta^{004}\text{JJK}$	$b_{a11}$ or $b_{\beta 2}; b_{a10}$ or $b_{\beta 1}; b_{a9}; b_{a8}; b_{a8}$ or $y_{a6}; b_{a7}; b_{a5}; b_{a4};$ $b_{a3}; b_{a2}; y_{a11}; y_{a10}; y_{a9}; y_{a8}; y_{a7}; y_{a4}; y_{a3}; y_{a2}$

## Anhang

**Tabelle-A 9 Fortsetzung**

991,5145	1982,0213	2	0,27	L-4 x J-4	$\alpha^{002}$ DQLTEEQIAEFK $\beta^{004}$ JKK	$b_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $b_{a10}$ or $b_{\beta1}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a6}$ or $b_{a8}$ ; $y_{a4}$ ; $y_{a3}$ ; $y_{a2}$
669,3348	2005,9899	3	0,11	M-76 x X-4	$\alpha^{075}$ KMKDSTDSEEEIR $\beta^{004}$ XKK	$b_{a10}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a4}$ ; $y_{a2}$
1003,4990	2005,9899	2	0,42	M-76 x X-4	$\alpha^{075}$ KMKDSTDSEEEIR $\beta^{004}$ XKK	$b_{a11}$ ; $b_{a10}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a3}$ ; $y_{a2}$
671,3414	2012,0100	3	-0,18	M-76 x X-4	$\alpha^{075}$ KMKDSTDSEEEIR $\beta^{004}$ JKK	$b_{a10}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $y_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a4}$ ; $y_{a3}$ ; $y_{a2}$
1006,5088	2012,0100	2	0,15	M-76 x X-4	$\alpha^{075}$ KMKDSTDSEEEIR $\beta^{004}$ JKK	$b_{a11}$ ; $b_{a10}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a8}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $y_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a4}$ ; $b_{\beta1}$
671,0111	2011,0180	3	0,32	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTMmARK $\beta^{004}$ XKK	$b_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a7}$ or $b_{\beta1}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a4}$
1006,0130	2011,0180	2	0,33	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTMmARK $\beta^{004}$ XKK	$b_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $b_{a10}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a6}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a8}$ or $b_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ;
673,0176	2017,0381	3	0,07	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTMmARK $\beta^{004}$ JKK	$b_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a4}$
1009,0232	2017,0381	2	0,48	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTMmARK $\beta^{004}$ JKK	$b_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $b_{a10}$ ; $b_{a9}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a7}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$
676,3425	2027,0129	3	-0,02	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTMmARK $\beta^{004}$ XKK	$b_{a11}$ or $b_{\beta2}$ ; $b_{a10}$ ; $b_{a9}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a11}$ ; $y_{a10}$ ; $y_{a9}$ ; $y_{a8}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a4}$ (M144); $y_{a3}$ or $b_{a6}$ ; $y_{a2}$

Anhang

Tabelle-A 9 Fortsetzung

676,3425	2027,0129	3	-0,02	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMARK $\beta^{004}$ XKK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 4}$ (M144); $y_{\alpha 3}$ or $b_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 2}$
678,3484	2033,0330	3	-1,01	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTMmARK $\beta^{004}$ JKK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 11}$ or $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 4}$ (M144)
678,3484	2033,0330	3	-1,01	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmMARK $\beta^{004}$ JKK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 11}$ or $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 4}$ (M144)
681,6737	2043,0078	3	-0,59	M-71 or M-72 x X-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmmARK $\beta^{004}$ XKK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 10}$ or $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $b_{\beta 1}$
683,6808	2049,0279	3	-0,09	M-71 or M-72 x J-4	$\alpha^{064}$ DFPEFLTmmARK $\beta^{004}$ JKK	$b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ (M144); $b_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 6}$
697,0213	2089,0488	3	0,30	L-4 x X-4	$\alpha^{001}$ Ac-ADQLTEEQIAEFK $\beta^{004}$ XKK	$b_{\alpha 12}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ or $y_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 12}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 2}$
699,0281	2095,0689	3	0,31	L-4 x J-4	$\alpha^{001}$ Ac-ADQLTEEQIAEFK $\beta^{004}$ JKK	$b_{\alpha 12}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ or $y_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 7}$ or $y_{\alpha 5}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{\alpha 6}$ or $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 12}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 2}$
1048,0388	2095,0689	2	0,68	L-4 x J-4	$\alpha^{001}$ Ac-ADQLTEEQIAEFK $\beta^{004}$ JKK	$b_{\alpha 12}$ or $b_{\beta 2}$ ; $b_{\alpha 11}$ ; $b_{\alpha 11}$ or $b_{\beta 1}$ ; $b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 8}$ or $y_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 3}$
761,3964	2282,1742	3	0,33	M-109 x X-4	$\alpha^{107}$ HVMTNLGEkLTDEEV $\beta^{004}$ XKK	$b_{\alpha 14}$ ; $b_{\alpha 14}$ or $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 13}$ ; $b_{\alpha 12}$ ; $b_{\alpha 11}$ ; $b_{\alpha 10}$ ; $b_{\alpha 9}$ ; $b_{\alpha 7}$ or $b_{\alpha 12}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 3}$ or $y_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 2}$ or $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 13}$ ; $y_{\alpha 12}$ or $b_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $b_{\beta 2}$
763,4029	2288,1944	3	-0,15	M-109 x J-4	$\alpha^{107}$ HVMTNLGEkLTDEEV $\beta^{004}$ JKK	$b_{\alpha 14}$ ; $b_{\alpha 13}$ ; $b_{\alpha 12}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 2}$ or $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 14}$ ; $y_{\alpha 13}$ ; $y_{\alpha 12}$ ; $y_{\alpha 11}$ ; $y_{\alpha 10}$ ; $y_{\alpha 9}$ ; $y_{\alpha 8}$ ; $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $b_{\beta 2}$

Anhang

Tabelle-A 9 Fortsetzung

1144,6011	2288,1944	2	0,21	M-109 x J-4	$\alpha$ <sup>107</sup> HVMTNLGEkLTDEEV $\beta$ <sup>004</sup> JKK	b <sub>a14</sub> ; b <sub>a13</sub> ; b <sub>a12</sub> ; b <sub>a11</sub> ; b <sub>a10</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a13</sub> ; y <sub>a12</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a7</sub> ; b <sub>β2</sub>
763,7283	2289,1696	3	0,36	X-4 x M-51	$\alpha$ <sup>004</sup> XKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>050</sup> DMINEV	b <sub>a12</sub> ; b <sub>a10</sub> or b <sub>β3</sub> ; b <sub>a9</sub> or y <sub>a9</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a6</sub> or y <sub>a8</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a4</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub>β5</sub> or y <sub>β5</sub> ; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub>
765,7349	2295,1897	3	0,18	J-4 x M-51	$\alpha$ <sup>004</sup> JKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>050</sup> DMINEV	b <sub>a10</sub> or b <sub>β3</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a4</sub> ; b <sub>β5</sub> or y <sub>β5</sub> ; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β4</sub> ; y <sub>β3</sub>
805,7172	2415,1359	3	0,43	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha$ <sup>133</sup> DGQVNYEEFVQMmTAK $\beta$ <sup>004</sup> XKK	b <sub>a15</sub> or b <sub>β2</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> or y <sub>a3</sub> ; y <sub>a15</sub> ; y <sub>a14</sub> ; y <sub>a13</sub> ; y <sub>a13</sub> or b <sub>a13</sub> ; y <sub>a12</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub>
1208,0727	2415,1359	2	0,87	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha$ <sup>133</sup> DGQVNYEEFVQMmTAK $\beta$ <sup>004</sup> XKK	b <sub>a15</sub> or b <sub>β2</sub> ; y <sub>a15</sub> ; y <sub>a14</sub> ; y <sub>a12</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub>
807,7234	2421,1561	3	-0,13	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha$ <sup>133</sup> DGQVNYEEFVQMmTAK $\beta$ <sup>004</sup> JKK	b <sub>a15</sub> or b <sub>β2</sub> ; b <sub>a9</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> or y <sub>a3</sub> -H <sub>2</sub> O; y <sub>a15</sub> ; y <sub>a14</sub> ; y <sub>a13</sub> or b <sub>a13</sub> ; y <sub>a12</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a6</sub>
1211,0818	2421,1561	2	0,13	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha$ <sup>133</sup> DGQVNYEEFVQMmTAK $\beta$ <sup>004</sup> JKK	b <sub>a15</sub> or b <sub>β2</sub> ; b <sub>a12</sub> ; b <sub>a11</sub> ; y <sub>a15</sub> ; y <sub>a14</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a9</sub>
811,0487	2431,1308	3	0,28	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha$ <sup>133</sup> DGQVNYEEFVQmTAK $\beta$ <sup>004</sup> XKK	b <sub>a15</sub> or b <sub>β2</sub> ; b <sub>a14</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a6</sub> or y <sub>a12</sub> ; b <sub>a4</sub> (M144); b <sub>a3</sub> or y <sub>a3</sub> ; y <sub>a15</sub> ; y <sub>a14</sub> ; y <sub>a13</sub> ; y <sub>a13</sub> or b <sub>a13</sub> ; y <sub>a12</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a7</sub> or y <sub>a12</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub>β2</sub>
811,0487	2431,1308	3	0,28	M-144 or M-145 x X-4	$\alpha$ <sup>133</sup> DGQVNYEEFVQmTAK $\beta$ <sup>004</sup> XKK	b <sub>a15</sub> or b <sub>β2</sub> ; b <sub>a14</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a6</sub> or y <sub>a12</sub> ; b <sub>a4</sub> (M144); b <sub>a3</sub> or y <sub>a3</sub> ; y <sub>a15</sub> ; y <sub>a14</sub> ; y <sub>a13</sub> ; y <sub>a13</sub> or b <sub>a13</sub> ; y <sub>a12</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a7</sub> or y <sub>a12</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub>β2</sub>
813,0549	2437,1510	3	-0,38	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha$ <sup>133</sup> DGQVNYEEFVQmTAK $\beta$ <sup>004</sup> JKK	b <sub>a15</sub> or b <sub>β2</sub> ; b <sub>a14</sub> ; b <sub>a10</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> (M144); b <sub>a3</sub> or y <sub>a3</sub> ; y <sub>a15</sub> ; y <sub>a14</sub> ; y <sub>a13</sub> ; y <sub>a13</sub> or b <sub>a13</sub> ; y <sub>a12</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a4</sub> (M144)

Anhang

**Tabelle-A 9 Fortsetzung**

813,0549	2437,1510	3	-0,38	M-144 or M-145 x J-4	$\alpha$ <sup>133</sup> DGQVNYEEFVQmMTAK $\beta$ <sup>004</sup> JKK	b <sub>a15</sub> or b <sub>β2</sub> ; b <sub>a14</sub> ; b <sub>a10</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> (M144); b <sub>a3</sub> or y <sub>a3</sub> ; y <sub>a15</sub> ; y <sub>a14</sub> ; y <sub>a13</sub> ; y <sub>a13</sub> or b <sub>a13</sub> ; y <sub>a12</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a4</sub> (M144)
928,1410	2782,4055	3	1,00	X-4 x M-144 or M-145	$\alpha$ <sup>004</sup> XKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>139</sup> EEFVQMMTAK	b <sub>a12</sub> ; b <sub>a11</sub> ; b <sub>a10</sub> ; b <sub>a9</sub> or b <sub>β6</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> or b <sub>a10</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; b <sub>β9</sub> ; b <sub>β7</sub> ; y <sub>β9</sub> ; y <sub>β8</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β6</sub> ; y <sub>β5</sub>
697,8619	2788,4256	4	0,09	J-4 x M-144 or M-145	$\alpha$ <sup>004</sup> JKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>139</sup> EEFVQMMTAK	b <sub>a12</sub> or y <sub>a7</sub> ; b <sub>a10</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub>β9</sub> or y <sub>β9</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β4</sub> ; y <sub>β8</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β6</sub> ; y <sub>β4</sub>
930,1471	2788,4256	3	0,35	J-4 x M-144 or M-145	$\alpha$ <sup>004</sup> JKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>139</sup> EEFVQMMTAK	b <sub>a11</sub> ; b <sub>a10</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> or y <sub>β5</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; b <sub>β9</sub> or y <sub>β9</sub> ; b <sub>β8</sub> ; b <sub>β7</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β6</sub>
933,4720	2798,4004	3	0,36	X-4 x M-144 or M-145	$\alpha$ <sup>004</sup> XKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>139</sup> EEFVQmMmTAK	b <sub>a12</sub> ; b <sub>a9</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> or y <sub>β5</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a9</sub> or b <sub>β9</sub> ; y <sub>a8</sub> or b <sub>a9</sub> ; y <sub>a7</sub> ; b <sub>β9</sub> or y <sub>β9</sub> ; b <sub>β6</sub> ; y <sub>β8</sub> ; y <sub>β6</sub> ; y <sub>β4</sub> (M145)
933,4720	2798,4004	3	0,36	X-4 x M-144 or M-145	$\alpha$ <sup>004</sup> XKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>139</sup> EEFVQmMTAK	b <sub>a12</sub> ; b <sub>a9</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> or y <sub>β5</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a9</sub> or b <sub>β9</sub> ; y <sub>a8</sub> or b <sub>a9</sub> ; y <sub>a7</sub> ; b <sub>β9</sub> or y <sub>β9</sub> ; b <sub>β6</sub> ; y <sub>β8</sub> ; y <sub>β6</sub> ; y <sub>β4</sub> (M145)
701,8597	2804,4205	4	-1,22	J-4 x M-144 or M-145	$\alpha$ <sup>004</sup> JKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>139</sup> EEFVQmMmTAK	b <sub>a12</sub> ; b <sub>a10</sub> ; b <sub>a9</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> or y <sub>β5</sub> ; b <sub>a3</sub> or y <sub>a4</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a2</sub> ; b <sub>β9</sub> or y <sub>β9</sub> ; b <sub>β8</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β7</sub> or y <sub>a6</sub> ; b <sub>β6</sub> or b <sub>a9</sub> ; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β8</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β6</sub>
701,8597	2804,4205	4	-1,22	J-4 x M-144 or M-145	$\alpha$ <sup>004</sup> JKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>139</sup> EEFVQmMTAK	b <sub>a12</sub> ; b <sub>a10</sub> ; b <sub>a9</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> or y <sub>β5</sub> ; b <sub>a3</sub> or y <sub>a4</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub>a2</sub> ; b <sub>β9</sub> or y <sub>β9</sub> ; b <sub>β8</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β7</sub> or y <sub>a6</sub> ; b <sub>β6</sub> or b <sub>a9</sub> ; b <sub>β4</sub> ; b <sub>β3</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β8</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β6</sub>
935,4780	2804,4205	3	-0,45	J-4 x M-144 or M-145	$\alpha$ <sup>004</sup> JKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>139</sup> EEFVQmMmTAK	b <sub>a12</sub> ; b <sub>a11</sub> ; b <sub>a9</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> or b <sub>β8</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a4</sub> ; b <sub>β9</sub> or y <sub>β9</sub> ; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β6</sub> ; y <sub>β8</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β6</sub> (M145)
935,4780	2804,4205	3	-0,45	J-4 x M-144 or M-145	$\alpha$ <sup>004</sup> JKKNFIAVSAANR $\beta$ <sup>139</sup> EEFVQmMTAK	b <sub>a12</sub> ; b <sub>a11</sub> ; b <sub>a9</sub> ; b <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> or b <sub>β8</sub> ; b <sub>a2</sub> ; y <sub>a11</sub> ; y <sub>a10</sub> ; y <sub>a9</sub> ; y <sub>a8</sub> ; y <sub>a7</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a4</sub> ; b <sub>β9</sub> or y <sub>β9</sub> -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; b <sub>β7</sub> ; b <sub>β6</sub> ; y <sub>β8</sub> ; y <sub>β7</sub> ; y <sub>β6</sub> (M145)

## Anhang

**Tabelle-A 10 Intermolekulare Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und dem GC-Photo-Peptid 3 nach Reaktion in Gegenwart von CaCl<sub>2</sub>**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δm (ppm)	Quervernetzte AS des GCAP-2/Bpa-GC Peptid Komplexes	Aminosäuresequenzen	Identifizierte Fragmentionen
788,3849	1575,7624	2	0,10	X-7 x M-64	α <sup>001</sup> Ac-ESTGLPXR β <sup>063</sup> AMFR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α5</sub> ; b <sub>α7</sub> or b <sub>β3</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α5</sub> ; y <sub>α7</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub>
791,3951	1581,7826	2	0,20	J-7 x M-64	α <sup>001</sup> Ac-ESTGLPJR β <sup>063</sup> AMFR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α7</sub> or b <sub>β3</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α6</sub> ; y <sub>α7</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub>

Anhang

**Tabelle-A 11 Intermolekulare Quervernetzungsprodukte zwischen GCAP-2 und dem GC Photo-Peptid 3 nach Reaktion in Gegenwart von EGTA**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	Quervernetzte AS des GCAP-2/Bpa-GC Peptid Komplexes	Aminosäuresequenzen	Identifizierte Fragmentionen
702,8585	1404,7293	2	0,34	X-7 x M-64	α <sup>002</sup> STGLPXR β <sup>063</sup> AMFR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; a <sub>α4</sub> ; b <sub>α6</sub> or b <sub>β3</sub> ; a <sub>α6</sub> or a <sub>β3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α5</sub> ; y <sub>α6</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub>
705,8687	1410,7294	2	0,49	J-7 x M-64	α <sup>002</sup> STGLPJR β <sup>063</sup> AMFR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; a <sub>α4</sub> ; b <sub>α6</sub> or b <sub>β3</sub> ; a <sub>α6</sub> or a <sub>β3</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α5</sub> ; y <sub>α6</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub>
788,3850	1575,7624	2	0,16	X-7 x M-64	α <sup>001</sup> Ac-ESTGLPXR β <sup>063</sup> AMFR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α7</sub> or b <sub>β3</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α5</sub> ; y <sub>α6</sub> ; y <sub>α7</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub>
791,3950	1581,7826	2	0,13	J-7 x M-64	α <sup>001</sup> Ac-ESTGLPJR β <sup>063</sup> AMFR	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α4</sub> ; b <sub>α7</sub> or b <sub>β3</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α4</sub> ; y <sub>α5</sub> ; y <sub>α6</sub> ; y <sub>α7</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β3</sub>

Anhang

Tabelle-A 12 Intermolekulare Quervernetzungsprodukte des GCAP-2-Homodimers in Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> (0,3 mM CaCl<sub>2</sub>)

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	<i>z</i>	Δ <i>m</i> (ppm)	vernetzte AS im GCAP-2 Homodimer	Aminosäuresequenzen	Identifizierte Fragmentionen
357,554	1070,647	3	0,3	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>14</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	α; b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α1</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; β; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; F; H; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub>
539,316	1077,626	2	-0,7	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>14</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N)	b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α2</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub>
360,213	1078,623	3	1,2	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>15</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	α; b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α1</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; β;
539,816	1078,623	2	1,8	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>15</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α2</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub>
543,305	1085,602	2	-0,2	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>15</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N)	b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub>
362,539	1085,602	3	0,1	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>15</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N)	α; b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α1</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; β; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; F; H; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub>
585,327	1169,647	2	-0,5	K-29(30) x K-46	α E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>14</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	α; b <sub>α3</sub> ; b <sub>α2</sub> ; b <sub>α2</sub> -CO; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; β ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; [Y+CO+XL]; (K-30) y <sub>α1</sub>
588,816	1176,626	2	-0,4	K-29(30) x K-46	α E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>14</sup> N; <sup>15</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N; <sup>14</sup> N)	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α2</sub> ; b <sub>α2</sub> -CO; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; β ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; [Y+CO+XL]; (K-30) y <sub>α1</sub>
592,306	1183,605	2	0,0	K-29(30) x K-46	α E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>15</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N)	b <sub>α3</sub> ; b <sub>α2</sub> ; b <sub>α2</sub> -CO; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL] ;β ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; [Y+CO+XL]; (K-30) y <sub>α1</sub>



Anhang

Tabelle-A 12 Fortsetzung

448,576	1343,715	3	-0,3	K-29(30) x K-29(30)	$\alpha$ E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>14</sup> N) $\beta$ E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>14</sup> N)	$\alpha/\beta$ ; $b_{\alpha/\beta 3}$ ; $b_{\alpha/\beta 1-NH_3}$ ; $y_{\alpha/\beta 3}$ ; $y_{\alpha/\beta 2}$ ; [ $\alpha/\beta+XL$ ]; W
450,903	1350,694	3	-0,3	K-29(30) x K-29(30)	$\alpha$ E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>14</sup> N; <sup>15</sup> N) $\beta$ E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>15</sup> N; <sup>14</sup> N)	$\alpha/\beta$ ; $b_{\alpha/\beta 3}$ ; $b_{\alpha/\beta 1-NH_3}$ ; $y_{\alpha/\beta 3}$ ; $y_{\alpha/\beta 2}$ ; [ $\alpha/\beta+XL$ ]; W
675,85	1350,694	2	-0,5	K-29(30) x K-29(30)	$\alpha$ E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>14</sup> N; <sup>15</sup> N) $\beta$ E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>15</sup> N; <sup>14</sup> N)	$\alpha/\beta$ ; $b_{\alpha/\beta 3}$ ; $b_{\alpha/\beta 2}$ ; $b_{\alpha/\beta 2-CO}$ ; $y_{\alpha/\beta 3}$ ; $y_{\alpha/\beta 2}$ ; [ $\alpha/\beta+XL$ ]; [ $\alpha/\beta+XL+\{K\}$ ]; $y_{\alpha/\beta 2+XL}$ ; [Y+CO+XL]; (K-30) $y_{\alpha/\beta 1}$
582,301	1744,890	3	-0,5	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>14</sup> N) $\beta$ E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>14</sup> N)	$b_{\alpha 8}$ o. $y_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 7-NH_3/H_2O}$ o. $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 7-NH_3/H_2O}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 2-H_2O}$
872,949	1744,890	2	0,4	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>14</sup> N) $\beta$ E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>14</sup> N)	$b_{\alpha 8}$ o. $y_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ o. $b_{\beta 2-NH_3}$ ; $b_{\alpha 7-H_2O}$ o. $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 7-NH_3}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $b_{\beta 2}; y_{\beta 3}$
876,937	1752,867	2	0,0	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>14</sup> N) $\beta$ E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>15</sup> N)	$b_{\alpha 8}$ o. $y_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 7-H_2O}$ o. $y_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $b_{\beta 2}$
882,421	1763,834	2	0,5	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>15</sup> N) $\beta$ E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>15</sup> N)	$b_{\alpha 8}$ o. $y_{\alpha 8}$ o. $b_{\beta 3}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 7-H_2O}$ o. $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 7-NH_3/H_2O}$ ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $b_{\beta 2}$

Anhang

Tabelle-A 13 Intermolekulare Quervernetzungsprodukte des GCAP-2-Homodimers in Abwesenheit von CaCl<sub>2</sub> (0,4 mM EGTA)

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	vernetzte AS im GCAP-2 Homodimer	Aminosäuresequenzen	Identifizierte Fragmentionen
357,554	1070,647	3	0,4	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>14</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	α; b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α1</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; β; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; F; H; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub>
535,827	1070,647	2	0,0	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>14</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub>
359,88	1077,626	3	-1,0	K-96(98) x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>14</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N)	α; b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α1</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; b <sub>α3</sub> - H <sub>2</sub> O o. y <sub>β2</sub> -H <sub>2</sub> O o. β; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; F; H; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub> ; (K-98) y <sub>α2</sub> ; y <sub>α1</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub>
539,316	1077,626	2	-1,4	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>14</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N)	b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α2</sub> ; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub>
360,213	1078,623	3	1,9	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>15</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	α; b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; y <sub>α1</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; β; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; F; H; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub>
539,816	1078,623	2	0,9	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>15</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α2</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub>
543,305	1085,602	2	-0,3	K-96 x K-46	α E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>15</sup> N) β E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N)	b <sub>α3</sub> o. y <sub>β2</sub> ; b <sub>α2</sub> ; y <sub>α3</sub> ; y <sub>α2</sub> ; [β+XL+{K}]; [β+XL]; b <sub>β2</sub> ; y <sub>β1</sub> ; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub>
382,577	1145,715	3	-0,3	K-96 x K-96	α E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>14</sup> N) β E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>14</sup> N)	α/β; b <sub>αβ3</sub> ; b <sub>αβ2</sub> ; y <sub>αβ3</sub> ; y <sub>αβ2</sub> ; y <sub>αβ1</sub> ; [α/β+XL+{K}]; [α/β+XL]; H; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub> ; b <sub>αβ2</sub> x y <sub>αβ3</sub> ; b <sub>αβ2</sub> x b <sub>αβ2</sub>
573,361	1145,715	2	0,2	K-96 x K-96	α E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>14</sup> N) β E/ <sup>095</sup> HKCLK ( <sup>14</sup> N)	b <sub>αβ3</sub> ; b <sub>αβ2</sub> ; y <sub>αβ3</sub> ; y <sub>αβ2</sub> ; [α/β+XL+{K}]; [α/β+XL]; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub> ; b <sub>αβ2</sub> x y <sub>αβ3</sub> ; b <sub>αβ2</sub> x b <sub>αβ2</sub>

Anhang

Tabelle-A 13 Fortsetzung

385,235	1153,692	3	-0,3	K-96 x K-96	$\alpha$ E/ <sup>095</sup> HKLLK ( <sup>14</sup> N; <sup>15</sup> N) $\beta$ E/ <sup>095</sup> HKLLK ( <sup>15</sup> N; <sup>14</sup> N)	$\alpha/\beta$ ; $b_{\alpha/\beta 3}$ ; $b_{\alpha/\beta 2}$ ; $y_{\alpha/\beta 3}$ ; $y_{\alpha/\beta 2}$ ; $y_{\alpha/\beta 1}$ ; [ $\alpha/\beta$ +XL+{K}]; [ $\alpha/\beta$ +XL]; H; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub> ; $b_{\alpha/\beta 2}$ x $y_{\alpha/\beta 3}$ ; $b_{\alpha/\beta 2}$ x $b_{\alpha/\beta 2}$
577,349	1153,692	2	-0,3	K-96 x K-96	$\alpha$ E/ <sup>095</sup> HKLLK ( <sup>14</sup> N; <sup>15</sup> N) $\beta$ E/ <sup>095</sup> HKLLK ( <sup>15</sup> N; <sup>14</sup> N)	$b_{\alpha/\beta 3}$ ; $b_{\alpha/\beta 2}$ ; $y_{\alpha/\beta 3}$ ; $y_{\alpha/\beta 2}$ ; [ $\alpha/\beta$ +XL+{K}]; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub> ; $b_{\alpha/\beta 2}$ x $y_{\alpha/\beta 3}$
387,894	1161,668	3	-0,4	K-96 x K-96	$\alpha$ E/ <sup>095</sup> HKLLK ( <sup>15</sup> N) $\beta$ E/ <sup>095</sup> HKLLK ( <sup>15</sup> N)	$\alpha/\beta$ ; $b_{\alpha/\beta 3}$ ; $b_{\alpha/\beta 2}$ ; $y_{\alpha/\beta 3}$ ; $y_{\alpha/\beta 2}$ ; $y_{\alpha/\beta 1}$ ; [ $\alpha/\beta$ +XL+{K}]; [ $\alpha/\beta$ +XL]; H; [XL+{K}]+NH <sub>3</sub> ; $b_{\alpha/\beta 2}$ x $y_{\alpha/\beta 3}$ ; $b_{\alpha/\beta 2}$ x $b_{\alpha/\beta 2}$
585,327	1169,647	2	-0,2	K-29(30) x K-46	$\alpha$ E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>14</sup> N) $\beta$ E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	$\alpha$ ; [ $\alpha$ +XL]; $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $b_{\alpha 2}$ -CO; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 2}$ ; [ $\beta$ +XL+{K}]; [ $\beta$ +XL]; $\beta$ ; $b_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 1}$ ; [Y+CO+XL]; $y_{\alpha 2}$ x $b_{\beta 2}$ ; (K-30) $y_{\alpha 1}$
588,816	1176,626	2	-0,2	K-29(30) x K-46	$\alpha$ E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>14</sup> N; <sup>15</sup> N) $\beta$ E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N; <sup>14</sup> N)	$b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $b_{\alpha 2}$ -CO; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 2}$ ; [ $\beta$ +XL+{K}]; [ $\beta$ +XL]; $\beta$ ; $b_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 1}$ ; [Y+CO+XL]; $y_{\alpha 2}$ x $b_{\beta 2}$ ; (K-30) $y_{\alpha 1}$
592,306	1183,605	2	-0,2	K-29(30) x K-46	$\alpha$ E/ <sup>027</sup> WYKK ( <sup>15</sup> N) $\beta$ E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>15</sup> N)	$\alpha$ ; [ $\alpha$ +XL]; $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $b_{\alpha 2}$ -CO; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 2}$ ; [ $\beta$ +XL+{K}]; [ $\beta$ +XL]; $\beta$ ; $b_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 1}$ ; [Y+CO+XL]; $y_{\alpha 2}$ x $b_{\beta 2}$ ; (K-30) $y_{\alpha 1}$
482,595	1445,771	3	-0,1	K-126 x K-200	$\alpha$ E/ <sup>123</sup> SIYKLLK ( <sup>14</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSA <sub>m</sub> F ( <sup>14</sup> N)	[ $\alpha$ +XL+{K}]; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $b_{\beta 4}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $y_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 1}$
727,377	1453,747	2	-0,4	K-126 x K-200	$\alpha$ E/ <sup>123</sup> SIYKLLK ( <sup>15</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSA <sub>m</sub> F ( <sup>14</sup> N)	$\alpha$ ; [ $\alpha$ +XL]; [ $\alpha$ +XL+{K}]; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $y_{\alpha 2}$ ; [ $\beta$ +XL]; $b_{\beta 4}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $b_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 3}$ ; $y_{\beta 2}$
487,248	1459,729	3	0,1	K-126 x K-200	$\alpha$ E/ <sup>123</sup> SIYKLLK ( <sup>15</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSA <sub>m</sub> F ( <sup>15</sup> N)	[ $\alpha$ +XL+{K}]; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 5}$ -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. $b_{\beta 4}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 4}$ ; $b_{\beta 4}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $y_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 1}$
557,279	1669,822	3	0,4	K-46 x K-50	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>14</sup> N) $\beta$ E/ <sup>045</sup> FKR ( <sup>14</sup> N)	$b_{\alpha 8}$ o. $y_{\alpha 8}$ ; $b_{\alpha 7}$ ; $b_{\alpha 7}$ -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. $y_{\alpha 7}$ ; $y_{\alpha 7}$ -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ; $b_{\alpha 6}$ ; $b_{\alpha 5}$ ; $b_{\alpha 4}$ ; $b_{\alpha 4}$ -CO; $b_{\alpha 3}$ ; $b_{\alpha 2}$ ; $b_{\alpha 2}$ -H <sub>2</sub> O o. $y_{\alpha 2}$ ; $y_{\alpha 2}$ -H <sub>2</sub> O; $y_{\alpha 6}$ ; $y_{\alpha 5}$ ; $y_{\alpha 3}$ ; $b_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 1}$ ; PDNE; $b_{\alpha 4}$ x $b_{\beta 2}$

## Anhang

**Tabelle-A 13 Fortsetzung**

835,415	1669,822	2	0,3	K-46 x K-50	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{14}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{045}\text{FKR}$ ( $^{14}\text{N}$ )	$\alpha$ ; $b_{a8}$ o. $y_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a7}\text{-H}_2\text{O}$ o. $y_{a7}$ ; $y_{a7}\text{-H}_2\text{O}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a4}\text{-CO}$ ; $b_{a3}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $b_{\beta 2}$ ; PDNE; PDN; $b_{a4}$ x $b_{\beta 2}$ ; FKV x $\beta$
838,905	1676,801	2	0,7	K-46 x K-50	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{14}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{045}\text{FKR}$ ( $^{15}\text{N}$ )	$b_{a8}$ o. $y_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a7}\text{-H}_2\text{O}$ o. $y_{a7}$ ; $y_{a7}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a4}\text{-CO}$ ; $b_{a3}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $b_{\beta 2}$ ; PDNE; PDN; $b_{a4}$ x $b_{\beta 2}$ ; FKV x $\beta$
563,261	1687,769	3	0,4	K-46 x K-50	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{15}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{045}\text{FKR}$ ( $^{15}\text{N}$ )	$b_{a8}$ o. $y_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a7}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ o. $y_{a7}$ ; $y_{a7}\text{-H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a4}\text{-CO}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a2}$ ; $y_{a2}\text{-H}_2\text{O}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $b_{\beta 2}$ ; $y_{\beta 1}$ ; PDNE; $b_{a4}$ x $b_{\beta 2}$
844,389	1687,769	2	0,7	K-46 x K-50	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{15}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{045}\text{FKR}$ ( $^{15}\text{N}$ )	$\alpha$ ; $b_{a8}$ o. $y_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a7}\text{-H}_2\text{O}$ o. $y_{a7}$ ; $y_{a7}\text{-H}_2\text{O}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a4}\text{-CO}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a3}\text{-CO}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $b_{\beta 2}$ ; PDNE; PDN; $b_{a4}$ x $b_{\beta 2}$ ; FKV x $\beta$
582,302	1744,89	3	0,0	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{14}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{095}\text{HKLK}$ ( $^{14}\text{N}$ )	$b_{a8}$ o. $y_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ o. $y_{a7}$ ; $y_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a2}$ ; $b_{a2}\text{-CO}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $y_{a2}\text{-H}_2\text{O}$ ; PDNE; PDN
872,949	1744,89	2	0,4	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{14}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{095}\text{HKLK}$ ( $^{14}\text{N}$ )	$b_{a8}$ o. $y_{a8}$ o. $b_{\beta 3}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ o. $y_{a7}$ ; $y_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a4}\text{-H}_2\text{O}$ o. $\alpha$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $b_{\beta 2}$ ; PDNE; PDN; $b_{a4}$ x $y_{\beta 3}$
438,971	1752,867	4	-1,8	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{14}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{095}\text{HKLK}$ ( $^{15}\text{N}$ )	$b_{a8}$ o. $y_{a8}$ o. $b_{\beta 3}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a3}$ o. $y_{a6}$ ; $b_{a2}$ o. $b_{a1}$ o. $y_{a1}$ ; $y_{a5}$
585,957	1755,858	3	-0,1	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{15}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{095}\text{HKLK}$ ( $^{14}\text{N}$ )	$b_{a8}$ o. $y_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ o. $y_{a7}$ ; $y_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a2}$ ; $b_{a2}\text{-CO}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a2}\text{-H}_2\text{O}$ ; PDNE
878,431	1755,858	2	-1,6	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{15}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{095}\text{HKLK}$ ( $^{14}\text{N}$ )	$b_{a8}$ o. $y_{a8}$ o. $b_{\beta 3}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ o. $y_{a7}$ ; $y_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $b_{\beta 3}$ ; $b_{\beta 2}$ ; PDNE; PDN; $b_{a4}$ x $y_{\beta 3}$
588,616	1763,834	3	0,4	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ $^{048}\text{FFKVPDNEE}$ ( $^{15}\text{N}$ ) $\beta$ E/ $^{095}\text{HKLK}$ ( $^{15}\text{N}$ )	$b_{a8}$ o. $y_{a8}$ ; $b_{a7}$ ; $b_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ o. $y_{a7}$ ; $y_{a7}\text{-NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; $b_{a6}$ ; $b_{a5}$ ; $b_{a4}$ ; $b_{a3}$ ; $b_{a2}$ ; $b_{a2}\text{-CO}$ ; $y_{a6}$ ; $y_{a5}$ ; $y_{a3}$ ; $y_{a2}\text{-H}_2\text{O}$ ; PDNE; PDN

Anhang

Tabelle-A 13 Fortsetzung

882,421	1763,834	2	0,5	K-50 x K-96	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>15</sup> N) $\beta$ E/ <sup>095</sup> HKLK ( <sup>15</sup> N)	b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub> o. b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a7</sub> -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O o. y <sub>a7</sub> ; y <sub>a7</sub> -NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a4</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; b <sub><math>\beta</math>2</sub> ; PDNE; PDN; b <sub>a4</sub> x y <sub><math>\beta</math>3</sub>
901,919	1802,831	2	0,3	K-50 x K-200	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>14</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSAMF ( <sup>14</sup> N)	$\alpha$ ; b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub> ; b <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. y <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a7</sub> - H <sub>2</sub> O o. y <sub>a7</sub> ; y <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; y <sub><math>\beta</math>4</sub> - NH <sub>3</sub> ; y <sub><math>\beta</math>2</sub> ; PDNE; PDN; b <sub>a4</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a3</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub>
904,911	1808,813	2	0,6	K-50 x K-200	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>14</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSAMF ( <sup>15</sup> N)	$\alpha$ ; b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. y <sub>a7</sub> ; y <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; y <sub><math>\beta</math>2</sub> ; PDNE; PDN; b <sub>a4</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a3</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub>
907,403	1813,798	2	0,4	K-50 x K-200	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>15</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSAMF ( <sup>14</sup> N)	b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub> ; b <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. y <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O o. y <sub>a7</sub> o. b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; y <sub>a7</sub> -NH <sub>3</sub> o. b <sub><math>\beta</math>3</sub> -NH <sub>3</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; b <sub>a2</sub> o. y <sub><math>\beta</math>2</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; PDNE; PDN; b <sub>a4</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a3</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub>
910,394	1819,78	2	0,4	K-50 x K-200	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>15</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSAMF ( <sup>15</sup> N)	$\alpha$ ; b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub> ; b <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. y <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a7</sub> - H <sub>2</sub> O o. y <sub>a7</sub> ; y <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. b <sub><math>\beta</math>3</sub> -NH <sub>3</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; y <sub><math>\beta</math>4</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ; y <sub><math>\beta</math>2</sub> ; PDNE; PDN; b <sub>a4</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a3</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub>
909,917	1818,825	2	0,2	K-50 x K-200	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>14</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSAmF ( <sup>14</sup> N)	$\alpha$ ; b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub> ; b <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. y <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a7</sub> - H <sub>2</sub> O o. y <sub>a7</sub> ; y <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O o. b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; b <sub><math>\beta</math>3</sub> -NH <sub>3</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; b <sub><math>\beta</math>2</sub> ; y <sub><math>\beta</math>4</sub> ; y <sub><math>\beta</math>2</sub> ; PDNE; PDN; b <sub>a4</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a3</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub>
912,908	1824,808	2	0,0	K-50 x K-200	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>14</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSAmF ( <sup>15</sup> N)	b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub> ; b <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. y <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub><math>\beta</math>4</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ; b <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O o. y <sub>a7</sub> ; y <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O o. b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; b <sub><math>\beta</math>2</sub> ; y <sub><math>\beta</math>4</sub> ; y <sub><math>\beta</math>2</sub> ; PDNE; b <sub>a4</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a3</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub>
918,392	1835,775	2	0,9	K-50 x K-200	$\alpha$ R/ <sup>048</sup> FFKVPDNEE ( <sup>15</sup> N) $\beta$ R/ <sup>200</sup> KSAMF ( <sup>15</sup> N)	b <sub>a8</sub> o. y <sub>a8</sub> ; b <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. y <sub>a8</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> o. b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub><math>\beta</math>4</sub> -H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ; b <sub>a7</sub> ; b <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O o. y <sub>a7</sub> ; y <sub>a7</sub> -H <sub>2</sub> O o. b <sub><math>\beta</math>3</sub> ; b <sub><math>\beta</math>3</sub> -NH <sub>3</sub> ; b <sub>a6</sub> ; b <sub>a5</sub> ; b <sub>a4</sub> ; b <sub>a3</sub> ; y <sub>a6</sub> ; y <sub>a5</sub> ; y <sub>a3</sub> ; y <sub><math>\beta</math>4</sub> ; y <sub><math>\beta</math>2</sub> ; PDNE; PDN; b <sub>a4</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub> ; b <sub>a3</sub> x b <sub><math>\beta</math>4</sub>

Anhang

**Tabelle-A 14** Identifizierte GCAP-2-Peptide modifiziert mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz (1 mM CaCl<sub>2</sub>)

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	<i>z</i>	Δ <i>m</i> (ppm)	modifizierte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	Identifizierte Dubletts <i>m/z</i>	Ladung der Dublett-Signale
419,7265	838,4458	2	-0,1	K-29 (K-30)	<sup>027</sup> WYKK	806,4229	355,3-368,3	2
477,2472	953,4873	2	-0,3	K-200	<sup>199</sup> RKSAMF	739,3920	412,8-425,8	2
483,2868	965,5666	2	-0,3	K-126	<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	418,8-431,8	2
510,7627	1020,5183	2	-0,2	K-178	<sup>177</sup> DKWVMK	806,4229	446,3-459,4	2
512,2587	1023,5106	2	-0,4	K-106	<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	447,8-460,9	2
518,7950	1036,5826	2	0,0	K-98	<sup>097</sup> LKWTFK	822,4872	454,4-467,4	2
588,8134	1176,6194	2	0,1	K-178	<sup>176</sup> RDKWVMK	962,5240	524,4-537,4	2
596,8107	1192,6143	2	-0,2	K-178	<sup>176</sup> RDKWVmK	978,5189	532,4-545,4	2
651,3719	1301,7365	2	0,1	K-98	<sup>095</sup> HKLKWTFK	1087,6411	587,1-600,0	2
434,5835	1301,7365	3	-0,4	K-98	<sup>095</sup> HKLKWTFK	1087,6411	391,8-400,4	3
793,4047	1585,8009	2	0,7	K-102 (or K-106)	<sup>099</sup> WTFKIYDKDR	1371,7056	729,1-742,1	2
529,2717	1585,8009	3	-0,2	K-102 (or K-106)	<sup>099</sup> WTFKIYDKDR	1371,7056	486,5-495,1 n.i. -742,1	3 2
888,9259	1776,8433	2	0,7	K-129	<sup>129</sup> KABSVEVEAEQQGK	1562,7479	824,6-837,6	2
955,9193	1910,8299	2	0,8	S-37 or T-39	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFMHE	1696,7346	891,5-904,5	2
963,9172	1926,8248	2	1,2	S-37 or T-39	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFmHE	1712,7295	899,6-912,7	2
1013,5269	2026,0451	2	0,7	K-142	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	949,2-962,2	2
1019,9668	2038,9249	2	0,7	K-30	<sup>030</sup> KFLEEBPSGTLFMHE	1824,8295	955,7-968,7	2
1027,9645	2054,9198	2	0,9	K-30	<sup>030</sup> KFLEEBPSGTLFmHE	1840,8244	963,7-976,7	2
1127,5823	2254,1561	2	0,5	K-142	<sup>135</sup> VEAEQQGKLLTPEEVVDR	2040,0608	1063,1-1076,3	2

## Anhang

Tabelle-A 15 Identifizierte GCAP-2-Peptide modifiziert mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz (10 mM EGTA)

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	<i>z</i>	$\Delta m$ (ppm)	modifizierte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	Identifizierte Dubletts <i>m/z</i>	Ladung der Dublett-Signale
370,2265	739,4461	2	-0,4	K-96	<sup>095</sup> HKLK	525,3507	305,8-318,8	2
419,7265	838,4458	2	-0,2	K-29	<sup>027</sup> WYKK	806,4229	355,3-368,3	2
477,2472	953,4871	2	-0,18	K-200	<sup>199</sup> RKSAMF	739,3920	412,8-425,8	2
483,2868	965,5666	2	-0,3	K-126	<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	418,8-431,8	2
510,7628	1020,5183	2	0,1	K-178	<sup>177</sup> DKWVMK	806,4229	446,3-459,3	2
512,2589	1023,5106	2	-0,1	K-106	<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	447,8-460,9	2
518,7600	1036,5132	2	-0,4	K-178	<sup>177</sup> DKWVmK	822,4178	454,4-467,4	2
518,7949	1036,5826	2	-0,1	K-98	<sup>097</sup> LKWTFK	822,4872	454,4-467,4	2
547,3342	1093,6616	2	-0,4	K-126 or K-128	<sup>123</sup> SIYKLKK	879,5662	483,0-495,9	2
365,2252	1093,6616	3	-0,5	K-126 or K-128	<sup>123</sup> SIYKLKK	879,5662	322,4-330,9 482,9-496,0	3 2
570,3244	1139,6419	2	-0,3	K-96	<sup>091</sup> GTLEHKLK	925,5465	506,0-518,8	2
588,8134	1176,6194	2	0,0	K-178	<sup>176</sup> RDKWVMK	962,5240	524,5-537,5	2
596,8105	1192,6143	2	-0,5	K-178	<sup>176</sup> RDKWVmK	978,5189	532,5-545,5	2
793,4044	1585,8009	2	0,4	K-102 (or K-106)	<sup>099</sup> WTFKIYDKDR	1371,7056	729,1-742,1	2
529,2716	1585,8009	3	-0,4	K-102 (or K-106)	<sup>099</sup> WTFKIYDKDR	1371,7056	486,5-495,1	3
888,9257	1776,8433	2	0,4	K-129	<sup>129</sup> KABSVEVEAEQQGK	1562,7479	824,6-837,4	2
609,6649	1826,9799	3	0,1	K-98 or K-102 or K-106	<sup>097</sup> LKWTFKIYDKDR	1612,8846	566,8-575,5	3

## Anhang

**Tabelle-A 15 Fortsetzung**

918,4827	1835,9585	2	-0,2	K-178	<sup>170</sup> FVEGARRDKWVMK	1621,8631	854,1-867,0	2
955,9189	1910,8299	2	0,3	S-37 or T-39	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFMHE	1696,7346	891,5-904,4	2
963,9159	1926,8248	2	-0,1	S-37 or T-39	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFmHE	1712,7295	899,5-912,6	2
665,9775	1995,9189	3	-0,4	K-106	<sup>103</sup> IYDKDRNGBIDRQE	1781,8235	623,3-631,9	2
998,4642	1995,9189	2	1,2	K-106	<sup>103</sup> IYDKDRNGBIDRQE	1781,8235	934,1-947,2	2
1013,5270	2026,0451	2	0,8	K-142	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	949,3-962,2	2
1019,9666	2038,9249	2	0,5	K-30	<sup>030</sup> KFLEEBPSGTLFMHE	1824,8295	955,7-968,7	2
1027,9645	2054,9198	2	1,0	K-30	<sup>030</sup> KFLEEBPSGTLFmHE	1840,8244	963,7-976,7	2
1127,5829	2254,1561	2	1,1	K-142	<sup>135</sup> VEAEQQGKLLTPEEVVDR	2040,0608	1063,3-1076,3	2



Anhang

Tabelle-A 16 Identifizierte Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Anwesenheit von 1 mM CaCl<sub>2</sub>

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	Quervernetzte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	Identifizierte Dubletts <i>m/z</i>	Ladung der Dublett-Signale
583,8337	1166,6602	2	-0,1	K-200 x K-128	<sup>200</sup> KSAMF <sup>127</sup> LKK	583,2908 388,2918	668,4-694,3 473,4-499,4	1 1
604,3629	1207,7198	2	-1,1	K-29 x K-128	<sup>027</sup> WYKK <sup>127</sup> LKK	624,3504 388,2918	709,3-735,5 473,5-499,4	1 1
614,8290	1228,6507	2	0,1	K-200 x K-46	<sup>200</sup> KSAMF <sup>045</sup> FKR	583,2908 450,2823	668,4-694,3 535,4-561,3	1 1
622,8264	1244,6456	2	0,0	K-200 x K-46	<sup>200</sup> KSAmF <sup>045</sup> FKR	599,2858 450,2823	684,4-710,3 535,4-561,3	1 1
635,3586	1269,7103	2	-0,3	K-29 x K-46	<sup>027</sup> WYKK <sup>045</sup> FKR	624,3504 450,2823	709,4-735,4 535,4-561,3	1 1
652,3632	1303,7191	2	0,1	K-200 x K-96	<sup>200</sup> KSAMF <sup>095</sup> HKLK	583,2908 525,3507	668,4-694,4 610,5-636,4	1 1
657,8419	1314,6762	2	0,2	K-200 x K-30	<sup>200</sup> KSAMF <sup>030</sup> KFLE	583,2908 536,3079	668,4-694,3 621,4-647,3	1 1
660,3608	1319,7140	2	0,2	K-200 x K-96	<sup>200</sup> KSAmF <sup>095</sup> HKLK	599,2858 525,3507	684,3-710,3 610,4-636,4	1 1
661,8845	1322,7613	2	0,3	K-200 x K-128	<sup>199</sup> RKSAMF <sup>127</sup> LKK	739,3920 388,2918	824,4-850,4 473,4-499,4	1 1
441,5916	1322,7613	3	-0,8	K-200 x K-128	<sup>199</sup> RKSAMF <sup>127</sup> LKK	739,3920 388,2918	824,4-850,5 473,4-499,4	1 1
665,8396	1330,6712	2	0,5	K-200 x K-30	<sup>200</sup> KSAmF <sup>030</sup> KFLE	599,2858 536,3079	684,4-710,3 621,4-647,3	1 1
669,8456	1338,6835	2	0,3	K-129 x K-46	<sup>129</sup> KABSVE <sup>045</sup> FKR	693,3236 450,2823	778,4-804,6 535,3-561,4	1 1
669,8817	1338,7562	2	-0,1	K-200 x K-128	<sup>199</sup> RKSAmF <sup>127</sup> LKK	755,3869 388,2918	840,4-866,4 473,4-499,4	1 1

## Anhang

**Tabelle-A 16 Fortsetzung**

698,9193	1396,8311	2	0,2	K-126 x K-46	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>045</sup> FKR	751,4713 450,2823	836,6-862,5 535,3-561,4	1 1
700,8770	1400,7467	2	-0,1	K-200 x K-46	<sup>199</sup> RKSAmF <sup>045</sup> FKR	755,3869 450,2823	840,5-866,4 535,4-561,3	1 1
701,8632	1402,7188	2	0,3	K-29 x K-200	<sup>027</sup> WYKK <sup>200</sup> KSAMF	624,3504 583,2908	709,4-735,4 668,4-	1 1
709,8608	1418,7137	2	0,4	K-29 x K-200	<sup>027</sup> WYKK <sup>200</sup> KSAmF	624,3504 599,2858	n.i. -735,4 684,4- n.i	1 1
473,5760	1418,7137	3	-0,2	K-29 x K-200	<sup>027</sup> WYKK <sup>200</sup> KSAmF	624,3504 599,2858	355,4-368,3 709,4-735,4 684,4-710,4	2 1 1
727,8912	1454,7750	2	0,0	K-106 x K-46	<sup>103</sup> IYDKDR <sup>045</sup> FKR	809,4152 450,2823	894,5-920,5 535,4-561,3	1 1
485,5963	1454,7750	3	-0,4	K-106 x K-46	<sup>103</sup> IYDKDR <sup>045</sup> FKR	809,4152 450,2823	447,9-460,9 894,6-920,5 268,2-281,2 535,4-561,4	2 1 2 1
736,3499	1471,6920	2	0,4	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVE <sup>200</sup> KSAMF	693,3236 583,2908	778,4-804,3 668,3-694,4	1 1
738,4115	1475,8151	2	0,3	K-200 x K-96	<sup>199</sup> RKSAmF <sup>095</sup> HKLK	755,3869 525,3507	840,5-866,5 610,4-636,4	1 1
763,9298	1526,8512	2	0,8	K-178 x K-96	<sup>177</sup> DKWVMK <sup>095</sup> HKLK	806,4229 525,3507	891,5-817,5 610,5-636,4	1 1
765,4240	1529,8396	2	0,7	K-126 x K-200	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>200</sup> KSAMF	751,4713 583,2908	836,5-862,5 668,4-694,3	1 1
771,9270	1542,8461	2	0,5	K-178 x K-96	<sup>177</sup> DKWVmK <sup>095</sup> HKLK	822,4178 525,3507	907,5-933,4 610,5-636,4	1 1

## Anhang

**Tabelle-A 16 Fortsetzung**

514,9534	1542,8461	3	-0,4	K-178 x K-96	<sup>177</sup> DKWVmK	822,4178	454,4-467,4	2
					<sup>095</sup> HKLK	525,3507	907,5-933,5 305,6-318,8 610,6-636,4	1 2 1
773,4212	1545,8345	2	0,4	K-126 x K-200	<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	836,5-862,5	1
					<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,4-710,4	1
779,9139	1558,8199	2	0,4	K-200 x K-29	<sup>199</sup> RKSAMF	739,3920	824,4-850,4	1
					<sup>027</sup> WYKK	624,3504	709,4-735,4	1
783,9013	1566,7945	2	0,5	K-129 x K-46	<sup>129</sup> KABSVEVE	921,4346	1006,5-1032,4	1
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	535,3-561,3	1
787,9115	1574,8148	2	0,6	K-200 x K-29	<sup>199</sup> RKSAMF	755,3869	840,4-866,4	1
					<sup>027</sup> WYKK	624,3504	709,4-735,4	1
525,6095	1574,8148	3	-0,6	K-200 x K-29	<sup>199</sup> RKSAMF	755,3869	420,8-433,8 840,5-866,4	2 1
					<sup>027</sup> WYKK	624,3504	355,3-368,3 709,4-735,4	2 1
792,8996	1584,7913	2	0,4	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVMK	806,4229	891,5-917,5	1
					<sup>200</sup> KSAmF	583,2908	668,3-694,3	1
800,8972	1600,7862	2	0,5	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVmK	822,4178	907,5-933,4	1
					<sup>200</sup> KSAmF	583,2908	668,4-694,3	1
534,2666	1600,7862	3	-0,6	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVMK	806,4229	891,5-917,5	1
					<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,4- n.i.	1
808,8948	1616,7811	2	0,7	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVmK	822,4178	907,5-933,4	1
					<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,4-710,3	1
820,4406	1639,8724	2	0,9	K-126 x K-129	<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	836,5-862,5	1
					<sup>129</sup> KABSVE	693,3236	778,4-804,3	1
837,4673	1673,9295	2	-1,3	K-126 or K-128 x K-200	<sup>123</sup> SIYKLKK	879,5662	964,7-990,7	1
					<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,4-710,6	1

## Anhang

**Tabelle-A 16 Fortsetzung**

850,4056	1699,8030	2	0,6	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVE <sup>200</sup> KSAMF	921,4346 583,2908	1006,5-1032,4 668,3-694,5	1 1
858,4032	1715,7979	2	0,7	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVE <sup>200</sup> KSAmF	921,4346 599,2858	1006,5-1032,4 684,3-710,3	1 1
580,9685	1740,8924	3	-0,8	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVMK  <sup>199</sup> RKSAMF	806,4229  739,3920	446,4-459,3 891,5-917,5 412,8- n.i. 824,5-850,4	2 1 2 1
878,4870	1755,9640	2	1,5	K-106 x K-126	<sup>103</sup> IYDKDR <sup>123</sup> SIYKLLK	809,4152 751,4713	894,5-920,4 836,5-862,5	1 1
585,9929	1755,9640	3	0,2	K-106 x K-126	<sup>103</sup> IYDKDR  <sup>123</sup> SIYKLLK	809,4152  751,4713	447,8-460,9 894,5-920,4 418,8-431,9 836,5-862,5	2 1 2 1
878,9478	1756,8873	2	0,6	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVMK <sup>199</sup> RKSAmF	806,4229 755,3869	891,5-917,5 840,5-866,5	1 1
586,3004	1756,8873	3	-0,5	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVMK  <sup>199</sup> RKSAmF	806,4229  755,3869	446,5-459,4 891,6-917,5 421,0- n.i. 840,5-866,5	2 1 2 1
885,4471	1769,8857	2	0,7	K-50 x K-46	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>045</sup> FKR	1124,5259 450,2823	1209,6-1235,5 535,4-561,3	1 1
887,4300	1773,8516	2	0,6	K-50 x K-200	<sup>048</sup> FFKVPDNE <sup>200</sup> KSAMF	995,4833 583,2908	1080,5-1106,5 668,4-694,5	1 1
928,4598	1855,9113	2	0,5	K-50 x K-30	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>030</sup> KFLE	1124,5259 536,3079	1209,5-1235,5 621,4-647,4	1 1
934,4962	1867,9834	2	0,9	K-129 x K-126	<sup>129</sup> KABSVEVE <sup>123</sup> SIYKLLK	921,4346 751,4713	1006,5-1032,4 836,5-862,5	1 1

## Anhang

**Tabelle-A 16 Fortsetzung**

936,4534	1871,8990	2	0,2	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVE <sup>199</sup> RKSAmF	921,4346 755,3869	1006,5-1032,4 840,5-866,4	1 1
942,5339	1884,0589	2	0,9	K-126 or K-128 x K-106	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>103</sup> IYDKDR	879,5662 809,4152	964,6-990,6 894,4-920,5	1 1
628,6912	1884,0589	3	0,0	K-126 or K-128 x K-106	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>103</sup> IYDKDR	879,5662 809,4152	483,0-495,9 964,6-990,6 447,9-460,9 894,5-920,4	2 1 2 1
950,4458	1899,8827	2	0,9	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVEAE <sup>200</sup> KSAMF	1121,5143 583,2908	1206,6-1232,5 668,4-694,3	1 1
951,9516	1902,8942	2	0,9	K-50 x K-200	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>200</sup> KSAMF	1124,5259 583,2908	1209,5-1235,5 668,4-694,3	1 1
958,4432	1915,8776	2	0,8	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVEAE <sup>200</sup> KSAmF	1121,5143 599,2858	1206,5-1232,5 684,3-710,4	1 1
959,9488	1918,8891	2	0,6	K-50 x K-200	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>200</sup> KSAmF	1124,5259 599,2858	1209,5-1235,5 684,4-710,4	1 1
972,4812	1943,9538	2	0,7	K-50 x K-30	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>027</sup> WYKK	1124,5259 624,3504	1209,6-1235,5 709,4-735,4	1 1
648,6562	1943,9538	3	0,1	K-50 x K-30	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>027</sup> WYKK	1124,5259 624,3504	1209,6-1235,4 355,4-368,2 709,4-735,4	1 2 1
976,9544	1952,8993	2	1,2	S-37 or T-39 x K-46	<sup>034</sup> EBPSGTLFMHE <sup>045</sup> FKR	1307,5395 450,2823	1392,5-1418,5 535,4-561,4	1 1
1006,9682	2012,9270	2	1,1	K-50 x K-129	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>129</sup> KABSVE	1124,5259 693,3236	1209,6-1235,4 778,4-804,4	1 1

## Anhang

**Tabelle-A 16 Fortsetzung**

1030,0025	2058,9953	2	1,1	K-50 x K-200	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,6-1235,5	1
					<sup>199</sup> RKSAMF	739,3920	824,4-850,4	1
1034,5364	2068,0631	2	1,2	K-129 x K-126	<sup>047</sup> RFFKVPDNEE	1280,6270	1365,6-1391,6	1
					<sup>200</sup> KSAMF	583,2908	668,4-694,4	1
1036,0420	2071,0746	2	1,0	K-50 x K-126	<sup>129</sup> KABSVEVEAE	1121,5143	1206,5-1232,5	1
					<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	836,5-862,5	1
691,0299	2071,0746	3	0,3	K-50 x K-126	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,6-1235,5	1
					<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	418,8-431,8 836,5-862,5	2 1
1037,9998	2074,9903	2	1,0	K-50 x K-200	<sup>047</sup> RFFKVPDNEE	1280,6270	1365,6-1391,6	1
					<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,4-710,3	1
1121,0239	2241,0380	2	1,1	K-50 x K-129	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,6-1235,4	1
					<sup>129</sup> KABSVEVE	921,4346	1006,5-1032,4	1
747,6844	2241,0380	3	0,3	K-50 x K-129	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,6-1235,5	1
					<sup>129</sup> KABSVEVE	921,4346	Rauschen	
781,3702	2342,0944	3	0,7	S-37 or T-39 x K-46	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFMHE	1696,7346	891,6-904,6	2
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	535,4-561,3	1
1171,5520	2342,0944	2	1,0	S-37 or T-39 x K-46	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFMHE	1696,7346	1781,7-1807,7	1
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	535,4-561,4	1
786,3759	2357,1112	3	0,8	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVEAEQQGK	1562,7479	824,7-837,5	2
					<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,4-710,4	1
786,7017	2358,0893	3	0,5	S-37 or T-39 x K-46	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFmHE	1712,7295	899,6-912,6	2
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	535,4-561,3	1
1198,1648	2395,3191	2	1,3	K-142 x K-128	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	1897,0-1923,0	1
					<sup>127</sup> LKK	388,2918	473,4-499,4	1

## Anhang

**Tabelle-A 16 Fortsetzung**

799,1115	2395,3191	3	0,4	K-142 x K-128	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>127</sup> LKK	1811,9498 388,2918	949,3-962,7 473,4-499,4	2 1
1231,1068	2461,2034	2	1,1	K-50 x K-46	<sup>048</sup> FFKVPDNEEATQYVE <sup>045</sup> FKR	1815,8436 450,2823	1900,9-1926,8 535,3-561,4	1 1
837,1044	2509,2967	3	0,7	K-129 x K-126	<sup>129</sup> KABSVEVEAEQQGK <sup>123</sup> SIYKLLK	1562,7479 751,4713	824,5- n.i. n.i. -862,5	2 1
1274,1176	2547,2290	2	-0,4	K-50 x K-30	<sup>048</sup> FFKVPDNEEATQYVE <sup>030</sup> KFLE	1815,8436 536,3079	1900,9-1926,5 621,36- n.i.	1 1
1297,6112	2594,2119	2	1,3	K-50 x K-200	<sup>048</sup> FFKVPDNEEATQYVE <sup>200</sup> KSAMF	1815,8436 583,2908	1900,86-1926,8 668,4-694,4	1 1
868,4044	2603,1979	3	0,2	K-30 x K-200	<sup>030</sup> KFLEEBPSGTLFMHE <sup>200</sup> KSAMF	1824,8295 583,2908	955,7-969,0 668,4-694,3	2 1
869,4431	2606,3130	3	0,6	K-142 x K-200	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>200</sup> KSAmF	1811,9498 599,2858	949,2-962,4 684,3-710,3	2 1
1305,6086	2610,2069	2	1,2	K-50 x K-200	<sup>048</sup> FFKVPDNEEATQYVE <sup>200</sup> KSAmF	1815,8436 599,2858	1900,8-1926,8 684,4-710,4	1 1
873,7363	2619,1928	3	0,6	K-30 x K-200	<sup>030</sup> KFLEEBPSGTLFMHE <sup>200</sup> KSAmF	1824,8295 599,2858	955,7-968,7 684,5-710,3	2 1
1318,1405	2635,2715	2	0,9	K-50 x K-29	<sup>048</sup> FFKVPDNEEATQYVE <sup>027</sup> WYKK	1815,8436 624,3504	1900,9-1926,8 709,4-735,4	1 1
900,7890	2700,3509	3	0,5	K-142 x K-129	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>129</sup> KABSVE	1811,9498 693,3236	949,3-962,2 778,4-804,3	2 1
938,4889	2813,4502	3	0,7	K-142 x K-178	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>177</sup> DKWVMK	1811,9498 806,4229	949,4-961,8 891,5-917,4	2 1
943,8207	2829,4451	3	0,9	K-142 x K-178	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>177</sup> DKWVmK	1811,9498 822,4178	n.i. 907,5-933,4	 1

Anhang

**Tabelle-A 16 Fortsetzung**

708,1169	2829,4451	4	0,2	K-142 x K-178	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	949,27-962,4	2
					<sup>177</sup> DKWVmK	822,4178	454,4-467,35 907,5-933,5	2 1
976,8265	2928,4619	3	1,1	K-142 x K-129	<sup>135</sup> VEAEQQGKLLTPEEVVDR	2040,0608	1063,3-1076,3	2
					<sup>129</sup> KABSVE	693,3236	778,4-804,4	1
976,8266	2928,4619	3	1,2	K-142 x K-129	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	949,2-962,3	2
					<sup>129</sup> KABSVEVE	921,4346	1006,5-1032,4	1
1464,7365	2928,4619	2	1,3	K-142 x K-129	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	1897,0-1923,0	1
					<sup>129</sup> KABSVEVE	921,4346	1006,5-1032,4	1
990,5224	2969,5513	3	0,4	K-142 x K-178	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	949,3-962,5	2
					<sup>176</sup> RDKWVMK	962,5240	1897,2-1923,0 524,4-537,4 1047,6-1073,5	1 2 1
					<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	949,3-962,4	2
					<sup>176</sup> RDKWVmK	978,5189	1897,3-1923,1 532,4-545,3 1063,6-1089,5	1 2 1
995,8540	2985,5462	3	0,4	K-142 x K-178	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	949,3-962,4	2
					<sup>176</sup> RDKWVmK	978,5189	1897,3-1923,1 532,4-545,3 1063,6-1089,5	1 2 1



Anhang

Tabelle-A 17 Identifizierte Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> (10 mM EGTA)

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	<i>z</i>	Δ <i>m</i> (ppm)	quervernetzte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	identifizierte Dubletts <i>m/z</i>	Ladung der Dublett-Signale
583,8341	1166,6602	2	0,5	K-200 x K-128	<sup>200</sup> KSAMF <sup>127</sup> LKK	583,2908 388,2918	668,3-694,3 473,4-499,4	1 1
591,8309	1182,6551	2	-0,5	K-200 x K-128	<sup>200</sup> KSAmF <sup>127</sup> LKK	599,2858 388,2918	684,4-710,4 473,4-499,4	1 1
614,8289	1228,6507	2	-0,2	K-200 x K-46	<sup>200</sup> KSAMF <sup>045</sup> FKR	583,2908 450,2823	668,3-694,3 535,4-561,3	1 1
622,8263	1244,6456	2	-0,2	K-200 x K-46	<sup>200</sup> KSAmF <sup>045</sup> FKR	599,2858 450,2823	684,4-710,3 535,4-561,3	1 1
635,3587	1269,7103	2	-0,1	K-29 x K-46	<sup>027</sup> WYKK <sup>045</sup> FKR	624,3504 450,2823	709,4-735,4 535,4-561,3	1 1
423,9082	1269,7103	3	-0,2	K-29 x K-46	<sup>027</sup> WYKK  <sup>045</sup> FKR	624,3504  450,2823	355,30-368,30 709,41-735,40 268,24-281,22 535,39-561,33	2 1 2 1
652,3634	1303,7191	2	0,3	K-200 x K-96	<sup>200</sup> KSAMF <sup>095</sup> HKLK	583,2908 525,3507	668,4-694,3 610,4-636,4	1 1
692,8794	1384,7518	2	-0,2	K-200 x K-46	<sup>199</sup> RKSAMF <sup>045</sup> FKR	739,3920 450,2823	824,4-850,5 535,4-561,4	1 1
698,9194	1396,8311	2	0,2	K-126 x K-46	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>045</sup> FKR	751,4713 450,2823	836,5-862,5 535,3-561,3	1 1
699,3828	1397,7576	2	0,5	K-50 x K-46	<sup>048</sup> FFKVDP <sup>045</sup> FKR	752,3978 450,2823	837,5-863,3 535,4-561,3	1 1
700,8771	1400,7467	2	0,2	K-200 x K-46	<sup>199</sup> RKSAmF <sup>045</sup> FKR	755,3869 450,2823	840,5-866,4 535,4-561,3	1 1
701,8632	1402,7188	2	0,2	K-29 x K-200	<sup>027</sup> WYKK <sup>200</sup> KSAMF	624,3504 583,2908	709,4-735,4 668,3- n.i.	1 1

## Anhang

**Tabelle-A 17 Fortsetzung**

709,8607	1418,7137	2	0,4	K-29 x K-200	<sup>027</sup> WYKK <sup>200</sup> KSAmF	624,3504 599,2858	n.i. -735,38 684,3- n.i.	1 1
736,3498	1471,6920	2	0,2	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVE <sup>200</sup> KSAmF	693,3236 583,2908	778,4-804,3 668,3-694,4	1 1
736,4536	1471,8995	2	0,3	K-126 x K-96	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>095</sup> HKLLK	751,4713 525,3507	836,5-862,5 610,5-636,4	1 1
756,8797	1512,7515	2	0,4	K-129 x K-29	<sup>129</sup> KABSVE <sup>027</sup> WYKK	693,3236 624,3504	778,4-804,3 709,4-735,4	1 1
762,9672	1524,9261	2	0,6	K-126 or K-128 x K-46	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>045</sup> FKR	879,5662 450,2823	964,7-990,6 535,4-561,4	1 1
508,9801	1524,9261	3	-0,2	K-126 or K-128 x K-46	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>045</sup> FKR	879,5662 450,2823	482,95-495,80 535,43-561,40	1 1
510,6188	1529,8435	3	-1,0	K-106 x K-96	<sup>103</sup> IYDKDR  <sup>095</sup> HKLLK	809,4152  525,3507	448,0-461,0 894,4-920,5 306,3-318,8 610,5-636,1	2 1 2 1
765,4232	1529,8396	2	-0,3	K-126 x K-200	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>200</sup> KSAmF	751,4713 583,2908	836,5-862,5 668,4-694,3	1 1
773,4216	1545,8345	2	0,9	K-126 x K-200	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>200</sup> KSAmF	751,4713 599,2858	836,5-862,5 684,4-710,3	1 1
779,9142	1558,8199	2	0,8	K-200 x K-29	<sup>199</sup> RKSAMF <sup>027</sup> WYKK	739,3920 624,3504	824,4-850,4 709,4-735,4	1 1
783,9011	1566,7945	2	0,3	K-129 x K-46	<sup>129</sup> KABSVEVE <sup>045</sup> FKR	921,4346 450,2823	1006,5-1032,4 535,4-561,3	1 1
785,9537	1570,8992	2	0,6	K-126 x K-29	<sup>123</sup> SIYKLLK <sup>027</sup> WYKK	751,4713 624,3504	836,5-862,5 709,4-735,4	1 1

Anhang

Tabelle-A 17 Fortsetzung

524,3046	1570,8992	3	0,0	K-126 x K-29	<sup>123</sup> SIYKLIK	751,4713	418,9-431,9	2
					<sup>027</sup> WYKK	624,3504	836,5-862,5	1
792,8998	1584,7913	2	0,6	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVMK	806,4229	891,5-917,5	1
					<sup>200</sup> KSAMF	583,2908	355,3-368,4	2
800,8975	1600,7862	2	0,9	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVmK	822,4178	709,4-735,4	1
					<sup>200</sup> KSAMF	583,2908	907,5-933,4	1
802,3932	1603,7785	2	0,4	K-178 x K-106	<sup>177</sup> DKWVmK	822,4178	894,5-920,4	1
					<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	668,3-694,3	1
808,8945	1616,7811	2	0,4	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVmK	822,4178	907,5-933,44	1
					<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,4-710,3	1
814,9256	1628,8431	2	0,5	K-106 x K-29	<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	894,5-920,5	1
					<sup>027</sup> WYKK	624,3504	709,4-735,4	1
543,6190	1628,8431	3	-0,5	K-106 x K-29	<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	447,8-460,8	2
					<sup>027</sup> WYKK	624,3504	894,5-920,5	1
820,4403	1639,8724	2	0,5	K-126 x K-129	<sup>123</sup> SIYKLIK	751,4713	355,3-368,5	2
					<sup>129</sup> KABSVE	693,3236	709,4-735,4	1
820,9257	1640,8431	2	0,6	K-50 x K-46	<sup>048</sup> FFKVPDNE	995,4833	1080,5-1106,7	1
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	535,3-561,3	1
547,6189	1640,8431	3	-0,6	K-50 x K-46	<sup>048</sup> FFKVPDNE	995,4833	1080,6-1106,6	1
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	268,2-281,2	2
829,4714	1657,9346	2	0,5	K-126 or K-128 x K-200	<sup>123</sup> SIYKLIK	879,5662	535,3-561,4	1
					<sup>200</sup> KSAMF	583,2908	964,6-990,6	1

Anhang

Tabelle-A 17 Fortsetzung

837,4687	1673,9295	2	0,3	K-126 or K-128 x K-200	<sup>123</sup> SIYKLKK <sup>200</sup> KSAmF	879,5662 599,2858	964,6-990,6 684,3-710,3	1 1
843,4746	1685,9407	2	0,8	K-126 x K-200	<sup>123</sup> SIYKLK <sup>199</sup> RKSAMF	751,4713 739,3920	818,5(-18)-862,5 824,5-850,4	1 1
850,0010	1698,9941	2	0,4	K-126 or K-128 x K-29	<sup>123</sup> SIYKLKK <sup>027</sup> WYKK	879,5662 624,3504	964,6-990,5 709,4-735,4	1 1
567,0029	1698,9941	3	0,0	K-126 or K-128 x K-29	<sup>123</sup> SIYKLKK  <sup>027</sup> WYKK	879,5662  624,3504	483,0-496,0 964,7-990,5 355,4-368,4 709,4-735,4	2 1 2 1
850,4055	1699,8030	2	0,5	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVE <sup>200</sup> KSAmF	921,4346 583,2908	1006,5-1032,4 668,4-694,4	1 1
854,4510	1707,8952	2	-0,2	K-50 x K-128	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>127</sup> LKK	1124,5259 388,2918	1209,6-1235,5 473,5-499,3	1 1
858,4032	1715,7979	2	0,7	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVE <sup>200</sup> KSAmF	921,4346 599,2858	1006,5-1032,4 684,4-710,3	1 1
580,9689	1740,8924	3	-0,2	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVMK  <sup>199</sup> RKSAMF	806,4229  739,3920	446,4-459,4 891,5-917,4 412,77- n.i. 824,4-850,4	2 1 2 1
870,9505	1740,8924	2	0,8	K-178 x K-200	<sup>176</sup> RDKWVMK <sup>200</sup> KSAmF	962,5240 583,2908	1047,5-1073,5 668,4-694,3	1 1
878,9477	1756,8873	2	0,5	K-178 x K-200	<sup>176</sup> RDKWVMK <sup>200</sup> KSAmF	962,5240 599,2858	1047,5-1073,5 684,4-710,3	1 1
885,4471	1769,8857	2	0,7	K-50 x K-46	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>045</sup> FKR	1124,5259 450,2823	1209,5-1235,5 535,3-561,3	1 1

## Anhang

**Tabelle-A 17 Fortsetzung**

886,9454	1772,8822	2	0,7	K-178 x K-200	<sup>177</sup> DKWVmK	822,4178	907,5-933,5	1
					<sup>199</sup> RKSAmF	755,3869	840,4-866,4	1
					<sup>176</sup> RDKWVmK	978,5189	1063,6-1089,7	1
					<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,4-710,5	1
604,3097	1810,9156	3	-0,6	K-106x K-178	<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	447,7-460,8 894,6-920,5	2 1
					<sup>177</sup> DKWVMK	806,4229	446,5-459,4 891,5-917,4	2 1
609,6649	1826,9800	3	0,1	K-98 x K-106	<sup>097</sup> LKWTFK	822,4872	454,5-467,4 907,6-933,5	2 1
					<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	447,9-460,9 894,5-920,5	2 1
913,9944	1826,9800	2	0,8	K-98 x K-106	<sup>097</sup> LKWTFK	822,4872	n.i. -933,5	1
					<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	894,5-920,5	1
922,9813	1844,9541	2	0,7	K-50 x K-96	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,5-1235,4	1
					<sup>095</sup> HKLK	525,3507	610,5-636,4	1
928,4566	1855,9041	2	1,0	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVE	921,4346	1006,5-1032,3	1
					<sup>199</sup> RKSAMF	739,3920	824,4-850,4	1
934,4958	1867,9834	2	0,6	K-129 x K-126	<sup>129</sup> KABSVEVE	921,4346	1006,4-1032,40	1
					<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	836,5-862,5	1
936,4538	1871,8990	2	0,7	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVE	921,4346	1006,5-1032,5	1
					<sup>199</sup> RKSAmF	755,3869	840,4-866,5	1
633,0024	1896,9935	3	-0,4	K-178 x K-200	<sup>176</sup> RDKWVMK	962,5240	524,4-537,5	2
					<sup>199</sup> RKSAMF	739,3920	824,5-850,4	1
950,4456	1899,8827	2	0,7	K-129 x K-200	<sup>129</sup> KABSVEVEAE	1121,5143	1206,5-1232,5	1
					<sup>200</sup> KSAMF	583,2908	668,4-694,3	1
951,9512	1902,8942	2	0,5	K-50 x K-200	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,5-1235,5	1
					<sup>200</sup> KSAMF	583,2908	668,4-694,3	1

Anhang

Tabelle-A 17 Fortsetzung

638,3347	1912,9884	3	0,5	K-178 x K-200	<sup>176</sup> RDKWVmK	978,5189	532,5-545,4	2
					<sup>199</sup> RKSAMF	739,3920	824,5-850,5	1
959,9489	1918,8891	2	0,8	K-50 x K-200	<sup>176</sup> RDKWVMK	962,5240	524,4-537,4	2
					<sup>199</sup> RKSAmF	755,3869	840,5-866,5	1
643,6658	1928,9833	3	-0,3	K-178 x K-200	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,5-1235,5	1
					<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,3-710,3	1
972,4814	1943,9538	2	0,9	K-50 x K-29	<sup>176</sup> RDKWVmK	978,5189	532,6-545,5	2
					<sup>199</sup> RKSAmF	755,3869	840,5-866,5	1
648,6563	1943,9538	3	0,3	K-50 x K-29	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,5-1235,5	1
					<sup>027</sup> WYKK	624,3504	355,4-368,4 709,4-735,4	2 1
1034,5362	2068,0631	2	1,0	K-129 x K-126	<sup>129</sup> KABSVEVEAE	1121,5143	1206,5-1232,4	1
					<sup>123</sup> SIYKLK	751,4713	836,5-862,5	1
691,0300	2071,0746	3	0,4	K-50 x K-126	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	605,3-618,4 1209,5-1235,6	2 1
					<sup>123</sup> SIYKLK	751,4713	418,9-431,8 836,5-862,5	2 1
1037,9995	2074,9903	2	0,7	K-50 x K-200	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,5-1235,5	1
					<sup>199</sup> RKSAmF	755,3869	840,4-866,4	1
523,7887	2092,1338	4	-0,4	K-102 or K-106 x K-96	<sup>099</sup> WTFKIYDKDR	1371,7056	729,2-742,1	2
					<sup>095</sup> HKLLK	525,3507	305,5-318,8	2
709,3469	2126,0263	3	0,0	K-50 x K-178	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,5- n.i.	1
					<sup>177</sup> DKWVMK	806,4229	446,4-459,3 891,5-917,4	2 1

## Anhang

**Tabelle-A 17 Fortsetzung**

1065,0141	2129,0186	2	1,1	K-50 x K-106	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>103</sup> IYDKDR	1124,5259 809,4152	1209,5-1235,4 894,5-920,4	1 1
710,3445	2129,0186	3	0,2	K-50 x K-106	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>103</sup> IYDKDR	1124,5259 809,4152	605,5-618,5 1209,5-1235,4 447,9-460,9 894,4-920,5	2 1 2 1
1071,5154	2142,0212	2	1,1	K-50 x K-178	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>177</sup> DKWVmK	1124,5259 822,4178	1209,6-1235,4 907,5-933,5	1 1
714,6788	2142,0212	3	0,3	K-50 x K-178	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>177</sup> DKWVmK	1124,5259 822,4178	605,5- n.i. 1209,6-1235,5 454,4-467,4 907,5-933,5	2 1 2 1
1121,0231	2241,0380	2	0,4	K-50 x K-129	<sup>048</sup> FFKVPDNEE <sup>129</sup> KABSVEVE	1124,5259 921,4346	1209,5-1235,6 1006,5-1032,4	1 1
781,3699	2342,0944	3	0,3	S-37 or T-39 x K-46	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFMHE <sup>045</sup> FKR	1696,7346 450,2823	891,2-904,2 535,3-561,3	2 1
786,7018	2358,0893	3	0,7	S-37 or T-39 x K-46	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFmHE <sup>045</sup> FKR	1712,7295 450,2823	899,6-912,3 535,4-561,2	2 1
599,5850	2395,3191	4	-0,4	K-142 x K-128	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>127</sup> LKK	1811,9498 388,2918	633,2-641,4 949,6-962,5 237,1-250,2 473,2-499,5	3 2 2 1
799,1116	2395,3191	3	0,4	K-142 x K-128	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>127</sup> LKK	1811,9498 388,2918	949,3-961,8/962,6 473,3-499,3	2 1
1231,1067	2461,2034	2	1,1	K-50 x K-46	<sup>048</sup> FFKVPDNEEATQYVE <sup>045</sup> FKR	1815,8436 450,2823	1900,8-1926,8 535,4-561,3	1 1
829,3999	2486,1843	3	0,4	K-30 x K-46	<sup>030</sup> KFLEEBPSGTLFmHE <sup>045</sup> FKR	1840,8244 450,2823	963,6-976,7 535,3-561,3	2 1

## Anhang

**Tabelle-A 17 Fortsetzung**

864,1112	2590,3181	3	0,4	K-142 x K-200	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>200</sup> KSAMF	1811,9498 583,2908	949,2-962,3 668,3-694,4	2 1
869,4430	2606,3130	3	0,5	K-142 x K-200	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>200</sup> KSAmF	1811,9498 599,2858	949,1-962,2 684,3-710,3	2 1
900,7887	2700,3509	3	0,2	K-142 x K-129	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>129</sup> KABSVE	1811,9498 693,3236	949,25-962,4 778,4-804,4	2 1
938,4889	2813,4502	3	0,7	K-142 x K-178	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>177</sup> DKWVMK	1811,9498 806,4229	n.i. -962,4 891,5-917,5	2 1
943,8204	2829,4451	3	0,6	K-142 x K-178	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>177</sup> DKWVmK	1811,9498 822,4178	n.i. -961,71/962,14 907,4-933,5	2 1
1464,7368	2928,4619	2	1,5	K-142 x K-129	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>129</sup> KABSVEVE	1811,9498 921,4346	1897,0-1922,9 1006,5-1032,4	1 1
976,8262	2928,4619	3	0,7	K-142 x K-129	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR <sup>129</sup> KABSVEVE	1811,9498 921,4346	949,2-962,1 1006,4-1032,4	2 1



## Anhang

**Tabelle-A 18 Potentielle intrapeptidal vernetzte Peptid-Kandidaten (können auf Grund der unterschiedlichen Fragmentierung nicht 100% bestätigt werden)**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	quervernetzte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	Verlust von 85 u	Ladung der Signale	relative Intensität der Signale	Neutralverluste Vorläuferion rel. Int.
361,2214	721,4355	2	0,07	K-96 x K-98	<sup>095</sup> HKLK	525.3507	318.8 636.5	2 1	20,2 % 2,6 %	100 %
410,7212	820,4352	2	-0,04	Y-28 or K-29 x K-29(K-30)	<sup>027</sup> WYKK	624.3504	368.3 735.4	2 1	5,5 % 7,8 %	100 %
468,2416	935,4767	2	-0,86	K-200 x S-201	<sup>199</sup> RKSAMF	739.3920	425.7 850.5	2 1	37,5 % 6,8 %	100 %
468,2419	935,4767	2	-0,35	K-200 x S-201	<sup>199</sup> RKSAMF	739.3920	425.3 850.4	2 1	5,6 % 1,5 %	100 %
474,2814	947,556	2	-0,49	?	<sup>123</sup> SIYKLLK	751.4713	431.5 862.6	2 1	12,2 % 5,2 %	34,6 %
474,2814	947,556	2	-0,49	?	<sup>123</sup> SIYKLLK	751.4713	431.8	2	2,1 %	95,2 %
476,2392	951,4717	2	-0,59	K-200 x S-201	<sup>199</sup> RKSAmF	755.3869	433.8 866.4	2 1	31,9 % 4,1 %	100 %
501,7573	1002,5077	2	-0,31	K-178 x K-182	<sup>177</sup> DKWVMK	806.4229	459.2 917.5	2 1	75,0 % 40,0 %	67,3 %
503,2534	1005,5000	2	-0,44	Y-104 x K-106	<sup>103</sup> IYDKDR	809.4152	460.9 920.5	2 1	11,0 % 1,3 %	6,3 %
509,7548	1018,5026	2	-0,26	K-178 x K-182	<sup>177</sup> DKWVmK	822.4178	467.3 933.1	2 1	28,2 % 5,2 %	79,5 %
538,3289	1075,6510	2	-0,26	?K-126 x K-128 o. K-129	<sup>123</sup> SIYKLKK	879.5662	495.9 990.2	2 1	100 % 0,8 %	18,8 %
559,2634	1117,5193	2	0,11	K-129 x S-132	<sup>129</sup> KABSVEVE	921.4346	516.4	2	1,6 %	38,4 %

Anhang

Tabelle-A 18 Fortsetzung

565,7972	1130,5873	2	-0,19	K-128 (o. K-129) x K-129 o. (S-132)	<sup>127</sup> LKKABSVE	934.5026	522.7 1045.4	2 1	15,5 % 0,6 %	21,2 %
605,3188	1209,6303	2	0,01	Y-28 or K-29 x K-29(K-30)	<sup>027</sup> WYKKFLE	1013.5455	562.9	2	14,2 %	84,9 %
642,3667	1283,7259	2	0,23	K-96 x K-98 (K-102)	<sup>095</sup> HKLKWTFK	1087.6411	600.1	2	100 %	51,0 %
679,8531	1358,6984	2	0,28	K-128 (o. K-129) x K-129 o. (S-132)	<sup>127</sup> LKKABSVEVE	1162.6136	637.5 1274.2	2 1	6,3 % 0,1 %	7,1 %
784,3991	1567,7904	2	0,54	? K-102 x K-106	<sup>099</sup> WTFKIYDKDR	1371.7056	742.1	2	100 %	28,5 %
810,8834	1620,7583	2	0,73	K-178 x K-182	<sup>177</sup> DKWVMKMLQMD	1424.6735	769	2	2,1 %	75,4 %
818,8804	1636,7532	2	0,2	K-178 x K-182	<sup>177</sup> DKWVMK <sub>m</sub> LQMD	1440.6684	777	2	0,9 %	25,5 %
826,8782	1652,7481	2	0,56	K-178 x K-182	<sup>177</sup> DKWV <sub>m</sub> KMLQ <sub>m</sub> D	1456.6633	784.5	2	2,1 %	39,5 %
904,4817	1807,9549	2	0,69	K-142 x T-145	<sup>139</sup> QQGKLLTPEEVVDR	1611.8701	862.7	2	56,9 %	28,1 %
946,914	1892,8193	2	0,71	S-37 x T-39	<sup>031</sup> FLEEBPSGTLFMHE	1696.7346	904.9 1807.7	2 1	7,8 % 0,8 %	8,8 %
1010,9615	2020,9143	2	0,68	K-30 o. S-37 x S-37 o. T-39	<sup>030</sup> KFLEEBPSGTLFMHE	1824.8295	968.6	2	100 %	63,0 %

## Anhang

**Tabelle-A 19 MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte GCAP-2-Peptide modifiziert mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz (1 mM CaCl<sub>2</sub>)**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	modifizierte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	identifizierte Dubletts <i>m/z</i>	relative Intensität der Dublett-Signale
838,451	838,446	1	6,5	K-29(K-30)	<sup>027</sup> WYKK	624,3504	709,3-735,3	44,0 % u. 39,6 %
969,493	969,482	1	11,5	K-200	<sup>199</sup> RKSAmF	755,3869	840,3-866,3	63,5 % u. 19,8 %
1023,529	1023,511	1	18,1	K-106	<sup>103</sup> IYDKDR	978,5189	894,3-920,3	100 % u. 61,5 %
1036,589	1036,583	1	5,9	K-98	<sup>097</sup> LKWTFK	822,4872	907,4-933,4	41,1 % u. 39,9 %
1585,812	1585,801	1	7,2	K-102 (o. K-106)	<sup>099</sup> WTFKIYDKDR	1371,7056	1456,7-1482,7	100 % u. 71,6 %
2026,081	2026,045	1	17,8	K-142	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	1897,0-1923,0	100 % u. 76,7 %

## Anhang

**Tabelle-A 20 MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte GCAP-2-Peptide modifiziert mit einem partiell hydrolysierten Harnstoff-Reagenz (10 mM EGTA)**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	<i>z</i>	$\Delta m$ (ppm)	modifizierte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	identifizierte Dubletts <i>m/z</i>	relative Intensität der Dublett-Signale
838,443	838,446	1	-3,5	K-29(K-30)	<sup>027</sup> WYKK	624,3504	709,2-735,2	100 % u. 92,2 %
965,568	965,567	1	0,9	K-126	<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	836,3-862,3	100 % u. 95,6 %
969,476	969,482	1	-6,2	K-200	<sup>199</sup> RKSA <sub>m</sub> F	755,3869	840,2-866,3	42,6 % u. 13,4 %
1023,520	1023,511	1	9,5	K-106	<sup>103</sup> IYDKDR	978,5189	894,3-920,3	100 % u. 59,6 %
1036,575	1036,583	1	-7,2	K-98	<sup>097</sup> LKWTFK	822,4872	907,3-933,3	65,1 % u. 66,8 %
1585,782	1585,801	1	-12,2	K-102 (o. K-106)	<sup>099</sup> WTFKIYDKDR	1371,7056	1456,6-1482,6	80,8 % u. 70,9 %
1825,955	1825,965	1	-6,0	K-142	<sup>139</sup> QQGKLLTPEEVVDR	1611,8701	1696,7-1722,8	100 % u. 86,1 %
2026,040	2026,045	1	-2,6	K-142	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	1896,9-1922,9	100 % u. 76,1 %

## Anhang

**Tabelle-A 21 MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> (1 mM CaCl<sub>2</sub>)**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	quervernetzte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	identifizierte Dubletts <i>m/z</i>	relative Intensität der Dublett-Signale
1182,648	1182,655	1	-6,1	K-200 x K-128	<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	684,7-710,7	72,7 % u. 11,8 %
					<sup>127</sup> LKK	388,2918	473,6- n.i.	100 % u. n.i.
1244,658	1244,646	1	10,3	K-200 x K-46	<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	683,8- n.i.	2,4 % u. n.i.
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,8-560,8	100 % u. 81,7 %
1269,723	1269,710	1	9,8	K-29 x K-46	<sup>027</sup> WYKK	624,3504	708,9- n.i.	2,4 % u. n.i.
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,9-560,9	100 % u. 97,1 %
1396,846	1396,831	1	10,7	K-126 x K-46	<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	n.i.	n.i.
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,9-560,9	100 % u. 82,2 %
1755,989	1755,964	1	14,2	K-106 x K-126	<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	893,8-919,7	91,8 % u. 100 %
					<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	835,8-861,7	3,3 % u. 2,3 %
1769,926	1769,886	1	22,8	K-50 x K-46	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1209,0- n.i.	2,5 % u. n.i.
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,7-560,6	100 % u. 83,8 %
2395,365	2395,319	1	19,0	K-142 x K-128	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	1896,6-1922,7	72,0 % u. 100 %
					<sup>127</sup> LKK	388,2918	472,7- n.i.	4,1 % u. n.i.

## Anhang

**Tabelle-A 22 MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> (10 mM EGTA)**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δ <i>m</i> (ppm)	quervernetzte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	identifizierte Dubletts <i>m/z</i>	relative, Intensität der Dublett-Signale
1170,717	1170,711	1	5,1	K-96 x K-46	<sup>095</sup> HKLK	525,3507	n.i.	n.i.
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,9-560,9	100 % u. 92,9 %
1181,665	1181,668	1	-2,1	K-30 x K-46	<sup>030</sup> KFLE	536,3079	n.i.	n.i.
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,7-560,7	100 % u. 95,5 %
1244,631	1244,646	1	-11,8	K-200 x K-46	<sup>200</sup> KSAmF	599,2858	683,7- n.i.	3,7 % u. n.i.
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,8-560,8	100 % u. 79,2 %
1269,698	1269,710	1	-9,8	K-29 x K-46	<sup>027</sup> WYKK	624,3504	708,8-734,8	2,2 % u. 1,3 %
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,8-560,8	100 % u. 93,5 %
1396,808	1396,831	1	-16,3	K-126 x K-46	<sup>123</sup> SIYKLK	751,4713	835,9-861,8	3,0 % u. 2,4 %
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,8-560,8	100 % u. 85,4 %
1529,841	1529,844	1	-1,4	K-106 x K-96	<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	893,7-919,7	88,4 % u. 100 %
					<sup>095</sup> HKLK	525,3507	609,8-635,7	7,6 % u. 5,9 %
1769,878	1769,886	1	-4,2	K-50 x K-46	<sup>048</sup> FFKVPDNEE	1124,5259	1208,8- n.i.	3,0 % u. n.i.
					<sup>045</sup> FKR	450,2823	534,7-560,6	100 % u. 93,4 %

## Anhang

**Tabelle-A 23 MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte intrapeptidale Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	<i>z</i>	Δ <i>m</i> (ppm)	quervernetzte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	[M + H – 85 u] <sup>+</sup>	relative Intensität des Signals ([M + H – 85 u] <sup>+</sup> )
951,490	951,472	1	18,9	K-200 x S-201	<sup>199</sup> RKSAmF	755,3869	866,4	71,7 %
1018,590	1018,572	1	17,1	K-98 x T-100 o. K-102	<sup>097</sup> LKWTFK	822,4872	933,5	97,4 %
1068,595	1068,599	1	-3,2	K-46 x K-50	<sup>045</sup> FKRFFK	872,5141	983,5	100 %
2008,052	2008,035	1	8,6	K-142 x T-145	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	1923,0	100 %

## Anhang

**Tabelle-A 24 MALDI-TOF/TOF-MS: Identifizierte intrapeptidale Quervernetzungsprodukte im GCAP-2 mit dem Harnstoff-Reagenz in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$**

<i>m/z</i> exp.	[M+H] <sup>+</sup> theor.	z	Δm (ppm)	quervernetzte AS im GCAP-2	Aminosäuresequenzen	[M+H] <sup>+</sup> theor. des Peptids	[M + H – 85 u] <sup>+</sup>	relative Intensität des Signals ([M + H – 85 u] <sup>+</sup> )
947,554	947,556	1	-2,4	?	<sup>123</sup> SIYKLLK	751,4713	862,3	67,9 %
951,468	951,472	1	-4,2	K-200 x S-201	<sup>199</sup> RKSAmF	755,3869	866,3	100 %
1005,494	1005,500	1	-5,7	Y-104 x K-106	<sup>103</sup> IYDKDR	809,4152	920,3	100 %
2008,013	2008,035	1	-11,0	K-142 x T-145	<sup>137</sup> AEQQGKLLTPEEVVDR	1811,9498	1922,9	100 %



### **Danksagung**

Für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die Möglichkeit, unter Ihrer Anleitung wissenschaftlich zu arbeiten und vor allem mich mit der wunderbaren Welt der Massenspektrometrie vertraut zu machen, danke ich von ganzem Herzen Frau Prof. Dr. Andrea Sinz. Ich möchte mich ganz besonders für Ihre stetige Diskussionsbereitschaft und das große Vertrauen bedanken und dafür, dass Sie immer und zu jeder Zeit ein offenes Ohr hatte.

Frau Prof. Dr. Birgit Dräger und Herrn Prof. Dr. Michael Linscheid danke ich recht herzlich für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Ein ganz besonderer Dank gilt ebenfalls allen früheren und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die die Zeit in- und außerhalb des Labors so angenehm gemacht haben. Christian I. danke ich für die Einführung in die Bedienung der HPLC- und Massenspektrometriesysteme, die stetige Hilfe bei der Methodenerstellung und seine ruhige Art bei der Beantwortung aller möglichen und unmöglichen Fragen. Danken möchte ich auch Mathias, Stefan K., Fabian und Jens für die Unterstützung bei meinen ersten Schritten in der Welt der Proteinanalytik und der Massenspektrometrie. Knut möchte ich ganz besonders für die ersten beiden gemeinsamen Bürojahre, die hilfreichen Gespräche, die CD-Messungen der GC-Peptide, einen nassen, aber sehr lustigen Festivalausflug und vor allem seine unglaubliche Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Ich danke Petra ganz herzlich für die Einführung in die Synthesewelt, die Unterstützung bei der Interpretation der NMR-Spektren, die interessante Zeit im AMA-Praktikum 2010 und die nette Atmosphäre im Syntheselabor. Mein besonderer Dank gilt diesbezüglich auch Christian W. für seine Geduld bei der Beantwortung synthetischer und analytischer Fragen, Hilfe bei Lösungsmittelknappheit und der schönen Zeit außerhalb der Uni. Sabine, Konny, Romy, Björn, Michael Z., Philip und Dirk danke ich für die schöne Zeit in und um das Labor. Christian A. danke ich auch für die Durchführung der Größenausschlusschromatographie der GCAP-2-Proben und Christine für ihre bereitwillige Hilfe bei „Formatierungsfragen“. Nicht zu vergessen ist Rico, der mir in den letzten Jahren die Zeit im Büro „versüßt“ hat. Ich danke ebenso Herrn Prof. Dr. Rüttinger, Frau Schilder, Frau Brandt, Frau Kniesa, Frau Nishnik, Frau Peters und Frau Mannd für ihre stetige Unterstützung und die wunderbare Zeit.

Michael G. danke ich für die exzellente Zusammenarbeit bei gemeinsamen Projekten, sowie für die Entwicklung der StavroX- und MeroX-Software. Für die Herstellung und großzügige Bereitstellung des nicht-markierten und <sup>15</sup>N-markierten GCAP-2 danke ich recht

## Danksagung

---

herzlich Thomas S. und Stefan T., Björn Olausson und Frau PD Dr. Iris Thondorf danke ich für die Erstellung der Modelle des GCAP-2/GC-Peptid-Komplexes und des GCAP-2-Homodimer-Komplexes. Für die AUC-Untersuchungen des GCAP-2 danke ich Herrn PD Dr. Hauke Lilie. Ich bedanke mich ebenso bei Dr. Olaf Jahn und Lars van Werven für die Synthese und Reinigung der Bpa-Peptide

Ein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Lewis Pannell, Jana, Lindsay, Franc und Jonathan für die unvergessliche Zeit am Mitchell Cancer Institute an der University of South Alabama in Mobile. Die Zeit verging leider viel zu schnell.

Ich danke natürlich auch allen hier nicht namentlich genannten Personen, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich vom ganzen Herzen bei all meinen Freunden, sowie meiner Familie für die riesige Unterstützung, die notwendige Ablenkung und die wunderbare Zeit abseits der Uni bedanken.

## Publikationen

### Originalarbeiten

**Pettelkau, J.**, Ihling, C., Frohberg, P., van Werven, L., Jahn, O., Sinz, A.: Reliable identification of cross-linked products in protein interaction studies by  $^{13}\text{C}$ -labeled *p*-benzoylphenylalanine. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* DOI **10.1007/s13361-014-0944-6** (2014)

Ihling, C.H., Schröder, T., **Pettelkau, J.**, Tischer, A., Lange, C., Sinz, A.: Accessibilities of N-terminal myristoyl chain and cysteines in guanylyl cyclase-activating protein-2 (GCAP-2) studied by covalent labeling and mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28**, 835-838 (2014)

**Pettelkau, J.**, Thondorf, I., Theisgen, S., Lilie, H., Schröder, T., Arlt, C., Ihling, C., Sinz, A.: Structural analysis of guanylyl cyclase-activating protein-2 (GCAP-2) homodimer by stable isotope-labeling, chemical cross-linking, and mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **24**, 1969-1979 (2013)

**Pettelkau, J.**, Schröder, T., Ihling, C.H., Olausson, B.E.S., Kölbl, K., Lange, C., Sinz, A.: Structural Insights into Retinal Guanylylcyclase-GCAP-2 Interaction Determined by Cross-Linking and Mass Spectrometry. *Biochemistry* **51**, 4932-4949 (2012)

Götze, M., **Pettelkau, J.**, Schaks, S., Bosse, K., Ihling, C., Krauth, F., Fritzsche, R., Kühn, U., Sinz, A.: StavroX—A software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **23**, 76-87 (2012)

Zur Veröffentlichung eingereicht:

Götze, M.\*, **Pettelkau, J.\***, Fritzsche R., Ihling, C.H., Schäfer, M, Sinz, A.: Automated Assignment of MS/MS Cleavable Cross-Links in Protein 3D-Structure Analysis. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*

\* Gemeinsame Erstautorschaft

### Vorträge

**Pettelkau, J.**, Schröder, T., Scheffler, K., van Werven, L., Frohberg, P., Jahn, O., and Sinz, A.: Incorporation of  $^{13}\text{C}$ -labeled *p*-Benzoylphenylalanine and Mass Spectrometry for Photo Cross-Linking of Protein/Peptide Complexes. *47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Frankfurt am Main, 02.-05. März, 2014*

**Pettelkau, J.**, Theisgen, S., Schröder, T., Lilie, H., Arlt, C., and Sinz, A.: Investigation of GCAP-2 dimerization by chemical cross-linking and ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Berlin-Adlershof, 10.-13. März, 2013*

**Pettelkau, J.,** Ihling, C. H., Schröder, T., Olausson, B. E. S., Lange, C., and Sinz, A.: Interaction Studies between Peptides derived from Photoreceptor Guanylyl Cyclase and GCAP-2. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft Braunschweig, 04.-07. Oktober, 2010*

#### Poster

**Pettelkau, J.,** Schröder, T., Ihling, C. H., Olausson, B. E. S., and Sinz, A.: Structural Insights into Retinal Guanylylcyclase / GCAP-2 Interaction by Cross-Linking and Mass Spectrometry, *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Greifswald, 11.-13. Oktober, 2012*

**Pettelkau, J.,** Schröder, T., Ihling, C. H., Olausson, B. E. S., and Sinz, A.: Structural Insights into Retinal Guanylylcyclase / GCAP-2 Interaction by Cross-Linking and Mass Spectrometry. *Joint Conference of German Mass Spectrometry Society and Polish Mass Spectrometry Society, Poznań, Polen, 4.-7. März, 2012*

**Pettelkau, J.,** Ihling, C. H., Schröder, T., Olausson, B. E. S., and Sinz, A.: Interaction Studies between GCAP-2 and ROS-GC Peptides by Chemical Cross-Linking and High-Resolution Mass Spectrometry. *44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Dortmund, 27. Februar–02. März, 2011*

**Pettelkau, J.,** Müller, M., Ihling, C. H., Schröder, T., Lange, C., and Sinz, A.: Interaction Studies between Peptides Derived from Photoreceptor Guanylyl Cyclase and its Activating Protein 2 (GCAP-2) by Chemical Cross-Linking, MALDI-TOF/TOF-MS, and ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Halle, 07.–10. März, 2010*

**Pettelkau, J.,** Müller, M., Ihling, C. H., Schröder, T., Lange, C., and Sinz, A.: Interaction studies between peptides derived from Photoceptor Guanylyl Cyclase and its Activating Protein 2 (GCAP-2) by chemical cross-linking and MALDI-TOF/TOF MS and ESI-LTQ-Orbitrap MS. *42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Konstanz, 08.–11. März, 2009*

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Geburtsdatum, -ort: 10.02.1984, Halle/Saale

Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung**

1990-1994            **Grundschule**  
Grundschule am Niedersachsenplatz, Halle/Saale

1994-2003          **Gymnasium**  
Gymnasium im Bildungszentrum, Halle/Saale

### **Zivil-/Wehrdienst**

10/2003-07/2004    **Zivildienst**  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale

### **Hochschulausbildung**

10/2004-10/2008    **Studium Pharmazie**  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale

10/2008-04/2009    **Diplom**  
Institut für Pharmazie, Abteilung für Pharm. Chemie und Bioanalytik (Prof. Dr. Andrea Sinz), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Thema der Diplomarbeit: „Untersuchung der Wechselwirkung zwischen GCAP-2 und den Peptiden der Guanylatcyclase mittels chemischer Quervernetzung und hochauflösender Massenspektrometrie“

05/2009-12/2009    **Pharmazie-Praktikum**  
Salza-Apotheke, Salzmünde

02/2010             **Approbation als Apotheker**

### **Promotion**

01/2010-05/2014    **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**  
Institut für Pharmazie, Abteilung für Pharm. Chemie und Bioanalytik (Prof. Dr. Andrea Sinz), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale

10/2011-12/2011    **Forschungsaufenthalt**  
USA Mitchell Cancer Institute (Prof. Dr. Lewis Pannell), University of South Alabama, Mobile, AL, USA

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen genutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, bei der Herstellung des Manuskripts, sowie bei der geistigen Herstellung der vorgelegten Arbeit waren keine anderen Personen beteiligt. Insbesondere wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die vorgelegte Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Halle (Saale), den

Jens Pettelkau