



**Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen  
der Guanylyl Cyclase A,  
dem Rezeptor für das atriale natriuretische Peptid,  
mittels Massenspektrometrie**

**Characterization of the phosphorylation sites  
of Guanylyl cyclase A,  
the receptor for atrial natriuretic peptide,  
by mass spectrometry application**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse: Biomedizin

vorgelegt von  
Juliane Börner

aus  
Gera

Würzburg, 2010

**Eingereicht am:**

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzender: Prof. Dr. med. Manfred Gessler**

**1. Betreuerin: Frau Prof. Dr. med. M. Kuhn**

**2. Betreuer: Herr Prof. Dr. med. T. Dandekar**

**3. Betreuer: Herr Prof. Dr. rer. nat. A. Sickmann**

**4. Betreuerin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Antje Gohla**

**Tag des Promotionskolloquiums:**

**Doktorurkunden ausgehändigt am:**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Funktionen des ANP/GC-A -Systems .....	1
1.1.1	Physiologische Funktionen .....	1
1.1.2	Mögliche klinische pathophysiologische Bedeutung eines Defekts des ANP/GC-A-Systems.....	3
1.2	Das atriale natriuretische Peptid und sein Guanylyl Cyclase A- Rezeptor .....	4
1.2.1	Synthese und Freisetzung des ANP .....	4
1.2.2	Der GC-A Rezeptor, seine Regulation und Aktivierung .....	6
1.2.3	Analyse der Phosphorylierungsstellen.....	10
1.2.4	Homologe und heterologe Desensibilisierung <i>in vitro</i> .....	12
1.2.5	Internalisierung und Degradation des GC-A-Rezeptors.....	15
1.3	Nutzung der Massenspektrometrie zur Identifizierung von Proteinen und ihrer posttranslationalen Modifikationen .....	16
1.3.1	Die Umkehrphasen-Chromatographie .....	17
1.3.2	Das Massenspektrometer.....	18
1.3.3	Tandem-MS und Hybrid-Systeme.....	20
1.3.4	Anreicherung von Phosphopeptiden mittels TiO <sub>2</sub> -Affinitäts- chromatographie.....	22
1.3.5	Datenauswertung und Spektreninterpretation .....	23
1.3.6	Labelfreie Quantifizierung mittels Multiple Reaction Monitoring .....	24
1.4	Motivation und Zielsetzung der Arbeit.....	26
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.1	Verwendete Materialien .....	27
2.1.1	Chemikalien.....	27
2.1.2	Verwendete Geräte.....	29
2.1.3	Zelllinien .....	30
2.1.4	Plasmide.....	31
2.2	Bakterientransformation und Plasmidisolation.....	31
2.2.1	Bakterientransformation.....	31
2.2.2	Plasmidisolation.....	32
2.3	Transfektion von HEK 293-Zellen.....	33
2.3.1	Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI) .....	33
2.3.2	Transfektion mittels FuGene® Transfektionsreagenz.....	34
2.4	Immunzytochemie.....	34

2.5	Inkubation von FLAG-GC-A exprimierenden HEK293 Zellen mit Peptiden zur Desensibilisierung .....	36
2.6	Membranpräparation aus Zellen.....	36
2.7	Immunpräzipitation .....	38
2.7.1	Immunpräzipitation des FLAG getaggen GC-A Rezeptors .....	38
2.7.2	Aufreinigung des polyklonalen GC-A-Antikörpers aus Kaninchenserum.....	38
2.7.3	Immunpräzipitation des GC-A Rezeptors .....	40
2.8	Western Blot-Analysen .....	41
2.8.1	Zielproteine und verwendete Antikörper .....	41
2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	42
2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	42
2.8.4	Immundetektion von Proteinen (Western Blot-Verfahren) .....	43
2.8.5	Auswertung der Western Blots mittels ImageJ .....	44
2.9	Detektion von Proteinen in SDS-Gelen.....	44
2.9.1	Silberfärbung .....	44
2.9.2	Kolloidale Coomassie-Färbung.....	45
2.10	Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie .....	45
2.10.1	Proteinfällung mittels Trichloressigsäure .....	45
2.10.2	Proteolytischer in-Gel Verdau mit Trypsin .....	45
2.10.3	TiO <sub>2</sub> -Affinitätschromatographie.....	47
2.10.4	Massenspektrometrische Analyse mittels ESI-MS.....	48
2.10.5	Nano-LC .....	49
2.10.6	MS/MS.....	49
2.10.7	Multiple Reaction Monitoring (MRM).....	50
2.10.8	Datenauswertung.....	51
2.11	Mutation der Aminosäure S487 .....	52
2.11.1	PCR-Mutagenese .....	52
2.11.2	DNA-Fällung mittels Chloroform/Isoamylalkohol.....	54
2.11.3	Verdau des PCR-Produktes und des pMCV5-FLAG-GC-A-Plasmids..	54
2.11.4	Ligation des mutierten DNA-Stückes mit dem Vektor .....	55
2.11.5	Kontrollverdau und Sequenzierung.....	55
2.12	Stimulierung der GC-A mit ANP .....	56
2.12.1	ANP-Stimulation an kultivierten Zellen.....	56
2.12.2	Zellmembranpräparation für Guanylyl Cyclase-Assay .....	56
2.12.3	Guanylyl Cyclase-Assay .....	57
2.12.4	cGMP-Radioimmunassay .....	58

2.13	Statistik .....	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
3.1	Der Einfluss des FLAG-Epitops auf die Rezeptoraktivität und dessen zelluläre Lokalisation .....	60
3.2	Die Immunpräzipitation des GC-A Rezeptors aus FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen.....	62
3.3	Die Analyse der Phosphorylierungsstellen der GC-A mittels Massenspektrometrie .....	66
3.4	Die Analysen zum Phosphorylierungsmuster des GC-A-Rezeptors nach homologer (ANP induziert) bzw. heterologer (Angiotensin II induziert) Desensibilisierung .....	75
3.5	Die Analyse der Phosphorylierungsstelle an Serin 487 .....	82
3.6	Die Bedeutung der Phosphorylierung von Serin 487 der GC-A nach homologer Desensibilisierung .....	85
3.7	Die Analyse der Phosphorylierungsstellen der GC-A in MA-10 Leydig- und MyEnd-Zellen.....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
4.1	Das FLAG-Epitop beeinflusst die Funktionalität der GC-A nicht und ermöglicht die Affinitätsaufreinigung.....	92
4.2	Mögliche Bedeutung der mittels MS zusätzlich zu dem GC-A-Rezeptor detektierten Proteine .....	94
4.3	Mittels MS konnten sieben Phosphorylierungsstellen in der KHD detektiert werden .....	96
4.4	Durch die Behandlung von FLAG-GC-A exprimierenden HEK-Zellen mit ANP bzw. Ang II entstanden unterschiedliche Phosphorylierungsmuster des GC-A-Rezeptors.....	100
4.5	Die Analyse der Phosphorylierung an Serin 487 ergab eine Bedeutung für die Deaktivierung des Rezeptors .....	103
4.6	Einige der Phosphorylierungen konnten in der endogen exprimierten GC-A aus MA-10 Leydig- und MyEnd-Zellen nachgewiesen werden	107
4.7	Ausblick .....	109
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>133</b>
8.1	m/z-Übergänge für MRM-Experimente .....	133

8.2	Spektren der detektierten Phosphorylierungsstellen in FLAG-GC-A exprimierenden HEK293-, MA-10 Leydig- und MyEnd-Zellen .....	135
8.3	Spectral Counting .....	136
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>137</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>139</b>

**I Abkürzungsverzeichnis**

Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure/n
AT1	Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
ERK 1/2	extrazellulär geregelte Kinasen 1 und 2
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ETD	Elektronentransfer-Dissoziation
GC-A	Guanylyl Cyklase A
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie, engl. <i>High Performance LC</i>
IAA	Iodacetamid
ID	Innerer Durchmesser
IMAC	engl. <i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i>
IP	Immunpräzipitation
KHD	Kinasehomologe Domäne
KO	Knock Out
LC	Flüssigkeitschromatographie, engl. <i>Liquid Chromatography</i>
MALDI	engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MH <sup>+</sup>	protoniertes Molekülion
MRM	engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MSA	mehrstufige Aktivierung
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
NPRC	natriuretischer Peptidrezeptor C, Clearance Rezeptor
[ <sup>32</sup> P]	radioaktives Phosphor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase

PMCA	Plasmamembran-Kalzium-ATPase
pSer, pS	phosphoryliertes Serin
pThr, pT	phosphoryliertes Threonin
pTyr, pY	phosphoryliertes Tyrosin
PTM	Posttranslationale Modifikationen
Q	Quadrupol
RP	Umkehrphase, engl. <i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
S487A	GC-A-Mutante mit Serin-gegen-Alaninaustausch an AS 487
S487E	GC-A-Mutante mit Serin-gegen-Glutamataustausch an AS 487
SC	engl. Spectral Counting
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. Sodium <i>Dodecyl Sulfate</i>
SIMAC	sequenzielle Elution von IMAC
WT	Wildtyp

## II Veröffentlichungen

**Schröter J**, Zahedi RP, Hartmann M, Gaßner B, Gazinski A, Waschke J, Sickmann A, Kuhn M. (2010) Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *FEBS J* 277, 2440-2453.

Klaiber M, Kruse M, Völker K, **Schröter J**, Feil R, Freichel M, Gerling A, Feil S, Dietrich A, Londoño JE, Baba HA, Abramowitz J, Birnbaumer L, Penninger JM, Pongs O, Kuhn M. (2010) Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic Res Cardiol.* 105, 583-95.

Hartmann M, Skryabin BV, Müller T, Gazinski A, **Schröter J**, Gassner B, Nikolaev VO, Bünemann M, Kuhn M. (2008) Alternative splicing of the guanylyl cyclase-A receptor modulates atrial natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem.* 283, 28313-20.

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktionen des ANP/GC-A -Systems

Mittels elektronenmikroskopische Analysen entdeckte Kisch 1956 Granula in den atrialen Zellen des Herzens, die als eine Art endokrine Drüsen mit einer Verbindung zur Niere beschrieben wurden<sup>1,2</sup>. 25 Jahre später demonstrierte de Bold, dass atriale Extrakte natriuretische Aktivität besitzen und kurz darauf gelang es ihm, das atriale natriuretische Peptid (ANP) zu isolieren<sup>3, 4</sup>. Anschließend folgte die Aufreinigung und Charakterisierung dieses Mitglieds der Familie der natriuretischen Peptidhormone durch verschiedene Gruppen<sup>5-9</sup>. ANP ist ein Ligand der Guanylyl Cyklase A (GC-A), auch bekannt als natriuretischer Peptidrezeptor A (NPRA), und aktiviert dessen Cyklaseaktivität zur Bildung des sekundären Botenstoffs cGMP. Außerdem bindet ANP an den natriuretischen Peptidrezeptor C (NPRC), der auch als Clearance Rezeptor bezeichnet wird<sup>10, 11</sup>.

Im Folgenden werden das atriale natriuretische Peptid, sein Rezeptor, dessen Funktion und der mögliche Aktivierungs- und Deaktivierungsmechanismus näher erläutert.

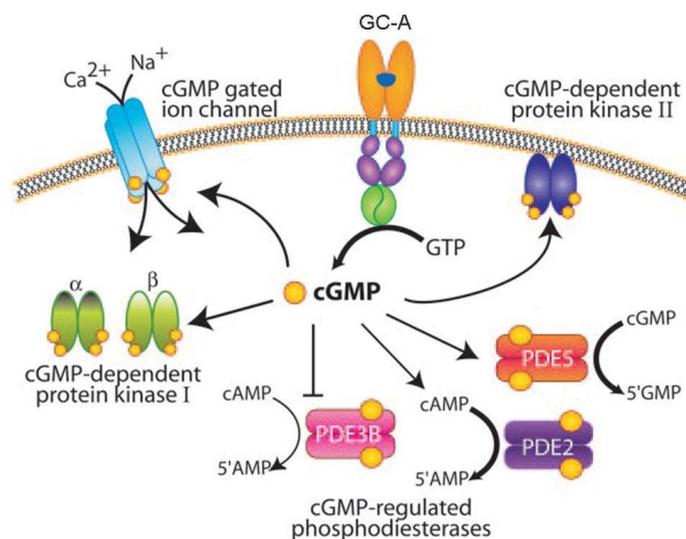
### 1.1.1 Physiologische Funktionen

Das Hormon ANP mit seinem GC-A-Rezeptor hat natriuretische, diuretische und vasorelaxierende Effekte, um den Blutdruck und das Plasmavolumen zu regulieren. Die physiologischen Effekte werden durch die Synthese des intrazellulären sekundären Botenstoffs zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ausgelöst, der 1963 im Urin von Ratten identifiziert wurde<sup>12</sup>. Es gibt drei bekannte cGMP-bindende Proteinfamilien: die cGMP-abhängige Proteinkinase PKG, die cGMP-bindenden Phosphodiesterasen (PDEs) und die zyklische-nukleotid-regulierten (CNG, engl. Cyclic Nucleotide-Gated) Ionenkanäle (Abbildung 1). Die am meisten untersuchten cGMP-abhängigen Effekte werden durch PKGs vermittelt, bei denen es sich um Serin- und Threoninkinasen handelt, die durch Bindung von cGMP aktiviert werden<sup>13, 14</sup>. PKG I ist überwiegend zytosolisch lokalisiert und wird unter anderem in Thrombozyten, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten und in spezifischen Regionen des Nervensystems, zum Beispiel dem Hippocampus und in Purkinje-Zellen des Kleinhirns, exprimiert. PKG II ist an der Membran lokalisiert und

kommt in hohen Konzentrationen in der Darmschleimhaut, in renalen Zellen, in verschiedenen Zellkernen des Gehirns und Chondrozyten vor <sup>15</sup>.

PDEs sind äußerst wichtige Regulatoren der Effekte der zyklischen Nucleotide cAMP und cGMP, da sie diese degradieren und dadurch die Konzentrationen dieser intrazellulären sekundären Botenstoffe regulieren. Es gibt elf verschiedene PDE-Familien, die in Säugetieren mindestens 25 verschiedene Proteine beinhalten <sup>16, 17</sup>. Die PDEs 2, 3 und 5 werden allosterisch durch cGMP reguliert. Zusätzlich kann die allosterische Aktivierung einen Crosstalk zwischen cGMP- und cAMP-Signalwegen ermöglichen.

cGMP vermittelt weiterhin zelluläre Antworten durch die Regulation von CNG-Ionenkanälen, einer Familie von nicht selektiven Kationen-Kanälen, die c-terminal cAMP oder cGMP binden <sup>18</sup>. Diese Kanäle sind in chemosensorischen Zellen, im Gehirn und in Epithelzellen der Luftwege und Nieren vorhanden.



**Abbildung 1: Die Effektoren von cGMP** <sup>19</sup>

Der sekundäre Botenstoff cGMP vermittelt seine Effekte durch Bindung an drei bekannte Proteinklassen: CNG-Ionenkanäle, cGMP-abhängige Proteinkinasen und Phosphodiesterasen.

Die GC-A wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und vermittelt eine Vielzahl von zentralen und peripheren ANP-Effekten. ANP wirkt direkt und indirekt auf die Niere, was zur Veränderung der renalen Hämodynamik und letztlich zum Anstieg der Natriurese und Diurese führt. Dabei erhöht ANP die glomeruläre Filtrationsrate und inhibiert die Salz- und Wasserreabsorption <sup>20-22</sup>. Weiterhin antagonisiert es das Renin-Angiotensin II-Aldosteron-System durch Inhibierung der Synthese und Freisetzung von Renin und Aldosteron <sup>23</sup>. Außerdem wirkt es allen bekannten Effekten von Angiotensin II entgegen und

bewirkt eine Vasodilatation, wobei für diesen Signalweg PKG I benötigt wird<sup>15</sup>. Des Weiteren verschiebt ANP Flüssigkeit aus dem intravaskulären Raum in interstitielle Kompartimente durch Steigerung der endothelialen Permeabilität für Albumin, wodurch eine Änderung des onkotischen Gradienten resultiert<sup>24</sup> und bewirkt einen erhöhten Flüssigkeitsefflux von dem intravaskulären in das lymphatische System in der Milz<sup>25</sup>. Außerdem zeigt es Effekte im Zentralnervensystem, die den Salzappetit und das Durstgefühl senken. Zusammenfassend wird durch diese Effekte der Blutdruck und das Plasmavolumen reguliert<sup>9, 26, 27</sup>. Mäuse, bei denen die GC-A global deletiert ist, sind hypertensiv und zeigen ein chronisch um etwa 30% erhöhtes Plasmavolumen<sup>28</sup>. Dies belegt die enorme Bedeutung dieses Hormon-Rezeptorsystems für die Regulation des arteriellen Blutdrucks und Blutvolumens.

Bei chronisch hämodynamischer Belastung ist die kardiale Expression von ANP signifikant erhöht<sup>29</sup>. ANP wirkt in solchen Situationen nicht nur als zirkulierender endokriner, sondern auch als lokal wirkender antihypertropher Faktor<sup>30</sup>. Eine Deletion der GC-A in ventrikulären Kardiomyozyten bewirkt eine leichte Hypertrophie der Kardiomyozyten und eine Erhöhung von bekannten Hypertrophie-Markergenen. Bei Druckbelastung bzw. Angiotensin II-Behandlung zeigen diese Mäuse eine verstärkte kardiale Hypertrophie und Fibrose<sup>31, 32</sup>. So zeigt ANP auch eine lokale parakrine Rolle in der Regulation des (patho)physiologischen Wachstums von Myozyten<sup>27, 33</sup>. Zusätzlich scheint die GC-A auch in weitere wichtige physiologische Prozesse involviert zu sein, wie dem der Angiogenese<sup>34, 35</sup>, der Leberregeneration<sup>36</sup> oder auch der Lipolyse und Lipid-Mobilisation im Fettgewebe<sup>37</sup>.

### **1.1.2 Mögliche klinische pathophysiologische Bedeutung eines Defekts des ANP/GC-A-Systems**

Die physiologische Bedeutung des ANP-GC-A-Systems zur Blutdruck-Regulation wurde unter anderem durch genetische Analysen gezeigt<sup>38</sup>. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in den Genen von ANP oder dem B-Typ natriuretischen Peptid (BNP) führen zu Veränderungen der Plasmaspiegel dieser Hormone und diese Veränderungen wiederum korrelieren negativ mit dem arteriellen Blutdruck, wodurch eine Hypertonie entsteht. Aber auch zur pathophysiologischen Bedeutung bei Erkrankungen wie der kongestiven Herzinsuffizienz, der kardialen Hypertrophie und bei einigen Formen des

Bluthochdrucks gibt es viele Hinweise. Menschen, die verschiedene Varianten des GC-A-Gens tragen, welche durch die quantitative Veränderung der Genexpression durch Polymorphismen in nicht kodierenden Sequenzen des GC-A-Gens hervorgerufen werden, und geringere Mengen GC-A exprimieren, sind genetisch anfälliger für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzhypertrophie und Bluthochdruck<sup>27, 33</sup>. Auch eine unzureichende ANP-Sekretion oder funktionelle Veränderungen dieses Peptides können in Herzerkrankungen involviert sein<sup>27</sup>.

Weiterhin ist schon sehr lange bekannt, dass bei Patienten mit einer Herzhypertrophie und kongestiver Herzinsuffizienz die kardiale Expression und die Plasmaspiegel der beiden kardialen Hormone ANP und BNP stark erhöht sind, wobei die Level mit der Schwere der Erkrankung korrelieren<sup>39</sup>. Die physiologischen ANP-Effekte sind jedoch stark abgeschwächt, was für eine Desensitisierung des Rezeptors oder einen Rezeptor- bzw. Postrezeptordefekt sprechen kann. Die reduzierte biologische Antwort auf ANP kann auch teilweise auf eine erhöhte Expression des C-Typ-Rezeptors für natriuretische Peptide (NPR-C-Rezeptor, Clearance-Rezeptor) zurückgeführt werden, da der Rezeptor ANP bindet und mit diesem internalisiert, was zu einer erhöhten Degradation von ANP führt<sup>40</sup>. Der Mechanismus, der in Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz zu einer reduzierten ANP-abhängigen Stimulation der GC-A führt, ist nicht geklärt.

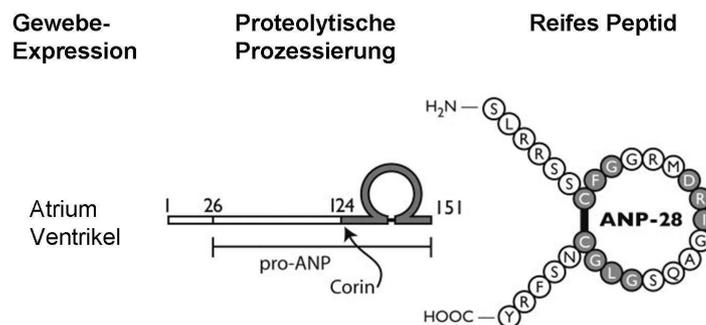
Das Verständnis der in die Aktivierung und vor allem die Deaktivierung involvierten Prozesse ist daher von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wird in den nächsten Punkten auf den Rezeptoraufbau und dessen Aktivierung sowie die Mechanismen der homologen und heterologen Desensitisierung eingegangen.

## **1.2 Das atriale natriuretische Peptid und sein Guanylyl Cyclase A-Rezeptor**

### **1.2.1 Synthese und Freisetzung des ANP**

Das Gen, welches für die Vorläuferform des humanen ANP kodiert, befindet sich mit drei Exons auf Chromosom 1<sup>41</sup>. Die Translation ergibt das 151 Aminosäuren lange Prä-Pro-ANP (Abbildung 2). Durch Abspalten der N-terminalen Signalsequenz entsteht das aus 126 Aminosäuren bestehende Pro-ANP, welches in atrialen Granula des Herzens gespeichert wird<sup>42</sup>. Nach der

Sekretion von Pro-ANP wird dieses im Herzen sofort durch die transmembranäre Serinprotease Corin gespalten<sup>43</sup>. Jetzt entstehen das biologisch aktive, ringförmige ANP<sub>99-126</sub> (28 Aminosäuren) und Pro-ANP<sub>1-99</sub><sup>44</sup>. Die Ringform des ANP<sub>99-126</sub> entsteht durch eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 105 und Cystein 121<sup>45</sup>.



**Abbildung 2: Expression, Prozessierung und Struktur von ANP<sup>19</sup>**

ANP wird in den angegebenen Geweben als Prä-Pro-Hormon synthetisiert. Nach Abspalten der Signalsequenz entsteht das Pro-Hormon, welches durch die Serinprotease Corin nochmals gespalten wird. Dieses reife und biologisch aktive Peptid (ANP<sub>99-126</sub>) kennzeichnet sich durch seine Ringstruktur aus 17 Aminosäuren, die für die Rezeptorerkennung notwendig ist. Die Disulfidbrücke ist schwarz dargestellt.

Eine Wanddehnung der atrialen Myozyten, hervorgerufen durch ein erhöhtes intravaskuläres bzw. intrakardiales Volumen, stellt den primären Stimulus für die ANP-Sekretion dar<sup>46, 47</sup>. ANP verlässt das Herz über die Blutbahn des Sinus coronarius, was die endokrine Verteilung des Peptids zu seinen Zielorganen ermöglicht. Die Produktion und Sekretion wird auch durch eine komplexe Interaktion von Neurohormonen und Immunsystem reguliert<sup>48</sup>. Hormone wie Endothelin, Angiotensin II und das antidiuretische Hormon (ADH) stimulieren ebenfalls die Sekretion von ANP<sup>49-54</sup>. Durch eine Hypoxie und wahrscheinlich auch durch eine erhöhte Herzfrequenz, einen erhöhten Sympathiko-Tonus, durch metabolische Faktoren sowie durch Hyperosmolarität des Plasmas wird die Sekretion von ANP erhöht<sup>55-59</sup>.

Die Halbwertszeit von ANP beträgt zwei bis drei Minuten. Der Plasmaspiegel beträgt bei gesunden Menschen etwa 10 fmol/mL und kann bei Herzerkrankungen 10- bis 30-fach erhöht sein<sup>60, 61</sup>.

Die Inaktivierung von ANP kann entweder enzymatisch durch die Neutrale Endopeptidase (NEP) oder durch eine lysosomale Degradation nach Binden an den NPR-C und zelluläre Internalisierung erfolgen<sup>40</sup>.

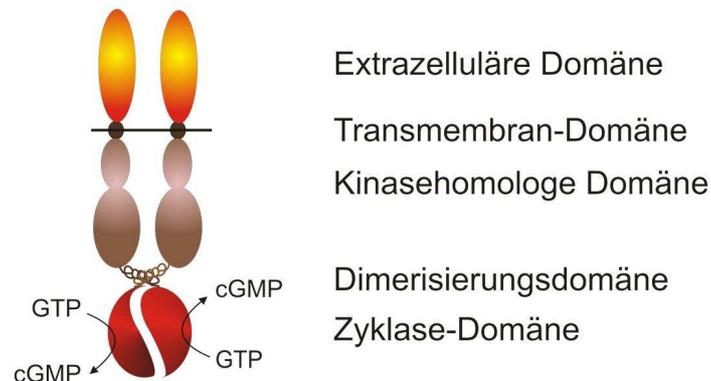
### 1.2.2 Der GC-A Rezeptor, seine Regulation und Aktivierung

Der GC-A-Rezeptor ist das erste entdeckte Mitglied der Familie von partikulären Guanylyl Cyclasen. Diese Familie besteht im Säugetier aus sieben homologen Proteinen. GC-A ist der Rezeptor für die kardialen Hormone ANP und BNP, bindet ANP aber mit höherer Affinität. GC-B ist der Rezeptor für das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) und spielt eine wichtige Rolle in der Knochenbildung und -reifung. GC-C wird im Darmepithel exprimiert und ist verantwortlich für einen erhöhten Wasser- und Elektrolyttransport und das epitheliale Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. GC-D, GC-E und GC-F sind sensorische Rezeptoren im olfaktorischen System und in der Retina. Bei diesen Rezeptoren sind bisher keine spezifischen Liganden bekannt, weshalb sie als Orphan-Rezeptoren bezeichnet werden. GC-G wird ubiquitär exprimiert und die physiologische Bedeutung ist unklar. GC-D und GC-G wurden nur in Nagern gefunden<sup>27</sup>.

Das humane Gen für den Guanylyl Cyclase A-Rezeptor ist auf dem ersten Chromosom lokalisiert, besteht aus 22 Exons und 21 Introns und ist 17,5 kb groß<sup>62</sup>. Die Expression des Rezeptors wird neben Sp 1 oder Sp 1-ähnlichen Transkriptionsfaktoren<sup>63</sup> auch von seinem Liganden ANP reguliert, wobei in kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta der GC-A mRNA-Gehalt durch ANP zeit- und konzentrationsabhängig unterdrückt wird<sup>64</sup>. Experimente mit einem membranpermeablen cGMP-Analogen deuten weiterhin daraufhin, dass die Genaktivität durch den sekundären Botenstoff cGMP moduliert wird<sup>64, 65</sup>. GC-A mRNA wird hauptsächlich im Herz, in der Niere, der Nebenniere, in Blutgefäßen, im zentralen und peripheren Nervensystem, in der Milz und im Fettgewebe, in geringeren Mengen auch im Darm und in der Plazenta exprimiert<sup>27, 66</sup>. Die GC-A besitzt ein N-terminales Signalpeptid, das vom reifen Protein abgespalten wird<sup>67</sup>.

Das Protein besteht aus 1061 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 130 kDa. Der Rezeptor beinhaltet eine ca. 450 Aminosäuren (AS) große, extrazelluläre Domäne am N-Terminus, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist, eine kurze hydrophobe Transmembran-Domäne (21 AS) und eine intrazelluläre Domäne. Diese besteht aus einer Kinasehomologen Domäne mit ca. 250 AS, einer 41 AS langen amphipathischen Dimerisierungsdomäne und einer C-terminalen katalytischen Zyklase-Domäne, die nochmals aus ca. 250 AS besteht und den sekundären Botenstoff cGMP synthetisiert (Abbildung 3). Die GC-A liegt im basalen Zustand als Homodimer oder Homotetramer vor,

wobei die Bindung des Liganden den Status der Rezeptor-Oligomerisierung nicht ändert<sup>68-71</sup>.



**Abbildung 3: Struktur des GC-A Rezeptors**

Der Rezeptor ist aus einer N-terminalen, ligandenbindenden extrazellulären Domäne (ca. 450 AS), einer kurzen hydrophoben Transmembran-Domäne (21 AS), einer Kinasehomologen Domäne (ca. 250 AS), einer amphipathischen Dimerisierungsdomäne (41 AS) und einer katalytischen c-terminal gelegenen Zyklase-Domäne (ca. 250 AS) aufgebaut. Er formt Homodimere oder Homotetramere.

In der extrazellulären Domäne (EZD) wurden als posttranslationale Modifikationen Glykosylierungen und Disulfidbrücken gefunden. Die drei intramolekularen Disulfidbrücken (Cys60 – Cys86, Cys164 – Cys215, Cys423 – Cys432) sind wichtig für die Rezeptoraktivierung und –oligomerisierung<sup>69, 72, 73</sup>. Intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Rezeptordimeren sind hingegen nicht vorhanden. Bei den Glykosylierungen handelt es sich ausschließlich um N-Glykane, deren Lokalisation und Struktur durch die Studien von Miyagi et al. determiniert wurden<sup>74</sup>. Die Glykosylierungen sind in den GC-A-Rezeptoren verschiedener Spezies konserviert und möglicherweise Voraussetzung für die richtige Faltung eines neu synthetisierten Rezeptor-Polypeptids, den Transport an die Zellmembran und die Stabilität des gefalteten Proteins<sup>74</sup>. Die Glykosylierungen liegen nicht in der putativen ANP-Bindungsstelle und werden demnach nicht für die Ligandenbindung benötigt<sup>75</sup>.

Weiterhin zeigt die Kristallstruktur, dass die ligandenbindende Domäne aus zwei Subdomänen besteht, die je aus einem zentralen parallelen  $\beta$ -Faltblatt mit flankierenden  $\alpha$ -Helices aufgebaut sind. Es wurden verschiedene Aminosäuren identifiziert, die für die Ligandenbindung, die Hormonspezifität und die Chloridion-Bindung wichtig sind<sup>75</sup>.

Die Transmembran-Domäne besteht aus einer einzelnen hydrophoben  $\alpha$ -Helix, die für die Membranlokalisation wichtig ist<sup>76</sup>.

Der Transmembran-Domäne schließt sich eine 25 AS lange Region an, die auch als Juxtamembran-Domäne bezeichnet wird. Die Funktion dieser Region ist noch unbekannt, aber sie enthält eine Konsensussequenz, die für das Anlagern von G-Proteinen wichtig sein könnte<sup>77</sup>.

Die Kinasehomologe Domäne (KHD) ist mit Protein-Tyrosin-Kinasen näher verwandt als mit Protein-Serin/Threonin-Kinasen. Sie zeigt eine 31%ige Homologie zur Kinase-Domäne des PDGF-Rezeptors aus Plättchen, einer Protein-Tyrosin-Kinase. Allerdings wurde für den GC-A-Rezeptor bislang keine Kinaseaktivität gezeigt<sup>78, 79</sup>. Im basalen Zustand liegt der Rezeptor innerhalb der KHD hoch phosphoryliert vor<sup>78</sup>. Auf diese Phosphorylierungen und deren Bedeutung wird später noch genauer eingegangen. Die KHD unterdrückt die Aktivität der Zykase Domäne im basalen Zustand. Wird die KHD durch Mutagenese entfernt, ergibt dies einen konstitutiv aktiven Rezeptor<sup>11, 80-82</sup>.

Die Dimerisierungsdomäne ermöglicht die Dimerisierung des Rezeptors, was generell für die Cyclase-Aktivität der Zykase-Domäne essentiell ist. Die primäre Struktur der Dimerisierungsdomäne ist eine Coiled-Coil-Konfiguration, die spezifische Proteininteraktionen begünstigt<sup>83, 84</sup>.

Die Struktur der Zykase-Domäne ist bei der löslichen GC, dem Rezeptor für Stickstoffmonoxid, und membrangebundenen GC stark konserviert und eng mit der katalytischen Domäne der Adenylatzyklasen verwandt<sup>85</sup>. In der aktiven Stelle der Guanylyl Cyklasen sind drei invariante AS (Glu, Cys, Arg) vorhanden, die spezifisch mit dem Purinring des Substrates GTP durch Wasserstoffbrücken interagieren<sup>86, 87</sup>. Durch die ausschließliche Umsetzung von GTP entstehen zyklisches GMP und Pyrophosphat. Homodimere Zykasen wie der GC-A-Rezeptor können im Gegensatz zu heterodimeren Zykasen, wie der Adenylatzyklase und der löslichen GC, zwei Substratbindungsstellen in einem Spalt ausbilden und daher zwei Substratmoleküle pro Dimer binden und umsetzen<sup>88, 89</sup>.

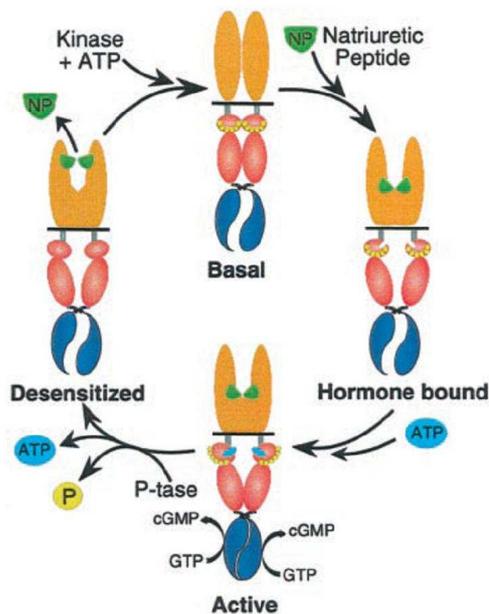
Wie auch bei anderen Rezeptoren führt die Bindung von ANP an seinen Rezeptor zu einer zeitabhängigen Veränderung der Affinität, was in Studien mit GC-A stabil exprimierenden HEK 293-Zellen gezeigt wurde. Im Gleichgewicht liegen 70% der GC-A-Rezeptoren in einem niedrig affinen Zustand ( $K_d = 2,5$  nM) vor, während 30% in einem höher affinen Zustand ( $K_d = 0,3$  nM) verbleiben. Wahrscheinlich wird diese Veränderung durch die KHD vermittelt<sup>81</sup>. Die Verschiebung von hoher zu niedriger Affinität ist ligandenabhängig<sup>90</sup>.

Weiterhin zeigen Studien von Antos et al., dass im Gegensatz zu früheren Annahmen die Zugabe von ATP keinen Effekt auf die anfängliche Aktivierung

hat. Bei längeren Inkubationszeiten erhöht ATP die hormonabhängige Aktivität durch Mechanismen, die Enzymstabilisierung, aber keine Aktivierung involvieren. ATP ist also kein allosterischer Kofaktor der GC-A, sondern hat den primären Effekt, die Phosphorylierungen des Rezeptors zu bewahren und die Enzymaktivität zu stabilisieren. Diese Daten unterstützen ein neues Ein-Stufen-Modell der Rezeptoraktivierung<sup>91</sup>.

Mittels Elektronenmikroskopie, Fluoreszenzspektroskopie und Röntgenstrahlen-Kristallographie gelang es Misono und Kollegen in den Jahren 2000 bis 2009, einen möglichen Mechanismus der transmembranären Signaltransduktion zu beschreiben<sup>75, 92-94</sup>. Die EZDs eines Rezeptordimers zeigen im kristallographischen Modell intermolekulare Kontakte, wodurch entweder ein Kopf-zu-Kopf- oder Schwanz-zu-Schwanz-Dimermodell entsteht. Dabei stellt nur das Kopf-zu-Kopf-Modell die native Struktur der extrazellulären Domänen mit und ohne gebundenes ANP dar. Die Bindung von ANP resultiert in einer großen Veränderung der Quartärstruktur des EZD-Dimers ohne dabei die intramolekulare Struktur merklich zu ändern. Es kommt zu einer Drehbewegung, wobei sich die membrandistalen Regionen der beiden EZDs teilweise öffnen und die zur Membran proximal liegenden Regionen um das gebundene ANP schließen. Die Regionen der beiden EZDs nahe der Membran werden durch diese Drehbewegung einer parallelen Translokation um etwa 10 Å in entgegengesetzte Richtung unterzogen, wobei sich aber der Abstand zwischen beiden Domänen nicht ändert. Diese ANP-induzierte Verschiebung verändert die relative Orientierung der membran-nahen Regionen und vermittelt möglicherweise die transmembranäre Signaltransduktion.

Der inhibitorische Effekt der KHD wird durch die Signalübermittlung aufgehoben, die Zykklase-Domänen können durch Zusammenlagerung ein aktives Zentrum formen und cGMP bilden. Die Konformationsänderung in der KHD bewirkt möglicherweise eine Freilegung der phosphorylierten AS, so dass diese entweder von einer konstitutiv aktiven oder auch von einer cGMP-aktivierten Proteinphosphatase dephosphoryliert werden können. Der daraus resultierende dephosphorylierte Rezeptor ist unempfindlich für eine weitere hormonale Stimulierung (Abbildung 4)<sup>68</sup>.



**Abbildung 4: Hypothetisches Modell der Aktivierung des GC-A-Rezeptors** <sup>68</sup>

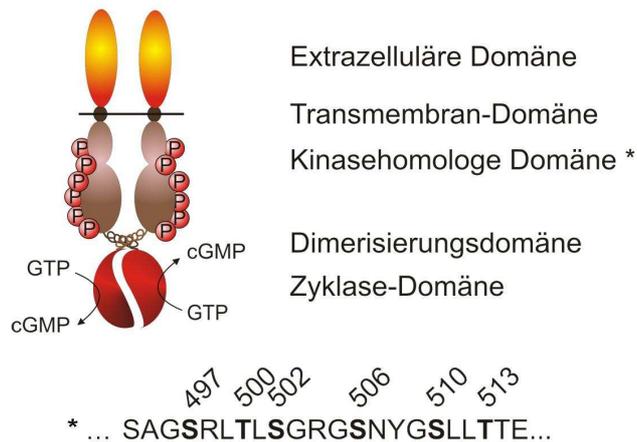
Ohne ANP liegt der Rezeptor als Homodimer oder Homotetramer vor, ist phosphoryliert und seine Zyklaseaktivität ist unterdrückt. Die Bindung des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne, wodurch das Signal über die Membran zu den intrazellulären Domänen geleitet wird. Durch die daraus resultierende Zusammenlagerung der Zyklase-Domänen kann das aktive Zentrum gebildet und cGMP produziert werden. ATP dient dazu, die Phosphorylierungen zu bewahren und den Rezeptor zu stabilisieren, trägt aber nicht zur eigentlichen Aktivierung bei. Durch die Konformationsänderung in der KHD werden die phosphorylierten AS möglicherweise leichter zugänglich für Proteinphosphatasen. Der dephosphorylierte Rezeptor ist für eine weitere hormonale Stimulation nicht empfänglich.

### 1.2.3 Analyse der Phosphorylierungsstellen

Eine phosphorylierungsabhängige Regulation einer Guanylyl Cyclase wurde zuerst im Spermia von Seeigeln gezeigt <sup>95-98</sup>. Der Rezeptor ist im basalen Zustand hoch phosphoryliert und die Bindung des Peptidhormons Resact resultiert in einer starken Aktivierung des Rezeptors, gefolgt von einer raschen Desensibilisierung. Dabei ist zu beobachten, dass die Deaktivierung mit einer massiven Rezeptordephosphorylierung einhergeht, die durch Phosphatasebehandlung nachgeahmt werden kann <sup>97</sup>.

Die zuvor publizierten Studien zur Identifizierung der phosphorylierten AS in der Guanylyl Cyclase A wurden von Potter und Kollegen 1998 durchgeführt. Um die eventuell vorhandenen Phosphorylierungen sichtbar zu machen, wurden die Zellen metabolisch mit [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat markiert <sup>78</sup>. Durch Deletionskonstrukte und chimäre Konstrukte aus GC-A und dem Guanylyl Cyclase B (GC-B)-Rezeptor, der hohe Homologie zur GC-A aufweist, wurde ein 132 AS umfassender Bereich am Anfang der intrazellulären Domäne identifiziert, der die Phosphorylierungen enthalten soll. Durch die zweidimensionale Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide und durch die Phosphoaminosäure-Analyse der wichtigsten Peptide postulierten Potter et al. 1998, dass die GC-A nur phosphorylierte Serine (pSer) und Threonine (pThr), aber keine Tyrosine enthält und ein Großteil der untersuchten tryptischen Peptide pSer und pThr zusammen beinhalten. Durch Mutationsexperimente, in denen alle eventuell phosphorylierten Serine und Threonine in dem 132 AS-Bereich zu Alanin mutiert wurden, wurde der jeweils unphosphorylierte Status

initiiert. Anschließend wurden Aktivitätsuntersuchungen der mutierten GC-A durchgeführt und angenommen, dass die AS Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510 und Thr513 phosphoryliert sind, da es bei der Mutation dieser AS zu einem Aktivitätsverlust kam. Potter und Kollegen schlussfolgerten daraus, dass die Phosphorylierungen an diesen AS essentiell für die maximale ANP-abhängige Rezeptoraktivierung sind <sup>11, 99, 100</sup>.



**Abbildung 5: Die Phosphorylierungsstellen der GC-A**

Durch Deletions- und chimäre Konstrukte und anschließender Mutationen von Serinen bzw. Threoninen zu Alaninen in der 132 AS großen Region innerhalb der N-terminalen Region der KHD wurden die phosphorylierten AS (Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510 und Thr513) postuliert <sup>78</sup>.

Bei diesen Ergebnissen ist zu beachten, dass alle Experimente in HEK 293-Zellen durchgeführt wurden, die die GC-A überexprimierten. Starke Überexpression eines Proteins könnte aber zu Modifikationen dieses Proteins führen, die endogen nicht auftreten, oder das überexprimierte Protein wird in Einschlusskörpern im Cytosol gespeichert und nicht an die Membran transportiert. Wenn bei Versuchen die Zellen nicht vorfraktioniert werden, um die im Cytosol abgelegten Membranproteine zu entfernen, werden diese mit analysiert und können zu falschen Ergebnissen führen, da Proteine in Einschlusskörpern meist nicht richtig gefaltet und modifiziert sind.

Außerdem kann die Behandlung von Zellen mit [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat zu einem Arrest des Zellzyklusses, zu Apoptose von proliferierenden Zellen, zur p53-abhängigen Inhibierung der DNA-Synthese und einem Anstieg des zellulären Gehalts von p53 führen <sup>101, 102</sup>. Die Zellen werden starkem Stress ausgesetzt, wodurch ebenfalls die posttranslationalen Modifikationen gestört werden könnten. Zudem können Phosphorylierungen, die nicht in allen Molekülen auftreten, neben den stark abundanten Phosphorylierungen, die im

Autoradiogramm durch die starke Intensität leicht zu erkennen sind, schnell übersehen werden.

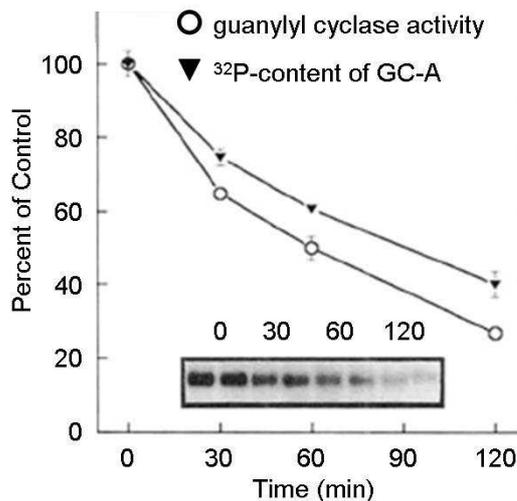
Für die Versuche zu den Phosphopeptid-Karten und der Phosphoaminosäure-Analyse wurde die GC-A mittels Immunpräzipitation (IP) aus markierten Zellen isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die Bande, die der GC-A entsprechen soll, wurde ausgeschnitten und entweder für die Phosphoaminosäure-Analyse in HCl hydrolysiert oder für die Phosphopeptid-Karten mit Trypsin verdaut. Dabei wurde nicht beachtet, dass bei einer IP mit einem polyklonalen Antiserum auch unspezifische Proteine angereichert werden können. Durch die anschließende elektrophoretische Auftrennung des Eluats können durchaus Proteine auf Höhe der GC-A komigrieren, die mit ausgeschnitten, somit auch mit analysiert werden und eventuell zu falschen Ergebnissen führen. Aus diesem Grund sollten diese Analysen kritisch betrachtet werden.

Eine Frage, die mit diesen Experimenten ebenfalls nicht beantwortet werden kann, ist, ob der endogene Rezeptor Phosphorylierungen an denselben, anderen oder zusätzlichen AS besitzt. Bei der oben erwähnten Guanylyl Cyclase aus Seeigel-Sperma konnten mittels Massenspektrometrie 14 phosphorylierte AS detektiert werden, wobei dies nur die Hälfte der erwarteten Phosphorylierungsstellen war<sup>103</sup>.

#### **1.2.4 Homologe und heterologe Desensibilisierung *in vitro***

Die hormonabhängige GC-A-Aktivität, welche an der cGMP-Synthese gemessen wird, wird durch chronisches Einwirken des Liganden reduziert, ein Prozess, der als homologe Desensibilisierung bezeichnet wird (Abbildung 4). Werden Membranen von HEK 293 Zellen, die GC-A stabil exprimieren, mit ANP und ATP stimuliert, erfolgt eine starke cGMP-Produktion. Eine Vorbehandlung dieser Membranen mit ANP über 60 min ergibt eine 50%ige Reduktion der GC-A-Aktivität ohne Veränderung der Rezeptorexpression oder -lokalisation<sup>99</sup>. In Studien, bei denen Zellen mit radioaktivem [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat markiert waren, bewirkte die ANP-Vorbehandlung scheinbar eine zeitabhängige Reduzierung des [<sup>32</sup>P]-Gehalts (Abbildung 6). Es erfolgt also möglicherweise eine globale Dephosphorylierung (Abbildung 7)<sup>99, 100, 104, 105</sup>, die als Mobilitätsshift im SDS-Gel beobachtet werden kann<sup>104, 106, 107</sup>. Die beobachtete Verringerung des [<sup>32</sup>P]-Gehalts könnte aber auch eine Rezeptorinternalisierung darstellen. Außerdem kann diese Bande auch zu einem GC-A-assoziierten Protein gehören, wodurch auch diese Aussage kritisch betrachtet werden muss.

Die sinkende GC-A-Aktivität nach ANP-Vorbehandlung ist allerdings auch in anderen Zelltypen gezeigt worden. MA-10 Leydig-Zellen zeigen eine hohe Expression von GC-A, aber keine Expression von GC-B und NPRC<sup>108</sup>. Die ANP-Vorbehandlung führt auch hier zu einem zeitabhängigen Abfall der ANP-stimulierten cGMP-Produktion, der schon nach 10 min signifikant ist.



**Abbildung 6: Die ANP-Vorbehandlung resultiert möglicherweise in einer Dephosphorylierung<sup>99</sup>**

HEK 293-Zellen, die GC-A stabil exprimieren, wurden mit [<sup>32</sup>P] Orthophosphat markiert und mit 1 μM ANP für die angegebenen Zeiten vorbehandelt. Die cGMP-Produktion wurde analysiert und der <sup>32</sup>P-Gehalt durch ein radioanalytisches Image-System quantifiziert. Die ANP-Vorbehandlung resultiert in einer zeitabhängigen Reduktion des <sup>32</sup>P-Gehalts, was einer Dephosphorylierung entspricht, und einer Reduktion der Rezeptoraktivität. Im Diagramm ist ein repräsentatives Autoradiogramm von <sup>32</sup>P der GC-A dargestellt, in dem der zeitabhängige Verlauf der Dephosphorylierung gezeigt ist. Allerdings wurde nicht in Betracht gezogen, dass eine Rezeptorinternalisierung stattfinden könnte, wodurch sich ebenfalls der <sup>32</sup>P-Gehalt reduzieren würde. Auch könnte das Signal von einem assoziierten Protein stammen.

Die an dem Prozess der homologen Dephosphorylierung beteiligten Proteinphosphatasen (PP) und -kinasen sind noch nicht bekannt, aber es wurden viele Studien durchgeführt, um den Kreis der infrage kommenden Enzyme einzugrenzen. Es wird diskutiert, dass die Dephosphorylierung nicht durch die Aktivierung einer Proteinphosphatase, sondern durch eine reduzierte Affinität oder Aktivität einer Proteinkinase entsteht<sup>104</sup>. Einer cGMP-aktivierten Kaskade ist keine eindeutige Rolle in der homologen Desensibilisierung zuzuschreiben<sup>109</sup>. cGMP allein ist nicht ausreichend, um die GC-A zu desensibilisieren, sondern eine Liganden-induzierte Konformationsänderung wird benötigt. Diese Konformationsänderung könnte die Phosphorylierungsstellen für die Kinase unzugänglich machen oder zugänglich für eine PP machen. Alternativ könnte das gebildete cGMP eine bislang unbekannt PP aktivieren oder die involvierte Kinase hemmen. Für beide Möglichkeiten fehlen allerdings experimentelle Daten. Eine Arbeit zeigte, dass PKG bei der Desensibilisierung involviert sein könnte, dies wurde aber nie durch andere Autoren bestätigt. Durch Bryan und Potter (2002) wurde die Zahl der möglichen PP, die an der Dephosphorylierung der GC-A beteiligt sein können, auf zwei Gruppen eingeschränkt<sup>110</sup>. Die eine Gruppe benötigt kein Magnesium, ist aber sensitiv für Microcystin-/Okadasäure-ähnliche Inhibitoren<sup>111, 112</sup>. Die Identität der

Phosphatase dieser Gruppe ist allerdings nicht bekannt und konnte aufgrund der Beschreibung nur auf die Kandidaten PP1, PP2A, PP4, PP5 oder PP6 eingeschränkt werden<sup>113, 114</sup>. Die andere Gruppe benötigt Magnesium und wird durch Microcystin nicht inhibiert, was nur auf die Mitglieder von den Familien PP2C und PP7 zutrifft. Durch Analyse der Metallionenabhängigkeit und des Expressionsortes konnten einige Mitglieder ausgeschlossen werden<sup>115-119</sup>. Die verbleibenden Mitglieder sind die der Familien PP2C $\alpha$  und PP2C $\beta$ , die in signifikanten Mengen zum Beispiel in Membranen von Nierenzellen aus Hamstern detektiert wurden<sup>110</sup>.

Die vasokonstriktorisches Hormone ADH, Angiotensin II und Endothelin, die die PKC durch Stimulierung der Phospholipase C $\beta$  aktivieren, wirken den Effekten der natriuretischen Peptide entgegen<sup>32, 108, 120-122</sup>. Sie sind in der Lage die ANP-abhängige cGMP-Produktion in kultivierten Zelllinien zu reduzieren, ein Prozess, der als heterologe Desensitisierung bezeichnet wird (Abbildung 7). Die Aktivierung der PKC scheint notwendig zu sein, da PMA, ein direkter PKC-Aktivator, die Fähigkeit dieser Hormone, den Rezeptor zu desensibilisieren, nachahmt und Inhibitoren der PKC diese Fähigkeit unterbinden<sup>100, 121, 123</sup>. Auch eine zytosolische Kalziumerhöhung kann den Rezeptor heterolog desensibilisieren, da die Inkubation mit einem Kalziumchelator die Ionomycin-induzierte GC-A-Desensibilisierung hemmt<sup>109</sup>. Dabei ist nicht klar, ob die PKC-Aktivierung und die Kalziumerhöhung über verschiedene Signalwege wirken oder ob eine Kalziumerhöhung im Zytosol für die PKC-induzierte GC-A-Inhibition notwendig ist. Die kalziumabhängige Desensibilisierung sollte ein kalziumaktiviertes System wie eine Kalzium-Calmodulin-aktivierte Kinase oder Phosphatase beinhalten. Als mögliche durch Kalzium aktivierte Kinase wurde Calmodulin vorgeschlagen<sup>124</sup>, andere Gruppen zeigten dagegen eine erhöhte Aktivität der kalziumaktivierten Phosphatase Calcineurin<sup>125</sup>. Um diesen Sachverhalt zu klären, inkubierten Fortin und De Lean (2006) Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren für die Kinase Calmodulin bzw. für die Phosphatase Calcineurin. Dabei zeigte sich, dass nur der Calcineurin-Inhibitor in der Lage war, die Ionomycin-induzierte Desensibilisierung zu hemmen. Die kalziumaktivierte Phosphatase Calcineurin könnte demnach in der GC-A-Inhibition eine Rolle spielen, wobei noch geklärt werden muss, ob Calcineurin den Rezeptor direkt oder indirekt dephosphoryliert<sup>109</sup>.

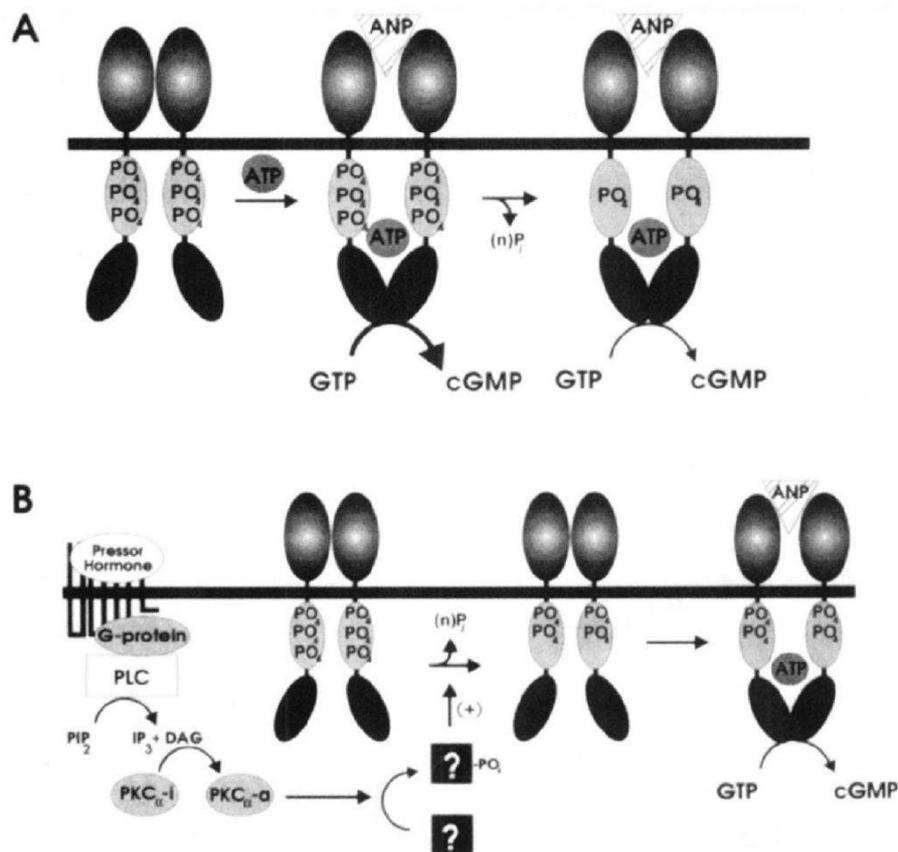
Diese Desensibilisierung unterscheidet sich von der homologen Desensibilisierung, da kein ANP gebunden werden muss, möglicherweise nur eine Dephosphorylierung einer einzelnen AS erfolgt und die Aktivierung der PKC

notwendig ist<sup>100, 123</sup>. Die Phosphoaminosäure-Analyse, bei der die tryptischen Peptide des Rezeptors durch Kochen in Salzsäure in ihre AS gespalten werden, zeigt bei dem heterolog desensitisierten GC-B-Rezeptor eine selektive Dephosphorylierung des Serins 523, was dem Serin 506 der GC-A entsprechen würde<sup>126, 127</sup>. Hingegen ist das Peptid, welches das phosphorylierte Serin 518 (Serin 502 in GC-A) enthält, nach der Behandlung für eine heterologe Desensitisierung vermehrt vorhanden. Es könnte daher sein, dass das Serin 518, das in einer Phosphorylierungs-Konsensussequenz der PKC liegt, verstärkt phosphoryliert wird<sup>127</sup>. Analoge Untersuchungen an der heterolog desensitisierten GC-A liegen bislang nicht vor.

Ob dieselben oder verschiedene Phosphatasen bzw. Kinasen aktiviert werden, die bei der homologen Desensitisierung involviert sind, ist nicht bekannt. Aber es wird davon ausgegangen, dass die homologe und heterologe Desensitisierung durch verschiedene Signalwege erfolgen<sup>68, 128</sup>.

### **1.2.5 Internalisierung und Degradation des GC-A-Rezeptors**

Die Frage, ob GC-A nach ANP-Bindung internalisiert und degradiert wird, wird kontrovers diskutiert. Studien in PC-12 Phäochromocytom-Zellen deuten darauf hin, dass ANP durch GC-A internalisiert und der Rezeptor anschließend an die Zellmembran rückgeführt wird<sup>129</sup>. Pandey und Kollegen, die mit MA-10 Leydig, COS und HEK 293 Zelllinien arbeiten, zeigten, dass die ANP-Bindung die Internalisierung stimuliert, wobei der Großteil der Rezeptoren degradiert und ein kleinerer Teil an die Membran zurückgeführt wird<sup>130-133</sup>. Im Gegensatz dazu zeigen Maack und Kollegen, dass GC-A in primären Nieren- oder stabil exprimierenden chinesischen Hamsteroovazellen ein Membranprotein ist, das weder eine Endozytose durchläuft noch eine lysosomale Hydrolyse von ANP vermittelt<sup>134, 135</sup>. GC-A exprimierende HEK 293-Zellen in Experimenten von Jewett et al. zeigen über die Zeit eine reduzierte ANP-Bindung, die durch eine verminderte Affinität der GC-A für ANP, aber nicht durch weniger Rezeptoren an der Zellmembran zustande kommt<sup>81</sup>. Fan et al. konnten weder eine Internalisierung, noch eine Rückführung an die Zellmembran oder signifikant degradierte ANP-Produkte in GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen feststellen<sup>136</sup>. Es konnte also bislang nicht eindeutig geklärt werden, ob der GC-A-Rezeptor internalisiert wird oder ständig an der Membran verbleibt.



**Abbildung 7: Schematische Modelle für die möglichen Mechanismen der Desensibilisierung** <sup>100</sup>

Im basalen Zustand liegt GC-A stark phosphoryliert vor. **A**, Bei der homologen Desensibilisierung wird angenommen, dass ANP eine Konformationsänderung bewirkt, die zur Aktivierung der Zykase-Domäne führt. Als Konsequenz werden die Phosphorylierungsstellen eventuell für eine Proteinphosphatase zugänglich gemacht und dadurch dephosphoryliert. Daraus folgt eine Inaktivierung des Rezeptors trotz des Vorhandenseins von ANP. **B**, Bei der heterologen Desensibilisierung ist ein Binden von ANP an den Rezeptor nicht notwendig, aber dafür wird die PKC benötigt. Vasokonstriktische Hormone binden an ihren Rezeptor und stimulieren die PLC durch Aktivierung eines heterotrimeren GTP-bindenden Proteins. PLC katalysiert die Bildung von Diazylglycerin, welches an PKC bindet und es aktiviert. Die aktivierte PKC selbst phosphoryliert und aktiviert dadurch ein bisher unbekanntes Protein (als „?“ dargestellt), welches zur Dephosphorylierung einer bzw. weniger Phosphorylierungsstelle/n der GC-A führt. Eine nachfolgende ANP-Stimulation ist deutlich reduziert. Die Dicke der Pfeile zwischen GTP und cGMP soll die relative enzymatische Aktivität darstellen. Abkürzungen: G-Protein, heterotrimeres GTP-bindendes Protein; IP<sub>3</sub>, Inositoltriphosphat; PIP<sub>2</sub>, Phosphoinositolbisphosphat.

### 1.3 Nutzung der Massenspektrometrie zur Identifizierung von Proteinen und ihrer posttranslationalen Modifikationen

Die Proteomforschung hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die Analyse von Proteinen und Peptiden ist nicht mehr nur auf die Sequenzanalyse und auf die Bestimmung der Primärstruktur beschränkt. Durch die Weiterentwicklung auf diesem Gebiet ist es unter anderem auch möglich, posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen und deren Lokalisation im Protein zu charakterisieren sowie

quantitative Aussagen zu treffen. Die Proteinanalyse mittels Massenspektrometrie (MS) beinhaltet die proteolytische Spaltung, die Auftrennung der entstehenden Peptide und die MS-basierte Analyse<sup>137</sup>.

Zur proteolytischen Spaltung werden spezifische Enzyme, meistens Trypsin, verwendet. Trypsin schneidet C-terminal der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, wenn diese nicht von einem Prolin gefolgt werden. Dadurch entstehen Peptide, die mindestens zwei geladene Gruppen enthalten, die basische Seitenkette am C-Terminus und die Aminogruppe am N-Terminus.

Die MS-Geräte und deren Anwendungen sind vielfältig. Im Anschluss sollen die in dieser Arbeit genutzten Methoden erklärt werden.

### 1.3.1 Die Umkehrphasen-Chromatographie

Die generierten tryptischen Peptide werden üblicherweise mittels HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde mit der Umkehrphasen-Chromatographie (*Reversed Phase Chromatographie*, RPC) gearbeitet. Bei der RPC findet die hydrophobe Wechselwirkung der Peptide mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wässrigen Lösungsmittel statt. Diese Wechselwirkung verzögert den Transport der einzelnen Peptide, wodurch jedes Peptid eine charakteristische Zeit, die sogenannte Retentionszeit, benötigt, um die Trennsäule zu verlassen.

Dabei dient Kieselgel, bei dem die OH-Gruppen mit langen Kohlenwasserstoffketten (C<sub>2</sub> bis C<sub>18</sub>) verethert werden, als stationäre Phase. Für die Auftrennung von Peptiden werden C<sub>18</sub>-Säulen bevorzugt. Als mobile Phase dient ein Lösungsmittelsystem, das sich aus Wasser, einem organischen Lösungsmittel und einem Ionenpaarreagens zusammensetzt. Bei der RPC wird bevorzugt Acetonitril aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften (geringe Viskosität und geringe UV-Absorption) als organisches Lösungsmittel eingesetzt. Das sogenannte Ionenpaarreagens bindet mit einem geladenen und einem ungeladenen Molekülteil als Gegenion an die ionische Seitengruppe des Peptids und erhöht dadurch dessen Hydrophobizität. Bei Peptiden wird dafür Trifluoressigsäure oder Ameisensäure eingesetzt. Durch das Ionenpaarreagens wird die Interaktion der Peptide mit der stationären Phase verstärkt und sowohl die Retention als auch die Trennleistung der Säule beeinflusst. Zur Elution wird eine Gradiententrennung angewandt, bei der durch Zumischung des organischen Lösungsmittels zur mobilen wässrigen Phase die Polarität verringert und dadurch die Elutionskraft erhöht wird. Die Detektion erfolgt durch die Messung der UV-Absorption bei 214 nm (Absorption der Peptidbindung)

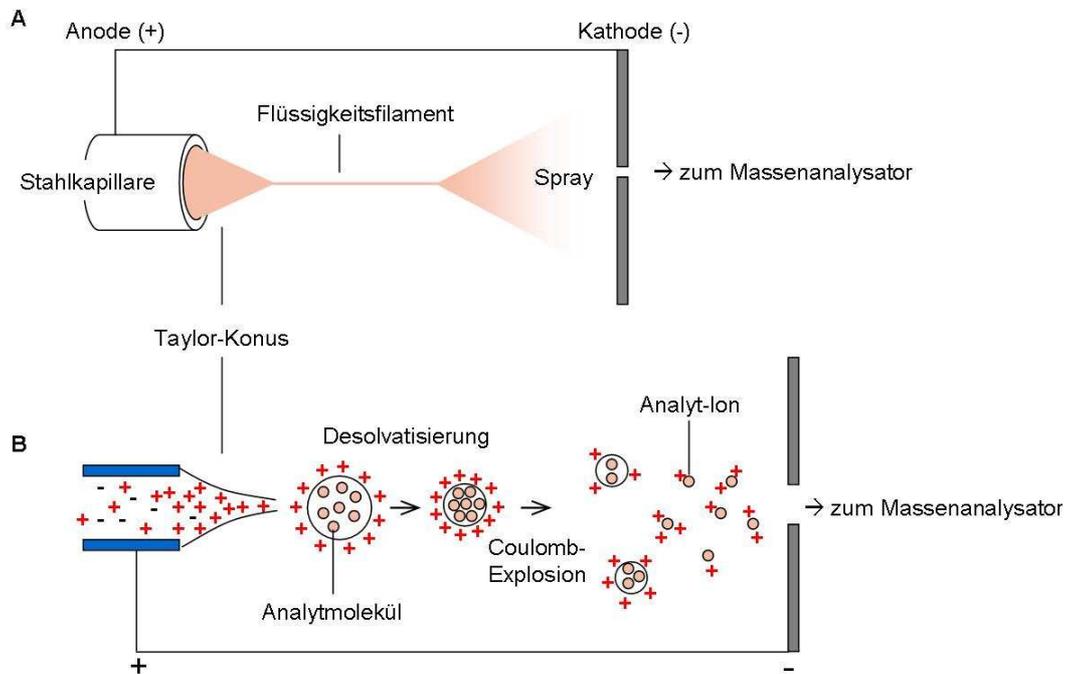
und 295 nm (Absorption der aromatischen AS-Ketten). Die Probeninjektion bei einer HPLC erfolgt meist mithilfe eines Autosamplers, der die Proben automatisch abarbeitet.

### 1.3.2 Das Massenspektrometer

Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. In der Ionenquelle wird aus einer Probe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt, die im Massenanalysator aufgrund ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) aufgetrennt und anschließend als Ionenstrom im Detektor gemessen werden. Die relative Häufigkeit der Ionen wird im Massenspektrum gegen ihr  $m/z$ -Verhältnis aufgetragen dargestellt. Die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie und die Miniaturisierung der Chromatographiesäulen haben die bioanalytischen Anwendungen stark beeinflusst. Es ermöglicht Nachweise bis in den subfemtomolaren Bereich und die Durchführung der MS/MS-Messungen direkt nach der chromatographischen Auftrennung.

Durch Einführung von den sanften Ionisierungstechniken MALDI und ESI wurde die Massenspektrometrie interessant für die Analyse von Proteinen und Peptiden<sup>138, 139</sup>. Durch beide Methoden können große, labile Biomoleküle ohne signifikante Degradation sensitiv und schnell ionisiert werden. Aufgrund ihrer Unterschiede ergänzen sich beide Methoden. Bei der in dieser Arbeit genutzten Methode der Elektrospray-Ionisierung (ESI), die bei Atmosphärendruck durchgeführt wird, wird die Probe in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel gelöst und durch eine enge mit Metall bedampfte Kapillare in die Ionenquelle des Massenspektrometers geleitet (Abbildung 8). Ein angelegtes elektrisches Feld zwischen Kapillarspitze (Anode) und Massenspektrometer (Kathode) trennt die Ionen und positive Ionen sammeln sich an der Flüssigkeitsoberfläche (Positivmodus). Der entstehende stabile Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus) emittiert einen filamentartigen Flüssigkeitsstrom, der nach einiger Entfernung von der Anode instabil wird, wodurch ein Aerosol von Tröpfchen entsteht. Die ersten Tröpfchen mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern weisen eine hohe Ladungsdichte auf und befinden sich nahe an der Stabilitätsgrenze (Rayleigh-Limit). Durch die Evaporation des Lösungsmittels schrumpfen die Tröpfchen und die Ladungsdichte an der Oberfläche erhöht sich, was letztendlich zu einem explosionsartigen Zerfall führt (Coulomb-Explosion). Dabei entstehen positive Ionen, die in das Hoch-Vakuum des Massenanalysators überführt und dort anhand ihres  $m/z$ -Verhältnisses

aufgetrennt werden. Die größten Vorteile von ESI sind, dass es (a) direkt an eine chromatographische Auftrennung wie die RP-HPLC gekoppelt werden kann und (b) mehrfach geladene Ionen erzeugt und dadurch Massenspektrometern wie Quadrupol oder Ionenfalle mit mäßigen  $m/z$ -Verhältnissen erlaubt, hochmolekulare Analyte zu detektieren.



**Abbildung 8: Darstellung der Elektrospray-Ionisierung und der ablaufenden Prozesse**

**A**, makroskopischer Prozess: Die Ionen des Analyten werden durch eine Stahlkapillare kontinuierlich zugeführt. Durch das angelegte elektrische Feld werden die Ionen getrennt, wobei die positiv geladenen Ionen an die Oberfläche gezogen und die negativen Ionen in die andere Richtung gedrängt werden. Es entsteht ein sogenannter Taylor-Konus, der bei einem hohen elektrischen Feld stabil ist und einen filamentartigen Flüssigkeitsstrom emittiert. Nach einiger Entfernung von der Anode wird dieser instabil und zerfällt in winzige Tröpfchen (Spray). **B**, mikroskopischer Prozess: Die ersten Tröpfchen haben einen Durchmesser von wenigen Mikrometern und die Oberfläche ist mit positiven Ionen angereichert. Durch die zunehmende Desolvatisierung schrumpfen die Tröpfchen und die Ladungsdichte an der Oberfläche nimmt zu. Wird die Stabilitätsgrenze (Rayleigh-Limit) überschritten, zerfallen die Tropfen durch die Abstoßung gleichnamiger Ladungen (Coulomb-Explosion) und es entstehen viele kleine Tröpfchen von nur wenigen Nanometern Durchmesser. Dieser Prozess setzt sich fort, bis die Analytionen schließlich in die Gasphase überführt werden.

ESI-Quellen werden meist mit Quadrupol- oder Ionenfallenanalysatoren gekoppelt. Das Prinzip der Ionenfalle (*Ion Trap*) beruht auf dem Einfangen von Ionen in einem geeigneten elektrischen Feld. Sie besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen, an die Wechselspannungen angelegt werden. Die Ionen, die durch zentrische Öffnungen in den Endplatten ein- und ausgelassen werden, werden auf stabilen, geschlossenen Bahnen gehalten und für gewöhnlich für einige Millisekunden in der Falle akkumuliert und

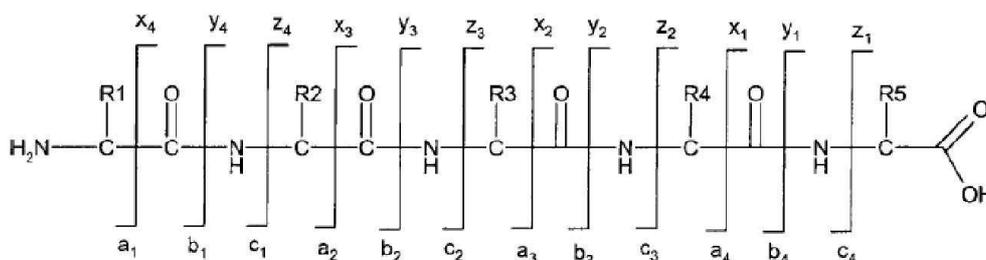
gespeichert. Danach werden sie mit steigendem  $m/z$  eijiziert und mit Hilfe eines Sekundärelektronenvervielfachers detektiert. In einer speziellen Form der Ionenfalle, dem Orbitrap-Massenanalysator<sup>140</sup>, werden die Ionen gefangen, umkreisen eine zentrale spindelförmige Elektrode und oszillieren harmonisch entlang der Elektrodenachse mit einer für ihr  $m/z$ -Verhältnis charakteristischen Frequenz. Das LTQ-Orbitrap-System besteht aus einer linearen Ionenfalle (LTQ), die über eine Radiofrequenz-Falle (C-Trap), die zur intermediären Speicherung von Ionen dient, mit der Orbitrap verbunden ist<sup>141</sup>. Es wird in dem sogenannten „Lock Mass“-Modus gearbeitet, bei dem zuerst das protonierte Hintergrund-Ion Polyzyklodimethylsiloxan  $[(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6\text{H}^+]$  mit der exakten Masse von 445,120025  $m/z$  in die lineare Ionenfalle transferiert wird. Dieses Ion kommt aus der Raumluft und kann für die interne Kalibrierung während der HPLC-MS-Analyse genutzt werden. Dadurch kann eine relative Massengenauigkeit im unteren ppm-Bereich erreicht werden<sup>142</sup>. Außerdem wurde mit der Strategie der mehrstufigen Aktivierung (*Multistage Activation*, MSA) von Phosphopeptiden gearbeitet<sup>143</sup>. Dabei werden potentiell generierte Neutralverlust-Ionen zusätzlich zum Vorläuferion aktiviert und fragmentiert. Dadurch entstehen Spektren mit einer höheren Sequenzinformation, da Spektren von Phosphopeptiden sonst oft, aufgrund massiver Neutralverlustsignale des Vorläuferions, nur einen geringen Informationsgehalt haben.

Das Quadrupolmassenspektrometer besteht aus einer Anordnung von vier parallelen stabförmigen Metallelektroden und stellt im Prinzip einen Massenfilter dar. Dabei haben gegenüberliegende Elektroden die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung. Durch ein kombiniertes Wechsel- und Gleichspannungsfeld können Ionen mit einem definierten  $m/z$ -Verhältnis den Quadrupol auf einer stabilen oszillierenden Bahn durchlaufen. Die Massentrennung wird durch das Verhältnis von Gleichspannung zu Amplitude erreicht. Dadurch gelangen Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses in den Bereich der stabilen Oszillation und erreichen den Detektor. Für alle anderen Ionen ergeben sich instabile Oszillationen, wodurch sie durch Kollision mit den Elektroden gestoppt werden oder zwischen den Stäben verloren gehen.

### 1.3.3 Tandem-MS und Hybrid-Systeme

Mittels der beschriebenen Methoden können Übersichtscans erzeugt werden, welche die  $m/z$ -Verhältnisse aller Peptidionen in einem definierten Bereich

aufzeigen. Bei der Tandem-MS (MS/MS oder MS<sup>2</sup>) werden die Ionen zusätzlich fragmentiert, wodurch MS/MS-Fragmentationsspektren entstehen. Dadurch ist es im Vergleich zum Übersichtscan nicht nur möglich Informationen über die Massen, sondern auch Informationen über die Struktur von Ionen zu erhalten. Es können aber auch zwei Massenanalytoren als Hybrid-System kombiniert werden, mit denen ebenfalls MS/MS-Spektren aufgezeichnet werden können. Das bereits beschriebene LTQ-Orbitrap-System zählt zu den Hybrid-Systemen, welches in diesem Fall aus einer Orbitrap und einer Ionenfalle besteht. Neben diesem System wird außerdem das Triple Quadrupol-Linear Iontrap-Instrument (Qtrap) in dieser Arbeit genutzt, bestehend aus einem Triple-Quadrupol und einer linearen Ionenfalle. Vor den eigentlichen Triple-Quadrupol ist ein „Hilfs“-Quadrupol geschaltet, in dem die Ionen zunächst fokussiert werden. Der erste Quadrupol (Q1) ist der erste Messquadrupol zum Scannen der Ionen. In Q2, der Kollisionszelle, können die Ionen durch Kollision mit einem inerten Gas, wie Helium oder Argon, mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (*collision-induced dissociation*, CID) fragmentiert werden. Dabei entstehen im Fall von Peptiden durch die Spaltung der Peptidbindung hauptsächlich b- und y-Fragment-Ionenserien, wobei b-Ionen den ursprünglichen N-Terminus und y-Ionen den C-Terminus enthalten (Abbildung 9). Durch andere Fragmentierungsarten werden die Peptidionen N- bzw. C-terminal der Peptidbindung gespalten und es entstehen a- und x- bzw. c- und z-Fragment-Ionenserien<sup>144</sup>.



**Abbildung 9: Schema der Fragmentierung von Peptiden**<sup>145</sup>

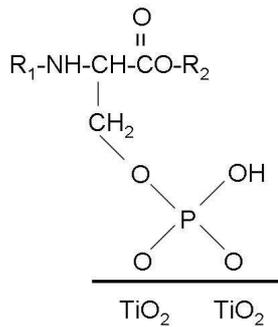
Durch die Spaltung der Peptidbindung entstehen b- und y-Fragment-Ionen. Wird N- bzw. C-terminal der Peptidbindung gespalten, entstehen a- und x- bzw. c- und z-Ionen.

Q3 ist eine lineare Ionenfalle, in der die Molekulargewichte der entstandenen Fragment-Ionen analysiert werden. Mit diesem Aufbau lassen sich verschiedene MS/MS-Analysen durchführen, wie Produktions-, Vorläuferionen- oder Neutralverlustanalyse, durch Einstellen von Q1 und Q3 auf entweder den gesamten Massenbereich oder konstante m/z-Verhältnisse.

### 1.3.4 Anreicherung von Phosphopeptiden mittels TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie

Posttranslationale Modifikationen (PTM) sind kovalente Modifikationen und spielen in biologischen Systemen eine wichtige Rolle bei der zellulären Lokalisation von Proteinen, der Interaktion mit anderen Proteinen und bei der Regulation von Proteinaktivität und -funktion<sup>146</sup>, wie zum Beispiel bei der bereits beschriebenen Aktivierung und Desensibilisierung der GC-A<sup>78</sup>. Mehr als 300 PTMs sind bekannt, die jedoch oftmals transient sind und *in vivo* nur bei einer kleinen Fraktion von Proteinen auftreten, da sie in substöchiometrischen Mengen präsent sind. Zu den wichtigsten PTMs zählen die reversiblen Phosphorylierungen des Threonins (pThr, pT), Serins (pSer, pS) und Tyrosins (pTyr, pY)<sup>147</sup>. Mittels Tandem-MS können PTMs analysiert werden, wenn sie eine Massendifferenz herbeiführen. Bei den genannten O-Phosphorylierungen zum Beispiel beträgt die charakteristische Massendifferenz +79,97 Da pro Phosphatgruppe.

Da Phosphopeptide im Vergleich zu nicht phosphorylierten Peptiden niedrig abundant sind und einfach phosphorylierte bzw. nicht phosphorylierte Peptide die Ionisierung von mehrfach phosphorylierten Peptiden unterdrücken können<sup>148</sup>, ist eine Anreicherung der Phosphopeptide vor der MS-Analyse essentiell. Dafür stehen bei der MS-basierten Proteomanalyse verschiedene Methoden, wie die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), die Kationenaustauscherchromatographie und die Anreicherung mittels verschiedener Metalloxide, zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde mit der Titaniumdioxid (TiO<sub>2</sub>)-Affinitätschromatographie gearbeitet. Mit dieser Methode können Phosphopeptide aus komplexen Proben angereichert werden, wobei die Phosphopeptide an die porösen TiO<sub>2</sub>-Mikrokugeln adsorbieren (Abbildung 10). Durch Zugabe von Phthalsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in Acetonitril und Trifluoressigsäure (TFA) wird die Selektivität erhöht, da die Bindung nicht phosphorylierter Peptide durch kompetitive Inhibition verringert wird. Mehrere Waschschrte reduzieren die Menge von nicht phosphorylierten Peptide und die Elution erfolgt durch alkalische Puffer<sup>149, 150</sup>. Die angereicherten Phosphopeptide werden anschließend mittels Qtrap-MS analysiert.



**Abbildung 10: Adsorption eines Phosphopeptides an  $\text{TiO}_2$**

Dargestellt ist ein phosphoryliertes Serin eines Peptides, welches über einen zweizähligen Brücken-Komplex mit dem Phosphat-Anion an die  $\text{TiO}_2$ -Oberfläche adsorbiert.

### 1.3.5 Datenauswertung und Spektreninterpretation

Die sorgfältige Datenauswertung ist ein wichtiger Bestandteil der Proteomanalyse. Dabei werden verschiedene Suchalgorithmen via Internet angeboten, um die experimentell aufgestellten Daten mit den vorhandenen Datensätzen in online Datenbanken zu vergleichen. Dazu werden die für einen Organismus vorhandenen Proteine der Proteindatenbank theoretisch gespalten. Die Massen der entstandenen theoretischen Peptide werden – innerhalb der gewählten Massentoleranz – mit den experimentell ermittelten Massen aus dem Übersichtsscan verglichen. Hierdurch erfolgt eine erste Vorauswahl. Potentielle Kandidaten werden dann innerhalb der gewählten Toleranzen fragmentiert. Anschließend erfolgt ein Abgleich der experimentellen mit den theoretischen Fragmentationsspektren der Kandidatenpeptide – ebenfalls im Rahmen der gewählten Massentoleranz für den MS/MS Modus. Das Ergebnis eines solchen Vergleichs ist die Identität von Peptiden, die genutzt werden, um Protein-Hitlisten zu erstellen. Üblicherweise werden zwei bis drei Peptide benötigt, um ein Protein eindeutig zu identifizieren<sup>147</sup>. Bei der Peptididentifizierung wird ein oberhalb des vom Algorithmus angegebenen Schwellenwertes (Mascot Threshold Score) verwendet, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Sequenzzuordnung  $p < 0,05$  ist. In dieser Arbeit wurde mit dem Mascot-Algorithmus<sup>151</sup> und den Datenbanken Swiss-Prot und IPI-Mouse gearbeitet.

Vor allem bei der Analyse von Phosphorylierungen und anderen PTMs beruhen die Identifikation der Peptide und die Zuordnung der Stelle der Modifikation auf der Auswertung von einzelnen Fragmentationsspektren. Bei der Nutzung von Datenbanksuchen müssen bei der Phosphopeptidanalytik die Phosphorylierungen als variable Modifikationen eingestellt werden, was bedeutet, dass prinzipiell jedes Serin, Threonin oder Tyrosin phosphoryliert sein könnte, wodurch die Anzahl der möglichen passenden Peptidsequenzen innerhalb einer Datenbank und damit auch das Risiko für eine falsch-positive

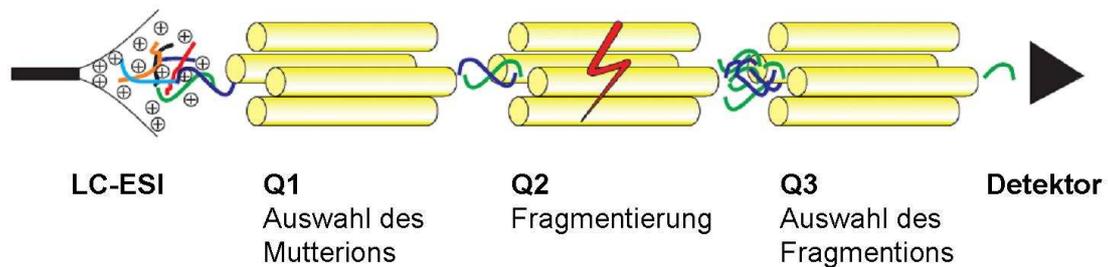
Peptididentifikation und PTM-Zuordnung erhöht wird. Aus diesen Gründen werden im Fall von Phosphorylierungen die Fragmentationenspektren zusätzlich manuell ausgewertet. Dabei sollten die Anzahl der b- und y-Ionen innerhalb einer Sequenz hoch und vor allem bei der jeweils modifizierten AS vorhanden sein. Auch das Signal/Rauschverhältnis ist ein Kriterium der manuellen Dateninterpretation. Durch die manuelle Auswertung wird die Anzahl falsch annotierter Phosphorylierungsstellen und der Verlust von falsch-negativen Identifizierungen verringert.

### 1.3.6 Labelfreie Quantifizierung mittels Multiple Reaction Monitoring

Ein Vorteil der Massenspektrometrie ist, dass ein quantitativer Vergleich von unterschiedlichen Zuständen einer biologischen Probe möglich ist. Interessant ist zum Beispiel die Veränderung des Phosphorylierungsmusters der GC-A unter basalen/aktiven und desensitisierenden Bedingungen. Dabei können entweder stabil-isotope Markierungen oder eine sogenannte labelfreie Quantifizierung mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Scans verwendet werden. Die letztere Methode wurde innerhalb dieser Arbeit mit Hilfe des Qtrap durchgeführt<sup>152</sup>. Der erste und dritte Quadrupol dienen als Massenfilter, die nur bestimmte m/z-Verhältnisse stabilisieren. Dabei bilden immer eine vordefinierte Mutterionen-Masse und eine Fragmentionen-Masse ein Paar. Diese sogenannten Übergänge bestimmter m/z-Verhältnisse werden aus vorhandenen Fragmentationenspektren der jeweiligen Peptide oder *in silico* durch Verwendung entsprechender PC-Software generiert<sup>153</sup>. Um ein Peptid möglichst genau darzustellen, wurden drei bis fünf Übergänge pro Peptid ausgewählt, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Übergänge nicht nur prominente Fragmentionen widerspiegeln sondern auch die phosphorylierte AS genau beschreiben. Selbst ein Peptid mit unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen kann durch die Wahl geeigneter MRMs analysiert werden.

In Q1 werden nur die ausgewählten Übergänge der Mutterionen stabilisiert und in Q2 zur Fragmentierung weitergeleitet. In Q3 wiederum werden nur jene Fragmentionen stabilisiert, die zu den spezifischen Übergängen gehören (Abbildung 11). Anschließend wird kein Fragmentationenspektrum akquiriert, sondern die Ionenspur aufgezeichnet. Durch diese Methode ist eine sehr sensitive und spezifische Analyse von bekannten Peptiden aus komplexen biologischen Proben möglich, jedoch können keine bis dahin unbekannt Modifizierungen aufgezeigt werden. Interne Standards dienen der Überprüfung

der Reproduzierbarkeit der Sprayintensitäten. Als Ergebnis werden Flächen der MRM-Übergänge erhalten, die dann zwischen den unterschiedlichen Proben verglichen werden können.



**Abbildung 11: MRM-Analyse mittels eines Triple-Quadrupol-Analysators** <sup>152</sup>

Mehrere Ionen eluieren gleichzeitig von der HPLC und gelangen zusammen in den ersten Quadrupol. Durch die spezifische Filterung in Q1 anhand des eingestellten  $m/z$ -Übergangs wird ein Großteil der Ionen gefiltert. Aufgrund des gleichen  $m/z$ -Verhältnisses gelangen jedoch auch unerwünschte Peptidionen (blau) in Q2, in dem die Fragmentierung statt findet. In Q3 erfolgt wiederum eine Filterung der Fragmentionen, wodurch das störende Ion den Quadrupol nicht passieren kann und nur ein spezifisches Fragmention (grün) mit dem passenden  $m/z$ -Verhältnis stabilisiert und detektiert wird.

## 1.4 Motivation und Zielsetzung der Arbeit

Das ANP/GC-A-System vermittelt wichtige endokrine natriuretische, diuretische und hypotensive Effekte sowie parakrine antihypertrophe Effekte. Eine Störung dieses Systems trägt vermutlich zur Entwicklung von Bluthochdruck und Herzhypertrophie im Menschen bei. Zum Beispiel ist in Patienten mit Herzinsuffizienz der ANP-Plasmaspiegel stark erhöht, die GC-A-vermittelten Effekte jedoch deutlich reduziert. Das Verständnis, warum trotz erhöhter Ligandenkonzentration der GC-A-Rezeptor die Effekte nicht übermitteln kann, also desensibilisiert ist, ist deshalb von großer Bedeutung.

An transfizierten HEK 293-Zellen, die die GC-A überexprimierten, wurden *in vitro* sechs Phosphorylierungsstellen der Kinasehomologen Domäne des GC-A-Rezeptors durch Markierung mit radioaktivem Phosphat postuliert. Deren Vorhandensein scheint von großer funktionaler Bedeutung, da der Rezeptor nur aktiv sein kann, wenn dieser phosphoryliert vorliegt<sup>78</sup>. In Anwesenheit erhöhter Konzentrationen des Liganden ANP, wie es bei kardiovaskulären Erkrankungen der Fall sein kann, bzw. durch vasokonstriktorisches Hormone wird die Rezeptoraktivität stark vermindert, was mit einer Dephosphorylierung der Kinasehomologen Domäne in Verbindung gebracht wird<sup>99</sup>.

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die postulierten und zum anderen eventuell zusätzlich vorhandene Phosphorylierungsstellen mittels Massenspektrometrie nachzuweisen. Die Nutzung der Massenspektrometrie erübrigt ein Behandeln der Zellen mit radioaktivem Orthophosphat, welches die Zellen negativ beeinflussen und damit eventuell zu artifiziellen posttranslationalen Modifikationen führen kann. Es wurde zuerst mit HEK 293-Zellen gearbeitet, die die GC-A mit einem FLAG-Epitop (DYKDDDDK) überexprimieren<sup>79</sup>. Die an diesem System etablierten Methoden wurden anschließend auf Zellen übertragen, die die GC-A endogen und damit physiologisch exprimieren. Außerdem wurden massenspektrometrische Methoden dazu genutzt, um die Phosphorylierungsmuster unter basalen und desensibilisierenden Bedingungen zu analysieren.

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente sollen die posttranslationalen Modifikationen des GC-A-Rezeptors besser charakterisiert werden, um das Verständnis der möglichen pathophysiologischen Bedeutung eines Defekts der GC-A zu erweitern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Merck, Darmstadt verwendet.

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Acrylamid/ N,N'Methylenbisacrylamid	Roth	Karlsruhe
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (37,5:1)		
Adenosin 5'-triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Agar	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Agarose	BioSell	Nürnberg
Ammoniumpersulfat	Biorad	München
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Angiotensin II	Bachem	Bubendorf, Schweiz
ANP (1-28, rat)	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Bacto <sup>™</sup> -Tryptone	Becton, Dickinson and Comapny	Sparks, USA
Beads (Synergi HydroRP, 100 µm ID, 3 cm Länge, 4 µm Partikelgröße, 80 Å Porengröße)	Phenomenex	Aschaffenburg
Beads (Synergi HydroRP, 75 µm ID, 30 cm Länge, 2,5 µm Partikelgröße, 80 Å Porengröße)	Phenomenex	Aschaffenburg
BC (Bicinchoninic Acid) Assay Reagent A	Uptima	Montlucon, Frankreich
Bromphenolblau	Fluka Chemie	Steinheim
BSA (MW ca. 68 kDa)	GERBU Biotechnik	Gaiberg
CF-Cyt	NanoTools	Teningen
Coomassie G-250	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
DABCO	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
DMEM	Biochrom	Berlin
DMEM-Häm	Biochrom	Berlin
DNA-Extraktions-Kit	Macherey-Nagel	Düren
DNA-Leiter (2 Log DNA Ladder, 0,1 – 10,0 kb)	NEB	Ipswich, USA
dNTP	Fermentas	St. Leon-Rot
<i>E.coli</i> (Top10 one shot)	Invitrogen	Karlsruhe
EGTA	Roth	Karlsruhe
Essigsäure (100 %)	Merck	Darmstadt
FCS	PAA	Cölbe
Fixierer Vision GV 60	Röntgen Bender	Baden-Baden
Formaldehyd (37 %)	Roth	Karlsruhe
FuGENE 6® Transfection Reagent	Roche Diagnostics	Mannheim
γ-Globulin	Serva	Heidelberg
Guanosintriphosphat	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
HEPES	GERBU Biotechnik	Gaiberg
3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
125 J cGMP	ImmunDiagnostik AG	Bensheim
Kreatinphosphokinase	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
10x Ligasepuffer	NEB	Ipswich, USA
M2 Agarose	Sigma Aldrich Chemie	Steinheim
Magermilch	Roth	Karlsruhe
Mowiol	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Natriumpyrophosphat	Sigma-Alrich Chemie	Steinheim
10x PCR Reaktionspuffer	Invitrogen	Karlsruhe
PCR Wasser	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Pferdeserum	PAA	Cölbe
Phosphatase-Inhibitoren	Roche Diagnostics	Mannheim
PhosStop		
Phospho-Kreatin	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Phthalsäure	Fluka	Steinheim
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	Dreieich
Plasmidisolations-Kit	Macherey Nagel	Düren

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Protease-Inhibitoren	Roche Diagnostics	Mannheim
Complete Mini		
Protein A Agarose	Roche Diagnostics	Mannheim
Proteinmarker (PageRuler	Fermentas	St. Leon-Rot
Prestained Protein Ladder, 10 -170 kDa)		
Restriktionsenzyme (EcoRV, SbfI, MluI, PstI)	NEB	Ipswich, USA
Restriktionspuffer	NEB	Ipswich, USA
Röntgen Rapid Entwickler	Adefo-Chemie	Nürnberg
Säulen zur Ak-Aufreinigung	Peptide Specialty Laboratories GmbH	Heidelberg
SDS	Serva	Heidelberg
Silbernitrat	Fluka	Steinheim
T4 Ligase	NEB	Ipswich, USA
Taq Polymerase	Invitrogen	Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
TiO <sub>2</sub> Partikel	GL Science	Tokio, Japan
TiO <sub>2</sub> Tips (15 µL)	GL Science	Tokio, Japan
triple FLAG Peptid	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Triethylamin	Fluka	Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Trizma Base (MW 121.4)	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Trypsin Gold	Promega	Madison, USA
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Waymouth	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim

### 2.1.2 Verwendete Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Biofuge fresco Rotor #3324 Ø 85 mm	Heraeus Instruments	Hanau
Brutschrank Hera cell 150	Heraeus Instruments	Hanau
Chamber Slides	Nunc	Langenselbold

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Konfokal-Laser-Scanning Mikroskop Eclipse E600	Nikon	Amstelveen, Niederlande
Elektrophoresekammer mit Gelkammer	Eigene Herstellung, Physiologisches Institut	Würzburg
γ-Counter	Berthold Technologies	Bad Wildbad
Feinwaage TE214S	Sartorius	Göttingen
Multifuge 1S-R	Heraeus Instruments	Hanau
Orbitrap XL Massenanalysator	Thermo	Amsterdam, Niederlande
Öl-Immersionsobjektiv	Nikon	Amstelveen, Niederlande
PCR-Gerät T1 Thermocycler	Biometra	Göttingen
Qstar Elite Massenanalysator	Applied Biosystems	Darmstadt
Qtrap 4000 Massenanalysator	Applied Biosystems	Darmstadt
SpeedVac Concentrator	Bachofer Laboratoriumsgeräte	Reutlingen
Spectrophotometer SmartSpec™ 3000	Biorad	München
Strom- und Spannungsquelle E802 für Elektrophorese	Consort nv	Turnhout, Belgien
Swing Out Rotor TTH 400	Heraeus Instruments	Hanau
Transferkammer Whatman	Biometra®	Göttingen
Ultimate 3000 HPLC System	Dionex	Idstein
Ultimate HPLC System	Dionex	Idstein
Ultraschalllanze Sonoplus	Bandelin electronics	Berlin
Viktor <sup>2</sup> ™ 1420 Multilabel Counter	Wallac	Waltham, USA
Waage 1219 MP	Sartorius	Göttingen

### 2.1.3 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien und deren Beschreibung

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Herkunft
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM-Ham's F12 mit 10 % FCS	ATCC, Manassas, USA

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Herkunft
FLAG-GC-A (Ratte) exprimierende HEK 293	HEK 293-Zellen mit stabiler Expression des FLAG-GC-A-Rezeptors	DMEM mit 10 % FCS, 300 µg/mL Zeocin	Dr. Yang, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
MA-10 Leydig- Tumorzellen aus der Maus 154	Testosteron- produzierende Zellen, endogene Expression von GC-A <sup>155, 156</sup>	Waymouth mit 15 % Pferdeserum	Dr. Müller, Universität Gießen
MyEnd-Zellen aus der Maus 157	Mikrovaskuläre endotheliale Myokard- Zellen aus der Maus	DMEM mit 10 % FCS	Prof. Drenkhahn, Universität Würzburg

#### 2.1.4 Plasmide

Die cDNA zur Expression des FLAG-GC-A Rezeptors (FLAG-Epitop: DYKDDDDK) in HEK 293-Zellen wurde freundlicherweise von Dr. Michael Chinkers (Department of Pharmacology, University of South Alabama, Mobile, USA) und das Plasmid, das für den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor kodiert, wurde von Dr. Viacheslav Nikolaev (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid mit dem cDNA-Konstrukt für GC-A Wildtyp (WT) wurde von Dr. Ruey-Bing Yang (Academia Sinica, Taipei, Taiwan) bereitgestellt. Die GC-A Konstrukte, bei denen Serin 487 durch Alanin bzw. Glutamat ersetzt wurde, wurden innerhalb dieser Arbeit generiert (Abschnitt 2.11).

## 2.2 Bakterientransformation und Plasmidisolation

### 2.2.1 Bakterientransformation

Um genügend Plasmid-DNA für die Transfektion der zuvor aufgeführten Zellen (Tabelle 1) zu erhalten, wurden Bakterien mit Plasmiden, die die cDNA-Sequenz des Ang II-Typ 1- (AT1) und FLAG-GC-A-Rezeptors sowie der beiden Mutanten der FLAG-GC-A (FLAG-GC-A S487A und S487E) enthalten, transformiert. Anschließend wurde aus diesen Bakterien das jeweils enthaltene Plasmid mittels Plasmidisolation aufgereinigt (siehe 2.2.2).

Hierzu wurden die zur Transformation verwendeten Bakterien (Top10 one shot) auf Eis aufgetaut. Zu 20 µL Bakteriensuspension wurde 1 µg Plasmid-DNA gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte zur Permeabilisierungssteigerung ein 45-sekundiger Hitzeschock bei 42 °C. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden 250 µL vorgewärmtes SOC-Medium (Tabelle 2) zur Suspension zugegeben. Nun wurde dieser Ansatz 45 bis 60 min bei 37 °C geschüttelt. Nach der Inkubation wurden je 10 µL der Bakteriensuspension auf die mit Ampicillin-Antibiotikum (0,06 µg/mL) versetzten Agarplatten ausplattiert. Hingegen wurde bei der Transformation einer Ligation der Ansatz komplett ausplattiert. Die Agarplatten (Tabelle 3) wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 2: Rezept für SOC-Medium**

<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration</b>
Hefe	0,5 % (w/v)
Tryptone	2,0 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
Glukose	20 mM

**Tabelle 3: Rezept für Agarplatten**

<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration</b>
Agar	1,55 % in LB-Medium

Nach dem Autoklavieren wurde der Agar abgekühlt, Ampicillin-Antibiotikum (60 µg/mL) zugegeben und in Platten gegossen.

### 2.2.2 Plasmid isolation

Für die Isolation der Plasmide aus Bakterien (Midi-Präp) wurde eine Vorkultur in 5 mL LB-Medium (Tabelle 4) mit 60 µg/mL Ampicillin durch Animpfen mit einer transformierten Bakterienkolonie angesetzt und diese unter Schütteln für ca. 8 h bei 37 °C inkubiert. Aus der Vorkultur wurde eine Übernachtskultur (200 mL LB-Medium mit 60 µg/mL Ampicillin) hergestellt, die ebenfalls bei 37 °C inkubiert wurde. Die Plasmid isolation erfolgte nach dem Handbuch des Plasmid DNA Purification-Kit der Firma Macherey-Nagel. Anschließend wurde die DNA-

Konzentration im Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 und 320 nm gemessen.

**Tabelle 4: Rezept für LB-Medium**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
Bacto trypt	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
A.dest.	ad 1 L
pH 7,0	
Das Medium wurde autoklaviert.	

## 2.3 Transfektion von HEK 293-Zellen

Um den AT1-Rezeptor in der stabilen FLAG-GC-A-Zelllinie bzw. um in den HEK 293-Zellen FLAG-GC-A oder mutierte FLAG-GC-A zu exprimieren, wurden die entsprechenden Zellen mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert.

Dazu wurden zwei verschiedene Methoden genutzt.

### 2.3.1 Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI)

Diese Methode wurde für die Transfektion von 10 cm-Schalen genutzt. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen ca. 30 – 50 % konfluent und mit DMEM-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt.

Es wurde ein Transfektionsmix (Tabelle 5) bestehend aus Medium ohne FCS und Antibiotika (DMEM/minus), cDNA und PEI hergestellt. Dabei betrug das Verhältnis DNA: PEI 1:3 ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ). Dieser Mix wurde 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend direkt in das Medium gegeben, welches auf den Zellen war. Ein Waschschrift war dabei nicht notwendig. Nach 5 – 10 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte ein Mediumwechsel (DMEM mit 10 % Serum).

**Tabelle 5: PEI-Transfektionsmix für eine 10 cm-Schale**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
DMEM/minus	1 mL
Plasmid-DNA	10 $\mu\text{g}$
PEI (1 mg/mL)	30 $\mu\text{L}$

### 2.3.2 Transfektion mittels FuGene® Transfektionsreagenz

Diese Methode wurde für die Transfektion von 24-Loch-Platten genutzt. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen ca. 30 – 50 % konfluent.

Das FuGene®-Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim) wurde nach Angaben des Herstellers 15 min auf Raumtemperatur erwärmt und vor Gebrauch gut gemischt. In DMEM/minus wurden Plasmid-DNA und FuGene im Verhältnis 1:3 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) zugegeben und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 6). Währenddessen wurde das Medium von den Zellen gesaugt und 500  $\mu\text{L}$  frisches DMEM mit FCS auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung auf die Zellen pipettiert. Zwei Tage nach der Transfektion konnten die Zellen lysiert oder für andere Versuche genutzt werden.

**Tabelle 6: Transfektionsansatz für eine 24-Loch-Platte**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
DMEM/minus	30 $\mu\text{L}$
Plasmid-DNA	0,2 $\mu\text{g}$
FuGene® Transfektionsreagenz	0,6 $\mu\text{L}$

## 2.4 Immunzytochemie

Um die subzelluläre Lokalisation von WT GC-A und FLAG-GC-A vergleichend zu untersuchen, wurden HEK 293-Zellen, die FLAG-GC-A stabil exprimieren bzw. die mit cDNA zur Expression des GC-A WT-Rezeptors transfiziert wurden, und HEK 293-Zellen als Negativkontrolle auf Deckgläsern kultiviert.

Nach 2 Tagen wurde das Medium von den Zellen gesaugt und bei RT folgende Schritte durchgeführt: Nach 15 min Inkubation in der Fixierlösung (Tabelle 7) wurden die Zellen 5 min mit PBS unter leichtem Schwenken gewaschen. Anschließend wurde Tritonlösung zur Permeabilisierung auf die Zellen gegeben und mit dieser 15 min inkubiert. Danach folgten zwei Waschschrte mit PBS und die freien Bindungsstellen wurden für 2,5 h bei 4 °C blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (Tabelle 8) über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 9) für ca. 1 h bei 4 °C. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit Mowiol/DABCO

eingebettet. Mowiol dient dabei als Einbettmittel, DABCO als Antibleichmittel. Die Proteinfärbung wurde nach dem Trocknen mit dem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop (Eclipse E600, Nikon) und einem 60-fachen Öl-Immersionsobjektiv analysiert und die Bilder mit der EZ-C1 Software (Nikon, Version 3.00) bearbeitet.

**Tabelle 7: Lösungen für die Immunfluoreszenz**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Fixierlösung	4 % Paraformaldehyd (w/v)
Tritonlösung	0,2 % Triton X-100 in PBS (v/v)
PBS	137 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl, pH 7,4
Blockierungslösung	5 % FCS in PBS (w/v)
Verdünnungslösung für Antikörper	5 % FCS in PBS
Mowiol/DABCO	6,0 g Glycerin 2,4 g Mowiol 6 mL A.dest. 12 mL 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 25 mg/mL DABCO

**Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper für Immunzytochemie an Zellen**

<b>Zielprotein (Größe)</b>	<b>Generierungsspezies</b>	<b>Verdünnung des Ak</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
α-FLAG	Kaninchen	1:250	Sigma Aldrich, Steinheim
α-GC-A	Kaninchen	1:250	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg (polyklonales Serum)
α-PMCA (5F10)	Maus	1:500	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

**Tabelle 9: Verwendete Fluoreszenz-Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz**

<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Generierungs-spezies</b>	<b>Verdünnung des Ak</b>	<b>Hersteller; Firmensitz</b>
Alexa Fluor 594 Anti-Kaninchen IgG (rot fluoreszierend)	Ziege	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 Anti-Maus IgG (grün fluoreszierend)	Ziege	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe

## **2.5 Inkubation von FLAG-GC-A exprimierenden HEK293 Zellen mit Peptiden zur Desensibilisierung**

Um eine Desensibilisierung des GC-A Rezeptors zu erzielen, wurden FLAG-GC-A exprimierende HEK 293-Zellen mit ANP für eine homologe bzw. FLAG-GC-A und AT1-Rezeptor exprimierende HEK 293-Zellen mit Angiotensin II für eine heterologe Desensibilisierung inkubiert. Dazu wurden die Zellen über Nacht in DMEM ohne FCS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 µM ANP für 60 min bzw. 10 nM Angiotensin II für 15 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> behandelt. Diese Behandlung wurde in Anlehnung an bereits publizierte Protokolle durchgeführt<sup>78, 108, 158</sup>.

Mit diesen Zellen wurden die folgenden Prozeduren der Membranaufreinigung, Immunpräzipitation (IP) und massenspektrometrischen Analysen durchgeführt, um das Phosphorylierungsmuster nach homologer bzw. heterologer Desensibilisierung darzustellen. Für einen Versuch wurden jeweils 15 unbehandelte und 15 mit Peptid behandelte 10 cm-Zellkulturschalen genutzt.

## **2.6 Membranpräparation aus Zellen**

Die Zellmembran wurde von Zytosol- und Kernfraktion getrennt, um eine bessere Aufreinigung der membranständigen GC-A zu erzielen. Hierzu wurde das Medium von den Zellen gesaugt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers (NanoTools, Teningen) mit 1 mL CF-Cyt-Puffer (Tabelle 10) pro 10 cm-Schale bei RT inkubiert und die Lyse unter dem Mikroskop beobachtet. Das Zelllysat

wurde abgenommen und bei 1000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt die Zytosolfraktion und wurde abgenommen. Das Pellet wurde in 1 mL Lysepuffer (1 % Triton X-100) pro Schale gelöst und die Suspension 30 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 2000 g für 10 min bei 4 °C, um Zelltrümmer und Zellkerne zu entfernen. Der Überstand enthielt nun die Zellmembranfraktion, mit welcher die Immunpräzipitation durchgeführt wurde. Zuletzt wurde das Pellet zur Kontrolle der Membranpräparation in PBS aufgenommen, um die Kernfraktion zu erhalten.

Von den einzelnen Schritten wurden jeweils Aliquots für eine Überprüfung der Methode mittels Western Blot aufbewahrt.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen der Membranpräparation**

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
CF-Cyt-Puffer	käuflicher Puffer mit unbekannter Zusammensetzung der Firma NanoTools (Teningen) zur Extraktion der zytosolischen Fraktion Zugabe von: Protease-Inhibitoren Complete Mini® (Roche Applied Sciences), 1 Tablette/10 mL Phosphatase-Inhibitoren PhosStop® (Roche Applied Sciences), 1 Tablette/10 mL
Membran-Lysepuffer (1% Triton X-100)	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton X-100 (v/v) 2,5 mM Natriumpyrophosphat 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> Protease-Inhibitoren Complete Mini® (Roche), 1 Tablette/10 mL Phosphatase-Inhibitoren PhosStop® (Roche), 1 Tablette/10 mL

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS	137 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl pH 7,4

## 2.7 Immunpräzipitation

### 2.7.1 Immunpräzipitation des FLAG getaggenen GC-A Rezeptors

Für die Immunpräzipitation (IP) von FLAG-GC-A aus stabil exprimierenden HEK 293-Zellen wurden für eine 10 cm-Zellkulturschale 40 µL Agarose-Suspension mit gebundenem anti-FLAG-Antikörper benutzt (M2-Agarose, Sigma-Aldrich, Steinheim). Die Agarose wurde dreimal mit PBS gewaschen und danach jeweils bei 2000 g für 30 s bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen die Inkubation der Agarose in einer Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA; 10 mg/mL in PBS) für 15 min unter leichter Rotation. Danach wurde die Agarose wiederum zentrifugiert und zur Membranfraktion der FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen (siehe Punkt 2.6) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h unter leichter Rotation wurden die an die Agarose gebundenen Immunkomplexe dreimal mit Lysepuffer (1 % Triton X-100, Tabelle 10) gewaschen. Die Elution erfolgte mit synthetischem 3x FLAG-Peptid (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK, 600 µL/mL PBS, 100 µL pro Kulturschale) 30 min lang unter leichtem Schütteln bei 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig von der Agarose abgenommen und für weitere Experimente genutzt.

Von den einzelnen Schritten wurden jeweils Aliquots für eine Überprüfung der Methode mittels Westen Blot aufbewahrt.

### 2.7.2 Aufreinigung des polyklonalen GC-A-Antikörpers aus Kaninchenserum

Um endogen exprimierte GC-A mittels IP aufzureinigen zu können, wurde ein affinitätsaufgereinigter GC-A-Antikörper benötigt. Zur Aufreinigung des polyklonalen GC-A Antikörpers, der gegen das C-terminale Ende des GC-A-Rezeptors (Epitop: CKGKVRTYWLLGERGSSTRG) gerichtet ist, wurden Säulen der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH benutzt. Diese bestanden aus einer Gelmatrix, an die das antigene Peptid gekoppelt war,

gegen das der Antikörper gerichtet ist. 2 mg Peptid waren an 1 mL Matrix gebunden. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und wurde wie folgt durchgeführt.

0,5 mL der Säulenmatrix wurden mit PBS equilibriert und 7,5 mL des Kaninchenserums mit dem gleichen Volumen PBS verdünnt. Nun wurden Serum und Säulenmatrix in ein 15 mL Falcon-Röhrchen gefüllt und über Nacht bei 4 °C langsam rotiert. Anschließend wurde die Säulenmatrix mit Serum wieder in die Säule gefüllt und der Durchfluss nochmals auf die Säule gegeben. Danach wurde die Säule dreimal mit 10 mL PBS und zweimal mit Natriumphosphatpuffer (Tabelle 11) gewaschen. Der gereinigte Antikörper wurde nun mit 10 x 0,5 mL Glycinpuffer eluiert und in Eppendorf-Röhrchen gesammelt. Jede Fraktion wurde mit 35 µL Kaliumphosphatpuffer versetzt, um einen pH-Wert von 7 einzustellen, und auf Eis gelagert. Der pH-Wert wurde mit pH-Stäbchen überprüft, der gereinigte Antikörper aliquotiert und mit gleichem Volumen Glycerin versetzt. Zuletzt wurde Natriumazid in einer Endkonzentration von 0,05 % (w/v) zu den Antikörperlösungen gegeben und die Aliquots bei -80 °C gelagert. Die Fraktionen wurden mittels Western Blot auf ihre Spezifität überprüft. Für Western Blot- und IP-Experimente wurden die Fraktionen 1 bis 5 genutzt.

Um die Säulenmatrix zu regenerieren, wurde diese einmal mit 10 mL Natriumphosphatpuffer, dann zweimal mit 10 mL Regenerationspuffer 1 und anschließend zweimal mit 10 mL Regenerationspuffer 2 gewaschen und in diesem gelagert.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer für die Aufreinigung des GC-A-Antikörpers**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Natriumphosphatpuffer	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6,8
Glycinpuffer	0,1 M Glycin pH 2,4
Kaliumphosphatpuffer	2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Regenerationspuffer 1	1 M NaCl in PBS
Regenerationspuffer 2	0,05 % NaN <sub>3</sub> (w/v) in PBS

### 2.7.3 Immunpräzipitation des GC-A Rezeptors

Für die IP des endogen exprimierten GC-A-Rezeptors aus MA-10 Leydig-Zellen<sup>154</sup> wurden 100x 10 cm-Zellkulturschalen mit konfluent gewachsenen Zellen der Passage 13 verwendet. Für diese Menge wurden 2 mL Protein-A-Agarose genutzt. Diese wurden abzentrifugiert und zusammen mit 250 µL GC-A-Antikörperlösung und 1 mL PBS 2 h bei 4 °C unter leichtem Rotieren inkubiert. Anschließend wurde die Protein-A-Agarose zweimal mit PBS gewaschen, um eventuell ungebundenen Antikörper zu entfernen.

Die Zellfraktionierung erfolgte wie unter 2.6 beschrieben. Die Membranfraktion wurde mit 2 mL Protein-A-Agarose zuerst für 45 min bei 4 °C vorinkubiert und nach Zentrifugation wurde die Agarose mit unspezifisch haftenden Proteinen entfernt. Anschließend wurde zu der Membranfraktion (siehe 2.6) die Protein-A-Agarose mit gebundenem GC-A-Antikörper gegeben und für 3 h bei 4 °C unter leichtem Rotieren inkubiert. Die an die Agarose gebundenen Immunkomplexe wurden pelletiert und dreimal mit Lysepuffer (1 % Triton X-100, Tabelle 10) gewaschen. Die Elution erfolgte mittels pH-Shift. Dazu wurden 1,5 mL Elutionspuffer (Tabelle 12) zu der Agarose gegeben und 10 min bei RT unter leichtem Schütteln eluiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit den eluierten Proteinen abgenommen und mit 135 µL Neutralisationspuffer (Tabelle 12) versetzt, um einen neutralen pH-Wert von 7,0 einzustellen. Damit eine vollständige Elution erreicht werden konnte, wurde die Agarose nochmals mit 0,75 mL Elutionspuffer inkubiert (danach Zugabe von 67,5 µL Neutralisationspuffer).

Für die Aufreinigung des endogen exprimierten GC-A Rezeptors aus MyEnd-Zellen<sup>157</sup> wurden 45x 10 cm konfluent bewachsene Kulturschalen mit Zellen der Passage 19 benutzt. Zur Entfernung unspezifisch an der Agarose haftenden Proteinen wurde die Membranfraktion erst mit 800 µL Protein-A-Agarose vorinkubiert. Anschließend wurde die Membranfraktion mit 800 µL Protein-A-Agarose inkubiert, an welche zuvor 100 µL affinitätsaufgereinigter GC-A-Antikörper (Proteinkonzentration 1,8 µg/µL) gekoppelt wurden. Die Elution erfolgte mit 0,5 mL Elutionspuffer und das Eluat wurde anschließend mit 65 µL Neutralisationspuffer versetzt. Auch hierbei wurde zur vollständigen Elution die Agarose nochmals mit 0,25 mL Elutionspuffer inkubiert (Zugabe von 32 µL Neutralisationspuffer).

Von den einzelnen Schritten wurden wiederum Aliquots für eine Überprüfung der Methode mittels Westen Blot aufbewahrt.

**Tabelle 12: Puffer für die Immunpräzipitation mit  $\alpha$ GC-A-Antikörper**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Elutionspuffer	0,1 M Glycin pH 2,5 (HCl)
Neutralisationspuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 9,5 1,5 M NaCl

## 2.8 Western Blot-Analysen

### 2.8.1 Zielproteine und verwendete Antikörper

**Tabelle 13: Verwendete Primärantikörper**

<b>Zielprotein (Größe)</b>	<b>Generierungsspezies</b>	<b>Verdünnung des Ak</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
FLAG (gekoppelt an GC-A, + 130 kDa)	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
GC-A (130 kDa)	Kaninchen	1:1000	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg (polykonales Serum)
PMCA, Klon 5F10 (150 kDa)	Maus	1:500	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
ERK 1/2 (42 und 44 kDa)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt/Main
AT1-Rezeptor (43 kDa)	Kaninchen	1:100	Santa Cruz, Heidelberg

**Tabelle 14: Verwendete Sekundärantikörper**

<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Generierungsspezies</b>	<b>Verdünnung des AK</b>	<b>Hersteller; Firmensitz</b>
Anti-Maus IgG (HRP)	Kaninchen	1:10000	Bio Rad Hercules, USA
Anti-Kaninchen IgG (HRP)	Ziege	1:10000	Bio Rad, Hercules, USA

### 2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Verfahren bestimmt. Die Absorption der Proteine in der BCA-Lösung wurde bei 562 nm im Spektralphotometer bestimmt und mittels Eichkurve wurde die Konzentration der Proben errechnet.

### 2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher und denaturierender SDS-PAGE. Das Gelsystem bestand aus einem 5%igem (w/v Acrylamid/ N,N'Methylenbisacrylamid) Sammelgel und einem 8%igem (w/v Acrylamid/ N,N'Methylenbisacrylamid) Trenngel (Tabelle 15).

Von jeder Fraktion eines IP-Experimentes wurde die gleiche Proteinmenge abgenommen, mit Lämmli <sup>159</sup> versetzt und 15 min bei 72 °C inkubiert. Die Proben und ein Proteinmarker wurden aufgetragen und die Elektrophorese mit 50 V gestartet. Nach Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 200 V erhöht.

**Tabelle 15: Zusammensetzung der Lösungen für SDS-PAGE**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Trenngel (8 %)	27 % (v/v) Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 25 % (v/v) 1 M Tris-HCl (pH 8.8) 0,1 % (w/v) SDS 0,06 % (v/v) TEMED 0,1 % (w/v) APS
Sammelgel (5 %)	16,5 % Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 12,5 % 1 M Tris-HCl (pH 6.8) 0,1 % SDS 0,05 % TEMED 0,1 % APS
Laufpuffer	25 mM Trizma Base 0,2 % SDS 192 mM Glycin
1x Lämmli	65 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % SDS 5 % (v/v) Glycerol 0,001 % (w/v) Bromphenolblau 3 % (v/v) β-Mercaptoethanol

#### 2.8.4 Immundetektion von Proteinen (Western Blot-Verfahren)

Um das GC-A-Protein und Markerproteine aus den jeweiligen Zellfraktionen mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen, wurden die Proteine aus dem Gel mittels Semi-Dry-Methode auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde ein Sandwich aus 2 Whatman-Papieren, Nitrocellulosemembran, Gel und abschließend wieder 2 Whatman-Papieren aufgebaut und in die Blotkammer gelegt. Alle Bestandteile wurden gut in Transferpuffer getränkt (Tabelle 16) und vorhandene Luftblasen zwischen den Schichten entfernt. Die Blotkammer wurde geschlossen und die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm<sup>2</sup> Gel und einer Laufzeit von 1 h elektrophoretisch auf die Membran übertragen.

Der Transfer wurde anschließend mit einer Ponceau-S-Färbung überprüft. Nach Entfärben der Membran in TBS-T wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer BSA- oder Milch-Lösung für mindestens 30 min geblockt (Tabelle 16). Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit Primärantikörper (Tabelle 13) bei 4 °C über Nacht unter leichtem Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T zum Entfernen ungebundener Primärantikörper erfolgte die Inkubation der Membran mit Sekundärantikörper (Tabelle 14) für ca. 2 h bei RT unter leichtem Schütteln. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Visualisierung der Proteine mittels Chemilumineszenz. Dabei wurde das Substrat ECL durch die Meerrettich-Peroxidase, welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, umgesetzt. Nach 2 – 10 min Belichtungszeit wurde der Röntgenfilm in der Entwicklerlösung geschwenkt. Die Entwicklung der Proteinbanden wurde durch Schwenken des Röntgenfilms in Fixierlösung gestoppt.

**Tabelle 16: Zusammensetzung der Lösungen für das Western Blot-Verfahren**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Transferpuffer	25 mM Trizma Base 20 % (v/v) Methanol 192 mM Glycin
Ponceau-S-Färbung	5 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Ponceau S
10x TBS	198 mM Trizma Base 946 mM NaCl pH 7.4
TBS-T	0,1 % Tween® 20 (v/v) in TBS
BSA-Lösung	5 % (w/v) BSA in TBS-T

Lösungen	Zusammensetzung
Milch-Lösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
Entwicklerlösung	103 mM Hydrochinon 987 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Fixierlösung	20 % (v/v) Fixierer in A.dest.

### 2.8.5 Auswertung der Western Blots mittels ImageJ

Die Proteinexpression wurde über die Schwarz-Weiß-Intensität mit dem Programm ImageJ (Freeware, NIH, Bethesda, MD, USA) quantifiziert. Dabei wurde das Hintergrundsignal von den Signalen der immunreaktiven Proteine abgezogen.

## 2.9 Detektion von Proteinen in SDS-Gelen

Zur Detektion von Proteinbanden in Gelen wurden zwei Methoden verwandt. Geringe Proteinmengen wurden mittels Silberfärbung<sup>160</sup> und größere Proteinmengen durch die kolloidale Coomassie-Färbung<sup>161</sup> nachgewiesen.

### 2.9.1 Silberfärbung

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für mindestens 1 h fixiert. Anschließend erfolgten 3 Waschschrte für jeweils 20 min, zweimal mit 30%igem Ethanol und einmal mit A.dest. Es erfolgte die Sensibilisierung (Tabelle 17) für 1 min und danach wurde dreimal 20 s mit A.dest. gewaschen. Das Gel wurde 30 min bei 4 °C gefärbt und anschließend gewaschen. Die nachfolgende Entwicklungsdauer betrug je nach Färbungsintensität der Proteinbanden ca. 3 – 5 min. Zuletzt wurde das Gel 20 s in A.dest. gewaschen und die Färbung gestoppt.

**Tabelle 17: Lösungen für Silberfärbung<sup>160</sup>**

Lösungen	Reagenzien
Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Sensibilisierungslösung	0,02 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O
Färbelösung	0,2 % (w/v) AgNO <sub>3</sub>
Entwicklungslösung	3 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,05 % (v/v) Formaldehyd
Stopplösung	0,05 M EDTA

### 2.9.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

Das Gel wurde in einem Plastikgefäß ausreichend mit der Coomassie-Lösung (Tabelle 18) bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Entfärben des Hintergrundes erfolgte mit A.dest. Sobald dieses bläulich gefärbt war, wurde das Wasser gewechselt.

Für die Färbelösung wurden erst Methanol, Phosphorsäure und Coomassie G-250 in einem Messzylinder gegeben und etwas Wasser dazugegeben. Nach und nach wurde das Ammoniumsulfat zugesetzt und so lange gerührt, bis das Ammoniumsulfat gelöst war. Erst danach wurde mit A.dest. auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

**Tabelle 18: Rezept für Coomassie G-250-Färbung** <sup>161</sup>

Reagenz	Konzentration
Methanol	34 % (v/v)
Phosphorsäure (89%ig)	2 % (v/v)
Ammoniumsulfat	17 % (w/v)
Coomassie G-250	0,066 % (w/v)

## 2.10 Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie

### 2.10.1 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure

Um die immunpräzipitierten Proteine der Elutionsfraktionen der anti-FLAG- bzw. anti-GC-A-IPs komplett in einem SDS-Gel auftrennen zu können, wurden diese zunächst mittels Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Hierfür wurde eine 72%ige TCA-Lösung in einem Endvolumen von 1/5 (v/v) zu jeder Probe gegeben. Nach einer 30- minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe mit 16.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 0,5 mL eiskaltem Aceton gewaschen und nochmals für 10 min zentrifugiert. Nach der Trocknung des Pellets für 5 – 10 min bei 37 °C wurde eine entsprechende Menge Lämmli-Puffer zugegeben und die somit konzentrierten Proteine der Probe für 15 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe in einem SDS-Gel (siehe 2.8.3) aufgetrennt. Dieses Prozedere wurde in der AG Prof. Sickmann zur Detektion von Phosphorylierungsstellen validiert.

### 2.10.2 Proteolytischer in-Gel Verdau mit Trypsin

Die zu analysierenden Gelbanden wurden ausgeschnitten und in Verdauröhrchen überführt. Um Puffersalze und Farbstoffe zu entfernen, wurden

die Gelbanden in der Pufferreihenfolge ABAB jeweils 10 min bei 37 °C gewaschen (Tabelle 19). Anschließend wurden die Proben mittels Dithiothreitol (DTT) reduziert und mittels Iodacetamid (IAA) alkyliert, um Disulfidbrücken zu zerstören sowie durch Anlagerung einer Carboxyaminomethylgruppe an die freien Schwefelatome eine erneute Ausbildung dieser zu verhindern. Dieser Prozess ist essentiell, damit das proteolytische Enzym Trypsin die Proteine ungehindert nach den Aminosäuren Lysin und Arginin schneiden kann. Darauf folgten erneut Waschschrte in der Reihenfolge ABAB. Nun wurden die Gelstücke unter Vakuum getrocknet, damit der Verdau puffer komplett aufgesaugt werden konnte. Anschließend wurden 10 µL Verdau puffer auf die Proben gegeben und diese bei 4 °C quellen gelassen. Als die Gelstückchen klar waren, wurde der Überstand abgenommen und die Proben über Nacht bei 37 °C verdaut. Anschließend erfolgte die Extraktion der tryptischen Peptide in drei Schritten. Dabei wurden die Gelstücke jeweils 15 min bei 37 °C inkubiert und die Extrakte anschließend abgenommen. Danach wurden diese vereint, ca. 5 min unter Vakuum eingeeengt, um das Acetonitril zu entfernen, und mit 0,1 % TFA auf 15 µL aufgefüllt. Diese Proben wurden für Übersichtscans genutzt, mit denen alle in der Probe enthaltenen Peptide analysiert und den entsprechenden Proteinen zugeordnet werden (siehe auch 1.3.5).

Um phosphorylierte Peptide anzureichern, wurden die Peptidextrakte mit TiO<sub>2</sub> behandelt (siehe 2.10.3).

**Tabelle 19: Lösungen für den proteolytischen in-Gel Verdau mit Trypsin**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Waschpuffer A	50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
Waschpuffer B	50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , 50 % Acetonitril
Reduktionspuffer	10 mM DTT in Waschpuffer A
Alkylierungspuffer	5 mM IAA in Waschpuffer A
Verdau puffer	12,5 ng/µL Trypsin Gold (Mass Spectrometry Grade) in Waschpuffer A
Extraktionspuffer	1. 15 µL 0,1 % TFA 2. 15 µL 0,1 % TFA 3. 15 µL 0,1 % TFA, 50 % Acetonitril

### 2.10.3 TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie

Zur Anreicherung von phosphorylierten Peptiden von aufgereinigten und verdauten Proben aus FLAG-GC-A exprimierende HEK 293-Zellen wurden die phosphorylierten Peptide aus der extrahierten Peptidlösung mittels TiO<sub>2</sub> durch Adsorption angereichert. Dazu wurde die Peptidlösung eingeeengt und anschließend mit Ladepuffer (Tabelle 20) versetzt. Pro Bande wurden 200 µg TiO<sub>2</sub> eingesetzt, welches zuvor 15 min unter leichtem Schütteln in Ladepuffer inkubiert wurde. Anschließend wurde die entsprechende Menge an TiO<sub>2</sub>-Lösung zu den Proben gegeben. Zusätzlich wurden je 2 pmol der Phospho-Standards NSLVTQDDpTFKDK und DIGpSEpSTEDQAMEDIK zugegeben. Zur Entfernung ungebundener Peptide wurde nach einer Inkubationszeit von 1 h das TiO<sub>2</sub> mit den gebundenen phosphorylierten Peptiden je zweimal in Ladepuffer, Waschpuffer und 0,1% TFA gewaschen. Dabei wurden das TiO<sub>2</sub> jeweils bei 16.000 g für 1 min bei 4 °C pelletiert, wodurch der Überstand problemlos entfernt werden konnte. Die Elution der Phosphopeptide erfolgte mit drei verschiedenen Elutionspuffern (Elutionspuffersystem A). Da diese stark alkalisch waren, wurden die Proben anschließend mit Ameisensäure auf pH 3 – 4 angesäuert.

Zur Anreicherung von geringen Mengen von phosphorylierten Peptiden, wie es bei der Analyse der endogen exprimierten GC-A aus MA-10 und MyEnd Zellen der Fall war, wurden TiO<sub>2</sub>-Tips verwendet. Die Säulen wurden anfangs zweimal mit 20 µL Ladepuffer gewaschen und bei 3000 g für 2 min zentrifugiert. Die fast bis zur Trockne eingeeengte Probe wurde in 65 µL Ladepuffer aufgenommen, auf die Säule gegeben und bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend nochmals viermal auf die Säule gegeben und für jeweils 2 min zentrifugiert. Das Waschen der Säule erfolgte zweimal mit 20 µL Ladepuffer und viermal mit 20 µL Waschpuffer mit jeweils anschließender 2-minütiger Zentrifugation bei 3000 g. Die phosphorylierten Peptide wurden letztlich in drei Schritten (je 20 µL) eluiert (Elutionspuffersystem B) und die Eluate vereint. Nach dem ersten Elutionsschritt wurden zum Ansäuern der Probe 10 µL Ameisensäure zugegeben.

**Tabelle 20: Zusammensetzung der Lösungen zur TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Ladepuffer	80 % (v/v) Acetonitril 2,5 % (v/v) TFA kalt gesättigt mit Phthalsäure

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Waschpuffer	80 % Acetonitril 0,1 % TFA
Elutionspuffersystem A (für Proben aus FLAG-GC-A überexprimierenden HEK 293-Zellen)	1. 200 mM NH <sub>4</sub> OH 30 % Acetonitril 2. 300 mM NH <sub>4</sub> OH 30 % Acetonitril 3. 400 mM NH <sub>4</sub> OH 30 % Acetonitril
Elutionspuffersystem B (für Proben aus endogenen GC-A exprimierenden Zelllinien mittels TiO <sub>2</sub> -Tips)	1. 250 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 9,3 2. 125 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 14 µL Phosphosäure/5 mL pH 10,5 3. 400 mM NH <sub>4</sub> OH
Phospho-Standard NSLVTQDDpTFKDK	2 pmol pro Probe MW 1590,70 pg/pmol
Phospho-Standard DIGpSEpSTEDQAMEDIK	2 pmol pro Probe MW 1927,69 pg/pmol

#### 2.10.4 Massenspektrometrische Analyse mittels ESI-MS

Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit der AG Prof. Sickmann durchgeführt. In dieser Arbeit wurde als nano-LC-ESI-MS-System mit einem Qtrap 4000 System, einem QStar Elite System und einem Orbitrap XL Massenanalysator gearbeitet. Während der Orbitrap XL Massenanalysator an ein Ultimate 3000 System gekoppelt war, waren die beiden anderen Systeme online an ein Ultimate HPLC-System gekoppelt. Es wurden die unterschiedlichen Vorteile der drei Massenanalysatoren für unterschiedliche Anwendungen genutzt. Durch die tQuad-Struktur konnte das Qtrap-System sowohl als Massenanalysator als auch für den spezifischen Scan-Modus MRM eingesetzt werden. Das QStar Elite System zeichnet sich durch eine hohe Massengenauigkeit im MS und MS/MS-Modus aus, wobei die Scangeschwindigkeit dieses Systems die Niedrigste aller genutzten Systeme war. Ein weiterer Vorteil gegenüber dem Orbitrap-System ist, dass die Fragmentierung nicht in der Ionenfalle stattfindet, wodurch die MS/MS-Spektren der Phosphopeptide nicht so stark durch einen Neutralverlust dominiert werden. Das Orbitrap-System mit der höchsten Sensitivität und mit einer hohen

Massengenauigkeit im MS-Modus wurde für die Analysen der endogen exprimierten GC-A aus MA-10 Leydig und MyEnd-Zellen genutzt. Im Folgenden werden die einzelnen Analyseverfahren näher beschrieben.

### 2.10.5 Nano-LC

Exemplarisch sollen hier die nano-LC Auftrennungparameter für das Qtrap 4000-System dargestellt werden. Die Proben wurden zuerst in 15  $\mu$ L 0,1 % TFA auf eine C18-Vorsäule gespült, um entsalzt und aufkonzentriert zu werden. Anschließend wurde die Probe über eine Hauptsäule in einem binären Gradienten aufgetrennt. Die Puffer für den Gradienten bestanden aus 0,1 % Ameisensäure (Puffer A) und 0,1 % Ameisensäure/84 % Acetonitril (Puffer B). Die hauptsächlich genutzten Gradienten sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Die Flussrate in der Vorsäule betrug 6 – 10  $\mu$ L/min und in der Hauptsäule 200 – 300 nL/min.

**Tabelle 21: HPLC-Gradienten für MS/MS und MRM**

<b>Gradient</b>	<b>Minute</b>	<b>Puffer B</b>
60 min Gradient	0 - 5	5 %
	5 - 48	5 - 50 % (linearer Anstieg)
	48 - 49	50 - 95 % (linearer Anstieg)
	49 - 52	95 %
	52 - 60	5 %
145 min Gradient	0 - 20	5 %
	20 - 109	5 - 50 % (linearer Anstieg)
	109 - 126	50 - 95 % (linearer Anstieg)
	126 - 136	95 %
	136 - 145	5 %

### 2.10.6 MS/MS

Für Messungen auf den verschiedenen MS-Systemen wurden Übersichtsscans in einem Bereich von 350 bis 2000 m/z akquiriert. Die vier (Qtrap 4000) bzw. drei (QstarElite) intensivsten Mutterionen wurden für ein nachfolgendes MS/MS-Experiment ausgewählt, wobei ein dynamisches Ausschlussverfahren verwendet wurde. Dadurch konnte der dynamische Bereich einer Analyse verbessert werden indem Mutterionen, die bereits analysiert wurden, in den nächsten 20 s nicht erneut fragmentiert wurden.

MS-Scans auf dem Orbitrap XL System wurden mit einer Auflösung von 60.000 akquiriert, wobei Polyzyklodimethylsiloxan  $[(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6\text{H}^+]$  mit  $m/z$  445,120030 als sogenannte „lock mass“ genutzt wurde<sup>142</sup>. Die fünf intensivsten Ionen wurden für nachfolgende MS/MS-Experimente fragmentiert. Dabei wurde in dem Modus Multistage Activation (MSA) mit Neutralverlusten bei  $m/z = 49$   $[(\text{H}_3\text{PO}_4)^{2+}]$ ,  $m/z = 58$   $[(\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O})^{2+}]$ ,  $m/z = 98$   $[(2 \times \text{H}_3\text{PO}_4)^{2+}]$  und  $m/z = 107$   $[(2 \times \text{H}_3\text{PO}_4 + 1 \times \text{H}_2\text{O})^{2+}]$  gearbeitet.

### 2.10.7 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

In diesem speziellen Scan-Modus dienen der erste und der dritte Quadrupol (Q1 und Q3) des Qtrap 4000-Systems als Massefilter. Nur Ionen mit einem vorher definierten  $m/z$ -Verhältnis können Q1 passieren und anschließend im zweiten Quadrupol (Q2) fragmentiert werden. Mutterionen, die keines der vordefinierten  $m/z$ -Verhältnisse aufweisen, hatten einen instabilen Flug und gelangten dadurch nicht in Q2. Letztlich wurden nach der Fragmentierung die Ionen sequenziell an Q3 gescannt, welcher ebenfalls als Massefilter diente.

Aus den zuvor erhaltenen Spektren aus MS/MS-Läufen wurden für jedes detektierte phosphorylierte GC-A Peptid jeweils 3 – 5 der intensivsten Ionenpeaks als spezifische  $m/z$ -Übergänge ausgewählt. Diese wurden dabei so gewählt, dass die jeweiligen Phosphorylierungsstellen damit eindeutig identifiziert werden können.

Zusätzlich wurden die nicht phosphorylierten, synthetischen Peptide VGGHAAEYGAELER, TEREDLIAYLK, VKVDEVGGEALGR und EFTPVLQADFQK kurz vor der Messung zugegeben, um die Messgenauigkeit, die Varianz und die Spraystabilität des Systems zu überprüfen.

Ein wichtiges Merkmal für die Fragmentierung der Ionen ist die Kollisionsenergie (CE), die nach folgenden Gleichungen für 2- und 3-fach positiv geladene Ionen berechnet wurde:

$$\text{2-fach geladene Ionen} \quad \text{CE} = (0,05 * m/z\text{-Verhältnis}) + 5$$

$$\text{3-fach geladene Ionen} \quad \text{CE} = (0,04 * m/z\text{-Verhältnis}) + 3$$

Die verwendeten  $m/z$ -Übergänge und Kollisionsenergien sind in Tabelle 40 (Anhang 8.1) dargestellt.

## 2.10.8 Datenauswertung

### 2.10.8.1 Auswertung der LC-MS-Daten

Zur Auswertung der LC-MS-Spektren wurde Mascot™ als Suchalgorithmus für Datenbanksuchen genutzt. Die Roh-Daten wurden vorher mittels entsprechender Softwaretools umgewandelt. Für die Datenbanksuche wurden die in Tabelle 22 gelisteten Parameter genutzt.

**Tabelle 22: Parameter für Datenbanksuche mittels Mascot Daemon**

<b>Mascot Daemon Parameter</b>	<b>Qtrap 4000</b>	<b>QstarElite</b>	<b>Orbitrap XL</b>
Datenbank	Swiss-Prot (Nov. 2009: 512994 Einträge)	Swiss-Prot (Nov. 2009: 512994 Einträge)	IPI-Mouse (Okt.2009: 65775 Einträge)
Enzym	Trypsin	Trypsin	Trypsin
Taxonomie	Rattus (7449 Sequenzen)	Rattus (7449 Sequenzen)	all entries
Feste Modifikationen	Carbamidomethyl (C)	Carbamidomethyl (C)	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifikationen	Oxidation (M), Phospho (STY)	Oxidation (M), Phospho (STY)	Oxidation (M), Phospho (STY)
Peptid-Ladung	2+ und 3+	2+ und 3+	2+ und 3+
Peptid-Toleranz	0,4 Da	0,25 Da	10 ppm
MS/MS-Toleranz	0,4 Da	0,5 Da	0,5 Da
#13C	0	0	1
Max. überlesene Schnittstellen	2	2	1
Instrument	ESI-4-SECTOR	ESI-QUAD-TOF	ESI-TRAP

### 2.10.8.2 Auswertung der MRM-Daten

Die MRM-Daten wurden mit dem Programm MultiQuant Version 1.0.0.1 (Applied Biosystems) evaluiert. Die Peakflächen-Zuordnung wurde für jeden m/z-Übergang auf korrekte Retentionszeit manuell überprüft und die Peakflächen sowie die zugehörige Retentionszeit in Excel2003 (Microsoft) exportiert. Zur relativen Quantifizierung wurden die Peakflächen der einzelnen m/z-Übergänge eines Peptides addiert. Die dargestellten Ergebnisse ergaben sich aus dem Verhältnis von ANP-vorbehandelten zu unbehandelten Proben.

## 2.11 Mutation der Aminosäure S487

### 2.11.1 PCR-Mutagenese

Um die funktionelle Bedeutung der neu gefundenen Phosphorylierungsstelle an Serin 487 zu untersuchen, wurde das Serin zu Alanin bzw. Glutamat mutiert<sup>78</sup>. Dabei wurde der FLAG-GC-A Rezeptor in dem pCMV5-Expressionsvektor als Matritze genutzt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 23 aufgeführt. Es wurden zuerst vier unabhängige PCRs (Tabelle 24) mit 10 ng Matritzen-DNA, dem jeweiligen Oligonukleotidpaar und der Taq DNA-Polymerase angesetzt (Tabelle 25). In Tabelle 26 ist der PCR-Ablauf dargestellt. In allen PCR-Abläufen wurde den Proben Q-Solution zugesetzt, um die Amplifikation GC-reicher Sequenzen zu erleichtern.

**Tabelle 23: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide**

Name	Sequenz	Tm [°C]
S487A/E fwd I	5'-CTG GCC TCT GGG ATA TCC ACC TC-3'	66,0
S487A rev I	5'-GTG GCG TTC TTA TGC GCT GGG CTG CAA GTC CTC CCA GCG CAC-3'	80,2
S487A fwd II	5'-GCA TTA GAA CGC CAC TTA CGG AGC GCT GGC AGC CGG CTG ACC-3'	80,2
S487A/E rev II	5'-CTT AGG GCA ATC TCC TGC AGG ATG-3'	64,4
S487E rev I	5'-GTG GCG TTC TAA CTC GCT GGG CTG CAA GTC CTC CCA GCG CAC-3'	80,2
S487E fwd II	5'-GAG TTA GAA CGC CAC TTA CGG AGC GCT GGC AGC CGG CTG ACC-3'	80,2

**Tabelle 24: PCRs für Ser487 Mutation mit eingesetzten Oligonukleotidpaaren**

PCR	eingesetztes Primerpaar
I	Oligonukleotid S487A/E fwd I und S487A rev I
II	Oligonukleotid S487A fwd II und S487A/E rev II
III	Oligonukleotid S487A/E fwd I und S487E rev I
IV	Oligonukleotid S487E fwd II und S487A/E rev II

**Tabelle 25: PCR-Ansatz für Mutation an S487**

Lösung	20 µL Ansatz
PCR-Wasser	11,6 µL
10x PCR Reaktionspuffer	2,0 µL
dNTP (10 mM)	0,2 µL

<b>Lösung</b>	<b>20 µL Ansatz</b>
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,6 µL
5x Q-Solution	4,0 µL
Oligonukleotid (S487A fwd I / S487A fwd II)	20 pM
Oligonukleotid (S487A rev I / S487A rev II)	20 pM
Taq (5 U/µL)	0,2 µL
DNA (10 ng/µL)	1,0 µL

**Tabelle 26: Programm für die ersten vier unabhängigen PCRs zur Mutation des Serin 487**

<b>PCR-Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	} 30
Annealing	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	3 min	1

Durch diese PCRs wurden vier DNA-Fragmente erzeugt, die jeweils an den Oligonukleotiden 2 und 3 (Alanin-Mutation) bzw. 5 und 6 (Glutamat-Mutation) überlappen. In dieser Überlappung wurde Serin gegen Alanin bzw. Glutamat mutiert. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA mittels Extraktions-Kit (Macherey-Nagel, Düren) aus dem Gel extrahiert und in 40 µL PCR-Wasser eluiert. In einer weiteren PCR (Tabelle 27) wurden die Produkte der PCR I (250 bp) und II (650 bp) fusioniert, um einen DNA-Strang zu generieren, der die Alanin-Mutation trägt. Durch eine analoge Fusion der PCR-Produkte III und IV wurde ein DNA-Strang mit der Glutamat-Mutation generiert.

**Tabelle 27: Ansatz für Fusions-PCR**

<b>Lösungen</b>	<b>50 µL Ansatz</b>
DNA I bzw. III	1,0 µL
DNA II bzw. IV	1,0 µL
dNTP (10 mM)	1,0 µL
10x PCR Reaktionspuffer	5 µL
5x Q-Solution	10 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µL
PCR-Wasser	30,5 µL
Taq (5 U/µL)	0,25 µL

Das PCR-Programm (Tabelle 28) wurde in diesem Fall so gewählt, dass zuerst zehn Zyklen ohne Oligonukleotide durchlaufen wurden, damit sich die DNA-Fragmente I und II bzw. III und IV an ihren komplementären Enden zusammenlagern konnten. Nach Abkühlung auf 4 °C wurden je 20 pM der Oligonukleotide S487A/E fwd I und S487A/E rev II und nochmals 1,25 U Taq zugegeben und die Reaktion für weitere 25 Zyklen durchgeführt.

**Tabelle 28: PCR-Programm für die Fusion der DNA-Fragmente I und II bzw. III und IV**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	45 s	} 10
Annealing	50 °C	2 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Pause	4 °C	Zugabe von 20 pM Oligonukleotide und 1,25 U Taq	
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	45 s	} 25
Annealing	55 °C	45 s	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

### 2.11.2 DNA-Fällung mittels Chloroform/Isoamylalkohol

Um das fusionierte PCR-Produkt (897 bp) zu reinigen, wurde dieses mit Chloroform/Isoamylalkohol gefällt. Dazu wurden 50 µL PCR-Mix mit 50 µL Chloroform/Isoamylalkohol (49/1) gemischt. Nach Zentrifugation bei 10.000 g für 5 min bei 4 °C wurde die obere Phase abgenommen. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 0,1 Volumenanteile 3 M Natriumacetat, pH 5, und 2,5 Volumenanteile Ethanol (100%, eiskalt) 30 min bei -20 °C präzipitiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 g für 8 min bei RT. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 µL 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10.000 g, 3 min, RT) wurde das Pellet im Vakuum getrocknet und anschließend in 20 – 25 µL PCR-Wasser aufgenommen.

### 2.11.3 Verdau des PCR-Produktes und des pMCV5-FLAG-GC-A-Plasmids

Die gereinigten PCR-Produkte mit der mutierten Aminosäure an Position 487 und das pMCV5-FLAG-GC-A-Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen Sbf I

und Eco RV bei 37 °C für 2 h verdaut (Tabelle 29). Mit diesem Ansatz wurde zum einen das pMCV5-FLAG-GC-A-Plasmid aufgeschnitten und dabei das DNA-Stück, an dem die Mutation sitzen soll, entfernt und zum anderen die Enden des PCR-Produktes mit der mutierten Stelle so geschnitten, dass es anschließend in das Plasmid ligiert werden konnte. Die verdauten Proben wurden zur Überprüfung auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen.

**Tabelle 29: Verdauansätze für PCR-Produkt und Vektor pMCV5**

<b>Lösung</b>	<b>20 µL-Ansatz für PCR-Produkt</b>	<b>10 µL-Ansatz für Vektor pMCV5</b>
10x Puffer 4	2 µL	1 µL
10x BSA	2 µL	1 µL
PCR-Produkt	10 µL	-
Vektor pMCV5	-	1,5 µg
Sbf I	5 U	5 U
Eco RV	10 U	10 U
A.dest.	5 µL	6,25 µL

#### 2.11.4 Ligation des mutierten DNA-Stückes mit dem Vektor

Die entsprechenden Gelbanden wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA laut Anleitung aus dem Gel extrahiert.

Der Ligationsansatz aus dem mutierten DNA-Stück und dem aufgeschnittenen Plasmid wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert (Tabelle 30).

**Tabelle 30: Zusammensetzung des Ligationsansatzes**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10x Ligase-Puffer	2 µL
T4-Ligase	1 µL
Vektor	7 µL
Insert	11 µL

#### 2.11.5 Kontrollverdau und Sequenzierung

Um die Integrität des Vektors, der die Sequenz der FLAG-GC-A WT, S487A oder S487E enthält, zu überprüfen, wurde je 1 µg DNA mit den Restriktionsenzymen Mlu I und Pst I für 2 h bei 37 °C verdaut. Durch diese Behandlung konnte das Schnittmuster der drei verschiedenen Plasmide nach

der Auftrennung im Agarosegel (1,5%) verglichen werden und bei Bedarf die DNA-Menge für die Transfektion von HEK 293 Zellen angeglichen werden. Stimmt die Schnittmuster in allen Konstrukten überein, wurden diese zusätzlich mit internen Primern sequenziert, um die Mutation an Position 487 zu Alanin bzw. Glutamat zu verifizieren.

## 2.12 Stimulierung der GC-A mit ANP

Die Stimulation der GC-A durch ANP (modifiziert nach Goy et al., 1987<sup>162</sup>) wurde mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Zum einen wurde die Stimulation an kultivierten Zellen in 24-Loch-Platten durchgeführt und intrazelluläres cGMP gemessen. Zum anderen wurde der Guanylatzyklase-Assay an Membranfraktionen durchgeführt.

### 2.12.1 ANP-Stimulation an kultivierten Zellen

Für eine ANP-Stimulation wurden HEK 293-Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät und zwei Tage vor dem Experiment mit dem zu untersuchenden Konstrukt transfiziert. 90 min vor der Stimulation wurden die Zellen in serumfreiem Medium gehalten. Nach Zugabe von 0,5 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), einem unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmer, wurden die Zellen 15 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde ANP in Endkonzentrationen von 10<sup>-11</sup> bis 10<sup>-7</sup> M zugegeben. Nach 10 min Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Reaktion mit 300 µL 70 % Ethanol (eiskalt) gestoppt. Die 24-Loch-Platte wurde bei -80 °C über Nacht eingefroren und anschließend das Ethanol bei 50 °C abgedampft. Nach Zugabe von 300 µL 50 mM Natriumacetat pH 6,0 konnte die Platte bei -20 °C gelagert werden oder die Proben wurden direkt in dem cGMP-RIA eingesetzt.

### 2.12.2 Zellmembranpräparation für Guanylyl Cyklase-Assay

Um die ANP-abhängige cGMP-Produktion der FLAG-GC-A WT im Vergleich zu den Mutanten FLAG-GC-A S487A und S487E zu bestimmen, wurden HEK 293-Zellen transient mit dem jeweiligen Plasmid mittels PEI-Methode transfiziert (siehe 2.3.1). Der Guanylatzyklase-Assay wurde zwei Tage später wie folgt durchgeführt:

Die Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert, um eine Beeinflussung der GC-A-Aktivität durch das FCS zu minimieren<sup>163</sup>. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei) gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 mL kaltem Homogenisierungsbuffer (Tabelle

31) pro 10 cm-Zellschale lysiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 mL-Gefäß überführt und auf Eis dreimal 3 s mit Ultraschall behandelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 16.000 g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit den partikulären Proteinen wurde in 300 – 500 µL Homogenisierungspuffer aufgenommen. Zur vollständigen Resuspendierung wurde das Pellet auf Eis zehnmal langsam durch eine dünne Kanüle (24 G) gezogen. Darauf folgte die Proteinbestimmung (siehe 2.8.1).

**Tabelle 31: Lösungen für ANP-abhängige Stimulierung der GC-A (in Anlehnung an Goy et al., 1987<sup>162</sup>)**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Homogenisierungspuffer	50 mM HEPES, pH 7,4 100 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin Protease-Inhibitoren Complete Mini®, 1 Tablette/10 mL Phosphatase-Inhibitoren PhosStop®, 1 Tablette/10 mL
Guanylyl Cyclase-Assay-Puffer	50 mM HEPES, pH 7,4 8 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 % (w/v) BSA 2 mM IBMX 4 mM GTP 60 mM Phospho-Kreatin 3 U/mL Kreatin-Phosphokinase 2 mM ATP
Mangan-Puffer	50 mM HEPES, pH 7,4 3 mM MnCl <sub>2</sub> 0,1 % BSA 2 mM IBMX 4 mM GTP 60 mM Phospho-Kreatin 3 U/mL Kreatin-Phosphokinase

### 2.12.3 Guanylyl Cyklase-Assay

1,5 mL-Gefäße wurden auf 37 °C vortemperiert und je 100 µL Assay-Puffer und Homogenisierungspuffer vorgelegt. Danach wurde A.dest. für den Basalwert

und ANP in den Konzentrationen  $10^{-10}$  bis  $10^{-7}$  M als Agonisten eingesetzt. Zur maximalen ligandenunabhängigen Stimulation der GC-A wurde 1 % Triton X-100 eingesetzt<sup>164, 165</sup>, wobei diese Proben anstelle des Assay-Puffers mit Mangan-Puffer versetzt wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µg der Membranproteine (Endvolumen 200 µL) für 10 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln gestartet und anschließend mit eiskaltem Ethanol (Endkonzentration 67%) gestoppt. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Nach Abdampfen der Proben unter Vakuum wurden die Proben in 300 µL Natriumacetat (50 mM, pH 6,0) aufgenommen und bei -20 °C gelagert oder direkt im cGMP-Radioimmunassay eingesetzt.

#### 2.12.4 cGMP-Radioimmunassay

Die cGMP-Standardkurve für den Radioimmunassay bestand aus den Verdünnungen S1 bis S9, Blank, Binding und Total (Tabelle 32). Dafür wurde die Stocklösung des cGMP-Standards (400 mM) in 50 mM Natriumacetat entsprechend verdünnt. Sowohl der Blank als auch die Binding-Probe enthielten nur 150 µL Natriumacetat.

**Tabelle 32: Zusammensetzung der cGMP-Standardkurve**

<b>Probe</b>	<b>cGMP-Konzentration [fmol]</b>	<b>Probe</b>	<b>cGMP-Konzentration [fmol]</b>
S1	1000	S6	31,3
S2	500	S7	15,7
S3	250	S8	7,8
S4	125	S9	3,9
S5	62,5		

Nun wurden 150 µL jeder Standardverdünnung mit 5 µL T/E acetyliert (Tabelle 33). Die Messproben wurden entsprechend in einem Endvolumen von 200 µL verdünnt und mit 6,7 µL T/E acetyliert. Nach Zugabe der Acetylierungsreagenz wurde die Lösung sofort durchgemischt und anschließend bei 16.000 g für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die folgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden 50 µL (Doppelwerte) pro Probe in RIA-Röhrchen gegeben und die Proben S1 bis S9, Binding sowie die Messproben mit 100 µL Antikörperverdünnung (1:30.000 verdünnt in 15 %  $\gamma$ -Globulin) versetzt. Zur Probe Blank wurden hingegen 100 µL 0,15 %  $\gamma$ -Globulin gegeben. Zuletzt

wurde zu allen Proben 50  $\mu\text{L}$   $^{125}\text{I}$ -cGMP pipettiert. Nachdem die Proben gemischt und abzentrifugiert (160 g, 1 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) wurden, konnten sie für 12 h bei 4  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert werden.

Anschließend wurden die Proben gefällt. Dazu wurden 100  $\mu\text{L}$  0,8%  $\gamma$ -Globulin und 750  $\mu\text{L}$  PEG<sub>6000</sub> in jedes Röhrchen, außer der Total-Probe, gegeben, gut durchmischt und 15 min bei 4  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde bei 2500 g für 10 min bei 4  $^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nun folgte die Messung im  $\gamma$ -Counter, wobei das Gerät aus den Standardwerten eine Eichkurve erstellte und direkt die cGMP-Mengen der Messproben bestimmte. Die Werte wurden anschließend mit der jeweiligen Verdünnung verrechnet und, wenn vorhanden, auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen.

**Tabelle 33: Lösungen für cGMP-RIA**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Natriumacetat	50 mM pH 6,0 mit Eisessig einstellen
T/E	67% Triethylamin 33% Essigsäureanhydrid
0,15 % $\gamma$ -Globulin	0,15% $\gamma$ -Globulin in 50 mM Natriumacetat
$^{125}\text{I}$ -cGMP	10.000 – 30.000 cpm/50 $\mu\text{L}$
Tris-HCl	10 mM pH 7,4
0,8% $\gamma$ -Globulin	0,8% $\gamma$ -Globulin in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
PEG <sub>6000</sub>	15% PEG 6000 in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4

## 2.13 Statistik

Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Auswertung der Proben erfolgte mittels T-Test.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss des FLAG-Epitops auf die Rezeptoraktivität und dessen zelluläre Lokalisation

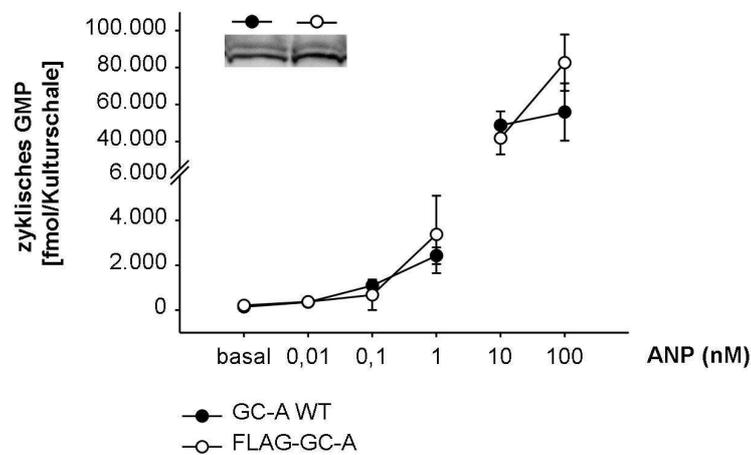
Das Plasmid zur Expression des GC-A-Rezeptors mit einem N-terminalen FLAG-Epitop wurde in der AG von M. Chinkers, Department of Pharmacology, University of South Alabama, Mobile, AL, USA) generiert<sup>80</sup>. Das FLAG-Epitop (DYKDDDDK) wurde mittels PCR-Mutagenese direkt hinter dem Signalpeptid des GC-A-Rezeptors positioniert. Um auszuschließen, dass die Position des Epitops an der N-terminalen Ligandenbindungsstelle einen Einfluss auf die Rezeptoraktivität und die Lokalisation des Rezeptors in der Zelle besitzt, wurden in der vorliegenden Doktorarbeit ANP-Stimulations- und Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt.

Dazu wurden HEK 293-Zellen mit cDNA zur Expression des Wildtyp GC-A- und FLAG-GC-A-Rezeptors transient transfiziert. Vor der ANP-Stimulation wurden die Zellen mit IBMX behandelt, wodurch in den Zellen vorhandene Phosphodiesterasen gehemmt wurden und das gebildete cGMP nicht durch diese abgebaut wurde. Anschließend wurde der intrazelluläre cGMP-Gehalt nach 10-minütiger ANP-Stimulation mittels cGMP-RIA bestimmt. ANP bewirkte in Konzentrationen von 10 pM bis 100 nM einen konzentrationsabhängigen Anstieg des intrazellulären cGMP, der sich nicht signifikant zwischen den GC-A WT und FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen unterschied (Abbildung 12). Die GC-A-Expression wurde mittels Western Blot überprüft und zeigte, dass ähnliche Expressionsdichten von WT und FLAG-GC-A vorlagen, was Voraussetzung für den cGMP-Assay war.

Für die Überprüfung der subzellulären Lokalisation des FLAG-GC-A-Rezeptors wurden FLAG-GC-A stabil exprimierende und nicht transfizierte HEK 293-Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern behandelt und anschließend mittels Konfokal-Laser-Scanning Mikroskop analysiert. Dabei wurde die Lokalisation des FLAG-GC-A-Rezeptors mit anti-GC-A- und anti-FLAG-Antikörper (rot) und die Zellmembran durch die Anfärbung der Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA, grün) dargestellt. Durch Überlagerung der aufgenommenen konfokalen Fluoreszenzbilder entstand eine gelbe Färbung bei Kollokalisierung von GC-A und PMCA. In Abbildung 13 A und B ist in dem überlagerten Bild („merge“) zu sehen, dass FLAG-GC-A, angefärbt mit FLAG- (A) und GC-A-Antikörper (B), mit dem Zellmembran-Marker PMCA kollokalisiert ist. Eine rote Färbung war

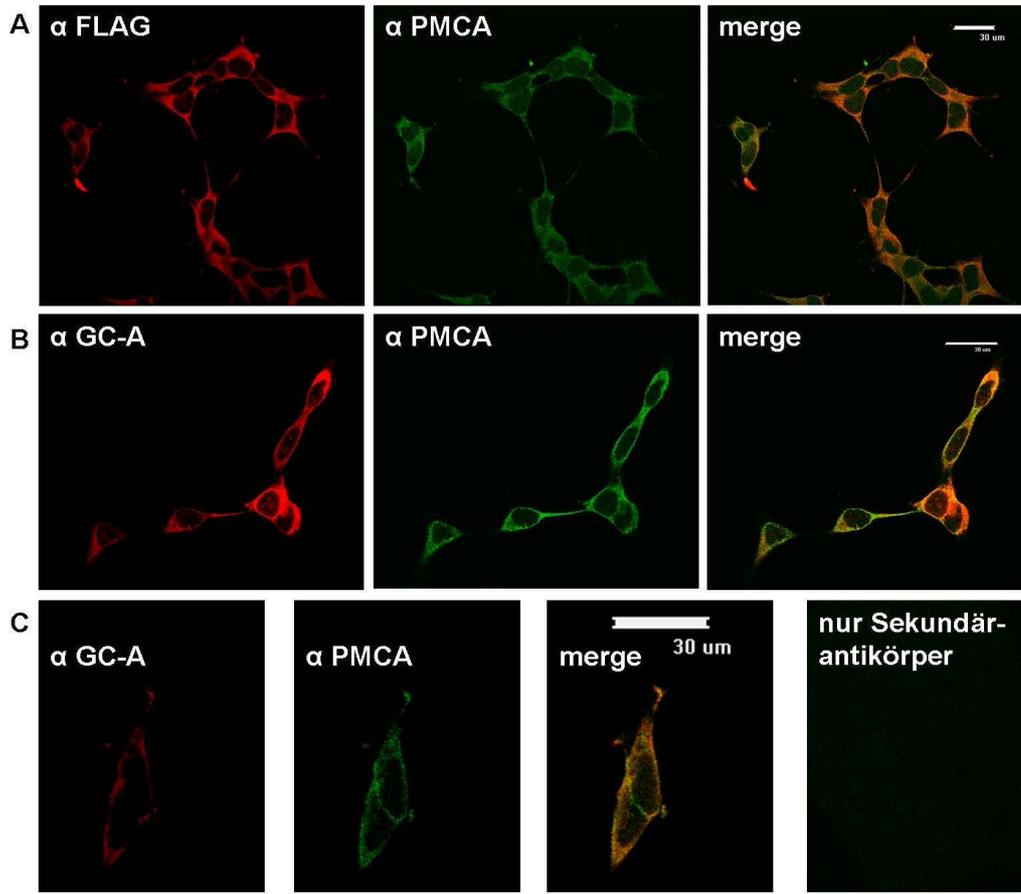
nicht nur an der Zellmembran, sondern auch leicht im Zytosol zu erkennen, was an der Überexpression des FLAG-tagged GC-A-Rezeptors liegen kann. Als Negativkontrollen wurden nicht transfizierte HEK 293-Zellen mit den oben genannten Antikörpern bzw. nur mit Sekundärantikörper angefärbt (Abbildung 13). Bei diesen Experimenten war eine zu den vorangegangenen Experimenten vergleichbare PMCA-Färbung, aber eine deutlich schwächere Färbung der GC-A zu sehen. Die Behandlung der Zellen mit Sekundärantikörper allein zeigte keine unspezifische Färbung anderer Proteine.

Diese Experimente zeigen, dass das FLAG-Epitop keinen Einfluss auf die GC-A-Aktivität und die subzelluläre Lokalisation des Rezeptors besitzt.



**Abbildung 12: Intrazellulärer cGMP-gehalt von GC-A WT und FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen nach ANP-Stimulation**

HEK 293-Zellen wurden mit den angegebenen cDNAs transient transfiziert. Nach IBMX-Behandlung und 10 min ANP-Stimulation wurde der intrazelluläre cGMP-Gehalt mittels RIA bestimmt (n= 3). Dabei war der ANP-abhängige cGMP-Anstieg annähernd identisch in den GC-A WT und FLAG-GC-A exprimierenden Zellen. Der Western Blot zeigte ähnliche Expressionsdichten von GC-A WT und FLAG-GC-A.

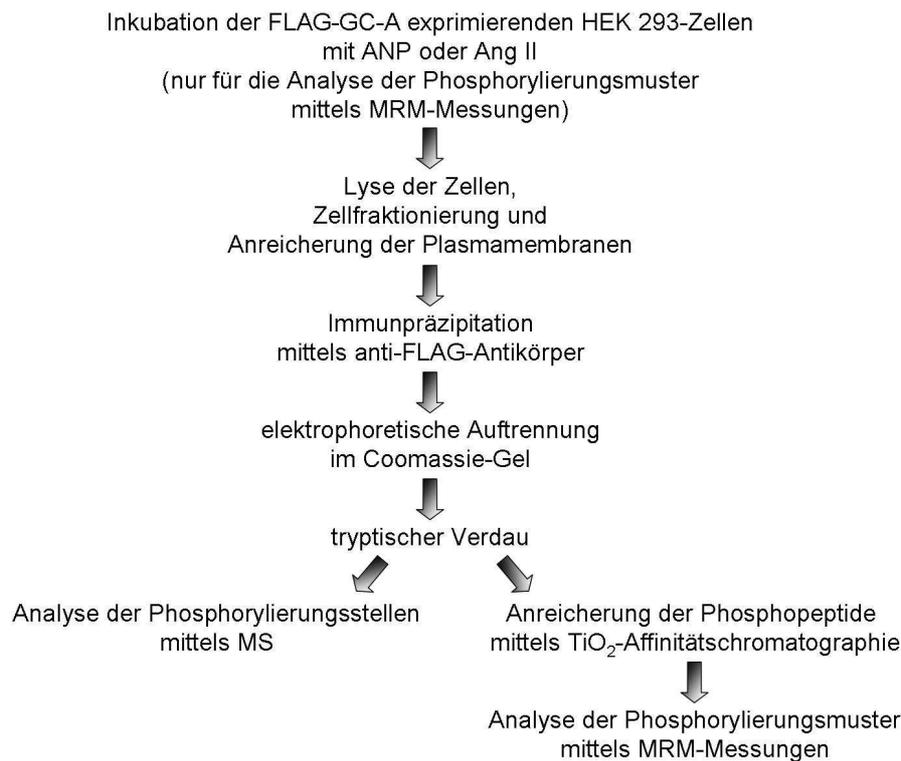


**Abbildung 13: Nachweis der Lokalisation der FLAG-GC-A mittels Immunfluoreszenz**

Zellen der FLAG-GC-A stabil exprimierenden HEK 293- Zelllinie wurden mit FLAG- und PMCA- (A) bzw. GC-A- und PMCA-Antikörpern (B) angefärbt und mit dem Konfokal-Laser-Scanning Mikroskop betrachtet. Durch Kolokalisation der FLAG-GC-A und PMCA ist eine gelbe Färbung in der Bildüberlagerung („merge“) zu erkennen. Analog wurden nicht transfizierte HEK 293-Zellen behandelt (C), wobei die GC-A-Färbung deutlich schwächer, aber die PMCA-Färbung vergleichbar mit den Fluoreszenzbildern in A und B war. Eine Behandlung der HEK 293-Zellen mit den Sekundärantikörpern allein zeigte keine unspezifische Anfärbung anderer Proteine. Der dargestellte Balken in den Abbildungen entsprach 30 µm.

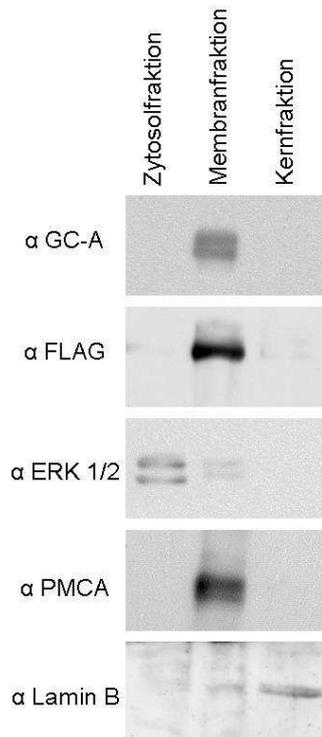
### 3.2 Die Immunpräzipitation des GC-A Rezeptors aus FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen

Das in Abbildung 14 dargestellte Fließschema soll die Arbeitsschritte von der Lyse der Zellen bis zu den massenspektrometrischen Analysen illustrierend darstellen.



**Abbildung 14: Fließschema zur übersichtlichen Darstellung der Arbeitsschritte von der Lyse der Zellen bis hin zu den massenspektrometrischen Analysen**

Zuerst wurden Plasmamembranen aus Zellen der FLAG-GC-A stabil exprimierenden HEK 293-Zelllinie angereichert. Hierfür wurden die Zellen mit verschiedenen Puffern behandelt, um die zellulären Proteine in eine Zytosol-, Membran- und Kernfraktion zu trennen. Dazu wurde ein Puffer der Firma NanoTools und ein Tris-Puffer mit Triton X-100 verwendet. Um die Effizienz dieser Methodik zu überprüfen, wurden Western Blots mit verschiedenen Antikörpern angefertigt (Abbildung 15). Dabei dienten die Proteine ERK 1/2, PMCA bzw. Lamin B als Nachweis für die Zytosol-, die Membran- bzw. die Kernfraktion. Der GC-A-Rezeptor wurde mittels anti-GC-A- und anti-FLAG-Antikörpern nachgewiesen. Dabei konnte mit diesen Western Blot Analysen gezeigt werden, dass ERK 1/2 hauptsächlich in der Zytosolfraction zu detektieren, aber auch eine leichte ERK-Bande in der Membranfraktion zu erkennen war. Hingegen konnten PMCA und Lamin B nur in der Membran- bzw. der Kernfraktion detektiert werden. Der GC-A-Rezeptor wurde ausschließlich in der Membranfraktion detektiert.



**Abbildung 15: Überprüfung der Zellfraktionierung von FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen mittels Western Blot**

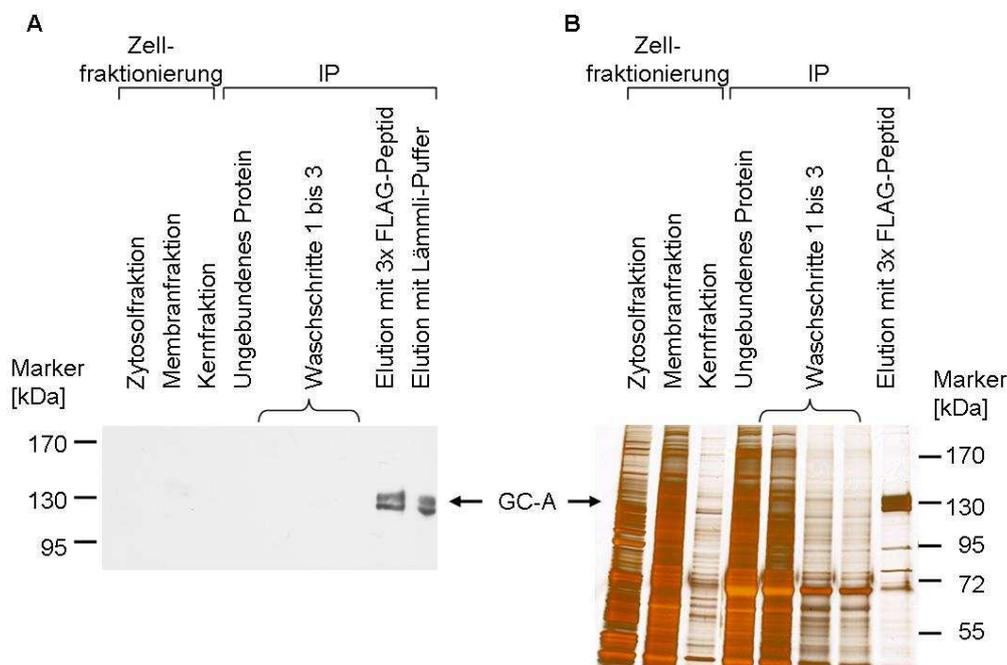
FLAG-GC-A exprimierende HEK 293-Zellen wurden lysiert und fraktioniert. Die Zellfraktionen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen (FLAG) GC-A (Plasmamembranrezeptor, 130 kDa), ERK 1/2 (Zytosolprotein, 42/44 kDa), PMCA (Plasmamembranrezeptor, 150 kDa) und Lamin B (Rezeptor der inneren Kernmembran, 70 kDa) analysiert. ERK 1/2 wurde hauptsächlich in der Zytosol-, aber auch schwach in der Membranfraktion detektiert. PMCA und Lamin B wurde nur in der Membran- bzw. der Kernfraktion nachgewiesen. GC-A wurde ausschließlich in der Membranfraktion detektiert. Zur Analyse wurden 10 µg Protein pro Spur aufgetragen.

Die Membranfraktion wurde anschließend benutzt, um den FLAG-GC-A-Rezeptor anzureichern. Dafür wurde Agarose genutzt, an die ein anti-FLAG-Antikörper (M2-Agarose, Sigma-Aldrich) gekoppelt war. Das GC-A-Protein wurde mittels 3x FLAG-Peptid von der Agarose eluiert und die Agarose für die Analyse in Lämmli-Puffer aufgenommen. Die Effizienz der Methodik wurde mittels Western Blot sowie Silbergel analysiert. Im Western Blot (Abbildung 16 A) war bei gleicher Proteinmenge in den Fraktionen des Zytosols, der Membran und der Zellkerne nur eine schwache bzw. keine GC-A-Bande sichtbar, dagegen war in dem Eluat ein starkes Signal vorhanden. Ebenfalls waren bei der Fraktion mit den ungebundenen Proteinen und in den Waschschrritten keine Proteinbanden zu sehen. Der Vergleich zwischen Membranfraktion und Elution zeigte eine etwa 17-fache Anreicherung der GC-A. Durch Kochen der Agarose in Lämmli-Puffer wurden alle noch daran befindlichen Proteine davon gelöst. Ein Teil dieser gekochten Agarose wurde ebenfalls mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde trotz vorheriger spezifischer Elution des FLAG-GC-A-Rezeptors mittels 3x FLAG-Peptid noch eine GC-A-Bande nachgewiesen werden, was auf eine inkomplette Elution hinweist.

Anhand des Silbergels (Abbildung 16 B) wurde die in den Proben vorhandene Proteinmenge analysiert. Bei gleicher aufgetragener Proteinmenge war auch hier ein Unterschied zwischen den Fraktionen erkennbar. Die

Proteinsuspensionen der Zellfraktionen zeigte eine große Anzahl verschiedener Proteine, wie an den einzelnen Silberbanden zu sehen waren. Bei den Waschschrritten nahm die Proteinanzahl sukzessive ab und in dem Eluat waren letztlich nur noch wenige Proteinbanden sichtbar, wobei eine deutliche Bande auf Höhe des GC-A-Rezeptors vorhanden war. Die Analyse der Präparationsschritte mittels Silbergel zeigt also eine deutliche Aufreinigung der GC-A.

Mit dieser Methodik konnte der GC-A-Rezeptor sehr gut aufgereinigt und angereichert werden, jedoch war auch ein Verlust durch eine unvollständige Elution vorhanden.

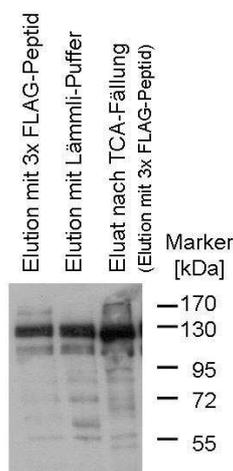


**Abbildung 16: Western Blot- und Silbergel-Analysen der Zellfraktionierung und IP des FLAG-GC-A-Rezeptors aus HEK 293-Zellen**

Die Proben der Zellfraktionierung und der Immunpräzipitation wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot und Silberfärbung analysiert. Für den Western Blot (A) wurden 2 µg Protein pro Spur aufgetragen und der FLAG-GC-A-Rezeptor mit anti-FLAG-Antikörper detektiert. Die Analyse zeigte eine 17-fache Anreicherung des Rezeptors im Vergleich von Membranfraction zu Eluat. Durch eine unvollständige Elution kam es zu einem Verlust an der Agarose, der nur durch Kochen in Lämmli-Puffer von der Agarose eluiert werden konnte. Für das silbergefärbte Gel (B) wurden 10 µg Protein pro Spur aufgetragen. In den Proben der Zellfraktionierung war eine große Anzahl von Proteinen sichtbar. In den Waschschrritten nahm die Proteinmenge ab und in dem Eluat waren nur wenige Proteinbanden zu erkennen.

### 3.3 Die Analyse der Phosphorylierungsstellen der GC-A mittels Massenspektrometrie

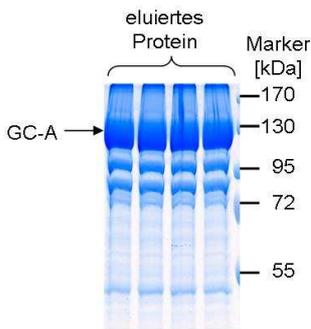
Um das komplette Eluat auf möglichst wenig Spuren im SDS-Gel auftragen zu können, wurde diese Fraktion mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Anschließend wurde durch Western Blot Analysen überprüft, dass durch diese Behandlung keine Degradation des Proteins erfolgte. Dazu wurden zum Vergleich das Eluat, die in Lämmli gekochte Agarose der IP und ein Teil der TCA-gefällten Probe analysiert (Abbildung 17). Dabei war zu erkennen, dass die Fällung nicht zu einer Degradation der GC-A führte, da kein verändertes Bandenmuster im Vergleich zum ungefällten Eluat vorhanden war.



**Abbildung 17: Analyse der TCA-Fällung des eluierten GC-A-Proteins mittels Western Blot**

3 µg des Eluats der Elution mit 3x FLAG-Peptid und ein Teil der Elution mit Lämmli-Puffer einer IP sowie ein Teil des TCA-gefällten Eluats der FLAG-Peptid-Elution (ca. 20 µg) wurden im Western Blot mit anti-GC-A-Antikörper inkubiert. Eine Degradation der GC-A war nicht zu erkennen, da das Bandenmuster der gefällten Probe mit dem unbehandelten Eluat identisch war.

Nach TCA-Fällung wurden die immunpräzipitierten Proteine im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinbanden mittels Coomassie G-Färbung visualisiert (Abbildung 18). Die prominenteste Proteinbande, welche mit dem apparenten MW der GC-A migriert, wurde ausgeschnitten, gewaschen, mit Trypsin verdaut und die entstandenen tryptischen Peptide mittels MS/MS analysiert. Die Auswertung ergab eine 64%ige Sequenzabdeckung der GC-A. Eine sehr gute Sequenzabdeckung wurde am N-Terminus, in der KHD und innerhalb der N-terminalen Region der Zykase-Domäne erzielt (Abbildung 19).



**Abbildung 18: Coomassie G gefärbtes SDS-Gel der immunpräzipitierten Proteine**

Das mit TCA gefällte Eluat (Elution mit 3x FLAG-Peptid) wurde in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteinbanden mittels Coomassie G-Färbung sichtbar gemacht. Für dieses Experiment wurden 15x 10 cm-Schalen mit konfluent gewachsenen FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen als Ausgangsmaterial genutzt.



**Abbildung 19: Mittels MS/MS detektierte tryptischen GC-A-Peptide**

Die in der GC-A-Sequenz rot markierten Bereiche wurden mittels MS/MS detektiert, was einer Sequenzabdeckung von 64 % entspricht. Die Sequenzabdeckung war am N-Terminus, in der Kinasehomologen Domäne sowie am Anfang der Zyklase-Domäne am höchsten. Die drei größten Domänen sind an der Sequenz beschriftet. Die durchgehend unterstrichene Sequenz kennzeichnet das Signalpeptid, die gestrichelte Sequenz die Transmembran-Domäne und die punktierte Sequenz die Hinge-Region. Hier und an allen anderen Stellen der vorliegenden Doktorarbeit werden die Positionen der AS auf das reife Protein (ohne Signalpeptid) bezogen

Bei den MS/MS Experimenten wurden neben der GC-A (Score von durchschnittlich 1700) auch verschiedene andere Proteine detektiert, allerdings mit einem sehr viel geringeren Score (30 bis 300). Der Score beschreibt die Signifikanz des MS-Suchergebnisses. Je höher der Score ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses. Diese Proteine komigrierten trotz unterschiedlicher Molekulargewichte mit der GC-A-Proteinbande (MW 130 kDa). In Tabelle 34 sind die am häufigsten zusätzlich detektierten Proteine aus 21 MS/MS-Messungen mit deren Molekulargewicht, zellulärer Lokalisation und Funktion aufgelistet.

**Tabelle 34: Neben der Guanylyl Cyklase A in der Proteinbande bei 130 kDa detektierte Proteine**

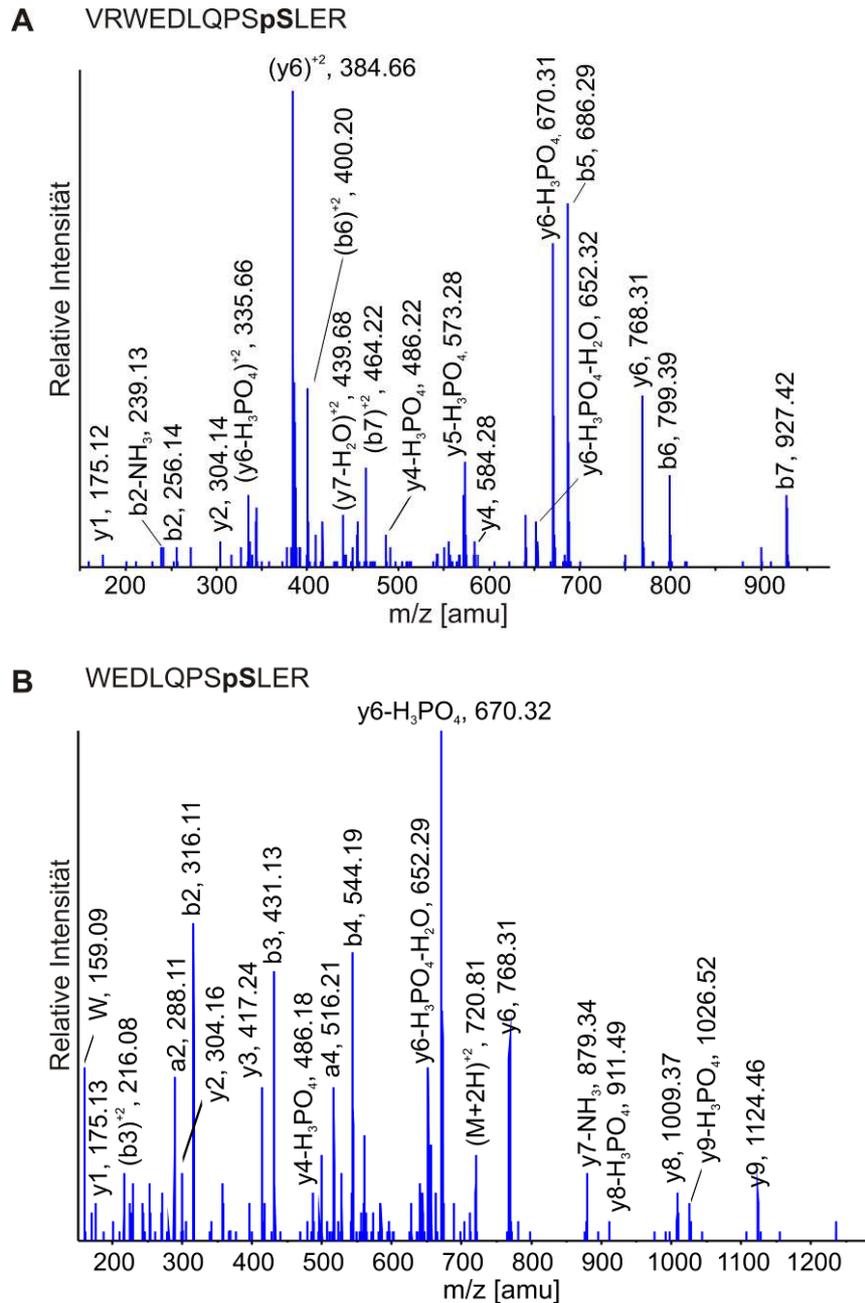
Die MS/MS-Analysen der tryptisch verdauten Proteinbande bei 130 kDa erzielte neben der GC-A weitere Proteintreffer. Die am häufigsten detektierten Proteine mit Molekulargewicht, zellulärer Lokalisation und ihrer Funktion sind hier aufgeführt. Abkürzungen: Nr., Swiss-Prot Accession-Nummer (Organismus: Ratte); P, Häufigkeit der Detektion in 21 MS/MS-Experimenten.

<b>Protein</b>	<b>Nr.</b>	<b>P</b>	<b>Molekulargewicht, Lokalisation</b>	<b>Funktion</b>
M-phase inducer Phosphatase 2	P48966	57 %	64 kDa, Zytoplasma	Tyrosin-Proteinphosphatase, induziert konzentrationsabhängig Mitosen, direkte Dephosphorylierung der Cyclinabhängigen Kinase 1 (CDK1) und dadurch Stimulation der Kinaseaktivität
RNA-binding Protein 10	P70501	57 %	94 kDa, Kern	nicht bekannt, bindet an RNA-Polymere
Guanylyl Cyklase B	P16067	57 %	117 kDa, Membran	Rezeptor für CNP, cGMP-Synthese
Hitzeschock Protein HSP 90-alpha	P82995	47 %	84 kDa, Zytoplasma	molekulares Chaperon mit ATPase-Aktivität, alpha-Untereinheit
78 kDa Glukose-regulierendes Protein	P06761	47 %	72 kDa, Lumen des ER	fördert wahrscheinlich die Anordnung multimerer Proteinkomplexe im ER
Hitzeschock Protein HSP 90-beta	P34058	33 %	83 kDa, Zytoplasma	molekulares Chaperon mit ATPase-Aktivität, beta-Untereinheit
Natriumkanal-Protein Typ 4 $\alpha$ -Untereinheit	P15390	24 %	208 kDa, Membran	Natriumselektiver Kanal in erregbaren Membranen
14-3-3 Protein $\epsilon$	P62260	24 %	29 kDa, Zytoplasma	Adapterprotein, bindet an große Anzahl von Partnern durch Phosphoserin- oder Phosphothreonin-Motiv-Erkennung, durch Bindung wird die Aktivität des Bindungspartners moduliert
Ig Gamma-2A Kette, C-Region	P20760	19 %	35 kDa	Antigen-Bindung

<b>Protein</b>	<b>Nr.</b>	<b>P</b>	<b>Molekulargewicht, Lokalisation</b>	<b>Funktion</b>
Thyroid-Hormon Rezeptor- assoziiertes Protein 3	Q5M7V8	19 %	108 kDa, Kern	spielt eine Rolle bei der transkriptionalen Ko- Aktivierung
Ubiquitin	P62989	19 %	8 kDa, Zytoplasma und Kern	Anhang an Proteine als Lys-48-Polymer führt zu Proteindegradation durch Proteasomen, Anhang als Monomer oder alternatives Polymer ist notwendig für verschiedene Funktionen, z. B. Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur, Regulation der Genexpression, Stressantwort, Ribosombiogenese und DNA-Reparatur

Allerdings konnten durch dieses methodische Vorgehen keine phosphorylierten tryptischen Peptide der GC-A oder komigrierenden Proteinen detektiert werden. Daher wurden die tryptischen Peptide mittels  $\text{TiO}_2$ -Affinitätschromatographie behandelt, um die Anzahl der hoch abundanten unphosphorylierten Peptide zu verringern und dagegen die wenig abundanten phosphorylierten Peptide anzureichern. Danach war es möglich, sieben Phosphorylierungsstellen in der KHD der GC-A zu detektieren. Die phosphorylierten Peptide wurden reproduzierbar detektiert und manuell validiert (Tabelle 35). Es wurden die sechs bereits postulierten Phosphorylierungsstellen der KHD (Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510, Thr513) <sup>78</sup> sowie eine bisher unbekannte Phosphorylierung an Serin 487 detektiert, welche ebenfalls in der KHD der GC-A liegt. Die entsprechenden MS/MS-Spektren sind im Anhang aufgeführt (siehe 8.2). Die Spektren der beiden Peptide VRWEDLQPS**p**SLER und WEDLQPS**p**SLER, welche die bisher unbekannte Phosphorylierungsstelle beinhalten, sind exemplarisch in Abbildung 20 A und B dargestellt. Wie in Tabelle 35 zu sehen ist, wurden sowohl partiell als auch komplett phosphorylierte Peptide detektiert.

Es wurden bei diesen Analysen auch einige phosphorylierte Peptide von den Proteinen, die neben der GC-A detektiert wurden (Tabelle 34), gefunden. Ebenfalls wurden phosphorylierte Peptide detektiert, die aufgrund eines zu geringen Scores keinem Protein zugeordnet werden konnten. Diese tryptischen Peptide wurden neben den phosphorylierten Peptiden der GC-A mit  $\text{TiO}_2$  angereichert. Allerdings wurden durch die vorherige Anreicherung der GC-A sowohl mit als auch ohne  $\text{TiO}_2$ -Behandlung immer sehr viel mehr tryptische Peptide dieses Rezeptors detektiert.



**Abbildung 20: MS/MS-Spektren der tryptischen GC-A-Peptide VRWEDLQPSpSLER und WEDLQPSpSLER**

Nach Anreicherung der tryptischen phosphorylierten Peptide mittels TiO<sub>2</sub> wurden diese mit MS/MS analysiert und mittels Mascot Daemon (siehe Angaben in Tabelle 22) ausgewertet. Die dargestellten Spektren zeigen die bisher unbekannte Phosphorylierungsstelle an Serin 487. **A**, VRWEDLQPSpSLER, m/z 565,66; **B**, WEDLQPSpSLER, m/z 720,40.

**Tabelle 35: Mittels MS/MS detektierte Phosphorylierungsstellen der GC-A aus FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen**

Die tryptischen GC-A-Peptide aus FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen wurden durch TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie angereichert und mittels MS/MS analysiert. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf das reife Protein (Spot Accession Nummer P18910). Die detektierten Phosphorylierungsstellen sind in der Peptidsequenz durch eine **fette** Markierung der jeweiligen Aminosäuren Serin und Threonin gekennzeichnet. Abkürzungen: m/z, Masse zu Ladungs-Verhältnis; z, Ladung; M<sub>r</sub> (exp), experimentelle Masse, M<sub>r</sub> (calc), kalkulierte Masse; Delta, Massenabweichung M<sub>r</sub> (exp) - M<sub>r</sub> (calc); ND, nicht detektiert.

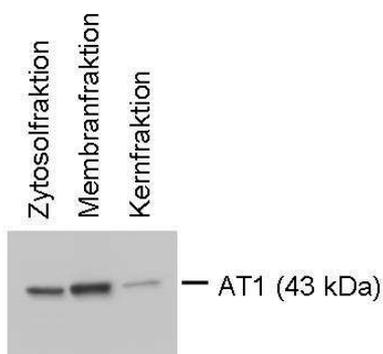
Position	Peptidsequenz	Phosphorylierungs- stelle(n)	Score	m/z	z	M <sub>r</sub> (exp)	M <sub>r</sub> (calc)	Delta	Massen- analysator
478 - 490	R.VRWEDLQPS <b>p</b> SLER.H	Ser487	37	565,66	3	1693,96	1693,78	0,18	QstarElite
480 - 490	R.WEDLQPS <b>p</b> SLER.H	Ser487	39	720,40	2	1438,72	1438,61	0,11	QstarElite
494 - 504	R.SAG <b>p</b> SRLTSLGR.G	Ser497	33	395,54	3	1183,60	1183,57	0,03	Qtrap
494 - 504	R.SAGSRL <b>p</b> TSLGR.G	ND							
494 - 504	R.SAGSRLTL <b>p</b> SGR.G	ND							
494 - 504	R.SAG <b>p</b> SRL <b>p</b> TSLGR.G	Ser497 und Thr500	21	422,19	3	1263,54	1263,55	-0,01	Qtrap
494 - 504	R.SAG <b>p</b> SRLTL <b>p</b> SGR.G	Ser497 und Ser502	34	632,83	2	1263,64	1263,54	0,10	QstarElite
494 - 504	R.SAGSRL <b>p</b> TL <b>p</b> SGR.G	Thr500 und Ser502	38	422,21	3	1263,61	1263,54	0,07	Qtrap
494 - 504	R.SAG <b>p</b> SRL <b>p</b> TL <b>p</b> SGR.G	Ser497, Thr500 und Ser502	32	672,71	2	1343,41	1343,50	-0,09	Qtrap
499 - 504	R.L <b>p</b> TSLGR.G	Thr500	34	363,68	2	725,34	725,35	-0,01	Qtrap
499 - 504	R.LTL <b>p</b> SGR.G	Ser502	28	363,68	2	725,33	725,35	-0,02	Qtrap
499 - 504	R.L <b>p</b> TL <b>p</b> SGR.G	Thr500 und Ser502	26	403,69	2	805,37	805,31	0,06	QstarElite
505 - 523	R.G <b>p</b> SNYGSLLTTEGQFQVFAK.T	Ser506	84	1063,89	2	2125,77	2125,97	-0,20	Qtrap
505 - 523	R.GSNY <b>Gp</b> SLLTTEGQFQVFAK.T	Ser510	100	1063,91	2	2125,81	2125,97	-0,16	Qtrap
505 - 523	R.GSNYGSLL <b>p</b> TTEGQFQVFAK.T	Thr513	57	709,74	3	2126,20	2125,97	0,23	QstarElite
505 - 523	R.G <b>p</b> SNY <b>Gp</b> SLLTTEGQFQVFAK.T	Ser506 und Ser510	78	1103,92	2	2205,83	2205,94	-0,11	Qtrap

Position	Peptidsequenz	Phosphorylierungs- stelle(n)	Score	m/z	z	M <sub>r</sub> (exp)	M <sub>r</sub> (calc)	Delta	Massen- analysator
505 - 523	R.Gp <b>S</b> NYGSLL <b>p</b> TTEGQFQVFAK.T	ND							
505 - 523	R.GSNY <b>Gp</b> SLL <b>p</b> TTEGQFQVFAK.T	Ser510 und Thr513	87	736,29	3	2205,84	2205,94	-0,10	Qtrap
505 - 523	R.Gp <b>S</b> NY <b>Gp</b> SLL <b>p</b> TTEGQFQVFAK.T	ND							

### 3.4 Die Analysen zum Phosphorylierungsmuster des GC-A-Rezeptors nach homologer (ANP induziert) bzw. heterologer (Angiotensin II induziert) Desensibilisierung

Zur Analyse des Phosphorylierungsmusters der GC-A unter desensibilisierenden Bedingungen wurde die MRM-Methode angewandt. Durch das Einstellen des ersten und dritten Quadrupols des Qtrap 4000 Systems als Massenfiter, konnte sehr spezifisch und sensitiv beobachtet werden, wie sich das Muster der phosphorylierten tryptischen Peptide des Rezeptors semiquantitativ verhält.

Um eine Desensibilisierung mit Angiotensin II (Ang II) zu ermöglichen, wurden stabil FLAG-GC-A exprimierende HEK 293-Zellen mit einem Plasmid zur Expression des Ang II-Typ 1-Rezeptor (AT1) transfiziert und die Expression dieses Rezeptors mit einem anti-AT1-Antikörper im Western Blot überprüft (Abbildung 21). Bei der Analyse der Zellfraktionen konnte sowohl in der Zytosol- als auch in der Membranfraktion eine AT1-Immunreaktivität detektiert werden. Da es durch die Transfektion zu einer Beeinflussung der Zellen kommt, wurden auch die Zellen, die als Kontrolle dienten und daher nicht mit Angiotensin II behandelt wurden, mit dem Plasmid zur AT1-Rezeptor-Expression transfiziert.

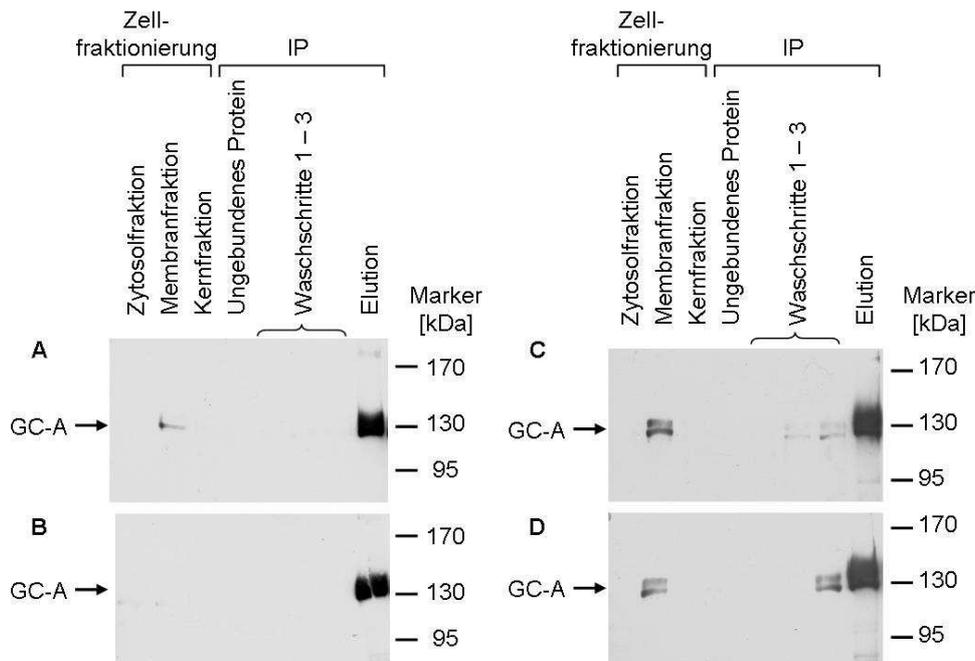


**Abbildung 21: Western Blot Analyse der Zellfraktionierung mit anti-AT1-Antikörper**

Für die Desensibilisierungsexperimente mit Ang II wurden die FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen mit einem Plasmid zur Expression des AT1-Rezeptors transfiziert. Die Expression wurde mittels Western Blot Analyse mit einem anti-AT1-Antikörper überprüft.

Nun wurden die FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen von je 15x 10 cm-Zellkulturschalen zuerst mit ANP (100 nM, 60 min) oder Ang II (10 nM, 15 min) behandelt bzw. blieben unbehandelt und anschließend wurde die Membranpräparation sowie die Immunpräzipitation wie zuvor durchgeführt. In jedem Experiment wurden behandelte vs. unbehandelte Zellen verglichen. Die Proteinmenge des Eluats wurde mittels BCA-Assay und Western Blot analysiert, damit jeweils die gleiche Ausgangsmenge von unbehandelten und behandelten Zellen für die weiteren Experimente eingesetzt werden konnte (Abbildung 22). Innerhalb eines Experimentes waren nach der IP die

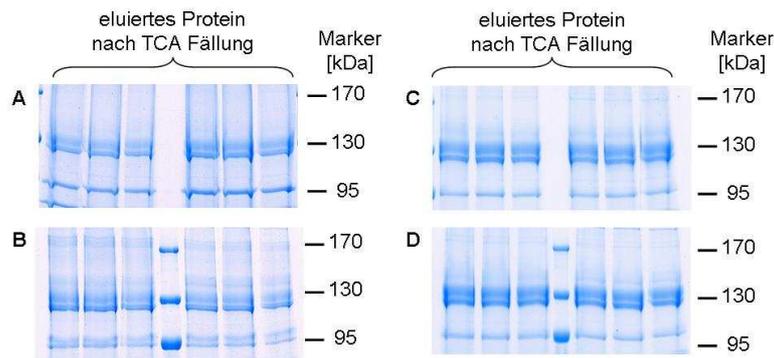
Proteinkonzentrationen der Eluate in der unbehandelten und der behandelten Probe identisch, sodass die Ergebnisse der MRM-Scans eines Experimentes miteinander verglichen werden konnten. Im Western Blot wurden im Gegensatz zum Eluat, das in allen Versuchen ein vergleichbar starkes Signal gab, in den Membranfraktionen nur sehr schwache GC-A-Signale detektiert, was jeweils für eine gute Anreicherung der GC-A von Membranfraktion zum Eluat spricht.



**Abbildung 22: Western Blot Analysen der Membranpräparationen und Immunpräzipitationen von unbehandelten und mit den Peptidhormonen behandelten FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen**

FLAG-GC-A exprimierende HEK 293-Zellen blieben unbehandelt (A und C) bzw. sie wurden mit ANP (B) oder Ang II (D) behandelt, anschließend wurde die GC-A aus den Zellen aufgereinigt, immunpräzipitiert und die Fraktionen im Western Blot mit anti-FLAG Antikörper analysiert. Es war eine starke Anreicherung der FLAG-GC-A in allen Western Blots zu erkennen, welche in den zusammengehörenden Experimenten (A und B bzw. C und D) ähnlich war. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Eluate ergab ebenfalls identische Proteinmengen in den jeweiligen Experimenten. In den hier dargestellten Versuchen betrug diese 1,12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (A), 1,13  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (B), 1,22  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (C) und 1,26  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (D).

Nach der IP wurden die Eluate wie bereits beschrieben mit TCA gefällt, die enthaltenen Proteine im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie G gefärbt. Dabei zeigte sich auch in den Gelen, dass die Proteinmengen innerhalb eines Experimentes vergleichbar waren (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Coomassie G gefärbte Gele der mit anti-FLAG-Antikörper immunpräzipitierten und mit TCA gefällten Proteine aus unbehandelten oder mit den Peptidhormonen ANP und Ang II behandelten FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen**

Die Eluate, die nach der Immunpräzipitation erhalten wurden, wurden mit TCA gefällt, im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie G angefärbt. Die Proteinbanden bei 130 kDa von unbehandelten (A und C) bzw. mit ANP (B) oder Ang II (D) behandelten Zellen waren innerhalb eines Experimentes identisch. Um die Gelspuren nicht zu überladen, wurde jede Probe auf sechs Spuren aufgeteilt, was einer Ausgangsmenge von Zellen aus insgesamt  $15 \times 10^7$  cm-Zellkulturschalen entsprach ( $\sim 10^7$  Zellen pro Schale).

Die Proteinbanden bei  $\sim 130$  kDa wurden nun ausgeschnitten, gewaschen und mit Trypsin verdaut.  $10 \mu\text{L}$  des Peptidextraktes der unbehandelten und behandelten Probe wurden mittels MS/MS und anschließendem Spectral Counting (SC) analysiert, um zusätzlich auf Ebene der hochsensitiven Massenspektrometrie zu sichern, dass gleiche Mengen GC-A in den unterschiedlichen Proben untersucht wurden. Dabei diente die Anzahl der Peptid-Massenspektren, die für GC-A identifiziert wurden, als Maß für die vorhandene Proteinmenge<sup>166</sup>. Die Spektrenanzahl war bei den jeweils direkt miteinander verglichenen Proben ähnlich, unterschied sich aber zwischen den einzelnen Experimenten stark. Es wurden zwischen 40 und 60 tryptische GC-A-Peptide pro Analyse detektiert (siehe Anhang 8.3, Tabelle 42).

Die aus jeweils drei Proteinbanden vereinten Peptidextrakte wurden wiederum mit  $\text{TiO}_2$  behandelt, um die phosphorylierten Peptide anzureichern. Anschließend wurden auf dem Qtrap 4000-System MRM-Analysen mit spezifischen Übergängen (Tabelle 40) für die jeweiligen Phosphorylierungsstellen durchgeführt. Zusätzlich wurden Übergänge für synthetische, phosphorylierte Standardpeptide, die vor der  $\text{TiO}_2$ -Affinitätschromatographie den Proben zugesetzt wurden, und Übergänge für synthetische Standardpeptide, die kurz vor der Messung zu den Proben gegeben wurden, programmiert und analysiert (siehe Anhang 8.1, Tabelle 40). Durch die Analyse der synthetischen phosphorylierten Standardpeptide wurde überprüft, ob die  $\text{TiO}_2$ -Affinitätschromatographie in den zu vergleichenden

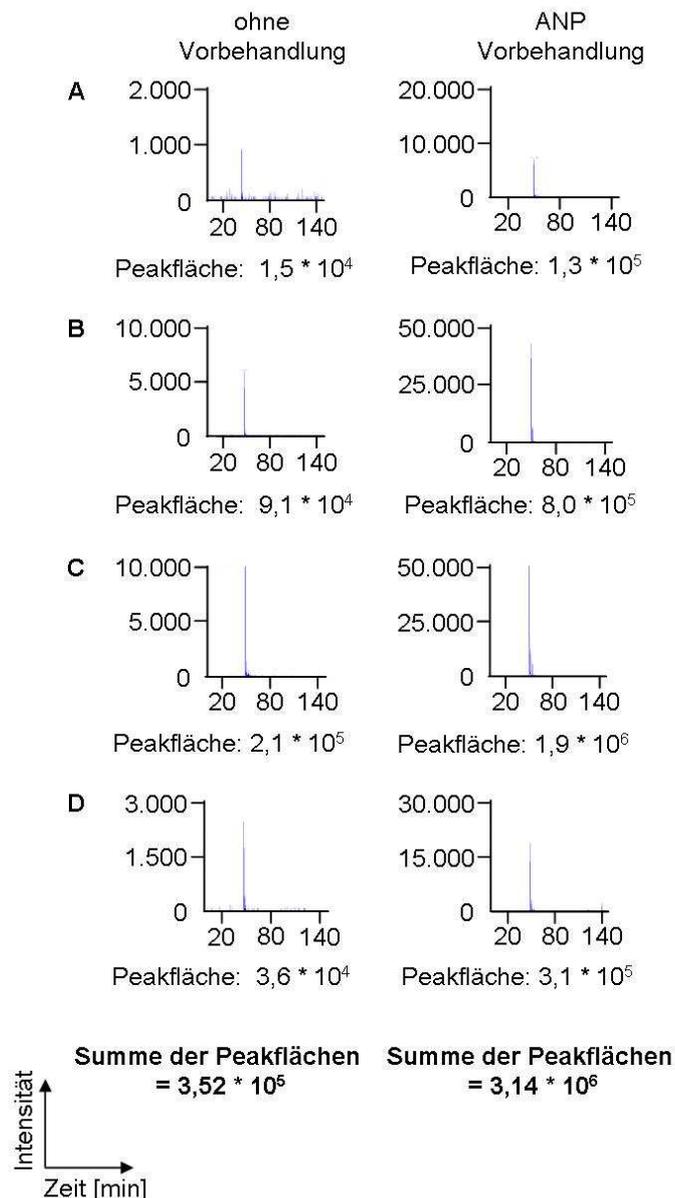
Proben methodisch reproduzierbar durchgeführt worden war, und durch die Analyse der synthetischen Standardpeptide die generelle Stabilität der MRM-Messungen auf dem Qtrap-System überprüft.

Die MRM-Experimente wurden mit der Multiquant-Software ausgewertet, wobei die beobachtete Peakfläche der Chromatogramme linear mit der in der Probe vorhandenen Peptidmenge korreliert. Die Peakflächen der jeweiligen Signalintensitäten der drei bis fünf Übergänge pro Peptid wurden addiert und die Proben aus den mit ANP bzw. AngII behandelten Zellen mit den Proben aus unbehandelten Zellen verglichen. In Abbildung 24 sind als Beispiel aus einem Experiment die Peakflächen der vier Übergänge des Peptides WEDLQPS**p**SLER aus Zellen, die mit ANP vorbehandelt waren oder unbehandelt blieben, dargestellt. Bei diesem tryptischen Peptid war zu erkennen, dass nach ANP-Vorbehandlung der Zellen die Peakflächen anstiegen, wodurch auch die Summe der Peakflächen etwa neunfach erhöht war als bei dem Peptid der Probe aus unbehandelten Zellen. Aus diesem Grund kann auf eine erhöhte Menge des Peptides WEDLQPS**p**SLER in Proben, bei denen die Zellen mit ANP vorbehandelt wurden, geschlossen werden.

In Tabelle 36 und Tabelle 37 sind alle mittels MRM detektierten phosphorylierten tryptischen GC-A-Peptide und ihr Verhalten nach ANP bzw. Ang II-Behandlung der FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen dargestellt. Die Peakflächen der Proben aus den Experimenten mit ANP- bzw. Ang II-Behandlung wurden jeweils auf die Kontrollen ohne Behandlung bezogen. Es wurde immer die vorbehandelte Probe mit einer unbehandelten Probe verglichen, die direkt nacheinander auf dem Qtrap-System gemessen wurden, um möglichst gleiche Systemeigenschaften auszunutzen. Die Verhältnisse der synthetischen Standardpeptide und der synthetischen, phosphorylierten Standardpeptide lagen bei etwa  $1 \pm 0,1$ , wodurch ein Vergleichen der anderen Peptide aus den verschieden behandelten Proben gerechtfertigt war. Nur das synthetische, zweifach phosphorylierte Standardpeptid zeigte eine höhere Standardabweichung.

Mittels der durchgeführten Methoden von der Fraktionierung der Zellen bis hin zur Analyse der tryptischen GC-A-Peptide durch MRM-Messungen war es zusammenfassend möglich, die relative Menge der phosphorylierten Peptide aus mit ANP- bzw. Ang II-vorbehandelten oder unbehandelten Zellen vergleichend darzustellen. Dabei zeigten sich durch die Behandlung der Zellen mit je einem der beiden Peptide unterschiedliche Veränderungen in den Phosphorylierungsmustern. Nach ANP-Inkubation sank die Menge der

merhfach phosphorylierten tryptischen Peptide ab, während die Menge der einfach phosphorylierten tryptischen Peptide anstieg. Hingegen war nach der Ang II-Behandlung ein Absinken der Menge aller phosphorylierten tryptischen Peptide zu verzeichnen.



**Abbildung 24: Peakflächen der vier Übergänge des Peptides WEDLQPSpSLER von Proben aus Experimenten ohne und mit ANP-Vorbehandlung der FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen**

Vier Übergänge wurden aus den MS/MS-Spektren dieses Peptides ausgesucht, um das Peptid WEDLQPSpSLER und dessen Phosphorylierungsstelle spezifisch mittels MRM-Scan zu analysieren. Nach ANP-Vorbehandlung der Zellen war in den Proben ein Anstieg der Peakflächen bei allen vier Übergängen zu sehen, wodurch auch die Summe der Peakflächen höher war, was letztlich für eine etwa neunfach erhöhte Menge dieses Peptides in Proben aus Experimenten mit ANP-Vorbehandlung der Zellen spricht. **A**, Übergang 720,3/486,3; **B**, Übergang 720,3/670,4; **C**, Übergang 720,3/768,4; **D**, Übergang 720,3/288,1.

**Tabelle 36: Relative Quantifizierung der phosphorylierten GC-A-Peptide mittels MRM nach ANP-Vorbehandlung von FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen**

Das Verhältnis der Peakflächen der tryptischen Peptide aus Proben mit ANP-vorbehandelten Zellen vs. unbehandelten Zellen wurde berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Verhältnisse aus 3 biologisch unabhängigen Experimenten (8 unabhängige MRM-Messungen). Für Kontrollzwecke wurden synthetische Standard- und synthetische, phosphorylierte Standardpeptide ebenfalls mittels MRM analysiert. N = Anzahl der Detektionen.

Phosphorylierte tryptische Peptide	Phosphorylierungsstelle(n)	N	Verhältnis der Peakflächen nach ANP-Vorbehandlung vs. Kontrollen	
			Mittelwerte	SEM
WEDLQPSpSLER	Ser487	8	9,56	1,31
VRWEDLQPSpSLER	Ser487	8	9,72	1,58
LTLpSGR	Ser502	8	2,3	0,37
LpTLpSGR	Thr500	8	1,79	0,23
LpTLpSGR	Thr500 und Ser502	8	0,50	0,09
SAGpSRLTLpSGR	Ser497	6	0,94	0,31
SAGSRLpTLpSGR	Thr500 und Ser502	8	3,64	0,99
SAGpSRLTLpSGR	Ser497 und Ser502	8	2,60	0,48
SAGpSRLpTLpSGR	Ser497 und Thr500	7	2,63	0,44
SAGpSRLpTLpSGR	Ser497, Thr500 und Ser502	8	0,19	0,07
GSNYGpSLLTTEGQFQVFAK	Ser510	7	1,61	0,36
GpSNYGSLLTTEGQFQVFAK	Ser506	8	2,51	0,68
GSNYGSLLpTTEGQFQVFAK	Thr513	7	1,72	0,39
GpSNYGpSLLTTEGQFQVFAK	Ser506 und Ser510	3	0,94	0,29
GSNYGpSLLpTTEGQFQVFAK	Ser510 und Thr513	2	1,25	0,76
<b>synthetische Standardpeptide</b>				
VGGHAAEYGAEALER		8	0,93	0,09
TEREDLIAYLK		8	0,94	0,10
VKVDEVGGEALGR		8	1,07	0,05
EFTPVLQADFQK		8	0,98	0,04
<b>synthetische phosphorylierte Standardpeptide</b>				
DIGpSEpSTEDQAmEDIK	Ser4 und Ser6	7	1,22	0,34
NSLVTQDDpTFKDK	Thr9	8	1,07	0,07

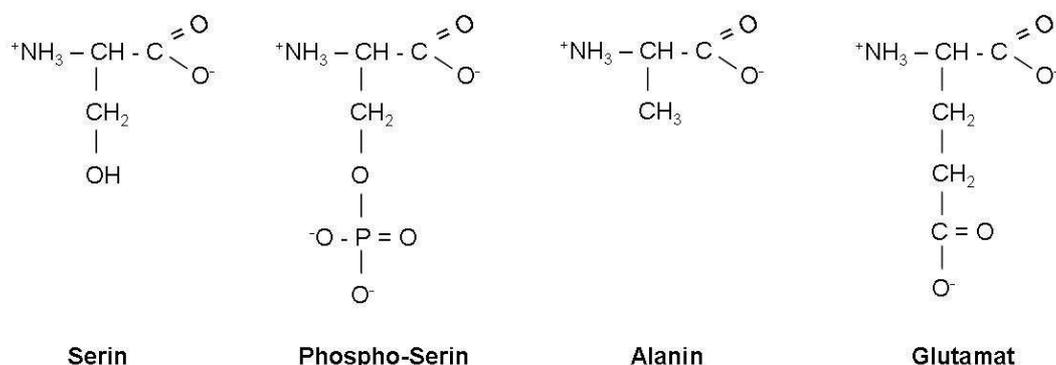
**Tabelle 37: Relative Quantifizierung der phosphorylierten GC-A-Peptide mittels MRM nach Ang II-Vorbehandlung von FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen**

Das Verhältnis der Peakflächen der tryptischen Peptide aus Proben mit Ang II-vorbehandelten Zellen vs. unbehandelten Zellen wurde berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Verhältnisse aus 3 biologisch unabhängigen Experimenten (8 unabhängige MRM-Messungen). Für Kontrollzwecke wurden synthetische Standard- und synthetische, phosphorylierte Standardpeptide ebenfalls mittels MRM analysiert. N = Anzahl der Detektionen.

Phosphorylierte tryptische Peptide	Phosphorylierungsstelle(n)	N	Verhältnis der Peakflächen nach Ang II-Vorbehandlung vs. Kontrollen	
			Mittelwerte	SEM
WEDLQPSpSLER	Ser487	8	0,76	0,24
VRWEDLQPSpSLER	Ser487	8	0,78	0,19
LTLpSGR	Ser502	8	0,67	0,15
LpTLpSGR	Thr500	8	0,82	0,16
LpTLpSGR	Thr500 und Ser502	8	0,76	0,17
SAGpSRLTLpSGR	Ser497	8	0,74	0,31
SAGSRLpTLpSGR	Thr500 und Ser502	8	0,82	0,22
SAGpSRLTLpSGR	Ser497 und Ser502	8	0,55	0,15
SAGpSRLpTLpSGR	Ser497 und Thr500	8	0,53	0,15
SAGpSRLpTLpSGR	Ser497, Thr500 und Ser502	7	1,32	0,50
GSNYGpSLLTTEGQFQVFAK	Ser510	8	0,62	0,39
GpSNYGSLLTTEGQFQVFAK	Ser506	7	0,17	0,08
GSNYGSLLpTTEGQFQVFAK	Thr513	8	0,51	0,29
GpSNYGpSLLTTEGQFQVFAK	Ser506 und Ser510	2	0,06	0,00
GSNYGpSLLpTTEGQFQVFAK	Ser510 und Thr513	3	2,52	2,41
<b>synthetische Standardpeptide</b>				
VGGHAAEYGAEALER		8	0,95	0,18
TEREDLIAYLK		8	1,06	0,26
VKVDEVGGEALGR		8	0,94	0,18
EFTPVLQADFQK		8	1,00	0,22
<b>synthetische phosphorylierte Standardpeptide</b>				
DIGpSEpSTEDQAmEDIK	Ser4 und Ser6	7	0,95	0,23
NSLVTQDDpTFKDK	Thr9	8	1,07	0,07

### 3.5 Die Analyse der Phosphorylierungsstelle an Serin 487

Um die Funktion der bisher unbekanntenen Phosphorylierungsstelle an Serin 487 zu untersuchen, wurde diese Aminosäure mittels PCR-vermittelter Mutagenese, bei der die FLAG-tagged GC-A in dem pMCV5-Expressionsvektor als Matritze genutzt wurde, zu Alanin bzw. Glutamat mutiert. Alanin als kleine Aminosäure ohne geladene Seitenketten wurde substituiert, um den unphosphorylierten Zustand an dieser Position im Protein darzustellen. Hingegen wurde durch die negativ geladene Seitenkette des Glutamats die negative Ladung des Phosphats nachgeahmt, wodurch diese Mutation den phosphorylierten Zustand darstellen sollte. In Abbildung 25 sind die Aminosäuren (Phospho-)Serin, Alanin und Glutamat im Vergleich dargestellt.

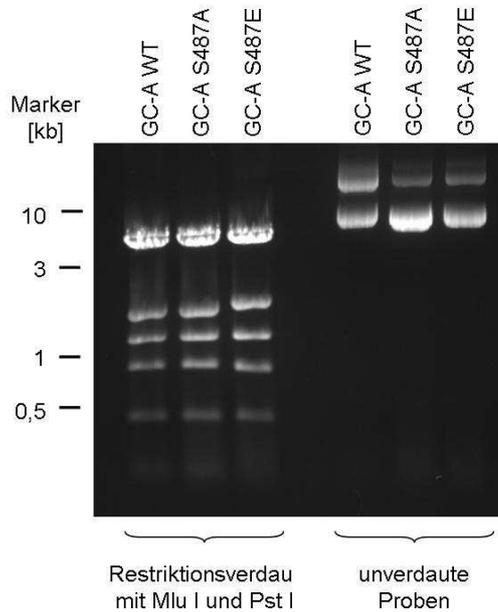


**Abbildung 25: Vergleich der Aminosäuren Serin, Phospho-Serin, Alanin und Glutamat**

(Phospho-)Serin an Position 487 des GC-A Rezeptors wurde mittels PCR-Mutagenese durch Alanin bzw. Glutamat zur Darstellung des unphosphorylierten bzw. phosphorylierten Zustandes ersetzt.

Der Expressionsvektor mit der eingefügten und veränderten cDNA, kodierend für beide GC-A-Mutanten, wurde mit internen Primern sequenziert, um sicher zu gehen, dass zum einen die Mutation erfolgreich war und zum anderen keine ungewollten Veränderungen in der DNA-Sequenz entstanden sind. Die Sequenzierung ergab jeweils eine erfolgreiche Mutation des Serin 487 zu Alanin bzw. Glutamat. Außerdem wurden die drei Konstrukte mit den zwei Restriktionsenzymen Mlu I und Pst I verdaut und die DNA-Fragmente miteinander verglichen. Die Produkte des Restriktionsverbaus wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Fragmente mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Die Analyse ergab bei der WT- und der mutierten DNA jeweils 5 Banden, die aufgrund ihrer Größe jeweils auf gleicher Höhe migrierten. Dies stellt zusätzlich die Integrität der mutierten cDNA sicher. Gleichzeitig konnte durch die Stärke der DNA-Banden im Gel auch die Konzentrationen der drei Konstrukte einander angeglichen werden. Die

unverdaute Proben ergaben zwei DNA-Banden im Agarosegel, die durch die entspannte (relaxed) und verknäuelte (supercoiled) Form entstanden sind.

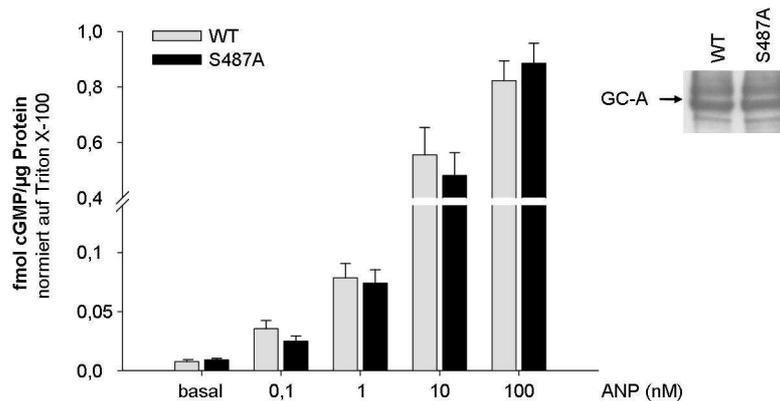


**Abbildung 26: Vergleich der Produkte des Restriktionsverdaus der Konstrukte GC-A WT, GC-A S487A und S487E im DNA-Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung**

2  $\mu$ g des jeweiligen Konstruktes wurden mit den Restriktionsenzymen Mlu I und Pst I verdaut, elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Der Restriktionsverdau ergab jeweils fünf DNA-Banden, die auf jeweils gleicher Höhe migrierten. Zusätzlich wurden unverdaute Proben von jedem Konstrukt analysiert. Diese ergaben zwei Banden, die der entspannten und der verknäuelten Form entsprechen.

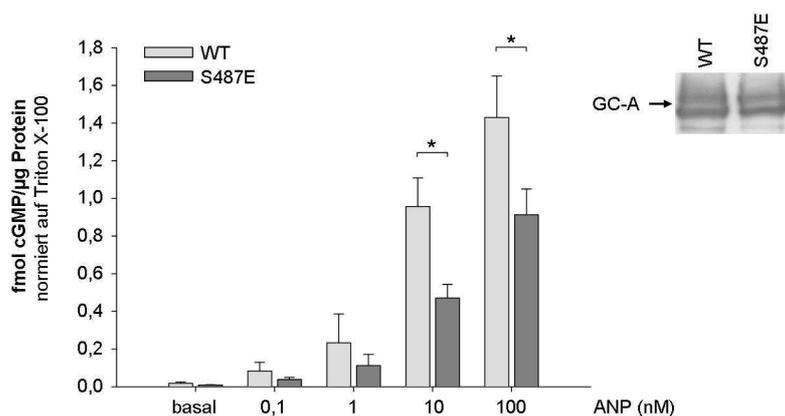
Das Verhalten der Mutanten in Bezug auf die Rezeptoraktivität wurde jeweils im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor überprüft. Dazu wurden HEK 293-Zellen mit dem jeweiligen Konstrukt transient transfiziert, die Membranen präpariert und die Aktivierbarkeit des GC-A-Rezeptors durch ANP mittels Guanylyl Cyclase-Assay und anschließendem cGMP-Radioimmunassay analysiert. Um sicherzugehen, dass eine unterschiedliche ANP-abhängige cGMP-Synthese nicht durch unterschiedliche Rezeptor-Expressionsdichten zustande kam, wurden die präparierten Membranen mittels anti-GC-A-Antikörper im Western Blot untersucht. Zusätzlich wurden die basale (Zugabe von A.dest.) und ANP-stimulierte cGMP-Bildung auf die Triton X-100-stimulierte cGMP-Bildung normiert, um noch eventuell kleine vorhandene Unterschiede in der Expression zu berücksichtigen. Da Triton X-100 den GC-A-Rezeptor ligandenunabhängig maximal stimuliert, wird dieser Wert zur Normierung genutzt<sup>164, 165</sup>. In Abbildung 27 und Abbildung 28 ist die cGMP-Produktion pro  $\mu$ g Protein/10 min unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit 0,1 bis 100 nM ANP des GC-A WT-Rezeptors im Vergleich zu den beiden Mutanten dargestellt. Die Alanin-Mutante (Abbildung 27) zeigte keine signifikanten Unterschiede in der ANP-Aktivierbarkeit im Vergleich zum GC-A WT-Rezeptor. Die Glutamat-Mutante (Abbildung 28) allerdings ließ sich durch ANP deutlich geringer

aktivieren, so dass sich die gebildete cGMP-Menge signifikant vom GC-A WT-Rezeptor nach Stimulation mit 10 und 100 nM ANP unterschied. Die Triton X-100-Aktivität entsprach aber der des WT-Rezeptors. Dies zeigt, dass die Mutationen und damit die Darstellung des unphosphorylierten bzw. phosphorylierten Zustandes des Serins an der Position 487 möglicherweise einen unterschiedlichen Einfluss auf die ANP-Aktivierbarkeit der GC-A haben.



**Abbildung 27: Guanylyl Cyclase-Aktivität des GC-A WT- und GC-A S487A-Rezeptors**

GC-A WT bzw. GC-A S487A exprimierende HEK 293-Zellen wurden lysiert, die Membranen präpariert und diese mit ANP (0,1 bis 100 nM) stimuliert. Das gebildete cGMP wurde mittels RIA gemessen und auf den cGMP-Wert nach Stimulation mit Triton X-100 normiert. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot analysiert (10 µg Protein pro Spur). Es waren keine Aktivitätsunterschiede zwischen GC-A WT- und GC-A S487A-Rezeptor vorhanden. Es wurden acht Replikate aus drei biologisch unabhängigen Experimenten analysiert.



**Abbildung 28: Guanylyl Cyclase-Aktivität des GC-A WT- und GC-A S487E-Rezeptors**

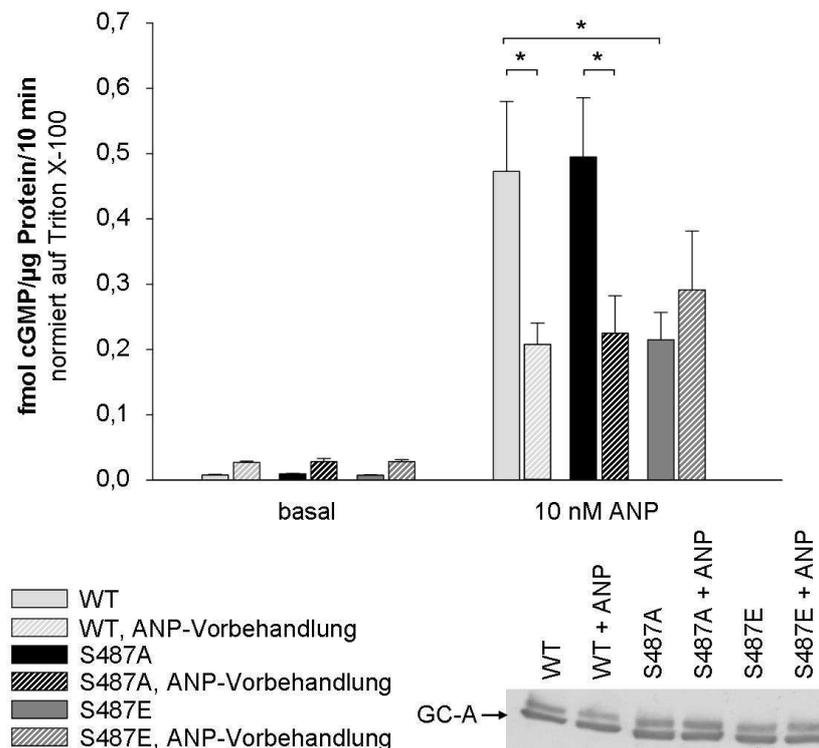
GC-A WT bzw. GC-A S487E exprimierende HEK 293-Zellen wurden lysiert, die Membranen präpariert und diese mit ANP (0,1 bis 100 nM) stimuliert. Das gebildete cGMP wurde mittels RIA gemessen und auf den cGMP-Wert nach Stimulation mit Triton X-100 normiert. Trotz gleicher Proteinexpression, die mittels Western Blot analysiert wurde (10 µg Protein pro Spur), war die cGMP-Produktion des GC-A S487E-Rezeptors signifikant geringer im Vergleich zur cGMP-Produktion des GC-A WT-Rezeptors. Es wurden neun Replikate aus drei biologisch unabhängigen Experimenten analysiert. \*  $p < 0,05$  vs WT

### 3.6 Die Bedeutung der Phosphorylierung von Serin 487 der GC-A nach homologer Desensibilisierung

Um den Einfluss der Phosphorylierung von Serin 487 der GC-A in Bezug auf die homologe Desensibilisierung des Rezeptors zu überprüfen, wurden wiederum HEK 293-Zellen mit den Konstrukten GC-A WT, GC-A S487A bzw. GC-A S487E transient transfiziert. Vor der Lyse der Zellen wurden diese mit 0,1  $\mu\text{M}$  ANP für 1 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  in Anlehnung an Potter und Hunter, 1998<sup>78</sup> inkubiert. Anschließend wurden wie zuvor die Membranen präpariert, diese mit A.dest. (Basalwert) behandelt oder mit 10 nM ANP bzw. 1 % Triton X-100 stimuliert, das gebildete cGMP mittels RIA gemessen und die erhaltenen Werte auf den cGMP-Wert nach Stimulation mit Triton X-100 normiert. Außerdem wurde die Rezeptorexpression mittels Western Blot analysiert. In Abbildung 29 ist die cGMP-Produktion pro  $\mu\text{g}$  Protein/10 min für GC-A WT und die beiden Mutanten ohne und mit ANP-Vorbehandlung dargestellt. Die cGMP-Produktion ohne Vorbehandlung war bei dem GC-A WT- und GC-A S487A-Rezeptor wiederum identisch. Ebenfalls war die Produktion des GC-A S487E-Rezeptors im Vergleich zum WT-Rezeptor wie bei dem vorherigen Experiment signifikant reduziert.

Durch die ANP-Vorbehandlung war bei dem GC-A WT- und GC-A S487A-Rezeptor die cGMP-Antwort nach anschließender ANP-Stimulation etwa um die Hälfte verringert im Vergleich zu der cGMP-Synthese ohne ANP-Vorbehandlung. Die statistische Auswertung dieser Daten ergab eine signifikante Reduktion des gebildeten cGMP als Beweis der Desensibilisierung der GC-A. Hingegen wurde die cGMP-Produktion des GC-A S487E-Rezeptors durch die ANP-Vorbehandlung nicht verändert. Die Bildung des cGMP war sogar leicht erhöht, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Membranen von unbehandelten und mit ANP-vorbehandelten Zellen.

Die Alanin-Mutante ließ sich also wie der WT-Rezeptor desensibilisieren, die Glutamat-Mutante jedoch zeigte keine veränderte cGMP-Synthese nach der ANP-Vorbehandlung.



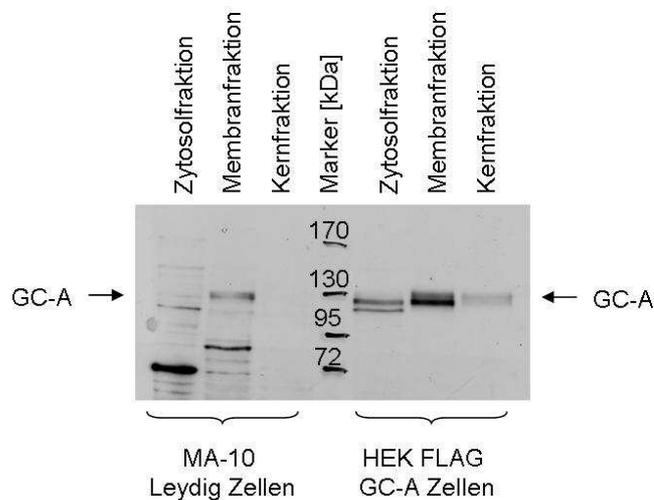
**Abbildung 29: Guanylyl Cyclase-Aktivität des GC-A WT-, GC-A S487A- und GC-A S487E-Rezeptors nach homologer Desensibilisierung**

HEK 293-Zellen wurden mit dem jeweiligen Konstrukt transient transfiziert und vor dem Guanylyl Cyclase-Assay für 1 h mit 0,1  $\mu$ M ANP inkubiert, um eine homologe Desensibilisierung hervorzurufen. Das während des nachfolgenden Assays durch Zellmembranen gebildete cGMP wurde mittels RIA gemessen und auf den cGMP-Wert nach Stimulation mit Triton X-100 normiert und die Proteinexpression im Western Blot überprüft (10  $\mu$ g Protein pro Spur). Im Ergebnis war die ANP-stimulierte cGMP-Produktion durch den GC-A WT- und GC-A S487A-Rezeptor ähnlich und wurde durch die ANP-Vorbehandlung auf etwa die Hälfte reduziert. Die cGMP-Produktion des GC-A S487E-Rezeptors war wiederum im Vergleich zum WT-Rezeptor deutlich erniedrigt, wurde allerdings durch die ANP-Vorbehandlung nicht weiter reduziert. Für diese Ergebnisse wurden sechs Replikate aus 2 biologisch unabhängigen Experimenten analysiert. \*  $p < 0,05$

### 3.7 Die Analyse der Phosphorylierungsstellen der GC-A in MA-10 Leydig- und MyEnd-Zellen

Murine MA-10 Zellen sind Leydig-Zellen des Testis und MyEnd-Zellen mikrovaskuläre endotheliale Myokardzellen. Beide Zellarten besitzen eine relativ hohe endogene GC-A Expression und ANP moduliert darüber die Testosteronproduktion (MA-10 Leydig-Zellen) bzw. Proliferation und Migration (MyEnd-Zellen) <sup>108, 167</sup>. Aufgrund der hohen endogenen GC-A-Expression wurden diese beiden Zellarten genutzt, um endogen exprimierte murine GC-A aufzureinigen und die in FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen detektierten Phosphorylierungsstellen der GC-A mittels Massenspektrometrie in diesen Zellen zu verifizieren.

Um die Expressionsdichte der endogen exprimierten GC-A mit der der FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen zu vergleichen und um anschließend das Ausgangszellmaterial für die weiteren Versuche anzupassen, wurden MA-10 Leydig- bzw. FLAG-GC-A exprimierende HEK 293-Zellen einer 10 cm-Zellkulturschale einer Zellfraktionierung unterzogen und die einzelnen Fraktionen mittels Western Blot analysiert (Abbildung 30). Die Proteinbanden wurden mittels ImageJ miteinander verglichen und ausgewertet. Schon im Western Blot war zu erkennen, dass die GC-A in den Membranen der MA-10 Leydig-Zellen geringer exprimiert war. Deutlich war auch, dass in der Zytosolfraktion im Gegensatz zu dem Überexpressionssystem keine GC-A detektiert wurde.



**Abbildung 30: Zellfraktionierung von MA-10 Leydig- und FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen**

Je eine 10 cm-Zellkulturschale mit MA-10 Leydig- bzw. FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen wurde für die Zellfraktionierung genutzt. Die Fraktionen wurden mittels anti-GC-A-Antikörper im Western Blot analysiert. Bei den Fraktionen der MA-10 Leydig-Zellen wurden 25 µg pro Spur aufgetragen, bei den FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen nur 1 µg pro Spur, wodurch schon die niedrigere Expressionsdichte der GC-A in MA-10 Leydig-Zellen deutlich wird.

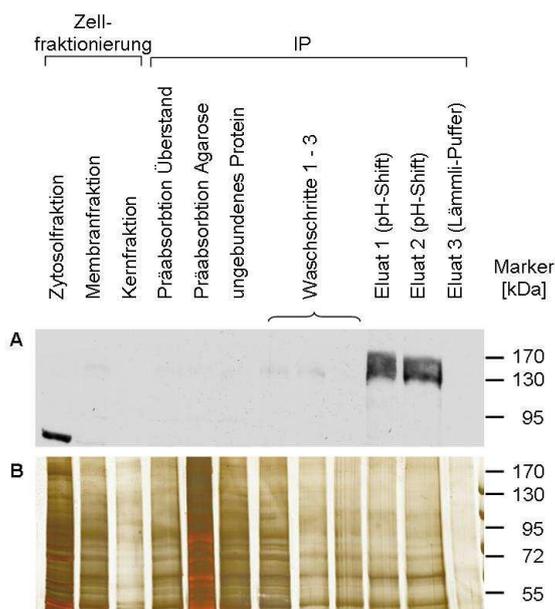
Durch die Auswertung der Proteinbanden (Tabelle 38) ergab sich eine etwa 80-fach geringere GC-A Expression in den MA-10 Leydig-Zellen im Vergleich zu den FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen. Bei den IP-Experimenten mit FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen wurde mit 15 x 10 cm-Zellkulturschalen gearbeitet, für die MS-Analyse wurden die Proben geviertelt, damit die HPLC-Säulen nicht überladen wurden. Daher wurde für eine Immunpräzipitation der endogen exprimierten GC-A aus MA-10 Leydig-Zellen mit Zellen aus 100x 10 cm-Zellkulturschalen gearbeitet, was etwa einer MS-Messung der FLAG-GC-A-Probe entsprach und von der Menge noch zu handhaben war. Bei Experimenten mit MyEnd-Zellen wurde mit Zellen aus 30x bis 45x 10 cm-Zellkulturschalen gearbeitet.

**Tabelle 38: Auswertung der Proteinbanden der Membranfraktion des Western Blots mit Zellfraktionen aus MA-10 Leydig- und FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen**

Die GC-A-Proteinbande der Membranfraktion aus MA-10 Leydig- bzw. FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen wurden mittels ImageJ analysiert. Durch dieses Programm wurde der Schwärzungsgrad des Western Blots in Pixel ausgedrückt und diese auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen. Die GC-A-Expression der MA-10 Leydig-Zellen wurde anschließend mit der Expression der FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen verglichen.

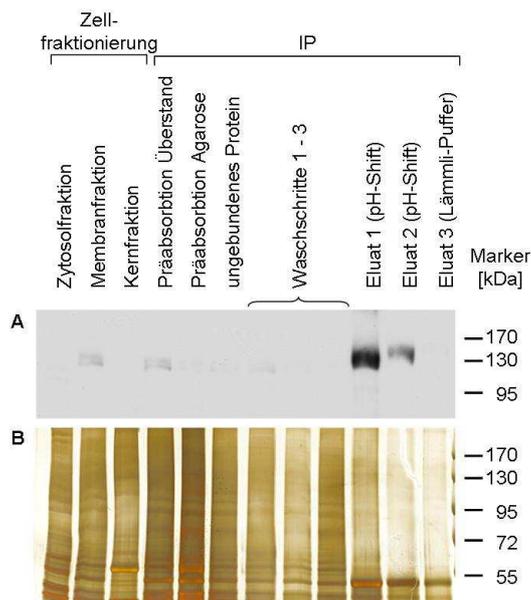
Zellen	aufgetragene Proteinmenge	Pixel	Pixel/ $\mu$ g Protein	Expressionsverhältnis
MA-10 Leydig-Zellen	25 $\mu$ g	5924	237	1/80
FLAG-GC-A exprimierende HEK 293-Zellen	1 $\mu$ g	19252	19252	1

Die MA-10 Leydig- bzw. MyEnd-Zellen wurden analog zu den FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen lysiert und die Immunpräzipitation mit Protein-A-Agarose und Antikörper gegen den C-Terminus der GC-A an der Membranfraktion durchgeführt. Die Effizienz der Methode wurde wiederum mittels Western Blot und Silbergel überprüft. Durch die Western Blot Analysen konnte wie bei den Experimenten mit den FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen eine sehr starke Anreicherung des Rezeptors gezeigt werden (Abbildung 31 A). Es ergab sich durchschnittlich eine 160-fache Anreicherung im ersten Elutionsschritt und eine 94-fache Anreicherung im zweiten Elutionsschritt. Beide Elutionen erfolgten durch pH-Shift. Durch die Anfärbung der Proteine im Silbergel war zu erkennen, dass der Rezeptor ebenfalls aufgereinigt wurde, da in den Eluat in Vergleich nur noch wenige Proteinbanden zu sehen waren (Abbildung 31 B). Allerdings war die Bande bei 130 kDa, dem apparenten MW der GC-A, nur sehr schwach zu erkennen. Bei den Experimenten mit MyEnd-Zellen war mittels Western Blot Analyse eine 53-fache Anreicherung bei Elution 1 und eine 21-fache Anreicherung bei Elution 2 zu sehen. Auch hier war im silbergefärbten SDS-Gel eine starke Aufreinigung zu erkennen, allerdings war die Bande auf der Höhe des MW der GC-A ebenfalls nur sehr schwach ausgebildet. Bei beiden Immunpräzipitationen war die Elution des Rezeptors von der Agarose vollständig, da keine GC-A in dem Eluat, das mit Lämmli-Puffer nach den pH-Shift-Elutionen erhalten wurde, detektiert werden konnte.



**Abbildung 31: Analyse der Zellfraktionierung und Immunpräzipitation der GC-A aus MA-10 Leydig-Zellen mittels Western Blot und silber gefärbtem Gel**

MA-10 Leydig-Zellen von 100x 10 cm-Zellkulturschalen wurden fraktioniert und eine Immunpräzipitation mit der Membranfraktion und anti-GC-A-Antikörper durchgeführt. Die Elution erfolgte zweimal mittels pH-Shift (pH 2,5), die Agarose wurde in Lämmli gekocht und dieses Eluat wurde ebenfalls analysiert. Die Western Blot-Analyse (**A**) zeigte eine deutliche Anreicherung der GC-A (bis zu 160-fach) und keine Verluste des GC-A-Proteins an der Agarose. Mittels silbergefärbtem Gel (**B**) wurde die Aufreinigung gezeigt, wobei allerdings nur eine schwache Proteinbande der bei 130 kDa, dem MW der GC-A, bei den Eluaten zu sehen war. Aufgetragene Proteinmenge: A, 9 µg pro Spur, 3 µg pro Spur bei Eluat 1 und 2. B, 1 µg pro Spur, 3 µg pro Spur bei Eluat 1 und 2.



**Abbildung 32: Analyse der Zellfraktionierung und Immunpräzipitation der GC-A aus MyEnd-Zellen mittels Western Blot und silber gefärbtem Gel**

MyEnd-Zellen von 30x 10 cm-Zellkulturschalen wurden fraktioniert und eine Immunpräzipitation mit der Membranfraktion und anti-GC-A-Antikörper durchgeführt. Die Elution erfolgte zweimal mittels pH-Shift (pH 2,5), die Agarose wurde in Lämmli gekocht und dieses Eluat wurde ebenfalls analysiert. Die Western Blot-Analyse (**A**) zeigte eine deutliche Anreicherung der GC-A (bis zu 53-fach). Mittels silbergefärbtem Gel (**B**) wurde die Aufreinigung gezeigt, wobei auch hier nur eine schwache Proteinbande bei 130 kDa, dem MW der GC-A) bei den Eluaten zu sehen war. Aufgetragene Proteinmenge: A, 9 µg pro Spur, 2,2 µg bei Eluat 1 und 0,9 µg bei Eluat 2. B, 1 µg pro Spur, 2,2 µg bei Eluat 1 und 0,9 µg bei Eluat 2.

Die eluierten Proteine der Eluate 1 und 2 wurden mit TCA gefällt, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassie G-Färbung sichtbar gemacht. Die entsprechende Proteinbande des GC-A Rezeptors wurde ausgeschnitten, gewaschen, mit Trypsin verdaut und die phosphorylierten tryptischen Peptide mittels TiO<sub>2</sub>-Tips angereichert. Die Analyse der tryptischen

Phosphopeptide erfolgte auf dem Orbitrap XL-System, welches sich durch eine hohe Sensitivität auszeichnet. Die Auswertung der MS/MS-Daten mit der IPI-Maus-Datenbank ergab eine geringe Abundanz von tryptischen Peptiden der GC-A mit einer Sequenzabdeckung von etwa 40 % und eine Vielzahl von Peptiden anderer Proteinen. Trotzdem konnten einige phosphorylierte Peptide detektiert werden, welche in Tabelle 39 aufgelistet sind. Die entsprechenden MS/MS-Spektren befinden sich im Anhang (siehe 8.2). Es wurden drei bzw. vier Phosphorylierungsstellen der GC-A aus MA-10 Leydig- bzw. MyEnd-Zellen detektiert. Bei den phosphorylierten Aminosäuren der GC-A aus MA-10 Leydig-Zellen handelt es sich um Serin 497, Threonin 500 und Serin 506. In den MyEnd-Zellen wurde das Peptid als einfach phosphoryliert detektiert, welches die zuvor in der Literatur unbekannte Phosphorylierungsstelle Serin 487 beinhaltet. Weiterhin waren auch hier die Phosphorylierungen an Serin 497 und Threonin 500 nachweisbar. Außerdem wurde ein phosphoryliertes Tyrosin am C-Terminus des Rezeptors (Tyrosin 1017) in der GC-A aus MyEnd-Zellen detektiert. Es wurden neben diesen phosphorylierten Peptiden der GC-A auch phosphorylierte Peptide anderer Proteine detektiert.

So konnten an der endogen, nativ exprimierten GC-A einige der Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden, die zuvor in dem Überexpressionssystem der FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen detektiert wurden. Allerdings war dafür eine sehr viel größere Ausgangsmenge an Zellen notwendig.

**Tabelle 39: Mittels MS/MS detektierte phosphorylierte Peptide der GC-A aus MA-10 Leydig- und MyEnd-Zellen**

Die tryptischen GC-A-Peptide aus MA-10 Leydig- und MyEnd-Zellen wurden durch TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie angereichert und mittels MS/MS auf dem Orbitrap XL-System analysiert. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf das reife Protein (IPI Accession Nummer IPI00111183). Die detektierten Phosphorylierungsstellen sind in der Peptidsequenz durch eine **fette** Markierung der jeweiligen AS Serin, Threonin oder Tyrosin gekennzeichnet. Abkürzungen: m/z, Masse zu Ladungs-Verhältnis; z, Ladung; M<sub>r</sub> (exp), experimentelle Masse, M<sub>r</sub> (calc), kalkulierte Masse; Delta, Massenabweichung M<sub>r</sub> (exp) - M<sub>r</sub> (calc).

Zellen	Position	Peptidsequenz	phosphorylierte Stelle(n)	Score	m/z	z	M <sub>r</sub> (exp)	M <sub>r</sub> (calc)	Delta
MA-10	494 - 504	R.SAG <b>p</b> SRL <b>p</b> TLSSGR.G	Ser497 und Thr500	28	623,78	2	1263,54	1263,54	-0,0016
	505 - 523	R.G <b>p</b> SNYGSLLTTEGGQFQVFAK.T	Ser506	126	1064,50	2	2126,98	2125,97	1,0116
MyEnd	480 – 490	R.WEDLQ <b>Pp</b> ( <b>SS</b> )LER.H	Ser486 oder Ser487	31	720,31	2	1438,61	1438,61	0,0008
	494 - 504	R.SAG <b>p</b> SRL <b>p</b> TLSSGR.G	Ser497 und Thr500	33	632,78	2	1263,54	1263,54	0,0004
	1016 – 1023	R.T <b>p</b> YWLLGER.G	Tyr1017	54	559,26	2	1116,50	1116,50	0,0032

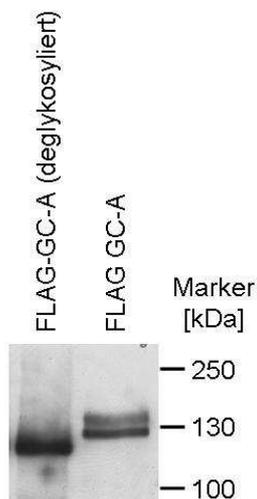
## 4 Diskussion

### 4.1 Das FLAG-Epitop beeinflusst die Funktionalität der GC-A nicht und ermöglicht die Affinitätsaufreinigung

In Rahmen dieser Arbeit wurden FLAG-GC-A exprimierende HEK 293-Zellen genutzt, um die Phosphorylierungsstellen der GC-A mittels MS darzustellen. Der Einfluss des FLAG-Epitops auf die Funktionalität des GC-A-Rezeptors wurde mittels cGMP-RIA- und Immunfluoreszenzexperimenten überprüft. Die Rezeptorantwort auf ANP-Stimulation durch das FLAG-Epitop wurde nicht beeinflusst, da der FLAG-GC-A-Rezeptor im Vergleich zum wildtypischen GC-A-Rezeptor nach ANP-Stimulation ähnliche Mengen des sekundären Botenstoffs cGMP bildete (Abbildung 12). Mittels Immunzytochemie war zu erkennen, dass FLAG-GC-A hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert ist (Abbildung 13). Allerdings war auch im Zytoplasma immunreaktives Protein vorhanden. Das bedeutete, dass entweder GC-A detektiert wurde, die durch das Zytoplasma an die Membran transportiert wurde und/oder die GC-A aufgrund der Überexpression in zytoplasmatischen Vesikeln gespeichert wurde. Trotzdem beeinflusst das FLAG-Epitop die Funktionalität und hauptsächlich Membranlokalisation des Rezeptors nicht und stellt daher ein gutes Werkzeug für die Affinitätsaufreinigung dar.

Aufgrund dieses Epitops ließ sich der GC-A-Rezeptor sehr gut anreichern und aufreinigen. Dazu wurden die Zellen zuerst fraktioniert und die Membranfraktion für die Immunpräzipitation mit anti-FLAG-Antikörper genutzt. Die Analyse der Zellfraktionen und der IP mittels Western Blot zeigte, dass die Fraktionierung zu einer guten Trennung der Zellkompartimente Zytosol, Membran und Kern führte (Abbildung 15) und der GC-A-Rezeptor ausgehend von der Membranfraktion im Vergleich zur Elutionsfraktion 17-fach angereichert wurde (Abbildung 16). Der anti-FLAG-Antikörper wies bei den Western Blot-Analysen ausschließlich den GC-A-Rezeptor nach, da keine weiteren, unspezifischen Banden zu erkennen waren. Die GC-A-Bande lag meist als Doppelbande vor. Da in der Literatur belegt ist, dass der Rezeptor glykosyliert ist <sup>74, 168</sup>, wurde getestet, ob die Doppelbande durch den Glykosylierungsstatus erklärt werden kann. Um dies zu analysieren, wurden Eluate aus einer FLAG-GC-A-IP mit Glykosidase F behandelt. Dadurch wurden die Glykosylierungen der extrazellulären Domäne entfernt und statt der Doppelbande war nur eine Bande bei einem etwas

geringeren Molekulargewicht zu erkennen. Die Doppelbande ist also auf einen unterschiedlichen Glykosylierungsstatus zurückzuführen (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Western Blot Analyse der deglykosylierten FLAG-GC-A**

Membranen von FLAG-GC-A überexprimierenden HEK 293-Zellen wurden mit 5 U N-Glykosidase F, welches N-Glykan-Bindungen von Glykoproteinen zwischen Asparagin und der Kohlenhydratkette spaltet, bei 37 °C über Nacht behandelt und anschließend mittels Western Blot (anti-FLAG-Antikörper) analysiert. Die unbehandelte Probe diente als Kontrolle. Durch die Deglykosylierung war im Vergleich zur Kontrolle nur noch eine GC-A-Bande zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Doppelbande der Kontrollprobe durch einen unterschiedlichen Glykosylierungszustand des Rezeptors entsteht. Wahrscheinlich beeinflusst der Glykosylierungszustand auch die Migrationseigenschaft des Rezeptors, da die deglykosylierte GC-A-Bande bei einem geringeren Molekulargewicht detektiert wurde. Es wurde 1 µg Protein pro Spur aufgetragen.

Anhand des silbergefärbten Gels wurde die Aufreinigung dokumentiert (Abbildung 16). Die Gelbanden der Zytosol- und Membranfraktion färbten sich schnell braun, da diese Fraktionen viele Proteine beinhalten. Die Kernfraktion zeigte im Vergleich dazu deutlich weniger Proteinbanden. Bei den Waschschrritten nahm die Proteinanzahl ab, das heißt, unspezifisch an der Agarose haftende Proteine wurden entfernt. In der Elutionsfraktion hingegen waren nur sehr wenige Proteinbanden, hauptsächlich eine dominante Bande auf Höhe der 130 kDa, vorhanden, was neben der Anreicherung der GC-A auch auf eine sehr gute Aufreinigung hinweist.

Trotz eines Überschusses an 3x FLAG-Peptid, welches bei der Elution der GC-A von der FLAG-Agarose kompetitiv eingesetzt wurde, verblieb ein Teil des Rezeptors an der Agarose und konnte nur mit dem denaturierenden Lämmli-Puffer eluiert werden. Dies könnte an einer unspezifischen Bindung liegen, welche jedoch unwahrscheinlich ist, da unspezifische Bindungsstellen der Agarose vor der IP durch Inkubation mit BSA geblockt wurden. Dieses Problem könnte durch noch stringenteres Waschen durch ansteigende Salzkonzentrationen bzw. Zusatz von Detergenzien wie SDS oder Nonidet P-40 minimiert werden <sup>169</sup>. Dabei besteht jedoch auch das Problem, dass durch zu intensives Waschen die Rezeptorausbeute verringert werden kann. Eine Elution durch einen pH-Shift wäre ebenfalls möglich, jedoch ist diese Art der Elution nicht spezifisch für das gewünschte Protein. Noch unspezifisch an der Agarose

heftende Proteine können somit ebenfalls eluiert werden und dadurch die Aufreinigung negativ beeinflussen.

Für die nachfolgenden MS-Analysen wurden also geringe Verluste bei der Immunpräzipitation akzeptiert, um eine qualitativ bessere Aufreinigung zu erzielen.

## **4.2 Mögliche Bedeutung der mittels MS zusätzlich zu dem GC-A-Rezeptor detektierten Proteine**

Die angereicherte und aufgereinigte GC-A wurde mittels Trichloracetat gefällt, elektrophoretisch aufgetrennt und tryptisch verdaut. In den anschließenden massenspektrometrischen Analysen der gewonnenen Peptide wurde hauptsächlich GC-A detektiert. Andere Proteine wurden auch gefunden, aber mit deutlich geringerem Protein-Score (Tabelle 34). Der Score beschreibt die Signifikanz des Suchergebnisses<sup>151</sup>. Je höher der Wert ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses.

Obwohl für die MS-Analysen die Zellmembranfraktion das Ausgangsmaterial war, wurden sowohl Zytosol- als auch Kernproteine detektiert. Dies könnte daran liegen, dass das Zytoskelett teilweise an der Zellmembran verankert ist und deshalb beide Zellkomponenten nicht komplett voneinander getrennt werden konnten. Auch Verunreinigungen können zu diesen Ergebnissen beitragen. Unerklärlich hingegen ist, dass diese Zytosol- und Kernproteine mit ganz unterschiedlichen Molekulargewichten in der Bande bei einem MW von 130 kDa detektiert werden konnten. Eventuell liegt eine Verunreinigung während der Aufreinigung vor oder das SDS-Gel war überladen, was die Migration von Proteinen stören könnte. Trotzdem sollen einige dieser Proteintreffer hier näher beschrieben werden.

Die M-Phase induzierende Phosphatase 2, auch bekannt als Cdc25b, wurde in den untersuchten Proben oft gefunden. Sie dephosphoryliert die Proteinkinase CDK1, der Cyklin-abhängigen Kinase 1, und aktiviert dadurch die Kinaseaktivität. CDK1 leitet in allen eukaryotischen Zellen sowohl den Eintritt in die M-Phase des Zellzyklusses als auch den Austritt aus dieser Phase<sup>170</sup> und ist im Zellkern lokalisiert. Interessanterweise wird durch das Internetprogramm NetPhosK, ein Programm, das theoretisch mögliche Phosphorylierungsstellen anhand von Konsensussequenzen ermittelt, die Phosphorylierung der Aminosäure S487 der GC-A vorgeschlagen und CDK1 als mögliche Proteinkinase genannt<sup>171</sup>.

Ein weiterer häufiger Proteintreffer war die Guanylyl Cyklase B. Da GC-A und GC-B homologe Rezeptoren sind <sup>19</sup>, ist es allerdings durchaus möglich, dass GC-B nur aus diesem Grund als Proteintreffer angezeigt wurde, da aus beiden Rezeptoren identische tryptische Peptide generiert werden können. Da HEK 293-Zellen endogen keine GC-B exprimieren <sup>172</sup>, ist die Detektion von GC-B somit eine Fehlinterpretation des Programms.

Die beiden Untereinheiten des Hitzeschock-Proteins 90 (HSP90) wurden ebenfalls detektiert. HSP90 ist ein Chaperon, welches mit Hilfe des Co-Chaperons p50<sup>cdc37</sup> möglicherweise an der Reifung und Faltung der GC-A beteiligt ist <sup>173</sup>. Auch das 78kDa Glukose-regulierte Protein, welches die Anordnung von Proteinkomplexen im ER fördert, wurde detektiert und könnte die Reifung der GC-A beeinflussen. Die Detektion der beiden Proteine deutet somit darauf hin, dass der GC-A-Rezeptor in den HEK-Zellen korrekt prozessiert wird. Eine andere Erklärung wäre, dass bei der Aufreinigung des Rezeptors auch GC-A aus dem Endoplasmatischen Retikulum aufgereinigt wurde.

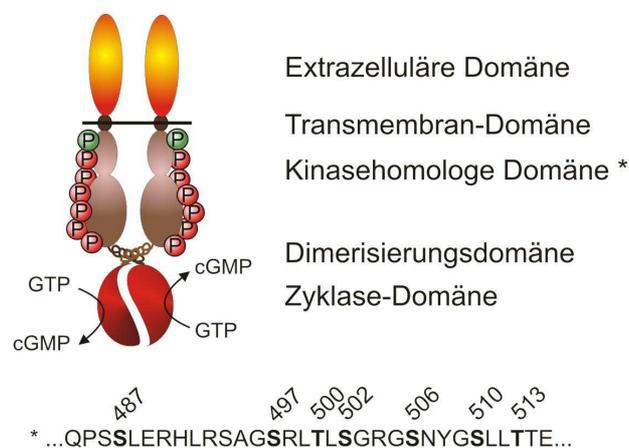
Das ebenfalls detektierte 14-3-3 Protein bindet an das Phosphoserin-Erkennungsmotiv Arg/Lys-Xxx-Xxx-pSer-Xxx-Pro und moduliert dadurch die Aktivität des jeweiligen Bindungspartners <sup>174</sup>. Es ist in der Regulation des Zellüberlebens, der Apoptose, der Proliferation und der Signalübertragung involviert <sup>175</sup>. Das Motiv ist zweimal in der GC-A-Sequenz enthalten (Lys-Iso-Cys-Ser-Ser-Pro in der extrazellulären Domäne (AS 211 bis 216) und Arg-Met-Ala-Ser-Pro-Pro in der KHD (AS 676 bis 681)), allerdings ist nicht bekannt, dass das jeweils in dem Motiv enthaltene Serin phosphoryliert ist. Die Detektion des 14-3-3 Proteins ist somit entweder ein Artefakt oder diese Serine liegen tatsächlich phosphoryliert vor und dies wurde bisher nicht detektiert.

Als letztes ebenfalls detektiertes Protein soll Ubiquitin genannt werden. Die Anlagerung von Ubiquitin-Polymeren führt zur Proteindegradation <sup>176</sup> und könnte am Abbau der GC-A beteiligt sein.

Bei Immunpräzipitationen werden zwangsläufig niedrig affine, aber abundante kontaminierende Proteine detektiert, das sogenannte Agarose-Proteom <sup>177</sup>. Um potentielle Interaktionen zu bestätigen bzw. Zufallsergebnisse herauszufiltern, müssen gezielte, quantitative Studien, wie Pull-down-Assays mit spezifischen Negativkontrollen, durchgeführt werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht realisiert, da die Fragestellung sich auf posttranslationale Modifikation, nicht auf Protein-Protein-Interaktionen, konzentrieren sollte.

### 4.3 Mittels MS konnten sieben Phosphorylierungsstellen in der KHD detektiert werden

Um die Phosphorylierungsstellen der GC-A nachweisen zu können, war es notwendig die tryptischen phosphorylierten Peptide mittels  $\text{TiO}_2$  anzureichern. Ohne diese Anreicherung konnten keine Phosphopeptide detektiert werden, da diese im Vergleich zu nicht phosphorylierten Peptiden niedrig abundant vorlagen. Nach Anreicherung mit  $\text{TiO}_2$ -Affinitätschromatographie, anschließenden MS/MS-Analysen und manueller Auswertung der Daten konnten sieben Phosphorylierungsstellen in der KHD detektiert werden (Abbildung 34). Die Phosphorylierungen an Serin 497, Threonin 500, Serin 502, Serin 506, Serin 510 und Threonin 513 wurden durch Markieren von GC-A exprimierenden HEK-Zellen mit  $[^{32}\text{P}]$ -Orthophosphat und durch AS-Mutagenese bereits vorgeschlagen <sup>78</sup>. Die starke Belastung der Zellen durch Radioaktivität <sup>101, 102</sup> schien dabei zumindest keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus zu haben und keine Artefakte darzustellen, da die genannten Phosphorylierungsstellen mittels MS nun definitiv bestätigt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich zu diesen sechs Phosphorylierungsstellen eine bisher unbekannte Phosphorylierung an Serin 487 detektiert (Abbildung 20).



#### Abbildung 34: Mittels MS wurden sieben Phosphorylierungsstellen in der KHD der GC-A detektiert

Nach  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung der tryptischen Peptide konnten die sieben Phosphorylierungsstellen mittels MS/MS-Analyse nachgewiesen werden. Sechs der Phosphorylierungen (Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510 und Thr513; rot) waren durch Experimente, bei denen GC-A exprimierende HEK-Zellen metabolisch mit  $[^{32}\text{P}]$ -Orthophosphat gelabelt wurden, von L. Potter bereits postuliert <sup>78</sup>. Eine bisher unbekannte Phosphorylierungsstelle an Serin 487 (grün) wurde zusätzlich detektiert.

In diesen Experimenten konnten sowohl komplett als auch partiell phosphorylierte Peptide detektiert werden (Tabelle 35). Das tryptische Peptid SAGSRLTSLGR (AS 494 – 504) kann an drei AS phosphoryliert werden

(Ser497, Thr500 und Ser502). Allerdings wurde nur eines der drei möglichen einfach phosphorylierten Peptide (pSer497) gefunden. Der Grund dafür ist höchstwahrscheinlich, dass, wenn das Peptid an Serin 497 phosphoryliert vorliegt, die tryptische Spaltung bei Arg498 durch die sterische Hinderung durch das Phosphat nicht stattfinden kann. Aus diesem Grund konnte das Peptid SAG**pSR** nicht entstehen. Selbst wenn es entstehen würde, bindet es wahrscheinlich nicht auf der Vorsäule, da es aufgrund der geringen Größe und der Phosphorylierung zu hydrophil ist. Wenn das Peptid SAGSRLT**L**SGR nicht an Ser497 phosphoryliert ist, kann die proteolytische Spaltung mit Trypsin erfolgen und die anderen beiden Phosphorylierungsstellen an Thr500 und Ser502 konnten in den Peptiden L**p**TLSGR und LTL**p**SGR detektiert werden. Beide Phosphorylierungsstellen wurden außerdem zusammen in dem Peptid L**p**T**Lp**SGR gefunden. Auch das dreifach phosphorylierte Peptid SAG**p**SRL**p**T**Lp**SGR konnte detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig die Phosphorylierungen an den Positionen Ser497, Thr500 und Ser502.

Das sich anschließende tryptische Peptid GSNYGSL**L**TTEGQFQVFAK (AS 505 – 523) enthält ebenfalls drei phosphorylierte AS an den Stellen Ser506, Ser510 und Thr513, die von Potter und Kollegen vorgeschlagen <sup>78</sup> und im Rahmen dieser Arbeit mittels MS in einfach und zweifach phosphorylierten Peptiden detektiert wurden (Tabelle 35). Das dreifach und somit komplett phosphorylierte Peptid konnte nicht detektiert werden. Dies könnte auch an der TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie liegen, da mehrfach phosphorylierte Peptide sehr stark an TiO<sub>2</sub> binden und daher schlechter eluiert werden.

Außerdem konnten zusätzlich zu diesen Phosphorylierungsstellen zwei Peptide (AS 478 – 490 und AS 480 – 490) ermittelt werden, die eine weitere, zuvor unbekannte Phosphorylierungsstelle an Ser487 enthalten.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere zusätzliche Phosphorylierungsstellen im GC-A-Rezeptor existieren, da die Sequenz mit den MS-Analysen nicht komplett abgedeckt werden konnte. In Studien über die Guanylyl Cyclase aus Seeigel-Spermien wurde gezeigt, dass dieser Rezeptor mit  $26,0 \pm 1,3$  mol Phosphat pro mol Rezeptor sehr viel mehr als nur sieben Phosphorylierungen besitzt. 14 phosphorylierte Serine konnten dabei in der Spermien-GC identifiziert werden <sup>103</sup>. Die Sequenz der GC-A aus FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen konnte mittels MS gut abgedeckt werden, jedoch wurden im Bereich von AS 223 bis 423 der extrazellulären Domäne, der Transmembran-Domäne und etwa der Hälfte der Zykase-Domäne keine

tryptischen Peptide detektiert. Falls in diesen Bereichen Phosphorylierungen vorhanden waren, wurden diese nicht detektiert. Dieser Verlust von tryptischen Peptiden kann dadurch zustande kommen, dass zu kleine oder zu große Peptide durch die enzymatische Spaltung entstehen, die dann aufgrund des erfassten Messbereichs (m/z Bereich von 350 bis 1500 bei QStar Elite und Qtrap, m/z Bereich von 350 bis 2000 bei Orbitrap) nicht detektiert werden können. Auch werden Trypsin-Spaltungsstellen durch posttranslationale Modifikationen (PTM) maskiert, was ebenfalls in zu großen Peptiden für die CID-Fragmentierung resultiert. Auch durch eine Sequenz, welche zum Beispiel durch zu viele Phosphorylierungen schlecht ionisiert und fragmentiert werden kann, oder durch weitere unbekannte PTMs, wodurch Peptide nicht identifiziert werden können, können zu einer unvollständigen Sequenzabdeckung führen. Der Einsatz von anderen bzw. mehreren Proteasen kann dieses Problem lösen. Die Endoproteasen Lys-C, Arg-C bzw. Asp-N zum Beispiel spalten Peptidverbindungen C-terminal von Lysin, C-terminal von Arginin bzw. N-terminal von Aspartat.

Auch kann es durch Anwenden der TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie zu Verlusten von Phosphopeptiden kommen. Mehrfach phosphorylierte Peptide können durchaus an TiO<sub>2</sub> binden, aber sie können durch die höhere Bindungsaffinität schwer eluiert werden. Durch Nutzung alternativer Anreicherungsstrategien könnte dieses Problem reduziert werden. Bei IMAC werden Metallionen für die Bindung von negativ geladenen Phosphopeptiden genutzt. Die IMAC-Technik verbesserte die Identifikation von Phosphopeptiden aus komplexen biologischen Proben<sup>178-181</sup> und scheint eine höhere Selektivität für mehrfach phosphorylierte Peptide zu zeigen<sup>182, 183</sup>. Allerdings werden unphosphorylierte Peptide, die viele saure AS beinhalten, zusammen mit den Phosphopeptiden aufgereinigt. Auch können verschiedene Puffer, Detergenzien und andere Chemikalien stören, die in biochemischen und zellbiologischen Analysen eingesetzt werden. Bei TiO<sub>2</sub> dagegen kann die unspezifische Ko-Elution von nicht phosphorylierten Peptiden durch Zusatz von 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Phthalsäure und TFA im Ladepuffer signifikant reduziert werden. Außerdem ist diese Affinitätschromatographie extrem unempfindlich gegenüber den meisten biologischen Puffern<sup>183</sup>. Somit wäre eine Kombination von IMAC und TiO<sub>2</sub> von Vorteil. Die sogenannte sequenzielle Elution von IMAC (*Sequential elution from IMAC*, SIMAC), die diese Kombination nutzt, besteht aus drei Komponenten<sup>184</sup>. Bei der ersten Komponente werden nicht am IMAC-Material gebundene Peptide genauso wie die Peptide aus den IMAC-Waschschritten und dem TFA-Eluat mit

TiO<sub>2</sub> behandelt, wodurch hauptsächlich einfach phosphorylierte Peptide angereichert werden. Durch die anschließende basische Elution vom IMAC-Material werden in der zweiten Komponente mehrfach phosphorylierte Peptide angereichert. Die phosphorylierungsgerichtete MSA-Tandem-MS wird als dritte Komponente zur getrennten Analyse der beiden Phosphopeptid-Pools genutzt. Dadurch konnte in anderen Studien die Anzahl der detektierten Phosphorylierungsstellen im Vergleich zur TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie verdoppelt werden <sup>184</sup>.

Es können bei der proteolytischen Spaltung auch Peptide entstehen, die schlecht ionisiert und durch CID schlecht fragmentiert werden. In Anwesenheit von einfach phosphorylierten und nicht modifizierten Peptiden wird die Ionisierung von mehrfach phosphorylierten Peptiden unterdrückt, wodurch diese schlechter detektiert werden können. Die Fragmentierung von phosphorylierten Peptiden ist erheblich schwieriger als von nicht modifizierten Peptiden, da der Verlust der Phosphatgruppe(n) der predominierte Fragmentierungsweg ist. Dadurch entstehen weniger Fragmentationen des Peptid-Rückgrates, welche aber die Basis für die anschließende Identifikation und Zuordnung der Phosphorylierungsstellen darstellen. Der Ersatz der CID-Fragmentierung durch ECD/ETD (*Electron Capture Dissociation / Electron Transfer Dissociation*) könnte diese Probleme umgehen, da bei dieser Methode hauptsächlich Peptid-Rückgrat-Fragmentationen ohne gleichzeitigen Verlust der Phosphatgruppe(n) entstehen <sup>185, 186</sup>. Es werden c- und z-Ionen generiert und PTMs werden bewahrt <sup>187, 188</sup>. Diese Methode ist außerdem in der Lage, mit langen (> 20 AS) und hoch-geladenen Peptiden umzugehen, was die Nutzung von alternativen Proteasen wie Lys-C und Arg-C begünstigt <sup>189</sup>. Die Nutzung einer alternativen Anreicherungsstrategie wie SIMAC in Verbindung mit ETD-Fragmentation könnte vor allem die Detektion des dreifach phosphorylierten Peptides **GpSNYGpSLLpTTEGQFQVFAK** erleichtern und eventuell weitere vorhandene Phosphorylierungsstellen aufzeigen.

#### **4.4 Durch die Behandlung von FLAG-GC-A exprimierenden HEK-Zellen mit ANP bzw. Ang II entstanden unterschiedliche Phosphorylierungsmuster des GC-A-Rezeptors**

Anhand der MS/MS-Spektren der detektierten Phosphopeptide wurden MRM-Übergänge erstellt, die spezifisch die jeweiligen Peptide mit deren Phosphorylierungen charakterisieren, womit eine labelfreie relative Quantifizierung der Phosphopeptide unter verschiedenen Bedingungen möglich ist. Diese Methode wurde anhand der neu detektierten Phosphorylierungsstelle überprüft. Die GC-A-Mutante, bei der das Serin 487 zu Alanin mutiert wurde, wurde mittels MRM analysiert. Dabei konnten die Phosphopeptide VRWEDLQPSpSLER und WEDLQPSpSLER nicht detektiert werden, da sie in dieser Mutante nicht vorkommen, was die Spezifität der Methode belegt.

In den FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen wurde die Menge der tryptischen phosphorylierten GC-A-Peptide nach homologer und heterologer Desensibilisierung analysiert. Dafür wurden die Zellen mit 100 nM ANP für 60 min bzw. 10 nM Ang II für 15 min vorbehandelt und anschließend die Membranpräparation, IP, TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie und MRM-Analysen durchgeführt.

Voraussetzung für den Vergleich von unbehandelten und mit ANP bzw. Ang II vorbehandelten Proben war, dass identische Mengen GC-A analysiert wurden, was mittels Western Blot-Analysen (Abbildung 22) und Spectral Counting (siehe Tabelle 42) überprüft wurde. Durch diese Methoden wurde sichergestellt, dass Unterschiede in den sich anschließenden MRM-Experimenten nicht aufgrund von unterschiedlichen analysierten GC-A-Mengen zustande kamen. Weiterhin wurde die TiO<sub>2</sub>-Anreicherung durch ein einfach und ein zweifach phosphoryliertes Standardpeptid und die Stabilität des ESI-Sprays sowie die Gleichförmigkeit der MRM-Durchführung durch Zugabe von vier nicht phosphorylierten Standardpeptiden überprüft. Hier wurden beim Vergleich von den jeweiligen Proben ein Mittelwert von  $1 \pm 0,1$  ermittelt, was für eine Uniformität der Messungen spricht.

Für die Analyse des Phosphorylierungsmusters nach homologer Desensibilisierung wurden acht MRM-Messungen an 3 biologisch unabhängigen Experimenten durchgeführt (Tabelle 36). Bei dem tryptischen Peptid LTLSGR stieg die Menge der beiden möglichen einfach phosphorylierten Peptide um den Faktor 3 bzw. 2 im Vergleich zu den beiden Peptiden aus nicht vorbehandelten

Zellen, die Menge des zweifach und somit komplett phosphorylierten Peptids hingegen sank um 30 % ab. Bei dem tryptischen Peptid SAGSRLTLSGR wurde ein ähnliches Ergebnis erzielt, das komplett (dreifach) phosphorylierte Peptid wurde sogar nur noch mit 24 % in den mit ANP vorbehandelten Zellen detektiert. Das Peptid mit der Phosphorylierung an Serin 497 blieb auf gleichem Level. Die Menge des Peptides GSNYGSLTTEGQFQVFAK im einfach phosphorylierten Zustand stieg ebenfalls, allerdings nicht so stark. Die beiden analysierten zweifach phosphorylierten Peptide blieben relativ konstant und konnten mit nur zwei bis drei Detektionen schlecht analysiert werden, das dreifach phosphorylierte Peptid wurde, wie oben erwähnt, nicht detektiert. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nach ANP-Vorbehandlung die Anzahl von komplett phosphoryliertem Rezeptor reduziert wird, wodurch die partiell phosphorylierten Peptide um den Faktor 2 – 10 vermehrt detektiert wurden. Dass einige Phosphopeptide nach ANP-Vorbehandlung gar nicht detektiert wurden, könnte daran liegen, dass die Peptide schon komplett dephosphoryliert waren. Insgesamt scheint die homologe Desensibilisierung eine Dephosphorylierung des GC-A-Rezeptors an den AS Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510 und Thr513 zu bewirken. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Potter und Kollegen in metabolisch markierten GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen, die nach ANP-Vorbehandlung eine starke Dephosphorylierung der GC-A zeigten <sup>78, 99</sup>. Eine komplette Dephosphorylierung wurde bei diesen Versuchen erst nach 120 min ANP-Vorbehandlung erreicht (Insert in Abbildung 6). Nach 60 min Inkubation konnte noch eine leichte Phosphatbande detektiert werden. Daher stehen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse einer Reduzierung der Phosphorylierungen, aber nicht eines kompletten Phosphatsverlust im Einklang mit den publizierten Daten.

Im Gegensatz dazu stieg die Menge der beiden einfach phosphorylierten Peptide, die die neue Phosphorylierung an Serin 487 enthalten, dramatisch an. Durchschnittlich war die Menge dieser Peptide nach ANP-Vorbehandlung neunfach erhöht. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass diese Phosphorylierungsstelle im Gegensatz zu den anderen während der homologen Desensibilisierung nicht dephosphoryliert wird.

Die homologe Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors ist demnach mit einem komplexen Muster von (De)Phosphorylierungen mit einem selektiven und prominenten Anstieg der Phosphorylierung an Serin 487 assoziiert.

Bei der heterologen Desensitierung wurden acht MRM-Analysen an drei biologisch unabhängigen Experimenten durchgeführt (Tabelle 37). Die HEK 293-Zellen mit stabiler FLAG-GC-A-Expression wurden dazu mit dem Plasmid zur Expression des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptors transient transfiziert (Abbildung 21). Unter den gegebenen Bedingungen war ein Abfall der Mengen aller einfach, zweifach und dreifach phosphorylierten Peptide um 20 bis 80 % im Vergleich zu Peptiden aus nicht mit Ang II vorbehandelten Zellen zu beobachten. Bei den Peptiden **SAGpSRLpTLpSGR** und **GSNYGpSLLpTTEGQFQVFAK** war ein leichter Anstieg zu sehen, allerdings waren dabei die Standardabweichungen relativ groß. Auch die Menge der Phosphopeptide mit der neuen Phosphorylierungsstelle an Ser487 war reduziert. Diese Ergebnisse sprechen für eine radikalere Dephosphorylierung der GC-A unter der heterologen Desensitierung. Der Phosphorylierungsstatus der GC-A wurde unter diesen Bedingungen bisher nicht analysiert. Eine heterologe Desensitierung der GC-B zeigte nur zwei prominente Veränderungen im Phosphorylierungsmuster. Dabei wurde Ser523 (entspricht Ser506 der GC-A) dephosphoryliert und Ser502 (entspricht Ser502 der GC-A) vermehrt phosphoryliert<sup>126, 127</sup>. Im Vergleich dazu wurde in dieser Arbeit ein komplett anderes Phosphorylierungsmuster der GC-A nach heterologer Desensitierung gezeigt.

Die homologe und heterologe Desensitierung bewirken demnach unterschiedliche Phosphorylierungsmuster der GC-A durch unterschiedlich starke Dephosphorylierungen. Die Dephosphorylierung unter heterologen Bedingungen scheint schneller zu erfolgen, da nach nur 15 min Inkubation mit Ang II weniger Phosphorylierungen vorhanden waren. Die Unterschiede in der Dephosphorylierung deuten außerdem darauf hin, dass die beiden Desensitierungsmöglichkeiten durch das Einschalten unterschiedlicher Signalwege erfolgen<sup>99, 100, 123</sup>. Eine interessante Frage ist, ob die heterologe Desensitierung mit anderen vasokonstriktorisches Hormonen wie Endothelin oder Vasopressin ebenfalls in einer schnellen und starken Dephosphorylierung resultiert. Eine Phosphorylierungsanalyse nach unterschiedlich langer ANP- bzw. Ang II-Inkubation könnte den Mechanismus der Desensitierung in Bezug darauf, wann welche AS dephosphoryliert werden, noch näher und eindeutiger beschreiben. Erst eine sehr lange ANP-Inkubation über vier Stunden scheint zu einer GC-A-Degradation bzw. einer zellulären Internalisierung zu führen<sup>190</sup>. Daher wäre es zum einen interessant, den Phosphorylierungsstatus über

diesen Zeitraum zu analysieren, und zum anderen könnte durch die mittels MS detektierten Proteine, die nach einer mehrstündigen Inkubation mit der GC-A assoziieren, der Degradationsprozess weiter beschrieben werden. Die Methodik dieser Arbeit legt den Grundstock für diese möglichen Folgeuntersuchungen. Mit diesen Experimenten und den Ergebnissen dieser Arbeit kann der Mechanismus der Rezeptoraktivierung und vor allem der Desensibilisierung weiter beschrieben und die Bedeutung eines Rezeptordefekts in kardiovaskulären Erkrankungen zum Beispiel durch Generierung phosphospezifischer Antikörper genauer erklärt werden.

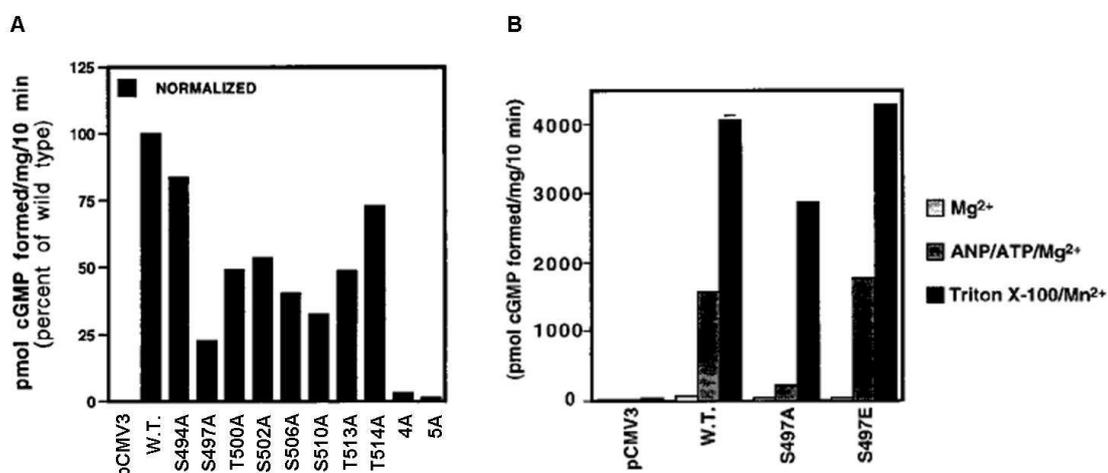
#### **4.5 Die Analyse der Phosphorylierung an Serin 487 ergab eine Bedeutung für die Deaktivierung des Rezeptors**

Um zu analysieren, ob die Phosphorylierung des Serins 487 einen Einfluss auf die Rezeptoraktivität besitzt, wurde diese Aminosäure zu Alanin bzw. Glutamat mutiert. Die Alanin-Mutante GC-A S487A stellte dabei die unphosphorylierte Variante dar, die Glutamat-Mutante GC-A S487E dagegen die phosphorylierte Variante. Durch diese Art der Mutation wurde in publizierten Studien auch die Funktionen der anderen sechs Phosphorylierungsstellen untersucht <sup>78</sup>. Die Effekte dieser Substitutionen wurden mittels Guanylyl Cyclase-Assay an Membranen von FLAG-GC-A WT, FLAG-GC-A S487A bzw. FLAG-GC-A S487E überexprimierenden HEK-Zellen analysiert.

Die Alanin-Mutante GC-A S487A zeigte wie der GC-A WT-Rezeptor einen konzentrationsabhängigen Anstieg des zellulären cGMPs nach ANP-Stimulation (Abbildung 27). Die Glutamat-Mutante zeigte ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Anstieg, jedoch war die cGMP-Antwort im Vergleich zur Antwort des WT-Rezeptors um die Hälfte reduziert (Abbildung 28). In den Studien von Potter und Kollegen zeigten die einzelnen Alanin-Mutanten der anderen sechs Phosphorylierungsstellen eine dramatische Abnahme der cGMP-Antwort. Wurden vier oder fünf Stellen in Alanine mutiert, entstand ein Rezeptor mit dominant negativer inhibitorischer Aktivität (Abbildung 35 A). Die Glutamat-Substitution an Position 497 dagegen konnte funktionell diese Phosphorylierung nachahmen und die cGMP-Antwort gleich der Antwort des WT-Rezeptors (Abbildung 35 B). In einer anderen Studie konnten allerdings Mutanten mit Glutamatsubstitution an 5 bzw. 6 der Phosphorylierungsstellen nicht äquivalent zum WT-Rezeptor stimuliert werden <sup>112</sup>. Trotzdem zeigten die Glutamat-Mutanten im Vergleich zu der Alanin-Mutante mit fünf ersetzten

Phosphorylierungsstellen eine bessere Aktivierbarkeit, was darauf hindeutet, dass eine Funktion der Phosphorylierungen die Bereitstellung von negativen Ladungen in der KHD ist, die für die ANP-Antwort benötigt werden <sup>112</sup>. Dies und die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Phosphorylierung an Serin 487, im Gegensatz zu den anderen Phosphorylierungen <sup>78</sup>, nicht für die Aktivierung des Rezeptors benötigt wird. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle scheint sogar nachteilig für die Rezeptoraktivierung.

Es kann jedoch auch sein, dass die Mutation zu Glutamat zu einer veränderten Proteinkonformation führt oder die einfach negative Ladung nicht in der Lage ist, die zweifach negative Ladung eines Phosphats nachzuahmen <sup>127</sup>. Da jedoch auch Potter und Kollegen diese Methode der Funktionsanalyse wählten und der GC-A S487E-Rezeptor nach Triton X-100-Stimulation, welche den Rezeptor ligandenunabhängig aktiviert, gleich starke cGMP-Antworten wie der WT-Rezeptor erzeugte, ist es sehr wahrscheinlich, dass er korrekt gefaltet, prozessiert und an der Membran exprimiert wird <sup>127</sup>. Somit sind die geringeren cGMP-Antworten nach ANP-Stimulation vermutlich aufgrund der Phosphorylierung und nicht aufgrund eines defekten Rezeptors entstanden.



**Abbildung 35: Analyse der Phosphorylierungen an Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510 und Thr513 <sup>78</sup>**

**A**, Die Mutationen der phosphorylierten Serine und Threonine zu Alanin resultierten im Vergleich zur cGMP-Antwort des WT-Rezeptors in einer reduzierten oder aufgehobenen Guanylyl Cyclase-Aktivität. Zusätzlich wurden die zwei benachbarten AS Ser494 und Thr514 mutiert, was aber nur zu einer geringen Änderung der Aktivität führte. Mutation von 4 oder 5 phosphorylierten AS (4A und 5A) resultierte in einer dominant negativen inhibitorischen Rezeptoraktivität. Die cGMP-Antworten wurden auf den Wert der Triton X-100-Stimulation normalisiert. **B**, Im Vergleich zur aufgehobenen Rezeptoraktivität der Mutante S497A konnte durch eine Glutamatsubstitution dieser AS (S497E) die Rezeptoraktivität wieder hergestellt werden.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Phosphorylierung an Serin 487 auf die homologe Desensibilisierung hat, wurden Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und vor dem Cyklase-Assay mit 100 nM ANP für 1 h vorbehandelt. Die ANP-Vorinkubation reduzierte die cGMP-Produktion und damit die Rezeptoraktivität um 50 % in GC-A WT und GC-A S487A exprimierenden HEK 293-Zellen (Abbildung 29). Die veränderte Aktivität ist nicht durch eine Rezeptordegradation oder –internalisierung entstanden, da eine gleich starke Rezeptorexpression vorhanden war. Es konnte somit unter diesen experimentellen Bedingungen, die auch schon in anderen Studien verwendet wurden<sup>99, 108</sup>, die homologe Desensibilisierung dargestellt werden. Die cGMP-Antworten der GC-A auf ANP sind dabei bereits stark reduziert, wenn der Rezeptor nicht komplett, sondern nur teilweise dephosphoryliert vorliegt, wie mit den MRM-Experimenten gezeigt wurde.

Die Glutamat-Mutante S487E zeigte im Gegensatz zur Alanin-Mutante ein völlig anderes Verhalten. Ohne ANP-Vorbehandlung waren die cGMP-Antworten im Vergleich zum WT-Rezeptor wie erwähnt stark reduziert. Die ANP-Vorbehandlung zeigte bei dieser Mutante jedoch keinen Effekt, da die cGMP-Synthese im Vergleich zur cGMP-Antwort von nicht vorbehandelten GC-A S487E-exprimierenden Zellen nicht signifikant verschieden war. Durch diese Experimente war nun zu sehen, dass die cGMP-Produktion des GC-A S487E-Rezeptors so niedrig war wie die Produktion des desensibilisierten, ANP-vorbehandelten GC-A WT-Rezeptors.

Die Mutante GC-A S487A ist aktivierbar und desensibilisierbar wie der GC-A WT-Rezeptor, die GC-A S487E-Mutante dagegen weder aktivierbar noch kann sie desensibilisiert werden. Daraus lässt sich vermuten, dass die negative Ladung durch die Phosphorylierung an dieser Stelle nicht für die Aktivierung notwendig ist, sondern eher in den Prozess der Desensibilisierung involviert ist. Für diese Hypothese sprechen auch die MRM-Ergebnisse, bei denen unter desensibilisierenden Bedingungen die Phosphorylierung dieser AS stark anstieg. Die ANP-induzierte Phosphorylierung an Serin 487 könnte eine Konformationsänderung im Rezeptor induzieren, durch die die GC-A-Aktivität inhibiert wird. Durch die negative Ladung könnte auch eine Konsensussequenz für eine Phosphatase entstehen, die die anderen sechs Phosphorylierungsstellen dephosphoryliert. Interessant ist, dass die Mutante S487A desensibilisiert werden kann, auch wenn in dieser Mutante keine Phosphorylierung an Serin 487 vorliegt. Es ist durchaus möglich, dass der Prozess der ANP-abhängigen Desensibilisierung weitaus komplexer ist und

durch die Aktivität von verschiedenen Proteinphosphatasen und -kinasen ausgelöst wird.

Mit Hilfe von Internetprogrammen wie NetPhosK<sup>171</sup>, mit dem kinase-spezifische Phosphorylierungsstellen in eukaryotischen Proteinen vorhergesagt werden können, können mögliche interagierende Kinasen ermittelt werden. So werden für die Phosphorylierungsstellen der GC-A folgende Kinasen angegeben: Cyclin-abhängige Proteinkinase 2 (CDK1) bzw. DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) für S487; CDK1 für S497; Casein Kinase I bzw. PKC für T500; PKC für S502; PKA für S506 und CDK1 für S510. Für T513 gab es keine Angabe, allerdings wurde für das benachbarte T514 die PKC angegeben. Dabei liegen nur die Angaben der PKC für T500 (Score 0,72) und S502 (Score 0,78) deutlich über dem angegebenen Grenzwert von 0,5. PKC wurde bisher nur in Verbindung mit der heterologen Desensibilisierung der GC-A beschrieben<sup>100</sup>. Interessanterweise werden durch das Programm NetPhos, mit dem Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphorylierungen vorhergesagt werden können, nicht alle der mittels MS identifizierten Phosphorylierungsstellen der GC-A als potentielle Phosphorylierungsstellen angegeben. Nur die AS S487, T500, S502 und S506 werden (mit einem Score von jeweils über 0,7) als durchaus mögliche Phosphorylierungsstelle bezeichnet. Die neu detektierte Phosphorylierung an Serin 487 wird zum Beispiel mit einem Score von 0,985 als sehr wahrscheinliche Phosphorylierung angezeigt, was die MS-basierte Detektion durchaus unterstützt. Die möglichen Proteinkinasen CDK1 bzw. DNA-PK werden jedoch nur mit einem Score von 0,55 bzw. 0,51 angegeben. Die Serin/Threonin-Proteinkinase CDK1 bildet mit der regulatorischen Untereinheit Cyclin B einen Komplex und leitet die S-Phase und damit die nächste mitotische Zellteilung ein<sup>191, 192</sup>. Die Kinase ist inaktiv bis die M-phase inducer Phosphatase 2, auch bekannt als Cdc25, die Kinase an zwei AS dephosphoryliert<sup>191, 193</sup>. Die M-phase inducer Phosphatase 2 wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels MS interessanterweise als häufiger Proteinhit neben der GC-A detektiert. Dies könnte bedeuten, dass CDK1 eine mögliche Kinase zur Phosphorylierung von S487 ist. Die Konsensussequenz der Kinase lautet X-S/T-P-X-K/R, welche sich allerdings nicht in der Sequenz um Serin 487 (LQP**S**SLER) wiederfindet, aber dieser durchaus ähnelt. Die DNA-PK ist eine nukleäre Serin/Threonin-Kinase mit der Konsensussequenz S/T-Q, die doppelsträngige DNA für ihre Aktivierung benötigt<sup>194, 195</sup>. Ihre hauptsächlichen Substrate sind DNA-bindende Proteine, wie zum Beispiel HSP90, welches wahrscheinlich zur Faltung des GC-A-Proteins benötigt wird<sup>173</sup>. Durch diese Eigenschaften ist die Wahrscheinlichkeit,

dass die DNA-PK tatsächlich die Kinase zur Phosphorylierung von S487 ist, relativ gering. Aber es könnte sein, dass die Kinase indirekt über die Phosphorylierung von HSP90 wichtig für die GC-A ist.

Zusammenfassend zeigt dies, dass diese Internetprogramme nur einen Hinweis geben können, welche AS phosphoryliert und welche Proteinkinasen involviert sein könnten, und dass weiterführende Experimente notwendig sind.

#### **4.6 Einige der Phosphorylierungen konnten in der endogen exprimierten GC-A aus MA-10 Leydig- und MyEnd-Zellen nachgewiesen werden**

Um auszuschließen, dass die detektierten Phosphorylierungsstellen Artefakte der FLAG-GC-A überexprimierenden HEK 293-Zellen sind, wurde das Phosphorylierungsmuster der endogen exprimierten GC-A aus MA-10 Leydig- (Leydig-Zellen des Testis) und MyEnd-Zellen (mikrovaskuläre endotheliale Myokardzellen) mittels MS analysiert (Tabelle 39). Diese beiden Zelltypen zeigen eine relativ hohe endogene GC-A-Expression. Es konnten drei bzw. vier Phosphorylierungsstellen mit Hilfe des sehr sensitiven Orbitrap XL-Systems identifiziert werden. In MA-10 Leydig-Zellen wurden die Phosphorylierungen an Ser497, Thr500 und Ser506 detektiert. In MyEnd-Zellen wurde das Peptid, welches die bisher unbekannte Phosphorylierung an Serin 487 enthält, als einfach phosphoryliertes Peptid detektiert. Jedoch konnte durch das manuell validierte MS/MS-Spektrum nicht eindeutig geklärt werden, ob dieses Peptid an Serin 486 oder Serin 487 phosphoryliert war. Da in den Experimenten mit den FLAG-GC-A exprimierenden HEK293-Zellen jedoch nie eine Phosphorylierung an Serin 486 detektiert und auch bei den NetPhos-Analysen eine Phosphorylierung an S487, nicht aber an S486 angegeben wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch in MyEnd-Zellen die bisher unbekannte Phosphorylierung an Serin 487 nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurden die Phosphorylierungen an Ser497 und Thr500 nachgewiesen. Eine Tyrosin-Phosphorylierung der AS Tyr1017 am C-terminalen Ende der GC-A wurde ebenfalls detektiert, die zuvor in keiner Analyse gefunden wurde. Durch diese Analysen konnte zum ersten Mal die Phosphorylierung des endogenen, nativen GC-A-Rezeptors gezeigt werden.

Durch die genutzte pH-Shift-Elution wurden neben der GC-A auch alle unspezifisch an der Agarose haftende Proteine eluiert und dadurch auch andere Phosphopeptide mittels  $\text{TiO}_2$  angereichert, was trotz sehr starker

Anreicherung des Rezeptors zu einem hohen Hintergrund in den MS/MS-Analysen führte. Daher war es schwierig, die niedrig abundanten Phosphopeptide der GC-A mittels MS zu ermitteln. Die Phosphorylierungen an Ser502, Ser510 und Thr513 wurden in den MA-10 Leydig-Zellen nicht gefunden, in MyEnd-Zellen fehlten die Phosphorylierungen an Ser502, Ser506, Ser510 und Thr513, die wahrscheinlich aufgrund der geringeren Rezeptorexpression, der niedrigen Abundanz und dem starken Hintergrund durch den pH-Shift nicht detektiert werden konnten. Eine spezifischere Elution wie bei der IP mit FLAG-Agarose könnte dieses Problem minimieren. Für eine solche Elution wäre das Peptid, gegen das der GC-A-Antikörper gerichtet ist, geeignet. Auch die Nutzung der MRM-Methode würde die Detektion vermutlich erleichtern, allerdings muss dazu die Elution spezifisch sein, damit die Anzahl von unspezifischen Peptiden mit denselben m/z-Verhältnissen wie die der GC-A-Phosphopeptide minimiert wird und die Messungen somit nicht stören. Allerdings können durch die Nutzung der MRM-Methode keine unbekannt Modifizierungen detektiert werden. Durch die *in silico*-Suche nach MRM-Übergängen könnten zusätzlich andere mögliche Phosphorylierungsstellen analysiert werden. Dabei muss aber beachtet werden, dass zwar alle möglichen Fragmentationen angezeigt werden, aber nicht bekannt ist, welche Fragmente starke Signale in den MS-Spektren geben. Die Analyse aller potentiellen Übergänge ist wiederum auch nicht möglich, da eine große Anzahl von MRM-Übergängen die Sensitivität der Methode reduziert, da die Analysedauer pro Übergang reduziert werden müsste. Bei einer Akquisitionszeit von zum Beispiel 20 ms ist die Anzahl der MRM-Übergänge auf ca. 50 Stück begrenzt, da sonst keine akkurate Quantifizierung möglich ist. Es wäre daher eventuell von Vorteil, die Proben mit verschiedenen MRM-Übergängen in aufeinander folgenden Messungen zu analysieren. Eine Retentionszeit-gekoppelte Programmierung von MRM-Übergängen, bei der zusätzlich die Zeit angegeben wird, bei der das Peptid die Trennsäule verlässt, wäre eine zusätzliche Möglichkeit der Methodenoptimierung. Auch die Nutzung der ETD-Fragmentierung könnte bei der Analyse der endogen exprimierten GC-A hilfreich sein. Dadurch wäre es außerdem zusätzlich möglich, Analysen bezüglich der desensitisierenden Mechanismen unter physiologischen Bedingungen durchzuführen.

## 4.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Phosphorylierungen der GC-A mittels Massenspektrometrie gezeigt. Wie in den vorherigen Abschnitten schon beschrieben wurde, kann die Anreicherung der GC-A aus Zellmembranen, die anschließende Analyse der PTMs und Quantifizierung eventuell verbessert bzw. komplettiert werden.

Neben der durchgeführten Zellfraktionierung und Zellmembrananreicherung sind viele alternative Methoden bekannt. Für die Analyse von Membranen bietet sich vor allem die sequentielle Extraktion wie die Karbonatextraktion<sup>196</sup> oder die Triton X-114 Phasenaufteilung an<sup>197</sup>, die auch mit anschließenden Proteomanalysen kompatibel sind.

Zur Isolierung und Identifizierung von Proteinen kann die 2D-Elektrophorese genutzt werden, bei der die isoelektrische Fokussierung in der ersten und SDS-PAGE in der zweiten Dimension genutzt werden<sup>198, 199</sup>. Für die Trennung von Proteinkomplexen aus Membranen kann außerdem die farblose native<sup>200</sup> und die blaue native Elektrophorese<sup>201</sup> oder die nicht reduzierende PAGE verwendet werden, bei denen die Proteinkomplexe in enzymatisch aktiver Form isoliert werden. Elektrophoretische Methoden, die unterschiedliche Detergenziensysteme nutzen, wie 16-BAC-PAGE, sind besonders für die Trennung von Membranproteinen geeignet<sup>202</sup>. Diese individuellen Elektrophoresemethoden sind oft an eine 2D-Trennung gekoppelt. 2D-Auftrennungen sind hochauflösende Techniken und in der Lage, unterschiedlich modifizierte Formen eines Proteins in verschiedenen Spots in dem Gel aufzutrennen. Unterschiedliche Phosphorylierungsstadien eines Proteins können dann durch Phosphor-Imaging von mit [<sup>32</sup>P]-radioaktiv markierten Proteinen oder durch Färben mit spezifischen Farbstoffen sichtbar gemacht werden<sup>203, 204</sup>.

Die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass die Phosphorylierung an Serin 487 zu einer Konformationsänderung führt oder das Andocken einer Phosphatase erleichtert und damit zur Desensibilisierung des GC-A-Rezeptors führt, kann mittels MS überprüft werden. Dazu könnte die GC-A S487E-Mutante unter basalen Bedingungen analysiert werden. Sind in der Analyse noch Phosphorylierungen an den anderen sechs Stellen vorhanden, würde das für eine inhibierende Konformationsänderung sprechen. Wären dagegen die Phosphorylierungen nicht mehr vorhanden oder reduziert, liegt es nahe, dass durch die Phosphorylierung an Ser487 eine Konsensussequenz für eine Phosphatase entstanden ist oder Kinasen nicht binden können.

Zusätzlich können Untersuchungen am GC-A-Rezeptor hilfreich sein, bei dem das phosphorylierte Serin 487 gegen die AS Aspartat ausgetauscht wurde. Aspartat kann wie Glutamat als Phosphat-Ersatz genutzt werden. Dabei hat es den Vorteil, dass die Kohlenwasserstoffkette um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe kürzer ist, wodurch das phosphorylierte Serin eventuell besser dargestellt werden kann (Abbildung 36). Entstehen dann bei den Analysen zur cGMP-Synthese dieselben Ergebnisse wie mit der Glutamat-Mutante, können die Glutamat-Ergebnisse zusätzlich validiert werden. Entstehen allerdings andere Ergebnisse, sollten die Hypothesen, die mit der Glutamat-Mutante aufgestellt wurden, überdacht und im Allgemeinen der Austausch von phosphoryliertem Serin mit Aspartat in Erwägung gezogen werden.

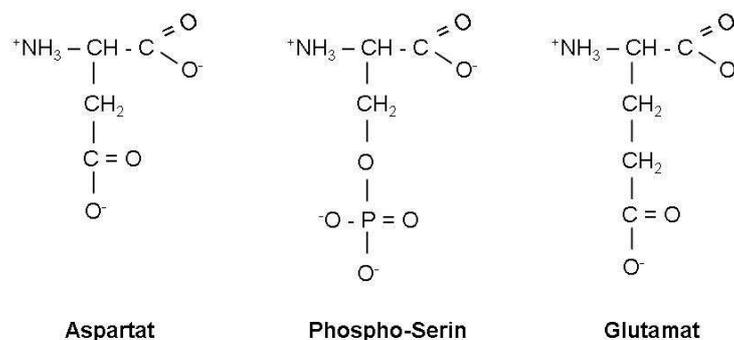


Abbildung 36: Vergleich der AS Aspartat und Glutamat als Ersatz für ein phosphoryliertes Serin

Auch für die Quantifizierung mittels MS stehen einige andere Methoden zur Verfügung, bei denen das zu analysierende Protein mit Isotopen markiert wird. Bei einer dieser Methoden werden Mikroorganismen auf einem Isotopen-Medium wie [<sup>15</sup>N]-Medium und auf normalem Medium kultiviert<sup>205</sup>. Die Peptide, die von der [<sup>15</sup>N]-Medium-Probe stammen, haben eine größere Masse, die von der Anzahl der eingebauten Stickstoffatome abhängt und die im MS/MS-Spektrum zu sehen ist. Auch der Einbau von Sauerstoff-Isotopen kann genutzt werden<sup>206</sup>. Generell werden zwei Sauerstoffatome in den C-Terminus aller tryptischen Peptide während des proteolytischen Verdauens eingebaut. Wird nun der Einbau von <sup>18</sup>O bzw. <sup>16</sup>O genutzt, entstehen bei der MS-Analyse Peptidpaare mit einer Massendifferenz von 4 Da. Durch den Vergleich der unterschiedlich markierten Peptide in einer Messung ist eine relative Quantifizierung möglich. Eine weitere sehr elegante Methode ist SILAC (engl. *stable isotope labelling by amino acids in cell culture*)<sup>207</sup>, bei der eine stabile Isotopenmarkierung mit <sup>2</sup>H- oder <sup>13</sup>C-modifizierten AS erfolgt. Dabei wird eine Zellprobe mit Medium mit unmodifizierter Aminosäurezusammensetzung und

eine weitere mit Medium kultiviert, welches ein oder zwei isotopensubstituierte AS enthält. Die Proben können direkt nach der Zellernte im Verhältnis 1:1 gemischt, zusammen aufgearbeitet und mittels MS relativ quantitativ analysiert werden, wodurch Unterschiede nicht durch eine eventuell unterschiedliche Aufreinigung entstehen können. Durch den Einsatz von  $^{13}\text{C}_6$ -Arginin,  $^2\text{H}_3$ -Lysin oder  $^{13}\text{C}_3$ -Lysin und einer spezifischen und vollständigen tryptischen Spaltung wird im MS-Spektrum eine einheitliche Massenverschiebung von 6 Da ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Argininpeptidpaar) bzw. 3 Da ( $^1\text{H}/^2\text{H}$ - oder  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Lysinpeptidpaar) beobachtet. Diese Methoden erfordern allerdings einen höheren Aufwand und sind teurer als die Quantifizierung mittels MRM-Messungen.

Da die endogen exprimierte GC-A in MA-10 Leydig- und MyEnd-Zellen und in Geweben sehr niedrig abundant vorliegt, ist eine Analyse, wie sie bei den FLAG-GC-A exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt wurde, nur mit sehr viel mehr Ausgangsmaterial möglich. Der Umgang mit extrem vielen Zellkulturschalen bzw. die Bereitstellung von genügend Gewebematerial ist dabei sehr schwierig und teilweise nicht möglich, da für eine einzige Analyse zum Beispiel 100 Mäuse geopfert werden müssten. Die Generierung von phosphospezifischen Antikörpern, mit denen verschiedene Phosphorylierungsmuster analysiert und nachgewiesen werden können, ist dann das Mittel der Wahl. Die Antikörper können für die *in vivo*-Analyse der endogen exprimierten GC-A aus verschiedenen Zelllinien und vor allem aus Gewebeproben genutzt werden. Außerdem können sie auch zur selektiven Präzipitation von phosphorylierten Proteinen genutzt werden<sup>208, 209</sup>. Zudem können die phosphospezifischen Antikörper dazu genutzt werden, um zu untersuchen, ob der Aktivitätsverlusts des GC-A-Rezeptors in Patienten mit Herzinsuffizienz ebenfalls mit einem Anstieg der Phosphorylierung an Ser487 korreliert.

Ein sehr wichtiger Aspekt bei der Analyse der GC-A sind die interagierenden Proteinkinasen und -phosphatasen, die für die Aktivierung und Desensibilisierung des Rezeptors wichtig sind. Die Nutzung eines Yeast-Two-Hybrid-Systems wäre eine Variante Interaktionspartner zu finden. Ein Vorteil des günstigen und robusten Hefesystems ist, dass eine Analyse unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen im Milieu einer Zelle und mit in Eukaryoten vorkommenden PTMs stattfindet. Da die Interaktionen aber im Zellkern der Hefe stattfinden müssen, ist eine falsche Faltung der Proteine in diesem Milieu denkbar bzw. ist es bei zum Beispiel membranständigen Proteinen schwierig, diese in den Zellkern zu transportieren. Auch können positive Ergebnisse zwischen Proteinen entstehen, die nicht in demselben Zellkompartiment

vorkommen. Positive Ergebnisse müssen deshalb mit anderen Methoden überprüft werden.

Eine weitere Möglichkeit nach Interaktionspartnern zu suchen, ist eine Ko-Immunpräzipitation. Das bedeutet, dass die FLAG-GC-A mit ihren Interaktionspartnern mittels IP aufgereinigt und elektrophoretisch aufgetrennt wird und anschließend die Proteinbanden jedes Molekulargewichts mittels MS analysiert werden. Auch können Proteine in Lösung verdaut und anschließend analysiert werden, wodurch der Schritt der Elektrophorese wegfällt. Alternativ könnte das Eluat unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt werden, wodurch mit der GC-A interagierende Proteine und die GC-A in einer Proteinbande als Komplex zu finden sind. Dabei muss aber beachtet werden, dass sich durch die anlagernden Proteine das Molekulargewicht stark ändern kann. Durch Analyse der gefundenen Proteine bezüglich ihrer zellulären Lokalisation kann eine erste Auswahl von möglichen Interaktionspartnern getroffen werden. Diese könnten dann mit anderen Techniken genauer untersucht werden. Mittels IF kann die zelluläre Lokalisation und eventuell vorhandene Ko-Lokalisation gezeigt werden. Bei Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)-Untersuchungen kann die GC-A und der mögliche Interaktionspartner mit je einem Fluorophor ausgestattet werden, deren Emissions- und Absorptionsspektren sich überschneiden<sup>210, 211</sup>. Dann kann die Interaktion *in vivo* mittels Zu- oder Abnahme des Fluoreszenzsignals analysiert werden.

Unter desensitisierenden Bedingungen kann die Suche nach Interaktionspartnern ebenfalls vielversprechend sein, wenn erst unter diesen Bedingungen Proteinkinasen oder -phosphatasen als Interaktionspartner auftreten.

## 5 Zusammenfassung

Das ANP/GC-A-System spielt durch die Produktion des sekundären Botenstoffs cGMP eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdruckes und des Blutvolumens. Bei Patienten mit Herzhypertrophie oder Herzinsuffizienz sind die ANP-Plasmakonzentrationen erhöht, aber die GC-A-vermittelten Effekte stark reduziert, was auf einen Defekt des Signalsystems hinweist. Studien an metabolisch markierten GC-A-überexprimierenden HEK 293-Zellen zeigten, dass der GC-A-Rezeptor im basalen Zustand stark phosphoryliert und die homologe bzw. heterologe Desensibilisierung wahrscheinlich mit einer Dephosphorylierung verbunden ist. Die Desensibilisierung stellt einen Mechanismus dar, der *in vivo* zu einem Funktionsverlust des Rezeptors beitragen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels Massenspektrometrie sieben Phosphorylierungsstellen in der Kinasehomologen Domäne aus FLAG-GC-A exprimierenden HEK 293-Zellen detektiert werden: Ser487, Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510 und Thr513. Die massenspektrometrische relative Quantifizierung basierend auf der Multiple-Reaction-Monitoring (MRM)-Methode zeigte bei ANP-induzierter, homologer Desensibilisierung eine Dephosphorylierung der Phosphorylierungsstellen Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510 und Thr513, was mit bereits publizierten Daten übereinstimmt, und einen starken Anstieg der Phosphorylierung an Ser487. Nach Inkubation mit Angiotensin II, welches eine heterologe Desensibilisierung hervorruft, wurde eine Reduzierung aller Phosphorylierungen verzeichnet, die zudem stärker ausgeprägt war als bei der ANP-abhängigen Desensibilisierung.

Die Funktion der neu identifizierten Phosphorylierung an Ser487 wurde mittels Mutagenese analysiert. Die Substitution des Serins durch Alanin, welche den unphosphorylierten Zustand nachstellt, resultierte in einer Rezeptoraktivität und -desensibilisierung vergleichbar zum GC-A Wildtyp-Rezeptor. Wurde hingegen Serin gegen Glutamat getauscht, um den phosphorylierten Zustand zu imitieren, konnte der Rezeptor weder aktiviert noch desensibilisiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen vorherige Studien, dass die GC-A-Rezeptorantwort auf ANP durch die Phosphorylierungen reguliert wird. Allerdings scheint bei der homologen Desensibilisierung die Phosphorylierung an der Position Ser487 eine Rolle zu spielen, da sie die Aktivität des Rezeptors inhibiert. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Phosphorylierungsstelle trägt zum Verständnis des Mechanismus der homologen Desensibilisierung bei.

Zusätzlich konnten einige der beschriebenen Phosphorylierungen in Zellsystemen detektiert werden, die die GC-A endogen exprimieren. Dadurch sind unter physiologischen Bedingungen Analysen der Mechanismen möglich, die bei der Aktivierung und Deaktivierung der GC-A involviert sind und somit wichtige pathophysiologische Konsequenzen haben können.

## 6 Summary

Atrial natriuretic peptide (ANP), via its guanylyl cyclase A (GC-A) receptor and intracellular guanosine 3',5'-cyclic monophosphate production, is critically involved in the regulation of blood pressure. In patients with chronic heart failure, the plasma levels of ANP are increased, but the cardiovascular actions are severely blunted, indicating a receptor or postreceptor defect. Studies on metabolically labelled GC-A-overexpressing cells have indicated that GC-A is extensively phosphorylated, and that ANP induced homologous desensitisation of GC-A correlates with receptor dephosphorylation, a mechanism which might contribute to a loss of function *in vivo*.

In this study, tandem MS analysis of the GC-A receptor, expressed in the human embryonic kidney cell line HEK 293, revealed that the intracellular domain of the receptor is phosphorylated at multiple residues: Ser487, Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510 and Thr513. MS quantification based on multiple reaction monitoring demonstrated that ANP-provoked homologous desensitisation was accompanied by a complex pattern of receptor phosphorylation and dephosphorylation. The population of completely phosphorylated GC-A was diminished which is in agreement with published data. However, the phosphorylation of GC-A at Ser487 was selectively enhanced after exposure to ANP. In contrast, the Angiotensin II-provoked heterologous desensitisation resulted in a complete reduction of phosphorylation, which was even more intensive than after ANP-dependend desensitisation.

The functional relevance of the newly identified phosphorylation site at serin 487 was analysed by site-directed mutagenesis. The substitution of Ser487 by alanine which mimics dephosphorylation resulted in a receptor which could be activated and desensitised like the GC-A wild-type receptor. However, the substitution by glutamate (which mimics phosphorylation) blunted the activation of the GC-A receptor by ANP, but prevented further desensitisation. These data corroborate previous studies suggesting that the responsiveness of GC-A to ANP is regulated by phosphorylation. However, in addition to the dephosphorylation of the previously postulated sites (Ser497, Thr500, Ser502, Ser506, Ser510), homologous desensitisation seems to involve the phosphorylation of GC-A at Ser487. Identification and characterisation of this phosphorylation site therefore contribute to the understanding of homologous desensitisation.

Additionally, some of the detected phosphorylated residues were detected in cells endogenously expressing the GC-A receptor. Therefore future analyses of the mechanisms which are involved in the activation and desensitisation under pathophysiological conditions might be possible.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Experimental medicine and surgery*. 1956;14(2-3):99-112.
2. Henry JP, Gauer OH, Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circulation research*. Jan 1956;4(1):85-90.
3. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*. Jan 5 1981;28(1):89-94.
4. de Bold AJ. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science (New York, N.Y.)*. Nov 15 1985;230(4727):767-770.
5. Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 28 1983;117(3):859-865.
6. Currie MG, Geller DM, Cole BR, Siegel NR, Fok KF, Adams SP, Eubanks SR, Galluppi GR, Needleman P. Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins). *Science (New York, N.Y.)*. Jan 6 1984;223(4631):67-69.
7. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 13 1984;118(1):131-139.
8. Misono KS, Fukumi H, Grammer RT, Inagami T. Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 15 1984;119(2):524-529.
9. Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev*. Jul 1990;70(3):665-699.
10. Drewett JG, Garbers DL. The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocr Rev*. Apr 1994;15(2):135-162.
11. Koller KJ, de Sauvage FJ, Lowe DG, Goeddel DV. Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Molecular and cellular biology*. Jun 1992;12(6):2581-2590.
12. Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun*. May 22 1963;11:330-334.
13. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in biochemical sciences*. Aug 1997;22(8):307-312.
14. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci*. 2005;10:1279-1289.
15. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO journal*. Jun 1 1998;17(11):3045-3051.
16. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circulation research*. Aug 22 2003;93(4):280-291.

17. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* Oct 1995;75(4):725-748.
18. Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* Jul 2002;82(3):769-824.
19. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev.* Feb 2006;27(1):47-72.
20. Kishimoto I, Dubois SK, Garbers DL. The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11 1996;93(12):6215-6219.
21. Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature.* Dec 4-10 1986;324(6096):473-476.
22. Harris PJ, Thomas D, Morgan TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature.* Apr 16-22 1987;326(6114):697-698.
23. Richards AM, McDonald D, Fitzpatrick MA, Nicholls MG, Espiner EA, Ikram H, Jans S, Grant S, Yandle T. Atrial natriuretic hormone has biological effects in man at physiological plasma concentrations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* Dec 1988;67(6):1134-1139.
24. Schreier B, Borner S, Volker K, Gambaryan S, Schafer SC, Kuhlencordt P, Gassner B, Kuhn M. The heart communicates with the endothelium through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of intravascular volume in response to volume expansion. *Endocrinology.* Aug 2008;149(8):4193-4199.
25. Kaufman S, Deng Y. Splenic control of intravascular volume in the rat. *The Journal of physiology.* Aug 1993;468:557-565.
26. Maack T. Role of atrial natriuretic factor in volume control. *Kidney international.* Jun 1996;49(6):1732-1737.
27. Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation research.* Oct 17 2003;93(8):700-709.
28. Skryabin BV, Holtwick R, Fabritz L, Kruse MN, Veltrup I, Stypmann J, Kirchhof P, Sabrane K, Bubikat A, Voss M, Kuhn M. Hypervolemic hypertension in mice with systemic inactivation of the (floxed) guanylyl cyclase-A gene by alphaMHC-Cre-mediated recombination. *Genesis.* Aug 2004;39(4):288-298.
29. de Bold AJ, Ma KK, Zhang Y, de Bold ML, Bensimon M, Khoshbaten A. The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Can J Physiol Pharmacol.* Aug 2001;79(8):705-714.
30. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *The Journal of clinical investigation.* Feb 15 1998;101(4):812-818.

31. Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *The Journal of clinical investigation*. May 2003;111(9):1399-1407.
32. Kilic A, Bubikat A, Gassner B, Baba HA, Kuhn M. Local actions of atrial natriuretic peptide counteract angiotensin II stimulated cardiac remodeling. *Endocrinology*. Sep 2007;148(9):4162-4169.
33. Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K. Natriuretic Peptide Signaling via Guanylyl Cyclase (GC)-A: An Endogenous Protective Mechanism of the Heart. *Current cardiology reviews*. Jan 2009;5(1):45-51.
34. Kook H, Itoh H, Choi BS, Sawada N, Doi K, Hwang TJ, Kim KK, Arai H, Baik YH, Nakao K. Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Apr 2003;284(4):H1388-1397.
35. Kuhn M, Volker K, Schwarz K, Carbajo-Lozoya J, Fogel U, Jacoby C, Stypmann J, van Eickels M, Gambaryan S, Hartmann M, Werner M, Wieland T, Schrader J, Baba HA. The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*. Jul 2009;119(7):2019-2030.
36. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Domenicotti C, Nitti MP, Pronzato MA, Albano E. Mechanisms of hepatocyte protection against hypoxic injury by atrial natriuretic peptide. *Hepatology (Baltimore, Md)*. Feb 2003;37(2):277-285.
37. Lafontan M, Moro C, Sengenès C, Galitzky J, Crampes F, Berlan M. An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides: the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Oct 2005;25(10):2032-2042.
38. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, Najjar SS, Zhao JH, Heath SC, Eyheramendy S, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nature genetics*. May 10 2009.
39. Burnett JC, Jr., Kao PC, Hu DC, Hesser DW, Heublein D, Granger JP, Opgenorth TJ, Reeder GS. Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science (New York, N.Y)*. Mar 7 1986;231(4742):1145-1147.
40. Andreassi MG, Del Ry S, Palmieri C, Clerico A, Biagini A, Giannessi D. Up-regulation of 'clearance' receptors in patients with chronic heart failure: a possible explanation for the resistance to biological effects of cardiac natriuretic hormones. *Eur J Heart Fail*. Aug 2001;3(4):407-414.
41. Yang-Feng TL, Floyd-Smith G, Nemer M, Drouin J, Francke U. The pronatriodilatin gene is located on the distal short arm of human chromosome 1 and on mouse chromosome 4. *American journal of human genetics*. Nov 1985;37(6):1117-1128.

42. Oikawa S, Imai M, Ueno A, Tanaka S, Noguchi T, Nakazato H, Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature*. Jun 21-27 1984;309(5970):724-726.
43. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 18 2000;97(15):8525-8529.
44. Vuolteenaho O, Arjamaa O, Ling N. Atrial natriuretic polypeptides (ANP): rat atria store high molecular weight precursor but secrete processed peptides of 25-35 amino acids. *Biochem Biophys Res Commun*. May 31 1985;129(1):82-88.
45. Inagami T, Misono KS, Fukumi H, Maki M, Tanaka I, Takayanagi R, Imada T, Grammer RT, Naruse M, Naruse K, et al. Structure and physiological actions of rat atrial natriuretic factor. *Hypertension*. Nov 1987;10(5 Pt 2):1113-1117.
46. de Bold AJ, de Bold ML, Sarda IR. Functional-morphological studies on in vitro cardionatriin release. *J Hypertens Suppl*. Jun 1986;4(2):S3-7.
47. Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC, Jr. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circulation research*. Feb 1988;62(2):191-195.
48. McGrath MF, de Bold AJ. Determinants of natriuretic peptide gene expression. *Peptides*. Jun 2005;26(6):933-943.
49. Stasch JP, Hirth-Dietrich C, Kazda S, Neuser D. Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. *Life Sci*. 1989;45(10):869-875.
50. Soualmia H, Barthelemy C, Masson F, Maistre G, Eurin J, Carayon A. Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue. *Journal of cardiovascular pharmacology*. May 1997;29(5):605-611.
51. Lachance D, Garcia R, Gutkowska J, Cantin M, Thibault G. Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. I. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 28 1986;135(3):1090-1098.
52. Thibault G, Amiri F, Garcia R. Regulation of natriuretic peptide secretion by the heart. *Annual review of physiology*. 1999;61:193-217.
53. Ogihara T, Shima J, Hara H, Tabuchi Y, Hashizume K, Nagano M, Katahira K, Kangawa K, Matsuo H, Kumahara Y. Significant increase in plasma immunoreactive atrial natriuretic polypeptide concentration during head-out water immersion. *Life Sci*. Jun 30 1986;38(26):2413-2418.
54. Hollister AS, Tanaka I, Imada T, Onrot J, Biaggioni I, Robertson D, Inagami T. Sodium loading and posture modulate human atrial natriuretic factor plasma levels. *Hypertension*. Jun 1986;8(6 Pt 2):1106-111.
55. Baertschi AJ, Hausmaninger C, Walsh RS, Mentzer RM, Jr., Wyatt DA, Pence RA. Hypoxia-induced release of atrial natriuretic factor (ANF) from the isolated rat and rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 15 1986;140(1):427-433.

56. Lew RA, Baertschi AJ. Mechanisms of hypoxia-induced atrial natriuretic factor release from rat hearts. *The American journal of physiology*. Jul 1989;257(1 Pt 2):H147-156.
57. Schiebinger RJ, Linden J. Effect of atrial contraction frequency on atrial natriuretic peptide secretion. *The American journal of physiology*. Nov 1986;251(5 Pt 2):H1095-1099.
58. Ruskoaho H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacological reviews*. Dec 1992;44(4):479-602.
59. Arjamaa O, Vuolteenaho O. Sodium ion stimulates the release of atrial natriuretic polypeptides (ANP) from rat atria. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 15 1985;132(1):375-381.
60. Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS, Shaknovich A, Pondolfino K, Clark M, Camargo MJ, et al. Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *The Journal of clinical investigation*. Nov 1986;78(5):1362-1374.
61. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *The Journal of clinical investigation*. Apr 1991;87(4):1402-1412.
62. Yamaguchi M, Rutledge LJ, Garbers DL. The primary structure of the rat guanylyl cyclase A/atrial natriuretic peptide receptor gene. *The Journal of biological chemistry*. Nov 25 1990;265(33):20414-20420.
63. Liang F, Schaufele F, Gardner DG. Sp1 dependence of natriuretic peptide receptor A gene transcription in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology*. Apr 1999;140(4):1695-1701.
64. Cao L, Wu J, Gardner DG. Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor. *The Journal of biological chemistry*. Oct 20 1995;270(42):24891-24897.
65. Cao L, Chen SC, Cheng T, Humphreys MH, Gardner DG. Ligand-dependent regulation of NPR-A gene expression in inner medullary collecting duct cells. *The American journal of physiology*. Jul 1998;275(1 Pt 2):F119-125.
66. Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, Goeddel DV. Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *The EMBO journal*. May 1989;8(5):1377-1384.
67. Potter LR. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Front Biosci*. 2005;10:1205-1220.
68. Potter LR, Hunter T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *The Journal of biological chemistry*. Mar 2 2001;276(9):6057-6060.
69. Chinkers M, Wilson EM. Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *The Journal of biological chemistry*. Sep 15 1992;267(26):18589-18597.

70. Lowe DG. Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase is self-associated prior to hormone binding. *Biochemistry*. Nov 3 1992;31(43):10421-10425.
71. Lowe DG, Fendly BM. Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase. Hormone cross-linking and antibody reactivity distinguish receptor glycoforms. *The Journal of biological chemistry*. Oct 25 1992;267(30):21691-21697.
72. Miyagi M, Misono KS. Disulfide bond structure of the atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: conserved disulfide bonds among guanylate cyclase-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta*. Mar 16 2000;1478(1):30-38.
73. Huo X, Abe T, Misono KS. Ligand binding-dependent limited proteolysis of the atrial natriuretic peptide receptor: juxtamembrane hinge structure essential for transmembrane signal transduction. *Biochemistry*. Dec 21 1999;38(51):16941-16951.
74. Miyagi M, Zhang X, Misono KS. Glycosylation sites in the atrial natriuretic peptide receptor: oligosaccharide structures are not required for hormone binding. *European journal of biochemistry / FEBS*. Sep 2000;267(18):5758-5768.
75. van den Akker F, Zhang X, Miyagi M, Huo X, Misono KS, Yee VC. Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor. *Nature*. Jul 6 2000;406(6791):101-104.
76. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological reviews*. Sep 2000;52(3):375-414.
77. Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, Lewicki JA, Schenk DB. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *The Journal of biological chemistry*. Jul 5 1988;263(19):9395-9401.
78. Potter LR, Hunter T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Molecular and cellular biology*. Apr 1998;18(4):2164-2172.
79. Wong SK, Ma CP, Foster DC, Chen AY, Garbers DL. The guanylyl cyclase-A receptor transduces an atrial natriuretic peptide/ATP activation signal in the absence of other proteins. *The Journal of biological chemistry*. Dec 22 1995;270(51):30818-30822.
80. Chinkers M, Garbers DL. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science (New York, N.Y.)*. Sep 22 1989;245(4924):1392-1394.
81. Jewett JR, Koller KJ, Goedel DV, Lowe DG. Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *The EMBO journal*. Feb 1993;12(2):769-777.
82. Rudner XL, Mandal KK, de Sauvage FJ, Kindman LA, Almenoff JS. Regulation of cell signaling by the cytoplasmic domains of the heat-stable enterotoxin receptor: identification of autoinhibitory and activating motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 23 1995;92(11):5169-5173.
83. Wilson EM, Chinkers M. Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry*. Apr 11 1995;34(14):4696-4701.

84. Thompson DK, Garbers DL. Dominant negative mutations of the guanylyl cyclase-A receptor. Extracellular domain deletion and catalytic domain point mutations. *The Journal of biological chemistry*. Jan 6 1995;270(1):425-430.
85. Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG. Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science (New York, N.Y.)*. Jun 30 1989;244(4912):1558-1564.
86. Liu Y, Ruoho AE, Rao VD, Hurley JH. Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 9 1997;94(25):13414-13419.
87. Sunahara RK, Beuve A, Tesmer JJ, Sprang SR, Garbers DL, Gilman AG. Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *The Journal of biological chemistry*. Jun 26 1998;273(26):16332-16338.
88. Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacological reviews*. Sep 1987;39(3):163-196.
89. Hurley JH. The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Current opinion in structural biology*. Dec 1998;8(6):770-777.
90. Crane MR, Hugues M, O'Hanley PD, Waldman SA. Identification of two affinity states of low affinity receptors for Escherichia coli heat-stable enterotoxin: correlation of occupation of lower affinity state with guanylate cyclase activation. *Molecular pharmacology*. Jun 1992;41(6):1073-1080.
91. Antos LK, Abbey-Hosch SE, Flora DR, Potter LR. ATP-independent activation of natriuretic peptide receptors. *The Journal of biological chemistry*. Jul 22 2005;280(29):26928-26932.
92. Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM, Misono KS. Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. Jul 2 2004;279(27):28625-28631.
93. Misono KS, Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM. Structural studies of the natriuretic peptide receptor: a novel hormone-induced rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *Peptides*. Jun 2005;26(6):957-968.
94. Ogawa H, Qiu Y, Huang L, Tam-Chang SW, Young HS, Misono KS. Structure of the atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain in the unbound and hormone-bound states by single-particle electron microscopy. *The FEBS journal*. Mar 2009;276(5):1347-1355.
95. Garbers DL. Molecular basis of fertilization. *Annual review of biochemistry*. 1989;58:719-742.
96. Garbers DL. Molecular basis of signalling in the spermatozoon. *Journal of andrology*. Mar-Apr 1989;10(2):99-107.
97. Vacquier VD, Moy GW. Stoichiometry of phosphate loss from sea urchin sperm guanylate cyclase during fertilization. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 30 1986;137(3):1148-1152.
98. Ramarao CS, Garbers DL. Purification and properties of the phosphorylated form of guanylate cyclase. *The Journal of biological chemistry*. Jan 25 1988;263(3):1524-1529.

99. Potter LR, Garbers DL. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *The Journal of biological chemistry*. Jul 25 1992;267(21):14531-14534.
100. Potter LR, Garbers DL. Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. May 20 1994;269(20):14636-14642.
101. Bond JA, Webley K, Wyllie FS, Jones CJ, Craig A, Hupp T, Wynford-Thomas D. p53-Dependent growth arrest and altered p53-immunoreactivity following metabolic labelling with <sup>32</sup>P ortho-phosphate in human fibroblasts. *Oncogene*. Jun 24 1999;18(25):3788-3792.
102. Hu VW, Heikka DS, Dieffenbach PB, Ha L. Metabolic radiolabeling: experimental tool or Trojan horse? (35)S-Methionine induces DNA fragmentation and p53-dependent ROS production. *Faseb J*. Jul 2001;15(9):1562-1568.
103. Furuya H, Yoshino K, Shimizu T, Mantoku T, Takeda T, Nomura K, Suzuki N. Mass spectrometric analysis of phosphoserine residues conserved in the catalytic domain of membrane-bound guanylyl cyclase from the sea urchin spermatozoa. *Zoological science*. Aug 1 1998;15(4):507-516.
104. Joubert S, Labrecque J, De Lean A. Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor. *Biochemistry*. Sep 18 2001;40(37):11096-11105.
105. Koller KJ, Lipari MT, Goeddel DV. Proper glycosylation and phosphorylation of the type A natriuretic peptide receptor are required for hormone-stimulated guanylyl cyclase activity. *The Journal of biological chemistry*. Mar 15 1993;268(8):5997-6003.
106. Suzuki N, Shimomura H, Radany EW, Ramarao CS, Ward GE, Bentley JK, Garbers DL. A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*. Dec 10 1984;259(23):14874-14879.
107. Ward GE, Vacquier VD. Dephosphorylation of a major sperm membrane protein is induced by egg jelly during sea urchin fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1983;80(18):5578-5582.
108. Muller D, Cortes-Dericks L, Budnik LT, Brunswig-Spickenheier B, Pancrattius M, Speth RC, Mukhopadhyay AK, Middendorff R. Homologous and lysophosphatidic acid-induced desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A, in MA-10 leydig cells. *Endocrinology*. Jun 2006;147(6):2974-2985.
109. Fortin Y, De Lean A. Role of cyclic GMP and calcineurin in homologous and heterologous desensitization of natriuretic peptide receptor-A. *Can J Physiol Pharmacol*. May 2006;84(5):539-546.
110. Bryan PM, Potter LR. The atrial natriuretic peptide receptor (NPR-A/GC-A) is dephosphorylated by distinct microcystin-sensitive and magnesium-dependent protein phosphatases. *The Journal of biological chemistry*. May 3 2002;277(18):16041-16047.
111. Foster DC, Garbers DL. Dual role for adenine nucleotides in the regulation of the atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A. *The Journal of biological chemistry*. Jun 26 1998;273(26):16311-16318.

112. Potter LR, Hunter T. A constitutively "phosphorylated" guanylyl cyclase-linked atrial natriuretic peptide receptor mutant is resistant to desensitization. *Molecular biology of the cell*. Jun 1999;10(6):1811-1820.
113. Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev*. Jan 2000;80(1):173-210.
114. Sheppeck JE, 2nd, Gauss CM, Chamberlin AR. Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorganic & medicinal chemistry*. Sep 1997;5(9):1739-1750.
115. Huang X, Honkanen RE. Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to Drosophila retinal degeneration C gene product (rdgC). *The Journal of biological chemistry*. Jan 16 1998;273(3):1462-1468.
116. Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, Vande Woude GF, O'Connor PM, Appella E. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 10 1997;94(12):6048-6053.
117. Guthridge MA, Bellosta P, Tavoloni N, Basilico C. FIN13, a novel growth factor-inducible serine-threonine phosphatase which can inhibit cell cycle progression. *Molecular and cellular biology*. Sep 1997;17(9):5485-5498.
118. Ishida A, Kameshita I, Fujisawa H. A novel protein phosphatase that dephosphorylates and regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of biological chemistry*. Jan 23 1998;273(4):1904-1910.
119. Tong Y, Quirion R, Shen SH. Cloning and characterization of a novel mammalian PP2C isozyme. *The Journal of biological chemistry*. Dec 25 1998;273(52):35282-35290.
120. Nambi P, Whitman M, Gessner G, Aiyar N, Crooke ST. Vasopressin-mediated inhibition of atrial natriuretic factor-stimulated cGMP accumulation in an established smooth muscle cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 1986;83(22):8492-8495.
121. Haneda M, Kikkawa R, Maeda S, Togawa M, Koya D, Horide N, Kajiwara N, Shigeta Y. Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation. *Kidney international*. Aug 1991;40(2):188-194.
122. Jaiswal RK. Endothelin inhibits the atrial natriuretic factor stimulated cGMP production by activating the protein kinase C in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 15 1992;182(1):395-402.
123. Yasunari K, Kohno M, Murakawa K, Yokokawa K, Horio T, Takeda T. Phorbol ester and atrial natriuretic peptide receptor response on vascular smooth muscle. *Hypertension*. Apr 1992;19(4):314-319.
124. Tokudome T, Horio T, Soeki T, Mori K, Kishimoto I, Suga S, Yoshihara F, Kawano Y, Kohno M, Kangawa K. Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways. *Endocrinology*. May 2004;145(5):2131-2140.

125. Lea JP, Jin SG, Roberts BR, Shuler MS, Marrero MB, Tumlin JA. Angiotensin II stimulates calcineurin activity in proximal tubule epithelia through AT-1 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of the PLC-gamma1 isoform. *J Am Soc Nephrol*. Jul 2002;13(7):1750-1756.
126. Potter LR, Hunter T. Identification and characterization of the phosphorylation sites of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors A and B. *Methods (San Diego, Calif)*. Dec 1999;19(4):506-520.
127. Potter LR, Hunter T. Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. *The Journal of biological chemistry*. Oct 6 2000;275(40):31099-31106.
128. Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Molecular and cellular biochemistry*. Jan 2002;230(1-2):31-47.
129. Rathinavelu A, Isom GE. Differential internalization and processing of atrial-natriuretic-factor B and C receptor in PC12 cells. *The Biochemical journal*. Jun 1 1991;276 ( Pt 2):493-497.
130. Pandey KN. Kinetic analysis of internalization, recycling and redistribution of atrial natriuretic factor-receptor complex in cultured vascular smooth-muscle cells. Ligand-dependent receptor down-regulation. *The Biochemical journal*. Nov 15 1992;288 ( Pt 1):55-61.
131. Pandey KN. Stoichiometric analysis of internalization, recycling, and redistribution of photoaffinity-labeled guanylate cyclase/atrial natriuretic factor receptors in cultured murine Leydig tumor cells. *The Journal of biological chemistry*. Feb 25 1993;268(6):4382-4390.
132. Pandey KN, Inagami T, Misono KS. Atrial natriuretic factor receptor on cultured Leydig tumor cells: ligand binding and photoaffinity labeling. *Biochemistry*. Dec 30 1986;25(26):8467-8472.
133. Pandey KN, Kumar R, Li M, Nguyen H. Functional domains and expression of truncated atrial natriuretic peptide receptor-A: the carboxyl-terminal regions direct the receptor internalization and sequestration in COS-7 cells. *Molecular pharmacology*. Feb 2000;57(2):259-267.
134. Vieira MA, Gao M, Nikonova LN, Maack T. Molecular and cellular physiology of the dissociation of atrial natriuretic peptide from guanylyl cyclase a receptors. *The Journal of biological chemistry*. Sep 28 2001;276(39):36438-36445.
135. Koh GY, Nussenzveig DR, Okolicany J, Price DA, Maack T. Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *The Journal of biological chemistry*. Jun 15 1992;267(17):11987-11994.
136. Fan D, Bryan PM, Antos LK, Potthast RJ, Potter LR. Down-regulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. *Molecular pharmacology*. Jan 2005;67(1):174-183.
137. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. Mar 13 2003;422(6928):198-207.

138. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)*. Oct 6 1989;246(4926):64-71.
139. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* Oct 15 1988;60(20):2299-2301.
140. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem.* Mar 15 2000;72(6):1156-1162.
141. Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K, Horning S. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem.* Apr 1 2006;78(7):2113-2120.
142. Olsen JV, de Godoy LM, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, Makarov A, Lange O, Horning S, Mann M. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics.* Dec 2005;4(12):2010-2021.
143. Schroeder MJ, Shabanowitz J, Schwartz JC, Hunt DF, Coon JJ. A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry. *Anal Chem.* Jul 1 2004;76(13):3590-3598.
144. Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomedical & environmental mass spectrometry.* Oct 1988;16(1-12):99-111.
145. Paizs B, Suhai S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass spectrometry reviews.* Jul-Aug 2005;24(4):508-548.
146. Graves JD, Krebs EG. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacology & therapeutics.* May-Jun 1999;82(2-3):111-121.
147. Salzano AM, Crescenzi M. Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications. *Annali dell'Istituto superiore di sanita.* 2005;41(4):443-450.
148. Steen H, Jebanathirajah JA, Rush J, Morrice N, Kirschner MW. Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. *Mol Cell Proteomics.* Jan 2006;5(1):172-181.
149. Thingholm TE, Jorgensen TJ, Jensen ON, Larsen MR. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nature protocols.* 2006;1(4):1929-1935.
150. Klemm C, Otto S, Wolf C, Haseloff RF, Beyermann M, Krause E. Evaluation of the titanium dioxide approach for MS analysis of phosphopeptides. *J Mass Spectrom.* Dec 2006;41(12):1623-1632.
151. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* Dec 1999;20(18):3551-3567.
152. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular systems biology.* 2008;4:222.

153. Mead JA, Bianco L, Ottone V, Barton C, Kay RG, Lilley KS, Bond NJ, Bessant C. MRmaid, the web-based tool for designing multiple reaction monitoring (MRM) transitions. *Mol Cell Proteomics*. Apr 2009;8(4):696-705.
154. Ascoli M. Effects of hypocholesterolemia and chronic hormonal stimulation on sterol and steroid metabolism in a Leydig cell tumor. *Journal of lipid research*. Nov 1981;22(8):1247-1253.
155. Pandey KN, Oliver PM, Maeda N, Smithies O. Hypertension associated with decreased testosterone levels in natriuretic peptide receptor-A gene-knockout and gene-duplicated mutant mouse models. *Endocrinology*. Nov 1999;140(11):5112-5119.
156. Pandey KN, Pavlou SN, Inagami T. Identification and characterization of three distinct atrial natriuretic factor receptors. Evidence for tissue-specific heterogeneity of receptor subtypes in vascular smooth muscle, kidney tubular epithelium, and Leydig tumor cells by ligand binding, photoaffinity labeling, and tryptic proteolysis. *The Journal of biological chemistry*. Sep 15 1988;263(26):13406-13413.
157. Golenhofen N, Ness W, Wawrousek EF, Drenckhahn D. Expression and induction of the stress protein alpha-B-crystallin in vascular endothelial cells. *Histochem Cell Biol*. Mar 2002;117(3):203-209.
158. Arise KK, Pandey KN. Inhibition and down-regulation of gene transcription and guanylyl cyclase activity of NPRA by angiotensin II involving protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 13 2006;349(1):131-135.
159. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Aug 15 1970;227(5259):680-685.
160. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987;8(1987):93-99.
161. 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*. Jun 1988;9(6):255-262.
162. Goy MF, Mandelbrot DA, York CM. Identification and characterization of a polypeptide from a lobster neurosecretory gland that induces cyclic GMP accumulation in lobster neuromuscular preparations. *Journal of neurochemistry*. Mar 1987;48(3):954-966.
163. Chrisman TD, Perkins DT, Garbers DL. Identification of a potent serum factor that causes desensitization of the receptor for C-Type natriuretic peptide. *Cell Commun Signal*. Nov 19 2003;1(1):4.
164. Ishikawa E, Ishikawa S, Davis JW, Sutherland EW. Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *The Journal of biological chemistry*. Dec 10 1969;244(23):6371-6376.
165. Hardman JG, Beavo JA, Gray JP, Chrisman TD, Patterson WD, Sutherland EW. The formation and metabolism of cyclic GMP. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Dec 30 1971;185:27-35.

166. Hendrickson EL, Xia Q, Wang T, Leigh JA, Hackett M. Comparison of spectral counting and metabolic stable isotope labeling for use with quantitative microbial proteomics. *The Analyst*. Dec 2006;131(12):1335-1341.
167. Muller-Marschhausen K, Waschke J, Drenckhahn D. Physiological hydrostatic pressure protects endothelial monolayer integrity. *American journal of physiology*. Jan 2008;294(1):C324-332.
168. Misono KS, Sivasubramanian N, Berkner K, Zhang X. Expression and purification of the extracellular ligand-binding domain of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor: monovalent binding with ANP induces 2:2 complexes. *Biochemistry*. Jan 12 1999;38(2):516-523.
169. van Werven FJ, Timmers HT. The use of biotin tagging in *Saccharomyces cerevisiae* improves the sensitivity of chromatin immunoprecipitation. *Nucleic acids research*. 2006;34(4):e33.
170. Okumura E, Sekiai T, Hisanaga S, Tachibana K, Kishimoto T. Initial triggering of M-phase in starfish oocytes: a possible novel component of maturation-promoting factor besides cdc2 kinase. *The Journal of cell biology*. Jan 1996;132(1-2):125-135.
171. Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. Jun 2004;4(6):1633-1649.
172. Hirsch J, Schlatter E. Genistein potentiates the ANP effect on a K(+)-conductance in HEK-293 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2003;13(4):223-228.
173. Kumar R, Grammatikakis N, Chinkers M. Regulation of the atrial natriuretic peptide receptor by heat shock protein 90 complexes. *The Journal of biological chemistry*. Apr 6 2001;276(14):11371-11375.
174. Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*. Mar 22 1996;84(6):889-897.
175. Aitken A. 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends in biochemical sciences*. Mar 1995;20(3):95-97.
176. Aude SR, Chen J, Maddika S. The ubiquitin pathway: an emerging drug target in cancer therapy. *European journal of pharmacology*. Dec 25 2009;625(1-3):199-205.
177. Trinkle-Mulcahy L, Boulon S, Lam YW, Urcia R, Boisvert FM, Vandermoere F, Morrice NA, Swift S, Rothbauer U, Leonhardt H, Lamond A. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *The Journal of cell biology*. Oct 20 2008;183(2):223-239.
178. Andersson L, Porath J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe<sup>3+</sup>) affinity chromatography. *Analytical biochemistry*. Apr 1986;154(1):250-254.
179. Li S, Dass C. Iron(III)-immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry for the purification and characterization of synthetic phosphopeptides. *Analytical biochemistry*. May 15 1999;270(1):9-14.

180. Neville DC, Rozanas CR, Price EM, Gruis DB, Verkman AS, Townsend RR. Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Sci.* Nov 1997;6(11):2436-2445.
181. Nuhse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC. Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* Nov 2003;2(11):1234-1243.
182. Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature biotechnology.* Mar 2002;20(3):301-305.
183. Jensen SS, Larsen MR. Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21(22):3635-3645.
184. Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, Larsen MR. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteomics.* Apr 2008;7(4):661-671.
185. Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 29 2004;101(26):9528-9533.
186. Zubarev RA, Horn DM, Fridriksson EK, Kelleher NL, Kruger NA, Lewis MA, Carpenter BK, McLafferty FW. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Anal Chem.* Feb 1 2000;72(3):563-573.
187. Chi A, Huttenhower C, Geer LY, Coon JJ, Syka JE, Bai DL, Shabanowitz J, Burke DJ, Troyanskaya OG, Hunt DF. Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 13 2007;104(7):2193-2198.
188. Molina H, Horn DM, Tang N, Mathivanan S, Pandey A. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 13 2007;104(7):2199-2204.
189. Wiesner J, Premsler T, Sickmann A. Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics.* Nov 2008;8(21):4466-4483.
190. Flora DR, Potter LR. Prolonged Atrial Natriuretic Peptide Exposure Stimulates Guanylyl Cyclase-A Degradation. *Endocrinology.* June 2010;151(6):2769-2776.
191. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature.* Apr 5 1990;344(6266):503-508.
192. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science (New York, N.Y.)* Dec 16 1994;266(5192):1821-1828.
193. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature.* Mar 9 1995;374(6518):131-134.

194. Anderson CW. DNA damage and the DNA-activated protein kinase. *Trends in biochemical sciences*. Nov 1993;18(11):433-437.
195. Jackson SP. DNA-dependent protein kinase. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Jul 1997;29(7):935-938.
196. Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*. Apr 1982;93(1):97-102.
197. Burkhardt J, Huber LA, Dieplinger H, Blocker A, Griffiths G, Desjardins M. Gaining insight into a complex organelle, the phagosome, using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. Dec 1995;16(12):2249-2257.
198. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*. 1975;26(3):231-243.
199. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry*. May 25 1975;250(10):4007-4021.
200. Schmidtke G, Schmidt M, Kloetzel PM. Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *Journal of molecular biology*. Apr 25 1997;268(1):95-106.
201. Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry*. Dec 1991;199(2):223-231.
202. Macfarlane DE. Two dimensional benzyltrimethyl-n-hexadecylammonium chloride----sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Analytical biochemistry*. Feb 1 1989;176(2):457-463.
203. Bykova NV, Stensballe A, Egsgaard H, Jensen ON, Moller IM. Phosphorylation of formate dehydrogenase in potato tuber mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. Jul 11 2003;278(28):26021-26030.
204. Patton WF. Detection technologies in proteome analysis. *Journal of chromatography*. May 5 2002;771(1-2):3-31.
205. Oda Y, Nagasu T, Chait BT. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nature biotechnology*. Apr 2001;19(4):379-382.
206. Schnolzer M, Jedrzejewski P, Lehmann WD. Protease-catalyzed incorporation of <sup>18</sup>O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis*. May 1996;17(5):945-953.
207. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. May 2002;1(5):376-386.

- 208.** Pandey A, Podtelejnikov AV, Blagoev B, Bustelo XR, Mann M, Lodish HF. Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 4 2000;97(1):179-184.
- 209.** Gronborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M, Jensen ON, Pandey A. A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics*. Jul 2002;1(7):517-527.
- 210.** Lleres D, Swift S, Lamond AI. Detecting protein-protein interactions in vivo with FRET using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.* Oct 2007;Chapter 12:Unit12 10.
- 211.** Grant DM, Zhang W, McGhee EJ, Bunney TD, Talbot CB, Kumar S, Munro I, Dunsby C, Neil MA, Katan M, French PM. Multiplexed FRET to image multiple signaling events in live cells. *Biophysical journal*. Nov 15 2008;95(10):L69-71.

## 8 Anhang

### 8.1 m/z-Übergänge für MRM-Experimente

**Tabelle 40: Für MRM-Scan verwendete m/z-Übergänge mit zugehörigen Kollisionsenergien**

Die phosphorylierten AS in den Peptiden sind durch **pS** bzw. **pT** gekennzeichnet. Abkürzungen: z, Ladung; Q1, erster Quadrupol; Q3, dritter Quadrupol; M, Mutterion

Peptid	z	Q1	Q3	Ion	Kollisionsenergie
WEDLQPSpSLER	2 <sup>+</sup>	720,31	486,27	y4-98	41,0
	2 <sup>+</sup>	720,31	670,35	y6-98	41,0
	2 <sup>+</sup>	720,31	768,35	y6	41,0
	2 <sup>+</sup>	720,31	288,13	a2	41,0
VRWEDLQPSpSLER	3 <sup>+</sup>	565,60	486,28	y4-98	26,6
	3 <sup>+</sup>	565,60	573,30	y5-98	26,6
	3 <sup>+</sup>	565,60	384,68	y6 <sup>++</sup>	26,6
	3 <sup>+</sup>	565,60	670,35	y6-98	26,6
LTLpSGR	2 <sup>+</sup>	363,68	301,16	y3-98	23,2
	2 <sup>+</sup>	363,68	414,24	y4-98	23,2
	2 <sup>+</sup>	363,68	515,29	y5-98	23,2
	2 <sup>+</sup>	363,68	613,29	y5	23,2
LpTLSGR	2 <sup>+</sup>	363,68	319,17	y3	23,2
	2 <sup>+</sup>	363,68	432,26	y4	23,2
	2 <sup>+</sup>	363,68	515,29	y5-98	23,2
	2 <sup>+</sup>	363,68	543,40	intensiver Peak ohne Annotation	23,2
LpTLpSGR	2 <sup>+</sup>	403,66	354,66	[M+2H] <sup>2+</sup> -98	25,2
	2 <sup>+</sup>	403,66	301,16	y3-98	25,2
	2 <sup>+</sup>	403,66	414,24	y4-98	25,2
	2 <sup>+</sup>	403,66	497,28	y5-196	25,2
SAGpSRLTLSGR	3 <sup>+</sup>	395,53	131,08	a2	19,8
	3 <sup>+</sup>	395,53	533,30	y5	19,8
	3 <sup>+</sup>	395,53	464,77	y9-98 <sup>++</sup>	19,8
	3 <sup>+</sup>	395,53	432,26	y4	19,8
SAGSRLpTLpSGR	3 <sup>+</sup>	422,19	301,16	y3-98	20,9
	3 <sup>+</sup>	422,19	497,28	y5-196	20,9
	3 <sup>+</sup>	422,19	455,76	y9-196 <sup>++</sup>	20,9
	3 <sup>+</sup>	422,19	553,76	y9 <sup>++</sup>	20,9
SAGpSRLTLpSGR	2 <sup>+</sup>	632,78	583,78	[M+2H] <sup>2+</sup> -98	36,6
	2 <sup>+</sup>	632,78	131,07	a2	36,6
	2 <sup>+</sup>	632,78	392,74	y7-98	36,6
	2 <sup>+</sup>	632,78	515,29	y5-98	36,6
	2 <sup>+</sup>	632,78	301,16	y3-98	36,6

Peptid	z	Q1	Q3	Ion	Kollisions- energie
SAGpSRLpTLsGR	2 <sup>+</sup>	632,77	131,07	a2	36,6
	2 <sup>+</sup>	632,77	455,76	y9-196 <sup>++</sup>	36,6
	2 <sup>+</sup>	632,77	628,37	y6-98	36,6
	2 <sup>+</sup>	632,77	432,25	y4	36,6
	2 <sup>+</sup>	632,77	583,77	[M+2H] <sup>2+</sup> -98	36,6
SAGpSRLpTLpSGR	2 <sup>+</sup>	672,76	525,76	[M+2H] <sup>2+</sup> -294	38,6
	2 <sup>+</sup>	672,76	131,08	a2	38,6
	2 <sup>+</sup>	672,76	441,22	b5	38,6
	2 <sup>+</sup>	672,76	637,34	b7	38,6
	2 <sup>+</sup>	672,76	301,16	y3	38,6
GSNYGpSLLTTEGQFQVFAK	3 <sup>+</sup>	709,66	231,11	a3	32,4
	3 <sup>+</sup>	709,66	548,21	b6	32,4
	3 <sup>+</sup>	709,66	661,25	b7	32,4
	3 <sup>+</sup>	709,66	924,49	y8	32,4
	3 <sup>+</sup>	709,66	404,15	b4-H <sub>2</sub> O	32,4
GpSNYGSLLTTEGQFQVFAK	2 <sup>+</sup>	1063,99	1625,85	y15	58,2
	2 <sup>+</sup>	1063,99	241,09	b3-98	58,2
	2 <sup>+</sup>	1063,99	1255,63	y11	58,2
	2 <sup>+</sup>	1063,99	1368,72	y12	58,2
GSNYGSLLpTTEGQFQVFAK	3 <sup>+</sup>	709,66	1237,62	y11-98	32,4
	3 <sup>+</sup>	709,66	619,31	y11-98 <sup>++</sup>	32,4
	3 <sup>+</sup>	709,66	577,80	y10 <sup>++</sup>	32,4
	3 <sup>+</sup>	709,66	592,34	y5	32,4
	3 <sup>+</sup>	709,66	739,41	y6	32,4
GpSNYGpSLLTTEGQFQVFAK	2 <sup>+</sup>	1103,98	1607,84	y15-98	60,2
	2 <sup>+</sup>	1103,98	1368,72	y12	60,2
	2 <sup>+</sup>	1103,98	241,09	b3	60,2
	2 <sup>+</sup>	1103,98	739,41	y6	60,2
GSNYGpSLLpTTEGQFQVFAK	3 <sup>+</sup>	736,32	1237,62	y11-98	33,6
	3 <sup>+</sup>	736,32	1154,58	y10	33,6
	3 <sup>+</sup>	736,32	661,29	b7-98	33,6
<b>synthetische Standardpeptide</b>					
VGGHAAEYGAELER	3 <sup>+</sup>	510,58	488,28	y4	24,4
	3 <sup>+</sup>	510,58	617,33	y5	24,4
	3 <sup>+</sup>	510,58	842,38	b9	24,4
	3 <sup>+</sup>	510,58	417,25	y3	24,4
TEREDLIAYLK	3 <sup>+</sup>	450,91	494,30	y4	22,0
	3 <sup>+</sup>	450,91	744,35	b6	22,0
	3 <sup>+</sup>	450,91	607,38	y5	22,0
	3 <sup>+</sup>	450,91	631,27	b5	22,0

Peptid	z	Q1	Q3	Ion	Kollisionsenergie
VKVDEVGGEALGR	3 <sup>+</sup>	443,58	416,26	y4	21,7
	3 <sup>+</sup>	443,58	659,35	y7	21,7
	3 <sup>+</sup>	443,58	232,14	y2	21,7
	3 <sup>+</sup>	443,58	345,22	y3	21,7
EFTPVLQADFQK	2 <sup>+</sup>	711,87	1045,57	y9	40,6
	2 <sup>+</sup>	711,87	849,45	y7	40,6
	2 <sup>+</sup>	711,87	523,29	y9 <sup>++</sup>	40,6
	2 <sup>+</sup>	711,87	608,30	y5	40,6
<b>synthetische phosphorylierte Standardpeptide</b>					
DIGpSEpSTEDQAmEDIK	2 <sup>+</sup>	972,30	1195,51	y10	46,7
	2 <sup>+</sup>	972,30	1264,54	y11-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	46,7
	2 <sup>+</sup>	972,30	965,42	y8	46,7
	2 <sup>+</sup>	972,30	923,36	MH- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>++</sup>	46,7
NSLVTQDDpTFKDK	3 <sup>+</sup>	530,91	368,19	y6- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>++</sup>	31,5
	3 <sup>+</sup>	530,91	359,67	y6- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>++</sup>	31,5
	3 <sup>+</sup>	530,91	310,67	y5- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>++</sup>	31,5
	3 <sup>+</sup>	530,91	498,26	b5-NH <sub>3</sub>	31,5

## 8.2 Spektren der detektierten Phosphorylierungsstellen in FLAG-GC-A exprimierenden HEK293-, MA-10 Leydig- und MyEnd-Zellen

Die Abbildungen der Spektren der jeweils detektierten Phosphorylierungsstellen sind unter den folgenden Datei-Namen auf CD (Ordner „MS-Spektren“) gespeichert:

- MS-Spektren der Phosphorylierungsstellen aus FLAG-GC-A exprimierenden HEK293-Zellen
- MS-Spektren der Phosphorylierungsstellen aus MA-10 Leydig-Zellen
- MS-Spektren der Phosphorylierungsstellen aus MyEnd-Zellen

**Tabelle 41: In MS/MS-Spektren verwendete Abkürzungen**

Abkürzung	Bedeutung
a <sup>++</sup> , b <sup>++</sup> , y <sup>++</sup> , z <sup>++</sup>	zweifach protoniertes a-, b-, y- bzw. z-Ion
b <sup>*</sup> , y <sup>*</sup>	Neutralverlust von NH <sub>3</sub> bei b- bzw. y -Ion
b <sup>+++</sup> , y <sup>+++</sup>	Neutralverlust von NH <sub>3</sub> bei zweifach protoniertem b- bzw. y-Ion
b <sup>0</sup> , y <sup>0</sup>	Neutralverlust von H <sub>2</sub> O bei b- bzw. y -Ion

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
$b^{0++}, y^{0++}$	Neutralverlust von $H_2O$ bei zweifach protoniertem b- bzw. y-Ion
Immon.	Immonium-Ion

### 8.3 Spectral Counting

Unter folgenden Dateinamen (Tabelle 42) im Ordner „Spectral Counting“ auf der beiliegenden CD sind einige durch Mascot erstellte Proteinlisten gespeichert, um den Vergleich der GC-A-Peptide aus miteinander verglichenen MRM-Proben mittels Spectral Counting darzustellen. Zusätzlich sind in diesen Dateien einige der neben der GC-A detektierten Proteine zu sehen. Dabei ist bei jedem Protein die Molekularmasse (Mass), der Score und die identifizierten Peptide, die zum Vergleich genutzt wurden (Queries matched) angegeben.

**Tabelle 42: Dateinamen der auf CD vorhandenen Proteinlisten für das Spectral Counting**

<b>Dateiname (Qtrap-Nr., Datum, Behandlung)</b>	<b>identifizierte GC-A-Peptide</b>
0015741 01.08.2008 ohne Ang II	60
0015748 01.08.2008 mit Ang II	58
0015765 13.08.2008 ohne Ang II	59
0015766 13.08.2008 mit Ang II	57
0016153 25.09.2008 ohne ANP, Exp.1	39
0016154 25.09.2008 mit ANP, Exp.1	40
0016155 25.09.2008 ohne ANP, Exp.2	38
0016156 25.09.2008 mit ANP, Exp.2	37

## 9 Danksagung

Großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Michaela Kuhn für die Möglichkeit der Promotion anhand eines solch interessanten Themas sowie für die fortwährende Unterstützung, die anregenden Diskussionen, die reichhaltigen Möglichkeiten bei der Realisierung dieser Arbeit und die ermöglichten Kongressreisen.

Ebenfalls gilt Herrn Prof. Dr. Albert Sickmann großer Dank für die Betreuung sowie die Bereitstellung seiner Labore in Würzburg und auch in Dortmund für alle massenspektrometrischen Untersuchungen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar für die Bereitschaft als zweiter Prüfer zur Verfügung zu stehen und auch für die interessanten Diskussionen danken.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Antje Gohla, dass sie so spontan als Gutachterin zur Verfügung stand.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen des SFB 487.

Außerdem möchte ich **allen** Mitarbeitern der Physiologie, Lehrstuhl 1 und der Arbeitsgruppe Proteomics für das inspirierende und einmalig gute Arbeitsklima danken. Ganz besonderer Dank gilt hierbei Birgit Gaßner und Alexandra Gazinski für die Unterstützung bei Zellkultur und RIA. Michael Hartmann möchte ich danken für die Unterstützung bei der Herstellung der GC-A-Mutanten. Michael Klaiber danke ich für die großzügige Hilfe, wenn mal wieder 100 Zellkulturschalen lysiert werden wollten. Prof. Kai Schuh und Dr. Peter Benz danke ich für die Anleitung für die Immunzytochemie sowie dafür, dass sie immer eine Antwort für jede Laborfrage hatten. Ein riesengroßer Dank gilt Dr. René Zahedi, von dessen Wissen über die Phosphoproteomanalytik ich sehr profitieren konnte, und Julia Wiesner und Beate Eyrich, die nie müde wurden, mir die Massenspektrometrie zu erklären. Doreen, Mirja, Melli, Bea, Katharina und Tobi sowie Urs, Frau Winkler, Frau Schütz, Julibu, Steffi P. und Steffi W. danke ich dafür, dass die Arbeit im Labor nie langweilig wurde.

PD Dr. Günther Schlunck und seinen Mitarbeitern aus der Experimentellen Ophthalmologie der Augenklinik und Poliklinik Würzburg danke ich für die großartige Unterstützung und die Nachsicht, während ich die Doktorarbeit schrieb.

Natürlich möchte ich meiner Familie und Sebastians Eltern danken für die fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen und die aufmunternden Worte, wenn im Labor mal wieder alles schief zu laufen schien.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden: Danke, dass ihr immer da seid, auch wenn nicht immer Zeit für ein Treffen oder Telefonat ist und danke, dass ihr mir auch immer wieder gezeigt habt, dass es auch noch ein Leben außerhalb des Labors gibt!

Der größte Dank gilt meinem Mann Sebastian für die gemeinsame Zeit seit wir uns in der Physiologie kennen gelernt haben und für die, die noch vor uns liegt! Ich danke Dir für die Diskussionen über die Arbeit, das Erdulden meiner Launen, für die manchmal notwendige Ablenkung von der Arbeit und dafür, dass Du immer an mich glaubst. Deshalb und aus tausend anderen Gründen widme ich Dir diese Arbeit!

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

I hereby declare that my thesis entitled

“Charakterisierung der Phosphorylierungen der Guanylyl Cyklase A, dem Rezeptor für das atriale natriuretische Peptid, mittels Massenspektrometrie”

is the result of my own work. I did not receive any help or commercial consultants. All sources and/or materials are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that this thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, den