

**Entwicklung neuer Methoden zur  
massenspektrometrischen Charakterisierung von  
Membranproteinen**

Dissertation

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Bernhard Granvogl  
aus Unterschleissheim

**Januar 2008**

1. Gutachter: Prof. Dr. Lutz A. Eichacker, LMU München

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Nickelsen, LMU München

Tag der Abgabe: 22.01.2008

Tag des Promotionskolloquiums: 10.04.2008

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Fakultät für Biologie, Department I, Fachbereich Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Eichacker durchgeführt. Die Finanzierung erfolgte über den SFB TR-1 (Sprecher: Prof. Dr. Jürgen Soll).

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Lutz Eichacker, der mir diese Arbeit ermöglicht und finanziert hat. Er hat mir die Freiheit gelassen eigenständige Ideen zu entwickeln und diese in seinem bestens ausgestatteten Labor zu verwirklichen. Zusammen sind wir der Problematik der massenspektrometrischen Analyse von Membranproteinen zumindest ein wenig näher gekommen. Sein freundschaftliches Verhältnis zu mir und allen anderen Mitarbeitern hat entscheidend das gute Arbeitsklima in unserem Labor geprägt.

Mikael Zoryan danke ich für die Proteinextraktionen aus der Thylakoidmembran von Tabak, die er mir für Versuche zur Verfügung gestellt hat. Falls Mikael weiterhin die unglaublich *aromatischen*, *marokkanischen*, *Karotten*, statt dicke Scheiben *rosaroter* Salami isst, wird er wahrscheinlich auch in ferner Zukunft von *Parodontose* verschont bleiben. Vorwärts Armenia Bielefeld!!

Des weiteren danke ich Axel Masanek, der unermüdlich darum bemüht war unseren Reichtum zu mehren, indem er jeden Samstag um fünf vor drei den Totoschein abgeben hat. Auch bei den unzähligen Problemen mit meinem Computer hatte er immer ein offenes Ohr und oft den entscheidenden Click.

Ich danke Matthias Plöscher, der trotz unzähliger Tafeln Schokolade, in der gesamten Zeit, bestimmt kein Gramm zugenommen hat. Mit ihm habe ich in der Abgeschlossenheit unseres MS-Labors so manches Problem gewälzt: „Wo kommen in den Spektren bloß alle diese Störsignale her?!“ Falls seine Versuche weiterhin so hervorragend funktionieren, wird er seine Dissertation sicher auch „bald“ fertig haben.

Veronika Reisinger danke ich für die unzähligen Gespräche, die so manche Wartezeit auf die richtige S-Bahn verkürzt haben. Manchmal haben wir *sogar* über die Forschung geredet! Ihre praktischen Tipps zu Elektrophorese und Proteinfärbung, waren mehr als einmal sehr hilfreich. Ich wünsche mir, dass sich eine Zusammenarbeit auch in Zukunft irgendwie fortsetzen lässt.

Nicht zuletzt möchte ich Nora Dotzler für ihre Fotos danken, die neue Einblicke in den Mikrokosmos von Kuchenkrümeln gewährt haben, sowie all den Diplomandinnen und Diplomanden, die während dieser Zeit im Labor waren und neben ihrer Zeit auch ein Stück Schokolade dagelassen haben.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Josef Komenda, der mir 2D-Gele mit Proteinen der Photosynthesemembran aus *Synechocystis* zur Verfügung gestellt hat.

Mein besonderer Dank gilt zum Schluss noch Ilona, mit der ich mein bis jetzt erfolgreichstes biologisches Experiment durchgeführt habe: Unseren Sohn Nils!



**Im Zeitraum dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:**

**Granvogl, B.**, Gruber, P. and Eichacker, L.A. (2007). Standardisation of rapid in-Gel digestion by mass spectrometry. **Proteomics** 7, 642-54

**Granvogl, B.**, Ploscher, M. and Eichacker, L.A. (2007). Sample preparation by in-Gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. **Anal. Bioanal. Chem.**, 389(4), 991-1002

Komenda, J., Kuvikova, S., **Granvogl, B.**, Eichacker, L.A., Diner, B.A. and Nixon, P.J. (2007). Cleavage after residue Ala352 in the C-terminal extension is an early step in the maturation of the D1 subunit of Photosystem II in *Synechocystis* PCC 6803. **Biochim Biophys Acta** 1767, 829-37

**Granvogl, B.**, Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2006). Mapping the proteome of thylakoid membranes by de novo sequencing of intermembrane peptide domains. **Proteomics** 6, 3681-95

Moslavac, S., Bredemeier, R., Mirus, O., **Granvogl, B.**, Eichacker, L.A. and Schleiff, E. (2005). Proteomic analysis of the outer membrane of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **J Proteome Res** 4, 1330-8

Schmitt, S., Ahting, U., Eichacker, L., **Granvogl, B.**, Go, N.E., Nargang, F.E., Neupert, W. and Nussberger, S. (2005). Role of Tom5 in maintaining the structural stability of the TOM complex of mitochondria. **J Biol Chem** 280, 14499-506

Komenda, J., Reisinger, V., Muller, B.C., Dobakova, M., **Granvogl, B.** and Eichacker, L.A. (2004). Accumulation of the D2 protein is a key regulatory step for assembly of the photosystem II reaction center complex in *Synechocystis* PCC 6803. **J Biol Chem** 279, 48620-9

Eichacker, L.A., **Granvogl, B.**, Mirus, O., Muller, B.C., Miess, C. and Schleiff, E. (2004). Hiding behind hydrophobicity. Transmembrane segments in mass spectrometry. **J Biol Chem** 279, 50915-22



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Trennung nativer Proteinkomplexe über 2D BN/SDS-PAGE.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>LHCP .....</i>	<i>1</i>
1.3	<i>Detektierbarkeit von Peptiden.....</i>	<i>2</i>
1.4	<i>In-Gel Verdau von Proteinen .....</i>	<i>3</i>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
2.1	<i>Membranproteine .....</i>	<i>5</i>
2.2	<i>Photosynthese .....</i>	<i>8</i>
2.3	<i>Proteinkomplexe der Thylakoidmembran.....</i>	<i>10</i>
2.3.1	<i>Photosystem II.....</i>	<i>10</i>
2.3.2	<i>Chlorophyll-<i>a,b</i>-bindende Proteine von PSII.....</i>	<i>12</i>
2.3.2.1	<i>Die majoren LHCP .....</i>	<i>13</i>
2.3.2.2	<i>Die minoren LHCP und PsbS.....</i>	<i>15</i>
2.4	<i>Techniken zur massenspektrometrischen Analyse von Pflanzenproteomen.....</i>	<i>16</i>
2.4.1	<i>Flüssigkeitschromatographie von intakten Proteinen.....</i>	<i>18</i>
2.4.2	<i>2D-Gelelektrophorese .....</i>	<i>19</i>
2.4.2.1	<i>Isoelektrische Fokussierung .....</i>	<i>19</i>
2.4.2.2	<i>Blue Native-PAGE .....</i>	<i>20</i>
2.4.3	<i>“Shotgun”-Proteomics .....</i>	<i>20</i>
2.4.4	<i>In-Gel Verdau von Proteinen nach elektrophoretischer Trennung.....</i>	<i>21</i>
2.4.4.1	<i>Visualisierung von Proteinen im Gel.....</i>	<i>23</i>
2.4.4.2	<i>Verdau der Proteine .....</i>	<i>23</i>
2.4.4.3	<i>Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix.....</i>	<i>25</i>
2.4.4.4	<i>Entsalzung und Konzentrierung der Peptidlösung.....</i>	<i>25</i>
2.5	<i>Massenspektrometrische Analyse von Proteinkomplexen der Thylakoidmembran .....</i>	<i>26</i>
2.5.1	<i>Die Untereinheiten von PSII.....</i>	<i>26</i>
2.5.2	<i>Die LHCP.....</i>	<i>28</i>
<b>3</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Allgemeiner Teil zur Massenspektrometrie .....</b>	<b>30</b>
4.1	<i>ESI-Massenspektrometrie.....</i>	<i>30</i>
4.1.1	<i>ES-Prozess .....</i>	<i>30</i>
4.1.2	<i>Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie .....</i>	<i>32</i>

4.1.3	<b>Auswertung von MSMS-Spektren .....</b>	<b>33</b>
4.1.3.1	<i>Auflösung einzelner Peptidsignale .....</i>	<i>33</i>
4.1.3.2	<i>Isotopenverteilung .....</i>	<i>34</i>
4.1.3.3	<i>Nomenklatur der Fragmentionen .....</i>	<i>36</i>
4.1.3.4	<i>Der Fragmentierungsprozess .....</i>	<i>37</i>
4.1.3.5	<i>Berechnung der AS-Sequenz von Peptiden.....</i>	<i>39</i>
4.2	<b>Aminosäure Modifikationen.....</b>	<b>41</b>
4.2.1	<b>Oxidationsreaktionen .....</b>	<b>41</b>
4.2.1.1	<i>Oxidierbare AS .....</i>	<i>41</i>
4.2.1.2	<i>Rolle der Oxidation von AS bei der Detektierbarkeit von Transmembranhelices.....</i>	<i>43</i>
4.2.2	<b>Modifikation der AS Cystein .....</b>	<b>44</b>
5	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>46</b>
5.1	<b>Isolation von Thylakoidmembranen .....</b>	<b>46</b>
5.2	<b>Gelelektrophorese.....</b>	<b>46</b>
5.2.1	<b>Blau-Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE).....</b>	<b>46</b>
5.2.2	<b>Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....</b>	<b>47</b>
5.2.2.1	<i>Die SDS-Gelelektrophorese als 2. Dimension der 2D-PAGE.....</i>	<i>47</i>
5.2.2.2	<i>Trennung von Standardproteinen über SDS-PAGE .....</i>	<i>48</i>
5.3	<b>Proteinfärbungen .....</b>	<b>49</b>
5.3.1	<b>CBB-Färbung .....</b>	<b>49</b>
5.3.2	<b>Entfärbung von CBB-gefärbten Gelbanden.....</b>	<b>49</b>
5.3.3	<b>Silberfärbung .....</b>	<b>49</b>
5.3.4	<b>Entfärbung von silbergefärbten Gelbanden.....</b>	<b>50</b>
5.3.5	<b>Markierung von Proteinen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 .....</b>	<b>50</b>
5.4	<b>Extraktion ganzer Proteine aus Polyacrylamidgelen .....</b>	<b>51</b>
5.4.1	<b>Passive Elution von fixierten Proteinen nach CBB-Färbung .....</b>	<b>51</b>
5.4.2	<b>Relative Quantifizierung der Proteinmengen mittels Bildanalyse.....</b>	<b>52</b>
5.4.3	<b>Extraktion von Proteinen aus SDS-Gelen mit FAPH.....</b>	<b>52</b>
5.4.4	<b>Extraktion niedermolekularer Proteine aus BN-Gelen.....</b>	<b>53</b>
5.5	<b>In-Gel Verdau.....</b>	<b>54</b>
5.5.1	<b>Konventioneller In-Gel Verdau von Proteinen.....</b>	<b>54</b>
5.5.2	<b>In-Gel Verdau von Proteinen mit OMX-S<sup>®</sup> .....</b>	<b>55</b>
5.6	<b>Massenspektrometrische Quantifizierung von Proteinen über die Einführung stabiler Isotope.....</b>	<b>57</b>
5.6.1	<b>Acetylierung von Peptiden auf einer C<sub>18</sub>-Mikrosäule .....</b>	<b>58</b>
5.6.2	<b>Präparation von Peptiden als interner Standard zur Quantifizierung ..</b>	<b>59</b>



5.6.3	<b>Quantitative Analyse der Teilschritte des In-Gel Verdauprozesses über die Einführung stabiler Isotope</b> .....	<b>60</b>
5.6.3.1	<i>Entfärbung von Proteinbanden</i> .....	60
5.6.3.2	<i>Reduktion und Alkylierung der Proteine</i> .....	60
5.6.3.3	<i>Verdauzeit</i> .....	60
5.6.3.4	<i>Absolute Quantifizierung der Autolyse von Trypsin</i> .....	61
5.7	<b>Quantifizierung von Proteinen über die Sequenzabdeckung</b> .....	<b>61</b>
5.8	<b>Modifikationen von Aminosäuren</b> .....	<b>62</b>
5.8.1	<b>Oxidation von Aminosäuren</b> .....	<b>62</b>
5.9	<b>Massenspektrometrie</b> .....	<b>63</b>
5.9.1	<b>Offline ESI-MS</b> .....	<b>63</b>
5.9.1.1	<i>Entsalzung und Konzentrierung der Peptidlösung vor der massenspektrometrischen Analyse</i> .....	63
5.9.1.2	<i>Beladung der ES-Quelle</i> .....	63
5.9.1.3	<i>MS- und MSMS-Messung</i> .....	63
5.9.2	<b>LC-ESI-MS</b> .....	<b>65</b>
5.9.2.1	<i>Probenvorbereitung für LC-MS</i> .....	65
5.9.2.2	<i>NanoLC-MS-Messung</i> .....	65
5.9.3	<b>Kalibrierung des MS</b> .....	<b>66</b>
5.9.3.1	<i>Externe Kalibrierung</i> .....	66
5.9.3.2	<i>Interne Kalibrierung</i> .....	67
5.10	<b>Datenauswertung</b> .....	<b>67</b>
5.10.1	<b>Identifikation von Proteinen über die Datenbanken</b> .....	<b>67</b>
5.10.2	<b>Berechnung der Hydrophobizität</b> .....	<b>69</b>
5.10.3	<b>Berechnung der Sequenzabdeckung</b> .....	<b>69</b>
6	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>70</b>
6.1	<b>Zweidimensionale Gelelektrophorese</b> .....	<b>70</b>
6.1.1	<b>Charakteristisches Proteinmuster nach Trennung nativer Proteinkomplexe der Thylakoidmembran über 2D BN/SDS-PAGE</b> .....	<b>70</b>
6.1.1.1	<i>„Freie“ Proteine</i> .....	72
6.1.1.2	<i>Komplexe des Photosystem I</i> .....	72
6.1.1.3	<i>Komplexe des Photosystem II</i> .....	75
6.1.2	<b>Passive Elution von Proteinen aus SDS-Gelen</b> .....	<b>76</b>
6.1.3	<b>Massenspektrometrische Analyse niedermolekularer Proteine</b> .....	<b>80</b>
6.1.3.1	<i>Cytochrom <math>b_{559}</math> (<math>\alpha</math>- und <math>\beta</math>-Untereinheit)</i> .....	82
6.1.3.2	<i>PsbI</i> .....	83
6.1.3.3	<i>PsbK</i> .....	83
6.1.3.4	<i>PsbL</i> .....	83

6.1.3.5	<i>PsbM</i> .....	84
6.1.3.6	<i>PsbTc</i> .....	84
6.1.3.7	<i>PsbX</i> .....	85
6.1.4	<b>Niedermolekulare UEn aus PSI</b> .....	<b>87</b>
6.1.5	<b>LHCII</b> .....	<b>87</b>
6.2	<b><i>Unterscheidung von Lhcb1-3</i></b> .....	<b>90</b>
6.3	<b><i>Unterscheidung von CP29 und CP26</i></b> .....	<b>92</b>
6.4	<b><i>Detektierbarkeit tryptischer Peptide aus löslichen und membranintegralen Proteinen mittels nanoESI-MS</i></b> .....	<b>93</b>
6.4.1	<b>Einfluss bestimmter AS auf die Detektierbarkeit von Peptiden</b> .....	<b>94</b>
6.4.1.1	<i>Vergleich der AS-Zusammensetzung nicht detektierter und detektierter tryptischer Peptide der RCP</i> .....	94
6.4.1.2	<i>Vergleich der AS-Zusammensetzung tryptischer, membranintegraler Peptide und detektierter Peptide der RCP</i> .....	96
6.4.2	<b>Lage der detektierten Peptide im Protein</b> .....	<b>97</b>
6.4.3	<b>Statistische Analyse der Detektierbarkeit von Peptiden aus löslichen und membranintegralen Proteinen</b> .....	<b>98</b>
6.4.4	<b>Einfluss von Sequenzlänge und Hydrophobizität auf die Detektion von Peptiden aus <math>\alpha</math>-helicalen Membranproteinen</b> .....	<b>100</b>
6.4.4.1	<i>Sequenzlänge</i> .....	100
6.4.4.2	<i>Hydrophobizität</i> .....	101
6.4.4.3	<i>Sequenzlänge und Hydrophobizität</i> .....	101
6.4.5	<b>Herabsetzung der Hydrophobizität durch AS-Oxidation</b> .....	<b>102</b>
6.4.5.1	<i>Quantitative Oxidation der AS Methionin</i> .....	102
6.4.5.2	<i>Reduktion der Hydrophobizität nach Oxidation von AS</i> .....	106
6.4.5.3	<i>Detektion von Transmembranpeptiden nach Modifikation der AS Methionin</i> .....	108
6.5	<b><i>Quantifizierung von Proteinen über Modifikation von primären Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid auf einer Mikrosäule</i></b> .....	<b>109</b>
6.6	<b><i>Optimierung des In-Gel Verdauprozesses</i></b> .....	<b>112</b>
6.6.1	<b>Entfärbung von Proteinen</b> .....	<b>112</b>
6.6.2	<b>Reduktion &amp; Alkylierung der Cysteine</b> .....	<b>115</b>
6.6.3	<b>In-Gel Verdau</b> .....	<b>118</b>
6.6.3.1	<i>Effizienz der Absorption von Trypsin von der Gelmatrix</i> .....	118
6.6.3.2	<i>Abhängigkeit der Enzymreaktion von Konzentration und Temperatur</i> .....	121
6.6.4	<b>Multiple Extraktionsschritte</b> .....	<b>123</b>
6.6.5	<b>Validierung des OVP an Membranproteinen von PSII</b> .....	<b>125</b>

<b>7</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>127</b>
7.1	<i>Im monomeren und dimeren PSII-Subkomplex nicht detektierte niedermolekulare UEn</i> .....	127
7.2	<i>PsbL, PsbM, PsbTc – Notwendig zur Dimerisierung von PSII?</i> .....	129
7.3	<i>Isoformen von Lhcb1</i> .....	130
7.4	<i>Problematik der Detektierbarkeit von membranintegralen Peptiden und Proteinen</i> .....	131
7.4.1	<b>Erfolgreiche Detektion von TMD in der Literatur</b> .....	131
7.4.2	<b>Möglichkeiten zur Detektion von membranintegralen Peptiden</b> .....	132
7.4.3	<b>Gründe für das Fehlen von Peptiden im (offline) ESI-MS</b> .....	133
7.4.3.1	<i>Signalunterdrückung durch störende Ionen</i> .....	134
7.4.3.2	<i>Detektierbarkeit von Ionen in Abhängigkeit von der Gasphasenbasizität des bei der Vernebelung verwendeten Lösungsmittels</i> .....	134
7.4.3.3	<i>Mangel an Ladungsträgern</i> .....	135
7.4.3.4	<i>Aggregation der Peptide aufgrund hydrophober Eigenschaften..</i>	136
7.5	<i>Löslichkeit von hydrophoben MP in organischen Lösungsmitteln</i> ...	138
7.5.1	<b>Chloroform/Methanol Extraktion von Membranproteinen</b> .....	138
7.5.2	<b>Acetonfällung</b> .....	139
7.6	<i>Quantifizierung von Proteinen</i> .....	140
7.6.1	<b>Quantifizierung von Proteinen im Gel nach CBB-Färbung</b> .....	140
7.6.2	<b>Limitierung des Quantifizierungsansatzes mit Essigsäureanhydrid</b> ....	141
7.7	<i>In-Gel Verdau</i> .....	142
7.7.1	<b>Kompatibilität von CBB- und Silberfärbung mit der MS-Analyse von Peptiden und Proteinen</b> .....	142
7.7.1.1	<i>Entfärbung von CBB gefärbten Proteinbanden</i> .....	143
7.7.1.2	<i>Verminderte Detektion von Peptiden nach Silberfärbung</i> .....	144
7.7.2	<b>Reduktion und Alkylierung von Proteinen im Elektrophoresegel</b> .....	146
7.7.3	<b>Zeitbedarf für den In-Gel Verdauprozess – Theorie und Praxis</b> .....	147
7.7.4	<b>Zusätzliche Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix</b> .....	149
7.7.5	<b>Detektionsgrenzen</b> .....	150
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>152</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>175</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>176</b>

## Abkürzungen

Ag	Silber
AS	Aminosäure
ACN	Acetonitril
Acc.-Nr.	Proteinidentifikationsnummer ( <i>accession number</i> )
amu	<i>atomic mass unit</i> ; 1 amu = 1.6605 x 10 <sup>-27</sup> kg = 1 Da = m (H <sup>+</sup> )
BN-PAGE	Blau-Native Polyacrylamidgelelektrophorese
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Chl	Chlorophyll
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
DTT	Dithiothreitol
ES(I)	Electrospray (Ionisation)
FA	Ameisensäure ( <i>Formic Acid</i> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GB	Gasphasenbasizität
GRAVY-Index	<i>Grand average of hydrophobicity</i> , Wert für die Hydrophibizität eines Proteins/Peptids
HOAc	Essigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
LC	<i>liquid chromatographie</i> , Flüssigkeitschromatographie
LHCI	Chlorophyll <i>a/b</i> -bindender Lichtsammelkomplex von PSI
LHCII	Chlorophyll <i>a/b</i> -bindender Lichtsammelkomplex von PSII
MALDI-MS	<b>M</b> atrix <b>A</b> ssociated <b>L</b> aserdesorptions <b>I</b> onisations-Massenspektrometrie
MetO	Methionin-Sulfoxid
MetO <sub>2</sub>	Methionin-Sulfon
MM	Molekularmasse
MP	Membranproteine
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
nanoES	Nano Elektrospray
n.d.	nicht detektiert

OD	optische Dichte
OEC	Wasserspaltender Apparat ( <i>oxygen evolving complex</i> )
OVP	optimiertes Verdauprotokoll in OMX-S®
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PFA	<i>performic acid</i> (Perameisensäure)
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
R&A	Reduktion und Alkylierung (der AS Cystein)
RC(II)	Reaktionszentrum (von Photosystem II)
RC47	RCII im Komplex mit dem inneren Antennenprotein CP47
RCII-Kernkomplex	RCII + innere Antennen + niedermolekulare UEn
RG	Reaktionsgefäß
RP	<i>Reversed phase</i> , Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TOF	<i>Time Of Flight</i> Flugzeitmassenanalysator
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
TMD	Transmembrandomäne
U/min	Umdrehungen pro Minute
UE(n)	Untereinheit(en)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x*g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

Drei und ein Buchstabencode für die 20 natürlichen AS: Alanin (Ala, A), Asparagin (Asn, N), Aspartat (Asp, D), Arginin (Arg, R), Cystein (Cys, C), Glycin (Gly, G), Histidin (His, H), Glutamat (Glu, E), Glutamin (Gln, Q), Isoleucin (Ile, I), Leucin (Leu, L) Lysin (Lys, K), Methionin (Met, M), Phenylalanin (Phe, F), Prolin (Pro, P), Serin (Ser, S), Threonin (Thr, T), Tyrosin (Tyr, Y), Tryptophan (Trp, W), Valin (Val, V)

In dieser Arbeit sind Begriffe aus dem Englischen enthalten, für die im wissenschaftlichen Sprachgebrauch im Deutschen keine sinngemäße Übersetzung existiert; diese Begriffe sind kursiv geschrieben.



# 1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der massenspektrometrischen Analyse von Membranproteinen (MP). Die Isolation und sensitive Detektion von MP ist aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften ein häufiges Problem in der Proteinbiochemie. Zum Studium der Eigenschaften membranintegrativer Proteine und Peptide stellte die Thylakoidmembran ein ideales Modellsystem dar. Die Untersuchungen wurden an Gerste (*Hordeum vulgare*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) durchgeführt.

## 1.1 Trennung nativer Proteinkomplexe über 2D BN/SDS-PAGE

Die Isolation der zum Teil extrem hydrophoben Membranproteine (MP) erfolgte über hochauflösende 2D-Blue Native (BN)/SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Das Gelsystem erlaubte die Trennung der Proteinkomplexe PSI/LHCI, PSII, Cytochrom *b<sub>6</sub>/f* und ATPase in unterschiedlichen Assemblierungszuständen. Die Charakterisierung der Proteinkomplexe erfolgte über die Identifikation ihrer Untereinheiten (UEn) nach enzymatischem Verdau mittels Massenspektrometrie (*offline* nanoESI-MS/MS). Dabei wurden MP > 10 kDa ausschließlich über ihre löslichen Abschnitte identifiziert. Die Identifikation der niedermolekularen Untereinheiten (< 10 kDa) wurde auf Ebene des Gesamtproteins nach Extraktion aus den Komplexbanden der BN-PAGE erreicht. Von PSI konnten beide niedermolekularen UEn (PsaI und PsaJ) im PSI/LHCI-Komplex nachgewiesen werden. Dem mono- und dimeren PSII-Subkomplex wurden folgende niedermolekularen UEn zugeordnet: PsbE, PsbF, PsbI, PsbK, PsbL, PsbM, PsbTc und PsbX. Da in der Zusammensetzung des mono- und dimeren PSII-Subkomplexes kein Unterschied existierte, konnte eine Beteiligung einer der niedermolekularen UEn an der Ausbildung des dimeren PSII-Subkomplexes im Rahmen der Assemblierung nicht bestätigt werden.

## 1.2 LHCP

Die Lichtsammelproteine (LHCP) des LHCII wurden nach 2D BN/SDS-PAGE auf Ebene der Superkomplexe oder abgetrennt als Mono- und Trimerer LHCII-Subkomplex identifiziert. Letztere unterschieden sich durch die minoren LHCP (CP29, CP26 und CP24), die beim trimeren LHCII-Komplex fehlten. Trotz dreier Transmembrandomänen (TMD) waren die LHCP deutlich hydrophiler als die Proteine des Reaktionszentrums. Die benötigte Hydrophobizität zur Durchspannung der Thylakoidmembran erhielten die LHCP durch die Bindung von Pigmenten (Chlorophyll). Trotz der hohen Sequenzhomologie war eine eindeutige Unterscheidung der maturen Genprodukte von *Lhcb1-3* anhand eines

charakteristischen Peptids innerhalb der N-terminalen 25 AS möglich. In Gerste wurde somit jeweils eine Form von Lhcb2 und 3, sowie sechs Isoformen von Lhcb1 identifiziert.

### **1.3 Detektierbarkeit von Peptiden**

Um das Fehlen von membranintegralen Peptiden in den Spektren zu erklären, wurde die Detektierbarkeit von tryptischen Peptiden mittels *offline* ESI-MS in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie Aminosäurezusammensetzung, Ionisierung, Sequenzlänge, Hydrophobizität und Lage der Peptide im Protein untersucht.

Lediglich ein Teil, der theoretisch zu erwartenden Peptide wurde bei der MS-Analyse in den Spektren detektiert. Dabei wurde eine direkte Korrelation zwischen der Proteinmenge einer Bande und der Anzahl der nach Verdau detektierten Peptide festgestellt. Ein signifikanter Einfluss bestimmter AS auf die Signalintensität oder die Detektierbarkeit eines Peptids wurde nicht festgestellt. Durch die erfolgreiche Detektion extrem hydrophober, niedermolekularer Proteine wurde ebenfalls gezeigt, dass die Detektierbarkeit von hydrophoben Molekülen kein Problem der Ionisierung darstellt.

Die Detektierbarkeit eines Peptids war abhängig von seiner Sequenzlänge. Dabei wurde festgestellt dass Peptide zwischen 9 und 14 AS statistisch am häufigsten detektiert wurden. Während etwa die Hälfte aller theoretisch entstehenden tryptischen Peptide aus löslichen und membranintegralen Proteinen unter 20 AS detektiert wurden, lag der Wert für Peptide mit einer Sequenzlänge > 20 AS nur noch bei ca. 5%. Da eine  $\alpha$ -helicale TMD aus mindestens 20 AS bestand, war die Wahrscheinlichkeit ein membranintegrales Peptid zu detektieren folglich extrem gering. Im Durchschnitt waren nicht detektierte Peptide zudem hydrophober als detektierte Peptide. Bei genauer Betrachtung der Einzelergebnisse wurde jedoch deutlich, dass vor allem extrem kurze und hydrophile bzw. lange und hydrophobe Peptide nicht detektiert wurden. Die Daten deuteten auf eine Verknüpfung von Sequenzlänge und Hydrophobizität hin. Danach stieg die durchschnittliche Hydrophobizität tryptischer Peptide mit zunehmender Sequenzlänge an. Dieser Trend ließ sich von den Proteinen der Thylakoidmembran auf das gesamte Proteom von *A. thaliana* übertragen.

Die Herabsetzung der Hydrophobizität eines Peptids wurde durch die Oxidation der Aminosäure (AS) Methionin erreicht. Bei Verwendung von Perameisensäure (PFA) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde Methionin selektiv und quantitativ zu Methioninsulfoxid oxidiert. Der Einfluss der Oxidation auf die hydrophoben Eigenschaften eines Peptids wurde anhand seiner chromatographischen Eigenschaften ermittelt. Hierbei war eine Korrelation von Peptidlänge und der Verschiebung der Retentionszeit hin zu einem früheren Zeitpunkt erkennbar. Kurze



Peptide waren somit von der Oxidation stärker betroffen als lange. Überdies wirkte sich die Modifikation erwartungsgemäß bei hydrophilen Peptide geringer aus als bei Hydrophoben. Die Detektion von membranintegralen Peptiden nach Reduktion der Hydrophobizität durch die Oxidation der enthaltenen Methionine war jedoch lediglich in Einzelfällen möglich.

Eine entscheidende Rolle für die Detektierbarkeit von tryptischen Peptiden spielte die Zugänglichkeit der Schnittstellen für die Protease. Dieser Umstand erklärte, warum hydrophobe niedermolekulare Proteine, die ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie membranintegrale Peptide besaßen, nach Extraktion gut detektierbar waren. Die sterische Blockade der Schnittstellen könnte ihre Ursache in der unzureichenden Denaturierung der Sekundärstruktur bzw. der Aggregation der hydrophoben Abschnitte im Rahmen der Probenaufarbeitung haben.

### ***1.4 In-Gel Verdau von Proteinen***

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für den In-Gel Verdau von Proteinen nach SDS- PAGE ein Reaktionsgefäß (RG) aus Polypropylen entwickelt. Das RG, mit dem Namen OMX-S<sup>®</sup>, stellt ein einfaches Werkzeug dar, um den Prozess des In-Gel Verdaus zu vereinfachen und zu standardisieren. Das Risiko der Kontamination mit Keratin wurde dabei minimiert. Im Zuge der Anpassung des konventionellen Protokolls zum In-Gel Verdau von Proteinen für OMX-S<sup>®</sup> wurde ein optimiertes Verdauprotokoll (OVP) entwickelt. Der konventionelle In-Gel Verdau besteht aus den Reaktionsschritten Entfärbung, Reduktion & Alkylierung der AS Cystein (Cys), enzymatischer Spaltung der Proteine, sowie (mehrfacher) Extraktion der entstandenen Peptide. Der Einfluss dieser Einzelschritte auf Qualität und Quantität der entstehenden Peptide wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Die Entfärbung der Proteinbanden brachte keine Verbesserung der Peptidausbeute nach In-Gel Verdau. Dies galt sowohl für CBB als auch für silbergefärbte Proteinbanden. Eine Reduktion & Alkylierung der Cysteine zum Carboxyamidomethylcystein war lediglich bei Proteinen mit einem hohen Gehalt an Disulfidbrücken sinnvoll. Generell waren cysteinhaltige Peptide auch ohne R&A als Addukte von Acrylamid bzw.  $\beta$ -Mercaptoethanol detektierbar. Eine einheitliche Modifikation der AS Cys, sowie eine optimale Ausbeute an Peptiden wurde lediglich bei Entkopplung des Prozesses vom In-Gel Verdau und Durchführung der R&A vor der PAGE erreicht. Der frühe Alkylierungszeitpunkt verhinderte die teilweise Rückfaltung der Proteine bei der elektrophoretischen Trennung und ermöglichte damit eine optimale Zugänglichkeit der Schnittstellen für die Protease während des In-Gel Verdaus. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50°C und die Verkürzung der Diffusionsstrecke für die Protease

fürten zu einer deutlichen Erhöhung der Effizienz des Verdauprozesses. Die Reduktion der Inkubationszeit von 3-12 h auf 45 min führte zu einem Anstieg fehlgeschnittener Peptide durch Auslassung eng beieinander liegender Schnittstellen. Gleichzeitig stieg jedoch die Sequenzabdeckung, da die Detektion kurzer Peptide ( $< 5$  AS) ausschließlich auf der Basis der nicht berücksichtigten Schnittstelle im Verbund mit einem längeren Peptid möglich war. Die Durchführung zusätzlicher Extraktionsschritte nach Abschluss des Verdauprozesses erhöhte die Peptidausbeute um ca. 10%. Unterschiede in der Peptidzusammensetzung bei Durchführung einer basischen bzw. sauren Extraktion wurden nicht beobachtet.

Mit OMX-S<sup>®</sup> wurde die gesamte Prozesszeit für den In-Gel Verdau von etwa 24 h auf 1 h verkürzt. Die Peptidausbeuten waren im Vergleich zum konventionellen In-Gel Verdau besser oder mindestens äquivalent. Da jeder Prozessierungsschritt eine potentielle Quelle für Verluste darstellte, wirkte sich die Reduktion der Einzelschritte positiv auf die Peptidausbeute aus. Das neue Verfahren erwies sich als geeignet für lösliche und für membranintegrale Proteine.

## 2 Einleitung

### 2.1 Membranproteine

Etwa 30% aller Gene codieren für Membranproteine (MP) (Wallin et al., 1998; Krogh et al., 2001). Die Analyse des Gesamtproteoms von *A. thaliana*, mit dem Vorhersageprogramm TMHMM ergibt, dass etwa 18% aller Proteine mindestens eine Transmembrandomäne (TMD) besitzen (Eichacker et al., 2004). Für das Proteom des Chloroplasten werden in *A. thaliana* etwa 520 MP vorhergesagt (Peltier et al., 2004). Bei einer geschätzten Zahl von 2000-5000 Proteinen entspricht dies einem Anteil von 10-26%. Gerade im pharmazeutischen Bereich sind diese Proteine besonders interessant, da die meisten der heutzutage eingesetzten Medikamente auf MP wirken (Stevens et al., 1999). Trotz der hohen Relevanz der MP bleibt ihre Charakterisierung aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften schwierig. Studien über die Struktur der MP werden zudem häufig erschwert, durch Probleme bei der Überexpression und Kristallisation.

Grundsätzlich besteht eine TMD aus einer bestimmten Anzahl ungeladener und häufig hydrophober Aminosäuren (AS) (von Heijne, 1981). TMD sind ebenso hydrophob wie die Lipidschicht in die sie eingebettet sind. Ihr hydrophober Charakter garantiert eine stabile Positionierung innerhalb der Lipidschicht, da der Übergang von der Lipid- in die wässrige Phase energetisch extrem ungünstig ist. Der durchschnittliche  $\Delta G$ -Wert für den Übergang einer Transmembranhelix aus einem polytopischen Protein in die wässrige Phase beträgt ca. +40 kcal/mol; für TMD aus Proteinen mit nur einer Helix liegt der Wert um ca. 10 kcal/mol höher. Der entscheidende Faktor für die Stabilisierung und Anordnung einer Helix scheint hierbei weniger die Abschirmung von polaren AS, als vielmehr die Maximierung der van der Waals Kräfte zwischen den beteiligten AS und den umgebenden Lipiden zu sein (Stevens et al., 1999).

Transmembrane Strukturen können in drei Kategorien unterteilt werden:  $\beta$ -Faltblatt-Proteine,  $\alpha$ -helicale Proteine mit einer TMD (bitopische Proteine) und  $\alpha$ -helicale Proteine mit mehreren TMD, auch als Helixbündel bezeichnet (polytopische Proteine). Gemessen an der Gesamtzahl der  $\alpha$ -helicalen Proteine liegt der Anteil der bitopischen Vertreter, mit etwa 56%, etwas über dem der Polytopischen (Arkin et al., 1998). Die  $\beta$ -Faltblattstruktur kommt durch Wasserstoffbrückenbildung zwischen benachbarten Sequenzabschnitten des Proteins zustande. Zusammen bilden diese eine membrandurchspannende Pore aus. Das Faltblatt besteht dabei aus einer alternierenden Anordnung polarer und unpolarer AS. Diese sind

analog zu ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften entweder zum hydrophilen Innenraum der Pore oder zur hydrophoben Lipidschicht ausgerichtet. Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung aus hydrophilen und hydrophoben AS ist die Gesamthydrophobizität dieser Proteine im Vergleich zu den  $\alpha$ -helicalen MP deutlich geringer (Braun et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeichnet sich die  $\alpha$ -Helix durch überwiegend unpolare AS aus, die als hydrophobe „Schraube“ die Membran durchspannen. Ihre Struktur kommt aufgrund von Wasserstoffbrücken innerhalb der Polypeptidkette zustande. Dabei stehen die AS-Seitenketten nach außen, wo sie mit benachbarten Helices der Polypeptidkette bzw. den Membranlipiden interagieren können.

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich ausschließlich mit  $\alpha$ -helicalen MP, da innerhalb der Proteine der Thylakoidmembran, die in dieser Arbeit experimentell untersucht wurden, keine  $\beta$ -Faltblatt-Proteine vorkommen. Mit Ausnahme von sehr polaren AS, ist die AS-Zusammensetzung der  $\alpha$ -Helices in bi- und polytopischen Proteinen ähnlich (Arkin et al., 1998). Der Anteil polarer AS ist in Proteinen mit mehreren Transmembranhelices im Vergleich höher. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in einem Helixbündel die polaren AS zur Lipidschicht hin abgeschirmt werden können und außerdem eine größere Anzahl polarer Aminosäuren im Bereich der Intermembransequenzen benötigt werden. Die meisten AS nehmen innerhalb der Helix keine bestimmte Position ein. Ausnahmen bilden lediglich die aromatischen AS, sowie die AS Gly und Ala (Arkin et al., 1998; Liu et al., 2002). Die aromatischen AS befinden sich bevorzugt an der Stelle, an der die Polypeptidkette in die Membran übergeht, wo sie in Wechselwirkung mit Membranoberfläche treten. Gly und Ala sind häufig im Kern der Helix akkumuliert. Glycin gilt wie Prolin als Helix-Brecher, ist jedoch trotzdem häufig innerhalb der TMD zu finden. Glycine sind bevorzugt in einem Abstand von 4 AS (eine Ganghöhe) in der Helix zu finden. Damit sind sie auf der gleichen Seite der  $\alpha$ -Helix lokalisiert. Im Gegensatz dazu gilt Ala als starker Helix-Bildner. Aufgrund ihrer kurzen Seitenketten spielen Gly und Ala eine wichtige Rolle bei einer engen räumlichen Anordnung der Helices.

Membranproteine aus dem endoplasmatischen Reticulum, Golgi-Apparat, der inneren Mitochondrienmembran der Thylakoidmembran eukaryotischer Organismen folgen generell der *positive-inside* Regel (von Heijne et al., 1988). Diese besagt, dass positiv geladene AS 2-4 Mal häufiger auf der cytoplasmatischen (stromalen) und damit DNA enthaltenden Seite der Membran auftreten, als in den translozierten (lumenalen) Bereichen der Polypeptidkette. Aminosäuren mit positiven Ladungen (Lys, Arg) sind somit verantwortlich für die richtige Orientierung der Transmembranhelices während der Insertion in die Membran. Die Regel gilt

für kurze lösliche Abschnitte (<100 AS) und damit für einen Großteil der Intermembransequenzen von MP.

Aus energetischen Gründen sind geladene Aminosäuren verhältnismäßig selten innerhalb einer  $\alpha$ -helicalen TMD zu finden (Engelman et al., 1986). Es sollte zumindest davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit einer geladenen AS innerhalb der Transmembranregion durch eine benachbart situierte AS mit entgegengesetzter Ladung oder durch die Bindung eines Cofaktors (z. B. Chlorophyll) neutralisiert wird. Eine intrahelicale Ionenbindung kann allerdings erheblich zur Stabilisierung der Transmembranhelices beitragen. In der Endregion der Transmembranhelix können ebenfalls positiv geladene AS wie Lys und Arg positioniert sein, die über den sogenannten „Snorkel“-Effekt zur Positionierung der Helix in der Lipidschicht beitragen. Grundlage hierfür sind die flexiblen, aliphatischen Seitenketten von Lys und Arg, die jeweils in einer positiv geladene Amino- bzw. Guanidinium-Gruppe enden. Der hydrophobe Anteil der AS-Seitenkette liegt somit in der hydrophoben Matrix der Lipidphase, wobei die Ladung zum umgebenden wässrigen Milieu hin exponiert wird und mit den Kopfgruppen der Lipide interagieren kann.

Es ist allgemein bekannt, dass auch aromatische AS die Transmembranhelices in der Membran positionieren (Landolt-Marticorena et al., 1993; Samatey et al., 1995; Arkin et al., 1998). Über die Bildung von Wasserstoffbrücken kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Ringen und den Kopfgruppen der Lipide. Die bevorzugte Anordnung der aromatischen AS bestätigte sich auch in den MP des photosynthetischen Apparates (Deisenhofer et al., 1989). Als einzige Ausnahme findet sich die Aminosäure Phenylalanin aufgrund des hohen Hydrophobizitätswertes über die gesamte TMD verteilt.

Die Länge einer Transmembranhelix kann stark variieren. Sie ist abhängig von der Dicke der zu durchspannenden Lipidschicht und dem Neigungswinkel der Helix bezüglich der Membran. Die durchschnittliche Dicke einer Lipiddoppelschicht beträgt etwa 30 Å (Arkin et al., 1998). Bei der klassischen  $\alpha$ -Helix, die exakt senkrecht zur Lipiddoppelschicht steht werden bei 3,6 AS pro 360° und einer Ganghöhe von (1.5 Å/AS) werden 20 AS benötigt, um diese zu durchspannen. Die durchschnittliche Länge einer Transmembranhelix wird in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben. Angefangen bei 21-23 AS (Arkin et al., 1998), 26.4 AS (Bowie, 1997) reicht sie bis zu 27.1 AS (Ulmschneider et al., 2001). Die Kernregion der Helix ist dabei etwa 20 Å breit. Sie besteht zu fast 100% aus  $\alpha$ -helicaler Struktur. Die auf beiden Seiten anschließende Übergangsregion ist jeweils etwa 10 Å breit. Dabei nimmt der Anteil an helicaler Struktur ab (Granseth et al., 2005).

### **2.2 Photosynthese**

Die meisten Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien gehören zu den photoautotrophen Organismen. Sie sind in der Lage die Energie der Sonne, welche die Erde in Form von Lichtquanten erreicht, durch spezielle Pigmente zu absorbieren und enzymatisch in chemisch gebundene Energie umzuwandeln. Dieser Vorgang wird als Photosynthese bezeichnet und läuft in zwei Teilprozessen ab, die als Licht- und Dunkelreaktion bezeichnet werden.

Die Lichtreaktion findet in der Thylakoidmembran der Chloroplasten statt. Dabei wird Lichtenergie in chemisch nutzbare Energie umgewandelt. Die von den Photosystemen absorbierte Strahlungsenergie führt zur Separation energiereicher Elektronen, die über eine Energiekaskade entlang der Thylakoidmembran transportiert werden. Als Endakzeptor für die Elektronen dient das Reduktionsäquivalent  $\text{NADP}^+$ . Die beim Prozess freiwerdende Redoxenergie führt zum Transfer von Protonen ins Lumen und damit zur Bildung eines (elektro-chemischen) Potentialgradienten über der Thylakoidmembran. Bei der Rückführung der Protonen über die Thylakoidmembran ins Stroma wird der Energiespeicher ATP gebildet. Diese Form der ATP-Synthese wird als Photophosphorylierung bezeichnet. Die fehlenden Elektronen werden aus der Spaltung von Wasser ersetzt. Dabei werden außerdem molekularer Sauerstoff und Protonen ( $\text{H}^+$ ) freigesetzt. Letztere tragen ebenfalls zum Aufbau und Erhalt des Protonengradienten bei.

Die Reduktions- und Energieäquivalente werden in der Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus), unter Einbindung von Kohlenstoff aus dem  $\text{CO}_2$  der Atmosphäre, zur Synthese von Kohlenhydraten und anderen organischen Verbindungen verwendet. Der Calvin-Zyklus findet im Stroma der Chloroplasten statt (Richter, 1996; Merchant et al., 2005; Nelson et al., 2004; Nelson et al., 2006).

In Grünalgen und höheren Pflanzen findet die Photosynthese in speziellen Zellorganellen meristematischer Gewebe statt, den Chloroplasten. Chloroplasten sind semiautotrophe, endosymbiontische Organellen der photosynthetisch aktiven Pflanzenzelle. Sie gehören zu den Plastiden, welche einst eigenständige prokaryotische Organismen (Cyanobakterien) waren, die im Laufe der Evolution in Eukaryoten eingewandert sind. Die Hülle der Chloroplasten besteht folglich aus einer Doppelmembran, welche die Plastide vom Cytosol der Zelle abgrenzt. Plastiden besitzen eine eigene ringförmige DNA. Diese codiert mit etwa 100-120 Proteinen nur einen geringen Teil der geschätzten 2000-5000 plastidären Proteine höherer Pflanzen (Abdallah et al., 2000; Emanuelsson et al., 2000; Park, 2004). Alle verbleibenden plastidären Proteine werden im Zellkern codiert und nach der Translation im Cytoplasma oder am rauhen endoplasmatischen Reticulum über spezielle

Transportmechanismen in die Plastide importiert. Das Proteom der Thylakoide besteht aus integralen und peripheren Membranproteinen, sowie lumenalen Proteinen. Es umfasst insgesamt etwa 200 Proteine, die sich zu etwa gleichen Anteilen auf den photosynthetischen Apparat und das Thylakoidlumen aufgliedern (Wollman et al., 1999; Peltier et al., 2002; Kieselbach et al., 2003; Friso et al., 2004).

Die Chloroplasten sind durch die Thylakoide charakterisiert. Es gibt zwei Arten von Thylakoiden, die gestapelten Granathylakoide und die, als Verbindung zwischen den Stapeln dienenden Stromathylakoide. Die Thylakoidmembran grenzt den Thylakoidinnenraum (Lumen) gegen das die Thylakoide umgebende Stroma ab. Als Hypothese zur Charakterisierung der Evolution der Thylakoide wird angenommen, dass sie aus Einfaltungen der inneren Hüllmembran der Plastide entstanden sind, die als eigenständige Membranvesikel abgeschnürt wurden und damit im Inneren der Plastide ein separates, internes Kompartiment aufbauen konnten (Vothknecht et al., 2001).

Die photosynthetischen Proteinkomplexe sind ungleichmäßig über die Thylakoidmembran verteilt. Die Membranen der Granathylakoide enthalten vorwiegend Photosystem II (PSII) und dessen Lichtsammelkomplex (LHCII). Im Gegensatz dazu sind der PSI-Komplex (inklusive seiner peripheren Antennen) und die ATP-Synthase hauptsächlich in den Stromathylakoiden lokalisiert. Der Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex ist etwa gleich verteilt in beiden Formen der Thylakoidmembran zu finden (Allred et al., 1985; Albertsson, 2001). Die Verteilung der einzelnen Komplexe innerhalb der Photosynthesemembran hat verschiedene Gründe. Bei der ATP-Synthase mit der großen, stromaexponierten CF<sub>1</sub>-Untereinheit bedingt die Raumstruktur des Proteinkomplexes die Lage in der Photosynthesemembran. Die am PSI ablaufende Reduktion von NADP<sup>+</sup> setzt ebenfalls einen Kontakt mit dem Stroma voraus. Die räumliche Trennung der Photosysteme (> 10 nm) verhindert zudem den direkten Energietransfer von PSII auf PSI, der aufgrund des höheren Redoxpotentials von PSII erfolgen könnte, und dient damit der Bildung des photosynthetischen ΔpH-Gradienten unter Einbeziehung des Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplexes im linearen und zyklischen Elektronentransport (Trissl et al., 1993; Richter, 1996). Die beiden Photosysteme sind über lateral diffundierende Elektronenüberträger verbunden. Dabei transportiert Plastochinon die Elektronen vom PSII zum Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex; Plastocyanin fungiert als Elektronenüberträger zwischen dem Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex und dem PSI.

## 2.3 Proteinkomplexe der Thylakoidmembran

Die Thylakoidmembran von Chloroplasten in Grünalgen und höheren Pflanzen enthält insgesamt vier Multiproteinkomplexe, welche die oxygene Photosynthese durchführen. Der photosynthetische Apparat umfasst die Komplexe Photosystem I (PSI), Photosystem II, ATP-Synthase und Cytochrom *b<sub>6</sub>f*. Er besteht aus mindestens 100 peripheren und membranintegralen Proteinen (Wollman et al., 1999). PSI und PSII sind ähnlich aufgebaut. Beide besitzen ein Reaktionszentrum (RCI bzw. II), das von Lichtsammelproteinen (*light-harvesting-complex proteins*, LHCP) umgeben ist. Die Lichtenergie für die photosynthetische Reaktion wird dabei von Chromophoren (Chlorophylle und Carotinoide) absorbiert, die an die Proteine gebunden sind. Von den LHCP wird die Lichtenergie an die Reaktionszentren weitergeleitet. Im Unterschied zum Reaktionszentrum von PSI (RCI) ist am RCII zusätzlich der wasserspaltende Apparat (OEC) assoziiert.

Da sich diese Arbeit auf die Proteine des PSII bezieht wird auf die Komplexzusammensetzung von PSII und LHCII näher eingegangen. Übersichtsartikel mit weitergehenden Informationen zu den drei anderen Komplexen des Photosyntheseapparates in höheren Pflanzen (PSI, Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplex und der ATPase) finden sich in der Literatur (Nelson, 1976; Allred et al., 1986; Chitnis, 1996; Fromme, 1996; Scheller et al., 2001; Saenger et al., 2002; Hervas et al., 2003; Nelson et al., 2004; Melkozernov et al., 2005; Dekker et al., 2005).

### 2.3.1 Photosystem II

PSII ist einer der beiden photosynthetisch aktiven Pigment-Protein-Komplexe, der in der Thylakoidmembran von höheren Pflanzen, Algen und Cyanobakterien lokalisiert ist. Seine Aufgabe besteht in der Übertragung von Elektronen aus der Spaltung von Wasser auf den Kofaktor Plastochinon, welcher in reduzierter Form (Plastochinol, PQH<sub>2</sub>) den Komplex verlässt. Der Enzymkomplex besteht aus mindestens 25 Untereinheiten (UEn) und katalysiert die Übertragung von Elektronen aus Wasser zur Reduktion von Plastochinon. Die einzelnen Proteine sind zu drei funktionellen Einheiten zusammengefasst, dem RCII-Kernkomplex, dem Lichtsammelkomplex (LHCII) und dem Wasserspaltungsapparat (Hankamer et al., 1997; Rhee et al., 1998). Letzterer ist auf der lumenalen Seite der Thylakoidmembran lokalisiert und besteht aus den drei kerncodierten UEn (*PsbO*, *P* und *Q*).

Das Reaktionszentrum (RC, *reaction center*) besteht aus einem Heterodimer, das aus den Proteinen D1 (*psbA*) und D2 (*psbD*) gebildet wird (Nanba et al., 1987). Hier findet die Ladungstrennung und der Transfer der Elektronen auf den primären Akzeptor und



anschließend auf gebundenes Plastochinon statt (Barber, 2006). D1 und D2 bestehen aus jeweils fünf Transmembranhelices. Als Kofaktoren binden sie zusammen sechs Moleküle Chl<sub>a</sub>, zwei Moleküle Pheophytin und mindestens ein Molekül  $\beta$ -Karotin. Zusätzlich umfasst das RC die zwei Cytochrome, PsbE und PsbF, sowie die niedermolekularen UEn PsbI und PsbW (Szabo et al., 2001; Huber et al., 2004).

An das RC schließen sich die Chlorophyll-*a*-bindenden Proteine CP47 und CP43 an, die nach ihrer apparenten Molekularmasse (MM) im Gel benannt wurden. Ihre Funktion besteht in der Absorption von Lichtenergie und der Weiterleitung der Elektronen von den äußeren Antennen zum Reaktionszentrum. Beide besitzen jeweils sechs Transmembranhelices und binden 14 bzw. 16 Moleküle Chl<sub>a</sub> (Rhee, 2001). Zum komplett assemblierten PSII gehören außerdem ein lösliches Protein (PsbTn), sowie 13 weitere Membranproteine (<10 kDa), die in der Peripherie des CP43/D1/D2/CP47-Subkomplexes lokalisiert sind. Es handelt sich dabei um die plastidären Genprodukte von *psbH*, *J*, *K*, *L*, *M*, *N*, *Tc*, und *Z*, sowie um die kernkodierte UEn *PsbR*, *W*, *X*, *Y-1* und *Y-2* (Shi et al., 2004). Mit Ausnahme von PsbZ (2 Transmembranhelices) besitzen diese niedermolekularen UEn eine Transmembranhelix. Das Verhältnis aller UEn im PSII-Komplex wird mit 1:1 angegeben (Shi et al., 2004).

Als Aufgaben der niedermolekularen Proteine im nativen PSII-Komplex wurden die Assemblierung (Genprodukte von *psbE*, *F*, *W*), die Dimerisierung des RC (Genprodukte von *psbK*, *L*, *M*, *T*, *W*), die Stabilisierung der Superkomplexe (Genprodukte von *psbL*, *I*, *R*, *Z*), der Elektronentransfer im PSII und die Bindung von Plastochinon (Genprodukte von *psbE* und *F*, sowie *psbI*, *J*, *L*, *M*, *T*, *X*) beschrieben. Des Weiteren wurde auf den Schutz vor Photoinhibition bzw. eine Funktion als Aktivator im Reparaturzyklus der RC-Proteine (v.a. D1) (Genprodukte von *psbH*, *M*, *T*, *W*) hingewiesen (Rhee, 2001; Shi et al., 2004; Barber, 2006). Im Gegensatz zu PSI bindet keine der kleinen UEn im PSII Chlorophyll (Dekker et al., 2005). Die Funktion des Genprodukts von *psbN* ist bis dato ungeklärt. Zudem ist nicht sicher, ob es überhaupt ein Bestandteil von PSII ist (Shi et al., 2004). Als native Form des Komplexes gilt das PSII-Dimer, das eine Masse von etwa 410 kDa besitzt.

Den Abschluss nach Außen bilden bei den höheren Pflanzen und Grünalgen Komplexe aus Chlorophyll-*a,b*-bindenden Proteinen (LHCP; vgl. Kapitel 2.3.2 S. 12), die als Lichtsammelapparate dienen (Bricker, 1990). *In vivo* bildet das PSII-Dimer mit bis zu vier LHCII-Trimeren die sogenannten Superkomplexe (Hankamer et al., 1997; Boekema et al., 1999; Boekema et al., 1999; Heinemeyer et al., 2004; Dekker et al., 2005).

### 2.3.2 Chlorophyll-*a,b*-bindende Proteine von PSII

Das Sammeln von Lichtenergie ist der erste Schritt im Photosyntheseprozess. In grünen Pflanzen wird diese Aufgabe von einer Reihe an Chlorophyll-*a,b*-bindenden Proteinen erfüllt, die sich zu den Lichtsammelkomplexen (LHC) assemblieren. Neben seiner Funktion als Lichtsammler ist das majore LHCI-*a*-Trimer an der Granabildung, sowie an der Abgabe überschüssiger Lichtenergie in Form von Wärme beteiligt (Horton et al., 1996; Elrad et al., 2002). Die LHCI regulieren außerdem indirekt die Verteilung der Anregungsenergie auf die Photosysteme I und II (Nilsson et al., 1997). Durch Phosphorylierung über eine membranassoziierte LHCI-Kinase entsteht ein innerhalb der Membran beweglicher LHCI-Komplex, welcher in Wechselwirkung mit dem Lichtsammelkomplex des PSI treten kann. Im Zuge dessen wird die räumliche Ausdehnung des Antennenkomplexes von PSI vergrößert z. B. um damit die maximale Effizienz des nicht-zyklischen Elektronentransports zu erreichen. Dies kann zur Anpassung an sich verändernde Lichtverhältnisse nötig sein. Die Aufklärung der Struktur von LHCI erfolgte mittels Röntgenstrukturanalyse an kristallisierten Proteinkomplexen (Kuhlbrandt et al., 1994; Liu et al., 2004). Danach werden mindestens sechs kerncodierte Proteinuntereinheiten Lhcb1-6 („Antennenproteine“) für den Chlorophyll-*a,b*-bindenden Lichtsammelkomplex von PSII in höheren Pflanzen und Grünalgen beschrieben (Tabelle 1). Die Proteinuntereinheiten werden allgemein auch als LHCP bezeichnet. In der Literatur werden neben den sechs Hauptproteinen in verschiedenen Organismen zusätzlich Isoformen für einzelne LHCP beschrieben (Chitnis et al., 1988; Morishige et al., 1994; Corradini et al., 2000; Huber et al., 2001).

**Tabelle 1: Unterschiedliche Benennung der LHCP in der Literatur**

Genprodukt	Green et al. (1991)	Thornber et al. (1991)	Bassi et al. (1990)	Harrison & Melis (1992)
Lhcb1	Type I LHCI	LHCIb 28 kDa	LHCI	b
Lhcb2	Type II LHCI	LHCIb 27 kDa	LHCI	c
Lhcb3	Type III LHCI	LHCIb 25 kDa	LHCIa	d ?
Lhcb4	Type II CP29	LHCIb IIa	CP29	a
Lhcb5	Type I CP29	LHCIb IIc	CP26	?
Lhcb6	CP24	LHCIb IId	CP24	e

Tabelle aus (Jansson, 1999).

Die primäre Aufgabe der LHCP ist die Versorgung des Reaktionszentrums mit Lichtenergie. Sie besitzen sehr ähnliche Strukturen und binden 12–14 Moleküle Chlorophyll (*a* und *b*), sowie bis zu vier Carotinoide (Kuhlbrandt et al., 1994; Liu et al., 2004). Alle Vertreter werden mit einer Präsequenz exprimiert, die den Import in den Chloroplasten und die Insertion in die Thylakoidmembran ermöglicht. Die Präsequenz wird bei der Prozessierung zum murenen Protein (schrittweise) abgeschnitten. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den

einzelnen LHCP und der oft abweichenden Benennung der Proteine in den einzelnen Spezies gestaltet sich eine Identifikation oft schwierig (Tabelle 1, S. 12). Folglich werden zum Teil ebenfalls Informationen aus den Transmembranbereichen benötigt, die bis zu 35% der Gesamtsequenz der LHCP ausmachen.

Die LHCP werden in zwei Gruppen eingeteilt, die majoren und minoren Antennenproteine. Während die minoren LHCP nur in geringer Menge in der Photosynthesemembran enthalten sind, beträgt der Anteil des majoren LHC-Komplexes ca. 50% der Gesamtproteinmenge der Thylakoidmembran (Bassi et al., 1992). Das Verhältnis zwischen minoren und majoren LHCP in mono- und dikotylen Pflanzen ist dabei jedoch unterschiedlich. Bei den Dikotylen ist der Anteil minorer Antennen deutlich höher (Zolla et al., 2003). Die Antennenproteine von PSII enthalten zwei konservierte Regionen (1. und 3. Transmembranhelix), die auch in den analogen Vertretern von PSI vorkommen. Dies deutet auf eine phylogenetische Verwandtschaft der Lichtsammelproteine hin (Richter, 1996).

### 2.3.2.1 Die majoren LHCP

Der am häufigsten vorkommende Komplex innerhalb der Thylakoidmembran ist das majore LHCII-Trimer. Es bindet etwa die Hälfte aller Chlorophyll-Moleküle. In der Literatur wird der majore LHCII-Komplex zum Teil auch als LHCIIb bezeichnet (Chitnis et al., 1988; Morishige et al., 1994). Er umfasst drei UEn, die als Chlorophyll-*a,b*-bindende Proteine Typ I-III bezeichnet werden und eine MM zwischen 24 und 25 kDa besitzen (Corradini et al., 2000). Die zugehörigen Genbezeichnungen sind *Lhcb1-3*. Im nativen LHCII-Komplex sind die UEn in verschiedenen mobilen und immobilen Homo- und Heterotrimeren organisiert (Kyle et al., 1983; Zhang et al., 2004). Nach Phosphorylierung kommt es zur lateralen Verlagerung von LHCII-Komplexen aus den gestapelten Grana- zu den PSI-reichen Stromathylakoiden, wo sie als Lichtsammelkomplex für PSI dienen (Allen, 1992; Nilsson et al., 1997). Die Interaktion reguliert die Energieverteilung auf die beiden Photosysteme. Damit wird die Akkumulation von Plastohydrochinon, dem Endprodukt der Elektronentransportkette von PSII verhindert und somit die Effizienz des nicht-zyklischen Elektronentransports zur Bereitstellung von Energieäquivalenten (ATP) gesteigert (Richter, 1996).

In *Arabidopsis* sind drei Kombinationen aus majoren LHCP in den isolierten Trimeren gefunden worden. Homotrimere bestehend aus dem *Lhcb1*-Protein, Heterotrimere aus *Lhcb1* und 2 und Heterotrimere aus allen drei majoren Proteinen (Jackowski et al., 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass neben den bereits identifizierten Formen auch alle anderen möglichen Kombinationen existieren könnten, außer Homotrimere von *Lhcb3* (Standfuss et al., 2004). Das absolute Verhältnis der drei UEn wird als 10:3:1 angegeben. Abhängig vom Organismus

und den Wachstumsbedingungen ist jedoch auch eine andere Stöchiometrie möglich (Peter et al., 1991; Jansson, 1999; Zolla et al., 2003).

Von *Lhcb1* existieren unterschiedliche Isoformen, die von einer multiplen Genfamilie im Zellkern codiert werden (Jansson, 1999). Die maturen Polypeptide bestehen jeweils aus etwa 232 AS (Liu et al., 2004). Die Anzahl der identifizierten Gene für die verschiedenen Arten schwankt zwischen 1 (Gerste) und bis zu 16 (Petunie) (Jansson, 1994; Huber et al., 2001). Dabei besitzen dikotyle Pflanzen im Durchschnitt deutlich mehr unterschiedliche Gene für *Lhcb1*. In Mais sind mindestens drei Isoformen für das Lhcb1-Apoprotein identifiziert worden (De Luca et al., 1999). In Gerste sind bislang zwei Isoformen für Lhcb1 beschrieben worden (Huber et al., 2001; Zolla et al., 2003). Die Detektion unterschiedlicher Isoformen eines Proteins kann mehrere Gründe haben: a) unterschiedliche Genprodukte (Jansson et al., 1990), b) posttranslationale Modifikationen z. B. Phosphorylierung (Michel et al., 1991) c) unterschiedliche Prozessierungsstellen eines Proteins (Lamppa et al., 1987) oder d) Artefakte bei der Probenvorbereitung.

Die Proteine Lhcb1 und Lhcb2 besitzen nahezu identische Molekularmassen und AS-Sequenzen. Unterschiede finden sich fast ausschließlich im N-terminalen Bereich der maturen Proteine (Jansson, 1994). Die maturen Proteine beginnen jeweils mit einem konservierten Arg (Michel et al., 1991). Mit Ausnahme von Arabidopsis sind keine Isoformen des *Lhcb2*-Gens bekannt (Jansson, 1999). Das Lhcb2-Apoprotein ist in der Peripherie der LHCII-Komplexe lokalisiert (Larsson et al., 1987) und kann analog zu Lhcb1 im Bereich des N-Terminus reversibel phosphoryliert werden (Mullet, 1983; Nilsson et al., 1997; Aro et al., 2004). Jedoch ist die Kinetik der Phosphorylierung von Lhcb2 deutlich schneller, was den Schluss zulässt, dass es zumeist in den mobilen LHC situiert ist und damit der Anpassung der Photosynthese an unterschiedliche Lichtbedingungen dient.

Die geringere Molekularmasse von Lhcb3 ist im wesentlichen bedingt durch das Fehlen der N-terminalen Phosphorylierungsstelle. Damit ist die Primärsequenz des Apoproteins um etwa 10 AS kürzer als die der beiden anderen Vertreter des LHCIIb (Jansson, 1994). Das Genprodukt von *Lhcb3* wird bereits in einem frühen Stadium der Assemblierung an das Reaktionszentrum gebunden und gilt als fest mit diesem assoziiert. Die Lhcb3-UE könnte infolge zur korrekten Positionierung der LHCII-Komplexe dienen oder als intermediärer Überträger der Anregungsenergie auf das Reaktionszentrum von PSII (RCII) (Standfuss et al., 2004).

### 2.3.2.2 Die minoren LHCP und PsbS

Die minoren LHCP werden als LHC-IIa oder CP29 (*Lhcb4*), LHC-IIc oder CP26 (*Lhcb5*) und als LHC-IIId oder CP24 (*Lhcb6*) bezeichnet. Sie sind in deutlich geringeren Mengen vorhanden wie die majoren LHCP und nicht in Multimeren organisiert. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Die beiden UEn CP26 und CP29 spielen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Bildung und Stabilität von Superkomplexen (Yakushevskaya et al., 2003). Fehlt CP26, findet zwar die Assemblierung zu hochmolekularen Komplexen statt, jedoch ist sowohl die Stabilität der Superkomplexe (geringere Beständigkeit gegen Detergenzien) als auch die strukturelle Anordnung innerhalb der Thylakoidmembran beeinträchtigt. CP29 defiziente Mutanten bilden keine Superkomplexe mehr aus. Es kommt dabei zu einer Abtrennung der fest an die RC gebundenen LHCII-Trimere. Obwohl es bei einem Fehlen der beiden UEn zu einer verringerten Quantenausbeute kommt, scheinen diese weder für den Energietransfer zum Reaktionszentrum von PSII, noch für die Regulation der Photosynthese zuständig zu sein (Andersson et al., 2001). CP26 ist in der Nähe von CP43 lokalisiert (Harrer et al., 1998; Yakushevskaya et al., 2003). CP29 befindet sich benachbart zu CP47 und CP24 (Hankamer et al., 1997). Eine enge Bindung an CP24 wird zusätzlich durch das Fehlen von CP24 in *Lhcb5*-Mutanten verdeutlicht. In den meisten Modellen von PSII bilden die minoren LHCP die Verbindung zwischen den Proteinen des Reaktionszentrums und den majoren LHCP (Peter et al., 1991; Bassi et al., 1992). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sie erst nach Bindung der Lichtsammelkomplexe an die Superkomplexe gebunden werden (Boekema et al., 1999).

Hohe Sequenzübereinstimmungen (über 70% Homologie), vor allem im Bereich der Transmembrandomänen (Jansson, 1994), ähnliche Molekularmassen und eine Vielzahl unterschiedlicher Gen- bzw. Proteinbezeichnungen sind charakteristisch für die LHCP. Eine korrekte Klassifizierung macht deshalb oft Schwierigkeiten. Dies gilt vor allem für Proteine aus Organismen, deren Genom noch nicht sequenziert wurde. Aus diesen Gründen ist trotz der Verwendung von MSMS-Daten in Kombination mit einer exakten Molekularmassenbestimmung eine erfolgreiche Identifikation oft nicht möglich. Aufgrund der uneinheitlichen und damit wenig aussagekräftigen Nomenklatur der Proteine werden die LHCP im Folgenden über ihre allgemeine Genbezeichnung *Lhcb1-6* differenziert.

Das *PsbS*-Genprodukt (CP22) wird ebenfalls den LHCP von PSII zugeordnet. Im Gegensatz zu den anderen LHCP besitzt es vier  $\alpha$ -helicale TMD (Kim et al., 1992). CP22 spielt eine wichtige Rolle bei der nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung (qE) (Demmig-Adams et al., 1996; Li et al., 2000; Horton et al., 2005). Zeaxanthin bindet dabei an PsbS und agiert

vermutlich als Aktivator für den Quenching-Prozess (Crouchman et al., 2006). Der Prozess schützt den photosynthetischen Komplex von PSII vor übermäßiger Absorption von Lichtenergie durch die Lichtsammelkomplexe. Die überschüssige Energie wird dabei in Form von Wärme abgegeben.

### **2.4 Techniken zur massenspektrometrischen Analyse von Pflanzenproteomen**

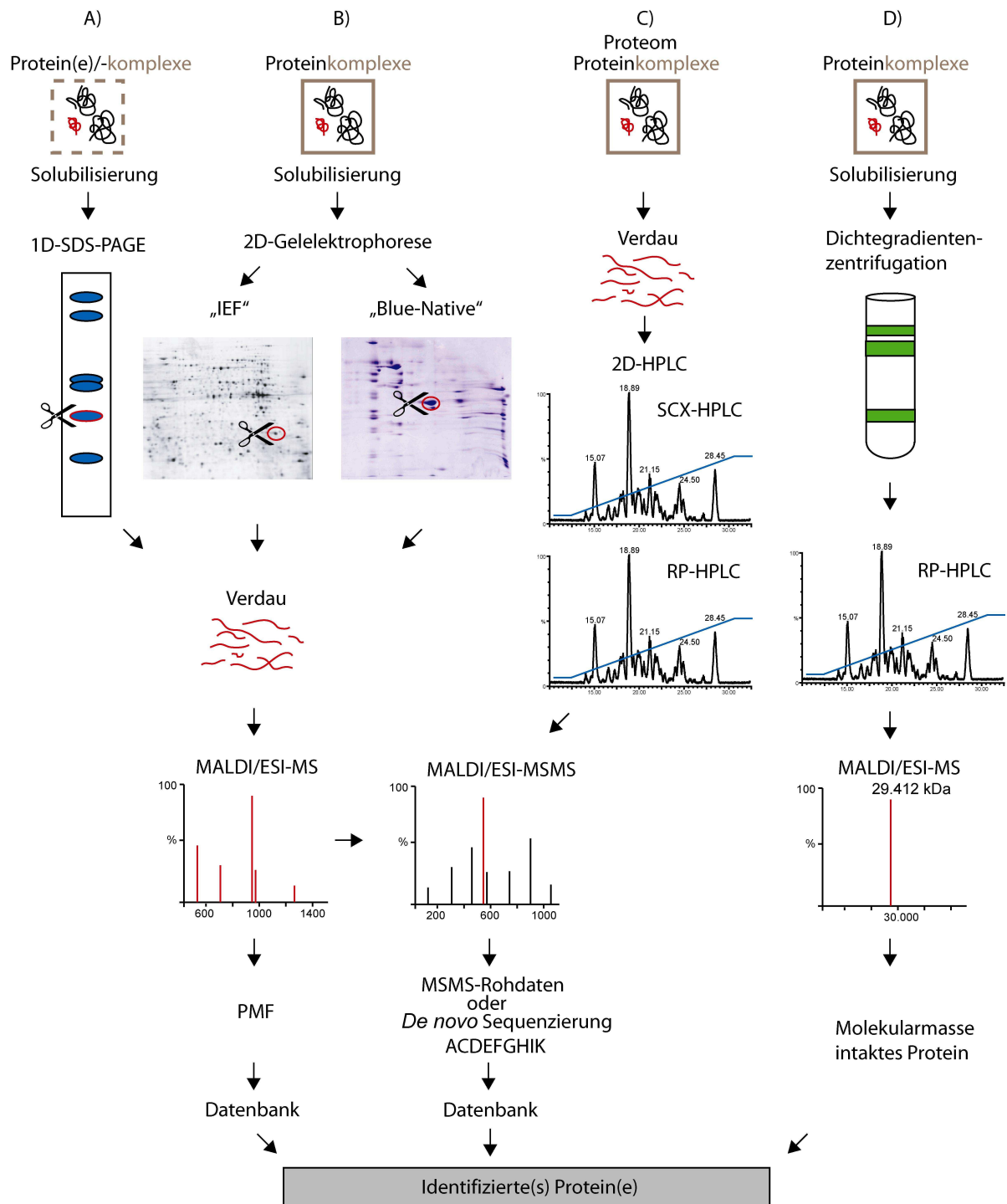
Der Begriff Proteom wurde von M. R. Wilkins und K. L. Williams (1994) geprägt. Er bezeichnet die Gesamtheit aller, zu einem bestimmten Zeitpunkt, in einem Organismus, einer Zelle oder einem Kompartiment, exprimierten Proteine.

Früher war die am häufigsten verwendete Technologie zur Analyse von Proteinen die SDS-PAGE. Die Identifikation der visualisierten Proteine erfolgte anschließend über N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) oder über Antikörper (Western-Blot).

Die Hauptaufgabe der Massenspektrometrie in der Proteomforschung ist die Korrelation von experimentell erhaltenen Proteindaten zu den Daten aus der entsprechenden Genomsequenz, um ein Protein spezifisch als das Produkt eines bestimmten Gens zu identifizieren. Biemann et al. führten 1966 die erste „*de novo*“ Sequenzierung an synthetischen Oligopeptiden durch (Biemann et al., 1966). Die anfänglichen Probleme bei der Transformation von intakten Biomolekülen (Peptide, Proteine) in Gasphasenionen, konnten erst durch die Erfindung (Dole et al., 1968) (1968) und Weiterentwicklung (Yamashita et al., 1984) der „sanften“ Ionisierungsmethode Elektrospray im MS gelöst werden (Fenn et al., 1989). Etwa zur gleichen Zeit erschien die erste Veröffentlichung, in der die Massenspektrometrie zur Analyse von Peptiden aus Proteinen der Thylakoidmembran eingesetzt wurde. Der Ansatz ermöglichte die Charakterisierung von N-terminalen Phosphopeptiden aus drei Untereinheiten (D1, D2 und CP43) von PSII (Michel et al., 1988). Die Methoden und Geräte haben sich seither kontinuierlich weiterentwickelt, so dass dem Forscher heute eine Vielzahl von Anwendungen zur Verfügung steht.

Zur Reduktion der Probenkomplexität wird häufig eine Subfraktionierung der isolierten Proben vorgenommen. Durch die Kombination unterschiedlicher Methoden zur Subfraktionierung (1. und 2. Dimension) erfolgt die Optimierung von Auflösung und Proteinausbeute. Gleichzeitig wird damit eine Anpassung an Proben mit unterschiedlichen Eigenschaften erreicht. Dies ist vor allem dann nötig, wenn aus Gründen der Kompatibilität mit nachfolgenden Analysemethoden (z. B. MS) Detergenzien und Puffersalze nur eingeschränkt verwendbar sind. Um ein Protein für eine MS-Analyse zugänglich zu machen,

muss es zunächst möglichst verlustfrei isoliert werden. Dies gestaltet sich für MP aufgrund ihrer extremen Hydrophobizität erheblich schwieriger als für lösliche Proteine. Zur Isolation von Proteinen wurden in den letzten Jahren einige Methoden erfolgreich etabliert (Abb. 1).



**Abb. 1: Verschiedene Methoden zur Proteinanalyse mittels Massenspektrometrie**

Im einfachsten Fall wird ein Proteingemisch bzw. ein Proteinkomplex mit Hilfe eines ionischen Detergenz (denaturiert) solubilisiert und über SDS-PAGE getrennt (A). Proteinbanden von Interesse werden ausgeschnitten, enzymatisch oder chemisch verdaut und die entstehenden Peptide massenspektrometrisch (MALDI-, ESI-MS) analysiert. Über PMF, MSMS-Rohdaten oder die Primärsequenzen der Peptide werden die Proteine schließlich über eine Proteindatenbank identifiziert. Die Analyse nativer Proteinkomplexe beginnt mit der Isolation der Komplexe mit einem nichtionischen Detergenz (B und D). Die nachfolgende Subfraktionierung der Komplexe kann über 2D-Gelelektrophorese (B) oder Dichtegradientenzentrifugation (D) erfolgen. Die gelbasierten

Methoden beruhen in der 1. Dimension auf einer Trennung der Einzelproteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEP, IEF) oder auf einer Trennung der nativen Proteinkomplexe nach ihrer Molekularmasse (BN). Als 2. Dimension schließt sich in beiden Fällen eine denaturierende SDS-PAGE an, die im Falle der IEF Proteine mit gleichem IEP weiter auflöst und bei der BN die Proteinkomplexe in ihre UEn trennt. Anschließend werden wie in (A) die Proteine verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde aufgrund der farbigen Banden häufig zur Trennung von nativen Komplexen der Thylakoidmembran eingesetzt (D). Die Trennung der Komplexe erfolgt aufgrund ihrer Molekularmasse und den damit verbundenen Sedimentationsgeschwindigkeiten. Die Komplexbanden werden anschließend unverdaut über Flüssigchromatographie (LC) in ihre UEn getrennt und die Molekularmasse der einzelnen Bestandteile massenspektrometrisch bestimmt. Die Molekularmasse des intakten Proteins führt schließlich zur Identifikation. Beim „Shotgun“-Verfahren erfolgt die Subfraktionierung erst auf der Ebene der Peptide (C). Die Proteine eines Komplexes oder eines gesamten Proteoms werden enzymatisch verdaut und anschließend über 2D-LC getrennt. Die 2D-LC besteht in der 1. Dimension aus einem Kationenaustauscherphase (SCX) und in der 2. Dimension aus einer Umkehrphase (RP). In einem iterativen Prozess werden durch schrittweise Erhöhung der Salzkonzentration die Peptide portionsweise von der 1. Phase abgelöst und auf die 2. Dimension aufgebracht. Von dort werden sie in einem steigenden Lösungsmittelgradienten aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften eluiert. Die Identifikation erfolgt über MALDI-, ESI-MS generierte MSMS-Daten. In Abhängigkeit von der Fragestellung und den Eigenschaften einer Probe können die verschiedenen „Bausteine“ beliebig miteinander kombiniert werden.

### 2.4.1 Flüssigkeitschromatographie von intakten Proteinen

Eine Möglichkeit zur nativen Isolation von photosynthetischen Proteinkomplexen stellt die Trennung der Komplexe über Dichtegradientenzentrifugation (z. B. Sucrose-Gradient) dar. Anschließend werden die Proteinkomplexe in die Untereinheiten aufgespalten und diese mittels *reversed phase* Flüssigkeitschromatographie (RP-LC) (2. Dimension) getrennt (Abb. 1, D; S. 17). Die Trennung von Proteinen erfolgt dabei aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften in einem Lösungsmittelgradienten. Lösliche Proteine, die zum Stroma oder Lumen der Thylakoidmembran hin orientiert sind, werden als sogenannte extrinsische Polypeptide zu einem früheren Zeitpunkt von der Chromatographiesäule eluiert als die hydrophoben membranintegralen und damit intrinsischen Proteine. Die Kopplung an ein MS ermöglicht dann eine direkte Detektion der chromatographisch aufgetrennten Proteine (*online* LC-MS). Die Identifikation der Proteinuntereinheiten erfolgt anschließend über die Bestimmung der apparenten Molekularmasse der detektierten Proteinsignale (Zolla et al., 2000; Corradini et al., 2000; Gomez et al., 2002; Huber et al., 2004). Obwohl die Methode rasche Ergebnisse liefert und Verluste durch eine geringe Anzahl an Bearbeitungsschritten vermieden werden, ist oftmals eine zusätzliche immunologische Verifizierung der identifizierten Proteine nötig. Ein weiterer Nachteil ergibt sich für Proteine aus Organismen, deren Genome noch nicht durchsequenziert sind. Eine Korrelation zwischen MM und Protein kann speziell bei Komplexuntereinheiten mit sehr ähnlichen Massen (z. B. LHCP) kaum gefunden werden. Im Zuge der Verbesserungen im Bereich der Auflösung der MS-Geräte, sowie der automatischen Datenauswertung, ist es heutzutage ebenfalls möglich MSMS-Daten von intakten Proteinen zu generieren und zur Proteinidentifikation heranzuziehen (Mortz et al., 1996; Kelleher et al., 1999; Whitelegge et al., 2006).



## 2.4.2 2D-Gelelektrophorese

Eine sehr effiziente und weit verbreitete Methode zur Auflösung und Identifikation einer großen Anzahl von Proteinen aus komplexen biologischen Systemen, stellt die Kombination aus Proteintrennung über zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) und die massenspektrometrische Analyse von Peptiden nach enzymatischem In-Gel Verdau der getrennten Proteine dar (Abb. 1, B; S. 17). Dies gilt für die Analyse von Proteinmengen bis in den niedrigen fmol-Bereich (Wilm et al., 1996).

### 2.4.2.1 Isoelektrische Fokussierung

Der Begriff „2D-PAGE“ bedeutet in der Regel die Kopplung von Isoelektrischer Fokussierung (IEF (O'Farrell, 1975)) als 1. Dimension und SDS-PAGE als 2. Dimension (Peltier et al., 2000; van Wijk, 2001). Bei der Isoelektrischen Fokussierung handelt es sich um die Auftrennung von Proteinen in einem (pH-) Gradientengel anhand ihrer Nettoladung. Die Ladung eines Proteins ist abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums und setzt sich aus den enthaltenen basischen und sauren Aminosäuren zusammen. Am IEP beträgt die Nettoladung eines Proteins Null und führt damit zur Immobilisierung des Proteins an einem bestimmten Punkt des Gels. Häufig wird dasselbe Protein mehrfach mit unterschiedlichem IEP detektiert. Die multiplen Spots resultieren dabei in der Regel aus Modifikationen (z. B. Phosphorylierung) des Proteins, die zur Änderung des Ladungszustandes führen. Ursprünglich zur Trennung von löslichen oder membranassoziierten Proteinen eingesetzt, erlaubt die Verwendung nichtionischer Detergenzien (z. B. CHAPS, n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DM)) mittlerweile auch die Trennung von Membranproteinen mit moderat hydrophoben Eigenschaften, wie z. B. den LHCP oder bestimmten Genprodukten aus den Reaktionszentren von PSI und PSII (z. B. *psaA* und *psbA*) (Pasquali et al., 1997; Hippler et al., 2001). Die Methode erwies sich bis dato jedoch als ungeeignet für die Isolation von extrem hydrophoben Membranproteinen (Santoni et al., 1999; Santoni et al., 2000; Kashino, 2003). Diese Art von Proteinen kann zum Einen mit den schwächeren nichtionischen Detergenzien nicht in Lösung gehalten werden, zum Anderen verhindert die Aggregation der MP an ihrem IEP den Übertritt in die 2. Dimension (Braun et al., 2007). In Plastiden wurde die IEF hauptsächlich zur Trennung von löslichen Proteinen aus dem Stroma (Goulas et al., 2006), sowie peripheren MP des Lumens (Kieselbach et al., 2000; Peltier et al., 2002) eingesetzt. Eine Zusammenfassung über den Einsatz der IEF in der Erforschung des pflanzlichen Proteoms findet sich in der Literatur (Weiss et al., 2007).

### 2.4.2.2 *Blue Native-PAGE*

Für die Trennung von hydrophoben MP wurde als alternative Elektrophoresetechnik zur IEF die *Blue Native-PAGE* entwickelt (Schagger et al., 1991; Schagger et al., 1994; Schagger, 2001). Um die Proteinkomplexe im nativen Zustand zu erhalten, werden sie mit einem nichtionischen Detergenz (z. B. DM, Digitonin) solubilisiert. Die gelösten Komplexe werden anschließend mit geladenen Farbstoffmolekülen markiert, um die elektrophoretische Mobilität der Komplexe zu erhöhen und damit eine Trennung in Abhängigkeit von der Molekularmasse des Komplexes ermöglichen. In Anlehnung an den blauen Farbstoff (Coomassie G) wurde diese Technik als *Blue Native* (BN)-PAGE bekannt. Die nativen Proteinkomplexe werden anschließend über SDS-PAGE (2. Dimension) in ihre Einzelproteine getrennt. Neben der Isolation von hydrophoben MP erlaubt das System eine direkte Zuordnung von UEn zu einem Proteinkomplex und damit eine Analyse von Protein-Protein Interaktionen (Zhang et al., 2001; Devreese et al., 2002; Thidholm et al., 2002; Kügler et al., 1997; Aro et al., 2005; Granvogl et al., 2006). Der Erhalt des nativen Zustands ermöglicht zusätzlich eine Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinkomplexen. Diese kann entweder direkt aus der Laufhöhe des Komplexes in der 1. Dimension abgelesen werden oder aus den addierten Massen der Komplexuntereinheiten in der 2. Dimension berechnet werden (Kashino, 2003). Die Auflösung ist dabei wesentlich besser als z. B. bei der Dichtegradientenzentrifugation. Bei Verwendung entsprechender Gradientengele ermöglicht die BN-PAGE eine Trennung von Proteinkomplexen bis zu einem Molekulargewicht von über 3.000 kDa (Heinemeyer et al., 2004). Als zweite Dimension schließt sich an die IEF bzw. BN die denaturierende SDS-PAGE an.

### 2.4.3 “*Shotgun*”-Proteomics

*Shotgun Proteomics* bzw. *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT) (Link et al., 1999; Washburn et al., 2001; Wu et al., 2002; Swanson et al., 2005) ist eine LC-MS gestützte Methode zur Analyse komplexer Proteingemische (Abb. 1, C; S. 17). Sie stellt damit eine Alternative zur traditionellen *top-down* Methode der 2D-Gelelektrophorese dar. Da Peptide in der Handhabung deutlich einfacher sind als Proteine, wird bei beiden Verfahren die Trennung der Analyten auf die Ebene der Peptide verlagert. Damit scheint der Ansatz auch speziell für die Charakterisierung von MP geeignet, da die Löslichkeit der Proteine auf der Peptidebene keine entscheidende Rolle mehr spielt.

Der Verdau eines kompletten Proteoms eines Kompartiments oder Organismus führt zu einer hochkomplexen Mischung an Peptiden. Bei der *Shotgun*-Methode werden diese anschließend

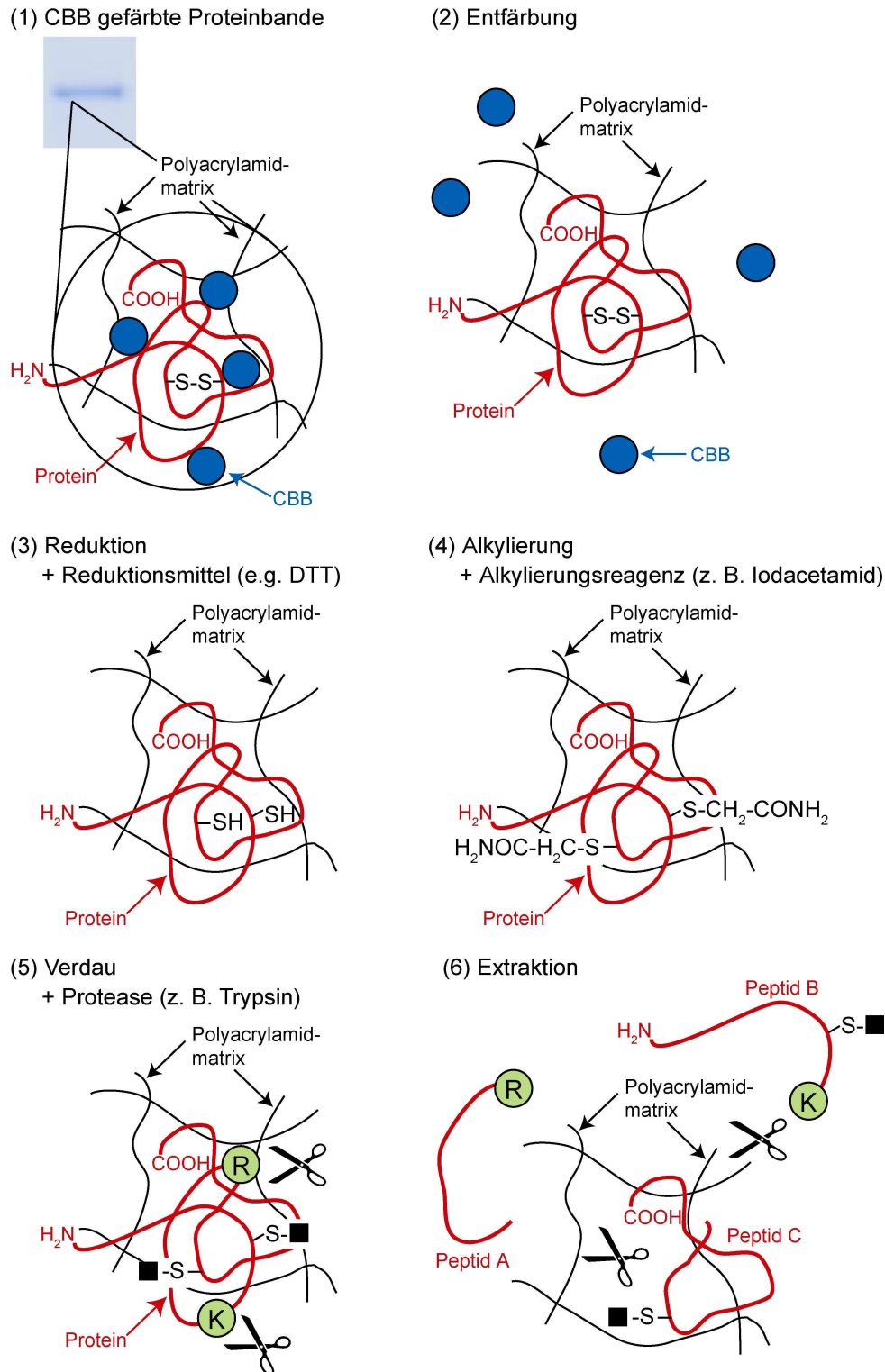
über 1D-Chromatographie getrennt. Im Gegensatz dazu verwendet das MudPIT-Verfahren zur Trennung multidimensionale Chromatographie. Die (iterativ) separierten Peptide werden mittels Tandem-MS analysiert und anschließend automatisch identifiziert. Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung sind Geräte (HPLC, MS) mit entsprechend hoher Auflösung und Messgeschwindigkeit. *Shotgun Proteomics* ist im Vergleich weniger (zeit-) aufwendig und benötigt aufgrund der Reduktion der Bearbeitungsschritte eine geringere Menge an Probenmaterial. Aufgrund der hohen Komplexität wird häufig eine Subfraktionierung der Probe mit klassischen biochemischen Methoden vorgeschaltet (z. B. Fällung, Affinitätschromatographie etc.). Informationen über die Masse der intakten Proteine, mögliche Isoformen oder AS-Modifikationen gehen dabei allerdings verloren. In Plastiden wurden die Techniken zur Identifikation von LHCP (Ouellette et al., 2002) und dem Gesamtproteom des Chloroplasten (Baginsky et al., 2005) angewendet.

### **2.4.4 In-Gel Verdau von Proteinen nach elektrophoretischer Trennung**

Der In-Gel Verdau von (Membran-) Proteinen stellt einen zentralen Schritt in der Probenvorbereitung dar, um Proteine nach einer Trennung mittels Gelelektrophorese mit massenspektrometrischen Methoden effizient identifizieren zu können. Die Methode wurde 1992 von Rosenfeld et al. etabliert (Rosenfeld et al., 1992). Die grundlegenden Komponenten sind weitgehend erhalten, obwohl zahlreiche Verbesserungen zur Steigerung der Peptidausbeute und der Qualität der massenspektrometrischen Daten entwickelt wurden (Jeno et al., 1995; Shevchenko et al., 1996). Heutzutage existiert eine Vielzahl modifizierter Protokolle zur Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse (Granvogl et al., 2007).

Im Wesentlichen werden bei der Probenvorbereitung nach der Elektrophorese die nachfolgend erläuterten Arbeitsschritte durchlaufen, um die Identität eines Proteins zu bestimmen (Abb. 2, S. 22). Zuerst werden die aufgetrennten Proteine, die nach der Gelelektrophorese in Proteinbanden oder *-spots* angeordnet sind, durch Anbindung eines Farbstoffes sichtbar gemacht. Die gefärbten Proteinbanden werden aus dem Gel ausgeschnitten und nach einem Entfärbungsschritt werden die im Protein enthaltenen Cysteine in einem Reduzierungs- und Alkylierungsschritt (R&A) modifiziert. Dabei werden die Disulfidbrücken des Proteins irreversibel getrennt, um eine optimale Entfaltung zu erreichen. Anschließend erfolgt der für die Methode namensgebende Schritt, der Verdau des Proteins im Gel. Das Protein wird hierbei enzymatisch (meist mit Trypsin) in kürzere Proteinfragmente (Peptide) gespalten, die aus dem Gel extrahiert werden können. Für den abschließenden Nachweis der Peptide mittels Massenspektrometrie erfolgt häufig noch ein

Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt oder die Auftrennung der Peptidgemische mittels RP-Chromatographie. Die Identität des Proteins selbst wird durch den Abgleich der massenspektrometrisch bestimmten Daten mit einer Proteindatenbank ermittelt.



**Abb. 2: Klassisches Verfahren zum In-Gel Verdau von Proteinen nach CBB-Färbung.**

Die gefärbten Proteine werden zunächst zusammen mit dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten (1). Im folgenden Entfärbeprozess werden die gebundenen CBB-Moleküle (blaue Punkte) durch wiederholte Inkubation in einem Puffer- /Lösungsmittelgemisch freigesetzt (2). Um die Effizienz des In-Gel Verdau und damit die Sequenzabdeckung zu verbessern, werden die innerhalb der Proteinsequenz enthaltenen Cysteine reduziert (3)

und alkyliert (4). Anschließend werden die Proteine proteolytisch verdaut (3) (hier: Trypsin) (5). Trypsin schneidet C-terminal zu den AS Arginin (R) und Lysin (K). Die entstehenden Peptide (A, B und C) werden aus der Acrylamidmatrix extrahiert (6). Das fertige Peptidgemisch kann jetzt entweder direkt massenspektrometrisch analysiert werden oder es wird noch eine Aufreinigung und/oder chromatographische Trennung vor der MS-Analyse vorgenommen.

### 2.4.4.1 Visualisierung von Proteinen im Gel

Über Gelelektrophorese getrennte Proteine können mit verschiedenen Färbemethoden visualisiert werden. Am weitesten verbreitet sind die Coomassie-, Silber- und Fluoreszenzfärbung. Welche Färbung verwendet wird, ist vor allem abhängig von der Proteinmenge in den getrennten Proteinbanden. Für eine Färbung mit dem Farbstoff Coomassie (Fazekas De St. Groth et al., 1963; Tal et al., 1985) müssen im Mittel mehr als 30 ng Protein vorliegen, während durch Anlagerung von Silber (Shevchenko et al., 1996; Rabilloud, 1990; Moertz et al., 2001) bereits 60-fach kleinere Proteinmengen sichtbar gemacht werden können. Durch die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die Aminosäure Lysin, sind teilweise bereits 0.025 ng Protein und damit 1200-fach geringere Mengen als bei der Visualisierung mittels Coomassie zum Nachweis ausreichend (Coomassie Blue-R250: > 30 ng (Neuhoff et al., 1988; Mackintosh et al., 2003), Silber: > 0.5 ng (Heukeshoven et al., 1985), Fluoreszenz, z. B. Sypro Ruby, *Deep Purple*, > 0.5 ng (Lilley et al., 2004) oder CyDyes > 0.025 ng (Marouga et al., 2005)). Speziell bei der Silberfärbung sind nicht alle Protokolle kompatibel zum In-Gel Verdau und zur massenspektrometrischen Analyse (Shevchenko et al., 1996; Moertz et al., 2001). Zur Verbesserung der Peptidausbeute und Sequenzabdeckung empfiehlt sich eine nachfolgende Entfärbung der Proteinbanden. Dies geschieht durch Oxidation des metallischen Silbers und nachfolgende Komplexierung der Silberionen (Gharahdaghi et al., 1999; Sumner et al., 2002). Mit „Blue Silver“ (> 1 ng) gibt es heute auch eine Coomassie-Färbung, die in der Sensitivität der Silberfärbung relativ nahe kommt (Candiano et al., 2004).

### 2.4.4.2 Verdau der Proteine

Der enzymatische Verdau eines Proteins mit einer spezifisch schneidenden Protease führt zu einer definierten Anzahl von Peptiden mit charakteristischer Masse, die massenspektrometrisch analysiert und anschließend zur Identifikation des Proteins verwendet werden können. Die häufigste in der Proteomanalytik verwendete Protease ist die Serin-Protease Trypsin. Trypsin spaltet Peptidbindungen spezifisch am Carboxyl-Ende von Arginin und Lysin. Die Hydrolyserate sinkt, wenn sich unmittelbar benachbart zur Schnittstelle eine saure Aminosäure befindet. Die Spaltung wird blockiert, wenn C-terminal von der Schnittstelle die Aminosäure Prolin liegt (Thiede et al., 2000). Als unerwünschter

Nebeneffekt tritt beim proteolytischen Verdau von Proteinen der Eigenverdau der Protease auf. Um dies zu verhindern, wurden dem Verdaupuffer früher  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zugesetzt (Sipos et al., 1970; Vajda et al., 1981). Heute wird von vielen Herstellern modifiziertes Trypsin angeboten. Durch selektive Methylierung der in der Proteinsequenz enthaltenen Lysine kann der Eigenverdau auf die argininhaltigen Peptide beschränkt werden (Rice et al., 1977). Die Modifikation von AS erhöht gleichzeitig die Toleranz des Enzyms gegenüber höheren Temperaturen (DeSantis et al., 1999). Im Gegensatz zum unmodifizierten Trypsin, das sein Temperaturoptimum zwischen  $35^{\circ}\text{C}$  und  $45^{\circ}\text{C}$  hat, zeigt modifiziertes Trypsin die höchste Aktivität zwischen  $50^{\circ}$  und  $55^{\circ}\text{C}$  (Venkatesh et al., 1998; Havlis et al., 2003; Finehout et al., 2005; Granvogl et al., 2007).

Neben Trypsin finden ebenfalls die Endoproteasen Lys-C (Jekel et al., 1983; Bansal et al., 1989; Jenö et al., 1995; Patterson, 1995), Glu-C (Houmard et al., 1972; Cleveland et al., 1977; Bansal et al., 1989; Scheler et al., 1998; Farah et al., 2005) und Asp-N (Wang et al., 2005) Verwendung. Diese Proteasen schneiden spezifisch nur an einer Aminosäure (Michalski et al., 1999). Aufgrund der höheren Spezifizierung entsteht hierbei im Vergleich zur Proteolyse mit Trypsin generell eine geringere Anzahl an längeren Peptiden.

Abhängig von der Verteilung der Schnittstellen ist die komplette Sequenzierung eines Proteins mit nur einer Protease meist nicht möglich. In diesem Fall wird das Zielprotein in verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Proteasen verdaut. Die dabei entstehenden, überlappenden Peptide können nach der Analyse zur Gesamtsequenz zusammengesetzt werden (Scheler et al., 1998; Choudhary et al., 2003; Wa et al., 2006).

Da die Proteine in der Gelmatrix immobilisiert sind, muss die Protease zum Verdau ins Gel eingebracht werden. Voraussetzung dafür ist, dass die Protease klein genug ist, um in die Gelmatrix eindringen zu können (Elder et al., 1977). Des Weiteren müssen die Schnittstellen der Substrate für die Protease frei zugänglich sein. Um das Eindringen der Protease ins Gel zu erleichtern, werden die proteinhaltigen Gelstücke mit Acetonitril entwässert und anschließend durch Inkubation in der Proteaselösung rehydriert (Hellman et al., 1995). Die Vorgehensweise basiert auf der Annahme, dass die Protease beim Rehydrieren des Gels mit einquillt. Es wird heute jedoch diskutiert, ob das Eindringen der Protease diffusionsabhängig ist (Havlis et al., 2003). Ein vorheriges Trocknen des Gels würde den Vorgang folglich kaum unterstützen. In den meisten Protokollen findet der In-Gel Verdau über Nacht statt. Die Inkubationszeit beträgt folglich 12-18h. Versuche haben jedoch gezeigt, dass bereits nach 3-6h genug Peptid-Material für die massenspektrometrische Analyse vorhanden ist (Finehout et al., 2003). Durch die Optimierung der Bedingungen für die Protease (pH, Temperatur) können sogar bereits

nach 30 min ausreichend Peptide erzeugt werden, um eine massenspektrometrische Analyse zu ermöglichen (Havlis et al., 2003).

### *2.4.4.3 Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix*

Nach dem In-Gel Verdau der Proteine müssen die entstandenen Peptide von der Gelmatrix getrennt werden. Die Protokolle beinhalten in der Regel mindestens zwei Extraktionsschritte. Hierbei werden die Gelpartikel mit dem Extraktionspuffer inkubiert und die aus den Gelpartikeln herausgewaschenen Peptide mit dem Überstand abgehoben. Zur Extraktion der sauren Peptide wird ein zusätzlicher Volumenanteil des während des Verdau eingesetzten Puffers verwendet (z. B.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Die basischen Peptide werden in Abhängigkeit von der Art der MS-Analyse entweder mit Ameisensäure (ESI) oder mit Trifluoressigsäure (TFA; MALDI) extrahiert. Die Verwendung von Acetonitril verhindert hierbei bereits ab einem Anteil von 30% (v/v), die Adsorption von Peptiden an die Oberflächen von Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen (Erdjument-Bromage et al., 1998). Für eventuell notwendige zusätzliche Reinigungs- und Konzentrierungsschritte müssen nach der Extraktion das flüchtige Salz Ammoniumhydrogencarbonat und Acetonitril in einem separaten Schritt im Vakuumkonzentrator entfernt werden.

### *2.4.4.4 Entsalzung und Konzentrierung der Peptidlösung*

Die vereinigten Überstände der Extraktionslösung enthalten neben den Peptiden des verdauten Proteins vor allem Salze, die aus den verwendeten Puffern stammen oder aus dem Elektrophoresegel mit extrahiert wurden und organische Lösungsmittel. Salze sind für Messungen mit ESI-MS nicht tolerierbar, während die MALD-Ionisierung unempfindlicher gegenüber dieser Kontamination ist. Dennoch wird auch hier die Qualität der Spektren eingeschränkt (Bagshaw et al., 2000). Bis zu einem gewissen Grad werden flüchtige Substanzen (Acetonitril,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) durch die Vakuumtrocknung der Proben abgetrennt. Gleichzeitig findet eine Konzentrierung der Probe statt. Eine vollständige Entfernung störender Komponenten (v.a. Salze) ist über die Vakuumtrocknung jedoch nicht möglich. Die erneut gelösten Peptide werden zur weiteren Reinigung und Konzentrierung mittels hydrophober Wechselwirkungen ihrer Aminosäureseitenketten an eine chromatographische Matrix (C18) gebunden (Wilm et al., 1996; Erdjument-Bromage et al., 1998). Der Prozess beginnt mit der Aktivierung der C18-Matrix in einem organischen Lösungsmittel (z. B. Acetonitril oder Methanol). Im zweiten Schritt erfolgt die Beladung der Matrix mit den Analytmolekülen in wässriger Lösung. Salze können nicht an die Matrix gebunden werden und werden somit während der Beladung ausgewaschen. Die Elution der Peptide erfolgt dann

in einem geringen Volumen eines organischen Lösungsmittels (z. B. Acetonitril, Methanol), das in verschiedenen Konzentrationen verwendet wird. Zur Analyse komplexer oder schwach konzentrierter Proben werden ESI-MS häufig an eine *Reversed Phase Liquid Chromatography* (RP-LC) gekoppelt (Lahm et al., 2000). Nach dem Probenauftrag wird hierbei auf einer Vorsäule mit einem großen Volumen an wässrigem Lösungsmittel (z. B. 0.1% FA) automatisch entsalzt.

## **2.5 Massenspektrometrische Analyse von Proteinkomplexen der Thylakoidmembran**

### **2.5.1 Die Untereinheiten von PSII**

Ende der 90er Jahre wurden die ersten massenspektrometrischen Studien von intakten PSII-Proteinen aus Erbse und Spinat durchgeführt. Morris und Mitarbeiter studierten Polypeptide aus dem monomeren und dimeren RC-Komplex, sowie aus RC47, mittels RP-LC-Trennung der Untereinheiten und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse. (Sharma et al., 1997; Sharma et al., 1997; Zheleva et al., 1998). Ziel war die Bestimmung der niedermolekularen Proteine und die Zusammensetzung der Gesamtkomplexe. Zum RCII gehören neben D1 und D2 ebenfalls die Genprodukte des Cytochrom  $b_{559}$  (*psbE* und *psbF*), sowie *psbI* (Sharma et al., 1997). Szabo et al. bestätigten diese Ergebnisse an RCII aus Spinat (Szabo et al., 2001). Die massenspektrometrische Analyse der kleinen Proteine wurde hierbei nach Isolation und Reinigung der solubilisierten Komplexe über Dichtegradientenzentrifugation mittels MALDI-MS durchgeführt. Die Identifikation erfolgte über die Bestimmung der apparenten Molekularmasse. Dabei wurde das Genprodukt von *PsbW* als sechstes Protein des RCII identifiziert.

Beim kleinsten im Gel visualisierbaren PSII-Subkomplex handelt es sich um den monomeren RC47-Komplex. Ihm fehlt das innere Antennenprotein CP43. Detektiert wurden die UEn CP47, D1, D2, PsbE, PsbF, PsbI, PsbTc und PsbW. Im RC47-Dimer wurden zusätzlich PsbL und PsbK nachgewiesen, die für die Dimerisierung verantwortlich sein sollen. Die Existenz des RC47-Subkomplexes von PSII *in vivo* ist nach wie vor umstritten. Obwohl seine Existenz als dimerer Komplex nach Kristallisation elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde (Hankamer et al., 1997; Rhee et al., 1998), gilt er bis heute zum Teil als Artefakt, das durch die Verwendung von Detergenzien zur Präparation der Membranproteinkomplexe entsteht (Szabo et al., 2001).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Rokka et al. bei Versuchen zur Assemblierung von PSII in Spinat, über radioaktive Markierung der AS Methionin (Met) (Rokka et al., 2005). Hierbei



wurden dem RC47-Monomer zusätzlich die UEn PsbH, PsbM und PsbR zugeordnet. Das fertig assemblierte PSII-Monomer enthält außerdem CP43 und PsbK. Von den insgesamt sieben detektierten UEn des RC47-Monomers PsbF, PsbH, PsbI, PsbK, PsbM, PsbR und PsbTc, wurden PsbH und PsbK über N-terminale Sequenzierung und PsbR über Immunodetektion identifiziert. Die Existenz der verbleibenden vier UEn PsbF, PsbI, PsbM und PsbTc wurde aufgrund der radioaktiven Markierung von Proteinen im SDS-Gel vermutet, da es sich bei diesen Untereinheiten um die einzig verbleibenden PSII-UEn handelt, die ein Met innerhalb ihrer Primärsequenz besitzen. Eine MS-Analyse zur Identifikation dieser UEn erfolgte nicht. Proteine, die kein Met innerhalb ihrer Primärsequenz enthalten (z. B. PsbE) wurden nicht berücksichtigt.

Eine exakte Bestimmung der Molekularmassen der hochmolekularen RCII-UEn D1 und D2 wurde von Whitelegge et al. durchgeführt (Whitelegge et al., 1998). Innerhalb des gleichen Arbeitskreises wurde ein paar Jahre später das Proteom der Granathylakoide untersucht (Gomez et al., 2002). Hierbei wurden neben einer Reihe von Proteinen aus PSI, dem LHC, dem wasserspaltenden Apparat, dem RCII und dem Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex auch nahezu alle kleinen UEn aus PSII detektiert. Es handelte sich dabei um sämtliche für PSII postulierte Genprodukte mit Ausnahme von *psbN*, *PsbX* (falsch annotiert) und *PsbY-1*. Obwohl sich 64% des Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex ebenfalls in den Granastapeln befinden (Albertsson, 2001) und der Komplex damit Bestandteil der Präparation war, wurden allerdings lediglich die Genprodukte von *petC* und *petD* isoliert. Die extrem hydrophoben niedermolekularen Proteine des Komplexes PetG, PetL, PetM und PetN konnten nicht detektiert werden.

Grundsätzlich war die Vorgehensweise zur Analyse von MP in allen MS-basierten Studien ähnlich. Zunächst wurden Lipide, Pigmente, Salze und Detergenzien durch Dialyse der isolierten Proteinkomplexe gegen 5% Essigsäure (HOAc) (Sharma et al., 1997) oder Präzipitation der Proteine mit Aceton entfernt (Whitelegge et al., 1998). Die Beladung der Chromatographiesäule mit den vorgereinigten Proteinen erfolgte in 5% HOAc (Sharma et al., 1997) bzw. in 60% Ameisensäure (FA) (Whitelegge et al., 1998). Zur RP-LC-MS-Analyse wurden verschiedene Lösungsmittel verwendet, um die zum Teil extrem hydrophoben Proteine von der Chromatographiematrix zu eluieren. Als Standardgemisch wurde ein Wasser-/Acetonitrilgradient (bis 90% ACN) zur Elution verwendet (Sharma et al., 1997). Gerade extrem hydrophobe oder höhermolekulare Proteine wurden dabei oft nur ineffizient von der Säule gelöst. Verbesserte Ausbeuten wurden bei Verwendung eines Ameisensäure-/2-Propanolgradienten erzielt (Whitelegge et al., 1998). Die chromatographische Auflösung wurde dabei allerdings reduziert. Die Messungen wurden entweder *offline* (Sharma et al.,

1997) oder *online*, durch Kopplung von LC und MS durchgeführt (Whitelegge et al., 1998). Bei der aufwendigeren *offline* Messung wurde das konzentrierte Probenmaterial nach der Chromatographie in Fraktionen gesammelt und anschließend über ESI-MS bzw. MALDI-MS analysiert. Zum Transfer in das MALDI-MS wurden die Proben in 60% 1-Propanol, 5% Essigsäure gelöst. Als universelle Elektrospraylösung diente ein Gemisch aus 22.5% ACN, 25% 1-Propanol und 25% 2-Methoxyethanol und 0.05% TFA (Sharma et al., 1997). Bei online Messungen wurde der Analyt direkt in der Lösungsmittelkonzentration ionisiert, in der das Molekül von der Chromatographiematrix eluiert wurde. Eine Isolation der niedermolekularen Proteine aus Komplexen, die über native PAGE getrennt wurden, ist bis heute nicht beschrieben.

### 2.5.2 Die LHCP

Experimentell ist eine Identifikation von LHCP durch den Vergleich der berechneten Masse aus der abgeleiteten DNA-Sequenz und der apparenten Masse nach Trennung in der SDS-PAGE möglich (Bassi et al., 1987; Peter et al., 1991; Bassi et al., 1992). Ein Nachteil dieser Methode zur Proteinmassenbestimmung ist die relativ niedrige Auflösung von ~ 1 kDa. Dies gilt vor allem für Proteine unter 15 kDa (Sharma et al., 1997). Außerdem kann es deutliche Abweichungen zwischen der Laufhöhe des Proteins im Gel und der aus der Gensequenz abgeleiteten Molekularmasse geben (Schwartz et al., 1990; Zolla et al., 2003). Eine umfassende Charakterisierung des LHCII-Komplexes wurde über RP-LC-MS durchgeführt (Corradini et al., 2000; Zolla et al., 2003). Dabei ist es sogar gelungen isomere Formen von Proteinen (z. B. von Lhcb1) zu trennen (Huber et al., 2001). Signifikante Sequenzunterschiede innerhalb des N-terminalen Sequenzabschnitts der Proteinisomere führen zu unterschiedlichen Retentionszeiten. Eine nachfolgende Identifikation des Proteins ist möglich, wenn die gemessenen Molekularmassen mit den theoretisch berechneten Massen aus der abgeleiteten Gensequenz korrelieren. Die erreichte Messgenauigkeit beträgt etwa  $\pm 2.5$  Da. In der Praxis weichen die berechneten und gemessenen Werte jedoch häufig voneinander ab. Als Gründe werden posttranslationale Modifikationen, unbekannte Prozessierungsstellen, die Existenz verschiedener isomerer Formen des gleichen Proteins, Fehler bei der DNA-Sequenzierung, sowie chemische Modifikationen während der Probenpräparation genannt.

### 3 Aufgabenstellung

Trotz der Erfolge, die bis heute bei der Analyse von Membranproteinen erzielt werden konnten, bleibt deren Charakterisierung mit Hilfe von 2D-PAGE, Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften schwierig und damit wenigen Spezialisten auf dem Gebiet vorbehalten.

Diese Arbeit soll neue Einsichten in die Zusammenhänge geben und helfen die Problematik bei der Analyse von MP besser zu verstehen und damit den Umgang mit diesen Polypeptiden zu vereinfachen. Neben neuen Lösungsansätzen werden gleichzeitig die zum Thema bekannten Ansätze zusammengefasst.

Ein Ziel der Versuche war es, das funktionelle Proteom der Thylakoidmembran zu definieren und die vorhandenen Membranproteinkomplexe über die massenspektrometrische Identifikation ihrer Untereinheiten zu charakterisieren. Dabei war das Hauptaugenmerk auf die Detektion und Identifikation der extrem homologen Proteine der Lichtsammelkomplexe von PSII, sowie der niedermolekularen Untereinheiten gerichtet. Nach heutigem Wissenstand spielen Letztere eine entscheidende Rolle für die Assemblierung der Komplexe.

Durch den systematischen Vergleich unterschiedlicher Arten von Proteinen sollten als weiteres Ziel Parameter identifiziert werden, die für die Probleme bei der Isolation und Detektion von Peptiden nach Verdau der Proteine verantwortlich sein könnten.

Um diese Ziele zu erreichen mussten Verfahren angewendet und entwickelt werden, die es ermöglichten alle Arten von Proteinen effizient zu isolieren und somit für die Detektion besser zugänglich zu machen. Außerdem sollte zusätzlich zur immunologischen Detektion ein verlässliches, reproduzierbares und sensitives System zur Identifikation der niedermolekularen Photosystemuntereinheiten geschaffen werden, das zudem universell auf verschiedene Proteine anwendbar war.

## 4 Allgemeiner Teil zur Massenspektrometrie

Heutzutage stellt die Massenspektrometrie die sensitivste Methode zur Charakterisierung von Biomolekülen dar. Dabei gelten ESI (*ElectroSpray Ionization*) und MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization*) als schonende Techniken zur Ionisierung von Biomolekülen (Karas et al., 1988; Fenn et al., 1989; Mann et al., 2001; Griffiths et al., 2001). Bei der ESI handelt es sich um ein kontinuierliches, bei der MALDI um ein pulsierendes Ionisierungsverfahren. Die Kombination mit verschiedenen Massenanalysatoren, wie dem *TOF (Time of Flight)*, dem Quadrupol oder der Ionenfalle ermöglicht die Charakterisierung von Proteinen bis in den subfemtomol-Bereich (Wilm et al., 1996; Kristensen et al., 2000).

### 4.1 ESI-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen (hier: Proteine bzw. Peptide) setzt die Überführung geladener Analytmoleküle in Gasphasen-Ionen voraus (Gaskell, 1997). Elektrospray (ES) ist optimal geeignet für die Ionisierung polarer Moleküle. Die Elektrospray Ionisierung basiert auf der Vernebelung eines Flüssigkeitsstroms unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes. Aus der Probenlösung wird dabei ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt. Der Durchbruch der Technik erfolgte Ende der 80er Jahre, als Fenn und Mitarbeitern das erste Mal die Kopplung einer ESI-Quelle mit einem Quadrupol Massenspektrometer gelang (Yamashita et al., 1984). Die schonende Ionisierung erlaubte ein paar Jahre später erstmals die Analyse von Proteinen über mehrfach geladene Analytionen (Fenn et al., 1989).

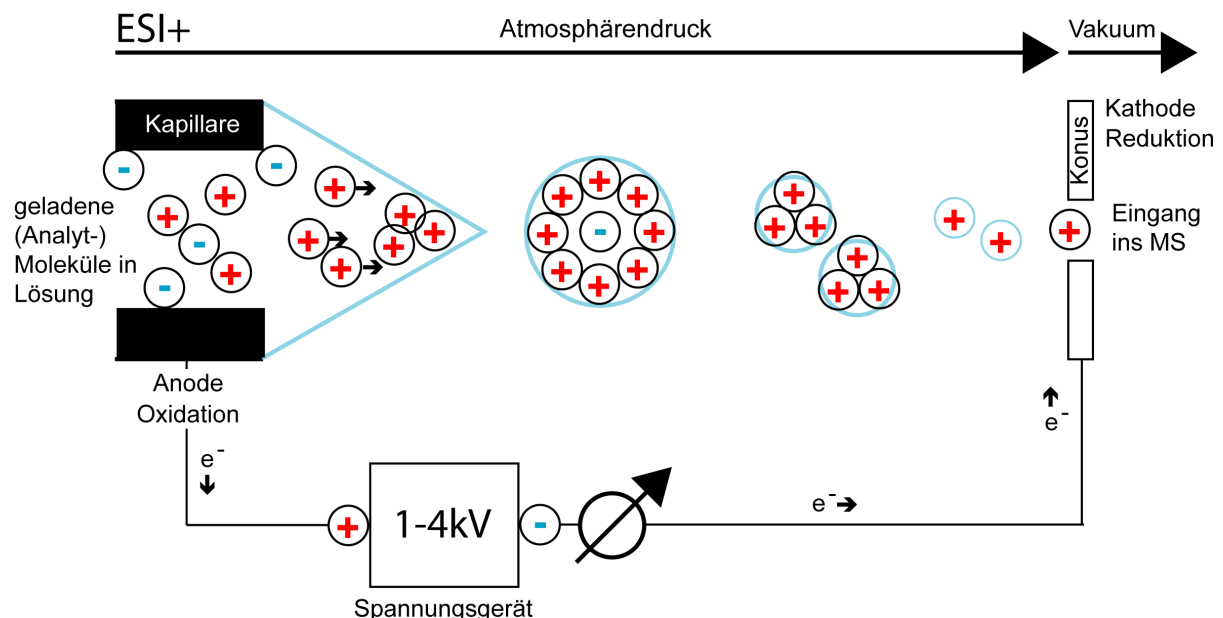
#### 4.1.1 ES-Prozess

Bei der ESI liegen die Analytmoleküle in gelöster und bis zu einem gewissen Grad, in ionisierter Form vor. Die Bildung von Ionen in der Vernebelungslösung erfolgt durch Anlagerung eines Protons ( $H^+$ ) oder Kations (z. B.  $Na^+$ ). Im ES-Prozess werden die gelösten Ionen in Gasphasen-Ionen umgewandelt.

Bei der Vermessung positiv geladener Teilchen stellt die Kapillare die Anode, der Konus des MS die Kathode dar (vgl. Abb. 3, S. 31) (Griffiths et al., 2001). Beim Austritt des Flüssigkeitsstroms und der darin gelösten Analyten aus der Kapillare in das elektrische Feld bildet sich der sogenannte Taylor Konus, der schließlich in einen feinen Nebel aus hochgeladenen Tröpfchen mit positiver Überschussladung übergeht, welche durch die Verdampfung des Lösungsmittels (Elektrotrocknung) immer kleiner werden. Die Vollständigkeit der Desolvatisierung ist abhängig von der Stärke des elektrischen Feldes, der Flussrate und dem verwendeten Lösungsmittel. Bei hohen Flussraten oder hohem

Wasseranteil in der Spraylösung kann die Evaporation durch Erhöhung der Konustemperatur oder ein Trocknungsgas (z. B.  $N_2$ ) verbessert werden. Der heiße Gasstrom unterstützt die Verdampfung des Lösungsmittels (Whitehouse et al., 1985; Bruins et al., 1987).

Coulomb-Explosionen, hervorgerufen durch die Abstoßung gleicher Ladungen, führen schließlich zum Zerfall der Tröpfchen. Die Gasphasenionen (Analytmoleküle) entstehen am Ende des Prozesses, wenn die gesamte Flüssigkeitshülle evaporiert ist. Der Weg der desolvatisierten Analytmoleküle in das Massenspektrometer wird bestimmt durch den Druck- und Potentialgradienten zwischen Kapillare und Gegenelektrode (Kathode). Die Menge der gebildeten Gasphasenionen ist abhängig von der Effektivität der Ladungstrennung innerhalb der Spraykapillare (Cech et al., 2001). Bei einem hohen Anteil an Gegenionen (z. B. bei hoher Salzkonzentration!) innerhalb der gebildeten Tröpfchen wird ein entsprechend geringerer Anteil an positiven Gasphasenionen des Analyten erzeugt, und die Intensität der Signale ist geringer. Der Übergang der Gasphasen-Ionen vom Atmosphärendruck in das Vakuum des Massenspektrometers erfolgt über eine Öffnung in der Gegenelektrode (Konus). Lediglich ein geringer Teil der Ionen (ca. 10%) gelangt durch diese Öffnung ins Innere des MS. Der Rest wird an der Metalloberfläche des Konus neutralisiert. Über elektrische Linsen (*Skimmer*) werden die Ionen im MS weitergeleitet und fokussiert. Die Ionisierung findet bei Atmosphärendruck, die anschließende Analyse der freien Ionen im Hochvakuum statt.



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Ionisierungsprozesses beim Elektrospray (+)**

Ausgangspunkt für den ESI-Prozess ist eine Lösung mit geladenen (Analyt-) Molekülen. Nach Anlegen einer hohen positiven Spannung an der Kapillare, kommt es im elektrischen Feld zwischen Kapillare und Gegenelektrode zur Bildung eines Flüssigkeitskonus mit einem Überschuss an positiven Ladungen an der Oberfläche. Mit zunehmendem Abstand zur Kapillare geht dieser in hochgeladene Mikro-Tröpfchen über. Die stetige Verdampfung des Lösungsmittels führt aufgrund der starken Abstoßungskräfte gleichgeladener Ionen zu einem explosionsartigen Zerfall der Tropfen (Coulomb Explosion) in kleinere Tröpfchen. Am Ende, wenn das

Lösungsmittel vollständig verdampft ist, bleiben im Vakuum des MS geladene, gasförmige Ionen der Analytmoleküle übrig.

Elektrochemische Oxidationsreaktionen negativ geladener Teilchen an der Anode führen zu einem Elektronenfluss zur Kathode, an der entsprechend die Reduktion eines Teils der ankommenden positiv geladenen Ionen abläuft. (Abbildung verändert nach (Kearle, 2000).

Nachteil der ES-Ionisierung ist die zeitaufwendige und komplizierte Technik, die gegenüber der MALDI etwa um den Faktor 10 geringere Sensitivität, sowie die geringe Toleranz gegenüber Verunreinigungen wie z. B. Salzen oder Detergenzien. Generell führt die Präsenz von Verunreinigungen zu erhöhtem chemischem Hintergrundrauschen, zur Unterdrückung von Analytsignalen und zur Bildung von Adduktionen ( $K^+$   $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ). Damit wird die Sensitivität einer Messung vermindert. Deshalb ist bei der Probenvorbereitung für die ESI-MS ein Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt unbedingt erforderlich. Beim statischen ES (*offline*) werden dabei die Analytmoleküle an eine Mikrosäule gebunden, die in eine Pipettenspitze eingebettet ist. Eine zusätzliche zeitliche Trennung der verschiedenen in einer Probe vorhandenen Analyte kann durch Kopplung von Flüssigkeitschromatographie (LC) an das MS erreicht werden (vgl. Kapitel 2.4.4.4, S. 25).

### 4.1.2 Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie

ESI und MALDI sind die gängigsten Techniken zur Ionisierung von Proteinen bzw. Peptiden. Je nach Methode werden unterschiedliche Arten von Daten generiert, die zur Identifikation des Zielproteins verwendet werden können.

Im Rahmen der Proteinanalyse ist der *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) eine schnelle und einfache Methode zur Identifikation von Proteinen nach 1D bzw. 2D-Gelelektrophorese (Henzel et al., 1993; Mann et al., 1993; Cottrell, 1994).

Grundlage für den PMF ist, dass jedes Protein nach Abbau mit einer spezifischen Endoprotease ein charakteristisches Peptidmuster besitzt. Die Massen der entstehenden Peptide werden mittels MALDI-MS detektiert und mit den für die einzelnen Proteine einer Datenbank theoretisch zu erwartenden Massen verglichen. Übereinstimmungen werden statistisch bewertet und erlauben letztlich die Identifikation eines Proteins mit einer definierten Wahrscheinlichkeit.

Trotzdem ist die Information aus dem PMF oft nicht ausreichend um alle Proteine eines Gels zu identifizieren. Das Ergebnis der Datenbanksuche ist oft nicht signifikant, wenn ein Spot nach Verdau nur eine geringe Anzahl an Peptiden liefert, das gesuchte Protein nicht in der Datenbank vorhanden ist, sich mehr als ein Protein in einem Spot befindet oder bei Modifikationen einzelner Aminosäuren. In diesen Fällen hilft nur die *de novo* Sequenzierung

der detektierten Peptide (Mann et al., 1994; Eng et al., 1994; Yates et al., 1995; Papayannopoulos, 1995; Rowley et al., 2000; Zhang et al., 2000).

Dazu werden die Peptide mit Hilfe der Tandem-MS Technik analysiert. Diese erlaubt im ersten Schritt die selektive Auswahl eines Vorläufer-Ions (hier: Peptidion) aus einem Peptidgemisch (MS-Spektrum), das nachfolgend in für seine Struktur signifikante Fragmentationen (hier: Peptidfragmente) gespalten wird (de Hoffmann, 1996; Hunt et al., 1986). Eine detaillierte Erklärung des Fragmentierungsprozesses ist auf Seite 37 in Kapitel 4.1.3.4 dargestellt. Die Spaltung erfolgt durch die Kollision mit einem inerten Gas (Argon). Im zweiten Teil des Prozesses werden die Peptidfragmente nach ihrem Masse zu Ladungs- ( $m/z$ ) Verhältnis aufgetrennt und im MSMS-Spektrum detektiert. Die Peptidsequenz kann durch die Interpretation der Daten aus der Fragmentierung berechnet werden. Diese Art der Datenanalyse wird als *de novo* Sequenzierung bezeichnet.

Im Gegensatz zum PMF ist bei der *de novo* Sequenzierung nicht die Anzahl der gefundenen Peptide für einen signifikanten Treffer in der Datenbank entscheidend, sondern die Qualität der Fragmentspektren und damit die Länge der ermittelten (Teil-) Sequenz. Diese hängt von der Aminosäurezusammensetzung und der Signalintensität eines Peptids ab. Ab einer Sequenzlänge von  $> 6$  As ist eine Vielzahl dieser Peptidsequenzen spezifisch für das Protein aus dem sie stammen. Zum Teil reicht die Information aus einem einzigen analysierten Peptid bereits für eine signifikante Identifikation aus.

Obwohl mit MALDI-MS eine *de novo* Sequenzierung (MALDI-PSD) von Peptiden heutzutage ebenfalls möglich ist, bleibt die Interpretation der Spektren schwierig. Der Grund hierfür liegt in der oft schlechten Qualität der Fragmentierungssignale. Erst der Einsatz von ESI-MSMS ermöglicht eine effiziente *de novo* Sequenzierung von Peptiden.

### **4.1.3 Auswertung von MSMS-Spektren**

#### *4.1.3.1 Auflösung einzelner Peptidsignale*

Entscheidend für die sichere Unterscheidung von relevanten Signalen (Peptidsignale) ist die vom MS erreichte Auflösung. Dies gilt vor allem dann, wenn ein Spektrum eine Vielzahl unterschiedlicher Signale enthält und die einzelnen Signale sehr nahe beieinander liegen bzw. überlappen.

Die Fähigkeit eines Massenspektrometers zwei Massen ( $M_1$ ;  $M_2$ ) voneinander zu trennen wird Auflösung ( $R = \text{resolution}$ ; ohne Einheit) genannt. Berechnet wird die Auflösung anhand folgender Gleichung:

$$R = M/(\Delta M)$$

Dabei entspricht  $M$  der Peptidmasse und  $M_2 - M_1$  ( $\Delta M$ ) der Breite des Signals. Die Auflösung eines Signals berechnet sich folglich aus der Peptidmasse ( $M$ ), die durch die Breite des Signals ( $\Delta M$ ) dividiert wird. Dazu ist es nötig festzulegen in welchem Abschnitt des Signals die Breite bestimmt wird. Gebräuchlich ist hierbei der Wert bei 50% der Intensität.

Die durchschnittliche Auflösung, die mit der Q-TOF I zu erreichen ist beträgt zwischen 5000 und 7000, wobei die Auflösung mit steigender Masse schlechter wird. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, wie nahe zwei unterschiedliche (Peptid-) Signale bei einer gegebenen Masse von 500 und einer Auflösung von 5000 beieinander liegen dürfen, um noch separiert zu werden. Löst man Gleichung 1 nach  $\Delta M$  auf ergibt sich eine Signalbreite von  $0.1 m/z$ . Zwei Signale müssen somit einen Mindestabstand von  $0.1 m/z$  haben um noch unterscheidbar zu sein. In diesem Beispiel also  $m/z$ -Werte von  $\leq 499.9$  bzw.  $\geq 500.1$  besitzen.

#### 4.1.3.2 Isotopenverteilung

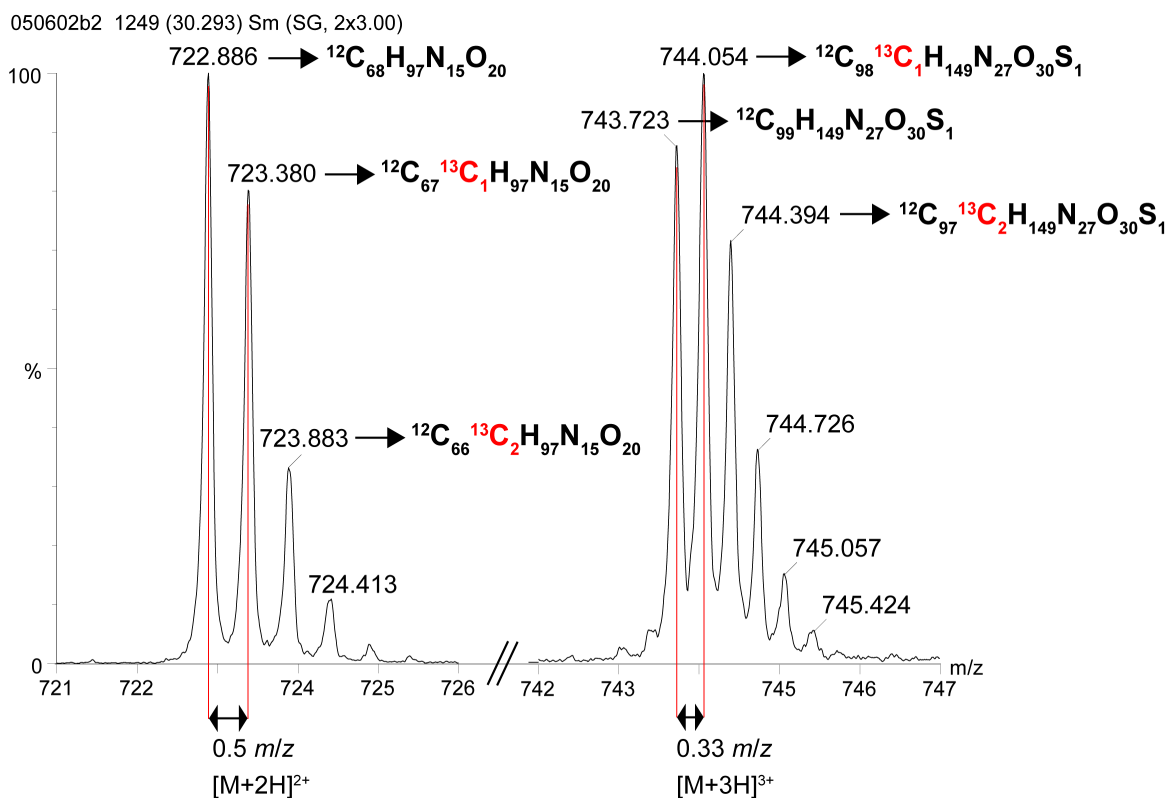
Chemische Elemente sind häufig Gemische aus Isotopen. Die unterschiedliche Anzahl von Neutronen im Atomkern führt dabei zu unterschiedlichen Molekulargewichten der Elemente. Die aus den Elementen aufgebauten Moleküle gleicher Art besitzen aufgrund der Isotopenverteilung ebenfalls unterschiedliche Massen, die sich in der Verteilung des massenspektrometrischen Signals auf mehrere, eng beieinander liegende Einzelsignale manifestiert (Yost et al., 1990). Die natürliche Verteilung des  $^{13}\text{C}$ -Isotops (1.1%) ist dabei die Hauptursache für die heterogene Massenverteilung eines Moleküls.

Bei Peptiden und Proteinen können bei entsprechender Auflösung eine Serie von Isotopensignalen unterschieden werden. Die Masse eines Moleküls (AS, Peptid und Protein) wird hauptsächlich durch zwei Größen definiert, die monoisotopische und die durchschnittliche Masse. Die Masse des Isotopensignals mit der geringsten  $m/z$  wird dabei als monoisotopische Masse bezeichnet. Das zugrunde liegende Peptid ist ausschließlich aus Elementen aufgebaut, die jeweils aus dem am häufigsten vorkommenden Isotop bestehen (z. B.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ , etc.). Da dieser Fall aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung für die verschiedenen Elemente der Wahrscheinlichste ist, ist das erste Isotopensignal eines Moleküls bis etwa 1500 Da das Intensivste. Bei schwereren Peptiden verschiebt sich das Intensitätsmaximum zunehmend auf die folgenden Isotopensignale (Abb. 4, S. 35), da



statistisch mit steigender Molekularmasse (MM) gleichzeitig das Vorhandensein eines selteneren Isotops wahrscheinlicher wird. Das monoisotopische Signal wird zur *de novo* Sequenzierung der Peptide herangezogen.

Die zweite Größe in diesem Zusammenhang ist die durchschnittliche Masse“ (*average mass*). Bei der Berechnung dieser Masse werden die durchschnittlichen Atomgewichte der einzelnen Elemente unter Einbeziehung der vorkommenden Isotope ermittelt. Zur Verdeutlichung dienen zwei Peptide aus CP47 von *Synechocystis* (PCC 6803) (Abb. 4). Für das neutrale Peptid T15 mit der Summenformel  $C_{68}H_{97}N_{15}O_{20}$  beträgt der Unterschied zwischen der monoisotopischen Masse (1443.703 Da) und der durchschnittlichen Masse (1444.607 Da) 0.904 Da. Mit zunehmender MM eines Teilchens wächst ebenfalls die Differenz zwischen den beiden Größen. Bei T17 ( $C_{99}H_{149}N_{27}O_{30}S_1$ ) beträgt der Unterschied bereits 1.434 Da.



**Abb. 4: Isotopenmuster zweier Peptide aus CP47 (Synechocystis, PCC 6803)**

Die Isotopenverteilung der Peptide T15 (links) und T17 (rechts) aus CP47 (Synechocystis, PCC 6803) sind im abgebildeten MS-Spektrum dargestellt. T15 wird im ESI-MS als  $[M+2H]^{2+}$  und T17 als  $[M+3H]^{3+}$  detektiert. Der Abstand der Isotopensignale beträgt folglich 0.5 m/z bzw. 0.33 m/z. Für das Isotopenmuster von Proteinen sind im Wesentlichen die beiden Kohlenstoffisotope  $^{12}C$  und  $^{13}C$  verantwortlich, deren Verhältnis in der Natur ca. 99:1 beträgt. Je größer das Peptid, desto höher ist folglich die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von einem oder mehreren  $^{13}C$ -Atomen (rechtes Signal). Die folgenden Isotopensignale sind ein Gemisch aus  $^{13}C$  und weiteren, seltener vorkommenden Isotopen anderer Atome (z. B.  $^{15}N$  und  $^{18}O$ ; Anteil in der Natur ca. 0.4% und 0.2%). Die Zusammensetzung der Signale kann anhand des MS-Spektrums nicht bestimmt werden und wurde deshalb hier nicht näher spezifiziert.

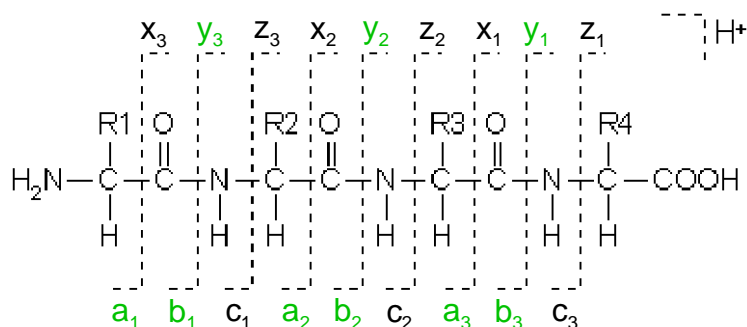
Der Abstand der Isotopensignale ist abhängig von der Anzahl der positiven (negativen) Ladungen des Peptids. Für einfach geladene Peptide beträgt der Abstand 1 m/z (= 1 Da). Bei

doppelt Geladenen halbiert sich der Abstand auf  $0.5 m/z$  (Abb. 4, S. 35, links). Die Isotopensignale dreifach geladener Peptidionen liegen um  $0.33 m/z$  (Abb. 4, S. 35, rechts) und die vierfach Geladener nur noch um  $0.25 m/z$  auseinander, usw.

#### 4.1.3.3 Nomenklatur der Fragmentationen

Der Fragmentierungsprozess in der Kollisionszelle des Q-TOF Massenspektrometers findet bei niedriger Kollisionsenergie (*Low-Energy Collision Induced Dissociation*) statt. Die Peptide brechen unter diesen Bedingungen vorwiegend an der Peptidbindung auseinander. Dabei reichen Dissoziationsenergien in einem Bereich von 10–100 eV zur Fragmentierung der Peptide aus.

Befindet sich die Ladung am C-terminalen Fragment, so wird das Ion per Definition als x-, y- oder z-Fragment bezeichnet (Biemann, 1990). Im umgekehrten Fall, wenn sich die Ladung am N-terminalen Fragment befindet, handelt es sich um a-, b- oder c-Fragmente (vgl. Abb. 5). Bei Niedrigenergie-Stoßaktivierung entstehen durch den Bruch der Peptidbindung überwiegend a-, b- und y-Ionen, sowie deren Satelliten-Ionen, die durch die Abspaltung niedermolekularer Gruppen zustande kommen (Papayannopoulos, 1995). Diese sogenannten Neutralverluste treten z. B. bei Peptiden mit endständigem Arginin auf, welches während des Fragmentierungsprozesses eine Ammoniumgruppe (-17 Da; mit  $b^*$ ,  $y^*$  bezeichnet) abspalten kann (Lottspeich et al., 1998). Peptide, welche die Aminosäuren Serin (Ser) bzw. Threonin (Thr) enthalten verlieren oft ein Molekül  $H_2O$  (-18 Da; mit  $b^\circ$ ,  $y^\circ$  bezeichnet) während der Fragmentierung.



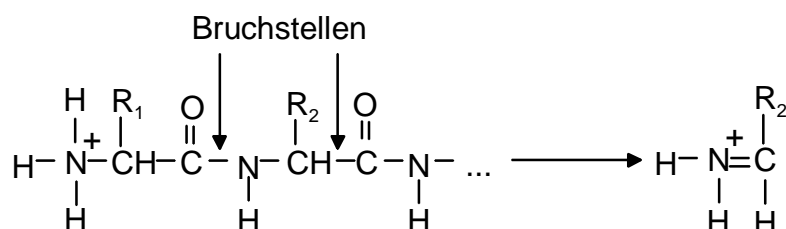
**Abb. 5: Theoretische Bruchstellen des Peptidrückgrats bei der Fragmentierung**

In Abhängigkeit von der Bruchstelle am Peptidrückgrat werden die auftretenden Fragmente unterschiedlich benannt (Biemann, 1990). Die bei Niedrigenergie-Stoßaktivierung auftretenden Fragmente sind grün markiert.

Die Ladung eines Fragments sitzt virtuell entweder am N- oder am C-Terminus. Dabei ist nicht entscheidend, wo die Ladung am Fragment zu finden ist (Seitenkette, N- oder C-Terminus). Es wird aber angenommen, dass einfach geladene y-Ionen ihre Ladung als  $NH_3^+$ -Gruppe (Ammonium) tragen und b-Ionen als  $CO^+$ -Gruppe (Carbenium) (Lottspeich et al.,

1998). Mit zunehmender Fragmentlänge kommt es zudem häufiger vor, dass die jeweiligen  $y$ - oder  $b$ -Ionen mehr als eine Ladung tragen.

Im unteren Massenbereich ( $< 160 m/z$ ) eines Fragmentspektrums befinden sich die Immonium-Ionen der einzelnen AS. Immonium-Ionen stellen eine Mischung aus  $a$ - und  $y$ -Ion dar (Abb. 5, S. 36 und Abb. 6). Sie können beim Fragmentierungsprozess freigesetzt werden, wenn das Peptid in mehr als zwei Teile zerfällt. Die einzelnen AS verlieren dabei zudem die C-terminale CO-Gruppe ( $28 m/z$ ). Unter Einberechnung der auf dem Stickstoff ruhenden Ladung und der um einen Wasserstoff geringeren Molekularmasse relativ zur N-terminalen Ammonium-Gruppe ergibt sich, dass alle Immonium-Ionen um  $27 m/z$  leichter sind als die Masse der korrespondierenden AS.



**Abb. 6: Allgemeine Formel der Immonium-Ionen**

Anhand des Auftretens des korrespondierenden Immonium-Ions einer identifizierten Aminosäure kann verifiziert werden, ob sich diese auch wirklich innerhalb der Sequenz befindet. Über die Position der Aminosäure im Peptid kann allerdings keine Aussage gemacht werden. Umgekehrt bedeutet das Fehlen des Immonium-Ions nicht zwangsläufig, dass die entsprechende Aminosäure *nicht* im Peptid vorkommt. Alle Aminosäuren können als Immonium-Ionen auftreten, sie bilden jedoch unterschiedlich starke Signale im Spektrum (Papayannopoulos, 1995).

#### 4.1.3.4 Der Fragmentierungsprozess

Ein Ansatz zur Identifikation von Proteinen mittels Massenspektrometrie stellt die Fragmentierung von isolierten Peptidionen mittels MALDI-PSD (*Post Source Decay*) (Spengler et al., 1992) oder ESI-CID (*Collision induced dissociation*) (Shevchenko et al., 1997; Jensen et al., 1999; Shevchenko et al., 2000) dar. Die Methode fand aus Gründen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der ionisierten Peptide ursprünglich nur in der ES-Ionisierung Anwendung. Beide Techniken führen in erster Linie zu einer Fragmentierung der Peptide an ihren Peptidbindungen und damit zur Entstehung von  $b$ - und  $y$ -Ionen (vgl. Kapitel 4.1.3.3, S.36). Die Massendifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden  $b$ - bzw.  $y$ -Ionen

entspricht der Masse einer Aminosäure. Folglich repräsentieren die Signale des Fragmentationsspektrums die Primärsequenz des Peptids.

Voraussetzung für die Fragmentierung eines Peptids ist die Anlagerung eines Protons an der Bruchstelle (Dongré et al., 1996; Wysocki et al., 2000; Griffiths et al., 2001). Die Fragmentionen resultieren somit aus unterschiedlichen Protonierungsstellen am Rückgrat des gleichen Peptids. In einem doppelt geladenen tryptischen Peptid befindet sich ein Proton an dessen basischster Stelle, d. h. an der  $\epsilon$ -Aminogruppe in der Seitenkette des C-terminal gelegenen Arginin oder Lysin. Das zweite Proton befindet sich in der Regel an der  $\alpha$ -Aminogruppe des N-Terminus. Abhängig von der Basizität der ladungstragenden Gruppe ist eine bestimmte Menge Energie (Kollisionsenergie!) nötig, um das Proton zu mobilisieren, d. h. auf das Peptidrückgrat zu verschieben. Die Energie kommt aus dem Zusammenstoß der Peptide mit den Argonmolekülen in der Kollisionszelle. Die Protonierung der Peptidbindung führt zu deren Destabilisierung und schließlich zum Bruch in unterschiedliche Fragmentionen und damit zu einer Serie von b und y-Ionen. B-Ionen werden zum Teil weiter zu a-Ionen bzw. Immonium-Ionen fragmentiert.

Dies erklärt ebenfalls, warum einfach geladene Peptide, wie sie z. B. in MALDI-PSD Spektren ausschließlich vorkommen, mehr Kollisionsenergie benötigen. Da sich bei einem einfach geladenen Peptid das Proton an der basischsten Stelle befindet, wird weitaus mehr Kollisionsenergie benötigt, um das Proton zu abstrahieren (Dongré et al., 1996). Trotz der höheren Kollisionsspannungen ist die Signalintensität der einzelnen Fragmentionen deutlich schwächer und damit schwieriger zu interpretieren. Zudem treten verstärkt Signale interner Peptidfragmente auf, die durch den Bruch zweier Peptidbindungen innerhalb eines Moleküls entstehen und eine Analyse zusätzlich erschweren.

Alle entstehenden Fragmente können nur dann detektiert werden, wenn sie mindestens eine positive Ladung tragen. Die zu erwartende Gesamtladung eines ionisierten Peptids oder Proteins kann näherungsweise aus der Anzahl der basischen AS (Arg, Lys, His) berechnet werden (Mann et al., 2001). Dazu wird eine weitere Ladung addiert, die sich formal an der Aminogruppe des N-Terminus befindet. Die basischen Gruppen stellen den wahrscheinlichsten Aufenthaltsort für das bzw. die Protonen dar. Der bevorzugte Ladungszustand eines Moleküls hängt von der Stärke der in der Vernebelungslösung verwendeten Säure ab (Hufnagel et al., 1996). Mit zunehmender Säurestärke ergibt sich ein erhöhter Protonierungsgrad für die Analytmoleküle. Im Spektrum verschiebt sich der  $m/z$ -Wert nach links, zu den niedrigeren Massen.

Beim Zerfall (MSMS-Analyse) der im ES-Prozess entstehenden, mehrfach geladenen Ionen können die Ladungen in unterschiedlicher Weise über die gebildeten Produktionen verteilt werden. Zum Beispiel kann ein doppelt geladenes Vorläufer-Ion in ein einfach geladenes b und y-Ion zerfallen bzw. in ein doppelt geladenes b oder y-Ion, wobei das korrespondierende Fragment als neutrales Teilchen verloren geht (Jonsson, 2001). Peptide, die beim Verdau mit Trypsin entstehen, besitzen eine basische Aminosäure am C-Terminus. Da die hohe Basizität die Aufenthaltswahrscheinlichkeit einer positiven Ladung erhöht, wird die Bildung von y-Ionen begünstigt (Mann et al., 2001).

#### 4.1.3.5 Berechnung der AS-Sequenz von Peptiden

Die Fragmentierung von Peptiden ist kein rein statistischer Prozess. Die Effizienz der Fragmentierung einer Peptidbindung hängt vielmehr von den beteiligten Aminosäuren ab. Die Fragmentationen treten folglich nicht alle mit der gleichen Signalintensität in den Spektren auf. So bilden z. B. die y-Ionen von Glycin oder Prolin (C-terminales Signal) meist sehr kleine Signale aus, denen ein intensives Signal der N-Terminal benachbarten Aminosäure vorausgeht (Mann et al., 2001).

Die Anzahl an Ladungen der Fragmentationen kann kleiner oder gleich der Anzahl der Ladungen des Mutterions sein. Das heißt Fragmentationen aus einem doppelt geladenen Mutterion können entweder ebenfalls doppelt  $[M+2H]^{2+}$  oder einfach  $[M+H]^{1+}$  geladen sein. Die Sequenzierung findet anhand der einfach geladenen Ionen einer Ionenserie statt. Mehrfach geladene Vertreter müssen entsprechend auf das einfach geladene Ion umgerechnet werden. Die Umrechnung erfolgt nach folgender einfacher Formel:

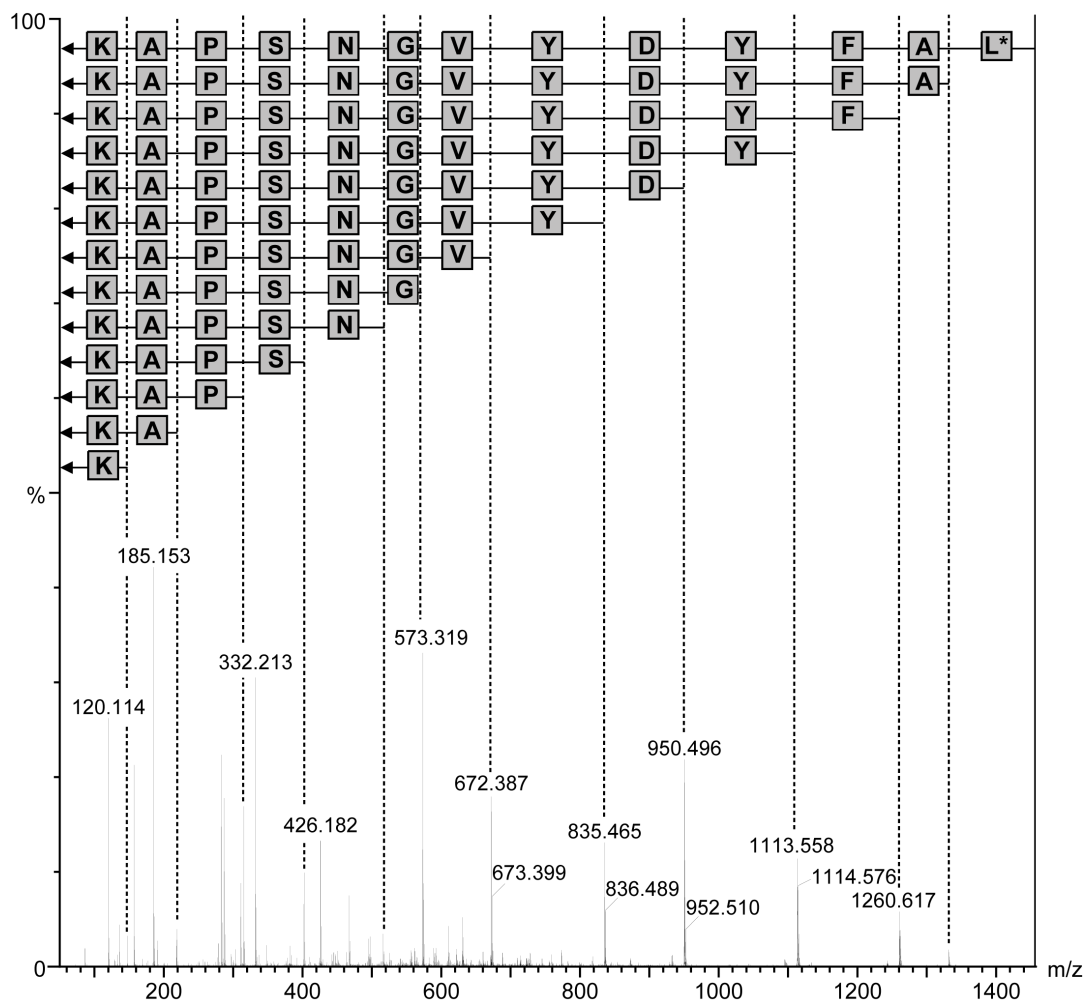
$$[m/z \text{ Ion}]^n * n - (n - 1) = [m/z \text{ Ion}]^{1+}$$

Der  $m/z$ -Wert eines Moleküls mit  $n$ -Ladungen wird mit der Anzahl der enthaltenen Ladungen multipliziert. Anschließend wird die um 1 verminderte Anzahl der Ladungen abgezogen.

Zur Sequenzierung tryptischer Peptide werden in erster Linie die y-Ionenserien herangezogen. Oberhalb des Mutterions bilden diese meist sehr intensive Signale; unterhalb nimmt die Intensität in der Regel ab (Abb. 7, S. 40). Die Signalintensitäten der korrespondierenden b-Ionen verhalten sich genau diametral dazu. Aufgrund der geringeren Anzahl an Signalen im Bereich der hohen Massen eines Spektrums wird die Sequenzierung meist von den hohen zu den niedrigen  $m/z$ -Werten, also vom N- zum C-terminalen Ende des Peptids durchgeführt. Die fortlaufende Peptidsequenz ergibt sich jeweils aus der Massendifferenz zweier benachbarter

Signale einer Ionenserie. Da bis auf wenige Ausnahmen (Ile und Leu, Gln und Lys) jede Aminosäure eine charakteristische Masse besitzt, kann anhand der aus dem Spektrum ermittelten  $\gamma$ -Ionenserie die Aminosäuresequenz des untersuchten Peptids bestimmt werden.

Welche AS den C-terminalen Abschluss bildet hängt von der Sequenzspezifität der verwendeten Protease ab. Im Falle des tryptischen Proteinverdaus muss die C-terminale Aminosäure (=  $\gamma_1$ -Ion) des Peptids entweder Arginin oder Lysin sein. Das Arginin-Signal (156 Da) ist im Spektrum bei  $175\ m/z$  detektierbar, Lysin (128 Da) tritt als Signal bei  $147\ m/z$  auf. Diese Massenwerte kommen durch die Addition von  $H_2O$  und einer Ladung ( $H^+$ ) am  $\gamma_1$ -Ion zustande, welches diese beiden Signale repräsentiert.



**Abb. 7: De novo Sequenzierung von Peptiden mittels tandem ESI-MSMS.**

Fragmentspektrum eines tryptischen Peptids (T15) von CP47 aus *Synechocystis* (PCC 6803) mit der Sequenz Nter-LAFYDYVGNPAK-Cter. Die Masse des Peptids beträgt  $1443.72\ Da$ . Im ESI-MS-Spektrum wird T15 als doppelt geladenes Signal bei  $722.86\ m/z$  detektiert. Die im Spektrum detektierbaren  $\gamma$ -Ionen sind über gestrichelte Linien markiert. Der Abstand zwischen zwei benachbarten  $\gamma$ -Ionen ergibt einen Massenwert, der für eine bestimmte AS charakteristisch ist. Die jeweils korrespondierenden  $b$ -Ionen sind hier nicht dargestellt (Abb. verändert nach Reinders et al. (2004)).

Ob es sich bei einem Signal um ein b- oder y-Ion handelt ist visuell anhand des Spektrums nicht zu unterscheiden. Da in den Spektren eine Vielzahl unterschiedlicher Ionensignale auftritt, z. B. y-Ionen ohne H<sub>2</sub>O oder NH<sub>3</sub>, y-Ionen mit Na<sup>+</sup> oder NH<sub>4</sub><sup>+</sup> anstatt H<sup>+</sup> als Ladungsträger, Immonium-Ionen usw. ist es zum Teil schwierig, das richtige Ion für die Fortsetzung der Sequenz zu finden. Zur Verifizierung der potentiellen y-Ionen können zum Teil die korrespondierenden b-Ionen herangezogen werden. Vom *m/z*-Wert des y-Ions ausgehend werden die b-Ionen nach folgender Formel berechnet:

$$m/z\text{-b-Ion} = [m/z\text{-Mutterion (H}^+) - m/z\text{-y-Ion}] + \text{H}^+$$

Da die b-Ionen, wie bereits erwähnt, lediglich unterhalb der *m/z* des Mutterions gut detektierbar waren, können diese zur Sequenzierung nur in begrenztem Umfang genutzt werden, d. h. nur für y-Ionen im oberen Bereich des Spektrums. Die erhaltenen (Teil-)Sequenzen der Peptide werden schließlich in eine Proteindatenbank eingegeben, um das zugehörige Protein zu identifizieren. Die Berechnung der Sequenzen wird heutzutage größtenteils von speziellen Computerprogrammen übernommen. Da diese Programme noch nicht vollständig ausgereift sind, liefern sie nur zum Teil verlässliche Ergebnisse. Gegebenenfalls müssen diese manuell nachbearbeitet werden.

## **4.2 Aminosäure Modifikationen**

Einige AS sind zugänglich für Modifikationen. Diese führen zur Veränderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften eines Proteins. Die Modifikationen können posttranslational *in vivo* durchgeführt werden und damit zur Funktionalität des Proteins in der Zelle beitragen oder ein Artefakt der Probenpräparation sein. Einige häufig auftretende Modifikationen, die auch in den meisten Suchalgorithmen der Datenbanken gelistet sind, werden im Folgenden vorgestellt.

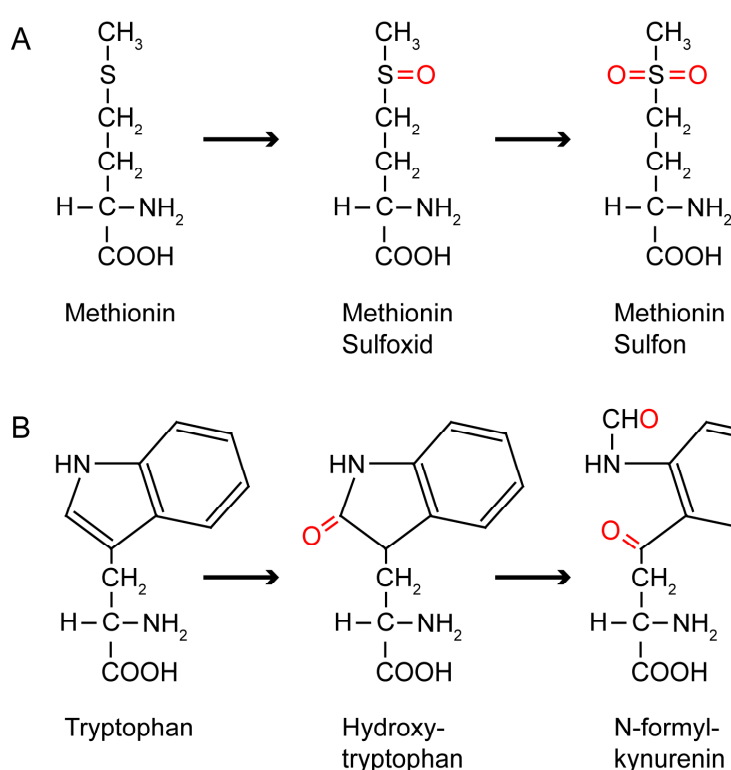
### **4.2.1 Oxidationsreaktionen**

#### *4.2.1.1 Oxidierbare AS*

Eine häufig zu beobachtende Modifikation ist die Oxidation einzelner AS. Die Aminosäuren Methionin (Met), Cystein (Cys), Tryptophan (Trp), Histidin (His) und Tyrosin (Tyr) besitzen jeweils einen oder zwei Oxidationszustände (Davies, 1987).

Vor allem die AS Methionin ist an ihrer Thioether-Seitenkette leicht zugänglich für eine Oxidation. MetO kommt in nativen Proteinen vor und beweist damit seine biologische

Relevanz in der Regulation verschiedener Zellfunktionen, z. B. bei der (De-) Aktivierung der enzymatischen Eigenschaften eines Proteins (Levine et al., 1996; Hoshi et al., 2001). Die Modifikation kann jedoch auch als Artefakt zu verschiedenen Zeitpunkten der Probenpräparation entstehen (Berlett et al., 1997). Unbeabsichtigte Oxidationen treten hauptsächlich während der Gelelektrophorese auf. Als Verursacher gelten hierbei molekularer Sauerstoff der im Gel eingeschlossen wird und die zum Start der Polymerisation enthaltenen starken Oxidantien (Ammoniumpersulfat) (Sun et al., 2004). Die basischen Bedingungen während des Gellaufs begünstigen diesen Vorgang. Methionin kann in zwei Oxidationsformen vorliegen (Swiderek, et al., 1998). Die einfache Oxidation führt zunächst zum Sulfoxid (MetO), das nach Anlagerung eines weiteren Sauerstoffs zum Sulfon (MetO<sub>2</sub>) weiterreagiert (Abb. 8, A). Während die Oxidation von MetO wieder rückgängig gemacht werden kann, ist die Modifikation zum Sulfon irreversibel (Pennington et al., 1995; Lagerwerf et al., 1996).



**Abb. 8: Die Aminosäuren Methionin und Tryptophan mit ihren Oxidationsstufen**

Verschiedene Oxidationszustände der AS Methionin (A) und Tryptophan (B) (Taylor et al., 2003). Beide AS besitzen zwei Oxidationszustände. Methionin wird über Methioninsulfoxid (MetO) zum Sulfon (MetO<sub>2</sub>), Tryptophan zunächst zu Hydroxytryptophan und anschließend zu N-Formylkynurenin oxidiert.

Die monoisotopische Masse von MetO beträgt 147.035 Da, die von MetO<sub>2</sub> 163.031 Da. Damit kann es in den MSMS-Spektren bei alleiniger Betrachtung der Massen zu Verwechslungen mit den AS Phenylalanin

(147.068 Da) und Tyrosin (163.063 Da) kommen. Zumindest MetO und Phe lassen sich im MSMS-Spektrum eindeutig unterscheiden (Lagerwerf et al., 1996). Bei der Fragmentierung eines Peptids, das ein MetO enthält, ergeben sich im Abstand von -64 Da zu den einfach geladenen  $\gamma$ -Ionen charakteristische Satellitensignale. Die Signale sind in jedem  $\gamma$ -Fragmentation zu beobachten, welches das MetO enthält und enden vom N-Terminus aus gesehen eine AS vor dem modifizierten Methionin. Sie resultieren aus der Abspaltung von Methylsulfensäure (CH<sub>3</sub>-SOH) von MetO. Im Gegensatz dazu zeigen sowohl MetO<sub>2</sub> als auch



Tryptophan keine signifikanten Satellitensignale bei der Fragmentierung (Swiderek et al., 1998; Bienvenut et al., 2002).

Die Masse einer AS erhöht sich bei Oxidation um 15.995 Da pro angehängtes Sauerstoffatom. Enthält ein Peptid mehrere oxidierbare AS, erhöht sich die Peptidmasse folglich um ein Vielfaches von „16“. Die uneinheitliche und nicht quantitative Oxidation von Methionin ist problematisch, da durch die Erhöhung der Anzahl an Signalen die Interpretation der MS Spektren erschwert wird. Gleichzeitig wird die Detektierbarkeit der methioninhaltigen Peptide herabgesetzt, da sich die Signalintensität auf die einzelnen Oxidationszustände verteilt.

Es gibt keine Hinweise darauf, dass die enzymatische Spaltung von Proteinen durch eine Oxidation einer benachbarten AS beeinträchtigt wird. Im Gegensatz dazu ist MetO nicht zugänglich für eine, speziell bei Membranproteinen häufig zur Anwendung kommende, chemische Spaltung mit Cyanogenbromid (CNBr) (Hollemeyer et al., 2002). Mit der Oxidation bekommt die unpolare Seitenkette von Met einen hydrophilen Charakter. Der für MetO bestimmte Hydrophobizitätswert ist ähnlich dem von Lysin (Black et al., 1991).

Ähnlich wie im Fall von Methionin existieren auch für Tryptophan zwei Oxidationszustände (Abb. 8B, S. 42). Die AS reagiert mit Sauerstoff zu Hydroxytryptophan und schließlich zu N-Formylkynurenin. Die Masse erhöht sich damit von 186.079 auf 202.074 Da bzw. 218.069 Da. Zugänglich für eine Oxidation sind außerdem sowohl freies Cystein als auch Cystine. Bei Letzteren trägt der Bruch der Disulfidbrücken zur Entfaltung des Proteins und damit zu der Erhöhung der Effizienz bei einem nachfolgenden enzymatischen Verdau bei (Chowdhury et al., 1995). Beide Formen werden zu Cysteinsäure (150.994 Da) oxidiert. Findet die Reaktion unter Anwesenheit von halogenhaltigen Puffersalzen (z. B. NaCl) statt, wird als Nebenreaktion die Halogenierung der AS Tyrosin beobachtet (Chowdhury et al., 1995). Tyrosin wird dabei in einer elektrophilen, aromatischen Substitution zu 3-Chloro- bzw. 3,5-Dichlorotyrosin umgewandelt. Das Ausmaß der Reaktion hängt dabei von der Konzentration des Salzes im Puffer ab. Selbst Spuren von NaCl, wie sie als Verunreinigungen in Chemikalien vorkommen können, sollen ausreichend sein, um einen Teil der Tyrosine zu modifizieren.

#### *4.2.1.2 Rolle der Oxidation von AS bei der Detektierbarkeit von Transmembranhelices*

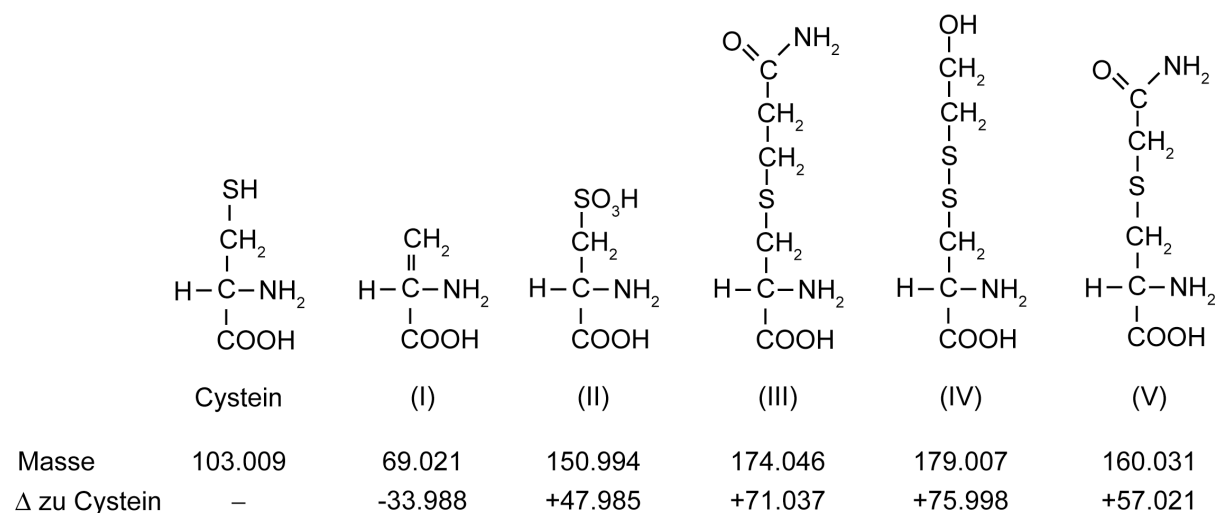
In verschiedenen Quellen finden sich Angaben zum Vorkommen der einzelnen AS in den  $\alpha$ -helicalen TMD von Membranproteinen. Dabei ist Met mit durchschnittlich 4.7% im Vergleich zu Trp (3.0%), Cys (2.0%) und His (1.0%) die am weitesten verbreitete oxidierbare AS innerhalb der  $\alpha$ -Helices. Klammert man His aufgrund seiner uneinheitlichen Oxidierbarkeit aus, so ergibt sich potentiell ein Anteil von etwa 10% an der Gesamtheit aller

AS, die nach einer Oxidation deutlich hydrophiler werden und somit zur Löslichkeit einer TMD beitragen können. Eine Optimierung der Analyse von TMD speziell über die Oxidation von Methionin ist insofern vielversprechend, als 60% aller potentiellen TMD in *E. coli* und fast 50% der entsprechenden Abschnitte in den Proteomen der Eukaryoten mindestens einmal die AS Methionin enthalten (Eichacker et al., 2004).

Eine potentielle Lösung des Problems der Detektierbarkeit stellt somit die Oxidation von AS in hydrophoben Peptiden dar, die eine TMD enthalten. Die Oxidation beispielsweise der AS Methionin bedingt eine deutliche Reduktion ihrer Hydrophobizität. In Abhängigkeit von der Peptidlänge verbessert die Veränderung der physikalischen Eigenschaften einzelner AS potentiell eine Detektierbarkeit der Transmembranpeptide.

#### 4.2.2 Modifikation der AS Cystein

Die Aminosäure Cystein (Cys) bereitet Probleme bei der massenspektrometrischen Analyse von Peptiden. Der Grund hierfür liegt in der Thiol-Seitengruppe, die durch ihre hohe Reaktivität eine Vielzahl von Verbindungen eingehen kann. Die Modifikationen entstehen fast ausschließlich *in vitro* während der Probenpräparation (z. B. Elektrophorese oder In-Gel Verdau). Neben der Bildung von Disulfidbrücken, die *in vivo* an der Ausbildung der Tertiärstruktur der Proteine beteiligt sind, können folgende Cys-Modifikationen auftreten: Dehydroalanin (I), Cysteinsäure (II), Acrylamid-Addukt (III),  $\beta$ -Mercaptoethanol-Addukt (IV) und Carboxyamidomethylcystein (V) (Abb. 9).



**Abb. 9: Modifikationen der AS Cystein**

Neben der monoisotopischen Masse der Cysteinderivate ist die jeweilige Massenänderung gegenüber dem unmodifizierten Cys angegeben.

Um während des In-Gel Verdau die Zugänglichkeit der Schnittstellen für die Protease und eine maximale Sequenzabdeckung zu gewährleisten, wird in einigen Protokollen ein

Reduktions- und Alkylierungsschritt (R&A) durchgeführt (Jeno et al., 1995; Shevchenko et al., 1996; Hale et al., 2004). Die Reduktion der Disulfidbindung zu Thiolgruppen wird über die Reaktion mit Chemikalien erreicht, die Sulfhydryl- oder Phosphingruppen enthalten (z. B. Dithiothreitol (DTT) oder Tris-2-Carboxyethylphosphin-Hydrochlorid (TCEP)). Durch die nachfolgende irreversible Alkylierung mit Iodacetamid wird Cys in das stabile S-Carboxyamidomethylcystein (CAM-Cys; Addukt:  $-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$ ) überführt. Die Schutzgruppe verhindert die Rückbildung der Disulfidbrücken. Dabei erhöht sich die spezifische Masse für die Aminosäure Cystein von 103.009 Da auf 160.031 Da. Eine quantitative Alkylierung der Cysteine nach dem Gellauf wird nur selten erreicht, da freie Acrylamid-Monomere während der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine ebenfalls Cysteine modifizieren können (Hamdan et al., 2001; Mineki et al., 2002). Die dabei entstehenden Acrylamid-Addukte (PAM-Cys; Addukt:  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}_2$ ) sind irreversibel an die Cysteine gebunden. Die spezifische Masse von PAM-Cys beträgt 174.05 Da.

## 5 Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien waren von *p.a.*-Qualität und wurden von den Firmen Bio-Rad, Fluka, GE-Healthcare, Roth, Serva und Sigma bezogen. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Feststoffe in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 5.1 Isolation von Thylakoidmembranen

Die Gewinnung von nativen Membranproteinkomplexen aus Gerstenchloroplasten (*Hordeum vulgare*, L. var. Steffi; Saatzucht Ackermann & Co, Irlbach, D) wurde nach Eichacker et al. durchgeführt (Eichacker et al., 1996). Dabei wurden immer frisch isolierte Plastiden verwendet. Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei ~ 4°C durchgeführt. Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^8$  Chloroplasten (ca. 50 µg Chl) in TMK-Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 6.8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl) lysiert und die Membranen durch Zentrifugation für 2 min bei 3800 x g vom Stroma getrennt. Nach zwei Waschschritten im gleichen Puffer wurden die erneut abzentrifugierten Membranen in 60 µl Probenpuffer (750 mM ε-Aminocapronsäure, 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7.0), 0.5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) resuspendiert. Die Membranproteine wurden anschließend durch Zugabe von 10 µl 10% (w/v) n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DM) solubilisiert. Die Endkonzentration des Detergenz betrug ~ 1%. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Proben für 10 min bei 20.000 x g zentrifugiert, um nicht solubilisiertes Material abzutrennen. Der Überstand mit den Membranproteinkomplexen wurde abgenommen, mit 5 µl Gelbeladungslösung (5% (w/v) Serva blue G-250 in 750 mM ε-Aminocapronsäure) versetzt und auf ein BN-Gel aufgetragen. Pro Gelspur wurde eine Proteinmenge von ~ 400 µg aufgetragen.

### 5.2 Gelelektrophorese

#### 5.2.1 Blau-Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die solubilisierten Membranproteinkomplexe wurden in einer ersten Dimension mittels BN-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Vorschrift zur nativen Trennung von Proteinkomplexen basiert auf der von Schagger und von Jagow entwickelten Methode (Schagger et al., 1991; Schagger et al., 1994). Die BN-PAGE wurde im vertikalen Elektrophoresesystem Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA) durchgeführt. Die Trennung der Proteinkomplexe erfolgte dabei auf einem linearen 6 bis 12%igen Polyacrylamid-Gradienten (6 bzw. 12% Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8), 500 mM ε-Aminocapronsäure, 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0), 20% (w/v) Glycerin (nur bei 12% PAA)).

Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel (4% Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8), 500 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)) von ca. 1-2 cm Höhe überschichtet. Die Abmessungen des Trenngels betragen etwa 18 cm  $\times$  20 cm  $\times$  0,75 mm. Als Molekularmassenstandard wurde ein Gemisch aus lyophilisierten Standardproteinen (*HMW-Marker*; GE Healthcare Europe, Freiburg, D) bestehend aus Thyroglobulin, Ferritin, Katalase, Lactatdehydrogenase und Rinderserumalbumin mit den MM 669, 440, 323, 140, 67 kDa verwendet. Die Trennkapazität des BN-Geles war auf ca.  $2 \times 10^8$  Plastiden limitiert. Zu hohe Proteinkonzentrationen führten zur Präzipitation der Proteine in den Geltaschen bzw. zur Entstehung unscharfer Banden. Der Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0), und 0,02% (w/v) CBB-G250) wurde nach etwa der Hälfte des Gellaufs durch einen farblosen Puffer gleicher Zusammensetzung ohne CBB-G250 ersetzt. Der Anodenpuffer enthielt 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0). Der Gellauf fand bei einer konstanten Stromstärke von 12 mA/Gel statt, während die Spannung kontinuierlich von 400 V auf 1200 V erhöht wurde. Die Elektrophoreseapparatur wurde während des Gellaufs auf ca. 6°C gekühlt. Die Trennung der Proteinkomplexe dauerte unter diesen Bedingungen ca. 4h.

### **5.2.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

#### *5.2.2.1 Die SDS-Gelelektrophorese als 2. Dimension der 2D-PAGE*

Im Anschluss an die native BN-PAGE wurden die Proteinkomplexe in einem denaturierenden Gelsystem in ihre Einzelproteine getrennt (Laemmli, 1970). Die Trennung der Proteine erfolgte in Abhängigkeit von der Molekularmasse (MM). Zur Übertragung der Proteinkomplexe von der ersten Dimension (Blue-Native-PAGE) auf die zweite Dimension (SDS-PAGE) wurden die Spuren des BN-Gels ausgeschnitten und in einer Solubilisierungslösung (2% (w/v) SDS, 66 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2% (v/v)  $\beta$ -Mercapto-Ethanol) bei RT für 20 min unter Schütteln inkubiert. Die Proteine werden dabei denaturiert.

Anschließend wurden die Gelstreifen auf ein SDS-Harnstoffgel aufgelegt. Ein Trenngel mit 12,5% Acrylamid (12,5% (v/v) Acrylamid, 4 M Harnstoff, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,016% (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,05% (v/v) TEMED) erwies sich als geeignet zur Auftrennung von Proteinen zwischen ca. 4 und 120 kDa.

Die Gelstreifen aus der ersten Dimension wurde möglichst trocken und luftblasenfrei aufgelegt, um einen nahtlosen Übergang der Proteine vom BN-Streifen ins SDS-Gel zu gewährleisten. Als Molekularmassenmarker wurden 10  $\mu$ l Proteinstandard (Mark 12 Wide Range Protein Standard, Novex) auf ein Filterpapierstück pipettiert und auf das Gel aufgelegt.

Die verbleibenden Hohlräume wurden mit 0.5%iger Agarose aufgefüllt. Alle zweiten Dimensionen wurden im Ettan Dalt II-System (GE Healthcare Europe, Freiburg, D) durchgeführt. Die Maße der Gele betrug 25.5 x 20.5 x 0.1 cm. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei ca. 15 mA pro Gel und einer konstanten Temperatur von 15°C über Nacht in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS (pH 8.4)).

### 5.2.2.2 Trennung von Standardproteinen über SDS-PAGE

Für die Versuche zum In-Gel Verdau von Proteinen (vgl. Kapitel 5.6.3, S. 60) wurden unterschiedliche Mengen der Standardproteine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH, Acc.-Nr.: P46406), Carbonsäure Anhydrase (CA, Acc.-Nr.: P00921), Ovalbumin (OV, Acc.-Nr. P01012) und Phosphorylase b (Acc.-Nr. P00489) mittels SDS-PAGE getrennt. Die Isolation der Proteine erfolgte mittels sogenannter „SDS-Minigele“ mit einem Format von 10 x 8 x 0.075 cm. Zur besseren Fokussierung der Banden wurde auf das Trenngel (12.5% (v/v) Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0.8), 4 M Harnstoff, 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.016% (w/v) Ammoniumpersulfat, 0.05% (v/v) TEMED) ein Sammelgel mit 4% (v/v) Acrylamid gegossen. Nach der Präparation wurden die Gele einen Tag bei 4°C gelagert, um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten und die Menge an freien Acrylamid-Monomeren zu reduzieren.

Vor dem Probenauftrag wurden die Proteine in SDS-Solubilisierungspuffer (2% (w/v) SDS, 10% (w/v) Saccharose, 66 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.66% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.03% (w/v) Bromphenolblau) für 3 min bei 72°C denaturiert.

Bei einem Teil der Proben wurden die enthaltenen Cysteine vor dem Gellauf reduziert und alkyliert. Zur vollständigen Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Proteine bei 60°C für 15 min in Solubilisierungspuffer inkubiert. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde das Alkylierungsreagenz Iodacetamid zugegeben. Die Endkonzentration betrug 60 mM. Die Alkylierung erfolgte bei RT für 15 min im Dunkeln.

Der Gellauf wurde im Mini-Protean-System (Bio-Rad, Hercules, CA) durchgeführt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von maximal 15 mA pro Gel und 15°C. Sofern die Proteine nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren, wurden sie über die Färbung mit (kolloidalem) Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250 oder G250 visualisiert (vgl. Kapitel 5.3.1, S. 49).

## **5.3 Proteinfärbungen**

### **5.3.1 CBB-Färbung**

Zur Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden die Gele in einer CBB (Coomassie Brilliant Blue) Färbelösung (30% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure (HOAc), 0,2% (w/v) CBB-R250) für 40 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde in einem 30 min dauernden ersten Entfärbeschritt (30% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) HOAc) entfernt. Danach wurde das Gel solange im zweiten Entfärber (10% (v/v) HOAc) inkubiert bis der Hintergrund nahezu vollständig klar war. Die Gele wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung in 1% HOAc aufbewahrt. Die Empfindlichkeit dieser Färbemethode liegt bei etwa 30-100 ng Protein (Patton, 2002; Mackintosh et al., 2003). Der Anteil von Essigsäure und organischem Lösungsmittel in der Färbelösung verbesserte die Löslichkeit des hydrophoben CBB-Moleküls. Gleichzeitig wurden die Proteine während der Färbung denaturiert und damit im Gel fixiert. Dies erleichterte die Farbstoffbindung, da die Farbstoffmicellen besser an die Oberfläche der denaturierten Proteine gelangen können. Ein Verlust an Protein durch Diffusion aus dem Gel wurde dadurch ebenfalls verhindert.

Eine deutlich sensitivere CBB-Färbung war unter Verwendung von kolloidalem Coomassie G250 zu erzielen (Neuhoff et al., 1988; Mackintosh et al., 2003). Die fertige Gebrauchslösung des sogenannten Neuhoff-Farbstoffs enthielt 10% (w/v) Ammoniumsulfat, 2% (w/v)  $H_3PO_4$ , 0,1% (w/v) CBB-G250 und 20% Ethanol. Zur Färbung wurden die Gele über Nacht in der Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes wurde in ddH<sub>2</sub>O durchgeführt. Die Gele wurden anschließend in 1% HOAc gelagert. Mit dieser Methode wurde die Empfindlichkeit um den Faktor zwei verbessert.

### **5.3.2 Entfärbung von CBB-gefärbten Gelbanden**

Unabhängig von der Art des verwendeten Coomassie (G250, R250 oder kolloidales Coomassie) wurde die zerkleinerte Gelbande zur Entfärbung für 10 min in 50 mM  $NH_4HCO_3$ /50% Acetonitril bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei unzerkleinerten Banden dauerte die Entfärbung in Abhängigkeit von der Färbintensität zwei- bis viermal länger.

### **5.3.3 Silberfärbung**

Die Silberfärbung wurde nach dem Protokoll von Blum et al. durchgeführt (Blum et al., 1987). Für ein Gel der Größe 20 x 20 cm wurden von jeder Reaktionslösung 125 ml benötigt. Die Silbernitrat- und die Entwicklerlösung wurden für jede Färbung frisch angesetzt. Zur Färbung wurden die Proteine zunächst für 30 min in einer Lösung aus 40% Ethanol (v/v) und

10% HOAc (v/v) im Gel fixiert. Nach drei Waschschritten für jeweils 20 min, zweimal in 30% Ethanol (v/v) und einmal in ddH<sub>2</sub>O, wurde das Gel zur Verbesserung des Kontrasts für 1 min in 0.02% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde durch dreimaliges Spülen in ddH<sub>2</sub>O entfernt. Die Bindung der Ag<sup>+</sup>-Ionen an die Proteine erfolgte durch Inkubation in 0.1%iger (w/v) Silbernitratlösung bei 4-8°C für 20 min. Nach dem Spülen in ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel in eine neue Färbeschale überführt und nochmals für 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Reduktion der gebundenen Ag<sup>+</sup>-Ionen erfolgte in einer Entwicklerlösung aus 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v, pH ~ 11.5), 0.05% (v/v) Formaldehyd und 0,002% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Nach dem Erreichen der gewünschten Färbeintensität wurde die Reaktion durch Waschen in 5% (v/v) HOAc gestoppt. Nach drei abschließenden Waschschritten in ddH<sub>2</sub>O für jeweils 10 min wurde das Gel in 1% (v/v) HOAc gelagert. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proteinbanden direkt nach der Färbung ausgeschnitten und tryptisch verdaut.

### 5.3.4 Entfärbung von silbergefärbten Gelbanden

Die silbergefärbten Gelbanden wurden nach Gharahdaghi et al. mit einer Lösung aus Kaliumhexacyanoferrat und Natriumthiosulfat entfärbt (Gharahdaghi et al., 1999). Oxidationsmittel war das Cyanoferrat, wobei die freiwerdenden Ag<sup>+</sup>-Ionen anschließend mit Thiosulfat komplexiert wurden. Die Entfärbung dauerte ca. 5 min. Zum Stoppen der Reaktionen und zum Entfernen der Salze wurde das Gelstück mit ddH<sub>2</sub>O mehrmals gründlich gewaschen.

### 5.3.5 Markierung von Proteinen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5

Zur Visualisierung kleinster Proteinmengen bis zu 0.025 ng (Marouga et al., 2005) wurde der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (GE Healthcare Europe, Freiburg, D) eingesetzt. Die Cy-Farbstoffe (Succinimide) wurden kovalent an die ε-Aminogruppe der Aminosäure Lysin gebunden. Die Bindung entsprach einer Peptidbindung. Um die elektrophoretischen Eigenschaften des markierten Proteins nicht zu verändern, fand eine sogenannte „Minimalmarkierung“ statt. Diese wurde über das Verhältnis Protein zu Farbstoffmoleküle gewährleistet. Insgesamt wurden dabei nur etwa 3% aller Proteine einer Probe markiert, wobei innerhalb eines Proteinmoleküls durchschnittlich lediglich ein Lysin betroffen war. Die markierten Lysine waren für die Proteolyse mit Trypsin nicht mehr zugänglich.

Zur Markierung der Proteine wurde der Farbstoff in DMF verdünnt. Für 100 µg Protein waren 0.8 µl Farbstofflösung einer 1:10 Verdünnung ausreichend. Die Markierung erfolgte in 1 x Solubilisierungspuffer bei einem pH-Wert von > 8. Der pH-Wert war dabei entscheidend, da nur im Basischen ein Großteil der Aminogruppen im unprotonierten Zustand (-NH<sub>2</sub>)



vorlagen. Die Proben wurden anschließend 30 min bei RT inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 µl 10 mM Lysin zugegeben. Nach der Auftrennung der Proben über SDS-PAGE wurden die markierten Proteine im Typhoon-Scanner (GE Healthcare Europe, Freiburg, D) bei einer Emissionswellenlänge von 669 nm visualisiert.

Im Fall eines anschließenden tryptischen Verdaus der Proteine musste das zur elektrophoretischen Trennung benötigte Detergenz (SDS) entfernt werden. Dazu wurden die Gele für 30 min in einer Fixierungslösung (30% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert.

## 5.4 Extraktion ganzer Proteine aus Polyacrylamidgelen

### 5.4.1 Passive Elution von fixierten Proteinen nach CBB-Färbung

Die Proteinausbeute nach Extraktion aus der Gelmatrix in unterschiedlichen Lösungen wurde bestimmt. Dazu wurden jeweils 50 pmol des Standardproteins GAPDH auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach dem Gellauf mit CBB-R250 gefärbt. Die Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß (RG) überführt und 2 x 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Banden mit einem Potter zerkleinert und die darin enthaltenen Proteine in einem Volumen von 40 µl Lösungsmittel extrahiert. Zur Extraktion verwendete Lösungsmittel sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Lösungen zur Extraktion von fixierten Proteinen nach SDS-PAGE**

Probe	Extraktionslösung	Bemerkungen	Inkubationszeit [min]	Geräte
(A) (Ref. 1); 50 pmol GAPDH	-		-	-
(B) (Ref. 2)	ddH <sub>2</sub> O		450	TS <sup>1</sup>
(C) (Ref. 3)	10% HOAc, 40% EtOH	1. Entfärber	30	USB <sup>2</sup>
(D)	0.25% (w/v) SDS		450	TS
(E)	FAPH: 50% FA, 25% ACN, 15% 2-Propanol	nach (Ehring et al., 1997)	30	USB
(F)	70% FA, 20% ACN, 10% 2-Propanol	70% Säure	30	USB
(G)	10% FA, 50% ACN, 30% 2-Propanol	80% organ. Lsgm. mit wenig FA	30	USB
(H)	FAPH 1: 50% FA, 15% ACN, 5% 2-Propanol	20% organ. Lsgm.	30	USB
(I)	FA/TFE (1:1)		30	USB

<sup>1</sup> Thermoschüttler, <sup>2</sup> Ultraschallbad

Die Extraktionen wurden bei 37°C entweder für 30 min in einem Ultraschallbad oder für 15h in einem Thermoschüttler durchgeführt. Der Überstand wurde anschließend quantitativ abgenommen und das Gel mit 20 µl der entsprechenden Extraktionslösung gespült, um an der Oberfläche anhaftende Proteine abzulösen. Die vereinigten Überstände wurden in einem Vakuumkonzentrator bis zur Trockene eingengt und die fertigen Proben bei -20°C gelagert.

Um die getrockneten Proteine wieder in Lösung zu bringen, wurden die Proben für 5 min bei 37°C in einem Gemisch aus Elektrophorese-Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 192mM Glycin, pH 8.4) und 5% Acetonitril (ACN; v/v) inkubiert. Die Proben wurden in neue 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 5 µl 3 x Solubilisierungspuffer (6% (w/v) SDS, 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 6% (v/v) β-Mercapto-Ethanol) versetzt und erneut über SDS-PAGE getrennt. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden in jedem Gellauf 2 Spuren mit 50 pmol GAPDH als Referenz mitaufgetragen. Jede Extraktion wurde in mindestens drei Parallelen durchgeführt.

### **5.4.2 Relative Quantifizierung der Proteinmengen mittels Bildanalyse**

Die Standardproteinbanden wurden nach Coomassiefärbung in einem Flachbettscanner detektiert und die Proteinmengen anhand der optischen Dichte (OD) mit dem Bildanalyseprogramm TINA (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, D) quantifiziert. Der lineare Bereich von Coomassie bzw. Cy5 wurde anhand einer Verdünnungsreihe (1 pmol, 2 pmol, 4 pmol, 8 pmol, 16 pmol, 32 pmol und 64 pmol) ermittelt. Zur Erstellung der Standardkurve wurde anschließend die Proteinmenge gegen die OD aufgetragen. In den Versuchen wurden nach Extraktion, Gellauf und Färbung die Gele erneut eingelesen und die extrahierte Proteinmenge der Banden anhand der OD ermittelt. Damit konnte die relative Änderung der Proteinmenge bezogen auf die Intensität der Ausgangsbanden berechnet werden. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die unterschiedliche Entfärbung des Gelhintergrundes auszuschließen, wurde von jeder Bande eine entsprechende Fläche leeres Gel abgezogen.

### **5.4.3 Extraktion von Proteinen aus SDS-Gelen mit FAPH**

Die Extraktion von fixierten Proteinen aus SDS-Gelen nach Coomassie Färbung wurde nach der Methode von Ehring et al. durchgeführt. Die Extraktion fand in einem Gemisch aus Ameisensäure, Acetonitril, Isopropanol und H<sub>2</sub>O (50:25:15:10, v/v/v/v) statt (Feick et al., 1990; Ehring et al., 1997).

Die gefärbten Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorf RG überführt und 2 x 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Im Unterschied zur Methode von Ehring et al., wurden die Proteinbanden vor der Extraktion nicht im Vakuumkonzentrator getrocknet, da in der lösungsmittelhaltigen Extraktionslösung keine vollständige Rehydrierung stattfand. Die gewaschenen Banden wurden anschließend mit einem Potter zerkleinert und abhängig vom Gelvolumen 20-80 µl FAPH-Lösung (50% Ameisensäure, 25% Acetonitril, 15% Isopropanol und 10% bidest. H<sub>2</sub>O, v/v/v/v) zugegeben. Das Zerkleinern des Gels erhöhte die Ausbeute der

Extraktion und verringerte gleichzeitig die Menge an Lösungsmittel, die notwendig war, um die Gelpartikel komplett zu bedecken. Anschließend wurden die Proteine bei 30-40°C im Ultraschallbad aus dem Gel herausgelöst. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Eine Erhöhung der Temperatur beschleunigte nach Ehring et al. den Extraktionsprozess. Gleichzeitig führte die Inkubation von Proteinen in hohen Konzentrationen an FA bei erhöhter Temperatur zu vermehrtem Auftreten von Modifikationen, insbesondere Formylierungen (Ehring et al., 1997). Betroffen davon waren der N-Terminus, sowie die Aminosäuren Serin und Threonin (Goodlett et al., 1990). Entsprechend dem Volumen an FAPH wurde nach der Extraktion Acetonitril (ACN) zugegeben und der Überstand mit der Pipette quantitativ abgenommen. Der erneute Zusatz von ACN am Ende des Prozesses ändert die Eigenschaften der Gelpartikel (hart, milchig weiß, Aggregation) und erleichterte damit das Abnehmen der Extraktionslösung. Das Lösungsmittel wurde im Vakuumkonzentrator (Eppendorf, Hamburg, D) entfernt und die getrocknete Probe bei -20°C eingefroren. Zur weiteren Analyse wurden die extrahierten Proteine verdaut.

#### **5.4.4 Extraktion niedermolekularer Proteine aus BN-Gelen**

Zur Extraktion der niedermolekularen Proteine wurden die Komplexbanden des monomeren und dimeren PSII-Subkomplexes aus der BN-PAGE ausgeschnitten. Um CBB-G250, das als Ladungsträger für die elektrophoretische Trennung der Proteinkomplexe fungierte zu entfernen, wurden die Banden zweimal für je 10 min in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /50% ACN entfärbt. Anschließend wurden die Banden in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  rehydriert. Die Banden wurden zerkleinert und zur Extraktion, der im Gel enthaltenen Proteine, jeweils 80-100  $\mu\text{l}$  FAPH (vgl. Kapitel 5.4.3, S. 52), EBP (50% HOAc, 40% 1-Butanol, 10% 2-Propanol; v/v/v) oder FABH (48% FA, 26% ACN, 15% 1-Butanol; v/v/v) zugegeben. Bei den Extraktionslösungen mit 1-Butanol fungierten 2-Propanol oder ACN als Lösungsvermittler, da 1-Butanol bei RT lediglich zu etwa 8% wasserlöslich ist. Die Extraktion erfolgte für 30 min im Ultraschallbad bei 30-40°C. Der grünlich gefärbte Überstand wurde abgenommen und die Proben anschließend in 50  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Extraktionslösung für 5 min bei 37°C unter leichtem Schütteln nachextrahiert. Um den Überstand quantitativ abnehmen zu können wurden die Gelpartikel anschließend durch Zugabe von 50-100  $\mu\text{l}$  ACN dehydriert. Die vereinigten Überstände wurden im Vakuum-Konzentrator bis zur Trockene eingeengt. Zur Akkumulation von Material wurden zum Teil die Extrakte aus bis zu drei Banden vereinigt.

Reste von Salzen und Detergenzien, sowie ein Großteil der enthaltenen Pigmente (Chl), wurden durch Fällung mit Aceton und Trichloressigsäure (TCA) abgetrennt. Das Verhältnis betrug dabei 1:8:1 Probe/Aceton/TCA. Dazu wurden die farbigen Pellets in 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

aufgenommen anschließend mit eiskaltem Aceton und TCA versetzt. Die Fällung erfolgte für mindestens 4 h oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurden die gefällten Proteine bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min bei  $10.000 \times g$  pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und vorhandene Restflüssigkeit im Vakuum-Konzentrator entfernt. Die fertigen Proben wurden bis zur MS-Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Messung erfolgte direkt, ohne vorherigen Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt, nach Aufnahme der Proben in ca.  $8 \mu\text{l}$  70% Aceton, 10% 2-Propanol und 1% FA.

### **5.5 In-Gel Verdau**

Eine Methode Proteine für die massenspektrometrische Identifizierung zugänglich zu machen war deren Spaltung in Peptide. Geeignet für den Verdau waren Proteinspots aus „frischen“ oder bereits getrockneten Gelen nach CBB-Färbung. Silbergefärbte Proteinbanden waren nur mit Einschränkungen verwendbar und wurden zum Teil vor dem Verdau entfärbt (vgl. Methoden, Kapitel 5.3.4, S. 50 und Diskussion, Kapitel 7.7.1.2, S. 144). Banden aus getrockneten Gelen wurden zunächst in  $\text{ddH}_2\text{O}$  für 15 min rehydriert. Im Hinblick auf die Peptidausbeute nach In-Gel Verdau, erwies sich die Anreicherung von Probenmaterial aus schwach gefärbten Proteinbanden nicht zwangsläufig als Vorteil für das Erzielen optimaler Ergebnisse, da mit den Signalen das Hintergrundrauschen im selben Verhältnis anstieg (Mann et al., 2001).

#### **5.5.1 Konventioneller In-Gel Verdau von Proteinen**

Das konventionelle Protokoll für den In-Gel Verdau von Proteinen wurde mit geringen Veränderungen nach Wilm et al. durchgeführt (Wilm et al., 1996). Zunächst wurden die zu identifizierenden Proteinspots mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Um das Volumen an „leerem“ Gel gering zu halten, wurde der gefärbte Bereich möglichst exakt ausgeschnitten. Die Banden wurden zweimal für jeweils 10 min in  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen und mit dem Skalpell in ca.  $1 \text{ mm}^3$  kleine Würfel geschnitten. Danach wurden die Gelstücke in jeweils  $50\text{-}100 \mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  erneut gewaschen. Das Volumen, der während des Prozesses verwendeten Lösungen, richtete sich nach dem Gelvolumen; die Gelstücke sollten dabei vollständig bedeckt sein. Anschließend wurde das Gel in ACN für 10 min dehydriert, der Überstand entfernt und die Gelstücke in einem Vakuumkonzentrator (Eppendorf, Hamburg, D) für 5 min bei RT getrocknet.

Zur Reduktion der Disulfidbrücken und anschließender Alkylierung der entstandenen SH-Gruppen mit 2-Iodacetamid wurden die getrockneten Gelstücke zunächst für 30 min bei  $56^{\circ}\text{C}$  in einer Reduktionslösung ( $10 \text{ mM DTT}$ ,  $100 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ ) inkubiert. Der Überstand

wurde verworfen und die Gelstücke mit ACN dehydriert. Die Gelstücke wurden in einer Lösung aus 55 mM 2-Iodacetamid in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  für 30 min bei RT im Dunkeln rehydriert. Die irreversibel gebundene Schutzgruppe verhinderte die erneute Bildung von Disulfidbrücken. Da beide Chemikalien in Lösung nicht stabil sind, waren die Gebrauchslösungen jeweils frisch anzusetzen. Um das Alkylierungsreagenz vollständig zu entfernen, wurden die Gelstücke für 15 min in 200  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gewaschen und mit ACN dehydriert. Während des R&A-Prozesses wurde gleichzeitig der Farbstoff Coomassie entfernt. Andernfalls wurden die beiden letzten Waschschrte bis zur völligen Entfärbung wiederholt.

Vor dem enzymatischen Verdau wurden die Gelstücke erneut im Vakuumkonzentrator getrocknet und in 20  $\mu\text{l}$  Verdaupuffer (50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 12.5 ng/ $\mu\text{l}$  Trypsin (*sequencing grade, modified*, Promega, V5111) rehydriert. Der Quellvorgang fand für 45 min bei 4°C auf Eis statt. Um den Anteil an Peptiden aus dem Eigenverdau von Trypsin möglichst gering zu halten, wurde nach dem Quellen der Überstand abgenommen und durch eine äquivalente Menge des gleichen Puffers ohne Trypsin ersetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C und 1000 U/min in einem Thermoschüttler (HLC, Bovenden, Deutschland).

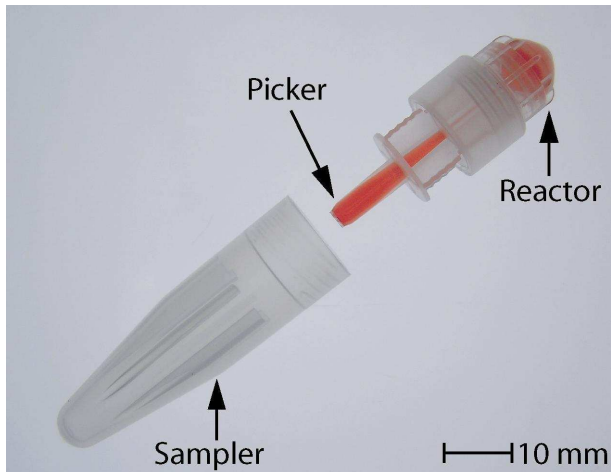
Nach Abschluss des Verdauprozesses wurden die entstandenen Peptide aus dem Gel extrahiert. Jeder Extraktionsschritt dauerte 15 min und wurde bei 37°C und 1000 U/min in einem Thermoschüttler durchgeführt. Zunächst wurden die sauren Peptide durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  extrahiert. Anschließend wurden 40  $\mu\text{l}$  ACN zugegeben und erneut für 15 min inkubiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen und in ein neues RG überführt. Analog erfolgte die Extraktion der basischen Peptide in 40  $\mu\text{l}$  5% FA. Die vereinigten Überstände wurden abschließend im Vakuumkonzentrator bei RT bis zur Trockene eingeeengt. Dieser Vorgang dauerte abhängig von Vakuum, Lösungsmenge und Probenanzahl ca. 1-3 h. Die fertigen Proben wurden bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20°C gelagert.

### 5.5.2 In-Gel Verdau von Proteinen mit OMX-S<sup>®</sup>

Zur Standardisierung des In-Gel Verdau wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Einmalartikel aus Polypropylen entwickelt, der es dem Benutzer ermöglichte, eine Gelbande auszustechen, den Verdau der enthaltenen Proteine durchzuführen, und am Ende die entstandene Peptidlösung von der Gelmatrix abzutrennen (Abb. 10, S. 56). Das OMX-S<sup>®</sup>-Reaktionsgefäß besteht aus einem Werkzeug zur Probenentnahme (*Picker*) aus gefärbten Proteinbanden, einem Reaktor zur Durchführung von chemischen oder enzymatischen Reaktionen und einem Auffangbehälter (*Sampler*) für die fertige Peptidlösung. Das Einbringen des Probenmaterials,

sowie der Austausch von Reaktionslösungen erfolgte mittels Zentrifugation. Während das Gel mit den fixierten Proteinen im Reaktor verblieb, konnten Lösungen zur Durchführung multipler Reaktionsschritte beliebig oft zu- und abgeführt werden.

Um den Prozess des In-Gel Verdaus im OMX-S<sup>®</sup> durchführen zu können wurde auf Basis des konventionellen In-Gel Verdaus ein optimiertes Verdauprotokoll (OVP) entwickelt. Das Verfahren verzichtete auf die Entfärbung der Gelbanden, sowie auf die Reduktion und Alkylierung (R&A) der Cysteine (Borchers et al., 2000; Havlis et al., 2003).



**Abb. 10: OMX-S<sup>®</sup> - Ein Werkzeug zum standardisierten In-Gel Verdaus von Proteinen**

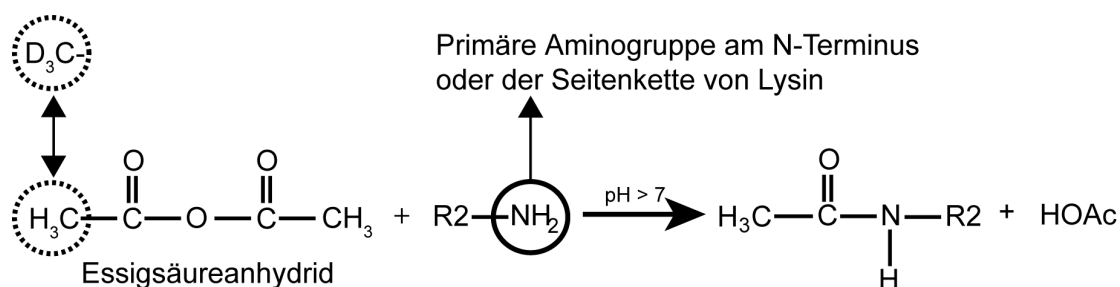
Vor dem Ausstechen der Proben wurden die gefärbten Gele für 2 x 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Gel auf eine mit Ethanol gereinigte Glasplatte gelegt. Zum Stechen der Gelzylinder wurde der *Sampler* auf den Boden des Reaktors aufgesteckt. Der Durchmesser der gestochenen Gelstücke betrug 1.8 mm. Zur Akkumulation von Probenmaterial konnten maximal drei Gelstücke gestochen werden. Soweit nicht anders angegeben wurde jedoch nur einmal pro Bande gestochen. Nach Aufnahme des Probenmaterials wurde das RG wieder verschlossen und mit dem Reaktor nach unten weisend in eine Tischzentrifuge gestellt (Typ: 5417R; Eppendorf, Hamburg, D). Die Gelstücke wurden bei 13.000 x g für 2 min durch eine Düse in die Reaktionskammer zentrifugiert und dabei zerkleinert. Danach wurden 20 µL Verdaupuffer (45 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8.0), 200 ng Trypsin (*sequencing grade, modified*, Promega, V5111)) in den *Picker* pipettiert und für 1 min bei 3800 x g in die Reaktionskammer zentrifugiert. Dabei wurden gleichzeitig Gelreste von der Innenwand des Stechkanals entfernt. Der tryptische Verdau fand für 45 min bei 50°C unter leichtem Schütteln (500 U/min) in einem Thermoschüttler (HLC, Bovenden, D) statt. Zur Trennung der Gelpartikel von der entstandenen Peptidlösung wurde das RG mit dem *Sampler* nach unten weisend erneut für 3 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Verdauprozess wurde durch Ansäuern der Proben mit 5 µl 1% (v/v) FA gestoppt. Die fertigen Proben wurden bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20°C gelagert.

## 5.6 Massenspektrometrische Quantifizierung von Proteinen über die Einführung stabiler Isotope

Die relative Quantifizierung von Proteinen mittels MS beruht grundsätzlich auf einer differentiellen Markierung mit stabilen Isotopen. Die zu quantifizierenden Proteinproben werden dabei getrennt voneinander mit einem Reagenz versetzt, welches kovalent an bestimmte funktionelle Gruppen der Proteine bindet. Die zugesetzten Reagenzien unterscheiden sich lediglich durch eine Isotopenmarkierung. In der Regel werden hierzu stabile Isotope wie Deuterium oder Kohlenstoff-13 verwendet. Nach enzymatischem Verdau differieren die generierten Peptide aus verschiedenen Proben aufgrund der Isotopenmarkierung in ihrer Molekularmasse. Um das Verhältnis der zu quantifizierenden Proteine zu erhalten, wird das Verhältnis der Signalintensitäten einzelner Peptidpaare zueinander gebildet. Zur Berechnung dient entweder die Intensität von Isotopensignalen im Spektrum oder die Flächen der Peptidsignale im Chromatogramm.

Die Strategien zur relativen Quantifizierung von Proteinen und Peptiden nach Markierung mit stabilen Isotopen unterscheiden sich in der reaktiven Gruppe, die markiert wurde (z. B. die Thiolgruppe am Cys, die Aminogruppe am Lys oder der C-Terminus), im Isotop, das zur Markierung verwendet wurde und im Zeitpunkt der Markierung während eines Experimentes. Detaillierte Informationen zu diesem Thema finden sich auch in verschiedenen Übersichtsartikeln (Moritz et al., 2003; Zhang et al., 2004; Yan et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Derivatisierung von Proteinen bzw. Peptiden Essigsäureanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) verwendet (Abb. 11) (Payne et al., 2000; Che et al., 2002; Noga et al., 2005). Bei der Reaktion wurde die  $\text{H}_3/\text{D}_3$  markierte Acetylgruppe von  $\text{Ac}_2\text{O}$  auf freie Aminogruppen proteolytischer Peptide transferiert.



**Abb. 11: Modifikation der primären Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid**

Die Acetylierung der freien Aminogruppen wurde mit Essigsäureanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) durchgeführt. Das Anhydrid reagiert unter basischen Bedingungen mit dem N-Terminus der Peptide und mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin. Eine differentielle Markierung von Peptiden wird über die Bindung einer leichten (Wasserstoff-gesättigten) oder schweren (Deuterium-gesättigten) Form des Anhydrids erreicht.

In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen wurden sowohl die N-terminale Aminogruppe der Peptide/Proteine als auch die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lys-Seitenkette acetyliert. Pro addierter Acetylgruppe wurde eine Zunahme der Molekülmasse von 42.106 Da detektiert.  $\text{Ac}_2\text{O}$  war in zwei Formen erhältlich. Bei der „leichten“ Form tragen die beiden Methylgruppen sechs Wasserstoffatome; bei der „schweren“ Form sind diese gegen das Isotop Deuterium ausgetauscht. Die „leichte“ ( $\text{CH}_3\text{CO}$ -) und „schwere“ Acetylgruppe ( $\text{CD}_3\text{CO}$ -) unterschieden sich um 3 Da. Damit konnte die Anzahl gebundener Acetylgruppen direkt aus der Differenz des Signalpaares berechnet werden.

### 5.6.1 Acetylierung von Peptiden auf einer $\text{C}_{18}$ -Mikrosäule

Die Derivatisierung von Peptiden, die zuvor auf einer  $\text{C}_{18}$ -Mikrosäule gebunden wurden, erlaubte eine drastische Reduktion der Reaktionszeit (Cindric et al., 2006). Die Methode ermöglichte außerdem die Durchführung der Derivatisierung in einem minimalen Lösungsvolumen und optimierter Ausbeute an markierten Analyten.

Die Modifizierung der Peptide nach In-Gel Verdau erfolgte auf einer Mikrosäule der Firma Millipore (ZipTip; Billerica, MA), die in eine Pipettenspitze eingebettet war. Zur Durchführung wurde das  $\text{C}_{18}$ -Material zunächst aktiviert, wie in Kapitel 5.9.1.1 auf S. 63 beschrieben. Die N-Acetylierung, der in den Peptiden vorhandenen, freien Aminogruppen (N-Terminus,  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin) wurde in 10  $\mu\text{l}$  einer für jeden Versuch frisch angesetzten Acetylierungslösung (5.4 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M HEPES (pH 8.5), 0.1% (v/v) Essigsäureanhydrid (H6/D6)) durchgeführt. Als Puffersalz wurde HEPES verwendet, da es nur tertiäre Amine besitzt, die nicht mit dem Säureanhydrid reagieren. Puffersubstanzen, die freie Aminogruppen enthielten (z. B. Tris oder  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) führten zu einem *Quenching* der Reaktion. Die Pufferkapazität musste ausreichend sein, um die während der Reaktion gebildete Essigsäure zu neutralisieren. Der basische pH-Wert begünstigte die Alkylierung der primären Amine, da die Reaktion nur bei unprotonierten Aminogruppen abläuft (Abb. 11, S. 57). Aus diesem Grund war die Seitenkette der AS Arginin nicht acetylierbar. Ihre extreme Basizität ( $\text{pK}_a \sim 12.5$ ) führte dazu, dass sie in Lösung nahezu ausschließlich protoniert als Ammonium-Ion ( $-\text{NH}_3^+$ ) vorlag. Zusätzlich enthielt die Lösung Guanidiniumchlorid, um eine optimale Entfaltung der Moleküle zu gewährleisten. Da Guanidiniumchlorid über einen weiten pH-Bereich größtenteils protoniert war, wurde die Reaktion nicht beeinträchtigt.

Zur Reaktion wurde das gesamte Volumen der Lösung in die ZipTip-Pipettenspitze aufgenommen, der ZipTip von der Pipette abgezogen und zur Inkubation für 3 min in ein



1.5 ml RG gestellt. Anschließend wurde die Acetylierungslösung verworfen und die Reaktion durch die Aufnahme von 5  $\mu$ l einer Lösung aus 67 mM Hydroxylamin und 67 mM Natronlauge gestoppt. Gleichzeitig wurden damit die in einer unerwünschten Nebenreaktion gebildeten Ester (O-Acetylierung an den Seitenketten von Ser, Thr, und Tyr) hydrolysiert (Chakraborty et al., 2002; Schmidt et al., 2005). Die Deacetylierung wurde analog der Acetylierung in einem 1.5 ml RG für 10 min bei RT durchgeführt. Anschließend wurde die RP-Matrix durch wiederholtes (insgesamt 10 x) Auf- und Abpipettieren von jeweils 20  $\mu$ l 0.1% (v/v) FA gewaschen. Die markierten Peptide wurden schließlich in 3  $\mu$ l Elutionslösung (65% ACN, 1% 2-Propanol, 0.1% FA (v/v/v)) vom ZipTip eluiert und bis zur Messung bei 8°C im Kühlschrank gelagert. Die Messung erfolgte jeweils am Tag der Präparation. Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten wurden alle Experimente zur Quantifizierung in mindestens drei parallelen durchgeführt.

### **5.6.2 Präparation von Peptiden als interner Standard zur Quantifizierung**

Für die Experimente zur relativen Quantifizierung von Proteinen wurde ein Peptidmix erzeugt, welcher als interner Standard zu den Proben gegeben wurde. Zur Herstellung des Standards wurde jeweils ein Verdau des Proteins verwendet, welches später quantifiziert werden sollte. Mit Ausnahme der Versuche zur Reduktion und Alkylierung, in denen Ovalbumin verwendet wurde, wurden alle Versuche mit dem Standardprotein CA durchgeführt. Zur Herstellung des Peptidstandards wurden 200 pmol Protein auf ein SDS-Gel geladen und anschließend nach dem konventionellen Protokoll zum In-Gel Verdau prozessiert (vgl. Kapitel 5.2.2.2, S. 48 und 5.5.1, S. 54). Die entstandenen Peptide wurden wie zuvor beschrieben auf einer C<sub>18</sub>-Mikrosäule D6-Ac<sub>2</sub>O acetyliert. Danach wurden die markierten Peptide in einem Volumen von 10  $\mu$ l 65% ACN, 1% 2-Propanol, 0.1% FA eluiert und mit 1% (v/v) FA bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Diese hing von der zu quantifizierenden Probe ab. Der dynamische Bereich, in dem die Verhältnisse der Signalintensitäten von Peptidpaaren linear waren, lag in der Größenordnung einer Zehnerpotenz (Yu et al., 2004). Innerhalb dieses Bereichs lag die Standardabweichung bei < 10% vom erwarteten Wert (Che et al., 2002). Ein Volumen von 5  $\mu$ l des entstandenen Peptidstandards wurde direkt nach Durchführung des zu quantifizierenden Schritts zu jeder Probe pipettiert. Der Peptidstandard wurde bei -20°C gelagert und war über Monate stabil.

### **5.6.3 Quantitative Analyse der Teilschritte des In-Gel Verdauprozesses über die Einführung stabiler Isotope**

Die einzelnen Teilschritte des konventionellen und optimierten Verdauprotokolls wurden bezüglich ihrer Notwendigkeit für den Gesamtprozess getestet. Die dazu durchgeführten Versuche sind im Folgenden beschrieben. Die relative Quantifizierung der Proben erfolgte dabei jeweils nach differentieller Isotopenmarkierung der generierten Peptide mittels massenspektrometrischer Analyse (vgl. Kapitel 5.6.1 und 5.6.2, S. 58 f).

#### *5.6.3.1 Entfärbung von Proteinbanden*

20 pmol CA wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel geteilt und jeweils eine Hälfte mit CBB-G250 bzw. mit Silber gefärbt. Pro Ansatz wurde etwa ein Viertel der Bande, ca. 5 pmol Protein verwendet und zum Teil entfärbt (vgl. Kapitel 5.3.2, S. 49 und 5.3.4, S. 50). Der optimierte In-Gel Verdau (OVP) wurde in 45 min bei 50°C durchgeführt (vgl. Kapitel 5.5.2, S. 55).

#### *5.6.3.2 Reduktion und Alkylierung der Proteine*

Die Versuche zur Reduktion und Alkylierung von Proteinen zu verschiedenen Zeitpunkten der Probenvorbereitung wurden an Ovalbumin durchgeführt. Das Protein enthielt eine Disulfidbrücke (zwischen Cys<sub>74</sub> und Cys<sub>121</sub>) und vier freie Cysteine. Zur Versuchsdurchführung wurden 20 pmol Ovalbumin über SDS-PAGE getrennt und mit kolloidalem CBB-G250 gefärbt. Pro Versuchsansatz wurde etwa ein Viertel der Bande, ca. 5 pmol Protein verwendet. Nach Entfärbung der Proteine (vgl. Kapitel 5.3.2, S. 49) erfolgte der In-Gel Verdau nach dem OVP (vgl. Kapitel 5.5.2, S. 55). Ein Teil der Proben wurde bereits vor dem Probenauftrag auf das SDS-Gel reduziert und alkyliert (vgl. Kapitel 5.2.2.2, S. 48). In einem zweiten Ansatz wurde die Reduktion der Cystine während des Verdauprozesses durchgeführt. Der Verdau-puffer enthielt hierbei zusätzlich 5 mM DTT (Nordhoff et al., 2001). Bei einem weiteren Teil der Proben fand die R&A, wie im konventionellen Protokoll beschrieben, während des In-Gel Verdau statt (vgl. Kapitel 5.5.1, S. 54). Als Referenz dienten Proteinproben, bei denen keine R&A durchgeführt wurde.

#### *5.6.3.3 Verdauzeit*

Die Versuche zur Ermittlung der für den Verdau benötigten Inkubationszeit in Abhängigkeit von Temperatur und Enzymmenge wurden mit 10 pmol CA durchgeführt. Die Proteinbanden wurden nach SDS-PAGE ausgeschnitten, entfärbt und nach dem konventionellen (Referenz, vgl. Kapitel 5.5.1, S. 54) bzw. optimierten Protokoll (vgl. Kapitel 5.5.2, S. 55) tryptisch

verdaut. Die Inkubationszeiten betragen beim konventionellen Protokoll 45 min bzw. 15 h, beim OVP 15 bzw. 45 min. In beiden Protokollen wurden 200 ng Trypsin zugesetzt. Die Temperatur betrug 37°C beim konventionellen Verdau und 50°C beim OVP.

### *5.6.3.4 Absolute Quantifizierung der Autolyse von Trypsin*

Zur absoluten Quantifizierung der Trypsinmenge, die im In-Gel Verdau zur Verfügung steht, wurden jeweils 200 ng Trypsin in 20 µl 50 mM FA (pH 2.5) mit zwei Gelstücken (12.5% Acrylamid, Volumen ca. 4 µl) ohne Protein für 30 min bei 4°C bzw. 50°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand quantitativ abgenommen und die Gelstücke mit 4 µl ddH<sub>2</sub>O kurz gespült, um außen anhaftendes Enzym zu entfernen. Der pH-Wert für den tryptischen Verdau wurde durch Zugabe von 6 µl 1 M Tris/HCl-Puffer auf einen Wert von pH 8.5 angehoben. Die Autolyse, der in der Lösung verbliebenen Enzymmoleküle, wurde für 45 min bei 60°C durchgeführt, da bei dieser Temperatur die Effizienz der Autolyse von Trypsin maximal war (Finehout et al., 2005). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 20% (v/v) FA gestoppt. Nach der Zugabe von 5 µl internem Standard wurden die Proben auf eine C<sub>18</sub>-Mikrosäule geladen, mit H<sub>6</sub>-Ac<sub>2</sub>O acetyliert (vgl. Kapitel 5.6.1, S. 58) und anschließend über ESI-MS analysiert.

Zur Verifizierung der Methode und zur Berechnung der Trypsinmengen wurde eine Eichgerade aus dem Verdau von 50-200 ng Trypsin in Abständen von 25 ng erstellt. Als Referenz diente die Autolyse, der pro Probe eingesetzten Ausgangsmenge, von 200 ng Trypsin. Zur Datenauswertung wurde jeweils das Verhältnis zwischen dem H<sub>3</sub>-acetylierten Peptid aus dem Eigenverdau und dem D<sub>3</sub>-acetylierten Peptid aus dem internen Standard von Referenz und Probe gebildet. Aus dem Quotienten der beiden Verhältniswerte wurde über die Geradengleichung der Eichgerade der Anteil an Trypsin berechnet, der nach 30 min Inkubationszeit nicht vom Gel aufgenommen wurde. Die Differenz zur eingesetzten Gesamtmenge von 200 ng ergab die Menge an Trypsin, die vom Gel absorbiert wurde.

## **5.7 Quantifizierung von Proteinen über die Sequenzabdeckung**

Die Quantifizierung von Proteinen über die Einführung stabiler Isotope war nicht immer möglich. Als problematisch erwies sich die Methode, wenn das Zielprotein nicht genügend geeignete Peptide zur Auswertung enthielt oder nur geringe Mengen an Probenmaterial (niedriger fmol-Bereich) zur Verfügung standen und damit die einzelnen Signale zum Teil nur schwer vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden waren. Eine weitaus einfachere Art der „relativen Quantifizierung“ wurde über die Sequenzabdeckung des zu analysierenden Proteins erreicht (vgl. Kapitel 5.10.3, S. 69). Grundlage für die Methode ist die Korrelation zwischen

eingesetzter Proteinmenge und der Anzahl unterschiedlicher Peptide, die im Spektrum detektiert werden (Washburn et al., 2001; Granvogl et al., 2006). Obwohl die Ergebnisse weniger exakt sind, fand die Methode eine breite Anwendung in der Literatur, da sowohl der experimentelle Ansatz als auch die Datenauswertung wesentlich einfacher durchführbar sind. Die Peptidausbeute des letzten Abschnitts des In-Gel Verdauprozesses, in dem es um die Notwendigkeit eines zusätzlichen Extraktionsschrittes geht, wurde mit dieser Methode ermittelt. Dazu wurden 100 fmol GAPDH auf ein Mini-Gel aufgetragen. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Silberfärbung (vgl. Kapitel 5.3.3 S. 49). Ab hier wurde der gesamte Prozess im OMX-S<sup>®</sup> durchgeführt. Die gestochenen Banden wurden unmittelbar nach der Färbung wieder entfärbt (vgl. Kapitel 5.3.4 S. 50) und anschließend nach dem OVP in 20 µl Verdaupuffer mit 100 ng Trypsin verdaut. Bei den Referenzproben wurde die Extraktion während des Verdaus im Volumen des Verdaupuffers durchgeführt. Bei allen anderen Proben wurde nach der Trennung von Gel und Peptidlösung ein zusätzlicher Extraktionsschritt angehängt. Die zweite Extraktion erfolgte in jeweils 20 µl Lösung für 10 min bei 50°C. Zur Extraktion wurden 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 5% FA, 5% FA in 50% ACN und 100% ACN eingesetzt. Anschließend wurden die beiden Extraktionen vereinigt und wegen der unterschiedlichen Volumina in einem Vakuumkonzentrator bis zur Trockene einrotiert. Die fertigen Proben wurden in 10 µl 1% FA aufgenommen, in ein Glasvial überführt und bis zur Messung bei -20°C gelagert. Die Messung erfolgte über nanoLC-MS. Dabei wurden jeweils etwa 20 fmol des proteolytisch abgebauten Proteins aufgetragen. Jeder Versuch wurde in drei Parallelen durchgeführt. Die relative Quantifizierung erfolgte bei diesem Versuch über die Signalintensitäten von vier Peptiden aus GAPDH.

## **5.8 Modifikationen von Aminosäuren**

### **5.8.1 Oxidation von Aminosäuren**

Die Oxidation von AS wurde mit Perameisensäure (*performic acid*, PFA) durchgeführt (Chowdhury et al., 1995). Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Oxidation nach dem enzymatischen In-Gel Verdau der Proteine. Die Oxidation mit PFA wurde entweder für 30 min bei 30°C mit Endkonzentrationen von 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) und 8% FA (v/v) oder für 2 h bei -20°C mit Endkonzentrationen von 3% FA (v/v), 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) und 20% Methanol (v/v) durchgeführt. Der Anteil an Methanol verhinderte das Einfrieren der Lösung. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Peptidlösung abgetrennt und die Reaktion durch die Bindung der Peptide an eine C<sub>18</sub>-Mikrosäule gestoppt. Die Analyse der Proben erfolgte

jeweils direkt im Anschluss an die Reaktion. Die eingesetzten Konzentrationen waren ausreichend, um Peptide aus mindestens 50 pmol Protein quantitativ zu oxidieren.

## 5.9 Massenspektrometrie

### 5.9.1 Offline ESI-MS

#### 5.9.1.1 Entsalzung und Konzentrierung der Peptidlösung vor der massenspektrometrischen Analyse

Für *offline*-Messungen wurde der Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt mit einer C<sub>18</sub>-Mikrosäule (ZipTip-Pipettenspitzen; Millipore, Billerica, MA) durchgeführt. Das enthaltene C<sub>18</sub>-Chromatographiematerial (15 nm, Porengröße 200 Å) mit einem Volumen von 0.6 µl besaß eine maximale Bindungskapazität von etwa 5 µg Protein und war zur Aufreinigung von Peptiden und Proteinen mit einer maximalen MM von 60 kDa geeignet. Die Peptidbindung an die C<sub>18</sub>-Matrix erfolgte über hydrophobe Wechselwirkungen. Zur Abtrennung von Detergenzien sind die C<sub>18</sub>-Mikrosäulen nicht geeignet, da diese ebenfalls an die C<sub>18</sub>-Matrix gebunden werden. Einrotierte Proben aus dem konventionellen Verdauprotokoll wurden zuvor in 10 µl 1%iger FA resuspendiert. Äquilibrierung, Peptidanbindung, Waschschrte und die Elution der Peptide wurde durchgeführt, wie in der Gebrauchsanleitung für die C<sub>18</sub>-Mikrosäulen angegeben. Zur Verbesserung der Qualität der ESI-Spektren enthielten alle Lösungen FA statt Trifluoressigsäure. Die Peptide wurden in 4 µl 65% ACN, 1% 2-Propanol und 0.1% FA eluiert. Bei *online*-Messungen fand die Entsalzung und Konzentrierung der Probe auf der Vorsäule der HPLC statt (vgl. Kapitel 5.9.2.2, S. 65).

#### 5.9.1.2 Beladung der ES-Quelle

Über eine *Geloader*-Pipettenspitze (Eppendorf, Hamburg, D) wurde die Elutionslösung direkt in eine „*medium*“ Nanospray-Kapillare aus Borosilikatglas überführt (Protana, Odense, Dk) und anschließend in einer Tischzentrifuge in die Spitze der geschlossenen Glaskapillare zentrifugiert. Die Nanospray-Kapillare wurde anschließend in der Nadelhalterung der ES-Quelle fixiert, durch Berührung des Konus mechanisch geöffnet und etwa 1-2 mm vor der Konusöffnung positioniert. Die Vernebelung erfolgte nach Anlegen der Kapillarspannung.

#### 5.9.1.3 MS- und MSMS-Messung

Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit einem Q-TOF-I bzw. Q-TOF *Premier* Tandemmassenspektrometer (Waters (Micromass), Manchester, UK) durchgeführt. Beide Massenspektrometer waren mit einer orthogonalen nanoESI Quelle ausgestattet, die an einen

Quadrupol- und einen nachfolgenden TOF-Massenanalysator gekoppelt war. Zur Messung von Peptiden (Proteinen) wurde ausschließlich der positive Ionisierungsmodus (ESI+) verwendet.

Die Analytlösungen wurden über Glaskapillaren in das MS eingebracht (vgl. Kapitel 5.9.1.2). Die Flussrate war dabei abhängig von der Kapillarspannung und der Öffnungsweite der abgebrochenen Glaskapillare. Sie betrug etwa 50-80 nl/min. Bei einer Gesamtprobenmenge von ca. 4 µl ergab sich somit eine durchschnittliche Messzeit von etwa 60 min. Eine optimale Verneblung der Spraylösung wurde bei beiden Geräten durch das Anlegen einer Kapillarspannung von 800-1000 V erreicht. Die Konusspannung betrug 35-45 V beim Q-TOF-I und 28 V beim Q-TOF *Premier*. Bei großen Peptiden wurde durch die Erhöhung der Konusspannung eine Verbesserung der Signalintensität erreicht. Gleichzeitig konnte eine hohe Konusspannung in Abhängigkeit von den Eigenschaften des Peptides bereits in der Quelle zu einer Fragmentierung des Moleküls führen (*in source dissociation*). Im Gegensatz zum Q-TOF-I wurde beim Q-TOF *Premier* auch im MS-Modus das Kollisionsgas (Argon) zugeschaltet.

Die Aufzeichnung der Übersichtsspektren (MS-Spektren) erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1-2 s/Einzelspektrum über einen Massenbereich von 400 bis 2000 *m/z*. In Abhängigkeit von der Signalintensität wurden jeweils 25-100 Einzelspektren zum Gesamtspektrum summiert. Ein Peptidsignal wurde als vorhanden gewertet wenn es zwei Kriterien erfüllte. Erstens musste die Signalintensität einen Wert von 50 Einschlägen/25 Spektren übersteigen. Dieser Wert entsprach der Minimalintensität für ein Peptid, um im Fragmentierungsmodus (MSMS) noch auswertbare Spektren zu ergeben. Zweitens musste das Peptidsignal eindeutig vom Hintergrundrauschen unterscheidbar sein.

Für die MSMS-Experimente wurden sukzessive die identifizierten Peptidionen im Quadrupol selektiert. Die ausgewählten Peptide wurden anschließend in der Kollisionszelle fragmentiert. Die Fragmentierung erfolgte durch Energieübertragung beim Zusammenstoß der Analytmoleküle mit den Molekülen eines Stossgases (hier Argon). Für eine effiziente Fragmentierung war die in den MS-Experimenten zum Passieren der Kollisionszelle angelegte kinetische Energie von 5 eV nicht ausreichend. Die Erhöhung der Beschleunigungsspannung resultierte in der Erhöhung der Energie, welche beim Zusammenstoß auf die Peptidmoleküle übertragen wurde. Die Beschleunigungsspannung variierte in Abhängigkeit von Molekularmasse und Ladungszustand zwischen 16 und 42 eV. Zur Fragmentierung und anschließender *de novo* Sequenzierung wurden bevorzugt doppelt

geladene Peptidionen ausgewählt, da diese im Gegensatz zu höher Geladenen weniger komplexe Spektren ergaben und eine geringere Messzeit für verwertbare Daten erforderten.

Soweit nicht anders angegeben, handelte es sich bei den in der Arbeit angegebenen Werten für die Proteinmassen, um die neutrale, monoisotopische Masse (vgl. Kapitel 4.1.3.2, S. 34).

Als „Peptidmassen“ wurden die  $m/z$ -Werte der im Spektrum detektierten Signale mit dem zugehörigen Ladungszustand angegeben. Je nach Kalibrierungszustand des MS erfolgte nach der Messung eine interne Massenkorrektur anhand eines bekannten Signals im Spektrum (*Lock mass*-Korrektur, z. B. Trypsin Eigenverdau bei 421.7589  $[M+2H]^{2+}$ , CBB-R250 bzw. G250 bei 804.277  $[M+H]^{1+}$  und 832.309  $m/z$   $[M+H]^{1+}$  oder Pheophytin *a* 871.5737  $[M+H]^{1+}$ ). Generell erhöhte sich die Abweichung mit zunehmendem  $m/z$ -Wert.

Die Steuerung des MS, sowie die Datenaufzeichnung und -auswertung wurden mit dem Programm MassLynx/Biolynx 4.0 und 4.1 durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Geräteparameter in den verschiedenen Messmodi, sowie zur Kalibrierung des MS findet sich in den Benutzerhandbüchern für die jeweiligen Massenspektrometer.

### 5.9.2 LC-ESI-MS

#### 5.9.2.1 Probenvorbereitung für LC-MS

Das Probenvolumen der Peptidlösung nach In-Gel Verdau betrug in der Regel etwa 25  $\mu$ l. Zur Abtrennung von ungelösten Bestandteilen wurde die Lösung für 5 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Danach war die angesäuerte Peptidlösung direkt für die chromatographische Trennung verwendbar, wobei 1-5  $\mu$ l Probenvolumen auf die Säule aufgetragen wurden.

#### 5.9.2.2 NanoLC-MS-Messung

Die Analyse von Peptiden über nanoLC-MS erfolgte über die Kopplung des nanoACQUITY-UPLC Systems (Waters, Milford, MA) an das Q-TOF *Premier*. Maximal 5  $\mu$ l Probenvolumen wurden für die Analyse verwendet. Die Analytmoleküle wurden auf einer Vorsäule konzentriert und entsalzt. Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgte auf einer analytischen Säule (BEH 130 C18, 75  $\mu$ m x 100 mm; Partikelgröße 1.7  $\mu$ m) mit einem linearen Gradienten von 1% bis 40% Lösungsmittel B (0.1% (v/v) FA in ACN). Die Laufzeit des Gradienten betrug 25-60 min bei einer Flussrate von 400 nl/min. Ein flacherer Gradient führte nicht zu einer verbesserten Auflösung, sondern lediglich zu einer Verbreiterung der Signale. Die Säule wurde am Ende des Laufs mit einem kurzen Gradienten auf 95% B gereinigt. Zur Stabilisierung des Elektrosprays wurde bei *online* LC-ESI-MS Experimenten wegen der hohen Flussrate von 300-400 nl/min N<sub>2</sub> (Reinheit N 5.0) als Trocknungsgas zur

rascheren Verdampfung der Spraylösung verwendet. Aus dem gleichen Grund wurde die Konustemperatur bei *online* Messungen von 60°C auf 100°C erhöht.

### 5.9.3 Kalibrierung des MS

Wie exakt eine Kalibrierung erfolgen musste, war abhängig von der Fragestellung der Messung. Wurden die Messdaten für die *de novo* Sequenzierung von Peptiden verwendet, war die Genauigkeit von geringerer Bedeutung, da hierfür lediglich der Abstand zwischen den Fragmentensignalen entscheidend war. Somit konnte der absolute Messwert der Signale abweichen ohne das Ergebnis zu verfälschen. Von den beiden Massenanalysatoren musste nur der Flugzeitmassenanalysator (*TOF, time of flight*) kalibriert werden. Da der Flugzeitmassenanalysator aus Aluminium bestand, kam es durch die temperaturbedingte Ausdehnung bzw. Verkürzung des Metalls zu einer Änderung der Flugstrecke für die Ionen. Die damit verbundene Änderung der Flugzeit bis zum Detektor führte zur Verfälschung der ermittelten Massen. Eine Änderung der Raumtemperatur um 1°C führte bereits zu einer Massenverschiebung von 60-120 ppm (0.06-0.12 Da). Trotz Klimaanlage traten im Messraum am Botanischen Institut, speziell in den Sommermonaten im Tagesverlauf, zum Teil beträchtliche Temperaturschwankungen auf, so dass eine Kalibrierung mehrmals am Tag nötig war.

#### 5.9.3.1 Externe Kalibrierung

Bei der durchgeführten externen Kalibrierung handelte es sich jeweils um eine Mehrpunktkalibrierung. Alle Kalibrierungen wurden im positiven Ionisierungsmodus durchgeführt. Zur externen Kalibrierung der Q-TOF-I wurde eine Lösung aus 0.2% (v/v) Phosphorsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) in 50% Methanol verwendet. Die Phosphorsäure bildet im MS-Spektrum Signallerien (*Cluster*) mit [H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]<sub>n</sub> deren Abstand jeweils 98 *m/z* betrug. Bei der Q-TOF *Premier* enthielt die Kalibrierungslösung [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptid B (Sigma, München, D; 785.843 *m/z*) in einer Konzentration von 500 fmol/μl in 50% ACN und 0.1% FA. Hier wurden die Fragmentierungssignale aus dem MSMS-Spektrum, welche sich aus der im Peptid enthaltenen AS-Sequenz ergaben, zur Kalibrierung herangezogen.

Nach Aufzeichnung eines Kalibrierungsspektrums wurden die aktuellen Signale im Spektrum mit den zu erwartenden Massen aus einer Referenzdatei verglichen. In Abhängigkeit von der Intensität der einzelnen Signale wurde jeder Masse in der Referenzdatei (Sollwert) automatisch ein korrespondierendes Signal im Kalibrierungsspektrum (Istwert) zugeordnet. Die sich ergebenden Massendifferenzen aus Soll- und Istwerten bildeten die Kalibrierungspunkte durch die eine Kalibrierungskurve gelegt wurde. Aus den Abständen der



einzelnen Kalibrierungspunkte zur Kurve wurde die durchschnittliche Massenabweichung eines Signals im Spektrum berechnet. Über die manuelle Entfernung stark abweichender Werte wurde die Differenz zwischen Ist- und Sollwerten vermindert und somit der TOF kalibriert. Die Genauigkeit der Kalibrierung erreichte beim Q-TOF I etwa 20-30 ppm (0.03 Da); beim Q-TOF *Premier* etwa 5 ppm (0.005 Da).

### 5.9.3.2 Interne Kalibrierung

Das Eigenverdausignal von Trypsin bei 421.759  $m/z$  wurde als interne Kalibrierung bei *offline* Messungen und zur Überprüfung der Enzymtätigkeit während des In-Gel Verdaus verwendet. Um temperaturbedingte Massenverschiebungen während des Laufs zu korrigieren, wurde bei den LC-MS Experimenten [ $\text{Glu}^1$ ]-Fibrinopeptid B als Referenzmasse verwendet. Die Konzentration der Lösung betrug 500 fmol/ $\mu\text{l}$  in 50% ACN und 0.1% FA, bei einer Flussrate von 500 nl/min. Zum Massenabgleich wurde während des Laufs alle 10 s ein Wert für die Referenzmasse aufgenommen.

## 5.10 Datenauswertung

### 5.10.1 Identifikation von Proteinen über die Datenbanken

Zur Identifikation der Proteine in den Datenbanken wurden die aus den Fragmentspektren der Peptide ermittelten Primärsequenzen verwendet. Die Primärsequenz eines Peptides eröffnete verschiedene Möglichkeiten das zugrunde liegende Protein zu identifizieren. Bei Sequenzierung von mindestens sechs aufeinanderfolgenden AS eines Peptids wurde die Suchmaske "*Amino acid sequence search*" auf dem Server des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) ([www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html](http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html)) zur Proteinidentifikation verwendet. Die Signifikanz des Suchergebnisses hing von der Länge der eingegebenen Sequenz und von der Zahl der existierenden homologen Peptide ab.

Waren aufgrund eines MSMS-Spektrums mit schwachen Peptidsignalen weniger als 6 AS zu ermitteln, gab es die Möglichkeit über die „*Peptide Sequence Tag*“-Suchmaske nach dem Protein zu suchen. Hierfür war lediglich eine Kurzsequenz aus mindestens zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren nötig, die in Verbindung mit der Masse des Peptids und der Masse der Fragmentionen am Beginn und am Ende der Kurzsequenz einen hohen Informationsgehalt besaß. Zur Eingrenzung der hypothetischen Treffer konnten bei den Parametern der Suchalgorithmen zum Teil zusätzliche Informationen eingegeben werden. Dazu gehörten unter anderem der Massenbereich in dem das gesuchte Protein anzusiedeln

war oder der Organismus aus dem es stammte. Voraussetzung für eine erfolgreiche Identifikation war jedoch in beiden Suchalgorithmen, dass das gesuchte Protein in der Datenbank vorhanden war. Da das Genom der Gerste bis dato nicht komplett durchsequenziert war, gab es häufig keine Treffer zu einer gegebenen Sequenz. In diesem Fall wurde mit der Peptidsequenz ein Homologievergleich (*Basic Local Alignment Search Tool*, Abk. *BLAST*) durchgeführt, bei der das Peptid einem Protein aus einem verwandten Organismus zugeordnet wird (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997). Die *BLAST*-Suche ermöglicht den Vergleich von Peptid- oder Proteinsequenzen mit den in einer Datenbank enthaltenen Sequenzen. Im Ergebnis werden die Sequenzen nach dem Grad der Homologie gelistet. Falls ein homologes Protein in der Datenbank existierte und das Peptid aus einem konservierten Bereich des Proteins stammte war die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Identifikation relativ hoch. Für einen Protein-*BLAST* waren Peptide jedoch in der Regel zu kurz. Auf der Homepage des *European Bioinformatics Institute* (EBI) gab es die Möglichkeit mit dem Suchalgorithmus „fast3 bzw. s3“ ([www.ebi.ac.uk/fasta33](http://www.ebi.ac.uk/fasta33)) eine *BLAST*-Suche mit kurzen Sequenzabschnitten durchzuführen (Pearson, 1990). Die Ergebnisse wurden ab einem Wahrscheinlichkeitswert von  $10^{-21}$  als signifikant angesehen. Der Wert hing dabei stark von der Länge der eingegebenen AS-Sequenz ab. Folglich waren auch Peptide mit einem niedrigeren Wert nicht zwangsläufig als „falsch Positive“ einzuordnen. Generell war es jedoch von Vorteil, wenn mehrere kurze Sequenzabschnitte für die Suche zur Verfügung standen. Diese konnten in einer Suchanfrage gleichzeitig verwendet werden („fast3“) und mussten innerhalb der Proteinsequenz nicht zusammenhängen. In Abhängigkeit des Homologiestatus eines Proteins wurden für eine eindeutige Identifikation mehrere Peptide benötigt.

Die verwendeten Suchmaschinen stützten sich auf verschiedene Proteindatenbanken. Die Suche am EMBL fand in der SWISS-PROT- und der TrEMBL-Datenbank vom *European Bioinformatics Institute* (EBI) statt. Die SWISS-PROT-Datenbank beinhaltete ausschließlich detektierte Proteinsequenzen. Als Ergänzung dazu enthielt die TrEMBL-Datenbank bis dato bekannte Nukleotidsequenzen, die in Proteine übersetzt wurden. Im „fasta“-Algorithmus konnten verschiedene Proteindatenbanken ausgewählt werden. Die Identifikation der Proteine erfolgte hierbei über die NCBI-Datenbank am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Das Kürzel „nr“ bei einer Datenbank steht für nicht redundant (*non redundant*). Dies bedeutete, dass doppelte Einträge in der Datenbank, z. B. wenn verschiedene Autoren dasselbe Protein beschrieben haben, aussortiert werden.

### 5.10.2 Berechnung der Hydrophobizität

Die Berechnung des Hydrophobizitätswertes (GRAVY-Index) für Peptide und Proteine wurde über das Programm „ProtParam“ ([www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)) durchgeführt, das im Internet über den ExPASy-Proteomics Server des *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) erhältlich ist (Appel et al., 1994). Die Hydrophobizitätswerte der Peptide wurden nach der von Kyte & Doolittle erstellten Tabelle berechnet (Kyte et al., 1982). Die Gesamthydrophobizität für ein Protein bzw. Peptid ergab sich dabei aus der Addition der Einzelwerte aller AS eines Peptids geteilt durch die AS-Gesamtzahl. Die Werte für die einzelnen AS spiegelten die jeweilige Löslichkeit in H<sub>2</sub>O wieder; gut lösliche (hydrophile) AS hatten negative Werte, schlecht lösliche (hydrophobe) AS positive Werte.

### 5.10.3 Berechnung der Sequenzabdeckung

Zur Berechnung der Sequenzabdeckung wurde zwischen absoluter und effektiver Sequenzabdeckung unterschieden. Erstere repräsentierte das prozentuale Verhältnis der Summe aller AS in den detektierten Peptiden und der Gesamtzahl der AS im Protein. Bei der effektiven Sequenzabdeckung wurde die Detektierbarkeit der einzelnen Peptide mitberücksichtigt. Das bedeutete, Peptide die außerhalb eines bestimmten Massenbereichs lagen, gingen in die Berechnung nicht mit ein. Infolge dessen war der Wert der effektiven Sequenzabdeckung immer  $\geq$  dem Wert der absoluten Sequenzabdeckung. Alle hier durchgeführten Berechnungen zur Sequenzabdeckung wurden nach dem Modus für die absolute Sequenzabdeckung durchgeführt. Fehlschnitte der Protease führten teilweise zu überlappenden Peptiden. AS aus diesen Sequenzabschnitten wurden jeweils nur einmal gezählt.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

#### 6.1.1 Charakteristisches Proteinmuster nach Trennung nativer Proteinkomplexe der Thylakoidmembran über 2D BN/SDS-PAGE

Die Thylakoidmembran eignete sich als Modellsystem zum Studium der Eigenschaften membranintegraler Proteine. Ihr Proteom setzt sich aus einer Vielzahl membrangebundener und löslicher Proteine zusammen, die mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Die Isolation der Proteinkomplexe erfolgte durch Solubilisierung der Membranen mit ca. 1% (Endkonzentration) des nicht-ionischen Detergenz DM. Die Trennung in der BN-PAGE erfolgte nach der Molekularmasse. Ein 6-12%iges Gradientengel erwies sich als geeignet für den zu trennenden Molekularmassenbereich von ca. 140 kDa (LHCII-Monomer) bis 1200 kDa (Superkomplexe). Um einen Einfluss der Eigenladung der Komplexe auf die Trennung zu verhindern, wurde der Farbstoff Coomassie G an die Detergenzmicellen gebunden, welche die Proteinkomplexe umgaben. Das unter den gegebenen Bedingungen negativ geladene Farbstoffmolekül maskierte die Eigenladung der Komplexe. Für die weitere Analytik der Proteinkomplexe wurde davon ausgegangen, dass ihr nativer Zustand in der Elektrophorese weitestgehend erhalten werden konnte. Im zweiten Schritt wurden die getrennten Komplexe über SDS-PAGE in ihre Untereinheiten getrennt. Eine spezielle Transfertechnik ermöglichte eine verlustfreie Übertragung der Proteine von der ersten auf die zweite Dimension (Eichacker et al., 2002). Die Kombination der beiden Elektrophoresetechniken ermöglichte die hochauflösende Trennung von Membranproteinen. Nach der Färbung der Gele mit CBB war ein reproduzierbares Proteinmuster erkennbar, das sich über alle Molekularmassen erstreckte. Das Muster bildete einen charakteristischen Fingerabdruck der Membranproteine der Thylakoide (Abb. 12, S. 74). Die Komplexzugehörigkeit der einzelnen Proteine konnte direkt aus deren Lage im SDS-Gel abgelesen werden. Proteine die in senkrechter Linie untereinander im Gel detektierbar waren, wurden demselben Protein-Komplex zugerechnet. Die Molekularmasse eines Proteins wurde hierbei mit Hilfe von Markerproteinen und anhand seiner Laufhöhe im Gel abgeschätzt (Abb. 12, S. 74). Die Identifikation der Proteine erfolgte nach enzymatischem Verdau über *de novo* Sequenzierung interner Peptide mittels Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MSMS).

In Übereinstimmung mit Devreese et al. konnte nach massenspektrometrischer Analytik der Proteine bestätigt werden, dass die Trennung von Membranproteinen mit einem GRAVY-Index von größer 0.5 über BN-PAGE möglich ist (Devreese et al., 2002). Zu den dabei separierten, hydrophoben Proteinen aus der Thylakoidmembran gehörten die Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Genprodukte *petB* (GRAVY-Index: 0.54) und *petD* (GRAVY-Index: 0.56), das RCII-Kernkomplexprotein *psbF* (GRAVY-Index: 0.71) und die CF<sub>0</sub>-ATPase UE *atpH* (GRAVY-Index: 1.03 (Abb. 12, S. 74).

Proteinkomplexe, die das Pigment Chlorophyll enthalten, erscheinen im Gel der 1. Dimension als dunkelgrüne Banden. Alle anderen Komplexe waren aufgrund der Bindung des zur Trennung hinzugefügten Farbstoffs Coomassie blau gefärbt. Chlorophyll wurde erst in der SDS-PAGE vom Protein getrennt und konnte nach der Elektrophorese als deutlich grüne Bande unterhalb der Lauffront nachgewiesen werden (Abb. 12, S. 74).

Die in der BN-PAGE auftretenden Proteinkomplexe wurden mit römischen Ziffern bezeichnet, welche für die Kennzeichnung der Proteinuntereinheiten in der 2. Dimension beibehalten wurden (Abb. 12, S. 74; I-V). Interessanterweise wurden Komplexe gleicher Art mehrmals in verschiedenen Assemblierungszuständen detektiert.

Nach der Trennung von Proteinkomplexen der Thylakoidmembran aus Gerstenchloroplasten waren im Bereich der Molekularmassen > 600 kDa zwei bis drei Superkomplexe detektierbar, die Proteine aus PSI und PSII enthielten, aber nicht einzeln untersucht wurden (Aro et al., 2005; Heinemeyer et al., 2004). Bei etwa 550-600 kDa trat eine intensiv grün gefärbte Bande auf, die dem PSI-LHCI und dem dimeren PSII-Komplex zugeordnet werden konnten (Abb. 12, S. 74). PSI und II erhielten I und II als Index. Aufgrund nahezu identischer Molekularmassen komigrierten die beiden Komplexe in der 1. Dimension der PAGE (Jordan et al., 2001). Auf einer Höhe von etwa 280 kDa lagen drei Komplexbanden nahe beieinander. Es handelte sich dabei um die ATP-Synthase (blaue Bande, 280-300 kDa), das Monomer des Chlorophyll-*a*-bindenden PSII-Monomers (grüne Bande, 280 kDa) und den dimeren Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex (blaue Bande) mit einer Molekularmasse von 250-270 kDa. Die ATP-Synthase wurde mit IV und der Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex mit Nummer V gekennzeichnet. Die Proteine des Lichtsammelkomplexes von PSII wurden während der BN-PAGE vom RCII abgetrennt. Sie bildeten zwei deutliche, grüne Banden bei ca. 70 und 140 kDa, welche die monomere und trimere Form des Komplexes repräsentierten. Die apparenten Molekularmassen der Proteinkomplexe berechneten sich aus den Massen der einzelnen Bestandteile. Zur Veranschaulichung soll der monomere LHCII-Komplex dienen. Seine apparente Masse verteilte sich auf ein Protein von 25-28 kDa, 14 Chlorophylle, sowie

zwei Luteine mit jeweils einer Masse von ca. 1 kDa. Die Detergenzmicelle trug ebenfalls noch einmal ca. 30 kDa bei, so dass sich eine Gesamtmasse von ca. 60-65 kDa ergab.

### 6.1.1.1 „Freie“ Proteine

Nach der 1. Dimension waren einige Proteine der isolierten Thylakoidmembranfraktion nahe der Lauffront lokalisiert. Diese Gruppe von Proteinen wurde als “freie” Proteine bezeichnet, da es nicht zu einer Massenzunahme aufgrund der Interaktion mit der Detergenzmicelle kam (Abb. 12, S. 74). Die „freien“ Proteine wurden folglich nicht solubilisiert bzw. während der BN-PAGE von den Komplexen abgetrennt. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich lösliche Proteine und Membranproteine aus verschiedenen Komplexen der Thylakoidmembran, sowie Proteine, die keinem Komplex zugeordnet werden konnten. Da der Hauptanteil, der auf der Stromaseite gelegenen, (membran-) assoziierten Proteine während der Präparation entfernt wurde, handelte es sich zu ca. 60% um Proteine, die dem Thylakoidlumen zugeordnet werden konnten. Ein Großteil der Proteine dieser Gruppe interagiert nicht mit der Lipidphase der Membran. Ihre Bindung kommt durch schwache Protein-Protein Wechselwirkungen mit Untereinheiten zustande, die in den Außenbereichen der Komplexe lokalisiert sind.

Einige als Bestandteil von Komplexen bekannte Proteine wurden komplett in der Gruppe der freien Proteine detektiert. Dazu gehörte z. B. das Genprodukt von *PsaN* (In) aus dem PSI, das als  $e^-$ -Überträger fungierende Plastocyanin (Ve) oder die UEn des Wasserspaltungsapparates PsbO (IIo), PsbP (IIp) und PsbQ (IIq) aus dem PSII. Lediglich in den Superkomplexen blieb ein Teil des wasserspaltenden Apparates am PSII assoziiert. Obwohl es sich bei den genannten Untereinheiten ausnahmslos um lösliche Proteine handelte, bestand kein genereller Zusammenhang zwischen der Abtrennung von Komplexuntereinheiten und der Zugehörigkeit des betroffenen Proteins zu den löslichen bzw. membranintegralen Proteinen. Die Genprodukte *PsaC* (Ic), *PsaD* (Id) und *PsaE* (Ie) aus PSI, die ebenfalls keine TMD aufwiesen, blieben während Solubilisierung und BN-PAGE stabil an den Holokomplex gebunden. Die Membranproteine PsaH, PsaG und PsaK (Ih, Ig, Ik) wurden sowohl als Bestandteil des PSI/LHCI-Komplexes als auch in der Gruppe der freien Proteinen detektiert. Die als Verbindung zwischen den LHCI und dem PSII dienenden Proteine CP26 und CP24 wurden ebenfalls zum Teil ohne Detergenzmicelle detektiert.

### 6.1.1.2 Komplexe des Photosystem I

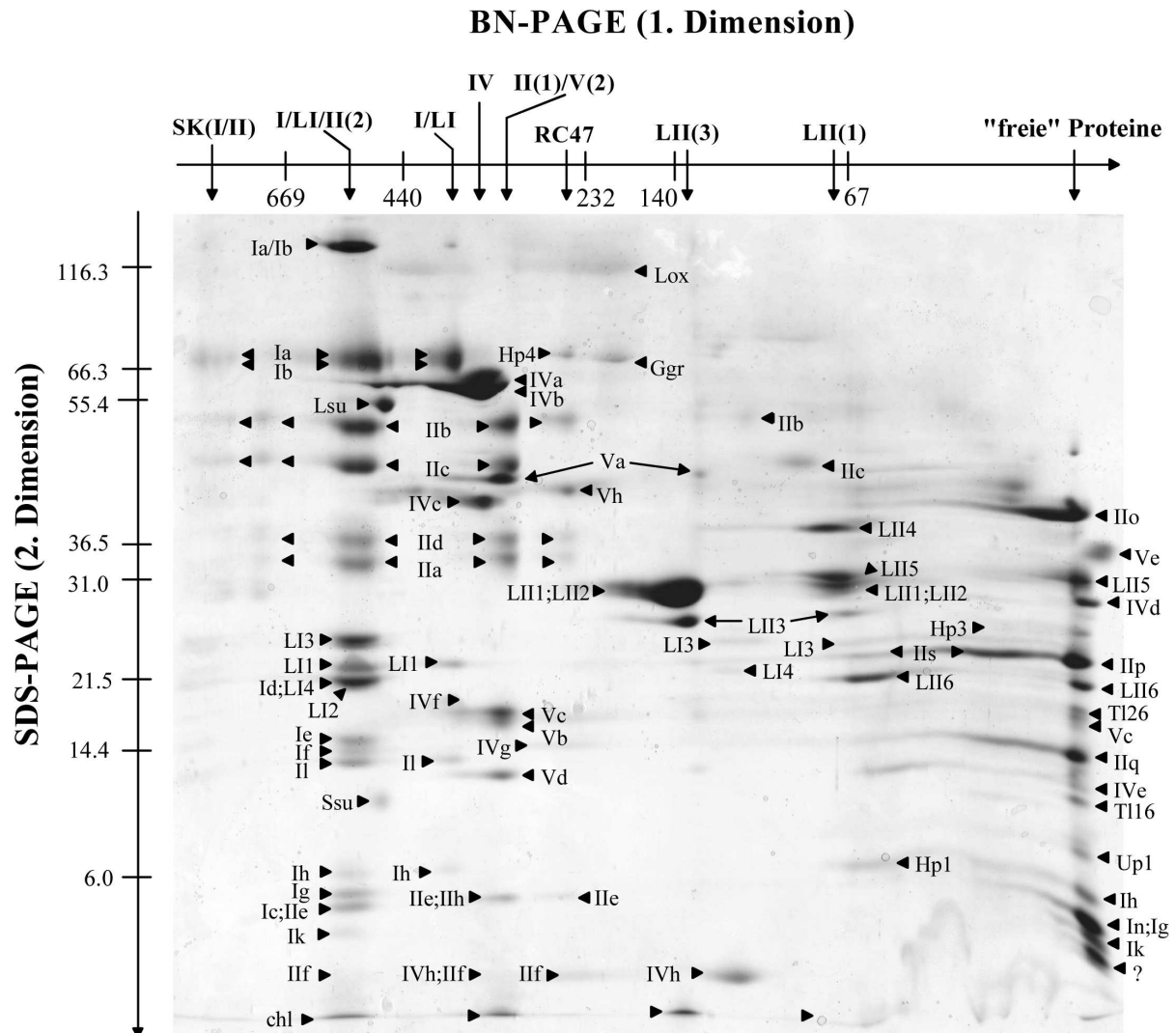
Bei ca. 80 kDa waren als deutlich ausgeprägte Bande in der SDS-PAGE zwei Proteine des PSI-RC (P700) zu finden. Es handelte sich dabei um PSI-A (*psaA*) und PSI-B (*psaB*), welche

jeweils 11 TMD besitzen (Abb. 12, S. 74, Ia und Ib). Ebenfalls in der Thylakoidmembran integriert liegen die Genprodukte von *PsaG*, *PsaK*, *psaL*, welche zwei TMD besitzen, sowie *psaI* und *psaJ*, mit je einer TMD. Die drei ersten Proteine konnten nach tryptischem Verdau über Peptide aus ihren löslichen Bereichen massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abb. 12, S. 74, Ig, Ik, Il). Die verbleibenden UEn des PSI gehören zu den löslichen Proteinen und besitzen keine TMD. Von den insgesamt sechs Proteinen waren vier auf der Stromaseite der Thylakoidmembran lokalisiert. Neben dem PSI-C-Protein (*psaC*), welches mit nur 8.8 kDa die kleinste Untereinheit des RCI darstellt, wurden außerdem die prozessierten Genprodukte des *PsaD*-, *PsaE*-, und *PsaH*-Proteins identifiziert (Abb. 12, S. 74, Ic, Id, Ie, Ih). Auf der luminalen Seite der Membran sind zwei Proteine (*PsaN* und *PsaF*) des PSI/LHCI-Komplexes lokalisiert. *PsaN* wurde im Bereich der freien Proteine detektiert, *PsaF* als Untereinheit des PSI/LHCI. Das *PsaN*-Genprodukt war offensichtlich nur schwach mit dem Membrankomplex assoziiert und wurde in der 1. Dimension der elektrophoretischen Trennung bereits abgetrennt. Die beiden niedermolekularen UEn *psaI* und *psaJ* wurden mit dieser Methode nicht detektiert.

Vier LHCP sind bekannt für PSI. Ihre Genbezeichnungen sind *Lhca1*, *Lhca2*, *Lhca3* und *Lhca4*. Obwohl drei davon mit 22.1 kDa (*Lhca1*) 22.3 kDa (*Lhca4*) und 23.2 kDa (*Lhca2*) sehr ähnliche Molekularmassen besitzen und deshalb in der PAGE nicht eindeutig voneinander getrennt werden konnten, war es kein Problem die Proteine über die Analyse der Fragmentspektren ihrer Peptide zu identifizieren (Abb. 12, S. 74, Ia2, Ia1, Ia4). Lediglich *Lhca3*, das mit ca. 25 kDa Schwerste der vier LHCP, wurde in der PAGE eindeutig aufgelöst (Ia3). Bis dato existiert das *Lhca3*-Protein aus Gerste nicht in den Datenbanken. Sowohl die Massenbestimmung als auch die Identifikation erfolgte deshalb über das homologe Protein aus Erbse (*Pisum sativum*). Wie ihre Verwandten aus dem LHCII enthielten die Proteine des LHCI ebenfalls drei  $\alpha$ -Helices. Mit einem durchschnittlichen GRAVY-Index von -0.137 wurden die Proteine des LHCI als hydrophil eingestuft und stellten damit keine typischen MP dar.

Zusätzlich zum fertig assemblierten PSI/LHCI-Komplex wurde ein Komplex gefunden, der ein Assemblierungsintermediat bzw. ein Abbauprodukt repräsentierte. Es handelte sich dabei um einen Chlorophyll enthaltenden Komplex, der in der Nähe der ATP-Synthase (Komplex IV) gelegen war (Abb. 12, S. 74). Im Vergleich zum murenen PSI/LHCI-Komplex wurden lediglich die Genprodukte von *PsaA* (Ia), *PsaB* (Ib), *Lhca1* (LI1), *PsaE* (Ie), *PsaL* (Il), und *PsaH* (Ih) identifiziert. Die fehlenden Untereinheiten zum nativen PSI/LHCI-Komplex befanden sich nicht unter den „freien“ Proteinen (vgl. Kapitel 6.1.1.1, S. 72). Dies

deutete darauf hin, dass es sich hier tatsächlich um einen intermediären Komplex handelte und nicht um ein Artefakt aus der Probenpräparation bzw. PAGE.



**Abb. 12: Proteom der Thylakoidmembran von Gerste nach Färbung mit CBB**

Chloroplasten aus Gerstenkeimlingen wurden lysiert und die Proteinkomplexe der Thylakoidmembran in 1.1% (v/v) DM solubilisiert. Anschließend wurden die nativen Komplexe in einer 1. Dimension über *Blue-Native*-PAGE (BN-PAGE) aufgetrennt. Pro Gelspur wurden die Membranen aus  $1.5 \times 10^8$  Chloroplasten aufgetragen. Dies entsprach einer Proteinmenge von ca. 600  $\mu$ g. Die isolierten Komplexe und Subkomplexe sind mit folgenden Abkürzungen bezeichnet: SK, Superkomplexe; (I), PSI, (LI), LHCI; (II), RCII; (IV), ATP-Synthase; (V), Cyt.*b<sub>6</sub>/f*-Komplex und (LII), LHCI. Neben den Komplexbezeichnungen ist in Klammern der Assemblierungsgrad angegeben. Dabei steht die in Klammern angegebene Zahl für die trimere (3), für die dimere (2) und für die monomere (1) Form des jeweiligen Komplexes. In der 2. Dimension wurden die Komplexe in ihre Untereinheiten gespalten und über SDS-PAGE getrennt. Die Laufrichtung beider Gele ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Nach Visualisierung der Proteine mit CBB-R250, wurden die Banden ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Die Identifikation der einzelnen Untereinheiten erfolgte mittels nanoESI-MS.

Die Proteinuntereinheiten sind im Gel mit einer römischen Zahl gekennzeichnet, welche die Komplexzugehörigkeit symbolisiert, sowie einem Buchstaben, welcher der Genbezeichnung des Proteins entspricht. Nach Auswertung der massenspektrometrischen Daten wurden folgende Komplexuntereinheiten identifiziert (Proteinkomplex, *Genbezeichnung der Untereinheit*, Proteinname): PSI (I): *psaA* (Ia), *psaB* (Ib), *psaC* (Ic), *PsaD* (Id), *PsaE* (Ie), *PsaF* (If), *PsaG* (Ig), *PsaH* (Ih), *PsaK* (Ik), *PsaL* (Il), *PsaN* (In), LHCI (LI): *Lhca1* (LI1), *Lhca2* (LI2), *Lhca3* (LI3), *Lhca4* (LI4); PSII (II): *psbA* (IIa), *psbB* (IIb), *psbC* (IIc), *psbD* (IId), *psbE* (IIe), *psbF* (IIf), *psbH* (IIh); *PsbO* (IIo); *PsbP* (IIp); LHCI (LII): *LhcllA-1* (LII4), *Lhcb1* (LII1), *Lhcb2* (LII2), *Lhcb3* (LII3), *Lhcb5* (LII5), *Lhcb6* (LII6), *PsbS* (IIs); ATP-synthase (IV): *atpA* (IVa), *atpB* (IVb), *atpC* (IVc), *atpD* (IVd), *atpE* (IVe), *atpF* (IVf), *atpG* (IVg), *atpH* (IVh); Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex (V): *petA*



(Va), *petB* (Vb), *PetC* (Vc), *petD* (Vd), *PetE* (Ve); *petH* (Vh); Proteine, die keinem Komplex zugeordnet werden konnten: - (Fbp), *CHLP* (Ggr), *At4g0110* (Hp1), - (Hp2), *LOX1* (Lox), - (Pie), *At4g02530* (Tl16), *At3g55330* (Tl26), *At1g54780* (Uc1), *At1g03600* (Up1), *Rbcl* (Lsu), - (Ssu), chl (Chlorophyll).

### 6.1.1.3 Komplexe des Photosystem II

Drei Komplexe wurden über ihre Proteinzusammensetzung in der SDS-PAGE dem PSII zugeordnet. Es handelte sich dabei um den monomeren und dimeren RCII-Kernkomplex, sowie als niedrigste Assemblierungsstufe der monomere RC47-Komplex. Alle drei Formen enthielten die Proteine D1, D2 und CP47. Von den niedermolekularen Untereinheiten wurden beide Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) von Cytochrom  $b_{559}$  detektiert (Abb. 12, S. 74, Iie und Iif). CP43 und das Phosphoprotein PsbH (7.7 kDa) wurden lediglich im monomeren und dimeren RCII-Kernkomplex identifiziert. Beide Proteine fehlen im RC47-Komplex, bei dem es sich um ein Assemblierungs- oder Degradationsprodukt des maturen PSII handelte (Buchel et al., 1999; van Wijk et al., 1997; Zheleva et al., 1998; Aro et al., 2005). Der Komplex besaß eine Molekularmasse von etwa 195-210 kDa (Abb. 12, S. 74). Weitere drei für den RC47 vorhergesagte Proteine, die Genprodukte von *psbI*, *PsbT* und *PsbW* konnten mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Als freie Proteine ohne Komplexzugehörigkeit konnten aus dem RCII lediglich CP43 und in geringerem Umfang CP47 detektiert werden.

Mit Ausnahme der Genprodukte von *psbH*, *psbE*, *psbF* (alle PSII) und *atpH* (ATP-Synthase) wurden über die massenspektrometrische Analyse nach tryptischem Verdau keine weiteren niedermolekularen (< 10 kDa) UEn der Membranproteinkomplexe der Thylakoide detektiert. Bei den vier Proteinen wurden, abhängig vom löslichem Anteil an der Primärsequenz sowie der Verteilung der Trypsinschnittstellen, ein bis vier Peptide detektiert (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Detektierbare tryptische Peptide aus niedermolekularen Proteinen**

Protein-nummer	Gen	Name (Masse)	Acc.-Nr. Gerste	Identifizierte Peptide ( <i>m/z</i> -Wert, Ladung, AS-Sequenz) in Gerste
Ilh	<i>psbH</i>	<b>PSII 10 kDa - Phosphoprotein</b> (7.7)	P12363	545.63 [M+3H] <sup>3+</sup> : TGAGSI/LI/LKPI/LNSEYGK <sup>1</sup>
Iie	<i>psbE</i>	<b>Cytochrom<sub>b559</sub> (<math>\alpha</math>-UE)</b> (9.3)	P05169	506.79 [M+2H] <sup>2+</sup> : QGI/LPI/LI/LTDR <sup>1</sup> 561.82 [M+2H] <sup>2+</sup> : SFADI/LI/LTSI/LR <sup>1</sup> 571.76 [M+2H] <sup>2+</sup> : PNEYFTESR 743.33 [M+2H] <sup>2+</sup> : FDSLEQI/LDEF SR <sup>1</sup>
Iif	<i>psbF</i>	<b>Cytochrom<sub>b559</sub> (<math>\beta</math>-UE)</b> (4.4)	P09198	498.77 [M+2H] <sup>2+</sup> : TYPI/LFTVR <sup>1</sup>
IVh	<i>atpH</i>	<b>ATP-Synthase CF0-UEIII</b> (8.0)	A1E9I6	521.78 [M+2H] <sup>2+</sup> : AAGQAVEGI/LAR <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die AS Isoleucin und Leucin können im MSMS-Spektrum nicht unterschieden werden.

Die Sequenzabdeckung betrug dabei zwischen 14% (AtpH) und 49% (PsbE). Beim Genprodukt von *atpH* wurde wiederholt ein Peptid detektiert, das kein tryptisches Peptid darstellte. Es handelte sich dabei um Fehlschnitt der Protease bzw. einen Sequenzbruch zwischen den AS 30 (Thr) und 31 (Ala).

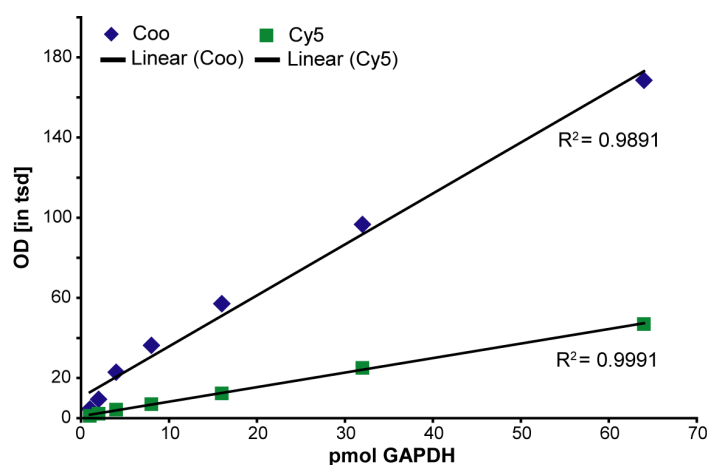
Zu den fehlenden Proteinen zählten die Genprodukte von *psaI* und *J* aus PSI, sowie *psbI*, *J*, *K*, *L*, *M*, *N*, *Tc*, *W*, *X*, *Y-1*, *Y-2* und *Z* aus PSII. Alle genannten UEn besaßen entweder keine Schnittstelle für die Protease Trypsin oder die Verteilung der Schnittstellen führte zur Entstehung von extrem kurzen Peptiden, die infolge nicht detektierbar oder für das entsprechende Protein nicht signifikant waren.

### 6.1.2 Passive Elution von Proteinen aus SDS-Gelen

Die Elution von Proteinen aus der Polyacrylamidmatrix stellte die Grundlage für die erfolgreiche massenspektrometrische Detektion niedermolekularer MP dar (vgl. Kapitel 6.1.3, S. 80).

Die Versuche zur Extraktion von fixierten Proteinen aus der Gelmatrix wurden am Standardprotein GAPDH mit SDS bzw. unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt. Die Lösung mit den extrahierten Proteinen wurde einrotiert, in einem kleinen Volumen Puffer aufgenommen und erneut auf ein Gel aufgetragen. Nach der Färbung mit CBB-R250 erfolgte die Quantifizierung der extrahierten Mengen über die Bestimmung der optischen Dichte.

Um einen Zusammenhang zwischen Färbeintensität und Proteinmenge zu verifizieren und damit die Tauglichkeit von CBB für eine Quantifizierung zu gewährleisten, wurde eine Verdünnungsreihe erstellt bei der die Proteine vorher mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert wurden (Abb. 13).



**Abb. 13: Linearität der Färbemethoden CBB-R250 und Cy5 (Fluoreszenz)**

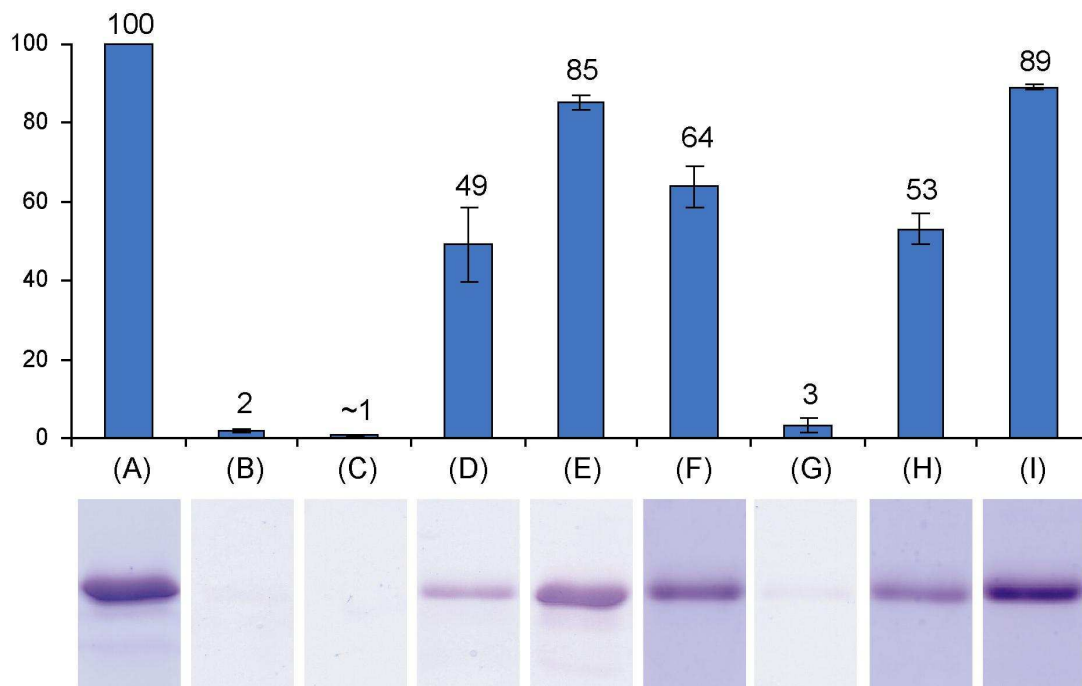
Die Linearität der Farbstoffmarkierung bei Verwendung von CBB-R250 bzw. dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 als Färbereagenz wurde verglichen. Auf der x-Achse sind die Mengen an GAPDH in pmol pro Verdünnungsschritt (1 pmol, 2 pmol, 4 pmol, 8 pmol, 16 pmol, 32 pmol und 64 pmol) angetragen. Die y-Achse repräsentiert die optische Dichte (OD). Für GAPDH ist die Ausgleichsgerade in beiden Fällen linear im gewählten Konzentrationsbereich. Der Bestimmungskoeffizient liegt für CBB-250 bei  $R^2 = 0.9891$  und für Cy5 bei  $R^2 = 0.9991$ .

Die Farbstoffe der Cy-Reihe werden standardmäßig zur Proteinquantifizierung verwendet. Die Intensität der einzelnen Banden der Verdünnungsreihe wurde anschließend im

Fluoreszenzscanner detektiert und die Proteine danach mit Coomassie gefärbt. Eine Verfälschung des Ergebnisses der CBB-Färbung durch Veränderung der Proteineigenschaften aufgrund der vorhergehenden Markierung mit Cy5 konnte ausgeschlossen werden, da der Fluoreszenzfarbstoff nur etwa 3% aller Proteine einer Probe an jeweils einer Bindungsstelle markiert. Die Quantifizierung der Verdünnungsreihe führte in beiden Fällen zu einer nahezu linearen Ausgleichsgerade im gewählten Konzentrationsbereich von 1-64 pmol. Folglich war eine Quantifizierung des für die Versuche gewählten Standardproteins GAPDH im Bereich  $\leq 50$  pmol direkt mit CBB-250 möglich.

Proteine adsorbieren leicht an Oberflächen. Eine verstärkte Adsorption fand statt, wenn die gelösten Proteine im Zuge des Versuchs einrotiert wurden. Da die Proteine in weiterführenden Versuchen massenspektrometrisch analysiert werden sollten, war die Menge an Protein entscheidend, die nach der Vakuumtrocknung ohne Zusatz von Detergenzien (SDS) zur Verfügung stand. Ein signifikanter Unterschied in der Proteinausbeute nach erneutem Lösen der Proben mit bzw. ohne SDS im Puffer konnte nicht festgestellt werden. Damit blieben zumindest lösliche Proteine nicht irreversibel an der PP-Oberfläche haften.

Die nicht extrahierte Proteinbande mit 50 pmol GAPDH stellte die Positivkontrolle dar und wurde auf 100% normiert (Referenz 1; Abb. 14, A).



**Abb. 14: Extraktion fixierter Proteine (GAPDH) aus SDS-Gelen nach CBB-Färbung**

50 pmol des Standardproteins GAPDH wurden über SDS-PAGE getrennt und anschließend mit CBB gefärbt. Die während der Färbung im Gel fixierten Proteine wurden anschließend mit verschiedenen Lösungen aus dem Gel extrahiert. Die Extraktion fand entweder über Nacht in einem Theroschüttler (B, D) oder für 30 min im Ultraschallbad (C, E-I) statt. Die Extrakte wurden anschließend erneut über SDS-PAGE getrennt und mit CBB gefärbt. Die gefärbte Proteinbande mit 50 pmol GAPDH stellt die Positivkontrolle dar und wurde auf 100% normiert (A). Die Ausbeute der einzelnen Extraktionen ist jeweils über dem zugehörigen Balken in %

angegeben. Als Nullkontrolle wurde die Extraktion mit ddH<sub>2</sub>O bzw. 1. Entfärber (Proteinfixierung) als Lösungsmittel inkubiert (B, C). Die Extraktion der in der Bande enthaltenen Proteinmenge wurde mit 0.25% SDS (D), einem Gemisch aus 50% FA, 25% ACN und 15% 2-Propanol (FAPH (Ehring et al., 1997); E) und FA/TFE (1:1) (I) durchgeführt. Um die Bedingungen bei der Extraktion mit FAPH zu optimieren, wurden zusätzlich die Anteile der an der Extraktion beteiligten Lösungsmittel variiert. Hierbei erfolgte die Extraktion unter Erhöhung der Säurekonzentration auf 70% FA (F), Verdopplung des Anteils an organischem Lösungsmittel auf 80% bei gleichzeitiger Reduktion des Säureanteils auf 10% (G) und Reduktion des Anteils an organischem Lösungsmittel auf 20% (H).

Als Nullkontrolle wurde die zerkleinerte Gelbande mit ddH<sub>2</sub>O als Lösungsmittel inkubiert (Referenz 2). Selbst bei einer Inkubationszeit von 15h blieb wie erwartet nahezu das gesamte Protein im Gel fixiert. Nur eine zu vernachlässigende Menge von etwa 2% der Ausgangsmenge an Protein wurde herausgelöst (Abb. 14, B; S.77). Als 2. Nullkontrolle wurde eine Extraktion der Proteine im 1. Entfärber (Fixierer) überprüft (Referenz 2). Die Lösung diente einer Fixierung der Proteine im Gel und sollte daher nicht zur Extraktion einer signifikanten Menge an Protein führen. Wie erwartet führte die Inkubation der Gelbanden in der methanol- bzw. ethanolhaltigen Lösung nicht zur Extraktion von Proteinen (Ausbeute < 1%) (Abb. 14, C; S. 77).

Eine herkömmliche Methode zur passiven Elution fixierter Proteine aus Polyacrylamidgelen stellte die Extraktion mit SDS dar. Dabei wurden Konzentrationen von max. 1% SDS verwendet. Die Extraktion mit 0.25% SDS diente als Basis zum Vergleich der folgenden Extraktionsversuche. Die Inkubation über Nacht in 0.25% SDS führte dabei zur Extraktion von etwa 50% der Proteine, die in der Gelbande enthalten waren (Abb. 14, D, S. 77). Eine über 30% höhere Ausbeute wurde bei der Inkubation mit einem Gemisch aus Ameisensäure (F), Acetonitril (A), Isopropanol (P) und H<sub>2</sub>O (H) (FAPH, 50/25/15/10, v/v/v/v) erreicht. Etwa 85% der aufgetragenen Proteinmenge wurden in diesem Ansatz aus dem Gel extrahiert (Abb. 14, E, S. 77). Die Extraktion mit FAPH erlaubte zudem eine erhebliche Reduktion der Inkubationszeit von 15h auf 30 min. Ähnlich hohe Ausbeuten konnten nach Austausch der Ameisensäure gegen Essigsäure (HOAc) erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Tests an Membranproteinen zeigten zudem, dass die Methode ebenfalls zur Extraktion von Membranproteinen aller Molekularmassen geeignet war.

Aufgrund der hohen Ausbeute an Protein bei Verwendung von FAPH stellte sich die Frage, nach dem für die Extraktion verantwortlichen Bestandteil des Gemisches aus Säure und organischen Lösungsmitteln. Interessant schien die Beantwortung dieser Frage auch vor dem Hintergrund, dass die Zusammensetzung der Lösung zur Fixierung von Proteinen aus ähnlichen Komponenten besteht, hier jedoch keine Extraktion von Proteinen aus dem Gel zu beobachten war. Der Grund hierfür könnte jedoch hauptsächlich darin zu suchen sein, dass im

Gegensatz zu ACN, der in der Entfärberlösung enthaltene Alkohol den Proteinen die Hydrathülle entzieht.

Für eine passive Elution der Proteine aus dem Gel war ein hoher Säureanteil in der Extraktionslösung essentiell. Die Inkubation der Proteinbanden in 40% organischem Lösungsmittel allein, ohne den Zusatz von Säure führte nicht zur Extraktion von Proteinen (Daten nicht gezeigt). Bei einer Verminderung der Konzentration an organischem Lösungsmittel auf 30% bzw. 20% ging die Proteinausbeute ebenfalls deutlich auf 64% bzw. 53% zurück (Abb. 14, F und H, S. 77). Die verminderte Ausbeute konnte trotz gleichzeitiger Erhöhung der Konzentration an FA nicht kompensiert werden (Abb. 14, F, S. 77). Die Inkubation von Proteinen mit einer hohen Konzentration an Ameisensäure kann zu Modifikationen an einzelnen Aminosäuren führen. Das Ausmaß der Modifikationen hing dabei von der Temperatur, der Expositionszeit und der Konzentration der Säure ab. Da sowohl Temperatur als auch die Inkubationszeit bereits optimiert waren (Daten nicht gezeigt und (Ehring et al., 1997)), wurde die Extraktion in geringer Konzentration an Ameisensäure (10%) mit doppelter der Menge an organischem Lösungsmittel (80%) durchgeführt. Die Proteinausbeute war hier mit nur etwa 3% ebenfalls sehr gering, so dass davon ausgegangen werden musste, dass die Konzentration der Säure beim Extraktionsprozess die entscheidende Rolle spielte (Abb. 14, G, S. 77).

Eine weitere Extraktion wurde mit Ameisensäure und 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) (1:1) durchgeführt. TFE gilt als gutes Lösungsmittel für Proteine und wurde bereits erfolgreich zur Isolation und Trennung von (Membran-) Proteinen in der IEF eingesetzt (Deshusses et al., 2003). Die Ausbeute an Protein lag mit 89% sogar noch leicht über dem Wert, der mit FAPH erreicht wurde.

Bei den Proben (A) und (E) waren deutlich zwei Abbaubanden bei etwa 33 und 27 kDa zu sehen. Diese waren sowohl in den Spuren der Referenz (A) als auch nach der Extraktion zu beobachten (E). Die massenspektrometrische Analyse der beiden Banden deutete darauf hin, dass es sich dabei um Proteinfragmente handelte, die aus dem Bruch einer Asp-Pro-Bindung resultieren. Diese Amidbindung, die in GAPDH zweimal vorkommt, gilt als besonders labil und kann im Sauren leicht hydrolysiert werden (Piszkiewicz et al., 1970; Yu et al., 1993; Skribanek et al., 2002). Generell ist die vom Prolin aus gesehen N-terminal gelegene Amidbindung aufgrund ihres basischeren Charakters deutlich labiler als andere Peptidbindungen (Jonsson, 2001).

Ein direkter Beweis über die Detektion der jeweiligen Peptidbruchstücke war nicht möglich. Da in beiden Spektren das C-terminale Peptid T36-37 detektiert wurde, schied eine

Verkürzung der Primärsequenz auf dieser Seite aus. Das Peptid T12 welches sich C-terminal benachbart zur 2. Bruchstelle befand wurde in beiden Fällen detektiert. Folglich lag die Bruchstelle N-Terminal von T12. Damit war der Bruch der Asp-Pro-Bindung unter den Bedingungen wahrscheinlich, zumal in der oberen Bande nur die beiden normalerweise detektierbaren Peptide T1-2 und T2 fehlten. In der unteren Bande waren sämtliche N-terminal der hypothetischen Bruchstelle gelegenen Peptide nicht detektierbar.

### **6.1.3 Massenspektrometrische Analyse niedermolekularer Proteine**

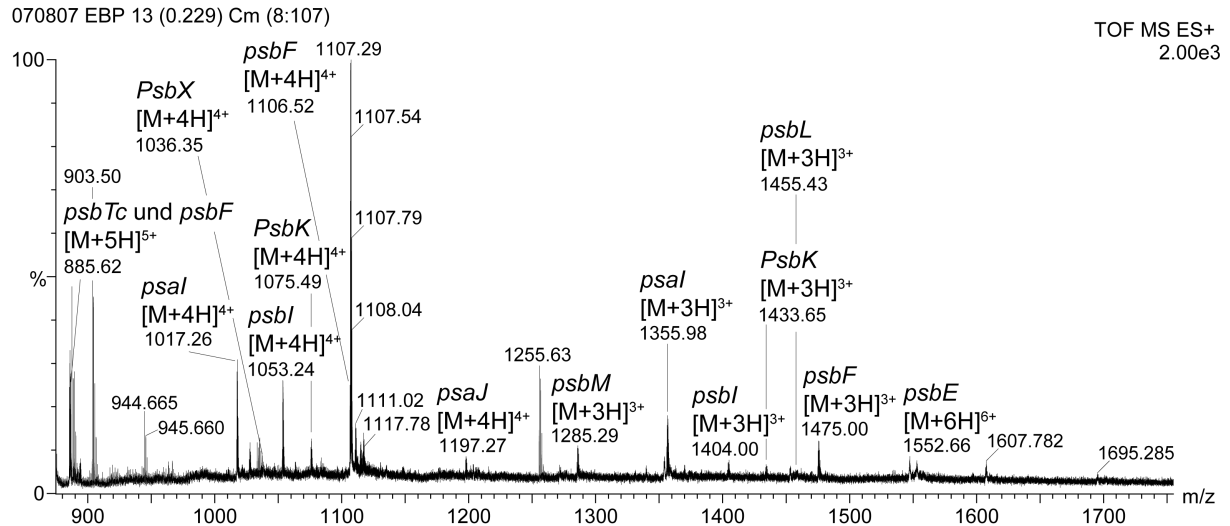
Die Analyse niedermolekularer MP wurde auf Ebene des unverdauten Proteins nach Isolation aus den nativen Komplexen der BN-PAGE durchgeführt. Dazu wurden die Komplexbanden des PSI-LHCI/PSII-Dimers, sowie des PSII-Monomers aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine mit einem Säure-Lösungsmittel-Gemisch extrahiert. Um CBB-G250, das in der BN-PAGE als Ladungsträger fungiert zu entfernen, wurden die Banden vor der Extraktion in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und ACN (1:1) entfärbt. Trotz Solubilisierung der Proteine bzw. Komplexe mit Detergenz wurden diese nicht in detektierbaren Mengen aus dem Gel ausgewaschen. Mit den Proteinen wurden ebenfalls Pigmente (Chl) und Lipide aus den Banden extrahiert. Nach dem Abziehen der Extraktionslösung in einem Vakuum-Konzentrator wurden die getrockneten Proben zur Abtrennung von Detergenzien und Chlorophyll in 80% Aceton aufgenommen. Gleichzeitig wurden im Zuge der Fällung Salze weitgehend abgetrennt, die während der Reaktion in die wässrige Phase übergehen (Jiang et al., 2004). Nach ca. 4 h war die quantitative Fällung der niedermolekularen Proteine erfolgt. Eine Verlängerung der Inkubationszeit erhöhte die Ausbeute der Zielmoleküle nicht. Im Überstand waren keine detektierbaren Mengen an Protein mehr festzustellen.

Um Proteinverluste durch irreversible Bindung der Analytmoleküle an die  $\text{C}_{18}$ -Matrix einer Mikrosäule zu vermeiden, erfolgte die Messung direkt, d. h. ohne weitere Aufreinigung, da ein Großteil der störenden Moleküle (Salze und Detergenzien) durch intensives Waschen der Gelbanden und durch die vorangegangene Acetonfällung bereits abgetrennt worden waren. Trotzdem war in den Spektren zum Teil ein starkes Hintergrundrauschen detektierbar. Die Ursache hierfür könnten höhermolekulare Proteine sein, die ebenfalls im Zuge der Extraktion aus dem Gel herausgelöst wurden, im Spektrum jedoch keine distinkten Signale bildeten, oder Reste an Salzen, die trotz der Reinigungsschritte nicht abgetrennt worden waren.

Im Fall des mono- und dimeren PSII-Subkomplexes erwies sich das Probenmaterial aus einer Komplexbande als ausreichend (Gelauftrag:  $1 \cdot 10^8$  Plastiden oder 50  $\mu\text{g}$  Chl). Bei schwächeren Banden war es möglich Material aus mehreren Banden gleicher Art für eine Messung zu akkumulieren. Die Methode erwies sich als gleichermaßen geeignet zur

Extraktion neutraler (z. B. PsbE, GRAVY-Index ~ 0) und stark hydrophober Proteine (z. B. PsbM, GRAVY-Index 1.362).

Für jedes Protein wurden in der Regel mehrere Signale im Spektrum detektiert (Abb. 15). Dies führte zum Teil zu Überlagerungen bei einzelnen Proteinsignalen. Bei Anwesenheit eines Methionins innerhalb der Primärsequenz wurden überwiegend die Oxidationsprodukte der betroffenen Proteine detektiert. Das Verhältnis von unmodifiziertem zu modifiziertem Molekül war von Probe zu Probe unterschiedlich. Zusätzlich kam es zur Bildung von Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Addukten. Dabei wurde das Salzion entweder an einer Aminogruppe (Arg, Lys und N-Terminus) oder an einer Carboxylgruppe (Glu, Asp und dem C-Terminus) angelagert. In beiden Fällen war die Anlagerung mit der Abspaltung von Protonen verbunden. Bei unveränderter Gesamtladung betrug die absolute Massenänderung des Proteins im Fall der Addition von Na<sup>+</sup> ~ 22, wenn der Austausch an eine Aminogruppe erfolgte, bzw. ~ 21 bei Addition an eine Carboxylgruppe. Im zweiten Fall wurden formal zwei Protonen entfernt, ein H<sup>+</sup> aus der Carboxylgruppe (-COOH → -COONa<sup>+</sup>) und ein H<sup>+</sup> aus einer Aminogruppe (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> → -NH<sub>2</sub>), die dann nicht mehr als Ladungsträger fungierte. Der Effekt war hauptsächlich bei Proteinen zu beobachten, bei denen die formalen Ladungsträger in geringem Abstand zueinander lagen (z. B. PsbTc, Tabelle 4 S. 86).



**Abb. 15: Niedermolekulare Proteine aus der PSI-LHCI/PSII-Dimer-Bande der BN-PAGE**

Die Proteinkomplexe der Thylakoidmembran aus  $1 \times 10^8$  Plastiden wurden über BN-PAGE getrennt. Aus der 1. Dimension wurde eine Bande ausgeschnitten, welche die Komplexe PSI/LHCI und das PSII-Dimer enthielt. Die enthaltenen Proteine wurden aus dem Gel extrahiert und mit Aceton gefällt. Anschließend wurden die niedermolekularen UEn direkt über nanoESI-MS analysiert. 100 Einzelspektren wurden zum gezeigten Gesamtspektrum summiert. Die relative Intensität (y-Achse) wurde auf das höchste Signal im Spektrum normiert (hier PsbF, entspricht 100%). Identifiziert wurden die Genprodukte von *psal* und *psaJ* aus PSI, sowie *psbE*, *psbF*, *psbI*, *psbK*, *psbL*, *psbM*, *psbTc* und *PsbX* aus PSII. Angegeben sind die monoisotopischen *m/z*-Werte (x-Achse) der einzelnen Proteine mit ihren Ladungszuständen von dreifach ([M+3H]<sup>3+</sup>) bis sechsfach geladen ([M+6H]<sup>6+</sup>).

Die Identifikation der Proteine erfolgte jeweils nach MSMS-Analyse des Gesamtproteins mittels von *de novo* Sequenzierung. Meist waren dabei nur Teilbereiche der Gesamtsequenz anhand der Fragmentensignale belegbar. In seltenen Fällen gelang jedoch auch die Berechnung der Gesamtsequenz (z. B. PsbX aus Tabak).

#### 6.1.3.1 Cytochrom *b*<sub>559</sub> ( $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit)

Bei der  $\alpha$ - und  $\beta$ -UE des Cytochrom *b*<sub>559</sub> handelte es sich um zwei 9.3 kDa und 4.4 kDa schwere Proteine aus dem RCII des Photosyntheseapparates. Die beiden plastidär codierten Genprodukte von *psbE* und *psbF* waren im sowohl im mono- als auch im dimeren PSII-Komplex detektierbar. Mit 82 AS war das Genprodukt von *psbE* in höheren Pflanzen etwa doppelt so lang wie *psbF* (38 AS). Die Primärsequenzen beider Proteine waren dabei über verschiedene mono- und dikotyle Arten zu etwa 95% konserviert und bei beiden UEn war das initialisierende Met abgetrennt. Während das PsbF-Protein mit einem Hydrophobizitätswert von ca. 0.6-0.7 zu den hydrophoben Proteinen gerechnet werden musste, war PsbE aufgrund seines höheren Anteils an löslichen Domänen mit einem GRAVY-Index von +/- 0 deutlich hydrophiler. Beide Polypeptide ließen sich über interne Peptide identifizieren, die durch tryptischen Verdau generiert wurden (vgl. Kapitel 6.1.1.3, S. 75). Im Fall von PsbF handelte es sich dabei um das N-terminale Peptid, welches sich außerhalb der TMD auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran befindet. In Gerste umfasste dieses Peptid 8 AS (TYPIFTVR) und wurde im MS-Spektrum als  $[M+2H]^{2+}$  bei 498.76 *m/z* detektiert. Mit einem GRAVY-Index von 0.338 war dieses Peptid ebenfalls als hydrophob einzustufen.

PsbE wurde in den Spektren in der Regel als  $[M+6H]^{6+}$  bei 1552.63 *m/z* detektiert (Abb. 15, S. 81). Seltener traten auch sieben- und achtfach geladene Ionen auf. Die daraus berechnete monoisotopische Molekularmasse (MM) betrug ca. 9310 Da. Damit blieb eine Differenz von 2 Da zum theoretisch aus der Primärsequenz ohne initialisierendes Met berechneten Wert, die nicht erklärt werden konnte. Im Fall von PsbF betrug der theoretische Wert für die monoisotopische Masse 4495.406 Da, berechnet aus der Primärsequenz des unmodifizierten Proteins. Das vierfach geladene Signal wäre demnach bei 1124.85 *m/z* zu erwarten. Das unverdaute Protein wurde als drei- vier- und fünffach geladenes Signal bei 1475.18 *m/z*  $[M+3H]^{3+}$ , 1106.58 *m/z*  $[M+4H]^{4+}$  und 885.52 *m/z*  $[M+5H]^{5+}$  im Massenspektrum detektiert (Abb. 15, S. 81). Im ungeladenen Zustand entsprach dies einer Masse von 4422.328. Unter Einbeziehung des Messfehlers ergab sich eine um ca. 73 Da zu niedrige Masse für PsbF. Für die Abweichung wurden folgende Ursachen ermittelt. In höheren Pflanzen und Grünalgen wird das initialisierende Methionin beim maturen Protein



abgetrennt. Die berechnete Masse von *psbF* reduzierte sich somit auf 4364.366 Da und lag damit um 58 Da niedriger als der gemessene Wert. Grund hierfür waren die posttranslationale Acetylierung des N-Terminus (+42 Da) am maturen Protein, sowie die Oxidation von Methionin an Position 33 (+16 Da). Eine posttranslationale Acetylierung der Amino-Termini in PSII-Proteinen von Eukaryoten wurde ebenfalls bereits früher beobachtet (Blenis et al., 1993). Die Modifikation findet bei den Proteinen CP43, D1, D2 und Cytochrom  $b_{559}$  ( $\beta$ -UE) jeweils an einem konserviertem Thr statt. Eine analoge Prozessierung wurde am maturen PsbF-Protein von Tabak festgestellt. Die Identität von *psbF* wurde nach Fragmentierung des Gesamtproteins verifiziert. Anhand des MSMS-Spektrums war lediglich ein Teil der Gesamtsequenz von PsbF belegbar. Es handelte sich dabei um den C-terminalen Abschnitt „...*HGLAVPTVFFLGSISAM<sub>ox</sub>QFIQR*“. Der Hauptanteil des Abschnitts (hier *kursiv*) gehörte dabei der Transmembrandomäne von PsbF an.

#### 6.1.3.2 *PsbI*

Das zum RCII gehörende Genprodukt von *psbI* wurde vorwiegend als  $[M+4H]^{4+}$  Signal bei 1049.32  $m/z$  bzw. in seiner oxidierten Form bei 1053.34  $m/z$  detektiert (Abb. 15, S. 81). Zusätzlich wurden ebenfalls die zugehörigen dreifach geladenen Ionen bei 1398.71  $m/z$  und 1404.14  $m/z$  detektiert. Analog zu den Genprodukten von *psbM* und *psbTc* blieb das initialisierende Formyl-Met am maturen Protein erhalten. Mit einem GRAVY-Index von 0.214 gehörte PsbI zu den weniger hydrophoben MP. PsbI wurde sowohl im monomeren als auch im dimeren PSII-Subkomplex nachgewiesen.

#### 6.1.3.3 *PsbK*

Das plastidär kodierte Genprodukt von PsbK wurde als vierfach und dreifach geladenes Molekül bei 1075.63  $m/z$  und 1433.89  $m/z$  detektiert (Abb. 15, S. 81). Daraus ergab sich eine MM von 4298 Da. Die Massendifferenz zum maturen Protein, welche aus der Primärsequenz berechnet wurde, betrug 16 Da. Die Verschiebung der MM kam durch die Oxidation des an Position 16 gelegenen Met zustande. PsbK wurde sowohl im monomeren als auch im dimeren PSII-Subkomplex nachgewiesen.

#### 6.1.3.4 *PsbL*

PsbL war bei der Extraktion aus dem Gel lediglich als schwaches Signal detektierbar. Grund hierfür war wahrscheinlich das Fehlen von Ladungsträgern (basische AS) innerhalb der Proteinsequenz. Mit nur einem Arg und der Ladung am N-Ter sollte PsbL formal lediglich als doppelt geladenes Ion vorkommen. Detektiert wurde das Genprodukt von *psbL* jedoch

ausschließlich als  $[M+3H]^{3+}$  bei 1455.43  $m/z$  (Abb. 15, S. 81). Das mature Protein besaß somit eine apparente MM von 4363.29 Da. Die berechnete Masse lag ohne das initialisierende Formyl-Met bei 4363.23 Da und war somit lediglich um 0.06 Da geringer. PsbL wurde nur im dimeren PSII-Subkomplex detektiert. Aufgrund des schwachen Proteinsignals ist eine Anwesenheit auf der Ebene des Monomers jedoch nicht auszuschließen. Im Gegensatz dazu wurde PsbL bei analogen Versuchen am monomeren PSII-Komplex aus Tabak zweifelsfrei nachgewiesen.

#### 6.1.3.5 *PsbM*

PsbM war mit einer Gesamtmasse von ~ 3.9 kDa eines der kleinsten und einem GRAVY-Index von etwa 1.4 gleichzeitig eines der hydrophobsten Proteine in der Thylakoidmembran. Das mature Protein, bei dem das initialisierende Formyl-Met ebenfalls erhalten blieb, wurde ausschließlich als  $[M+3H]^{3+}$  bei 1280.08  $m/z$  detektiert. Meist wurde jedoch die oxidierte Form des Proteins bei 1285.41  $m/z$  detektiert (Abb. 15, S. 81). PsbM wurde sowohl im monomeren als auch im dimeren PSII-Subkomplex nachgewiesen.

#### 6.1.3.6 *PsbTc*

Bei PsbTc erfolgte keine Abtrennung des initialisierenden Formyl-Met. Die aus der Sequenz berechnete monoisotopische MM von PsbTc betrug somit 4407.48 Da. Die Identifikation von PsbTc gestaltete sich in Gerste als schwierig, da das mature Protein nahezu exakt die gleiche Masse besitzt, wie PsbF (4406.38 Da). Da von beiden Proteinen ebenfalls eine oxidierte Form existierte, war auch nach Modifikation keine Differenzierung möglich. PsbTc wurde ausschließlich als  $[M+5H]^{5+}$  detektiert (Abb. 15, S. 81). Da PsbF ebenfalls als  $[M+5H]^{5+}$  detektiert wurde, kam es zur Überlagerung der beiden Proteinsignale. Die oxidierte Form von PsbF besaß als  $[M+5H]^{5+}$  eine berechnete  $m/z$  von 885.47; die oxidierte Form von PsbTc lag bei 885.70  $m/z$ . Der Unterschied zwischen beiden Proteinen betrug somit lediglich 0.23  $m/z$ . Da sich bei einem fünffach geladenen Ion die Isotopensignale um 0.2  $m/z$  unterschieden, lagen die beiden Ionen nahezu exakt in Phase. Das monoisotopische Signal von PsbTc befand sich somit unter dem 1. Isotopensignal von PsbF. Eine eindeutige Identifikation beider Proteine war jedoch nach MSMS-Analyse des Signals möglich. Aus dem Fragmentspektrum konnten beiden Proteinen jeweils Teilsequenzen zugeordnet werden. PsbTc wurde zum Teil auch als Fragment bei 1007.58  $m/z$  detektiert. Das vierfach geladene Molekül war um etwa 381 Da zu leicht. Unter Einbeziehung einer Oxidation am Formyl-Met resultierte die Massenverschiebung aus der Abtrennung der drei C-terminalen AS Arg-Leu-Lys vom

maturen Protein. PsbTc wurde auf Ebene des monomeren und dimeren PSII-Subkomplexes nachgewiesen.

#### 6.1.3.7 PsbX

Das nukleär codierte PsbX ist in den Proteindatenbanken weder für Gerste noch für Tabak erhältlich. In Gerste wurde das mature Protein hauptsächlich als  $[M+4H]^{4+}$  bei 1036.34  $m/z$  und als  $[M+4H+Na]^{5+}$  bei 833.64 detektiert. Die Identifikation erfolgte über die aus dem MSMS-Spektrum des Proteins ermittelte Teilsequenz „...LSLVSGGVV...“. Die MM des muren Proteins wurde aus dem vierfach geladenen Signal auf etwa 4141 Da berechnet. Im monomeren PSII-Subkomplex konnte PsbX nicht nachgewiesen werden.

Die Anwesenheit von PsbX im PSII-Dimer konnte in der entsprechenden Bande aus Tabak bestätigt werden. Zudem wurde PsbX ebenfalls im PSII-Monomer nachgewiesen. Da es sich bei *N. tabacum* um eine Hybride aus *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* handelte, wurde PsbX in zwei unterschiedlichen Formen (PsbX<sub>A</sub> und PsbX<sub>B</sub>) detektiert. PsbX<sub>A</sub> wurde als  $[M+4H]^{4+}$  bei 1017.59  $m/z$  und als  $[M+4H+Na]^{5+}$  bei 818.67  $m/z$  detektiert. In diesem Fall konnte anhand der massenspektrometrischen Daten, und auf der Basis von Sequenzhomologien zu PsbX aus Arabidopsis (Acc.-Nr.: Q9SKI3) und Erbse (Acc.-Nr.: Q8VYY1), für das Tabakprotein eine Gesamtsequenz N-Ter-EAAASPSLKNFLLSLVAGGAVLTALLGALLGVSNFDPVKRS-C-Ter ermittelt werden. Das mature Protein hat damit eine Gesamtmasse von 4066 Da. PsbX<sub>B</sub> wurde entsprechend bei 1032.1  $m/z$  ( $[M+4H]^{4+}$ ) und 830.28  $m/z$  ( $[M+4H+Na]^{5+}$ ) detektiert. Mit einer monoisotopischen MM von 4124 Da war PsbX<sub>B</sub> um 58 Da schwerer als die erste Form. Zwei Unterschiede in den Primärsequenzen konnten aus dem Fragmentspektrum ermittelt werden. Es handelte sich dabei um die AS Ala an Position 17 des muren Proteins und die AS Ala an Position 20, die gegen Ser bzw. Val ausgetauscht wurden. Daraus ergab sich immer noch ein  $\Delta$  von 14 Da, das im Spektrum jedoch nicht zugeordnet werden konnte.

Aus der Kristallstruktur von *S. elongatus* war ersichtlich, dass PsbX in der Peripherie von PSII lokalisiert ist, benachbart zu den Proteinen D2, PsbH und PsbE. Während PsbE und PsbH in der BN-PAGE fest mit dem PSII-Dimer assoziiert blieben, wurde ein großer Teil von PsbX in der Lauffront des Gels detektiert, in der Gruppe der „freien“ Proteine. PsbX ist außerdem eng mit dem OEC assoziiert (Ikeuchi et al., 1989). Dessen UEn (Genprodukte von *PsbO*, *PsbP* und *PsbQ*) lagen im Gel ebenfalls getrennt vom PSII-Dimer vor. Vermutlich wurde PsbX mit den Proteinen des OEC abgetrennt.

**Tabelle 4: Niedermolekulare Proteine im mono- und dimeren PSII-Subkomplex aus Gerste**

Gen	Acc.-Nr. <sup>1</sup>	Länge	Proteinsequenz, <u>TMD</u> , <u>sequenzierter Abschnitt</u> <u>des murenen Proteins</u>	Theoret. Masse <sup>2</sup>	Apparente Masse	GRAVY <sup>3</sup>	Modifi- kationen	Komplex <sup>4</sup>
<i>psbE</i>	P69390	82	MSGSTGERSFADIITSI RYWVIHSITIPSLFIAG WLFVSTGLAYDVFGS PRPNEYFTESRQGIPLI TDRFDSLEQLDEFSRS F	9466.703	9309.756	0.019	Formyl- Met entfernt	1/2
<i>psbF</i>	P05171	38	MTIDRTYPIFTVRWL <u>AIHGLAVPTVFFLGS</u> <u>SAMOFIOR</u>	4523.401	4422.556	0.746	Acetyl-N- ter, MetO	1/2
<i>psbH</i>	P12363	72	MATQTVEDSSKPRPK RTGAGSLLKPLNSEY GKVAPGWGTTPEFMG VAMALFAIFLSIILEIY NSSILLDGILT <sup>5</sup>	7745.033	n.d. <sup>6</sup>	0.253	Phospho- rylierung an Pos. 3 (Thr)	1/2
<i>psbI</i>	P25876	36	MLTLKLFVYTVVIFV <u>VSLFIFGFLSNDPGRN</u> PGREE	4193.206	4193.276	0.678	Formyl- Met	1/2
<i>psbJ</i>	P20175	40	MADTTGRIPLWLIGT VAGIPVIGLVGVFFYG SYSGLGSSL	4112.170	n.d.	1.042	-	-/-
<i>psbK</i>	P25877	37	KLPEAYAFNPVIDIM PVIPLFFFLAFVWQ <u>AAVSR</u>	4282.346	4298.508	1.241	MetO	1/2
<i>psbL</i>	P60143	37	MTQSNPNEQNVELNR TSLYWGLLLIFVLAV <u>LFSNYFFN</u>	4522.267	4363.293	0.258	Formyl- Met entfernt	-/2
<i>psbM</i>	A1E9H9	34	MEVNILAFIATALFIL <u>IPTSFLLIYVKTVSQ</u> NN	3837.141	3853.224	1.362	MetO	1/2
<i>(psbN)</i> <sup>8</sup>	A1E9L8	43	METATLV AISISGLLV SFTGYALYAFGQPS QQLRDPFEEHGD	4687.279	n.d.	0.112	-	-/-
<i>PsbR</i>	Q40070	99	KKAKKVQTAQPYGP GGGVAFKEGVDASG RVAKGKGVYQFADK YGANVDGYSPIYTP EWSPSGDVYVGGKT <u>GLFLWAVTLAGILLG</u> <u>GALLVYSTSALAS</u> <sup>7</sup>	10170.289	n.d.	-0.015	-	-
<i>psbT<sub>c</sub></i>	P69669	38	ME <u>ALVYTFLLVSTL</u> <u>GIIFFAIFREPPKVP</u> TPTKRIK	4407.484	(4422.58) <sup>9</sup>	0.639	MetO	1/2
<i>PsbW</i>	Q41387 (st <sup>10</sup> )	54	LVDERMSTEGTGLPF GLSNNLLGWILFGVF <u>GLIWALYFVYASGLE</u> EDEESGLSL	5923.959	n.d.	0.299	-	-/-
<i>PsbY-1</i>	O49347 (ath <sup>11</sup> )	43	AANASSDN <u>RLALLL</u> <u>PIFPAIAWVLYNILQP</u> AINQVNKMRESK	4719.569	n.d.	0.228	-	-/-
<i>PsbY-2</i>	O49347 (ath <sup>11</sup> )	46	AAEAAAASSDSRGL <u>LLIVVTPALLWVLYNI</u> <u>LQPALNQINKMRSGD</u>	4890.643	n.d.	0.398	-	-/-
<i>PsbX</i>	Q10LL6 (os <sup>12</sup> )	43	EAAPALSPSLKNFLLS <u>I(A)VSGGVVLVAIVG</u> <u>AVVAVS</u> NFDPVKRT	4276.420	4141.344	0.995	?	-/2
<i>psbZ</i>	P69696	62	MTIAFQLAVFALIATS SVLVISVPLVFASPDG WSNNKNVVFSGTSL <u>WIGLVFLVAILNSLIS</u>	6577.599	n.d.	1.376	-	-/-

<sup>1</sup> Organismus, wenn abweichend von Gerste

<sup>2</sup> Die theoretische Masse wurde aus der in der Datenbank enthaltenen Primärsequenz inklusive initialisierendem Met berechnet. Es handelt sich dabei um die ungeladene monoisotopische Masse. Bei kerncodierten Proteinen wurde die Präsequenz entfernt.

<sup>3</sup> GRAVY-Index berechnet nach Kyte&Doolittle aus der Primärsequenz (vgl. <sup>2</sup>) (Kyte et al., 1982).

<sup>4</sup> Proteinkomplex, in dem das Protein in Gerste nachgewiesen wurde: 1 = PSII-Monomer, 2 = PSII-Dimer

<sup>5</sup> Identifikation über interne Peptide nach tryptischem Verdau

<sup>6</sup> nicht detektiert

<sup>7</sup> TMD bestimmt über Sequenzhomologie

<sup>8</sup> Die Existenz von PsbN im PSII ist nicht sicher belegt (Shi et al., 2004).

<sup>9</sup> Proteinsignal war überlagert von PsbF

<sup>10</sup> *Solanum tuberosum*

<sup>11</sup> *Arabidopsis thaliana*

<sup>12</sup> *Oryza sativa*

### 6.1.4 Niedermolekulare UEn aus PSI

Aufgrund der gleichen Laufhöhe des dimeren PSII und des PSI-LHCI-Komplexes wurden in den Komplexbanden der 1. Dimension ebenfalls die beiden, in höheren Pflanzen enthaltenen, niedermolekularen UEn PsaI und PsaJ von PSI detektiert. In beiden Proteinen blieb das initialisierende Formyl-Met erhalten. Es ergab sich eine theoretische Molekularmasse von 4033.28 Da für PsaI (Acc.-Nr.: P13165) und 4769.57 Da für PsaJ (Acc.-Nr.: A1E9L0). Im MS-Spektrum wurden die Genprodukte von *psaI* und *psaJ* jeweils bevorzugt als vierfach geladene Ionen ( $[M+4H]^{4+}$ ) detektiert. Aus den MS-Signalen der beiden Proteine bei 1017.33  $m/z$  und 1197.33  $m/z$  ergaben sich als apparente Massen 4065.33 Da für PsaI bzw. 4785.32 Da für PsaJ (Abb. 15, S. 81) Die Differenz zu den theoretisch berechneten Massen entsprach der Addition eines Sauerstoffatoms bei PsaJ oder von zwei Sauerstoffatomen im Fall von PsaI. Dies korrelierte jeweils mit der Anzahl an Met innerhalb der Primärsequenz, die zu MetO oxidiert wurden. Mit der Identifikation der beiden niedermolekularen UEn konnten alle für PSI vorhergesagten UEn detektiert werden.

### 6.1.5 LHCI

Der Antennenkomplex des PSII war im BN-Gel, sofern nicht in den Superkomplexen gebunden, getrennt vom RCII als trimerer und monomerer Komplex detektierbar (Abb. 12, S. 74, LII(3) und LII(1)). Der monomere Komplex war in der BN-PAGE bei etwa 70 kDa detektierbar. Der trimere LHCI lag bei etwa 140 kDa. In der 2. Dimension wurden die Proteinuntereinheiten Lhcb1-6 identifiziert und als LIII1-6 bezeichnet (Abb. 12, S. 74 und Tabelle 5, S. 88). Die majoren LHCP (*Light-harvesting-complex protein*) wurden sowohl im LHC-Trimer als auch im Monomer detektiert (Abb. 12, S. 74, LIII1-3). Im Gegensatz dazu waren die minoren LHCI-Proteine CP29, CP26, CP24 (LII4-6) im trimeren Komplex nicht vorhanden. Die Identifikation der Proteine Lhcb2 (LII2) und CP26 (LII6) aus Gerste wurde

anhand ihrer Homologie zu den entsprechenden Genprodukten aus Mais (*Zea mays*; Q41823) und Reis (*Oryza sativa*; Q7XV11) durchgeführt (Tabelle 5).

**Tabelle 5: LHCP aus Gerste (*Hordeum vulgare*)**

Protein	Proteinname und Genbezeichnung in Gerste	Acc.-Nr. <sup>1</sup>	Masse [kDa] <sup>4</sup>	Hydrophobizität <sup>5</sup>
Lhcb1	LHCII type I protein/ -	Q40065	25.137	0.012
	CB22/ -	P08963	24.708	-0.006
Lhcb2	-	Q41823 <sup>2</sup>	24.726	-0.017
Lhcb3	CB23/ <i>LhbC</i>	P27523	24.286	0.035
Lhcb4	LHC-IIa-1/ <i>Lhc-IIa-1</i>	445116	28.399	-0.189
Lhcb5	CP29/ -	Q40039	27.137	-0.045
Lhcb6	-	Q7XV11 <sup>3</sup>	22.731	-0.073

<sup>1</sup> aus den Proteindatenbanken SwissProt, TrEMBL und nrNCBI

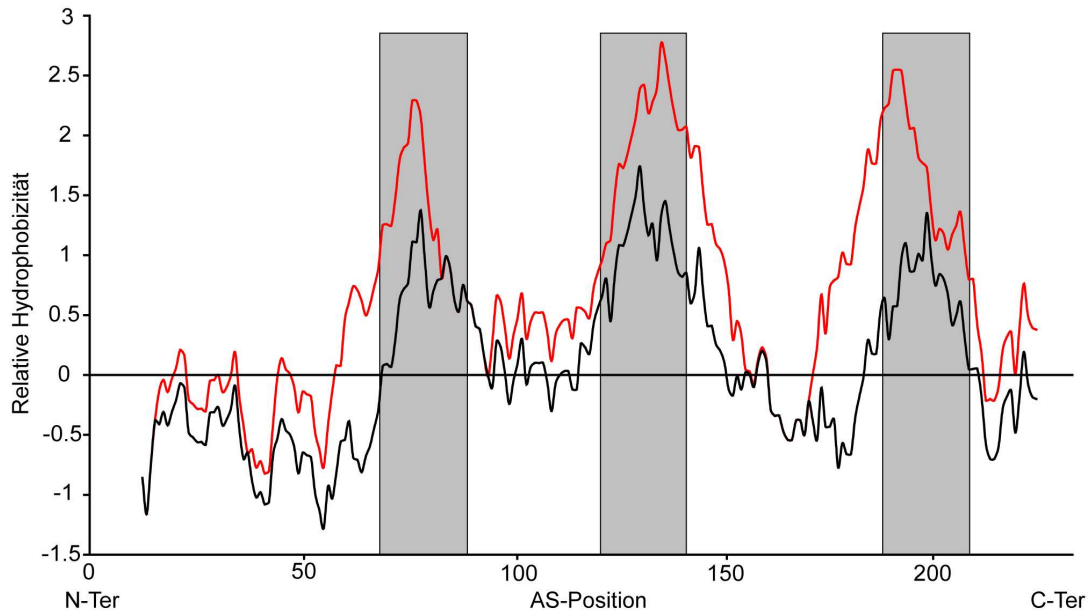
<sup>2</sup> homologes Protein aus Mais

<sup>3</sup> homologes Protein aus Reis

<sup>4</sup> Berechnete Masse des murenen Proteins aus Proteinsequenz.

<sup>5</sup> Berechnet nach Kyte & Doolittle (Kyte et al., 1982).

Die LHCP nehmen einen gesonderten Status unter den Membranproteinen ein. Sie waren mit einem durchschnittlichen Hydrophobizitätswert von -0.040 um einen Hydrophobizitätswert von ca. 0.3 hydrophiler als die benachbart in der Thylakoidmembran gelegenen Proteine aus den Reaktionszentren (GRAVY-Index: 0.236). Einen Teil der benötigten Hydrophobizität zur Durchspannung der Lipiddoppelschicht erhalten die LHCP aufgrund der Bindung von Pigmenten (v.a. Chl). Die Bindungsstellen für die Chlorophylle a1-a6, sowie b1-b4 waren in der Proteindatenbank beschrieben (www.expasy.org). Bei den Chlorophyllen b5, b6, a7 und a8 wurde keine Bindung an bestimmte AS angegeben. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften führten die Pigmente zu einem deutlichen Anstieg der spezifischen Hydrophobizität beim Bindungspartner. Hydrophile Seitenketten der einzelnen AS wurden damit maskiert. Während es im Hydrophobizitätsplot nach Austausch der chlorophyllbindenden AS gegen Ile bei den löslichen Regionen kaum Änderungen in der relativen Hydrophobizität für die einzelnen AS gibt, finden sich deutlich erhöhte Werte im Bereich der TMD (Abb. 16, S.89).



**Abb. 16: Hydrophobizitätsplot von Lhcb1 aus *Hordeum vulgare* (Q40065).**

Der Plot wurde nach der Methode von Kyte & Doolittle erstellt (Kyte et al., 1982). Zur Visualisierung der Transmembrandomänen wurde ein Fenster von 21 AS gewählt. Aufgetragen ist der Hydrophobizitätswert jeder einzelnen AS als Mittelwert aus den AS innerhalb des gewählten Fensters (y-Achse), gegen die Position der AS innerhalb der Primärsequenz (x-Achse). Auf der y-Achse bezeichnen Werte unterhalb der Nulllinie hydrophile Bereiche, darüber liegende Abschnitte sind hydrophob. Die grauen Balken kennzeichnen die Lage der Transmembrandomänen. Die schwarze Linie bezeichnet den Hydrophobizitätsplot des Lhcb1-Proteins. Bei der roten Kurve wurden alle Chl-bindenden AS durch die AS mit dem höchsten Hydrophobizitätswert ersetzt (Ile).

Die korrekte Zuordnung der LHCP aus den analysierten Peptiden eines Proteinspots gestaltete sich oft schwierig. Die sehr ähnlichen Molekularmassen führten zu einer mangelnden Auflösung der einzelnen Proteine im 2D-Gel. Infolge waren meist zwei oder mehr verschiedene LHCP innerhalb einer Bande zu finden. Zusätzlich wurde die Auswertung aufgrund der geringen Präsenz der LHCP innerhalb der Proteindatenbanken erschwert. Der Hauptgrund für die Probleme bei der Zuordnung der LHCP war allerdings die hohe Sequenzhomologie unter den verschiedenen Vertretern. Die Homologie gleicher LHCP in verschiedenen Arten war nur wenig größer als die Homologie verschiedener LHCP innerhalb einer Art. Die Analyse der *Lhcb1*-Genprodukte verschiedener Arten höherer Pflanzen ergab eine Übereinstimmung von  $\geq 86\%$ . Für *Lhcb2* betrug die Homologie mehr als 88% und für *Lhcb3* sogar  $\geq 91\%$ . Beim Vergleich der Konsensussequenzen von *Lhcb1-3* untereinander wurde mit 84% Übereinstimmung zwischen *Lhcb1* und 2 ein ähnlich hoher Wert erzielt. Die Homologie zwischen *Lhcb1* bzw. *Lhcb2* und *Lhcb3* betrug 76 bzw. 77%. Für die Berechnung zur Homologie wurden soweit erhältlich die Proteinsequenzen aus *A. thaliana*, *P. sativum*, *L. esculentum*, *N. tabacum*, *Z. mays*, *H. vulgare* und *O. sativa* herangezogen. Unter Einbeziehung von LHCP aus Grünalgen (*Chlamydomonas*) oder Cyanobakterien (*Synechocystis*) waren diese Grenzen nicht mehr klar definierbar.

## 6.2 Unterscheidung von *Lhcb1-3*

Während eine ganze Reihe von Proteinen als *Lhcb1* bzw. LHCP vom Typ I klassifiziert werden, gibt es nur vier Proteine in der SwissProt/TrEMBL-Datenbank, die dem *Lhcb2* bzw. LHCP Typ II zugeordnet wurden (Abb. 17 b, unterstrichen). Bei den *Lhcb2*-Genprodukten aus *Arabidopsis* (Q9SYW9), Erbse (Q5I8X2) und Mais (Q41823) war jeweils die gesamte Primärsequenz des murenen Proteins angegeben, wohingegen vom vierten Protein aus Spinat (Q9T2K9) nur die N-terminalen 9 Aminosäuren existierten.

a) *Lhcb1*:

sp P04777 CB21	ARA	RKTVA-KPK--GPSGSE	WYGSDR...	20
tr Q5I8X3 Q5I8X3	PEA	RKSATTKKV--ASSGSP	WYGPDR...	21
sp P07369 CB2G	LYC	RKTAT-KAKP-ASSGSP	WYGPDR...	21
sp P27493 CB22	TOB	RKTVA-KPV--ASS-SP	WYGPDR...	19
sp P27497 CB29	MAI	RKTAA-KAKPAASSGSP	WYGPDR...	22
tr Q40065 Q40065	HOR	RKTAA-KAKQ-VSSSSP	WYGADR...	21
sp P08963 CB22	HOR	RKTAATTKV----GSP	WYGPDR...	18
Isoform A	HOR/691.80	V-AA-SSSP	WYGSDR...	13
Isoform B	HOR/697.82	AATSSSP	WYGPDR...	13
Isoform C	HOR/705.33	Q <sup>L</sup> -VSSGSP	WYGADR...	13
Isoform D	HOR/713.32	Q <sup>L</sup> -VSSGSP	WYGSDR...	13
Konsensus		**:.:. *	*****. **	

b) *Lhcb2*:

<u>tr Q9SYW9 Q9SYW9</u>	ARA	<u>RRTVKSTPQSI</u>	<u>WYGPDR...</u>	17
<u>tr Q5I8X2 Q5I8X2</u>	PEA	<u>RRTVKSAPESI</u>	<u>WYGPDR...</u>	17
<u>tr Q41823 Q41823</u>	MAI	<u>RRTVKSVPQSI</u>	<u>WYGPDR...</u>	17
sp Q9T2K9 CB22	SPIOL	RRTVKSAPQ...		9
sp P14278 CB24	LYCES	RRTVKSAPQSI	WYGEDR...	17 <sup>2</sup>
sp P27494 CB23	TOBAC	RRTVKSAPQSI	WYGEDR...	17
sp P27519 CB23	ORYSA	RRTVKSAPQSI	WYGPDR...	17
	<i>Lhcb2</i> HOR	SAPQSI	WYGPDR...	12
Konsensus		*****.*:***** **		

c) *Lhcb3*

tr Q9S7M0 Q9S7M0	ARA	GNDI	WYGPDR...	10
tr Q04918 Q04918	PEA	GNDI	WYGPDR...	10
sp P27489 CB23	SOL	SNDI	WYGPDR...	10
tr Q6ZF30 Q6ZF30	ORY	SKEL	WYGPDR...	10
sp P27523 CB23	HOR	<b>GNDI</b>	<b>WYGPDR...</b>	10
Konsensus		.:.******		

**Abb. 17: Klassifizierung der majoren LHCP anhand der N-terminalen Sequenzabschnitte**

Die Zuordnung der majoren LHCP findet aufgrund der Unterschiede im N-terminalen Bereich ihrer Genprodukte *Lhcb1* (a), *Lhcb2* (b) und *Lhcb3* (c) statt. Die eingerahmten Sequenzabschnitte kennzeichnen den Beginn des stark konservierten Bereiches der LHCP. Die angegebenen Konsensussequenzen beziehen sich auf die LHC-Proteine aus den Datenbanken. Zur Maximierung der Homologie wurden zum Teil in die einzelnen Sequenzen Lücken eingefügt. Identische AS (\*), konservierte (:.) bzw. ähnliche AS (.) sind in der Konsensussequenz verdeutlicht. In Gerste wurden neben den zwei in der SwissProt/TrEMBL-Datenbank enthaltenen Vertretern von *Lhcb1*, vier weitere potentielle Isoformen dieses Proteins über *de novo* Sequenzierung der entsprechenden doppelt geladenen Peptide identifiziert (a). *Lhcb2* aus Gerste existiert nicht in den Datenbanken. Das Protein wurde über ein für *Lhcb2* charakteristisches Peptid identifiziert (b). Die unterstrichenen Proteine sind als *Lhcb2* in der Datenbank klassifiziert. Über die Homologie lassen sich in den Datenbanken weitere Proteine als *Lhcb2*



identifizieren. Von *Lhcb3* existieren bis dato lediglich die fünf gelisteten Vertreter in den Datenbanken. Das mature Protein ist durch einen deutlich verkürzten N-terminalen Bereich gekennzeichnet (c).

<sup>1</sup> Die Aminosäuren Gln und Lys sind im Spektrum nicht eindeutig zu unterscheiden.

<sup>2</sup> Auch P14279, Unterschiede bestehen lediglich innerhalb der Präsequenz.

Aufgrund der generell hohen Übereinstimmungen der maturen LHCP über weite Bereiche ihrer Primärsequenz wurden die Konsensussequenzen von *Lhcb1* und 2 verglichen. Innerhalb der untersuchten Vertreter von *Lhcb1* und 2 aus höheren Pflanzen gab es lediglich an 5 Stellen konservierte AS-Unterschiede, wobei vier davon innerhalb der ersten 25 AS des maturen Proteins zu finden waren (Abb. 17, S. 90). Damit waren beide Arten von LHCP nahezu über die gesamte Länge ihrer Primärsequenz extrem homolog. Eine eindeutige Identifikation war deshalb nur über diesen N-terminalen Abschnitt möglich. Innerhalb der *Lhcb2*-Familie war dieser N-terminale Abschnitt zu 83% homolog (Abb. 17, S. 90). Eine Homologiesuche (BLAST) mit den ersten 11 AS der Konsensussequenz von *Lhcb2* ergab eine Reihe weiterer Proteine (aus höheren Pflanzen), die eine entsprechende Startsequenz enthielten. Drei daraus ausgewählte Vertreter aus Tomate (P14278), Tabak (P27494) und Reis (P27519) wurden in der Datenbank als *Lhcb1*-Proteine geführt. Damit ergab sich ein eindeutiges Kriterium zur Unterscheidung von *Lhcb1* und 2. Im Gegensatz dazu war die Diversität der Anfangssequenzen von *Lhcb1* in den verschiedenen Spezies bezüglich Länge und Zusammensetzung wesentlich höher. Die Homologie betrug hier lediglich 35%. Trotzdem konnte ein Teil des N-terminalen Bereichs in beiden Arten von LHCP von einem jeweils charakteristischen tryptischen Peptid abgedeckt werden. Über dieses Peptid war eine Zuordnung eindeutig möglich (Abb. 17 a und b, S. 90).

In den Datenbanken sind zwei Isoformen des *Lhcb1*-Proteins vorhanden. Ihre aus der Primärsequenz berechneten maturen Gesamtmassen betragen 25.137 kDa (Q40065) und 24.708 kDa (P08963). Diese Werte korrelierten nur näherungsweise mit den experimentell für *Lhcb1* ermittelten Werten von 24.630 kDa und 24.853 kDa (Zolla et al., 2003). Ein Verdau und die nachfolgende massenspektrometrische Analyse der LHCII-Banden aus der 2. Dimension ergab, dass Gerste jedoch mindestens vier zusätzliche Isoformen von *Lhcb1* besitzt (Abb. 17 a, S. 90). Die entsprechenden Peptide aus der N-terminalen Region wurden über *de novo* Sequenzierung verifiziert. Alle sequenzierten Peptide stimmten nicht mit den entsprechenden Abschnitten aus den Datenbankeinträgen überein. Somit ergaben sich für die Gerste mindestens sechs Isoformen für *Lhcb1*. Für die anderen LHCP (*Lhcb2-6*) aus Gerste konnten keine Isoformen identifiziert werden.

*Lhcb3* ist das kleinste der drei majoren LHCP. Die geringere Molekularmasse kommt durch einen gegenüber *Lhcb1* bzw. 2 um 8-12 AS verkürzten N-Terminus zustande (Abb. 17 c, S. 90). Die Klassifizierung von *Lhcb3* findet folglich über das Fehlen der für *Lhcb1* und 2

signifikanten AS-Kombinationen im N-terminalen Bereich statt. Daneben finden sich aufgrund der für LHCP geringen Homologie an vielen Stellen der Primärsequenz signifikante Abweichungen zur eindeutigen Charakterisierung des Lhcb3-Proteins.

### 6.3 Unterscheidung von CP29 und CP26

Die korrekte Zuordnung der minoren Proteine CP29 und CP26 gestaltete sich aufgrund der widersprüchlichen Annotierung innerhalb der Datenbanken ebenfalls als schwierig. Im Gegensatz zu den majoren LHCP gab es hier jedoch eine einheitliche Bezeichnung der einzelnen Proteine in den verschiedenen Spezies. Mit wenigen Ausnahmen wurden diese als CP29 (Gen: *Lhcb4*), CP26 (Gen: *Lhcb5*) und CP24 (Gen: *Lhcb6*) bezeichnet.

Die Existenz eines ca. 31 kDa schweren LHC IIa (CP29) Apoproteins in Gerste (*Hordeum vulgare*) wurde bereits 1992 nachgewiesen (Morishige et al., 1992). Die vollständige Primärsequenz war bis dato nur in der nrNCBI-Datenbank (445116 NCBIInr) erhältlich. Im Datenbankeintrag wurde das Protein als „*Light-harvesting complex IIa protein*“ mit der Genbezeichnung *LHC-IIa-1* geführt. Dasselbe Protein existierte in der SwissProt/TrEMBL-Datenbank (Acc.-Nr. O65817) lediglich als 75 AS langes Fragment. Als Proteinname bzw. Genbezeichnung wurden dort „*Chlorophyll a/b-binding protein*“ und *Cp29* angegeben. Das Protein wies eine signifikante Homologie zum *Lhcb4*-Genprodukt aus anderen Organismen auf. Die aus der Primärsequenz berechnete Gesamtmasse (incl. Präsequenz) betrug für CP29 31.311 kDa. Die hypothetische Länge der Präsequenz konnte aufgrund der Peptiddaten und der Homologien zu anderen nahe verwandten Organismen (Reis und Mais) ermittelt werden. Für das mature Protein CP29 ergab sich somit eine Masse von 28.399 kDa. CP29 war damit das größte der sechs LHCP (Tabelle 5, S. 88). Bestätigt wurde die korrekte Annotierung der Präsequenz durch eine gemessene Masse von 28.388 kDa (Zolla et al., 2003). Im 2D-Gel wurde das Protein jedoch mit einer apparenten Masse von 32-35 kDa detektiert. Wie diese deutliche Massenverschiebung zustande kam, blieb ungeklärt.

CP26 (Genbezeichnung *Lhcb5*) aus Gerste wurde in der SwissProt/TrEMBL-Datenbank fälschlich als „*Precursor of CP29 ...*“ (Acc.-Nr.: Q40039) bezeichnet. Ein Vergleich der beiden Proteinsequenzen für die hypothetischen „Isoformen“ von CP29 (Q40039 und 445116 NCBIInr) ergab jedoch keine signifikante Homologie. Mit 30.744 kDa (incl. Präsequenz) besaß CP26 eine ähnliche Masse wie LHC IIa. Eine genaue Angabe zur Prozessierungsstelle der Präsequenz gab es innerhalb der Datenbanken nicht. Für das mature Protein wurde eine Gesamtmasse von ca. 27.170 kDa bestimmt (Zolla et al., 2003). Die Kombination aus dieser Massenangabe und den Daten der analysierten Peptide von CP26 ergab eine Präsequenz von

36 AS in Gerste. Daraus resultierte eine aus der Primärsequenz berechnete Masse von 27.137 kDa für das mature Protein. Beide Proteine wurden anhand von *de novo* Sequenzierung mehrerer tryptischer Peptide eindeutig identifiziert. Die absolute Sequenzabdeckung betrug danach für CP26 52% und für CP29 23%.

#### **6.4 Detektierbarkeit tryptischer Peptide aus löslichen und membranintegralen Proteinen mittels nanoESI-MS**

Zur Identifikation komplexgebundener Proteine wurden die gefärbten Banden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide massenspektrometrisch im statischen nanoESI-MS analysiert (Abb. 12, S. 74). Der tryptische Verdau von Proteinen führt zu Peptiden unterschiedlicher Länge in Abhängigkeit von der Verteilung der Proteaseschnittstellen Arg und Lys. Lediglich ein Teil der theoretisch zu erwartenden Peptide wurde bei der anschließenden MS-Analyse in den Spektren detektiert. Ein Peptid galt als detektiert, wenn die relative Intensität aus 25 summierten Einzelspektren einen Wert von 50 überschritt und gleichzeitig eindeutig vom Hintergrundrauschen zu trennen war.

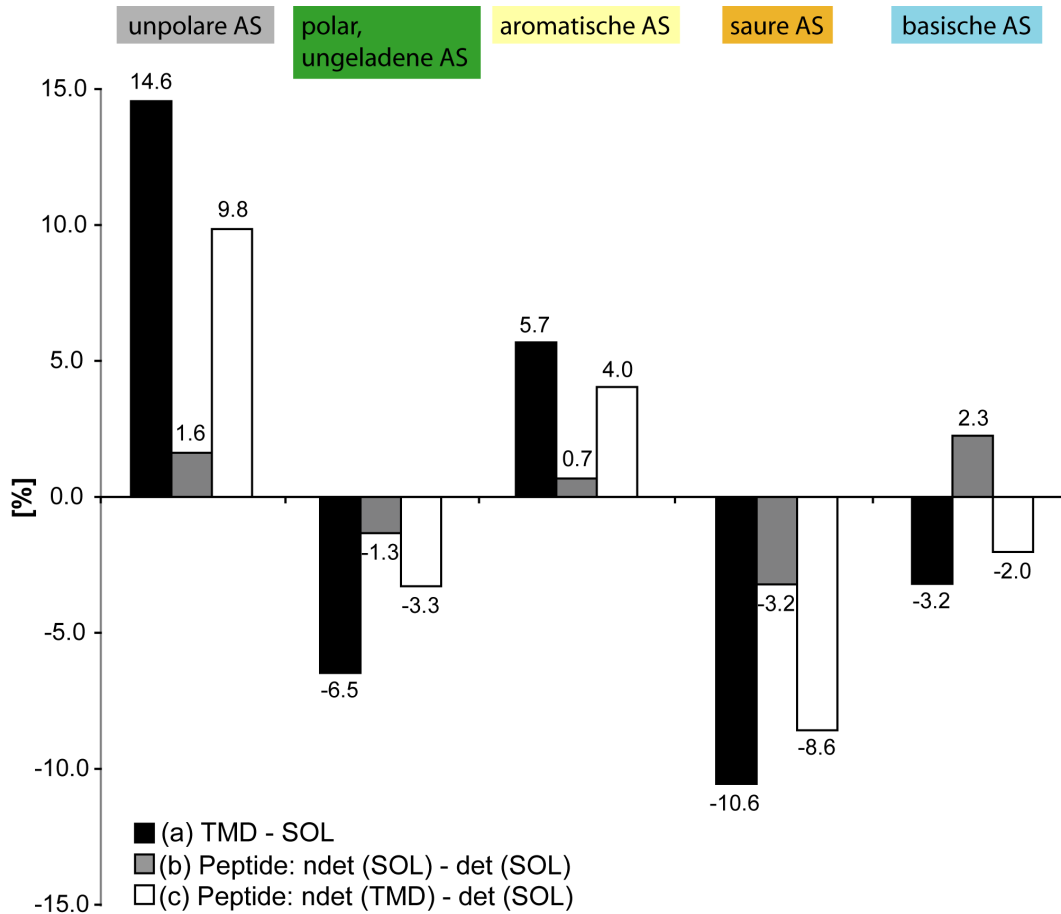
In den MS-Spektren traten die Peptide und niedermolekularen Proteine in der Regel zwischen 400  $m/z$  und 1400  $m/z$  auf. Peptide  $> 1.4$  kDa mussten folglich mehrfach geladen sein, um in diesen  $m/z$ -Bereich zu passen. Ihr Ladungszustand variierte dabei in Abhängigkeit von den enthaltenen basischen Gruppen von  $[M+H]^{1+}$  bis  $[M+4H]^{4+}$ . Vor allem größerer Peptide ( $> 1500$  Da) waren häufig in verschiedenen Ladungszuständen detektierbar. Durch die Verteilung auf mehrere Ladungszustände wurde die Gesamtintensität eines Peptids herabgesetzt. Die Signalintensitäten der Peptide nahmen in der Regel mit steigender MM ab. Mehrfach geladene Peptide  $< 0.6$  kDa wurden nicht detektiert. Die Qualität der Spektren war stark abhängig von der Peptidmenge, die aus dem Gel extrahiert werden konnte. Dabei existierte eine direkte Korrelation zwischen der Proteinmenge einer Bande (Färbeintensität) und der Anzahl der nach Verdau detektierten Peptide. In keinem Fall konnte die komplette Primärsequenz eines Proteins anhand der Analyse seiner tryptischen Peptide ermittelt werden. Im Durchschnitt hatten die detektierten Peptide eine Sequenzlänge von 7-13 AS. Damit wurden „kurze“ Peptide deutlich häufiger detektiert als „lange“ Peptide ( $>14$  AS). Die Analyse des Proteoms der Thylakoidmembran ergab, dass speziell die TMD enthaltenden Peptide nicht detektiert wurden. Membranproteine wurden folglich nahezu ausschließlich über ihre löslichen Bereiche detektiert. Die TMD waren aber speziell für die Identifikation kleiner Membranproteine von besonderem Interesse, da diese kaum hydrophile Domänen besaßen.

### 6.4.1 Einfluss bestimmter AS auf die Detektierbarkeit von Peptiden

Der Einfluss bestimmter AS auf die Detektierbarkeit von Peptiden wurde an 12 Proteinen (PsaA, PsaB, PsaG, PsaH, PsaK, PsaL und PsbA-F) der Reaktionszentren von PSI und II (RCP) untersucht. Zur Analyse wurden die RCP in drei verschiedene Kategorien unterteilt: transmembrane und lösliche Abschnitte (a), detektierte und nicht detektierte Peptide aus löslichen Bereichen (b), sowie nicht detektierte membranintegrale Peptide und detektierte lösliche Peptide (c). Anschließend wurden die 20 natürlichen AS mit Bezug auf ihre chemisch-physikalischen Eigenschaften in die fünf Gruppen unpolare (hydrophobe), polar-ungeladene, aromatische, saure und basische AS eingeteilt und der Anteil jeder Gruppe an der AS-Gesamtzahl der drei Kategorien bestimmt. Zur Verdeutlichung der Unterschiede wurde jeweils die Differenz der einzelnen AS-Gruppen (in %) für die verschiedenen Kategorien bestimmt (Abb. 18, S. 95). Innerhalb der Gruppen hatten einzelne AS einen entscheidenden Einfluss auf die Größe des Wertes. Diese waren entweder besonders stark beteiligt (z. B. Gln, Asn, Phe) oder ihre Einzelwerte befanden sich gegensätzlich zum Trend innerhalb einer Gruppe (z. B. Pro, His).

#### 6.4.1.1 Vergleich der AS-Zusammensetzung nicht detektierter und detektierter tryptischer Peptide der RCP

Obwohl die Membranproteine über Peptidsequenzen aus den löslichen Bereichen identifiziert wurden, konnten nicht alle theoretisch vorkommenden Peptide aus diesen Abschnitten detektiert werden. Um einen hypothetischen Einfluss einzelner AS auf die Detektierbarkeit von Peptiden zu beweisen, wurden nicht detektierte und detektierte Peptide aus den löslichen Domänen auf ihre AS-Zusammensetzung hin untersucht. Bei Betrachtung der einzelnen Gruppen von AS ergaben jedoch lediglich geringe Unterschiede zwischen nicht detektierten und detektierten Peptiden (Abb. 18, S. 95, dunkelgrauer Balken). Auch nach Analyse der Einzelwerte war eine Korrelation zwischen der Detektierbarkeit eines Peptides und der An- bzw. Abwesenheit einer bestimmten AS kaum möglich. Im Vergleich mit den Werten für membranintegrale und lösliche Abschnitte der Proteine (Abb. 18, S. 95, schwarzer Balken) ergab sich ein ähnliches Bild, wenn auch mit deutlich extremeren Werten. Einzige Ausnahme bildete die Gruppe der basischen AS. Verantwortlich hierfür war der Umstand, dass membranintegrale Abschnitte im Vergleich zwar häufiger die AS His besaßen, jedoch deutlich weniger Lys und Arg.



**Abb. 18: Einfluss der AS-Zusammensetzung auf die Detektierbarkeit von Peptiden**

Zwölf Proteine (RCP) der Reaktionszentren von PSI und II wurden auf ihre AS-Zusammensetzung in den membranintegralen und löslichen Regionen hin untersucht. Die zwanzig natürlichen AS wurden dazu bezüglich ihrer chemisch physikalischen Eigenschaften in fünf Gruppen eingeteilt: unpolare (hydrophobe) AS (grau), aromatische AS (gelb), polar, ungeladene AS (grün), saure AS (orange) und basische AS (blau). Verglichen wurden transmembrane Bereiche (TMD) versus lösliche Bereiche (SOL) der RCP ((a), schwarzer Balken), nicht detektierte versus detektierte Peptide aus löslichen Bereichen der RCP ((b), dunkelgrauer Balken) und nicht detektierte transmembrane Peptide aus den RCP versus detektierte Peptide der RCP, die aus den löslichen Bereichen stammen ((c), weißer Balken). Zur Verdeutlichung der Unterschiede werden die Differenzen (in %) des Auftretens der einzelnen AS-Gruppen in den verschiedenen Kategorien (a-c) gezeigt.

Der Anteil an unpolaren AS (Gly, Val, Leu, Ile, Ala, Pro) war mit ca. 40% bei den nicht detektierten und den detektierten Peptiden in etwa gleich hoch. Im Vergleich bewegten sich die Werte für die einzelnen AS um +/- 1.0%, wobei die sehr hydrophoben AS (Leu und Ile) interessanterweise etwas häufiger in den detektierten Peptiden zu finden waren. Damit war die Anwesenheit hydrophober AS nicht per se ein Grund dafür, dass ein Peptid nicht detektiert wurde. Der im Endeffekt leicht höhere Anteil von unpolaren AS bei den nicht detektierten Peptiden war hauptsächlich auf den mit +3.3 % sehr hohen Wert für die AS Gly zurückzuführen (Abb. 18, hellgrauer Balken, unpolare AS). Die AS war damit deutlich häufiger in den nicht detektierten Peptiden zu finden. Die polaren AS (Met, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln) waren im Verhältnis etwas häufiger in den detektierten Peptiden zu finden (Abb. 18, hellgrauer Balken, polare AS). Dies galt vor allem für die AS Met, Asn und Gln. Im

Gegensatz dazu war Serin seltener in den detektierten Peptiden angesiedelt; bei Thr ergaben sich keine Unterschiede. Gemessen an der AS-Gesamtzahl kamen die AS Met und Cys, mit einem Gesamtanteil von 1.2% bzw. 0.3%, verhältnismäßig selten in den löslichen Bereichen der untersuchten Proteine vor. Die aromatischen AS Phe, Tyr und Trp waren in ähnlichen Verhältnissen auf beide Bereiche verteilt. Insgesamt lag das Gleichgewicht jedoch mehr auf Seiten der nicht detektierten Peptide, was hauptsächlich auf einen deutlich positiven Wert für Tryptophan zurückzuführen war. Da Trp, mit einem Anteil von 3.2% innerhalb der löslichen Bereiche ebenfalls zu den seltenen AS gehört, war sein Einfluss auf die Detektierbarkeit von Peptiden jedoch als gering einzustufen. Die sauren AS Aspartat und Glutamat begünstigten aufgrund ihres hydrophilen Charakters die Löslichkeit der Peptide und damit die Detektion (Abb. 18, S. 95, hellgrauer Balken, saure AS). Dies galt jedoch nicht für extrem kurze Peptide, da diese aufgrund begrenzter Wechselwirkungen mit dem Chromatographiematerial bereits bei der Probenvorbereitung verloren gingen. Die nach tryptischem Verdau endständigen AS Arginin bzw. Lysin schienen ebenfalls einen Einfluss auf die Detektierbarkeit eines Peptids zu haben. Argininhaltige Peptide wurden im Verhältnis deutlich häufiger detektiert als jene mit einem Lysin am C-terminalen Ende. Die AS Histidin spielte eine ambivalente Rolle bei der Detektion von Peptiden. Während sie die Detektion hochmolekularer Peptide aufgrund der Einführung einer weiteren Ladung begünstigte, war bei kurzen Peptiden eher das Gegenteil der Fall. Diese wurden bei Anwesenheit von Histidin sowohl als doppelt als auch als dreifach geladene Ionen seltener detektiert.

### *6.4.1.2 Vergleich der AS-Zusammensetzung tryptischer, membranintegraler Peptide und detektierter Peptide der RCP*

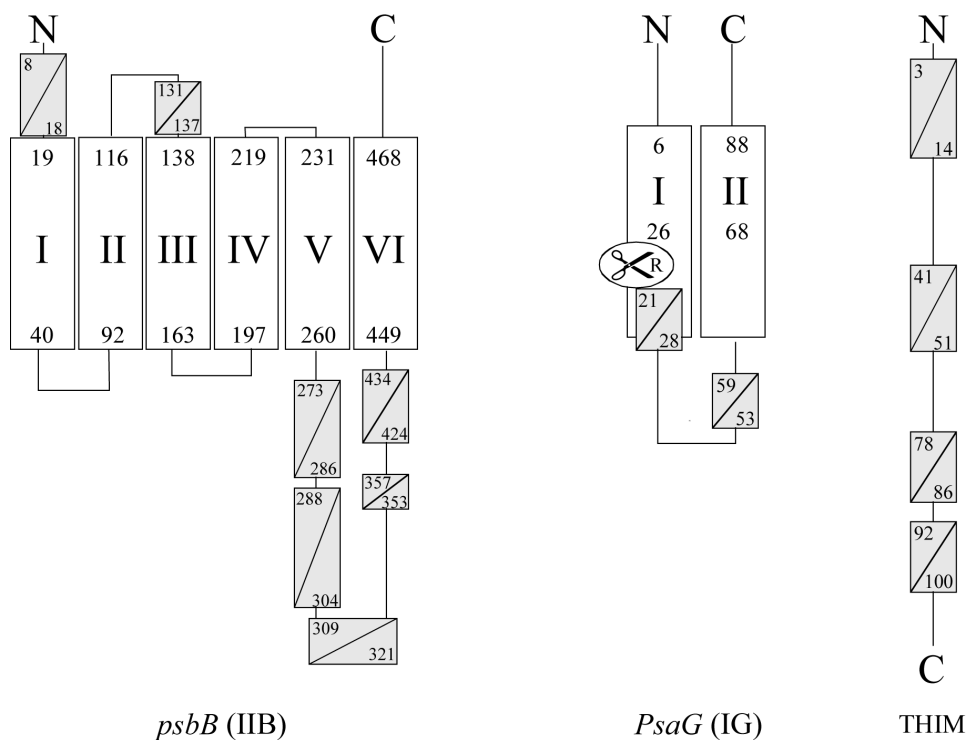
Als Bestandteile von tryptischen Peptiden ist jedoch nicht nur die AS-Zusammensetzung der TMD für der Ionisierbarkeit von Bedeutung, sondern ebenfalls die löslichen Reste der membranintegralen Peptide. Trotz zum Teil erheblicher löslicher Anteile ergab sich ein weitgehend ähnliches Bild, wie für die TMD allein. Gegenüber dem Vergleich der Domänen lagen die Einzelwerte bei den Peptiden jedoch um 20 bis 50% niedriger (Abb. 18, S. 95, schwarzer und hellgrauer Balken). In Abhängigkeit von der Gesamtlänge der Peptide ergab sich zum Teil ein erheblicher Einfluss von AS aus den löslichen Bereichen. Bei den RCP ergab sich bei langen Peptiden ein Verhältnis von löslichen zu transmembranen Anteilen von bis zu 3.5:1.

Bei der Betrachtung der Werte für die einzelnen AS fiel auf, dass die AS Glycin in den Transmembranpeptiden, ebenso wie in den nicht detektierten Peptiden der löslichen Domänen, überdurchschnittlich häufig enthalten war. Trotz teilweise beträchtlicher, löslicher

Anteile enthielten die Transmembranpeptide immer noch deutlich geringere Mengen an hydrophilen AS. Dies galt vor allem für polare AS, wie Asn und Gln und saure AS, wie Asp und Glu. Bei den basischen AS Lysin und Arginin zeigte sich ebenfalls ein deutliches Ungleichgewicht zu Gunsten der detektierten Peptide aus den löslichen Bereichen der Proteine. Da jedes tryptische Peptid am C-Terminus eine der beiden AS trägt, ergab sich dieses Ungleichgewicht ausschließlich aus einer geringeren Anzahl an sehr langen Peptiden auf Seiten der TMD.

### 6.4.2 Lage der detektierten Peptide im Protein

Für eine detaillierte Analyse dieses Phänomens wurde zunächst die Lage der detektierten Peptide in löslichen und membranintegralen Proteinen untersucht. Bei den löslichen Proteinen waren die detektierten Peptide über die gesamte Länge der Primärsequenz verteilt (Abb. 19, THIM). Die Lage der detektierten Peptide in den Membranproteinen ergab, dass nahezu alle Peptide in den löslichen Domänen der MP lokalisiert waren (Abb. 19, PsbB).



**Abb. 19: Positionierung detektierter Peptide innerhalb der Primärsequenz von Proteinen**

Die Modelle zweier Membranproteine (*psbB* (IIB), *PsaG* (IG), vgl. Abb. 12, S. 74) und eines stromalen Proteins (Thioredoxin *m-type*, THIM) geben Aufschluss über die Lokalisierung der detektierten Peptide nach Verdau mit Trypsin. Die weißen Boxen (I-VI bzw. I-II) symbolisieren die Transmembrandomänen. In den Ecken ist jeweils die AS in der Primärsequenz angegeben, die den Anfang und das Ende der potentiellen Transmembrandomäne darstellt. Die Lage der Peptide, die massenspektrometrisch analysiert wurden, ist mit grauen Boxen dargestellt. "N" und "C" bezeichnet jeweils den N- bzw. C-Terminus der Proteine.

Für das *PsbB*-Protein werden insgesamt sechs  $\alpha$ -helicale Transmembrandomänen vorhergesagt. Alle detektierten Peptide lagen hier in den löslichen Intermembranbereichen. Die erste TMD (I) von *PsaG* enthält eine tryptische Schnittstelle ( $\text{R} < \text{Arg}$ ), die zur Detektion eines Peptids aus dem Bereich einer TMD führte. Aus dem löslichen THIM-Protein wurden vier Peptide detektiert, die sich über die gesamte Primärsequenz verteilen.

Im Gegensatz zu Peptiden, die sich inmitten der löslichen Bereiche befanden waren Peptide, die direkt im Anschluss an eine TMD positioniert waren, nur eingeschränkt detektierbar. Eine sterische Blockade der Schnittstellen durch die Sekundärstruktur einer benachbarten TMD war somit nicht auszuschließen. Eine Analyse der AS-Zusammensetzung der TMD ergab, dass diese in der Regel keine Schnittstelle für die Protease Trypsin besitzen. Mit Ausnahme der LHCP gab es in der Thylakoidmembran lediglich zwei Proteine (*PsaG* und *K*), in denen Teilbereiche der helicalen Transmembrandomänen detektiert wurden. In beiden Fällen enthielt die TMD eine Proteaseschnittstelle (Abb. 19, S. 97; *PsaG*). Von den theoretisch detektierbaren Peptiden aus Proteinen der Thylakoidmembran beinhalten etwa 35% zumindest einen Anteil helicaler TMD. Mit den zwei gefundenen Peptiden konnte von diesen jedoch lediglich ein Anteil von ~1.4% detektiert werden. Peptide die eine komplette Transmembrandomäne enthielten waren nur bei den LHCP detektierbar (vgl. Kapitel 6.4.5.3, S. 108).

### **6.4.3 Statistische Analyse der Detektierbarkeit von Peptiden aus löslichen und membranintegralen Proteinen**

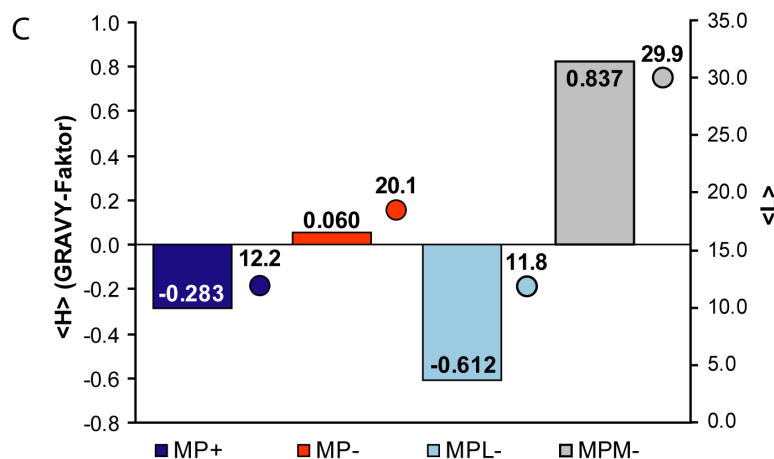
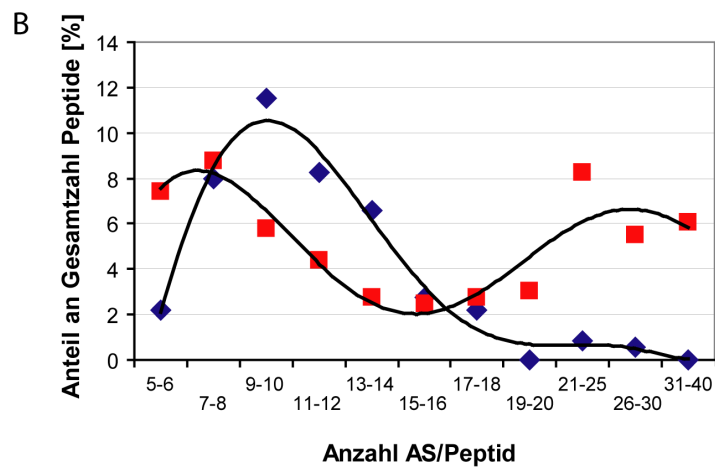
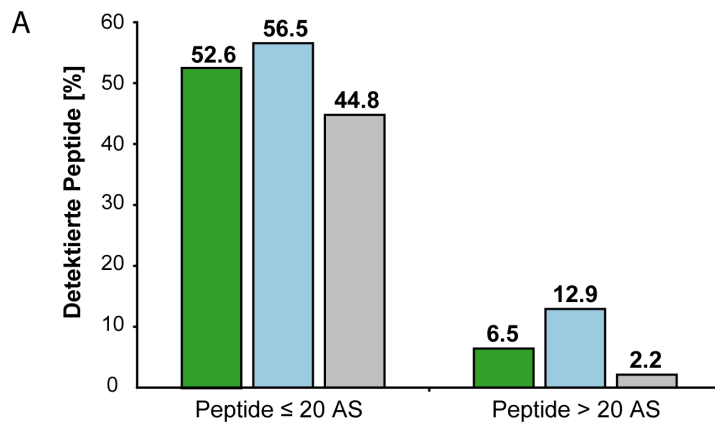
Insgesamt wurden 364 tryptische Peptide aus 12 löslichen Proteinen und 12 Membranproteinen auf ihre Detektierbarkeit mittels *offline* ESI-MS untersucht. Die Analyse wurde dabei auf Peptide mit einer Sequenzlänge zwischen 5 und 40 AS beschränkt. Diese Grenzen orientierten sich an Werten aus der Literatur, wonach Peptide < 0.6 kDa und > 4kDa generell nicht detektiert werden (Wilm et al., 1996; Venter et al., 2002). Bei den untersuchten Membranproteinen handelte es sich um  $\alpha$ -helicale Proteine aus der Thylakoidmembran. Die löslichen Proteine stammten aus dem Stroma der Plastide. N- bzw. C-terminale Peptide gingen in die Berechnung nicht mit ein.

Unter Betrachtung der Gesamtheit aller Peptide aus löslichen und membranintegralen Proteinen wurden mittels *offline* nanoESI-MS etwa 43% aller detektierbaren Peptide in den Spektren gefunden. Nach detaillierter Aufspaltung der Peptide anhand ihrer Sequenzlänge ergab sich, dass der Hauptanteil der detektierten Peptide im Bereich von 9-14 AS lag (Abb. 20, S. 99, B). Diese Peptide wurden etwa doppelt so häufig detektiert, wie nicht detektiert. Bei der Gruppe von Peptiden mit einer Sequenzlänge von 7-8 und 15-18 AS war der Prozentsatz detektierter und nicht detektierter Peptide etwa gleich hoch. Sehr kurze und sehr lange Peptide ( $\leq 6$  AS und  $> 19$  AS) fehlten in der Regel ganz.

Um eine Aussage zur Detektierbarkeit von Transmembrandomänen treffen zu können wurden die Peptide hinsichtlich ihrer Länge in zwei Kategorien eingeteilt. Als Kriterium für die Unterteilung wurde eine Peptidlänge von 20 AS definiert, der typischen Länge einer  $\alpha$ -



helicalen TMD. Die Analyse aller Peptide mit einer Sequenzlänge  $\leq 20$  AS ergab, dass etwa 53% dieser Peptide detektiert wurden. Wurde diese Gruppe weiter unterteilt in Peptide aus löslichen bzw. membranintegralen Proteinen, so wurden 57% bzw. 45% detektiert. In der Fraktion der Membranproteine wurden damit im Vergleich etwa 12% weniger Peptide unter 20 AS detektiert. Ein deutlich anderes Bild ergab sich für die Gruppe  $> 20$  AS. Hier waren insgesamt nur etwa 7% aller möglichen Peptide in den Spektren vorhanden. Bei getrennter Betrachtung wurden etwas mehr als 13% der Peptide  $> 20$  AS aus löslichen Proteinen detektiert, jedoch nur ca. 2% der langen Peptide aus Membranproteinen.



**Abb. 20: Statistische Analyse der Detektierbarkeit von Peptiden**

Tryptische Peptide aus 12 stromalen (löslichen) Proteinen und 12 Membranproteinen von PSI und II wurden auf ihre Detektierbarkeit über nanoESI-MS untersucht (A). In die Berechnungen gehen aufgrund der Detektionsgrenzen für mehrfach geladene Moleküle nur Peptide mit einer Sequenzlänge von 5 bis 40 AS ein. Der Anteil detektierter Peptide (in %) an der Gesamtheit der theoretisch zu erwartenden Peptide ist dargestellt für alle untersuchten Peptide (Balken 1 und 4), Peptide aus löslichen Proteinen (Balken 2 und 5) und Peptide aus Membranproteinen (Balken 3 und 6). Der Einfluss der Sequenzlänge auf die Detektierbarkeit von Peptiden wird durch die zusätzliche Unterteilung in Peptide  $\leq 20$  AS und  $> 20$ AS verdeutlicht. Der Einfluss der Sequenzlänge auf die Detektierbarkeit von Peptiden wurde analysiert (B). Auf der x-Achse ist die Anzahl an AS pro Peptid angegeben, auf der y-Achse der Anteil der einzelnen Fraktionen an der Gesamtzahl der erwarteten Peptide. Die Einteilung der Fraktionen wurde unter Berücksichtigung der statistischen Häufigkeit des Auftretens bestimmter Sequenzlängen gewählt. Blaue Karos repräsentieren die detektierten, rote Quadrate die nicht detektierten Peptide. Durch die Werte wurde jeweils eine polynomische Ausgleichsgerade (6. Ordnung) gelegt. Die durchschnittliche Hydrophobizität ( $\langle H \rangle$ , Balken) und Sequenzlänge ( $\langle L \rangle$ , Kreise) der detektierten (MP+, dunkelblauer Balken und Kreis) bzw. nicht detektierten (MP-, roter Balken und Kreis) Peptide von

12 Membranproteinen (MP) wurde berechnet (C). Nicht detektierte Peptide wurden weiter unterteilt in Peptide aus löslichen Bereichen (MPL-, hellblauer Balken und Kreis) und Peptide mit Anteilen von TMD (MPM-, grauer Balken und Kreis). Die Kalkulation der Hydrophobizitätswerte (GRAVY) erfolgte nach Kyte & Doolittle (Kyte et al., 1982).

Eine statistische Analyse der Verteilung der Schnittstellen in Löslichen und MP ergab, dass lösliche Proteine deutlich mehr Schnittstellen für die Protease Trypsin enthielten (Daten nicht gezeigt). Die durchschnittliche Peptidlänge stromaler und damit löslicher Proteine betrug danach etwa 13 AS. Folglich lagen diese Peptide in dem Bereich  $< 20$ AS, in dem der Großteil ( $\sim 88\%$ ) der mit *offline* nanoESI-MS detektierten Peptide zu finden war. Im Gegensatz dazu betrug die durchschnittliche Länge eines Peptids aus einem Protein der Thylakoidmembran etwa 21 AS. Peptide dieser Länge wurden hier nur selten detektiert. Die Identifikation der Membranproteine fand folglich über ihre löslichen Domänen statt.

### **6.4.4 Einfluss von Sequenzlänge und Hydrophobizität auf die Detektion von Peptiden aus $\alpha$ -helicalen Membranproteinen**

#### *6.4.4.1 Sequenzlänge*

Damit stellte sich die Frage, warum bestimmte Peptide der Membranproteine detektierbar bzw. nicht detektierbar waren. Als ein entscheidender Faktor für das Fehlen von Peptiden in den Spektren von löslichen und in membranintegralen Proteinen erwies sich die Sequenzlänge. Ihr Einfluss auf die Detektierbarkeit von Peptiden aus MP wurde genauer analysiert. Die durchschnittliche Sequenzlänge von detektierten Peptiden aus Membranproteinen betrug 12.2 AS (Abb. 20, S. 99, C (MP+)). Der Wert lag damit in einem Bereich, in dem generell eine große Anzahl an Peptiden detektiert wurde (Abb. 20, S. 99, B). Im Gegensatz dazu waren die nicht detektierten Peptide im Mittel um etwa 8 AS länger (Abb. 20, S. 99, C (MP-)). Die weitere Aufteilung der nicht detektierten Peptide in Vertreter aus löslichen Bereichen der MP und jene mit einem Membrananteil, ergab mit 11.8 AS für Erstere eine Länge, die dem Wert für die detektierten Peptide sehr ähnlich war (Abb. 20, S. 99, C (MPL-)). Bei genauerer Analyse stellte sich heraus, dass dieser Mittelwert aus der hohen Divergenz der Einzelwerte resultierte, die sich aus den Längen vieler sehr kurzer bzw. langer Peptide zusammensetzten. Dabei blieb unklar, warum diese Fragmente nicht detektiert werden konnten. Bei der gesonderten Betrachtung der Peptide mit Membrananteil ergab sich ein Wert von etwa 30 AS pro Peptid (Abb. 20, S. 99, C (MPM-)). Im Bereich dieser Sequenzlänge wurden prinzipiell kaum noch Peptide detektiert (Abb. 20, S. 99, B).

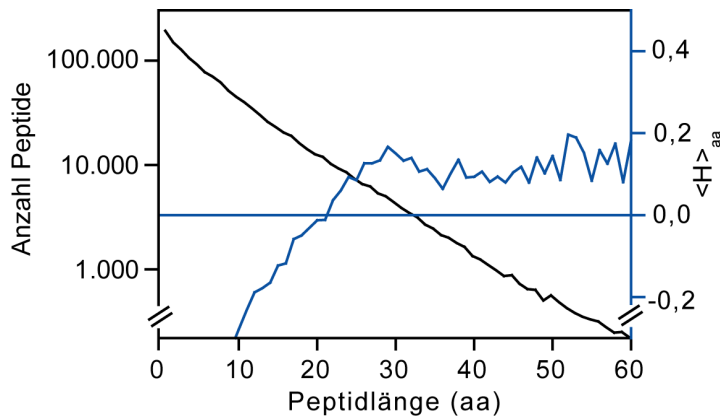
#### 6.4.4.2 Hydrophobizität

Ein weiterer physikalischer Parameter, der eine TMD beschreibt ist die Hydrophobizität. Nach der von Kyte & Doolittle erstellten Hydrophobizitätsskala ergaben sich für alle untersuchten TMD Werte von  $> 0.5$ . Die Gesamthydrophobizität eines membranintegralen Peptides wurde durch die unterschiedlichen Anteile an löslichen Domänen bestimmt. Damit wurden zum Teil Hydrophobizitätswerte erreicht die deutlich niedriger als 0.5 waren.

Um den Einfluss der Hydrophobizität auf die Detektierbarkeit von Peptiden zu untersuchen wurde die durchschnittliche Hydrophobizität detektierter Peptide bzw. nicht detektierter Peptide verglichen (Abb. 20, S. 99, dunkelblauer und roter Balken). Unabhängig von der Sequenzlänge wiesen die detektierten Peptide durchschnittlich einen leicht hydrophilen GRAVY-Index von ca. -0.3 auf. Der Anteil der hydrophilen Peptide (GRAVY-Index:  $< 0$ ) betrug dabei rund zwei Drittel. Obwohl sich der Großteil der gemessenen Peptide in einem Bereich moderater Hydrophobizitätswerte befand, wurden auch einzelne extrem hydrophile (GRAVY: -2.062) bzw. hydrophobe (GRAVY: 1.029) Vertreter detektiert. Demgegenüber lag der durchschnittliche Wert für die nicht detektierten Peptide im Positiven, bei ca. 0.1. Diese Gruppe wurde hinsichtlich ihrer Position im Protein weiter unterteilt. Dabei stellte sich heraus, dass die Peptide aus löslichen Regionen mit einem Wert von -0.6, im Durchschnitt deutlich hydrophiler waren als die aus den entsprechenden Regionen stammenden detektierten Peptide (Abb. 20, S. 99, hellblauer Balken). Im Gegensatz dazu war die Hydrophobizität bei den nicht detektierten Peptiden mit einem Transmembrananteil um einen Wert von 0.777 höher als der Durchschnitt (Abb. 20, S. 99, grauer Balken). Aus den Ergebnissen wurde deutlich, dass vor allem Peptide mit extremen Hydrophobizitätswerten, unabhängig davon ob hydrophil oder hydrophob, nicht detektiert wurden.

#### 6.4.4.3 Sequenzlänge und Hydrophobizität

Die Analyse von Peptiden aus Proteinen der Thylakoidmembran ließ auf eine Verknüpfung der beiden Parameter Sequenzlänge und Hydrophobizität schließen (Abb. 20, S. 99, C). Damit stellte sich die Frage nach einem generellen Zusammenhang zwischen der Sequenzlänge und der Hydrophobizität von Peptiden. Um diese Frage zu beantworten, wurde das Proteom von *A. thaliana in silico* tryptisch verdaut und in Gruppen von Peptiden mit definierter Sequenzlänge eingeteilt (Abb. 21, S. 102). Für jede Gruppe wurde die durchschnittliche Hydrophobizität nach der Skala von Kyte & Doolittle berechnet. Eine Selektion von Peptiden nach ihrer Detektierbarkeit im MS (vgl. Kapitel 6.4.3, S. 98) wurde hier nicht vorgenommen. Wie erwartet sank dabei die Anzahl tryptischer Peptide mit steigender Sequenzlänge.



**Abb. 21: Statistische Analyse des *in silico* Verdau der Genprodukte von *A. thaliana* mit Trypsin.**

Der theoretische Verdau der Gesamtheit aller Proteine von *A. thaliana* führt zu Peptiden mit unterschiedlichen Eigenschaften. Die Verteilung der Sequenzlängen der dabei entstehenden Peptide ist gegen die Anzahl (rechts, schwarz) und die durchschnittliche Hydrophobizität (GRAVY-Index<sub>aa</sub>, links, blau) aufgetragen. Die Berechnung der Hydrophobizität erfolgte nach der Skala von Kyte & Doolittle (Kyte et al., 1982).

Im Gegensatz dazu stieg die durchschnittliche Hydrophobizität der Peptide bis zu einer Peptidlänge von 30 AS nahezu linear an (Abb. 21, S. 102). Danach pendelte sich der Hydrophobizitätsindex, trotz zunehmendem Anteil löslicher Abschnitte im Peptid, im moderat hydrophoben Bereich bei Werten zwischen 0,1 und 0,2 ein. Die Gruppe der Peptide < 21 AS hatte somit eher hydrophilen Charakter, wohingegen Peptide > 21 AS im Durchschnitt hydrophobe Eigenschaften besaßen. Dies entsprach in etwa der Länge einer Transmembranhelix, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der überwiegende Teil der Peptide > 21 AS mindestens eine TMD besaß. Der Trend, der sich bereits bei den Proteinen der Thylakoidmembran abgezeichnet hatte, konnte folglich auf das gesamte Proteom übertragen werden.

#### 6.4.5 Herabsetzung der Hydrophobizität durch AS-Oxidation

##### 6.4.5.1 Quantitative Oxidation der AS Methionin

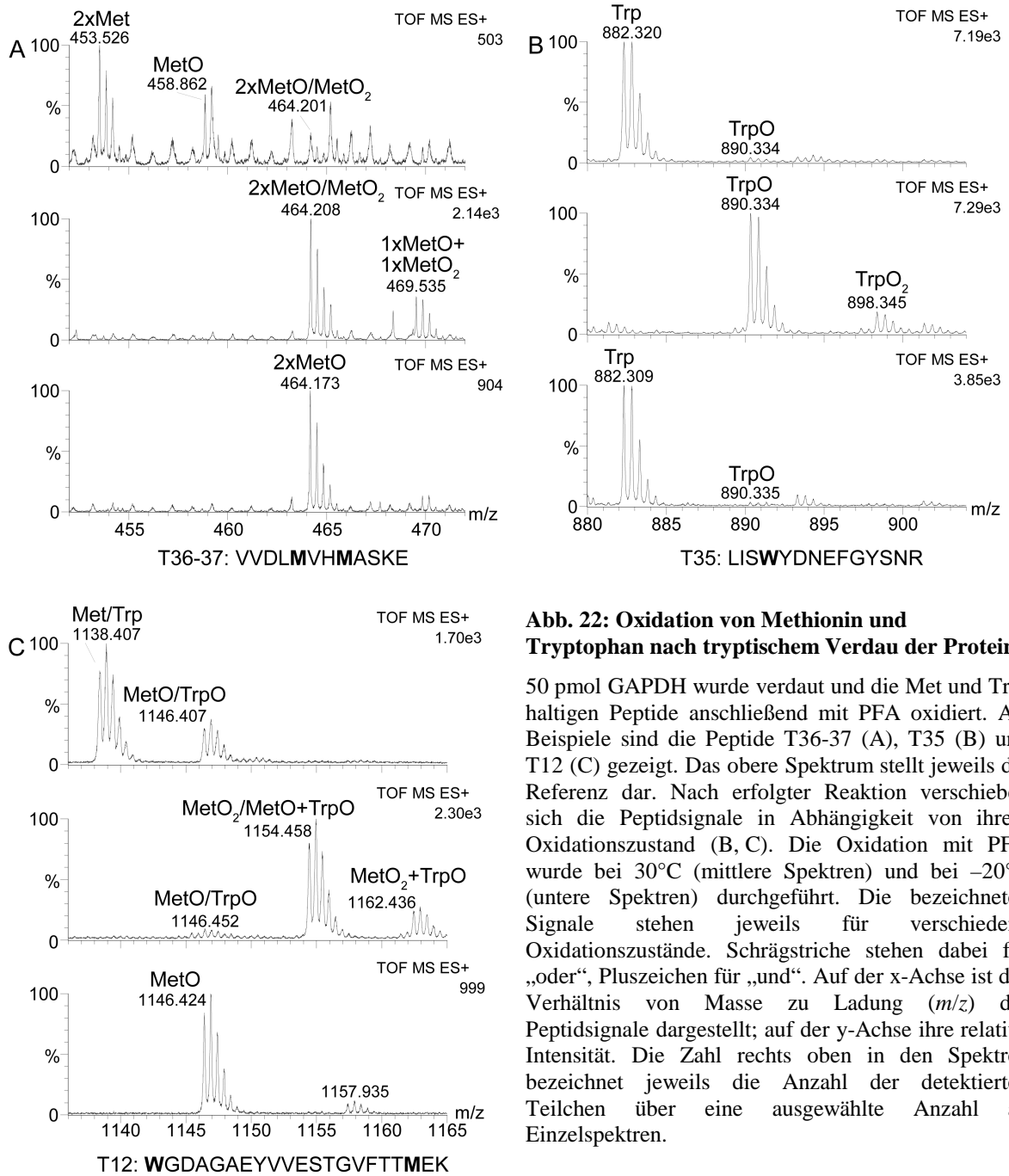
Durch die einfache Zugänglichkeit der AS Met für Reaktionen mit Sauerstoff, lagen die in der AS-Sequenz eines Peptids enthaltenen Methionine häufig in verschiedenen Oxidationszuständen vor. Dies führte zur Detektion multipler Signale desselben Peptids. Bei zwei möglichen Oxidationszuständen ergaben sich im Extremfall für ein Peptid, welches zwei Methionine enthielt fünf detektierbare Signale im MS-Spektrum. Dies reduzierte die Übersichtlichkeit der Spektren und verringerte gleichzeitig die Detektierbarkeit des Peptids, durch die Verteilung der Signalintensitäten. In Abhängigkeit vom Ladungszustand des Peptids im Spektrum führte eine einfache Oxidation zu einer Erhöhung der Peptidmasse um  $7.997 m/z$  bei  $[M+2H]^{2+}$ ,  $5.332 m/z$  bei  $[M+3H]^{3+}$  und  $3.999 m/z$  bei  $[M+4H]^{4+}$ . Auf den Ladungszustand eines Peptids hatte eine Oxidation keinen Einfluss.

Untersucht wurde die Oxidierbarkeit von Methionin, Tryptophan, Histidin, Cystein und Tyr mit dem Oxidationsmittel PFA. Um die Bedingungen für eine quantitative und einheitliche

Oxidation von Peptiden mit PFA festzulegen, wurden Versuche mit 50 pmol GAPDH durchgeführt. Nach tryptischem Verdau von GAPDH ergaben sich theoretisch 11 Peptide, die (mindestens) einmal die potentiell oxidierbaren AS Met, Trp, Cys, His und Tyr oder einer Kombination aus diesen enthielten.

Bereits innerhalb der Referenzprobe war ein bestimmter Anteil der Methionine eines Proteins modifiziert (Abb. 22, A, oberes Spektrum, S. 104). Ursache konnte theoretisch eine posttranslationale Modifikation des betroffenen Met *in vivo* sein. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich hierbei jedoch um Artefakte, die bei der Aufarbeitung der Proben entstanden, speziell während der Elektrophorese. Der Grad der Oxidation war dabei extrem unterschiedlich und variierte von Versuch zu Versuch. Die genaue Ursache bzw. der Bearbeitungsschritt in dem die Derivatisierung stattfand, konnte hier nicht eindeutig geklärt werden. In Übereinstimmung mit Sun et al. zeigte sich jedoch, dass unter den Bedingungen des Verdau keine Oxidation erfolgte (Daten nicht gezeigt) (Sun et al., 2004).

Untersucht wurde das Oxidationsverhalten dreier Peptide aus GAPDH. Es handelte sich dabei um das N-terminale Peptid T36-37 (VVDLMV**H**MASKE), sowie T35 (LISWYDNEFGYSNR) und T12 (WGDAGAEYV**V**ESTGVFTT**M**EK). Nach 30 min Inkubation mit PFA bei erhöhter Temperatur lagen alle Methionine und Tryptophane in einfach oxidierten Form, als Sulfoxid bzw. Hydroxytryptophan, bzw. zweifach oxidierten Form, als Sulfon bzw. N-Formylkynurenin vor (Abb. 22, A-C, S. 104) mittlere Spektren). Das Verhältnis von MetO zu MetO<sub>2</sub> bzw. TrpO zu TrpO<sub>2</sub> war dabei nicht konstant. Bei mehreren oxidierbaren AS innerhalb eines Peptids stellten die gemessenen Signale in der Regel Mischungen aus den verschiedenen Oxidationszuständen dar. Im MSMS-Spektrum wurden demnach beide Ionenserien dokumentiert. Im Fall des Peptides T36-37 setzte sich beispielsweise das dreifach geladene Signal von T36-37 aus einem Anteil an 2 x MetO und einem Anteil an MetO<sub>2</sub> zusammen (Abb. 22, A, S. 104). Der prozentuale Anteil beider Peptidderivate konnte anhand der Fragmentensignale nicht ermittelt werden. Eine einheitliche Oxidation zur einfach bzw. zweifach oxidierten Form wurde durch eine Änderung der Inkubationszeit und/oder der Konzentration der Reagenzien nicht erreicht. Cysteine, die nicht bereits als Acrylamid-Addukt vorlagen, wurden in den Peptiden als Cysteinsäure detektiert. Das Peptid T27 (VPTPNVSVVDLTCR) mit einer  $m/z$  von 750.394  $[M+2H]^{2+}$  wurde nach der Oxidation seines Cys folglich als Signal bei 774.387  $m/z$  detektiert. Daneben existierte in unveränderter Form weiterhin das Acrylamid-Addukt bei 785.90  $m/z$  (vgl. Kapitel 4.2.2, S. 44). His und Tyr blieben unmodifiziert.

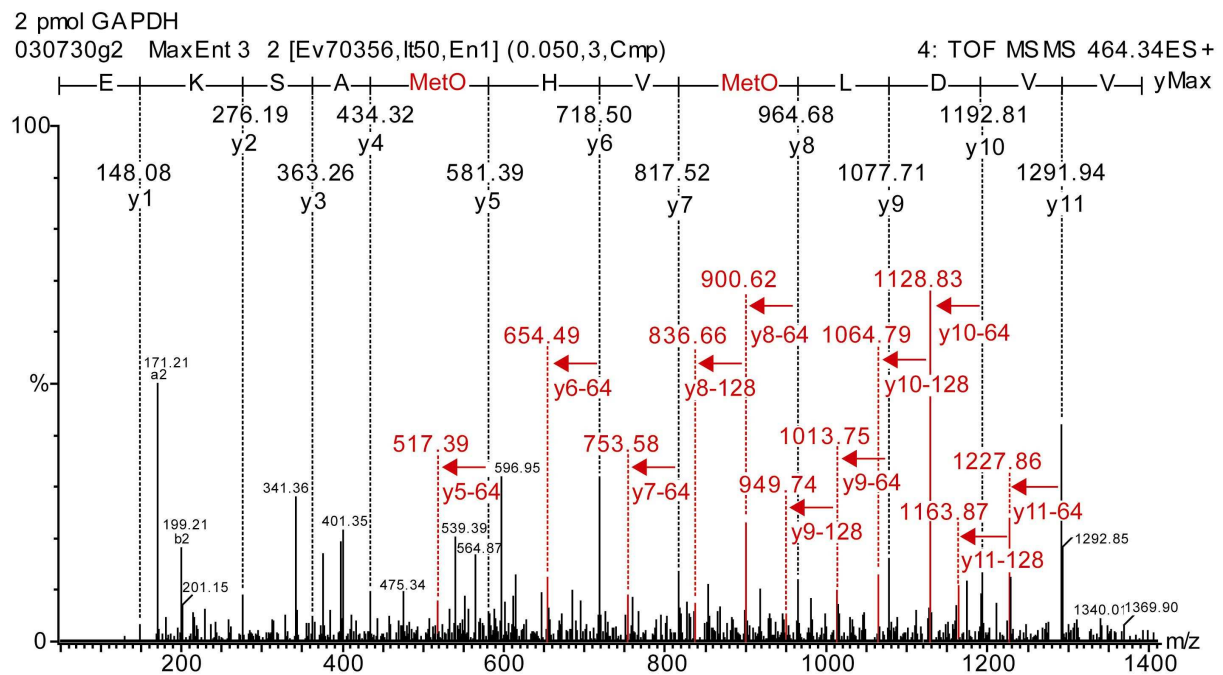


**Abb. 22: Oxidation von Methionin und Tryptophan nach tryptischem Verdau der Proteine**

50 pmol GAPDH wurde verdaut und die Met und Trp-haltigen Peptide anschließend mit PFA oxidiert. Als Beispiele sind die Peptide T36-37 (A), T35 (B) und T12 (C) gezeigt. Das obere Spektrum stellt jeweils die Referenz dar. Nach erfolgter Reaktion verschieben sich die Peptidsignale in Abhängigkeit von ihrem Oxidationszustand (B, C). Die Oxidation mit PFA wurde bei 30°C (mittlere Spektren) und bei -20°C (untere Spektren) durchgeführt. Die bezeichneten Signale stehen jeweils für verschiedene Oxidationszustände. Schrägstriche stehen dabei für „oder“, Pluszeichen für „und“. Auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) der Peptidsignale dargestellt; auf der y-Achse ihre relative Intensität. Die Zahl rechts oben in den Spektren bezeichnet jeweils die Anzahl der detektierten Teilchen über eine ausgewählte Anzahl an Einzelspektren.

Um die Oxidationsprodukte zu vereinheitlichen, wurde die Reaktion bei -20°C durchgeführt. Ein Anteil von 20% Methanol verhinderte dabei das Gefrieren der Lösung. Die homologe Oxidation von Met zum Sulfoxid konnte am Beispiel des Peptides T36-37 gezeigt werden. Das unmodifizierte Peptid wurde als  $[M+3H]^{3+}$  bei 453.53  $m/z$  detektiert (Abb. 22, A oberes Spektrum). Nach der Reaktion war das zugehörige Signal um +10.65  $m/z$  auf 464.17  $m/z$   $[M+3H]^{3+}$  verschoben. Dies entsprach einer Addition von zwei Sauerstoffatomen. Ob das Signal das Resultat einer Mischung von MetO und MetO<sub>2</sub> oder die einheitliche Oxidation beider Methionine zu MetO darstellte, konnte anhand des Fragmentspektrums geklärt werden. Bei der Fragmentierung von Peptiden, die ein MetO enthielten kam es zur Bildung von

Satellitenionen mit einem Abstand von  $\Delta = -64$  Da zum zugehörigen y-Ion (Abb. 23, hier: y5-y11). Enthielt die Peptidsequenz, wie im Fall von T36-37, zwei Methionine ergaben sich zusätzliche Satellitenionen, deren Signale aus den Neutralverlusten beider MetO gebildet wurden ( $\Delta = -128$ , hier: y8-y11). Da das stabilere MetO<sub>2</sub> während der Fragmentierung keine Satellitenionen ausbildete, ließ sich ein theoretisch vorhandener Anteil an diesem Derivat nur durch y-Ionen mit einer Masse von 163.031 Da belegen. Folglich müsste das y7-Ion bei 801.46 *m/z* und das y4-Ion bei 418.23 *m/z* detektiert werden. Beide Signale waren im Spektrum nicht detektierbar. Somit waren beide Met einheitlich zu MetO oxidiert.



**Abb. 23: MSMS-Spektrum des doppelt oxidierten Peptides T36-37 aus GAPDH**

GAPDH wurde über SDS-PAGE getrennt und die Proteinbanden mit Coomassie gefärbt. Nach tryptischem Verdau wurden die resultierenden Peptide über LC-MS analysiert. Die aufgetragene Menge entsprach ca. 2 pmol GAPDH. Nach der Oxidation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit PFA wurde das Peptid T36-37 im MS-Spektrum in doppelt oxidierte Form detektiert. Die Fragmentierung des Peptides ermöglicht die exakte Zuordnung der modifizierten AS (MetO), sowie die Ermittlung des Grades der Modifikation. Die entstandenen y-Ionen sind mit y1-y11 gekennzeichnet. Oberhalb des Signals ist die Masse eines jeden y-Ions, sowie die zugehörige AS angegeben. Die Signale der Satellitenionen, die durch den Neutralverlust von  $-64$  Da *pro* MetO entstehen sind in rot dargestellt.

Trp wurde unter diesen Bedingungen nicht mehr oxidiert (Abb. 22, B und C, S. 104). Im Peptid T35 aus GAPDH, welches einmal die AS Trp enthielt, konnte im Vergleich zur Referenz keine messbare Erhöhung der Menge an modifiziertem Trp nach Ablauf der Reaktion nachgewiesen werden. Met war folglich für eine Oxidationsreaktion leichter zugänglich als Trp. Das Peptid T12 enthielt sowohl die AS Met als auch die AS Trp. Anhand des MSMS-Spektrums wurde deutlich, dass selektiv die AS Met von der Modifikation betroffen war. Eine Inkubation unter den genannten Bedingungen erwies sich somit als ausreichend zu einer einheitlichen und quantitativen Oxidation der Methionine zu MetO. Die

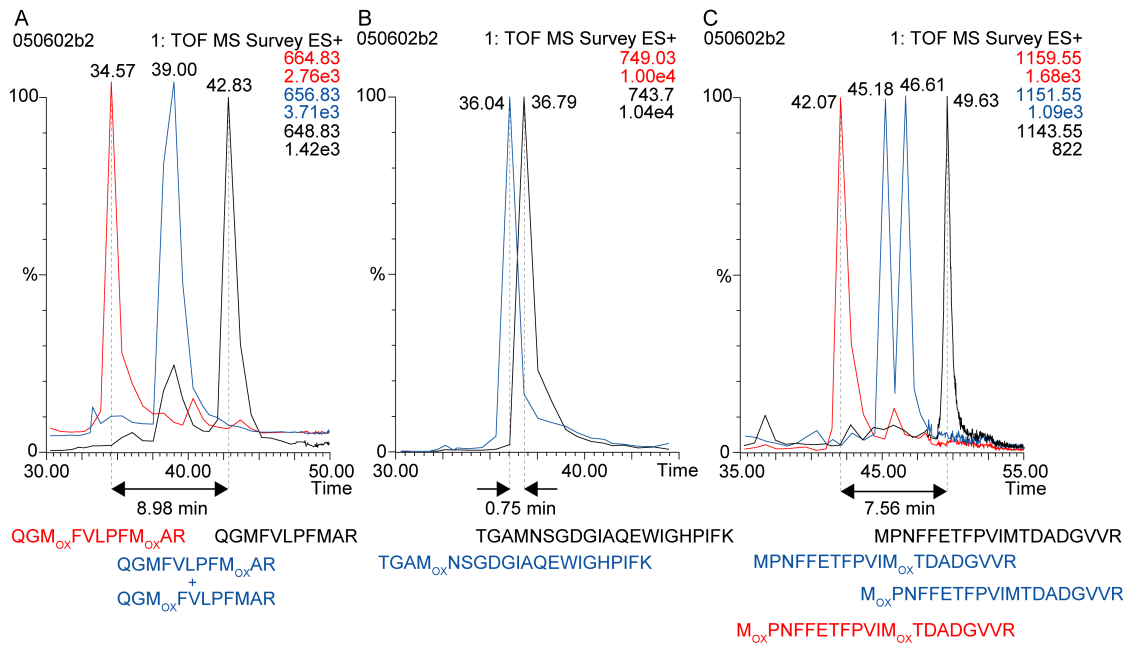
Inkubation der Peptide bei -20°C verhinderte zudem die Oxidation von Cys zu Cysteinsäure. Die AS His und Tyr waren von der Oxidation nicht betroffen.

#### 6.4.5.2 Reduktion der Hydrophobizität nach Oxidation von AS

Infolge der Oxidation wurde die Hydrophobizität des betroffenen Peptides erniedrigt. Die Reduktion der Hydrophobizität verminderte bei hydrophoben Peptiden die Gefahr der Aggregation und der irreversiblen Adsorption an RP-Material. Das Ausmaß der Veränderung für einzelne Peptide wurde anhand der Retentionszeiten auf einer RP-Säule untersucht. Die Retentionszeit eines Peptides auf einer RP-Säule ist in erster Linie abhängig von seiner Sequenzlänge und Hydrophobizität. Da während eines Gradienten die geräteimmanenten Parameter für alle zu trennenden Moleküle weitgehend gleich waren, wirkten sich ausschließlich die physikalischen Eigenschaften der einzelnen Peptide auf den Elutions- bzw. Detektionszeitpunkt aus. Generell wurden kurze, hydrophile Peptide zu einem früheren Zeitpunkt eluiert als lange hydrophobe Peptide. Das gleiche galt für die oxidierte und damit hydrophilere Form eines Peptids. Sie eluierte zu einem früheren Zeitpunkt als die unmodifizierte Form. CP47 aus *Synechocystis* enthielt drei detektierbare Peptide mit einem bzw. zwei Methioninen. Entsprechend ihrer Hydrophobizität und Sequenzlänge wurden diese in der Reihenfolge T17 TGAMNSGDGIAQEWIGHPIFK (GRAVY-Index: -0.233) < T4 QGMFVLPMAR (GRAVY-Index: 0.836) < T22 MPNFFETFPVIMTDADGVVR (GRAVY-Index: 0.380) abgelöst. Da ein Teil der Methionine nach SDS-PAGE in oxidiertem Form vorlag, wurden die entsprechenden Oxidationsprodukte der Peptide ebenfalls detektiert. Als Artefakt der PAGE wurde ausschließlich das Oxidationsprodukt MetO gefunden; eine Oxidation bis zum Sulfon wurde nicht festgestellt.

Die Oxidation beider Methionine führte im Fall von T4 zu einer deutlichen Änderung der Retentionszeit von fast 9 min zwischen der unmodifizierten und der oxidierten Form. (Abb. 24, A, S. 107). Daneben existierte ebenfalls eine Form des Peptids bei der lediglich eines der beiden Methionine zu MetO oxidiert war. Die beiden Produkte QG[MetO]FVLPMAR und QGMFVLPM[MetO]AR waren sowohl im Chromatogramm als auch im zugehörigen MSMS-Spektrum nicht voneinander unterscheidbar, da beide Formen zum selben Zeitpunkt eluierten (Abb. 24, A blaues Signal, S. 107). Mit einer Länge von 11 AS war das Peptid T4 etwa halb so lang, wie T17 und T22.



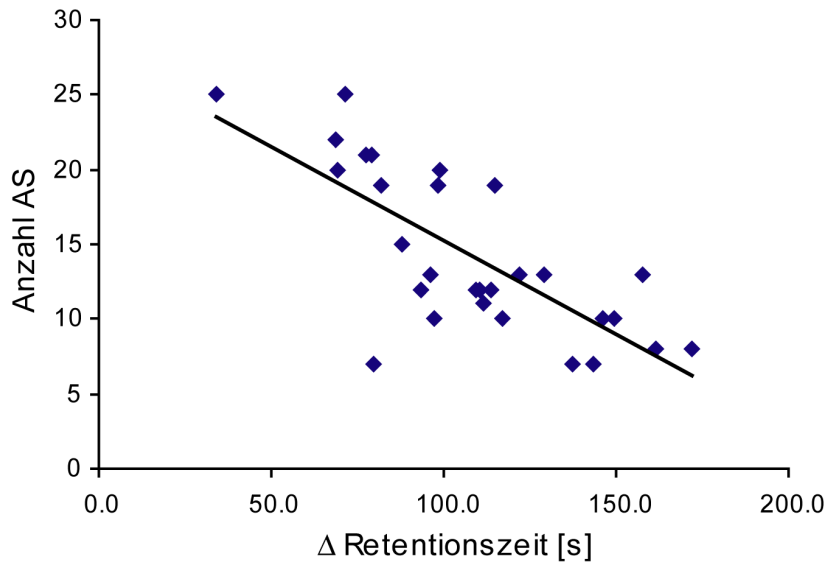


**Abb. 24: Oxidationsbedingte Verschiebung der Retentionszeit von Peptiden aus CP47**

Die Proteinbande von CP47 aus *Synechocystis* wurde aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide über nanoLC-MS analysiert. Für drei detektierte Peptide, die mindestens ein Methionin enthalten sind die Signale der auftretenden Formen im Chromatogramm dargestellt (A, B, C). Das schwarze Signal entspricht jeweils dem unmodifizierten Peptid, das Blaue der einfach oxidierten Form und das Rote enthält zwei oxidierte Methionine. Der Elutionszeitpunkt ist am Maximum der Signale angegeben. In Abhängigkeit von den physikalischen Eigenschaften der Peptide ergab sich der zeitliche Abstand zwischen den (un-) modifizierten Formen eines Peptids. Die Peptidsequenz steht unterhalb des jeweiligen Chromatogramms. Rechts oben sind in den entsprechenden Farben die Peptidmassen der Signale und darunter deren maximale Intensität angegeben.

Speziell bei längeren, hydrophilen Peptiden hatte die Oxidation eines Methionins kaum Auswirkungen auf die Retentionszeit, da die Änderung der physikalischen Eigenschaften im Verhältnis geringer ausfiel. Das hydrophile Peptid T17 eluierte nach der Oxidation des enthaltenen Met zu MetO lediglich 45 s früher von der Säule (Abb. 24, B). T22 hatte mit 20 AS fast die gleiche Länge wie T17, enthielt jedoch wie T4 zweimal die AS Met innerhalb seiner Sequenz. Die Verschiebung der Retentionszeit nach einfacher Oxidation beider Methionine fiel aufgrund der Sequenzlänge etwas geringer aus als bei T4. Sie betrug ca. 7.5 min (Abb. 24, C). Im Unterschied zu T4 war hier die Auflösung aller vier Formen des Peptids möglich. Anhand der MSMS-Spektren waren beide Formen des einfach oxidierten Peptids deutlich unterscheidbar. Die Maxima beider Signale waren im Chromatogramm um 1.43 min getrennt (Abb. 24, C, blaues Signal). Die Lage des Methionins im Molekül hatte folglich ebenfalls eine Auswirkung auf dessen physikalische Eigenschaften und damit auf die Retentionszeit. Obwohl T4 und T22 nach der Oxidation beider Methionine mit ca. -0.2 einen ähnlichen Hydrophobizitätswert erreichten, wurde das längere Peptid T22 7.5 min später von der Säule eluiert. Infolge waren kurze Peptide von einer Oxidation stärker betroffen als

Lange. Bis auf wenige Ausnahmen war eine Korrelation von Peptidlänge bzw. dessen Masse und der Verschiebung der Retentionszeit hin zu einem früheren Zeitpunkt erkennbar (Abb. 25).



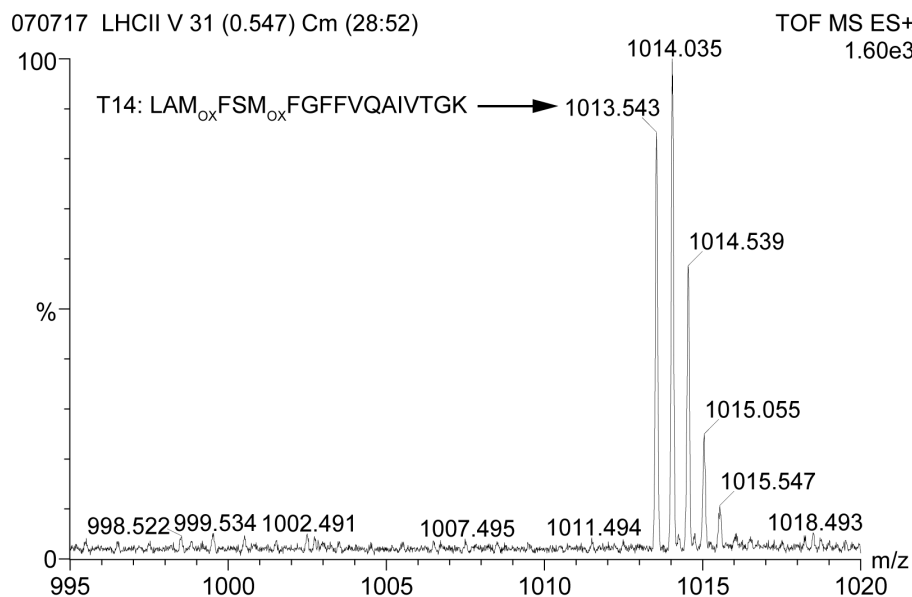
**Abb. 25: Verschiebung der Retentionszeit nach Oxidation der AS Methionin**

Nach In-Gel Verdau der Proteine GAPDH, Protochlorophyllid Oxidoreduktase, ATP-Synthase ( $\alpha$ -UE), Ovalbumin und Phosphorylase B wurden die resultierenden Peptide über nanoRP-LC getrennt. Aus den fünf Proteinen konnten insgesamt 29 Peptide detektiert werden, die jeweils ein oder mehrere Methionine enthielten und im Chromatogramm in unmodifizierter Form, sowie als MetO nachweisbar waren. Im Diagramm ist die aufgrund der Derivatisierung hervorgerufene

Verschiebung der Retentionszeit (x-Achse) in Sekunden in Abhängigkeit von der AS-Anzahl der einzelnen Peptide (y-Achse) aufgetragen.

#### 6.4.5.3 Detektion von Transmembranpeptiden nach Modifikation der AS Methionin

Die Modifikation der AS Met ermöglichte die Detektion einer Transmembranhelix nach In-Gel Verdau. Es handelte sich dabei um das tryptische Peptid T14 aus einem Protein des Lichtsammelapparates (*LhbC*, P27523) von Gerste (Abb. 26).



**Abb. 26: MS-Signal des oxidierten Transmembranpeptids T14 nach tryptischem Verdau von CB23 (*LhbC*) aus Gerste**

Thylakoidmembranen aus Gerste wurden über 2D-PAGE getrennt und die Proteine mit CBB visualisiert (vgl. Abb. 12, S. 74). Die zu CB23 (*LhbC*) gehörende Gelbande wurde anschließend aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide im MS analysiert. Das abgebildete MS-Spektrum

stellt eine Addition von 25 Einzelspektren dar. Gezeigt ist der Ausschnitt zwischen 995 und 1020  $m/z$ . Das tryptische Peptid T14, welches bis auf drei AS die dritte TMD beinhaltet, besitzt als doppelt geladenes Ion eine theoretische Masse von 997.510  $m/z$ . Die unmodifizierte Form des Peptids gilt mit einem Hydrophobizitätswert von 1.422 als extrem hydrophob. In allen Experimenten konnte bei 1013.51  $m/z$  lediglich eine Form des Peptids detektiert werden, bei der beide Methionine in oxidiertem Zustand vorlagen.

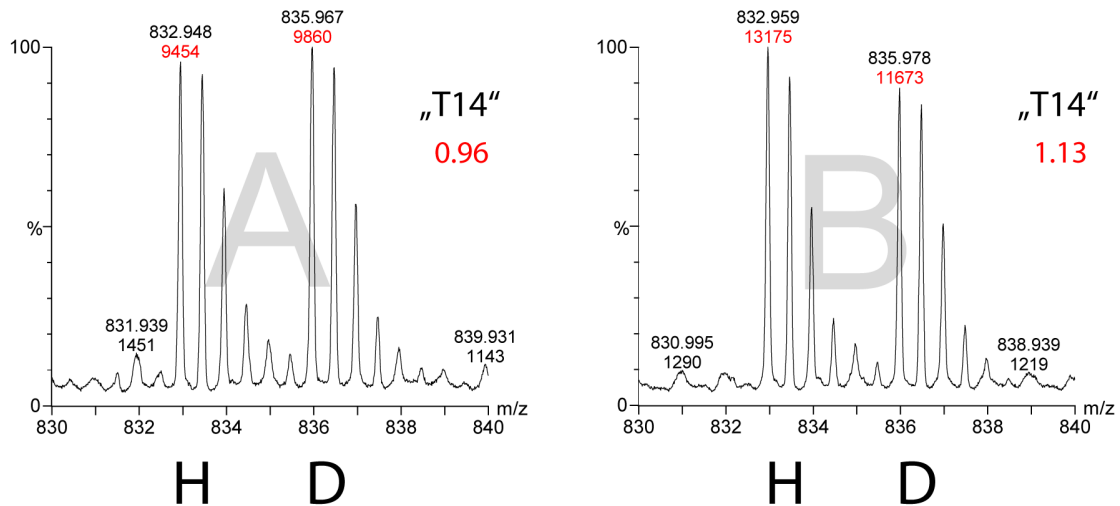
Das Peptid mit einer Masse von etwa 2 kDa umfasst nahezu die komplette 3. TMD. In der unmodifizierten Form wurde das Peptid nicht detektiert. Der GRAVY-Index des unmodifizierten Peptides T14 LAMFSMFGFFVQAIVTGK betrug 1.422. Nach Oxidation der beiden enthaltenen Methionine zum MetO reduzierte sich der Wert deutlich um 0.644 auf 0.778.

Die Detektion von membranintegralen Peptiden, nach Reduktion der Hydrophobizität durch die Oxidation eines oder mehrerer enthaltener Methionine, war jedoch lediglich in Einzelfällen möglich. Es handelte sich dabei ausnahmslos um „kurze“ Peptide < 25 AS. Folglich war davon auszugehen, dass die Hydrophobizität nicht allein für das Fehlen eines Großteils der membranintegralen Peptide verantwortlich war.

### ***6.5 Quantifizierung von Proteinen über Modifikation von primären Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid auf einer Mikrosäule***

Die Markierung von Proteinen mit stabilen Isotopen wird normalerweise in der vergleichenden Proteomforschung eingesetzt, zur Analyse von Proteinen aus Zellen, die unter unterschiedlichen Bedingungen gehalten wurden. Im Gegensatz dazu wurde hier anhand von Standardproteinen die Effizienz der verschiedenen Schritte des In-Gel Verdauens von Proteinen über relative Quantifizierung untersucht.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur relativen Quantifizierung von Proteinen liefen grundsätzlich nach folgendem Schema ab. Zunächst wurde ein Peptidstandard hergestellt, der aus einem Verdau des gleichen Proteins bestand, welches innerhalb des Experiments quantifiziert werden sollte. Die entstandenen Peptide wurden auf eine C<sub>18</sub>-Mikrosäule geladen und mit der „schweren“ Form des Acetylierungsreagenz (hier: D6-Ac<sub>2</sub>O) markiert. Die Reaktion auf der Mikrosäule war quantitativ. Dabei wurde die Acetylgruppe kovalent an die freien Aminogruppen der Peptide gebunden. Die markierten Peptide wurden anschließend eluiert und bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Jeder zu quantifizierenden Probe wurde ein äquivalentes Volumen des internen Standards zugesetzt. Zur Derivatisierung der Peptide aus den zu analysierenden Proben wurde das Peptidgemisch aus Probe und Standard anschließend erneut an eine C<sub>18</sub>-Mikrosäule gebunden. Bei Inkubation mit der „leichten“ Form des Acetylierungsreagenz (hier: H6-Ac<sub>2</sub>O) reagierten ausschließlich die noch unmodifizierten Peptide aus den zu quantifizierenden Proben. Das differentiell markierte Peptidgemisch wurde anschließend massenspektrometrisch analysiert. Zur Datenauswertung wurde anhand der Signalintensitäten im Spektrum in jeder Probe das Verhältnis von Peptidpaaren aus Probe und internem Standard bestimmt (Abb. 27, S. 110).



Verhältnis Probe A zu B = 1:1.18

**Abb. 27: Illustration des Quantifizierungsprinzips am Beispiel des Peptids T14 aus CA.**

Zu quantifizieren sind die unterschiedlich prozessierten Proben A und B. Ausschnitte aus den MS-Spektren der beiden Proben zeigen jeweils das tryptische Peptid „T14“ (Ac-YAAELHLVHWNTK(Ac) aus CA mit unterschiedlicher Isotopenmarkierung. Das linke Peptidsignal (H) stammt aus der zu analysierenden Probe und wurde mit H6-Ac<sub>2</sub>O markiert; das Rechte Peptidsignal (D) repräsentiert den internen Standard und wurde mit D6-Ac<sub>2</sub>O markiert. Für jedes Peptidpaar wird anhand der Signalintensitäten das Verhältnis von H/D bestimmt (rote Zahlen). Die relative Quantifizierung der Proben A und B erfolgt aus der Relation der Verhältniswerte. Das Ergebnis für das Peptid wird mit der ursprünglich in den Proben vorhandenen Proteinmenge gleichgesetzt. In Probe B war damit rund 1.2 x mehr Protein als in Probe A.

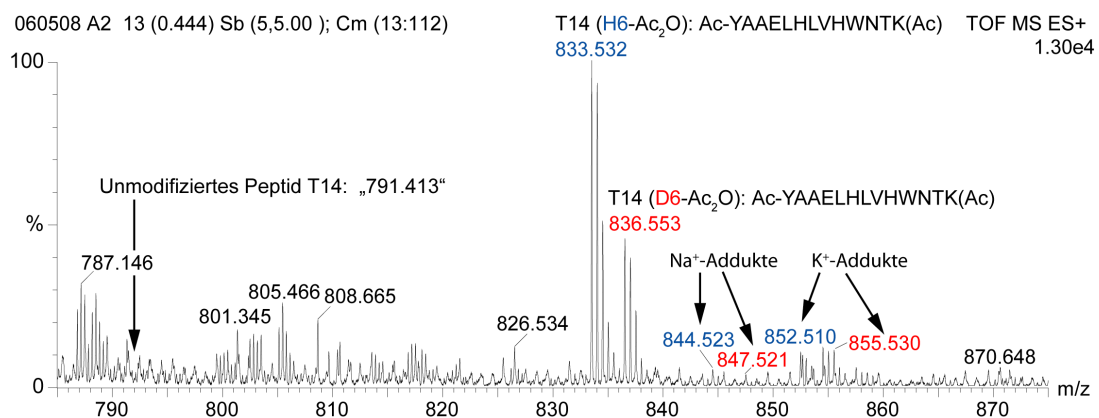
Die relative Quantifizierung von unterschiedlichen Proben ergab sich aus der Relation dieser Verhältniswerte. Mit dem hier beschriebenen Verfahren war es möglich mit nur einer Referenz zwei oder mehr Proben miteinander zu vergleichen. Einzige Bedingung war, dass ausreichend Standard für alle Proben zur Verfügung stand und zum selben Zeitpunkt dieselbe Menge an Standard zu jeder Probe zugesetzt wurde. Pro Zustand war dabei eine eigene MS-Messung erforderlich.

Die Acetylierung der primären Aminogruppen wurde grundsätzlich über zwei Arten von Reagenzien erreicht – Succinimidester und Säureanhydride. Die Reagenzien unterschieden sich vor allem in ihrer Reaktivität und damit in der benötigten Reaktionszeit. Bei der Verwendung eines Succinimidesters dauerte eine quantitative Markierung der Analytmoleküle etwa 2-3h (Chakraborty et al., 2002; Asara et al., 2006; Schmidt et al., 2005). Ac<sub>2</sub>O war deutlich reaktiver. Die quantitative Acetylierung der Peptide wurde in Lösung bereits nach 30–45 min erreicht (Che et al., 2002). Nach Bindung der Peptide an eine C<sub>18</sub>-Mikrosäule (vgl. Kapitel 5.6.1, S. 58) lief die Reaktion innerhalb weniger Minuten quantitativ ab. Trotz der kurzen Reaktionszeit befanden sich am Ende alle Peptide einer Art im gleichen Acetylierungszustand (Abb. 28, S. 111). Unmodifizierte bzw. teilweise modifizierte Moleküle wurden nicht nachgewiesen. Die kurze Reaktionszeit erwies sich außerdem in einem zweiten

Punkt als günstig. In wässriger Lösung konkurriert die Reaktion von Succinimidestern und Anhydriden mit primären Aminen mit der Hydrolyse der aktivierten Carbonsäure. Um ausreichend Reagenz für die Umsetzung zur Verfügung zu stellen, musste deshalb bei längeren Inkubationszeiten in bestimmten Intervallen erneut  $\text{Ac}_2\text{O}$  zugegeben werden.

Neben der Zeitersparnis lag ein weiterer Vorteil der Methode in der einfachen Handhabung. Die  $\text{C}_{18}$ -Mikrosäule war in eine  $10\ \mu\text{l}$  Pipettenspitze eingebettet. Definierte Zeitpunkte zum Starten und Beenden der Reaktion bildeten das Auf- und Auspipettieren der Reaktionslösung. Während der Reaktion fungierte die Flüssigkeitssäule über der stationären Phase als Reservoir für die beteiligten Reagenzien. Beim Wechsel der Reaktionslösungen und bei der Durchführung von Waschschrritten blieben die Peptide fest an die stationäre Phase gebunden. Die beteiligten Reagenzien waren durch einfaches Auspipettieren leicht aus dem System zu entfernen.

Bei der Durchführung der Markierungsreaktion auf einer  $\text{C}_{18}$ -Mikrosäule erwies sich die geringe Wasserlöslichkeit von  $\text{Ac}_2\text{O}$  als problematisch, da konzentriertes  $\text{Ac}_2\text{O}$  die  $\text{C}_{18}$ -Matrix der Mikrosäule auflöste. Beim Mischen von Wasser und  $\text{Ac}_2\text{O}$  kam es zu einer Phasentrennung, wobei  $\text{Ac}_2\text{O}$  die untere und Wasser die obere Phase darstellte. Um das Problem zu umgehen, wurde ACN (10%, v/v) als Lösungsvermittler eingesetzt. Damit war es möglich geringe Mengen an  $\text{Ac}_2\text{O}$  in Wasser zu lösen. Aufgrund der hohen Reaktivität der Chemikalie waren 0.1% (v/v, Endkonzentration)  $\text{Ac}_2\text{O}$  ausreichend für eine quantitative Reaktion. In der geringen Konzentration von 10% erwies sich das normalerweise als Lösungsmittel für Peptide eingesetzte ACN als unproblematisch im Bezug auf die Elution von Peptiden von der  $\text{C}_{18}$ -Matrix.



**Abb. 28: Modifikation von primären Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid**

Als Reagenz zur Acetylierung von primären Aminogruppen wurde Essigsäureanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) verwendet. Das Anhydrid reagiert im Basischen mit primären Aminogruppen, wie sie im Protein/Peptid am N-Terminus und an der Seitenkette von Lysin zu finden sind. Pro primärer Aminogruppe wird bei der Reaktion eine Acetylgruppe des Anhydrids übertragen. Dabei wird Essigsäure freigesetzt. Nach Addition einer Acetylgruppe erhöht sich die Masse des Peptids um 42.106 amu.

Das Peptid T14 aus CA ( $791.413\ m/z$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ) wurde mit H6-Ac<sub>2</sub>O bzw. D6-Ac<sub>2</sub>O modifiziert. Da das Peptid als C-terminale AS ein Lysin trägt, wurde es doppelt acetyliert. Folglich verschiebt sich das doppelt geladene Signal des Peptids im MS-Spektrum um die Masse von zwei (deutierten) Acetylgruppen, d. h. um  $42\ m/z$  bzw.  $45\ m/z$ , auf  $833.532\ m/z$  und  $836.553\ m/z$ . Die Reaktion verläuft quantitativ. Das Verhältnis von Probe (H3-Ac-Peptid) zu internem Standard (D3-Ac-Peptid) beträgt in diesem Fall 2.21:1.

Acetylierte Peptidsignale wurden häufig zusätzlich als Addukte von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>-Salzen detektiert. In diesem speziellen Fall wurden kaum Salzaddukte beobachtet. Der Grund hierfür waren wahrscheinlich die in der Sequenz vorhandenen zwei Histidine, die als Ladungsakzeptoren nach der Acetylierung dienen.

Acetylierte Peptide wurden, wie ihre unmodifizierten Vorläufer, in unterschiedlichen Ladungszuständen und als Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Addukte detektiert (Abb. 28, S. 111). Der Ladungszustand blieb von der Modifikation unberührt, obwohl die Acetylierung zum Verlust der formalen Ladungsträger in einem Peptid führte. Im Gegensatz zum unmodifizierten Peptid waren die Signale der Salzaddukte zum Teil deutlich erhöht. Eine Quantifizierung war sowohl mit den protonierten Peptidsignalen als auch mit den Signalen der Salzaddukte möglich. Im Protein CA wurde lediglich ein Peptid nahezu ohne Salzaddukte detektiert. Dabei handelte es sich um das tryptische Peptid T14, das zweimal die basische AS Histidin innerhalb seiner Sequenz enthielt. Es wurde deshalb davon ausgegangen, dass His eventuell nach dem Wegfall der Aminogruppen als Ladungsakzeptor fungierte.

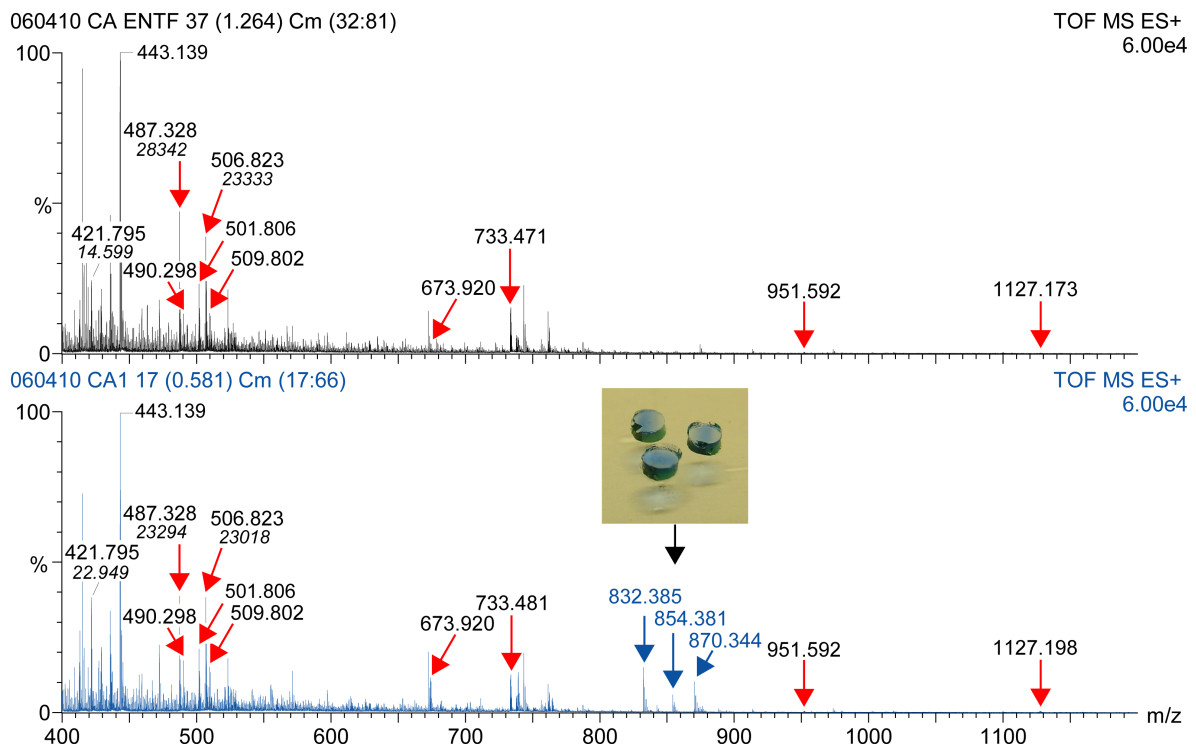
### **6.6 Optimierung des In-Gel Verdauprozesses**

Zur Optimierung des In-Gel Verdauprozesses wurden die einzelnen Schritte des konventionellen Protokolls hinsichtlich ihrer Relevanz für die Funktionalität des Gesamtprozesses untersucht.

#### **6.6.1 Entfärbung von Proteinen**

Alle konventionellen Protokolle zum In-Gel Verdau von Proteinen enthielten zu Beginn einen Entfärbeschritt, da CBB in saurer Lösung als positiv geladenes Teilchen im MS detektiert wurde. Das CBB R250 Molekül war als einfach geladenes Signal in drei Formen detektierbar. Dabei handelte es sich um die Signale des protonierten CBB-R250 bei  $804.28\ m/z$   $[M+H]^{1+}$ , sowie des Na<sup>+</sup>- bzw. K<sup>+</sup>-Addukts bei  $826.26\ m/z$   $[M+Na]^{1+}$  und  $842.23\ m/z$   $[M+K]^{1+}$ . Das Molekül von CBB-G250 enthält zusätzlich zwei Methylgruppen. Die Molekularmasse erhöht sich infolge um 28 Da. Die entsprechenden Signale traten im Massenspektrum bei  $832.31\ m/z$   $[M+H]^{1+}$ ,  $854.29\ m/z$   $[M+Na]^{1+}$  und  $870.27\ m/z$   $[M+K]^{1+}$  auf (Abb. 29, S. 113). Zusätzlich zu den Signalen des intakten Moleküls war zum Teil ebenfalls das CBB-Abbauprodukt 3-Methylbenzensulfonat detektierbar. Dabei handelte es sich um ein CBB-Fragment, das bei beiden verwendeten Arten von CBB auftrat und als Signal bei  $634.27\ m/z$   $[M+H]^{1+}$ ,  $656.26\ m/z$   $[M+Na]^{1+}$  und  $673.23\ m/z$   $[M+K]^{1+}$  detektiert wurde.

Die verwendete Entfärbelösung enthielt neben einem organischen Lösungsmittel (50% Acetonitril), 50 mM des Salzes  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  zur Reduktion der elektrostatischen Interaktionen zwischen den Farbstoffmolekülen und den positiv geladenen AS. Im Vergleich zu einem reinen Gemisch aus Wasser und organischem Lösungsmittel (1:1) wurde die Effektivität der Entfärbelösung durch den Salzanteil deutlich verbessert. Bei Auslassung des Entfärbeschrittes führte der gleiche Effekt während des Verdauprozesses vermehrt zur Freisetzung der im Gel gebundenen, proteinassoziierten CBB-Moleküle. Freigesetzte Farbstoffmoleküle wurden beim anschließenden Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt an die  $\text{C}_{18}$ -Matrix der Mikrosäule gebunden und entsprechend der Konzentration an organischem Lösungsmittel mit den Peptiden eluiert. In Abhängigkeit von Farbeintensität und Zusammensetzung des MS-Spektrums variierten das Auftreten und die Intensität der CBB-Signale deutlich. Durch die Verwendung von Tris-Base als Puffersubstanz konnte die CBB-Elution teilweise verringert werden. Nach Silberfärbung von Proteinen ergab sich kein Unterschied in der Signalzusammensetzung der MS-Spektren (Daten nicht gezeigt). Peptide mit gebundenem Ag wurden nicht detektiert.

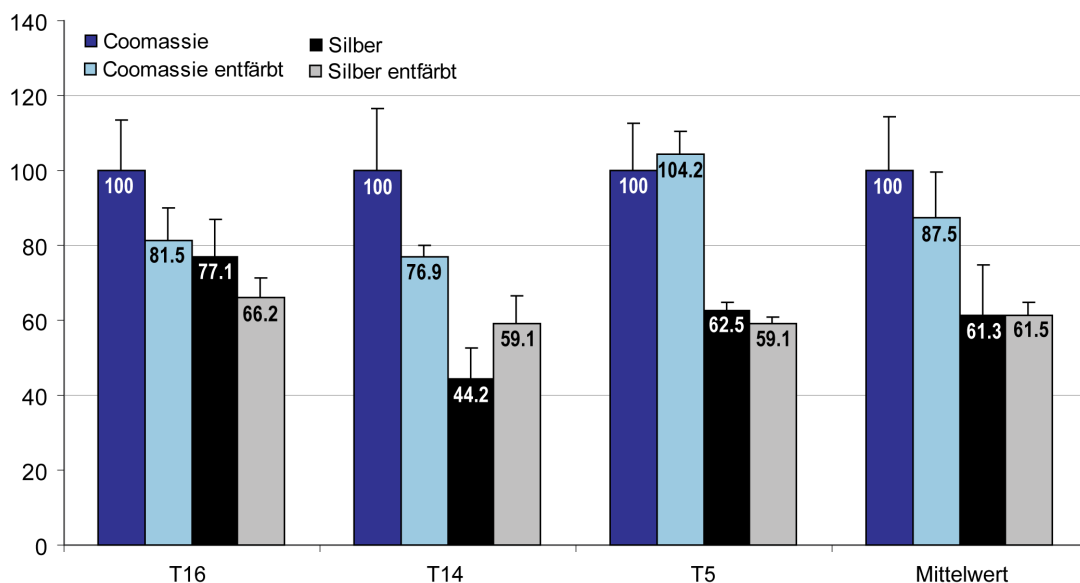


**Abb. 29: Qualitativer Vergleich von MS-Spektren mit bzw. ohne CBB-Entfärbung**

20 pmol CA wurden über SDS-PAGE getrennt und mit kolloidalem CBB gefärbt. Etwa ein Viertel der Bande (5 pmol) wurden mit (oberes Spektrum) bzw. ohne (unteres Spektrum) vorherige Entfärbung der Proteinbande tryptisch verdaut. Die resultierenden Peptidsignale sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Im Spektrum ohne Entfärbung der Bande werden zusätzlich drei Signale des Farbstoffmoleküls CBB-G250 (blaue Pfeile) detektiert. Zum Vergleich sind von jeweils drei Peptiden die Signalintensitäten (*kursiv*) angegeben.

Die MS-Spektren mit bzw. ohne vorherige Entfärbung des Zielproteins unterschieden sich lediglich im Auftreten von drei zusätzlichen Signalen für die jeweilige Form von CBB (Abb. 29, S. 113). Grundsätzlich wurde weder die Anzahl an detektierten Peptiden noch deren Signalintensität in den Spektren beeinträchtigt. Geringe Schwankungen in der Signalintensität (z. B. Peptid T21 bei 673.92  $m/z$  lagen im Rahmen für Messungen mit statischer nanoESI-MS. Die Sequenzabdeckung betrug in beiden Fällen etwa 48%. Unterschiede im bevorzugt auftretenden Ladungszustand der einzelnen Peptide ergaben sich nicht. Addukte aus Peptiden und CBB wurden ebenfalls nicht detektiert.

Zum quantitativen Vergleich von CBB- und Silberfärbung wurden die relativen Intensitäten der tryptischen Peptide T16, T14 und T5 aus CA herangezogen. Obwohl sich dabei zum Teil deutliche Unterschiede in der Ausbeute bei den einzelnen Peptiden ergaben, war im Mittel ein eindeutiger Trend feststellbar (Abb. 30; „T16“, „T14“, „T5“ und „Mittelwert“). Im Vergleich wurde die höchste Ausbeute nach Färbung der Proteine mit CBB ohne nachfolgende Entfärbung der Banden erreicht. Die im Spektrum zusätzlich detektierten Signale für CBB führten nicht zu einer Verringerung der Signalintensitäten der Analytmoleküle (Abb. 30 und Abb. 29, S. 113).



**Abb. 30: Quantifizierung der Peptidausbeute CBB- bzw. silbergefärbter Proteinbanden**

20 pmol CA wurden auf die SDS-PAGE aufgetragen, das Gel geteilt und jeweils eine Hälfte mit CBB-G250 bzw. mit Silber gefärbt. Pro Ansatz wurden ca. 5 pmol Protein aus den Banden gestochen und zum Teil entfärbt (Methoden). Der Verdau erfolgte nach dem optimierten Verdauprotokoll (OVP) in 45 min bei 50°C. Die relative Quantifizierung der Proben erfolgte nach differentieller Isotopenmarkierung der generierten Peptide mittels massenspektrometrischer Analyse.

Dargestellt sind jeweils drei Peptide (x-Achse) und der Mittelwert für CBB gefärbte Banden von CA ohne (dunkelblauer Balken) bzw. mit (hellblauer Balken) Entfärbung vor dem Verdau. Der Versuch wurde analog mit Proteinbanden nach Silberfärbung durchgeführt (schwarzer bzw. grauer Balken). Die y-Achse bezeichnet die relativen Peptidausbeuten [%] in Relation zu dem Wert, der beim Verdau CBB gefärbter Proteine ohne vorherige Entfärbung erhalten wurde. Dieser Wert wurde jeweils auf 100% normiert.



Durch Auswaschung des Proteins während des Entfärbeprozesses verminderte sich die Ausbeute bei der CBB-Entfärbung insgesamt um etwa 12% (Abb. 30, S. 114; „Mittelwert“, hellblauer Balken). Eine Erhöhung der Ausbeute nach Entfärbung von silbergefärbten Banden wurde nicht festgestellt. Unabhängig davon, ob die Proteinbande vor dem Verdau entfärbt wurde, war die Peptidausbeute nach Silberfärbung um fast 40% geringer (Abb. 30, S. 114; „Mittelwert“, schwarzer und grauer Balken). Die Implementierung eines Entfärbeschrittes in den Gesamtprozess des In-Gel Verdau war damit nach den hier erzielten Ergebnissen nicht notwendig.

### 6.6.2 Reduktion & Alkylierung der Cysteine

Zur weiteren Optimierung des In-Gel Verdau wurde der Einfluss der Reduktion & Alkylierung (R&A) von Cysteinen auf die Peptidausbeute nach enzymatischem Verdau von Proteinen untersucht. Nach der Alkylierung wurden die Cysteine als Carboxyamidomethylcystein (CAM-Cys) mit einer Masse von 160.031 Da (+57.022 Da) detektiert. Sowohl Detektierbarkeit als auch Intensität der modifizierten Peptide war in den Spektren nicht konstant. In Übereinstimmung mit Speicher et al. ergab sich bei den hier durchgeführten Versuchen keine Evidenz dafür, dass der Prozess während des In-Gel Verdau zu einer signifikanten Erhöhung der Peptidausbeute oder Sequenzabdeckung führte (Speicher et al., 2000).

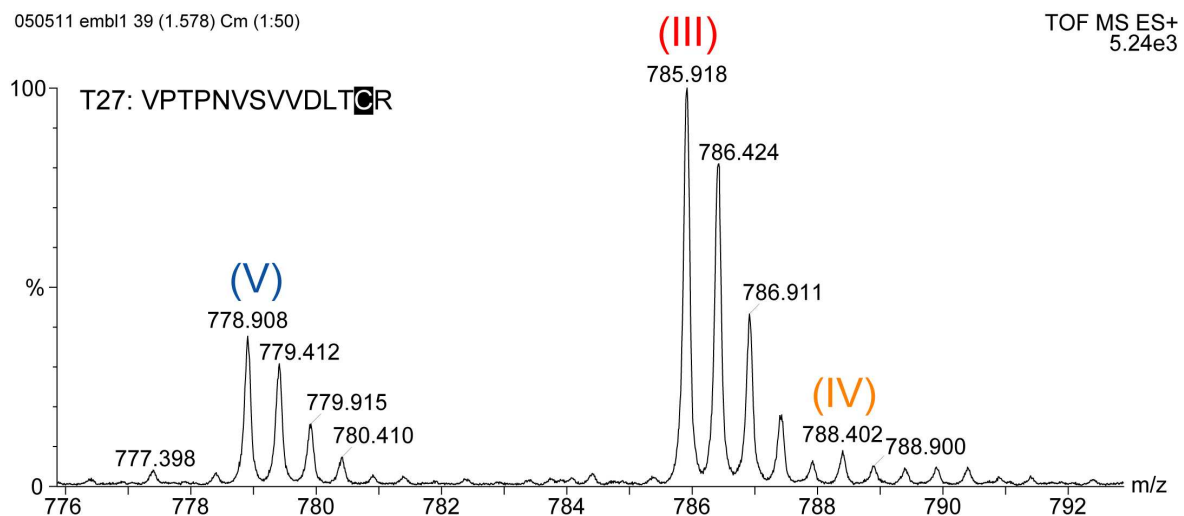
Cysteinhaltige Peptide wurden trotz fehlender R&A als Addukte von Acrylamid (PAM-Cys) bzw.  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME-Cys) detektierbar. Die Massenverschiebung betrug +71.037 Da im Fall von PAM-Cys und +75.998 Da bei ME-Cys. Die Modifikation durch Acrylamid entstand während der gelelektrophoretischen Trennung der Proteine. Grund war die unvollständige Polymerisation der Acrylamidmatrix. Die verbliebenen Monomere reagierten infolge mit den in den Proteinen enthaltenen Cysteinen. Eine Verlängerung der Polymerisationszeit verminderte zwar die Intensität der Adduktensignale, führte jedoch nicht zu einer vollständigen Hemmung der Reaktion.

Ursache der zweiten Modifikation war das Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol. Als Bestandteil des Solubilisierungspuffers für die SDS-PAGE garantierte  $\beta$ -Mercaptoethanol eine optimale Entfaltung der zu trennenden Proteine. Damit wurde eine hohe Trennschärfe, sowie eine möglichst exakte Darstellung der Molekularmasse erreicht. Während der nachfolgenden Färbe- und Waschschrte vor der MS-Analyse wurde das Reduktionsmittel wieder entfernt. Zumindest partiell war damit eine Rückbildung der Disulfidbrücken, sowohl auf intra- als auch auf intermolekularer Ebene nicht auszuschließen.

Die Oxidation zu Cysteinsäure wurde nicht beobachtet. Sie fand ausschließlich unter dem Einfluss starker Oxidationsmittel (z. B. PFA, vgl. Kapitel 6.4.5, S. 102) statt. Die Bildung von Dehydroalanin wurde ebenfalls nicht beobachtet. Die hohe Reaktivität der AS wurde dadurch deutlich, dass unter den vorliegenden Versuchsbedingungen Peptide mit der unmodifizierten Form von Cys nicht detektiert wurden. Die verschiedenen Formen von Cys führten im MS-Spektrum zu multiplen Signalen für dasselbe Peptid. Durch die Aufteilung auf unterschiedliche Signale verminderte sich gleichzeitig die Intensität der betroffenen Peptide. Infolgedessen erhöhte sich ebenfalls die Komplexität der MS-Spektren. Die Detektion Cys-haltiger Peptide war somit nur eingeschränkt möglich.

Der qualitative und quantitative Einfluss der R&A auf die Detektierbarkeit von Peptiden wurde an den Standardproteinen GAPDH und Ovalbumin untersucht.

Das Protein GAPDH enthielt im detektierbaren Massenbereich drei tryptische Peptide (T18, T27 und T34) mit insgesamt vier Cysteinen. Bei allen enthaltenen Cysteinen handelte es sich um freie Cysteine, die nicht über Disulfidbrücken verbunden waren. Das tryptische Peptid T27 aus GAPDH enthielt ein Cystein (Cys<sub>244</sub>) (Abb. 31).



**Abb. 31: Cystein-Modifikationen bei T27 aus GAPDH**

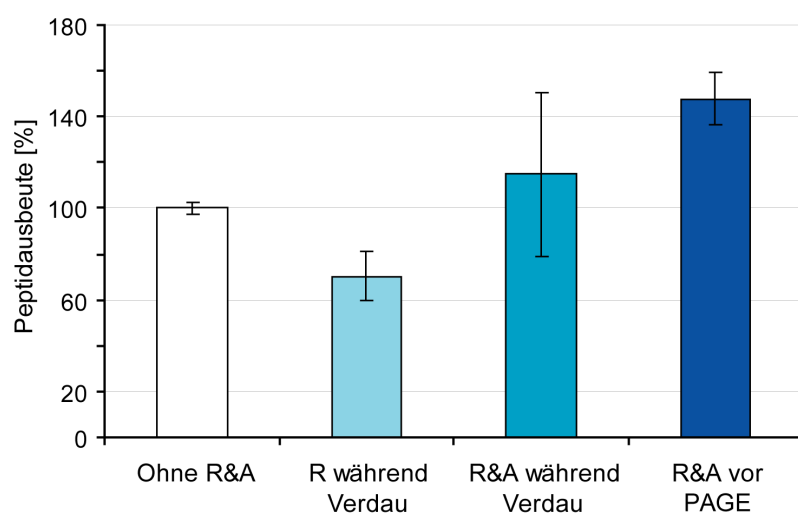
20 pmol GAPDH wurden über 1D-SDS-PAGE getrennt und die Proteinbanden mit Coomassie visualisiert. Der In-Gel Verdau erfolgte nach dem konventionellen Protokoll einschließlich Entfärbung, Reduktion und Alkylierung, sowie mehrfacher Extraktion der resultierenden Peptide. Peptide, die ein Cystein enthielten wurden in drei verschiedenen Formen detektiert. Der Ausschnitt des MS-Spektrums zeigt das Peptid T27 aus GAPDH. Das Signal bei 778.90 m/z enthält das Cysteinderivat CAM-Cys (V). Die Modifikation resultierte aus einem Alkylierungsschritt, der in einem Teil der Protokolle zum In-Gel Verdau durchgeführt wird. Unabhängig davon wurde T27 zusätzlich in zwei weiteren Formen detektiert. Cystein lag dabei als PAM-Cys (III, 785.91 m/z) bzw. als ME-Cys (IV, 788.41 m/z) vor. Beide Modifikationen wurden während der PAGE eingeführt. Das Verhältnis der gezeigten Signalintensitäten (y-Achse) variierte in verschiedenen Proben. Die zugehörigen Moleküle sind in Abb. 9, S. 44 abgebildet.

Die Berechnung der Molekularmasse ergab einen Wert von 750.40 m/z für das zweifach geladene Peptid. Da die AS Cystein in unmodifizierter Form nicht vorkam, wurde das Peptid in maximal drei Formen, jeweils mit unterschiedlicher Modifikation des enthaltenen Cys

detektiert. Wurde während des In-Gel Verdau eine R&A durchgeführt, lag ein Teil des Peptids nach der chemischen Modifikation mit Iodacetamid als Carboxyamidomethylcystein-Derivat vor (Abb. 31, S. 116, (V)). Daneben wurde das Peptid in zwei weiteren Formen detektiert, als PAM-Cys und als ME-Cys (Abb. 31, S. 116, (III + IV)). Wurde kein zusätzlicher Alkylierungsschritt durchgeführt, wurde das Peptid ausschließlich in den Formen (III) und (IV) detektiert. Analoge Beobachtungen ergaben sich für das Peptid T34 (Cys<sub>281</sub>) aus GAPDH. Die Ausnahme bildete das Peptid T18, das zwei Cysteine (Cys 149 und Cys 153) in nur 3 AS Abstand enthielt. Die beiden Cysteine wurden hier nach der Ausbildung einer Disulfidbrücke *in vitro* als Cystin detektiert. Folglich ergab sich für T18 eine Masse von 852.42  $m/z$   $[M+2H]^{2+}$ , 2 Da weniger als mit unmodifizierten Cysteinen. Alle Modifikationen wurden in MSMS-Experimenten bestätigt.

Um eine quantitative Aussage zum Einfluss der R&A auf die Peptidausbeute treffen zu können, wurde als zweites Substrat das Standardprotein Ovalbumin untersucht. Dieses enthielt neben vier freien Cysteinen eine Disulfidbrücke zwischen Cys<sub>74</sub> und Cys<sub>121</sub>. Die Quantifizierung der Peptidausbeute erfolgte anhand von drei tryptischen Peptiden nach Verdau von 5 pmol Ovalbumin. Es handelte sich dabei um die Peptide T25 (LTEWTSSNVMEER), T14 (GGLEPINFQTAADQAR) und T32, (ISQAVHAAHAEINEAGR). Das Peptid T25 wurde zusätzlich mit einer Modifikation der AS Met detektiert. Zur Auswertung wurden folglich die Signalintensitäten beider Formen des Peptids addiert.

Die Ausbeute nach Verdau ohne R&A wurde als Referenz festgelegt und auf 100% normiert (Abb. 32, weißer Balken). Die Durchführung der Reduktion während des enzymatischen Verdau durch den Zusatz von 5 mM DTT als Reduktionsreagenz verminderte die Peptidausbeute auf durchschnittlich etwa 70% (Abb. 32, hellblauer Balken).



**Abb. 32: Optimierung der Peptidausbeute von Cystinhaltigen Proteinen**

20 pmol Ovalbumin wurden über SDS-PAGE getrennt und mit kolloidalem CBB gefärbt. Etwa ein Viertel der Bande (5 pmol) wurde nach Entfärbung der Proteine tryptisch verdaut. Die relative Quantifizierung der Proben erfolgte nach differentieller Isotopenmarkierung der generierten Peptide mittels massenspektrometrischer Analyse. Auf der y-Achse ist die Peptidausbeute in Prozent (%) in Abhängigkeit von einem

Referenzwert aufgetragen, bei dem keine R&A durchgeführt wurde (weißer Balken). Bei einem Teil der Proben wurde lediglich eine Reduktion der Cysteine während des Verdauprozesses durchgeführt (hellblauer Balken). Die verbleibenden Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Probenvorbereitung reduziert und alkyliert. Der R&A-Schritt fand dabei vor der SDS-PAGE (dunkelblauer Balken) bzw. während des In-Gel Verdaus (mittelblauer Balken) statt.

Gleichzeitig war die Intensität der Eigenverdausignale der Protease deutlich erhöht (Daten nicht gezeigt). Der Zusatz von DTT führte folglich nicht nur beim denaturierten Zielprotein, sondern auch bei der nativen Protease zumindest teilweise zum Aufbrechen der Disulfidbrücken. Die geringere Ausbeute an Peptiden war somit ein Resultat der teilweisen Hemmung der Protease. Dieser Anteil wurde damit gleichzeitig in erhöhtem Maße zugänglich für den Eigenverdau.

Wurde die R&A während des In-Gel Verdauprozesses durchgeführt, lag die Peptidausbeute durchschnittlich bezüglich der Referenz um etwa 15% höher (Abb. 32, S. 117; mittelblauer Balken). Dabei ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede in der Ausbeute der einzelnen Peptide. Im Vergleich war die Ausbeute von T25 deutlich, die von T32 nur leicht erhöht. Im Gegensatz dazu wurde T14 in geringerem Umfang detektiert. Die inhomogene Ausbeute für die einzelnen Peptide erklärte die Höhe des Fehlerbalkens. Ein ursächlicher Zusammenhang mit der Lage der Disulfidbrücke konnte nicht festgestellt werden.

Eine homologe Erhöhung der Ausbeuten für die einzelnen Peptide ergab sich nach Durchführung der R&A vor der SDS-PAGE. Im Vergleich zur Referenz stieg der Wert um etwa 50% (Abb. 32, S. 117; dunkelblauer Balken). Eine teilweise Rückfaltung der Proteine, während und nach der elektrophoretischen Trennung, wurde durch den frühen Zeitpunkt der Alkylierung verhindert. Dies ermöglichte eine optimale Zugänglichkeit der Schnittstellen für die Protease während des In-Gel Verdaus. Trotz zum Teil deutlicher Erhöhung der Signalintensitäten wurden bei Durchführung des R&A-Schrittes keine zusätzlichen Peptide detektiert. Cysteinhaltige Peptide waren bei der eingesetzten Proteinmenge von 5 pmol ebenfalls nicht detektierbar. Bei Proteinen ohne Disulfidbrücken (z. B. GAPDH) wirkte sich die R&A nicht auf die Peptidausbeute aus (Daten nicht gezeigt).

### **6.6.3 In-Gel Verdau**

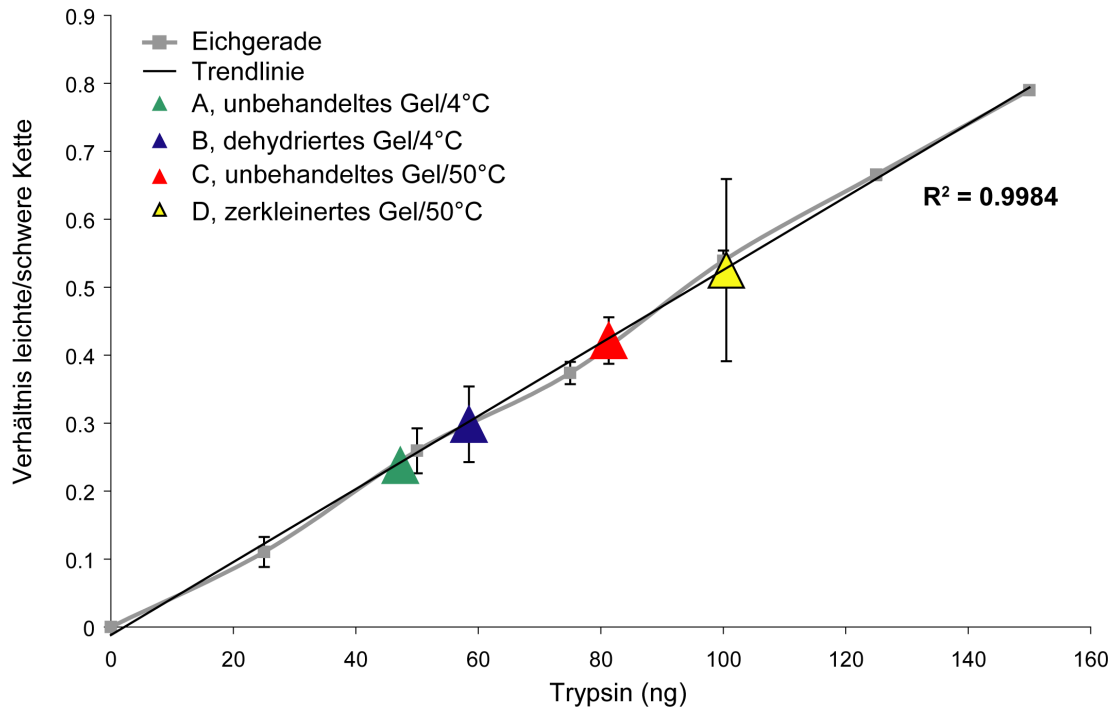
#### *6.6.3.1 Effizienz der Absorption von Trypsin von der Gelmatrix*

Während bzw. vor der Färbung wurden die elektrophoretisch getrennten Proteine im Gel fixiert. Um den In-Gel Verdau zu realisieren, musste die Protease folglich in die Gelmatrix eindringen. Dabei stellte sich die Frage, welche Menge an Trypsin innerhalb einer festgelegten Inkubationszeit, von einem definierten Volumen an Acrylamidmatrix („Gelbande“) aufgenommen wird und damit der Reaktion zur Verfügung steht. In diesem

Zusammenhang wurden der Einfluss der Dehydrierung des Gels, die Erhöhung der Oberfläche und/oder Temperatur, sowie eine Zerkleinerung der Gelmatrix auf die Absorption des Enzyms untersucht.

Zu diesem Zweck wurden zwei Gelstücke mit einem Volumen von ca. 4 µl in 20 µl einer sauren Lösung mit einer Konzentration von 10 ng/µl Trypsin inkubiert. Die eingesetzte Gesamtmenge an Enzym betrug 200 ng. Voraussetzung für das Experiment war, dass Trypsin bei einem pH-Wert von < 4 (hier 2.5) reversibel inhibiert wird. Nach einer Inkubationszeit von 30 min unter verschiedenen Bedingungen wurde der Überstand abgenommen und anschließend die darin verbliebene Menge an Trypsin quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte nach Autolyse des Enzyms in Lösung. Eines der Autolyseprodukte, das Peptid „VATVSLPR“, wurde nach Acetylierung der N-terminalen Aminogruppe massenspektrometrisch analysiert. Nach H3-Acetylierung wurde das unacetyliert bevorzugt doppelt geladene Peptid ausschließlich als  $[M+H]^{1+}$  bei 884.624  $m/z$  detektiert. Das korrespondierende D3-acetylierte Signal war um 3 Da zu den höheren  $m/z$ -Werten verschoben. Die Trypsinmenge der einzelnen Proben berechnete sich aus dem Verhältnis der relativen Signalintensitäten des Autolyseproduktes in Probe und Referenz. Die Differenz zwischen der Ausgangsmenge und der in Lösung verbliebenen Menge an Trypsin repräsentierte die Menge an Enzym, die vom Gel absorbiert wurde. Etwa 5% der Gesamtmenge an Trypsin lag dabei bereits verdaut im Lyophilisat vor, das vom Hersteller geliefert wurde. Da diese Menge in Referenz und Probe äquivalent war, wurde sie bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Multiple Einfrier- und Auftauzyklen der Enzymlösung führten nicht zur signifikanten Änderung der Menge an abgebautem Enzym.

Die Genauigkeit der Methode wurde über die Quantifizierung des Peptides „VATVSLPR“ nach Autolyse verschiedener Trypsinmengen (50-200 ng in 25 ng Schritten) bei gleicher Inkubationszeit evaluiert. Das Verhältnis der Signalintensitäten von Probe zu internem Standard wurde dabei gegen die Trypsinmenge aufgetragen, die zur Autolyse eingesetzt wurde. Die daraus ermittelte Kurve zum Abbau von Trypsin folgte dabei einer Reaktion 1. Ordnung. Über den untersuchten Bereich ergab sich eine Gerade. Die aus den Daten berechnete Trendlinie wurde durch die Gleichung  $y = 0.0054 * x^2 + 0.0625$  mit einem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0.9984 definiert (Abb. 33, S. 120).



**Abb. 33: Quantifizierung der Enzymdiffusion in die Gelmatrix**

Untersucht wurde der Prozess der Enzymabsorption von der Acrylamidmatrix eines SDS-Geles. 200 ng Trypsin wurden dazu bei unterschiedlichen Bedingungen mit einer definierten Menge an „leerem“ Gel inkubiert. Nach 30 min wurde der Überstand abgenommen und das darin verbliebene Enzym bei 60°C autolysiert. Das Verhältnis der relativen Signalintensität des Peptids „VATVSLPR“ von Probe und Referenz wurde aufgetragen gegen die absolute Menge (in ng) an Trypsin, die ins Gel diffundiert war.

Um die Autolyse von unterschiedlichen Mengen an Trypsin in Lösung darzustellen, wurde eine Eichgerade erstellt. Die Genauigkeit der Eichgerade wurde mit  $R^2 = 0.9984$  bestimmt. Der Einfluss der Temperatur in Kombination mit dem Zustand der Gelmatrix auf die Aufnahme der Protease Trypsin wurde untersucht. Die einzelnen Datenpunkte resultieren aus der Absorption von Trypsin in unbehandelte Gelmatrix bei 4°C (A), dehydrierte Gelmatrix bei 4°C (B), unbehandelte Gelmatrix bei 50°C (C) und zerkleinerte Gelmatrix bei 50°C (D).

Konventionelle Protokolle zum In-Gel Verdau beinhalten vor der Zugabe der proteasehaltigen Pufferlösung einen Dehydrierungsschritt des Gels. Die Methode antizipierte eine verbesserte Aufnahme der Protease ins Gel im Zuge der Rehydrierung. Gleichzeitig wurde zur Begrenzung des Eigenverdaus, nach einer Inkubationszeit von 30-45 min auf Eis, die Protease wieder aus dem Überstand entfernt. Folglich stand lediglich die Menge an Enzym, die während dieser Zeit ins Gel gelangt war, letztlich für den Verdau zur Verfügung. Zunächst war die Frage zu klären, wie viel Trypsin unter diesen Bedingungen ins Gel gelangte. Die leeren Gelstücke wurden dazu in der Trypsinlösung für 30 min bei 4°C inkubiert. Die anschließende quantitative Analyse des Überstandes ergab, dass 153 ng Trypsin in der Lösung verblieben waren (Abb. 33, Datenpunkt A). Folglich wurden etwa 47 ng vom Gel aufgenommen, etwa  $\frac{1}{4}$  der eingesetzten Menge von 200 ng.

In einem zweiten Experiment wurde die Diffusionsabhängigkeit des Prozesses untersucht. In diesem Versuch wurden dehydrierte Gelstücke verwendet. Die Analyse ergab, dass 59 ng

Trypsin vom Gel absorbiert wurden (Abb. 33, Datenpunkt B, S. 120). Somit wurden zusätzlich etwa 10% mit dem gerichteten Fluss der Pufferlösung ins dehydrierte Gel transportiert. Das Ergebnis wies darauf hin, dass die Aufnahme der Protease ins Gel zu etwa 80% diffusionsbedingt ist. Die Dehydrierung unterstützte somit den Prozess, war aber nicht entscheidend für die Aufnahme der Protease ins Gel.

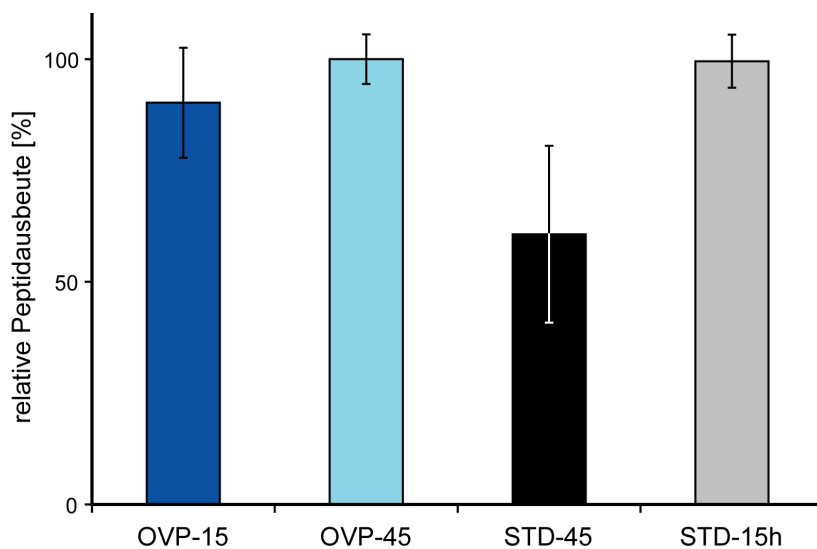
Durch Erhöhung der Temperatur und Vergrößerung der Oberfläche konnte die Menge an Enzym, die vom Gel absorbiert wurde weiter gesteigert werden. Nach Inkubation bei 50°C verblieben ca. 119 ng Trypsin in Lösung. Daraus folgte, dass etwas mehr als 80 ng ins Gel diffundiert waren (Abb. 33, Datenpunkt C, S. 120). Damit erhöhte sich die Enzymkonzentration im Gel auf etwa 41%. Die Kombination von erhöhter Temperatur und Vergrößerung der Oberfläche durch mechanische Zerkleinerung der Gelmatrix führte schließlich zur Absorption von ca. 100 ng (50%) an Enzym (Abb. 33, Datenpunkt D, S. 120). Die Bedingungen in Experiment D führten somit zu einer um 20% verbesserten Enzymaufnahme ins Gel.

### *6.6.3.2 Abhängigkeit der Enzymreaktion von Konzentration und Temperatur*

Bei empirischen Versuchen mit einer Vielzahl verschiedener Proteine wurde eine Inkubationszeit von maximal 45 min als ausreichend für den In-Gel Verdau ermittelt. Um diese Daten quantitativ zu bestätigen wurden 10 pmol CA mit unterschiedlichen Inkubationszeiten verdaut. Zur relativen Quantifizierung wurden die tryptischen Peptide T17, T14 und T5 aus CA herangezogen. Ein Teil der Proben wurde nach dem optimierten Verdauprotokoll (OVP) in 15 bzw. 45 min verdaut (Abb. 34, S. 122, OVP-15 und 45). Um die Vollständigkeit des Prozesses zu überprüfen, wurde zum Vergleich das konventionelle In-Gel Verdauprotokoll herangezogen, bei dem der Verdauprozess über Nacht (mind. 12 h) durchgeführt wird. Die zugesetzte Trypsinmenge betrug in beiden Protokollen 200 ng. Im konventionellen Verdau stand jedoch lediglich ein Teil dieser Menge zur Verfügung. Es handelte sich dabei um den Anteil, der vor dem Start der Reaktion ins Gel diffundiert war. Wie im Protokoll vorgesehen, wurde der in Lösung verbleibende Rest an Enzym entfernt. Die relative Quantifizierung der Peptidausbeuten erfolgte wie in den Kapiteln 5.6, S. 57 und 6.5, S. 109 beschrieben.

Der 45 min dauernde Verdau nach dem OVP wurde auf 100% normalisiert (Abb. 34, S. 122, OVP-45). Bereits nach 15 min bei 50°C waren 90% des Proteins in Peptide gespalten und aus der Gelmatrix herausgelöst (Abb. 34, S. 122, OVP-15). Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 45 min führte zum vollständigen Verdau aller für die Protease zugänglichen Proteine. Die resultierenden Peptide wurden im Verdauopuffer gelöst. Zur Überprüfung der Vollständigkeit

der Reaktion wurden die Peptidausbeuten mit dem konventionellen Verdauprotokoll verglichen, bei dem der Verdau über Nacht (hier: 15 h) bei 37°C durchgeführt wurde (Abb. 34, STD-15 h). Trotz einer 20-fachen Verlängerung der Inkubationszeit, waren die Peptidausbeuten in beiden Fällen äquivalent. Wurde die Inkubationszeit im konventionellen Protokoll auf 45 min verringert, wurde nur noch eine Ausbeute von etwa 60% erreicht (Abb. 34, STD-45). Die Unvollständigkeit der Reaktion wurde in den beiden Ansätzen mit verkürzten Inkubationszeiten (OVP-15 und STD-45) durch die stärkeren Schwankungen der Einzelwerte unterstrichen (Abb. 34, Fehlerbalken). Die Anhebung der Temperatur, sowie die Erhöhung der Enzymkonzentration, führte somit zu einer drastischen Reduktion der Inkubationszeit. Im OVP waren die Proteine bereits nach 45 min quantitativ abgebaut.



**Abb. 34: Effizienz des tryptischen Verdau**

Proteinbanden mit 10 pmol CA wurden nach SDS-PAGE ausgeschnitten und mit dem konventionellen (STD) bzw. optimierten Protokoll (OVP) tryptisch verdaut. Die relative Quantifizierung der Proben erfolgte nach differentieller Isotopenmarkierung der generierten Peptide mittels massenspektrometrischer Analyse. Dargestellt sind die relativen Peptidausbeuten in % (y-Achse) nach dem OVP mit Inkubationszeiten von 15 (dunkelblauer Balken) und

45 min (hellblauer Balken). Die Peptidausbeute nach Verdau für 45 min nach dem OVP wurde auf 100% normalisiert. Zum Vergleich wurde die relative Peptidausbeute von analogen Proben ermittelt, die mit dem konventionellen Verdau prozessiert worden waren. Die Inkubationszeiten betragen hier 45 min (schwarzer Balken) und 15 h (grauer Balken).

Die Substratspezifität der Protease wurde dabei nicht beeinflusst. Im Vergleich zum konventionellen Verdau stieg jedoch die Zahl der nicht berücksichtigten Schnittstellen. Dominante Signale fehlgeschnittener Peptide stammten hierbei aus Sequenzabschnitten mit einer Schnittstellen-Dopplung (z. B. Arg-Arg), Sequenzabschnitten die kurze Peptide (Di- oder Tripeptide) einschlossen oder Sequenzabschnitten, bei denen sich direkt benachbart bzw. in unmittelbarer Umgebung der Schnittstelle saure AS (Asp, Glu) befanden. Alle anderen Schnittstellen wurden in gleichem Umfang bedient, wie beim konventionellen Verdau. Dies führte partiell zu komplexeren MS-Spektren. Gleichzeitig stieg die Sequenzabdeckung, da die Detektion kurzer Peptide (< 5 AS) ausschließlich auf der Basis der nicht berücksichtigten Schnittstelle, im Verbund mit einem längeren Peptid möglich war.



#### 6.6.4 Multiple Extraktionsschritte

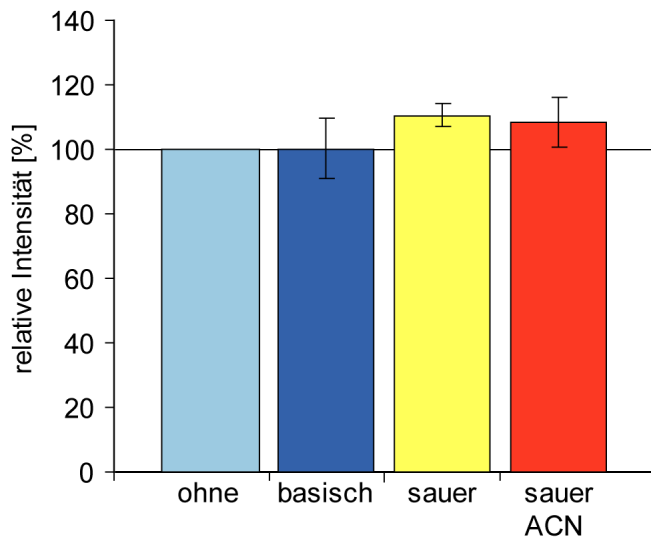
Um den Einfluss zusätzlicher Extraktionsschritte auf die Detektierbarkeit von Peptiden zu untersuchen, wurden 20 pmol GAPDH tryptisch verdaut und die entstandenen Peptide über *offline* nanoESI-MS analysiert. Im konventionellen Protokoll zum In-Gel Verdau werden zwei zusätzliche Extraktionsschritte durchgeführt, um eine optimale Peptidausbeute zu gewährleisten. Grundsätzlich werden basische Peptide unter sauren Bedingungen extrahiert und umgekehrt. Im Fall von GAPDH hatten lediglich 25% der Peptide ihren isoelektrischen Punkt im Basischen, mit Werten zwischen 8 und 11.

Beim OVP wurden ausschließlich Peptide detektiert, welche während des Verdaus im Basischen (pH ~ 8.0) in den Verdaupuffer diffundieren. Verdaupuffer und Extraktionslösung für die (sauren) Peptide waren folglich identisch. Zusätzliche Extraktionsschritte wurden beim OVP nicht durchgeführt. Trotz fehlender saurer Extraktion wurden bei der anschließenden MS-Analyse sowohl basische als auch saure Peptide gleichermaßen detektiert. Ein genereller Verlust der basischen Peptide nach dem Wegfall der sauren Extraktion wurde somit ausgeschlossen.

Um den Einfluss eines zusätzlichen (sauren) Extraktionsschrittes zu untersuchen, wurde im Anschluss an das OVP, nach der Trennung von Gel und Verdaupuffer, eine weitere Extraktion in je 20 µl Verdaupuffer (50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH ~ 8.0) bzw. 5% FA (pH ~ 1.8) durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss des Quellungszustandes der Gelmatrix auf die Extraktion durch Zugabe von ACN untersucht, das in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer (partiellen) Dehydrierung des Gels und damit zu einer Strukturänderung der Gelmatrix führt. Die saure Extraktion erfolgte hierbei unter Zusatz von 50% ACN.

Zur Ermittlung der Peptidausbeute über die Signalintensitäten wurden vier Peptide ausgewählt, die in allen Proben vorhanden waren. Dabei hatten zwei Peptide ihren *pI* im Basischen (T23, *pI* 8.75 und T2, *pI* 9.72), die anderen zwei im Sauren (T33, *pI* 6.0 und T25, *pI* 5.97). Die Ausbeute wurde für die vier untersuchten Peptide bei Durchführung eines zusätzlichen Extraktionsschrittes nicht wesentlich gesteigert. Auch eine Korrelation zwischen dem *pI* der Peptide und dem pH-Wert der Extraktionslösung konnte nicht beobachtet werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Speicher et al. lag die Erhöhung der Ausbeute lediglich bei maximal ~ 10% (Speicher et al., 2000).

Im Durchschnitt wurden nach nanoLC-MS-Analyse von 20 fmol GAPDH beim OVP ohne zweite Extraktion 5.3 Peptide detektiert. Dies entsprach einer Sequenzabdeckung von fast 14%. Der OVP wurde als Referenz ausgewählt und das Ergebnis auf 100% normiert (Abb. 35, S. 124; hellblauer Balken).



**Abb. 35: Einfluss eines zusätzlichen Extraktionsschrittes auf die Peptidausbeute**

20 fmol GAPDH wurden nach In-Gel Verdau über nanoLC-MS analysiert. Auf der y-Achse ist der Mittelwert aus den relativen Signalintensitäten von vier resultierenden Peptiden in % angegeben. Die Peptidausbeute nach dem OVP (Referenz) wurde auf 100% normiert (hellblauer Balken). In Relation dazu sind die Peptidausbeuten nach Durchführung eines zusätzlichen basischen (dunkelblauer Balken), sauren (gelber Balken) und sauren Extraktionsschrittes mit einem Anteil an organischem Lösungsmittel (hellroter Balken) dargestellt.

Obwohl die basische Extraktion im Mittel nicht zu einer Steigerung der Ausbeute bei den untersuchten vier Peptiden führte (Abb. 35, dunkelblauer Balken), wurde hier mit durchschnittlich 7.0 Peptiden die größte Anzahl unterschiedlicher Peptide detektiert. Die Sequenzabdeckung betrug dabei ca. 18%. Eine zweite Extraktion führte somit nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung der Ausbeute, ermöglichte jedoch die Detektion von zusätzlichen Peptiden, die sich ohne weitere Extraktion unterhalb der Detektionsgrenze befanden. Analog dazu wurden mit 6.5 Peptiden und 17.5% Sequenzabdeckung bei der sauren Extraktion mit 5% FA ähnliche Werte erreicht. Mit ca. 110% wurde hier die höchste Ausbeute für die vier untersuchten Peptide erzielt (Abb. 35, gelber Balken). Qualitativ ergab die massenspektrometrische Analyse eine ähnliche Peptidzusammensetzung bei basisch bzw. sauer extrahierten Proben.

Die Zugabe von ACN führte zu einer (teilweisen) Dehydrierung der Gelstücke. Dabei stellte sich die Frage, ob im Zuge des gerichteten Flüssigkeitstransports aus dem Gel die Extraktion von Peptiden begünstigt wird. Obwohl mit ca. 8% eine leichte Verbesserung der Ausbeute zu beobachten war (Abb. 35, hellroter Balken), führte der Zusatz von ACN im Vergleich zu einer Erniedrigung der Anzahl an detektierten Peptiden. Mit einer Peptidanzahl von 5.0 und einer Sequenzabdeckung von ca. 14% lagen die mit einem Gemisch aus FA und ACN nachextrahierten Proben im Rahmen der Referenz, bei der kein zusätzlicher Extraktionsschritt durchgeführt wurde.

### 6.6.5 Validierung des OVP an Membranproteinen von PSII

Nachdem die Einzelschritte des OVP erfolgreich an verschiedenen Standardproteinen getestet worden waren, erfolgte die Validierung des Gesamtverfahrens an sechs MP aus dem Reaktionszentrum von PSII. Dazu wurden die Proteinkomplexe aus der Thylakoidmembran von Gerstenchloroplasten über 2D- (BN/SDS) PAGE aufgetrennt und die Einzelproteine mit CBB-R250 visualisiert. Aus den separierten Proteinkomplexen wurde das Monomer des RCII-Kernkomplexes von PSII ausgewählt. Der Komplex, der in der BN-PAGE bei etwa 280 kDa lokalisiert wurde, zerfiel in der 2. Dimension in sechs im Gel detektierbare UEn. Es handelte sich dabei um die Genprodukte *psbA-F*. Das ebenfalls zum Komplex gehörende Genprodukt von *psbI* enthielt nach tryptischer Spaltung keine detektierbaren Peptide und war damit für den Versuch nicht geeignet. Aus jeder der sechs Proteinbanden wurden zwei Gelstücke mit jeweils 2.5 µl Volumen entnommen. Die enthaltenen Proteine wurden anschließend nach dem konventionellen bzw. dem optimierten Protokoll zum In-Gel Verdau prozessiert. Im Bezug auf die Sequenzabdeckung wurden, mit Ausnahme der Genprodukte von *psbB* und *psbE*, mit beiden Methoden ähnliche Ergebnisse erzielt (Tabelle 6).

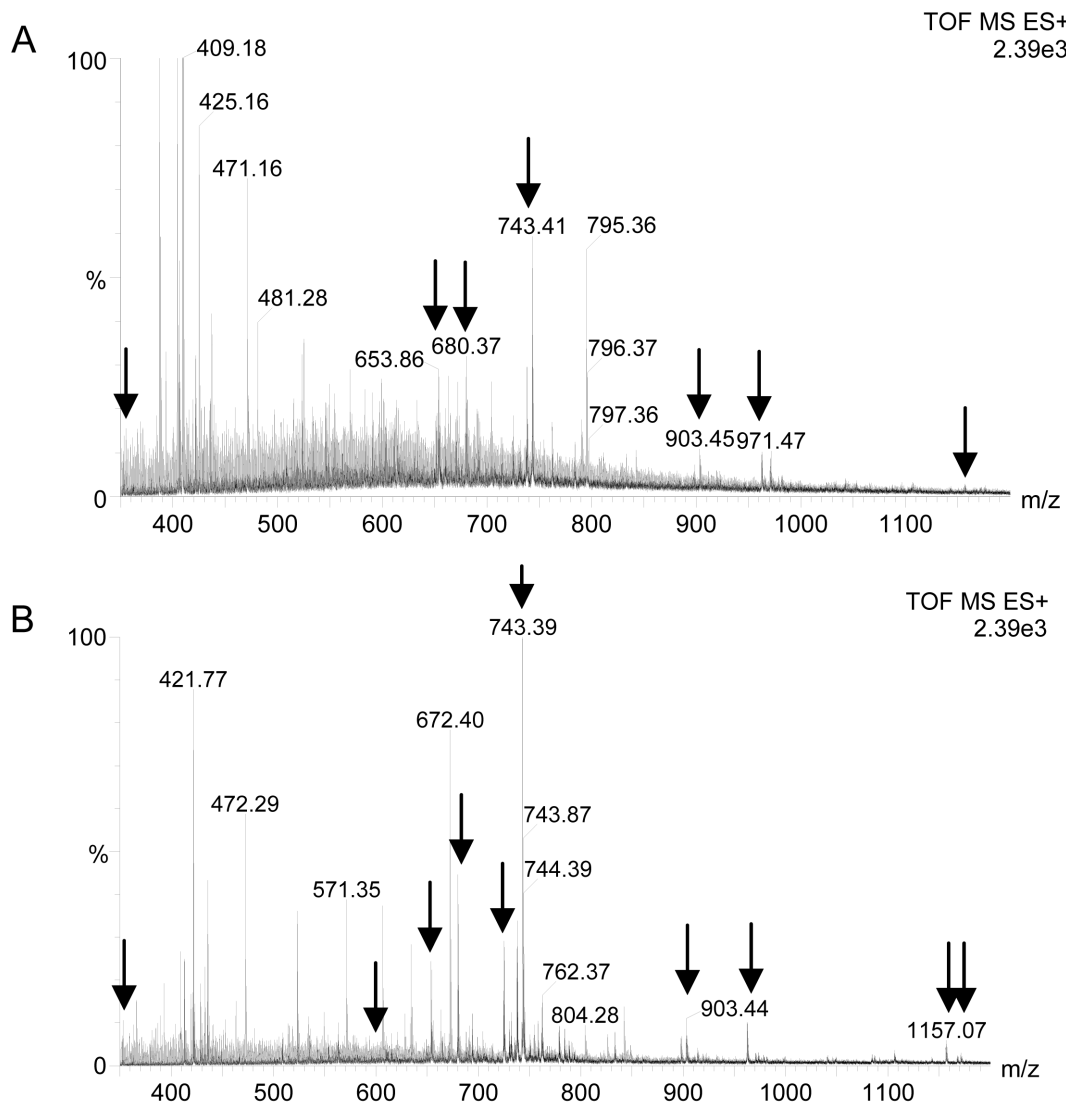
**Tabelle 6: Vergleich der Sequenzabdeckungen von sechs Untereinheiten des RCII aus Gerste nach Prozessierung mit unterschiedlichen Verdauprotokollen**

Protein	Gen	Acc. Nr./ Datenbank	Anzahl TMD	Masse [kDa]/ Sequenzlänge [AS]	Sequenzabdeckung [%] konv./OVP
CP47	<i>psbB</i>	P10900/SwissProt	6	56.1/508	22.4/30.7
CP43	<i>psbC</i>	P11095/SwissProt	6	52.1/473	24.5/26.0
D1	<i>psbA</i>	P05337/SwissProt	5	38.9/353	27.5/27.8
D2	<i>psbD</i>	P11849/SwissProt	5	39.6/353	22.0/22.0
Cytochrome b <sub>559</sub> - alpha chain	<i>psbE</i>	P05169/SwissProt	1	9.3/82	48.8/37.8
Cytochrome b <sub>559</sub> - beta chain	<i>psbF</i>	P60126/SwissProt	1	4.4/38	21.0/21.0

Die UEn des monomeren RCII wurden mit dem konventionellen bzw. optimierten Protokoll zum In-Gel Verdau prozessiert. Die Spalten beinhalten Angaben zu Proteinnamen, Genbezeichnung und Datenbankidentifikationsnummer, Anzahl TMD, Molekularmasse und Anzahl AS, sowie der mit den beiden Methoden erreichten Sequenzabdeckung.

Die maximal erreichte Sequenzabdeckung betrug knapp 50%, da alle untersuchten Vertreter mindestens eine TMD besaßen und Peptide aus diesen Regionen nicht detektiert wurden. Der Verdau von PsbE lieferte beim konventionellen Protokoll ein zusätzliches Peptid, das aus der Spaltung einer Arg-Pro-Bindung resultierte. Diese Schnittstelle wird in der Regel vom Enzym nicht prozessiert. Aufgrund der langen Inkubationszeit wurde die Bindung allerdings zu einem gewissen Grad gespalten. Die höhere Sequenzabdeckung im Fall von PsbB nach dem OVP resultierte aus den höheren Signalintensitäten, die nach Verdau mit dem OVP erzielt

wurden (Abb. 36). Neben intensiveren Peptidsignalen zeigte das nach dem OVP aufgenommene Spektrum ebenfalls ein deutlich verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis.



**Abb. 36: Vergleich des konventionellen und optimierten In-Gel Verdauprotokolls am Beispiel von CP47 aus Gerste**

Isolierte Membranproteinkomplexe aus Gerstenthylakoiden wurden über 2D-(BN/SDS)-PAGE getrennt und die Einzelproteine anschließend über CBB-Färbung visualisiert (vgl. Abb. 12, S. 74). Aus der Bande des Proteins CP47 (*psbB*, IIb), das zu den inneren Antennen von PSII gehört, wurden zwei identische Proben entnommen und mit dem konventionellen bzw. dem hier entwickelten Protokoll zum In-Gel Verdau prozessiert. Beide Proben wurden über RP-Mikrosäulen entsalzt, in 4  $\mu$ l Spraylösung eluiert und über *offline* nanoESI-MS analysiert. Die resultierenden MS-Spektren zeigen den konventionellen (A) und den optimierten Verdau (B). Im Spektrum ist das Verhältnis Masse zu Ladung ( $m/z$ ) gegen die relative Signalintensität aufgetragen. Zum direkten Vergleich wurden beide Spektren auf das intensivste Signal in Spektrum B normiert. Das Signal bei 743.39  $m/z$  repräsentiert ein Peptid aus CP47. In beiden Spektren sind die Signale markiert, die dem CP47-Protein zugeordnet werden konnten (schwarze Pfeile).

## 7 Diskussion

### *7.1 Im monomeren und dimeren PSII-Subkomplex nicht detektierte niedermolekulare UEn*

Einige der niedermolekularen UEn aus PSII konnten massenspektrometrisch weder nach tryptischem Verdau noch auf Ebene des Gesamtproteins detektiert werden. Es handelte sich dabei um die Genprodukte von *psbJ*, *psbZ*, *PsbR* und *PsbW*. Zumindest die letzten drei sollten auf Ebene des monomeren bzw. dimeren PSII-Subkomplexes bereits am Komplex assoziiert sein.

Die Existenz des kernkodierten Proteins PsbW in den verschiedenen PSII-(Sub)komplexen wird aufgrund kontroverser Ergebnisse bereits seit langem diskutiert. Das etwa 6 kDa schwere Protein, das nur in Grünalgen und höheren Pflanzen vorkommt, wurde von mehreren Forschungsgruppen bereits auf der Ebene des RCII (Irrgang et al., 1995; Szabo et al., 2001) bzw. im RC47-Monomer (Zheleva et al., 1998) immunologisch nachgewiesen. Die Existenz von PsbW im Etioplasten und ein Expressionsmuster, das mit dem anderer im Stadium der Ergrünung gebildeter Proteine (z. B. der Genprodukte von *psbE* und *psbF*) übereinstimmt, sind ein Indiz für den Einbau von PsbW zu einem frühen Zeitpunkt der Assemblierung (Lorkovic et al., 1995). In der eigenen Arbeitsgruppe wurde PsbW nach BN/SDS-PAGE immunologisch lediglich im monomeren und im dimeren PSII-Subkomplex nachgewiesen, wobei der Hauptanteil des Proteins auf Ebene des dimeren Komplexes lag (unveröffentlichte Ergebnisse; (Bisle, 2000)). Der Umstand das PsbW nicht in der Gruppe der „freien“ Proteine detektiert wurde, weist dabei auf eine enge Bindung des Proteins an die anderen Untereinheiten des PSII-Komplexes, sowie auf die native Präparationsmethode hin.

Neuere Untersuchungen deuten auf eine Assemblierung von PsbW auf der Ebene des dimeren PSII-Subkomplexes hin (Shi et al., 2000; Thidholm et al., 2002; Rokka et al., 2005). Bei  $\Delta$ *PsbW*-Mutanten fehlen die Superkomplexe vollständig, während die Mengen an dimerem PSII-Subkomplex deutlich reduziert sind. Dies deutet auf eine Rolle von PsbW in der Stabilisierung des PSII-Dimers und damit auf eine Assoziation von PsbW zu einem späteren Zeitpunkt der Assemblierung hin (Shi et al., 2000). Im nativen PSII von Wildtyppflanzen befindet sich Hauptanteil von PsbW auf Ebene der Superkomplexe (Rokka et al., 2005). Dabei sind nur geringe Mengen im monomeren und dimeren PSII-Subkomplex detektiert worden. Dies deutet auf eine Beteiligung von PsbW (ähnlich wie PsbZ) an der Verbindung des PSII-Kernkomplex mit den LHCII hin. Die geringen Mengen von PsbW im monomeren

und dimeren PSII-Subkomplex würden ebenfalls das Fehlen der UE im Rahmen dieser Arbeit erklären. Aufgrund der Verluste bei der Extraktion aus dem Gel wäre es möglich, dass die Proteinmenge für eine massenspektrometrische Detektion nicht ausreichend ist. In der 2D-PAGE wird die Analyse von PsbW zudem dadurch erschwert, dass PsbW weder mit CBB noch mit Silberfärbung im Gel visualisierbar ist (Irrgang et al., 1995).

Wie PsbW wurde auch PsbZ über Immunodetektion bereits im Stadium des PSII-Monomers nachgewiesen (Swiatek et al., 2001). Der überwiegende Anteil von PsbZ befindet sich nach BN/SDS-PAGE von Thylakoidmembranen jedoch auf der Ebene der Superkomplexe bzw. des LHCII-Monomers und der „freien“ Proteine (Rokka et al., 2005). Aufgrund seiner Rolle als Verbindungsprotein zwischen den LHCP und dem PSII-Kernkomplex ist PsbZ wahrscheinlich in der Peripherie des PSII angesiedelt und wird dadurch leicht von den PSII-Subkomplexen abgetrennt. Das Fehlen von PsbZ im LHC-Trimer erklärt sich vermutlich durch das Fehlen von CP26 mit dem PsbZ eng assoziiert ist. Weder die hohe Hydrophobizität (GRAVY-Index: > 1.4) noch die Molekularmasse (ca. 6.5 kDa) sollten ein Problem bei der Detektion darstellen, da PsbZ aus Thylakoidmembranpräparationen von Tabak bereits erfolgreich detektiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Das kerncodierte Protein PsbR, das nur in Grünalgen und höheren Pflanzen vorkommt, ist bereits auf der Ebene des monomeren PSII-Subkomplexes assoziiert (Rokka et al., 2005). Der Hauptanteil von PsbR befindet sich auf der lumenalen Seite der Thylakoidmembran mit einer C-Terminal gelegenen TMD zur Verankerung in der Membran (vgl. Tabelle 2, S. 51). PsbR liegt benachbart zu CP47 und dem OEC. Obwohl die Funktion von PsbR noch unbekannt ist, könnte es aufgrund der Lage im Komplex an der Bindung von OEC-UEen beteiligt sein. Aufgrund der engen Assoziation zum OEC liegt die Vermutung nahe, dass PsbR ähnlich wie PsbX (vgl. Kapitel 6.1.3.7, S. 85) und der Wasserspaltungsapparat leicht vom PSII abgetrennt wird und sich in der Gruppe der „freien“ Proteine befindet. PsbR ist hier jedoch weder im monomeren oder dimeren PSII-Subkomplex noch in der Gruppe der „freien“ Proteine nachgewiesen worden. Da PsbR drei tryptische Peptide im detektierbaren Bereich aufweist, sollte die Detektion nach tryptischem Verdau kein Problem darstellen.

Aus der Analyse von  $\Delta psbJ$ -Mutanten ist bekannt, dass ohne das Genprodukt von *psbJ* sowohl PSII (1) als auch PSII (2) assembliert werden können (Suorsa et al., 2004). PsbJ ist jedoch essentiell bei der Bildung von Superkomplexen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, die im dimeren PSII-Komplex ebenfalls kein PsbJ nachweisen konnten (Zheleva et al., 1998; Boekema et al., 1999; Szabo et al., 2001). In der Gruppe der „freien“ Proteine ist PsbJ ebenfalls nicht detektiert worden. Da PsbJ

grundsätzlich detektierbar ist (Signal bei 1338.24 [M+3H]<sup>3+</sup>), deutet dies auf eine Assemblierung des Proteins auf Ebene der Superkomplexe hin.

## 7.2 *PsbL, PsbM, PsbTc* – Notwendig zur Dimerisierung von PSII?

PsbM ist mit einer Gesamtmasse von ~ 3.9 kDa eines der kleinsten und einem GRAVY-Index von 1.362 (Gerste) gleichzeitig eines der hydrophobsten Proteine in der Thylakoidmembran. Das Protein ist bei höheren Pflanzen massenspektrometrisch lediglich im Proteom der Granathylakoide von Erbse (Gomez et al., 2002) nachgewiesen worden. Eine direkte Komplexzuordnung ist bis dato nicht möglich gewesen. Die Untereinheit wurde hier im monomeren und dimeren PSII-Komplex nachgewiesen.

Die Primärsequenz der hochkonservierten PsbM-Untereinheit von höheren Pflanzen ist zu etwa 54% identisch mit der von *Synechocystis* PCC6803 (Shi et al., 2004). Aufgrund von Daten aus der Kristallstruktur von PSII aus Cyanobakterien ist bekannt, dass im PSII-Dimer, PsbM an der Grenzfläche der beiden monomeren PSII-Kernkomplexe lokalisiert ist (Loll et al., 2005). Die strukturelle Anordnung von PsbM deutet darauf hin, dass die Untereinheit an der Aufrechterhaltung der Dimerisierung des nativen PSII-Subkomplexes beteiligt ist (Barber, 2006). Nach einer neuen Studie an  $\Delta psbM$ -Mutanten aus Tabak konnte diese Hypothese jedoch nicht bestätigt werden (Umate et al., 2007). Menge und Zusammensetzung der Proteinkomplexe in der Thylakoidmembran der Mutanten entsprechen in etwa den Werten aus dem Wildtyp. Lediglich bei den PSII-LHCII Superkomplexen ist ein leichter Rückgang der Menge zu verzeichnen. Weder die Assemblierung von PSII noch die Stabilität des PSII-Dimers werden beeinträchtigt. Trotz annähernd identischer Mengen an PSII, wird im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verringerte Aktivität des Photosystems beobachtet. Diese ist wahrscheinlich auf eine Beeinträchtigung der Interaktion der Redoxkomponenten Q<sub>A</sub> und Q<sub>B</sub> (Plastochinon) zurückzuführen (Umate et al., 2007). Grund hierfür könnte eine Konformationsänderung der Q<sub>B</sub>-Bindungsstelle am D1-Protein sein. Die Oxidation von reduziertem Q<sub>A</sub> und damit die Bildung von Plastochinol (PQH<sub>2</sub>) wird infolge drastisch eingeschränkt. Damit ist PsbM, ebenso wie PsbL im nativen PSII-Dimer am gerichteten Elektronenfluss und damit letztendlich an der Aufrechterhaltung des linearen Elektronentransports beteiligt (Kitamura et al., 1994; Swiatek et al., 2003).

Neben PsbM befinden sich an der Verbindungsstelle der beiden PSII-Monomere ebenfalls PsbL und PsbTc. Dabei sind PsbM und PsbTc eng miteinander verbunden (Iwai et al., 2004). Auch PsbL und PsbTc konnten massenspektrometrisch im mono- und dimeren PSII-Subkomplex nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 6.1.3.4, S. 83). In der Literatur wird PsbL als

entscheidende Strukturkomponente für die Dimerisierung von PSII dargestellt (Suorsa et al., 2004). Aus der Analyse von Mutanten ist bekannt, dass ein Fehlen von PsbL die Assemblierung des PSII-Dimers und die Bildung von PSII-Superkomplexen verhindert. Gleichzeitig findet keine stabile Bindung von CP43 im monomeren PSII statt. Das Genprodukt von *psbL* könnte folglich in erster Linie der Stabilisierung des PSII-Dimers und höherwertigerer Assemblierungszustände dienen. Im Gegensatz dazu ist mittels Immunoblot-Analyse gezeigt worden, dass in der  $\Delta psbJ$ -Mutante ebenfalls PsbL fehlt (Swiatek et al., 2003). Da diese Mutanten einen dimeren PSII-Komplex enthalten, kann PsbL nicht die entscheidende Komponente zur Dimerisierung von PSII sein.

Über die Funktion von PsbTc in höheren Pflanzen gibt es bis dato keine Untersuchungen. Aus *psbTc*-Mutanten von *T. elongatus* ist jedoch bekannt, dass die Dimerisierung von PSII-Komplexen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert ist (Iwai et al., 2004). Folglich könnte PsbTc an der Dimerisierung von PSII beteiligt. Im Gegensatz zu  $\Delta psbL$  ist bei  $\Delta psbTc$  (ähnlich wie bei  $\Delta psbM$ ) jedoch photoautotrophes Wachstum möglich. Untersuchungen zur Funktion von PsbTc an *C. reinhardtii* und haben gezeigt, dass das Protein zusätzlich an der Wiederherstellung von photoinaktiviertem PSII beteiligt ist (Ohnishi et al., 2001; Ohnishi et al., 2007). Dabei ist PsbTc jedoch nicht in den Austausch von beschädigten Proteinuntereinheiten involviert. Aufgrund der engen räumlichen Assoziation mit der  $Q_A$ -bindenden Region am D2 beschränkt sich seine Rolle wahrscheinlich auf die Stabilisierung der Bindestelle.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass trotz der zentralen Lokalisation der drei PSII-UEen PsbL, PsbM und PsbTc, die auf eine strukturelle Funktion hinweist, keine Aussage darüber möglich ist, welche Untereinheit zur Ausbildung des dimeren PSII-Subkomplexes notwendig ist. Alle drei wurden massenspektrometrisch im monomeren PSII-Subkomplex nachgewiesen und könnten damit lediglich der Stabilisierung, jedoch nicht der Assemblierung des Komplexes dienen.

### **7.3 Isoformen von Lhcb1**

Aufgrund der MSMS-Daten bestätigte sich die Annahme, dass in Gerste deutlich mehr Gene für Lhcb1 codieren als bisher vermutet. Die zugeordneten Peptide (Abb. 17, S. 90) sprechen eindeutig für verschiedene Isoformen von Lhcb1. Sowohl posttranslationale Modifikationen als auch eine uneinheitliche Prozessierung können mit dieser Methode eindeutig ausgeschlossen werden. Damit ist die *de novo* Sequenzierung in dieser Hinsicht der SDS-PAGE und der Bestimmung der Molekularmasse des intakten Proteins deutlich überlegen.



Es kann nur spekuliert werden, warum eine Multigen-Familie für die LHCP existiert. Die funktionelle Bedeutung für das Vorkommen einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine mit ähnlichen Eigenschaften ist ungeklärt. Eine Erklärung wäre, dass für die Gewährleistung des Photosyntheseprozesses die beteiligten Proteine in hoher Kopienzahl benötigt werden. Die unterschiedliche Hydrophobizität der einzelnen LHCP ist eventuell bedingt durch deren Rolle bei der Organisation von Superkomplexen. Dabei reguliert die variable Zusammensetzung der Komplexe eventuell den Energietransfer von den majoren LHCI<sub>2</sub> zum Reaktionszentrum. Der Gedanke, dass die unterschiedliche Kombination der LHCP die photosynthetische Aktivität der Pflanze regelt, wird ebenfalls gestützt durch die starke Konservierung der Primärsequenz über einen evolutionär langen Zeitraum. Damit ist die Möglichkeit gegeben sich unterschiedlichen Umweltbedingungen anzupassen. Des Weiteren ist unklar, zu welchem Zeitpunkt die unterschiedlichen LHCP-Gene exprimiert werden und ob dies in Abhängigkeit des Stadiums der Entwicklung und/oder unter dem Einfluss verschiedener Umweltfaktoren geschieht (Zolla et al., 2003; Standfuss et al., 2004; Dekker et al., 2005).

### ***7.4 Problematik der Detektierbarkeit von membranintegralen Peptiden und Proteinen***

#### **7.4.1 Erfolgreiche Detektion von TMD in der Literatur**

Trotz der großen Schwierigkeiten finden sich in der Literatur immer wieder Berichte über die erfolgreiche Detektion und Sequenzierung von Transmembranpeptiden (Venter et al., 2002; Yu et al., 2004; Blonder et al., 2004). Damit kann ausgeschlossen werden, dass Peptide mit einer TMD aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften *per se* nicht detektierbar sind. Auffallend ist, dass jeweils relative hohe Mengen ( $\mu\text{g}$ -Bereich) des zu analysierenden Proteins zum Verdau eingesetzt werden. Eine Verbesserung der Detektionsrate von membranintegralen Peptiden erscheint im Hinblick auf die direkte Korrelation zwischen eingesetzter Proteinmenge und der Anzahl detektierter Peptide durchaus wahrscheinlich (Washburn et al., 2001; Granvogl et al., 2006).

Da es während der Probenpräparation zu einem hohen Grad an Peptidverlusten kommen kann, bietet eine geringe Probenmenge eine überzeugende Erklärung für das Fehlen von membranintegralen Peptiden. Als potentielle Quellen für Verluste werden die Adsorption an Oberflächen von Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen, Vakuumtrocknen der Proben, unvollständiger Verdau durch blockierte oder schwer zugängliche Schnittstellen, eingeschränkte Extrahierbarkeit aus der Gelmatrix und eine mangelnde Ionisierbarkeit der Moleküle genannt (Speicher et al., 2000; Stewart et al., 2001). In Abhängigkeit von den

chemisch-physikalischen Eigenschaften der Peptide liegt die Menge an Verlusten zwischen 15 und 50%. Zusätzlich ist die für eine Analyse zur Verfügung stehende Proteinmenge limitiert, z. B. durch die geringe Abundanz bestimmter Proteine im Organismus und die begrenzte Menge an Probenmaterial, die zur Verfügung steht.

Einen entscheidenden Anteil an der Detektierbarkeit besitzt ebenfalls die Methode zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Das hohe Konzentrierungspotential bei chromatographischer Auftrennung der Analyte erleichtert die Detektion von Peptiden und Proteinen. Während sich beim statischen *Nanospray* die Analytmenge auf 3-4  $\mu$ l Spraylösung verteilt, konzentriert sie sich bei der nanoLC-MS Messung auf wenige 100 nl. Hierbei wird eine Konzentrierung von etwa Faktor 10 erzielt. Zusätzlich werden die Interaktionen zwischen den verschiedenen Peptiden innerhalb der Spraylösung durch die zeitliche Trennung aufgrund ihrer chromatographischen Eigenschaften weitgehend minimiert. Als problematisch erweist sich hier jedoch die unvollständige Elution der hydrophoben Moleküle von der Chromatographiematrix und der damit verbundene *Memory*-Effekt bei aufeinander folgenden Proben.

Darüber hinaus erfolgt der Verdau der Proteine, als Bestandteil der in vielen Laboren üblichen Probenvorbereitung, jeweils in Lösung ohne vorherige gelelektrophoretische Trennung. Die reduzierte Peptidausbeute nach In-Gel Verdau könnte damit ein entscheidender Grund für die limitierte Detektierbarkeit von membranintegralen Peptiden sein. Speziell lange Peptide mit zum Teil sehr hydrophoben Sequenzanteilen werden wahrscheinlich nur begrenzt aus dem Gel herausgelöst. Versuche zum Verdau von MP der Thylakoidmembran in Lösung, die nach der Extraktion aus dem Gel gewonnen worden waren, haben jedoch gezeigt, dass dies nicht der alleinige Grund sein kann, da auch hier keine membranintegralen Peptide detektiert werden.

### **7.4.2 Möglichkeiten zur Detektion von membranintegralen Peptiden**

Unabhängig von ihrer Hydrophobizität werden Peptide mit einer Sequenzlänge von maximal 13 AS bevorzugt detektiert (vgl. Kapitel 6.4, S. 93). Folglich besteht eine weitere Möglichkeit zur Detektion von TMD in der Verkürzung der Peptide. Da sich innerhalb der  $\alpha$ -Helix praktisch keine Schnittstellen für Trypsin befinden, wurde Thermolysin als Alternative verwendet. Thermolysin schneidet bevorzugt N-terminal von den unpolaren AS Leu, Ile und Val. Alle drei kommen häufig innerhalb der TMD vor. Trotz positiver Ergebnisse in Versuchen an löslichen Proteinen wurden nach Verdau von MP keine Peptide aus den membranintegralen Bereichen detektiert. Zudem besitzt Thermolysin den Nachteil einer relativ hohen MM von 35 kDa. Da die Voraussetzung für den In-Gel Verdau das Eindringen

der Protease in die Gelmatrix Gel ist, sind hierfür niedermolekulare Proteasen besser geeignet (vgl. Kapitel 6.6.3.1, S. 118 und 7.7.3, S. 147). In Kombination mit der Aggregation der MP im Gel führt dies wahrscheinlich zu einer weitgehenden Blockade der Proteolyse.

Um dies zu umgehen, bietet sich eine chemische Spaltung der Proteine mit Cyanogenbromid oder HCl an. Die Spaltung von Proteine mit Cyanogenbromid erfolgt ausschließlich C-terminal zur AS Met (Ogorzalek Loo et al., 1996; van Montfort et al., 2002). Da die AS Methionin speziell bei über PAGE getrennten Proteinen häufig in oxidiertes Form vorliegt und die Reaktion mit Cyanogenbromid nur am unmodifizierten Methionin durchführbar ist, erscheint dieser Ansatz nur partiell erfolgversprechend (Hollemeier et al., 2002). Ein weiterer Nachteil ist die relativ geringe Frequenz der AS Met innerhalb membranintegraler Peptide. Betrachtet man ausschließlich die Transmembrandomänen potentieller MP von *A. thaliana* und *H. sapiens*, so ist die AS Met mit einem Anteil von nur etwa 3% vertreten.

Eine weitere Möglichkeit zur chemischen Spaltung bietet 6 M HCl bei erhöhter Temperatur (Zubarev et al., 1994; Shevchenko et al., 2000). Bevorzugte „Schnittstellen“ lagen hier N-terminal von Ser, Thr und Gly, sowie C-terminal von Asp. Daneben traten aber auch Bruchstellen an anderen AS auf. Obwohl damit zum Teil auch Peptide aus TMD generiert werden können, war die Ausbeute im Vergleich zur enzymatischen Spaltung sehr gering. Dies wirkte sich ebenfalls auf die Qualität der Spektren aus. Zudem wurde die Auswertung der Fragmentspektren durch die wechselnden C-terminalen AS deutlich erschwert.

### 7.4.3 Gründe für das Fehlen von Peptiden im (*offline*) ESI-MS

Ein Teil der nach Verdau mit Trypsin erwarteten Peptide konnte in den *offline* nanoESI-MS-Spektren nicht detektiert werden. Die Anzahl und die Intensität der detektierten Peptide hing hierbei von den physikalisch chemischen Eigenschaften der einzelnen Moleküle ab. Die Faktoren Löslichkeit, Molekularmasse, AS-Zusammensetzung und Ionisierungseigenschaften, sowie das verwendete MS auf dem die Analyse durchgeführt wird, können die erfolgreiche Detektion beeinflussen. Es ist somit wenig verwunderlich, dass die Signalintensität von Molekül zu Molekül stark divergiert. Aus diesen Gründen können manche Proteine bis in den sub-fmol Bereich detektiert werden, während bei anderen Proteinen Mengen bis zu 1 pmol nötig sind. Die verwendete Ionisierungsmethode hat dabei nur einen begrenzten Einfluss auf die Detektierbarkeit eines Peptids. Obwohl Unterschiede in der Intensität bei einzelnen Peptide auftreten, eignen sich sowohl MALD als auch ES gleichermaßen zur Ionisierung (Doucette et al., 2003). Als Ursachen für das Fehlen der membranintegralen Peptide bieten sich somit eine Reihe von Gründen an, die im Folgenden erläutert werden.

#### 7.4.3.1 *Signalunterdrückung durch störende Ionen*

Eine denkbare Erklärung für das Fehlen der membranintegralen Peptide wäre eine schlechtere Ionisierung hydrophober Moleküle. Da sich die Spraylösung aus einem komplexen Gemisch verschiedenster ionisierbarer Moleküle mit unterschiedlichen Eigenschaften zusammensetzt, kann die Wechselwirkung von Molekülen untereinander zur Signalunterdrückung von Analyten führen (Iavarone et al., 2000). Ursachen für störende Ionen können z. B. Säuren sein, die im positiven Ionenmodus als Elektrolyte zur Unterstützung der Ionisierung zugesetzt werden oder Verunreinigungen durch Rückstände von Puffersalzen. Das bei diesen Versuchen in hoher Konzentration auftretende Chlorophyll hatte allerdings kaum Auswirkung auf die Signalintensität der niedermolekularen Proteine.

Die Signalintensität ( $I_A$ ) eines Analyten ergibt sich rechnerisch aus seiner Konzentration und seinem Reaktionskoeffizienten ( $k$ ), der die Effizienz wiederspiegelt, mit der ein Analyt in ein Gasphasenion umgewandelt wird. Der Reaktionskoeffizient kann bei extrem hydrophilen Analyten so gering sein, dass dieser im Spektrum nicht mehr detektiert werden kann. Der Zusammenhang ist in nachfolgender Gleichung für eine Lösung mit drei Ionen dargestellt:

$$I_A = p \cdot f \cdot I_0 \cdot \left\{ \frac{k_A \cdot [A^+]}{k_A \cdot [A^+] + k_B \cdot [B^+] + k_C \cdot [C^+]} \right\}$$

Dabei sind  $p$  und  $f$  Proportionalitätskonstanten, welche die Effizienz der Ionenaufnahme ins MS und den Anteil der Ladungen innerhalb der ES-Tröpfchen beschreiben, die in Gasphasenionen umgewandelt werden. Der Kapillarstrom  $I_0$  ändert sich ebenfalls kaum mit steigender Konzentration von Analyt- bzw. Störionen (Tang et al., 1993; Kebarle, 2000).

Die Bildung von Gasphasenionen bei der Ionisierung wird durch den hydrophoben Charakter der enthaltenen Ionen positiv beeinflusst (Wert für  $k$  steigt an), da die Wahrscheinlichkeit hydrophobe Moleküle an der Oberfläche des geladenen Tröpfchens anzutreffen im Vergleich deutlich höher ist. Daraus ergibt sich eine erhöhte Bildung von Gasphasenionen und damit eine höhere Signalintensität. In der Praxis ist dies für kleine hydrophobe Peptide häufig in den MS-Spektren zu beobachten. Für große hydrophobe Moleküle (z. B. membranintegrale Peptide) sollten grundsätzlich ähnliche Zusammenhänge gelten. Folglich stellt die Ionisierungseffizienz kein Problem bei der MS-Analyse von membranintegralen Peptiden oder niedermolekularen hydrophoben Proteinen dar.

#### 7.4.3.2 *Detektierbarkeit von Ionen in Abhängigkeit von der Gasphasenbasizität des bei der Vernebelung verwendeten Lösungsmittels*

Die Gasphasenbasizität (GB) beschreibt die Affinität eines Moleküls (B) ein Proton aufzunehmen:  $B_{(g)} + H^+_{(g)} \rightarrow BH^+_{(g)}$ . Sie ist definiert als die negative Änderung der freien

Enthalpie ( $-\Delta G^0$ ) bei Anlagerung eines Protons in der Gasphase (Harrison, 1997). Je höher die GB ist, desto leichter wird ein Proton auf das Molekül übertragen. Die Übertragung findet nach Evaporation der Tröpfchen im ESI-Prozess statt, wenn sich das Analytmolekül bereits in der Gasphase befindet, aber noch einzelne Lösungsmittelmoleküle assoziiert sind. Diese können im Zuge der Abtrennung vom Analytmolekül Protonen mitnehmen. Der Vorgang geschieht in einem gewissen Umfang auch bei niedriger GB des Lösungsmittels. Im Extremfall, bei sehr hoher GB des Lösungsmittels bzw. sehr niedriger GB des Analyten, ist die Übertragung quantitativ und der Analyt wird folglich im Spektrum nicht mehr detektierbar sein (Amad et al., 2000). Für Lösungen, die aus mehr als einer Komponente zusammengesetzt sind, gilt die GB des basischsten Anteils (Harrison, 1997). Bei steigender GB des verwendeten Lösungsmittels sinkt der Ladungszustand der detektierten Analytmoleküle (Iavarone et al., 2000). Wesentlich für den Analyten ist aber auch, dass die Protonierung zwar hauptsächlich in Lösung stattfindet (Cole, 2000), aber sich der in Lösung dominierende Ladungszustand eines Peptids oder Proteins in der Gasphase noch drastisch verändern kann, so dass auch aus basischen Lösungen positiv geladene Analyte erzeugt werden können (Kelly et al., 1992; Le Blanc et al., 1994; Amad et al., 2000).

GB von Peptiden oder Proteinen sind nicht aus der Literatur erhältlich, so dass vereinfacht die GB des gesamten Moleküls definiert wird, als die GB der basischsten AS im Peptid bzw. Protein (Covey et al., 1988; Gorman et al., 1992). Der Wert ist unabhängig von der Hydrophobizität der Moleküle. Aus Untersuchungen an Pentapeptiden wurde deutlich, dass der tatsächliche Wert in Abhängigkeit von der Anzahl der enthaltenen basischen AS noch (deutlich) darüber liegen kann (Harrison, 1997). Die GB von Lys liegt bei 229 kcal/mol, die von Arg sogar bei  $> 232$  kcal/mol. Alle tryptischen Peptide, sowie alle in dieser Arbeit detektierten niedermolekularen Proteine besitzen wenigstens einmal die AS Arg oder Lys. Damit liegen die GB der standardmäßig verwendeten Lösungsmittel (Wasser: 158 kcal/mol, ACN: 179 kcal/mol, Methanol: 173 kcal/mol, Aceton: 187 kcal/mol, 2-Propanol: 182 kcal/mol) und Säuren (FA: 170 kcal/mol) in der Vernebelungslösung für die ESI alle unterhalb der GB von Peptiden und Proteinen. Die Auswirkungen der Lösungsmittel auf den Ladungszustand der Analytmoleküle ist folglich als gering einzuschätzen und sollte die Ionisierung nicht beeinträchtigen.

### 7.4.3.3 *Mangel an Ladungsträgern*

Die in den ESI-MS Spektren detektierbaren Peptide liegen in der Regel zwischen 300 und 1600  $m/z$ . Peptide  $> 1.6$  kDa müssen folglich mehrfach geladen sein, um in den angesprochenen  $m/z$ -Bereich zu passen. Die nach tryptischem Verdau generierten

membranintegralen Peptide aus den MP der Thylakoidmembran besitzen Sequenzlängen von 22 AS (z. B. in PsaA) bis 89 AS (z. B. in PsbA). Bei einer durchschnittlichen Masse von 110 Da/AS entspricht das rechnerisch einem Peptid mit einer Masse von etwa 2.4 - 9.8 kDa. Um in den Bereich von 300-1600  $m/z$  zu passen, müssten diese TMD-Peptide 2-6-fach geladen sein.

Die Messung von Peptiden erfolgt im positiven Ionenmodus unter sauren Bedingungen. Die Seitenketten der Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin besitzen einen  $pK_a$  von 7, 10 und 12. Das bedeutet, dass diese AS unter den stark sauren Bedingungen vor und während der Messung (pH liegt bei ca. 2) zu nahezu 100% protoniert vorliegen müssten. Durch die Spezifikation der Protease Trypsin müsste infolge jedes gebildete Peptid mindestens doppelt geladen sein. Formal befindet sich damit eine Ladung am N-Terminus ( $NH_3^+$ ) und eine an der Seitenkette, der immer C-terminal gelegenen basischen AS Arginin oder Lysin. Die doppelte Ladung würde für Membranpeptide bis zu etwa 3.0 kDa ausreichen. Peptide  $> 3.0$  kDa benötigen in Abhängigkeit von ihrer MM jedoch zusätzlich ein bis vier protonierbare AS (z. B. His) innerhalb ihrer Sequenz, um in den für eine Detektion relevanten  $m/z$ -Bereich des Massenspektrometers zu kommen.

Erschwerend kommt hinzu, dass aufgrund von Ladungsabstoßung und der molekularen Zusammensetzung der Spraylösung (Ionenstärke) nicht alle basischen Gruppen zur Ionisierung eines Peptids beitragen. Zusätzlich kann die Interaktion zwischen verschiedenen Peptiden oder zwischen Peptiden und Molekülen, die als Störsignale (z. B. Detergenzien) in den Spektren detektiert werden zum Verlust von Ladungen führen. Dies kann eine Verlagerung des Moleküls in den nicht detektierbaren  $m/z$ -Bereich zur Folge haben. Dementsprechend könnte der Mangel an Ladungsträgern einer der Gründe sein, warum Peptide  $> 4$  kDa mittels ESI-MS nicht detektiert werden (Wilm et al., 1996; Venter et al., 2002). Die Erklärung ist jedoch nur für einen Teil der untersuchten Peptide plausibel. Über 60% der membranintegralen Peptide besitzen ausreichend potentielle Ladungsträger, um in den detektierbaren  $m/z$ -Bereich von 300 - 1600 zu passen.

#### *7.4.3.4 Aggregation der Peptide aufgrund hydrophober Eigenschaften*

Transmembranregionen allein sind mit Hydrophobizitätswerten zwischen 0.5 und 2.5 extrem hydrophob. Bei einem membranintegralen Peptid wird dieser Wert von den benachbarten löslichen Abschnitten beeinflusst in die eine TMD eingebettet ist. Speziell in sehr langen Peptiden verringern sich die Hydrophobizitätswerte mit steigendem Anteil an hydrophilen AS, die in den stromalen oder lumenalen Bereichen der MP angesiedelt sind. Allgemein muss davon ausgegangen werden, dass sich mit steigender Hydrophobizität die Wahrscheinlichkeit

zur Aggregation hydrophober Proteinabschnitte erhöht. Dies gilt speziell dann, wenn die löslichen Abschnitte eines MP proteolytisch entfernt werden. Gleichzeitig vermindert sich die Effizienz der Extraktion aus der Gelmatrix, sowie der Elution von Chromatographiematerialien aufgrund gesteigerter hydrophober Wechselwirkungen. Die Problematik einer verringerten Extraktion langer, hydrophober Peptide aus der Gelmatrix kann durch Extraktion des in der Regel hydrophileren Gesamtproteins umgangen werden. Der enzymatische Verdau erfolgt anschließend in Lösung. Da dies ebenfalls nicht zum Erfolg führt, scheint in erster Linie die Aggregation membranintegrityaler Peptide untereinander deren Detektion zu beeinträchtigen. Die Herabsetzung der Hydrophobizität zur Verminderung der Aggregation von Molekülen kann über die Modifikation einzelner AS (vgl. Kapitel 6.4.5, S. 102) erreicht werden. Dies bedingt jedoch die Existenz bestimmter AS (z. B. Met) innerhalb der membranintegrityalen Peptide und ist somit nur teilweise realisierbar.

Aufgrund der Ergebnisse scheint die Problematik hauptsächlich höhermolekulare Peptide zu betreffen, da kurze Peptide (< 12 AS) mit Hydrophobizitätswerten von über 1.0 gut detektierbar sind. Dazu gehören unter anderem Peptide mit Transmembrananteilen in  $\beta$ -Faltblattproteinen der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten. Diese werden innerhalb der statistischen Häufigkeitsverteilung für lösliche Proteine detektiert (Eichacker et al., 2004). Es gibt daher Grund zu der Annahme, dass eine Korrelation von Peptidlänge und Hydrophobizität die Detektionsgrenze bestimmen könnte.

Falls diese Annahme zutreffend ist, stellt sich die Frage warum hydrophobe niedermolekulare Proteine nach Extraktion gut detektierbar sind, membranintegrityale Peptide jedoch nicht. Nach Auswertung der Hydrophobizität und Sequenzlänge von 51 membranintegrityalen Peptiden aus 12 Proteinen (> 10k Da), sowie 18 Proteinen (< 10 kDa) von PSI und PSII wird deutlich, dass sich beide untersuchten Gruppen in keinem der Parameter signifikant unterscheiden. Folglich kann nicht von einem entscheidenden Einfluss von Peptidlänge und Hydrophobizität auf die Detektierbarkeit ausgegangen werden, zumal es sich bei den ermittelten Werten um Durchschnittswerte handelt. Unter Einbeziehung der Peptide > 40 AS, die einen Anteil von etwa 40% an der Gesamtheit der membranintegrityalen Peptide aus den höhermolekularen Proteinen der Thylakoidmembran haben (vgl. Kapitel 6.4.3, S. 98), ergibt sich eine durchschnittliche Sequenzlänge von 41 AS bei einem GRAVY-Index von 0.759. Im Vergleich waren die niedermolekularen Proteine der beiden Photosysteme um 8 AS länger, dafür aber um einen Wert von ca. 0.100 hydrophiler.

Letztendlich könnte die geringe Schnitffrequenz der Protease die Erklärung liefern, für die deutlich schlechtere Ausbeute bei Anwendung der Extraktionsmethode für die

niedermolekularen MP auf membranintegrale Peptide. In diesem Zusammenhang spielen zwei Faktoren eine Rolle. Erstens ist nicht bekannt, inwieweit die Sekundärstruktur eines Proteins nach elektrophoretischer Trennung und Färbung tatsächlich aufgelöst wird. Zweitens ist anzunehmen, dass es in einem gewissen Umfang zur Aggregation der MP bzw. TMD im Gel kommt. Folglich ist es wahrscheinlich, dass speziell die Proteaseschnittstellen, die benachbart einer TMD liegen für das Enzym nur in geringem Umfang zugänglich sind. Die damit verbundene Heterogenität der entstehenden Peptide, sowie deren geringe Abundanz könnte der Grund für die Probleme bei der Detektion von membranintegralen Peptiden sein.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass wahrscheinlich ein Zusammenspiel verschiedener Gründe für die Probleme bei der Detektion von Transmembranpeptiden verantwortlich ist. Die Kombination der Parameter Länge und Hydrophobizität der Peptide, sowie die Zugänglichkeit der Schnittstellen für die Protease, sind entscheidend für die Detektierbarkeit. Um in Zukunft den Status der Gelelektrophorese für die Proteinanalyse zu erhalten und deren Möglichkeiten zu erweitern, sind technische Verbesserung im Bereich der Chromatographie und Massenspektrometrie, sowie die weitere Optimierung des In-Gel Verdau vonnöten, um membranintegrale Peptide besser für die massenspektrometrische Analyse zugänglich zu machen. Das Problem der limitierten Probenmenge, die für einen Versuch zur Verfügung steht, wird zum Teil jedoch schwierig zu lösen sein.

### ***7.5 Löslichkeit von hydrophoben MP in organischen Lösungsmitteln***

#### **7.5.1 Chloroform/Methanol Extraktion von Membranproteinen**

Ähnlich wie Aceton, wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Chloroform und Methanol ursprünglich zur Präzipitation von löslichen und membranintegralen Proteinen verwendet (Wessel et al., 1984; Whitelegge et al., 1999). Bei der Extraktion von Proteinen aus Plastidenmembranen mit Chloroform/Methanol gehen bis zu 30% der Proteine in die organische Lösungsmittelphase über (Henriques et al., 1976). Analysen der Chloroform/Methanol-Fraktion haben ergeben, dass dieses Lösungsmittelgemisch eine einfache und effiziente Möglichkeit zur Isolation extrem hydrophober Proteine bietet (Seigneurin-Berny et al., 1999). Dabei wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem Verhältnis von AS-Anzahl zu TMD-Anzahl und der Löslichkeit in Chloroform/Methanol festgestellt (Ferro et al., 2000). Da mit dieser Methode ausschließlich sehr hydrophobe Proteine angereichert werden, kann sie gleichzeitig zur Fraktionierung von Kompartimenten und damit zur Reduktion der Probenkomplexität verwendet werden. Periphere und lösliche



Proteine werden quantitativ entfernt (Ferro et al., 2000; Friso et al., 2004). Für optimale Ergebnisse muss das Verhältnis von Chloroform zu Methanol an den zu analysierenden Typ der biologischen Membran angepasst werden (Ferro et al., 2000). Die Methode ist bereits erfolgreich auf verschiedene Membransysteme und Kompartimente aus pflanzlichen Zellen, wie Hüllmembranen (Seigneurin-Berny et al., 1999), die Thylakoidmembran (Ferro et al., 2000) oder Mitochondrien (Brugiere et al., 2004) angewendet worden. Nachteile der Methode sind die Limitierung auf ein bestimmtes Set an Proteinen und die mögliche Copräzipitation von Zielproteinen bei einem hohen Anteil an hydrophilen Proteinen in der Probe (Seigneurin-Berny et al., 1999; Ephritikhine et al., 2004). Zudem ist ein erneutes Lösen der evaporierten Pellets für weitere Analysen (SDS-PAGE, MS-Analyse) aufgrund des hohen Anteils an Pigmenten und Lipiden kaum möglich. Trotz der hohen Volatilität der Lösungsmittel ist eine Chloroform/Methanol-Mischung ebenfalls als Spraylösung für *offline* ESI-MS geeignet (Barnidge et al., 1999; Carroll et al., 2007). Für die Extraktion niedermolekularer MP nach PAGE ist die Chloroform/Methanol-Methode jedoch nicht geeignet, da aufgrund der Dehydrierung der Gelmatrix der Übergang der Proteine in die Lösung verhindert wird. Da sich die Methode zudem auf die Extraktion extrem hydrophober Proteine (GRAVY-Index  $> 0.5$ ) beschränkt, wird nur ein Teil der niedermolekularen Proteine aus der Thylakoidmembran isoliert (Friso et al., 2004). Beispielsweise werden die hydrophileren UEn des PSII wie PsbE (GRAVY-Index von -0.004) oder PsbL (GRAVY-Index von 0.214) in Chloroform/Methanol nicht gelöst.

### 7.5.2 Acetonfällung

Da ESI-MS extrem empfindlich gegen Salze und Detergenzien ist, stellt die Acetonfällung einen wichtigen Schritt zur Reinigung der Proteinproben dar. In der Literatur sind eine Reihe von Protokollen zur Acetonfällung beschrieben, die alle weitgehend ähnlich ablaufen. Unterschiede ergeben sich hauptsächlich in der Inkubationszeit für die Fällung. In der Regel dauert der Vorgang nur max. 1 h (Hurkman et al., 1986; le Maire et al., 1993; Whitelegge et al., 1998; Friso et al., 2004; Puchades et al., 1999). Speziell im Fall von niedermolekularen, hydrophoben Proteinen funktioniert die Methode nicht ohne Einschränkung. Nach Friso et al. befindet sich eine Reihe niedermolekularer, hydrophober Proteine nach der Fällung im Acetonüberstand (Friso et al., 2004). Die Beobachtung ist insofern korrekt, da sich diese Proteine erst nach etwa 4 h quantitativ im Pellet befinden. Bei kürzeren Inkubationszeiten verbleibt ein Großteil der Proteine im Überstand, werden mit diesem abgetrennt und gehen somit verloren. Aus dem gleichen Grund vermindert ein Waschen des Pellets mit eiskaltem

Aceton oder Isopropanol zur Entfernung von Lipiden und Pigmenten (Chl) die Proteinausbeute.

## **7.6 Quantifizierung von Proteinen**

### **7.6.1 Quantifizierung von Proteinen im Gel nach CBB-Färbung**

Die Quantifizierung von Proteinbanden nach Visualisierung mit dem Farbstoff Coomassie gilt als problematisch. Der dynamische Bereich des Farbstoffs wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Allgemein wird von einem 20-40-fachen dynamischen Bereich gesprochen, in dem die Farbstoffintensität zur Proteinkonzentration linear ist (Fiévet et al., 2004). Andere Arbeitsgruppen berichten, dass selbst bei nur vierfachem Konzentrationsunterschied die Farbstoffbindung nicht linear sein kann (Consoli et al., 2001). Das Problem bei einer Quantifizierung mit CBB liegt hauptsächlich darin, dass die Farbstoffbindekapazität, d. h. die Anzahl Farbstoffmoleküle, die an ein Protein gebunden werden, stark von den Eigenschaften der einzelnen Proteine abhängt (Chial et al., 1993). Folglich ist der quantitative Vergleich verschiedener Proteine über die CBB-Färbung nicht zulässig. Eine Quantifizierung des gleichen Proteins bzw. zweier homologer Proteine liefert jedoch signifikante Ergebnisse.

CBB besitzt zwei Sulfonsäuregruppen und drei Stickstoffatome mit einem freien Elektronenpaar. Somit wäre eine Bindung der Farbstoffmoleküle über ionische Wechselwirkungen sowohl an die Carboxylgruppen von Asp und Glu als auch an die Aminogruppen von Arg, Lys, His und dem N-Terminus des Proteins möglich. Versuche haben gezeigt, dass die Farbstoffbindung in erster Linie zwischen den Sulfonsäuregruppen der Farbstoffmoleküle und den Seitenketten der basischen Aminosäuren erfolgt. Hierfür spricht eine Korrelation zwischen der Färbintensität und dem Anteil an basischen Seitenketten, vor allem bei Arg (Tal et al., 1985; Righetti et al., 1978). Eine mögliche Beteiligung der Carboxylgruppen von Asp und Glu an der Farbstoffbindung kann ausgeschlossen werden, da unter den sauren Bedingungen der CBB-Färbung die Carboxylgruppen der Aminosäuren protoniert vorliegen. Die Interaktion zwischen CBB und dem Protein wird zusätzlich verstärkt durch hydrophobe Wechselwirkungen an denen die aromatischen Aminosäuren Phe, Trp und Tyr beteiligt sind (Fazekas De St. Groth et al., 1963). Folglich ist die Verteilung der positiven Ladungen über das Protein und eventuell benachbart liegender hydrophober Aminosäuren wahrscheinlich ausschlaggebend dafür, wie viele Farbstoffmoleküle letztlich gebunden werden. In der Regel handelt es sich um 1.5 bis 3 Moleküle pro positive Ladung. CBB ist mit einer Masse von über 800 Da etwa 7 x schwerer als im Durchschnitt eine Aminosäure.

Deshalb wird diskutiert, inwiefern die Sekundärstruktur eines denaturierten Proteins eine weitaus entscheidendere Rolle für die Bindung spielt als die Eigenschaften einzelner Aminosäuren (Fiévet et al., 2004).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Quantifizierung der Proteinausbeute nach passiver Elution aus einem SDS-Gel, spielte die unterschiedliche Bindekapazität verschiedener Proteine für den Farbstoff keine Rolle, da immer das gleiche Protein quantifiziert wurde.

### **7.6.2 Limitierung des Quantifizierungsansatzes mit Essigsäureanhydrid**

Die relative Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie wird hier durch die Markierung der Proteine nach enzymatischem Verdau auf Ebene ihrer Peptide realisiert. Pro Protein ergeben sich in der Regel mehrere potentielle Peptidpaare für die Quantifizierung. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten, ist dies entscheidend, da sich zum Teil Unterschiede von bis zu 20% zwischen den Verhältnissen verschiedener Peptidpaare eines Proteins ergeben (Chakraborty et al., 2002).

Der hier verwendete interne Standard besteht aus den gleichen Peptiden, wie das zu quantifizierende Zielprotein. Folglich muss das Protein vorher bekannt und in ausreichender Menge vorhanden sein bzw. hergestellt werden (Klonierung), um daraus die Referenzpeptide generieren zu können. Bereits im Vorfeld des Experiments kann abgeschätzt werden, ob eine Quantifizierung mit der hier beschriebenen Methode (vgl. Kapitel 5.6, S. 57) für ein bestimmtes Protein möglich ist. Theoretisch sind alle Peptide für die Quantifizierung geeignet. Vorzugsweise liegt die Masse eines Peptides zwischen ca. 0.8 und 2.5 kDa, da in diesem Bereich allgemein die meisten Peptide im MS detektiert werden. Weitere Auswahlkriterien sind das Fehlen leicht modifizierbarer AS (z. B. Met) und die AS Lysin am C-Terminus. Letzteres führt zur doppelten Acetylierung des Peptides und damit zur Einführung von sechs statt drei zusätzlichen Massen. Dies verhindert die Überlagerung von Isotopensignalen eines markierten Peptidpaares. Mögliche Überlagerungen von verschiedenen Peptiden eines Proteins können durch Berechnung der Massen der unterschiedlich derivatisierten Peptide ausgeschlossen werden. Dies ist derzeit lediglich manuell möglich, da Programme zur Berechnung von Peptidmassen nach Isotopenmarkierung auf Peptidebene fehlen.

Nach Isotopenmarkierung werden im optimalen Fall für jedes Peptid zwei Signale im MS-Spektrum detektiert, jeweils eines als Derivat der „leichten“ bzw. „schweren“ Form des Markierungsreagenz. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass das gleiche Peptid, oft noch weitere Signale innerhalb eines Spektrums bildet. Es handelt sich dabei um Salzaddukte ( $\text{Na}^+$  oder

K<sup>+</sup>) oder um Produkte der Modifikation einzelner AS. Die Verhältnisse der einzelnen Zustände eines Peptids können sich auch bei exakt gleich behandelten Proben deutlich unterscheiden. Speziell bei der ESI-MS werden durch das mehrfache Auftreten des gleichen Peptids in unterschiedlichen Ladungszuständen zusätzliche Signale detektiert. Peptidsignale, die von anderen Signalen aus dem MS-Spektrum überlagert werden, können nicht für die Quantifizierung verwendet werden.

Aufgrund der Vielfalt an detektierbaren Signalen ist die Auflösung speziell bei *offline* ESI-/MALDI-Messungen oft unzureichend, da die Peptide lediglich eindimensional nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden. In den hier beschriebenen Experimenten wurden Proteine mit Molekularmassen zwischen 20 und 50 kDa bevorzugt für eine Markierung ausgewählt. Die MS-Spektren solcher Proteine sind grundsätzlich weniger komplex und damit einfacher zu analysieren. Die Methode eignet sich folglich hauptsächlich für die Quantifizierung einzelner Proteine oder Proteinkomplexe aus einem 1D bzw. 2D-Gel.

Die Quantifizierung ganzer Proteome ist angesichts der Komplexität der Daten kaum möglich. Aufgrund der hohen Anzahl detektierbarer Peptide steigt die Gefahr der Überlagerung von Signalen. Bei komplexen Proben ist eine Auflösung der Peptide nur über eine chromatographische Trennung möglich. Hierbei wird neben der Molekularmasse die Retentionszeit als zweite Dimension eingeführt. Es bleibt aber zu bedenken, dass Deuterium etwas hydrophiler ist als Wasserstoff. Dies führt während der Chromatographie zu einer geringen Verschiebung der Retentionszeiten bei den unterschiedlich markierten Peptidpaaren (Courchesne et al., 1997; Moritz et al., 2003). Um die Komplexität einer Probe herabzusetzen, ist eine Modifikation auf der Ebene des intakten Proteins ebenfalls möglich. Dabei entsteht eine geringere Anzahl an Peptiden mit längeren Sequenzen, da nach Modifikation die Lysin-Schnittstelle für die Protease blockiert ist. Speziell bei niedermolekularen Proteinen und bei Proteinen, die kaum Arginine aufweisen, ist diese Vorgehensweise problematisch, da adäquate Peptide für die Quantifizierung fehlen.

## **7.7 In-Gel Verdau**

### **7.7.1 Kompatibilität von CBB- und Silberfärbung mit der MS-Analyse von Peptiden und Proteinen**

Protokolle zum In-Gel Verdau beginnen in der Regel mit der Entfärbung der ausgeschnittenen Proteinbanden. Inwiefern eine Entfärbung die Peptidausbeute und damit die Signalintensität in den MS-Spektren steigert, wird kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zur weit verbreiteten

Meinung müssen weder CBB- noch silbergefärbte Banden zwangsläufig entfärbt werden (vgl. Kapitel 6.6.1, S. 112).

### 7.7.1.1 Entfärbung von CBB gefärbten Proteinbanden

CBB stört den In-Gel Verdau von Proteinen und die nachfolgende massenspektrometrische Analyse nur bedingt (vgl. Kapitel 6.6.1, S. 112). Obwohl es theoretisch zur Überlagerung von Peptidsignalen kommen kann, tritt dieser Fall in der Praxis nur selten ein. Die Signalintensität der CBB-Moleküle variiert in Abhängigkeit von der Färbintensität und diese wiederum mit dem Proteingehalt der Gelbande. Proben die wenig Protein enthalten, sind dementsprechend schwach gefärbt und führen folglich zu niedrigen CBB-Signalen. Eine Unterdrückung der ebenfalls zum Teil wenig intensiven Peptidsignale während der Ionisierung ist damit unwahrscheinlich und das Weglassen des Entfärbeschrittes folglich unkritisch. In Übereinstimmung mit den von Speicher et al. erzielten Ergebnissen kommt es zudem während des Entfärbevorganges zu Verlusten an Probenmaterial (Speicher et al., 2000). Diese Verluste liegen im Mittel bei ca. 10%, können aber in Abhängigkeit von Art und Größe des zu analysierenden Proteins deutlich variieren.

Im Gegensatz dazu ist eine Entfärbung von intakten Proteinen vor der massenspektrometrischen Analyse aufgrund der Bildung von CBB-Addukten unumgänglich (Jin et al., 2005; Ogorzalek Loo et al., 1996). Die Adduktbildung erfolgt dabei mit einer unterschiedlichen Anzahl an Farbstoffmolekülen. Aufgrund der hohen Auflösung heutiger Massenspektrometer werden die Adduktsignale im Spektrum zwar deutlich getrennt, die Signalverteilung führt jedoch zu einem drastisch verschlechterten Signal-zu-Rausch Verhältnis und damit zu einer verminderten Sensitivität.

Die detektierte Masse der extrahierten Proteine unterscheidet sich um etwa  $\pm 0.2 - 0.3\%$  von der aus der Aminosäuresequenz berechneten Masse. Grund hierfür sind hauptsächlich Modifikationen, die einerseits bereits während der Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 4.2.2, S. 44) andererseits durch Formylierung des N-Terminus, sowie der Aminosäuren Serin und Threonin während der Inkubation in hohen Konzentrationen an Ameisensäure entstehen (Goodlett et al., 1990). Die Addition einer oder mehrerer Formylgruppe(n) an ein Protein ist erkennbar an der Erhöhung der Proteinmasse um +28 Da bzw. deren Vielfaches. Bei der nachfolgenden massenspektrometrischen Bestimmung der Proteinmasse können die Modifikationen zu einer verminderten Auflösung sowie zu einer Reduktion der Signalintensität führen. Der Verdau und eine nachfolgende *de novo* Sequenzierung der resultierenden Peptide zur Bestimmung der Identität eines Proteins bleiben davon unbeeinflusst.

### 7.7.1.2 *Verminderte Detektion von Peptiden nach Silberfärbung*

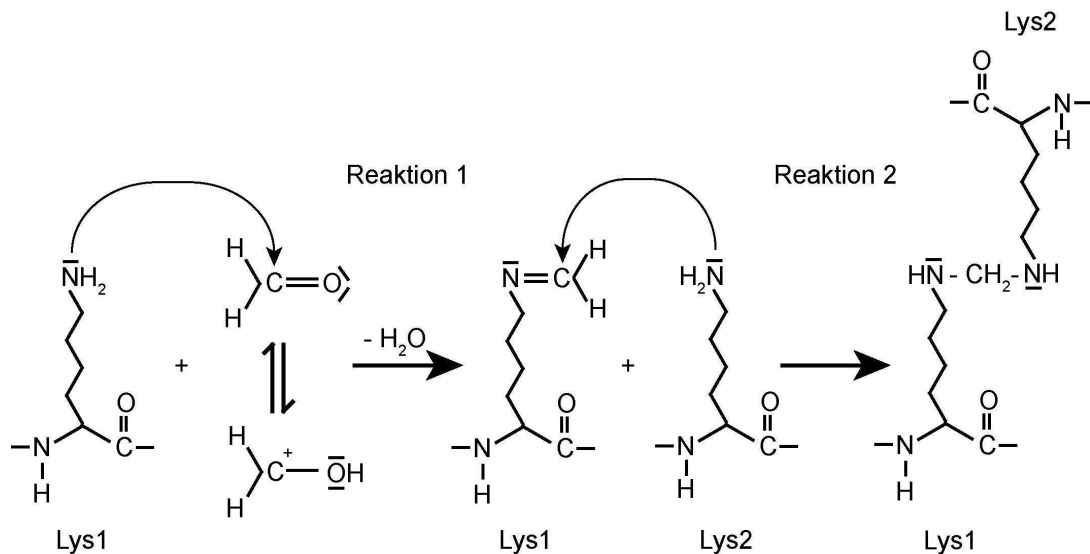
Die hier verwendete Methode zur Silberfärbung von Proteinen nach PAGE basiert auf Reaktionen, wie sie auch aus der Fotografie bekannt sind. Der Prozess beginnt mit der Diffusion von Ag-Ionen ins Gel unter sauren Bedingungen. Dort binden sie vorwiegend an Sulfhydryl- (R-SH) und Carboxylgruppen (R-COOH) der AS-Seitenketten. Zum Schluss findet in basischem Milieu die Reduktion zu metallischem Silber statt (Merril et al., 1986; Heukeshoven et al., 1985; Rabilloud, 1990).

Kontrovers diskutiert wird die Frage, ob die Peptidausbeute aus CBB gefärbten Banden besser ist als aus Silbergefärbten und inwiefern eine Entfärbung die Sensitivität und Qualität der Spektren verbessert. Trotz ähnlicher Verfahren zur Silberfärbung fallen die Ergebnisse in der Literatur extrem unterschiedlich aus. Während einige Arbeitsgruppen von einer äquivalenten Sequenzabdeckung nach MS-Analyse von silber- und CBB-gefärbten Banden sprechen (Terry et al., 2004; Shevchenko et al., 1996; Shevchenko et al., 2001; Castellanos-Serra et al., 2005), wird ebenfalls berichtet, dass die Sequenzabdeckung nach Silberfärbung im Vergleich um durchschnittlich etwa 40% niedriger liegt (Scheler et al., 1998; Lauber et al., 2001; Richert et al., 2004). Eine vorherige Entfärbung der Proteine verbessert das Ergebnis in der Regel nicht (Terry et al., 2004; Moertz et al., 2001; Scheler et al., 1998; Zhu et al., 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zur Ausbeute nach In-Gel Verdau eines Standardproteins (CA) wurden nicht anhand der Sequenzabdeckung ermittelt, sondern nach differentieller Isotopenmarkierung von Peptiden, die während des Prozesses entstehen. Bei dieser Methode werden lediglich die Peptide berücksichtigt, welche in allen Proben in ausreichender Menge detektierbar sind. Nachdem die Signalintensität mit der Anzahl detektierter Peptide korreliert, ergibt sich zwangsweise bei niedrigerer Intensität auch eine Verringerung der Sequenzabdeckung. Analog zu den Ergebnissen der zweiten Gruppe von Forschern (s.o.) reduziert sich die Peptidausbeute nach Silberfärbung um etwa 40% (vgl. Kapitel 6.6.1, S. 112).

Um die Anzahl detektierter Peptide zu erhöhen, wird ebenfalls die Durchführung eines Entfärbeschrittes vor dem In-Gel Verdau vorgeschlagen (Gharahdaghi et al., 1999; Sumner et al., 2002). Die Verfahren beinhalten die Oxidation von metallischem Silber sowie Resten von Formaldehyd mit Hilfe von Kaliumhexacyanoferrat oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nachfolgend werden die freiwerdenden Schwermetallionen mit Natriumthiosulfat komplexiert. Nach Entfärbung der Banden wird, wie ebenfalls mehrfach beobachtet, keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt.

Hauptgrund für die verringerte Ausbeute ist wahrscheinlich die Modifikation der Lys-Seitenketten während der Silberfärbung. In einer Nebenreaktion können Aldehyde (z. B. Glutaraldehyd), die in der Entwicklerlösung zur Reduktion der Ag-Ionen dienen, mit den Seitenketten bestimmter Aminosäuren (v. a. Lys und Cys) reagieren. Nach der Modifikation sind die Schnittstellen für die Protease partiell nicht mehr zugänglich (Rabilloud, 1990). Ein unvollständiger Verdau ist die Folge. Zusätzlich wird die Extraktion der Peptide aus dem Gel eingeschränkt, da es über Methylenbrücken zur Verknüpfung zwischen zwei benachbarten Lys-Resten kommen kann (Abb. 37). Die irreversible Quervernetzung fixiert die Proteine im Gel. Wegen der hohen Reaktivität von Glutaraldehyd wird dieses in Protokollen zur Silberfärbung, welche als kompatibel zu In-Gel Verdau und massenspektrometrischer Analyse gelten, durch Formaldehyd ersetzt (Shevchenko et al., 1996; Moertz et al., 2001; Moertz et al., 2001). Dies bewirkt jedoch lediglich eine Verlangsamung der *Crosslinking*-Reaktion. Da sich der Prozess nach Abschluss des Färbvorgangs fortsetzt, ergibt sich eine deutlich höhere Peptidausbeute aus Gelen, die direkt nach der Färbung prozessiert werden (Richert et al., 2004).



**Abb. 37: Kovalente Verbindung von Lysin Seitenketten während der Silberfärbung**

In Reaktion 1 wird durch den nukleophilen Angriff des Elektronenpaares der  $\epsilon$ -Aminogruppe an der Seitenkette von Lysin (Lys1) auf den Carbonylkohlenstoff von Formaldehyd ein Imin (Schiff'sche Base) gebildet. Dabei wird Wasser freigesetzt. Die Iminbildung ist unter neutralen Bedingungen bereits möglich, wird aber in saurer Lösung durch die Aktivierung des Carbonylkohlenstoffs begünstigt. Nach dem gleichen Reaktionsmechanismus läuft Reaktion 2 ab. Die kovalente Verknüpfung der Schiff'schen Base mit der Aminogruppe eines zweiten benachbart gelegenen Lysin (Lys2) führt schließlich zur Vernetzung der beiden Lysine über die Ausbildung einer Methylenbrücke ( $-\text{CH}_2-$ ).

Trotz der Probleme, die eine Färbung von Proteinen mit Silber mit sich bringt, wird sie aufgrund ihrer hohen Sensitivität häufig verwendet. Im Vergleich zu CBB, ist die Sensitivität der Silberfärbung um bis zu 100-fach höher (Rabilloud, 1990; Shevchenko et al., 1996).

Folglich werden mit der Silberfärbung auch niedrig abundante Proteine als deutliche Spots visualisiert und für die nachfolgende MS-Analyse ausgewählt, die in der CBB-Färbung nicht auftauchen. Mit dem wesentlich geringeren Proteingehalt dieser Spots sinkt jedoch gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit der Detektion von Peptiden im MS. Folglich könnte man argumentieren, dass nicht die Silberfärbung *per se* inkompatibel mit der massenspektrometrischen Analyse ist, sondern die Proteinmenge zur Detektion nicht ausreicht. Das Detektionslimit der Silberfärbung liegt, je nach verwendetem Färbeverfahren, zwischen 0.5 und 5 ng Protein (Heukeshoven et al., 1985; Shevchenko et al., 1996). Bei einem Protein von 50 kDa Masse entspricht dies einem Detektionslimit von 10-100 fmol. Diese Mengen sollten mit den heutigen Massenspektrometern jedoch problemlos detektierbar sein.

### 7.7.2 Reduktion und Alkylierung von Proteinen im Elektrophoresegel

Um eine optimale Denaturierung der Proteine für die elektrophoretische Trennung zu erreichen, enthält bereits der Solubilisierungspuffer ein Reduktionsmittel (hier  $\beta$ -Mercaptoethanol). Die alleinige Reduktion der Disulfidbrücke zu SH-Gruppen reicht jedoch aufgrund ihrer hohen Reaktivität nicht aus. Speziell in basischem Milieu, z. B. unter den Bedingungen des In-Gel Verdau (pH 8.0 - 8.5), wird die erneute Bildung von intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken begünstigt, da die Thiolgruppe bevorzugt deprotoniert vorliegt. In den konventionellen Protokollen zum In-Gel Verdau schließt sich deshalb an die Entfärbung der Proteine die Reduktion der Disulfidbrücken und nachfolgend die irreversible Alkylierung der SH-Gruppen an. Dabei entsteht Carboxyamidomethylcystein (CAM-Cys). Bei der klassischen 2D-PAGE findet die R&A grundsätzlich zwischen den beiden elektrophoretischen Trennverfahren statt. Da es sich um einen irreversiblen Prozess handelt, ist hier ein zusätzlicher R&A-Schritt während des In-Gel Verdau überflüssig.

Für einen Grossteil der Proteine bringt die Reduktion & Alkylierung weder qualitativ noch quantitativ eine deutliche Erhöhung der Peptidausbeute (Speicher et al., 2000; Shevchenko et al., 2001; Havlis et al., 2003; Borchers et al., 2000). Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Die Alkylierung garantiert nicht *per se* die Detektierbarkeit der modifizierten Peptide. Die durch die Reaktion notwendigen zusätzlichen Prozessierungsschritte können im Gegenteil auch zu Verlusten an Probenmaterial führen. Zusätzlich erhöht sich das Risiko einer Kontamination mit Keratin. Ein weiterer Grund liegt in der Seltenheit der Aminosäure Cystein. Eine Analyse des Gesamtproteoms von *A. thaliana* ergibt, dass lediglich etwa 20% der Peptide, die sich im relevanten Massenbereich für die MS-Analyse befinden, ein Cystein enthalten. Im



Umkehrschluss bedeutet dies, dass 80% der Peptide ohne den Prozess der Reduktion & Alkylierung isoliert werden können.

Bei der Vielfalt an unterschiedlichen Proteinen gibt es jedoch immer wieder Fälle, bei denen eine R&A notwendig sein kann. Dazu gehören Proteine mit einer Vielzahl an intramolekularen Disulfidbrücken, deren kompakte Tertiärstruktur die Zugänglichkeit der Schnittstellen einschränkt. Die Modifikation erhöht somit die Wahrscheinlichkeit einer Identifikation des Proteins durch eine Erhöhung der Sequenzabdeckung (Hale et al., 2004; Katayama et al., 2004). Die maximal erreichbare Ausbeute an unterschiedlichen Peptiden spielt vor allem bei der Proteinidentifikation über den PMF eine entscheidende Rolle. Mit der Anzahl an Peptidmassen steigt äquivalent die Signifikanz des Datenbankergebnisses. Im Fall der Proteinidentifikation über *de novo* sequenzierte Peptide ist eine maximale Sequenzabdeckung weniger entscheidend, da in der Regel bereits zwei Peptide „mittlerer Länge“ für einen eindeutigen Treffer in der Datenbank ausreichen.

Eine quantitative Alkylierung der Cysteine wird während des In-Gel Verdau praktisch nicht erreicht. Während der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine werden die Cysteine zum Teil durch freie Acrylamid-Monomere modifiziert. Die Modifikation kann selbst dann stattfinden, wenn das Cystein Bestandteil einer Disulfidbrücke ist (Hamdan et al., 2001; Mineki et al., 2002). Die dabei entstehenden Acrylamid-Addukte sind irreversibel an die Cysteine gebunden. Analog zu CAM-Cys kann diese Modifikation ebenfalls in PMF gestützten Datenbanksuchen implementiert werden. Um eine heterogene Alkylierung zu vermeiden und damit die Spektren übersichtlicher zu gestalten, sowie die Zuordnung der Signale zu vereinfachen, empfiehlt es sich die Reduktion und Alkylierung bereits vor der elektrophoretischen Trennung der Proteine durchzuführen (Sechi et al., 1998; Herbert et al., 2001). Die Versuche in dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine Verlagerung des R&A-Schrittes vor die SDS-PAGE zu optimalen Peptidausbeuten bei Proteinen mit internen Disulfidbrücken führt. Um eine Denaturierung der Proteine vor der SDS-PAGE zu gewährleisten, enthält der SDS-Probenpuffer zum Beladen der Gele grundsätzlich ein Reduktionsmittel. Die Alkylierung lässt sich somit ohne großen Aufwand anschließen. Störende Reste der Reagenzien werden in der nachfolgenden Gelelektrophorese abgetrennt.

### **7.7.3 Zeitbedarf für den In-Gel Verdauprozess – Theorie und Praxis**

Der Zeitbedarf für den tryptischen In-Gel Verdau hängt von verschiedenen Faktoren ab. Nach der Gelelektrophorese befinden sich die Proteine eingebettet in der Polyacrylamidmatrix. Folglich muss die Protease in das Netzwerk eindringen, um den In-Gel Verdau zu realisieren. Durch die extreme Zerkleinerung des Gels im optimierten Verdauprotokoll (Methoden)

reduziert sich die Diffusionsstrecke. Dies erleichtert sowohl den Transport des Enzyms zu den im Gel fixierten Proteinen als auch die nachfolgende Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix. Kleine Enzymmoleküle (z. B. Trypsin, 23.5 kDa) eignen sich deshalb besser zum In-Gel Verdau als große Enzymmoleküle (z. B. Thermolysin, 35 kDa) (Bark et al., 2001).

In der Literatur wird das optimale Verhältnis von Enzym zu Substrat im Fall von Trypsin mit 1:20 bis 1:50 angegeben. Zur Vereinfachung wird hierbei die Menge an zu verdauendem Protein als Wert für das Substrat herangezogen. Exakter wäre es jedoch die Enzymmenge auf die Anzahl der Schnittstellen pro Proteinmolekül zu beziehen. So benötigt der quantitative Verdau der gleichen Menge eines Proteins mit einer geringen Anzahl an Schnittstellen deutlich weniger Enzym als ein Protein mit vielen Schnittstellen. Die Problematik wird anhand eines Beispiels deutlich. Wird eine Gesamtmenge von 8.5 pmol (= 200 ng) Trypsin zum Verdau von 10 pmol (= 290 ng) CA eingesetzt, so ergibt sich ein Verhältnis von Enzym zu Substrat von  $\sim 1:1.2$ . Bei diesem Verhältnis ist ein hoher Grad an Eigenverdau zu erwarten. Das Substrat des Enzyms ist jedoch nicht das Protein an sich, sondern vielmehr die Anzahl an darin enthaltenen Schnittstellen, die vom Enzym erkannt werden (hier: Arg und Lys). Im Fall von CA sind insgesamt 27 Schnittstellen (9 x Arg und 18 x Lys) enthalten. Damit ergibt sich ein deutlich anderes Verhältnis von Enzym zu Substrat von  $\sim 1:30$ .

In der Praxis ist das Zielprotein meist jedoch nicht bekannt. Zudem ist eine genaue Quantifizierung der Proteinmenge einer Gelbande kaum möglich. Deshalb wird zum In-Gel Verdau in der Regel eine Standardmenge an Enzym zugesetzt, von der bekannt ist, dass sie über einen weiten Bereich verschieden konzentrierter Proteinbanden positive Ergebnisse liefert. Diese liegt meist zwischen 100 und 200 ng (4.25-8.5 pmol) Trypsin.

Um den Eigenverdau zu begrenzen, werden bei erkennbar schwach konzentrierten Banden deshalb oft geringere Mengen an Enzym eingesetzt. Dies verlängert jedoch die benötigte Verdauzeit, da aufgrund der Enzymkinetik im Vergleich für niedrig konzentrierte Proben eine größere Menge an Enzym benötigt wird, um in der selben Zeit die gleiche Ausbeute an Reaktionsprodukten zu erhalten (Finehout et al., 2003). Bei einem ähnlichen Anteil von Enzym und Substrat kann der Prozess des In-Gel Verdaus erheblich beschleunigt werden (Havlis et al., 2003).

Ist das Zielprotein vollständig abgebaut, so fungiert das Enzym selbst als Substrat. Die Eigenverdausignale der Protease können, speziell bei Proben mit geringer Substratmenge oder bei einer hohen Konzentration an Enzym, zu einer Unterdrückung von Peptidsignalen des Zielproteins führen. Um die Intensität der Eigenverdausignale zu begrenzen, wird in den konventionellen Protokollen zum In-Gel Verdau der Überstand, welcher die vom Gel nicht

absorbierten Enzymmenge enthält, nach einer Inkubationszeit von maximal 45 min entfernt. Beim Einsatz von Analysetechnologien mit einer hohen dynamischen Spannbreite zur Detektion oder bei vorheriger chromatographischer Trennung des Peptidgemisches (LC-MS) tritt die Problematik der Signalunterdrückung durch intensive Autolysesignale der Protease allerdings nur bedingt auf (Havlis et al., 2003).

Ein weiterer Faktor ist die Geschwindigkeit der Enzymreaktion. Diese wird durch die Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) bestimmt. Die Wechselzahl ist ein Maß für die maximale Anzahl an Substratmolekülen, die von einem aktiven Zentrum pro Zeiteinheit umgesetzt werden. Voraussetzung für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist die Sättigung mit Substrat und optimale äußere Bedingungen (Temperatur, pH, Pufferbedingungen etc.).

$K_{\text{cat}}$  beträgt im Fall von modifiziertem Trypsin (Fa. Promega) bei 37°C 0.44/s und bei 48°C 0.48/s. Dies bedeutet, dass bei 37°C für die Spaltung einer Peptidbindung etwa 2.3 s benötigt werden. Bei Erhöhung der Temperatur auf ca. 50°C verringert sich der Zeitbedarf geringfügig um 0.2 s auf etwa 2.1 s. Zur Veranschaulichung der Umsetzungsgeschwindigkeit wird im Folgenden der theoretische Zeitbedarf zur quantitativen Umsetzung von 10 pmol CA erläutert. Die Menge von 10 pmol CA ergibt bei 27 Trypsinschnittstellen 270 pmol Substrat. Würden zum Verdau 8.25 pmol Trypsin eingesetzt, so kämen auf ein Enzymmolekül ca. 33 Schnittstellen. Der gesamte Verdau würde somit unter optimalen Bedingungen bei 37°C ca. 1 ¼ min dauern. Bei Erhöhung der Temperatur auf 50°C verkürzt sich die Zeit theoretisch um weitere 6 s. Hierbei handelt es sich um eine vereinfachte Betrachtungsweise, da die Substratsättigung nicht über die gesamte Prozessdauer gegeben ist, keine Diffusionszeit berechnet wurde etc. Die Rechnung soll lediglich veranschaulichen, welche Verdaueiten unter optimalen Bedingungen möglich wären. Fazit ist, dass die Geschwindigkeit der Enzymreaktion kaum einen Einfluss auf die Dauer des Verdauprozesses haben sollte.

### **7.7.4 Zusätzliche Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix**

Die Peptidextraktion wird im OVP ohne Verwendung saurer Lösungen bzw. den Zusatz von organischen Lösungsmitteln (ACN) durchgeführt. Die Hauptmenge an Peptid wird bereits im ersten Schritt extrahiert. Zusätzliche Extraktionen verbessern die Peptidausbeute zusammengenommen nur etwa um 5-10% (Speicher et al., 2000). Dabei handelt es sich jedoch um einen Durchschnittswert. Die Intensitäten der einzelnen Peptide nach Durchführung der zweiten Extraktion können erheblich schwanken, hier von -10% bis zu +20%. In der Regel erweist sich die im Verdau puffern extrahierte Menge an Peptiden als ausreichend für eine erfolgreiche Detektion des in der Gelbande enthaltenen Proteins. Für die Identifikation eines Proteins ist jedoch weniger die Intensitätszunahme einzelner Peptide

entscheidend, sondern vielmehr die Detektion einer möglichst großen Anzahl an Peptiden. Folglich kann bei Proben, die sehr geringe Proteinmengen enthalten, die Durchführung einer zweiten Extraktion notwendig werden, um die Detektion zusätzlicher Peptide zu ermöglichen, die zuvor unterhalb der Detektionsgrenze lagen.

Wie erklärt sich jedoch die lediglich geringe Steigerung der Ausbeuten durch die Durchführung zusätzlicher Extraktionsschritte? Mit dem entwickelten Reaktionsgefäß können definierte Probenmengen aus einer Gelbande entnommen und damit das Gelvolumen im Prozess reduziert werden. Ein mit OMX-S<sup>®</sup> aus einem 0.75 mm dicken Gel gestochenes Gelstück hat ein Volumen von etwa 2 µl. Der Verdau der Proteine und die Extraktion der resultierenden Peptide wird simultan in 20 µL Puffervolumen durchgeführt. Grundsätzlich würde ein Gelvolumen von 2 µl nur wenige Mikroliter Puffer benötigen, um komplett mit Lösung bedeckt zu sein. Beim In-Gel Verdau nach dem OVP wird jedoch ein verhältnismäßig großes Puffervolumen verwendet. Es entstehen zwei flüssigkeitsgefüllte Räume, das Gelvolumen (2 µl) und das Puffervolumen (20 µl). Das Verhältnis beträgt etwa 1:10. Die während des Verdauprozesses entstehenden Peptide diffundieren aus der Gelmatrix in den umgebenden Puffer und umgekehrt. Dabei verteilen sie sich gleichmäßig auf beide Flüssigkeitsräume. Folglich befinden sich etwa 90% der Peptide im Verdau-puffer, der gleichzeitig auch die erste Extraktionslösung darstellt. Die verbleibenden 10% können in zusätzlichen Extraktionsschritten gewonnen werden (vgl. Kapitel 6.6.4, S. 123).

### 7.7.5 Detektionsgrenzen

Messungen von isolierten Peptiden bis in den attomol-Bereich sind technisch bereits seit langem möglich (Emmett et al., 1994; Vorm et al., 1994). Derart niedrige Konzentrationen wurden sowohl mit MALDI- als auch mit ESI-MS erreicht und das, obwohl die MALDI-Technik als etwa 10-fach sensitiver gilt. In der Praxis wird diese Sensitivität bei der Identifikation von Proteinen nach PAGE in der Regel nicht erreicht. Das Problem ist hier nicht die mangelnde Sensitivität des MS, sondern die hohen Verluste an Analytmolekülen während Probenvorbereitung und MS-Analyse. Die geringen Mengen an Peptiden, die den Detektor erreichen sind dabei oft kaum noch aus dem chemischen Hintergrundrauschen herauszufiltern (Shevchenko et al., 1996).

Im Vergleich zum Verdau in Lösung liefert der In-Gel Verdau qualitativ vergleichbare Peptide (Jeno et al., 1995). Im Gegensatz dazu beträgt die quantitative Ausbeute an Analytmolekülen ca. 70-80% der zu erwartenden Gesamtmenge an Peptid (Speicher et al., 2000). Dies ist anhand von Modellproteinen belegt worden. In der Praxis wird deutlich, dass die Ausbeute wahrscheinlich wesentlich geringer ist. Dabei wird der Verlust an Protein/Peptid

sehr uneinheitlich beziffert. Er schwankt stark in Abhängigkeit von den Eigenschaften und der zur Verfügung stehenden Menge an Protein. Durchschnittlich wird von einem Verlust von 50% - 80% ausgegangen, zwischen der Menge an Protein, die auf das Gel geladen wurde und der Menge an Peptid, die nach der Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse im MS zur Verfügung steht (Jeno et al., 1995; Shevchenko et al., 1996; Stewart et al., 2001). Der Verlust an Protein bzw. Peptid akkumuliert sich mit jedem Schritt des verwendeten Protokolls. Typische Ursachen für Verluste sind, die partielle Extraktion der Proteine in den multiplen Waschschrritten während des Gesamtprozesses, die Adsorption der Peptide an Oberflächen von Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen, die unvollständige Resolubilisierung nach der Vakuumtrocknung sowie die unvollständige Extraktion nach dem Verdauprozess (Speicher et al., 2000; Stewart et al., 2001). Trotz Minimierung der Verluste auf der Ebene des In-Gel Verdaus ist die Detektion eines Peptides aufgrund seiner unterschiedlichen Ionisierungseigenschaften nicht gewährleistet.

Zum Abschluss lässt sich feststellen, dass während des konventionellen In-Gel Verdaus multiple Trocknungs- und Rehydrierungsschritte der Gelstücke durchgeführt werden, um organisches Lösungsmittel (ACN) zu entfernen, das im Protokoll z. B. zur Entfärbung der Gelbanden oder zur Extraktion der Peptide eingesetzt wird. Im OVP erweist sich die Durchführung der Schritte in der beschriebenen Form als nicht notwendig und der Einsatz von ACN damit als überflüssig.

## 8 Literaturverzeichnis

**Abdallah, F., Salamini, F. and Leister, D. (2000).** A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **5**, 141-2

**Albertsson, P. (2001).** A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends Plant Sci* **6**, 349-58

**Allen, J.F. (1992).** Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1098**, 275-335

**Allred, D.R. and Staehelin, L.A. (1985).** Lateral Distribution of the Cytochrome b(6)/f and Coupling Factor ATP Synthetase Complexes of Chloroplast Thylakoid Membranes. *Plant Physiol* **78**, 199-202

**Allred, D.R. and Staehelin, L.A. (1986).** Implications of cytochrome b6/f location for thylakoidal electron transport. *J Bioenerg Biomembr* **18**, 419-36

**Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10

**Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402

**Amad, M.H., Cech, N.B., Jackson, G.S. and Enke, C.G. (2000).** Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *J Mass Spectrom* **35**, 784-9

**Andersson, J., Walters, R.G., Horton, P. and Jansson, S. (2001).** Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: implications for the mechanism of protective energy dissipation. *Plant Cell* **13**, 1193-204

**Appel, R.D., Bairoch, A. and Hochstrasser, D.F. (1994).** A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem Sci* **19**, 258-60

**Arkin, I.T. and Brunger, A.T. (1998).** Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim Biophys Acta* **1429**, 113-28

**Aro, E.M., Rokka, A. and Vener, A.V. (2004).** Determination of phosphoproteins in higher plant thylakoids. *Methods Mol Biol* **274**, 271-85

**Aro, E.M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N. and Rintamaki, E. (2005).** Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J Exp Bot* **56**, 347-56

**Asara, J.M., Zhang, X., Zheng, B., Christofk, H.H., Wu, N. and Cantley, L.C. (2006).** In-Gel Stable-Isotope Labeling (ISIL): a strategy for mass spectrometry-based relative quantification. *J Proteome Res* **5**, 155-63

**Baginsky, S., Kleffmann, T., von Zychlinski, A. and Gruissem, W. (2005).** Analysis of

shotgun proteomics and RNA profiling data from *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *J Proteome Res* **4**, 637-40

**Bagshaw, R.D., Callahan, J.W. and Mahuran, D.J. (2000).** Desalting of in-Gel-digested protein sample with mini-C18 columns for matrix-assisted laser desorption ionization time of flight peptide mass fingerprinting. *Anal Biochem* **284**, 432-5

**Bansal, M.P., Cook, R.G., Danielson, K.G. and Medina, D. (1989).** A 14-kilodalton selenium-binding protein in mouse liver is fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* **264**, 13780-4

**Barber, J. (2006).** Photosystem II: an enzyme of global significance. *Biochem Soc Trans* **34**, 619-31

**Bark, S.J., Muster, N., Yates, J.R. 3rd and Siuzdak, G. (2001).** High-temperature protein mass mapping using a thermophilic protease. *J Am Chem Soc* **123**, 1774-5

**Barnidge, D.R., Dratz, E.A., Jesaitis, A.J. and Sunner, J. (1999).** Extraction method for analysis of detergent-solubilized bacteriorhodopsin and hydrophobic peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* **269**, 1-9

**Bassi, R. and Dainese, P. (1992).** A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem- II membranes. *Eur J Biochem* **204**, 317-26

**Bassi, R., Hoyer-Hansen, G., Barbato, R., Giacometti, G.M. and Simpson, D.J. (1987).** Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system. *J Biol Chem* **262**, 13333-41

**Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. (1997).** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**, 20313-6

**Biemann, K. (1990).** Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol* **193**, 886-7

**Biemann, K., Cone, C., Webster, B.R. and Arsenault, G.P. (1966).** Determination of the amino acid sequence in oligopeptides by computer interpretation of their high-resolution mass spectra. *J Am Chem Soc* **88**, 5598-606

**Bienvenut, W.V., Deon, C., Pasquarello, C., Campbell, J.M., Sanchez, J.C., Vestal, M.L. and Hochstrasser, D.F. (2002).** Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins. *Proteomics* **2**, 868-76

**Bisle, B. (2000).** Diplomarbeit an der biologischen Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität München.

**Black, S.D. and Mould, D.R. (1991).** Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post- or cotranslational modifications. *Anal Biochem* **193**, 72-82

**Blenis, J. and Resh, M.D. (1993).** Subcellular localization specified by protein acylation and phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 984-9

**Blonder, J., Conrads, T.P., Yu, L.R., Terunuma, A., Janini, G.M., Issaq, H.J., Vogel, J.C. and Veenstra, T.D. (2004).** A detergent- and cyanogen bromide-free method for integral

membrane proteomics: application to Halobacterium purple membranes and the human epidermal membrane proteome. *Proteomics* **4**, 31-45

**Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-9

**Boekema, E.J., van Roon, H., Calkoen, F., Bassi, R. and Dekker, J.P. (1999).** Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry* **38**, 2233-9

**Boekema, E.J., Van Roon, H., Van Breemen, J.F. and Dekker, J.P. (1999).** Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur J Biochem* **266**, 444-52

**Borchers, C., Peter, J.F., Hall, M.C., Kunkel, T.A. and Tomer, K.B. (2000).** Identification of in-Gel digested proteins by complementary peptide mass fingerprinting and tandem mass spectrometry data obtained on an electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Anal Chem* **72**, 1163-8

**Bowie, J.U. (1997).** Helix packing in membrane proteins. *J Mol Biol* **272**, 780-9

**Braun, R.J., Kinkl, N., Beer, M. and Ueffing, M. (2007).** Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem*

**Bricker, T.M. (1990).** The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in Photosystem II. *Photosynthesis Research* **24**, 1-13

**Brugiere, S., Kowalski, S., Ferro, M., Seigneurin-Berny, D., Miras, S., Salvi, D., Ravanel, S., d'Herin, P., Garin, J., Bourguignon, J., Joyard, J. and Rolland, N. (2004).** The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from Arabidopsis cell suspensions. *Phytochemistry* **65**, 1693-707

**Bruins, A.P., Covey, T.R. and Henion, J.D. (1987).** Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **59**, 2642-6

**Buchel, C., Barber, J., Ananyev, G., Eshaghi, S., Watt, R. and Dismukes, C. (1999).** Photoassembly of the manganese cluster and oxygen evolution from monomeric and dimeric CP47 reaction center photosystem II complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14288-93

**Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P.G. (2004).** Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327-33

**Carroll, J., Altman, M.C., Fearnley, I.M. and Walker, J.E. (2007).** Identification of membrane proteins by tandem mass spectrometry of protein ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14330-5

**Castellanos-Serra, L., Ramos, Y. and Huerta, V. (2005).** An in-Gel digestion procedure that facilitates the identification of highly hydrophobic proteins by electrospray ionization-mass spectrometry analysis. *Proteomics* **5**, 2729-38

**Cech, N.B. and Enke, C.G. (2001).** Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev* **20**, 362-87



- Chakraborty, A. and Regnier, F.E. (2002).** Global internal standard technology for comparative proteomics. *J Chromatogr A* **949**, 173-84
- Che, F.Y. and Fricker, L.D. (2002).** Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Anal Chem* **74**, 3190-8
- Chial, H.J. and Splittgerber, A.G. (1993).** A comparison of the binding of Coomassie brilliant blue to proteins at low and neutral pH. *Anal Biochem* **213**, 362-9
- Chitnis, P.R. (1996).** Photosystem I. *Plant Physiol* **111**, 661-9
- Chitnis, P.R. and Thornber, J.P. (1988).** The major light-harvesting complex of photosystem II: aspects of its molecular and cell biology. *Photosynth. Res.* **16**, 41-63
- Choudhary, G., Wu, S.L., Shieh, P. and Hancock, W.S. (2003).** Multiple enzymatic digestion for enhanced sequence coverage of proteins in complex proteomic mixtures using capillary LC with ion trap MS/MS. *J Proteome Res* **2**, 59-67
- Chowdhury, S.K., Eshraghi, J., Wolfe, H., Forde, D., Hlavac, A.G. and Johnston, D. (1995).** Mass spectrometric identification of amino acid transformations during oxidation of peptides and proteins: modifications of methionine and tyrosine. *Anal Chem* **67**, 390-8
- Cindric, M., Cepo, T., Skrlin, A., Vuletic, M. and Bindila, L. (2006).** Accelerated on-column lysine derivatization and cysteine methylation by imidazole reaction in a deuterated environment for enhanced product ion analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**, 694-702
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K. (1977).** Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* **252**, 1102-6
- Cole, R.B. (2000).** Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **35**, 763-72
- Consoli, L. and Damerval, C. (2001).** Quantification of individual zein isoforms resolved by two-dimensional electrophoresis: genetic variability in 45 maize inbred lines. *Electrophoresis* **22**, 2983-9
- Corradini, D., Huber, C.G., Timperio, A.M. and Zolla, L. (2000).** Resolution and identification of the protein components of the photosystem II antenna system of higher plants by reversed-phase liquid chromatography with electrospray-mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* **886**, 111-21
- Cottrell, J.S. (1994).** Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept Res* **7**, 115-24
- Courchesne, P.L., Luethy, R. and Patterson, S.D. (1997).** Comparison of in-Gel and on-membrane digestion methods at low to sub-pmol level for subsequent peptide and fragmentation mass analysis using matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* **18**, 369-81
- Covey, T.R., Bonner, R.F., Shushan, B.I. and Henion, J. (1988).** The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2**, 249-56

- Crouchman, S., Ruban, A. and Horton, P. (2006).** PsbS enhances nonphotochemical fluorescence quenching in the absence of zeaxanthin. *FEBS Lett* **580**, 2053-8
- Davies, K.J. (1987).** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* **262**, 9895-901
- de Hoffmann, E. (1996).** Tandem mass spectrometry: A primer. *Journal of Mass Spectrometry* **31**, 129-37
- De Luca, C., Varotto, C., Svendsen, I., Polverino De Laureto, P. and Bassi, R. (1999).** Multiple light-harvesting II polypeptides from maize mesophyll chloroplasts are distinct gene products. *J Photochem Photobiol B* **49**, 50-60
- Deisenhofer, J. and Michel, H. (1989).** The Photosynthetic Reaction Center from the Purple Bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Science* **245**, 1463-73
- Dekker, J.P. and Boekema, E.J. (2005).** Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* **1706**, 12-39
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M. and Adams, W.W. 3rd (1996).** Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J* **10**, 403-12
- DeSantis, G. and Jones, J.B. (1999).** Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 324-30
- Deshusses, J.M., Burgess, J.A., Scherl, A., Wenger, Y., Walter, N., Converset, V., Paesano, S., Corthals, G.L., Hochstrasser, D.F. and Sanchez, J.C. (2003).** Exploitation of specific properties of trifluoroethanol for extraction and separation of membrane proteins. *Proteomics* **3**, 1418-24
- Devreese, B., Vanrobaeys, F., Smet, J., Van Beeumen, J. and Van Coster, R. (2002).** Mass spectrometric identification of mitochondrial oxidative phosphorylation subunits separated by two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 2525-33
- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D. and Alice, M.B. (1968).** *Molecular Beams of Macroions*. **49**, 2240
- Dongré, A.R., Jones, J.L., Somogyi, A. and Wysocki, V.H. (1996).** Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8365-74
- Doucette, A., Craft, D. and Li, L. (2003).** Mass spectrometric study of the effects of hydrophobic surface chemistry and morphology on the digestion of surface-bound proteins. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**, 203-14
- Ehring, H., Stromberg, S., Tjernberg, A. and Noren, B. (1997).** Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins extracted directly from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. *Rapid Commun Mass Spectrom* **11**, 1867-73
- Eichacker, L. and Müller, B. (2002).** Verfahren zur Erhöhung der Trennschärfe bei der mehrdimensionalen Elektrophorese oder der mehrdimensionalen isoelektrischen Fokussierung. DE 101 19 597 A1

**Eichacker, L.A., Granvogl, B., Mirus, O., Muller, B.C., Miess, C. and Schleiff, E. (2004).** Hiding behind hydrophobicity. Transmembrane segments in mass spectrometry. *J Biol Chem* **279**, 50915-22

**Eichacker, L.A., Helfrich, M., Rudiger, W. and Muller, B. (1996).** Stabilization of chlorophyll a-binding apoproteins P700, CP47, CP43, D2, and D1 by chlorophyll a or Zn-*pheophytin a*. *J Biol Chem* **271**, 32174-9

**Elder, J.H., Pickett, R.A. 2nd, Hampton, J. and Lerner, R.A. (1977).** Radioiodination of proteins in single polyacrylamide gel slices. Tryptic peptide analysis of all the major members of complex multicomponent systems using microgram quantities of total protein. *J Biol Chem* **252**, 6510-5

**Elrad, D., Niyogi, K.K. and Grossman, A.R. (2002).** A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation. *Plant Cell* **14**, 1801-16

**Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (2000).** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-16

**Emmett, M.R. and Caprioli, R.M. (1994).** Micro-electrospray mass spectrometry: ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 605-13

**Eng, J.K., McCormack, A.L. and Yates, I.J.R. (1994).** An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 976-89

**Engelman, D.M., Steitz, T.A. and Goldman, A. (1986).** Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **15**, 321-53

**Ephritikhine, G., Ferro, M. and Rolland, N. (2004).** Plant membrane proteomics. *Plant Physiol Biochem* **42**, 943-62

**Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Lacomis, L., Grewal, A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Carr, S.A. and Tempst, P. (1998).** Examination of micro-tip reversed-phase liquid chromatographic extraction of peptide pools for mass spectrometric analysis. *J Chromatogr A* **826**, 167-81

**Farah, M.A., Bose, S., Lee, J.H., Jung, H.C. and Kim, Y. (2005).** Analysis of glycosylated insulin by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **1725**, 269-82

**Fazekas De St. Groth, S., Webster, R.G. and Datyner, A. (1963).** Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 377-91

**Feick, R.G. and Shiozawa, J.A. (1990).** A high-yield method for the isolation of hydrophobic proteins and peptides from polyacrylamide gels for protein sequencing. *Anal Biochem* **187**, 205-11

**Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M. (1989).** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71

- Ferro, M., Seigneurin-Berny, D., Rolland, N., Chapel, A., Salvi, D., Garin, J. and Joyard, J. (2000).** Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis* **21**, 3517-26
- Finehout, E.J., Cantor, J.R. and Lee, K.H. (2005).** Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin. *Proteomics* **5**, 2319-21
- Finehout, E.J. and Lee, K.H. (2003).** Comparison of automated in-gel digest methods for femtomole level samples. *Electrophoresis* **24**, 3508-16
- Fiévet, J., Dillmann, C., Lagniel, G., Davanture, M., Negroni, L., Labarre, J. and de Vienne, D. (2004).** Assessing factors for reliable quantitative proteomics based on two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **4**, 1139-49
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., Rudella, A., Sun, Q. and Wijk, K.J. (2004).** In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* **16**, 478-99
- Fromme, P. (1996).** Structure and function of photosystem I. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 473-84
- Gaskell, S.J. (1997).** Electrospray: Principles and Practice. *J. Mass Spectrom.* **32**, 677-88
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S. and Mische, S.M. (1999).** Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20**, 601-5
- Gomez, S.M., Nishio, J.N., Faull, K.F. and Whitelegge, J.P. (2002).** The chloroplast grana proteome defined by intact mass measurements from liquid chromatography mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **1**, 46-59
- Goodlett, D.R., Armstrong, F.B., Creech, R.J. and van Breemen, R.B. (1990).** Formylated peptides from cyanogen bromide digests identified by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Biochem* **186**, 116-20
- Gorman, G.S., Speir, J.P., Turner, C.A. and Amster, I.J. (1992).** Proton Affinities of the 20 Common  $\alpha$ -Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3581-4020
- Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, L.A., Gardstrom, P., Schroder, W. and Hurry, V. (2006).** The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. *Plant J* **47**, 720-34
- Granseth, E., von Heijne, G. and Elofsson, A. (2005).** A study of the membrane-water interface region of membrane proteins. *J Mol Biol* **346**, 377-85
- Granvogl, B., Gruber, P. and Eichacker, L.A. (2007).** Standardisation of rapid in-gel digestion by mass spectrometry. *Proteomics* **7**, 642-54
- Granvogl, B., Ploscher, M. and Eichacker, L.A. (2007).** Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Anal Bioanal Chem* **389**, 991-1002
- Granvogl, B., Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2006).** Mapping the proteome of

thylakoid membranes by de novo sequencing of intermembrane peptide domains. *Proteomics* **6**, 3681-95

**Griffiths, W.J., Jonsson, A.P., Liu, S., Rai, D.K. and Wang, Y. (2001).** Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J* **355**, 545-61

**Hale, J.E., Butler, J.P., Gelfanova, V., You, J.S. and Knierman, M.D. (2004).** A simplified procedure for the reduction and alkylation of cysteine residues in proteins prior to proteolytic digestion and mass spectral analysis. *Anal Biochem* **333**, 174-81

**Hamdan, M., Bordini, E., Galvani, M. and Righetti, P.G. (2001).** Protein alkylation by acrylamide, its N-substituted derivatives and cross-linkers and its relevance to proteomics: a matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry study. *Electrophoresis* **22**, 1633-44

**Hankamer, B., Barber, J. and Boekema, E.J. (1997).** Structure and Membrane Organization of Photosystem II in Green Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 641-71

**Hankamer, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E., Jansson, S. and Barber, J. (1997).** Isolation and characterization of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur. J. Biochem.* **243**, 422-9

**Harrer, R., Bassi, R., Testi, M.G. and Schafer, C. (1998).** Nearest-neighbor analysis of a photosystem II complex from *Marchantia polymorpha* L. (liverwort), which contains reaction center and antenna proteins. *Eur J Biochem* **255**, 196-205

**Harrison, A.G. (1997).** The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides. *Mass Spectrom Rev* **16**, 201-17

**Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M. and Shevchenko, A. (2003).** Fast-response proteomics by accelerated in-Gel digestion of proteins. *Anal Chem* **75**, 1300-6

**Heinemeyer, J., Eubel, H., Wehmhoner, D., Jansch, L. and Braun, H.P. (2004).** Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochemistry* **65**, 1683-92

**Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, J. and Heldin, C.H. (1995).** Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* **224**, 451-5

**Henriques, F. and Park, R.B. (1976).** Compositional characteristics of a chloroform/methanol soluble protein fraction from spinach chloroplast membranes. *Biochim Biophys Acta* **430**, 312-20

**Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C. and Watanabe, C. (1993).** Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5011-5

**Herbert, B., Galvani, M., Hamdan, M., Olivieri, E., MacCarthy, J., Pedersen, S. and Righetti, P.G. (2001).** Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how? *Electrophoresis* **22**, 2046-57

- Hervas, M., Navarro, J.A. and De La Rosa, M.A. (2003).** Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis. *Acc Chem Res* **36**, 798-805
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1985).** Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**, 103-12
- Hippler, M., Klein, J., Fink, A., Allinger, T. and Hoerth, P. (2001).** Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **28**, 595-606
- Hollemeyer, K., Heinzle, E. and Tholey, A. (2002).** Identification of oxidized methionine residues in peptides containing two methionine residues by derivatization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* **2**, 1524-31
- Horton, P. and Ruban, A. (2005).** Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J Exp Bot* **56**, 365-73
- Horton, P., Ruban, A.V. and Walters, R.G. (1996).** Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 655-84
- Hoshi, T. and Heinemann, S. (2001).** Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* **531**, 1-11
- Houmard, J. and Drapeau, G.R. (1972).** Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 3506-9
- Huber, C.G., Timperio, A.M. and Zolla, L. (2001).** Isoforms of photosystem II antenna proteins in different plant species revealed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Biol Chem* **276**, 45755-61
- Huber, C.G., Walcher, W., Timperio, A.M., Troiani, S., Porceddu, A. and Zolla, L. (2004).** Multidimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography-mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 3909-20
- Hufnagel, P., Schweiger, U., Eckerskorn, C. and Oesterhelt, D. (1996).** Electrospray ionization mass spectrometry of genetically and chemically modified bacteriorhodopsins. *Anal Biochem* **243**, 46-54
- Hunt, D.F., Yates, J.R. 3rd, Shabanowitz, J., Winston, S. and Hauer, C.R. (1986).** Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6233-7
- Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K. (1986).** Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiol* **81**, 802-6
- Iavarone, A.T., Jurchen, J.C. and Williams, E.R. (2000).** Effects of solvent on the maximum charge state and charge state distribution of protein ions produced by electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* **11**, 976-85
- Ikeuchi, M., Takio, K. and Inoue, Y. (1989).** N-terminal sequencing of photosystem II low-molecular-mass proteins. 5 and 4.1 kDa components of the O<sub>2</sub>-evolving core complex from higher plants. *FEBS Lett* **242**, 263-9

- Irrgang, K.D., Shi, L.X., Funk, C. and Schroder, W.P. (1995).** A nuclear-encoded subunit of the photosystem II reaction center. *J Biol Chem* **270**, 17588-93
- Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2004).** PSII-Tc protein plays an important role in dimerization of photosystem II. *Plant Cell Physiol* **45**, 1809-16
- Jackowski, G., Kacprzak, K. and Jansson, S. (2001).** Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of Photosystem II (LHC II). *Biochim Biophys Acta* **1504**, 340-5
- Jansson, S. (1994).** The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1184**, 1-19
- Jansson, S. (1999).** A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **4**, 236-40
- Jansson, S., Selstam, E. and Gustafsson, P. (1990).** The rapidly phosphorylated 25 kDa polypeptide of the light-harvesting complex of photosystem II is encoded by the type 2 cab-II genes. *Biochim Biophys Acta* **1019**, 110-4
- Jekel, P.A., Weijer, W.J. and Beintema, J.J. (1983).** Use of endoproteinase Lys-C from *Lysobacter* enzymogenes in protein sequence analysis. *Anal Biochem* **134**, 347-54
- Jeno, P., Mini, T., Moes, S., Hintermann, E. and Horst, M. (1995).** Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **224**, 75-82
- Jensen, O.N., Wilm, M., Shevchenko, A. and Mann, M. (1999).** Peptide sequencing of 2-DE gel-isolated proteins by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **112**, 571-88
- Jiang, L., He, L. and Fountoulakis, M. (2004).** Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A* **1023**, 317-20
- Jin, Y. and Manabe, T. (2005).** High-efficiency protein extraction from polyacrylamide gels for molecular mass measurement by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* **26**, 1019-28
- Jonsson, A.P. (2001).** Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell Mol Life Sci* **58**, 868-84
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W. and Krauss, N. (2001).** Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**, 909-17
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988).** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**, 2299-301
- Kashino, Y. (2003).** Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **797**, 191-216
- Katayama, H., Tabata, T., Ishihama, Y., Sato, T., Oda, Y. and Nagasu, T. (2004).** Efficient in-Gel digestion procedure using 5-cyclohexyl-1-pentyl-beta-D-maltoside as an additive for gel-based membrane proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 2388-94

- Kebarle, P. (2000).** A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **35**, 804-17
- Kelleher, N.L., Lin, H.J., Valaskovic, G.A., Aaserud, D.J. and Fridriksson, E.K.M.F.W. (1999).** Top down versus bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 806-12
- Kelly, M.A., Vestling, M.M., Fenselau, C.C. and Smith P.B. (1992).** Electrospray analysis of proteins: A comparison of positive-ion and negative-ion mass spectra at high and low pH. *Org. Mass Spectrom.* **27**, 1143-7
- Kieselbach, T., Bystedt, M., Hynds, P., Robinson, C. and Schroder, W.P. (2000).** A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the Arabidopsis chloroplast thylakoid lumen. *FEBS Lett* **480**, 271-6
- Kieselbach, T. and Schroder, W.P. (2003).** The proteome of the chloroplast lumen of higher plants. *Photosynth Res* **78**, 249-64
- Kim, S., Sandusky, P., Bowlby, N.R., Aebersold, R., Green, B.R., Vlahakis, S., Yocum, C.F. and Pichersky, E. (1992).** Characterization of a spinach psbS cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II. *FEBS Lett* **314**, 67-71
- Kitamura, K., Ozawa, S., Shiina, T. and Toyoshima, Y. (1994).** L protein, encoded by psbL, restores normal functioning of the primary quinone acceptor, QA, in isolated D1/D2/CP47/Cytb-559/I photosystem II reaction center core complex. *FEBS Lett* **354**, 113-6
- Kristensen, D.B., Imamura, K., Miyamoto, Y. and Yoshizato, K. (2000).** Mass spectrometric approaches for the characterization of proteins on a hybrid quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer. *Electrophoresis* **21**, 430-9
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-80
- Kuhlbrandt, W., Wang, D.N. and Fujiyoshi, Y. (1994).** Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**, 614-21
- Kyle, D.J., Staehelin, L.A. and Arntzen, C.J. (1983).** Lateral mobility of the light-harvesting complex in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants. *Arch Biochem Biophys* **222**, 527-41
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982).** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-32
- Kügler, M., Jänsch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K. and Braun H.P. (1997).** Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). *Photosynth Res* **53**, 35-44
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5
- Lagerwerf, F.M., van de Weert, M., Heerma, W. and Haverkamp, J. (1996).** Identification of oxidized methionine in peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* **10**, 1905-



- Lahm, H.W. and Langen, H. (2000).** Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis* **21**, 2105-14
- Lamppa, G.K. and Abad, M.S. (1987).** Processing of a wheat light-harvesting chlorophyll *a/b* protein precursor by a soluble enzyme from higher plant chloroplasts. *J Cell Biol* **105**, 2641-8
- Landolt-Marticorena, C., Williams, K.A., Deber, C.M. and Reithmeier, R.A. (1993).** Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J Mol Biol* **229**, 602-8
- Larsson, U.K., Sundby, C. and Andersson, B. (1987).** Characterization of two different subpopulations of spinach light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex (LHC II): Polypeptide composition, phosphorylation pattern and association with Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **894**, 59-68
- Lauber, W.M., Carroll, J.A., Dufield, D.R., Kiesel, J.R., Radabaugh, M.R. and Malone, J.P. (2001).** Mass spectrometry compatibility of two-dimensional gel protein stains. *Electrophoresis* **22**, 906-18
- Le Blanc, J.C.Y., Wang, J., Guevremont, R. and Siu, K.W.M. (1994).** Electrospray mass spectra of protein cations formed in basic solutions. *Org. Mass Spectrom.* **29**, 587-93
- le Maire, M., Deschamps, S., Moller, J.V., Le Caer, J.P. and Rossier, J. (1993).** Electrospray ionization mass spectrometry on hydrophobic peptides electroeluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis application to the topology of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase. *Anal Biochem* **214**, 50-7
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. (1996).** Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15036-40
- Li, X.P., Bjorkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S. and Niyogi, K.K. (2000).** A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**, 391-5
- Lilley, K.S. and Friedman, D.B. (2004).** All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics* **1**, 401-9
- Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M. and Yates, J.R. 3rd (1999).** Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **17**, 676-82
- Liu, Y., Engelman, D.M. and Gerstein, M. (2002).** Genomic analysis of membrane protein families: abundance and conserved motifs. *Genome Biol* **3**, research0054
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X. and Chang, W. (2004).** Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287-92
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. and Biesiadka, J. (2005).** Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **438**, 1040-4

- Lorkovic, Z.J., Schroder, W.P., Pakrasi, H.B., Irrgang, K.D., Herrmann, R.G. and Oelmuller, R. (1995).** Molecular characterization of PsbW, a nuclear-encoded component of the photosystem II reaction center complex in spinach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8930-4
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (1998).** *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag 323-68
- Mackintosh, J.A., Choi, H.Y., Bae, S.H., Veal, D.A., Bell, P.J., Ferrari, B.C., Van Dyk, D.D., Verrills, N.M., Paik, Y.K. and Karuso, P. (2003).** A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3**, 2273-88
- Mann, M., Hendrickson, R.C. and Pandey, A. (2001).** Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* **70**, 437-73
- Mann, M., Hojrup, P. and Roepstorff, P. (1993).** Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom* **22**, 338-45
- Mann, M. and Wilm, M. (1994).** Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem* **66**, 4390-9
- Marouga, R., David, S. and Hawkins, E. (2005).** The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* **382**, 669-78
- Melkozernov, A.N. and Blankenship, R.E. (2005).** Structural and functional organization of the peripheral light-harvesting system in photosystem I. *Photosynth Res* **85**, 33-50
- Merchant, S. and Sawaya, M.R. (2005).** The light reactions: a guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell* **17**, 648-63
- Merril, C.R. and Pratt, M.E. (1986).** A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates. *Anal Biochem* **156**, 96-110
- Merril, C.R. and Pratt, M.E. (1986).** A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates. *Anal Biochem* **156**, 96-110
- Michalski, W.P. and Shiell, B.J. (1999).** Strategies for analysis of electrophoretically separated proteins and peptides. *Anal. Chim. Acta* **383**, 27-46
- Michel, H., Griffin, P.R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Bennett, J. (1991).** Tandem mass spectrometry identifies sites of three post-translational modifications of spinach light-harvesting chlorophyll protein II. Proteolytic cleavage, acetylation, and phosphorylation. *J Biol Chem* **266**, 17584-91
- Michel, H., Hunt, D.F., Shabanowitz, J. and Bennett, J. (1988).** Tandem mass spectrometry reveals that three photosystem II proteins of spinach chloroplasts contain N-acetyl-O-phosphothreonine at their NH<sub>2</sub> termini. *J Biol Chem* **263**, 1123-30
- Mineki, R., Taka, H., Fujimura, T., Kikkawa, M., Shindo, N. and Murayama, K. (2002).** In situ alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* **2**, 1672-81

- Moertz, E., Krogh, T.N., Vorum, H. and Gorg, A. (2001).** Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **1**, 1359-63
- Moertz, E., Krogh, T.N., Vorum, H. and Gorg, A. (2001).** Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **1**, 1359-63
- Morishige, D.T. and Thornber J. P. ( 1992).** Identification and Analysis of a Barley cDNA Clone Encoding the 31-Kilodalton LHC IIa (CP29) Apoprotein of the Light -Harvesting Antenna Complex of Photosystem II. *Plant Pysiology* **98**, 238-45
- Morishige, D.T. and Thornber, J.P. ( 1994).** Identification of a novel light-harvesting complex II protein (LHC IIc'). *Photosynth. Res.* **39**, 33-8
- Moritz, B. and Meyer, H.E. (2003).** Approaches for the quantification of protein concentration ratios . *Proteomics* **3**, 2208-20
- Mortz, E., O'Connor, P.B., Roepstorff, P., Kelleher, N.L., Wood, T.D., McLafferty, F.W. and Mann, M. (1996).** Sequence tag identification of intact proteins by matching tandem mass spectral data against sequence data bases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8264-7
- Mullet, J.E. (1983).** The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *J Biol Chem* **258**, 9941-8
- Nanba, O. and Satoh, K. (1987).** Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 109-12
- Nelson, N. (1976).** Structure and function of chloroplast ATPase. *Biochim Biophys Acta* **456**, 314-38
- Nelson, N. and Ben-Shem, A. (2004).** The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 971-82
- Nelson, N. and Yocum, C.F. (2006).** Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 521-65
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988).** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-62
- Nilsson, A., Stys, D., Drakenberg, T., Spangfort, M.D., Forsen, S. and Allen, J.F. (1997).** Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light harvesting complex II. *J Biol Chem* **272**, 18350-7
- Noga, M.J., Lewandowski, J.J., Suder, P. and Silberring, J. (2005).** An enhanced method for peptides sequencing by N-terminal derivatization and MS. *Proteomics*
- Nordhoff, E., Egelhofer, V., Giavalisco, P., Eickhoff, H., Horn, M., Przewieslik, T., Theiss, D., Schneider, U., Lehrach, H. and Gobom, J. (2001).** Large-gel two-dimensional electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry: an analytical challenge for studying complex protein mixtures. *Electrophoresis* **22**, 2844-55

- O'Farrell, P.H. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250** , 4007-21
- Ogorzalek Loo, R.R., Stevenson, T.I., Mitchell, C., Loo, J.A. and Andrews, P.C. (1996).** Mass Spectrometry of Proteins Directly from Polyacrylamide Gels . *Anal. Chem.* **68**, 1910-7
- Ohnishi, N., Kashino, Y., Satoh, K., Ozawa, S. and Takahashi, Y. (2007).** Chloroplast-encoded polypeptide PsbT is involved in the repair of primary electron acceptor QA of photosystem II during photoinhibition in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **282**, 7107-15
- Ohnishi, N. and Takahashi, Y. (2001).** PsbT polypeptide is required for efficient repair of photodamaged photosystem II reaction center. *J Biol Chem* **276**, 33798-804
- Ouellette, A.J. and Barry, B.A. (2002).** Tandem mass spectrometric identification of spinach Photosystem II light-harvesting components. *Photosynth Res* **72**, 159-73
- Papayannopoulos, I.A. (1995).** The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides . *Mass Spectrom. Rev.* **14**, 49-73
- Park, O.K. (2004).** Proteomic studies in plants. *J Biochem Mol Biol* **37**, 133-8
- Pasquali, C., Fialka, I. and Huber, L.A. (1997).** Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* **18**, 2573-81
- Patterson, S.D. (1995).** Matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins in the 5-50 pmol range. *Electrophoresis* **16**, 1104-14
- Patton, W.F. (2002).** Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **771**, 3-31
- Payne, A.H., Chelf, J.H. and Glish, G.L. (2000).** C-terminal peptide sequencing using acetylated peptides with MSn in a quadrupole ion trap. *Analyst* **125**, 635-40
- Pearson, W.R. (1990).** Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* **183**, 63-98
- Peltier, J.B., Emanuelsson, O., Kalume, D.E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., Liberles, D.A., Soderberg, L., Roepstorff, P., von Heijne, G. and van Wijk, K.J. (2002).** Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* **14**, 211-36
- Peltier, J.B., Friso, G., Kalume, D.E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I. and van Wijk, K.J. (2000).** Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* **12**, 319-41
- Peltier, J.B., Ytterberg, A.J., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2004).** New functions of the thylakoid membrane proteome of Arabidopsis thaliana revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J Biol Chem* **279**, 49367-83
- Pennington, M.W. and Byrnes, M.E. (1995).** Evaluation of TiCl<sub>4</sub>-mediated reduction of methionine sulfoxide in peptides with oxidizable or reducible residues. *Pept Res* **8**, 39-43

- Peter, G.F. and Thornber, J.P. (1991).** Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J Biol Chem* **266**, 16745-54
- Piszkiewicz, D., Landon, M. and Smith, E.L. (1970).** Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations. *Biochem Biophys Res Commun* **40**, 1173-8
- Puchades, M., Westman, A., Blennow, K. and Davidsson, P. (1999).** Removal of sodium dodecyl sulfate from protein samples prior to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**, 344-9
- Rabilloud, T. (1990).** Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11**, 785-94
- Rabilloud, T. (1990).** Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11**, 785-94
- Reinders, J., Lewandrowski, U., Moebius, J., Wagner, Y. and Sickmann, A. (2004).** Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics* **4**, 3686-703
- Rhee, K.H. (2001).** Photosystem II: the solid structural era. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**, 307-28
- Rhee, K.H., Morris, E.P., Barber, J. and Kuhlbrandt, W. (1998).** Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* **396**, 283-6
- Rice, R.H., Means, G.E. and Brown, W.D. (1977).** Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation. *Biochim. Biophys. Acta* **492**, 316-21
- Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E. and Rabilloud, T. (2004).** About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 909-16
- Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E. and Rabilloud, T. (2004).** About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 909-16
- Richter, G. (1996).** *Biochemie der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York
- Righetti, P.G. and Chillemi, F. (1978).** Isoelectric focusing of peptides. *Journal of Chromatography A* **157**, 243-51
- Rokka, A., Suorsa, M., Saleem, A., Battchikova, N. and Aro, E.M. (2005).** Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem J* **388**, 159-68
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C. and Ferrara, P. (1992).** In-Gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* **203**, 173-9
- Rowley, A., Choudhary, J.S., Marzioch, M., Ward, M.A., Weir, M., Solari, R.C. and Blackstock, W.P. (2000).** Applications of protein mass spectrometry in cell biology. *Methods* **20**, 383-97

- Saenger, W., Jordan, P. and Krauss, N. (2002).** The assembly of protein subunits and cofactors in photosystem I. *Curr. Opin in Struct. Biol.* **12**, 244-54
- Samatey, F.A., Xu, C. and Popot, J.L. (1995).** On the distribution of amino acid residues in transmembrane alpha-helix bundles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4577-81
- Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F. and Rabilloud, T. (2000).** Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* **21**, 3329-44
- Santoni, V., Rabilloud, T., Doumas, P., Rouquie, D., Mansion, M., Kieffer, S., Garin, J. and Rossignol, M. (1999).** Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* **20**, 705-11
- Schagger, H. (2001).** Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* **65**, 231-44
- Schagger, H., Cramer, W.A. and von Jagow, G. (1994).** Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**, 220-30
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1991).** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-31
- Scheler, C., Lamer, S., Pan, Z., Li, X.P., Salnikow, J. and Jungblut, P. (1998).** Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). *Electrophoresis* **19**, 918-27
- Scheller, H.V., Jensen, P.E., Haldrup, A., Lunde, C. and Knoetzel, J. (2001).** Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochim Biophys Acta* **1507**, 41-60
- Schmidt, A., Kellermann, J. and Lottspeich, F. (2005).** A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **5**, 4-15
- Schwartz, E. and Pichersky, E. (1990).** Sequence of two tomato nuclear genes encoding chlorophyll a/b-binding proteins of CP24, a PSII antenna component. *Plant Mol Biol* **15**, 157-60
- Sechi, S. and Chait, B.T. (1998).** Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal Chem* **70**, 5150-8
- Seigneurin-Berny, D., Rolland, N., Garin, J. and Joyard, J. (1999).** Technical Advance: Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *Plant J* **19**, 217-28
- Sharma, J., Panico, M., Barber, J. and Morris, H.R. (1997).** Characterization of the low molecular weight photosystem II reaction center subunits and their light-induced modifications by mass spectrometry. *J Biol Chem* **272**, 3935-43

**Sharma, J., Panico, M., Barber, J. and Morris, H.R. (1997).** Purification and determination of intact molecular mass by electrospray ionization mass spectrometry of the photosystem II reaction center subunits. *J Biol Chem* **272**, 33153-7

**Shevchenko, A., Chernushevich, I., Wilm, M. and Mann, M. (2000).** De Novo peptide sequencing by nanoelectrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments. *Methods Mol Biol* **146**, 1-16

**Shevchenko, A., Loboda, A., Shevchenko, A., Ens, W. and Standing, K.G. (2000).** MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. *Anal Chem* **72**, 2132-41

**Shevchenko, A. and Shevchenko, A. (2001).** Evaluation of the efficiency of in-Gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Anal Biochem* **296**, 279-83

**Shevchenko, A., Wilm, M. and Mann, M. (1997).** Peptide sequencing by mass spectrometry for homology searches and cloning of genes. *J Protein Chem* **16**, 481-90

**Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-8

**Shi, L.X., Lorkovic, Z.J., Oelmuller, R. and Schroder, W.P. (2000).** The low molecular mass PsbW protein is involved in the stabilization of the dimeric photosystem II complex in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **275**, 37945-50

**Shi, L.X. and Schroder, W.P. (2004).** The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1608**, 75-96

**Sipos, T. and Merkel, J.R. (1970).** An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry* **9**, 2766-75

**Skribanek, Z., Mezo, G., Mak, M. and Hudecz, F. (2002).** Mass spectrometric and chemical stability of the Asp-Pro bond in herpes simplex virus epitope peptides compared with X-Pro bonds of related sequences. *J Pept Sci* **8**, 398-406

**Speicher, K.D., Kolbas, O., Harper, S. and Speicher, D.W. (2000).** Systematic Analysis of Peptide Recoveries from in-Gel Digestions for Protein Identifications in Proteome Studies. *Journal of Biomolecular Techniques* **11**, 74-86

**Spengler, B., Kirsch, D., Kaufmann, R. and Jaeger, E. (1992).** Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **6**, 105-8

**Standfuss, J. and Kuhlbrandt, W. (2004).** The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *J Biol Chem* **279**, 36884-91

**Stevens, T.J. and Arkin, I.T. (1999).** Are membrane proteins "inside-out" proteins? *Proteins* **36**, 135-43

**Stewart, I.I., Thomson, T. and Figeys, D. (2001).** 18O labeling: a tool for proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* **15**, 2456-65

- Sumner, L.W., Wolf-Sumner, B., White, S.P. and Asirvatham, V.S. (2002).** Silver stain removal using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for enhanced peptide mass mapping by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **16**, 160-8
- Sumner, L.W., Wolf-Sumner, B., White, S.P. and Asirvatham, V.S. (2002).** Silver stain removal using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for enhanced peptide mass mapping by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **16**, 160-8
- Sun, G. and Anderson, V.E. (2004).** Prevention of artifactual protein oxidation generated during sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis. *Electrophoresis* **25**, 959-65
- Suorsa, M., Regel, R.E., Paakkanen, V., Battchikova, N., Herrmann, R.G. and Aro, E.M. (2004).** Protein assembly of photosystem II and accumulation of subcomplexes in the absence of low molecular mass subunits PsbL and PsbJ. *Eur J Biochem* **271**, 96-107
- Swanson, S.K. and Washburn, M.P. (2005).** The continuing evolution of shotgun proteomics. *Drug Discov Today* **10**, 719-25
- Swiatek, M., Kuras, R., Sokolenko, A., Higgs, D., Olive, J., Cinque, G., Muller, B., Eichacker, L.A., Stern, D.B., Bassi, R., Herrmann, R.G. and Wollman, F.A. (2001).** The chloroplast gene *ycf9* encodes a photosystem II (PSII) core subunit, PsbZ, that participates in PSII supramolecular architecture. *Plant Cell* **13**, 1347-67
- Swiatek, M., Regel, R.E., Meurer, J., Wanner, G., Pakrasi, H.B., Ohad, I. and Herrmann, R.G. (2003).** Effects of selective inactivation of individual genes for low-molecular-mass subunits on the assembly of photosystem II, as revealed by chloroplast transformation: the *psbEFLJ* operon in *Nicotiana tabacum*. *Mol Genet Genomics* **268**, 699-710
- Swiderek, K.M., Davis, M.T. and Lee, T.D. (1998).** The identification of peptide modifications derived from gel-separated proteins using electrospray triple quadrupole and ion trap analyses. *Electrophoresis* **19**, 989-97
- Szabo, I., Seraglia, R., Rigoni, F., Traldi, P. and Giacometti, G.M. (2001).** Determination of photosystem II subunits by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Biol Chem* **276**, 13784-90
- Tal, M., Silberstein, A. and Nusser, E. (1985).** Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *J Biol Chem* **260**, 9976-80
- Tang, L. and Kebarle, P. (1993).** Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass Spectrometry on the Concentration of the Analytes in the Electro sprayed Solution. **65**, 3654-68
- Taylor, S.W., Fahy, E., Murray, J., Capaldi, R.A. and Ghosh, S.S. (2003).** Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins. *J Biol Chem* **278**, 19587-90
- Terry, D.E., Umstot, E. and Desiderio, D.M. (2004).** Optimized sample-processing time and peptide recovery for the mass spectrometric analysis of protein digests. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**, 784-94



- Thidholm, E., Lindstrom, V., Tissier, C., Robinson, C., Schroder, W.P. and Funk, C. (2002).** Novel approach reveals localisation and assembly pathway of the PsbS and PsbW proteins into the photosystem II dimer. *FEBS Lett* **513**, 217-22
- Thiede, B., Lamer, S., Mattow, J., Siejak, F., Dimmler, C., Rudel, T. and Jungblut, P.R. (2000).** Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-Gel tryptic digestion. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**, 496-502
- Trissl, H.W. and Wilhelm, C. (1993).** Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends Biochem Sci* **18**, 415-9
- Ulmschneider, M.B. and Sansom, M.S. (2001).** Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta* **1512**, 1-14
- Umate, P., Schwenkert, S., Karbat, I., Dal Bosco, C., Mlcochova, L., Volz, S., Zer, H., Herrmann, R.G., Ohad, I. and Meurer, J. (2007).** Deletion of PsbM in tobacco alters the QB site properties and the electron flow within photosystem II. *J Biol Chem* **282**, 9758-67
- Vajda, T. and Garai, A. (1981).** Comparison of the effect of calcium(II) and manganese(II) ions on trypsin autolysis. *J Inorg Biochem* **15**, 307-15
- van Montfort, B.A., Canas, B., Durkens, R., Godovac-Zimmermann, J. and Robillard, G.T. (2002).** Improved in-Gel approaches to generate peptide maps of integral membrane proteins with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **37**, 322-30
- van Wijk, K.J. (2001).** Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol* **126**, 501-8
- van Wijk, K.J., Roobol-Boza, M., Kettunen, R., Andersson, B. and Aro, E.M. (1997).** Synthesis and assembly of the D1 protein into photosystem II: processing of the C-terminus and identification of the initial assembly partners and complexes during photosystem II repair. *Biochemistry* **36**, 6178-86
- Venkatesh, R. and Sundaram, P.V. (1998).** Modulation of stability properties of bovine trypsin after in vitro structural changes with a variety of chemical modifiers. *Protein Eng* **11**, 691-8
- Venter, H., Ashcroft, A.E., Keen, J.N., Henderson, P.J. and Herbert, R.B. (2002).** Molecular dissection of membrane-transport proteins: mass spectrometry and sequence determination of the galactose-H<sup>+</sup> symport protein, GalP, of *Escherichia coli* and quantitative assay of the incorporation of. *Biochem J* **363**, 243-52
- von Heijne, G. (1981).** Membrane proteins: the amino acid composition of membrane-penetrating segments. *Eur J Biochem* **120**, 275-8
- von Heijne, G. and Gavel, Y. (1988).** Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **174**, 671-8
- Vorm, O., Roepstorff, P. and Mann, M. (1994).** Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Anal. Chem.* **66**, 3281-7

- Vothknecht, U.C. and Westhoff, P. (2001).** Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1541**, 91-101
- Wa, C., Cerny, R. and Hage, D.S. (2006).** Obtaining high sequence coverage in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry for studies of protein modification: analysis of human serum albumin as a model. *Anal Biochem* **349**, 229-41
- Wallin, E. and von Heijne, G. (1998).** Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* **7**, 1029-38
- Wang, L., Amphlett, G., Lambert, J.M., Blattler, W. and Zhang, W. (2005).** Structural characterization of a recombinant monoclonal antibody by electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Pharm Res* **22**, 1338-49
- Washburn, M.P., Wolters, D. and Yates, J.R. 3rd (2001).** Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**, 242-7
- Weiss, W. and Gorg, A. (2007).** Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics. *Methods Mol Biol* **355**, 121-43
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984).** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**, 141-3
- Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M. and Fenn, J.B. (1985).** Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* **57**, 675-9
- Whitelegge, J., Halgand, F., Souda, P. and Zabrouskov, V. (2006).** Top-down mass spectrometry of integral membrane proteins. *Expert Rev Proteomics* **3**, 585-96
- Whitelegge, J.P., Gundersen, C.B. and Faull, K.F. (1998).** Electrospray-ionization mass spectrometry of intact intrinsic membrane proteins. *Protein Sci* **7**, 1423-30
- Whitelegge, J.P., le Coutre, J., Lee, J.C., Engel, C.K., Prive, G.G., Faull, K.F. and Kaback, H.R. (1999).** Toward the bilayer proteome, electrospray ionization-mass spectrometry of large, intact transmembrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10695-8
- Wilm, M. and Mann, M. (1996).** Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* **68**, 1-8
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T. and Mann, M. (1996).** Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nanoelectrospray mass spectrometry. *Nature* **379**, 466-9
- Wollman, F.A., Minai, L. and Nechushtai, R. (1999).** The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes1. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 21-85
- Wu, C.C. and MacCoss, M.J. (2002).** Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther* **4**, 242-50
- Wysocki, V.H., Tsaprailis, G., Smith, L.L. and Breci, L.A. (2000).** Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom* **35**, 1399-406
- Yakushevskaya, A.E., Keegstra, W., Boekema, E.J., Dekker, J.P., Andersson, J., Jansson,**

- S., Ruban, A.V. and Horton, P. (2003).** The structure of photosystem II in Arabidopsis: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes. *Biochemistry* **42**, 608-13
- Yamashita, M. and Fenn, J.B. (1984).** Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451-9
- Yan, W. and Chen, S.S. (2005).** Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling. *Brief Funct Genomic Proteomic* **4**, 27-38
- Yates, J.R. 3rd, Eng, J.K., McCormack, A.L. and Schieltz, D. (1995).** Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal Chem* **67**, 1426-36
- Yost, R.A. and Boyd, R.K. (1990).** Tandem mass spectrometry: quadrupole and hybrid instruments. *Methods Enzymol* **193**, 154-200
- Yu, W., Vath, J.E., Huberty, M.C. and Martin, S.A. (1993).** Identification of the facile gas-phase cleavage of the Asp-Pro and Asp-Xxx peptide bonds in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **65**, 3015-23
- Yu, Y., Cui, J., Wang, X., Liu, Y. and Yang, P. (2004).** Studies on peptide acetylation for stable-isotope labeling after 1-D PAGE separation in quantitative proteomics. *Proteomics* **4**, 3112-20
- Yu, Y.Q., Gilar, M. and Gebler, J.C. (2004).** A complete peptide mapping of membrane proteins: a novel surfactant aiding the enzymatic digestion of bacteriorhodopsin. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 711-5
- Zhang, H., Yan, W. and Aebersold, R. (2004).** Chemical probes and tandem mass spectrometry: a strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 66-75
- Zhang, L., Paakkarinen, V., Suorsa, M. and Aro, E.M. (2001).** A SecY homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis. *J Biol Chem* **276**, 37809-14
- Zhang, S. and Scheller, H.V. (2004).** Light harvesting complex II binds to several small subunits of photosystem I. *J Biol Chem* **279**, 3180-7
- Zhang, Z. and McElvain, J.S. (2000).** De novo peptide sequencing by two-dimensional fragment correlation mass spectrometry. *Anal Chem* **72**, 2337-50
- Zheleva, D., Sharma, J., Panico, M., Morris, H.R. and Barber, J. (1998).** Isolation and characterization of monomeric and dimeric CP47-reaction center photosystem II complexes. *J Biol Chem* **273**, 16122-7
- Zhu, W., Venable, J., Giometti, C.S., Khare, T., Tollaksen, S., Ahrendt, A.J. and Yates, J.R. 3rd (2005).** Large-scale muLC-MS/MS for silver- and Coomassie blue-stained polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **26**, 4495-507
- Zolla, L. and Timperio, A.M. (2000).** High performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the simultaneous resolution and identification of intrinsic thylakoid membrane proteins. *Proteins* **41**, 398-406

**Zolla, L., Timperio, A.M., Walcher, W. and Huber, C.G. (2003).** Proteomics of light-harvesting proteins in different plant species. Analysis and comparison by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Photosystem II. Plant Physiol* **131**, 198-214

**Zubarev, R.A., Chivanov, V.D., Hakansson, P. and Sundqvist, B.U. (1994).** Peptide sequencing by partial acid hydrolysis and high resolution plasma desorption mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **8**, 906-12

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterschiedliche Benennung der LHCP in der Literatur .....	12
Abb. 1: Verschiedene Methoden zur Proteinanalyse mittels Massenspektrometrie .....	17
Abb. 2: Klassisches Verfahren zum In-Gel Verdau von Proteinen nach CBB-Färbung.....	22
Abb. 3: Schematische Darstellung des Ionisierungsprozesses beim Elektrospray (+) .....	31
Abb. 4: Isotopenmuster zweier Peptide aus CP47 ( <i>Synechocystis</i> , PCC 6803) .....	35
Abb. 5: Theoretische Bruchstellen des Peptidrückgrads bei der Fragmentierung .....	36
Abb. 6: Allgemeine Formel der Immonium-Ionen .....	37
Abb. 7: De novo Sequenzierung von Peptiden mittels tandem ESI-MSMS.....	40
Abb. 8: Die Aminosäuren Methionin und Tryptophan mit ihren Oxidationsstufen .....	42
Abb. 9: Modifikationen der AS Cystein.....	44
Tabelle 2: Lösungen zur Extraktion von fixierten Proteinen nach SDS-PAGE .....	51
Abb. 10: OMX-S <sup>®</sup> - Ein Werkzeug zum standardisierten In-Gel Verdau von Proteinen.....	56
Abb. 11: Modifikation der primären Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid .....	57
Abb. 12: Proteom der Thylakoidmembran von Gerste nach Färbung mit CBB .....	74
Tabelle 3: Detektierbare tryptische Peptide aus niedermolekularen Proteinen.....	75
Abb. 13: Linearität der Färbemethoden CBB-R250 und Cy5 (Fluoreszenz).....	76
Abb. 14: Extraktion fixierter Proteine (GAPDH) aus SDS-Gelen nach CBB-Färbung.....	77
Abb. 15: Niedermolekulare Proteine aus der PSI-LHCI/PSII-Dimer-Bande der BN-PAGE ..	81
Tabelle 4: Niedermolekulare Proteine im mono- und dimeren PSII-Subkomplex aus Gerste	86
Tabelle 5: LHCP aus Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> ) .....	88
Abb. 16: Hydrophobizitätsplot von Lhcb1 aus <i>Hordeum vulgare</i> (Q40065). .....	89
Abb. 17: Klassifizierung der majoren LHCP anhand der N-terminalen Sequenzabschnitte ...	90
Abb. 18: Einfluss der AS-Zusammensetzung auf die Detektierbarkeit von Peptiden .....	95
Abb. 19: Positionierung detektierter Peptide innerhalb der Primärsequenz von Proteinen .....	97
Abb. 20: Statistische Analyse der Detektierbarkeit von Peptiden .....	99
Abb. 21: Statistische Analyse des <i>in silico</i> Verdau der Genprodukte von <i>A. thaliana</i> mit Trypsin.....	102
Abb. 22: Oxidation von Methionin und Tryptophan nach tryptischem Verdau der Proteine	104
Abb. 23: MSMS-Spektrum des doppelt oxidierten Peptides T36-37 aus GAPDH .....	105
Abb. 24: Oxidationsbedingte Verschiebung der Retentionszeit von Peptiden aus CP47 .....	107
Abb. 25: Verschiebung der Retentionszeit nach Oxidation der AS Methionin .....	108
Abb. 26: MS-Signal des oxidierten Transmembranpeptids T14 nach tryptischem Verdau von CB23 ( <i>LhbC</i> ) aus Gerste.....	108
Abb. 27: Illustration des Quantifizierungsprinzips am Beispiel des Peptids T14 aus CA.....	110
Abb. 28: Modifikation von primären Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid .....	111
Abb. 29: Qualitativer Vergleich von MS-Spektren mit bzw. ohne CBB-Entfärbung.....	113
Abb. 30: Quantifizierung der Peptidausbeute CBB- bzw. silbergefärbter Proteinbanden.....	114
Abb. 31: Cystein-Modifikationen bei T27 aus GAPDH .....	116
Abb. 32: Optimierung der Peptidausbeute von Cystin-haltigen Proteinen .....	117
Abb. 33: Quantifizierung der Enzymdiffusion in die Gelmatrix .....	120
Abb. 34: Effizienz des tryptischen Verdau .....	122
Abb. 35: Einfluss eines zusätzlichen Extraktionsschrittes auf die Peptidausbeute.....	124
Tabelle 6: Vergleich der Sequenzabdeckungen von sechs Untereinheiten des RCII aus Gerste nach Prozessierung mit unterschiedlichen Verdauprotokollen .....	125
Abb. 36: Vergleich des konventionellen und optimierten In-Gel Verdauprotokolls am Beispiel von CP47 aus Gerste.....	126
Abb. 37: Kovalente Verbindung von Lysin Seitenketten während der Silberfärbung.....	145

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Bernhard Florian Granvogl  
geboren am: 04.12.1972 in München-Pasing  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung

1979 - 1983 Grundschule in Puchheim  
1983 - 1984 Hauptschule in Puchheim  
1984 - 1993 Gymnasium in Puchheim, Abschluss: Abitur

### Zivildienst

1993 - 1995 Zivildienst im Kreiskrankenhaus München-Pasing, Ausbildung zum  
Pflegehelfer

### Hochschulbildung

1995 - 2000 **Biologiestudium** (Diplom) an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Hauptfach: Botanik (Physiologie), Nebenfächer: Biochemie, Ökologie,  
Pharmakologie/Toxikologie  
2000 - 2001 **Diplomarbeit** am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der  
LMU München, unter Leitung von Prof. Dr. Lutz Eichacker  
Titel: „Massenspektrometrische Charakterisierung von Membranprotein-  
Komplexen aus Gersten Chloroplasten“  
2002 - 2005 **Promotion** unter Leitung von Prof. Dr. Lutz Eichacker am Department  
und 2007 für Biologie I, Ludwig-Maximilians-Universität, München  
Titel: „Entwicklung neuer Methoden zur massenspektrometrischen  
Charakterisierung von Membranproteinen“

### Berufliche Tätigkeit

03.02.2004 Mitgründer und Gesellschafter der OMX-GmbH (Ausgründung aus der LMU-  
München). Die OMX GmbH entwickelt, produziert und vermarktet  
Produktlösungen für den Proteomics-Markt.  
2006 - Leiter der Abteilung Forschung & Entwicklung bei der OMX GmbH  
Apr. 2007

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere ferner, dass ich die vorliegende Arbeit nicht bereits als Doktor-, Magister- oder Diplomarbeit an einer anderen Hochschule eingereicht habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift