

**Analyse membranständiger Subproteome  
aus Etioplasten und Chloroplasten der Gerste  
(*Hordeum vulgare* L.)**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Matthias Plöscher**

aus Gauting

**2008**

Dissertation eingereicht: 16.10.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Lutz Eichacker

2. Gutachter: Prof. Dr. Hugo Scheer

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Department Biologie I, Fachbereich physiologische Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Lutz Eichacker durchgeführt. Die Finanzierung dieser Arbeit erfolgte über den SFB TR-1 mit Herrn Prof. Dr. Jürgen Soll als Sprecher.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Lutz Eichacker, der mir diese Arbeit in seinem exzellent ausgestatteten Labor für Massenspektrometrie und Proteomics ermöglicht hat. Er ermöglichte mir nicht nur die Arbeit an modernsten Geräten, sondern ich durfte diese auch in Betrieb nehmen und verschiedenste neue Methoden zu deren Anwendung entwickeln. Zusammen gelang es uns dadurch sicherlich ein bisschen mehr Licht in das dunkle Feld des Etioplastenproteoms zu bringen.

Bernhard Granvogel danke ich besonders für die Einführung in die Massenspektrometrie an unserem guten, alten Einser-QToF. Ich weiß nicht wie viele Stunden wir an diversen Spektren mit rauchendem Kopf verbracht haben, aber es hat sehr viel Spaß gemacht. Vor allem habe ich eins von dir gelernt: Ruhig bleiben, auch wenn sich eine Pumpe mit lautem Knall verabschiedet.

Veronika Reisinger danke ich für die Unterstützung bei diversen gelelektrophoretischen Fragen und Problemchen, wodurch sich immer alles in Wohlgefallen aufgelöst hat. Sie ist halt die gute Seele des Labors.

Mikael Zoryan, von dir weiß ich zwar immer noch nicht so genau, was du alles machst, aber eines weiß ich sicher: Du weißt was du machst. Dadurch kam so mancher Stein erst ins Rollen, Danke.

Axel Masanek danke ich für die Hilfe bei so manchem Problem zwischen Bits und Bytes in den verschlungenen Wegen so mancher Computersoftware.

Mein Dank gilt natürlich auch allen Diplomanden des Labors, besonders Oliver Vosityka, mit dir kam auch die MALDI in Schwung.

Vielen Dank auch an Gisela Nagy, unsere TA, die immer für perfekte Spitzenkästen im MS-Labor gesorgt hat.

Herrn Prof. Dr. Hugo Scheer möchte ich dafür danken, dass der Kontakt zu den Biliproteinen nicht abgerissen ist und diverse Messungen für Tu und Stephan Teile von Arbeiten geworden sind.

Meinen Eltern möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung während dieser Arbeit und natürlich auch während der Zeit davor danken. Dadurch wurden ein erfolgreiches Studium und diese Arbeit erst ermöglicht.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meiner lieben Angela! Mit dir zusammen waren die letzten vier Jahre einfach schön und eines weiß ich: Das Labor ist nicht alles...



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

- **Plösch M.**, Granvogl B., Zoryan M., Reisinger V., Eichacker L.A., Mass spectrometric characterization of membrane integral low molecular weight proteins from photosystem II in barley etioplasts; Proteomics; angenommen
- **Plösch M.**, Granvogl B., Reisinger V., Eichacker L.A., Identification of the N-terminus of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A and B from barley etioplasts (*Hordeum vulgare* L.); eingereicht
- Reisinger V., **Plösch M.**, Eichacker L.A., Lil3 assembles as chlorophyll-binding protein complex during deetiolation; FEBS Lett. 582(10) (2008) 1547-51
- Granvogl B., Zoryan M., **Plösch M.**, Eichacker L.A., Localization of 13 one-helix integral membrane proteins in photosystem II subcomplexes; Anal. Biochem.; online veröffentlicht, im Druck
- Reisinger V., Hertle A., **Plösch M.**, Eichacker L.A., Cytochrome b<sub>6</sub>f is a dimeric protochlorophyll a binding complex in etioplasts; FEBS J. 275(5) (2008) 1018-1024
- Vogl K., Wenter R., Dressen M., Schlickerrieder M., **Plösch M.**, Eichacker L., Overmann J., Identification and analysis of four candidate symbiosis genes from „Chlorochromatium aggregatum“, a highly developed bacterial symbiosis; Environmental Microbiology; online veröffentlicht, im Druck
- Blot N., Wu X., Thomas J., Zhang J., Garczarek L., Böhm S., Tu J., Zhou M., **Plösch M.**, Eichacker L., Partensky F., Scheer H., Zhao K., Post-translational formation of phycourobilin in unique trichromatic biliprotein; eingereicht
- Tu J., Kupka M., Böhm S., **Plösch M.**, Eichacker L., Zhao K., Scheer H., Intermediate binding of phycocyanobilin to the lyase, CpeS1, and transfer to apoprotein; Photosynth. Res. 95 (2-3) (2008) 163-168
- Zhao K., Zhang J., Tu J., Böhm S., **Plösch M.**, Eichacker L., Bubenzer C., Scheer H., Wang X., Zhou M., Lyase activities of CpcS and CpcT-like proteins from *Nostoc* PCC7120, and sequential reconstitution of binding sites of phycoerythrocyanin and phycocyanin  $\beta$ -subunits; J. Biol. Chem. 282 (47) (2007) 34093-103
- Zhao K., Su P., Tu J., Wang X., Liu H., **Plösch M.**, Eichacker L., Yang B., Zhou M., Scheer H., Phycobilin:cystein-84 biliprotein lyase, a nearuniversal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins; PNAS 104 (36) (2007) 14300-5
- Moslavac S., Reisinger V., Berg M., Mirus O., Vasyka O., **Plösch M.**, Flores E., Eichacker L.A., Schleiff E., The proteome of the heterocyst cell wall in *Anabaena* sp. PCC 7120; Biol Chem. 388 (8) (2007) 823-9

### Übersichtsartikel:

- **Plösch M.**, Granvogl B., Reisinger V., Masanek A., Eichacker L.A., Organelle Proteomics; Buchkapitel, angenommen
- Granvogl B., **Plösch M.**, Eichacker L.A., Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics; Anal. Bioanal. Chem. 388 (8) (2007) 991-1002



# Inhaltsverzeichnis

<b>A. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
1. Identifikation des murenen N-Terminus von PORA und PORB.....	1
2. Massenspektrometrische Charakterisierung des NDH-Komplexes.....	2
3. Identifikation niedermolekularer, membranintegraler Proteine.....	2
<b>B. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1. Plastiden: Hochkomplexe Endosymbionten der pflanzlichen Zelle.....	3
2. Chloroplasten: Ort der Photosynthese.....	4
2.1. Struktureller Aufbau von Chloroplasten.....	4
2.2. Die Photosynthese.....	5
2.2.1. Photosystem II.....	6
2.2.2. Cytochrom <i>b<sub>6</sub>f</i> -Komplex.....	7
2.2.3. Photosystem I.....	8
2.2.4. ATP-Synthase.....	8
2.2.5. NDH-Komplex.....	9
2.3. Import kernkodierter Proteine.....	10
3. Etioplasten: Organelle in Dunkelheit.....	11
3.1. Struktureller Aufbau von Etioplasten.....	12
3.2. Die Rolle der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase.....	12
3.3. Vorgänge bei der Ergrünung.....	13
4. Moderne Strategien zur (Sub-) Proteomanalyse.....	15
4.1. „Shotgun-Proteomics“.....	16
4.2. Funktionelle Plastiden-Proteomics.....	17
4.3. Gelelektrophoretische Fraktionierung von Proteomen.....	18
4.4. Massenspektrometrie.....	19
5. Aufgabenstellung.....	22
<b>C. Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
1. Material.....	23
1.1. Geräte.....	23
1.2. Chemikalien.....	24
1.3. Pflanzenmaterial.....	25
1.4. Antikörper.....	25
2. Methoden.....	25
2.1. Pflanzenanzucht.....	25
2.1.1. Gerste.....	25
2.1.2. Erbse.....	25
2.1.3. Absorptionsspektrometrie.....	26
2.2. Plastidenisolation.....	26
2.3. Isolation von Membranproteinen.....	27
2.3.1. Isolation innerer Plastidenmembranen.....	27
2.3.2. Solubilisierung nativer Membranproteinkomplexe.....	28
2.3.3. Solubilisierung von Einzelproteinen.....	29
2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	29
2.4.1. BN-PAGE.....	29
2.4.2. CNL-PAGE.....	31
2.4.3. SDS-PAGE.....	31
2.5. Detektion von Proteinen.....	33

2.5.1.	Coomassie-Färbung.....	33
2.5.2.	Colloidale Coomassie-Färbung.....	33
2.5.3.	Silber-Färbung.....	34
2.5.4.	CyDye-Markierung.....	35
2.6.	Immunodetektion.....	35
2.7.	Enzymaktivitätstests.....	37
2.7.1.	Diaphorase-Aktivitätstest.....	37
2.7.2.	Menadion-Aktivitätstest.....	37
2.8.	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie.....	38
2.8.1.	In-Gel Verdau.....	38
2.8.2.	Verdau in Lösung.....	39
2.8.3.	Entsalzung der Probe.....	40
2.8.4.	Einführung N-terminaler Modifikationen.....	40
2.8.5.	Extraktion niedermolekularer Membranproteine.....	41
2.9.	Massenspektrometrie.....	42
2.9.1.	Offline ESI-Massenspektrometrie.....	42
2.9.2.	Online ESI-Massenspektrometrie.....	43
2.9.2.1.	Verwendung einer HPLC Agilent 1100 Nano Pump.....	43
2.9.2.2.	Verwendung einer UPLC nanoAcquity.....	45
2.9.3.	MALDI-Massenspektrometrie.....	48
2.9.4.	Interpretation der Massenspektren.....	49
2.9.5.	Bioinformatische Methoden.....	50
<b>D.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
<b>1.</b>	<b>Übersicht: Membranproteinkomplexe des Etio- und Chloroplasten.....</b>	<b>51</b>
1.1.	Spektroskopische Charakterisierung des etiolierten Zustandes.....	51
1.2.	Plastidäre Membranproteinkomplexe in der BN-PAGE.....	52
1.3.	Identifizierte Untereinheiten plastidärer Komplexe.....	54
<b>2.</b>	<b>Identifikation des murenen N-Terminus von PORA und PORB.....</b>	<b>58</b>
2.1.	Entwicklung einer Methode zur selektiven Identifikation N-terminaler Peptide.....	59
2.2.	Identifikation N-terminaler Peptide von PORA und PORB.....	63
2.3.	Vergleich der N-Termini von PORA, PORB und POR aus <i>P. sativum</i> .....	65
2.4.	Detaillierte Betrachtung des N-Terminus von PORB.....	67
<b>3.</b>	<b>Charakterisierung des NDH-Komplexes.....</b>	<b>69</b>
3.1.	Massenspektrometrische Identifikation des NDH-Komplexes.....	69
3.2.	Identifikation der kernkodierten Untereinheiten NdhM und NdhN.....	72
3.3.	Vergleich identifizierter und nicht identifizierter Untereinheiten.....	74
3.4.	Identifikation weiterer Proteine im Bereich des NDH-Komplexes.....	80
3.4.1.	Identifikation eines Proteins der PsbP-Familie.....	80
3.4.2.	Identifikation von Proteinen der PsbQ-Familie.....	82
3.4.3.	Weitere Proteine im Bereich des NDH-Komplexes.....	84
3.5.	Auftrennung des NDH-Komplexes in die Untereinheiten.....	85
3.6.	NAD(P)H-Diaphorase Aktivität des NDH-Komplexes.....	88
<b>4.</b>	<b>Identifikation niedermolekularer Proteine von Photosystem I und II.....</b>	<b>91</b>
4.1.	Niedermolekulare Proteine in Etioplasten und Chloroplasten.....	91
4.1.1.	Überblick über identifizierte niedermolekulare Proteine aus PSI und PSII.....	91
4.1.2.	Zuordnung niedermolekularer Proteine zu Komplexen in der BN-PAGE.....	93
4.2.	Detaillierte Betrachtung der Massenspektren von LMW-Proteinen.....	96
4.2.1.	Ladungszustände identifizierter LMW-Proteine.....	96
4.2.2.	Bildung von Alkalimetall-Adduktionen.....	97
4.2.3.	Oxidationen an Methoninen.....	100

4.2.4.	Extraktionseffizienz und Signalintensität.....	101
4.2.5.	Fragmentionenanalyse.....	103
<b>5.</b>	<b>Niedermolekulare Untereinheiten des Cytochrom <i>b<sub>6</sub>f</i>-Komplexes.....</b>	<b>107</b>
5.1.	Identifikation der LMW-Proteine des Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i> -Komplexes .....	107
5.2.	Ermittlung der vollständigen Sequenz von PetM aus Gerste.....	109
5.3.	Nachweis von LMW-Proteinen mittels MALDI-MS.....	111
<b>E.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>113</b>
<b>1.</b>	<b>Bedeutung der N-Termini von PORA und PORB.....</b>	<b>113</b>
1.1.	Terminal Proteomics: Die Identifikation der Enden eines Proteins.....	113
1.2.	Methodische Ansätze zur Identifikation des N-Terminus.....	114
1.3.	Methoden der selektiven Isolation N-terminaler Peptide.....	116
1.4.	Vorteile der eigenen Methode zur Bestimmung des N-Terminus.....	117
1.5.	Position der N-Termini von PORA und PORB .....	118
1.5.1.	Homologe Lage der N-Termini von PORA und PORB.....	118
1.5.2.	Mögliche Ursachen der alternativen N-Termini von PORB .....	119
1.6.	Das Transitpeptid von PORA enthält keine Pchlid-Bindestelle.....	121
<b>2.</b>	<b>Charakterisierung des etioplastidären NDH-Komplexes.....</b>	<b>124</b>
2.1.	Die Untereinheiten des NDH-Komplexes.....	125
2.1.1.	Plastidär kodierte Untereinheiten .....	125
2.1.2.	Aufbau des NDH-Komplexes und kernkodierte Untereinheiten .....	128
2.1.3.	Neue Untereinheiten aus der Familie der OEC-Proteine .....	129
2.1.4.	Enthält der NDH-Komplex noch weitere Untereinheiten? .....	130
2.2.	Das Molekulargewicht des NDH-Komplexes.....	132
2.3.	Die Diaphorase-Aktivität des NDH-Komplexes.....	133
2.4.	Eine potentielle Elektronentransportkette in Etioplasten .....	135
<b>3.</b>	<b>Massenspektrometrische Identifikation von LMW-Proteinen .....</b>	<b>137</b>
3.1.	Vorteile der neuen Extraktionsmethode von LMW-Proteinen .....	137
3.1.1.	Alternative Nachweismethoden von LMW-Proteinen mittels MS .....	138
3.1.2.	Eigenschaften der <i>offline</i> ESI-MS-Spektren von LMW-Proteinen.....	139
3.1.3.	Detektion von LMW-Proteinen mittels MALDI-MS.....	141
3.2.	Identifikation von PSI und PSII LMW-Proteinen in Plastiden .....	142
3.2.1.	Nachweis von 13 PSII LMW Proteinen in Etioplasten.....	142
3.2.2.	Die unterschiedliche Akkumulation von PSI und PSII LMW-Proteinen ..	143
3.3.	Identifikation von PSI und PSII LMW-Proteinen in Chloroplasten .....	144
3.4.	LMW-Proteine des Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i> -Komplexes .....	146
<b>F.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>G.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
<b>H.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>172</b>

## Abkürzungen

Ac	Acetylgruppe, kovalent an eine Aminogruppe gebunden
Acc.-Nr.	Proteinidentifikationsnummer ( <i>accession number</i> )
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-Synthase-Komplex
BN-PAGE	Blau-Native Polyacrylamidgelelektrophorese
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Chl	Chlorophyll
CNL	farblos nativ mit Lithium-Dodecylsulfat
Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i>	Cytochrom <i>b<sub>6</sub>f</i>
Da	Dalton
DCIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FAPH	Ameisensäure-Acetonitril-2-Propanol-Lösung
FBM	Ameisensäure-1-Butanol-Methanol-Lösung
FNR	Ferredoxin:NADP <sup>+</sup> -Oxidoreduktase
GGH	Geranylgeranyl-Hydrogenase
GRAVY	<i>Grand average of hydrophobicity</i> , Wert für die Hydrophobizität eines Proteins/Peptids
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMW-Marker	<i>High Molecular Weight</i> , Höhermolekularer Molekulargewichtsstandard
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochdruckflüssigkeitschromatographie
K <sub>Ac</sub>	an der ε-Aminogruppe acetyliertes Lysin
kDa	Kilodalton
LC	<i>Liquid Chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
LDS	Lithiumdodecylsulfat

LHCI/II	Chlorophyll <i>a/b</i> -bindender Lichtsammelkomplex von PSI/II
LMW-Protein	<i>Low Molecular Weight</i> -Protein, Niedermolekulares Protein
LOX	Lipoxygenase
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> , Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MetO	Methioninsulfoxid
MG	Molekulargewicht
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MSMS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
(nano)ESI	(Nano) Elektrospray Ionisation
NBT	4-Nitrotetrazoliumchlorid-Blau
NDH	NAD(P)H-Dehydrogenase
OEC	<i>Oxygen Evolving Complex</i> , Wasserspaltender Apparat
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Plastocyanin
Pchlid	Protochlorophyllid
PLB	<i>Prolamellar body</i> , Prolamellarkörper
POR	NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
PPI	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase
PPL	<i>PsbP like protein</i> , PsbP ähnliches Protein
pPOR	NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase mit Transitpeptid
PQ	Plastoquinon
PSI/II	Photosystem I/II
PT	Prothylakoidmembran
PTOX	Plastidäre terminale Oxidase
RC	Reaktionszentrum
RP	<i>Reversed Phase</i> , Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase

SDS	Natriumdodecylsulfat
SPP	<i>Stromal Processing Peptidase</i> , allgemeine stromale Prozessierungspeptidase
TAT	<i>Twin-Arginine Translocase</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	<i>Translocon at the inner envelope of chloroplasts</i>
TLP	Thylakoid Lumen Protein
TMD	Transmembrandomäne
TMK	Tris-Magnesium-Kalium
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure, Picrylsulfonsäure
TNP	Trinitrophenyl
TOC	<i>Translocon at the outer envelope of chloroplasts</i>
TOF	<i>Time Of Flight</i> , Flugzeitmassenanalysator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> , Höchstdruckflüssigkeitschromatographie
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 wurden Begriffe aus dem Englischen verwendet, für die im wissenschaftlichen Sprachgebrauch keine sinngemäße Übersetzung in die deutsche Sprache existiert. Diese Begriffe wurden kursiv geschrieben.

## **A. Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten mehrere spezifische Analysen von plastidären Subproteomen. Ausgewählte Subproteome der inneren Membranen von Etioplasten der Gerste wurden im Vergleich zum Proteom der Thylakoidmembran von Chloroplasten analysiert. Durch die Kombination verschiedener gelelektrophoretischer Trennmethode für Einzelproteine und Proteinkomplexe mit massenspektrometrischen Analysemethoden gelangen sensitivste Nachweise niedrig konzentrierter Untereinheiten von Membranproteinkomplexen. Darüber hinaus gelangen der Nachweis niedermolekularer membranintegraler Proteine und die spezifische Charakterisierung von Einzelproteinen.

### **1. Identifikation des murenen N-Terminus von PORA und PORB**

Die N-Termini von NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) A und B wurden durch ein LC-MS basiertes Verfahren bestimmt. Es erfolgte die Entwicklung einer Methode zur selektiven Isolation N-terminaler Peptide mittels Höchstdruckflüssigkeitschromatographie (UPLC). Dazu wurden zwei chemische Reaktionsschritte auf Protein- und Peptidebene durchgeführt, wodurch das N-terminale Peptid nach einem tryptischen Verdau ausschließlich acetyliert vorlag und interne Peptide durch eine weitere Modifikation mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure abgetrennt wurden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die N-Termini von PORA und PORB homolog zueinander sind und eine vergleichbare Erkennungssequenz für die prozessierende(n) Protease(n) vorliegt. Das Transitpeptid von PORA ist somit deutlich kürzer, als bislang vermutet, wodurch neue Rückschlüsse bezüglich einer möglichen Bindestelle von Protochlorophyllid gezogen werden konnten, da eine von Reinbothe *et al.* 2008 beschriebene Bindestelle nicht im Bereich des Transitpeptids, sondern in Bereich der murenen PORA liegt. Bei PORB konnten neben einem dominierenden N-terminalen Peptid zwei weitere um jeweils ein Alanin verkürzte N-terminale Peptide mit geringerer Signalintensität nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine unpräzise N-terminale Prozessierung hin.

## **2. Massenspektrometrische Charakterisierung des NDH-Komplexes**

Es gelang die bislang umfassendste massenspektrometrische Charakterisierung des NAD(P)H-Dehydrogenase-Komplexes aus einer C<sub>3</sub>-Pflanze. In Etioplasten konnten sechs plastidär kodierte und mindestens fünf kernkodierte Untereinheiten des NDH-Komplexes identifiziert werden. Dies gelang durch die Isolation des Komplexes mittels nativer PAGE als 1. Dimension und die anschließende Aufkonzentrierung der Untereinheiten in einer SDS-PAGE als konzentrierende 2. Dimension. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der NDH-Komplex bereits in Etioplasten neben dem membranintegralen Subkomplex aus mindestens zwei löslichen Subkomplexen aufgebaut ist. Aufgrund dieser umfangreichen Assemblierung ist eine physiologische Funktion wahrscheinlich und erste Versuche zur NAD(P)H-Dehydrogenase Aktivität lieferten Hinweise auf eine mögliche enzymatische Aktivität.

## **3. Identifikation niedermolekularer, membranintegraler Proteine**

In Etioplasten gelang erstmals der Nachweis aller bekannten membranintegralen, niedermolekularen Untereinheiten von Photosystem II, nicht aber von Photosystem I. Die Untereinheiten von PSI konnten ausschließlich in Chloroplasten nachgewiesen werden. Von PSII konnten 13 niedermolekulare Untereinheiten mit jeweils einer Transmembrandomäne nachgewiesen werden. Diese Untereinheiten konnten im Gegensatz zu Chloroplasten nicht in höhermolekularen Komplexen, sondern ausschließlich nahe der Lauffront einer BN-PAGE im Bereich der freien Proteine nachgewiesen werden. Der Nachweis von PsbN war ausschließlich in Etioplasten möglich. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass ausschließlich nicht-chlorophyllbindende Untereinheiten von PSII in Etioplasten akkumuliert werden und die Anreicherung von chlorophyllbindenden Untereinheiten von PSI und PSII von der Anwesenheit von Chlorophyll abhängt. Darüber hinaus konnten die vier niedermolekularen, membranintegralen Untereinheiten des Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplexes in Etioplasten und in Chloroplasten sowohl in der monomeren, als auch dimeren Assemblierungsstufe nachgewiesen werden. Ermöglicht wurden diese Nachweise durch eine neu entwickelte Methode zur Extraktion von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel mit organischen Lösungsmitteln und der anschließenden massenspektrometrischen Charakterisierung mittels *offline* ESI-MS.

## **B. Einleitung**

### **1. Plastiden: Hochkomplexe Endosymbionten der pflanzlichen Zelle**

Die Entstehung von Lebewesen, so wie wir sie heute kennen, wurde erst durch zwei fundamentale Ereignisse im Erdaltertum ermöglicht: Die primären Endosymbiosen, die zur Bildung der Mitochondrien und der Plastiden als Zellorganelle führten. Diese beiden entscheidenden Schritte der Evolution führten zur Entstehung der eukaryotischen tierischen und pflanzlichen Zellen und ermöglichten erst die Bildung von komplexen, vielzelligen Organismen. Mitochondrien entstanden vor ca. 2 Mrd. Jahren aus  $\alpha$ -Proteobakterien und stellen heute die Kraftwerke zur heterotrophen Energieversorgung der Zelle dar (Gray et al., 1999). Die Ursprünge der Plastiden gehen auf photosynthetisch aktive Cyanobakterien zurück, die vor ca. 1,5 Mrd. Jahren durch eine zweite primäre Endosymbiose in eine eukaryotische Zelle aufgenommen wurden, wodurch dieser die photoautotrophe Energiegewinnung ermöglicht wurde (Reyes-Prieto et al., 2007).

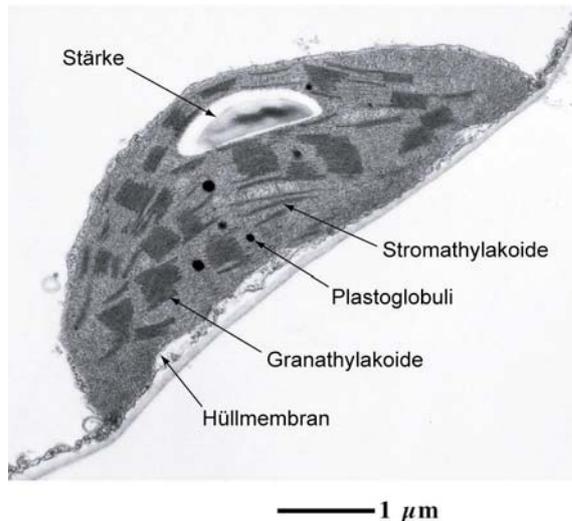
Im Laufe der Zeit wurden diese neu gewonnenen Organelle immer mehr in die eukaryotische Zelle integriert, allerdings blieben auch zahlreiche Eigenschaften, die auf die ursprüngliche Herkunft hinweisen, erhalten. So sind sowohl Plastiden, als auch Mitochondrien von einer Doppelmembran umgeben, wobei die innere Membran bakterieller Herkunft ist. Beide Organellen besitzen eigene, ringförmige DNA, wobei keine Histone assoziiert sind und die Translation erfolgt durch einen prokaryotischen Proteinbiosyntheseapparat. So findet man 70s-Ribosomen und die mRNA enthält weder die für Eukaryoten typische 5'-Cap-Sequenz, noch eine Polyadenylierung. Allerdings weist das plastidäre Genom nur Gene für ca. 10 bis 200 Proteine auf, wohingegen die kleinsten cyanobakteriellen Genome für ca. 1900 Proteine codieren (Abdallah et al., 2000; Leister, 2003; Dufresne et al., 2003). Während der Integration dieser neuen Organelle erfolgte somit eine grundlegende Neuorganisation des Genoms der gesamten Zelle, wobei zahlreiche Gene des Organells in den Zellkern transferiert wurden (Martin et al., 1998). Da der Wirkort der Genprodukte jedoch weiterhin innerhalb des Zellorganells blieb, kam es zur Entwicklung komplexer Mechanismen zum zielgerichteten Import kernkodierter Proteine in die Plastide. Ergebnis dieser Endosymbiose ist nun nicht nur ein chimäres eukaryotisches Genom, sondern auch ein mosaikartiges Proteom innerhalb der Organelle (Lopez-Juez et al., 2005).

## 2. Chloroplasten: Ort der Photosynthese

Im Laufe der Evolution übernahmen Plastiden einhergehend mit einer strukturellen Differenzierung weitere Funktionen innerhalb der Zelle. So entstanden etwa Chromoplasten, die Carotinoide anreichern, Elaioplasten, welche als Lipidspeicher fungieren, Amyloplasten, welche die Synthese und Speicherung von Stärke als Aufgabe haben, sowie Etioplasten, die chlorophyllfreie Vorläufer von Chloroplasten sind (Lopez-Juez et al., 2005). Doch nach wie vor kann die Photosynthese als zentrale Aufgabe angesehen werden, weshalb Chloroplasten die bedeutendste Gruppe der Plastiden darstellen.

### 2.1. Struktureller Aufbau von Chloroplasten

In transmissions-elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann man deutlich den ultrastrukturellen Aufbau von Chloroplasten und die für die Photosynthese wichtigen inneren Membransysteme erkennen (Abb. 1).



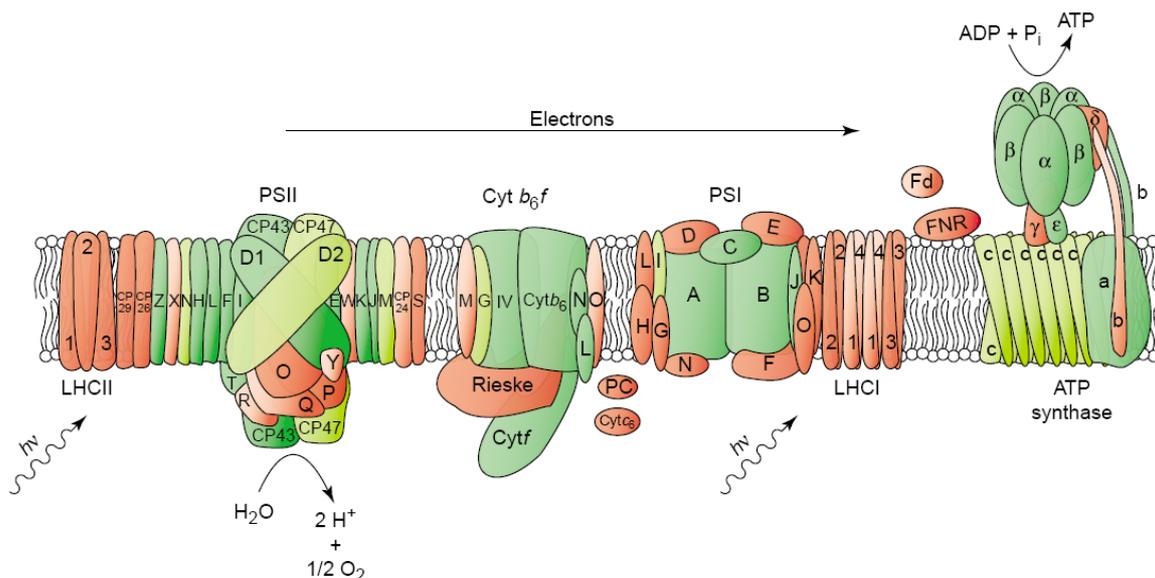
**Abb. 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chloroplasten**

Die Aufnahme stammt von einem Chloroplasten aus *Solanum lycopersicum*. Neben einem Stärkekorn, dunkel erscheinenden Plastoglobuli und der Hüllmembran sind deutlich ungestapelte Stroma- und gestapelte Granathylakoide erkennbar. Die Aufnahme wurde von G. Wanner zur Verfügung gestellt.

Chloroplasten weisen mehrere getrennte Membransysteme auf. Zunächst finden sich eine äußere und eine innere Hüllmembran mit dazwischen liegendem Intermembranraum. Diese Doppelmembran umschließt ein inneres Kompartiment, das Stroma. Im Stroma ist das unabhängige innere Membransystem des Chloroplasten, die Thylakoidmembran, eingebettet (Vothknecht et al., 2001). Thylakoidmembranen treten zum einen in ungestapelten Stromathylakoiden und zum anderen in gestapelten Granathylakoiden auf. Darin enthalten sind die membranintegralen Proteinkomplexe der Photosynthese. Darüber hinaus finden sich in Chloroplasten Stärkekörner als Energiespeicher, Plastoglobuli und Ribosomen.

## 2.2. Die Photosynthese

Bei der Photosynthese wird Lichtenergie in chemische Energie überführt und es erfolgt die Bildung energiereicher organischer Verbindungen, wobei CO<sub>2</sub> der Luft als Kohlenstoffquelle dient. Dieser komplexe Prozess ist in zwei räumlich getrennte Teilreaktionen untergliedert, zum einen in die Lichtreaktion, die an den Thylakoidmembranen abläuft und zum anderen in die Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus), welche im Stroma abläuft. Bei der Lichtreaktion wird die Energie von Photonen durch eine Elektronentransportkette zur Bildung des Reduktionsäquivalent NADPH/H<sup>+</sup> und des Energieträgers ATP verwendet, wobei H<sub>2</sub>O gespalten und O<sub>2</sub> produziert wird. In der anschließenden Dunkelreaktion erfolgt die Synthese energiereicher Kohlenhydrate unter Beteiligung des Enzyms Rubisco aus CO<sub>2</sub>, NADPH/H<sup>+</sup> und ATP. An der Lichtreaktion sind vier große, membranintegrale Proteinkomplexe, sowie mehrere mobile Elektronentransporter beteiligt (Abb. 2). Dies sind Photosystem I und II (PSI, PSII), der Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplex (Cyt *b<sub>6</sub>f*), der ATP-Synthase Komplex (ATPase), sowie die mobilen Elektronentransporter Plastochinon, Plastocyanin und Ferredoxin.



**Abb. 2 Aufbau der Thylakoidmembrankomplexe nach Leister 2003 (Leister, 2003)**

Dargestellt werden Thylakoidmembrankomplexe und lösliche Komponenten der Lichtreaktion. Plastidär kodierte Untereinheiten sind grün dargestellt und kernkodierte Untereinheiten rot. Die einzelnen Komponenten werden wie folgt bezeichnet: PSII bezeichnet den Photosystem II-Komplex, LHCII den Lichtsammelkomplex II, Cyt *b<sub>6</sub>f* den Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplex, PSI den Photosystem I-Komplex, LHCI den Lichtsammelkomplex I, ATP-Synthase den ATP-Synthase-Komplex, PC bezeichnet Plastocyanin, Fd Ferredoxin und FNR Ferredoxin:NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase.

Die Verteilung dieser Komplexe ist nicht gleichmäßig innerhalb der Thylakoidmembran, sondern PSI und die ATPase befinden sich in erster Linie innerhalb der Stromathylakoide, wohingegen PSII hauptsächlich innerhalb der Granathylakoide lokalisiert ist. Der Cyt *b<sub>6</sub>f*-

Komplex findet sich sowohl innerhalb der Stroma- als auch der Granathylakoide (Anderson et al., 1983; Anderson, 2002). Der grundlegende Prozess der Energiegewinnung basiert auf einem linearen Elektronentransport von PSII über Cyt *b<sub>6</sub>f* zu PSI, wobei die Elektronen durch die Spaltung von Wasser am PSII gewonnen werden und abschließend auf NADP<sup>+</sup> übertragen werden. Die Überbrückung zwischen den Komplexen erfolgt durch lateral diffundierende Redoxsysteme, wobei Plastochinon Elektronen zwischen PSII und Cyt *b<sub>6</sub>f* transportiert und Plastocyanin zwischen Cyt *b<sub>6</sub>f* und PSI. Alternativ existiert auch ein zyklischer Elektronentransport zwischen PSI und Cyt *b<sub>6</sub>f*. In beiden Fällen wird ein elektrochemischer Gradient an der Thylakoidmembran erzeugt, wodurch die Bildung von ATP an der ATPase ermöglicht wird. Alle beteiligten Membrankomplexe stellen dabei ein Mosaik aus plastidär kodierten und kernkodierten Proteinen dar, wobei zahlreiche prosthetische Gruppen wie Chlorophyll (Chl) *a* und *b*, Häm,  $\beta$ -Carotin oder Phylloquinon assoziiert vorliegen. Zahlreiche Rückschlüsse auf die Struktur und Funktion dieser Komplexe konnten durch Kristallstrukturanalysen (Zouni et al., 2001; Jordan et al., 2001; Ben-Shem et al., 2003; Kurisu et al., 2003; Liu et al., 2004; Loll et al., 2005; Amunts et al., 2007) und Mutantanalysen (Morais et al., 1998; Meenam et al., 1999; Hager et al., 2002; Swiatek et al., 2003; Komenda et al., 2005; Schwenkert et al., 2006; Iwai et al., 2006; Hansson et al., 2007; Umate et al., 2007) gewonnen werden.

### 2.2.1. Photosystem II

PSII stellt den Anfang des linearen Elektronentransports dar. Der zentrale Vorgang ist dabei die Oxidation des durch Licht angeregten Reaktionszentrums P680\* zu P680<sup>+</sup>. Ein Elektron wird dabei von einem Chl *a* auf Phaeophytin übertragen, welches dann den mobilen Träger Plastochinon (Q<sub>A</sub>) zu Semichinon reduziert. Dieses reduziert dann ein weiteres Chinon (Q<sub>B</sub>) und nach zwei solchen Reaktionsschritten liegt Plastohydrochinon vor, welches den Komplex verlässt. Dazu ist Anregungsenergie nötig, welche durch die Absorption von Lichtquanten an den Chlorophyllen assoziierter Proteinen der Lichtsammelkomplexe gewonnen wird und über die inneren Antennen CP43 (PsbC) und CP47 (PsbB) auf das Reaktionszentrum bestehend aus D1, D2 (PsbD),  $\alpha$ -Cytochrom *b<sub>559</sub>* (PsbE) und  $\beta$ -Cytochrom *b<sub>559</sub>* (PsbF) übertragen wird (Nelson et al., 2006). Durch die Proteolyse von Wasser wird wieder ein Elektron gewonnen und P680<sup>+</sup> in den ursprünglichen Zustand überführt. Die Wasserspaltung erfolgt an der lumenalen Seite der Thylakoidmembran unter Beteiligung des wasserspaltenden Subkomplexes (OEC), welcher aus den Proteinen OEC 16 (PsbQ), OEC 23 (PsbP) und

OEC 33 (PsbO), sowie PsbR und PsbTn besteht (Rögner et al., 1996; McEvoy et al., 2005). Darüber hinaus sind an PSII zahlreiche membranintegrale Proteine kleiner 10 kDa beteiligt, die allein kein Chl binden und durch eine Transmembrandomäne gekennzeichnet sind. Möglicherweise binden einige von ihnen Carotinoide (Loll et al., 2005), in erster Linie wird ihnen aber eine Funktion bei der Assemblierung und Stabilisierung des Gesamtproteinkomplexes zugeschrieben (Hankamer et al., 2001; Shi et al., 2004; Rokka et al., 2005).

### 2.2.2. Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplex

Der Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex ist ein Elektronentransportkomplex, der im linearen Elektronentransport als Koppler zwischen PSII und PSI fungiert und bezüglich seiner Aufgabe als Plastohydrochinon-Plastocyanin-Oxidoreduktase bezeichnet werden kann. Plastohydrochinon wird dabei oxidiert und Plastocyanin reduziert, wobei es zu einem Übergang von einem Zwei-Elektronenüberträger zu einem Ein-Elektronenüberträger kommt. Dabei werden pro Elektron zwei Protonen über die Membran transportiert, welche am Aufbau eines elektrochemischen Gradienten mitwirken. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktion ist die Reduktion von Plastocyanin, weshalb diese Reaktion ein potentieller Regulationspunkt der gesamten Elektronentransportkette ist (Lee et al., 1989). Alternativ zum linearen Elektronentransport existiert auch ein zyklischer Elektronentransport zwischen PSI und Cyt *b<sub>6</sub>f*, wobei Elektronen über die Ferredoxin:NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (FNR) transportiert werden (Zhang et al., 2001). Für die dimere Form des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes aus *Chlamydomonas reinhardtii* konnte mittels Kristallstrukturanalyse eine Aufklärung der Struktur vorgenommen werden. Insgesamt wurden acht membranintegrale Untereinheiten (PetA-D, G, L, M, N) nachgewiesen, wobei die vier großen Untereinheiten PetA-D am Elektronentransport beteiligt sind. Für die vier niedermolekularen Untereinheiten PetG, L, M, N wurde eine Funktion bei der Assemblierung des Komplexes, sowie eine stabilisierende Aufgabe angenommen (Zhang et al., 2004). Neben diesen acht Proteinuntereinheiten wurden auch mehrere prosthetische Gruppen, wie vier Häme, ein  $\beta$ -Carotin und ein Chl *a* nachgewiesen (Cramer et al., 2004). Die Häme fungieren dabei neben einem Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Cluster als wesentliche Kofaktoren beim Elektronentransport, doch die Funktionen des Chl und  $\beta$ -Carotins sind noch nicht geklärt.

### 2.2.3. Photosystem I

Der zentrale Vorgang am PSI ist die im Licht stattfindende primäre Ladungstrennung des angeregten Chl *a*-Dimers im Reaktionszentrum P700\*, wobei P700\* zu P700<sup>+</sup> oxidiert und der primäre Akzeptor A<sub>0</sub>, ein Chl *a*, reduziert wird (Nelson et al., 2006). Das Elektron stammt dabei ursprünglich von Plastocyanin und wird auf der lumenalen Seite der Membran auf P700<sup>+</sup> übertragen. Somit findet ein Transport des Elektrons über die Membran statt und es wird von A<sub>0</sub> über ein Naphtochinon (A<sub>1</sub>) auf ein Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Cluster übertragen, welches sich auf der Matrixseite der Thylakoidmembran befindet. Bei dieser Reaktion wird ein Membranpotential aufgebaut und diese Reaktionsfolge findet an den beiden Proteinen PsaA und PsaB statt. Im Anschluss an die Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Zentren erfolgt die Reduktion von Ferredoxin, welches über die FNR im linearen Elektronentransport NADP<sup>+</sup> reduziert, oder im zyklischen Elektronentransport das Elektron auf den Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex überträgt. Aufgebaut ist das PSI aus einem Reaktionszentrum (RC) und dem Lichtsammelkomplex I (LHCI). Das RC ist dabei aus 14 Untereinheiten (PsaA-L, N, O) und der LHCI aus vier Untereinheiten (Lhca1-4) aufgebaut (Chitnis, 2001). Darüber hinaus finden sich in dem Komplex als prosthetische Gruppen ca. 200 Chlorophylle, zwei Phyllochinone, drei Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Cluster und β-Carotin (Jordan et al., 2001; Ben-Shem et al., 2003).

### 2.2.4. ATP-Synthase

Die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat setzt Energie frei, weshalb ATP als universelle Energiewährung der Zelle gilt. Umgekehrt erfordert die Knüpfung einer Anhydridbindung zwischen ADP und Phosphat Energie. Diese Synthese von ATP erfolgt nach einem universellen System bei Prokaryoten ebenso wie bei Eukaryoten in Mitochondrien und Plastiden unter Ausnützung der protonenmotorischen Kraft. Bei Chloroplasten liegt dabei eine chemiosmotische Kopplung zwischen den lichtgetriebenen Protonenpumpen (PSI und II, Cyt *b<sub>6</sub>f*) und dem ATP-Synthase-Komplex vom F-Typ vor. Die ATPase ist aus einem hydrophilen Kopfteil (F<sub>1</sub>) und einem hydrophoben Membranteil (F<sub>0</sub>) aufgebaut, welche durch einen Stiel mit zentralem und peripherem Teil verbunden sind, wobei insgesamt neun verschiedene Untereinheiten an der ATPase beteiligt sind (Dekker et al., 2005). Bislang war es nicht möglich den Gesamt-Komplex zu kristallisieren, aber einzelne Komponenten konnten mittels Kristallstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie analysiert werden, wodurch ein Überblick über die Struktur gegeben werden konnte (Groth et al., 2001; Carbajo et al., 2004; Carbajo et al., 2005). Danach besteht der F<sub>1</sub>-Subkomplex aus drei

katalytisch inaktiven  $\alpha$ -Untereinheiten, sowie drei katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten, die zu einem Sechseck angeordnet sind. Zentral davon liegt die  $\gamma$ -Untereinheit, welche die zentrale Verbindung zum  $F_0$ -Subkomplex darstellt. Im  $F_0$ -Teil bilden 14 Untereinheiten III einen Kanal durch die Thylakoidmembran und bei der Passage von Protonen durch diesen Transmembrankanal kommt es zu einer Rotation des  $F_1$ -Subkomplexes, wodurch die Synthese von ATP an der  $\beta$ -Untereinheit ermöglicht wird (Seelert et al., 2000). Dieser Mechanismus und die beteiligten Untereinheiten sind hochkonserviert. So gelang es beispielsweise einen funktionellen ATPase-Komplex aus Untereinheiten von *Escherichia coli* mit Untereinheiten aus Chloroplasten und Cyanobakterien zu erzeugen (Lill et al., 1993).

### 2.2.5. NDH-Komplex

Neben den vier Proteinkomplexen der Lichtreaktion in der Thylakoidmembran konnte ein weitere Komplex, der NAD(P)H-Dehydrogenase-Komplex (NDH-Komplex), nachgewiesen werden. Dieser Komplex besteht aus 11 plastidär kodierten Untereinheiten (NdhA-K) und aus mindestens vier kernkodierten Untereinheiten (NdhL-O) (Maier et al., 1995; Rumeau et al., 2005; Shimizu et al., 2008). Der Komplex ist dabei aus einem membranintegralen Subkomplex bestehend aus NdhA-G, L und aus einem membranassoziierten Subkomplex (NdhH-K, M, N, O) aufgebaut (Casano et al., 2004). Homologe Komplexe finden sich in verschiedenen anderen Gruppen von Organismen, wie Archaeen, Eubakterien und Cyanobakterien, sowie in Mitochondrien (Yagi et al., 1998; Friedrich et al., 2000; Brandt et al., 2003). In Mitochondrien entspricht der plastidäre NDH-Komplex dem NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Komplex (Komplex 1) der Atmungskette, wobei für diesen Komplex bis zu 45 Untereinheiten beschrieben wurden (Carroll et al., 2002). In Cyanobakterien wurden zwei verschiedene NDH-Komplexe beschrieben, NDH-1L und NDH-1M, welche sich durch unterschiedliche Isomere der Untereinheiten NdhF und D unterscheiden (Zhang et al., 2004; Battchikova et al., 2005; Battchikova et al., 2007).

Die grundlegende Funktion dieser Komplexe ist der Elektronentransfer von dem Elektronendonator NADH, evtl. auch NADPH, zu einem Chinon, um einen Protonengradienten aufzubauen, welcher dann zur ATP-Synthese führt. Der mitochondriale Komplex 1 ist dabei der erste von drei Membrankomplexen der Atmungskette und überträgt zwei Elektronen von NADH auf Ubichinon, wobei vier Protonen über die Membran transportiert werden (Wikstrom, 1984). In Cyanobakterien wird NDH-1L eine Funktion beim zyklischen Elektronentransport um PSI zugeschrieben, wohingegen NDH-1M in die Aufnahme von  $CO_2$

involviert ist (Zhang et al., 2004; Herranen et al., 2004; Ogawa et al., 2007). In Chloroplasten wird dem NDH-Komplex eine Funktion beim zyklischen Elektronentransport und bei der Chlororespiration zugeschrieben (Sazanov et al., 1998; Shikanai et al., 1998; Casano et al., 2000; Peltier et al., 2002; Rumeau et al., 2007). In beiden Fällen wird der Plastochinonpool durch NAD(P)H reduziert, wobei bei der Chlororespiration eine sauerstoffabhängige Oxidation von Plastochinon vorliegt. Als terminaler Elektronenakzeptor wurde die plastidäre terminale Oxidase (PTOX) identifiziert (Carol et al., 2001; Joet et al., 2002; Kuntz, 2004). Einzelne Komponenten des NDH-Komplexes wurden auch im inneren Membransystem von Etioplasten nachgewiesen, wobei die Konzentration dieser Untereinheiten wie NdhF sogar deutlich höher als in Chloroplasten ist (Catala et al., 1997; Guera et al., 2000). Auf dieser Basis wurde bereits eine mögliche Elektronentransportkette in Etioplasten postuliert, da auch weitere mögliche Komponenten wie die FNR, Cyt *b<sub>6</sub>f* sowie der ATPase-Komplex vorhanden sind (Guera et al., 2000). Bislang existiert jedoch keine vollständige Charakterisierung der Untereinheiten des NDH-Komplexes in Etioplasten und auch die Existenz einer Elektronentransportkette konnte noch nicht bewiesen werden.

### 2.3. Import kernkodierter Proteine

Zahlreiche Proteine des Proteoms von Plastiden sind im Zellkern kodiert und werden im Cytosol translatiert. Liegt der Wirkort dieser Proteine im Stroma oder im inneren Membransystem von Plastiden müssen diese zielgerichtet importiert werden (Jarvis, 2008). Die Translokation über beide Hüllmembranen wird dabei durch einen Transportapparat bestehend aus TOC (*Translocon at the Outer envelope of Chloroplasts*) und TIC (*Translocon at the Inner envelope of Chloroplasts*) ermöglicht (Soll et al., 2004). Dabei handelt es sich um membranintegrale Porenkomplexe, wobei der Transport über den TOC-Komplex GTP-abhängig ist und durch eine Pore gebildet aus Toc75 erfolgt (Sveshnikova et al., 2000; Schleiff et al., 2003). Vom TOC-Komplex erfolgt der Transfer des zu importierenden Proteins über den Intermembranraum zum TIC-Komplex, wo ATP-abhängig der Import ins Stroma erfolgt (Schleiff et al., 2000; Becker et al., 2004). Voraussetzung für diesen Importweg ist ein abspaltbares Transitpeptid zur organellspezifischen Zielsteuerung (Blobel et al., 1979; Bruce, 2000). Die Transitpeptide verschiedener Proteine ähneln sich bezüglich ihrer Primärstruktur nur sehr wenig, weisen aber bezüglich des Zielortes Plastide bestimmte Gemeinsamkeiten auf. Sie bestehen bevorzugt aus kleinen hydrophoben Aminosäuren und sind angereichert mit hydroxylierten Aminosäuren wie Ser und Thr. Darüber hinaus liegen sie in wässriger Lösung

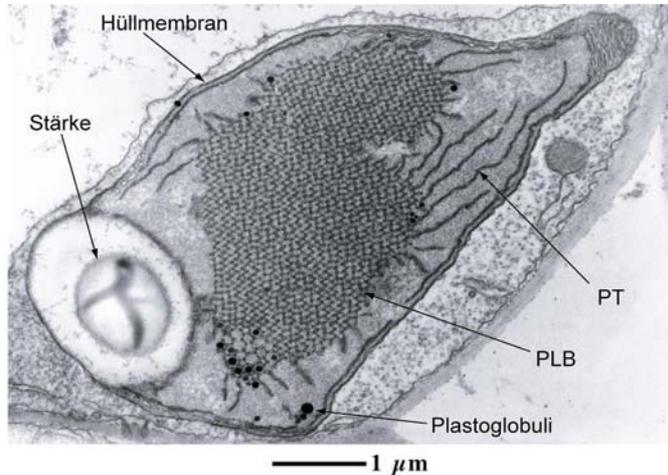
unstrukturiert vor, nehmen aber partiell in einer Lipidumgebung  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturen an (Bruce, 2001). Nach dem Import erfolgt die Prozessierung des Vorläuferproteins und das Transitpeptid wird durch eine Signalpeptidase abgetrennt (Richter et al., 1998). Ein Teil dieser Proteine wird innerhalb des Chloroplasten über eine weitere Membran, die Thylakoidmembran, in das Lumen transportiert. Für diesen Transport wurden mehrere verschiedene Mechanismen beschrieben. Zum einen sind dies der Sec-Transportweg (*Secretory*) und zum anderen der TAT-Transportweg (*Twin-Arginine Translocase*) für den Transport in das Lumen, sowie der SRP-Weg (*Signal Recognition Particle*) und ein Mechanismus der spontanen Insertion für die Integration von Proteinen in die Thylakoidmembran (Jarvis et al., 2004; Gutensohn et al., 2006). Lumenale Proteine weisen in der Regel ein zweites Transitpeptid auf, welches C-terminal direkt an das erste Transitpeptid anschließt und nach dem Import ebenfalls abgespalten wird (von Heijne et al., 1989). Einzelne membranintegrale Proteine der Thylakoidmembran, deren N-Terminus auf der lumenalen Seite liegt, wie etwa PsbK und PsbY, weisen ebenfalls ein lumenales Transitpeptid auf (Thompson et al., 1998; Thompson et al., 1999).

### **3. Etioplasten: Organelle in Dunkelheit**

In Angiospermen ist die Biosynthese von Chl strikt lichtabhängig und die Assemblierung von Proteinkomplexen zur Photosynthese erfolgt erst nachdem Licht zur Verfügung steht. Wachsen Pflanzen in völliger Dunkelheit, so beobachtet man die Bildung von Etioplasten, welche eigenständig differenzierte Chl-freie Plastiden darstellen, die nach Belichtung eine Transformation zu Chloroplasten erfahren.

### 3.1. Struktureller Aufbau von Etioplasten

Etioplasten sind zwar direkte Vorstufen von Chloroplasten, zeigen aber signifikante Unterschiede zu diesen in ihrem ultrastrukturellen Aufbau (Abb. 3).



**Abb. 3 Aufnahme eines Etioplasten mittels Elektronenmikroskopie**

Die Aufnahme stammt von einem Etioplasten aus *Sorghum bicolor*. Dominierendes Kompartiment innerhalb des Stromas ist der parakristalline Prolamellarkörper (PLB). Daran angegliedert sind Prothylakoidmembranen (PT) erkennbar. Des Weiteren sind ein Stärke Korn und Plastoglobuli, sowie die doppelte Hüllmembran erkennbar. Die Aufnahme wurde von G. Wanner zur Verfügung gestellt.

Etioplasten weisen wie Chloroplasten eine äußere und eine innere Hüllmembran mit dazwischen liegendem Intermembranraum auf, welche das Stroma mit einem unabhängigen inneren Membransystem umschließen. Dieses innere Membransystem weist jedoch eine grundlegend andere Organisation und Struktur auf. Zentrales Element ist der parakristalline Prolamellarkörper. Darin enthalten sind Lipide entsprechend der Thylakoidmembran, jedoch fehlen mehrere für die Photosynthese nötige Proteinkomplexe (Mackender, 1978; Selstam et al., 1984). Stattdessen findet sich in hoher Konzentration das Protein NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase A (PORA), welches ein wesentliches Enzym der Chl-Synthese ist (Franck et al., 2000; Blomqvist et al., 2008). Darüber hinaus finden sich in Etioplasten Prothylakoidmembranen, sowie entsprechend den Chloroplasten Stärkeköerner, Plastoglobuli und Ribosomen.

### 3.2. Die Rolle der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase

In Angiospermen ist einer der letzten Schritte der Chl-Synthese strikt lichtabhängig, wodurch die gesamte Differenzierung von Chloroplasten aus Proplastiden oder Etioplasten reguliert wird. Lichtabhängig ist dabei die Umwandlung von Protochlorophyllid *a* (Pchlid *a*) zu Chlorophyllid *a* durch das Enzym POR (Griffiths, 1978; Apel et al., 1980). Von POR wurden bisher drei verschiedene Isoenzyme beschrieben PORA, PORB und PORC (Spano et al., 1992; Holtorf et al., 1995; Oosawa et al., 2000; Masuda et al., 2003). PORA wurde in erster Linie in Etioplasten nachgewiesen und liegt dort in hoher Konzentration im PLB und den PT vor (Dahlin et al., 1995). Zusammen mit dem Substrat Pchlid *a* und dem Kofaktor NADPH bildet

sie einen ternären Komplex (Griffiths, 1978). Dieser Komplex zerfällt nach der Belichtung und Umwandlung zu Chlorophyllid *a* und PORA wird anschließend abgebaut. Gleichzeitig unterliegt die mRNA-Expression von PORA einer lichtabhängigen negativen Kontrolle, was dazu führt, dass nach vierstündiger Belichtung keine mRNA mehr nachgewiesen werden kann (Batschauer et al., 1984; Reinbothe et al., 1995). In Chloroplasten ist PORA dann vollständig abwesend. PORB hingegen weist keine lichtregulierte Expression auf und ist sowohl in Etioplasten, als auch in Chloroplasten anwesend (Holtorf et al., 1996). PORC wurde bislang in *Arabidopsis thaliana*, nicht aber in Gerste oder anderen Gräsern nachgewiesen und fungiert möglicherweise als Lichtschutz während der Ergrünung (Oosawa et al., 2000; Masuda et al., 2003).

Alle drei Isoenzyme von POR sind kernkodiert und werden als Precursor-Proteine mit einem Transitpeptid im Cytosol synthetisiert. Während des Imports in die Plastide erfolgt die Prozessierung zum murenen Protein. Von Bedeutung ist dabei, dass für PORA und PORB zwei grundlegend unterschiedliche Hypothesen bezüglich des Importmechanismus durch die äußere und innere Hüllmembran postuliert wurden (Aronsson et al., 2003). Nach der ersten Hypothese erfolgt sowohl der Import von PORA, als auch von PORB über den generellen Importweg und die Komplexe TOC und TIC (Dahlin et al., 2000; Aronsson et al., 2000; Aronsson et al., 2003). Die zweite Hypothese nimmt einen unterschiedlichen Import von PORA und PORB an. PORB wird danach über den generellen Importweg importiert, wohingegen PORA abhängig von der Anwesenheit des Substrats Pchlid, welches an das Transitpeptid bindet, importiert wird (Reinbothe et al., 1995; Reinbothe et al., 1996; Reinbothe et al., 2000; Kim et al., 2004). Entsprechend wurden auch Proteine, die an diesem neuen Importweg beteiligt sind, wie ein Protein der äußeren Hüllmembran OEP16, sowie der Chlorophyllid *a* Oxigenase (CAO), beschrieben (Reinbothe et al., 2004; Reinbothe et al., 2004; Reinbothe et al., 2005; Kim et al., 2005). In jüngster Zeit erfolgte jedoch eine Modifikation dieser Hypothese, wonach PORA sowohl durch den generellen Importweg, als auch substratabhängig importiert werden kann (Schemenewitz et al., 2007). Auch konnte eine Beteiligung der Proteine OEP16 und CAO nicht bestätigt werden (Philippar et al., 2007).

### **3.3. Vorgänge bei der Ergrünung**

Unmittelbar nach der Belichtung von Etioplasten beginnt die Umstrukturierung des PLB, sowie der Prothylakoide und die Bildung der Thylakoidmembranen setzt ein. Dadurch wird die Oberfläche des inneren Membransystems um ca. das Zehnfache vergrößert (Von

Wettstein et al., 1995). Gleichzeitig setzt die Assemblierung der Photosystemkomplexe ein. Wesentliche Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit von Chl *a*. So werden zwar auch in Dunkelheit alle plastidenkodierte und Chl-bindenden Proteine exprimiert, doch werden diese mit Ausnahme von D2 in Abwesenheit von Chl *a* sofort wieder abgebaut (Eichacker et al., 1990; Kim et al., 1994; Müller et al., 1999). Dieser proteolytische Abbau wird erst durch Chl *a* gestoppt, wodurch es zur Akkumulation dieser Proteine und der Assemblierung der Photosystemkomplexe kommt (Eichacker et al., 1996; Eichacker et al., 1996). Chl *a* wird dabei nicht direkt auf die entsprechenden Proteine der Photosystemkomplexe übertragen, sondern es erfolgt eine Zwischenspeicherung durch einen Proteinkomplex aus Lil3 (Reisinger et al., 2008). Für verschiedene kernkodierte Proteine, wie der LHC-Proteine oder PsbX, wurde eine lichtregulierte Transkription beobachtet (Apel et al., 1978; Silverthorne et al., 1984; Shi et al., 1999). Folglich erfolgt der Import dieser Proteine in die Plastide erst nach Belichtung und in den Chloroplasten erfolgen die Bindung von Chl und die Assemblierung zu den entsprechenden Photosystemkomplexen. Über die Regulation niedermolekularer und plastidär kodierter Proteine des PSII ist bislang nur sehr wenig bekannt. In Etioplasten konnte die mRNA von PsbE, F, H, J, L, M, N, nicht aber von PsbK und I nachgewiesen werden (Hird et al., 1991; Kawaguchi et al., 1992). Der Proteinnachweis gelang bislang nur für die Proteine PsbE und PsbH (Müller et al., 1999; Blomqvist et al., 2008). Bei der Assemblierung von PSII wird diesen Untereinheiten eine wichtige Funktion beim Aufbau und der Stabilisierung des Komplexes zugeschrieben (Shi et al., 2004; Rokka et al., 2005). Während der Ergrünung sind nicht nur die Komponenten des späteren Photosystemkomplexes von Bedeutung, sondern es wurden auch mehrere Faktoren beschrieben, die während der Assemblierung eine zeitlich begrenzte Rolle spielen, aber kein Bestandteil des muren Komplexes sind (Plucken et al., 2002; Stockel et al., 2004; Amann et al., 2004; Peng et al., 2006; Ma et al., 2007). In ergrünenden Keimlingen konnte gezeigt werden, dass bereits vier Stunden nach Beginn der Belichtung ein linearer Elektronentransport vorliegt (Ohashi et al., 1989).

#### **4. Moderne Strategien zur (Sub-) Proteomanalyse**

Mitte der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde der Begriff des Proteoms von M. R. Wilkins und K. L. Williams eingeführt. Ein Proteom stellt danach die Gesamtheit aller Proteine in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle, oder einem Zellkompartiment dar, die während eines definierten Zustands exprimiert werden. Im Gegensatz zum Genom, welches einen statischen Zustand darstellt, ist im Proteom eine dynamische Komponente enthalten, wobei nicht nur unterschiedliche Zusammensetzungen in verschieden differenzierten Zellen und Kompartimenten beobachtet werden, sondern es sind auch Veränderungen während der Entwicklung und abhängig von Umwelteinflüssen von Bedeutung. Subproteome sind in diesem Zusammenhang Gruppen von Proteinen, die durch ein gemeinsames Merkmal wie ein bestimmter Molekularmassenbereich, Hydrophobizität oder eine definierte posttranslationale Modifikation gekennzeichnet sind und Teil eines übergeordneten Proteoms sind. Von Bedeutung ist auch die Anordnung von Proteinen im Proteom eines Kompartiments. Zahlreiche Proteine liegen nicht frei vor, sondern entfalten ihre Funktion erst in einem funktionellen Verbund mit anderen Proteinen und Kofaktoren in einem definierten stöchiometrischen Verhältnis, dem Proteinkomplex.

Die Analyse von Proteomen wird nicht nur durch ihre hohe Komplexität erschwert, sondern sie stellt auch hohe Anforderungen an die Empfindlichkeit der verwendeten analytischen Methoden. Basierend auf Genomanalysen werden etwa für *Arabidopsis thaliana* ca. 27000 exprimierte Proteine vorhergesagt (Wortman et al., 2003), wobei für ca. 25% dieser Proteine angenommen wird, dass sie membranintegral vorliegen (Schwacke et al., 2003). Für Chloroplasten wird eine Proteomgröße von ca. 2500 bis 5000 verschiedenen Proteinen angenommen (Park, 2004; Baginsky et al., 2004). In diesem Chloroplastenproteom von *A. thaliana* wurde ein Subproteom von 520 Proteinen vorhergesagt, welche jeweils durch mindestens eine Transmembrandomäne gekennzeichnet sind (Peltier et al., 2004). Von Bedeutung ist dabei ein großer dynamischer Bereich bezüglich der molaren Konzentration einzelner Proteine von ca.  $10^6$ , was besondere Herausforderungen an die Detektierbarkeit niedrig konzentrierter Proteine stellt (van Wijk, 2004). Darüber hinaus werden Proteine häufig nach der Translation modifiziert, wobei zum einen die Abspaltung von Transitpeptiden zählt und zum anderen posttranslationale Modifikationen, wie etwa Acetylierungen oder Phosphorylierungen. Die Herausforderung für die moderne Proteomforschung besteht somit nicht nur in der möglichst umfangreichen Identifizierung von Proteinen über einen großen

dynamischen Bereich, sondern auch in der Charakterisierung einzelner Proteine und ganzer Proteome mit Bezug auf mögliche Funktionszusammenhänge (Mann et al., 2001; de Hoog et al., 2004; Cox et al., 2007). Entsprechend dieser Anforderung wurden verschiedene Strategien zur Charakterisierung von Proteomen entwickelt, wie „Shotgun-Proteomics“ und Funktionelle Proteomics. Darüber hinaus sind mehrere grundlegende Methoden zur Fraktionierung und Proteinidentifizierung Voraussetzung für erfolgreiche Proteomanalysen.

#### 4.1. „Shotgun-Proteomics“

Als „Shotgun-Proteomics“ werden Techniken bezeichnet, welche auf die möglichst umfangreiche Identifikation von Proteinen einer Probe abzielen und als Resultat Proteinlisten liefern. Mit dieser auch als *bottom-up* Ansatz bezeichneten Strategie werden komplexe Proteome durch proteolytischen Verdau direkt in Peptide gespalten und eine Reduzierung der Komplexität dieser Proben wird durch ein- und mehrdimensionale Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie auf Peptidebene erreicht. Bei der *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT) erfolgt eine Kopplung zweier unterschiedlicher chromatographischer Trennsysteme, wie *Reversed Phase* (RP)- und *Strong Cation Exchange* (SCX)-Chromatographie (Link et al., 1999; Washburn et al., 2001; Swanson et al., 2005; Florens et al., 2006). Die Identifikation der Proteine wird durch direkt gekoppelte massenspektrometrische Analysen und den Abgleich der erhaltenen Daten mit Proteindatenbanken erreicht. Entsprechende Methoden sind oft hochgradig automatisiert, wodurch ein hoher Durchsatz an Proben bewältigt werden kann, was umfangreiche Analysen von verschiedenen Zellzuständen oder Organellen ermöglicht. In Chloroplasten wurden entsprechende Methoden erfolgreich zur Bestimmung des kompletten Proteoms (Baginsky et al., 2005) und zur Identifikation von LHC-Proteinen (Ouellette et al., 2002) eingesetzt. Nach Baginsky *et al.* 2004 können mittels *Shotgun Proteomics* drei biologische Fragestellungen beantwortet werden (Baginsky et al., 2004): Erstens ist es möglich, hypothetische Proteine, die in Datenbanken basierend auf Genomsequenzierungen postuliert werden, als exprimierte Proteine nachzuweisen. Voraussetzung ist jedoch eine vorangegangene Sequenzierung des Genoms des zu untersuchenden Organismus. Zweitens besteht die Möglichkeit, innerhalb der Zelle die einzelnen Proteome von Organellen zu bestimmen, wodurch neue Erkenntnisse über den Proteintransport und die Lokalisierung einzelner Proteine gewonnen werden können. Drittens können auch quantitative Aussagen über die Menge einzelner Proteine gewonnen werden. Ältere Ansätze beruhen dabei auf der Abschätzung der Proteinmenge auf Basis der

Anzahl identifizierter Peptide pro Protein (Washburn et al., 2001). Fortgeschrittene Methoden zur präzisen Quantifizierung basieren auf der Signalintensität der gemessenen Peptidsignale (Silva et al., 2005; Johansson et al., 2006), auf der Markierung von Peptiden durch isotopenmarkierte Aminosäuren, wie etwa SILAC (Ong et al., 2002; Ong et al., 2007), oder auf der kovalenten Einführung isotopenmarkierter Tags (Gygi et al., 1999; Ross et al., 2004; Schmidt et al., 2005). Informationen über posttranslationale Modifikationen, die Masse intakter Proteine oder die Zugehörigkeit zu Komplexen werden bei diesen Ansätzen zur Proteomanalyse nicht gewonnen.

## 4.2. Funktionelle Plastiden-Proteomics

Die funktionelle Proteomanalyse bezieht sich nicht auf die ausschließliche Identifizierung von Proteinen eines Proteoms, sondern versucht eine weitergehende Charakterisierung von Proteinen bezüglich Komplexzugehörigkeit, posttranslationaler Modifikationen, Prozessierungen, funktionaler Protein-Protein Interaktionen und auch quantitativer Aspekte (Mann et al., 2001; Baginsky et al., 2004; Jorin et al., 2007; Collura et al., 2007; Salvi et al., 2008). Die Komplexität ganzer Proteome wird durch Auftrennung in intakte Proteinkomplexe oder Einzelproteine verringert und erst dann erfolgt gegebenenfalls ein proteolytischer Verdau in Peptide. Diese Strategie wird im Gegensatz zum *bottom-up* Ansatz auch als *top-down* Ansatz bezeichnet (Whitelegge et al., 2006). Weit verbreitete Methoden zur Proteinauftrennung vor der massenspektrometrischen Analyse basieren auf ein- und zweidimensionaler Gelelektrophorese. Durch die Kombination von isoelektrischer Fokussierung mit SDS-PAGE gelang in erster Linie die Trennung von löslichen und membranassoziierten Proteinen stromaler oder lumenaler Herkunft aus Plastiden (Kieselbach et al., 2000; Hippler et al., 2001; Peltier et al., 2002; Goulas et al., 2006). Die Kombination von blau-nativer (BN)-PAGE mit SDS-PAGE ermöglicht auch die Auftrennung von membranintegralen Proteinen verbunden mit der Identifikation von Proteinkomplexen und der zugehörigen Untereinheiten. Dadurch konnten die Membranproteinkomplexe von Thylakoidmembranen detailliert charakterisiert werden (Zhang et al., 2001; Thidholm et al., 2002; Aro et al., 2005; Ciambella et al., 2005; Granvogl et al., 2006). Alternativ zu gelelektrophoretischen Trennungen von Proteinen gibt es auch verschiedene gelfreie Methoden zur Isolation von Komplexen oder Fraktionierung von Proteingemischen. Eine Möglichkeit besteht darin mittels Affinitätschromatographie einzelne Komplexe zu isolieren. So gelang die Aufreinigung verschiedener Komplexe der Thylakoidmembran durch Ni<sup>2+</sup>-

Affinitätschromatographie, nachdem einzelne Untereinheiten durch Transformation mit His-Tags versehen worden waren (Sugiura et al., 1998; Bricker et al., 1998; Rumeau et al., 2005). In anderen Ansätzen zur Analyse ganzer Plastidenproteome erfolgt eine Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation (z.B. Sucrose-Gradient), gefolgt von einer Auftrennung der intakten Proteine mittels RP-HPLC (Gomez et al., 2002; Friso et al., 2004; Huber et al., 2004; Zolla et al., 2007). Mit diesen Methoden besteht auch die Möglichkeit der Identifikation posttranslationaler Modifikationen wie N-terminale Acetylierung und Formylierung, oder auch Phosphorylierungen (Vener et al., 2001; Whitelegge et al., 2006; Hung et al., 2007).

### 4.3. Gelelektrophoretische Fraktionierung von Proteomen

Ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese ist die am häufigsten verwendete Methode zur Auftrennung komplexer Proteinproben. Die grundlegende Methode ist dabei die SDS-PAGE nach dem System von Lämmli *et al.*, wo eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht der Proteine erfolgt (Laemmli, 1970). Oft wird die SDS-PAGE nicht mehr alleine zur Trennung herangezogen, sondern es erfolgt eine Kombination mit einer zweiten gelelektrophoretischen Trennmethode, wobei hier die Trennung aufgrund einer anderen Eigenschaft als dem Molekulargewicht eines Einzelproteins erfolgt. Häufig wird die isoelektrische Fokussierung als 1. Dimension eingesetzt, wobei eine Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt erfolgt (O'Farrell, 1975). Ein Proteingemisch wird dabei in einem pH-Gradientengel aufgetrennt. Die Trennung beruht auf der pH-Abhängigkeit des Ladungszustandes eines Proteins und nur am isoelektrischen Punkt liegt ein Protein neutral vor, wobei es immobilisiert wird. Durch diese Methode können auch unterschiedlich modifizierte Formen eines Proteins getrennt werden, da etwa Phosphorylierungen Einfluss auf den isoelektrischen Punkt haben. Die Verwendung von nichtionischen Detergenzien wie n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DM) ermöglicht auch die Trennung von Membranproteinen mit moderat hydrophoben Eigenschaften, jedoch gelang bislang noch nicht die Trennung von hydrophoben membranintegralen Proteinen (Pasquali et al., 1997; Hippler et al., 2001; Weiss et al., 2007). Durch native Gelelektrophorese erfolgt zunächst die Auftrennung in einzelne Proteinkomplexe, bevor mittels SDS-PAGE als 2. Dimension die Auftrennung in die Untereinheiten der Komplexe erfolgt. Im Gegensatz zur IEF ist diese Methode auch zur Trennung von hydrophoben, membranintegralen Proteinen geeignet und ermöglicht direkte Aussagen über Protein-Protein Interaktionen (Reisinger et al., 2006; Reisinger et al., 2007;

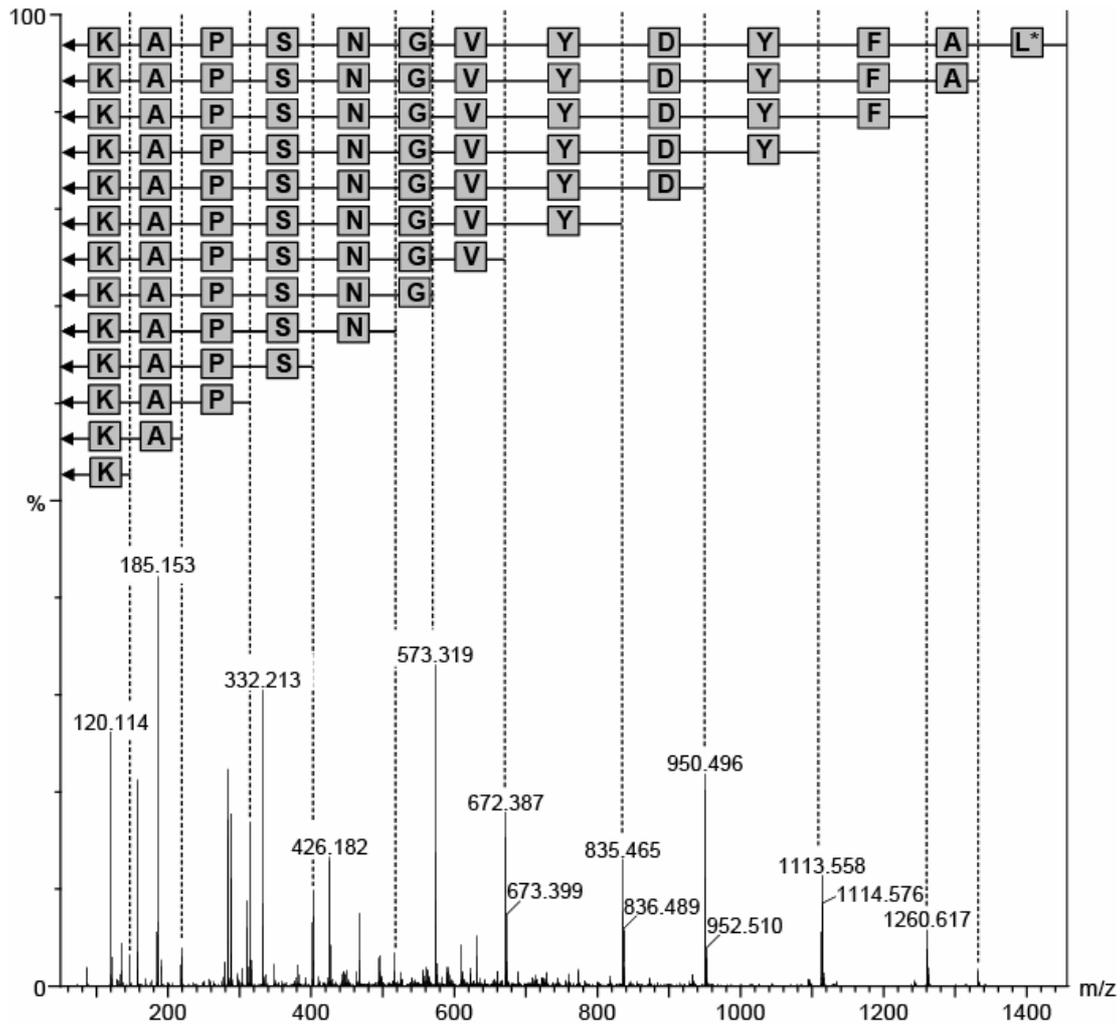
Reisinger et al., 2008). Die Proteinkomplexe werden mit einem nichtionischen Detergenz wie DM oder Digitonin solubilisiert, um sie in einem möglichst nativen Zustand zu erhalten. In der ursprünglichen Methode nach Schagger & von Jagow 1991 erfolgt die gelelektrophoretische Auftrennung mit Verwendung von Coomassie G als Ladungsüberträger um die elektrophoretische Mobilität zu erhöhen und eine Auftrennung nach der Molekularmasse des Komplexes zu erhalten (Schagger et al., 1991; Schagger et al., 1994; Schagger, 2001). Alternativ dazu können auch farblose Ladungsüberträger, wie Lithiumdodecylsulfat oder Desoxycholat verwendet werden, wodurch spektroskopische Eigenschaften der separierten Komplexe im Gel vermessen werden können (Wittig et al., 2005; Wittig et al., 2007; Reisinger et al., 2008).

Die Visualisierung von Proteinbanden im Gel erfolgt entweder durch direkte Färbung mit Coomassie (Fazekas de St Groth et al., 1963; Tal et al., 1985) oder Silber (Rabilloud, 1990; Mortz et al., 2001), oder mittels Fluoreszenzfarbstoffen (Marouga et al., 2005). Die Detektion von Proteinen mittels Fluoreszenzfarbstoffen erfordert in der Regel die kovalente Modifikation der Proteine vor der gelelektrophoretischen Auftrennung. Die Verwendung von drei unterschiedlichen CyDye Farbstoffen ermöglicht auch einen qualitativen und quantitativen Vergleich zweier Proteome mittels *differential gel electrophoresis* (DIGE) (Lilley et al., 2004).

#### **4.4. Massenspektrometrie**

Die Identifikation von Proteinen erfolgt heutzutage in den meisten Fällen mittels Massenspektrometrie. In den vergangenen 20 Jahren wurden zwei Methoden zur schonenden Ionisierung von Biomolekülen entwickelt. Zum einen sind dies die *Elektrospray Ionisation* (ESI), wobei die Ionisierung der Analytmoleküle kontinuierlich aus einer Lösung erfolgt (Whitehouse et al., 1985; Fenn et al., 1989), und zum anderen die *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI), wobei es sich um eine gepulste Ionisierung aus einer kristallinen Matrix handelt (Karas et al., 1988). Mittels MALDI werden fast ausschließlich einfach geladene Ionen erzeugt, wohingegen mittels ESI überwiegend mehrfach geladene Analytmoleküle generiert werden. Dieser Unterschied hat einen wesentlichen Einfluss auf die Methode, die zur Proteinidentifikation angewendet wird. Sowohl für ESI, als auch für MALDI-MS erfolgt in der Regel zunächst ein proteolytischer Verdau von intakten Proteinen mit einer spezifischen Endoprotease entweder in Lösung nach gelfreien Aufreinigungsmethoden, oder innerhalb des Polyacrylamidgels (PAG) (Rosenfeld et al., 1992;

Granvogl et al., 2007). Erfolgt die Analyse des resultierenden Peptidgemisches mittels MALDI, so wird das Protein üblicherweise mittels *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) identifiziert (Henzel et al., 1993; Mann et al., 1993; Cottrell, 1994). Wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Protein-Identifikation mittels PMF ist eine möglichst umfangreiche Proteindatenbank, denn die Identifikation beruht auf dem Vergleich der detektierten Peptidmassen mit den theoretisch zu erwartenden Peptidmassen aller Proteine der Datenbank. Vorteil dieser Methode ist eine sehr kurze Messzeit verbunden mit der Möglichkeit eines hohen Probendurchsatzes. Nachteil ist der Umstand, dass Proteine, die nicht in der Datenbank eingetragen sind, nicht identifiziert werden können. Darüber hinaus liefern Proben mit niedriger Proteinkonzentration oft nicht signifikante Ergebnisse, da zu wenige Peptide für ein signifikantes Match detektiert werden. In diesen Fällen führt die ESI-MS häufig zu qualitativ besseren Ergebnissen. Zwar besteht auch mittels ESI-MS die Möglichkeit der Bestimmung von Peptidmassen mit anschließender PMF-Identifikation des Proteins, doch der eigentliche Vorteil der ESI liegt in der Möglichkeit Fragmentationenspektren von mehrfach geladenen Peptiden aufzunehmen (Shevchenko et al., 1997; Jensen et al., 1999; Shevchenko et al., 2000). Die Erzeugung von Fragmentationen erfolgt nach Selektion eines Vorläuferions, etwa durch einen Quadrupol und anschließende niederenergetische Stoßfragmentierung mit einem Inertgas wie beispielsweise Argon. Die resultierenden Fragmentationen werden dann mit einem zweiten Massenanalysator, wie einem weiteren Quadrupol oder einem Flugzeitmassenanalysator (*Time of Flight*, TOF) analysiert. Diese Technik wird auch als Tandem-MS bezeichnet und entsprechend generierte Spektren werden MSMS-Spektren genannt. Da mehrfach geladene Vorläuferionen fragmentiert werden erhält man mit hoher Wahrscheinlichkeit auch geladene Fragmentationen, die detektiert werden können. Dabei werden in erster Linie Brüche der Peptidbindung beobachtet und resultierende Fragmentationen, die den N-Terminus des Peptides beinhalten, werden *y*-Ionen genannt. Die korrespondierenden Fragmentationen, welche den C-Terminus des Peptides enthalten, werden als *b*-Ionen bezeichnet. Brüche von C-C, bzw. N-C-Bindungen des Peptidrückgrades führen zu *a* und *x*, bzw. *c* und *z*-Ionen (Biemann, 1990). Diese stellen jedoch nur einen geringen Anteil der beobachteten Fragmentationen dar. Der Massenunterschied zwischen zwei benachbarten Ionen einer Ionenserie entspricht nun genau der Masse der Aminosäure an dieser Position im Peptid. Dadurch besteht die Möglichkeit durch *de novo* Sequenzierung die Sequenz des Peptides zu ermitteln, ohne dass weitere Informationen über das Peptid oder Protein nötig sind (Abb. 4) (Yates et al., 1995; Rowley et al., 2000; Zhang et al., 2000).



**Abb. 4** Fragmentationenspektrum und mittels *de novo* Sequenzierung ermittelte Aminosäuresequenz

Fragmentationenspektrum eines tryptischen Peptids mit der Masse 1443.72 Da von CP47 aus *Synechocystis* (PCC 6803) mit der Sequenz LAFYDYVGNVYDGYVYDFYAL\* nach Granvogl *et al.* (Granvogl *et al.*, 2007). Das Vorläuferion wurde bei  $m/z$  722.86  $[M+2H]^{2+}$  detektiert. Durch gepunktete Linien sind die identifizierten y-Ionen dargestellt, wobei sich aus der für jede Aminosäure charakteristischen Massendifferenz zweier benachbarter y-Ionen die Aminosäuresequenz ergibt.

Der entscheidende Vorteil der *de novo* Sequenzierung liegt darin, dass Aminosäuresequenzen unabhängig von weiteren Informationen über das Peptid oder Protein ermittelt werden können. Dadurch können auch Sequenzinformationen von Proteinen gewonnen werden, deren Existenz bislang unbekannt war und wo es somit keine Sequenzinformationen aus Datenbanken gibt. Gewonnene Sequenzen können durch BLAST-Analysen mit Proteindatenbanken verglichen werden, wodurch homologe Proteine identifiziert werden können (Pearson, 1990; Yates *et al.*, 1995). Dadurch besteht nicht nur die Möglichkeit ein bekanntes Protein zu identifizieren, sondern es können auch homologe Proteine aus anderen Organismen identifiziert werden, oder ein unbekanntes Protein kann zumindest mit nahe verwandten Proteinen in Zusammenhang gebracht werden.

## **5. Aufgabenstellung**

Etioplasten sind hochspezialisierte pflanzliche Organelle der Plastidenfamilie, die während der Skotomorphogenese von Pflanzen gebildet werden. Die Morphologie der Etioplasten unterscheidet sich grundlegend von Chloroplasten, die während der Photomorphogenese gebildet werden. Durch Belichtung von Pflanzen, die im Dunkeln angezogen worden sind, kommt es zur Induktion der Transformation von Etioplasten zu Chloroplasten. Die unmittelbar vor Induktion des biologischen Systems bestehende Zusammensetzung der Proteine und Proteinkomplexe des Etioplasten ist allerdings bislang kaum untersucht worden.

Aufgabe dieser Promotionsarbeit war es deshalb, die Proteine und Proteinkomplexe der inneren Membransysteme des Etioplasten mit massenspektrometrischen Techniken zu charakterisieren. Verschiedene Teilbereiche des plastidären Subproteoms sollten hierbei genauer betrachtet werden. Zum einen sollten die N-Termini einzelner importierter Proteine von Etioplasten bestimmt werden und zum anderen war es das Ziel die membranintegralen Proteine der inneren Etioplastenmembran zu identifizieren. Die Charakterisierung dieser Proteine sollte sich darüber hinaus auch auf die Zugehörigkeit zu Proteinkomplexen erstrecken und im Vergleich zum Proteom der Thylakoidmembran von Chloroplasten erfolgen.

## C. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1. Geräte

Anzuchtschrank	Rumed Kühl-Brutschrank	Rubarth Apparate, Laatzen
Auflichtscanner	Epson Perfection 1640SU	Epson Deutschland, Meerbusch
Blot-Apparatur	Nova Blot Kit (MultiPhor II)	GE Healthcare, Buckinghamshire
Elektrophoreseapparatur	Protean II	Biorad, Hercules
Fluoreszenzscanner	Typhoon Trio	GE Healthcare, Buckinghamshire
Geltrockner	Gel slab dryer GD2000	Hoefer, San Francisco
Gradientenmischer	Gradient maker SG 50	Hoefer, San Francisco
Hochdruck- flüssigkeitschromatographie	nanoAcquity UPLC Agilent 1100 Nano Pump	Waters, Eschborn Agilent Technologies, Waldbronn
Horizontalschüttler	K2	Bachofer, Reutlingen
Kühlzentrifugen	Sorvall RC5B Centrifuge 5415R Hettich Universal 30RF	Sorvall Dupont, Wilmington Eppendorf, Hamburg Andreas Hettich, Tuttlingen
Lichtbank	Eigenbau	Werkstatt, Botanisches Institut
Lichtmikroskop	Leitz Diavert	Leitz Wetzlar, Wetzlar
Massenspektrometer	Q-TOF Premier nano-ESI Q-TOF 1.5 nano-ESI MALDI Micro MX	Waters, Eschborn Waters, Eschborn Waters, Eschborn
Spektralphotometer	UV2401 PC	Shimadzu, Duisburg
Software	MassLynx 4.0/ 4.1 ProteinLynx Global Server ChemStation LC	Waters, Eschborn Waters, Eschborn Agilent Technologies, Waldbronn
Spannungsgerät	EPS 600/EPS 3500	Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermoschüttler	HTM 130 LP; MKR 10	HLC Bio Tech, Bovenden
Ultraschallbad	Ultrasonic 28X	Blackstone NEY, Jamestown
Ultra-Thurax	Polytron PT 10-35	Kinematica, Littau-Lucerne
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg

## 1.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und wurden von den Firmen Aldrich, Applichem, Biomol, Fluka, GE Healthcare, Merck, Promega, Roth, Serva und Sigma bezogen. Lösungsmittel für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie waren von HPLC *gradient grade*-Qualität und wurden von der Firma Fisher Scientific bezogen.

Als Molekularmassenstandard wurden *high molecular weight* (HMW) Marker (BN-PAGE) (Tab. 1 A) und *low molecular weight* Marker (SDS-PAGE) (Tab. 1 B) von der Firma GE Healthcare, Buckinghamshire, sowie *protein marker broad range* (SDS-PAGE) von der Firma New England Biolabs, Ipswich (Tab. 1 C) verwendet.

**Tab. 1 Molekularmassenstandards für BN-PAGE (A) und SDS-PAGE (B, C)**

<b>A</b>	<b>Protein</b>	<b>MG (kDa)</b>	<b>C</b>	<b>Protein</b>	<b>MG (kDa)</b>
	Thyroglobulin	669		Myosin	212
	Ferritin	440		MBP-β- Galaktosidase	158
	Katalase	232		β-Galaktosidase	116
	Laktat-Dehydrogenase	140		Phosphorylase b	97,2
	BSA	67		BSA	66,4
				Glutamat-Dehydrogenase	55,6
				MBP	42,7
				Thioredoxinreduktase	34,6
				Triosephosphat-Isomerase	27,0
				Trypsininhibitor	20,1
<b>B</b>	<b>Protein</b>	<b>MG (kDa)</b>		Lysozym	14,3
	Phosphorylase b	97		Aprotinin	6,5
	Albumin	66			
	Ovalbumin	45			
	Carboanhydrase	30			
	Trypsininhibitor	20,1			
	α-Lactalbumin	14,4			

### 1.3. Pflanzenmaterial

Sommergerste ( <i>Hordeum vulgare</i> L. cultivar. Steffi)	Saatzucht Ackermann &Co, Irlbach
Erbse ( <i>Pisum sativum</i> L. var. Violetta/var. Golf)	Bayerische Futtersaatbau, Ismaning

### 1.4. Antikörper

Rabbit anti-PORA-Antikörper	Arbeitsgruppe Sundqvist, Göteborg
Rabbit IgG, HRP-Linked F(ab') <sub>2</sub> Fragment	GE Healthcare, Buckinghamshire

## 2. Methoden

### 2.1. Pflanzenanzucht

#### 2.1.1. Gerste

Die Anzucht erfolgte auf einer ca. 3 cm dicken Vermiculitschicht in einer 21 x 35 x 5 cm großen Anzuchtschale. Pro cm<sup>2</sup> wurden 2-3 Samen ausgesät und anschließend mit destilliertem Wasser getränkt, sowie mit einer dünnen Vermiculitschicht überdeckt.

Etiolierte Keimlinge wurden 4,5 Tage bei 25°C im lichtdichten Anzuchtschrank angezogen. Innerhalb dieser Zeit erreichten die gelb gefärbten Keimlinge eine Länge von 5-6 cm und hatten die Koleoptile durchwachsen.

Grüne Keimlinge wurden 4,5 Tage unter Dauerlicht (50 µE/m<sup>2</sup>) auf der Lichtbank angezogen.

#### 2.1.2. Erbse

Die Anzucht erfolgte entsprechend Gerste auf Vermiculit in einer Anzuchtschale. Die Erbsen wurden vor der Anzucht 12 h gewässert. Anschließend wurde pro cm<sup>2</sup> Vermiculit eine Erbse ausgesät. Etiolierte Erbsenkeimlinge wurden 6 Tage bei 25°C im lichtdichten Anzuchtschrank bei täglichem Wasserwechsel angezogen. Innerhalb dieser Zeit erreichten die Keimlinge eine Länge von ca. 10-15 cm und entwickelten 0,3-0,5 cm lange etiolierte Blätter.

### **2.1.3. Absorptionsspektrometrie**

Der etiolierte, chlorophyllfreie Zustand von Gersten- und Erbsenblättern wurde durch ein Spektralphotometer mit Ulbrichtkugel überprüft. Dazu wurden intakte, etiolierte Blätter auf dem Probenhalter fixiert und Absorptionsspektren wurden im Bereich von 400 bis 750 nm erstellt.

## **2.2. Plastidenisolation**

Die Isolation von Etioplasten erfolgte unter grünem Sicherheitslicht (515-560 nm,  $7 \times 10^{-4}$  W/m<sup>2</sup>), um eine Photoumwandlung des Pchlids und eine Bildung von Chl zu vermeiden. Chloroplasten wurden bei Tageslicht isoliert. Alle Arbeitsschritte der Plastidenisolation wurden, soweit möglich, auf Eis durchgeführt und sämtliche benötigten Medien und Materialien wurden auf 4°C vorgekühlt.

Pro Plastidenisolation wurden die Keimlinge einer Schale verwendet. Die Keimlinge wurden etwa 1 cm oberhalb des Vermiculits mit einer Schere abgeschnitten und in Isolationsmedium überführt. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem drehzahlregulierten Ultra-Thurax. Die erhaltene Suspension wurde über vier Lagen Baumwollgaze und eine Lage Nylongaze (Porengröße 22 µm) filtriert. Der Rückstand wurde ein zweites Mal mittels Ultra-Thurax in Isolationsmedium aufgeschlossen und erneut filtriert. Die vereinigten Filtrate wurden zentrifugiert (3800 x g, 3 min, 4°C) und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml Isolationsmedium resuspendiert, über die Nylongaze filtriert und auf einen 40%/80% Percoll<sup>TM</sup>-Stufengradienten geschichtet. Die intakten Plastiden wurden nach der Zentrifugation (4100 x g, 8 min, 4°C) im Ausschwingrotor von der 40%/80%-Stufe abgenommen. Die Suspension intakter Plastiden wurde mit dem 5-fachen Volumen an Waschmedium verdünnt und erneut zentrifugiert (4100 x g, 3 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bestehend aus intakten Plastiden wurde in ca. 200 µl Waschmedium resuspendiert.

Die Plastidenzahl wurde mikroskopisch durch Auszählung bestimmt. Ein Aliquot wurde im Verhältnis 1:500 mit Waschmedium hergestellt und in einem Hämatozytometer (Modell Thomazählkammer) im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. In der Zählkammer entsprachen

16 Felder einem Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$ , wodurch sich folgende Formel zur Bestimmung der Plastidenzahl/ $\mu\text{l}$  ergab:

$$\text{Plastidenzahl}/\mu\text{l} = \text{Plastidenzahl in 4 Feldern} \times 4 \times 10 \times 500$$

## **Lösungen**

Isolationsmedium:	0,4 M Sorbit 50 mM HEPES/KOH 2 mM EDTA pH 8,0
Waschmedium:	0,4 M Sorbit 50 mM HEPES/KOH pH 8,0
40% Perkoll:	40% (v/v) Perkoll™ 0,4 M Sorbit 50 mM HEPES/KOH 2 mM EDTA pH 8,0
80% Perkoll:	80% (v/v) Perkoll™ 0,4 M Sorbit 50 mM HEPES/KOH 2 mM EDTA pH 8,0

## **2.3. Isolation von Membranproteinen**

### **2.3.1. Isolation innerer Plastidenmembranen**

Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^8$  intakte Plastiden mit 200  $\mu\text{l}$  Tris-Magnesium-Kalium (TMK) Puffer versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Plastiden wurden zentrifugiert (7500 x g, 3 min, 4°C), wodurch lösliche Bestandteile von der Membranfraktion abgetrennt wurden. Der Überstand, welcher die stromalen Proteine enthielt, wurde verworfen und das

Pellet bestehend aus den Membranen wurde noch zweimal mit jeweils 200 µl TMK-Puffer gewaschen.

### **Lösungen**

TMK-Puffer:           10 mM Tris-HCL  
                          10 mM MgCl<sub>2</sub>  
                          20 mM KCl  
                          pH 8,5

### **2.3.2. Solubilisierung nativer Membranproteinkomplexe**

Die Solubilisierung nativer Membranproteinkomplexe für die blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) erfolgte mit n-Dodecyl-β-D-maltosid (DM). Dazu wurde das mit TMK-Puffer gewaschene Membranpellet in 70 µl ACA-Puffer resuspendiert und mit 10 µl DM versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden nicht solubilierte Membranbestandteile durch Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4°C) entfernt. Der Überstand, welcher die solubilierten Membranproteinkomplexe enthielt, wurde mit 5 µl Coomassie-Beladungslösung versetzt und direkt auf ein BN-PAG aufgetragen.

Im Fall der farblosen nativen PAGE (CNL-PAGE) erfolgte die Solubilisierung mittels DM, LDS und Digitonin. Die Membranen wurden in 70 µl TMK-Puffer resuspendiert und mit einem Detergenzgemisch bestehend aus 3 µl DM, 6 µl Digitonin und 0.1 µl LDS-Beladungslösung versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4°C) um nicht solubilierte Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde direkt auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen.

### **Lösungen**

ACA-Puffer:                           750 mM ε-Aminocapronsäure  
  50 mM Bis-Tris  
  0,5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>  
  pH 7,0

Digitonin:                           10% (w/v) Digitonin

DM:                                   10% (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid

Coomassie-Beladungslösung:       750 mM ε-Aminocapronsäure  
  5% (w/v) Coomassie-G

LDS-Beladungslösung:                    750 mM  $\epsilon$ -Aminocaprionsäure  
    5% (w/v) Lithium-Dodecylsulfat (LDS)

### **2.3.3. Solubilisierung von Einzelproteinen**

Im Fall von Etioplasten aus Gerste wurden Membranen, welche aus  $1 \times 10^8$  Etioplasten isoliert wurden, direkt in 100  $\mu$ l SB-Puffer resuspendiert und für 2 min bei 72°C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (16000 x g, 1 min, 15°C) abgetrennt. Der gesamte Überstand wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Die Isolation von Einzelproteinen aus etiolierten Erbsenkeimlingen erfolgte direkt aus den Einzelblättern. Dazu wurden ca. 10 Blätter in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 200  $\mu$ l TMK-Puffer versetzt und mittels Potter zerkleinert. Mittels Zentrifugation (16000 x g, 5 min, 4°C) wurden die löslichen Anteile abgetrennt und verworfen. Das Pellet wurde weitere zwei Mal mit 200  $\mu$ l TMK-Puffer versetzt und gepottert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit 100  $\mu$ l SB-Puffer versetzt und 5 min bei 100°C inkubiert. Nach Zentrifugation (16000 x g, 5 min, 15°C) wurde der Überstand mit den gelösten Membranproteinen direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

#### **Lösungen**

SB-Puffer:                    0,67% (w/v) SDS  
    1,1% (w/v) Saccharose  
    0,001% (w/v) Bromphenolblau  
    22 mM NaCO<sub>3</sub>  
    22 mM Dithiothreitol

## **2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

### **2.4.1. BN-PAGE**

Die Trennung nativer Membranproteinkomplexe für anschließende massenspektrometrische Analysen, sowie als 1. Dimension mit anschließender SDS-PAGE als 2. Dimension, erfolgte mittels BN-PAGE. Die verwendete Vorschrift basiert auf der Originalmethode von Schägger

und von Jagow (Schagger et al., 1991). Verwendet wurden 6-12% Gradientengele, welche mittels Gradientenmischer vertikal von oben nach unten gegossen wurden. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gradientengel mit einem 4% Sammelgel überschichtet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Gesamtgröße eines Gradientengels betrug ca. 20 x 20 x 0.075 cm.

Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C mit 1200 V, 12 mA, 24 W pro Gel in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur. Zu Beginn der Elektrophorese wurde ein mit Coomassie-G gefärbter Kathodenpuffer verwendet, der bei Erreichen der ersten Hälfte des Gradientengels durch einen farblosen Kathodenpuffer ohne Coomassie-G ersetzt wurde. Sobald die blaue Lauffront das untere Ende des Gradientengels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

### **Lösungen**

Gradientengel:	6 bzw. 12% PAA (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8) 500 mM ε-Aminocapronsäure 50 mM Bis-Tris/HCl 20% (w/v) Glycerin (nur bei 12% PAA) 0,019% (w/v) APS 0,048% (w/v) TEMED pH 7,0
Sammelgel:	4% PAA (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8) 500 mM ε-Aminocapronsäure 50 mM Bis-Tris/HCl 0,019% (w/v) APS 0,048% (w/v) TEMED pH 7,0
Kathodenpuffer:	50 mM Tricin 15 mM Bis-Tris/HCl 0,02% (w/v) Coomassie-G (optional) pH 7,0
Anodenpuffer	50 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0

### **2.4.2. CNL-PAGE**

Die CNL-PAGE wurde auf Basis der BN-PAGE entwickelt (Reisinger, 2008). Diese Form der nativen PAGE verwendet anstelle von Coomassie-G Lithium-Dodecylsulfat (LDS) als Ladungsüberträger. Dadurch weisen Membranproteinkomplexe ein identisches Laufverhalten wie bei der BN-PAGE auf, sind jedoch nicht blau gefärbt, wodurch etwa Enzymaktivitätstests im Gel möglich werden. Die verwendeten Gradientengele sowie die verwendeten Laufbedingungen der Elektrophorese waren identisch wie bei der BN-PAGE. Lediglich der Kathodenpuffer wurde modifiziert und ein Pufferwechsel während der Elektrophorese fand nicht statt.

#### **Lösungen**

Kathodenpuffer:      80 mM Tricin  
                             15 mM Bis-Tris/HCl  
                             0,002% (w/v) LDS  
                             pH 7,0

### **2.4.3. SDS-PAGE**

Die denaturierende PAGE basierte auf einem Tris-Glycin-Puffersystem entsprechend der Methode von Lämmli (Laemmli, 1970). Die Trenngele wiesen eine Konzentration von 12,5% Acrylamid auf und wurden mit Sammelgelen von 5% Acrylamid überschichtet. Zur Verbesserung der Auftrennung von Membranproteinen wurde den Trenngelen 4 M Harnstoff zugesetzt.

Im Fall der eindimensionalen Elektrophorese wurde ein Gel der Größe 20 x 20 x 0,075 cm verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 mA, 200 V, 20 W, 15°C über Nacht.

Mittels SDS-PAGE als 2. Dimension bestand auch die Möglichkeit Komplexe, die durch die native PAGE aufgetrennt wurden, in die einzelnen Untereinheiten zu zerlegen und diese aufzukonzentrieren. Dazu wurde ein bestimmter Komplex aus der 1. Dimension mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten und für 2 min in SDS-Solubilisierungspuffer bei RT inkubiert. Auf ein SDS-Gel mit einer Größe von 20 x 20 x 0,1 cm konnten bis zu fünf Banden luftblasenfrei gestapelt werden. Um die Position der Banden zu fixieren wurden sie mit

Agarose überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 mA, 200 V, 20 W, 15°C über Nacht.

### **Lösungen**

Trenngel:	12,5% PAA (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8) 4 M Harnstoff 375 mM Tris/HCl 0,016% (w/v) APS 0,05% (w/v) TEMED pH 6,8
Sammelgel:	5% PAA (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8) 125 mM Tris/HCl 0,05% (w/v) APS 0,015% (w/v) TEMED pH 8,8
Laufpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS pH 8,4
SDS-Solubilisierungspuffer:	2% (w/v) SDS 66 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2% (v/v) β-Mercapto-Ethanol
Agarose	0,5% (w/v) Agarose 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS pH 8,4

## 2.5. Detektion von Proteinen

### 2.5.1. Coomassie-Färbung

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele für 1 h in Coomassie-Färbelösung unter Schwenken inkubiert. Gleichzeitig erfolgte während der Färbung die Denaturierung der Proteine, wodurch sie im Gel fixiert wurden. Der blau gefärbte Hintergrund wurde zunächst durch 30 min Schwenken im 1. Entfärber verringert. Die vollständige Entfärbung des Hintergrundes erfolgte im 2. Entfärber über Nacht. Im Anschluss an die Dokumentation mittels Auflichtscanner wurden die Gele entweder auf 3 MM Whatmann-Filterpapier im Vakuumtrockner getrocknet oder es wurden direkt Proteinbanden für die Massenspektrometrie ausgeschnitten und bei -20°C aufbewahrt.

#### Lösungen

Färbelösung:	40% (v/v) Ethanol
	10% (v/v) Essigsäure
	0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
1. Entfärber:	40% (v/v) Ethanol
	10% (v/v) Essigsäure
2. Entfärber:	10% (v/v) Essigsäure

### 2.5.2. Colloidale Coomassie-Färbung

Für die Färbung von 2. Dimensionen wurde die colloidale Coomassie-Färbung verwendet, da diese eine deutlich höhere Sensitivität aufweist, als die unter 2.5.1. beschriebene Coomassie-Färbung. Die Empfindlichkeit liegt bei dieser Methode bei ca. 30 ng Protein im Vergleich zu ca. 100 ng Protein bei standardmäßiger Coomassie-Färbung (Neuhoff et al., 1988).

Die Gele wurden zunächst für 1 h unter Schwenken in Fixierlösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung über Nacht in Coomassie-Färbelösung auf dem Horizontalschüttler. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch mehrmaliges waschen in ddH<sub>2</sub>O. Die Dokumentation erfolgte mittels Auflichtscanner und im Anschluss wurden die Gele entweder getrocknet, oder Proteinbanden von Interesse wurden ausgeschnitten und bei -20°C gelagert.

## Lösungen

Fixierlösung:	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Ethanol
Coomassie-Färbelösung:	73.5% (v/v) Lösung A 1,5% (v/v) Lösung B 25% (v/v) Ethanol
Lösung A:	2% (w/v) ortho-Phosphorsäure (85%) 10% (w/v) Ammoniumsulfat
Lösung B:	5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250

### 2.5.3. Silber-Färbung

Die Silberfärbung wurde entsprechend eines modifizierten Protokolls von Blum *et al.* durchgeführt (Blum et al., 1987). Alle Inkubationsschritte wurden auf dem Horizontalschüttler durchgeführt. Die verwendete Silbernitratlösung und die Entwicklerlösung wurden vor jeder Färbung frisch angesetzt. Im ersten Schritt erfolgte die Fixierung der Proteine, wobei das Gel 1 h in Fixierlösung inkubiert wurde. Anschließend wurde das Gel dreimal für je 20 min in Waschlösung inkubiert. Es folgte für 1 min die Sensibilisierung in Thiosulfatlösung mit drei darauf folgenden Waschschritten in ddH<sub>2</sub>O für jeweils 20 s. Darauf folgte für 20 min die Inkubation in Silbernitratlösung mit anschließendem zweimaligem Waschen in ddH<sub>2</sub>O für jeweils 20 s. In der Entwicklerlösung wurden nun die Banden sichtbar gemacht, wobei die Dauer der Inkubation von der gewünschten Intensität der Färbung abhing. Direkt im Anschluss an die Entwicklung wurde das Gel zweimal für jeweils 1 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann in Stopplösung überführt. Es folgte die Dokumentation mittels Auflichtscanner und die Trocknung mittels Vakuumtrockner.

## Lösungen

Fixierlösung:	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Ethanol
Waschlösung:	30% (v/v) Ethanol
Thiosulfatlösung:	0,02% (w/v) Natriumthiosulfat
Silbernitratlösung:	0,2% (w/v) Silbernitrat
Entwicklerlösung:	3% (w/v) Natriumcarbonat

0,0004% Natriumthiosulfat  
0,05% Formaldehyd  
Stopplösung: 0,5% (w/v) Glycin

#### 2.5.4. CyDye-Markierung

Bei der CyDye-Markierungstechnik erfolgt eine kovalente Markierung von Proteinen durch einen Fluoreszenzfarbstoff vor der Gelelektrophorese. Die Cy-Farbstoffe (Succinimide) werden dabei an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin gebunden. Damit die elektrophoretischen Eigenschaften der Proteine nicht verändert werden, fand eine Minimalmarkierung statt, wobei pro Probe nur ca. 3% der Proteine mit jeweils einem Farbstoffmolekül markiert wurden. Dadurch besteht die Möglichkeit kleinste Proteinmengen von bis zu 0,025 ng zu visualisieren (Marouga et al., 2005).

Die Markierung der Proteine erfolgte auf der Ebene der isolierten Membranen der Plastiden. Dazu wurden Membranen aus  $1 \times 10^8$  Plastiden in 35  $\mu$ l TMK-Puffer resuspendiert und mit 0,2  $\mu$ l Cy3-Farbstoff für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Farbstoff durch die Zugabe von 20 mM L-Lysin abgebunden. Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis wurden die Membranen pelletiert und entsprechend Kap. 2.3.2 für die native PAGE solubilisiert. Die Visualisierung erfolgte nach Abschluss der Elektrophorese im Typhoon Trio bei Exc. 532 nm/Em. 580BP30.

#### Lösungen

Cy-Farbstoff 1 mM Cy3 in Dimethylformamid

#### 2.6. Immunodetektion

Im Anschluss an die denaturierende Elektrophorese wurden zur Identifikation von NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) ein spezifischer Antikörper verwendet. Bei dem verwendeten Antikörper handelt es sich um einen Rabbit anti-PORA-Antikörper von der Arbeitsgruppe Sundqvist, Göteborg.

Die Proteine wurden aus dem SDS-Gel im Semi-dry Verfahren nach Towbin *et al.* auf eine stabilisierte Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin et al., 1979). Dazu wurde das Gel luftblasenfrei auf die Nitrocellulosemembran aufgelegt und zwischen jeweils drei Lagen mit

Towbinpuffer getränktem Filterpapier platziert. Der Proteintransfer erfolgte bei 400 mA für 1 h. Mittels Ponceaufärbung wurde überprüft, ob der Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran erfolgreich war. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran 1 min in Ponceaulösung geschwenkt und anschließend der Hintergrund so lange mittels ddH<sub>2</sub>O entfärbt, bis einzelne Proteinbanden sichtbar waren. Darauf folgte die vollständige Entfärbung der Nitrocellulosemembran mit TBS-Puffer. Der spezifische Proteinnachweis erfolgte durch Verwendung des *enhanced chemo luminescence* (ECL)-Systems. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Schwenken der Membran in MTBS für 1 h abgebunden. Dann wurde die Membran 1 h in PORA-Antikörper (1:2000 (v/v) in MTBS) inkubiert und im Anschluss dreimal für jeweils 10 min in TBS gewaschen. Darauf folgte für 1 h die Inkubation mit sekundärem Antikörper (Rabbit IgG, HRP-Linked F(ab')<sub>2</sub>Fragment; 1:10000 (v/v) in MTBS). Nicht gebundener Antikörper wurde erneut durch dreimaliges Waschen mit TBS für jeweils 10 min entfernt. Im Photolabor erfolgte die Visualisierung der immunologisch detektierten Proteine durch kurzzeitige Inkubation der Membran in einer 1:2 Mischung von ECL1 und ECL2 mit anschließendem Auflegen eines Röntgenfilms. Nach 1 bis 10 min Einwirkzeit wurde der Röntgenfilm abgenommen, entwickelt und mittels Durchlichtscanner dokumentiert.

### Lösungen

Towbinpuffer:	96 mM Glycin 10 mM Tris 10% (v/v) Methanol
Ponceau:	0,2% (v/v) Ponceau 1% Essigsäure
TBS:	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl pH 7,7
MTBS:	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS
ECL1:	100 mM Tris/HCl 2,5 mM Luminol 0,4 mM p-Cumarsäure
ECL2:	100 mM Tris/HCl 0,018% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pH 8,3

## 2.7. Enzymaktivitätstests

Mit Hilfe von Enzymaktivitätstest wurde untersucht, ob mittels nativer PAGE isolierte Komplexe in der Lage waren, NAD(P)H in Gegenwart eines Elektronenakzeptors zu oxidieren. In einem zweiten gekoppelten Reaktionsschritt erfolgt durch diesen Elektronenakzeptor die Reduktion eines Farbstoffs, wodurch im Gel eine Färbung auftritt. Die hier beschriebenen Vorschriften zur Durchführung des Diaphorase- und Menadion-Aktivitätstests beruhen auf Vorschriften von Manchenko (Manchenko, 2002).

### 2.7.1. Diaphorase-Aktivitätstest

Im Diaphorase-Aktivitätstest wird als Elektronenakzeptor für die enzymatisch erfolgende Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P)<sup>+</sup> 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) verwendet. Im gekoppelten zweiten Reaktionsschritt wird 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem Formazan reduziert, wodurch eine Blaufärbung der enzymatisch aktiven Bande in einer nativen PAGE auftritt (Manchenko, 2002).

Direkt im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte die Inkubation des Gels für 1 h bei 37°C in Diaphorase-Färbelösung. Anschließend wurde das Gel zweimal für jeweils 1 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, worauf die Fixierung in der Fixierlösung für mindestens 30 min erfolgte. Die Dokumentation wurde mittels Durchlichtscanner vorgenommen.

### Lösungen

Diaphorase-Färbelösung:	0,28 mM NAD(P)H
	0,14 mM DCIP
	0,34 mM MTT
	0,15 M Tris/HCl
	pH 8,2
Fixierlösung:	25% (v/v) Ethanol

### 2.7.2. Menadion-Aktivitätstest

Für den Menadion-Aktivitätstest wurde als Elektronenakzeptor der Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P)<sup>+</sup> Menadion und als Farbstoff 4-Nitrotetrazoliumchlorid-Blau (NBT) verwendet. Das zu untersuchende Gel einer nativen PAGE wurde direkt nach der Elektrophorese für 1 h

bei 37°C in der Menadion-Färbelösung inkubiert. Nach zwei Waschschritten für jeweils 1 min in ddH<sub>2</sub>O erfolgte die Fixierung in Fixierlösung für mindestens 30 min.

### Lösungen

Menadion-Färbelösung:     0,4 mM NAD(P)H  
                                  2 mM Menadion  
                                  0,16 mM (NBT)  
                                  0,2 M Tris/HCl  
                                  pH 7,0

## 2.8. Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

### 2.8.1. In-Gel Verdau

Durch tryptischen In-Gel Verdau konnten gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine in Peptide gespalten werden, welche dann massenspektrometrisch durch *de novo* Sequenzierung identifiziert werden konnten. Verwendet wurden BN- und SDS-Gele nach Coomassie- oder colloidalen Coomassie-Färbung. Die Bande von Interesse wurde aus dem Gel ausgeschnitten und zweimal für jeweils 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Im Fall von getrockneten Gelen führte dies gleichzeitig zur Rehydrierung. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung der Bande durch Zentrifugation (9300 x g, 2 min) durch eine 10 µl Pipettenspitze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Coomassie wurde durch 10 min Inkubation mit Entfärberlösung bei 37°C im Thermoschüttler entfernt. Nach Abnahme der Entfärberlösung wurde die Probe im Vakuumkonzentrator getrocknet um Acetonitril vollständig zu entfernen. Der Verdau wurde mit Verdaupuffer 1 bei 50°C für 45 min im Thermoschüttler durchgeführt. Dies erfolgte in einem Volumen von 20-50 µl, abhängig vom Gelvolumen. Danach wurde die Verdaulösung von den Gelresten abgenommen und mit 40% Ameisensäure auf eine Endkonzentration von 5% gebracht, um den Verdau zu stoppen. Erfolgte die massenspektrometrische Analyse zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Probe bei -20°C gelagert.

Alternativ erfolgte der In-Gel Verdau unter Verwendung eines OMX-S<sup>®</sup>-Reaktionsgefäßes (Granvogel et al., 2007). Die Durchführung des Verdau entspricht dem oben beschriebenen Protokoll, wobei die Gelbande direkt mittels OMX-S<sup>®</sup> ausgestochen wurde. Die

Zerkleinerung des Gels und der Austausch von Reaktionslösungen erfolgten durch Zentrifugation.

### **Lösungen**

Entfärberlösung:                   50% (v/v) Acetonitril  
  50 mM Ammoniumhydrogencarbonat  
Verdaupuffer 1:                   100 mM Ammoniumhydrogencarbonat  
  200 ng Trypsin  
  pH 8,0

### **2.8.2. Verdau in Lösung**

Alternativ zum In-Gel Verdau wurden Proteine intakt aus Polyacrylamidgelen extrahiert und anschließend in Lösung tryptisch verdaut. Die Zerkleinerung und Entfärbung der Proteinbanden wurde entsprechend Kap. 2.8.1 durchgeführt. Die Extraktion erfolgte entsprechend einer Methode von Ehring *et al.* (Ehring *et al.*, 1997). Dazu wurde das Gel in einem Volumen von 30 – 100 µl FAPH-Lösung für 20 min bei 37°C im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde das Volumen mit Acetonitril verdoppelt, wodurch die Gelreste dehydriert wurden. Dadurch konnte die Proteinlösung vollständig vom Gel abgenommen werden. Die Lösungsmittel wurden im Vakuumkonzentrator abgezogen. Es folgte der Verdau in Lösung mit 20 µl Verdaupuffer 2 bei 50°C für 4 h im Thermoschüttler. Abschließend wurde der Verdau durch Zugabe von 40% Ameisensäure gestoppt, indem eine Endkonzentration von 5% Ameisensäure erreicht wurde.

### **Lösungen**

FAPH-Lösung:                   50% (v/v) Ameisensäure  
  25% (v/v) Acetonitril  
  15% (v/v) 2-Propanol  
Verdaupuffer 2:                   100 mM Ammoniumhydrogencarbonat  
  400 ng Trypsin  
  pH 8,0

### 2.8.3. Entsalzung der Probe

Im Anschluss an den tryptischen Verdau erfolgte ein Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt für Proben, die für *offline* ESI-Massenspektrometrie bestimmt waren. Dazu wurde eine C<sub>18</sub>-Mikrosäule (ZipTip™-Pipettenspitzen, Millipore, Billerica, USA) verwendet, welche eine maximale Bindungskapazität von 5 µg Protein aufweist und zur Aufreinigung von Peptiden und Proteinen mit einem Molekulargewicht von maximal 60 kDa geeignet ist. Vor Verwendung wurden die C<sub>18</sub>-Mikrosäulen mit 100% Methanol aktiviert und mit Waschlösung äquilibriert. Dann wurde die Probe vollständig auf die C<sub>18</sub>-Matrix aufgetragen und mit ca. 100 µl Waschlösung gespült, wodurch Salze entfernt wurden. Abschließend erfolgte die Elution mit 4,5 µl Spraylösung.

#### Lösungen

Äquilibrierungslösung:	100% (v/v) Methanol
Waschlösung:	5% (v/v) Ameisensäure
Spraylösung:	65% (v/v) Acetonitril
	1% (v/v) 2-Propanol
	0,1% (v/v) Ameisensäure

### 2.8.4. Einführung N-terminaler Modifikationen

Zur Bestimmung des natürlichen N-terminalen Endes eines Proteins erfolgte die selektive Markierung der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe im SDS-Gel und im Anschluss an den In-Gel Verdau erfolgte eine weitere selektive N-terminale Markierung interner tryptischer Peptide. Alle Schritte dieser Vorschrift erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in einem Volumen von 50 µl bei 37°C im Thermoschüttler. Zunächst wurde die Proteinbande aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, für 10 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann mittels Zentrifugation (9300 x g, 2 min) durch eine 10 µl Pipettenspitze zerkleinert. Im Anschluss wurde die Probe zweimal für jeweils 10 min in Entfärberlösung entfärbt. Dann wurde die Probe für 30 min in Acetylierungslösung inkubiert, wodurch der N-Terminus acetyliert wurde. Es folgte dreimaliges Waschen für jeweils 5 min mit Entfärberlösung und anschließen wurde die Probe für 15 min mit Hydroxylaminlösung inkubiert, wodurch unerwünschte Acetylierungen an Serin und Threonin entfernt wurden. Es erfolgte erneut zweimaliges Waschen mit Entfärberlösung für jeweils 5 min. Dann wurde bei 50°C für 45 min der tryptische Verdau in der Verdauung durchgeführt. Anschließend wurde die Probe von den Gelresten

abgenommen und halbiert. Eine Hälfte der Probe wurde mit 5 µl 40% Ameisensäure versetzt und als Probe 1 direkt für LC-Messungen verwendet. Bei der zweiten Hälfte (Probe 2) erfolgte die Modifikation der N-terminalen α-Aminogruppe interner Peptide mittels 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS). Dazu wurde Probe 2 zweimal für jeweils 30 min mit 1 µl TNBS-Lösung inkubiert, bevor sie ebenfalls mit 5 µl 40% Ameisensäure angesäuert wurde und für LC-Messungen bereitstand.

**Lösungen:**

Entfärberlösung:	50% (v/v) Acetonitril
Acetylierungslösung:	50% (v/v) Acetonitril 10% (v/v) Essigsäureanhydrid
Hydroxylaminlösung:	0,5 mM Hydroxylamin 50 mM Natriumhydroxid
Verdauungslösung:	50 mM Dinatriumtetraborat-Decahydrat 200 ng Trypsin pH 8,4
TNBS-Lösung:	100 mM 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)

**2.8.5. Extraktion niedermolekularer Membranproteine**

Die Extraktion niedermolekularer Membranproteine erfolgte aus Coomassie-gefärbten BN-Gelen. Banden von Interesse wurden aus dem Gel ausgeschnitten und für 10 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Im Fall von getrockneten Gelen erfolgte dabei die Rehydrierung. Mittels Zentrifugation (9300 x g, 2 min) durch eine 200 µl Pipettenspitze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß erfolgte die Zerkleinerung des Gels. Coomassie wurde durch zweimalige Inkubation in jeweils 200 µl Entfärberlösung entfernt. Nach Abnahme der Entfärberlösung wurde das Gel für 20 min in 100 µl FBM-Lösung im Ultraschallbad bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und es erfolgte in 50 µl FBM-Lösung für 5 min eine Nachextraktion im Ultraschallbad. Um den 2. Überstand quantitativ abnehmen zu können, wurden die Gelpartikel durch Zugabe von 100 µl Acetonitril dehydriert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und im Vakuumkonzentrator bis zur Trockene eingengt. Zur Abtrennung von Salzen, Detergenzien und eines Großteils der Pigmente wie Chl *a* erfolgte eine Fällung mit 80% Aceton bei -20°C für mindestens 4 h oder über Nacht. Die Proteine wurden dann durch Zentrifugation (10000 x g, 10 min, 4°C) pelletiert und der Überstand

wurde verworfen. Das Pellet wurde im Vakuumkonzentrator getrocknet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Unmittelbar vor einer massenspektrometrischen Analyse erfolgte die Aufnahme in  $6\ \mu\text{l}$  Spraylösung.

### Lösungen

Entfärberlösung:	50% (v/v) Acetonitril 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat
FBM-Lösung:	50% (v/v) Ameisensäure 40% (v/v) 1-Butanol 10% (v/v) Methanol
Fällungslösung:	80% (v/v) Aceton
Spraylösung:	70% (v/v) Aceton 10% (v/v) 2-Propanol 1% (v/v) Ameisensäure

## 2.9. Massenspektrometrie

### 2.9.1. Offline ESI-Massenspektrometrie

Mittels *offline* ESI-Massenspektrometrie konnten Proben von Peptiden oder ganzen Proteinen manuell vermessen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein Micromass Q-TOF 1.5 und ein Micromass Q-TOF Premier Massenspektrometer verwendet. Die Kalibrierung der Geräte erfolgte mit einer Kalibrierlösung, die  $500\ \text{fM}$   $[\text{Glu}^1]$ -Fibrinopeptid B enthielt. Dazu wurde das Peptid  $785,8426\ [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  bei einer Fragmentierungsspannung von  $28\ \text{V}$  fragmentiert. Anschließend wurden 100 erhaltene Einzelspektren aufsummiert und für die Kalibrierung verwendet. Als interner Standard zur Feinkalibrierung von MS-Spektren wurde bei tryptischen Verdauen das Eigenverdaupeptid von Trypsin bei  $421,7589\ [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  verwendet. Bei Extraktionen Chl *a*-haltiger ganzer Proteine wurde das Signal von Chl *a* ohne zentrales Magnesiumion bei  $871.5737\ [\text{M}+\text{H}]^{1+}$  verwendet. Dadurch wurde beim Q-TOF 1.5 eine Massengenauigkeit von 20-30 ppm und beim Q-TOF Premier von 5 ppm erreicht. Die zu messenden Proben wurden unmittelbar vor der Messung in Spraylösung aufgenommen (siehe Kap. 2.8.3 und 2.8.5 ) und in eine Nanospray-Kapillare aus Borosilikatglas überführt. Unmittelbar vor Beginn der Messung wurde die Kapillare durch Brechen der Spitze am

Konus geöffnet und ca. 2 mm vor dem Konus positioniert. Die Messung erfolgte bei einer Konusspannung von 28 V und einer Konustemperatur von 65°C. Die Kapillarspannung betrug 800 bis 1200 V, abhängig von der Güte des erreichten Elektrosprays. Es wurde ausschließlich im positiven Ionisierungsmodus und im einfachen Reflektronmodus gemessen. Zunächst erfolgte die Aufnahme eines MS-Spektrums, wobei abhängig von der Signalintensität 25 bis 100 Einzelspektren von jeweils 2 s zu einem Spektrum aufsummiert wurden. Darin detektierte Signale mehrfach geladener Peptide oder Proteine wurden für die manuelle Fragmentierung in der Kollisionszelle und die Aufnahme von Fragmentationenspektren (MSMS-Spektren) ausgewählt. Entsprechende Peptide wurden mittels Quadrupol selektiert und in der Kollisionszelle fragmentiert. Die Fragmentierungsspannung wurde abhängig von der Qualität der erzielten Fragmentierung zwischen 16 und 45 V gewählt.

### **Lösungen**

Kalibrierungslösung:            500 fM [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptid B (human)  
   50% (v/v) Acetonitril  
   0,1% (v/v) Ameisensäure

## **2.9.2. Online ESI-Massenspektrometrie**

### **2.9.2.1. Verwendung einer HPLC Agilent 1100 Nano Pump**

Durch den Anschluss einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an ein Massenspektrometer kann im Vergleich zu einer *offline* Messung eine deutliche Steigerung der Sensitivität erreicht werden. Des Weiteren weisen Peptide auf einer Umkehrphasensäule (*reversed phase*, RP-Säule) entsprechend ihrer Hydrophobizität ein unterschiedliches Laufverhalten auf, wodurch es zu einer Trennung kommt. Hydrophile Peptide eluieren aufgrund schwächerer Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial früher als hydrophobe, wodurch die Komplexität einer Probe deutlich herabgesetzt wird, da zeitgleich nur ein kleiner Anteil der Peptide einer Probe im Massenspektrometer gemessen wird. Ein weiterer Vorteil in der automatisierten Form der Aufnahme von MS- und MSMS-Spektren liegt in der Möglichkeit diese sowohl manuell, als auch automatisch mit dem Programm ProteinLynx Global Server auszuwerten.

Die verwendete HPLC Agilent Modell 1100 Nano Pump wurde sowohl in Verbindung mit einem Micromass Q-TOF 1.5, als auch einem Micromass Q-TOF Premier

Massenspektrometer verwendet. Als Vorsäule wurde eine Zorbax 300SB-C18 5  $\mu\text{m}$  5 x 0,3 mm und als analytische Säule eine Zorbax 300SB-C18 3,5  $\mu\text{m}$  150 mm x 75  $\mu\text{m}$  verwendet. Das Probenauftragsvolumen betrug 5  $\mu\text{l}$  und die Proben wurden auf 10°C gekühlt. Zur Auftrennung der Peptide wurde ein Gradient aus Lösungsmittel A und Lösungsmittel B entsprechend der HPLC-Methode 75-96 verwendet (Tab. 2). Vor einer Messung wurde die Säule für 1 h mit 90% Lösungsmittel A äquilibriert und es erfolgte die Umstellung von Normalflussmodus auf Mikroflussmodus wodurch eine konstante Flussrate von 0,28  $\mu\text{l}/\text{min}$  über die analytische Säule erreicht wurde. Nach Start der HPLC-Methode 75-96 erfolgte innerhalb der ersten 4 min im Anreicherungsmodus durch die Kapillarpumpe bei einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  mit 100% Lösungsmittel A die Beladung der Vorsäule mit der Probenlösung. Nach 4 min wurde ein Ventil vom Anreicherungsmodus auf den analytischen Modus geschaltet. Darauf folgten die Elution der Peptide von der Vorsäule und die Auftrennung dieser über die Hauptsäule durch die Nanopumpe bei einer Flussrate von 0,28  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Nach der Elution der Peptide folgte ein Reinigungsschritt der Hauptsäule bei 100% Lösungsmittel B mit anschließender Wiederherstellung der Startbedingungen. Nach Beendigung der Methode folgte für 30 min eine Äquilibrierungsphase vor einer erneuten Messung. Während dieser Methode wurden maximale Drücke von 80 bar bei der Kapillarpumpe und 150 bar bei der Nanopumpe erreicht.

Die Erzeugung eines Elektrosprays erfolgte unter Verwendung eines NanoEase Emitters bei einer Kapillarspannung von 3,2 kV und einer Konusspannung von 45 V. Die Konustemperatur betrug 100°C. Zur besseren Vernebelung des Elektrosprays wurde am NanoEase Emitter ein konstanter Stickstofffluss von 0,5 bar angelegt (Stickstoff N 5.0). Die Aufnahme von MS- und MSMS-Messungen erfolgte automatisch durch das Programm MassLynx in einem Zeitfenster von 4 min bis 80min nach Start der HPLC-Methode.

**Tab. 2 Gradientenprogramm der Nanopumpe der HPLC-Methode 75-96**

<b>Zeit [min]</b>	<b>Flussrate [<math>\mu\text{l}/\text{min}</math>]</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
0	0,28	90	10
4,0	0,28	90	10
74,0	0,28	30	70
79,0	0,28	30	70
81,0	0,28	0	100
91,0	0,28	0	100
96,0	0,28	90	10

## Lösungen

Lösungsmittel A:	5% (v/v) Acetonitril
	0,1% (v/v) Ameisensäure
Lösungsmittel B:	99,9% (v/v) Acetonitril
	0,1% (v/v) Ameisensäure

### 2.9.2.2. Verwendung einer UPLC nanoAcquity

Die Höchstdruckflüssigkeitschromatographie (UPLC) zeichnet sich gegenüber einer standardmäßigen HPLC durch die Verwendung von Säulenmaterial mit einer Partikelgröße von 1,7µm aus. Daraus resultieren wesentlich höhere Drücke und es kommt zu einer deutlich höheren Geschwindigkeit und Effizienz der chromatographischen Auftrennung.

Die nanoAcquity wurde gekoppelt an ein Micromass Q-TOF Premier verwendet. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene analytische RP-Säulen. Zum einen eine 1,7 µm BEH130 C18 100 µm x 100 mm, welche ausschließlich mit der UPLC-Methode 100-26 (Tab. 3) betrieben wurden und eine 1,7 µm BEH130 C18 75 µm x 100 mm, welche mit den UPLC-Methoden 75-55 (Tab. 4) und 75-90 (Tab. 5) betrieben wurde. In allen Fällen wurde als Vorsäule eine 5 µm Symmetry C18 180 µm x 20 mm verwendet. Die analytischen Säulen wurden auf eine konstante Temperatur von 35°C temperiert. Zur Auftrennung der Peptide wurde ein Gradient aus Lösungsmittel A und Lösungsmittel B entsprechend der jeweiligen UPLC-Methode verwendet. Vor einer Messung wurde die Säule für 30 min mit 99% Lösungsmittel A äquilibriert. Das Probenauftragsvolumen betrug 2 µl und die Proben wurden auf 10°C gekühlt. Der Probenauftrag auf die Vorsäule erfolgte bei einer Flussrate von 5 µl/min bei einer Probenauftragszeit von 3 min durch das Pumpensystem des *Binary Solvent Manager* (BSM). Nach dem Probenauftrag wurde die Flussrate des BSM auf 1,2 bzw. 0,4 µl/min verringert und es folgte die Separation der Peptide durch den Lösungsmittelgradienten auf der analytischen Säule. Nach der Elution der Peptide folgte ein Reinigungsschritt der Hauptsäule bei 95 bzw. 99% Lösungsmittel B mit anschließender Wiederherstellung der Startbedingungen. Nach Abschluss dieser Äquilibrierungsphase konnte eine erneute Messung gestartet werden. Während des Gradientenverlaufs wurden bei der Methode 100-26 maximale Drücke von 8000 psi und bei den Methoden 75-55 und 75-90 von 5500 psi erreicht.

Das zweite Pumpensystem, der *Auxiliary Solvent Manager* (ASM), wurde verwendet um über einen zweiten Elektrosprayemitter ein kontinuierliches Lockspray zu ermöglichen. Während

einer Messung wurde alle 30 s ein Spektrum des Locksprays aufgenommen, wodurch eine Massenkorrektur des aktuellen Kalibrierungszustandes ermöglicht wurde. Als Lockspray wurde eine Lösung von 500 fM [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptid B verwendet und das resultierende Signal 785,8426 [M+2H]<sup>2+</sup> zur Massenkorrektur verwendet.

Die Erzeugung eines Elektrosprays erfolgte unter Verwendung eines NanoEase Emitters bei einer Kapillarspannung von 3,2 kV, einer Konusspannung von 28 V und einer Konustemperatur von 100°C. Zur besseren Vernebelung des Elektrosprays wurde am NanoEase Emitter ein konstanter Stickstofffluss von 0,5 bar angelegt (Stickstoff N 5.0). Die Aufnahme von MS- und MSMS-Messungen erfolgte automatisch durch das Programm MassLynx in einem Zeitfenster von Beginn des Gradienten bis 10 min nach Beendigung des Gradienten. Sollte von möglichst allen Peptiden einer Probe jeweils ein MSMS-Spektrum generiert werden, wurden von einer Probe mehrere Läufe durchgeführt. Die Peptide, von denen bereits ein MSMS-Spektrum generiert wurde, wurden im jeweils nachfolgenden Lauf in eine Ausschlussliste aufgenommen und somit nicht mehr für die Generierung weiterer MSMS-Spektren berücksichtigt. Dadurch konnten auch Peptide gemessen werden, die zeitgleich mit anderen deutlich intensiveren Peptiden eluierten.

**Tab. 3 Gradientenprogramm der UPLC-Methode 100-26**

<b>Zeit [min]</b>	<b>Flussrate [µl/min]</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
0	1,2	99,0	1,0
0,33	1,2	99,0	1,0
16,00	1,2	20,0	80,0
16,33	1,2	1,0	99,0
17,66	1,2	1,0	99,0
18,00	1,2	99,0	1,0
26,00	1,2	99,0	1,0

**Tab. 4 Gradientenprogramm der UPLC-Methode 75-55**

<b>Zeit [min]</b>	<b>Flussrate [<math>\mu</math>l/min]</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
0	0,4	99,0	1,0
1,00	0,4	99,0	1,0
25,00	0,4	60,0	40,0
27,00	0,4	5,0	95,0
30,00	0,4	5,0	95,0
31,00	0,4	99,0	1,0
55,00	0,4	99,0	1,0

**Tab. 5 Gradientenprogramm der UPLC-Methode 75-90**

<b>Zeit [min]</b>	<b>Flussrate [<math>\mu</math>l/min]</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
0	0,4	99,0	1,0
1,00	0,4	99,0	1,0
60,00	0,4	60,0	40,0
62,00	0,4	5,0	95,0
65,00	0,4	5,0	95,0
66,00	0,4	99,0	1,0
90,00	0,4	99,0	1,0

**Lösungen**

- Lösungsmittel A1: 99,9% (v/v) ddH<sub>2</sub>O  
0,1% (v/v) Ameisensäure
- Lösungsmittel B1: 99,9% (v/v) Acetonitril  
0,1% (v/v) Ameisensäure
- Lösungsmittel A2: 100% (v/v) ddH<sub>2</sub>O  
10 mM Ammoniumformiat
- Lösungsmittel B2: 100% (v/v) Acetonitril
- Lockspray-Lösung: 500 fM [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptid B (human)  
50% (v/v) Acetonitril  
0,1% (v/v) Ameisensäure

### 2.9.3. MALDI-Massenspektrometrie

Die Probenvorbereitung für Messungen am MALDI MicroMX Massenspektrometer erfolgte entsprechend Kap. 2.8.5. Der wesentliche Unterschied zur Vorbereitung für ESI-Messungen bestand in der Verwendung von 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) anstelle von 1% FA im Probenlösungsmittel. Für Messungen wurden MALDI-Probenträger mit 96 Probenspots und 24 Locksprayspots verwendet. Der Probenauftrag auf den Probenträger erfolgte durch eine Dünnschichtpräparation. Dazu wurde zunächst 1 µl Matrixlösung auf den Probenträger aufgebracht und bei RT inkubiert, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war. Anschließend wurde auf die entstandenen Matrixkristalle 1 µl Probenlösung aufgetragen und ebenfalls bis zur Trockene bei RT inkubiert.

Die Messungen erfolgten im Positivionenmodus und im Reflektronmodus. Vor jeder Messreihe erfolgte eine Grundkalibrierung mit Kalibrierlösung auf Basis von Polyethylenglycol (PEG). Benachbart zu den jeweiligen Probenspots wurde zusätzlich ein Lockmassspot aufgetragen, indem die Lockmasslösung 1:1 mit Matrixlösung vermischt wurde und jeweils 1,5 µl auf den Probenträger aufgetragen wurden. Als Lockmass wurde [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptid B verwendet und zu jedem Probenspektrum wurde auch ein Lockmass-Spektrum aufgenommen. Dadurch wurde eine Massengenauigkeit kleiner 50 ppm erreicht.

Die Messung einzelner Proben erfolgte in einem Massenbereich von 800 m/z bis 8500 m/z. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Laser Pulsenergie 200 – 250 µJ, Pulse-Spannung 1950 V, Detektor-Spannung 2450 V, Suppression-Spannung 800 V.

#### Lösungen

Matrixlösung:	49,5% (v/v) Acetonitril 5 mM Ammoniumdihydrogenphosphat 50 mM α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA) 0,001% (v/v) TFA
Probenlösungsmittel:	70% (v/v) Aceton 10% (v/v) 2-Propanol 0,1% (v/v) TFA
Lockmasslösung:	40 fM [Glu <sup>1</sup> ]-Fibrinopeptid B (human) 50% (v/v) Acetonitril 0,1% (v/v) TFA
Kalibrierlösung:	0,15 mg/ml PEG 1000

0,15 mg/ml PEG 2000  
0,15 mg/ml PEG 3000  
0,66 mM NaI  
25 mM CHCA  
50% (v/v) Acetonitril  
0,1% (v/v) TFA

#### 2.9.4. Interpretation der Massenspektren

Die Interpretation aufgenommener *offline* Massenspektren erfolgte manuell, unter Verwendung der Software MassLynx 4.0/4.1 und MaxEnt3. Mittels *de novo* Sequenzierung wurden die Signale der *y*- und *b*-Ionenserie in einem MSMS-Spektrum manuell der entsprechenden Aminosäuresequenz zugeordnet. Die Identifikation des Proteins erfolgte mit der identifizierten Primärsequenz durch den Abgleich mit Proteindatenbanken. Dazu wurde die BLAST-Suchmaschine FASTA33 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) verwendet, welche die ermittelte Aminosäuresequenz gegen die vorhandenen Datenbankeinträge abgleicht (Pearson, 1990). Ab einem Wahrscheinlichkeitswert von  $10^{-21}$  wurde ein Ergebnis als signifikant angesehen, wobei dieser Wert stark von der Sequenzlänge abhing. Ein niedrigerer Wert bedeutete somit nicht automatisch ein falsches Ergebnis, sondern es musste durch Identifikation weiterer Sequenzabschnitte, gegebenenfalls in weiteren Peptiden, bestätigt werden. Verwendet wurden bei dieser Suche sowohl die SwissProt-, als auch die TrEMBL-Datenbank des European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.expasy.org>) (Gasteiger et al., 2003).

Im Fall von *online* Messungen erfolgte die Interpretation der Massenspektren zunächst automatisch unter Verwendung der Software ProteinLynx Global Server. Die Identifikation der Proteine erfolgte durch die exakte Bestimmung der Peptidmasse und den Vergleich mit theoretisch ermittelten Peptidmassen der Proteine in der Datenbank (*Peptide Mass Fingerprint*, PMF), in Kombination mit dem Vergleich gemessener intensiver Fragmentationensignale mit den theoretisch zu erwartenden Fragmentationen der mittels PMF bereits zugeordneten Peptide. Verwendet wurden bei dieser Suche neben der SwissProt-Datenbank auch eine eigens erstellte Datenbank mit allen Einträgen der Gattungen *Triticum* und *Hordeum* aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Neben dieser automatischen Auswertung erfolgte

eine manuelle Auswertung von nicht identifizierten Peptiden wie oben beschrieben. Dies betraf in erster Linie Proteine, deren Sequenz nicht in den Datenbanken enthalten war.

### **2.9.5. Bioinformatische Methoden**

Wurde ein Protein aus Gerste identifiziert, dessen Sequenz noch nicht in einer Datenbank eingetragen war, erfolgte ein Vergleich der gesamten ermittelten Sequenz mit den bereits bekannten homologen Proteinsequenzen möglichst nahe verwandter Arten durch eine BLAST-Analyse. Verwendet wurde das Programm CLUSTALW ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html)) (Thompson et al., 1994).

Die theoretische Prozessierungsschnittstelle zwischen Transitpeptid und maturem Protein von kernkodierten Proteinen wurde durch das Programm ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) ermittelt (Emanuelsson et al., 1999).

Die Hydrophobizität eines Proteins, welche durch den GRAVY-Wert angegeben wird, wurde entsprechend der Methode von Kyte und Doolittle ermittelt (Kyte et al., 1982). Verwendet wurde dazu das Programm ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

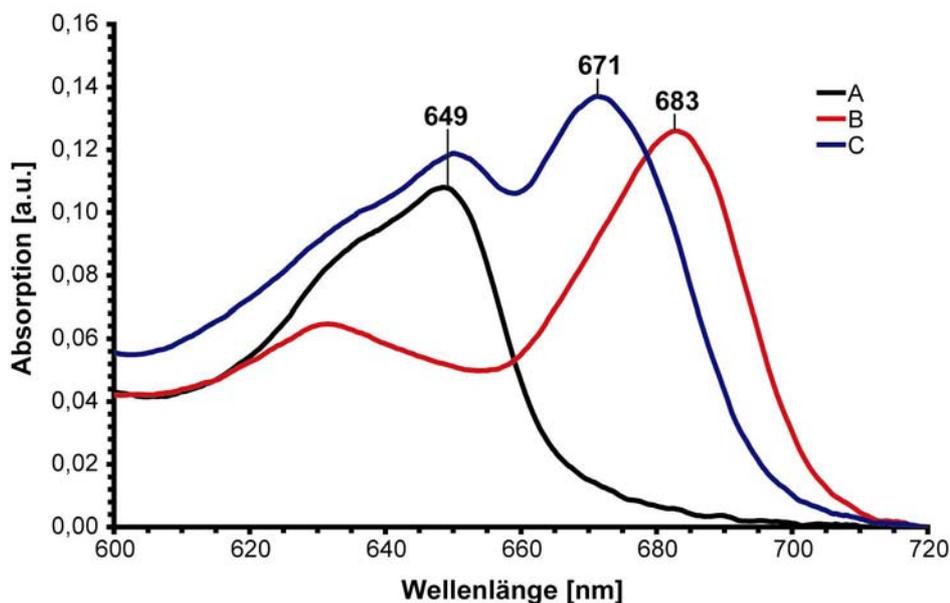
Die Identifikation von Transmembrandomänen erfolgte mit mehreren Programmen des ExPSAy Proteomics Servers (<http://www.expasy.org>) (Gasteiger et al., 2003). Verwendet wurden die Programme HMMTOP 2.0 (Tusnady et al., 2001), TMHMM 2.0 (Krogh et al., 2001), SOSUI 1.11 (Hirokawa et al., 1998).

## D. Ergebnisse

### 1. Übersicht: Membranproteinkomplexe des Etio- und Chloroplasten

#### 1.1. Spektroskopische Charakterisierung des etiolierten Zustandes

Der etiolierte Zustand der Gerste sollte zunächst mittels UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert werden, denn im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine detaillierte Analyse mehrere Subproteome des Etioplasten im Vergleich zu Chloroplasten. Damit war von entscheidender Bedeutung, dass die verwendeten etiolierten Gerstenkeimlinge während ihrer gesamten Entwicklungszeit unbelichtet waren und folglich keine möglichen Artefakte einer kurzzeitigen Belichtung beobachtet wurden. Der etiolierte Zustand ist durch die Anwesenheit von Pchlid *a* und die vollständige Abwesenheit von Chl *a* gekennzeichnet. Nach nur 5 s Belichtung mit Weißlicht erfolgte bereits die Synthese von Chlorophyllid *a* mit anschließender Bildung von Chl *a* (Abb. 5).



**Abb. 5** Absorptionsspektren etiolierter Blätter der Gerste vor und nach Belichtung

Die Absorptionsspektren wurden im Bereich von 600-720 nm an ganzen, etiolierten Blättern der Gerste mit Hilfe der Ulbrichtkugel aufgenommen. Absorptionsspektren wurden vom unbelichteten Zustand (A), unmittelbar nach 5 s Belichtung mit Weißlicht (B) und 1 h nach dieser Belichtung (C) aufgenommen. Sämtliche Studien in dieser Arbeit beruhen auf Etioplasten isoliert aus Gerstenblättern in Zustand A.

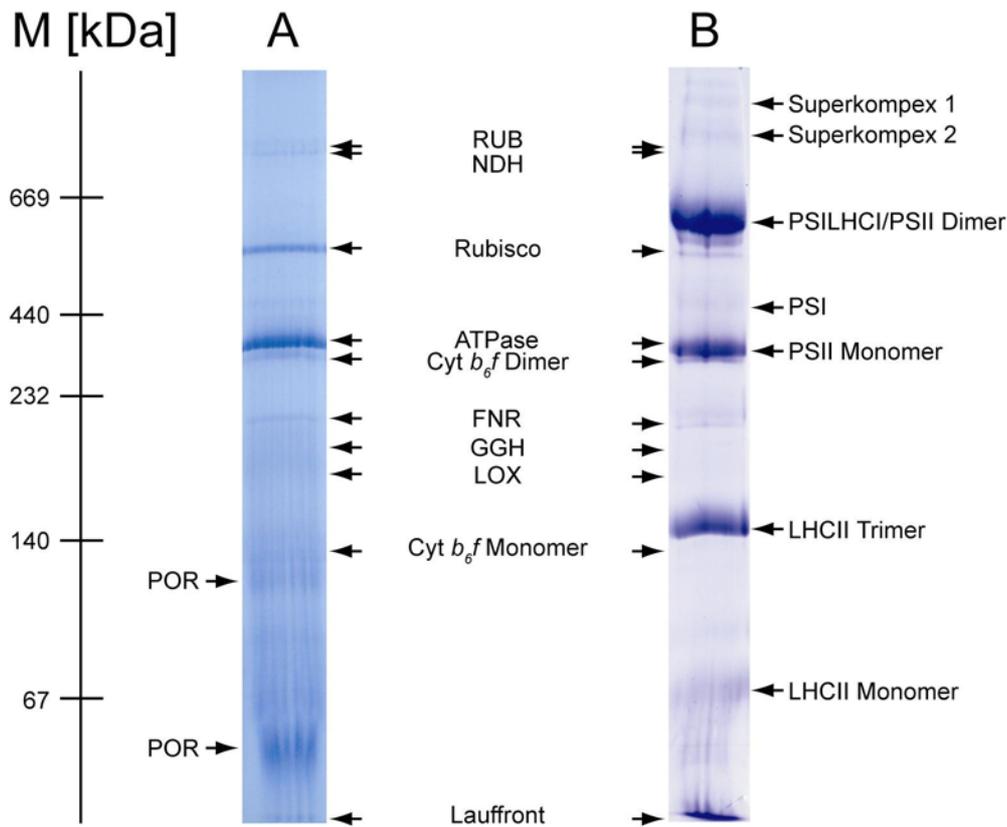
Das Absorptionsmaximum lag bei etiolierten, unbelichteten Blättern bei 649 nm, entsprechend Pchlid *a* (Abb. 5 A). Die Belichtung mit Weißlicht für 5 s führte zu einer

deutlichen Verschiebung des Absorptionsmaximums, welches nun bei 683 nm lag (Abb. 5 B). Im weiteren Verlauf kam es nach 1 h Inkubation in Dunkelheit zu einer Verschiebung des Maximums, dem so genannten Shibata-Shift (Abb. 5 C) (Artus et al., 1992). Das Absorptionsmaximum befand sich nun bei 671 nm, wobei eine gleichzeitige Rückbildung des Absorptionsmaximums bei 649 nm stattfand. Das Absorptionsmaximum bei 671 nm zeigte nun die Anwesenheit von Chlorophyllid *a*, bzw. Chl *a* an (Artus et al., 1992). Im unbelichteten Zustand konnte kein entsprechendes Absorptionsmaximum detektiert werden. Der entsprechende etiierte Zustand war somit Chl-frei und alle Studien an isolierten Membranproteinen aus Etioplasten beruhten im Rahmen dieser Arbeit auf diesem Zustand.

## 1.2. Plastidäre Membranproteinkomplexe in der BN-PAGE

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung einzelner membranständiger plastidärer Subproteome. Entsprechend war eine Auftrennung des Proteoms der inneren Membranen von Plastiden nötig, wofür sich die Blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) anbot. Membranproteinkomplexe können entsprechend ihrer Molekularmasse durch die BN-PAGE aufgetrennt werden. Der native Zustand der Komplexe kann durch Verwendung milder, nicht ionischer Detergenzien bei der Solubilisierung aufrechterhalten werden. Während der Elektrophorese erfolgt durch den negativ geladenen Farbstoff Coomassie G eine Ladungsübertragung auf die Komplexe, wobei der native Zustand erhalten bleibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Membranproteinkomplexe aus den inneren Membranen von Etioplasten, sowie der Thylakoidmembranen aus Chloroplasten aufgetrennt (Abb. 6).

Mehrere Membrankomplexe aus Chloroplasten wiesen aufgrund des endogen gebundenen Chl eine grüne Färbung auf und waren deshalb in der BN-PAGE deutlich sichtbar. Durch die Färbung mit Coomassie konnten auch Chl-freie Komplexe sichtbar gemacht werden. Etioplastidäre Membranproteinkomplexe zeigten grundsätzlich keine Eigenfärbung und konnten erst nach der Färbung mit Coomassie detektiert werden. Wurden die detektierten Komplexe aus Etioplasten und Chloroplasten verglichen, fielen neben mehreren identischen Komplexen auch zahlreiche Unterschiede auf und sowohl die inneren Membranen des Etioplasten, als auch die Thylakoidmembranen des Chloroplasten waren durch ihnen eigene Komplexe charakterisiert. Die Identifikation der Komplexe erfolgte mittels LC-MS und *de novo* Sequenzierung und basierte bei den Komplexen des Chloroplasten zusätzlich auf vorangegangenen Arbeiten (Granvogl et al., 2006). Eine detaillierte Zusammenstellung aller identifizierten Komplexuntereinheiten erfolgte in Kap. 1.3.



**Abb. 6 BN-PAGE von Membranproteinkomplexen aus Etioplasten und Chloroplasten**

Die Auftrennung der Membranproteinkomplexe erfolgte mittels BN-PAGE bei Verwendung eines 6-12% Gradientengels. Die Isolation der inneren Membranen erfolgte aus jeweils  $1 \times 10^8$  Etioplasten (A) oder Chloroplasten (B) mittels Aufschluss in TMK-Puffer. Die Solubilisierung der Membranproteinkomplexe erfolgte in 1,25% DM. Zur Bestimmung der Molekularmassen wurde HMW-Marker verwendet (M), welcher zusätzlich auf das Gel aufgetragen wurde.

Die Membranproteinkomplexe wurden wie folgt beschriftet: ATPase, ATP Synthase-Komplex; Cyt *b<sub>6</sub>f*, Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplex in monomerer und dimerer Form; FNR, Ferredoxin:NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase; GGH, Geranylgeranyl-Hydrogenase; LOX, Lipoxygenase; NDH, NAD(P)H Dehydrogenase Komplex; POR, NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase-Komplexe; Rubisco, Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase-Komplex; RUB, *Rubisco-binding protein*-Komplex; PSI/II, Reaktionszentrums-Kern-Komplexe des Photosystem I/II; LHCI/II, Lichtsammelkomplexe I/II; Superkomplexe 1/2, bestehend aus PSI/II und LHCI/II.

Betrachtet man die Komplexe der beiden Entwicklungszustände der Plastide nach Coomassiefärbung so konnte sowohl in Etioplasten, als auch in Chloroplasten bei einer Molekularmasse von ca. 290-310 kDa der ATP-Synthase Komplex identifiziert werden, welcher in Etioplasten der dominierende Komplex war (Abb. 6 A, B). Des Weiteren fand sich in Etio- und Chloroplasten der *Rubisco-binding protein* (RUB) Komplex (ca. 740-760 kDa). Hierbei handelt es sich um einen Komplex zur Proteinfaltung, welcher homolog zum GroEL/ES Komplex aus *Escherichia coli* ist (Hemmingsen et al., 1988). Mit identischem Molekulargewicht konnte der NAD(P)H-Dehydrogenase (NDH) Komplex detektiert werden (vgl. Kap. 3). Darüber hinaus konnten bei ca. 480-490 kDa der Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase-Komplex (Rubisco), sowie der Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplex in der

monomeren (ca. 140 kDa) und dimeren (ca. 270-280 kDa) Form identifiziert werden. Schließlich konnten ein Komplex der Ferredoxin:NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (FNR) bei ca. 200 kDa, ein Komplex der Geranylgeranyl-Hydrogenase (GGH) bei ca. 160 kDa und ein Komplex der Lipoxygenase bei ca. 150-190 kDa nachgewiesen werden. Der Komplex der Lipoxygenase, welchem bislang nur ein Protein, die Lipoxygenase 2.1 zugeordnet werden konnte, zeigte keine scharf abgegrenzte Bande, sondern eine relativ breite Verteilung mit einem Maximum, das sich über einen Bereich von ca. 40 kDa erstreckte. Jedoch war die Lipoxygenase 2.1 massenspektrometrisch bis in einen Bereich von ca. 700 kDa nachweisbar. Ein vergleichbares Laufverhalten wurde auch bei der NADPH: Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) beobachtet, welche die einzigen Komplexe bildete, die ausschließlich in Etioplasten nachgewiesen werden konnten. Dabei konnte ein Komplex bei ca. 60-65 kDa und ein weiterer bei ca. 125-130 kDa nachgewiesen werden (Abb. 6 A). Die beiden Untereinheiten PORA und PORB konnten allerdings in niedriger Konzentration über die gesamte Laufstrecke der BN-PAGE identifiziert werden.

In den Thylakoidmembranen von Chloroplasten fanden sich mehrere zusätzliche Komplexe, die dadurch gekennzeichnet waren, dass sie Chl und Chl-bindende Proteine enthielten (Abb. 6 B). Zum einen handelte es sich dabei um das Photosystem I (PSI) ohne (ca. 450 kDa) und mit dem Lichtsammelkomplex I (LHCI) (ca. 540-585 kDa). Zum andern konnte das Photosystem II (PSII) in einer monomeren (ca. 290-310 kDa) und einer dimeren (ca. 540-585 kDa) Assemblierungsstufe nachgewiesen werden. Der Lichtsammelkomplex des PSII (LHCII) wurde in einer monomeren (ca. 75-85 kDa) und einer trimeren (ca. 145-155 kDa) Assemblierungsstufe gefunden. Darüber hinaus fanden sich im hochmolekularen Bereich mindestens zwei so genannte Superkomplexe bestehend aus den Reaktionszentren der beiden Photosysteme und den jeweiligen Lichtsammelkomplexen. Dies waren der Superkomplex 1 bei ca. 840-880 kDa und der Superkomplex 2 bei ca. 730-780 kDa.

### **1.3. Identifizierte Untereinheiten plastidärer Komplexe**

Die Identifikation der einzelnen Untereinheiten der Membranproteinkomplexe erfolgte massenspektrometrisch nach In-Gel Verdau mittels LC-MS. Dazu wurden die Komplexbanden aus der BN-PAGE ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Identifizierte Untereinheiten konnten so direkt den in Abb. 6 gezeigten Komplexen zugeordnet werden (Tab. 6). Einzelne Untereinheiten, welche in der Literatur eindeutig zu bestimmten Komplexen zugeordnet werden, fanden sich jedoch von den Komplexen abgetrennt als freie

Proteine nahe der Lauffront. Die Identifikation der Untereinheiten aus Thylakoidmembranen des Chloroplasten wurde auch durch vorangegangene Arbeiten ergänzt (Granvogl et al., 2006).

**Tab. 6 Identifizierte Untereinheiten plastidärer Membranproteinkomplexe**

Die Nachweise erfolgten durch massenspektrometrische Identifikation tryptischer Peptide nach In-Gel Verdau.

Acc.-Nr. <sup>1</sup>	Gen	kodiert <sup>7</sup>	Proteinname	MG <sup>8</sup>	Komplex	Nachweis <sup>10</sup>
P12112	<i>atpA</i>	P	ATP-Synthase A-Chain	55.3	ATP-Syn.	E/C
P00828	<i>atpB</i>	P	ATP-Synthase B-Chain	53.9	ATP-Syn.	E/C
P28552	<i>atpC</i>	N	ATP-G-Chain	35.8	ATP-Syn.	E/C
Q07300	<i>atpD</i>	N	ATP-D-Chain	20.6	ATP-Syn. frei <sup>9</sup>	E/C
P20859	<i>atpE</i>	P	ATP-E-Chain	15.2	ATP-Syn. frei <sup>9</sup>	E/C
P06528	<i>atpF</i>	P	ATP-SYNTHASE B-Chain	21.0	ATP-Syn. frei <sup>9</sup>	E/C
P31853	<i>atpG</i>	N	ATP-SYNTHASE B'-Chain	16.5	ATP-Syn. frei <sup>9</sup>	E/C
P00843	<i>atpH</i>	P	ATP-SYNTHASE C-Chain	8.0	ATP-Syn.	E/C
P05151	<i>petA</i>	P	CYT-F	31.3	Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i> (1)(2)	E/C
P12362	<i>petB</i>	P	CYT-B6	24.1	Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i> (1)(2)	E/C
Q9ZSU7	<i>petC</i>	N	RIESKE Fe-S-Protein	23.9	Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i> (2)	E/C
P12119	<i>petD</i>	P	CYT <i>b<sub>6</sub>f</i> SU IV	17.6	Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i> (1)(2)	E/C
P08248	<i>petE</i>	N	Plastocyanin	10,2	Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i> frei <sup>9</sup>	E/C
P41344 <sup>4</sup>	<i>petH</i>	N	Ferredoxin:NADP-Oxidoreduktase	34,0	FNR	E/C
Q45FE7	<i>chlP</i>	N	Geranylgeranyl Hydrogenase	50,5	GGH	E/C
P93184	<i>lox 2.1</i>	N	Lipoxygenase 2.1	105,9	LOX	E/C
Q40065	<i>lhcb-1</i>	N	LHCII Typ I Protein	28,5	LHCII	C
Q41823 <sup>2</sup>	<i>lhcb-2</i>	N	LHCII Typ II Protein	24,7	LHCII	C
P27523	<i>lhcb-3</i>	N	LHCII Typ III Protein	24,3	LHCII	C
445116 <sup>11</sup>	<i>lhcb-4</i>	N	CP29	31,3	LHCII	C
Q40039	<i>lhcb-5</i>	N	„CP29“ ist aber CP26 <sup>12</sup>	30,7	LHCII	C
P27525 <sup>3</sup>	<i>lhcb-6</i>	N	CP24	22,9	LHCII	C
Q943K1 <sup>4</sup>	<i>psbS</i>	N	CP22	21,7	LHCII; E: frei <sup>9</sup>	E/C
Q33532	<i>ndhB</i>	P	NAD(P)H-Dehydrogenase SU 2	57,0	Ndh	E
Q32440	<i>ndhF</i>	P	NAD(P)H-Dehydrogenase SU 5	82,9	Ndh	E/C
O98691	<i>ndhH</i>	P	NAD(P)H-Dehydrogenase SU H	45,6	Ndh	E/C
O98692	<i>ndhI</i>	P	NAD(P)H-Dehydrogenase SU I	21,0	Ndh	E
Q7GT16	<i>ndhJ</i>	P	NAD(P)H-Dehydrogenase SU J	18,7	Ndh	E
Q85XC3	<i>ndhK</i>	P	NAD(P)H-Dehydrogenase SU K	27,5	Ndh	E
Q7FB12 <sup>4</sup>	<i>ndhM</i> <sup>13</sup>	N	NAD(P)H-Dehydrogenase SU M <sup>13</sup>	25,6	Ndh	E
Q0JH55 <sup>4</sup>	<i>ndhN</i> <sup>13</sup>	N	NAD(P)H-Dehydrogenase SU N <sup>13</sup>	23,6	Ndh	E/C
P13653	<i>porA</i>	N	PORA	33.8	POR	E
Q42850	<i>porB</i>	N	PORB	36.0	POR	E/C
A1E9J1	<i>psaA</i>	P	PSIA-Protein	83,1	PSI	C
A1E9J0	<i>psaB</i>	P	PSIB-Protein	82,6	PSI	C
P69416	<i>psaC</i>	P	PSI SU VII Fe-S-center	8,9	PSI	C
P36213	<i>psaD</i>	N	PSI RC SU II	17,6	PSI	C
P13194	<i>psaE</i>	N	PSI-RC SU IV	10,8	PSI	C
P13192	<i>psaF</i>	N	PSI-RC SU III	17,5	PSI	C
Q00327	<i>psaG</i>	N	PSI-RC SU V	10,8	PSI	C
P20143	<i>psaH</i>	N	PSI-RC SU VI	10,2	PSI	C
P36886	<i>psaK</i>	N	PSI-RC SU X	9,0	PSI	C

P23993	<i>psaL</i>	N	PSI-RC SU IX	18,0	PSI	C
P31093	<i>psaN</i>	N	PSI-RC SU N	9,8	PSI frei <sup>9</sup>	C
Q9SDM1	<i>lhca1</i>	N	Chl a/b binding protein	19,4	PSI	C
Q43485	<i>lhca2</i>	N	LHCI-680	23,1	PSI	C
Q32904 <sup>5</sup>	<i>lhca3</i>	N	Chl a/b binding protein 3	29,6	PSI	C
Q9LKC7	<i>lhca4</i>	N	Chl a/b binding protein	25,1	PSI	C
P05337	<i>psbA</i>	P	D1	38,9	PSII	C
P10900	<i>psbB</i>	P	CP47	56,1	PSII	C
P11095	<i>psbC</i>	P	CP43	52,1	PSII	C
P11849	<i>psbD</i>	P	D2	39,6	PSII	C
P69390	<i>psbE</i>	P	Cyt b <sub>559</sub> α-Chain	9,4	PSII	C
P60126	<i>psbF</i>	P	Cyt b <sub>559</sub> β-Chain	4,5	PSII	C
P12363	<i>psbH</i>	P	PSII H	7,8	PSII	C
P27665 <sup>6</sup>	<i>psbO</i>	N	OEC 33	34,7	PSII frei <sup>9</sup>	C
Q00434 <sup>6</sup>	<i>psbP</i>	N	OEC 23	20,0	PSII frei <sup>9</sup>	C
Q41048 <sup>2</sup>	<i>psbQ</i>	N	OEC 16	16,4	PSII frei <sup>9</sup>	C
P08823 <sup>6</sup>	none	N	RuBisCO SU-binding protein α	57.5	RUB	E/C
Q43831 <sup>6</sup>	<i>cpn60</i>	N	RuBisCO SU-binding protein β	53.4	RUB	E/C
P05698	<i>rbcL</i>	P	RuBisCO large subunit	53.0	RuBisCo	E/C
Q40004	<i>rbcS</i>	N	RuBisCO small subunit	14.7	RuBisCo	E/C

<sup>1</sup> Datenbankeintrag in SwissProt und TrEMBL von *Hordeum vulgare*, sowie *Zea mays*<sup>2</sup>, *Solanum lycopersicum*<sup>3</sup>, *Oryza sativa*<sup>4</sup>, *Pisum sativum*<sup>5</sup>, *Triticum aestivum*<sup>6</sup>

<sup>7</sup> Kernkodierte (N) oder plastidär kodierte (P) Proteine

<sup>8</sup> Das Molekulargewicht (MG) in kDa bezieht sich auf die mature Form des Proteins entsprechend des Eintrags in der DB.

<sup>9</sup> Das Protein findet sich nicht in dem ihm zuzuordnenden Komplex sondern ausschließlich in der Lauffront der BN-PAGE.

<sup>10</sup> Nachweis des Proteins in inneren Membranen aus Etioplasten (E) oder Chloroplasten (P).

<sup>11</sup> Der Eintrag stammt aus der NCBI Datenbank.

<sup>12</sup> Korrektur des Datenbankeintrags entsprechend Granvogl *et al.* 2006 (Granvogl *et al.*, 2006)

<sup>13</sup> Proteinname und Genname entsprechend Rumeau *et al.* 2005 (Rumeau *et al.*, 2005); die DB Einträge waren noch nicht entsprechend aktualisiert und bezeichneten putative Proteine.

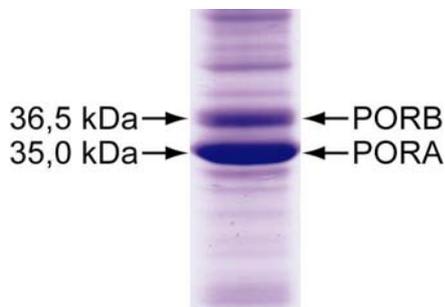
Mehrere identifizierte Komplexe wiesen sowohl in Etioplasten, als auch in Chloroplasten eine identische Zusammensetzung bezüglich der detektierten Untereinheiten auf. Dabei handelte es sich zunächst um den ATP-Synthase-Komplex, den Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex und den Rubisco-Komplex. Bei der ATP-Synthase sind jedoch mehrere Untereinheiten vom Komplex während der Solubilisierung oder der Elektrophorese abgetrennt worden. Vom Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex konnte neben der dimeren Form auch ein monomerer Assemblierungszustand identifiziert werden, der durch das Fehlen des Rieske-Proteins gekennzeichnet war. Die membranintegralen Untereinheiten kleiner 10 kDa des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes konnten mittels tryptischen In-Gel Verdaus nicht identifiziert werden. Deren Identifikation durch eine neu entwickelte Methode wird in Kap. 5 beschrieben. Des Weiteren fanden sich in beiden Organisationsformen der Plastide der RUB-Komplex und der NDH-Komplex. Beide wiesen

in Etioplasten eine deutlich höhere Konzentration auf als in Chloroplasten. Eine ausführliche Analyse des NDH-Komplexes mit der Identifikation neuer Untereinheiten erfolgt in Kapitel 3. Die Untereinheiten PORA und B bildeten die einzigen Komplexe die ausschließlich in Etioplasten gefunden wurden. Dabei wiesen beide Untereinheiten gleichermaßen eine Verteilung über die gesamte Laufstrecke der BN-PAGE auf, wobei zumindest zwei Bereiche innerhalb der PAGE eine signifikant höhere Konzentration aufwiesen, welche als monomerer und dimerer Assemblierungszustand der POR beschrieben wurden (Reisinger, 2008). In Chloroplasten konnte ausschließlich PORB als freies Protein nachgewiesen werden. In Kap. 2 wird auf die N-Termini von PORA und PORB detailliert eingegangen.

In den Thylakoidmembranen aus Chloroplasten fanden sich als dominierende Komplexe PSI und PSII sowie die LHC-Komplexe. Diese wiesen auch mehrere höhere Assemblierungsstufen, die Superkomplexe auf, bestehend aus PSII und LHCII, sowie PSI mit LHCI. Durch massenspektrometrische Analyse des tryptischen In-Gel Verdau konnten in erster Linie Peptide der höhermolekularen Untereinheiten dieser Komplexe identifiziert werden, wie etwa D1 und D2. Allerdings gelang auch der Nachweis dreier membranständiger Proteine des PSII kleiner 10 kDa, PsbE, PsbF und PsbH. Diese konnten jeweils durch ein Peptid identifiziert werden. Eine ausführliche Analyse der membranintegralen Proteine von PSI und PSII findet sich in Kap. 4.

## 2. Identifikation des murenen N-Terminus von PORA und PORB

Im Proteom des Prolamellarkörpers und der Prothylakoidmembranen des Etioplasten der Gerste stellt die NAD(P)H:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase A (PORA) (P13653) das Einzelprotein mit dem höchsten Anteil dar. Neben PORA existiert in Gerste auch PORB (Q42850), welche in deutlich niedriger Konzentration vorliegt und zu 70,2% eine identische Aminosäuresequenz zu PORA aufweist. Die Auftrennung des membranständigen Proteoms aus Gerste mittels SDS-PAGE zeigte deutlich zwei intensiv mit Coomassie färbbare Banden, die PORA und PORB zugeordnet werden konnten (Abb. 7).



**Abb. 7 Ausschnitt einer SDS-PAGE von PORA und PORB**

Aufgetrennt wurden die Proteine der inneren Membranfraktion von Etioplasten aus Gerste mittels eindimensionaler SDS-PAGE. Verwendet wurde ein 12,5% PAA-Gel mit 4 M Harnstoff. Die Größenabschätzung von PORA und PORB erfolgte durch Verwendung eines Molekularmassenstandards.

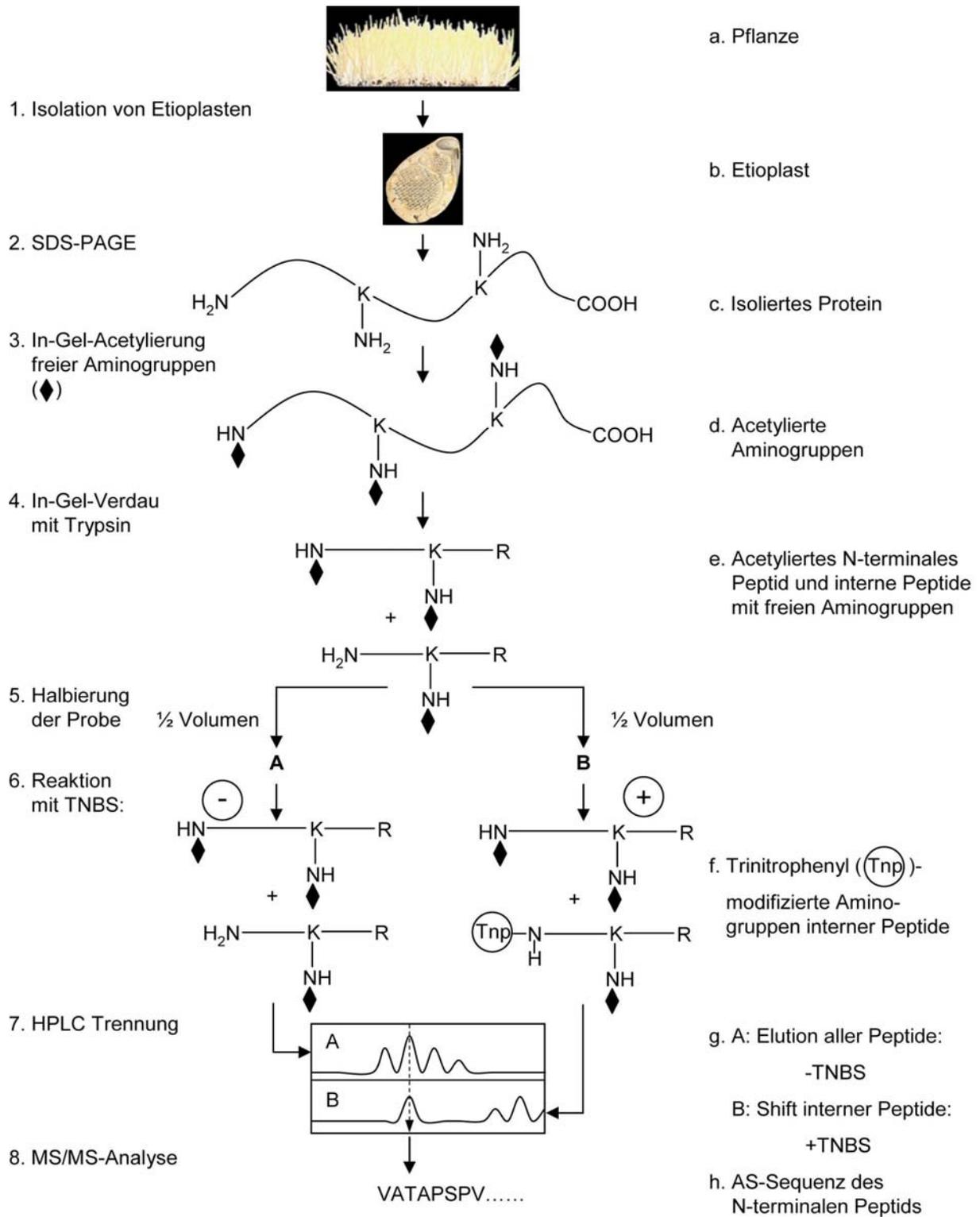
Für PORA konnte ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa ermittelt werden und das Molekulargewicht von PORB lag bei ca. 36,5 kDa. Diese Werte lagen etwas höher als die berechneten Molekulargewichte auf Basis von vorhergesagten N-terminalen Schnittstellen zwischen den Transitpeptiden und den murenen Proteinen PORA und PORB in den Datenbankeinträgen von SwissProt/TrEMBL. Danach hätte PORA ein Molekulargewicht von 33,8 kDa und PORB von 36,1 kDa. PORA würde demnach eine deutlich längere Transitsequenz als PORB aufweisen. Eine Analyse von tryptischen Peptiden von PORA isoliert aus den inneren Membranen des Etioplasten führte jedoch zu einem Peptid, welches innerhalb dieser postulierten Transitsequenz lag. Folglich zeigte die in SwissProt/TrEMBL angegebene Schnittstelle nicht den korrekten N-Terminus von PORA an.

Sowohl PORA, als auch PORB katalysieren die lichtabhängige Synthese von Chlorophyllid *a* aus Pchlid *a*. Trotz dieser Übereinstimmungen wurden für diese Proteine zwei grundlegend unterschiedliche Mechanismen des Imports dieser kernkodierte Proteine durch die Hüllmembranen in die Plastide beschrieben (Reinbothe et al., 1995; Reinbothe et al., 1997). Danach wird PORA abhängig von der Anwesenheit von Pchlid *a* importiert, wohingegen PORB auch in Abwesenheit von Pchlid *a* importiert werden kann. Eine wesentliche Rolle

spielt danach eine postulierte Bindestelle von Pchlid *a* im Bereich der Transitsequenz von PORA. Bislang wurden jedoch nur zwei widersprüchliche experimentelle Nachweise des N-Terminus von PORA basierend auf Sequenzanalysen mittels Edman-Abbau erbracht (Schulz et al., 1989; Benli et al., 1991). Somit war nicht nur der experimentelle Nachweis der exakten Position der postulierten Bindestelle von Pchlid *a* ausstehend, sondern es fehlte auch eine klare Identifikation der Sequenzbereiche der Transitpeptide von PORA und PORB.

## **2.1. Entwicklung einer Methode zur selektiven Identifikation N-terminaler Peptide**

Ziel war die Entwicklung einer Methode zur schnellen und eindeutigen massenspektrometrischen Identifikation des N-terminalen Peptides eines Proteins nach tryptischen In-Gel Verdau. Das N-terminale Peptid des maturen Proteins unterscheidet sich von internen tryptischen Peptiden in der Regel dadurch, dass sich N-terminal zur N-terminalen AS des Peptids in der Sequenz des unprozessierten Proteins keine AS befindet, die eine Schnittstelle der Protease Trypsin darstellt. Dieses Merkmal alleine reichte jedoch nicht aus um das N-terminale Peptid sicher zu identifizieren, da zum einen Trypsin zu einem geringen Anteil auch nach anderen AS als Arg und Lys schneiden kann. Zum anderen kann es vorkommen, dass während der Ionisierung im Elektrospray Brüche der Peptidbindung auftreten, wodurch ebenfalls Peptide entstehen können, die nicht auf einer N-terminalen tryptischen Schnittstelle beruhen. In beiden Fällen könnte irrtümlich ein falscher, innerhalb des maturen Proteins liegender N-Terminus angenommen werden. Das N-terminale Peptid musste also bereits vor dem Verdau markiert werden, um eine sichere Identifikation zu ermöglichen. Gevaert *et al.* entwickelten eine Methode zur Isolation N-terminaler Peptide aus dem tryptischen Verdau eines gesamten Zellproteoms, um die Komplexität der Probe zu verringern (Gevaert et al., 2003). Auf Basis dieser COFRADIC genannten Methode wurde eine eigene Methode entwickelt, mit der selektiv das N-terminale Peptid eines Proteins isoliert und identifiziert werden konnte (Abb. 8).

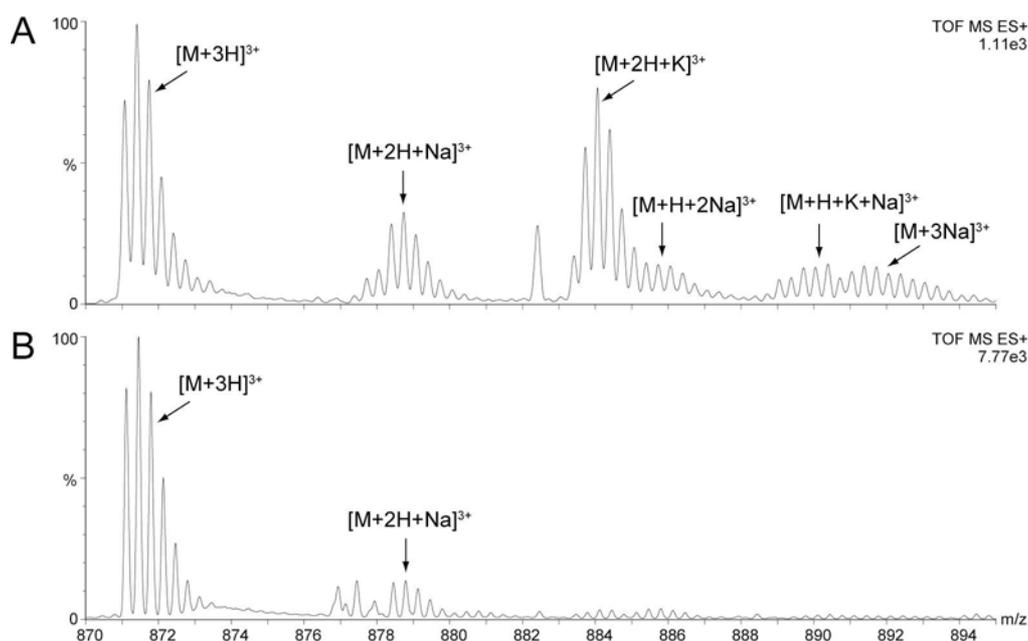


**Abb. 8 Übersicht der Methode zur selektiven Identifikation N-terminaler Peptide**

Gezeigt werden die einzelnen Arbeitsschritte von der Proteinisolation bis zur abschließenden Identifikation der AS-Sequenz des N-terminalen Peptids eines Proteins. Von 1 bis 8 sind die einzelnen Arbeitsschritte angegeben und von a bis h werden die entsprechenden Vorgänge bei der Probenverarbeitung gezeigt.

Diese Methode zur selektiven Isolation des N-terminalen Peptids aus der Gesamtheit aller Peptide nach dem tryptischen Verdau beruhte auf der Möglichkeit, die  $\alpha$ -Aminogruppe am N-Terminus bereits vor dem Verdau chemisch zu maskieren. Dazu wurde diese Aminogruppe mit Essigsäureanhydrid innerhalb des SDS-PAGE acetyliert. Essigsäureanhydrid wurde anstelle von Sulfo-N-hydroxysuccinimid Acetat verwendet, da dadurch im Gel eine effiziente und schnelle Acetylierung erreicht wurde. Zugleich wurden auch die  $\epsilon$ -Aminogruppen der AS Lys acetyliert. Die gleichzeitige Modifikation von Lys führte dazu, dass diese AS nicht mehr als Schnittstelle von Trypsin erkannt wurde. Folglich resultierten im anschließenden In-Gel Verdau ausschließlich Peptide, die durch ein Arg am C-Terminus gekennzeichnet waren. Als Nebenreaktion kam es auch zu einer teilweisen Acetylierung von Ser und Thr. Diese Acetylierungen wurden selektiv und vollständig durch eine Reaktion mit Hydroxylamin direkt im Anschluss an die Acetylierung wieder entfernt. Bei dem folgenden In-Gel Verdau entstanden an allen internen Peptiden N-terminal neue  $\alpha$ -Aminogruppen, nicht jedoch am N-terminalen Peptid des Proteins selbst. Nun erfolgte eine Teilung der Peptidlösung und die eine Hälfte wurde direkt mittels LC-MS analysiert. Bei der zweiten Hälfte der Probe erfolgte eine weitere chemische Modifikation der neu entstandenen Aminogruppen mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS). Dadurch wurde ein stark hydrophober Rest an alle internen Peptide gekoppelt, wodurch diese Peptide eine deutliche Verschiebung ihrer Retentionszeit bei einer Auftrennung mittels UPLC erfuhren. Im direkten Vergleich der Chromatogramme von TNBS-modifizierter und nicht modifizierter Probe konnte somit direkt das N-terminale Peptid identifiziert werden, da es das einzige Peptid war, welches in beiden UPLC-Trennungen eine identische Retentionszeit aufwies. Die Auswertung des entsprechenden MSMS-Spektrums führte dann zur exakten Bestimmung der N-terminalen AS des murens Proteins.

Die Methode der Acetylierung von Aminogruppen hatte aber auch einen störenden Nebeneffekt. Während der Ionisierung entstanden nicht mehr nahezu ausschließlich mehrfach protonierte Peptide, sondern es traten signifikant mehr Peptide auf, welche  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -Ionen anstellen von  $\text{H}^+$  trugen (Abb. 9). Dies führte dazu, dass ein einzelnes Peptid nicht mehr als ein einziges MS-Signal gemessen wurde, sondern es verteilte sich auf zahlreiche Signale, die sich durch die unterschiedliche Anzahl von  $\text{Na}^+$ - und/oder  $\text{K}^+$ -Ionen unterschieden. Dieses Phänomen erschwerte die Auswertung aufgenommener MSMS-Spektren, da zum einen die Signalintensität der einzelnen Signale deutlich abnahm. Zum andern waren MSMS-Spektren mit diesen Adduktionen deutlich schwerer interpretierbar, da Peptide mit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  deutlich schlechter fragmentierten.



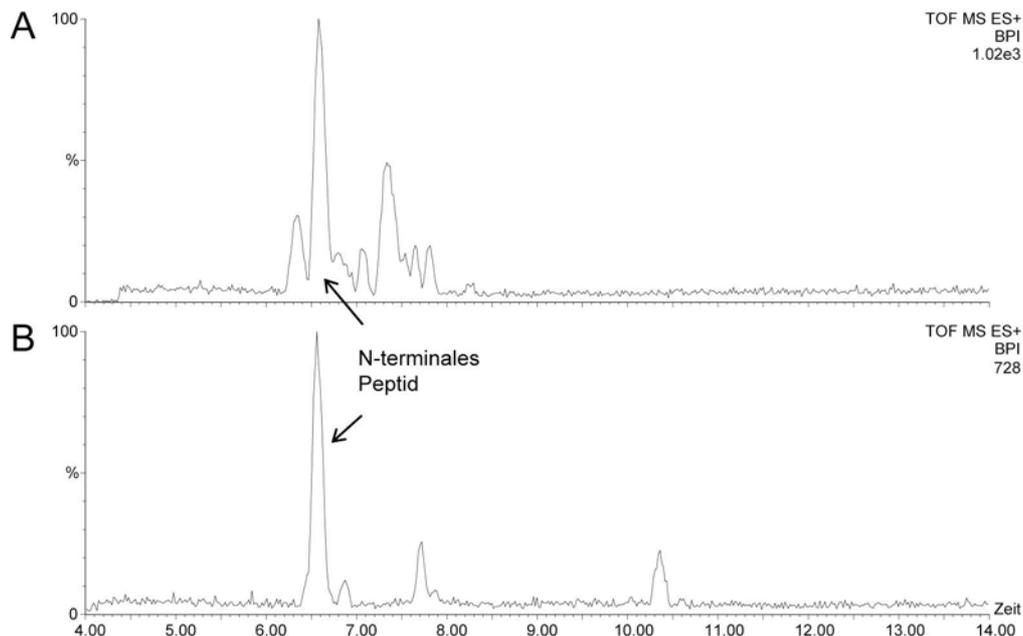
**Abb. 9 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Bildung von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Addukten**

Am Beispiel des acetylierten N-terminalen Peptids von PORA aus Gerste konnte die Wirkung angesäuertes Lösungsmittel (A) im Vergleich zu neutralen Lösungsmitteln (B) bei der Chromatographie gezeigt werden. Wurde zur Auftrennung der Peptide mittels UPLC ein Gradient aus Wasser und Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure verwendet, so wurden neben dem Signal des dreifach protonierten Peptids (871.11  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ) mehrere intensive Signale von Addukten mit  $\text{Na}^+$  und/oder  $\text{K}^+$  beobachtet (A). Wurde die Ameisensäure durch Ammoniumformiat ersetzt, kam es zu einer signifikanten Verringerung der Adduktbildung und das protonierte Signal wies eine deutlich höhere Signalintensität auf.

Die Lösung dieses Problems wurde durch die Verwendung von neutralen Lösungsmitteln bei der chromatographischen Auftrennung mittels UPLC erreicht. Anstelle von 0,1% Ameisensäure wurde das Lösungsmittel Wasser mit 10 mM Ammoniumformiat versetzt und Acetonitril wurde in reiner Form und nicht angesäuert verwendet. Dies führte zu einer signifikanten Verringerung von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Addukten und zu einer Steigerung der Signalintensität des ausschließlich protonierten Peptids (Abb. 9). Eine Erklärung für diese Beobachtung lag darin, dass  $\text{NH}_4^+$ -Ionen während der Ionisierung wesentlich besser an Peptide angelagert werden als Alkalimetallionen. Dann kommt es zu einer Abspaltung von  $\text{NH}_3$  und  $\text{H}^+$  verbleibt beim Peptid. Dieser Vorgang lief nur bei einer hohen Kapillarspannung von mindestens 3,2 kV erfolgreich ab, wie sie bei LC-MS verwendet wurde. Bei etwas niedrigeren Spannungen von ca. 2-2,5 kV konnten vermehrt auch Signale von  $\text{NH}_4^+$ -Addukten beobachtet werden, bei einer gleichzeitigen Verringerung der Signalintensität. Aus diesem Grund konnten bei *offline* Messungen Lösungsmittel mit Ammoniumformiat nicht erfolgreich eingesetzt werden, da hierbei die mögliche Kapillarspannung nur bei maximal ca. 1,2 kV lag, was für eine erfolgreiche Ionisierung zu niedrig war.

## 2.2. Identifikation N-terminaler Peptide von PORA und PORB

Mit der Methode der selektiven Isolation N-terminaler Peptide gelang die Identifikation der N-terminalen Peptide von PORA und PORB aus Gerste, sowie von POR aus *Pisum sativum*. Das N-terminale Peptid konnte durch den hydrophoben Shift interner Peptide nach der Modifikation mit TNBS eindeutig selektiert werden (Abb. 10). Durch Auswertung der entsprechenden MSMS-Spektren gelang jeweils die eindeutige Identifikation der N-terminalen AS des murenen Proteins.



**Abb. 10** Isolation des N-terminalen Peptids von PORA

In einer ersten UPLC-Trennung erfolgte die Auftrennung von Peptiden, die nicht mittels TNBS modifiziert worden waren (A). In einer zweiten UPLC-Trennung erfolgte die Auftrennung von Peptiden, deren nach dem Verdau neu entstandenen freien Aminogruppen mit TNBS modifiziert worden waren (B). Das N-terminale Peptid ist das einzige, welches nicht durch TNBS zusätzlich modifiziert wurde, da dessen N-Terminus bereits vor dem tryptischen Verdau durch eine Acetylierung blockiert worden war. Folglich wies dieses Peptid in beiden chromatographischen Auftrennungen eine identische Retentionszeit auf, wohingegen interne Peptide aufgrund der TNBS-Modifikation einen hydrophoben Shift erfuhren, der die Retentionszeit deutlich verlängerte. Die Auftrennung der Peptide erfolgte jeweils mit einem Acetonitril-Gradienten von 16 min Dauer bei einer gleichmäßig ansteigenden Konzentration von 1% bis 80% Acetonitril (UPLC-Methode 100-26). Das verwendete ddH<sub>2</sub>O enthielt 10 mM Ammoniumformiat.

Für das acetylierte N-terminale Peptid von PORA (871.11 [M+3H]<sup>3+</sup>) aus Gerste konnte die Sequenz Ac-VATAPSPVTTSPGSTASSPSGK<sub>Ac</sub>K<sub>Ac</sub>TLR ermittelt werden. Folglich handelte es sich bei AS Val-48 um die erste AS des murenen Proteins. Das N-terminale Peptid von PORB (693.31 [M+3H]<sup>3+</sup>) wies die Sequenz Ac-AAAVSAPTATPASPAGK<sub>Ac</sub>K<sub>Ac</sub>TVR auf. Somit konnte Ala-61 als erste AS des murenen Proteins PORB identifiziert werden, wobei in diesem Fall zwei weitere N-terminale Peptide nachgewiesen werden konnten, die jeweils um

ein weiteres Ala verkürzt waren (siehe Kap. 2.4). Bei POR aus *P. sativum* konnte das N-terminale Peptid 804.39  $[M+3H]^{3+}$  mit der Sequenz Ac-ETAAPATPAVNK<sub>Ac</sub>SSSEGK<sub>Ac</sub>K<sub>Ac</sub>TLR identifiziert werden. Folglich konnte Glu-64 als erste Aminosäure des murens Proteins nachgewiesen werden.

Die Bedeutung der N-terminalen Acetylierung zur sicheren Identifikation der N-terminalen AS wurde dadurch deutlich, dass sowohl bei dem N-terminalen Peptid von PORA, als auch bei PORB bereits eine Fragmentierung während der Ionisierung in der Quelle beobachtet werden konnte. Diese Fragmentierung führte dazu, dass im MS-Spektrum von PORA ein Signal bei 1114.34  $[M+2H]^{2+}$  beobachtet werden konnte, dem durch MSMS-Analyse die Sequenz PSPVTTSPGSTASSPSGK<sub>Ac</sub>K<sub>Ac</sub>TLR zugewiesen werden konnte. Bei PORB wurde ein Signal bei 469.24  $[M+2H]^{2+}$  detektiert, wobei die Sequenz PAGK<sub>Ac</sub>K<sub>Ac</sub>TVR ermittelt werden konnte. Diese Peptide zeigten N-terminal weder eine Acetylierung, noch eine Modifikation durch TNBS und waren zugleich durch eine identische Retentionszeit nach der UPLC-Auftrennung entsprechend den acetylierten N-terminalen Peptiden von PORA bzw. PORB gekennzeichnet. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass es sich um Artefakte während der Ionisierung handelte. Ohne vorangegangene kovalente Modifikationen des N-Terminus könnten solche Peptide jedoch irrtümlich für N-terminale Peptide gehalten werden, da sie ebenfalls nicht auf tryptischen Schnittstellen beruhen.

Neben dem N-terminalen Peptid wurde ein weiteres Peptid mit sehr geringer Intensität detektiert, welches ebenfalls keinen hydrophoben Shift nach der Modifikation mit TNBS aufwies. Es handelte sich dabei um das Peptid 447.32  $[M+2H]^{2+}$  mit der Sequenz EHIPLFR, wobei dieses Peptid im Vergleich zum theoretisch berechneten Molekulargewicht einen um 18 Da zu niedrigen Wert aufwies. Dies konnte nach einer MSMS-Analyse des entsprechenden Peptids auf die Abspaltung von H<sub>2</sub>O am N-Terminus zurückgeführt werden, wodurch N-terminal Pyroglutaminsäure gebildet worden ist. Diese Reaktion verhinderte folglich nach dem tryptischen Verdau die Reaktion mit TNBS, da die N-terminale Aminogruppe nicht mehr frei vorlag. Diese Reaktion trat jedoch nur zu einem sehr geringen Anteil auf und es war die einzige beobachtete Reaktion, die den N-terminalen Shift durch TNBS verhindern konnte. Darüber hinaus war sie auf die AS Glu und Gln beschränkt.

### 2.3. Vergleich der N-Termini von PORA, PORB und POR aus *P. sativum*

Auf Basis der ermittelten N-terminalen AS erfolgte ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von PORA und PORB aus Gerste mit POR aus *P. sativum* durch ein Sequenzalignment. Dadurch konnte festgestellt werden inwieweit die N-terminalen Bereiche dieser drei Proteine homolog zueinander sind (Abb. 11).



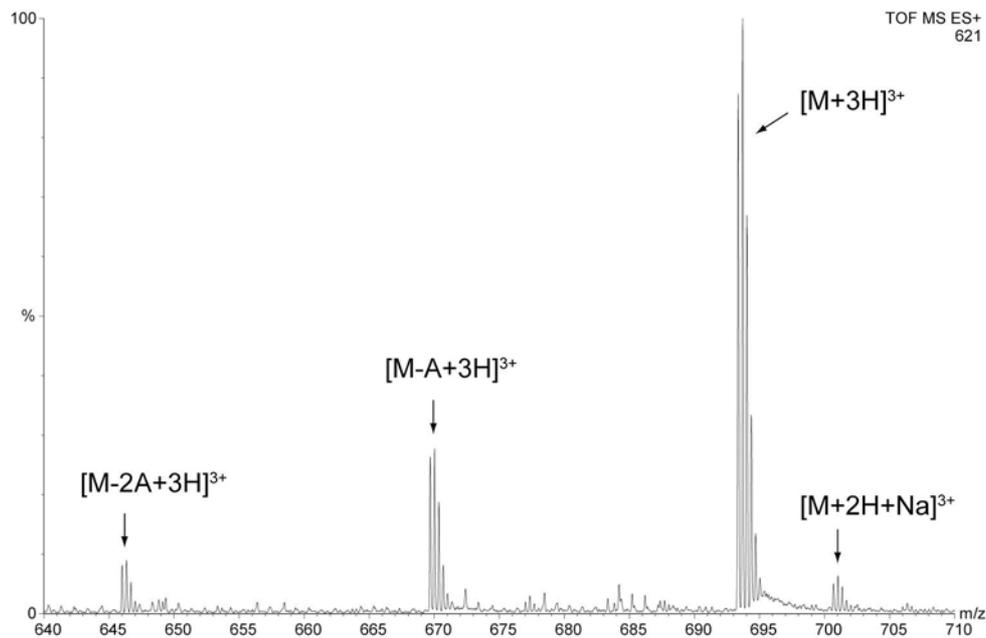
Abb. 11 Sequenzalignment von PORA, PORB und POR aus *Pisum sativum*

Es erfolgte ein Alignment der Sequenzen von PORA (P13653) und PORB (Q42850) aus *Hordeum vulgare*, sowie von POR aus *Pisum sativum* (Q01289). Der Bereich der Transitsequenzen ist durch Fettdruck gekennzeichnet. Der experimentell ermittelte N-Terminus von PORA ist durch ↓ markiert und homolog zu dem experimentell ermittelten N-Terminus von PORB. Zu dem N-Terminus von POR aus *P. sativum* ist er um eine AS versetzt. Der nach Schulz *et al.* beschriebene N-Terminus von PORA ist mit ▼ gekennzeichnet (Schulz *et al.*, 1989) und der nach Benli *et al.* beschriebene N-Terminus ist mit ↓ markiert (Benli *et al.*, 1991). Mit dem Programm ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) erfolgte eine Vorhersage der Schnittstelle zwischen Transitsequenz und maturem Protein für PORA, wobei das Ergebnis mit ▼ gekennzeichnet ist. Ein von Reinbothe *et al.* beschriebenes Bindemotiv von Pchlid in PORA ist kursiv und mit Fettdruck hervorgehoben (Reinbothe *et al.*, 2008). Identische Aminosäuren sind mit \* gekennzeichnet. Ein Aminosäureaustausch durch eine in ihren Eigenschaften sehr ähnliche Aminosäure ist mit : gekennzeichnet. Ein Austausch durch eine Aminosäure mit abgeschwächter Ähnlichkeit ist mit . gekennzeichnet. Das Alignment erfolgte mit dem Programm CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994).

Durch diesen Vergleich konnte gezeigt werden, dass sich die N-Termini von PORA und PORB in zueinander homologen Sequenzbereichen befinden und sich die Schnittstelle zwischen Transitpeptid und maturem Protein exakt entsprechen. Die ermittelte N-terminale Schnittstelle von POR aus *P. sativum* lag ebenfalls in diesem Bereich, war aber nicht exakt homolog zu den N-Termini von PORA und PORB, sondern befand sich um eine AS N-terminal versetzt zu dieser Stelle. Bezüglich PORA konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus 21 AS vor dem nach Benli *et al.* beschriebenen N-Terminus und 27 AS vor dem nach Schulz *et al.* beschriebenen N-Terminus liegt (Schulz *et al.*, 1989; Benli *et al.*, 1991). Die theoretische Vorhersage der Schnittstelle zwischen Transitsequenz und maturem Protein mit dem Programm ChloroP lieferte ein Ergebnis, dass 43 AS von dem experimentell bestimmten N-Terminus entfernt lag. Im Gegensatz dazu wurde für PORB die AS Ala-59 als N-terminale AS von ChloroP vorhergesagt. Diese AS liegt zwei AS N-terminal versetzt zur experimentell bestimmten ersten AS der maturen PORB. Der N-Terminus von POR aus *P. sativum* wurde bereits experimentell mittels Edman-Abbau von Spano *et al.* bestimmt (Spano *et al.*, 1992). Hierbei wurde ein identisches Ergebnis erzielt und Gln-64 ebenfalls als N-terminale AS bestimmt. Die Vorhersage von ChloroP lieferte Ala-63 als N-terminale AS. Die experimentelle Bestimmung der N-Termini von PORA und PORB führte darüber hinaus zu einem neuen theoretischen Molekulargewicht für diese Proteine. Danach weist PORA ein Molekulargewicht von 36454 Da und PORB von 35929 Da auf. Entsprechend müsste PORB unterhalb von PORA innerhalb der SDS-PAGE zu finden sein, was aber nicht der Fall war (Abb. 7). Deshalb wurde für beide Proteine versucht eine möglichst umfangreiche Sequenzabdeckung durch Identifikation möglichst vieler proteolytischer Peptide zu erreichen, um zu kontrollieren, ob die restlichen Sequenzbereiche den Einträgen in SwissProt/TrEMBL entsprechen. Dazu erfolgte eine Reduzierung und Alkylierung der Cysteine vor der elektrophoretischen Auftrennung, um möglichst auch alle cysteinhaltigen Peptide zu detektieren. Identifiziert wurden sowohl tryptische Peptide mit und ohne Acetylierung der Lys. Dadurch wurde für PORA eine Sequenzabdeckung von 92,9% und von PORB von 65,9% erzielt. In beiden Fällen gelang insbesondere der Nachweis des C-terminalen Peptides, wodurch bestätigt werden konnte, dass der C-Terminus korrekt in SwissProt/TrEMBL angegeben ist. Bei PORB konnten trotz Alkylierung die Peptide mit Cysteinen nicht nachgewiesen werden, was durch die deutlich geringere Proteinkonzentration von PORB erklärt werden konnte. Peptide innerhalb der Transitsequenzen wurden in keinem Fall identifiziert. Folglich kann die Größe der maturen Proteine PORA und PORB als bestätigt angesehen werden.

## 2.4. Detaillierte Betrachtung des N-Terminus von PORB

Die Isolation des N-terminalen Peptids von PORB führte zu einem interessanten Ergebnis. Im Gegensatz zu PORA und POR aus *P. sativum* wurde nicht nur ein einziges N-terminales Peptid identifiziert, sondern es traten noch zwei weitere N-terminale Peptide auf, die jeweils um eine AS relativ zum größten und intensivsten Peptid verkürzt waren (Abb. 12).



**Abb. 12** Alternative N-Termini von PORB

Im Gegensatz zu PORA und POR aus Erbse wies der N-Terminus von PORB keine klar definierte Aminosäure auf, welche ausschließlich die erste AS des maturen Proteins darstellte, sondern es waren drei unterschiedliche N-terminale Peptide detektierbar. Das intensivste N-terminale Peptid 693.31  $[M+3H]^{3+}$  wies Ala-61 als erste AS auf. Daneben konnten zwei weitere Peptide 669.65  $[M-A+3H]^{3+}$  und 645.98  $[M-2A+3H]^{3+}$  mit den AS Ala-62 und Ala-63 als jeweils erste AS nachgewiesen werden.

Das intensivste Signal eines N-terminalen Peptids lag bei  $m/z$  693.31  $[M+3H]^{3+}$ , wobei Ala-61 die N-terminale AS darstellte. Darüber hinaus fand sich ein weiteres Peptid mit niedrigerer Signalintensität bei  $m/z$  669.65  $[M+3H]^{3+}$ , welches nicht Ala-61, sondern Ala-62 als N-terminale AS aufwies. Schließlich konnte mit noch niedrigerer Signalintensität bei  $m/z$  645.98  $[M+3H]^{3+}$  ein drittes Peptid identifiziert werden, welches Ala-63 als erste AS aufwies. Alle drei Peptide wiesen an der N-terminalen Aminogruppe eine Acetylierung auf, wie eindeutig mittels MSMS-Analyse belegt werden konnte. Zudem wiesen diese drei Peptide nach der Auftrennung mittels UPLC eine geringfügig verschobene Retentionszeit auf. Folglich handelte es sich bei diesem Phänomen um ein bzw. zwei AS verkürzten N-Terminus nicht um ein Artefakt während der massenspektrometrischen Analyse vergleichbar der Fragmentierung während der Ionisierung (vgl. Kap. 2.2). Die Abspaltung dieser AS während

des tryptischen Verdaus konnte aufgrund der vorliegenden Acetylierung ebenfalls ausgeschlossen werden. Darüber hinaus führte die Analyse eines tryptischen Verdaus ohne vorangegangene Acetylierung ebenfalls zu zwei N-terminalen Peptiden, die wie oben beschrieben, um ein, bzw. zwei Ala verkürzt waren und neben dem Peptid mit Ala-61 als N-terminale AS auftraten. Dadurch konnte auch eine mögliche Nebenreaktion während der Acetylierung ausgeschlossen werden. Insgesamt erfolgte die Bestimmung dieser N-terminalen Peptide fünfmal unabhängig voneinander basierend auf jeweils eigenen Proteinisolationen aus Etioplasten und elektrophoretischen Auftrennungen. Die Bestimmung des N-Terminus erfolgte dabei sowohl unmittelbar nach der Coomassie-Färbung des PAG, als auch nach zweiwöchiger Lagerung in Entfärbelösung, sowie nach der Trocknung des PAG. Das Resultat war auch bezüglich der relativen Signalintensität der drei N-terminalen Peptide zueinander immer gleich und es konnten jeweils drei alternative N-terminale Peptide identifiziert werden. Eine unerwünschte Nebenreaktion während der Aufarbeitung oder eine theoretisch mögliche säurekatalysierte hydrolytische Abspaltung einzelner N-terminaler AS während der Färbung bzw. der anschließenden Lagerung des PAG konnte somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

### **3. Charakterisierung des NDH-Komplexes**

In der BN-PAGE der Membranproteinkomplexe des Etioplasten fand sich der erste deutlich mit Coomassie färbbare Komplex bei einem Molekulargewicht von 740-760 kDa (Abb. 6). In einer vorangegangenen Arbeit konnten in diesem Komplex die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des RUB-Komplexes mittels 2D BN/SDS-PAGE und massenspektrometrischer Identifikation bestimmt werden (Reisinger, 2008). Die direkte Analyse von diesem Bereich der BN-PAGE mittels LC-MS zeigte darüber hinaus, dass sich dort nicht nur der RUB-Komplex befindet, sondern es konnten auch mehrere Untereinheiten des NDH-Komplexes identifiziert werden.

#### **3.1. Massenspektrometrische Identifikation des NDH-Komplexes**

Die massenspektrometrische Identifikation von Untereinheiten des NDH-Komplexes erfolgte mittels LC-MS. Ziel war eine möglichst umfassende Identifikation der in diesem Bereich vorhandenen Proteine. Dazu wurden verschiedene Methoden der Probenvorbereitung für die anschließende massenspektrometrische Identifikation der Untereinheiten angewendet, um die größtmögliche Sensitivität beim Nachweis einzelner Peptide zu erreichen. Ein Ansatz beruhte auf der direkten, gleichzeitigen massenspektrometrischen Analyse aller Untereinheiten des Komplexes mittels LC-MS. Dazu erfolgte zum einen der direkte Verdau der Proteine im BN-PAG mit Trypsin und zum anderen wurde eine Extraktion der intakten Proteine aus dem BN-PAG vorgenommen und der Verdau erfolgte anschließend in Lösung. Ein zweiter Ansatz beruhte auf einer anderen Strategie und basierte auf einer aufkonzentrierenden 2. Dimension. Dadurch konnten die einzelnen Untereinheiten mittels SDS-PAGE aufgetrennt und visualisiert werden (siehe Kap. 3.5). Die massenspektrometrische Identifikation erfolgte mittels In-Gel Verdau und LC-MS. Mit diesen Methoden gelang eine umfangreiche Identifikation von Peptiden des NDH-Komplexes, wobei gleichzeitig deutliche Unterschiede bei der Sensitivität und auch bei der Selektivität bezüglich einzelner Untereinheiten festgestellt werden konnte (Tab. 7). Zudem gelang auch in Chloroplasten der Nachweis einzelner Untereinheiten des NDH-Komplexes in einem dem Etioplasten entsprechenden Molekularmassenbereich.

Tab. 7 Identifizierte Peptide der Untereinheiten des NDH-Komplexes

Protein	Signal [m/z]	Sequenz	GRAVY <sup>1</sup>	M1 <sup>2</sup>	% <sup>5</sup>	M2 <sup>3</sup>	% <sup>5</sup>	M3 <sup>4</sup>	% <sup>5</sup>
Ndh B	560.29 [M+2H] <sup>2+</sup>	NQEITPYVR	-1,100	X	1,76		0,00	X	1,76
Ndh F	403.25 [M+2H] <sup>2+</sup>	VFTLGIR	1,386	X				X	
Ndh F	455.75 [M+2H] <sup>2+</sup>	DFVLSTTK	0,150					X	
Ndh F	558.29 [M+2H] <sup>2+</sup>	IGSFTTSFGAK	0,382	X				X <sup>7</sup>	
Ndh F	574.29 [M+2H] <sup>2+</sup>	GYIDIFYTR	0,011					X	
Ndh F	601.78 [M+2H] <sup>2+</sup>	NIYSWSYNR	-1,344					X	
Ndh F	655.84 [M+2H] <sup>2+</sup>	SGVSFFSQNIPK	-0,083	X <sup>7</sup>				X <sup>7</sup>	
Ndh F	685.34 [M+2H] <sup>2+</sup>	ESSLYSISLWGK	-0,092	X	5,68		0,00	X <sup>7</sup>	9,20
Ndh H	374.18 [M+2H] <sup>2+</sup>	EGDGLAR	-1,014			X		X	
Ndh H	404.22 [M+2H] <sup>2+</sup>	QELYVR	-0,800			X		X	
Ndh H	471.78 [M+2H] <sup>2+</sup>	IIQQAIEK	0,113			X		X	
Ndh H	480.78 [M+2H] <sup>2+</sup>	VIMLELSR	1,175			X		X	
Ndh H	490.24 [M+2H] <sup>2+</sup>	VGEMSESIK	-0,256	X		X		X	
Ndh H	523.28 [M+2H] <sup>2+</sup>	ASGIQWDLR	-0,389	X		X		X <sup>7</sup>	
Ndh H	649.40 [M+3H] <sup>3+</sup>	IRPPGFINLQILPQLVK	0,459			X		X	
Ndh H	666.28 [M+2H] <sup>2+</sup>	NSEWNDFEYK	-2,160			X		X	
Ndh H	672.35 [M+2H] <sup>2+</sup>	IPGGPYENLEVR	-0,650			X		X <sup>7</sup>	
Ndh H	683.89 [M+2H] <sup>2+</sup>	TIHQYLPYVTR	0,309	X <sup>6,7</sup>		X		X <sup>7</sup>	
Ndh H	787.92 [M+2H] <sup>2+</sup>	IGGVAADLPYGWIDK	0,313		7,38	X	28,8	X	28,8
Ndh I	458.59 [M+3H] <sup>3+</sup>	LPITIHYPYK	-0,391			X		X	
Ndh I	579.97 [M+3H] <sup>3+</sup>	YIGQSFITLSTNR	-0,300			X		X	
Ndh I	860.97 [M+2H] <sup>2+</sup>	LPISIMGDYTIQTIR	0,447		0,00		14,4	X	22,8
Ndh J	414.71 [M+2H] <sup>2+</sup>	AQKDNPR	-2,671					X	
Ndh J	416.21 [M+2H] <sup>2+</sup>	SLGFDHR	-0,829					X	
Ndh J	426.70 [M+2H] <sup>2+</sup>	SADFQER	-1,600					X	
Ndh J	451.27 [M+2H] <sup>2+</sup>	GIETLQIK	0,100			X		X	
Ndh J	575.99 [M+3H] <sup>3+</sup>	ILMPESWIGWPLRK	0,029					X	
Ndh J	594.56 [M+3H] <sup>3+</sup>	ESYDMVGISYDNHPR	-1,153			X		X	
Ndh J	602.32 [M+2H] <sup>2+</sup>	IPSVFWIWR	0,811	X <sup>6</sup>		X		X	
Ndh J	807.43 [M+2H] <sup>2+</sup>	ILMoxPESWIGWPLR	0,331			X		X	
Ndh J	846.43 [M+2H] <sup>2+</sup>	IQYGIDNPEEVC <sub>Acrvl</sub> IK	-0,321					X	
Ndh J	863.40 [M+2H] <sup>2+</sup>	DYITPNFYEIQDAH	-0,857		5,66		20,1	X	59,8
Ndh K	350.16 [M+2H] <sup>2+</sup>	FDLDR	-1,180					X	
Ndh K	352.71 [M+2H] <sup>2+</sup>	YGLVPR	0,033					X	
Ndh K	389.21 [M+2H] <sup>2+</sup>	SPVPSYK	-0,829	X		X		X	
Ndh K	567.78 [M+2H] <sup>2+</sup>	LYEQMPEPK	-1,467	X		X		X	
Ndh K	575.84 [M+2H] <sup>2+</sup>	Ac-VLTEYLDKK	-0,556	X				X	
Ndh K	731.39 [M+2H] <sup>2+</sup>	QADLILTAGVTMK	0,600	X	15,9	X	12,2	X	20,4
Ndh M	388.89 [M+3H] <sup>3+</sup>	VLNFSMoxGKPR	-0,200					X	
Ndh M	413.25 [M+2H] <sup>2+</sup>	GPAQSLPR	-0,850					X	
Ndh M	439.23 [M+3H] <sup>3+</sup>	LIGAMLEHYIR	0,673			X		X	
Ndh M	454.58 [M+3H] <sup>3+</sup>	VKFNSSQIPDVK	-0,483					X	
Ndh M	475.76 [M+2H] <sup>2+</sup>	LLYDGEIK	-0,062			X		X	
Ndh M	539.85 [M+2H] <sup>2+</sup>	KLLYDGEIK	-0,489					X	
Ndh M	567.79 [M+2H] <sup>2+</sup>	FNSSQIPDVK	-0,610	X	4,55	X	13,2	X	22,7
Ndh N	452.72 [M+2H] <sup>2+</sup>	WLDDVEK	-1,043	X		X		X <sup>7</sup>	
Ndh N	466.28 [M+2H] <sup>2+</sup>	FLWKPLK	0,014					X	
Ndh N	497.29 [M+2H] <sup>2+</sup>	LSLLHPDAK	0,022					X	
Ndh N	543.95 [M+3H] <sup>3+</sup>	ALAIYPPHEGGYEGR	-0,653			X		X	
Ndh N	559.29 [M+2H] <sup>2+</sup>	VIAEC <sub>Acrvl</sub> GNWR	0,022					X	
Ndh N	559.30 [M+2H] <sup>2+</sup>	GLGDPESTLTK	-0,718			X		X <sup>7</sup>	
Ndh N	589.34 [M+2H] <sup>2+</sup>	GLLVWVYEAK	0,780					X	
Ndh N	678.00 [M+3H] <sup>3+</sup>	LNGLFDFVGGDLVKPDNGR	-0,195					X	
Ndh N	686.32 [M+2H] <sup>2+</sup>	WYFPPEVDYR	-1,120	X		X		X	
Ndh N	748.36 [M+2H] <sup>2+</sup>	YQGYFLDLSAR	-0,367		8,06		20,4	X	51,7

<sup>1</sup> Hydrophobizität der Peptide berechnet nach Kyte & Doolittle (Kyte et al., 1982).

<sup>2</sup> Methode 1: In-Gel Verdau der Proteine direkt im BN-PAG.

<sup>3</sup> Methode 2: Isolation der ganzen Proteine mittels Ultraschall/FAPH und Verdau in Lösung.

<sup>4</sup> Methode 3: Aufkonzentrierung der Proteine durch 2D BN/SDS-PAGE und In-Gel Verdau.

<sup>5</sup> Erreichte Sequenzabdeckung durch die jeweils angewandte Methode.

<sup>6</sup> Diese Peptide konnten auch mittels Agilent 1100 und Q-TOF 1 detektiert werden. Alle übrigen Nachweise erfolgten unter Verwendung des Q-TOF Premier mit nanoAcquity.

<sup>7</sup> Diese Peptide konnten auch in Chloroplasten detektiert werden.

Erfolgte der Verdau der Untereinheiten des NDH-Komplexes direkt im BN-PAG, so gelang der Nachweis der Untereinheiten NdhB, F, H, J, K, M, N in Etioplasten (Tab. 7 M1). Die erreichte Sequenzabdeckung lag hierbei zwischen 1,76% bei NdhB, welches nur durch ein Peptid nachgewiesen werden konnte, und 15,9% bei NdhK. Insgesamt wurden mit dieser Methode 16 Peptide aus Untereinheiten des NDH-Komplexes identifiziert. Alternativ zu dieser Methode des In-Gel Verdaus erfolgte die Extraktion ganzer Proteine aus dem BN-PAG mittels Ultraschall und FAPH. Dadurch gelang der Nachweis von NdhH, I, J, K, M, N, wobei eine Sequenzabdeckung von 12,2% (NdhK) bis 28,8% (NdhH) erreicht wurde (Tab. 7 M2). Insgesamt wurden 27 Peptide identifiziert. Der Vorteil dieser Methode lag in der Möglichkeit der Aufkonzentrierung der Verdauungslösung. Bei Anwendung des In-Gel Verdaus ist das Volumen des Verdaus durch das Gelvolumen bereits vorgegeben und lag bei ca. 50 µl. Bei der Extraktion mittels Ultraschall und FAPH wurden vor dem Verdau in Lösung die Lösungsmittel der Extraktion abgezogen, wodurch ein geringeres Puffervolumen für den Verdau von 20 µl gewählt werden konnte. Durch diese Aufkonzentrierung um den Faktor 2,5 konnte die höhere Peptidausbeute erklärt werden, jedoch trifft sie ausschließlich auf die hydrophilen Untereinheiten des membranassoziierten Subkomplexes ohne TMD zu. Die beiden membranintegralen Untereinheiten NdhB, F konnten mit dieser Methode nicht identifiziert werden. Darauf erfolgte ein Kontrollversuch, um festzustellen, ob diese membranintegralen Untereinheiten während der Ultraschall-Extraktion im Gel verblieben. Dazu wurde eine Ultraschall/FAPH Extraktion durchgeführt und anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen des Gels mit ddH<sub>2</sub>O ein In-Gel Verdau. Die Analyse dieses Extraktes mittels LC-MS erbrachte jedoch keine Peptid-Signale von Untereinheiten des NDH-Komplexes. Die Ursache des Verlustes von NdhB, F liegt somit möglicherweise beim Verdau in Lösung und nicht bei der Ultraschall/FAPH Extraktion.

Ein weiterer Ansatz zur möglichst umfangreichen Identifikation der Untereinheiten des NDH-Komplexes basierte auf einer konzentrierenden SDS-PAGE als 2. Dimension (vgl. Kap. 3.5). Hierbei erfolgte eine Konzentrierung des Komplexes um den Faktor 5 und aufgrund der Auftrennung in die einzelnen Untereinheiten wurde die Komplexität der einzelnen Proben

deutlich reduziert. Dadurch gelang der Nachweis der Untereinheiten NdhB, F, H, I, J, K, M, N mittels In-Gel Verdau in Etioplasten und die Sequenzabdeckung lag zwischen 1,76% (NdhB) und 59,8% (NdhJ) (Tab. 7 M3). Insgesamt konnten mit dieser Methode 55 Peptide identifiziert werden, wobei darin alle mit den Methoden 1 und 2 identifizierten Peptide eingeschlossen sind.

In Chloroplasten gestaltete sich der Nachweis einzelner Untereinheiten des NDH-Komplexes deutlich schwieriger. Die Signalintensität detektierter Peptide war bei identischer Probenvorbereitung signifikant niedriger und es gelang auch nur der Nachweis von Peptiden, die in Etioplasten durch besonders intensive Signale aufgefallen waren. Durch In-Gel Verdau im BN-PAGE konnten nur NdhF und NdhH nachgewiesen werden, wobei jeweils auch nur ein Peptid identifiziert werden konnte. Mittels konzentrierender PAGE gelang die zusätzliche Identifikation von NdhN und insgesamt konnten 8 Peptide eindeutig nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt auf eine signifikant niedrigere Konzentration des NDH-Komplexes in Chloroplasten schließen.

Weder in Etioplasten, noch in Chloroplasten konnten in einem anderen Molekularmassenbereich der BN-PAGE Untereinheiten des NDH-Komplexes detektiert werden. Überprüft wurde dies, indem ein gesamtes Gel in 0,5 cm breite Abschnitte unterteilt wurde und nach In-Gel Verdau und massenspektrometrischer Analyse auf die Anwesenheit von Peptiden der Untereinheiten des NDH-Komplexes überprüft wurde. Dadurch konnte die mögliche Existenz weiterer NDH-(Sub-)Komplexe ausgeschlossen werden.

### **3.2. Identifikation der kernkodierten Untereinheiten NdhM und NdhN**

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals der Nachweis der kernkodierten Untereinheiten NdhM und NdhN aus Gerste. Für diese Untereinheiten waren keine Sequenzinformationen in Sequenzdatenbanken für Gerste verfügbar, weshalb die Identifikation entsprechender Peptide auf Basis der homologen Sequenzen von *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana* erfolgte. Durch *de novo* Sequenzierung ermittelte Peptidsequenzen wurden in einem Sequenzalignment diesen homologen Sequenzen gegenübergestellt (Abb. 13).

**NdhM**

```

A.th.  MVAAFS-YTACTKLSLLH--PSMVAQIR-----P--RTTQKAFVVTNPEQDSTLEVQETE
O.sa.  MATTASPFLSPAKLSLERRLPATWTARRSVRFPVRAQDQQQVKEEEEEEAAVENLPPP
H.vu.  -----
      *.: : * : : :***** : * . * * * : : *.: *::: : * .

A.th.  TLKEEQSTEKMKKQPTPLRPVEKQLNVKSKGMG-DFGGQWLSSVTRHVRIYAAAYIDPETC
O.sa.  PQEEEQRREKTRRQGPAPLQPLVQPLAESKNMSREYGGQWLSCTTRHIRIYAAAYINPETN
H.vu.  -----GPAQSLPR-----
      . :*** * : .: : * : : * . :**.* . :***** . **:*:*****:***

A.th.  EFDQSQMDKLTLLDPTTEEFVWDDDESCNKVYSYFQELVDHYEGAPLTEYTLRLIGSDVEH
O.sa.  AFDQTQMDKLTLLLDPTDEFVWTDETCQKVYDEFQDLVDHYEGAELSEYTLRLIGSDLEH
H.vu.  -----LIGAMLEH-----
      ***:*****:*****:***** **:*:***. **:*:***** *:*:*****: :**

A.th.  YIRKMLFDGEIQYNMDARVLNFSMGKPRVQFNTSNIEGGGDGPQEDA
O.sa.  FIRKLLYDGEIKYNMMSRVLNFSMGKPRIKFNSSQIP---DVK-----
H.vu.  YIRKLLYDGEIK-----VLNFSMGKPRVKFNSSQIP---DVK-----
      :***:*:***:*** :*****:***:*** * *
  
```

**NdhN**

```

A.th.  MGSRAICIQRVAPPCFEASQVKKIKTVGSFLVNTRSKRRRSTGVKCSSIADYIGGDLVKP
O.sa.  MWS--AAAARTVTPPLPAASPLQQHQRRGAWARVGNGRAASTTAARAGLWDFVGGDLVKP
H.vu.  -----LNGLFDFVGGDLVKP-----
      * * . * . . * ** : : : . . . . * ** . : * :*****

A.th.  DIGQWLQDVEEHKAIAYAPHEGGYEGRYLNRLKMQGYFLDISARGLGDPETTLKKNYP
O.sa.  DMGRWLDVVEKHKSLAIYPPHEGGYEGRYLSRLSYQGYFLDLSARGLGDPETTLTKIHP
H.vu.  DNGRWLDVVEK--ALAIYPPHEGGYEGR-----YQGYFLDLSARGLGDPETTLTK---
      * * :***:***:***:***.*****.***. *****:*****:*** * :*

A.th.  VCPAHLGKQPIARWYYPPEVDYRLAALPPSAKGLVWVWLEAKVLSKSELQFLALLPSLRP
O.sa.  VCPSLGRQPVARWYFPPEVDYRLSLLHPDAKGLVWVWMEAKVLSKAELQFLAILPDIRP
H.vu.  -----WYYPPEVDYRLSLLHPDAKGLLVWVYEAK-----
      ***. **:*:***:***:*****: * * .***:*:*** *****:*****:***. :**

A.th.  NVRVIAECGNWRKFVWKPLAEIANLA----AQE
O.sa.  KVRVIAECGNWRKFVWKPLKQIAGLEPDPDAEE
H.vu.  ---VIAECGNWR-FLWKPLK-----
      :*****:***** :**.* * :*
  
```

**Abb. 13 Sequenzalignment der kernkodierten Untereinheiten NdhM und NdhN**

Es erfolgte ein Alignment der Sequenzen von NdhM von *Arabidopsis thaliana* (A.th.) (Q2V2S7) und *Oryza sativa* (O.sa.) (Q7FB12), sowie von NdhN (Q9LVM2; Q0JH55) zu den jeweils identifizierten Peptiden von *Hordeum vulgare* (H.vu.). Identische Aminosäuren sind mit \* gekennzeichnet. Ein Aminosäureaustausch durch eine in ihren Eigenschaften sehr ähnliche Aminosäure ist mit : gekennzeichnet. Ein Austausch durch eine Aminosäure mit abgeschwächer Ähnlichkeit ist mit . gekennzeichnet. Das Alignment erfolgte mit dem Programm CLUSTALW (Thompson et al., 1994). Mit dem Programm ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) erfolgte die Vorhersage der N-terminalen Präsequenz, welche durch Fettdruck markiert ist.

Von NdhM konnten in Gerste 7 Peptide mit insgesamt 50 Aminosäuren bestimmt werden. Dies entspricht einer Sequenzabdeckung von 22,7% in Vergleich zur unprozessierten und von 27,3% zur prozessierten Sequenz von *O. sativa*. Die Prozessierungsschnittstelle wurde, ebenso wie bei NdhN, mit dem Programm ChloroP theoretisch postuliert. Von den 50 bestimmten Aminosäuren waren 44 (88%) identisch mit der Sequenz von *O. sativa* und 33

(66%) identisch mit der Sequenz von *A. thaliana*. Der Vergleich der Sequenzen von *O. sativa* und *A. thaliana* zeigte, dass vor allem der N-terminale Bereich und das Transitpeptid eine nur geringe Homologie aufwiesen, wohingegen der C-terminale Bereich deutlich stärker konserviert war. Im Bereich zwischen Aminosäure 97 von *O. sativa* und dem C-Terminus waren 70,5% der Aminosäuren identisch. Im voran liegenden N-terminalen Bereich hingegen betrug die Übereinstimmung nur 22,9%. Insgesamt waren 50,9% der Aminosäuren identisch. Von NdhN konnten in Gerste 10 Peptide mit insgesamt 109 Aminosäuren bestimmt werden. Dies entsprach einer Sequenzabdeckung von 51,7% bezüglich der unprozessierten Sequenz und von 60,6% bezüglich der prozessierten Sequenz von *O. sativa*. Des Weiteren waren 92,7% der Aminosäuren aus Gerste identisch mit der Sequenz aus *O. sativa* und 79,8% identisch mit *A. thaliana*. Insgesamt zeigten die Sequenzen von NdhN von *O. sativa* und *A. thaliana* eine etwas größere Übereinstimmung von 61,9% im Vergleich zu NdhM. Dabei wies der N-terminale Bereich bis Aminosäure 45 von *A. thaliana* mit dem Transitpeptid ebenfalls die geringste Übereinstimmung mit nur 19,6% auf, wohingegen der darauf folgende C-terminale Bereich eine Übereinstimmung von 73,2% aufwies.

### 3.3. Vergleich identifizierter und nicht identifizierter Untereinheiten

Insgesamt gelang der massenspektrometrische Nachweis von 8 Untereinheiten, deren Zugehörigkeit zum NDH-Komplex bereits bekannt war, wobei die Untereinheiten NdhB, F dem membranintegralen Subkomplex und NdhH, I, J, K dem membranassoziierten Subkomplex angehören. Darüber hinaus konnten zwei kernkodierte Untereinheiten, NdhM und NdhN, identifiziert werden, die ebenfalls keine TMD aufwiesen. In der Literatur wurden aber noch fünf weitere membranintegrale Untereinheiten des NDH-Komplexes beschrieben (NdhA, C, D, E, G), sowie zwei weitere kernkodierte Untereinheit NdhL und NdhO, welche massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden konnten (Rumeau et al., 2005; Shimizu et al., 2008). Eine Analyse der vorhandenen Sequenzinformationen aller Untereinheiten zeigte deutliche Unterschiede bezüglich der Eigenschaften der Untereinheiten des membranintegralen Subkomplexes und des membranassoziierten Subkomplexes (Tab. 8).

Tab. 8 Eigenschaften bislang bekannter Untereinheiten des plastidären NDH-Komplexes

Gen-Name	Acc.-Nr. <sup>1</sup>	K. <sup>2</sup>	MG [kDa]	GRAVY <sup>3</sup>	T1 <sup>4</sup>	T2 <sup>5</sup>	T3 <sup>6</sup>	% <sup>7</sup> theo.	% <sup>8</sup> err.	P <sup>9</sup>	Bemerkungen
<i>ndhA</i>	P92432	P	40,4	0,800	8	6	8	33,7	0	0	8 TMD in DB
<i>ndhB</i>	Q33532	P	57,0	0,716	14	14	13	12,2	1,76	1	11 TMD in DB
<i>ndhC</i>	Q85XC4	P	13,7	1,075	3	3	3	20,8	0	0	
<i>ndhD</i>	O03060	P	56,3	0,798	15	14	13	19,8	0	0	
<i>ndhE</i>	P69378	P	11,3	0,698	3	3	3	8,9	0	0	
<i>ndhF</i>	Q32440	P	82,9	0,565	18	14	15	21,3	9,20	7	
<i>ndhG</i>	O98693	P	19,5	1,057	5	5	5	0	0	0	
<i>ndhH</i>	O98691	P	45,6	-0,143	0	0	0	62,1	28,8	12	
<i>ndhI</i>	O98692	P	21,0	-0,308	0	0	0	61,1	22,8	3	
<i>ndhJ</i>	Q7GT16	P	18,7	-0,386	0	0	1	78,6	59,8	10	
<i>ndhK</i>	Q85XC3	P	27,5	-0,215	0	0	0	38,8	20,4	6	
<i>ndhL</i> <sup>10</sup>	A3B2Z3	N	22,3	-0,046	3	2	3	18,4	0	0	<i>O. sativa</i>
<i>ndhM</i> <sup>10</sup>	Q7FB12	N	25,6	-0,831	0	0	0	65,6	22,7	7	<i>O. sativa</i>
<i>ndhN</i> <sup>10</sup>	Q0JH55	N	23,6	-0,335	0	0	0	79,4	51,7	10	<i>O. sativa</i>
<i>ndhO</i> <sup>10</sup>	Q5JN29	N	17,9	-0,235	2	0	0	40,3	0	0	<i>O. sativa</i>

<sup>1</sup> Datenbankeintrag von *Hordeum vulgare* in SwissProt und TrEMBL

<sup>2</sup> Kernkodierte (N) oder plastidär kodierte (P) Proteine

<sup>3</sup> Hydrophobizität der Peptide berechnet nach Kyte & Doolittle (Kyte et al., 1982)

<sup>4</sup> Anzahl an Transmembrandomänen berechnet mit HMMTOP 2.0 (Tusnady et al., 2001)

<sup>5</sup> Anzahl an Transmembrandomänen berechnet mit TMHMM 2.0 (Krogh et al., 2001)

<sup>6</sup> Anzahl an Transmembrandomänen berechnet mit SOUSI 1.11 (Hirokawa et al., 1998)

<sup>7</sup> Theoretisch erreichbare Sequenzabdeckung durch Identifikation aller Peptide zwischen 6 und 20 AS

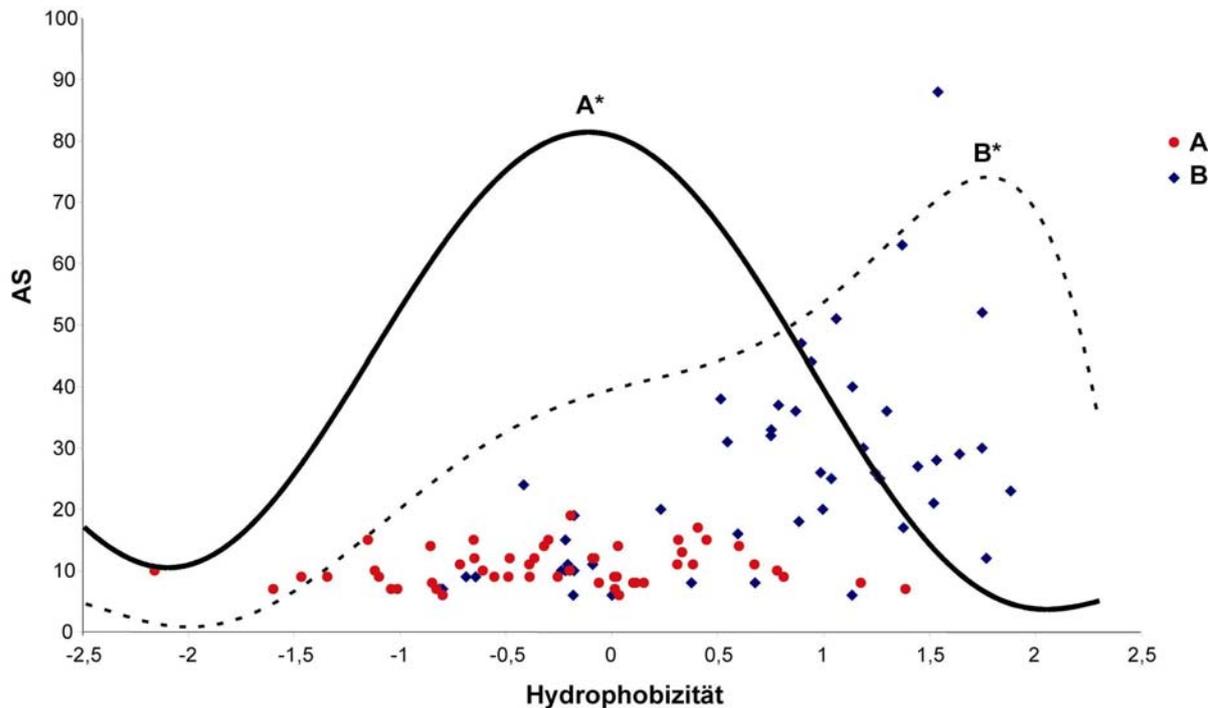
<sup>8</sup> Erreichte Sequenzabdeckung mittels LC-MS

<sup>9</sup> Anzahl identifizierter Peptide mittels LC-MS

<sup>10</sup> Benennung entsprechend (Rumeau et al., 2005; Shimizu et al., 2008)

Die Analyse der Sequenzen zeigte bei den membranintegralen Untereinheiten NdhA, B, C, D, E, F, G die Existenz zahlreicher  $\alpha$ -helikaler TMDs (Tab. 8). Die drei Untereinheiten NdhC, E, G mit einem Molekulargewicht von weniger als 20 kDa wiesen dabei drei, bzw. fünf TMDs auf, wobei keine löslichen Domänen mit einer Länge von mehr als 30 Aminosäuren bestimmt werden konnten. Bei den größeren Untereinheiten konnte für NdhA eine lösliche Domäne mit einer Länge von ca. 50 AS identifiziert werden. Bei NdhF konnten zwei lösliche Domänen mit einer Länge von ca. 80 und 90 AS identifiziert werden. Allerdings führte die Anwendung verschiedener Programme zur Vorhersage von TMDs zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen. So wurden für NdhF je nach Programm zwischen 14 und 18 TMDs vorhergesagt. Die Analyse der Hydrophobizität der einzelnen detektierten Peptide im Vergleich zur Hydrophobizität der ganzen Proteine zeigte, dass die Peptide der membranintegralen Untereinheiten deutlich hydrophiler als die entsprechenden ganzen Proteine waren, wohingegen bei den membranassoziierten Untereinheiten nahezu kein Unterschied bei der durchschnittlichen Hydrophobizität der ganzen Proteine im Vergleich zu den detektierten Peptiden bestand. Durchschnittlich wiesen die beiden membranintegralen Proteine NdhB, F, welche jeweils durch die Existenz mehrerer TMDs gekennzeichnet waren, eine

Hydrophobizität von 0,641 auf. Die durchschnittliche Hydrophobizität der detektierten Peptide lag bei -0,086. Folglich waren die detektierten Peptide dieser Untereinheiten im Mittel deutlich hydrophiler, als die entsprechenden ganzen Proteine. Im Vergleich dazu wiesen die sechs membranassoziierten Untereinheiten NdhH, I, J, K, M, N, welche jeweils keine TMD besaßen, eine durchschnittliche Hydrophobizität von -0,379 auf. Die detektierten Peptide wiesen eine durchschnittliche Hydrophobizität von -0,383 auf, welche nahezu identisch mit der durchschnittlichen Hydrophobizität der ganzen Proteine war. Diese Beobachtung ließ den Rückschluss zu, dass membranintegrale Proteine in erster Linie durch lösliche Domänen identifiziert wurden, wohingegen lösliche Proteine keine für die massenspektrometrische Identifikation bevorzugten Bereiche aufwiesen. Für die zwei kernkodierte Untereinheiten wurde die durchschnittliche Hydrophobizität auf Basis der Sequenzen von *Oryza sativa* ermittelt, da die entsprechenden Sequenzen aus Gerste nicht zur Verfügung standen, wobei das Transitpeptid auf Basis der Vorhersage des Programms ChloroP entfernt wurde (vgl. Kap. 3.2). Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass detektierte Peptide in der Regel eine Größe zwischen 6 und 20 Aminosäuren aufwiesen und der tryptische Verdau von membranintegralen Proteinen tendenziell deutlich größere Peptide lieferte. Der Zusammenhang von Peptidgröße und Hydrophobizität mit der massenspektrometrischen Detektierbarkeit wird in Abb. 14 gezeigt.



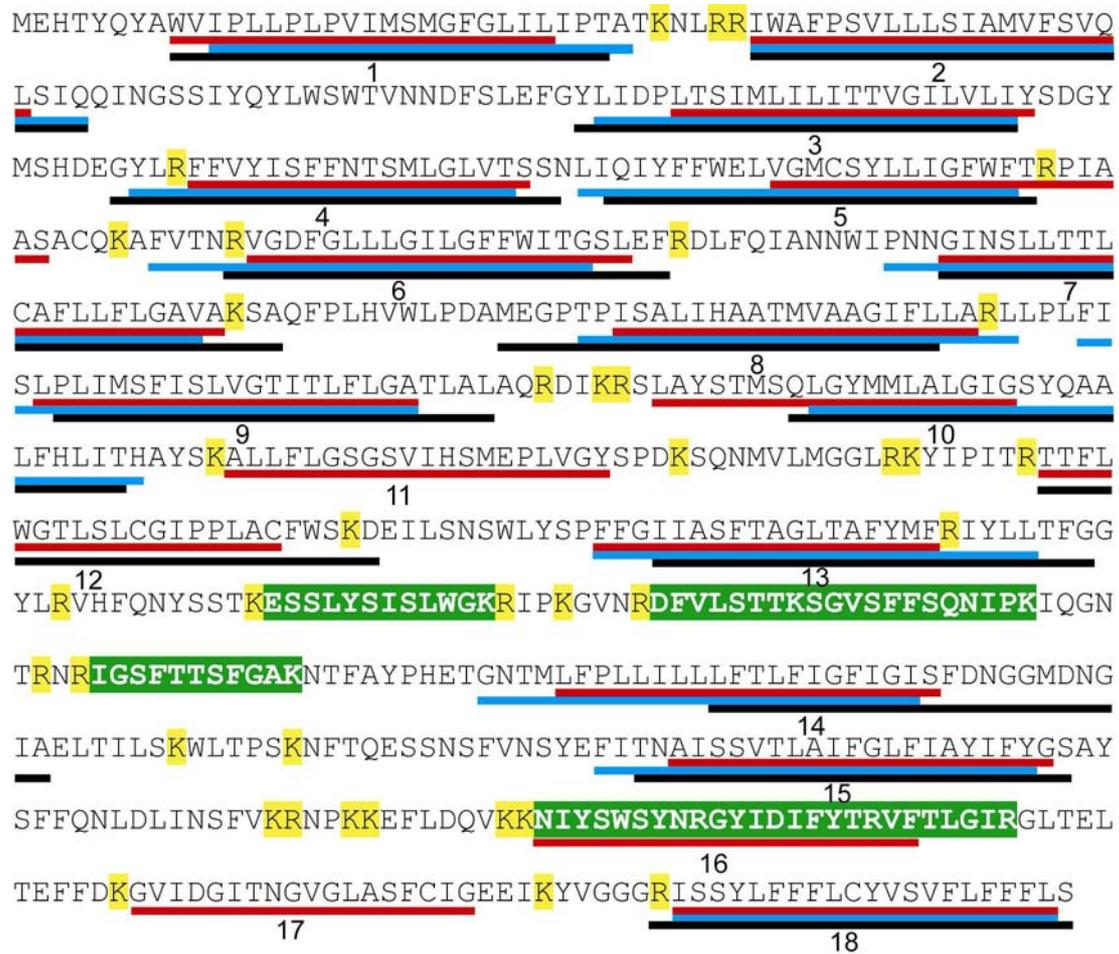
**Abb. 14 Einfluss von Peptidgröße und Hydrophobizität auf die Detektierbarkeit mittels MS**

Die Anzahl von Aminosäuren (AS) wurde gegen die Hydrophobizität nach Kyte & Doolittle aufgetragen (Kyte et al., 1982). A stellt die Gruppe von tryptischen Peptiden der Untereinheiten NdhB, F, H, I, J, K, M, N dar, welche massenspektrometrisch detektiert werden konnten. A\* zeigt die Verteilung dieser Peptide bezüglich ihrer Hydrophobizität. B stellt die Gruppe aller tryptischer Peptide der nicht detektierten Untereinheiten NdhA, C, D, E, G dar und entsprechend wird die Verteilung dieser Peptide bezüglich ihrer Hydrophobizität angegeben (B\*).

Durch den Vergleich der Gruppe der detektierten Peptide der Untereinheiten NdhB, F, H, I, J, K, M, N (vgl. Tab. 7) mit allen theoretischen tryptischen Peptiden der nicht detektierten Untereinheiten NdhA, C, D, E, G wurde deutlich, dass ein signifikanter Unterschied bezüglich der Hydrophobizität und der Peptidgröße zwischen diesen beiden Gruppen von Peptiden vorlag. Die Mehrzahl der Peptide der nicht detektierten Untereinheiten wies sowohl eine Größe, als auch eine Hydrophobizität auf, die deutlich außerhalb des Bereichs lag, der für detektierte Peptide typisch war. Diese Beobachtung legte ebenfalls die Vermutung nahe, dass membranintegrale Proteine, falls sie überhaupt massenspektrometrisch detektiert werden, nur durch Peptide aus löslichen Domänen nachgewiesen werden können.

Für NdhF mit einer Hydrophobizität von 0,565 gelang der massenspektrometrische Nachweis von 7 Peptiden mit einer durchschnittlichen Hydrophobizität von 0,059. Durch Anwendung verschiedener Computerprogramme zur Vorhersage von  $\alpha$ -helikalen TMDs konnten je nach Programm 14 bis 18 TMDs identifiziert werden. Dadurch war eine Überprüfung der Hypothese möglich, inwieweit tatsächlich ausschließlich lösliche Domänen von

membranintegralen Proteinen massenspektrometrisch identifiziert werden, oder ob auch membranintegrale Sequenzabschnitte detektiert werden können (Abb. 15).



**Abb. 15 Lage identifizierter Peptide und Transmembrandomänen bei NdhF**

Massenspektrometrisch identifizierte Peptide wurden grün hinterlegt. Weitere potentielle Schnittstellen für Trypsin wurden gelb hervorgehoben. Vorhergesagte Transmembrandomänen wurden farbig unterstrichen und nummeriert. Rot markierte Transmembrandomänen wurden mittels HMMTOP 2.0 (Tusnady et al., 2001) bestimmt, blau markierte mittels TMHMM 2.0 (Krogh et al., 2001) und schwarz markierte mittels SOSUI 1.11 (Hirokawa et al., 1998).

Insgesamt wurden für NdhF 14 TMDs übereinstimmend mit allen drei Programmen vorhergesagt (Abb. 15). Es fiel auf, dass die einzelnen TMDs nicht von allen Programmen für die exakt gleichen Sequenzabschnitte prognostiziert wurden. Die Überlappung der Sequenzabschnitte der TMDs, die mit allen drei Programmen ermittelt wurden, lag bei mindestens 35%. Die TMD 12 wurde nur durch zwei Programme vorhergesagt und die Prognose der TMDs 11, 16 und 17 erfolgte nur durch das Programm HMMTOP 2.0. Bei genauer Betrachtung der Lage der identifizierten Peptide fiel auf, dass sich innerhalb der vorhergesagten TMD 16 zwei Arg befanden und es erfolgte die massenspektrometrische

Identifikation der drei Peptide, die diese putative TMD vollständig abdeckten. Die anderen vier identifizierten Peptide befanden sich in dem Bereich zwischen TMD 13 und 14 und gehörten keinem membranintegralen Abschnitt an. Auffällig war die Lage der Aminosäuren Arg und Lys, welche in erster Linie zwischen den TMDs lagen. Diese Häufung führte zu vielen sehr kurzen Peptiden mit maximal fünf AS, welche massenspektrometrisch kaum detektiert werden konnten. So fanden sich in NdhF 12 Peptide mit einer Länge von 1 bis 5 AS, die zwischen TMDs lagen. Gleichzeitig wiesen TMDs in der Regel keine tryptischen Schnittstellen auf und es resultierten sehr große Peptide mit einer Länge von mehr als 20 AS. Ob es sich bei TMD 16 tatsächlich um einen membranintegralen  $\alpha$ -helikalen Abschnitt handelt war somit fragwürdig, da dieser gleich zwei Arg enthielt und zudem nur durch ein Programm prognostiziert wurde. Aus dieser Verteilung der Schnittstellen resultierten folglich relativ wenige für eine massenspektrometrische Identifikation günstige potentielle Peptide, die eine Länge von 6 bis 20 AS aufwiesen.

Die Identifikation der membranintegralen Untereinheit NdhB gelang durch den Nachweis von nur einem Peptid. Dieses Peptid befand sich in einem kurzen löslichen Bereich von ca. 30 AS zwischen der 13. und 14. TMD (bestimmt mit TMHMM 2.0 und HMMTOP 2.0) am C-terminalen Ende und war mit einem GRAVY-Wert von -1,1 im Vergleich zur Hydrophobizität des ganzen Proteins von 0,716 überaus hydrophil.

Diese Analyse der relativen Lage detektierter Peptide zu TMDs lieferte einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Identifikation von membranintegralen Proteinen tatsächlich über lösliche Domänen erfolgte. Eine Erklärung dafür könnte auch die Lage der tryptischen Schnittstellen sein, denn Arg und Lys befanden sich in erster Linie zwischen den TMDs. Sequenzabschnitte mit TMDs enthielten oft weder ein Arg noch ein Lys, wodurch sehr große Peptide entstanden, die massenspektrometrisch nicht mehr detektiert werden konnten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde sowohl für die Gruppe der membranintegralen Proteine des NDH-Komplexes (NdhA, B, C, D, E, F, G, L), als auch für die membranassoziierten Untereinheiten (NdhH, I, J, K, M, N, O) die Anzahl an AS bestimmt, die sich innerhalb von potentiellen tryptischen Peptiden mit einer Sequenzlänge von 6 bis 20 AS befinden (Tab. 8). Dadurch konnte eine theoretisch zu erreichende maximale Sequenzabdeckung bestimmt werden. Im Vergleich dazu wurde auch die tatsächlich erreichte Sequenzabdeckung für diese Proteine ermittelt. Insgesamt ergab sich für die Gruppe der membranintegralen Untereinheiten eine theoretisch mögliche Sequenzabdeckung von 18,9% und tatsächlich erreicht wurden nur 2,91%. Für die Gruppe der membranassoziierten Untereinheiten ergab sich eine theoretisch mögliche Sequenzabdeckung von 60,5%, wobei durch die massenspektrometrische Analyse

eine Sequenzabdeckung von 31,1% erreicht wurde. Dieses Ergebnis zeigte zum einen, dass bei den löslichen, membranassoziierten Untereinheiten ein deutlich größerer Sequenzanteil theoretisch massenspektrometrisch zugänglich ist. Zum anderen wurde bei dieser Gruppe von Proteinen auch ca. die Hälfte der theoretisch möglichen Sequenzabdeckung tatsächlich erreicht, wohingegen bei den membranintegralen Proteinen nur etwas weniger als ein Sechstel der theoretisch möglichen Sequenzabdeckung erreicht werden konnte. Folglich wiesen lösliche Proteine zwar eine deutlich höhere Anzahl an theoretisch detektierbaren Peptiden auf, aber dieser Sachverhalt reichte nicht als einzige Erklärung für die geringe Detektierbarkeit von membranintegralen Proteinen aus.

### **3.4. Identifikation weiterer Proteine im Bereich des NDH-Komplexes**

In den vorangegangenen Kapiteln 3.1 und 3.2 erfolgte eine Beschreibung der Untereinheiten, die eindeutig dem NDH-Komplex zugeordnet werden konnten. Neben diesen Proteinen konnten in dem entsprechenden Bereich des BN-PAGs noch weitere Proteine identifiziert werden. Zum einen handelte es sich dabei um Proteine, die Komplexen mit etwas geringerem Molekulargewicht zugeordnet werden konnten und lediglich als Verunreinigung im Bereich des NDH-Komplexes auftraten. Dies waren PORA und PORB, je zwei Untereinheiten des ATPase-Komplexes Atp  $\alpha$  und Atp  $\beta$  und des Rubisco-Komplexes RbcL und RbcS, sowie zwei 30S ribosomale Proteine S4 und S7. Neben diesen bekannten Untereinheiten anderer Komplexe konnten aber noch weitere Proteine identifiziert werden, die nur im Bereich des NDH-Komplexes nachzuweisen waren und nicht in Bereichen oberhalb und unterhalb dieses Komplexes. Dies waren zwei Untereinheiten des RUB-Komplexes Rub  $\alpha$  und Rub  $\beta$ , sowie zwei weitere Chaperone, Ycf4 und eine Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase. Darüber hinaus gelang die Identifikation von Proteinen aus der Gruppe der OEC-Proteine. Es handelte sich dabei um ein PsbP ähnliches Protein (*PsbP like protein*, PPL) und um mindestens ein PsbQ ähnliches Protein. In einer aktuellen Veröffentlichung wurde die mögliche Zugehörigkeit dieser Proteine der PsbP- und PsbQ-Familie zum NDH-Komplex bereits teilweise gezeigt (Ishihara et al., 2007).

#### **3.4.1. Identifikation eines Proteins der PsbP-Familie**

In der konzentrierenden 2. Dimension gelang die Identifikation von vier Peptiden eines Proteins mit einem geschätzten Molekulargewicht von ca. 21 kDa. Diesen Peptiden konnte

das Protein PPL2 (*PsbP-like protein 2*) zugeordnet werden (Abb. 16), welches von Ishihara *et al.* als ein Protein der PsbP-Familie beschrieben wurde, das eine bislang unbekannte Untereinheit des NDH-Komplexes in Chloroplasten aus *A. thaliana* darstellt (Ishihara *et al.*, 2007).

H. vu. C	-----
PsbPW	<b>MASTSCFLHQSTARLAASARPAPAVG</b> ----- <b>RTQLFVCKAQKNDDEAASDAAVVTSRR</b>
PsbP1	MAYSACFLHQALASSAARSSSSSSSS--QRHVSLSKPVQIICKAQQSHE---DDNSAVSRR
PPL1	MASLKLSP-----SSPISISKVGVIP---SSKKGLSFLVKAEEHSSSSSSSHLQDKC <b>QRR</b> L
PPL2	MAVSSLSIRCGGFSPTISHKTEILCP---NPSLKACCLLSSGGKADSSESTYQKGSNNW
H. vu. E	-----
H. vu. C	----- <b>AYGEAANVFGK</b> --- <b>NTDFVAYS GEGFK</b> -----
PsbPW	<b>AALSLLAGAAAIAVKVSPAA</b> - <b>AAYGEAANVFGK</b> AKK <b>NTDFVAYS GEGFK</b> LMIPAKWNPSK
PsbP1	LALTLVGA AVGSKVSPAD-AAYGEAANVFGKPK <b>TNTDFLPYNGD GFK</b> VQVPAKWNPSK
PPL1	IVTFGVVAP--WISLLSRAP----LSFA---AESKKGFLAVSDNKDAYAFLYPFGWQ---
PPL2	<b>KRR</b> QALVGVGTLVATSIPAT---- <b>LLLA</b> --- <b>EEIPKSYSPFVDREDG</b> Y <b>SY</b> YPSDWR---
H. vu. E	-----
H. vu. C	-- <b>EFPGQVLR</b> -----
PsbPW	ER <b>EFPGQVLR</b> YEDNFDATS <b>NL</b> SV <b>I</b> IN <b>PT</b> TK <b>KT</b> ITDYGSPEEF <b>LSQVGFLLGQ</b> SYGGKTD
PsbP1	E <b>IEY</b> PG <b>QVLR</b> FEDNFDATS <b>NL</b> N <b>VM</b> VT <b>PT</b> D <b>KK</b> SITDYGSPEEF <b>LSQV</b> NYLLG <b>KQAY</b> FGETA
PPL1	EVVIEGQDKVYKDVIEPLE <b>SV</b> SV <b>N</b> LV <b>PT</b> SK <b>Q</b> TIKEFGPPK----QIAETLIKKVLA---P
PPL2	EF <b>D</b> FRAHDSAFKDRYL <b>QLQ</b> N <b>V</b> RV <b>R</b> FI <b>P</b> TE <b>K</b> NDIHEVGPME----EVVYDLVKHKFA---A
H. vu. E	----- <b>NVQLQSVRVAFIPTQK</b> -----
H. vu. C	----- <b>VLESSAPVVDGKQYYSITVLR</b> ----- <b>HQLITATVADGK</b> -----
PsbPW	SEGGFESDAVATAN <b>VLESSAPVVDGKQYYSITVLR</b> TADGDEGG <b>KHQLITATVADGKLY</b> V
PsbP1	SEGGFDNNAVATAN <b>ILESSQ</b> EVG <b>GKPY</b> YLS <b>VL</b> TRTADGDEGG <b>KHQLITATVNGKLY</b> I
PPL1	PNQ--KT-----TLIDASEHDVDG <b>KTY</b> Y <b>Q</b> FEFTVQARNYT---RH <b>ALG</b> TI <b>TV</b> F <b>NG</b> NYT
PPL2	PNQ--VA-----TIYDMKER <b>VEDGKN</b> Y <b>Y</b> TFEYGL <b>R</b> TP <b>I</b> YA---TTSF <b>ATVAVGN</b> NR <b>Y</b> YT
H. vu. E	----- <b>YYT</b> -----
H. vu. C	-----
PsbPW	CKAQR-DKRWFKGAKKFVENA <b>AGS</b> FSVA--
PsbP1	CKA <b>Q</b> AGDKRWFKGARKF <b>VESA</b> AT <b>S</b> FSVA--
PPL1	<b>LTTGAN</b> ERRWEK-MKDRLHT <b>VVDS</b> FKITV-
PPL2	<b>LIVGAN</b> ERRWRK-VKK <b>QLQV</b> VADSLKILQI
H. vu. E	<b>LIVTANER</b> ----- <b>LQVVAD</b> SFK-----

**Abb. 16 Sequenzalignment identifizierter Peptide aus Gerste mit Proteinen der PsbP-Familie**

Es erfolgte ein Alignment identifizierter Peptid-Sequenzen aus der NDH-Komplexbande von Etioplasten der Gerste (H.vu.E), sowie von Peptidsequenzen von PsbP aus Chloroplasten der Gerste (H.vu.C) nach Granvogl *et al.* (Granvogl *et al.*, 2006). Das Alignment wurde durchgeführt zu PsbP aus *Triticum aestivum* (PsbPW) (Q00434), PsbP1 aus *A. thaliana* (PsbP1) (Q42029), PPL1 aus *A. thaliana* (P82538) und PPL2 aus *A. thaliana* (O80634). Farblich hervorgehoben sind jeweils übereinstimmende AS mit den identifizierten Aminosäuresequenzen der Peptide aus Gerste. Das Alignment erfolgte mit dem Programm CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Der Bereich der Transitsequenzen ist bei PsbPW durch Fettdruck markiert, ebenso wie die AS Arg, die Twin Arginin Motive darstellen.

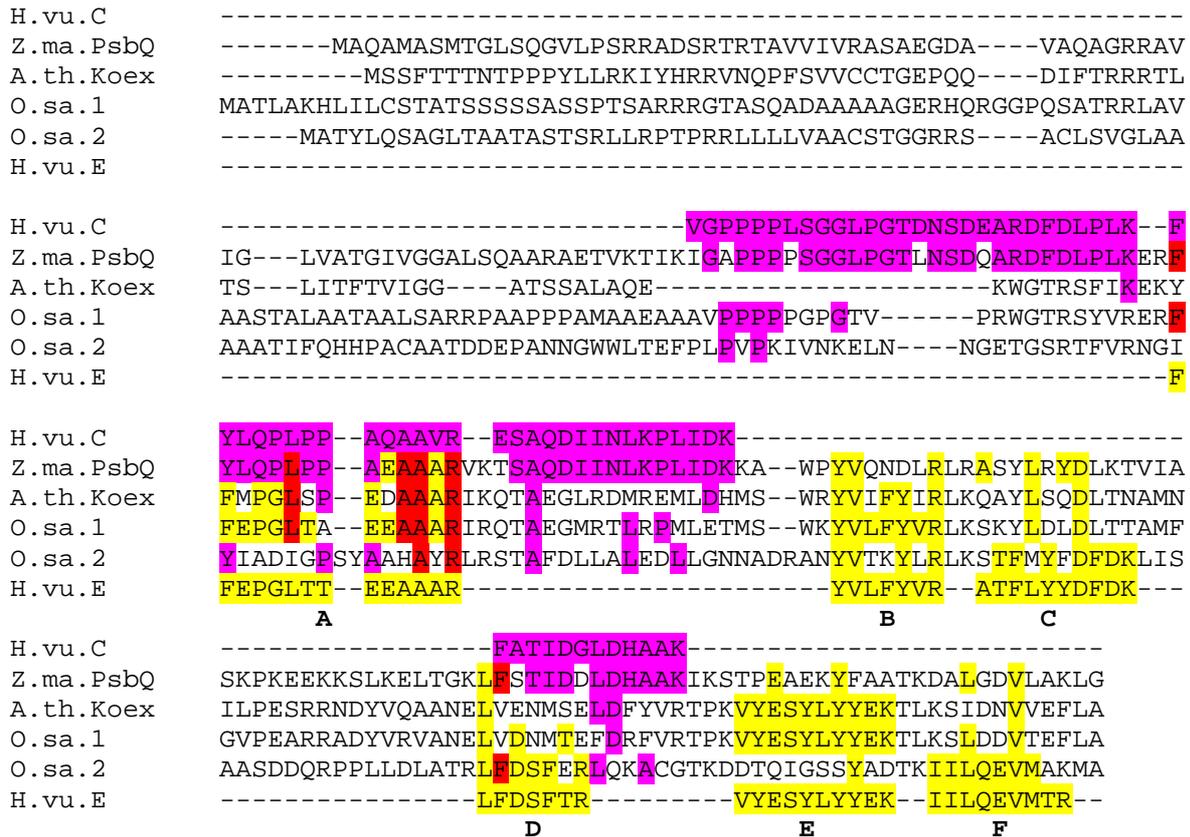
In Chloroplasten der Gerste konnte bereits das Protein PsbP des OEC-Komplexes nachgewiesen werden (Granvogl *et al.*, 2006). Die hierbei identifizierten Peptide zeigten zu 100% eine Sequenzübereinstimmung mit PsbP aus *T. aestivum* und zu 75,8% zu PsbP1 aus *A.*

*thaliana*. Zu PPL2 aus *A. thaliana* bestand nur zu 18,2% eine Sequenzübereinstimmung der identifizierten Peptide. Insgesamt wiesen PsbP aus *T. aestivum* und PPL2 17,3% identische AS auf. Im Gegensatz dazu wiesen die Peptide des Proteins aus der NDH-Komplexbande des Etioplasten aus Gerste zu 80,6% identische AS mit den entsprechenden Sequenzbereichen in PPL2 aus *A. thaliana* auf. Ein weiteres PsbP ähnliches Protein aus *A. thaliana* PPL1, wies eine Sequenzübereinstimmung von 52,8% auf. Zu PsbP aus *T. aestivum* bestand eine Sequenzübereinstimmung von nur 22,2%. Dieses Resultat zeigte eindeutig, dass im NDH-Komplex des Etioplasten aus Gerste ausschließlich PPL2 vorlag, wohingegen in Chloroplasten PsbP nachgewiesen werden konnte, welche als Untereinheit des OEC-Komplexes von PSII fungiert.

Die Bestimmung des Molekulargewichts anhand eines Größenstandards im SDS-PAG ergab für PsbP einen Wert von ca. 21 kDa, welcher nahe an dem theoretisch berechneten Wert von 20,0 kDa lag. Dieser Wert basierte auf dem experimentell ermittelten N-Terminus nach Schubert *et al.* (Schubert *et al.*, 2002), welcher durch Granvogl *et al.* bestätigt werden konnte (Granvogl *et al.*, 2006). PsbP besitzt zwei Transitpeptide, eines für den Import in das Stroma der Plastide und ein weiteres für den Import in das Lumen. Die theoretische Vorhersage der Länge der gesamten Transitsequenz mittels ChloroP führte für dieses Protein nur zu einer Transitsequenz von 34 AS, im Gegensatz zu den experimentell ermittelten 73 AS, weshalb für die anderen Proteine keine Vorhersage mittels ChloroP getroffen wurde. Alle oben genannten Proteine wiesen aber zwei konservierte Arg auf, welche ein Twin Arginin Motiv darstellen, das für den Import in das Lumen durch den TAT-Importweg nötig ist. Für PPL2 in Gerste wurde ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa ermittelt, was dem Molekulargewicht von PsbP entspricht. Dies lässt auch bei PPL2 auf eine zweifache Prozessierung in Etioplasten schließen.

### **3.4.2. Identifikation von Proteinen der PsbQ-Familie**

Neben der Identifikation des PsbP-ähnlichen Proteins PPL2 gelang im Bereich der NDH-Komplexbande auch die Identifikation von sechs Peptiden, die PsbQ-ähnlichen Proteinen zugeordnet werden konnten (Abb. 17). Ishihara *et al.* konnten in einer Koexpressionsstudie zeigen, dass es in *A. thaliana* zu einer Koexpression eines PsbQ-ähnlichen Proteins mit PPL2 kommt (Ishihara *et al.*, 2007), weshalb es sich bei diesem Protein um eine weitere Untereinheit des NDH-Komplexes handeln könnte.



**Abb. 17 Sequenzalignment identifizierter Peptide aus Gerste mit Proteinen der PsbQ-Familie**

Es erfolgte ein Alignment identifizierter Peptid-Sequenzen aus der NDH-Komplexbande von Etioplasten der Gerste (H.vu.E), sowie von Peptidsequenzen von PsbQ aus Chloroplasten der Gerste (H.vu.C) nach Granvogel *et al.* (Granvogel *et al.*, 2006). Das Alignment wurde durchgeführt zu PsbQ aus *Zea mays* (Z.ma.PsbQ) (Q41048), dem PsbQ-ähnlichem Protein aus *A. thaliana*, welches mit PPL2 koexprimiert wird (A.th.Koex) (Q9XI73) (Ishihara *et al.*, 2007), sowie zwei PsbQ-ähnlichen Proteinen aus *O. sativa* (O.sa.1, Q6EP57 und O.sa.2, Q8L472), welche mittels FASTA3 als die Proteine identifiziert werden konnten, welche die höchste Sequenzübereinstimmung mit den gefundenen Peptiden aus dem NDH-Komplex aus Gerste aufweisen. Farblich hervorgehoben sind jeweils übereinstimmende AS mit den identifizierten Aminosäuresequenzen der Peptide aus Gerste, wobei rosa markierte AS ausschließlich mit den Sequenzen von PsbQ aus Chloroplasten übereinstimmen und gelb markierte ausschließlich mit den Sequenzen aus Etioplasten. Bei rot markierten AS liegt bei homologen Sequenzabschnitten eine Sequenzidentität zwischen den Peptiden aus Etio- und Chloroplasten vor. Identifizierte Peptide aus Etioplasten sind mit A – F nummeriert. Das Alignment erfolgte mit dem Programm CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994).

In Chloroplasten der Gerste konnte PsbQ mit fünf Peptiden identifiziert werden, wobei mit PsbQ aus *Zea mays* (Q41048) eine Sequenzübereinstimmung von 85,5% vorlag (Granvogel *et al.*, 2006). In Etioplasten der Gerste gelang im Bereich des NDH-Komplexes die Sequenzierung von insgesamt sechs Peptiden, die mittels einer Datenbankanalyse durch FASTA3 Proteinen aus der PsbQ-Familie zugeordnet werden konnten. Zu PsbQ aus Mais lag jedoch nur eine Sequenzübereinstimmung von 35,1% vor. Darüber hinaus konnten die zwei Peptide A und D identifiziert werden, die homolog zu ebenfalls identifizierten Peptiden von PsbQ aus Gerste waren, aber deutliche Sequenzunterschiede aufwiesen. Ein Vergleich der ermittelten Sequenzen mit Einträgen in den Datenbanken SwissProt/TrEMBL führte zu zwei

Proteinen der PsbQ-Familie aus *O. sativa* (O.sa.1, Q6EP57; O.sa.2, Q8L472). Dabei lag die Sequenzübereinstimmung zu O.sa.1 bei 64,9% und zu O.sa.2 bei 52,6%. Auffällig waren dabei signifikante Unterschiede bezüglich der Sequenzhomologien einzelner Peptide. Die Peptide A, B und E wiesen zu O.sa.1 96,8% Sequenzübereinstimmung auf, wohingegen die Peptide C, D und F nur 26,9% Übereinstimmung zeigten. Im Gegensatz dazu wiesen die Peptide A, B und E nur 22,6% Sequenzübereinstimmung zu O.sa.2 auf, wohingegen die Peptide C, D und F 76,9% identische AS mit O.sa.2 besaßen. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass möglicherweise zwei unterschiedliche Proteine der PsbQ-Familie vorlagen. Identifiziert wurden die Peptide in einer einzigen Bande in der konzentrierenden zweiten Dimension bei einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa (vgl. Abb. 18). Sollten es zwei unterschiedliche Proteine sein müssten diese ein identisches Molekulargewicht aufweisen. Insgesamt betrachtet zeigten diese Daten, dass es sich bei dem oder den beiden Proteinen aus dem NDH-Komplex der Gerste nicht um PsbQ aus dem OEC-Komplex des Chloroplasten handelte, sondern um ein oder zwei andere Proteine der PsbQ-Familie.

In einer Koexpressionsstudie konnten Ishihara *et al.* zeigen, dass zusammen mit PPL2 auch ein Protein der PsbQ-Familie (Q9XI73) in *A. thaliana* exprimiert wird (Ishihara *et al.*, 2007). Bezüglich dieses Proteins konnte eine Sequenzübereinstimmung von 49,1% mit den Peptiden aus Etioplasten festgestellt werden, wohingegen die identifizierten Peptide von PsbQ aus Chloroplasten nur eine Übereinstimmung von 14,5% zeigten.

### 3.4.3. Weitere Proteine im Bereich des NDH-Komplexes

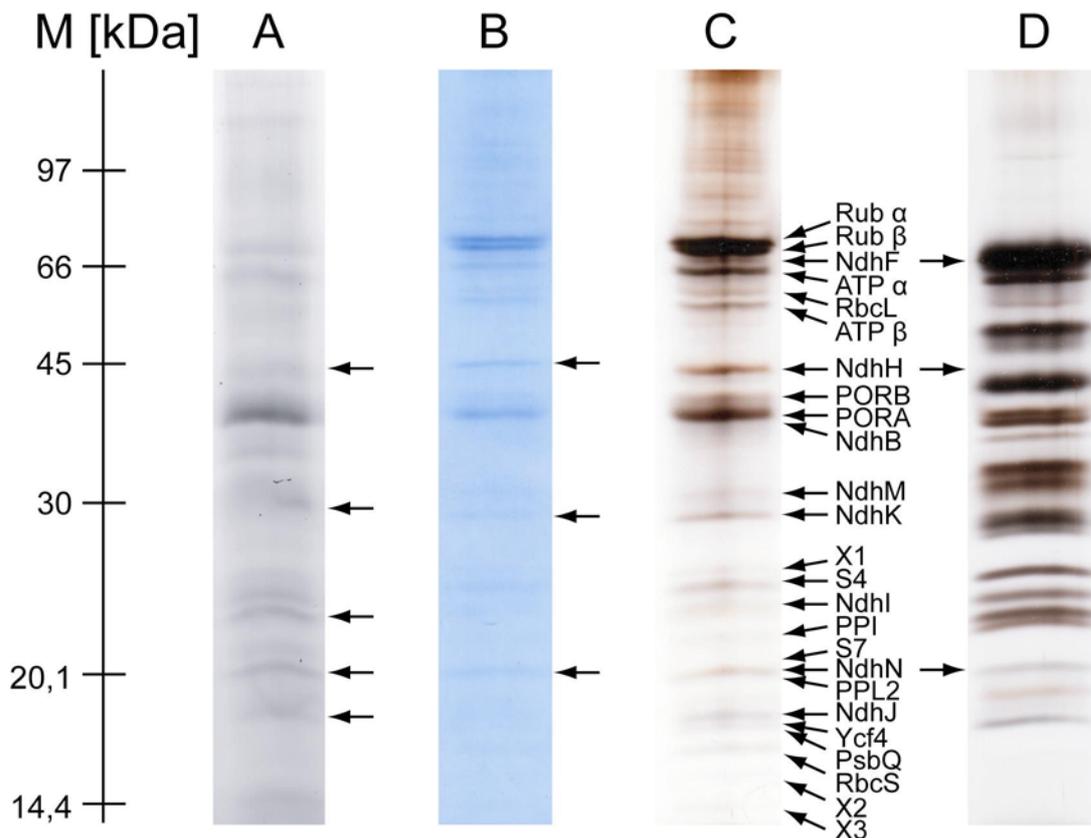
Ausschließlich im Bereich des NDH-Komplexes fanden sich zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa, welche relativ zu allen anderen Proteinen in der 2. Dimension die intensivste Färbung mit Coomassie und Silber aufwiesen. Dabei handelte es sich um die zwei kernkodierte Untereinheiten des RUB-Komplexes Rub  $\alpha$  (P08823) und Rub  $\beta$  (Q43831), welche einen höhermolekularen oligomeren Komplex bilden. Von Rub  $\alpha$  konnten 12 Peptide identifiziert werden und es wurde eine Sequenzabdeckung von 28,0% erreicht, von Rub  $\beta$  gelang der Nachweis von 14 Peptiden, wodurch eine Sequenzabdeckung von 49,9% erreicht wurde. Diese beiden Untereinheiten des RUB-Komplexes konnten auch in Chloroplasten nachgewiesen werden, wobei der Komplex ein identisches Molekulargewicht in der BN-PAGE aufwies. Jedoch war die Konzentration deutlich niedriger, da die Signalintensität der einzelnen Peptide in LC-MS-Spektren signifikant niedriger war, als bei entsprechenden Messungen aus Etioplasten.

Neben diesen beiden relativ großen Proteinen konnten noch zwei weitere Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht identifiziert werden, die ebenfalls ausschließlich im Bereich des NDH-Komplexes nachgewiesen werden konnten. Zum einen handelte es sich bei einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa um eine Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (Q6XPZ6), welche zu der Gruppe der Cyclophiline gehört und kernkodiert ist. Es gelang die Identifikation von 5 Peptiden und es wurde eine Sequenzabdeckung von 26,9% erreicht. Zum anderen konnte bei einem Molekulargewicht von ca. 18 kDa das Protein Ycf4 (P20454) mit 2 Peptiden und einer Sequenzabdeckung von 9,7% identifiziert werden. Dieses Protein ist im Gegensatz zu den drei zuvor genannten Proteinen plastidär kodiert und weist als einziges zwei TMDs auf. Die Konzentration dieser Proteine war in Etioplasten sehr niedrig und eine Visualisierung der Banden gelang nur mittels Silberfärbung der konzentrierenden 2. Dimension. In Chloroplasten konnten diese beiden Proteine nicht nachgewiesen werden.

### **3.5. Auftrennung des NDH-Komplexes in die Untereinheiten**

Wurden solubilisierete Membranproteinkomplexe aus den inneren Membranen von  $2 \times 10^8$  Etioplasten mittels BN-PAGE als erste Dimension aufgetrennt und die Untereinheiten der Komplexe mittels SDS-PAGE als zweite Dimension isoliert, konnten auch mittels Silberfärbung keine weiteren Untereinheiten im Bereich des RUB-Komplexes identifiziert werden. Mittels LC-MS gelang jedoch die Identifikation mehrerer Peptide, die zu Untereinheiten des NDH-Komplexes gezählt werden, direkt aus der ersten Dimension. Ziel war es deshalb diese Untereinheiten anzureichern und mittels SDS-PAGE als zweite Dimension sichtbar zu machen. Dazu wurde aus insgesamt fünf ersten Dimensionen die entsprechende Bande zwischen 740 und 760 kDa ausgeschnitten und nach Solubilisierung mit SDS übereinander gestapelt auf die zweite Dimension aufgetragen. Um eine möglichst hohe Sensitivität bei der Detektion von Proteinbanden zu erreichen wurden mehrere möglichst sensitive Färbemethoden im Vergleich angewendet. Einzelne Spuren wurden mit Silber oder alternativ mit colloidalem Coomassie gefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Markierung der Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 vor der Solubilisierung der Membranproteinkomplexe, mit anschließender Detektion der Banden durch einen Laserscanner. Dadurch war es möglich zahlreiche bislang unbekannte Proteinbanden in der zweiten Dimension zu detektieren (Abb. 18 A, B, C). Die Identifikation der Proteine erfolgte mittels In-Gel-Verdau und LC-MS.

In Chloroplasten gestaltete sich der Nachweis von Untereinheiten des NDH-Komplexes noch schwieriger, da die Konzentration des Komplexes deutlich niedriger als in Etioplasten war und zudem in diesem Molekularmassenbereich auch Superkomplexe aus PSI und PSII auftraten. Trotzdem gelang mittels der konzentrierenden 2. Dimension der massenspektrometrische Nachweis dreier Untereinheiten des NDH-Komplexes (Abb. 18 D).



**Abb. 18 2. Dimension der Bande des NDH-Komplexes aus Etioplasten und Chloroplasten**

Die Auftrennung in die einzelnen Untereinheiten des NDH- und RUB-Komplexes erfolgte mittels SDS-PAGE als zweite Dimension. Pro Spur wurden jeweils fünf Banden der entsprechenden Komplexe mit einer Breite von ca. 5 mm aus der 1. Dimension ausgeschnitten und gestapelt auf die zweite Dimension aufgetragen. Bei Etioplasten erfolgte vor der elektrophoretischen Auftrennung die Markierung der Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3. Die Detektion der Banden erfolgte durch drei verschiedene Verfahren: Fluoreszenzdetektion mittels Laserscanner nach Anregung bei 532 nm (A); colloidale Coomassie-Färbung (B); Silberfärbung (C). Bei Chloroplasten erfolgte die Visualisierung der Banden ausschließlich durch Silberfärbung (D).

Mittels Silberfärbung konnten in Etioplasten neben Banden von NdhB, F, H, I, J, K, M, N auch Banden von zwei Proteinen aus der Gruppe der OEC-Proteine PPL2 und ein PsbQ-ähnliches Protein, detektiert werden (C). Darüber hinaus gelang der Nachweis einer Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPI) und von Ycf4. Konnten Banden dieser Proteine auch mittels Fluoreszenz (A) oder colloidalen Coomassie-Färbung (B) detektiert werden, erfolgte die Markierung durch einen Pfeil. Weitere identifizierte Proteine konnten folgenden Komplexen zugeordnet werden: RUB-Komplex (Rub  $\alpha$ ,  $\beta$ ); ATPase-Komplex (ATP  $\alpha$ ,  $\beta$ ); Rubisco (RbcL, S); POR (PORA, B), sowie zwei 30S ribosomale Proteine S4 und S7. Schwach erkennbare, aber massenspektrometrisch nicht identifizierbare Banden wurden mit X1, X2 und X3 bezeichnet. In Chloroplasten wurden durch Pfeile die Bereiche markiert, wo massenspektrometrisch der Nachweis der Untereinheiten NdhF, H, N gelang.

Als sensitivste Färbemethode erwies sich die Silberfärbung. In Etioplasten war es möglich alle durch MS identifizierten Proteine einer gefärbten Bande im Gel zuzuweisen (Abb. 18). Dabei handelte es sich um acht Untereinheiten die eindeutig dem NDH-Komplex zugeordnet werden konnten (NdhB, F, H, I, J, K, M, N), sowie um zwei Proteine aus der Gruppe der OEC-Proteine, PPL2 und ein PsbQ-ähnliches Protein, ferner eine Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase und Ycf4. Des weitern konnten POR A und POR B, sowie je zwei Untereinheiten des ATPase-Komplexes (ATP  $\alpha$ ,  $\beta$ ), der Rubisco (RbcL, S) und des RUB-Komplexes (Rub  $\alpha$ ,  $\beta$ ) identifiziert werden. Darüber hinaus fanden sich auch zwei 30S ribosomale Proteine S4 und S7 (Q95H61; P62733). Sowohl der ATPase-Komplex, als auch die Rubisco und die POR fanden sich in der BN-PAGE in ihrem Konzentrationsmaximum in deutlich niedrigeren Molekularmassenbereichen, weshalb diese Untereinheiten hier nur als Verunreinigung vorlagen. Drei schwach gefärbte Banden der Silberfärbung (X1, X2, X3) bei einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa, 15 kDa und 14 kDa konnten massenspektrometrisch nicht identifiziert werden. Mittels Fluoreszenzdetektion konnten fünf Banden von Untereinheiten des NDH-Komplexes identifiziert werden, dies waren NdhH, I, J, K, N (Abb. 18 A). Auffällig war bei dieser Methode, dass die Doppelbande von Rub  $\alpha$ ,  $\beta$  nur eine sehr geringe Intensität aufwies. Im Gegensatz dazu war diese Doppelbande in der Silber- und colloidalen Coomassiefärbung jeweils am intensivsten gefärbt. Die geringste Sensitivität wurde mittels colloidalen Coomassie-Färbung erreicht. Hierbei konnten nur drei Banden von Untereinheiten des NDH-Komplexes visualisiert werden, nämlich NdhH, K, N (Abb. 18 B).

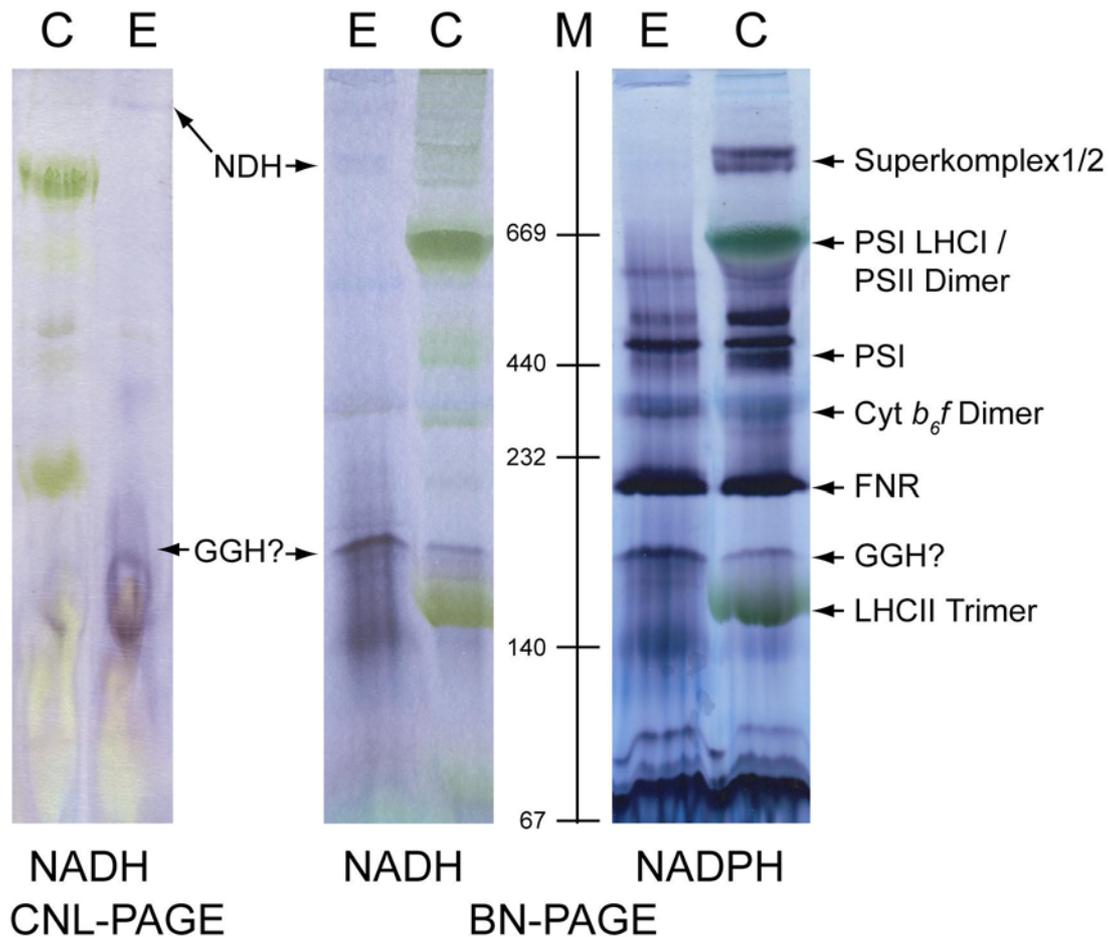
Mittels Molekularmassenstandard erfolgte eine Abschätzung der Größe der identifizierten Untereinheiten des NDH-Komplexes. Eine sehr gute Übereinstimmung des experimentell ermittelten Wertes mit dem theoretisch berechneten Wert auf Grundlage der Sequenzinformation aus dem Datenbankeintrag ergab sich für die vier membranassoziierten Untereinheiten NdhH, I, J, K. Für NdhH wurden 45 kDa bestimmt, welche sehr gut mit dem berechneten Wert von 45,6 kDa übereinstimmten. Für NdhI wurden 23 kDa ermittelt (berechnet 21,0 kDa), für NdhJ 18 kDa (berechnet 18,7 kDa) und für NdhK 28 kDa (berechnet 27,5 kDa). Im Gegensatz dazu wich das experimentell ermittelte Molekulargewicht der beiden identifizierten membranintegralen Untereinheiten NdhB, F signifikant von den theoretisch zu erwartenden Werten ab. Für NdhB wurde ein Molekulargewicht von 37 kDa ermittelt, wohingegen sich aus der Sequenz des Datenbankeintrages ein Molekulargewicht von 57,0 kDa ergab. Ebenso wurde für NdhF ein Molekulargewicht von 66 kDa ermittelt, welches deutlich niedriger war, als es laut Datenbankeintrag mit 82,9 kDa sein sollte. Die Molekularmassenbestimmung für die

kernkodierten Untereinheiten ergab für NdhM einen Wert von 30 kDa und für NdhN einen Wert von 20 kDa. Da für diese beiden Untereinheiten keine Sequenzinformationen von Gerste aus Datenbanken vorlagen und zudem eine Prozessierung während des Imports stattfindet, konnte nur ein grober Vergleich mit den Sequenzen von *O. sativa* gemacht werden. Auf Basis der mittels ChloroP ermittelten Prozessierungsstelle ergibt sich für NdhM ein Wert von 21,4 kDa und von NdhN von 20,2 kDa (vgl. Kap. 3.2).

In Chloroplasten gestaltete sich der Nachweis einzelner Untereinheiten des NDH-Komplexes deutlich schwieriger, da die Konzentration deutlich niedriger war, als in Etioplasten. Eine Visualisierung einzelner Banden war auch mittels Silberfärbung nicht möglich, da zudem zahlreiche Banden von Proteinen der Superkomplexe aus PSI und PSII, sowie LHCI/II die Banden des NDH-Komplexes überlagerten. Somit gelang massenspektrometrisch nur der Nachweis von NdhF, H, N. Im Bereich von NdhF waren PsaA und PsaB die dominierenden, überlagernden Proteine, wobei die beiden Untereinheiten Rub  $\alpha$ ,  $\beta$  des RUB-Komplexes ebenfalls nachgewiesen werden konnten. NdhH konnte knapp oberhalb von PsbC identifiziert werden. Eine silbergefärbte Bande, die NdhH zuzuordnen wäre, konnte jedoch nicht erhalten werden. NdhN wurde durch das Protein PsaF überlagert.

### 3.6. NAD(P)H-Diaphorase Aktivität des NDH-Komplexes

Auf spezifische Funktionen von Enzymen *in vivo* kann durch Reaktionen, die *in vitro* ablaufen, geschlossen werden. Mit Hilfe von Enzymaktivitätstests, die an isolierten Enzymen ablaufen, besteht die Möglichkeit *in vitro* bestimmte Reaktionen von Enzymen nachzuweisen. Die Diaphorase Aktivität beschreibt dabei eine Reaktion, bei der unter Anwesenheit eines Elektronenakzeptors, wie DCIP oder Menadion, NADH oder NADPH durch das zu untersuchende Enzym zu  $\text{NAD}^+$ , bzw.  $\text{NADP}^+$  oxidiert werden. Der Elektronenakzeptor wird in diesem ersten Reaktionsschritt reduziert und anschließend in einer gekoppelten Reaktion wieder oxidiert, wobei ein Farbstoff reduziert wird und es zu einer Farbänderung kommt. Wird als Farbstoff MTT oder NBT verwendet, entsteht durch die Reduktion ein blaues Formazan. Erfolgt diese Reaktion innerhalb eines Polyacrylamidgels, führt diese zu einer Färbung des enzymatisch aktiven Bereichs innerhalb des PAG. Entsprechende Diaphorase Aktivitätstests wurden mit NADH und NADPH in der CNL- und BN-PAGE von Etioplasten und Chloroplasten durchgeführt (Abb. 19).



**Abb. 19 NAD(P)H-Diaphorase Aktivität von Membranproteinkomplexen aus Etio- und Chloroplasten**

Die Auftrennung der Membranproteinkomplexe isoliert aus jeweils  $1 \times 10^8$  Etioplasten (E) oder Chloroplasten (C) erfolgte entweder mittels CNL- oder BN-PAGE unter Verwendung eines 6-12% Gradientengels. Die Solubilisierung der Komplexe erfolgte mit 1,25% DM und zur Bestimmung der Molekularmassen in kDa wurde HMW-Marker verwendet. Der Diaphorase Aktivitätstest wurde sowohl mit NADH, als auch mit NADPH durchgeführt. Als Elektronenakzeptor wurde DCIP und als Farbstoff MTT verwendet. Die Inkubation in diese Färbelösung erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Elektrophorese für 1 h. Die Beschriftung einzelner Komplexe erfolgte entsprechend Abb. 6.

Die Durchführung der Diaphorase Aktivitätsfärbung mit DCIP als Elektronenakzeptor führte bei Verwendung von NADH zu einem deutlich anderen Resultat als mit NADPH (Abb. 19). Sowohl in Etioplasten, als auch in Chloroplasten konnten bei Verwendung von NADPH als Elektronendonator deutlich mehr intensiv gefärbte Banden detektiert werden, als bei Verwendung von NADH. Die am intensivsten gefärbte Bande war sowohl in Etioplasten, als auch in Chloroplasten die Bande der FNR, deren Identität eindeutig massenspektrometrisch bestimmt werden konnte. Im Bereich des Cyt *b<sub>6</sub>f* Komplexes war ebenfalls eine Diaphorase Aktivität detektierbar. Weitere Banden fanden sich im Bereich zwischen ca. 80 und 100 kDa, sowie bei ca. 440 bis 500 kDa, wobei deren Identität massenspektrometrisch nicht bestimmt werden konnte. Diese Banden konnten auch mit anderen Färbemethoden wie der Coomassie-

oder Silber-Färbung nicht detektiert werden. Mit dieser Färbemethode, die auf der enzymatischen Aktivität beruht, wurde somit eine deutlich höhere Sensitivität erreicht. Im Bereich der Superkomplexe bei ca. 800 kDa konnten zwei weitere Banden identifiziert werden. Diese Banden entsprachen den beiden grün gefärbten Banden der Superkomplexe 1 und 2.

Die Bande des NDH-Komplexes, die im Bereich der Superkomplexe 1 und 2 lag, konnte beim Diaphorase Aktivitätstest mit NADPH weder in Etioplasten noch in Chloroplasten detektiert werden. Bei Verwendung von NADH als Elektronendonator gelang jedoch der Nachweis einer schwachen, aber eindeutigen Bande in Etioplasten, nicht aber in Chloroplasten. Da in Chloroplasten die Konzentration des NDH-Komplexes signifikant niedriger als in Etioplasten war, könnte dies der Grund dafür sein, dass eine entsprechende Bande nicht mehr detektiert werden konnte. Zudem überlagern in diesem Bereich die Superkomplexe, weshalb eine möglicherweise vorhandene sehr schwache Bande ebenfalls nicht mehr erkannt werden konnte.

Neben der schwachen Bande des NDH-Komplexes konnte durch die Diaphorase Aktivitätsfärbung mit NADH ein weiterer enzymatisch aktiver Bereich bei ca. 140 bis 200 kDa detektiert werden. Bei Verwendung von NADPH erfolgte in diesem Fall eine entsprechende Färbung. Dieser Bereich deckte sich gut mit dem Bereich der massenspektrometrischen Detektion von GGH. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Färbung durch mehr als nur ein Protein oder einen Proteinkomplex verursacht wurde, da neben der diffusen Färbung zwischen 140 und 200 kDa auch eine scharfe Bande bei ca. 200 kDa sichtbar war. Zu dieser Bande konnte jedoch massenspektrometrisch kein Protein zugeordnet werden, welches ausschließlich in dieser Bande vorlag.

Die Diaphorase Aktivitätsfärbung wurde nicht nur mit DCIP als Elektronenakzeptor durchgeführt, sondern es erfolgte auch eine entsprechende Aktivitätsfärbung mit Verwendung von Menadion als Elektronenakzeptor. Das hierbei erhaltene Bandenmuster zeigte keinen Unterschied zu dem Bandenmuster, welches bei Verwendung von DCIP erhalten wurde. Die schwache Färbung im Bereich des NDH-Komplexes konnte ebenfalls bestätigt werden, weshalb eine Diaphorase Aktivität für diesen Bereich in Etioplasten bei Verwendung von NADH als Elektronendonator als gesichert angesehen wurde, obwohl diese Aktivität im Verhältnis zu der anderer Banden, vor allem auch im Vergleich zu Aktivitätsbanden mit NADPH als Elektronendonator, sehr schwach war.

## **4. Identifikation niedermolekularer Proteine von Photosystem I und II**

### **4.1. Niedermolekulare Proteine in Etioplasten und Chloroplasten**

Sowohl in Photosystem I, als auch in Photosystem II von höheren Pflanzen finden sich zahlreiche Untereinheiten, die durch eine Molekularmasse von weniger als 10 kDa und durch eine Transmembrandomäne gekennzeichnet sind. Zudem sind diese niedermolekularen Proteine (*low molecular weight proteins*, LMW-Proteine) durch eine relativ hohe Hydrophobizität gekennzeichnet. Die massenspektrometrische Identifikation dieser Proteine gestaltete sich bislang überaus schwierig und war in erster Linie auf gelfreie Extraktionsmethoden aus Plastiden und LC-MS Methoden beschränkt (Gomez et al., 2002; Friso et al., 2004). Durch tryptischen In-Gel Verdau und *offline* MS konnten bislang nur PsbE, F und H in Chloroplasten nachgewiesen werden, da diese eine tryptische Schnittstelle aufweisen, wodurch je ein Peptid einer löslichen Domäne zugänglich war (Granvogl et al., 2006). Ziel dieser Arbeit war auf Basis einer neuen Extraktionsmethode aus Polyacrylamid-Gelen und mittels einer neuen Spray-Lösung für *offline* MS möglichst alle vorhandenen LMW-Proteine von PSI und PSII in Chloroplasten und soweit vorhanden auch in Etioplasten nachzuweisen.

#### **4.1.1. Überblick über identifizierte niedermolekulare Proteine aus PSI und PSII**

Die membranständigen Proteome von Etioplasten und Chloroplasten der Gerste wurden mittels BN-PAGE in einzelne Membrankomplexe aufgetrennt und LMW-Proteine wurden ohne vorangehenden proteolytischen Verdau direkt aus dem BN-PAGE extrahiert. Die Extraktion erfolgte im Ultraschallbad mit einer Extraktionslösung aus 50% Ameisensäure, 40% 1-Butanol und 10% Methanol (FBM-Lösung) (Material und Methoden, C.2.8.5). Die Entsalzung der Probe, sowie die Abtrennung von Detergenzien aus der BN-PAGE, erfolgten durch eine Acetonfällung über Nacht, wobei im Fall von Extraktionen aus Komplexen von Chloroplasten auch Chl größtenteils abgetrennt werden konnte. Die im Vakuumkonzentrator getrockneten präzipitierten Proteine wurden anschließend in einer Spraylösung aus 70% Aceton, 10% 2-Propanol und 1% Ameisensäure aufgenommen und direkt durch *offline* ESI-MS analysiert und mittels *de novo* Sequenzierung aufgenommener MSMS-Spektren identifiziert. Mit dieser Methode gelang die Identifikation von insgesamt 15 LMW-Proteinen, welche aus PSI und PSII stammten (Tab. 9).

Tab. 9 Niedermolekulare membranintegrale Proteine von PSI und PSII

Protein	Acc.-Nr. <sup>1)</sup>	K <sup>2)</sup>	GRAVY <sup>3)</sup>	Intensivstes Signal ( <i>m/z</i> )	Gemessene MM <sup>4)</sup> [Da]	Berechnete MM <sup>5)</sup> [Da]	$\Delta^6$ [Da]	[%]	Modifikationen
PsaI	P13165	P	1.150	1009.33 [M+4H] <sup>4+</sup>	4033.32	4005.29	28.03	38.9	N-Formyl-Met
PsaJ	A1E9L0	P	0.879	1193.66 [M+4H] <sup>4+</sup>	4770.64	4741.57	29.07	28.6	N-Formyl-Met
PsbE	P69390	P	-0.004	1330.69 [M+7H] <sup>7+</sup>	9307.83	9438.71	-130.88	25.6	- Met
PsbF	P60126	P	0.716	1102.60 [M+4H] <sup>4+</sup>	4406.40	4495.41	-89.01	63.2	- Met; N-Acetylierung
PsbH	P12363	P	0.231	1278.69 [M+6H] <sup>6+</sup>	7666.14	7796.11	-129.97	20.8	- Met
PsbI	P25876	P	0.678	1049.32 [M+4H] <sup>4+</sup>	4193.28	4165.21	28.07	69.4	N-Formyl-Met
PsbJ	P20175	P	1.021	1338.05 [M+3H] <sup>3+</sup>	4011.15	4084.17	-73.02	87.2	- Met; N-Acetylierung; Pro-20→Leu/Ile
PsbK	P69693	P	1.241	1071.60 [M+4H] <sup>4+</sup>	4282.40	6991.65	-2709.25	43.2	Transitpeptid nach Ala-24 entfernt
PsbL	P60143	P	0.214	1455.39 [M+3H] <sup>3+</sup>	4363.17	4494.27	-131.10	40.5	- Met
PsbM	A1E9H9	P	1.362	1280.09 [M+3H] <sup>3+</sup>	3837.27	3809.15	28.12	85.3	N-Formyl-Met
PsbN	A1E9L8	P	0.112	1187.77 [M+4H] <sup>4+</sup>	4747.08	4659.28	87.80	65.1	N-Formyl-Met <sup>7)</sup>
PsbT <sub>c</sub>	P69669	P	0.639	885.41 [M+5H] <sup>5+</sup>	4422.05	4379.49	42.56	55.3	N-Acetylierung
PsbW	-	N	-	1473.25 [M+4H] <sup>4+</sup>	5889.00	-	-	-	?
PsbX	-	N	-	1036.33 [M+4H] <sup>4+</sup>	4141.32	-	-	-	?
PsbY <sub>2</sub>	-	N	-	941.52 [M+5H] <sup>5+</sup>	4702.60	-	-	-	?

<sup>1</sup> Datenbankeintrag von *Hordeum vulgare* in SwissProt/TrEMBL<sup>2</sup> Kernkodierte (N) oder plastidär kodierte (P) Proteine<sup>3</sup> Hydrophobizität der Peptide berechnet nach Kyte & Doolittle (Kyte et al., 1982)<sup>4</sup> Experimentell bestimmte Molekularmasse berechnet aus dem Signal in Spalte 5 nach interner Massenkorrektur auf Basis von Pheophytin *a* (871.5737 [M+H]<sup>1+</sup>) oder CBB-G250 (832.309 [M+H]<sup>1+</sup>)<sup>5</sup> Theoretisch berechnete Molekularmasse entsprechend der Aminosäuresequenz in SwissProt/TrEMBL<sup>6</sup> Massendifferenz zwischen experimentell ermitteltem und theoretisch berechnetem Molekulargewicht<sup>7</sup> Eine zusätzliche Massendifferenz von 59.8 Da konnte nicht erklärt werden

Von PSI konnten zwei LMW-Proteine nachgewiesen werden. Dies waren PsaI und PsaJ, wobei es sich um die einzigen bekannten LMW-Proteine von PSII aus höheren Pflanzen handelte. Für PsaI konnte experimentell eine Molekularmasse von 4033,32 Da bestimmt werden und für PsaJ von 4770,64 Da. Diese Werte wiesen jeweils zum theoretisch aus der

AS-Sequenz berechneten Wert auf Basis des Eintrags in SwissProt/TrEMBL eine Differenz von ca. 28 Da auf, was auf eine Formylierung als posttranslationale Modifikation schließen ließ. Durch Interpretation von MSMS-Spektren konnte dies bestätigt werden und N-terminal war jeweils eindeutig N-Formyl-Met nachzuweisen.

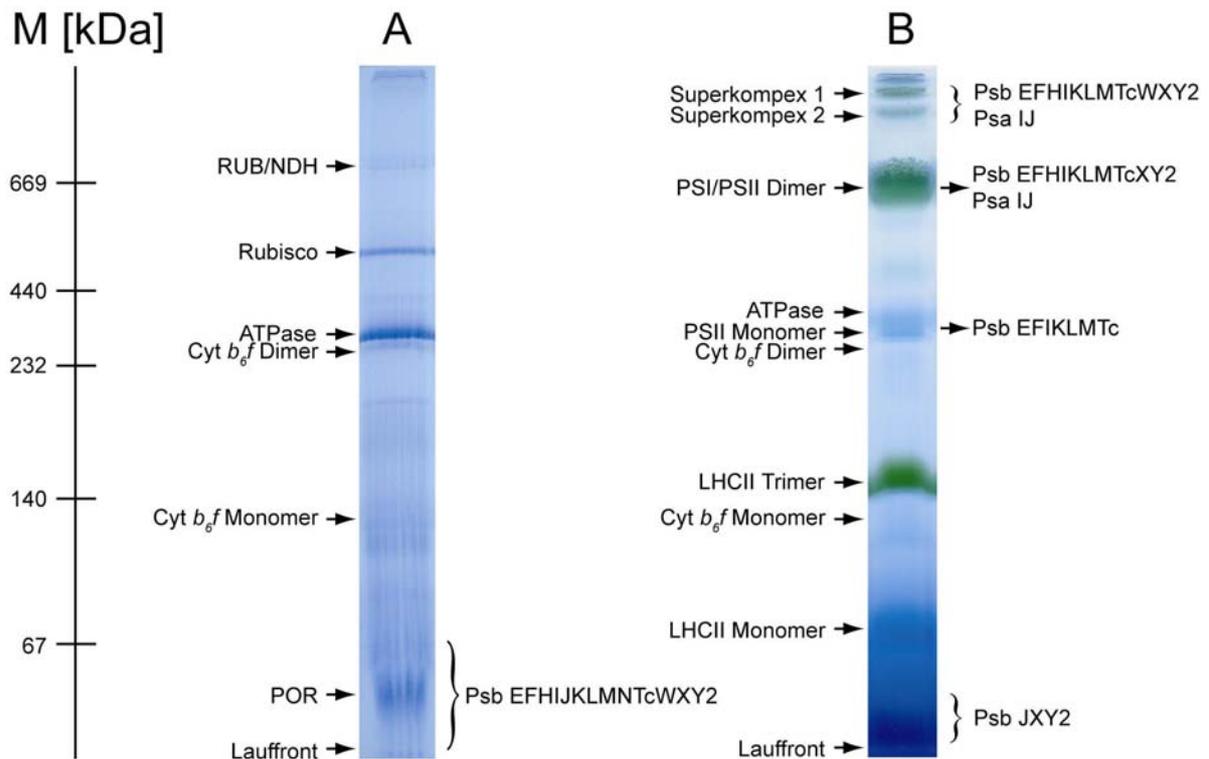
Von PSII konnten insgesamt 13 LMW-Proteine identifiziert werden, wobei zehn plastidär kodiert (PsbE, F, H, I, J, K, L, M, N, Tc) und drei kernkodiert (PsbW, X, Y2) waren. PsbK war das einzige plastidär kodierte Protein, das ein Transitpeptid für die Integration in die Thylakoidmembran aufwies. Als N-terminale AS konnte Lys-25 identifiziert werden, folglich war die Prozessierungsstelle nach Ala-24 korrekt in dem entsprechenden Eintrag in SwissProt/TrEMBL angegeben. Eine weitere N-terminale posttranslationale Modifikation konnte bei PsbK nicht gefunden werden. Die anderen plastidär kodierten LMW-Proteine wiesen entweder eine Abspaltung des N-terminalen Met auf (PsbE, F, H, J, L), wobei bei PsbF und J zusätzlich eine N-terminale Acetylierung nachgewiesen werden konnte, oder es wurde eine N-terminale Formylierung identifiziert. Dies war bei PsbI, M und N der Fall. Lediglich PsbTc wies N-terminal eine Acetylierung ohne Abspaltung des Met auf. Bei PsbJ konnte im Vergleich zum Eintrag P20175 in SwissProt/TrEMBL an Position 20 statt Pro eine AS mit der MM von 113 Da entsprechen Leu oder Ile identifiziert werden. Bei PsbN konnte die Ursache für eine Massendifferenz von 59,8 Da zwischen theoretischer und beobachteter MM nicht geklärt werden.

Für die kernkodierten Untereinheiten PsbW, X und Y2 lagen für Gerste noch keine Sequenzinformationen in SwissProt/TrEMBL vor, weshalb die Identifikation dieser Proteine auf Basis homologer Sequenzen verwandter Spezies vorgenommen wurde (siehe Kap. 4.2.5). Insgesamt betrachtet konnten mit dieser Methode membranintegrale Proteine mit jeweils einer TMD nachgewiesen werden, die nach der Hydrophobizitätsskala von Kyte & Doolittle (Kyte et al., 1982) Werte zwischen -0,004 (PsbE) und 1,362 (PsbM) aufwiesen und einen Massenbereich von 3837 Da bis 9307 Da abdeckten.

#### **4.1.2. Zuordnung niedermolekularer Proteine zu Komplexen in der BN-PAGE**

Der Nachweis von LMW-Proteinen von PSII gelang sowohl in Etioplasten, als auch in Chloroplasten der Gerste. Im Gegensatz dazu konnten die LMW-Proteine PsaI und PsaJ von PSI ausschließlich in Chloroplasten nachgewiesen werden. In Chloroplasten konnten die LMW-Proteine mehreren Komplexen in der BN-PAGE von PSI und PSII eindeutig zugeordnet werden, wohingegen in Etioplasten keine höhermolekularen und klar definierten

Komplexe mit LMW-Proteinen identifiziert werden konnten. Hier erfolgte der Nachweis dieser Proteine ausschließlich nahe der Lauffront der BN-PAGE (Abb. 20).



**Abb. 20 Identifikation von LMW-Proteinen in der BN-PAGE von Etioplasten und Chloroplasten**

Die Auftrennung der Membranproteinkomplexe aus jeweils  $1 \times 10^8$  Etioplasten (A) oder Chloroplasten (B) erfolgte mittels BN-PAGE bei Verwendung eines 6-12% Gradientengels. Bei Etioplasten wurden Banden durch die anschließende Färbung mit Coomassie visualisiert, bei Chloroplasten erfolgte keine weitere Färbung nach der elektrophoretischen Auftrennung, da die dominierenden Banden des PS aufgrund endogenen Chl *a* sichtbar waren. Zur Bestimmung der Molekularmassen wurde HMW-Marker verwendet (M), welcher zusätzlich auf das Gel aufgetragen wurde. Zur Identifikation der LMW-Proteine wurde jeweils das gesamte Gel in 2 bis 3 mm breite Abschnitte unterteilt. Diese Abschnitte wurden auf die Anwesenheit von LMW-Proteinen hin untersucht und identifizierte Proteine von PSI und PSII wurden den entsprechenden Bereichen zugeordnet.

Die Membranproteinkomplexe wurden wie folgt beschriftet: ATPase, ATP Synthase-Komplex; *Cyt b<sub>6</sub>/f*, Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex in monomerer und dimerer Form; NDH, NAD(P)H Dehydrogenase Komplex; POR, NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase-Komplexe; Rubisco, Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase-Komplex; RUB, *Rubisco-binding protein*-Komplex; PSI/II, Reaktionszentrums-Kern-Komplexe des Photosystem I/II; LHCI/II, Lichtsammelkomplexe I/II; Superkomplexe 1/2, bestehend aus PSI/II und LHCI/II.

In Etioplasten gelang der Nachweis von insgesamt 13 LMW-Proteinen des PSII. Dabei handelte es sich um die plastidär kodierte Untereinheiten PsbE, F, H, I, J, K, L, M, N, Tc, sowie um die kernkodierte Untereinheiten PsbW, X, Y2. Diese fanden sich ausschließlich in einem Bereich nahe der Lauffront der BN-PAGE. Oberhalb eines Molekulargewichts von ca. 70 kDa konnten keine LMW-Proteine des PSII mehr nachgewiesen werden. Interessanterweise gelang der Nachweis von PsbN ausschließlich in Etioplasten und nicht

auch in Chloroplasten. Von PsbY konnte ausschließlich PsbY2 nachgewiesen werden, nicht jedoch PsbY1 (vgl. Kap. 4.2.5).

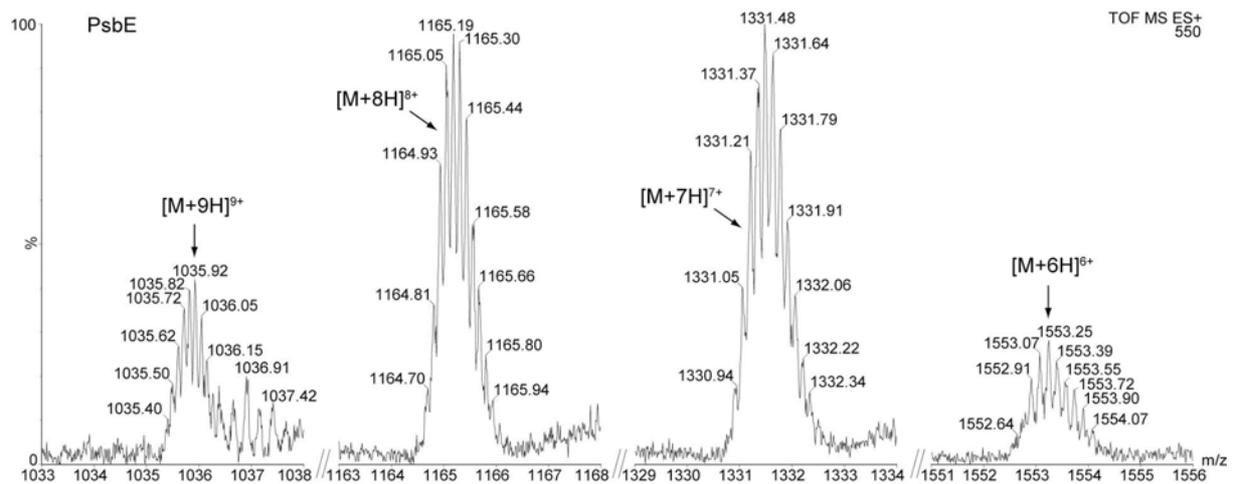
Wurden Membranproteinkomplexe aus Chloroplasten mittels BN-PAGE aufgetrennt, konnte eine grundlegend andere Verteilung der LMW-Proteine beobachtet werden. Im Bereich des PSII Dimer konnten die Untereinheiten PsbE, F, H, I, K, L, M, Tc, X, Y2 nachgewiesen werden. PsbX und PsbY2 waren nur durch sehr schwache Signale nahe der Detektionsgrenze identifizierbar. Interessanterweise fehlten PsbW und PsbJ. In den Superkomplexen hingegen konnte PsbW zusätzlich nachgewiesen werden, allerdings war PsbJ ebenso wie im PSII Dimer nicht detektierbar. Zwischen den einzelnen Superkomplexen waren qualitativ keine Unterschiede bezüglich der Anwesenheit der LMW-Proteine festzustellen. Das PSII Monomer wies generell eine relativ niedrige Proteinkonzentration auf. Es waren PsbE, F, I, K, L, M, Tc nachweisbar, die Untereinheiten PsbH, W, X, Y2 konnten nicht nachgewiesen werden. Nahe der Lauffront der BN-PAGE wurden jedoch intensive Signale von PsbX, Y2 gefunden und es konnte auch PsbJ nachgewiesen werden, welches in keinem höhermolekularem Komplex identifiziert werden konnte. PsbN wurde in Chloroplasten weder in einem Komplex, noch nahe der Lauffront gefunden. Für dieses Protein gelang der Nachweis ausschließlich in Etioplasten. Im Bereich des trimeren und monomeren Komplexes von LHCII konnten keine LMW-Proteine nachgewiesen werden.

Die Untereinheiten PsaI und PsaJ von PSII wurden ausschließlich in Chloroplasten, nicht jedoch in Etioplasten nachgewiesen. Beide Untereinheiten konnten in den Komplexen von PSI und PSILHCI nachgewiesen werden. Darüber hinaus gelang die Identifikation im Bereich der Superkomplexe, wobei ebenfalls qualitativ keine Unterschiede zwischen den einzelnen Superkomplexen festgestellt werden konnten. Nahe der Lauffront waren PsaI und PsaJ nicht nachweisbar.

## 4.2. Detaillierte Betrachtung der Massenspektren von LMW-Proteinen

### 4.2.1. Ladungszustände identifizierter LMW-Proteine

LMW-Proteine konnten in einem Massenbereich zwischen 3,8 und 9,3 kDa nachgewiesen werden. Detektiert wurden diese Proteine in einem Bereich von ca. 600 bis 2000  $m/z$ . Entsprechend wurden mehrfach geladene Signale detektiert, wobei dreifach bis neunfach geladene Signale beobachtet werden konnten. Dabei wurden die einzelnen LMW-Proteine grundsätzlich nicht nur in einem Signal detektiert, sondern es waren immer mehrere Ladungszustände zu finden, wobei in der Regel ein Ladungszustand dominierte und das intensivste Signal aufwies (Abb. 21).



**Abb. 21** Ladungszustände des LMW-Proteins PsbE

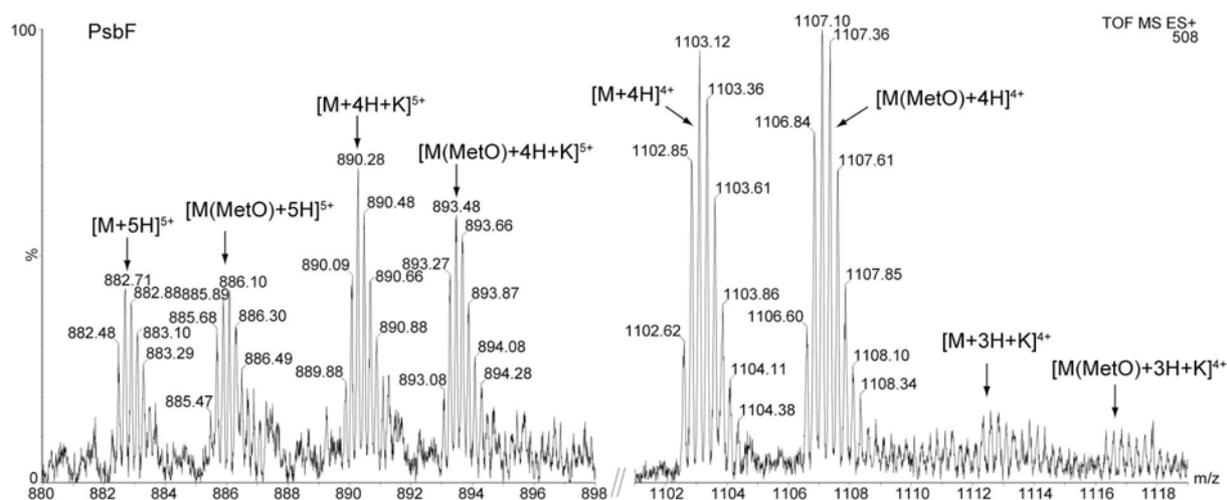
Die Extraktion von PsbE erfolgte aus einer BN-PAGE von Membranproteinkomplexen aus Etioplasten mit einer Extraktionslösung aus 50% Ameisensäure, 40% 1-Butanol und 10% Methanol. Die Aufnahme dieses Spektrums erfolgte an einem Q-TOF Premier bei einer Kapillarspannung von 0,9 kV und mit einer Spraylösung aus 70% Aceton, 10% 2-Propanol und 1% Ameisensäure. PsbE konnte darin in vier Ladungszuständen detektiert werden: 1035.40 [M+9H]<sup>9+</sup>, 1164.70 [M+8H]<sup>8+</sup>, 1330.94 [M+7H]<sup>7+</sup> und 1552.64 [M+6H]<sup>6+</sup>.

Die LMW-Proteine mit der höchsten Molekularmasse PsbE (9,3 kDa) und PsbH (7,7 kDa) waren auch durch hohe Ladungszustände gekennzeichnet, wobei bei PsbE die Zustände [M+7H]<sup>7+</sup> und [M+8H]<sup>8+</sup> die dominierend waren und PsbH konnte in erster Linie als [M+6H]<sup>6+</sup> detektiert werden. Neben diesen Ladungszuständen waren noch zwei bis drei weitere Ladungszustände mit deutlich niedrigerer Signalintensität zu beobachten (Abb. 21). Dabei nahm die Signalintensität dieser Ladungszustände kontinuierlich ab, umso weiter die Zahl an Ladungen von dem dominierenden Ladungszustand abwich. Der beobachtete

dominierende Ladungszustand lag sowohl bei PsbE, als auch bei PsbH nahe an dem auf Basis der vorhandenen Ladungsträger zu erwartenden theoretischen Ladungszustand. Als Ladungsträger werden AS bezeichnet die direkt ein Proton aufnehmen können, wie Arg, Lys und His, sowie die unmodifizierte N-terminale Aminogruppe. PsbE wies sechs Arg, ein His sowie einen freien N-Terminus auf, entsprechend acht potentiellen Ladungsträgern und PsbH enthielt zwei Arg, vier Lys und ebenfalls eine unmodifizierte N-terminale Aminogruppe, entsprechend sieben potentiellen Ladungsträgern. Alle anderen identifizierten LMW-Proteine von PSI und PSII wiesen eine Molekularmasse von 3,8 bis 5,9 kDa auf und die dominierenden Ladungszustände lagen zwischen  $[M+3H]^{3+}$  und  $[M+5H]^{5+}$ . Dabei korrelierte die Anzahl potentieller Ladungsträger im Protein mit dem tatsächlich beobachteten intensivsten Signal nur teilweise. So wies PsbTc fünf potentielle Ladungsträger auf und konnte in erster Linie als  $[M+5H]^{5+}$  detektiert werden, ebenso wurde PsbF mit vier potentiellen Ladungsträgern als  $[M+4H]^{4+}$  gefunden. PsbL hingegen wies zwei potentielle Ladungsträger auf und wurde in erster Linie als  $[M+3H]^{3+}$  nachgewiesen und besaß damit eine Ladung mehr als anhand der potentiell vorhandenen Ladungsträger zu erwarten gewesen wäre. Dieses Phänomen konnte auch bei PsaI und PsaJ, sowie PsbI und PsbK beobachtet werden, die alle in erster Linie als  $[M+4H]^{4+}$  detektiert wurden, jeweils aber nur drei potentielle Ladungsträger aufwiesen. Am auffälligsten waren PsbN mit nur zwei potentiellen Ladungsträgern und einem dominierenden Signal mit einer Ladung von  $[M+4H]^{4+}$ , sowie PsbJ und PsbM mit nur je einem potentiellen Ladungsträger und einem tatsächlich detektierten Ladungszustand von  $[M+3H]^{3+}$ . In diesen Fällen waren sogar zwei Ladungen zusätzlich vorhanden, die nicht einem Ladungsträger zugeordnet werden konnten.

#### 4.2.2. Bildung von Alkalimetall-Adduktionen

Von den detektierten LMW-Proteinen wurden nicht nur Signale von ausschließlich protonierten Proteinen detektiert, sondern es traten auch Signale von Proteinen auf die eine oder mehrere Ladungen von der Komplexbildung mit Natrium- oder Kalium-Ionen enthielten. Diese Adduktbildung mit  $Na^+$  und  $K^+$  führte zu zahlreichen zusätzlichen Signalen im MS-Spektrum und zu einer Abnahme der Signalintensitäten der jeweils korrespondierenden ausschließlich protonierten Signale (Abb. 22).



**Abb. 22 Alkalimetall-Adduktbildung am Beispiel PsbF**

PsbF wurde aus der BN-PAGE der Membranfraktion von Etioplasten extrahiert und die Aufnahme dieses Spektrums erfolgte an einem Q-TOF Premier bei einer Kapillarspannung von 0,9 kV und mit einer Spraylösung aus 70% Aceton, 10% 2-Propanol und 1% Ameisensäure. PsbF konnte darin in vierfach und fünffach geladenen Zuständen detektiert werden. Neben unmodifiziertem PsbF wurde auch Signale von PsbF mit oxidiertem Methionin (MetO) detektiert. Im vierfach geladenen Zustand waren fast nur die Signale des ausschließlich protonierten Proteins zu sehen. Addukte mit  $K^+$  waren nachweisbar, aber deren Signalintensität war deutlich niedriger. Im fünffach geladenen Zustand hingegen war die Signalintensität der  $K^+$ -Adduktionen signifikant höher und deren Signalintensität war sogar höher als die Signalintensität der ausschließlich protonierten Proteine.

Die Bildung von Alkalimetall-Adduktionen wurde bei vielen LMW-Proteinen beobachtet, allerdings traten diese nicht bei allen LMW-Proteinen und auch nicht bei allen Ladungszuständen gleichermaßen auf. Eine signifikante Steigerung des Anteils von Adduktionen konnte beobachtet werden, wenn die Anzahl der Ladungen die Anzahl von potentiellen Ladungsträgern überstieg. PsbF beispielsweise besaß vier Ladungsträger, drei Arg und ein His, und im vierfach geladenen Zustand waren ausschließlich protonierte Signale dominierend (Abb. 22). Adduktionen mit  $K^+$  waren nur als schwache Signale nachweisbar. Überstieg die Anzahl der Ladungen jedoch die Anzahl der Ladungsträger im Protein, so war eine signifikante Zunahme an Signalen von Alkalimetall-Adduktionen zu beobachten. Im fünffach geladenen Zustand zeigten beispielsweise diese Signale von Adduktionen bei PsbF sogar eine höhere Signalintensität, als die Signale von ausschließlich protonierten Ionen.

Das Vorhandensein von Alkalimetall-Adduktionen war nicht nur von der Anzahl an Ladungen relativ zu Ladungsträgern abhängig, sondern es konnte auch ein deutlicher Einfluss der N-terminalen Modifikationen auf die Intensität der Adduktensignale beobachtet werden. Lag N-terminal eine freie Aminogruppe vor, wie bei PsbE, H, K und L, so wurden unabhängig vom Ladungszustand signifikant weniger Adduktionen beobachtet. Sowohl bei N-terminalen Acetylierungen, als auch bei N-Formyl-Met traten vermehrt Alkalimetall-Adduktionen auf.

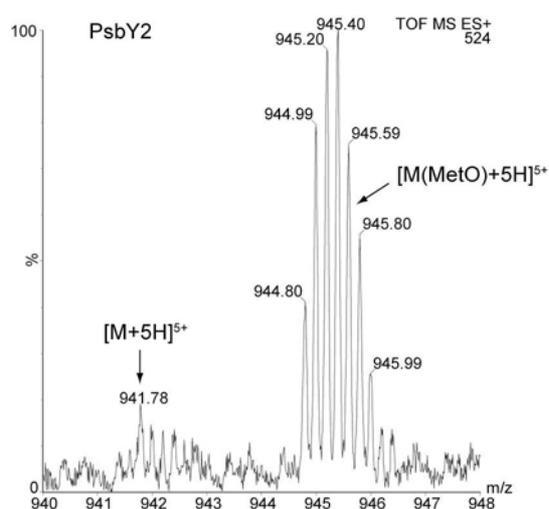
Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Alkalimetallionen an diesen N-terminalen Modifikationen lokalisiert sind.

Bei den durchgeführten Messungen wurden sowohl  $\text{Na}^+$ - als auch  $\text{K}^+$ -Adduktionen beobachtet. Das vermehrte Auftreten des einen oder anderen Typs schwankte zwischen den durchgeführten Messreihen und schien in Zusammenhang mit den verwendeten Salzen zur Pufferherstellung während der Probenvorbereitung und der Gelelektrophorese zu stehen. Eine Verringerung der Signalintensität dieser Adduktionen durch mehrfaches Reinigen der isolierten Proteine nach der Extraktion aus dem PAG mittels Acetonfällung führte zu keinem Erfolg. Eine Veränderung verschiedener Parameter während der Ionisierung, wie etwa der Kapillarspannung oder der Konusspannung führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Signalintensität dieser Ionen. Die Verwendung einer neutralen Spraylösung zur Verringerung der Adduktionen wie bei LC-MS (vgl. Kap. 2.1, Abb. 9) mit Ammoniumformiat anstelle von Ameisensäure führte zu keiner ausreichend guten Ionisierung um die LMW-Proteine noch sicher identifizieren zu können. Ursache war die deutlich niedrigere Kapillarspannung von 0,8 bis 1,2 kV, die bei Verwendung von Spraykapillaren bei *offline* MS verwendet wurde. Wurde die Kapillarspannung deutlich erhöht, so führte dies zu einem instabilen Elektrospray.

Wurden MSMS-Experimente mit Alkalimetall-Adduktionen durchgeführt, konnte ein deutlich unterschiedliches Fragmentierungsverhalten im Vergleich zu ausschließlich protonierten Ionen beobachtet werden. Dabei unterschieden sich auch  $\text{Na}^+$  von  $\text{K}^+$ -Addukten deutlich. Adduktionen mit  $\text{Na}^+$  zeigten nur eine sehr geringe Anzahl von Fragmentionen und auch eine deutliche Steigerung der Kollisionsspannung während der Fragmentierung führte zu keiner Steigerung der Signalintensität der Fragmentionen. In der Mehrzahl der Fälle gelang nur die Identifikation kurzer, meist C-terminaler Sequenzabschnitte von ein bis drei AS. Lagen Adduktionen mit  $\text{K}^+$  vor so wurden ebenfalls weniger Fragmentionen als bei ausschließlich protonierten Ionen beobachtet. Das Fragmentierungsverhalten war jedoch besser als bei  $\text{Na}^+$ -Addukten und interessanterweise konnten teilweise AS aus Sequenzabschnitten identifiziert werden, die in den Fragmentionenspektren von ausschließlich protonierten Ionen nicht identifizierbar waren. Dadurch gelang es in einigen Fällen einen größeren Sequenzbereich eines LMW-Proteins durch *de novo* Sequenzierung zu ermitteln (vgl. Kap. 5.2).

### 4.2.3. Oxidationen an Methioninen

Die Mehrzahl der identifizierten LMW-Proteine wies mindestens ein Met in der Sequenz auf. Met ist eine schwefelhaltige AS und dieser Schwefel kann oxidiert vorliegen, wobei Methioninsulfoxid oder bei zweifacher Oxidation Methioninsulfon entstehen. Diese posttranslationale Modifikation kann *in vivo* auftreten, ist aber häufig auch ein Artefakt der Probenvorbereitung. Identifizierte methioninhaltige LMW-Proteine wiesen in der Regel eine partielle Oxidation von Met zu Methioninsulfoxid auf (Abb. 22, Abb. 23).



**Abb. 23 Oxidationszustand von PsbY2**

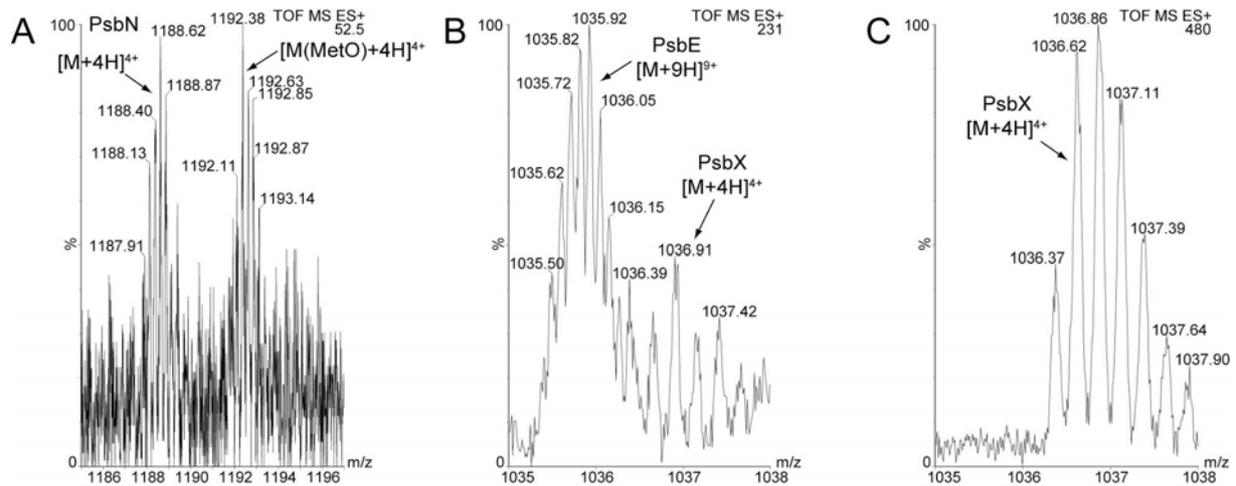
Die Extraktion von PsbY2 erfolgte aus einer BN-PAGE einer Membranproteinextraktion aus Etioplasten. Die Aufnahme dieses Spektrums erfolgte an einem Q-TOF Premier bei einer Kapillarspannung von 0,9 kV und mit einer Spraylösung aus 70% Aceton, 10% 2-Propanol und 1% Ameisensäure. Das Signal von PsbY2 mit nicht oxidiertem Methionin bei 941,52  $[M+5H]^{5+}$  wies eine signifikant niedrigere Signalintensität auf, als das Signal mit einem oxidierten Methionin bei 944,80  $[M(\text{MetO})+5H]^{5+}$ .

Die meisten identifizierten methioninhaltigen LMW-Proteine zeigten eine partielle Oxidation des oder der Methionine zu Methioninsulfoxid. Durch diese Modifikation traten im MS-Spektrum zusätzliche Signale im Abstand von 16 Da zum unmodifizierten Protein auf. Die Signalintensität dieser zusätzlichen Signale war dabei vergleichbar mit der Signalintensität des nicht modifizierten Proteins und war maximal ein Drittel niedriger oder höher als dieses (Abb. 22). Von Bedeutung war, dass die Signalintensität dieser Proteine mit oxidiertem Met nach längerer Verweildauer in der Spraykapillare zunahm. So konnte nach 1 h Messzeit eine Zunahme der Signale mit oxidierten Methioninen um ca. 25-30% beobachtet werden. Wurde die Probe dann 4 h in der Spraykapillare bei RT gelagert und anschließend ein weiteres MS-Spektrum aufgenommen, so konnte eine Zunahme der Signalintensität um ca. 50% beobachtet werden. Die Lagerung von LMW-Proteinen in der Spraylösung außerhalb der Spraykapillare führte zu keiner Zunahme von oxidierten Methioninen. Folglich waren diese partiellen Oxidationen der Met zumindest zu einem wesentlichen Teil Artefakte der Probenverarbeitung und konnten in direktem Zusammenhang mit der Verwendung der Spraykapillare gebracht werden.

Auffällig war jedoch PsbY2. Dieses war das einzige LMW-Protein welches grundsätzlich in allen erfolgten Messungen und bereits zu Beginn der Messung nahezu quantitativ oxidiert vorlag. Der Vergleich der MSMS-Fragmentationenspektren zeigte, dass sich diese Oxidation im C-terminalen Bereich des Proteins befand. Leider war es nicht möglich die Aminosäuresequenz in diesen Sequenzabschnitt durch *de novo* Sequenzierung zu ermitteln (vgl. Kap. 4.2.5) und von Gerste lagen keine Sequenzinformationen von PsbY vor. PsbY2 aus *O. sativa* weist C-terminal ein Met zwischen zwei Arg auf. Die Anwesenheit von zwei Arg würde erklären warum dieser Bereich keine Fragmentationen lieferte und das Met könnte oxidiert vorliegen. Inwieweit es sich möglicherweise um eine Oxidation *in vivo* handelte, oder ob die zwei benachbarten basischen AS Arg eine Oxidation des Met katalytisch während der Probenvorbereitung förderten, konnte nicht geklärt werden.

#### 4.2.4. Extraktionseffizienz und Signalintensität

Analysen der Kristallstruktur von PSII zeigten, dass die LMW-Untereinheiten innerhalb dieses Komplexes im Verhältnis 1:1 vorliegen (Shi et al., 2004). Ein Vergleich der Signalintensitäten zwischen den einzelnen Untereinheiten, die aus einem Komplex aus der BN-PAGE der Membranproteinfraction aus Chloroplasten isoliert wurden, zeigte jedoch signifikante Unterschiede bei den Signalintensitäten. Einzelne Untereinheiten wie PsbF, PsbI und PsbT zeigten sehr intensive Signale, wohingegen PsbJ, PsbL und PsbM sehr schwache Signalintensitäten aufwiesen. Diese Beobachtung erfolgte nicht nur bei allen Komplexen aus Chloroplasten, sondern auch bei Extraktionen nahe der Lauffront aus der BN-PAGE von Membranproteinextraktionen aus Etioplasten. PsbN, welches ausschließlich in Etioplasten gefunden wurde, wies dabei die niedrigste Signalintensität von allen identifizierten LMW-Proteinen auf (Abb. 24 A). Bei PsbX war auffällig, dass in Extraktionen aus Etioplasten die Signalintensität sehr niedrig war, wohingegen bei Extraktionen aus Chloroplasten nahe der Lauffront der BN-PAGE sehr intensive Signale detektiert werden konnten (Abb. 24 B, C). Alle anderen Untereinheiten zeigten sowohl in Etioplasten, als auch in Chloroplasten keine Unterschiede bezüglich ihrer Signalintensität. Grundsätzlich stellte sich dadurch die Frage, inwieweit die einzelnen Untereinheiten ein unterschiedliches Ionisierungsverhalten aufwiesen und ob diese quantitativ mittels FBM-Lösung aus der BN-PAGE extrahiert worden sind.



**Abb. 24** Signalintensitäten von PsbN und PsbX

Die Extraktion von PsbN (A) erfolgte aus einer BN-PAGE einer Membranproteinextraktion aus Etioplasten. Die Signalintensität ist nur um ca. 50% höher als das Hintergrundrauschen. Diese Signale waren die schwächsten, die noch eindeutig identifizierbar waren und deren MSMS-Spektren noch interpretierbar waren. PsbX wurde sowohl in Etioplasten (B), als auch in Chloroplasten (C) nahe der Lauffront der BN-PAGE gefunden. Die Signalintensität war in Chloroplasten bei PsbX grundsätzlich deutlich höher als bei Extraktionen aus Etioplasten.

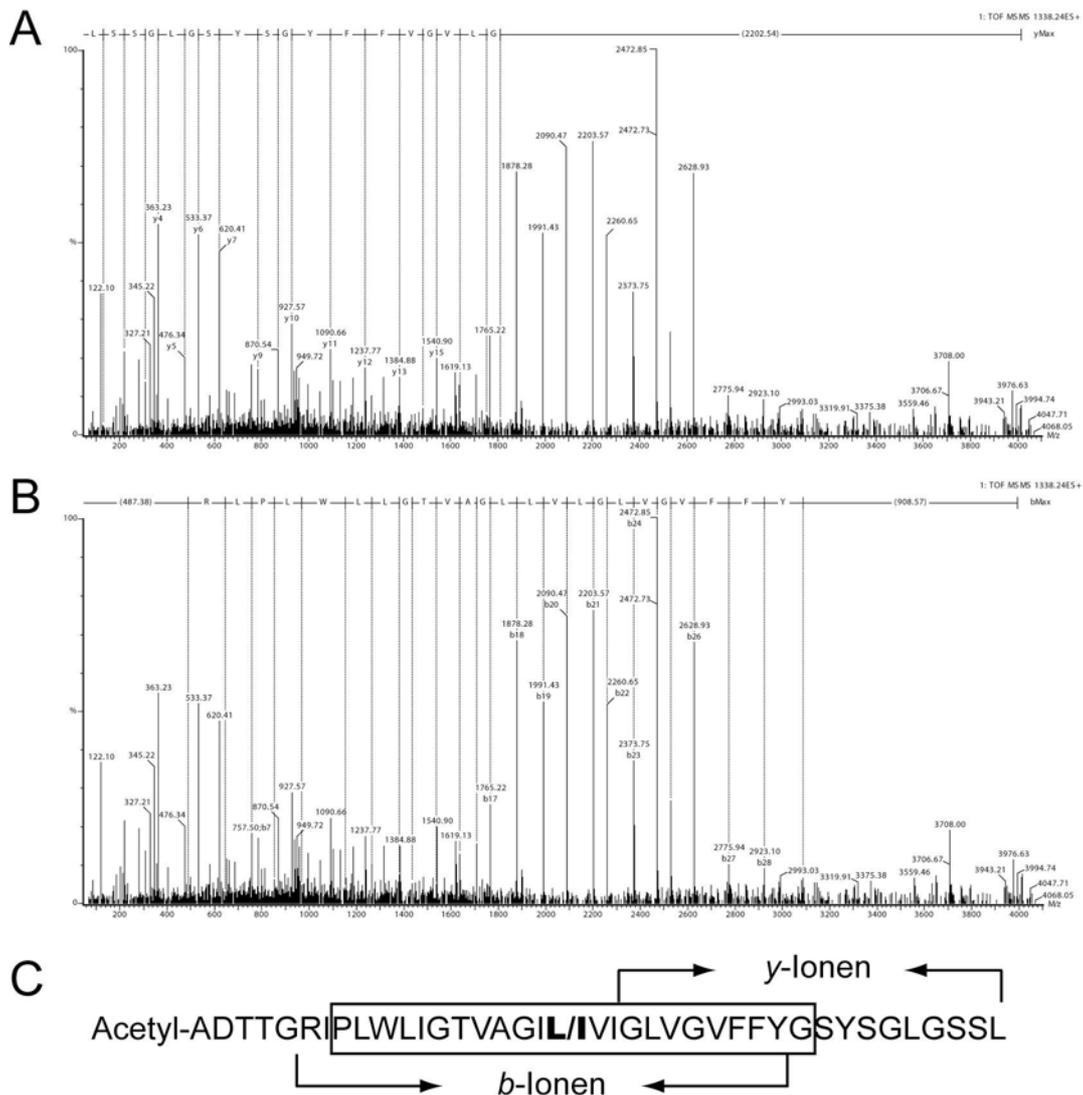
Grundsätzlich weisen verschiedene Peptide und Proteine eine unterschiedliche Ionisierungseffizienz auf. Bezüglich der identifizierten LMW-Proteine war dabei ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Signalintensität und vorhandenen Ladungsträgern zu erkennen. PsbJ, L und M wiesen nur jeweils ein oder zwei Ladungsträger auf, obwohl sie als höher geladene Signale detektiert wurden (vgl. Kap. 4.2.2). Diese Proteine waren durch sehr niedrige Signalintensitäten gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu waren PsbF, I und T durch intensive Signale gekennzeichnet und wiesen jeweils drei bis vier Ladungsträger auf. Folglich führte eine höhere Anzahl von potentiellen Ladungsträgern im Protein zu einer höheren Ionisierungseffizienz.

Die Extraktionseffizienz der LMW-Proteine wurde durch folgenden Versuch überprüft. Zunächst erfolgte ein tryptischer Verdau in Lösung von den mittels FBM-Lösung aus der BN-PAGE extrahierten Proteinen einer Gel-Bande des PSII Dimers. In der anschließenden Analyse mittels LC-MS konnten die tryptischen löslichen Peptide von PsbE, PsbH und PsbF identifiziert werden. Höhermolekulare Proteine, wie D1, D2 und LHC-Proteine von PSI konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Diese Gel-Bande des PSII Dimers wurde nach der Extraktion der LMW-Proteine mit FBM-Lösung zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann wurde ein tryptischer In-Gel Verdau durchgeführt, um zu überprüfen inwieweit noch Proteine in diesem Gel nachgewiesen werden können. Mittels LC-MS gelang dadurch der Nachweis von PsbE und PsbH, nicht aber von PsbF. Zudem waren höhermolekulare Proteine, wie D1 und D2, sowie LHC-Proteine von PSI, erneut nachweisbar. Folglich wurden mittels FBM-

Lösung Proteine mit ca. 5 kDa praktisch quantitativ extrahiert, wohingegen bei höherem Molekulargewicht ab ca. 8 kDa keine quantitative Extraktion mehr stattfand. Der selektive Nachweis von LMW-Proteinen mittels *offline* MS konnte dadurch erklärt werden, dass in der verwendeten Spraylösung mit 70% Aceton LMW-Proteine mit einem MG von weniger als ca. 10 kDa gut in Lösung gingen, was nicht für höhermolekulare Proteine galt, welche dadurch nicht mehr in den MS-Spektren beobachtet werden konnten.

#### 4.2.5. Fragmentationsanalyse

Die Identifikation der LMW-Proteine erfolgte durch *de novo* Sequenzierung. Dazu wurden durch MSMS-Experimente Fragmentationsspektren erzeugt die durch niederenergetische Stoßfragmentierung der intakten Proteine nach der Selektion mittels Quadrupol generiert wurden. Die dadurch entstandenen Serien von *y*- und *b*-Ionen führten zu Teilsequenzen des zu identifizierenden Proteins (Abb. 25).



**Abb. 25 Fragmentionenserien und mittels *de novo* Sequenzierung ermittelte Teilsequenzen von PsbJ**

Im MS-Spektrum wurde das Mutterion bei  $m/z$  1338,05  $[M+3H]^{3+}$  detektiert. Mittels Quadrupol erfolgte die Selektion dieses Ions und es wurde eine niederenergetische Stoßfragmentierung durchgeführt. Die Zuordnung der Fragmentionen zu Ionenserien erfolgte mit dem Programm MaxEnt 3. In den erzeugten Fragmentionensignalen konnten zwei Ionenserien ermittelt werden und zur *de novo* Sequenzierung herangezogen werden. Dies waren zum einen die  $y$ -Ionen von  $y_1$  bis  $y_{18}$  (A) und zum anderen  $b$ -Ionen von  $b_5$  bis  $b_{29}$  (B). Dadurch gelang es in diesem Spektrum 82% der Sequenz von PsbJ (P20175) experimentell zu identifizieren, wobei an Position 20 Leu oder Ile anstelle von Pro entsprechend des Eintrags P20175 in SwissProt/TrEMBL identifiziert werden konnte (C). Zudem konnte der gesamte Bereich der TMD, welche durch einen Rahmen gekennzeichnet ist, sequenziert werden.

Mittels *de novo* Sequenzierung von Fragmentionenspektren intakter LMW-Proteine konnte eine Sequenzabdeckung zwischen 20,8% (PsbH) und 87,2% (PsbJ) erreicht werden (vgl. Tab. 9). Dabei gelang bei Proteinen mit niedrigerem Molekulargewicht bei ca. 4 kDa eine höhere Sequenzabdeckung als bei Proteinen mit höherem Molekulargewicht. So konnte bei den größten in Rahmen dieser Studie identifizierten Proteinen PsbE und PsbH nur noch eine Sequenzabdeckung von 25,6%, bzw. von 20,8% erreicht werden. Proteine größer als 10 kDa konnten nicht identifiziert werden. Zum einen zeigten Signale solcher Proteine in den MS-Spektren nur eine sehr niedrige Signalintensität und zum anderen waren in MSMS-Spektren dieser Proteine keine Ionenserien mehr identifizierbar, die zu Teilsequenzen geführt hätten, die eine Identifikation des Proteins ermöglicht hätten. Somit war diese Methode der Proteinidentifikation nur für Proteine geeignet die ein Molekulargewicht von weniger als 10 kDa aufwiesen.

Für die *de novo* Sequenzierung wurden sowohl  $b$ - als auch  $y$ -Ionenserien herangezogen (Abb. 25). Auffällig war dabei, dass häufig unterschiedliche Sequenzbereiche von diesen Ionenserien abgedeckt wurden. Am Beispiel von PsbJ gelang etwa in einem Spektrum die Identifikation der  $y$ -Ionenserie von  $y_1$  bis  $y_{18}$ , sowie der  $b$ -Ionenserie von  $b_5$  bis  $b_{29}$ . Daraus resultierten insgesamt 34 identifizierte AS entsprechend einer Sequenzabdeckung von 82%, wobei nur 8 AS in beiden Ionenserien nachgewiesen werden konnten (Abb. 25 C). Durch die Fragmentionenanalyse unterschiedlicher Ladungszustände konnten teilweise zusätzliche Sequenzbereiche identifiziert werden. Auch lieferte die Analyse von  $K^+$ -Adduktionen teilweise zusätzliche Sequenzabschnitte (vgl. Kap. 5.2). Dadurch konnte bei PsbJ eine Sequenzabdeckung von insgesamt 87,2% erreicht werden.

Zwischen der Hydrophobizität eines Proteins oder einer Teilsequenz eines Proteins und der Identifizierbarkeit der Sequenz durch *de novo* Sequenzierung konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Membranintegrale Sequenzbereiche zeigten kein unterschiedliches Fragmentierungsverhalten verglichen mit löslichen Domänen. Am Beispiel von PsbJ konnte der gesamte Bereich der TMD durch *de novo* Sequenzierung ermittelt werden (Abb. 25 C).

Die Identifikation der kernkodierten LMW-Proteine PsbW, X und Y aus Gerste gelang nur durch den Vergleich mit den Sequenzen der homologen Proteine aus *O. sativa* und *A. thaliana*, da für Gerste die entsprechenden Sequenzen nicht zur Verfügung standen (Abb. 26).

### A PsbW

```
O.sa.      ERMSTEGTGLSLGLSNNLLGWILLGVFGLIWSLYTYTSDLEEDEESGGLSL
H.vu.      -----LGWILLGVFGLIWS-----EDEESGGLSL
                *****
```

### B PsbX

```
O.sa.      EAAPALSPSLKNFLLSIASGGVVLVAIVGAVVAVSNFDPVKRT
H.vu.      -----LLSIVSGGVVFAGIAGAVVAVSNFDPVKRT
                ****.*****:.*.*****
```

### C PsbY1

```
A.th.      AANASSDNRGLALLLPVPAIAWVLYNILQPAINQVNMRESK
O.sa.      AAAGADDNRGLALLLPVPAIAWVLYNILQPALNQLNRMRSQ
H.vu.      -----LLLFVVAPAIGWVLYNILQ-----
                **: :.***.*****
```

### D PsbY2

```
A.th.      AAEAAAASS-DSRGQLLLIVVTPALLWVLYNILQPALNQINKMRSGD
O.sa.      AAEAAAEEGGDNRGLLLLFVVAPAIAWVLYNILQPALNQLNRMRS-D
H.vu.      -----LLLFVVAPAIGWVLYNILQ-----
                ***:**:**: *****
```

**Abb. 26 Sequenzalignment der kernkodierten Untereinheiten PsbW, PsbX und PsbY**

Es erfolgte ein Alignment identifizierter Teilsequenzen mit den entsprechenden homologen Proteinen aus *Oryza sativa* (O.sa.) sowie *Arabidopsis thaliana* (A.th.). Ermittelte Teilsequenzen aus *H. vulgare* (H.vu.) zeigten zu 100% eine Sequenzübereinstimmung mit PsbW aus *O. sativa* (Q5ZBY9) (A) und zu 83,3% zu PsbX aus *O. sativa* (Q10LL7) (B). Bei PsbY, welches beim Import in PsbY1 und PsbY2 prozessiert wird, wurden die Prozessierungsschnittstellen von PsbY aus *A. thaliana* (O49347) aus SwissProt/TrEMBL durch ein Sequenzalignment auf PsbY aus *O. sativa* (Q6ZJ41) übertragen, da für dieses Protein keine entsprechenden Daten vorlagen (C, D). Die ermittelte Teilsequenz aus *H. vulgare* zeigte dabei zu PsbY2 aus *O. sativa* eine Übereinstimmung von 94,7% (D), wohingegen die Übereinstimmung zu PsbY1 nur bei 73,7% lag (C).

Das Alignment erfolgte mit dem Programm CLUSTALW (Thompson et al., 1994). Identische Aminosäuren sind mit \* gekennzeichnet. Ein Aminosäureaustausch durch eine in ihren Eigenschaften sehr ähnliche Aminosäure ist mit : gekennzeichnet. Ein Austausch durch eine Aminosäure mit abgeschwächter Ähnlichkeit ist mit . gekennzeichnet.

Identifizierte Teilsequenzen zeigten zu PsbW aus *O. sativa* eine Übereinstimmung von 100%, wobei 46,2% der Sequenz von *O. sativa* abgedeckt wurde. Bei PsbX lag die Übereinstimmung der identifizierten Teilsequenz bei 83,3%, wobei 69,8% der Sequenz von *O. sativa* abgedeckt wurde. Die Identifikation von PsbY gestaltete sich schwieriger. Für *A. thaliana* wurde gezeigt, dass PsbY während des Imports in die Plastide in zwei sehr ähnliche Proteine, PsbY1 und PsbY2, prozessiert wird (Gau et al., 1998). In Gerste gelang jedoch nur

die Identifikation von einem Protein, welches zu 94,7% mit PsbY2 aus *O. sativa* übereinstimmte. Zu PsbY1 war nur eine Übereinstimmung von 73,7% vorhanden, weshalb ausschließlich der Nachweis für die Existenz von PsbY2 in Gerste erbracht werden konnte. Ein entsprechendes Signal von PsbY1 konnte nicht nachgewiesen werden.

## 5. Niedermolekulare Untereinheiten des Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplexes

Der Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex findet sich in einer monomeren und einer dimeren Form sowohl in Etioplasten, als auch in Chloroplasten. Erfolgte die Auftrennung dieser Komplexe mittels BN-PAGE, so gelang bislang durch tryptischen In-Gel Verdau nur die Identifikation der vier großen Untereinheiten Cyt *f* (PetA), Cyt *b<sub>6</sub>* (PetB), Rieske Fe-S-Protein (PetC) und Cyt *b<sub>6</sub>f*-Untereinheit IV (PetD). Dem Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex werden aber noch vier weitere niedermolekulare Untereinheiten, PetG, L, M und N zugeordnet, deren massenspektrometrischer Nachweis nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung bislang nicht möglich war.

### 5.1. Identifikation der LMW-Proteine des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes

Die Extraktion der niedermolekularen Untereinheiten des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes aus der BN-PAGE erfolgte entsprechend der Extraktion der LMW-Proteinen von PSI und PSII im Ultraschallbad mit der FBM-Extraktionslösung aus 50% Ameisensäure, 40% 1-Butanol und 10% Methanol (vgl. Kap. 4.1.1). Dadurch gelang die Identifikation aller vier bekannten niedermolekularen Untereinheiten (Tab. 10).

**Tab. 10** Niedermolekulare membranintegrale Untereinheiten des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes

Protein	Acc.-Nr. <sup>1)</sup>	K <sup>2)</sup>	GRAVY <sup>3)</sup>	Intensivstes Signal ( <i>m/z</i> )	Gemessene MM <sup>4)</sup> [Da]	Berechnete MM <sup>5)</sup> [Da]	Δ <sup>6)</sup> [Da]	[%]	Modifikationen
PetG	A1E9K9	P	1.114	1049.83 [M+4H] <sup>4+</sup>	4195.32	4167.32	28.00	81.1	N-Formyl-Met
PetL	A1E9K8	P	1.448	1157.03 [M+3H] <sup>3+</sup>	3468.09	3424.00	44.09	54.8	N-Formyl-Met MetO
PetM	-	N	0.792	1365.40 [M+3H] <sup>3+</sup>	4093.20	4093.14	0.06	84.6 <sup>7)</sup>	Transitpeptid entfernt
PetN	A1E9I0	P	1.545	1071.55 [M+3H] <sup>3+</sup>	3211.65	3167.69	43.96	75.9	N-Formyl-Met MetO

<sup>1</sup> Datenbankeintrag von *Hordeum vulgare* in SwissProt/TrEMBL

<sup>2</sup> Kernkodierte (N) oder plastidär kodierte (P) Proteine

<sup>3</sup> Hydrophobizität der Peptide berechnet nach Kyte & Doolittle (Kyte et al., 1982)

<sup>4</sup> Experimentell bestimmte Molekularmasse berechnet aus dem Signal in Spalte 5 nach interner Massenkorrektur auf Basis von Pheophytin *a* (871.5737 [M+H]<sup>1+</sup>) oder CBB-G250 (832.309 [M+H]<sup>1+</sup>)

<sup>5</sup> Theoretisch berechnete Molekularmasse entsprechend der Aminosäuresequenz in SwissProt/TrEMBL

<sup>6</sup> Massendifferenz zwischen experimentell ermitteltem und theoretisch berechnetem Molekulargewicht

<sup>7</sup> Durch den Vergleich mit PetM aus *A. thaliana* (Q9SZY6) gelang eine Sequenzabdeckung von 100%

Bei diesen Untereinheiten des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes handelte es sich um sehr kleine Proteine zwischen 3,2 und 4,2 kDa, welche jeweils durch eine TMD gekennzeichnet waren. Durch niederenergetische Stoßfragmentierung und *de novo* Sequenzierung gelang eine Sequenzabdeckung zwischen 54,8 und 84,6%. Dabei wiesen PetL und PetN mit GRAVY-Werten von 1,448 bzw. 1,545 die höchsten Hydrophobizitätswerte aller gemessenen LMW-Proteine in dieser Arbeit auf. PetG wies mit einem Wert von 1,114 eine etwas niedrigere Hydrophobizität auf und PetM war mit 0,792 das Protein mit der niedrigsten Hydrophobizität dieser Gruppe von Proteinen. Auffällig war die Beobachtung, dass alle Untereinheiten intensive Signale von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>-Adduktionen zeigten. Ein Vergleich der jeweils aufgetretenen Ladungszustände mit den potentiellen Ladungsträgern im Molekül zeigte, dass deutlich höher geladene Zustände beobachtet wurden, als potentielle Ladungsträger im jeweiligen Protein vorhanden waren. So enthielt PetN nur einen, PetG und L zwei, sowie PetM drei Ladungsträger. Beobachtet wurden aber Ladungszustände zwischen drei und fünf Ladungen, wobei PetN im Vergleich zu den anderen Proteinen die Signale mit der geringsten Intensität aufwies. Dadurch wurde die Beobachtung bestätigt, wonach die Signalintensität und die Tendenz zur Bildung von Alkalimetall-Adduktionen nicht mit der Hydrophobizität des Proteins sondern mit der Anzahl an potentiellen Ladungsträgern korreliert (vgl. Kap 4.2.2 und Kap. 4.2.4). Bei den drei plastidär kodierten Untereinheiten PetG, L und N wurde jeweils N-Formyl-Met als N-terminale Modifikation festgestellt. Die kernkodierte Untereinheit PetM zeigte nach der Abspaltung der Transitsequenz keine weitere Modifikation der N-terminalen AS (vgl. Kap. 5.2). Darüber hinaus zeigten alle vier Untereinheiten intensive Signale, die auf der Oxidation von Met zu Methioninsulfoxid beruhten. Insbesondere PetL und PetN zeigten sehr intensive Signale in der oxidierten Form, wohingegen die nichtoxidierte Formen nur sehr schwache Signale nahe dem Hintergrundrauschen lieferten.

Der Nachweis dieser vier Untereinheiten gelang jeweils in der monomeren und in der dimeren Form des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes. Darüber hinaus konnte zwischen Etioplasten und Chloroplasten weder im Monomer, noch im Dimer ein Unterschied festgestellt werden. Der Nachweis dieser vier Untereinheiten gelang dabei ausschließlich im Bereich der beiden Assemblierungsformen des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes. Es erfolgte keine Detektion entsprechender Signale nahe der Lauffront oder in einem höhermolekularen Bereich der BN-PAGE. Somit konnte gezeigt werden, dass diese vier Untereinheiten auch in der BN-PAGE fest an den Komplex gebunden vorliegen und ein möglicher Unterschied zwischen Monomer und Dimer nicht auf einer dieser Untereinheiten beruht.

## 5.2. Ermittlung der vollständigen Sequenz von PetM aus Gerste

PetM ist die einzige der vier niedermolekularen Untereinheiten des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes welche kernkodiert ist. Da für PetM aus Gerste keine Sequenzinformationen in SwissProt/TrEMBL vorlagen, erfolgte die Identifikation durch den Vergleich mit den Sequenzen von PetM aus *A. thaliana* und *O. sativa*. Dabei gelang die Identifikation der vollständigen Sequenz von PetM aus Gerste (Abb. 27).

```

A.th. (TP)      M-----KVSYITGLNSYGGGLKAQNNKVVSMGSP LCTEQCFAN
O.sa. (TP)      MASLSMATTLP SLAGAAPAARKRSGVTYVEGMNAYSGLKALN-KVTLLGV RKTADYSFAK
*                               *::: *:::* .***** * ** .:*      :: .**:

A.th. (TP)      VVMSLK--GRRGNGGALSTTC
O.sa. (TP)      VVAKLSPAGGKSRGGAFGAQC
** .*. * :..***:.: *

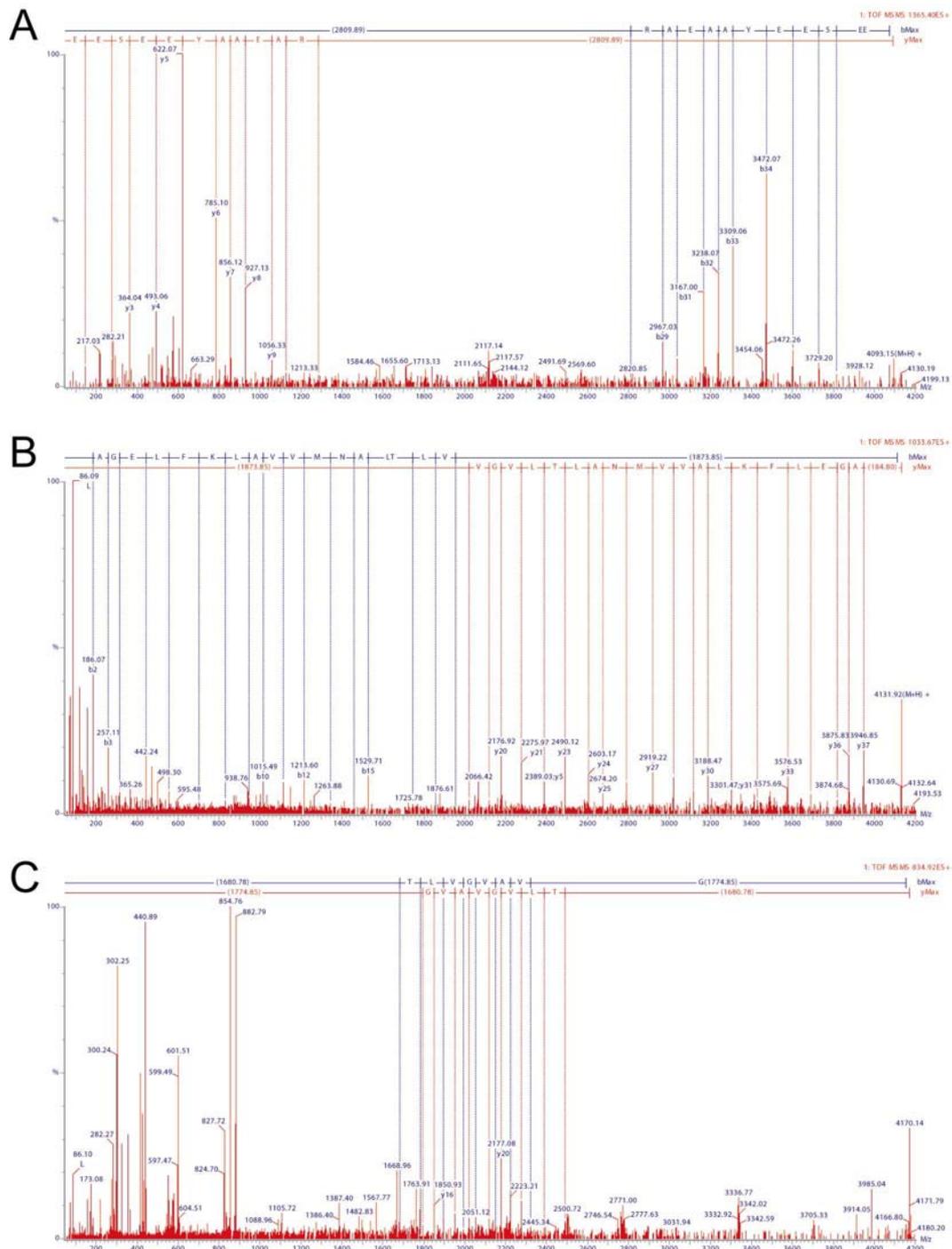
A.th.           NAVGEIFKIAAIMNALT LVGVAVG FVLLRIETSVEEAEAE
O.sa.           NAAGEIFRIAVIMNGLVLVGVAVG FVLLRVEAAVEESE
H.vu.           NAAGEIFKIAVVMNALT LVGVAVG FVLLRAEAAEYEESE E
** .*****:*. :**.* .***** *::: **:*

1365.40 [M+3H]3+                                     RAEAAEYEESE E
1033.67 [M+K+3H]4+                                AGEIFKIAVVMNALT LVGV
834.92 [M+2K+3H]5+                                TLVGVAVG
berechnet:      NA                                     FVLL
    
```

**Abb. 27 Ermittlung der vollständigen murenen Sequenz von PetM aus Gerste**

Es erfolgte ein Alignment identifizierter Teilsequenzen von PetM aus *Hordeum vulgare* (H.vu.) mit PetM aus *Arabidopsis thaliana* (A.th.) (Q9SZY6), sowie PetM aus *Oryza sativa* (O.sa.) (Q7Y0C9). Die Transitpeptide (TP) von *A. thaliana* und *O. sativa* zeigten deutliche Unterschiede in der AS-Sequenz und wiesen nur zu 30% identische Sequenzabschnitte auf. Mittels *de novo* Sequenzierung gelang es unterschiedliche Bereiche von PetM aus *H. vulgare* zu ermitteln, indem Fragmentationenspektren von unterschiedlichen Ladungszuständen, sowie K<sup>+</sup>-Adduktionen interpretiert wurden. Dazu wurden die Fragmentationenspektren der Signale 1365,40 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1033,67 [M+K+3H]<sup>4+</sup> und 834,92 [M+2K 3H]<sup>5+</sup> herangezogen (vgl. Abb. 28). Durch den Vergleich mit PetM aus *A. thaliana* und *O. sativa* gelang so eine vollständige Identifikation der Sequenz. Die AS Leu und Ile konnten massenspektrometrisch nicht unterschieden werden und sind entsprechend der homologen AS angegeben. Das Alignment erfolgte mit dem Programm CLUSTALW (Thompson et al., 1994). Identische Aminosäuren sind mit \* gekennzeichnet. Ein Aminosäureaustausch durch eine in ihren Eigenschaften sehr ähnliche Aminosäure ist mit : gekennzeichnet. Ein Austausch durch eine Aminosäure mit abgeschwächter Ähnlichkeit ist mit . gekennzeichnet.

Der Vergleich der Sequenzen von PetM aus *A. thaliana* und *O. sativa* zeigte zunächst, dass die Transitpeptide deutliche Unterschiede aufwiesen und nur zu 30% identische AS in der Sequenz vorlagen. Die Sequenzen der murenen Proteine hingegen wiesen eine Übereinstimmung von 72,5% auf. Mittels *de novo* Sequenzierung gelang es 84,6% der Sequenz von PetM aus Gerste experimentell zu ermitteln, wobei durch den Vergleich mit den Sequenzen aus *A. thaliana* und *O. sativa* eine vollständige Ermittlung der Sequenz gelang. Die hohe experimentelle Sequenzabdeckung konnte dadurch erreicht werden, dass verschiedene Ladungszustände und K<sup>+</sup>-Adduktionen von PetM ein signifikant unterschiedliches Fragmentierungsverhalten aufwiesen (Abb. 28).



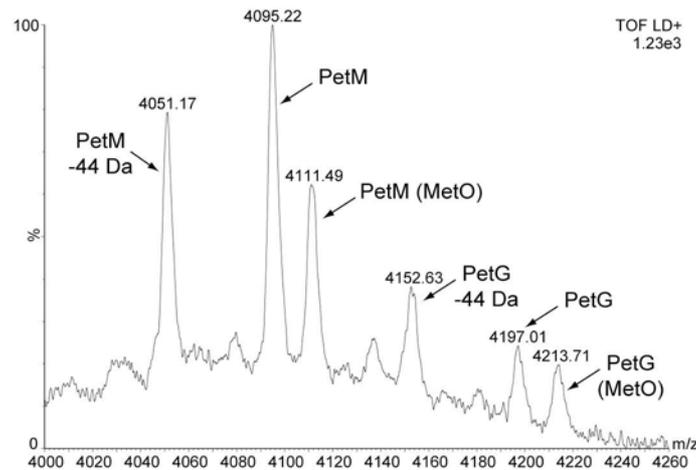
**Abb. 28** Fragmentationsspektren verschiedener Ladungszustände von PetM

Im MS-Spektrum wurden folgende Mutterionen bei  $m/z$  1365,40  $[M+3H]^{3+}$  (A), 1033,67  $[M+K+3H]^{4+}$  (B) und 834,92  $[M+2K+3H]^{5+}$  (C) ausgewählt. Mittels Quadrupol erfolgte die Selektion dieser Ionen und es wurde jeweils eine niederenergetische Stoßfragmentierung durchgeführt. Die Zuordnung der Fragmentionen zu Ionenserien erfolgte mit dem Programm MaxEnt 3. In den erzeugten Fragmentionensignalen konnten jeweils  $y$ - und  $b$ -Ionenserien ermittelt und zur *de novo* Sequenzierung herangezogen werden. Dabei zeigten die verschiedenen Ladungs- und Adduktionenzustände ein signifikant unterschiedliches Fragmentierungsverhalten. Im Ladungszustand  $[M+3H]^{3+}$  gelang die Identifikation von 11 C-terminalen AS (A), wohingegen im Zustand  $[M+K+3H]^{4+}$  19 AS nahe des N-Terminus identifiziert werden konnten (B). Der Zustand  $[M+2K+3H]^{5+}$  lieferte eine Teilsequenz von 8 zentral gelegenen AS (C). Dadurch gelang es insgesamt 84,6% der Sequenz von PetM experimentell zu identifizieren.

Die niederenergetische Stoßfragmentierung führte beim ausschließlich protonierten Ladungszustand  $1365.40 [M+3H]^{3+}$  zu Signalen, welche die Identifikation von 11 C-terminal gelegenen AS ermöglichte. Dabei gelang die Identifikation der  $y$ -Ionen  $y_1$  bis  $y_{11}$ , sowie der  $b$ -Ionen  $b_{28}$  bis  $b_{37}$  woraus die Sequenz RAEAAAYEESEE ermittelt werden konnte. Die Fragmentierung des einfachen  $K^+$ -Adduktions  $1033.67 [M+K+3H]^{4+}$  lieferte ein völlig anderes Ergebnis. In diesem Spektrum gelang die Zuordnung der  $y$ -Ionen  $y_{18}$  bis  $y_{37}$ , sowie der  $b$ -Ionen  $b_2$  bis  $b_{18}$ , weshalb 19 N-terminal gelegene AS mit der Sequenz AGEIFKIAVVMNALTLVGV identifiziert werden konnten. Schließlich gelang mit dem zweifachen  $K^+$ -Adduktion  $834,92 [M+2K+3H]^{3+}$  die Identifikation der  $y$ -Ionen  $y_{15}$  bis  $y_{23}$  und der  $b$ -Ionen  $b_{16}$  bis  $b_{23}$ . Dadurch konnte die acht AS umfassende Teilsequenz TLVGVAVG ermittelt werden. Zwischen diesen identifizierten AS verblieb eine Lücke von 472,3 Da und N-terminal verblieb ein Bereich von 185,1 Da, wo keine Fragmentionen identifizierbar waren. Der Vergleich mit den homologen Sequenzen von PetM aus *A. thaliana* und *O. sativa* ergab, dass bei beiden Organismen in diesen Bereichen von PetM die Sequenzen NA sowie FVLL vorlagen. Die jeweiligen Molekularmassen dieser AS entsprachen exakt den beobachteten Lücken in der Sequenz aus Gerste. Dadurch gelang die vollständige Identifikation der Sequenz von PetM. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die AS Leu und Ile massenspektrometrisch nicht unterschieden werden konnten, da diese ein identisches Molekulargewicht aufweisen. In der ermittelten Sequenz für PetM aus Gerste wurde jeweils Leu oder Ile entsprechend der homologen Sequenzen aus *A. thaliana* und *O. sativa* angegeben.

### 5.3. Nachweis von LMW-Proteinen mittels MALDI-MS

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Identifikation von LMW-Proteinen nach der Extraktion aus Gelen ausschließlich durch *offline* ESI-MS durchgeführt. Grundsätzlich sollte jedoch auch überprüft werden, ob der Nachweis dieser niedermolekularen und hydrophoben intakten Proteine auch durch MALDI-MS möglich ist. Dazu wurden die LMW-Proteine einer Bande des Dimers des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes aus Etioplasten extrahiert und nach der Aufreinigung mittels Acetonfällung in einer Lösung aus 70% Aceton 10% 2-Propanol und 0,1% Trifluoressigsäure aufgenommen. Diese Lösung wurde dann auf die bereits auskristallisierte Matrix CHCA in einem Dünnschichtverfahren aufgetragen (vgl. Material und Methoden, C.2.9.3). Mit dieser Methode gelang der Nachweis von PetG und PetM (Abb. 29).



**Abb. 29 MALDI-MS Spektrum von PetG und PetM**

Die Identifikation mittels MALDI-MS von PetG und PetM gelang im Cyt *b<sub>6</sub>f* Dimer aus Etioplasten. Neben den unmodifizierten Proteinen konnten Signale detektiert werden, die auf die Oxidation der Methionine schließen lassen (MetO). Darüber hinaus wurden jeweils Signale im Abstand von -44 Da beobachtet, was auf eine Decarboxylierung von Glutaminsäure zurückzuführen sein könnte. Die Präparation der MALDI-Probe erfolgte nach einem Dünnschichtverfahren. Die aufgereinigten intakten LMW-Proteine wurden in 70% Aceton, 10% 2-Propanol und 0,1% Trifluoressigsäure aufgenommen und auf eine bereits auskristallisierte Matrixschicht aus CHCA aufgetragen. Die Messung erfolgte an dem Gerät MALDI MicroMX (Waters).

Die Bestimmung der monoisotopischen Masse der detektierten Proteine war mit dem Gerät MALDI MicroMX aufgrund des hohen Molekulargewichts von ca. 4,1 kDa und der niedrigen Auflösung in diesem Bereich nicht möglich. Es konnte nur die durchschnittliche MM bestimmt werden. Für PetM wurde eine durchschnittliche MM von 4095,22 Da und für PetG von 4197,01 Da ermittelt. Die theoretisch berechnete durchschnittliche MM betrug bei PetM 4095,74 Da und bei PetG 4198,03 Da. Somit stimmten die experimentell ermittelten Werte in Rahmen der Messgenauigkeit des Gerätes gut mit den theoretisch bestimmten Werten überein. Es konnte bei beiden Proteinen im Abstand von +16 Da ein zusätzliches Signal detektiert werden, was auf eine partielle Oxidation des Met schließen ließ. Die Signalintensität dieser Signale war dabei relativ zum nicht oxidierten Signal niedriger, als bei Messungen mittels ESI. Darüber hinaus wurde jeweils ein Signal im Abstand von -44 kDa zum Signal des unmodifizierten Proteins detektiert. Diese Modifikation wurde mittels ESI-MS nicht detektiert. Es könnte sich um eine MALDI-spezifische Reaktion der Decarboxylierung von Glutaminsäure gehandelt haben (Nakamura et al., 1996). Auffällig war, dass weder bei PetG, noch bei PetM Signale von Alkalimetall-Adduktionen nachgewiesen werden konnten. Die Untereinheiten PetL und PetN konnten nicht detektiert werden. Diese Proteine waren bereits in den Messungen mittels ESI durch deutlich niedrigere Signalintensitäten gekennzeichnet, als PetG und PetM. Es könnte sein, dass diese Proteine bei den Messungen mittels MALDI bereits unter der Detektionsgrenze lagen.

## **E. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurden einzelne Subproteome der inneren Membranen aus Etioplasten und Chloroplasten untersucht. Der Schwerpunkt der Analysen wurde auf verschiedene Subproteome aus Etioplasten gesetzt und Analysen an Chloroplasten wurden zum Vergleich durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst eine Fraktionierung des plastidären Proteoms durch verschiedene gelelektrophoretische Trennmethode und anschließend eine detaillierte Identifizierung und Charakterisierung mittels verschiedener MS-Techniken.

### **1. Bedeutung der N-Termini von PORA und PORB**

Ein Teilprojekt dieser Arbeit hatte die exakte Identifikation des N-Terminus von PORA und PORB aus Gerste zum Ziel. Eine exakte Definition dieser N-Termini und somit indirekt auch der Länge der Transitpeptide ist von entscheidender Bedeutung, da für PORA, nicht aber für PORB, die Bindung des Pigments Pchlid am Transitpeptid postuliert wurde (Reinbothe et al., 1997; Reinbothe et al., 2008). Bisher existiert jedoch keine zuverlässige Identifikation der N-Termini dieser Proteine und somit sind auch die Sequenzabschnitte der jeweiligen Transitpeptide selbst noch nicht klar definiert. Aus diesem Grund ist die Aussage von Reinbothe *et al.* über die Lage eines Bindemotivs für Pchlid innerhalb des Transitpeptids spekulativ (Reinbothe et al., 2008).

#### **1.1. Terminal Proteomics: Die Identifikation der Enden eines Proteins**

Im Bereich der funktionalen Proteomics ist nicht nur die Identifikation eines Proteins von Bedeutung, sondern Ziel ist auch eine weitergehende Charakterisierung des Proteins. Ein wesentlicher Aspekt ist dabei im Rahmen der terminalen Proteomics die exakte Identifikation der N- und C-terminalen Enden eines Proteins (Nakazawa et al., 2008). Die Charakterisierung dieser Bereiche eines Proteins ist deshalb von Bedeutung, da es aufgrund von Gendaten auf Basis von DNA- und mRNA-Sequenzen häufig nicht möglich ist den exakten Bereich des muren Proteins vorherzusagen. Dies trifft vor allem auf Proteine mit einem oder mehreren Transitpeptiden zu, die kernkodiert sind und in ein definiertes Zellorganell importiert werden. Dabei kommt es zu einer oder mehreren Prozessierungen bei der die entsprechenden

Transitpeptide vom maturen Protein abgetrennt werden (Richter et al., 1998; Bruce, 2000). Es wurden zwar verschiedene Programme zur theoretischen Vorhersage der Prozessierungsschnittstellen, sowie der intrazellulären Lokalisierung von Proteinen entwickelt, wie etwa ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) oder SignalP (Bendtsen et al., 2004; Emanuelsson et al., 2007), doch diese Programme erreichen bezüglich der korrekten Vorhersage der Lokalisierung nur zu 85% richtige Ergebnisse und die Wahrscheinlichkeit einer zutreffenden Vorhersage der Prozessierungsschnittstelle ist noch deutlich niedriger (Emanuelsson et al., 2000; Gomez et al., 2003). Eine Kalkulation der Länge des Transitpeptids wurde auch für pPORA und pPORB mit dem Programm ChloroP vorgenommen. Bezüglich pPORB zeigte ChloroP eine Abweichung von zwei AS zu der experimentell ermittelten Schnittstelle zwischen Transitpeptid und maturem Protein. Dieses Ergebnis kann als korrekte Vorhersage gewertet werden, da für ChloroP eine Abweichung von maximal zwei AS des theoretisch vorhergesagten N-Terminus vom tatsächlich vorliegenden N-Terminus als noch tolerierbar definiert worden ist (Emanuelsson et al., 1999; Gomez et al., 2003). Für pPORA zeigte die Kalkulation jedoch eine Abweichung von 43 AS vom experimentell bestimmten N-Terminus. Entsprechend der Vorhersage von ChloroP wäre somit das Transitpeptid von PORA nahezu doppelt so lange und der resultierende N-Terminus wäre nicht homolog zum N-Terminus von PORB. Diese signifikante Abweichung zeigt deutlich die Bedeutung einer experimentellen Verifizierung von Aussagen, die auf theoretischen Kalkulationen beruhen.

## **1.2. Methodische Ansätze zur Identifikation des N-Terminus**

Ursprünglich erfolgte die Identifikation N-terminaler AS mittels Edman-Abbau (Edman, 1970). Diese Methode der N-terminalen Sequenzierung, die auf dem stufenweisen chemischen Abbau einzelner AS beruht, setzt aber eine unmodifizierte  $\alpha$ -Aminogruppe voraus. Schätzungen gehen jedoch davon aus, dass ca. 30 bis 80% der N-Termini kovalent modifiziert sind und somit für diese Art der Sequenzierung nicht zugänglich sind (Meinzel et al., 2005). Darüber hinaus erfolgten in älteren Arbeiten Identifikationen von N-terminalen Peptiden nach einem proteolytischen Verdau nur auf der Basis, dass kein weiteres Peptid mehr gefunden werden konnte, welches noch näher am N-terminalen Endes des unprozessierten Proteins liegt. Dadurch wurden für PORA aus Gerste zwei widersprüchliche potentielle N-Termini publiziert, die Transitpeptide mit 74 AS (Schulz et al., 1989), bzw. 68 AS (Benli et al., 1991) zur Folge hätten. Moderne massenspektrometrische Methoden

weisen diesen Nachteil nicht auf und ermöglichen grundsätzlich die Identifikation aller Sequenzbereiche eines Proteins unabhängig von posttranslationalen Modifikationen. So besteht die Möglichkeit über die Bestimmung der Masse eines intakten Proteins die N-terminale AS zu berechnen, sofern Sequenzinformationen für das Protein bereits vorliegen. Durch MSMS-Experimente und *de novo* Sequenzierung kann die N-terminale AS gegebenenfalls auch direkt ermittelt werden (vgl. Kap. D.4.1.1). In der Regel findet jedoch ein proteolytischer Verdau der Proteine statt, wodurch Peptide generiert werden, die aufgrund der geringeren Größe deutlich besser für MSMS-Experimente und *de novo* Sequenzierung geeignet sind und alternativ dazu auch die Identifikation eines Proteins mittels PMF ermöglichen. Die Schwierigkeit besteht nun darin ein N-terminales Peptid zuverlässig von internen Peptiden zu unterscheiden. Im einfachsten Fall liegt bereits *in vivo* eine N-terminale Modifikation, wie etwa eine Acetylierung, an der  $\alpha$ -Aminogruppe vor. Da nach einem proteolytischen Verdau keine entsprechende kovalente Modifikation mehr auftreten kann, ist davon auszugehen, dass es sich bei einem entsprechenden Peptid um das N-terminale Peptid handelt. Zahlreiche Proteine erfüllen diese Bedingung jedoch nicht und es liegt eine freie  $\alpha$ -Aminogruppe vor. In der Literatur wurden verschiedene Methoden zur selektiven Markierung der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe beschrieben, wodurch diese von internen  $\alpha$ -Aminogruppen unterschieden werden können. Dabei wurden die Reagenzien Nicotinsäure (Munchbach et al., 2000), 5-Bromnicotinsäure (Miyagi et al., 1998), 4-Sulfophenyl-isothiocyanat (Wang et al., 2004), Essigsäureanhydrid (Noga et al., 2005; Sanchez et al., 2007; Sanchez et al., 2007), sowie ein Ruthenium(II)-Komplex mit einer N-Succinimid-Gruppe als Kopplungsgruppe beschrieben (Okamura et al., 2005). Bei diesen Methoden muss aber berücksichtigt werden, dass neben der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe an den Seitenketten der AS Lys auch  $\epsilon$ -Aminogruppen vorliegen, welche sich chemisch nur geringfügig unterscheiden und somit ebenfalls partiell oder vollständig modifiziert werden können. Dies ist auch von Bedeutung, da Lys eine Schnittstelle für die Protease Trypsin ist, welche sehr häufig für den proteolytischen Verdau eingesetzt wird. Eine chemische Modifikation von Lys führt jedoch dazu, dass diese Schnittstelle nicht mehr bedient wird. Folglich wird nur noch Arg als Schnittstelle erkannt, wodurch signifikant größere Peptide entstehen. Das N-terminale Peptid wird in der Regel durch die Identifikation aller Peptide der Probe ermittelt, wobei häufig LC-MS-Techniken kombiniert mit Fragmentationenanalysen eingesetzt werden.

Ito *et al.* entwickelten eine Methode durch die selektiv die  $\epsilon$ -Aminogruppen mittels Guadinylierung modifiziert werden und die Markierung der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe erfolgt durch einen Ruthenium(II)-Komplex in einem zweiten Reaktionsschritt (Ito et al.,

2007). Anschließend erfolgt ein proteolytischer Verdau mit Chymotrypsin. Diese Methode hat gegenüber den oben genannten den Vorteil, dass ausschließlich das N-terminale Peptid mit dem Ruthenium(II)-Komplex modifiziert ist, nicht aber die internen Lys-haltigen Peptide. Ruthenium weist ein charakteristisches Isotopenmuster auf, welches sich signifikant von dem Isotopenmuster unterscheidet, das für unmodifizierte Peptide aufgrund des Anteils an  $^{13}\text{C}$  typisch ist. Dadurch kann das N-terminale Peptid sofort erkannt werden und eine Identifikation der internen Peptide ist nicht mehr nötig.

### 1.3. Methoden der selektiven Isolation N-terminaler Peptide

Auf Basis der chemischen Modifikation der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe besteht auch die Möglichkeit, das entsprechend modifizierte N-terminale Peptid selektiv von allen anderen Peptiden abzutrennen. Der Grundgedanke liegt darin, dass nach der Modifikation des N-Terminus und dem proteolytischen Verdau den neu entstandenen  $\alpha$ -Aminogruppen der internen Peptide durch eine weitere chemische Modifikation eine physikalische oder chemische Eigenschaft übertragen wird, die es ermöglicht das N-terminale Peptid selektiv von den internen Peptiden abzutrennen. Dadurch kann aus dem entsprechenden Fragmentationenspektrum die Sequenz des N-terminalen Peptides ermittelt werden und die übrigen Peptide treten nicht mehr in Erscheinung.

In der Literatur wurden bereits mehrere unterschiedliche methodische Ansätze beschrieben, wodurch die selektive Isolation des N-terminalen Peptids ermöglicht wird. Yamaguchi *et al.* entwickelten eine Methode mit der das N-terminale Peptid durch das Biotin-Avidin System isoliert wird (Yamaguchi *et al.*, 2007). Dabei werden zunächst die internen  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lys durch Guadinylierung blockiert. In einem zweiten Reaktionsschritt wird eine Biotin-Gruppe über eine Sulfo-N-Hydroxysuccinimid-Estergruppe an die  $\alpha$ -Aminogruppe des N-Terminus gekoppelt. Es erfolgt dann ein proteolytischer Verdau und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie wird das N-terminale Peptid aus dem Verdau isoliert. Durch eine Oxidationsreaktion mit Perameisensäure wird der Biotinrest wieder abgespalten und das isolierte Peptid kann massenspektrometrisch identifiziert werden. Bei einer alternativen Methode erfolgt zunächst die Acetylierung aller Aminogruppen und dann ein proteolytischer Verdau. Die Biotinylierung erfolgt an allen internen Peptiden, wodurch bei der anschließenden Affinitätschromatographie nur das N-terminale Peptid nicht gebunden wird (McDonald *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2006). Der Vorteil liegt hier zum einen in einer deutlich vereinfachten Reaktionsfolge und zum anderen können auch N-terminale Peptide

isoliert werden, deren N-Terminus bereits aufgrund einer natürlichen Modifikation der  $\alpha$ -Aminogruppe blockiert ist.

Eine anderen Ansatz, der nicht auf dem Biotin-Avidin System basiert, verfolgten Gevaert *et al.* (Gevaert et al., 2003). Diese Methode ist darauf ausgelegt möglichst viele Einzelproteine eines gesamten Proteoms ausschließlich über die N-terminalen Peptide zu identifizieren. Dazu erfolgt zunächst eine Acetylierung der Aminogruppen und anschließend ein tryptischer Verdau der gesamten Probe. In einer ersten HPLC-Fraktionierung erfolgt darauf eine Auftrennung aller Peptide über eine RP-Säule und die eluierenden Peptide werden in einzelnen Fraktionen aufgefangen. Dann erfolgt die kovalente Modifikation der  $\alpha$ -Aminogruppen der internen Peptide mit TNBS. Dadurch wird eine hydrophobe Gruppe eingeführt und in einem zweiten HPLC-Lauf weisen alle entsprechend modifizierten Peptide einen signifikanten hydrophoben Shift auf, was zu einer deutlich längeren Retentionszeit führt. Ausschließlich die N-terminalen Peptide weisen diesen Shift nicht auf und zeigen eine identische Retentionszeit im Vergleich zum ersten HPLC-Lauf. Dadurch werden die N-terminalen Peptide isoliert und die Identifikation der Proteine des zu analysierenden Proteoms wird ausschließlich über diese Peptide vorgenommen, wodurch die Komplexität der Gesamtprobe deutlich verringert wird. Auf Basis dieser Methode erfolgte die Entwicklung einer eigenen Methode zur selektiven Identifikation des N-terminalen Peptids eines gelelektrophoretisch isolierten Einzelproteins.

#### **1.4. Vorteile der eigenen Methode zur Bestimmung des N-Terminus**

Vergleicht man die verschiedenen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Identifikation N-terminaler AS, so fällt auf, dass bei einem Teil der Ansätze die N-terminalen Peptide zwar markiert werden, aber es erfolgt keine Abtrennung von den internen Peptiden, wodurch eine sehr komplexe Probe mit relativ großem Arbeitsaufwand analysiert werden muss. Andererseits wurden auch Methoden entwickelt um N-terminale Peptide abzutrennen, doch sind diese Methoden eher für die Analyse ganzer Proteome ausgelegt und die Identifikation eines Proteins erfolgt über das N-terminale Peptid, wodurch der Aufwand für eine Proteomanalyse deutlich verringert wird (Gevaert et al., 2003). Ziel der eigenen Entwicklung war eine präzise Markierung des N-Terminus kombiniert mit einer möglichst einfachen Methode zur Isolation des N-terminalen Peptids. Wichtig war darüber hinaus die Kompatibilität mit einer vorangehenden gelelektrophoretischen Auftrennung des zu analysierenden Proteins. Die Markierung der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe erfolgte deshalb

durch eine Acetylierung mit Essigsäureanhydrid, da dieser Schritt im PAG erfolgen kann. Anschließend erfolgt ein In-Gel Verdau mit Trypsin, wobei die Peptide des Proteins gleichzeitig aus dem Gel extrahiert werden und es kann bei der Hälfte der Probe der zweite Schritt der Modifikation interner  $\alpha$ -Aminogruppen mit TNBS erfolgen. Durch zwei UPLC-Läufe wird dann das N-terminale Peptid selektiv isoliert und identifiziert (siehe Abb. 8). Als störend erwies sich dabei die Beobachtung, dass acetylierte Peptide signifikant höhere Signale von Alkalimetall-Adduktionen während der Messung mittels ESI-MS bilden. Mortier *et al.* führen dies auf eine höhere Affinität von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ -Ionen auf Carbonyl- und vor allem Estergruppen zurück, wodurch es zu einer Anlagerung dieser Ionen an die Estergruppe kommt (Mortier et al., 2004). Die Verwendung von Ammoniumformiat anstelle von Ameisensäure in den Lösungsmitteln der UPLC führte zu einer deutlichen Verringerung dieser Addukte, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Verwendung von Ammoniumformiat zur Ionisierung mittels ESI nicht nur bei niedermolekularen organischen Molekülen möglich ist, sondern auch bei höhermolekularen Peptiden. Durch die neue Strategie wird die Signalintensität des ausschließlich protonierten Signals deutlich erhöht, wodurch die Identifikation der Sequenz vereinfacht wird. Insgesamt betrachtet ermöglicht diese Methode die präzise Identifikation des N-Terminus eines Proteins auf Basis einer vorangegangenen gelelektrophoretischen Trennung mit anschließender LC-MS basierter Identifikation des N-terminalen Peptides. Dabei können auch *in vivo* posttranslational an der  $\alpha$ -Aminogruppe modifizierte N-Termini identifiziert werden, da TNBS selektiv nur mit unmodifizierten primären Aminogruppen reagiert und somit die internen Peptide von dem *in vivo* modifizierten N-terminalen Peptid abgetrennt werden können.

## **1.5. Position der N-Termini von PORA und PORB**

Mit der Methode zur selektiven Isolation N-terminaler Peptide gelang der eindeutige Nachweis der N-terminalen AS von PORA und PORB aus Gerste, sowie von POR aus Erbse, wodurch mehrere Aussagen über die Position des N-Terminus, sowie der Prozessierung zum murenen Protein ermöglicht werden.

### **1.5.1. Homologe Lage der N-Termini von PORA und PORB**

Die erste wesentliche Aussage, die aus der Identifikation der N-terminalen AS von drei unterschiedlichen POR-Proteinen getroffen werden kann ist, dass die N-Termini homolog

zueinander sind. Bei PORA und PORB stimmen die N-Termini im Sequenzalignment exakt überein, wobei die letzte AS des jeweiligen Transitpeptides ein Gln ist (vgl. Abb. 11). Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm CLUSTALW erstellt und entspricht im Allgemeinen einem Sequenzalignment von PORA zu PORB in Holtorf *et al.* 1995 (Holtorf *et al.*, 1995). Bezüglich PORA wird deutlich, dass die Lage des tatsächlich vorliegenden N-Terminus signifikant von den bisher publizierten Positionen des N-Terminus abweicht. Speziell ist das Transitpeptid von PORA um 21 bzw. 27 AS kürzer als wie in zwei älteren Arbeiten vermutet (Schulz *et al.*, 1989; Benli *et al.*, 1991). Für den N-Terminus von PORB lag bislang kein experimenteller Nachweis vor, allerdings wird in SwissProt ein Transitpeptid mit einer Länge von 59 AS für PORB mit dem Vermerk „*potential*“ geführt (Ac. Nr. Q42850). Das experimentell ermittelte Transitpeptid ist um eine AS kürzer, als in diesem Eintrag von SwissProt. Reinbothe *et al.* hingegen nahmen für PORB ein Transitpeptid an, welches zu dem von Schulz *et al.* 1989 ermittelten Transitpeptid von PORA homolog ist (Reinbothe *et al.*, 2008).

Vergleicht man die Lage dieser beiden N-Termini mit dem N-Terminus von POR aus Erbse, so befindet sich dieser ebenfalls in diesem Bereich, ist allerdings relativ zu PORA um eine AS in aminoterminaler Richtung verschoben. Die N-terminale AS von POR aus Erbse wurde bereits experimentell von Spano *et al.* mittels Edman-Analyse identifiziert (Spano *et al.*, 1992). Dieses Ergebnis konnte durch die eigenen Messungen bestätigt werden. Darüber hinaus existiert für die drei Isoformen PORA (Q42536), PORB (P21218) und PORC (O48741) aus *A. thaliana* in der Datenbank von SwissProt jeweils ein Eintrag mit dem Vermerk „*potential*“, wonach die N-Termini aller dreier Isoformen exakt homolog zu dem N-Terminus von POR aus Erbse sind. Möglicherweise beruht die Vorhersage dieser N-Termini auf dem experimentell ermittelten Ergebnis von Spano *et al.* 1992 für POR aus Erbse. Entsprechend ist nach diesem Eintrag in SwissProt für alle drei Isoformen von POR aus *A. thaliana* die erste AS des maturen Proteins ein Gln. In Gerste findet sich an dieser Position bei PORA und PORB ebenfalls ein Gln. Im Gegensatz zum SwissProt Eintrag für *A. thaliana* konnte hier gezeigt werden, dass es sich bei Gln um die letzte AS des Transitpeptids und nicht um die erste AS des maturen Proteins handelt.

### 1.5.2. Mögliche Ursachen der alternativen N-Termini von PORB

Die Bestimmung der N-terminalen AS der maturen PORB aus Gerste führte zu dem überraschenden Ergebnis, dass nicht nur eine einzelne AS den N-Terminus repräsentiert,

sondern es konnten zwei zusätzliche N-terminale Peptide identifiziert werden, die um eine, bzw. zwei AS verkürzt waren. Auffällig waren dabei deutlich unterschiedliche Signalintensitäten der drei Peptide, die relativ zueinander in unabhängigen Messungen sehr ähnlich waren. Das intensivste Signal entsprach immer dem Peptid mit Ala-61 als erster AS des maturen Proteins. Die beiden verkürzten N-terminalen Peptide mit Ala-62, bzw. Ala-63 als erster N-terminaler AS zeigten immer deutlich schwächere Signalintensitäten. Dabei betrug die Signalintensität von Ala-62 ca. ein Viertel und von Ala-63 ca. ein Zehntel der Signalintensität des Peptides mit Ala-61 als N-terminaler AS. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass Ala-61 die überwiegend vorliegende N-terminale AS ist und somit ein Transitpeptid mit einer Länge von 60 AS vorliegt. Dieser N-Terminus ist auch exakt homolog zu dem N-Terminus von PORA, für den keine weiteren verkürzten Formen identifiziert werden konnten.

Der direkte Vergleich der ersten drei N-terminalen AS zwischen PORA und PORB zeigt, dass der dominante N-Terminus von PORB mit drei Ala beginnt, wohingegen der N-Terminus von PORA mit den AS Val-Ala-Thr beginnt. Darüber hinaus fällt auf, dass sich zwei AS vor der Schnittstelle zwischen dem Transitpeptid und dem maturen Protein ein konserviertes Arg befindet. Zwischen diesem Arg und der N-terminalen AS befinden sich bei PORA ein Thr und ein Gln und bei PORB ein Ala und ein Gln. Aminoterminal von diesem Arg befindet sich entweder ein Val (PORA) oder ein Ile (PORB). Richter *et al.* beschrieben eine Konsensussequenz für die allgemeine stromale Prozessierungspeptidase (*general stromal processing peptidase*, SPP) (Richter *et al.*, 1998; Richter *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2003), welche auch Grundlage für die Entwicklung des Programms ChloroP zur Vorhersage der N-terminalen AS war (Emanuelsson *et al.*, 1999). Nach dieser Konsensussequenz liegt die Prozessierungsschnittstelle C-terminal von einer der beiden basischen AS Arg oder Lys. N-terminal dieser basischen AS liegt in der Regel eine hydrophobe AS und zwar in den meisten Fällen Val oder Ile. Nach Arg oder Lys folgt in den meisten Fällen ein Ala, welches dann die erste AS des maturen Proteins wäre. Somit stimmt diese Konsensussequenz sehr gut mit den vorliegenden Sequenzen von PORA und PORB überein. Für PORB wurde von ChloroP tatsächlich diese Position Ala-59 als N-Terminus angegeben, aber für PORA erfolgte eine Vorhersage des N-Terminus mit einem Abstand von 45AS zu dieser entsprechenden Position, die nicht nachvollzogen werden kann.

Experimentell wurde jedoch ein N-Terminus identifiziert, der bei PORA zusätzlich um zwei weitere AS relativ zur theoretisch für die SPP zu erwartenden Schnittstelle verkürzt war und bei PORB war nicht nur eine Verkürzung von zwei, sondern zusätzlich um drei und vier AS

zu beobachten. Die Beobachtung, dass der mature N-Terminus ein bis zwei AS von der eigentlichen Schnittstelle der SPP entfernt liegt, wurde bereits mehrfach berichtet, worauf eine weitere Protease postuliert wurde, welche nach der Prozessierung durch die SPP ein bis zwei weitere AS vom N-Terminus abspaltet (Emanuelsson et al., 1999; Emanuelsson et al., 2000; Zybaïlov et al., 2008). Allerdings konnte diese hypothetische Protease bislang nicht direkt nachgewiesen werden und es wurde auch vermutet, dass möglicherweise die Schnittstelle durch die SPP nicht immer direkt nach der basischen AS Arg oder Lys liegt, sondern um einige AS versetzt vorliegt (Zybaïlov et al., 2008). Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass PORB drei alternative N-Termini aufweist. Eine vergleichbare Beobachtung wurde bislang nur für ein chloroplastidäres Protein, die Cystein-Synthase gemacht (Zybaïlov et al., 2008). Dieses Protein weist eine *in vivo* Acetylierung auf und zeigt zwei alternative N-Termini, wobei der kürzere um ein Ala verkürzt vorliegt. Dieses verkürzte Protein beginnt dann mit einem acetylierten Val als erste AS. Hierbei fällt auf, dass ebenfalls wie bei PORB ein Ala von der N-terminalen Verkürzung betroffen ist. Es sollte deshalb in einer weiteren Arbeit untersucht werden, ob entweder die SPP bei mehreren vorliegenden Ala unpräzise schneidet, oder ob eine weitere Protease vorliegt, welche nach der Prozessierung durch SPP vor allem Ala entfernt.

### **1.6. Das Transitpeptid von PORA enthält keine Pchlid-Bindestelle**

Für PORA und PORB wurden unterschiedliche Mechanismen des Imports in die Plastide beschrieben, nach denen nur PORB über den allgemeinen Importweg und durch die Komplexe TOC und TIC in das Stroma importiert wird (Reinbothe et al., 1997; Kim et al., 2004; Kim et al., 2005). PORA hingegen soll abhängig von der Anwesenheit des Substrates Pchlid importiert werden (Reinbothe et al., 1995; Reinbothe et al., 2000). Dieser Import soll nicht über den TOC/TIC Komplex sondern über einen alternativen Komplex den *Pchlid-dependent translocon complex* (PTC-Komplex) erfolgen (Reinbothe et al., 2004; Reinbothe et al., 2004). Von wesentlicher Bedeutung ist dabei die Bindung von Pchlid an das Transitpeptid von pPORA, wodurch der Import erst ermöglicht wird (Reinbothe et al., 1997). In jüngster Zeit erfolgte eine präzise Charakterisierung dieses Transitpeptides (Reinbothe et al., 2008). Danach existiert zum einen ein Erkennungsmotiv für den PTC-Komplex im Bereich der AS 17-30 nahe des N-terminalen Endes des Transitpeptides und zum andern konnte ein Motiv aus fünf AS nahe des C-terminalen Endes des Transitpeptides identifiziert werden, welches Pchlid bindet. Diese Motiv mit der Sequenz TTSPG weist eine Ähnlichkeit mit dem Chl-Bindemotiv

von LHCII-Proteinen auf (Kuhlbrandt et al., 1994; Liu et al., 2004; Reinbothe et al., 2008). Eine Deletion der AS 56 bis 67 führte dazu, dass Pchlid nicht mehr an das Transitpeptid gebunden werden konnte. Durch Punktmutationen wurde gezeigt, dass Pro und Gly an den Positionen 58 und 59 verantwortlich für die Bindung von Pchlid sind und es wurde spekuliert das über ein Wassermolekül eine Bindung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Gly und dem Magnesium des Pchlids vorliegt (Reinbothe et al., 2008).

Wesentlich für die Aussage, dass dieses Pentapeptid eine Pchlid-Bindestelle innerhalb des Transitpeptids darstellt, ist eine präzise Identifikation der Länge des Transitpeptids und folglich eine exakte Bestimmung des N-Terminus des maturen Proteins. Reinbothe *et al.* bezogen sich in ihrer Arbeit auf den N-Terminus nach Benli *et al.* , wonach das Transitpeptid von PORA eine Länge von 67 AS aufweist (Benli et al., 1991; Reinbothe et al., 2008). Im Rahmen der eigenen Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass der tatsächlich vorliegende mature N-Terminus deutlich von dem nach Benli *et al.* 1991 beschriebenen abweicht und Val-48 die N-terminale AS darstellt. Damit hat das Transitpeptid von pPORA nur eine Länge von 47 AS und das identifizierte Pentapeptid von Reinbothe *et al.* 2008 befindet sich nicht innerhalb des Transitpeptids, sondern im Bereich des maturen Proteins.

Durch dieses Ergebnis muss eine Neubewertung der Ergebnisse von Reinbothe *et al.* vorgenommen werden, da in deren Arbeit nicht zutreffende Angaben über die Länge des Transitpeptids vorausgesetzt wurden und nach den neuen Daten das Transitpeptid von pPORA nicht die beschriebene Bindestelle für Pchlid aufweist (Reinbothe et al., 2008). Darüber hinaus wurden weitere Arbeiten mit chimären Proteinen veröffentlicht, in denen das Transitpeptid von PORA an die mature Sequenz von PORB, sowie das Transitpeptid von PORB an die mature Sequenz von PORA gekoppelt wurden, oder es erfolgte die Kopplung des Transitpeptids an ein anderes Protein wie Dihydrofolat Reduktase aus der Maus (Reinbothe et al., 1997; Reinbothe et al., 2000; Kim et al., 2004). In *A. thaliana* wurde *in vivo* nur in Kotyledonen ein substratabhängiger Import von PORA beobachtet, wohingegen in maturen Blättern kein substratabhängiger Import beobachtet werden konnte (Kim et al., 2004; Kim et al., 2005). Bei diesen Arbeiten wurde ebenfalls das zu lange Transitpeptid von PORA zugrunde gelegt und für PORB wurde ein zu PORA homologes Transitpeptid, welches ebenfalls zu lang ist, angenommen. Folglich wurde auch bei diesen Versuchen Ergebnisse erzielt, die auf der Bindestelle von Pchlid innerhalb der maturen PORA beruhen und nicht auf einer Bindung von Pchlid an das Transitpeptid von PORA. Geht man davon aus, dass der Import von PORA tatsächlich abhängig von der Anwesenheit des Substrates Pchlid ist, dann erfolgt die Bindung im maturen Bereich des Proteins ohne Beteiligung des Transitpeptids.

Danach könnte Pchlid bereits während des Imports PORA durch Bindung an die N-terminale Erkennungssequenz stabilisieren und vor proteolytischen Abbau im Stroma von Etioplasten schützen und dadurch den Vorgang des Imports irreversibel abschließen.

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten wurde aber auch von mehreren Arbeitsgruppen ein substratunabhängiger Import von PORA beschrieben (Teakle et al., 1993; Dahlin et al., 1995; Jarvis et al., 1998; Dahlin et al., 2000; Aronsson et al., 2000; Aronsson et al., 2001; Aronsson et al., 2003; Philippar et al., 2007). Danach erfolgt der Import von PORA über den allgemeinen Importweg und die Komplexe TOC/TIC ohne Beteiligung anderer Transmembrankanäle, wobei die Anwesenheit von Pchlid nicht nötig ist (Aronsson et al., 2000; Philippar et al., 2007). Die Beobachtung eines Pchlid-abhängigen Imports wurde häufig auf die Verwendung von Harnstoff und auf die partiell denaturiert vorliegenden Transitpeptide zurückgeführt und somit wurde die Vermutung geäußert, dass die Beobachtung eines substratabhängigen Imports ein Artefakt der Versuchsdurchführung sein könnte (Aronsson et al., 2000; Philippar et al., 2007).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die präzise Bestimmung des N-Terminus von PORA und PORB aus Gerste eindeutig gezeigt werden konnte, dass sich eine beschriebene Pchlid-Bindestelle von PORA nicht im Bereich des Transitpeptides, sondern innerhalb des maturen Proteins befindet und das tatsächlich vorliegende Transitpeptid ist somit deutlich kürzer als bisher angenommen. Darüber hinaus sind die N-Termini von PORA und PORB homolog zueinander was auf einen identischen Mechanismus der Prozessierung schließen lässt, wobei bei PORB die Schnittstelle nicht exakt bedient wird. Sollte tatsächlich ein substratabhängiger Import von PORA vorliegen, so hat das Transitpeptid selbst keine direkte Funktion bezüglich einer Interaktion mit Pchlid. Ein scheinbar substratabhängiger Import aufgrund der Assemblierung von Pchlid an die mature PORA, wodurch diese vor Abbau stabilisiert wird, erscheint nach diesen Ergebnissen eine mögliche Erklärung der bislang beschriebenen Experimente mit falsch klonierten Precursor-Proteinen zu sein.

## **2. Charakterisierung des etioplastidären NDH-Komplexes**

In Chloroplasten konnten bereits zahlreicher Untereinheiten eines plastidären NDH-Komplexes nachgewiesen werden. Dabei gelang nicht nur der Nachweis einzelner plastidär codierter Untereinheiten des NDH-Komplexes, sondern es wurden auch mehrere kernkodierte Untereinheiten wie NdhL, M, N, O nachgewiesen, denen homologe Untereinheiten im NDH-Komplex von Cyanobakterien zugewiesen werden konnten (Rumeau et al., 2005; Shimizu et al., 2008). Darüber hinaus gelang auch der Nachweis einzelner Komponenten, wie PPL2, denen bislang keine entsprechenden Untereinheiten im cyanobakteriellen NDH-Komplex oder im mitochondrialen Komplex 1 zugeordnet werden konnten und deren Funktion bislang ungeklärt ist (Ishihara et al., 2007; Majeran et al., 2008). Umfangreiche Proteomanalysen mit einer detaillierten Analyse der Untereinheiten des NDH-Komplexes basierend auf mehrdimensionalen gelelektrophoretischen Auftrennungen und massenspektrometrischer Identifikation oder Immunodetektion wurden bislang vor allem in Organismen mit C4-Photosynthese, wie *Zea mays* durchgeführt (Darie et al., 2005; Darie et al., 2006; Majeran et al., 2008). Bei C4-Pflanzen finden sich in den unterschiedlichen Zelltypen der Bündelscheiden und des Mesophylls auch unterschiedlich differenzierte Chloroplasten wieder. Die Chloroplasten der Bündelscheidenzellen weisen dabei nahezu ausschließlich Stromathylakoide auf, wobei PSII nur in sehr niedriger Konzentration vorliegt. Der NDH-Komplex hingegen weist in diesen Plastiden eine sehr hohe Konzentration auf, was für eine wesentliche Funktion im zyklischen Elektronentransport zusammen mit PSI und dem Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex spricht und gleichzeitig eine Analyse der Komplexuntereinheiten deutlich vereinfacht (Majeran et al., 2008).

In Pflanzen mit C3-Photosynthese weist der NDH-Komplex eine deutlich niedrigere Konzentration auf, wodurch vor allem die massenspektrometrische Identifikation der Untereinheiten erschwert wird. Aus Tabak gelang die massenspektrometrische Identifikation verschiedener Untereinheiten, indem die Untereinheit NdhH mit einem His-Tag versehen wurde, wodurch der Komplex durch eine Ni<sup>2+</sup>-Säule aufkonzentriert werden konnte (Rumeau et al., 2005). Interessanterweise gelang der Nachweis einzelner Untereinheiten des NDH-Komplexes nicht nur in Chloroplasten, sondern auch in Etioplasten, wobei aber die Nachweise in erster Linie auf Immunodetektion basierten und es erfolgte noch keine systematische massenspektrometrische Identifikation des NDH-Komplexes (Catala et al., 1997; Guera et al., 2000; Blomqvist et al., 2008; Kanervo et al., 2008). Mittels

Immunodetektion wurde darüber hinaus von Guera *et al.* gezeigt, dass die Konzentration des NDH-Komplexes in Etioplasten höher ist, als in Chloroplasten (Guera *et al.*, 2000). Dies ist ein Hinweis für eine besondere Funktion des NDH-Komplexes in Etioplasten und die Anwesenheit weiterer Komplexe, wie des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes und des ATPase-Komplexes könnte bedeuten, dass bereits in Etioplasten eine Elektronentransportkette vorliegt und möglicherweise auch die Synthese von ATP möglich ist.

## 2.1. Die Untereinheiten des NDH-Komplexes

Der plastidäre NDH-Komplex besteht aus bis zu 11 plastidär kodierten Untereinheiten NdhA-K, deren Gene in verschiedenen Arbeiten identifiziert werden konnten (Shinozaki *et al.*, 1986; Matsubayashi *et al.*, 1987; Maier *et al.*, 1995), sowie aus mehreren kernkodierten Untereinheiten (Rumeau *et al.*, 2005; Majeran *et al.*, 2008). Dabei kann man grundsätzlich zwischen membranintegralen Untereinheiten, die mindestens eine TMD besitzen und membranassoziierten Untereinheiten ohne TMD unterscheiden, wobei plastidäre und cyanobakterielle NDH-Komplexe weitestgehend homolog zueinander sind (Battchikova *et al.*, 2007). Membranintegral sind die Untereinheiten NdhA-G, L und membranassoziiert sind die Untereinheiten NdhH-K, M, N, O, sowie alle möglichen weiteren Untereinheiten aus der Gruppe der OEC-Proteine.

Der Schwerpunkt der Analyse der Untereinheiten des NDH-Komplexes lag in dieser Arbeit auf dem etioplastidären NDH-Komplex. Die Konzentration des Komplexes war in Etioplasten deutlich höher als in Chloroplasten und durch die konzentrierende 2. Dimension konnten zahlreiche Untereinheiten auch gelelektrophoretisch mit verschiedenen sensitiven Färbetechniken, wie der Silberfärbung und Fluoreszenzdetektion, nachgewiesen werden.

### 2.1.1. Plastidär kodierte Untereinheiten

Von den 11 plastidär kodierten Untereinheiten des NDH-Komplexes konnten im Rahmen dieser Arbeit sowohl die vier membranassoziierten Untereinheiten NdhH-K, als auch zwei membranintegrale Untereinheiten NdhB und NdhF identifiziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit der Methode des In-Gel Verdaus auch membranintegrale Proteine detektiert werden können, wobei der Nachweis dieser Proteine auf der Identifikation löslicher Domänen beruht und sich die identifizierten Proteine in einem Größenbereich zwischen 6 und 20 AS befinden. Peptide, die partiell oder vollständig eine TMD enthalten, konnten nicht identifiziert

werden. Damit entsprechen die Ergebnisse vorangegangenen Arbeiten, wonach TMDs nach In-Gel Verdau nicht detektiert werden können und membranintegrale Proteine nur über lösliche Domänen identifiziert werden (Eichacker et al., 2004; Granvogl, 2008). Betrachtet man die erreichten Sequenzabdeckungen relativ zu einer theoretisch erreichbaren Sequenzabdeckung auf Basis von Peptiden mit einer Größe zwischen 6 und 20 AS, die nicht innerhalb einer TMD liegen, so fällt auf, dass für membranintegrale Peptide immer noch eine deutlich schlechtere Sequenzabdeckung erreicht wird, als für lösliche Proteine (vgl. Tab. 8). So wurde etwa die Hälfte der theoretisch möglichen Sequenzabdeckung bei den membranassoziierten Untereinheiten des NDH-Komplexes erreicht, wohingegen bei den detektierten membranintegralen Untereinheiten nur etwa ein Sechstel der theoretisch möglichen Sequenzabdeckung erreicht wurde. Darüber hinaus gelang durch den Verdau in Lösung ausschließlich der Nachweis von membranassoziierten Untereinheiten, nicht aber der Nachweis von membranintegralen Untereinheiten. Insgesamt lassen diese Beobachtungen darauf schließen, dass die Detektierbarkeit membranintegraler Proteine nicht nur auf der Anzahl möglicher Peptide in löslichen Domänen beruht, sondern auch auf der Zugänglichkeit von Schnittstellen durch die Protease des Verdau. Membranintegrale Proteine weisen möglicherweise auch nach der denaturierenden SDS-PAGE noch eine Sekundär- oder Tertiärstruktur auf, die den proteolytischen Verdau behindert. Ein Hinweis darauf ist auch das um ca. ein Drittel niedrigere Molekulargewicht relativ zum Molekulargewicht auf Basis der vollständigen AS-Sequenz, welches experimentell für NdhB und NdhF durch Vergleich mit Markerproteinen in der SDS-PAGE ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu zeigten die membranassoziierten Untereinheiten nahezu keinen Unterschied zwischen theoretisch zu erwartenden und experimentell ermittelten Molekulargewicht.

In der konzentrierenden SDS-PAGE konnten darüber hinaus drei schwache Banden bei ca. 25 kDa, 15 kDa und 14 kDa in der Silberfärbung nachgewiesen werden, welche massenspektrometrisch nicht identifiziert werden konnten. Bei diesen Banden könnte es sich um membranintegrale Untereinheiten, wie NdhA und NdhG handeln, wenn man annimmt, dass ebenfalls wie bei NdhB und NdhF in der SDS-PAGE ein Laufverhalten vorliegt, welches ein niedrigeres Molekulargewicht vortäuscht, als tatsächlich vorhanden ist. So könnte es sich bei der Bande bei ca. 25 kDa um NdhA handeln und NdhG könnte bei ca. 14-15 kDa vorliegen.

Vergleicht man die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit massenspektrometrischen Identifikationen von NDH-Untereinheiten in der Literatur, so fällt auf, dass die mittels konzentrierender 2. Dimension und LC-MS erreichte Sequenzabdeckung der identifizierten

Untereinheiten sehr hoch ist. Rumeau *et al.* konnten die fünf plastidär kodierten Untereinheiten NdhA, H, I, J, K aus *Nicotiana tabacum* identifizieren (Rumeau et al., 2005). Der Komplex wurde in dieser Arbeit aus Chloroplasten isoliert, nachdem eine Plastidentransformation mit His<sub>6</sub>-NdhH durchgeführt wurde und eine Konzentrierung des Komplexes durch eine Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie erfolgte. Trotz dieser Isolierung und Konzentrierung des NDH-Komplexes war die Anzahl identifizierter Peptide und somit die erreichte Sequenzabdeckung deutlich niedriger als in der vorliegenden Arbeit. Von NdhH wurden beispielsweise nur vier Peptide identifiziert, wodurch eine Sequenzabdeckung von 11,7 % erreicht wurde, wohingegen in der vorliegenden Arbeit 11 Peptide mit einer Sequenzabdeckung von 28,8 % nachgewiesen werden konnten. Von den membranintegralen Untereinheiten konnten Rumeau *et al.* ausschließlich NdhA mit einem Peptid identifizieren (Rumeau et al., 2005). Dieses Peptid existiert jedoch aufgrund einer fehlenden tryptischen Schnittstelle nicht in Gerste, weshalb hierin eine Ursache dafür zu sehen ist, dass NdhA in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte.

Majeran *et al.* gelang die bislang umfangreichste Identifikation plastidär kodierter Untereinheiten, nämlich von NdhA, D, F, H, I, J, K aus den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen aus Mais im Rahmen einer Gesamtproteomanalyse mittels 2D-BN-PAGE und LC-MS (Majeran et al., 2008). Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Konzentration des NDH-Komplexes in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen dieser C<sub>4</sub>-Pflanze signifikant höher ist, als in C<sub>3</sub>-Pflanzen (Darie et al., 2006; Majeran et al., 2008).

Insgesamt betrachtet gelang bislang sowohl mittels Immunodetektion, als auch massenspektrometrisch in erster Linie der Nachweis der vier membranassoziierten Untereinheiten NdhH, I, J, K und von den 7 auf Basis der Gensequenzen postulierten membranintegralen Untereinheiten konnten NdhA, B, D, E, F überwiegend mittels spezifischer Antikörper auf Proteinebene nachgewiesen werden (Berger et al., 1993; Martin et al., 1996; Guedeney et al., 1996; Catala et al., 1997; Darie et al., 2005; Darie et al., 2006). Inwieweit die zwei Untereinheiten NdhC und NdhG mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht zwischen 13 und 20 kDa tatsächlich exprimiert werden und im NDH-Komplex von Plastiden vorliegen ist nach wie vor ungeklärt.

### 2.1.2. Aufbau des NDH-Komplexes und kernkodierte Untereinheiten

Betrachtet man die grundlegende Struktur verschiedener NDH-Komplexe, wie etwa dem bakteriellen und cyanobakteriellen NDH-Komplex und dem mitochondrialen Komplex 1, so kann man eine Unterteilung in drei Subkomplexe treffen (Friedrich et al., 1995; Friedrich et al., 2000). Bei dem ersten Subkomplex handelt es sich um den membranintegrateden Subkomplex welcher mindestens aus 7 Untereinheiten besteht und die im Fall des plastidären NDH-Komplexes plastidär codiert sind, wobei es sich um die Untereinheiten NdhA-G handelt. In jüngster Zeit wurde in *A. thaliana* eine weitere Untereinheit NdhL nachgewiesen, welche mindestens zwei TMDs aufweist und kernkodiert ist (Shimizu et al., 2008). Dabei handelt es sich um eine weitere membranintegratede Untereinheit, wobei ein homologes Protein auch im cyanobakteriellen NDH-Komplex nachgewiesen werden konnte und eine Interaktion mit NdhH angenommen wird (Battchikova et al., 2005; Shimizu et al., 2008). In Plastiden aus Gerste konnte NdhL bislang jedoch nicht nachgewiesen werden.

Der zweite Subkomplex besteht aus membranassoziierten Untereinheiten, die jeweils keine TMD enthalten. Er wird als verbindender Komplex zwischen dem membranintegrateden Subkomplex und dem NAD(P)H-oxidierenden, löslichen Subkomplex angesehen. In Plastiden besteht dieser zum einen aus den vier plastidär codierten Untereinheiten NdhH-K und zum anderen aus den kernkodierten Untereinheiten NdhM, N, O (Darie et al., 2005; Rumeau et al., 2005). Entsprechende homologe Untereinheiten konnten auch in cyanobakteriellen NDH-Komplexen nachgewiesen werden, wobei diesem Komplex eine Funktion bei der Elektronenübertragung zum membranintegrateden Subkomplex nach der Oxidation von NAD(P)H zugeschrieben wird (Zhang et al., 2005; Battchikova et al., 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang erstmals der Nachweis der Untereinheiten NdhM und NdhN in Etioplasten der Gerste. Dabei handelt es sich generell um den ersten Nachweis kernkodierter Untereinheiten im NDH-Komplex aus Etioplasten, wodurch gezeigt werden konnte, dass bereits in Etioplasten ein aus plastidär- und kernkodierten Untereinheiten mosaikartig aufgebauter Komplex vorliegt.

Allerdings wird davon ausgegangen, dass die Oxidation von NAD(P)H nicht direkt an diesem membranassoziierten Subkomplex stattfindet, sondern an einem dritten, dem löslichen NAD(P)H-bindenden Subkomplex (Arteni et al., 2006). Dieser konnte bislang weder am cyanobakteriellen, noch am plastidären NDH-Komplex direkt auf Proteinebene nachgewiesen werden (Battchikova et al., 2007). Allerdings wurde ein Hinweis auf dessen Existenz durch elektronenmikroskopische Studien an aufgereinigten cyanobakteriellen NDH-Komplexen

erhalten (Arteni et al., 2006). Im bakteriellen NDH-Komplex wird dieser NADH-bindende Subkomplex aus den Proteinen NuoE, F, G gebildet (Friedrich et al., 2000). Entsprechende homologe Proteine konnten weder in Cyanobakterien, noch in Plastiden von höheren Pflanzen nachgewiesen werden, obwohl sich homologe Gene zu NuoE, F, G im Zellkern von höheren Pflanzen finden, doch deren Genprodukte werden in den mitochondrialen Komplex 1 eingebunden (Heazlewood et al., 2003). Folglich wird vermutet, dass in Cyanobakterien und Plastiden dieser Subkomplex von anderen, bislang unbekanntem Proteinen aufgebaut wird. Die Analyse dieser Untereinheiten wird dadurch erschwert, dass dieser Subkomplex nur sehr schwach an den membranassoziierten Subkomplex gebunden vorliegt, und somit relativ leicht während einer Aufreinigung abgetrennt werden kann, wodurch eine Identifikation der Untereinheiten bislang nicht möglich war (Arteni et al., 2006).

### **2.1.3. Neue Untereinheiten aus der Familie der OEC-Proteine**

In jüngster Zeit gelang der Nachweis weiterer kernkodierter Untereinheiten des chloroplastidären NDH-Komplexes, deren Existenz vorher nicht bekannt war (Ishihara et al., 2007; Majeran et al., 2008). In diesen Arbeiten konnten massenspektrometrisch zwei Proteine aus der Gruppe der OEC-Proteine nachgewiesen werden, nämlich PPL2, welches ein PsbP-ähnliches Protein ist, sowie eines PsbQ-ähnlichen Proteins. Diese Untereinheiten scheinen spezifisch nur im plastidären NDH-Komplex vorzuliegen, da nach Ishihara *et al.* keine homologen Untereinheiten in den NDH-Komplexen aus Cyanobakterien, Bakterien oder Mitochondrien identifiziert werden konnten (Ishihara et al., 2007). Allerdings beschreiben Majeran *et al.* eine gewisse Ähnlichkeit des PsbQ-ähnlichen Proteins mit NdhL aus *Synechocystis elongatus* (Majeran et al., 2008).

Im Rahmen der Analysen des etioplastidären NDH-Komplexes gelang in dieser Arbeit der Nachweis des PsbP-ähnlichen Proteins PPL2 und von mindestens einem PsbQ-ähnlichen Protein. Interessant ist bei diesen neu identifizierten Untereinheiten die Tatsache, dass beide zwei Transitpeptide aufweisen, wobei ein Twin-Arginin-Motiv darauf schließen lässt, dass über den TAT-Importweg ein Import in das Lumen stattfindet. Da es sich hierbei um lösliche Proteine handelt, die keine TMD aufweisen, liegt folglich ein weiterer löslicher, bzw. membranassoziiertes Subkomplex am plastidären NDH-Komplex vor, denn der bislang beschriebene membranassoziierte Subkomplex bestehend aus NdhH-K und NdhM, N, O findet sich auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran (Friedrich et al., 1995). Über die Funktion dieser neuen Untereinheiten ist bislang nichts bekannt. Eine Funktion bei der

Bindung und Oxidation von NAD(P)H, welche zu erwarten wäre, wenn es sich hierbei um den gesuchten NAD(P)H-oxidierenden löslichen Subkomplex handeln würde, ist jedoch nur schwer vorstellbar, da die räumliche Lokalisation nicht auf der stromalen, sondern auf der lumenalen Seite der Thylakoidmembran ist.

#### **2.1.4. Enthält der NDH-Komplex noch weitere Untereinheiten?**

Neben den Proteinen aus der Gruppe der OEC-Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit weitere Proteine im Bereich des NDH-Komplexes nachgewiesen werden. Zum einen waren dies die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des RUB-Komplexes, welcher homolog zum GroEL-Komplex aus *Escherichia coli* ist und eine Funktion bei der Faltung von Proteinen hat (Horwich et al., 2007; Levy-Rimler et al., 2002). Die Gruppe dieser Chaperone weist eine ringförmige Komplexstruktur auf, wodurch ein zentraler Hohlraum gebildet wird. In diesem Hohlraum erfolgt die ATP-abhängige Faltung von Proteinen in ihren nativen Zustand. Elektronenmikroskopische Ultrastrukturanalysen lieferten Hinweise darauf, dass jeweils 7  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten einen funktionellen tetradekameren Komplex bilden (Saibil et al., 1993; Viitanen et al., 1995). Es gibt aber auch Hinweise auf eine hexadekamere Struktur des RUB-Komplexes (Nishio et al., 1999). Auf Basis der Molekularmassen für die murenen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  des RUB-Komplexes in Tab. 6 kann für einen tetradekameren Komplex ein Molekulargewicht von 776 kDa theoretisch berechnet werden, was nahe an dem experimentell bestimmten Molekulargewicht von ca. 740-760 kDa liegt. Folglich befindet sich dieser Komplex nur zufällig im gleichen Molekularmassenbereich wie der NDH-Komplex.

Zum anderen konnten zwei Proteine ausschließlich im Bereich des NDH- und RUB-Komplexes nachgewiesen werden, deren Komplexzugehörigkeit bislang nicht eindeutig geklärt ist. Dies sind eine Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPI) (Q6XPZ6), welche auch als *Thylakoid Lumen Protein 20* (TLP20) bezeichnet wird und das Protein Ycf4. Bei TLP20 handelt es sich um ein Chaperon aus der umfangreichen Gruppe der Immunophilinen (Romano et al., 2005). Verschiedene Immunophilinen konnten bereits innerhalb der Thylakoidmembran, sowie im Lumen nachgewiesen werden (Peltier et al., 2002; Peltier et al., 2004). Darüber hinaus gelang der Nachweis von Immunophilinen in Etioplasten (Kanervo et al., 2008). Einzelnen Proteinen dieser Familie wurde eine Funktion bei der Proteinfaltung während des Imports in das Lumen (Fulgosi et al., 1998), sowie bei der Assemblierung des PSII und der Superkomplexe des PSII zugeschrieben (Lima et al., 2006; Fu et al., 2007).

Komigrationsstudien in nativen Gelelektrophoresen von Majeran *et al.* lieferten Hinweise dafür, dass mindestens zwei Proteine aus der Gruppe der Immunophiline, nämlich TLP20 (TC295339) und FKBP (TC298326) im NDH-Komplex aus den Bündelscheidenzellen von *Zea mays* vorliegen könnten (Majeran *et al.*, 2008). In die Datenbank *Plant Proteome Database* (PPDB, <http://ppdb.tc.cornell.edu/>) wurden alle in Majeran *et al.* 2008 identifizierten Proteine eingetragen und es erfolgte die Zuordnung homologer Proteine aus anderen Organismen. Danach ist die im Rahmen dieser Arbeit in Gerste nachgewiesene Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase homolog zu TLP20 aus *Zea mays* nach Majeran *et al.* 2008. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in der Arbeit von Majeran *et al.* mehrere nahe verwandte Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerasen in verschiedenen Molekularmassenbereichen der nativen Gelelektrophorese identifiziert worden sind und somit die Zuordnung von TLP20 zum NDH-Komplex noch nicht sicher bestätigt ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dieses Protein ebenfalls nicht sicher einem der beiden möglichen Komplexe zugeordnet werden, da sowohl der NDH- als auch der RUB-Komplex in der nativen Gelelektrophorese ein identisches Laufverhalten aufweisen. TLP20 weist jedoch nach dem Eintrag in die SwissProt-Datenbank zwei Transitpeptide auf und wird somit in das Lumen transportiert. Da es sich bei dem RUB-Komplex um einen stromalen Komplex handelt (Nishio *et al.*, 1999), würde eine räumliche Trennung zwischen dem RUB-Komplex und TLP20 vorliegen, weshalb eine Interaktion zum NDH-Komplex auf der lumenalen Seite der Thylakoidmembran vorliegen könnte. Es muss bei dieser Überlegung aber auch berücksichtigt werden, dass der Nachweis von TLP20 in dieser Arbeit ausschließlich in dem inneren Membransystem von Etioplasten gelang. In Etioplasten liegen noch keine Thylakoidmembranen vor, sondern lediglich Prothylakoide und der Prolamellarkörper, wobei die räumliche Verteilung einzelner Proteine nicht abschließend geklärt ist. Folglich kann TLP20 als mögliche weitere Untereinheit des NDH-Komplexes betrachtet werden, aber eine sichere Bestätigung steht noch aus.

Als weiteres Protein konnte Ycf4 im Bereich des NDH- und RUB-Komplexes in Etioplasten detektiert werden. Ycf4 wurde als essentieller Assemblierungsfaktor für PSI beschrieben, wobei dieses Protein plastidär kodiert ist und homologe Gene wurden sowohl in Landpflanzen, als auch in Algen, sowie Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis* beschrieben (Boudreau *et al.*, 1997; Rochaix *et al.*, 2004). Die Inaktivierung des entsprechenden Gens in *Chlamydomonas reinhardtii* führte zu einer signifikanten Verringerung der PSI-Aktivität und es wurde keine stabile Assemblierung von PSI-Komplexen beobachtet (Boudreau *et al.*, 1997). Für Ycf4 werden zwei TMDs angenommen (SwissProt Eintrag P20454), weshalb dieses

Protein als membranintegrales Protein angesehen werden kann. Dies lässt jedoch keinen direkten Rückschluss auf die Zugehörigkeit zu einem Komplex zu, denn grundsätzlich ist sowohl eine Assoziation zum membranintegralen NDH-Komplex, als auch zum membranassoziierten RUB-Komplex denkbar. Nach den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen kann Ycf4 noch nicht einem der beiden Komplexe, RUB oder NDH, zugeordnet werden.

## 2.2. Das Molekulargewicht des NDH-Komplexes

Für das Molekulargewicht des NDH-Komplexes in der BN-PAGE konnte ein Wert von ca. 740-760 kDa ermittelt werden. Zwischen den NDH-Komplexen aus Etioplasten und Chloroplasten bestand kein Unterschied und es gelang in keinem anderen Massenbereich ein weiterer Nachweis von Untereinheiten des NDH-Komplexes. Von Interesse ist das Molekulargewicht bezüglich der Frage nach dem Assemblierungszustand des NDH-Komplexes. Liegt er im monomeren oder im dimeren Zustand vor und sind möglicherweise einzelne Untereinheiten oder Subkomplexe mehr als einmal in einem Komplex vorhanden? In der Literatur wurden bereits mehrfach unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. In umfangreichen Studien an *Zea mays* konnten monomere und dimere Assemblierungsstufen des NDH-Komplexes nachgewiesen werden, wobei mittels BN-PAGE für das Monomer ein Molekulargewicht von ca. 550-600 kDa und für das Dimer von ca. 1100 kDa ermittelt wurden (Darie et al., 2005; Majeran et al., 2008). In diesen Arbeiten wurden aber noch weitere Banden bei ca. 800, 320, 220 und 170 kDa nachgewiesen. Erklärt wurden diese Banden durch den modularen Aufbau des NDH-Komplexes und durch eine Destabilisierung des Komplexes während der Solubilisierung (Majeran et al., 2008). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für *A. thaliana* erhalten, wobei ebenfalls ein dimerer Assemblierungszustand bei ca. 1000 kDa und ein monomerer bei ca. 500 kDa beschrieben wurde (Ishihara et al., 2007). Shimizu *et al.* konnten in *A. thaliana* ausschließlich den dimeren Zustand bei ca. 1000-1100 kDa nachweisen (Shimizu et al., 2008). Im Gegensatz dazu wurden in älteren Arbeiten geringere Molekulargewichte beschrieben. So wurde in *Zea mays* ausschließlich der monomere Zustand bei 550 kDa beschrieben (Funk et al., 1999), ebenso wie in *N. tabacum* (Burrows et al., 1998) und *Pisum sativum* (Sazanov et al., 1998), wobei jeweils zusätzlich bei ca. 200 kDa Subkomplexe identifiziert werden konnten. Für Gerste wurden bislang Komplexgrößen von 580 kDa (Guera et al., 2000) und 690 kDa (Quiles et al., 2003; Quiles et al., 2000) beschrieben.

Shimizu *et al.* führen diese unterschiedlichen Komplexgrößen auf die experimentellen Bedingungen während der Solubilisierung zurück (Shimizu *et al.*, 2008). Milde Solubilisierungsbedingungen bei Verwendung von ca. 1% DM oder 1,5% Digitonin führen danach zu einer geringeren Destabilisierung des NDH-Komplexes und es kommt zum vermehrten Auftreten des dimeren Zustandes bei der Komplexisolation mittels BN-PAGE oder Dichtegradientenzentrifugation. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Solubilisierung ebenfalls unter relativ milden Bedingungen unter Verwendung von 1% DM. Eine dimere Assemblierungsstufe mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 kDa konnte nicht beobachtet werden, jedoch lag das beobachtete Molekulargewicht mit 740-760 kDa höher, als in den Arbeiten von Guera *et al.* 2000 und Quiles *et al.* 2003. Geht man davon aus, dass der NDH-Komplex alle bislang beschriebenen Untereinheiten NdhA-O, sowie die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Untereinheiten aus der Gruppe der OEC-Proteine und TLP20 enthält, so errechnet sich ein Molekulargewicht von ca. 540 kDa. Berücksichtigt man aufgrund der milden Solubilisierungsbedingungen auch Lipideinschlüsse in der gebildeten Mizelle, so kann man von einer monomeren Assemblierungsstufe des NDH-Komplexes in Gerste ausgehen. Grundsätzlich kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere, bislang nicht identifizierte Untereinheiten vorliegen, bzw. einzelne Untereinheiten oder Subkomplexe mehrfach in einem Komplex vorhanden sind. So lieferten elektronenmikroskopische Analysen Hinweise darauf, dass in *Thermosynechococcus elongatus* ein NDH-Komplex mit mehreren löslichen Subkomplexen vorliegt (Arteni *et al.*, 2006).

### **2.3. Die Diaphorase-Aktivität des NDH-Komplexes**

Mit dem Ziel eine erste Einschätzung über eine mögliche enzymatische Aktivität des NDH-Komplexes in Etioplasten vornehmen zu können, erfolgte die Durchführung von Diaphorase Aktivitäts-Färbungen. Zum einen sollte dadurch überprüft werden, ob überhaupt eine enzymatische Aktivität des NDH-Komplexes nach der Aufreinigung mittels BN-PAGE vorliegt und zum anderen sollte festgestellt werden, ob NADH oder NADPH als Substrat dient. In der Literatur wurden bereits mehrfach experimentelle Nachweise der Diaphorase-Aktivität des NDH-Komplexes beschrieben, die zum Teil widersprüchliche Ergebnisse lieferten. So wurde ausschließlich eine Spezifität entweder für NADH (Sazanov *et al.*, 1998; Elortza *et al.*, 1999; Casano *et al.*, 2000), oder für NADPH (Guedeney *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2006) beschrieben. Darüber hinaus wurde auch eine Diaphorase-Aktivität sowohl für NADH,

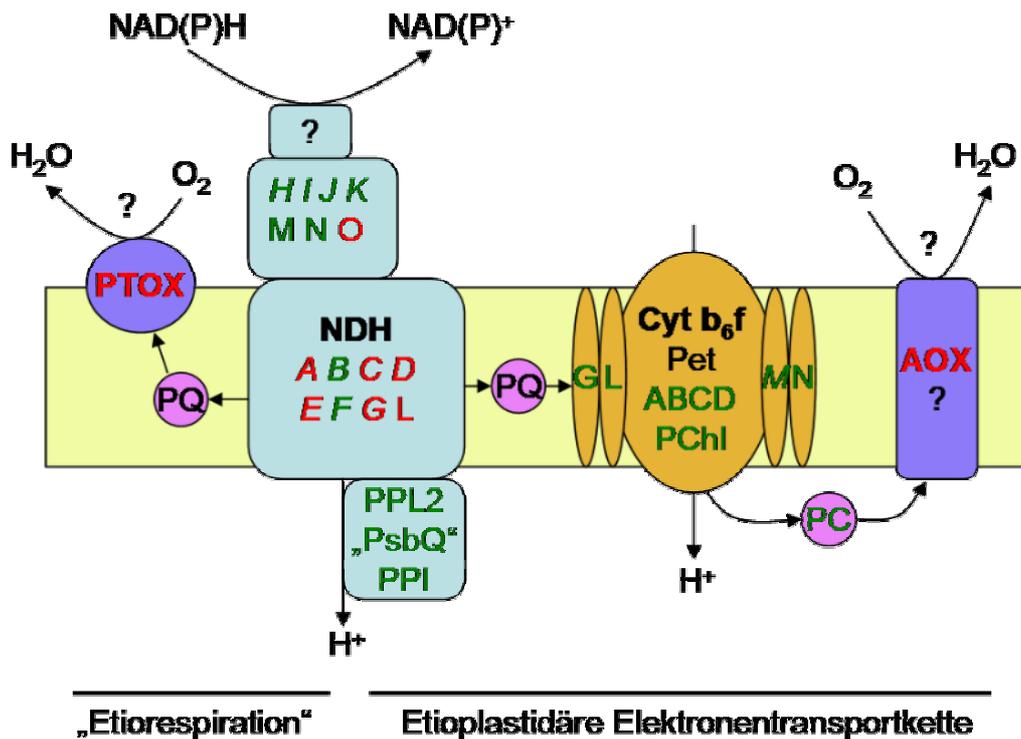
als auch für NADPH beschrieben (Quiles et al., 2000; Funk et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Ergebnis eine nur sehr schwache Aktivitäts-Färbung der Bande des NDH-Komplexes erhalten, welche ausschließlich bei Verwendung von NADH als Elektronendonator erhalten wurde (vgl. Kap. D.3.6). Im Gegensatz dazu wurden in erster Linie bei Verwendung von NADPH zahlreiche intensive Banden detektiert, wobei vor allem FNR und möglicherweise GGH ursächlich für diese Banden sind. Für FNR wurde bereits eine intensive Diaphorase-Aktivität beschrieben (Cuello et al., 1995) und auch die Diaphorase-Aktivität des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes wurde der Anwesenheit von FNR zugeschrieben (Zhang et al., 2001). Die überaus schwache Diaphorase-Aktivität des NDH-Komplexes kann dadurch erklärt werden, dass der NAD(P)H-bindende Subkomplex während der Solubilisierung abgetrennt wurde und folglich nicht mehr der vollständige NDH-Komplex in der beschriebenen Bande vorliegt (vgl. Kap. 2.1.2). Dies würde bedeuten, dass der NAD(P)H-bindende Subkomplex in einem anderen Molekularmassenbereich des BN-PAGE zu finden sein müsste. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist aber noch nicht bekannt welche Proteine diesen Subkomplex bilden (Arteni et al., 2006) und ein in Frage kommender Komplex konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. In *Synechocystis* gelang die Isolation eines NDH-Komplexes mit einem Molekulargewicht von ca. 1000 kDa mittels BN-PAGE, welcher eine intensive Diaphorase-Aktivität ausschließlich mit NADPH als Elektronendonator zeigte, und es konnten mehrere weitere Banden mit Untereinheiten des NDH-Komplexes zwischen 250 und 500 kDa nachgewiesen werden, die sehr schwache Diaphorase-Aktivitäten zeigten (Ma et al., 2006). Ma *et al.* folgerten aus diesen Ergebnissen, dass die enzymatisch aktive Form als Dimer vorliegt und möglicherweise noch weitere NADPH-bindende Komponenten enthält (Ma et al., 2006). Alternativ zu der Hypothese eines NAD(P)H-bindenden Subkomplexes wurde auch vermutet, dass FNR Elektronen von NADPH auf den NDH-Komplex überträgt (Guedeney et al., 1996). Dadurch wäre als Elektronendonator nur NADPH möglich und es würde kein weiterer Subkomplex aus bislang unbekanntem Untereinheiten am NDH-Komplex vorliegen. Bezüglich der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Diaphorase-Aktivität kann festgehalten werden, dass die enzymatische Aktivität des detektierten Komplexes bei 740-760 kDa nicht sicher nachgewiesen werden konnte. Dies liegt möglicherweise daran, dass ein NAD(P)H-bindender Subkomplex während der Solubilisierung abgetrennt wurde. Bei Verwendung von NADH als Elektronendonator konnte zwar eine schwache Aktivität nachgewiesen werden, wobei dieses Ergebnis noch keine klare Aussage über die Substratspezifität erlaubt, solange die Frage nach den NAD(P)H-bindenden Untereinheiten ungeklärt ist.

## 2.4. Eine potentielle Elektronentransportkette in Etioplasten

Der erste Nachweis einer Untereinheit des NDH-Komplexes auf Proteinebene in Etioplasten gelang bereits 1993 in *Zea mays* und *Sorghum bicolor*, wobei bereits über eine für Etioplasten spezifische Funktion spekuliert wurde (Berger et al., 1993). Fischer *et al.* gelang ebenfalls der Nachweis einzelner Untereinheiten des NDH-Komplexes in Etioplasten aus *Zea mays*, sowie *Oryza sativa* und es wurde postuliert, dass der NDH-Komplex am Aufbau eines möglichen Protonengradienten beteiligt sein könnten, welcher möglicherweise für die Assemblierung membranintegraler Komplexe nötig ist (Fischer et al., 1997). Guera *et al.* postulierten eine eigene Elektronentransportkette in Etioplasten unter wesentlicher Beteiligung des NDH-Komplexes (Guera et al., 2000). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Proteinkonzentration von Untereinheiten des NDH-Komplexes der Gerste in Etioplasten deutlich höher als in Chloroplasten ist, was für eine spezifische Funktion in Etioplasten spricht (Catala et al., 1997). Eine weitere mögliche Komponente einer etioplastidären Elektronentransportkette ist der Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex, welcher in Etioplasten vollständig assembliert vorliegt, wie durch die Identifikation aller aus Chloroplasten bekannter Untereinheiten gezeigt werden konnte (vgl. Kap. D.5.1). Der Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex enthält darüber hinaus verschiedene Kofaktoren, wie ein Chl *a* (Yan et al., 2008; Stroebel et al., 2003), und es konnte in Etioplasten Protochlorophyll *a* anstelle von Chl *a* nachgewiesen werden, was als Hinweis für einen funktionellen Zustand des Komplexes in Etioplasten gewertet werden kann (Reisinger et al., 2008).

In Chloroplasten wird dem NDH-Komplex eine duale Funktion zugeschrieben. Zum einen fungiert er bei der Chlororespiration, wobei Elektronen von NAD(P)H über den NDH-Komplex in den Plastochinon-Pool eingespeist und über eine plastidäre terminale Oxidase (PTOX) auf O<sub>2</sub> übertragen werden (Kuntz, 2004; Aluru et al., 2004; Joet et al., 2002; Wu et al., 1999; Bennoun, 1982). Zum anderen wird dem NDH-Komplex eine Funktion beim zyklischen Elektronentransport um PSI zugeschrieben, wobei ebenfalls Elektronen von NAD(P)H auf Plastochinon übertragen werden, die dann über den Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex und Plastocyanin zum PSI übertragen werden (Endo et al., 2008; Rumeau et al., 2007; Joet et al., 2002; Nixon, 2000).

Auf Basis dieser Ergebnisse sind zwei hypothetische Elektronentransportketten in Etioplasten denkbar, die vergleichbar den Elektronentransportketten in Chloroplasten sind (Abb. 30).



**Abb. 30** Hypothetische Elektronentransportketten in Etioplasten

Bei einer denkbaren Elektronentransportkette erfolgt ein Elektronenfluss von NAD(P)H über den NDH-Komplex, Plastochinon (PQ) und die plastidäre terminale Oxidase (PTOX) auf O<sub>2</sub>. Diese „Etiorepiration“ entspricht in ihrem Aufbau der Chlororespiration. Alternativ dazu ist eine Elektronentransportkette von NAD(P)H über den NDH-Komplex, PQ, Cyt *b<sub>6</sub>f*, Plastocyanin (PC) zu einer alternativen Oxidase (AOX) und O<sub>2</sub> denkbar. In beiden Fällen könnte ein Protonengradient aufgebaut werden. Massenspektrometrisch in dieser Arbeit identifizierte Untereinheiten sind grün dargestellt, bislang nicht nachgewiesene rot. Plastidär kodierte Untereinheiten sind im Gegensatz zu kernkodierten Untereinheiten kursiv dargestellt. Der neu identifizierte zweite lösliche Subkomplex des NDH-Komplexes besteht aus einem PsbP-ähnlichen Protein (PPL2), mindestens einem PsbQ-ähnlichen Protein („PsbQ“) sowie einer Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPI).

Die erste mögliche Elektronentransportkette entspricht in ihrem Aufbau der Chlororespiration und könnte entsprechend als „Etiorepiration“ bezeichnet werden. Hierbei erfolgt ein Elektronenfluss von NAD(P)H über den NDH-Komplex, Plastochinon und PTOX auf O<sub>2</sub>, wobei ein Protonengradient aufgebaut würde. Der Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex wäre in diesem Modell nicht beteiligt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass ein Nachweis von PTOX auf Proteinebene in Etioplasten bislang noch nicht erfolgte. Ein entsprechender Nachweis gelang bislang nur in Chloroplasten (Majeran et al., 2008). Eine alternative denkbare etioplastidäre Elektronentransportkette könnte den Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex einschließen und ein Elektronenfluss würde vom NDH-Komplex über Plastochinon zum Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex erfolgen. Dieser Weg setzt aber eine hypothetische alternative Oxidase voraus, deren Existenz in Plastiden bislang nicht nachgewiesen werden konnte. Inwieweit möglicherweise PTOX für diese Funktion in Frage kommt ist bislang nicht geklärt.

### **3. Massenspektrometrische Identifikation von LMW-Proteinen**

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals sowohl in Chloroplasten, als auch in Etioplasten aus Gerste eine umfangreiche massenspektrometrische Identifikation von niedermolekularen, membranintegralen Proteinen, die den Protein-Komplexen der photosynthetischen Elektronentransportkette zugewiesen werden. Dabei gelang nicht nur die Identifikation einzelner LMW-Proteine, sondern diese konnten auch mittels BN-PAGE aufgetrennten Komplexen zugeordnet werden.

#### **3.1. Vorteile der neuen Extraktionsmethode von LMW-Proteinen**

Die Verwendung der FBM-Lösung aus 1-Butanol, Methanol und Ameisensäure ermöglicht erstmals die spezifische Extraktion von LMW-Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen, wodurch diese für eine massenspektrometrische Identifikation zugänglich werden. Diese Extraktionsmethode basiert auf einer älteren Vorschrift von Ehring *et al.*, welche für die Extraktion löslicher Proteine aus SDS-Gelen entwickelt wurde und auf einer Mischung aus Ameisensäure, Acetonitril, 2-Propanol und Wasser beruht (Ehring *et al.*, 1997). Alternative Extraktionsmethoden von hydrophoben Membranproteinen basieren auf Methanol/Chloroform und weisen den Nachteil auf, dass Extraktionen nur direkt aus Membranen möglich sind, nicht aber aus Gelen, da aus diesen aufgrund einsetzender Dehydrierung der Gelmatrix die Proteine nicht mehr in die lösliche Phase überführt werden können (Ferro *et al.*, 2000; Seigneurin-Berny *et al.*, 1999; Henriques *et al.*, 1976). Die Verwendung alternativer Lösungsmittel, wie in erster Linie 1-Butanol, führt dazu, dass hydrophobe Membranproteine mit einer TMD und einem Molekulargewicht von weniger als 10 kDa aus einem Polyacrylamid-Gel extrahiert werden können und die Gelmatrix weist keine Schrumpfung durch Dehydrierung auf. Dies liegt auch darin begründet, dass die Verwendung von 1-Butanol zu keiner ausgeprägte Phasentrennung bei der Mischung mit wässrigen Systemen führt, weshalb dieses organische Lösungsmittel schon in älteren Arbeiten zur Extraktion von hydrophoben Proteinen aus Membranen in wässrigen Puffersystemen verwendet worden ist (Sigrist *et al.*, 1977). Deutlich größere Proteine werden mit dieser Methode nur zu einem sehr geringen Teil aus einem Gel extrahiert. Dadurch weist diese Methode den Vorteil auf, dass aus einem Proteinkomplex, welcher mittels BN-PAGE isoliert

worden ist, selektiv die LMW-Proteine extrahiert und identifiziert werden können. Die Komplexität einer Probe ist dabei so niedrig, dass eine *offline* Analyse mittels ESI-MS ermöglicht wird. Dies beruht auch auf der Beobachtung, dass hydrophobe, niedermolekulare Membranproteine sehr gut in Aceton löslich sind (Friso et al., 2004). Eine quantitative Präzipitation dieser Proteine in 80% Aceton wird erst nach mindestens vier Stunden bei -20°C erreicht, weshalb Aceton als organisches Lösungsmittel für die Elektrospray-Lösung bei der *offline* ESI-MS geeignet ist. Andere Lösungsmittel, wie Methanol und Acetonitril die üblicherweise für die *offline* ESI-MS verwendet werden, erwiesen sich für LMW-Proteine als nicht geeignet, da die Löslichkeit in diesen Elektrospraylösungen zu niedrig war.

### 3.1.1. Alternative Nachweismethoden von LMW-Proteinen mittels MS

Der Nachweis von hydrophoben Proteinen mit  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen ist mit massenspektrometrischen Methoden nach wie vor nur eingeschränkt möglich (vgl. Kap. 2.1.1) (Eichacker et al., 2004). Nach einem proteolytischen Verdau sind dabei in erster Linie die Sequenzbereiche einer TMD nicht detektierbar. Daher stellt es eine besondere massenspektrometrische Herausforderung dar Proteine zu identifizieren, die nur ein sehr niedriges Molekulargewicht aufweisen und zudem über eine TMD verfügen, die sich über einen wesentlichen Bereich des ganzen Proteins erstreckt. Entsprechende LMW-Proteine finden sich als wesentliche Bestandteile der Komplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette, wie PSI, PSII und Cyt *b<sub>6</sub>f* (Shi et al., 2004; Zhang et al., 2004). In der Literatur wurden mehrere methodische Ansätze beschrieben, mit denen es möglich ist ein Gesamtproteinextrakt aus isolierten Thylakoidmembranen zu erhalten, wobei mittels LC-MS eine Proteinidentifikation auch von membranintegralen Proteinen möglich ist. Friso *et al.* führten eine fraktionierte Extraktion der Proteine aus Thylakoidmembranen mit einem Natriumcarbonat-Puffer, sowie organischen Lösungsmitteln, wie Aceton und Chloroform/Methanol durch und identifizierten die unverdauten Proteine (Friso et al., 2004). Mittels LC-MS gelang dadurch der Nachweis mehrere LMW-Proteine, wie PsbE, F, H, L, Tc, W, X, Y, aber besonders hydrophobe Untereinheiten, wie PsbJ, K, M und die Untereinheiten PetG, L, M, N des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes konnten nicht detektiert werden (Friso et al., 2004). Zudem war durch diesen Ansatz keine Charakterisierung von Proteinkomplexen möglich, sondern es fand nur eine Gesamtproteomanalyse der Thylakoidmembran statt. Gomez *et al.* wendeten einen vergleichbaren Ansatz an und trennten ein unverdautes Gesamtproteinextrakt aus Thylakoidmembranen nach einer Acetonfällung mittels HPLC auf und bestimmten direkt

mittels MS die Proteinmassen (Gomez et al., 2002). Dadurch gelang eine umfangreiche Identifikation der LMW-Proteine des PSII und es war zusätzlich die Identifikation von Phosphorylierungen, etwa an PsbH möglich. Aufgrund fehlender Fragmentationenanalysen war jedoch nur die Identifikation von Proteinen möglich, deren Massen bereits aus Proteindatenbanken bekannt waren. Huber *et al.* trennten zusätzlich die Proteinkomplexe mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation auf und führten anschließend ebenfalls mittels LC-MS eine Identifikation der unverdauten Proteine durch (Huber et al., 2004). Dadurch gelang der Nachweis von PsbE, F, H, I, K, L im PSII-Komplex. Whitelegge *et al.* gelangen im isolierten Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex der Nachweis der LMW-Untereinheiten PetG, L, M, N ebenfalls mittels LC-MS und es gelang eine umfangreiche Sequenzbestimmung dieser Untereinheiten mittels *de novo* Sequenzierung von MSMS-Spektren (Whitelegge et al., 2002). Diesen vorgenannten Arbeiten ist eine gelfreie Probenvorbereitung gemeinsam und eine umfangreiche Charakterisierung von verschiedenen Assemblierungszuständen einzelner Proteinkomplexe ist somit nicht oder nur eingeschränkt möglich. Entsprechende Studien werden vor allem unter Verwendung der BN/SDS-PAGE durchgeführt, wodurch sowohl eine Auftrennung in einzelne Proteinkomplexe, als auch in die entsprechenden Untereinheiten möglich ist (Schagger et al., 1994). Die Identifikation von LMW-Proteinen gestaltete sich in diesem System aber als überaus schwierig und durch proteolytischen In-Gel Verdau mit anschließender MS-Identifikation der Proteine gelang nur der Nachweis von PsbE, F, H, L (Heinemeyer et al., 2004; Granvogl et al., 2006).

Eine weitere methodische Gemeinsamkeit der oben beschriebenen Arbeiten zum Nachweis von LMW-Proteinen ist die Verwendung einer HPLC zur Verringerung der Komplexität der Probe. Ein zentrales Problem bei der Verwendung einer HPLC ist aber ein ausgeprägter *Memory*-Effekt der Chromatographie-Säule, welcher bei der Auftrennung von hydrophoben LMW-Proteinen zu beobachten ist (Whitelegge et al., 2006; Gomez et al., 2002). Dieser führt einerseits zu einem deutlichen Probenverlust und folglich niedrigeren Signalintensitäten der zu untersuchenden LMW-Proteine und erfordert andererseits aufwändige Reinigungsschritte der verwendeten Säulen.

### 3.1.2. Eigenschaften der *offline* ESI-MS-Spektren von LMW-Proteinen

*Offline* ESI-MS weist im Gegensatz zu *online* ESI-MS mehrere Vorteile auf. Zum einen ist der Zeitaufwand für die Messung einer Probe deutlich niedriger, da keine Reinigungsschritte einer HPLC-Säule durchgeführt werden müssen. Zum anderen besteht die Möglichkeit

Signale von Peptiden manuell für die MSMS-Fragmentierung auszuwählen, wodurch selektiv nur MSMS-Spektren von Interesse aufgenommen werden. Zudem können die Bedingungen der Fragmentierung, wie etwa die Kollisionsspannung, für jedes Peptid optimal justiert werden, wodurch qualitativ höherwertige Fragmentationenspektren generiert werden können. Automatisch generierte Spektren weisen vor allem bei höher geladenen Peptiden aufgrund von voreingestellten Werten eine deutlich schlechtere Qualität auf. Auffällig war die Beobachtung, dass hydrophobe und hydrophile Bereiche des Proteins kein unterschiedliches Fragmentierungsverhalten aufweisen. Die Identifikation von Teilsequenzen gelang sowohl von löslichen Domänen, als auch von TMDs. Signifikant schlechtere Fragmentationen wurden aber von Bereichen erhalten, welche die basischen AS Arg und Lys enthielten. Diese Beobachtung kann mit der Lokalisierung eines Protons an diesen AS erklärt werden (Wysocki et al., 2000).

Deutlich unterschiedliche Fragmentationensmuster wurden bei der Fragmentierung von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Adduktionen erhalten, vergleichbar den Ergebnissen, welche für synthetische Peptide erhalten wurden (Sabareesh et al., 2006). Vor allem  $\text{K}^+$ -Adduktionen führten zu Fragmentationen, welche die Sequenzermittlung von Bereichen ermöglichte, die bei der Analyse der Fragmentationen von ausschließlich protonierten Peptiden nicht zugänglich waren. Dieser Vorteil von Adduktionen steht dem Nachteil gegenüber, dass durch die Aufspaltung in verschiedene Signale deutlich niedrigere Signalintensitäten erreicht werden und zugleich vermehrt Überlagerungen von verschiedenen Signalen auftreten können. Eine Unterdrückung von Alkalimetall-Adduktionen durch Verwendung neutraler Lösungsmittel und Ammoniumformiat vergleichbar Kap. D.2.1 war jedoch aufgrund der niedrigen Kapillarspannung bei einer *offline* Messung nicht möglich (vgl. Kap. 1.4).

Ein weiteres interessantes Ergebnis war die Beobachtung deutlich unterschiedlicher Signalintensitäten einzelner LMW-Proteine. Die einzelnen LMW-Proteine eines Komplexes, wie etwa des PSII-Dimers, sollten in äquimolarer Menge vorliegen, wie aus Kristallstrukturanalysen ermittelt werden konnte (Loll et al., 2005). Trotzdem wurden signifikant unterschiedliche Signalintensitäten beobachtet. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an potentiellen Ladungsträgern, wie basischen Aminosäuren, und der Signalintensität festgestellt werden. Je mehr Ladungsträger vorhanden sind, umso intensivere Signale wurden beobachtet. Die Hydrophobizität eines Proteins hingegen scheint keinen Einfluss auf die Ionisierungseffizienz und damit die Signalintensität zu haben. Die Ursache für die unzureichende Detektierbarkeit von sehr hydrophoben Peptiden scheint somit in der Probenvorbereitung zu liegen und nicht in der Ionisierung selbst (Eichacker et al., 2004).

### 3.1.3. Detektion von LMW-Proteinen mittels MALDI-MS

Alternativ zu verschiedenen *online* und *offline* ESI-MS Methoden besteht auch die Möglichkeit LMW-Proteine mittels MALDI-MS nachzuweisen. In der Literatur wurden bislang nur wenige Methoden zum Nachweis der niedermolekularen, membranintegralen Untereinheiten der Photosystem-Komplexe mittels MALDI-MS beschrieben. Redeby *et al.* gelang mittels MALDI-TOF-MS der Nachweis mehrerer LMW-Proteine aus der Thylakoidmembran nach einer organischen Extraktion mit Chloroform/Methanol, sowie Hexafluorisopropanol und Auftrennung mittels HPLC (Redeby *et al.*, 2006). Szabo *et al.* gelang der Nachweis der Untereinheiten PsbE, F, I, K, L, Tc, W in PSII aus *Spinacia oleracea*, sowie von PsbE, F, H, I, K, L, M, Y in PSII aus *Synechocystis* (Szabo *et al.*, 2001). Die Aufreinigung des PSII-Komplexes erfolgte mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation und die Proteinkomplexe wurden direkt, ohne weitere Aufarbeitung mit einer Matrix-Lösung versetzt und mittels MALDI-MS vermessen. Dadurch gelang die Bestimmung der Proteinmassen der einzelnen Untereinheiten der PSII-Komplexe ohne zusätzliche Entsalzungsschritte (Szabo *et al.*, 2001). Die hohe Toleranz gegenüber Salzen ist ein Vorteil bei Messungen mittels MALDI, wodurch der Aufwand bei der Probenvorbereitung deutlich vereinfacht wird (Henzel *et al.*, 2001). Im Rahmen der eigenen Messungen wurde dies ebenfalls deutlich, da im Gegensatz zu Messungen mittels ESI-MS keine Alkalimetall-Adduktionen beobachtet wurden. Nachteil war jedoch sowohl bei den eigenen Messungen, als auch bei Szabo *et al.* 2001, die deutlich schlechtere gerätespezifische Auflösung in dem Massenbereich der intakten Proteine und die fehlende Möglichkeit der Erzeugung von Fragmentionsserien zur *de novo* Sequenzierung. So konnten Szabo *et al.* 2001 zahlreiche Signale nicht zu konkreten Proteinen zuordnen. Die Schwierigkeit der *de novo* Sequenzermittlung aus Fragmentionsserien von einfach geladenen Proteinen, wie sie typisch für MALDI MS-Spektren sind, ist dabei ein grundsätzlicher Nachteil der MALDI-Ionisierung gegenüber ESI-MS (Wysocki *et al.*, 2005).

## 3.2. Identifikation von PSI und PSII LMW-Proteinen in Plastiden

### 3.2.1. Nachweis von 13 PSII LMW Proteinen in Etioplasten

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals ein umfassender Nachweis von niedermolekularen, membranintegralen Untereinheiten des PSII auf Proteinebene im inneren Membransystem von Etioplasten. Nach der Auftrennung der Proteinkomplexe mittels BN-PAGE konnten nahe der Lauffront sowohl die plastidär kodierten Untereinheiten PsbE, F, H, I, J, K, L, M, N, Tc, als auch die kernkodierten Untereinheiten PsbW, X, Y2 nachgewiesen werden. Zusammen mit den Untereinheiten PsbO, P, Q des OEC-Komplexes und PsbS, deren Existenz in Etioplasten schon länger bekannt ist, sind nun 17 Untereinheiten des PSII in Etioplasten nachgewiesen worden (Kanervo et al., 2008; Blomqvist et al., 2008; von Zychlinski et al., 2005; Lonosky et al., 2004).

Bislang gab es Hinweise für die Transkription verschiedener Gene von PSII LMW-Proteinen, nicht aber auch für deren umfangreiche Akkumulation auf Proteinebene in Etioplasten. In *Triticum aestivum* konnte unabhängig von einer Belichtung die mRNA des PsbE, F, L, J-Operons nachgewiesen werden, ebenso wie die mRNA von PsbM und PsbN (Kawaguchi et al., 1992). Von PsbW gelang der Nachweis der mRNA in etiolierten Blättern von *Spinacia oleracea* (Lorkovic et al., 1995). Bezüglich der Transkription von PsbH, I, K wurde eine Lichtregulation der Intensität der Expression beschrieben (Kawaguchi et al., 1992). Interessanterweise wurde bei PsbX eine strikt lichtabhängige Transkription des entsprechenden Gens beschrieben (Shi et al., 1999; Funk, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit gelang aber auch in Etioplasten der Nachweis von PsbX, auch wenn die Konzentration signifikant niedriger als in Chloroplasten zu sein scheint. Dies ist zumindest ein Hinweis auf eine lichtabhängige Verstärkung der Expression von PsbX. Auf Proteinebene gelang bislang nur der Nachweis von PsbE, F, H, W, welche in erster Linie immunologisch identifiziert werden konnten (Kanervo et al., 2008; Muller et al., 1999; Hird et al., 1991).

Der Nachweis von PsbN gelang ausschließlich in Etioplasten. In Chloroplasten aus Gerste konnte PsbN weder in einem Komplex, noch nahe der Lauffront nachgewiesen werden, ebenso gelang kein Nachweis in Chloroplasten aus *Nicotiana tabacum* (Granvogl et al., eingereicht). Es ist nach wie vor ungeklärt, ob PsbN tatsächlich eine permanente Untereinheit von PSII ist (Kashino et al., 2002; Zghidi et al., 2007). Mutantanalysen in *Synechocystis* lieferten keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Photosynthese oder des Aufbaus der PSII-Komplexe bei einer Inaktivierung des Gens von PsbN (Mayers et al., 1993). Ältere

Arbeiten über den Nachweis von PsbN in PSII von *Synechocystis* und *Thermosynechococcus vulcanus* wurden durch neue Studien widerlegt (Kashino et al., 2002; Kashino et al., 2002; Ikeuchi et al., 1989). Expressionsanalysen zeigten jedoch, dass eine Genregulation vorliegt, die auch die Expression von PsbB, H, Tc beeinflusst (Zghidi et al., 2007). Entsprechend diesen Ergebnissen scheint PsbN zwar einen Zusammenhang mit PSII aufzuweisen, ist aber keine permanente Untereinheit von PSII. Möglicherweise bindet PsbN transient an PSII und spielt während der Ergrünung zu Beginn der Assemblierung von PSII eine Rolle. Dafür würde die Akkumulation von PsbN ausschließlich in Etioplasten sprechen.

Ein weiteres interessantes Ergebnis ist die Abwesenheit von PsbY1 sowohl in Etioplasten, als auch Chloroplasten der Gerste. Identifiziert werden konnte ausschließlich PsbY2, wobei Signale von hoher Intensität nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis von PsbY1 und Y2 in Chloroplasten aus *N. tabacum* (Granvogel et al., eingereicht). Von PsbY ist in Cyanobakterien, sowie in eukaryotischen Algen nur eine Form bekannt, wobei PsbY in Algen plastidär kodiert ist (Mant et al., 1998). In höheren Pflanzen ist PsbY kernkodiert, wobei eine Duplikation des ursprünglichen Gens vorliegt (Mant et al., 1998; Gau et al., 1998). Während des Imports kommt es zu einer mehrstufigen Prozessierung, woraus PsbY1 und PsbY2 resultieren, welche in *A. thaliana* und *N. tabacum* nachgewiesen werden konnten (Gau et al., 1998; Thompson et al., 1999), (Granvogel et al., eingereicht). Das Fehlen von PsbY1 in Gerste spricht dafür, dass nur ein PsbY, bzw. im konkreten Fall PsbY2, für einen funktionellen PSII-Komplex nötig ist. Möglicherweise wird der Import von PsbY1 in die innere Membran durch eine Mutation verhindert, oder es hat eine andere Mutation stattgefunden, welche für die Abwesenheit von PsbY1 verantwortlich ist.

### **3.2.2. Die unterschiedliche Akkumulation von PSI und PSII LMW-Proteinen**

Ein überraschendes Ergebnis war die Abwesenheit der PSI LMW-Proteine PsaI und PsaJ in Etioplasten. Im Gegensatz dazu waren in Chloroplasten beide Proteine eindeutig nachweisbar. Dies spricht für eine strikt lichtabhängige Akkumulation dieser beiden Untereinheiten, wodurch diese sich von den PSII LMW-Proteinen grundsätzlich unterscheiden. Bislang konnten weder im Rahmen der eigenen Arbeit Untereinheiten des PSI in Etioplasten massenspektrometrisch nachgewiesen werden, noch wurden in der Literatur bei Proteomanalysen von Etioplasten PSI-Proteine detektiert (Blomqvist et al., 2008; Kanervo et al., 2008; Blomqvist et al., 2006; von Zychlinski et al., 2005; Lonosky et al., 2004). Im Gegensatz dazu sind von PSII insgesamt 17 Proteine in Etioplasten nachgewiesen worden

(siehe Kap. 3.2.1). Dies zeigt, dass für die Assemblierung von PSI und PSII zwei grundlegend unterschiedliche Strategien bezüglich der Anreicherung der Untereinheiten im etiolierten Zustand vorliegen. Eine Schlüsselrolle scheint dabei Chl *a* zuzukommen, welches erst mit einsetzender Belichtung gebildet wird, wodurch es auch zur Anreicherung von Chl *a*-bindenden Proteinen kommt (Eichacker et al., 1990). Weder die 13 nachgewiesenen PSII LMW-Proteine, noch PsbO, P, Q des OEC-Komplexes binden Chl *a*, wie in Kristallstrukturanalysen nachgewiesen werden konnte (Nelson et al., 2006). Ob es sich bei PsbS um ein Chl *a*-bindendes Protein handelt ist nach wie vor umstritten (Dominici et al., 2002). Im Gegensatz dazu konnten bei PsaJ zwei gebundene Chl *a* nachgewiesen werden und bei PsaI ist noch nicht sicher geklärt, ob ein Chl *a* gebunden wird (Nelson et al., 2006). Die Anreicherung von höhermolekularen Untereinheiten von PSI, ebenso wie von PSII, erfolgt erst nach Belichtung von Etioplasten mit einsetzender Chl *a*-Synthese. So wurde bei Abwesenheit von Chl *a* zwar die Expression der plastidär kodierten Untereinheiten PsaA, B, sowie PsbA, B, C, D nachgewiesen, doch durch radiaktive Markierung dieser Proteine konnte deren schneller Abbau gezeigt werden (Eichacker et al., 1996; Kim et al., 1994; Eichacker et al., 1990). Lediglich PsbD zeigte eine gewisse Stabilität bei Abwesenheit von Chl *a*, welche durch eine Interaktion mit PsbE erklärt werden konnte (Choquet et al., 2001; Muller et al., 1999; Morais et al., 1998). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Anreicherung von Chl *a*-bindenden Proteinen in Plastiden von der Anwesenheit von Chl *a* abhängig ist. Untereinheiten, die kein Chl *a* binden werden auch unabhängig von der Anwesenheit von Chl *a* in Etioplasten akkumuliert.

### **3.3. Identifikation von PSI und PSII LMW-Proteinen in Chloroplasten**

In der BN-PAGE der Thylakoidmembranen von Chloroplasten gelang der Nachweis zahlreicher LMW-Proteine in verschiedenen Komplexen von PSI und PSII. PsaI und PsaJ konnten im PSI/LHCI-Komplex, sowie im Bereich der Superkomplexe nachgewiesen werden. Im Bereich des PSII Dimers gelang der Nachweis von PsbE, F, H, I, K, L, M, Tc, X, Y2 und im PSII Monomer konnten diese Proteine bis auf PsbH, X, Y2 ebenfalls nachgewiesen werden. Im PSII Monomer scheint eine deutlich niedrigere Proteinkonzentration vorzuliegen, wie aus der signifikant schwächeren Färbung der Bande im Gel, sowie aus der deutlich niedrigeren Signalintensität aller daraus extrahierten LMW-Proteine deutlich wird. Die Signalintensität von PsbH, X, Y2 war bereits im PSII Dimer sehr niedrig, weshalb die

Konzentration im PSII Monomer vermutlich unterhalb der Detektionsgrenze lag. Zumindest PsbH liegt im PSII Monomer vor, wie durch den Nachweis eines tryptischen Peptides gezeigt werden konnte (Granvogl et al., 2006). Von den Untereinheiten PsbX und PsbY2 wurden Signale mit sehr hoher Intensität nahe der Lauffront der BN-PAGE detektiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese beiden Untereinheiten sehr leicht während der Solubilisierung der Komplexe abgetrennt werden und somit nicht sehr fest am Komplex gebunden sind. Kristallstrukturanalysen an PSII aus *Thermosynechococcus elongatus* ergaben ebenfalls eine periphere Lage von PsbY, direkt benachbart zu PsbE und PsbF (Kawakami et al., 2007). Die exakte Position von PsbX konnte anhand von Kristallstrukturanalysen noch nicht abschließend geklärt werden, da noch mehrere  $\alpha$ -Helices nicht sicher einer Untereinheit zugewiesen werden konnten, aber die möglichen Lokalisationen sind ebenfalls peripher und nicht zentral innerhalb des PSII Dimers (Kawakami et al., 2007; Loll et al., 2005). Bei PsbJ handelte es sich um eine Untereinheit, welche ausschließlich nahe der Lauffront detektiert werden konnte. PsbJ wurde in Kristallstrukturanalysen ebenfalls peripher benachbart zu PsbE, F lokalisiert, was ebenfalls für eine leichte Dissoziierbarkeit vom Komplex spricht (Kawakami et al., 2007; Loll et al., 2005).

Bezüglich der Untereinheiten PsbL, M, Tc war kein Unterschied zwischen PSII Monomer und Dimer feststellbar. Diesen Untereinheiten wurde eine Funktion bei der Ausbildung des dimeren Zustandes von PSII zugesprochen (Loll et al., 2005; Iwai et al., 2004; Suorsa et al., 2004; Zheleva et al., 1998). Aufgrund der Anwesenheit dieser Untereinheiten in beiden Assemblierungsstudien scheint diesen Untereinheiten aber weniger eine regulierende Funktion bei der Bildung des PSII Dimers zuzukommen, vielmehr ist deren Anwesenheit eine Voraussetzung für die dimere Form (Granvogl *et al.*, eingereicht).

Im Bereich der Superkomplexe gelang zusätzlich der Nachweis von PsbW, welches weder im Bereich des PII Dimers, noch im PSII Monomer nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass PsbW eine Funktion bei der Bindung der LHCII Komplexe an das PSII Dimer innehat. Entsprechende Ergebnisse wurden auch durch immunologische Nachweise von PsbW in PSII Superkomplexen von *Spinacia oleracea* erhalten (Rokka et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurde in älteren Arbeiten eine Lokalisation von PsbW im PSII Dimer beschrieben, welche nicht bestätigt werden konnte (Zheleva et al., 1998; Irrgang et al., 1995).

### 3.4. LMW-Proteine des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes

Im Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex gelang erstmals der massenspektrometrische Nachweis aller vier bislang bekannten niedermolekularen, membranintegralen Untereinheiten PetG, L, M, N nach der Auftrennung mittels BN-PAGE. Bei PetL und PetN handelt es sich um die Proteine mit den höchsten Hydrophobizitätsgraden, welche im Rahmen dieser Arbeit detektiert werden konnten. Bei PetM, welches als einziges dieser vier Proteine kernkodiert ist, gelang eine vollständige Sequenzermittlung auf Basis unterschiedlicher Fragmentationsserien verschiedener Ladungs- und Adduktionenzustände. Bislang wurde eine massenspektrometrische Identifikation dieser Untereinheiten nur auf Basis von gelfreien und LC-basierten Methoden erreicht, wobei zwischen unterschiedlichen Assemblierungsstufen des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes nicht unterschieden werden konnte (Whitelegge et al., 2002).

Ein wesentliches Ergebnis des Nachweises dieser LMW-Proteine war die Beobachtung, dass zwischen dem Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex aus Etioplasten und aus Chloroplasten kein Unterschied besteht. Alle vier LMW-Untereinheiten konnten ebenso wie die vier höhermolekularen Untereinheiten PetA, B, C, D in beiden Plastidentypen nachgewiesen werden. Zusammen mit dem Nachweis von Protochlorophyll *a* anstelle von Chl *a* im etioplastidären Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplex ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass diesem Komplex eine funktionelle Rolle in Etioplasten zukommt (vgl. Kap. 2.4) (Reisinger et al., 2008).

Ein weiteres Ergebnis war der Nachweis aller vier LMW-Proteine sowohl im dimeren, als auch im monomeren Zustand des Cyt *b<sub>6</sub>f*-Komplexes. Studien an Deletionsmutanten von PetG, L, N lieferten Hinweise dafür, dass diese Untereinheiten eine Rolle bei der Dimerisierung spielen (Schwenkert et al., 2007). Da im Rahmen dieser Arbeit alle vier LMW-Untereinheiten in der monomeren Assemblierungsstufe nachgewiesen werden konnten, kann aber gefolgert werden, dass diese Untereinheiten zwar eine Funktion bei der Stabilisierung des dimeren Assemblierungszustandes innehaben können, aber die Anwesenheit auch im monomeren Assemblierungszustand spricht dafür, dass diese Untereinheiten nicht direkt zur Assemblierung des dimeren Zustandes führen. Möglicherweise hat das Rieske Fe-S-Protein PetC eine solche Funktion, denn diese Untereinheit konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht in der monomeren Assemblierungsstufe nachgewiesen werden (Granvogl et al., 2006). Darüber hinaus ist auch nicht abschließend geklärt, inwieweit der monomere Zustand funktionell ist, oder nur ein Artefakt der Solubilisierung darstellt (Breyton et al., 1997; Huang et al., 1994).

## F. 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

**Aluru, M.R. and Rodermel, S.R. (2004).** Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase. *Physiol Plant* **120**, 4-11

**Amann, K., Lezhneva, L., Wanner, G., Herrmann, R.G. and Meurer, J. (2004).** ACCUMULATION OF PHOTOSYSTEM ONE1, a member of a novel gene family, is required for accumulation of. *Plant Cell* **16**, 3084-97

**Amunts, A., Drory, O. and Nelson, N. (2007).** The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* **447**, 58-63

**Anderson, J.M. (2002).** Changing concepts about the distribution of Photosystems I and II between grana-appressed and stroma-exposed thylakoid membranes. *Photosynth Res* **73**, 157-64

**Anderson, J.M. and Melis, A. (1983).** Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 745-9

**Apel, K. and Kloppstech, K. (1978).** The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*). Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Eur J Biochem* **85**, 581-8

**Apel, K., Santel, H.J., Redlinger, T.E. and Falk, H. (1980).** The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Isolation and characterization of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur J Biochem* **111**, 251-8

**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

**Aronsson, H., Sohrt, K. and Soll, J. (2000).** NADPH:Protochlorophyllide oxidoreductase uses the general import route into chloroplasts. *Biol Chem* **381**, 1263-7

**Aronsson, H., Sundqvist, C. and Dahlin, C. (2003).** POR hits the road: import and assembly of a plastid protein. *Plant Mol Biol* **51**, 1-7

**Aronsson, H., Sundqvist, C. and Dahlin, C. (2003).** POR - import and membrane association of a key element in chloroplast development. *Physiol Plant* **118**, 1-9

**Aronsson, H., Sundqvist, C., Timko, M. and Dahlin, C. (2001).** Characterization of the assembly pathway of the pea NADPH:protochlorophyllide (Pchl) oxidoreductase (POR), with emphasis on the role of its substrate, Pchl. *Physiol. Plant.* **111**, 239-44

**Arteni, A.A., Zhang, P., Battchikova, N., Ogawa, T., Aro, E.M. and Boekema, E.J. (2006).** Structural characterization of NDH-1 complexes of *Thermosynechococcus elongatus* by single particle electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1469-75

- Artus, N.N., Ryberg, M., Lindsten, A., Ryberg, H. and Sundqvist, C. (1992).** The Shibata Shift and the Transformation of Etioplasts to Chloroplasts in Wheat with Clomazone (FMC 57020) and Amiprofos-Methyl (Tokunol M). *Plant Physiol* **98**, 253-63
- Baginsky, S. and Gruissem, W. (2004).** Chloroplast proteomics: potentials and challenges. *J Exp Bot* **55**, 1213-20
- 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
- Batschauer, A. and Apel, K. (1984).** An inverse control by phytochrome of the expression of two nuclear genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Eur J Biochem* **143**, 593-7
- Battchikova, N. and Aro, E.M. (2007).** Cyanobacterial NDH-1 complexes: multiplicity in function and subunit composition. *Physiol Plant* **131**, 22-32
- Battchikova, N., Zhang, P., Rudd, S., Ogawa, T. and Aro, E.M. (2005).** Identification of NdhL and Ssl1690 (NdhO) in NDH-1L and NDH-1M complexes of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **280**, 2587-95
- Becker, T., Hritz, J., Vogel, M., Caliebe, A., Bukau, B., Soll, J. and Schleiff, E. (2004).** Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. *Mol Biol Cell* **15**, 5130-44
- Ben-Shem, A., Frolov, F. and Nelson, N. (2003).** Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**, 630-5
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004).** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-95
- Benli, M., Schulz, R. and Apel, K. (1991).** Effect of light on the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **16**, 615-25
- Bennoun, P. (1982).** Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 4352-6
- Berger, S., Ellersiek, U., Westhoff, P. and Steinmueller, K. (1993).** Studies on the expression of NDH-H, a subunit of the NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase of higher-plant chloroplasts. *Planta* **190**, 25-31
- Biemann, K. (1990).** Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol* **193**, 886-7
- Blobel, G., Walter, P., Chang, C.N., Goldman, B.M., Erickson, A.H. and Lingappa, V.R. (1979).** Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. *Symp Soc Exp Biol* **33**, 9-36
- Blomqvist, L.A., Ryberg, M. and Sundqvist, C. (2008).** Proteomic analysis of highly purified prolamellar bodies reveals their significance in chloroplast development. *Photosynth Res* **96**, 37-50

- Blomqvist, L.A., Ryberg, M. and Sundqvist, C. (2006).** Proteomic analysis of the etioplast inner membranes of wheat (*Triticum aestivum*) by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Physiol. Plant.* **128**, 368-81
- 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
- Boudreau, E., Takahashi, Y., Lemieux, C., Turmel, M. and Rochaix, J.D. (1997).** The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex. *EMBO J* **16**, 6095-104
- Brandt, U., Kerscher, S., Drose, S., Zwicker, K. and Zickermann, V. (2003).** Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Lett* **545**, 9-17
- Breyton, C., Tribet, C., Olive, J., Dubacq, J.P. and Popot, J.L. (1997).** Dimer to monomer conversion of the cytochrome b6 f complex. Causes and consequences. *J Biol Chem* **272**, 21892-900
- Bricker, T.M., Morvant, J., Masri, N., Sutton, H.M. and Frankel, L.K. (1998).** Isolation of a highly active photosystem II preparation from *Synechocystis* 6803 using a histidine-tagged mutant of CP 47. *Biochim Biophys Acta* **1409**, 50-7
- Bruce, B.D. (2000).** Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol* **10**, 440-7
- Bruce, B.D. (2001).** The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim Biophys Acta* **1541**, 2-21
- Burrows, P.A., Sazanov, L.A., Svab, Z., Maliga, P. and Nixon, P.J. (1998).** Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J* **17**, 868-76
- Carbajo, R.J., Kellas, F.A., Runswick, M.J., Montgomery, M.G., Walker, J.E. and Neuhaus, D. (2005).** Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an alpha-subunit. *J Mol Biol* **351**, 824-38
- Carbajo, R.J., Silvester, J.A., Runswick, M.J., Walker, J.E. and Neuhaus, D. (2004).** Solution structure of subunit F(6) from the peripheral stalk region of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *J Mol Biol* **342**, 593-603
- Carol, P. and Kuntz, M. (2001).** A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci* **6**, 31-6
- Carroll, J., Shannon, R.J., Fearnley, I.M., Walker, J.E. and Hirst, J. (2002).** Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification of two new subunits. *J Biol Chem* **277**, 50311-7
- Casano, L.M., Lascano, H.R., Martin, M. and Sabater, B. (2004).** Topology of the plastid Ndh complex and its NDH-F subunit in thylakoid membranes. *Biochem J* **382**, 145-55
- Casano, L.M., Zapata, J.M., Martin, M. and Sabater, B. (2000).** Chlororespiration and

poising of cyclic electron transport. Plastoquinone as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J Biol Chem* **275**, 942-8

**Catala, R., Sabater, B. and Guera, A. (1997).** Expression of the plastid *ndhF* gene product in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of developing barley seedlings. *Plant Cell Physiol* **38**, 1382-8

**Chitnis, P.R. (2001).** PHOTOSYSTEM I: Function and Physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 593-626

**Choquet, Y., Wostrikoff, K., Rimbault, B., Zito, F., Girard-Bascou, J., Drapier, D. and Wollman, F.A. (2001).** Assembly-controlled regulation of chloroplast gene translation. *Biochem Soc Trans* **29**, 421-6

**Ciambella, C., Roepstorff, P., Aro, E.M. and Zolla, L. (2005).** A proteomic approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics* **5**, 746-57

**Collura, V. and Boissy, G. (2007).** From protein-protein complexes to interactomics. *Subcell Biochem* **43**, 135-83

**Cottrell, J.S. (1994).** Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept Res* **7**, 115-24

**Cox, J. and Mann, M. (2007).** Is proteomics the new genomics? *Cell* **130**, 395-8

**Cramer, W.A., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G. and Smith, J.L. (2004).** Evolution of photosynthesis: time-independent structure of the cytochrome *b6f* complex. *Biochemistry* **43**, 5921-9

**Cuello, J., Quiles, M.J., Albacete, M.E. and Sabater, B. (1995).** Properties of a large complex with NADH dehydrogenase activity from barley thylakoids. *Plant Cell Physiol.* **36**, 265-71

**Dahlin, C., Aronsson, H., Almkvist, J. and Sundqvist, C. (2000).** Protochlorophyllide-independent import of two NADPH:Pchl<sub>a</sub> oxidoreductase proteins (PORA and PORB) from barley into isolated plastids. *Physiol Plant* **109**, 298-303

**Dahlin, C., Sundqvist, C. and Timko, M.P. (1995).** The in vitro assembly of the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in pea chloroplasts. *Plant Mol Biol* **29**, 317-30

**Darie, C.C., Binossek, M.L., Winter, V., Mutschler, B. and Haehnel, W. (2005).** Isolation and structural characterization of the Ndh complex from mesophyll and bundle sheath chloroplasts of *Zea mays*. *FEBS J* **272**, 2705-16

**Darie, C.C., De Pascalis, L., Mutschler, B. and Haehnel, W. (2006).** Studies of the Ndh complex and photosystem II from mesophyll and bundle sheath chloroplasts of the C4-type plant *Zea mays*. *J. Plant Physiol.* **163**, 800-8

**de Hoog, C.L. and Mann, M. (2004).** Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **5**, 267-93

**Dekker, J.P. and Boekema, E.J. (2005).** Supramolecular organization of thylakoid

membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* **1706**, 12-39

**Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M. and Bassi, R. (2002).** Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J Biol Chem* **277**, 22750-8

**Dufresne, A., Salanoubat, M., Partensky, F., Artiguenave, F., Axmann, I.M., Barbe, V., Duprat, S., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Le Gall, F., Makarova, K.S., Ostrowski, M., Oztas, S., Robert, C., Rogozin, I.B., Scanlan, D.J., Tandeau de Marsac, N., Weissenbach, J., Wincker, P., Wolf, Y.I. and Hess, W.R. (2003).** Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10020-5

**Edman, P. (1970).** Sequence determination. *Mol Biol Biochem Biophys* **8**, 211-55

**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.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

**Eichacker, L.A., Muller, B. and Helfrich, M. (1996).** Stabilization of the chlorophyll binding apoproteins, P700, CP47, CP43, D2, and D1, by synthesis of Zn-pheophytin a in intact etioplasts from barley. *FEBS Lett* **395**, 251-6

**Eichacker, L.A., Soll, J., Lauterbach, P., Rudiger, W., Klein, R.R. and Mullet, J.E. (1990).** In vitro synthesis of chlorophyll a in the dark triggers accumulation of chlorophyll a apoproteins in barley etioplasts. *J Biol Chem* **265**, 13566-71

**Elortza, F., Asturias, J.A. and Arizmendi, J.M. (1999).** Chloroplast NADH dehydrogenase from *Pisum sativum*: characterization of its activity and cloning of *ndhK* gene. *Plant Cell Physiol* **40**, 149-54

**Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. (2007).** Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**, 953-71

**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

**Emanuelsson, O., Nielsen, H. and von Heijne, G. (1999).** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**, 978-84

**Endo, T., Ishida, S., Ishikawa, N. and Sato, F. (2008).** Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex and cyclic electron transport around photosystem I. *Mol Cells* **25**,

158-62

**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

**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

**Fischer, M., Funk, E. and Steinmuller, K. (1997).** The expression of subunits of the mitochondrial complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase during plastid development. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **52**, 481-6

**Florens, L. and Washburn, M.P. (2006).** Proteomic analysis by multidimensional protein identification technology. *Methods Mol Biol* **328**, 159-75

**Franck, F., Sperling, U., Frick, G., Pochert, B., van Cleve, B., Apel, K. and Armstrong, G.A. (2000).** Regulation of etioplast pigment-protein complexes, inner membrane architecture, and protochlorophyllide a chemical heterogeneity by light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B. *Plant Physiol* **124**, 1678-96

**Friedrich, T. and Scheide, D. (2000).** The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett* **479**, 1-5

**Friedrich, T., Steinmuller, K. and Weiss, H. (1995).** The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett* **367**, 107-11

**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

**Fu, A., He, Z., Cho, H.S., Lima, A., Buchanan, B.B. and Luan, S. (2007).** A chloroplast cyclophilin functions in the assembly and maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15947-52

**Fulgosi, H., Vener, A.V., Altschmied, L., Herrmann, R.G. and Andersson, B. (1998).** A novel multi-functional chloroplast protein: identification of a 40 kDa immunophilin-like protein located in the thylakoid lumen. *EMBO J* **17**, 1577-87

**Funk, C. (2000).** Functional analysis of the PsbX protein by deletion of the corresponding gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **44**, 815-27

**Funk, E., Schaefer, E. and Steinmueller, K. (1999).** Characterization of the complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase (NDH-complex) of maize chloroplasts. *J. Plant Physiol.* **154**, 16-23

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2003).** ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-8
- Gau, A.E., Thole, H.H., Sokolenko, A., Altschmied, L., Hermann, R.G. and Pistorius, E.K. (1998).** PsbY, a novel manganese-binding, low-molecular-mass protein associated with photosystem II. *Mol Gen Genet* **260**, 56-68
- Gevaert, K., Goethals, M., Martens, L., Van Damme, J., Staes, A., Thomas, G.R. and Vandekerckhove, J. (2003).** Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat Biotechnol* **21**, 566-9
- Gomez, S.M., Bil', K.Y., Aguilera, R., Nishio, J.N., Faull, K.F. and Whitelegge, J.P. (2003).** Transit peptide cleavage sites of integral thylakoid membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1068-85
- 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
- Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, L.A., Gardestrom, 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
- Granvogl, B. (2008).** Entwicklung neuer Methoden zur massenspektrometrischen Charakterisierung von Membranproteinen. Dissertation
- 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
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (1999).** Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-81
- Griffiths, W.T. (1978).** Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochem J* **174**, 681-92
- Groth, G. and Pohl, E. (2001).** The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution. *J Biol Chem* **276**, 1345-52
- Guedeney, G., Corneille, S., Cuine, S. and Peltier, G. (1996).** Evidence for an association of ndh B, ndh J gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett* **378**, 277-80
- Guera, A., de Nova, P.G. and Sabater, B. (2000).** Identification of the Ndh (NAD(P)H-

plastoquinone-oxidoreductase) complex in etioplast membranes of barley: changes during photomorphogenesis of chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **41**, 49-59

**Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B. and Klosgen, R.B. (2006).** Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* **163**, 333-47

**Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H. and Aebersold, R. (1999).** Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-9

**Hager, M., Hermann, M., Biehler, K., Krieger-Liszky, A. and Bock, R. (2002).** Lack of the small plastid-encoded PsbJ polypeptide results in a defective water-splitting apparatus of photosystem II, reduced photosystem I levels, and hypersensitivity to light. *J Biol Chem* **277**, 14031-9

**Hankamer, B., Morris, E., Nield, J., Carne, A. and Barber, J. (2001).** Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Lett* **504**, 142-51

**Hansson, A., Amann, K., Zygadlo, A., Meurer, J., Scheller, H.V. and Jensen, P.E. (2007).** Knock-out of the chloroplast-encoded PSI-J subunit of photosystem I in *Nicotiana tabacum*. *FEBS J* **274**, 1734-46

**Heazlewood, J.L., Howell, K.A. and Millar, A.H. (2003).** Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim Biophys Acta* **1604**, 159-69

**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

**Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W. and Ellis, R.J. (1988).** Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**, 330-4

**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

**Henzel, W.J. and Stults, J.T. (2001).** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass analysis of peptides. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 16**, Unit 16.2

**Herranen, M., Battchikova, N., Zhang, P., Graf, A., Sirpio, S., Paakkarinen, V. and Aro, E.M. (2004).** Towards functional proteomics of membrane protein complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* **134**, 470-81

**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
- Hird, S.M., Webber, A.N., Wilson, R.J., Dyer, T.A. and Gray, J.C. (1991).** Differential expression of the psbB and psbH genes encoding the 47 kDa chlorophyll a-protein and the 10 kDa phosphoprotein of photosystem II during chloroplast development in wheat. *Curr Genet* **19**, 199-206
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, S. (1998).** SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**, 378-9
- Holtorf, H. and Apel, K. (1996).** Transcripts of the two NADPH protochlorophyllide oxidoreductase genes *PorA* and *PorB* are differentially degraded in etiolated barley seedlings. *Plant Mol Biol* **31**, 387-92
- Holtorf, H., Reinbothe, S., Reinbothe, C., Berezina, B. and Apel, K. (1995).** Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3254-8
- Horwich, A.L., Fenton, W.A., Chapman, E. and Farr, G.W. (2007).** Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 115-45
- Huang, D., Everly, R.M., Cheng, R.H., Heymann, J.B., Schagger, H., Sled, V., Ohnishi, T., Baker, T.S. and Cramer, W.A. (1994).** Characterization of the chloroplast cytochrome b6/f complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry* **33**, 4401-9
- 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
- Hung, C.W., Schlosser, A., Wei, J. and Lehmann, W.D. (2007).** Collision-induced reporter fragmentations for identification of covalently modified peptides. *Anal Bioanal Chem* **389**, 1003-16
- Ikeuchi, M., Koike, H. and Inoue, Y. (1989).** N-terminal sequencing of low-molecular-mass components in cyanobacterial photosystem II core complex. Two components correspond to unidentified open reading frames of plant chloroplast DNA. *FEBS Lett* **253**, 178-82
- 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
- Ishihara, S., Takabayashi, A., Ido, K., Endo, T., Ifuku, K. and Sato, F. (2007).** Distinct functions for the two PsbP-like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast thylakoid lumen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **145**, 668-79
- Ito, A., Okamura, T.A., Yamamoto, H., Ueyama, N., Yamaguchi, M., Kuyama, H., Ando, E., Tsunasawa, S., Ake, K., Masui, R., Kuramitsu, S., Nakazawa, T. and Norioka, S. (2007).** Simultaneous detection of N-terminal fragment ions in a protein mixture using a ruthenium(II) complex. *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**, 2647-53
- Iwai, M., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2006).** Absence of the psbH gene product

destabilizes the Photosystem II complex and prevents association of the Photosystem II-X protein in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Photosynth Res* **87**, 313-22

**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

**Jarvis, P. (2008).** Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol*

**Jarvis, P., Chen, L.J., Li, H., Peto, C.A., Fankhauser, C. and Chory, J. (1998).** An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* **282**, 100-3

**Jarvis, P. and Robinson, C. (2004).** Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr Biol* **14**, R1064-77

**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

**Joet, T., Cournac, L., Peltier, G. and Havaux, M. (2002).** Cyclic electron flow around photosystem I in C(3) plants. In vivo control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiol* **128**, 760-9

**Joet, T., Genty, B., Josse, E.M., Kuntz, M., Cournac, L. and Peltier, G. (2002).** Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the Arabidopsis thaliana enzyme in tobacco. *J Biol Chem* **277**, 31623-30

**Johansson, C., Samskog, J., Sundstrom, L., Wadensten, H., Bjorkesten, L. and Flensburg, J. (2006).** Differential expression analysis of Escherichia coli proteins using a novel software for relative quantitation of LC-MS/MS data. *Proteomics* **6**, 4475-85

**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

**Jorin, J.V., Maldonado, A.M. and Castillejo, M.A. (2007).** Plant proteome analysis: a 2006 update. *Proteomics* **7**, 2947-62

**Kanervo, E., Singh, M., Suorsa, M., Paakkarinen, V., Aro, E., Battchikova, N. and Aro, E.M. (2008).** Expression of protein complexes and individual proteins upon transition of etioplasts to chloroplasts in pea (*Pisum sativum*). *Plant Cell Physiol* **49**, 396-410

**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., Koike, H., Yoshio, M., Egashira, H., Ikeuchi, M., Pakrasi, H.B. and Satoh, K. (2002).** Low-molecular-mass polypeptide components of a photosystem II preparation from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*. *Plant Cell Physiol* **43**, 1366-73

- Kashino, Y., Lauber, W.M., Carroll, J.A., Wang, Q., Whitmarsh, J., Satoh, K. and Pakrasi, H.B. (2002).** Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides. *Biochemistry* **41**, 8004-12
- Kawaguchi, H., Fukuda, I., Shiina, T. and Toyoshima, Y. (1992).** Dynamical behavior of psb gene transcripts in greening wheat seedlings. I. Time course of accumulation of the psbA through psbN gene transcripts during light-induced greening. *Plant Mol Biol* **20**, 695-704
- Kawakami, K., Iwai, M., Ikeuchi, M., Kamiya, N. and Shen, J.R. (2007).** Location of PsbY in oxygen-evolving photosystem II revealed by mutagenesis and X-ray crystallography. *FEBS Lett* **581**, 4983-7
- 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
- Kim, C. and Apel, K. (2004).** Substrate-dependent and organ-specific chloroplast protein import in planta. *Plant Cell* **16**, 88-98
- Kim, C., Ham, H. and Apel, K. (2005).** Multiplicity of different cell- and organ-specific import routes for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductases A and B in plastids of Arabidopsis seedlings. *Plant J* **42**, 329-40
- Kim, J., Eichacker, L.A., Rudiger, W. and Mullet, J.E. (1994).** Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll proteins P700 and D1 by increasing apoprotein stability. *Plant Physiol* **104**, 907-16
- Komenda, J., Tichy, M. and Eichacker, L.A. (2005).** The PsbH protein is associated with the inner antenna CP47 and facilitates D1 processing and incorporation into PSII in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **46**, 1477-83
- 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
- Kuntz, M. (2004).** Plastid terminal oxidase and its biological significance. *Planta* **218**, 896-9
- Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J.L. and Cramer, W.A. (2003).** Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* **302**, 1009-14
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982).** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-32
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5
- Lee, W.J. and Whitmarsh, J. (1989).** Photosynthetic Apparatus of Pea Thylakoid Membranes : Response to Growth Light Intensity. *Plant Physiol* **89**, 932-40

- Leister, D. (2003).** Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* **19**, 47-56
- Levy-Rimler, G., Bell, R.E., Ben-Tal, N. and Azem, A. (2002).** Type I chaperonins: not all are created equal. *FEBS Lett* **529**, 1-5
- Lill, H., Burkovski, A., Altendorf, K., Junge, W. and Engelbrecht, S. (1993).** Complementation of *Escherichia coli* unc mutant strains by chloroplast and cyanobacterial F1-ATPase subunits. *Biochim Biophys Acta* **1144**, 278-84
- 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
- Lima, A., Lima, S., Wong, J.H., Phillips, R.S., Buchanan, B.B. and Luan, S. (2006).** A redox-active FKBP-type immunophilin functions in accumulation of the photosystem II supercomplex in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12631-6
- 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, 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
- Lonosky, P.M., Zhang, X., Honavar, V.G., Dobbs, D.L., Fu, A. and Rodermel, S.R. (2004).** A proteomic analysis of maize chloroplast biogenesis. *Plant Physiol* **134**, 560-74
- Lopez-Juez, E. and Pyke, K.A. (2005).** Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol* **49**, 557-77
- 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
- Ma, J., Peng, L., Guo, J., Lu, Q., Lu, C. and Zhang, L. (2007).** LPA2 is required for efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**, 1980-93
- Ma, W., Deng, Y., Ogawa, T. and Mi, H. (2006).** Active NDH-1 complexes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **47**, 1432-6
- Mackender, R.O. (1978).** Etioplast Development in Dark-grown Leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiol* **62**, 499-505
- Maier, R.M., Neckermann, K., Igloi, G.L. and Kossel, H. (1995).** Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol* **251**, 614-28
- Majeran, W., Zybaylov, B., Ytterberg, A.J., Dunsmore, J., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2008).** Consequences of C4 differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize

mesophyll and bundle sheath cells. *Mol Cell Proteomics*

**Manchenko, G. (2002).** Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels, 2nd Ed. CRC Press

**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

**Mant, A. and Robinson, C. (1998).** An Arabidopsis cDNA encodes an apparent polyprotein of two non-identical thylakoid membrane proteins that are associated with photosystem II and homologous to algal ycf32 open reading frames. *FEBS Lett* **423**, 183-8

**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

**Martin, M., Casano, L.M. and Sabater, B. (1996).** Identification of the product of ndhA gene as a thylakoid protein synthesized in response to photooxidative treatment. *Plant Cell Physiol* **37**, 293-8

**Martin, W. and Herrmann, R.G. (1998).** Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**, 9-17

**Masuda, T., Fusada, N., Oosawa, N., Takamatsu, K., Yamamoto, Y.Y., Ohto, M., Nakamura, K., Goto, K., Shibata, D., Shirano, Y., Hayashi, H., Kato, T., Tabata, S., Shimada, H., Ohta, H. and Takamiya, K. (2003).** Functional analysis of isoforms of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **44**, 963-74

**Matsubayashi, T., Wakasugi, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Zaita, N., Hidaka, T., Meng, B.Y., Ohto, C., Tanaka, M., Kato, A. and et, a.l. (1987).** Six chloroplast genes (ndhA-F) homologous to human mitochondrial genes encoding components of the respiratory chain NADH dehydrogenase are actively expressed: determination of the splice sites in ndhA and ndhB pre-mRNAs. *Mol Gen Genet* **210**, 385-93

**Mayers, S.R., Dubbs, J.M., Vass, I., Hideg, E., Nagy, L. and Barber, J. (1993).** Further characterization of the psbH locus of Synechocystis sp. PCC 6803: inactivation of psbH impairs QA to QB electron transport in photosystem 2. *Biochemistry* **32**, 1454-65

**McDonald, L. and Beynon, R.J. (2006).** Positional proteomics: preparation of amino-terminal peptides as a strategy for proteome simplification and characterization. *Nat Protoc* **1**, 1790-8

**McDonald, L., Robertson, D.H., Hurst, J.L. and Beynon, R.J. (2005).** Positional proteomics: selective recovery and analysis of N-terminal proteolytic peptides. *Nat Methods* **2**, 955-7

**McEvoy, J.P., Gascon, J.A., Batista, V.S. and Brudvig, G.W. (2005).** The mechanism of photosynthetic water splitting. *Photochem Photobiol Sci* **4**, 940-9

- Meetam, M., Keren, N., Ohad, I. and Pakrasi, H.B. (1999).** The PsbY protein is not essential for oxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* **121**, 1267-72
- Meinzel, T., Peynot, P. and Giglione, C. (2005).** Processed N-termini of mature proteins in higher eukaryotes and their major contribution to dynamic proteomics. *Biochimie* **87**, 701-12
- Miyagi, M., Nakao, M., Nakazawa, T., Kato, I. and Tsunasawa, S. (1998).** A novel derivatization method with 5-bromonicotinic acid N-hydroxysuccinimide for determination of the amino acid sequences of peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* **12**, 603-8
- Morais, F., Barber, J. and Nixon, P.J. (1998).** The chloroplast-encoded alpha subunit of cytochrome b-559 is required for assembly of the photosystem two complex in both the light and the dark in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **273**, 29315-20
- Mortier, K.A., Zhang, G.F., van Peteghem, C.H. and Lambert, W.E. (2004).** Adduct formation in quantitative bioanalysis: effect of ionization conditions on paclitaxel. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**, 585-92
- Mortz, 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
- Müller, B. and Eichacker, L.A. (1999).** Assembly of the D1 precursor in monomeric photosystem II reaction center precomplexes precedes chlorophyll a-triggered accumulation of reaction center II in barley etioplasts. *Plant Cell* **11**, 2365-77
- Munchbach, M., Quadroni, M., Miotto, G. and James, P. (2000).** Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety. *Anal Chem* **72**, 4047-57
- Nakamura, T., Yu, Z., Fainzilber, M. and Burlingame, A.L. (1996).** Mass spectrometric-based revision of the structure of a cysteine-rich peptide toxin with gamma-carboxyglutamic acid, TxVIIA, from the sea snail, *Conus textile*. *Protein Sci* **5**, 524-30
- Nakazawa, T., Yamaguchi, M., Okamura, T.A., Ando, E., Nishimura, O. and Tsunasawa, S. (2008).** Terminal proteomics: N- and C-terminal analyses for high-fidelity identification of proteins using MS. *Proteomics* **8**, 673-85
- 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
- Nishio, K., Hirohashi, T. and Nakai, M. (1999).** Chloroplast chaperonins: evidence for heterogeneous assembly of alpha and beta Cpn60 polypeptides into a chaperonin oligomer. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 584-7
- Nixon, P.J. (2000).** Chlororespiration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 1541-7

- 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* **5**, 4367-75
- O'Farrell, P.H. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250** , 4007-21
- Ogawa, T. and Mi, H. (2007).** Cyanobacterial NADPH dehydrogenase complexes. *Photosynth Res* **93**, 69-77
- Ohashi, K., Tanaka, A. and Tsuji, H. (1989).** Formation of the Photosynthetic Electron Transport System during the Early Phase of Greening in Barley Leaves. *Plant Physiol* **91**, 409-14
- Okamura, T., Iwamura, T., Ito, A., Kaneko, M., Yamaguchi, M., Yamamoto, H., Ueyama, N., Kuyama, H., Ando, E., Norioka, S., Nakazawa, T., Masui, R. and Kuramitsu, S. (2005).** Application of bis(terpyridine)ruthenium(II) to N-terminal amino acid sequencing. *Chem. Lett.* **34**, 332-3
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A. and Mann, M. (2002).** Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**, 376-86
- Ong, S.E. and Mann, M. (2007).** Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods Mol Biol* **359**, 37-52
- Oosawa, N., Masuda, T., Awai, K., Fusada, N., Shimada, H., Ohta, H. and Takamiya, K. (2000).** Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **474**, 133-6
- Ouellette, A.J. and Barry, B.A. (2002).** Tandem mass spectrometric identification of spinach Photosystem II light-harvesting components. *Photosynth Res* **72**, 159-73
- 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
- Pearson, W.R. (1990).** Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* **183**, 63-98
- Peltier, G. and Cournac, L. (2002).** Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 523-50
- 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 luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* **14**, 211-36
- 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
- Peng, L., Ma, J., Chi, W., Guo, J., Zhu, S., Lu, Q., Lu, C. and Zhang, L. (2006).** LOW

PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18**, 955-69

**Philippar, K., Geis, T., Ilkavets, I., Oster, U., Schwenkert, S., Meurer, J. and Soll, J. (2007).** Chloroplast biogenesis: the use of mutants to study the etioplast-chloroplast transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 678-83

**Plucken, H., Muller, B., Grohmann, D., Westhoff, P. and Eichacker, L.A. (2002).** The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **532**, 85-90

**Quiles, M.J., Garcia, A. and Cuello, J. (2000).** Separation by blue-native PAGE and identification of the whole NAD(P)H dehydrogenase complex from barley stroma thylakoids. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)* **38**, 225-32

**Quiles, M.J., Garcia, A. and Cuello, J. (2003).** Comparison of the thylakoidal NAD(P)H dehydrogenase complex and the mitochondrial complex I separated from barley leaves by blue-native PAGE. *Plant Science (Shannon, Ireland)* **164**, 541-7

**Rabilloud, T. (1990).** Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11**, 785-94

**Redeby, T., Carr, H., Bjork, M. and Emmer, A. (2006).** A screening procedure for the solubilization of chloroplast membrane proteins from the marine green macroalga *Ulva lactuca* using RP-HPLC-MALDI-MS. *Int J Biol Macromol* **39**, 29-36

**Reinbothe, C., Lebedev, N., Apel, K. and Reinbothe, S. (1997).** Regulation of chloroplast protein import through a protochlorophyllide-responsive transit peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8890-4

**Reinbothe, C., Pollmann, S., Phetsarath-Faure, P., Quigley, F., Weisbeek, P. and Reinbothe, S. (2008).** A pentapeptide motif related to a pigment binding site in the major light-harvesting protein of photosystem II, LHCII, governs substrate-dependent plastid import of NADPH:proto-chlorophyllide oxidoreductase (POR). *Plant Physiol*

**Reinbothe, S., Mache, R. and Reinbothe, C. (2000).** A second, substrate-dependent site of protein import into chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9795-800

**Reinbothe, S., Pollmann, S., Springer, A., James, R.J., Tichtinsky, G. and Reinbothe, C. (2005).** A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR). *Plant J* **42**, 1-12

**Reinbothe, S., Quigley, F., Gray, J., Schemenewitz, A. and Reinbothe, C. (2004).** Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase A into the chloroplast of barley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2197-202

**Reinbothe, S., Quigley, F., Springer, A., Schemenewitz, A. and Reinbothe, C. (2004).** The outer plastid envelope protein Oep16: role as precursor translocase in import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2203-8

**Reinbothe, S., Reinbothe, C., Holtorf, H. and Apel, K. (1995).** Two NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductases in Barley: Evidence for the Selective

Disappearance of PORA during the Light-Induced Greening of Etiolated Seedlings. *Plant Cell* **7**, 1933-40

**Reinbothe, S., Reinbothe, C., Neumann, D. and Apel, K. (1996).** A plastid enzyme arrested in the step of precursor translocation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12026-30

**Reinbothe, S., Runge, S., Reinbothe, C., van Cleve, B. and Apel, K. (1995).** Substrate-dependent transport of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase into isolated plastids. *Plant Cell* **7**, 161-72

**Reisinger, V. (2008).** Biogenese photosynthetischer Elektronentransportkomplexe in Plastiden der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation

**Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2006).** Analysis of Membrane Protein Complexes by Blue Native PAGE. *Proteomics* **6 Suppl 2**, 6-15

**Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2007).** How to analyze protein complexes by 2D blue native SDS-PAGE. *Proteomics* **7 Suppl 1**, 6-16

**Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2008).** Isolation of membrane protein complexes by blue native electrophoresis. *Methods Mol Biol* **424**, 423-31

**Reisinger, V., Hertle, A.P., Ploscher, M. and Eichacker, L.A. (2008).** Cytochrome b6f is a dimeric protochlorophyll a binding complex in etioplasts. *FEBS J* **275**, 1018-24

**Reisinger, V., Ploscher, M. and Eichacker, L.A. (2008).** Lil3 assembles as chlorophyll-binding protein complex during deetiolation. *FEBS Lett* **582**, 1547-51

**Reyes-Prieto, A., Weber, A.P. and Bhattacharya, D. (2007).** The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu Rev Genet* **41**, 147-68

**Richter, S. and Lamppa, G.K. (1998).** A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7463-8

**Richter, S. and Lamppa, G.K. (2002).** Determinants for removal and degradation of transit peptides of chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* **277**, 43888-94

**Richter, S. and Lamppa, G.K. (2003).** Structural properties of the chloroplast stromal processing peptidase required for its function in transit peptide removal. *J Biol Chem* **278**, 39497-502

**Rochaix, J.D., Perron, K., Dauvillee, D., Laroche, F., Takahashi, Y. and Goldschmidt-Clermont, M. (2004).** Post-transcriptional steps involved in the assembly of photosystem I in *Chlamydomonas*. *Biochem Soc Trans* **32**, 567-70

**Rogner, M., Boekema, E.J. and Barber, J. (1996).** How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion. *Trends Biochem Sci* **21**, 44-9

**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

- Romano, P., Gray, J., Horton, P. and Luan, S. (2005).** Plant immunophilins: functional versatility beyond protein maturation. *New Phytol* **166**, 753-69
- 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
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A. and Pappin, D.J. (2004).** Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* **3**, 1154-69
- 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
- Rumeau, D., Becuwe-Linka, N., Beyly, A., Louwagie, M., Garin, J. and Peltier, G. (2005).** New subunits NDH-M, -N, and -O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell* **17**, 219-32
- Rumeau, D., Peltier, G. and Cournac, L. (2007).** Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* **30**, 1041-51
- Sabareesh, V. and Balaram, P. (2006).** Tandem electrospray mass spectrometric studies of proton and sodium ion adducts of neutral peptides with modified N- and C-termini: synthetic model peptides and microheterogeneous peptaibol antibiotics. *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**, 618-28
- Saibil, H.R., Zheng, D., Roseman, A.M., Hunter, A.S., Watson, G.M., Chen, S., Auf Der Mauer, A., O'Hara, B.P., Wood, S.P., Mann, N.H., Barnett, L.K. and Ellis, R.J. (1993).** ATP induces large quaternary rearrangements in a cage-like chaperonin structure. *Curr Biol* **3**, 265-73
- Salvi, D., Rolland, N., Joyard, J. and Ferro, M. (2008).** Purification and proteomic analysis of chloroplasts and their sub-organellar compartments. *Methods Mol Biol* **432**, 19-36
- Sanchez, A., Ramos, Y., Solano, Y., Gonzalez, L.J., Besada, V., Betancourt, L., Gil, J., Alvarez, F., Rodriguez, M., Perez, L., Pujol, M. and Padron, G. (2007).** Double acylation for identification of amino-terminal peptides of proteins isolated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**, 2237-44
- Sanchez, A., Ramos, Y., Solano, Y., Gonzalez, L.J., Betancourt, L., Gil, J., Padron, G. and Besada, V. (2007).** Letter: Specific isotope labeling for the identification of free N-terminal peptide of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* **13**, 307-9
- Sazanov, L.A., Burrows, P.A. and Nixon, P.J. (1998).** The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1319-24
- 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

**Schemenewitz, A., Pollmann, S., Reinbothe, C. and Reinbothe, S. (2007).** A substrate-independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8538-43

**Schleiff, E., Jelic, M. and Soll, J. (2003).** A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4604-9

**Schleiff, E. and Soll, J. (2000).** Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* **211**, 449-56

**Schmidt, A., Kellermann, J. and Lottspeich, F. (2005).** A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **5**, 4-15

**Schubert, M., Petersson, U.A., Haas, B.J., Funk, C., Schroder, W.P. and Kieselbach, T. (2002).** Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **277**, 8354-65

**Schulz, R., Steinmuller, K., Klaas, M., Forreiter, C., Rasmussen, S., Hiller, C. and Apel, K. (1989).** Nucleotide sequence of a cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (PCR) of barley (*Hordeum vulgare* L.) and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **217**, 355-61

**Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flugge, U.I. and Kunze, R. (2003).** ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol* **131**, 16-26

**Schwenkert, S., Umate, P., Dal Bosco, C., Volz, S., Mlcochova, L., Zoryan, M., Eichacker, L.A., Ohad, I., Herrmann, R.G. and Meurer, J. (2006).** PsbI affects the stability, function, and phosphorylation patterns of photosystem II assemblies in tobacco. *J Biol Chem* **281**, 34227-38

**Schwenkert, S., Legen, J., Takami, T., Shikanai, T., Herrmann, R.G. and Meurer, J. (2007).** Role of the low-molecular-weight subunits PetL, PetG, and PetN in assembly, stability, and dimerization of the cytochrome b6f complex in tobacco. *Plant Physiol*. **144**, 1924-35

**Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H. and Muller, D.J. (2000).** Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405**, 418-9

**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

**Selstam, E. and Sandelius, A.S. (1984).** A Comparison between Prolamellar Bodies and Prothylakoid Membranes of Etioplasts of Dark-Grown Wheat Concerning Lipid and Polypeptide Composition. *Plant Physiol* **76**, 1036-40

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

**Shi, L.X., Kim, S.J., Marchant, A., Robinson, C. and Schroder, W.P. (1999).** Characterisation of the PsbX protein from Photosystem II and light regulation of its gene expression in higher plants. *Plant Mol Biol* **40**, 737-44

**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

**Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K. and Yokota, A. (1998).** Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9705-9

**Shimizu, H., Peng, L., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K. and Shikanai, T. (2008).** CRR23/NdhL is a subunit of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **49**, 835-42

**Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. (1986).** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* **5**, 2043-9

**Sigrist, H., Sigrist-Nelson, K. and Gitler, C. (1977).** Single-phase butanol extraction: a new tool for proteolipid isolation. *Biochem Biophys Res Commun* **74**, 178-84

**Silva, J.C., Denny, R., Dorschel, C.A., Gorenstein, M., Kass, I.J., Li, G.Z., McKenna, T., Nold, M.J., Richardson, K., Young, P. and Geromanos, S. (2005).** Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem* **77**, 2187-200

**Silverthorne, J. and Tobin, E.M. (1984).** Demonstration of transcriptional regulation of specific genes by phytochrome action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1112-6

**Soll, J. and Schleiff, E. (2004).** Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 198-208

**Spano, A.J., He, Z., Michel, H., Hunt, D.F. and Timko, M.P. (1992).** Molecular cloning, nuclear gene structure, and developmental expression of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Mol Biol* **18**, 967-72

- Stockel, J. and Oelmüller, R. (2004).** A novel protein for photosystem I biogenesis. *J Biol Chem* **279**, 10243-51
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L. and Picot, D. (2003).** An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature* **426**, 413-8
- Sugiura, M., Inoue, Y. and Minagawa, J. (1998).** Rapid and discrete isolation of oxygen-evolving His-tagged photosystem II core complex from *Chlamydomonas reinhardtii* by Ni<sup>2+</sup> affinity column chromatography. *FEBS Lett* **426**, 140-4
- Suorsa, M., Regel, R.E., Paakkarinen, 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
- Sveshnikova, N., Grimm, R., Soll, J. and Schleiff, E. (2000).** Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75. *Biol Chem* **381**, 687-93
- Swanson, S.K. and Washburn, M.P. (2005).** The continuing evolution of shotgun proteomics. *Drug Discov Today* **10**, 719-25
- 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 psbEFLJoperon in *Nicotiana tabacum*. *Mol Genet Genomics* **268**, 699-710
- 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
- Teakle, G.R. and Griffiths, W.T. (1993).** Cloning, characterization and import studies on protochlorophyllide reductase from wheat (*Triticum aestivum*). *Biochem J* **296 ( Pt 1)**, 225-30
- 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
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-80
- Thompson, S.J., Kim, S.J. and Robinson, C. (1998).** Sec-independent insertion of thylakoid membrane proteins. Analysis of insertion forces and identification of a loop intermediate involving the signal peptide. *J Biol Chem* **273**, 18979-83
- Thompson, S.J., Robinson, C. and Mant, A. (1999).** Dual signal peptides mediate the signal recognition particle/Sec-independent insertion of a thylakoid membrane polyprotein, PsbY. *J Biol Chem* **274**, 4059-66
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from

polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4

**Tusnady, G.E. and Simon, I. (2001).** The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**, 849-50

**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

**van Wijk, K.J. (2004).** Plastid proteomics. *Plant Physiol Biochem* **42**, 963-77

**Vener, A.V., Harms, A., Sussman, M.R. and Vierstra, R.D. (2001).** Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in photosynthetic membranes of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 6959-66

**Viitanen, P.V., Schmidt, M., Buchner, J., Suzuki, T., Vierling, E., Dickson, R., Lorimer, G.H., Gatenby, A. and Soll, J. (1995).** Functional characterization of the higher plant chloroplast chaperonins. *J Biol Chem* **270**, 18158-64

**von Heijne, G., Steppuhn, J. and Herrmann, R.G. (1989).** Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* **180**, 535-45

**Von Wettstein, D., Gough, S. and Kannangara, C.G. (1995).** Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1039-57

**von Zychlinski, A., Kleffmann, T., Krishnamurthy, N., Sjolander, K., Baginsky, S. and Gruissem, W. (2005).** Proteome analysis of the rice etioplast: metabolic and regulatory networks and novel protein functions. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1072-84

**Vothknecht, U.C. and Westhoff, P. (2001).** Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1541**, 91-101

**Wang, D., Kalb, S.R. and Cotter, R.J. (2004).** Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 96-102

**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

**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., Laganowsky, A., Nishio, J., Souda, P., Zhang, H. and Cramer, W.A. (2006).** Sequencing covalent modifications of membrane proteins. *J Exp Bot* **57**, 1515-22

- Whitelegge, J.P., Zhang, H., Aguilera, R., Taylor, R.M. and Cramer, W.A. (2002).** Full subunit coverage liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LCMS+) of an oligomeric membrane protein: cytochrome b(6)f complex from spinach and the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Mol Cell Proteomics* **1**, 816-27
- Wikstrom, M. (1984).** Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone. *FEBS Lett* **169**, 300-4
- Wittig, I., Karas, M. and Schagger, H. (2007).** High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1215-25
- Wittig, I. and Schagger, H. (2005).** Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5**, 4338-46
- Wortman, J.R., Haas, B.J., Hannick, L.I., Smith, R.K. Jr, Maiti, R., Ronning, C.M., Chan, A.P., Yu, C., Ayele, M., Whitelaw, C.A., White, O.R. and Town, C.D. (2003).** Annotation of the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiol* **132**, 461-8
- Wu, D., Wright, D.A., Wetzel, C., Voytas, D.F. and Rodermeil, S. (1999).** The IMMUTANS variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell* **11**, 43-55
- Wysocki, V.H., Resing, K.A., Zhang, Q. and Cheng, G. (2005).** Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* **35**, 211-22
- Wysocki, V.H., Tsaprailis, G., Smith, L.L. and Brechi, L.A. (2000).** Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom* **35**, 1399-406
- Yagi, T., Yano, T., Di Bernardo, S. and Matsuno-Yagi, A. (1998).** Procaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 125-33
- Yamaguchi, M., Obama, T., Kuyama, H., Nakayama, D., Ando, E., Okamura, T.A., Ueyama, N., Nakazawa, T., Norioka, S., Nishimura, O. and Tsunasawa, S. (2007).** Specific isolation of N-terminal fragments from proteins and their high-fidelity de novo sequencing. *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**, 3329-36
- Yan, J., Dashdorj, N., Baniulis, D., Yamashita, E., Savikhin, S. and Cramer, W.A. (2008).** On the structural role of the aromatic residue environment of the chlorophyll a in the cytochrome b6f complex. *Biochemistry* **47**, 3654-61
- Yates, J.R. 3rd, Eng, J.K. and McCormack, A.L. (1995).** Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases. *Anal Chem* **67**, 3202-10
- 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
- Zghidi, W., Merendino, L., Cottet, A., Mache, R. and Lerbs-Mache, S. (2007).** Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the *psbN* gene in plastids. *Nucleic Acids Res* **35**, 455-64

- Zhang, H. and Cramer, W.A. (2004).** Purification and crystallization of the cytochrome b6f complex in oxygenic photosynthesis. *Methods Mol Biol* **274**, 67-78
- Zhang, H., Whitelegge, J.P. and Cramer, W.A. (2001).** Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b6f complex. *J Biol Chem* **276**, 38159-65
- 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, P., Battchikova, N., Jansen, T., Appel, J., Ogawa, T. and Aro, E.M. (2004).** Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* **16**, 3326-40
- Zhang, P., Battchikova, N., Paakkarinen, V., Katoh, H., Iwai, M., Ikeuchi, M., Pakrasi, H.B., Ogawa, T. and Aro, E.M. (2005).** Isolation, subunit composition and interaction of the NDH-1 complexes from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochem J* **390**, 513-20
- 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
- Zolla, L., Rinalducci, S. and Timperio, A.M. (2007).** Proteomic analysis of photosystem I components from different plant species. *Proteomics* **7**, 1866-76
- Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. and Orth, P. (2001).** Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* **409**, 739-43
- Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2008).** Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* **3**, e1994

## G. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chloroplasten .....	4
Abb. 2	Aufbau der Thylakoidmembrankomplexe nach Leister 2003 (Leister, 2003) .....	5
Abb. 3	Aufnahme eines Etioplasten mittels Elektronenmikroskopie .....	12
Abb. 4	Fragmentationsspektrum und mittels <i>de novo</i> Sequenzierung ermittelte Aminosäuresequenz .....	21
Abb. 5	Absorptionsspektren etiolierter Blätter der Gerste vor und nach Belichtung .....	51
Abb. 6	BN-PAGE von Membranproteinkomplexen aus Etioplasten und Chloroplasten	53
Abb. 7	Ausschnitt einer SDS-PAGE von PORA und PORB.....	58
Abb. 8	Übersicht der Methode zur selektiven Identifikation N-terminaler Peptide .....	60
Abb. 9	Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Bildung von Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Addukten ...	62
Abb. 10	Isolation des N-terminalen Peptids von PORA.....	63
Abb. 11	Sequenzalignment von PORA, PORB und POR aus <i>Pisum sativum</i> .....	65
Abb. 12	Alternative N-Termini von PORB .....	67
Abb. 13	Sequenzalignment der kernkodierte Untereinheiten NdhM und NdhN .....	73
Abb. 14	Einfluss von Peptidgröße und Hydrophobizität auf die Detektierbarkeit mittels MS .....	77
Abb. 15	Lage identifizierter Peptide und Transmembrandomänen bei NdhF .....	78
Abb. 16	Sequenzalignment identifizierter Peptide aus Gerste mit Proteinen der PsbP- Familie.....	81
Abb. 17	Sequenzalignment identifizierter Peptide aus Gerste mit Proteinen der PsbQ- Familie.....	83
Abb. 18	2. Dimension der Bande des NDH-Komplexes aus Etioplasten und Chloroplasten .....	86
Abb. 19	NAD(P)H-Diaphorase Aktivität von Membranproteinkomplexen aus Etio- und Chloroplasten .....	89
Abb. 20	Identifikation von LMW-Proteinen in der BN-PAGE von Etio- und Chloroplasten .....	94
Abb. 21	Ladungszustände des LMW-Proteins PsbE .....	96
Abb. 22	Alkalimetall-Adduktbildung am Beispiel PsbF .....	98
Abb. 23	Oxidationszustand von PsbY2 .....	100
Abb. 24	Signalintensitäten von PsbN und PsbX.....	102
Abb. 25	Fragmentationsserien und mittels <i>de novo</i> Sequenzierung ermittelte Teilsequenzen von PsbJ .....	104
Abb. 26	Sequenzalignment der kernkodierte Untereinheiten PsbW, PsbX und PsbY ..	105
Abb. 27	Ermittlung der vollständigen maturen Sequenz von PetM aus Gerste.....	109
Abb. 28	Fragmentationsspektren verschiedener Ladungszustände von PetM .....	110
Abb. 29	MALDI-MS Spektrum von PetG und PetM .....	112
Abb. 30	Hypothetische Elektronentransportketten in Etioplasten .....	136

## H. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Molekularmassenstandards für BN-PAGE (A) und SDS-PAGE (B, C).....	24
Tab. 2	Gradientenprogramm der Nanopumpe der HPLC-Methode 75-96.....	44
Tab. 3	Gradientenprogramm der UPLC-Methode 100-26 .....	46
Tab. 4	Gradientenprogramm der UPLC-Methode 75-55 .....	47
Tab. 5	Gradientenprogramm der UPLC-Methode 75-90 .....	47
Tab. 6	Identifizierte Untereinheiten plastidärer Membranproteinkomplexe .....	55
Tab. 7	Identifizierte Peptide der Untereinheiten des NDH-Komplexes.....	70
Tab. 8	Eigenschaften bislang bekannter Untereinheiten des plastidären NDH-Komplexes	75
Tab. 9	Niedermolekulare membranintegrale Proteine von PSI und PSII.....	92
Tab. 10	Niedermolekulare membranintegrale Untereinheiten des Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i> -Komplexes.....	107

# CURRICULUM VITAE

## Persönliche Daten

Name: **Matthias Plöscher**  
geboren am: 08.11.1977 in München  
Nationalität: deutsch

## Ausbildung

seit 10/2004 **Promotion**  
Department Biologie I, Ludwig-Maximilians-Universität München  
unter Leitung von Prof. Dr. Lutz Eichacker

1998 – 2004 **Studium der Biologie und Chemie**  
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Abschlüsse:**  
Diplom Biologie  
1. Staatsexamen Biologie/Chemie, Lehramt vertieft

**Diplomarbeit:**  
„<sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N isotopenmarkiertes  $\alpha$ -Phycoerythrocyanin:  
Rekonstitution und Aufreinigung für die NMR-Spektroskopie“  
Betreuer: Prof. Dr. Hugo Scheer

1997 – 1998 **Wehrdienst**  
Jagdbombergeschwader 32, Lagerlechfeld

1997 **Abitur**

1988 – 1997 Otto-von-Taube Gymnasium Gauting

1984 – 1988 Josef-Dosch Grundschule Gauting

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere ferner, dass ich die vorliegende Arbeit nicht schon als Doktor-, Magister- oder Diplomarbeit bei einer anderen Hochschule eingereicht habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift