

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Methoden der Proteomanalyse	3
1.2.	Stand der Proteomanalyse bei Pflanzen	7
1.3.	Zielsetzung der Arbeit	12
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Labormaterial	13
2.1.1.	Chemikalien	13
2.1.2.	Laborgeräte, Roboter und Maschinen	13
2.2.	Pflanzenmaterial	14
2.2.1.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.2.2.	Gurke und Kürbis	14
2.2.3.	Präparation von 80S Ribosomen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Blättern	14
2.3.	Proteinextraktion	15
2.3.1.	Fraktionierte Proteinextraktion	18
2.3.1.1.	Fraktion 1	18
2.3.1.2.	Fraktion 2	19
2.3.1.3.	Fraktion 3	20
2.3.1.4.	Fraktion 4	20
2.3.2.	TCA/Aceton-präzipitationsbasierte Proteinextraktion	21
2.4.	Proteinkonzentrationsbestimmung	21
2.5.	Elektrophorese	22
2.5.1.	Isoelektrische Fokussierung mit Carrier Ampholyten	22
2.5.2.	Isoelektrische Fokussierung mit Immobilen	23
2.5.3.	SDS-PAGE	23
2.6.	Färbungen	24
2.6.1.	Silber-Färbung	24
2.6.1.1.	Analytische Silber-Färbung	24
2.6.1.2.	Massenspektrometrie kompatible Silber-Färbung	24
2.6.1.3.	Silber-Färbung nach Shevchenko	25
2.6.2.	Coomassie-Färbungen	25
2.6.2.1.	Konventionelle Coomassie-R250-Färbung	25
2.6.2.2.	Kolloidale Coomassie-G250-Färbung	26
2.6.3.	Zink/Imidazol-Färbung	26
2.6.4.	Fluoreszenz-Färbungen	26
2.6.4.1.	Sypro(-Ruby-Färbung	27
2.6.4.2.	Ruthenium-Farbstoff-Synthese	27
2.6.4.3.	Ruthenium-Färbung	28
2.7.	Bildauswertung	28
2.7.1.	Spotdetektion	29
2.7.2.	Vergleich von 2-DE-Gelen	30
2.8.	Präparation der Mikrotiterplatten für den tryptischen Verdau	31
2.9.	Ausstanzen von Proteinspots	31
2.9.1.	Manuelles Ausstanzen von Proteinspots	31
2.9.2.	Automatisiertes Ausstanzen von Proteinspots	32
2.10.	Herstellung und SDS-PAGE von Proteinstandards	34
2.11.	Tryptischer In-Gel-Proteinverdau	34
2.11.1.	Protokoll des tryptischen In-Gel-Verdau	35
2.11.1.1	.Entfärbung von Silber gefärbten Proteinspots	35
2.11.1.2.	Waschen von Silber gefärbten Proteinspots ohne Entfärbung	36

2.11.1.3.	Entfärbung von Coomassie gefärbten Proteinspots	36
2.11.1.4.	Waschen von Zink/Imidazol und Fluoreszenz gefärbten Proteinspots	36
2.11.1.5.	Reduktion der Disulfidbrücken	37
2.11.1.6.	Alkylierung der Cystein tragenden Peptide	37
2.11.1.7.	Tryptischer Verdau der Proteine	37
2.11.1.8.	Extraktion der tryptischen Peptide	38
2.12.	Matrixpräparation für die MALDI-MS	38
2.12.1.	"Dried-droplet"-Präparationsmethoden für MALDI-Matrices	38
2.12.2.	Matrixpräparation auf dem Anchor Chip-Probenteller	39
2.12.3.	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure	40
2.12.4.	2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB oder Gentinsäure)	40
2.12.5.	Trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure (SA oder Sinapinsäure)	40
2.13.	Probenpräparation für die MALDI-Massenspektrometrie	41
2.13.1.	Präparation von Peptiden auf dem Anchor Chip-Probentellern	41
2.13.2.	Präparation von intakten Proteinen	41
2.14.	MALDI-TOF-MS	42
2.14.1.	Messung von Peptiden und Proteinen	42
2.15.	Kalibrierung und Auswertung der Massenspektren	43
2.15.1.	Herstellung der PPG-Lösung	43
2.15.2.	Kalibrierung der Massenspektren	43
2.16.	Identifikation der Proteine	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Proteinextraktion	46
3.1.1	Präzipitationsbasierte Proteinextraktion	46
3.1.2	Fraktionierte Proteinextraktionsmethode	47
3.1.2.1	Zellaufschluss	47
3.1.2.2	Verwendung von chaotropen Reagenzien	49
3.1.2.3	Verwendung von Detergenzien	50
3.1.2.4	Verwendung von Proteaseinhibitoren	51
3.1.2.5	Verwendung von Suspensionen bei der IEF	52
3.1.2.6	Päzipitation als Mittel zur Proteinaufkonzentration	53
3.2	Vergleich detektierbarer Proteinspots der verwendeten Proteinextraktionen	54
3.3	2-D Gelelektrophorese	56
3.3.1	Vergleich verschiedener IEF-Methoden (CA und IPG)	56
3.3.2	Vergleich von Riesengelen gegen Großgele	58
3.4	Färbung von 2-DE-Gelen	60
3.4.1	Analytische Färbungen	60
3.4.2	Präparative Färbungen	62
3.5	Etablierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Standardmustern	65
3.6	MALDI -MS	67
3.6.1	MALDI-MS-Probenpräparation	68
3.6.1.1	Wahl der MALDI-Matrix	68
3.6.1.2	Waschen der HCCA-Matrix	70
3.6.2	Sensitivität der MALDI-TOF-MS	71
3.6.3	Identifizierung aus Proteingemischen	74
3.6.4	Tryptischer In-Gel-Verdau	75
3.6.5	Vergleich der Proteinfärbungen auf MS-Ebene	78
3.7	Automatisierung	81
3.7.1	Automatisierung des Ausstanzens von Proteinspots	81
3.7.2	Automatisierung des In-Gel-Verdau	81
3.7.3	2-DE und In-Gel-Verdau voralkylierte Proteine	82

3.7.4	Automatisierung der MALDI-Probenpräparation	86
3.7.5	Wahl der MALDI-Matrix unter Automatisierungsaspekten	86
3.8	Anwendung der Methoden auf biologische Systeme	87
3.8.1	Hochdurchsatzanalytik von fraktionierten <i>Arabidopsis thaliana</i> Blattextrakten	88
3.8.1.1	Auswertung identifizierter Blattproteine	89
3.8.1.2	Proteinidentifikation aus Fraktion 3-Blattextrakten	91
3.8.1.3	Zusammensetzung von Schoten-Fraktion 1 und Blattgewebe-Fraktion	193
3.8.2	Differentielle 2-DE-Analyse von <i>Curcubita sativa</i> Phloemexsudaten	94
3.8.3	Extraktion und Analyse von <i>Arabidopsis thaliana</i> -80S Ribosomen	96
4	Diskussion	99
4.1	Bewertung der entwickelten Methoden für die Proteomanalyse	99
4.1.1	Bewertung der fraktionierten Proteinextraktionsmethode	99
4.1.2	Bewertung des 2-DE-Systems	101
4.1.2.1	Carrier Ampholine oder Immobiline?	101
4.1.2.2	Riesengele, große Gele, viele Gele, keine Gele	103
4.1.3	Bewertung der Proteinfärbungen für die 2-DE	105
4.1.4	Anmerkungen zur Etablierung des In-Gel-Verdau	107
4.1.5	Möglichkeiten und Grenzen der MALDI-TOF-MS	108
4.1.6	Automatisierung der verwendeten Methoden	110
4.2	Bedeutung der aus den Anwendungsbeispielen gewonnen Resultate für Pflanzenproteomprojekte	111
4.2.1	Was bedeuten 3600 Proteinspots aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Blattextrakten? Und wo sind die anderen?	111
4.2.2	Differentielle 2-DE-Analyse	114
4.2.3	Subproteomics: Wie sauber ist ein Komplex? Funktionelle Proteine oder Artefakte?	116
4.3	Zukunft der Proteomanalyse im Allgemeinen und Speziellen	118
5.	Zusammenfassung	121
6.	Summary	122
7.	Abkürzungen	123
8.	Literaturverzeichnis	124
9.	Eigene Veröffentlichungen	138
9.1.	Publikationen	138
9.2.	Tagungsbeiträge	138
10.	Danksagung	140
11.	Lebenslauf	141