

## 3 Ergebnisse

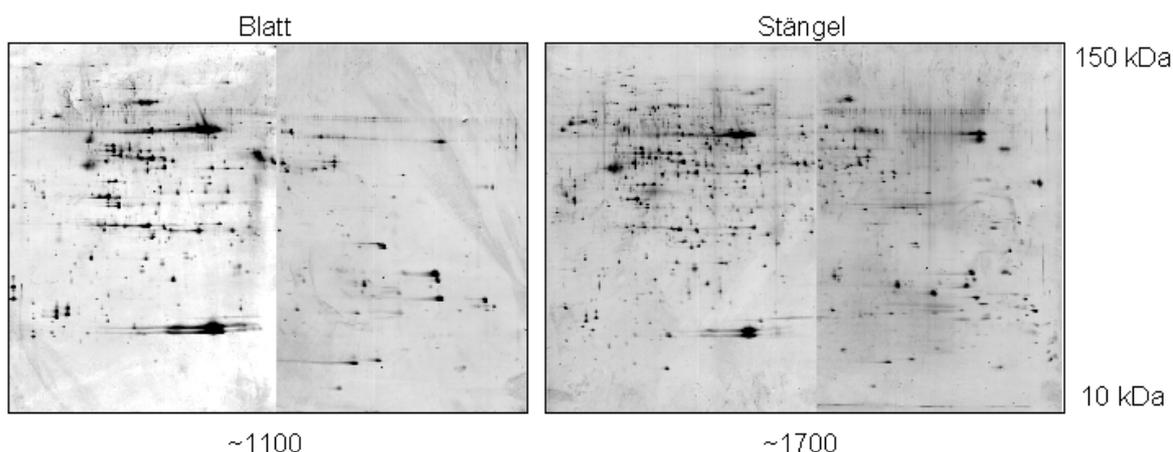
### 3.1 Proteinextraktion

Die Basis einer jeden Proteomanalyse ist eine effiziente Proteinextraktion. Im Bereich der Pflanzen-Proteomanalysen wird vorwiegend eine präzipitationsbasierte Proteinextraktionsmethode verwendet, die bereits 1987 entwickelt wurde<sup>151</sup>. Diese Methode wurde daher auch zu Beginn dieser Arbeit eingesetzt und diente als Maßstab für eine neue, zu entwickelnde Methode. Die Anwendung der Präzipitationsmethode und später die Entwicklung einer neuen Proteinextraktionsmethode erfolgte zunächst mittels Blatt- und Stängelgewebe von 50 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen.

#### 3.1.1 Präzipitationsbasierte Proteinextraktion

Die präzipitationsbasierte Proteinextraktion ist eine zweischrittige Methode. Im ersten Schritt werden, nach Aufschluss der Zellen, alle Proteine mittels eines TCA/Aceton-Puffers ausgefällt und durch Zentrifugation sedimentiert. Im zweiten Schritt erfolgt die selektive Resolubilisierung der Proteine aus dem Sediment der Zentrifugation. Diese Resolubilisierung wird durch die Verwendung eines Puffers gewährleistet, der hohe Konzentration an Chaotropen und zwitter- bzw. nichtionischen Detergenzien aufweist.

In Abbildung 9 sind 2-DE-Gele dargestellt, die mit Proteinextrakten aus der präzipitationsbasierten Extraktion hergestellt wurden.



**Abbildung 9:** 2-DE-Gele von präzipitationsbasierten Proteinextrakten.

Wie man in der Abbildung 9 erkennt, zeigen Blatt- und Stängel-2-DE-Gele relativ große Unterschiede in der Anzahl der detektierbaren Proteinspots (Blatt ca. 1100, Stängel ca. 1700 Proteinspots). Diese Anzahl detektierbarer Proteine entspricht in etwa der Anzahl getrennter Proteinspots, die bereits in mehreren Publikationen für diese Gewebe gezeigt

wurde<sup>107,108,151,178,179</sup>, sodass diese Gele als Referenzgele für die neue, zu entwickelnde Proteinextraktionsmethode dienen könnten.

### **3.1.2 Fraktionierte Proteinextraktionsmethode**

Basierend auf dem Prinzip der fraktionierten Proteinextraktion von Klose et al.<sup>48,152</sup> wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine neue, pflanzenspezifisch fraktionierte Proteinextraktion entwickelt. Diese Extraktionsmethode hatte 2 Anforderungen zu erfüllen: Zum einen sollte sie qualitativ hochwertige Proteinextrakte liefern, die eine höhere Spotauflösung ermöglichen. Zum zweiten sollte die Methode möglichst einfach durchzuführen sein und somit die Reproduzierbarkeit der Extraktion erleichtern.

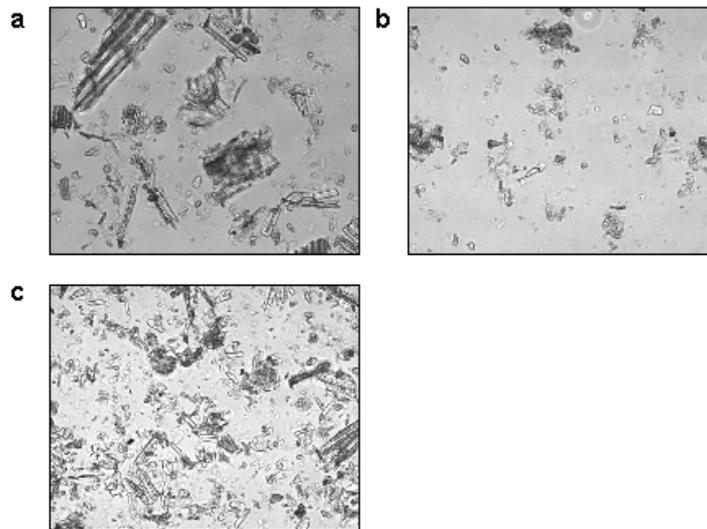
Wie bereits in 2.3.1 beschrieben ist die Grundlage dieser Methode ein sequentielle Extraktion, die auf der Verwendung von Puffern mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften beruht. Diese Puffer sind in der Lage, unterschiedliche Klassen von Proteinen in Lösung zu bringen bzw. in Lösung zu halten. In Abbildung 1 ist der Verlauf der Extraktion schematisch dargestellt. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte, die für die Etablierung des Protokolls notwendig sind, näher beschrieben.

#### **3.1.2.1 Zellaufschluss**

Der Zellaufschluss, als Grundlage für jegliche Extraktion von Proteinen, sollte bei einer Proteinextraktion so vollständig wie möglich sein. Bei Pflanzen, die aufgrund ihrer stabilen Zellwände sehr schlecht aufzuschließen sind, eignen sich nur mechanische Aufschlussmethoden wie Mörsern oder Ultraschall (oder Kombinationen von beiden). Osmotische oder gar Gefrier-Auftaumethoden, wie sie bei Bakterien, Hefen oder Zellkulturen angewandt werden können, fallen fast vollständig aus.

Für den Zellaufschluss wurde im Rahmen dieser Arbeit die Probe unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Eine hierbei aufkommende Frage lautete: Wie lange bzw. wie häufig müssen die Zellen gemörsert werden, um einen relativ vollständigen Aufschluss des Gewebes zu erzielen?

Hierfür wurden die 2 Standardgewebe (Blatt und Stängel) jeweils 1mal für 5 Minuten unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Ein Aliquot des Homogenats wurde sodann lichtmikroskopisch analysiert. Der Rest wurde per Zentrifugation sedimentiert und anschließend erneut unter flüssigem Stickstoff für weitere 5 Minuten gemörsert. Abbildung 10 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Homogenate.

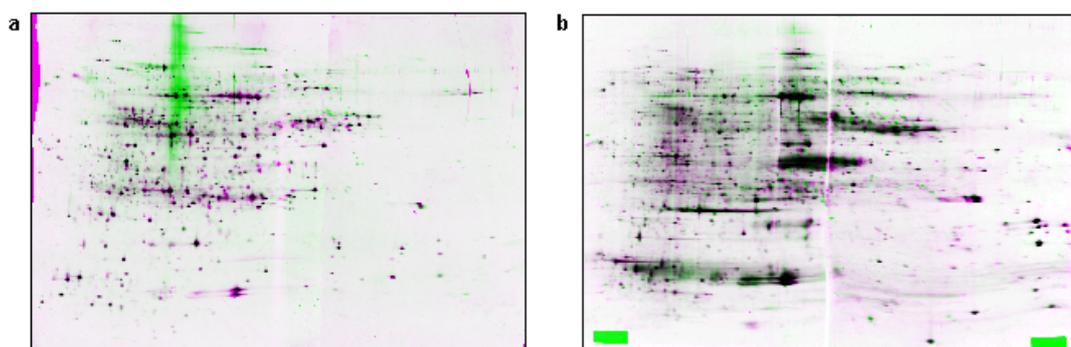


**Abbildung 10:** Lichtmikroskopische Aufnahme von Pflanzenhomogenaten. (a) Stängelhomogenat 1mal gemörsert, (b) Stängelhomogenat 2mal gemörsert und (c) Blatthomogenat 1mal gemörsert.

Wie sich erkennen lässt, sind die Zellstrukturen beim Stängelhomogenat nach einmaligem Mörsern noch in weiten Teilen intakt (Abb. 10a). Dies ist auf die faserige Struktur des Stängels zurückzuführen. Durch ein wiederholtes Mörsern verschwanden die größeren Strukturen jedoch fast vollständig und es entstand ein gleichmäßiges, feines Homogenat (Abb. 10b). Bei der Homogenisation von Blattgewebe war die Situation eine andere: Dieses Gewebe, das nicht so faserig wie Stängelgewebe ist, zeigte bereits nach einmaligem Mörsern ein relativ homogenes, gut aufgeschlossenes Erscheinungsbild (Abb. 10c).

Dieses Ergebnis zeigt, dass auch ein sehr faseriges Gewebe wie der Stängel nach zweimaligem Mörsern gut aufgeschlossen und somit einer Proteinextraktion zugänglich ist.

Im Folgenden galt es zu beantworten, inwieweit sich aufgrund der Verwendung von Ultraschall eine Verbesserung des Zellaufschlusses erzielen lässt. Zu diesem Zweck wurde die Extraktion einmal unter Verwendung einer Ultraschallbehandlung, wie bei Klose et al. beschrieben<sup>152</sup>, durchgeführt, während bei der zweiten Probe gänzlich darauf verzichtet wurde. Bei der Darstellung der aus diesem Experiment resultierenden 2-DE-Gele wurde die Fehlfarbenüberlagerungsfunktion der Bildauswertesoftware (Z3) genutzt (vgl. 2.7.2)



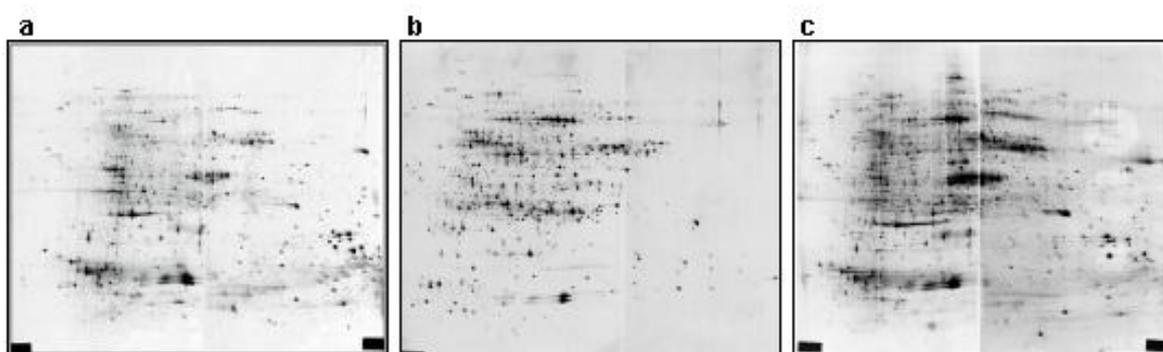
**Abbildung 11:** Fehlfarbenüberlagerung von Fraktion 1 (a) und Fraktion 2 (b) Blatt-2-DE-Gele, die mit (grün) bzw. ohne (rot) Verwendung von Ultraschall hergestellt wurden.

Wie man in der Abbildung 11a sehen kann, zeigt die Überlagerung der Fraktionen 1 mit Ultraschall (grün) bzw. ohne Ultraschall (rot), einige Unterschiede beider 2-DE-Muster. Während in der Abbildung 11b, welche die Überlagerung der Fraktion 2-Extrakte zeigt, fast gar keine Unterschiede mehr zu erkennen sind. Dies legte den Schluss nahe, dass ein Ultraschall-Schritt in dem Extraktionsprotokoll für Pflanzen nicht sinnvoll zu sein scheint. Dies brachte mit sich, dass das Protokoll schneller, einfacher und dadurch reproduzierbarer wurde.

### 3.1.2.2 Verwendung von chaotropen Reagenzien

Chaotrope sind wichtige Chemikalien für die Proteinextraktion, da sie helfen, die Proteine in Lösung zu bringen oder aber in Lösung zu halten. Die Funktionsweise basiert auf einem partiellen Aufbrechen der Wasserstoffbrückenstruktur wässriger Lösungsmittel, was zu einer verstärkten Entfaltung hydrophober Bereiche von Proteinen führt<sup>180</sup>. Die am häufigsten verwendete chaotrope Reagenz im Bereich der 2-DE ist Harnstoff. Er wird häufig in Konzentrationen von bis zu 9,5 M verwendet<sup>47</sup>.

Seit 1997 erschienen jedoch gerade im 2-DE-Bereich zunehmend Publikationen, die eine Mischung von 5 M–7 M Harnstoff in Verbindung mit 1 M–2 M Thioharnstoff postulieren<sup>181-184</sup>. Dieses Mischen von Harnstoff und Thioharnstoff soll eine stark verbesserte Solubilisierung von hydrophoben Proteinen ermöglichen<sup>180,181</sup>. In Abbildung 12 ist ein Vergleich der 2-DE-Gele der Fraktion 2 von Blattgewebe mit und ohne Thioharnstoff dargestellt.



**Abbildung 12:** Vergleich eines Fraktion 1-2-DE-Gels (b) mit Fraktion 2-2-DE-Gelen, die mit unterschiedlich zusammengesetzten Chaotropen aufgearbeitet wurden. (a) 9 M Harnstoff bzw. (c) 7 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff.

Wie man im direkten Vergleich des Harnstoff extrahierten Gels 12a mit dem Thioharnstoff extrahierten Gel 12c sehen kann, ist das Muster des Thioharnstoff extrahierten 2-DE-Gels in 12c viel gefüllter. Darüber hinaus sind die meisten Proteine auch in größerer Menge

vorhanden. Gerade im zentralen Bereich des Thioharnstoff extrahierten 2-DE-Gels kann man eine deutliche Anhäufung roter Spots finden.

Der Vergleich der 2-DE-Muster dieser beiden unterschiedlich extrahierten Fraktion 2-Gelen mit dem Muster des Fraktion 1-Gels (Abb. 12b) führte zu folgendem Ergebnis: Der Vergleich des Harnstoff extrahierten Fraktion 2-Gels mit dem Fraktion 1-Gel zeigt eine klare Dominanz der Fraktion 1-Spots im zentralen Bereich. Hingegen liegt in den basischen Randbereichen eine klare Dominanz von Fraktion 2-Spots vor. Der Vergleich des Thioharnstoff behandelten Fraktion 2-2-DE-Gels mit dem Fraktion 1-Gel fiel dagegen anders aus: Viele der Spots im zentralen Bereich des Fraktion 1-Gels finden einen korrespondierenden Spot im Fraktion 2-Gel. Dieser Befund zeigt somit, dass viele der zusätzlichen Spots, die im Thioharnstoff extrahierten Gel zu finden sind, nicht unbedingt von hydrophoben Proteinen stammen müssen, sondern eher Proteinen entsprechen, die bereits im Muster der stark wasserlöslichen Proteine der Fraktion 1 vorhanden waren. Dieses Ergebnis wurde durch eine Massenspektrometrie unterstützte Proteomanalyse von Fettzellen bestätigt<sup>184</sup> bei der sich zeigte, dass keines der unter Verwendung von Thioharnstoff zusätzlich auftretenden Proteine besonders hydrophob war.

### **3.1.2.3 Verwendung von Detergenzien**

Die beiden bis dato hauptsächlich für die 2-DE verwendeten Detergenzien sind zum einen Nonidet P40, ein nicht ionisches Detergens, das von O'Farrell in seiner 1975 erschienenen Originalpublikation verwendet wurde<sup>47</sup>. Zum anderen handelt es sich um das zwitterionige Detergens CHAPS, das aufgrund seiner verbesserten Eigenschaften Nonidet P40 fast vollständig verdrängte<sup>185</sup>. Mit dem verstärkten Aufkommen von Proteomprojekten erfuhr die Synthese und Erprobung neuer Detergenzien in den letzten Jahren einen Aufschwung, sodass sich Publikationen mit verbesserten Detergenzien häufen<sup>123</sup>. Hierbei sticht besonders die Verwendung des zwitterionigen Detergens ASB 14 hervor<sup>186</sup>. Dieses Detergens verspricht in Verbindung mit einer Thioharnstoffextraktion verbesserte Solubilisierung von stark hydrophoben Membranproteinen<sup>124,186,187</sup>. Um diesen Befund zu überprüfen, wurden für diese Arbeit Fraktion 2-Extrakte einmal in Verbindung mit CHAPS und einmal mit ASB 14 extrahiert.

Als Ergebnis dieses Vergleichs stellte sich heraus, dass sich letztlich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden 2-DE-Gelen, die unter Verwendung der unterschiedlichen Detergenzien hergestellt wurden, erkennen lassen. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte darin liegen, dass in dem Ausgangsmaterial – dem Sediment aus Fraktion 1 – nicht

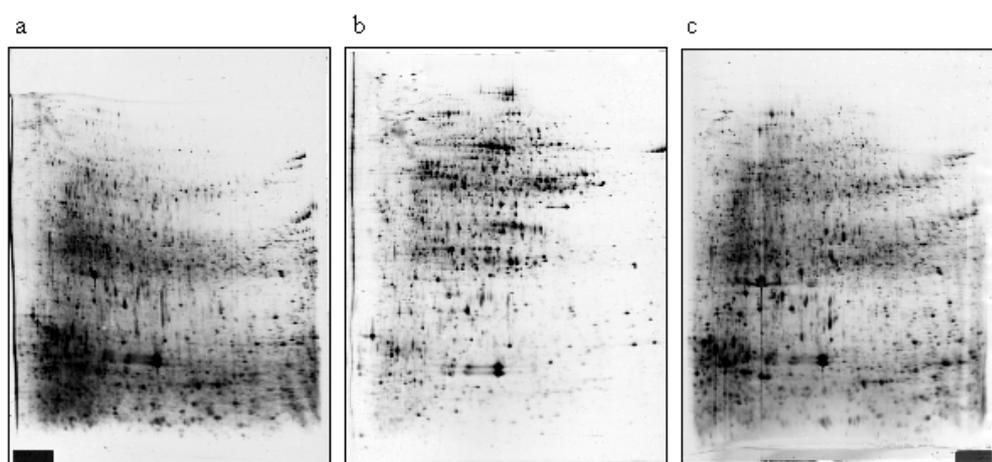
ausreichend hydrophobe Proteine in angereicherter Form vorliegen, sodass sie letztlich auch nicht in visualisierbarer Menge für 2-DE-Gele extrahiert werden können. Die publizierten Experimente, die eine verbesserte Effizienz von ASB 14 im Vergleich zu CHAPS zeigen, verwenden vorwiegend aufgereinigte Plasmamembranfraktionen, die eine starke Anreicherung von hydrophoben Membranproteinen aufweisen.

Eine weitere Erklärung für das Fehlen zusätzlicher, hydrophober Proteine könnte darin liegen, dass das verwendete 2-DE-Gelsystem grundsätzlich eine ausschließende Selektivität gegen diese Proteinklasse zeigt <sup>188</sup>.

### 3.1.2.4 Verwendung von Proteaseinhibitoren

Ein weiterer wichtiger Aspekt, insbesondere bei der Extraktion von Pflanzenproteinen, ist der Schutz der Proteine vor den reichhaltig vorhandenen Proteasen in pflanzlichen Geweben <sup>189</sup>. Diese extreme Anhäufung von Proteasen war der Hauptgrund für die konservative Verwendung von präzipitationsbasierten Extraktionsprotokollen <sup>95,190</sup>.

Um die Wirkung und Effizienz der in dieser Arbeit verwendeten Proteaseinhibitoren zu demonstrieren, wurden Extrakte der Fraktion 1 jeweils mit und ohne Proteaseinhibitoren hergestellt und aufgetrennt. Hierbei sollte gezeigt werden, wie ein typisches 2-DE-Muster ohne Proteaseinhibition aussieht, um es somit gegen ein reguläres 2-DE-Muster abgrenzen zu können. Abbildung 13a zeigt ein 2-DE-Gel von einem Blatt Fraktion 1-Extrakt, bei dem auf die Zugabe von Proteaseinhibitoren gänzlich verzichtet wurde, während bei dem 2-DE-Gel in Abbildung 13b Proteaseinhibitoren zum Schutz der Proteine verwendet wurden.



**Abbildung 13:** 2-DE-Gele von Blatt-Proteinextrakten, die ohne (a), mit (b) und mit alten (c) Proteaseinhibitoren aufgearbeitet wurden.

Wie sich klar erkennen lässt, sind in dem Muster in Abbildung 13a fast alle hochmolekularen Proteine verschwunden, während sich die Anzahl niedermolekularer Proteine vervielfältigt.

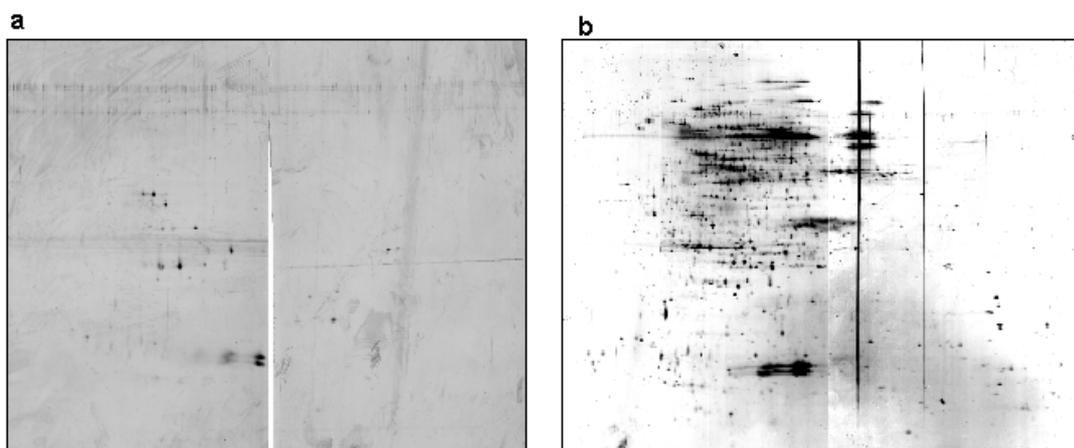
Darüber hinaus zeigen viele der Proteinspots ein unscharfes, „träniges“ Laufverhalten. Im Vergleich dazu sind die Proteinspots in Abbildung 13b zum größten Teil sehr scharf fokussiert und zeigen eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten Molekulargewichtsbereich.

Um die Fragilität und die Grenzwertigkeit des Schutzes der pflanzlichen Proteinextrakte vor Proteasen noch einmal klarer zu demonstrieren, wurde ein Blatt-Fraktion 1-Extrakt unter Verwendung eines kommerziellen Proteaseinhibitor-mixes extrahiert, der 2 Wochen über sein Haltbarkeitsdatum war. Das resultierende 2-DE-Gel ist in Abbildung 13c dargestellt und zeigt tendenziell eine ähnliche Verteilung der Proteinspots wie das gänzlich ungeschützte 2-DE-Muster in Abbildung 13a.

### 3.1.2.5 Verwendung von Suspensionen bei der IEF

Wie bereits erwähnt, diente das Protokoll der fraktionierten Proteinextraktion für tierische Gewebe von Klose et al. <sup>48,152</sup> zum Teil als Grundlage für das hier entwickelte pflanzenspezifische Extraktionsprotokoll. Bei der Aufarbeitung der tierischen Gewebe, bei der 3 Proteinfractionen generiert werden, bildet die Aufnahme des Fraktion 2-Sediments, in einem DNase-haltigen Puffer den letzten Extraktionsschritt. Nach einer Inkubation wird die gesamte Suspension als Probe auf das IEF-Gel aufgetragen.

Ein ähnlicher Extraktionsansatz wurde zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die 2-DE-Muster dieser Suspension sehr wenig Proteinspots aufwiesen. In Abbildung 14 ist ein 2-DE-Gel einer solchen Suspension dargestellt.



**Abbildung 14:** 2-DE-Gele einer rohen Proteinsuspension (a) und des Überstands der zentrifugierten Suspension (b).

Bei näherer Betrachtung dieses Extrakts und vor allem bei einem Vergleich der pflanzlichen und tierischen Suspensionen zeigte sich ein gravierender Unterschied. Der Anteil fester, also

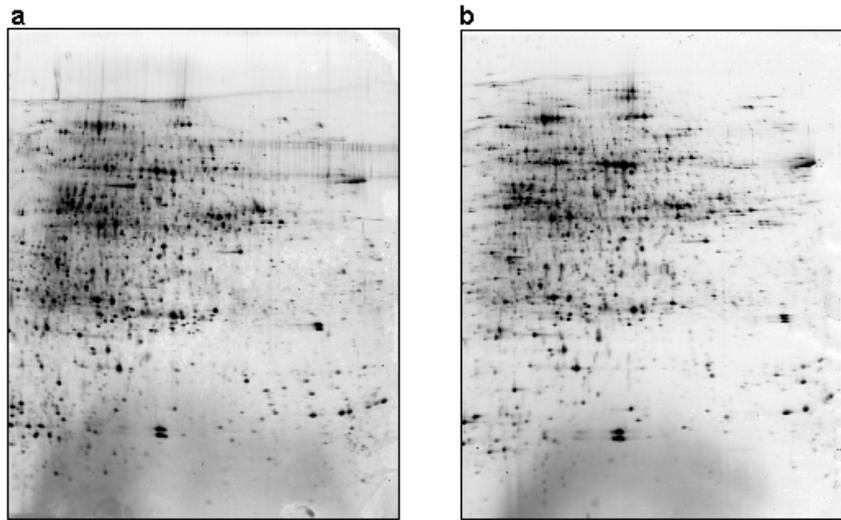
in dem Puffersystem unlöslicher Bestandteile ist in den Pflanzensuspensionen wesentlich höher. Dies begründet sich aus dem generellen Aufbau der Pflanzenzelle. Pflanzen mit ihren robusten Zellwänden haben einen höheren Anteil unlöslicher Anteile als z. B. Leber-, Herz- oder Gehirnzellen von Mäusen. Hieraus resultierte letztlich, dass diese Pflanzensuspension obwohl sie proteinhaltig zu sein schien, kein 2-DE-Muster zuließ. Der Grund hierfür liegt darin, dass die festen Bestandteile zu Beginn der IEF sedimentieren und somit den Eintritt der Proteine in die Polyacrylamidmatrix verhindern. Abbildung 14b zeigt ein 2-DE-Gel des Überstands der Pflanzensuspension. Wie sich im Vergleich der beiden 2-DE-Gele erkennen lässt, ist der Überstand dieser Suspension tatsächlich proteinhaltig und weist ein reichhaltiges 2-DE-Muster auf, das dem Muster der Fraktion 2 stark ähnelt.

Aus diesen beiden Beobachtungen lassen sich 2 Schlussfolgerungen für das weitere Vorgehen ziehen: Zum einen wurden keine unzentrifugierten Extrakte für die 2-DE-Trennung verwendet, da sedimentierende, feste Bestandteile zu Ausbeuteverluste führen können. Zum zweiten wurden die Extraktionen der Detergenzien und harnstofflöslichen Proteine und die der nukleinsäureassoziierten Proteine aufgrund der großen Ähnlichkeit beider Muster in einem einzigen Schritt zusammengefasst, nämlich in der Extraktion der Fraktion 2 (vgl. 2.3.1).

### **3.1.2.6 Präzipitation als Mittel zur Proteinaufkonzentration**

Obwohl aus vielen Publikationen bekannt war, dass die Präzipitation von Proteinen als irreversibel gilt und daher zu spezifischen Verlusten führen kann<sup>190,191</sup>, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Präzipitationsschritt zur Herstellung des Fraktion 1-Extraktes eingeführt. Dieser Schritt war bei Gewebe nicht notwendig, da die Konzentration bzw. das Volumen der Zellflüssigkeiten und die darin gelösten Proteine im ersten Überstand der Zentrifugation exakt den Konzentrationen entsprachen, die bei der 2-DE verwendet werden (ca. 8–24 µg Protein/µl Lösungsmittel). Jedoch gerade bei „trockenem“ Gewebe – wie beim Samen oder aber bei stark „wässrigem“ Gewebe z. B. der Wurzel – erwies es sich als sehr schwierig, Fraktion 1-Extrakte zu erhalten, die hinreichend konzentriert für die 2-DE waren. Um dieses Problem zu lösen, galt es zu untersuchen, inwieweit sich das 2-DE-Muster eines Fraktion 1-Extrakts durch die Präzipitation der Proteine und deren Resolubilisierung verändert. Abbildung 15a zeigt 2-DE-Muster eines nicht präzipitierten Fraktion 1-Blattextrakts. Derselbe Blattextrakt wurde in einem zweiten Ansatz präzipitiert, das Präzipitat abzentrifugiert und das resultierende Pellet in einem Volumen Resolubilierungspuffer, das dem Volumen des

Ausgangsextrakts entsprach, aufgenommen. Das 2-DE-Muster dieses Extrakts ist in Abbildung 15b dargestellt.

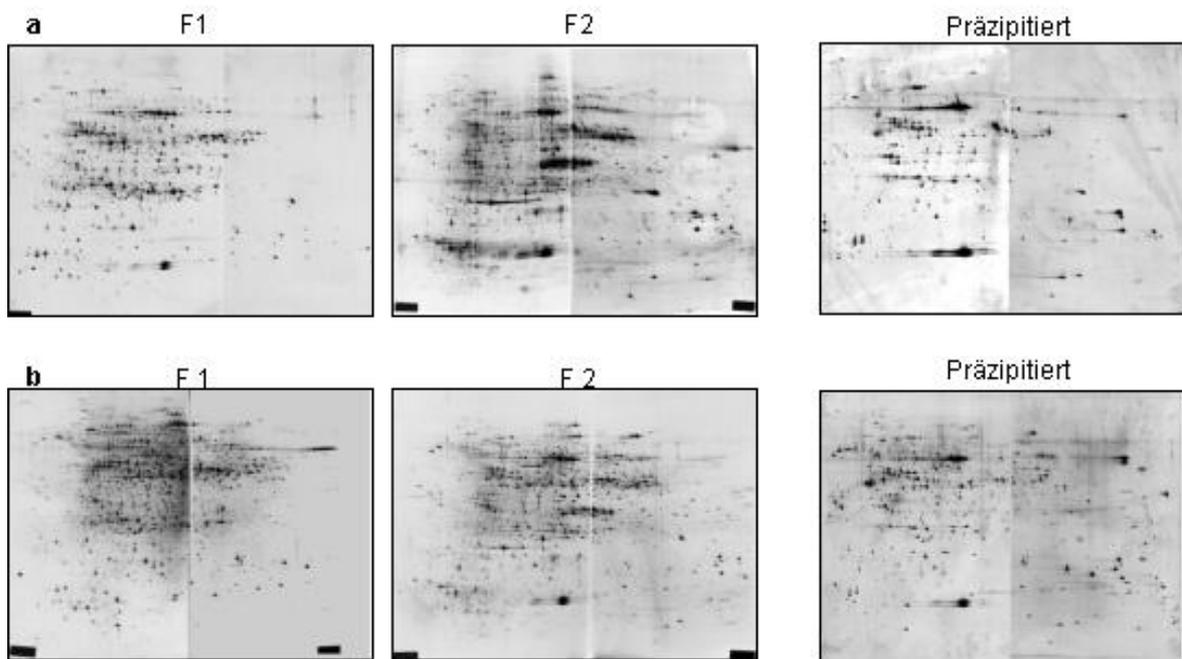


**Abbildung 15:** Blatt-2-DE-Gele von unpräzipitierten (a) und präzipitierten (b) Fraktion 1-Proteinextrakten.

Wie sich beim Vergleich beider 2-DE-Gele erkennen lässt, besteht eine überaus hohe Übereinstimmung zwischen beiden Proteinmustern. Dieser Befund legt nahe, dass die Präzipitation von stark wasserlöslichen Proteinen – so die Fraktion 1-Proteine – nicht zwingend zu irreversiblen Verlusten führen muss. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die unter 2.3.1.1. beschriebene Änderung des Extraktionsprotokolls in Bezug auf die Herstellung des Fraktion 1-Extrakts eingefügt.

### **3.2 Vergleich detektierbarer Proteinspots der verwendeten Proteinextraktionen**

Nachdem anhand der zuvor beschriebenen Experimente das im Abschnitt 2.2.1 beschriebene und in Abbildung 4 dargestellte Protokoll etabliert wurde, galt es, die 2-DE-Muster von *Arabidopsis thaliana*-Blatt- und Stänglextrakten der 2-DE tauglichen Extrakte 1 und 2 der fraktionierten Proteinextraktionsmethode gegen die 2-DE-Muster der präzipitationsbasierten Blatt- und Stänglextrakte zu vergleichen. In Abbildung 16 sind jeweils die 2 Muster der fraktionierten Extraktion dem Muster der präzipitationsbasierten Extrakte gegenübergestellt.



**Abbildung 16:** Vergleich der 2-DE-Gele der fraktionierten Proteinextraktion (F1 und F2) mit den 2-DE-Gele der präzipitationsbasierten Proteinextraktion. (a) zeigt die 2-DE-Gele von Blattgewebe, während (b) die 2-DE-Gele der Stängelgewebe darstellt.

Gewebe	Fraktion 1	Fraktion 2	überlappend zwischen F1 und F2 (%)	Unterschiedlich Gesamt	Präzipitiert
Blatt	2500	2000	900 (20)	3600	1100
Stängel	3200	2600	1200 (21)	4600	1700

**Tabelle 2:** Ergebnisse der Bildauswertung der unterschiedlich proteinextrahierten 2-DE-Gele.

Um nun die Gesamtzahl der aufgetrennten Proteine beider Extraktionsmethoden miteinander vergleichen zu können, musste die Anzahl der einmaligen Proteinspots für die fraktionierte Proteinextrakte eines Gewebes ermittelt werden. Hierzu wurden die 2-DE-Gele der Fraktion 1 und Fraktion 2 unter Verwendung der Bildauswertesoftware Z3 übereinander gelagert. Anschließend wurde die Summe der korrespondierenden Proteinspots beider 2-DE-Gele ermittelt und diese von der Summe der detektierbaren Proteinspots in den einzelnen Gelen beider Fraktionen dieses Gewebes subtrahiert. Hieraus ergab sich die Anzahl einmaliger und somit unterschiedlicher Proteinspots aus dem jeweiligen Gewebe. Die genaue Anzahl der Proteinspots, die aus den einzelnen Fraktionen und den verschiedenen Geweben bzw. verschiedenen Extraktionsmethoden detektiert wurden, sind in der Tabelle 2 ausgeführt.

Hierbei zeigt sowohl das Blatt F1 2-DE-Gel mit 2500 Proteinspots, als auch das Blatt F2 2-DE-Gel mit 2000 Proteinspots jeweils mehr Proteinspots als das präzipitationsbasierte Blatt 2-DE-Gel, das lediglich 1100 Proteinspots aufweist. Dasselbe gilt für die fraktionierten Stängel 2-DE-Gele, bei denen das F1 2-DE-Gel 3200 Proteinspots aufweist, während das Stängel F2 2-DE-Gel 2500 Proteinspots zeigt. So ergab sich, dass nach Addition der Spotanzahlen aus

den Einzelfractionen bei Blatt- und Stängelgewebe eine Verdreifachung der detektierbaren Proteinspots im Vergleich zu den Spotanzahlen in den präzipitationsbasierten Geweben resultiert.

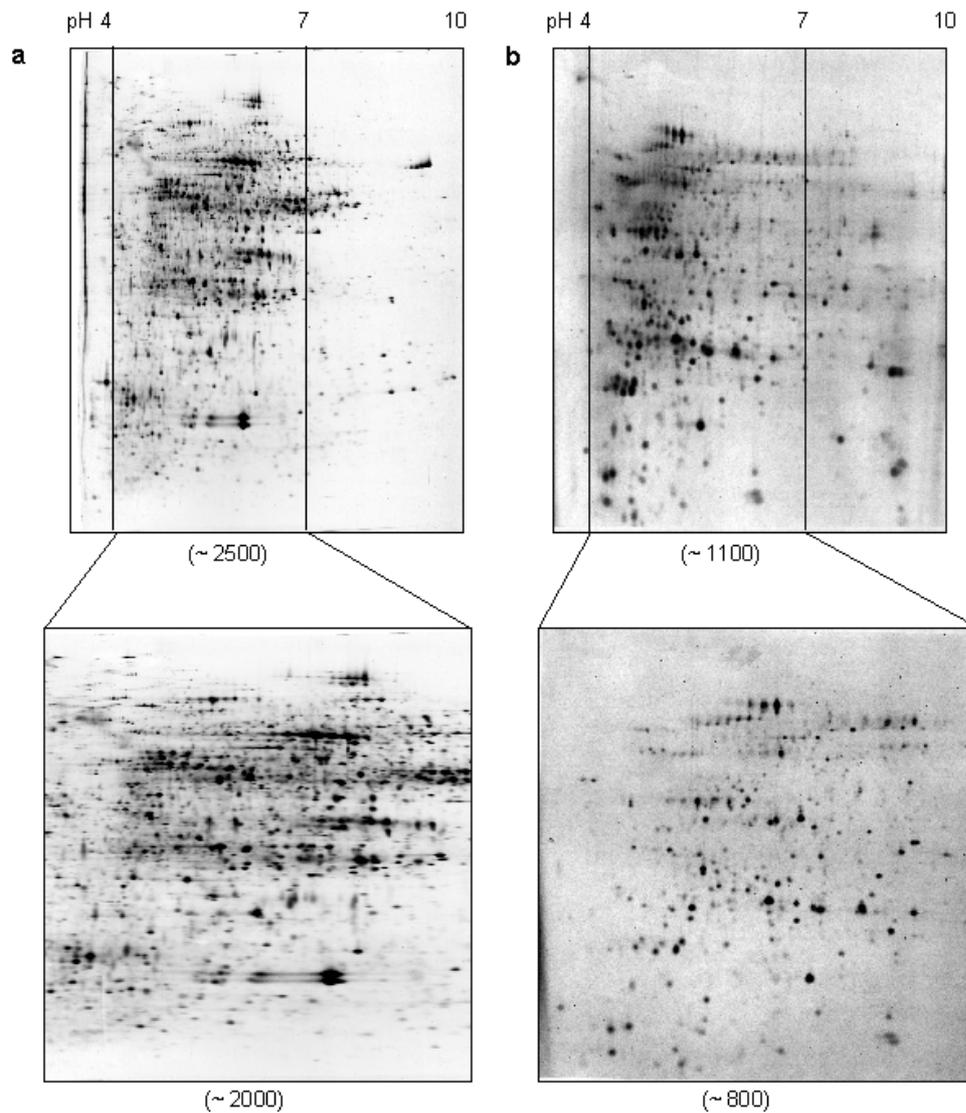
### **3.3 2-D Gelelektrophorese**

Nachdem nun die eigentliche Proteinextraktionsmethode etabliert war, stellte sich im Folgenden die Frage, in welcher Form die 2-DE durchzuführen sei. Hierfür gab es zum einen die Möglichkeit, zwischen 2 verschiedenen isoelektrischen Fokussiersystemen dem IPG-System<sup>155,192</sup> und dem Carrier-Ampholin-System<sup>43</sup> zu wählen.

Zum anderen bestand die Option, verschiedene Gelmaße zu verwenden. Dabei handelte es sich einmal um die von Joachim Klose etablierten „Riesengele“ (32 cm x 40 cm)<sup>48,154</sup> oder aber um die halb so großen „Großgele“ (32 cm x 20 cm).

#### **3.3.1 Vergleich verschiedener IEF-Methoden (CA und IPG)**

Zum Vergleich der beiden isoelektrischen Fokussiersysteme wurden Fraktion 1-Blattextrakte verwendet. Diese wurden zum einen auf 20 cm-CA-Gelen des pH-Bereichs von pH 3 bis pH 10 aufgetrennt. Zum anderen wurde der gleiche Proteinextrakt einmal auf einem 18 cm-IPG-Gel, das den pH-Bereich pH 3 bis pH 10 abdeckt, und einmal auf einem 18 cm-IPG-Gel, das den pH-Bereich pH 4 bis pH 7 abdeckt, aufgetrennt. Diese Gele sind in Abbildung 17 dargestellt.

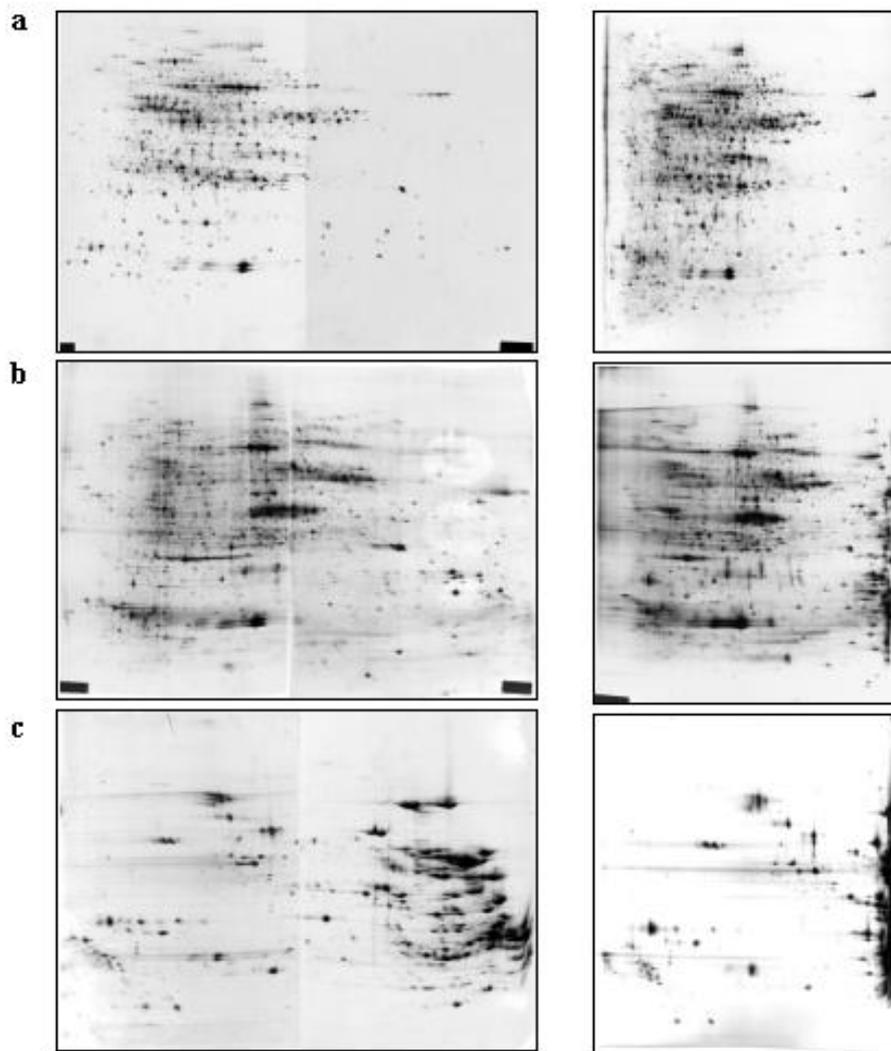


**Abbildung 17:** Vergleich von CA-basierter IEF (a) und IPG-basierter IEF (b) anhand von Blatt-Fraktion 1-Proteinextrakten.

Wie man dem Vergleich der beiden Gele des pH-Bereichs pH 3 bis pH 10 bereits entnehmen kann, weist das 2-DE-Muster des CA-getrennten Blattextrakts mit ca. 2500 Proteinspots eine weitaus höhere Spotdichte auf als das resultierende 2-DE-Muster des IPG-Gels, das ca. 1100 Proteinspots beinhaltet. Weiterhin fällt auf, dass die 2-DE-Muster eine grundsätzliche Ähnlichkeit aufweisen. Bei näherer Betrachtung jedoch ist festzustellen, dass mit Ausnahme einiger Referenzpunkte die Proteinspots der einzelnen Muster schwer bis gar nicht einander zuzuordnen sind – ein Befund, der bereits in einer früheren Publikationen gezeigt wurde<sup>193</sup>. Noch deutlicher werden die beschriebenen Beobachtungen im Vergleich des IPG-Gels pH 4 bis 7 mit dem entsprechenden Bereich des 20 cm-CA-Gels. Diese Gegenüberstellung zeigt der untere Teil der Abbildung 17. Hier wird die Differenz der Spotdichte noch einmal eindrucksvoller dokumentiert. Während das CA-Gel ca. 2000 Proteinspots in diesem Bereich aufweist, zeigt das IPG-Gel nur noch ca. 800 Proteinspots.

### 3.3.2 Vergleich von Riesengelen gegen Großgele

Wie der Vergleich der beiden IEF-Systeme gezeigt hat, charakterisiert sich das CA-System durch eine weitaus höhere Auflösung von Proteinspots. Daher stellte sich nunmehr die Frage, inwieweit es notwendig ist, die von Klose et al. etablierten, jedoch sehr arbeitsaufwendigen Riesengele<sup>48</sup> zu verwenden. Wie Klose und Kobalz in ihrer Publikation zeigen konnten, beträgt der effektive Reingewinn an zusätzlichen Spots ca. 8,5 %. Um den Wert der doppelt so arbeitsaufwendigen Riesengele gegen die Großgele zu evaluieren, wurden 3 unterschiedliche Proben sowohl mittels Riesengelen also auch unter Verwendung von Großgelen aufgetrennt. Diese 3 Gelpaare sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Vergleich von 20 cm- und 40 cm-2-DE-Gelen anhand dreier verschiedener Proteinextrakte. (a) Blatt Fraktion 1, (b) Blatt Fraktion 2 und (c) 80S ribosomaler Proteinextrakt aus *Arabidopsis thaliana*-Blättern.

Das oberste Pärchen (Abb. 18a) zeigt ein Fraktion 1-Blattextrakt, also eine ähnliche, wenn auch nicht ganz so komplexe Probe, wie sie in der Publikation von Klose und Kobalz<sup>48</sup> verwendet wurde. Diese beiden Gele weisen in etwa die gleiche Anzahl an Proteinspots auf

und zeigen darüber hinaus ein sehr homologes Spotmuster. Im Vergleich dieser Gele ist es für fast alle Spots möglich, den korrespondierenden Spot im Vergleichsgel zu lokalisieren. Aufgrund dieser Ergebnisse lag der Schluss nahe, dass das Großgel – auch wenn die Abstände der einzelnen Proteinspots zueinander geringer sind – eine fast vergleichbare Auflösung zeigt wie das Riesengel.

Diese Einschätzung ändert sich jedoch schlagartig, sobald man die Gelpärchen in den Abbildungen 18b und 18c betrachtet. Bei diesen beiden Pärchen handelt es sich um ein Fraktion 2-Blattextrakt (Abb. 18b) und um einen ribosomalen Proteinextrakt aus *Arabidopsis thaliana*-Blättern (Abb. 18c). Bei diesen beiden Vergleichen lässt sich neben der besseren räumlichen Trennung der Proteinspots eine weitere Stärke der Riesengele erkennen: Es handelt sich um die Fähigkeit, basische Proteine im 2-DE-Gel darstellen zu können. Die 20 cm-Großgele der Blatt-Fraktion 2 zeigen einen undifferenzierten Proteinstreifen auf der basischen Seite, der trotz verkürzter Fokussierdauer auftrat. Hingegen zeigen die 40 cm-Riesengele keinen solchen Streifen – im Gegenteil, die Riesengele lösen nach wie vor selbst basische Proteine klar auf. Dieses „Einfangen“ der basischen Proteine konnte durch eine Verkürzung der Fokussierdauer erreicht werden – eine Technik, die bereits 1977 von O’Farrell publiziert wurde <sup>194</sup>. Hierbei erreichen die meisten Proteine zwar nicht ihren absoluten isoelektrischen Punkt, sind aber trotzdem scharf aufgetrennt.

Beim Vergleich des dritten Gelpärchens wird die verbesserte Auflösung basischer Proteine noch klarer: Ribosomale Proteine – bekannt dafür, dass ein Großteil von ihnen extrem basisch ist – können im 20 cm-Gelsystem eigentlich gar nicht fokussiert werden. Diese basischen Proteine laufen, selbst bei einer extremen Laufzeitverkürzung (-30 %), aus dem Fokussiergel heraus. Eben dieser Effekt kann bei Riesengelen durch starke Laufzeitverkürzungen (-30 %) so weit reduziert werden, dass die extrem basischen Proteine im 2-DE-Gel darstellbar werden. Zwar sieht man, dass einige Proteine am basischen Ende des IEF-Gels aufgelaufen sind, der Großteil der anderen Proteine befindet sich jedoch innerhalb der Trennfläche und weist scharf getrennte, differenzierbare Proteinspots auf.

Das dem hier beschriebenen Phänomen zugrunde liegende Prinzip beruht auf der Steigung des pH-Gradienten. Je weiter die Trennstrecke des Fokussiergels ist, desto flacher wird der pH-Gradient. Gehen wir davon aus, dass der pH-Gradient von pH 3 bis pH 10 linear verläuft, so bedeutet das für ein 20 cm-Gel, dass eine pH-Einheit sich über ca. 2,85 cm erstreckt, während sich für ein 40 cm-Gel eine pH-Einheit über ca. 5,7 cm verteilt. Nähert sich ein Protein nun seinem isoelektrischen Punkt, so verringert sich seine Migationsgeschwindigkeit, da es sukzessive seine Nettoladung verliert und einer neutralen Gesamtladung zusteuert. Je länger

das Trenngel also ist, desto länger ist auch die Strecke, auf der ein Protein nahe seinem isoelektrischen Punkt mit zunehmend geringerer Migrationsgeschwindigkeit wandert.

### **3.4 Färbung von 2-DE-Gelen**

Neben der Proteinextraktion ist die Färbung von Proteinen eine der Grundlagen für eine erfolgreiche Proteomanalyse. Auch bei der Proteinfärbung gibt es mehrere Möglichkeiten der Durchführung, genauso, wie es mehrere Ausgangssituationen gibt, die verschiedene Färbungen erfordern. Wie bereits in 2.6 dargelegt, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Färbetechniken angewendet. Dies liegt insbesondere darin begründet, dass die Färbung in der Proteomanalyse nach wie vor ein aktives Forschungsfeld mit vielen Optimierungsmöglichkeiten darstellt. Allein im Bereich der Silber-Färbung wurden mehr als 100 verschiedene Färbeprotokolle publiziert <sup>195</sup>, seit Switzer et al. diese Technik 1979 für die Proteinfärbung etabliert hat <sup>196</sup>. Darüber hinaus erscheinen mehrere Übersichtsartikel zum Thema Proteinfärbung pro Jahr <sup>57,166,197-200</sup>.

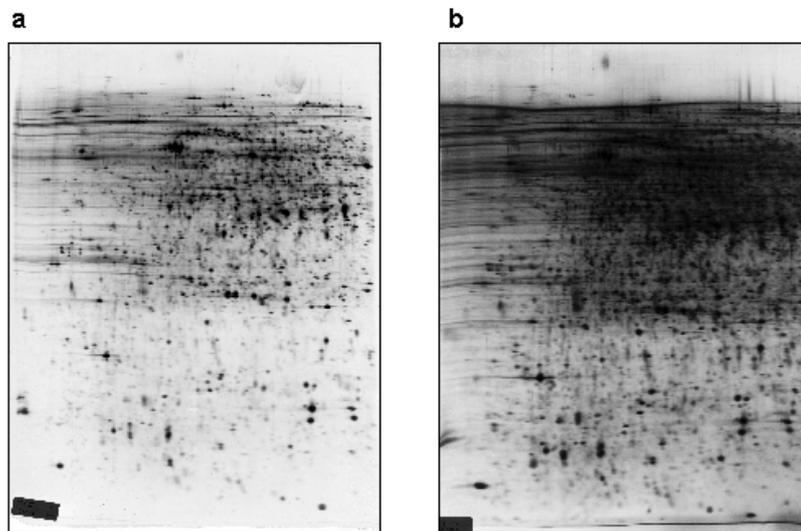
Wie erwähnt, existieren unterschiedliche Ausgangssituationen, die verschiedene Färbungen erforderlich machen. Extrem vereinfacht, lassen sich diese Ausgangssituationen in 2 Bereiche untergliedern: Einerseits besteht die Möglichkeit, analytische 2-DE-Gele herzustellen, die eine möglichst sensitive Färbung erfordern. Andererseits kann die Notwendigkeit bestehen, präparative 2-DE-Gele herstellen zu müssen. Auch bei diesen ist es Ziel, so sensitiv als möglich zu färben, wobei man aufgrund der nachgeschalteten Identifikationsmethoden in der Verwendung bestimmter Chemikalien beschränkt ist, da diese mitunter eine Inkompatibilität mit der Identifikation der Proteine mit sich bringen können.

#### **3.4.1 Analytische Färbungen**

Bei dieser Art von Färbung handelt es sich zumeist um Silber-Färbungen. Silber-Färbungen sind deshalb so beliebt, weil sie sehr sensitiv, relativ kostengünstig und persistent sind. Ein sensitiv gefärbtes und getrocknetes Silbergel lässt sich also auch Jahre nach seiner Färbung noch verwenden und auswerten.

Die Sensitivität der Silber-Färbung geht der Literatur zufolge bis ca. 1 ng Detektionsvermögen <sup>201</sup>. Eine Schwäche der Silber-Färbung liegt im Bereich der Quantifizierbarkeit. Laut Literatur lassen sich Silber gefärbte Proteinspots nur im Bereich zwischen 100 und 150 ng quantitativ akkurat auswerten <sup>57</sup>. Eine weitere Schwäche von Silber-Färbungen liegt in ihrer verhältnismäßig schlechten Reproduzierbarkeit <sup>202</sup>. Der Grund hierfür liegt darin, dass sie keine Endpunktfärbung und die Bestimmung des Färbeendpunktes

subjektiven Kriterien unterworfen ist. Dies kann leicht zu „Unter-, bzw. „Überfärbung“ von 2-DE-Gelen führen, die sodann nicht mehr reproduzierbar mit „normal“ gefärbten 2-DE-Gelen verglichen werden können. Abbildung 19b zeigt ein Beispiel für eine solche „Überfärbung“.



**Abbildung 19:** Vergleich eines „normal“ (a) und eines „überfärbten“ (b) 2-DE-Gels. Die Färbung erfolgte unter Verwendung von Silbernitrat.

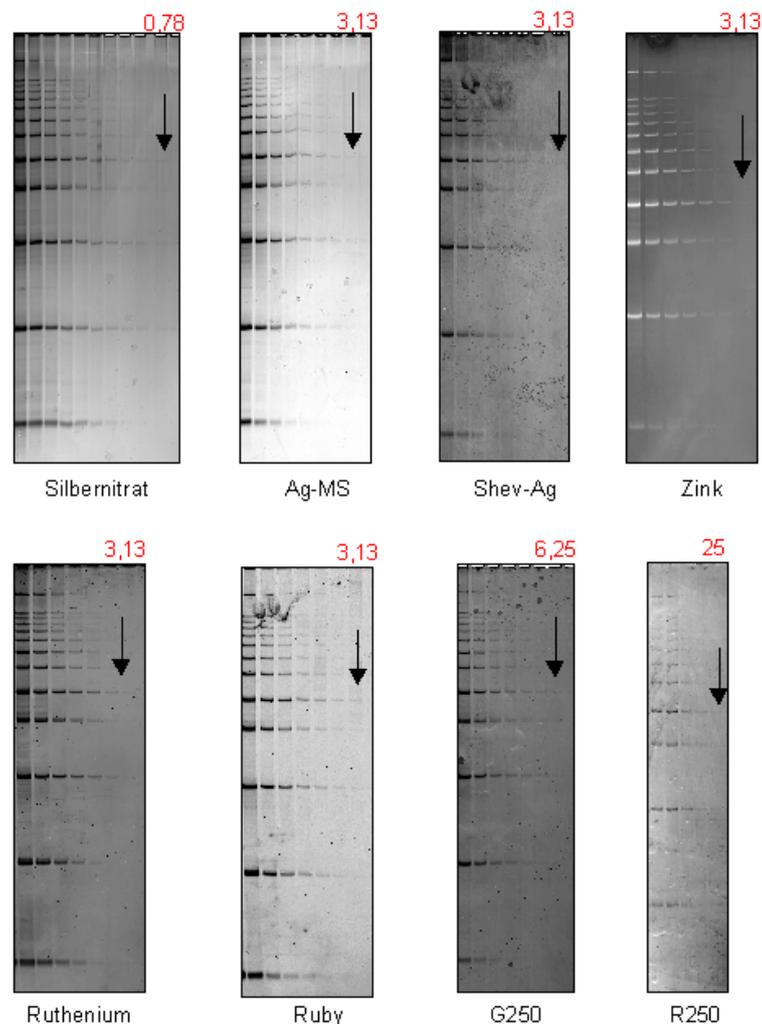
Eine Alternative zu der Silber-Färbung sind die kommerziellen Sypro<sup>®</sup>-Fluoreszenz-Färbungen<sup>162,164</sup>. Diese neue Art der Färbung zeigt einige Vorteile gegenüber der klassischen Silber-Färbung. So liegt ihre Sensitivität ebenfalls bei 1 ng Detektionsvermögen, wobei die lineare Detektion von z. B. Sypro<sup>®</sup>- Ruby mit Werten von 2–2000 ng der Silber-Färbung deutlich überlegen ist<sup>57,203</sup>.

Ein weiterer Vorteil dieser Färbstoffe liegt darin, dass sie keine „Überfärbung“ im eigentlichen Sinne zeigen, da sie Endpunktfärbungen sind. Neben einer verbesserten Reproduzierbarkeit erleichtert dies auch die Handhabbarkeit der Färbung von Proteingelen, da man sie tagelang in der Färbelösung lagern kann.

Der größte Nachteil kommerzieller Farbstoffe ist ihr extrem hoher Preis, aber auch dafür gibt es eine Lösung: So hat sich die Arbeitsgruppe von Thierry Rabillouds die Mühe gemacht, einen Fluoreszenzfarbstoff mit ähnlichen Eigenschaften wie die SYPRO-Farbstoffe nachzusynthetisieren und das Protokoll für die Synthese des Farbstoffs zu publizieren<sup>165</sup>. Unter 3.4.2 wird detaillierter auf einige Eigenschaften dieses überaus attraktiven Fluoreszenzfarbstoffs eingegangen.

### 3.4.2 Präparative Färbungen

Im Rahmen der präparativen – also Massenspektrometrie tauglichen – Färbungen werden die Färbemethoden auf ihre Sensitivität und Handhabbarkeit überprüft. Zu den verwendeten Färbemethoden zählen eine klassische Silber-Färbung nach Heukeshoven (Ag) <sup>204</sup>, eine Massenspektrometrietaugliche Modifikation der klassischen Silber-Färbung, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde (Ag-MS), eine kolloidale G250-Coomassie-Färbung (G250) <sup>159</sup>, eine R250 Coomassie-Färbung (R250) <sup>158</sup>, eine Zink/Imidazol-Färbung (Zn) <sup>160</sup>, eine kommerzielle Fluoreszenz-Färbung (Ruby) <sup>164</sup>, ein weitere Massenspektrometrietaugliche Silber-Färbung <sup>157</sup> (Shev-Ag) und eine Fluoreszenz-Färbung mit einem selbstsynthetisierten Fluoreszenzfarbstoff nach Rabilloud et al. (Ruthenium) <sup>165</sup>. In Abbildung 20 sind Verdünnungsreihen eines Proteinmolekulargewichtsmarkers auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen und mit den verschiedenen Farbstoffen gefärbt worden.



**Abbildung 20:** Sensitivitätsvergleich unterschiedlicher Färbemethoden. Die rot markierten Angaben entsprechen der Sensitivitätsgrenze in ng. Unterhalb der Gelabschnitte ist die Färbemethode angegeben.

Wie sich anhand dieser Abbildung eindeutig erkennen lässt, zeigt die analytische Silber-Färbung, die als Referenz für die erzielbare Sensitivität dienen sollte, mit ca. 0,8 ng Protein

klar die höchste Sensitivität. Die nächsthöchste Sensitivität weist der selbstsynthetisierte Fluoreszenzfarbstoff, die modifizierte Silber-Färbung (Ag-MS), die Silber-Färbung (Shev-Ag), die Zink/Imidazol-Färbung und die kommerziellen SYPRO®-Ruby-Fluoreszenz-Färbung auf. All diese Färbungen waren in der Lage, Proteine bis zu einer Menge von ca. 3 ng nachzuweisen. An nächster Stelle folgt die Coomassie-G 250-Färbung, die ca. 6 ng Protein nachzuweisen vermag. Die geringste Sensitivität weist die Coomassie-R250-Färbung auf, die mit 25 ng Nachweisgrenze ca. 30 mal unsensitiver als die analytische Silber-Färbung ist.

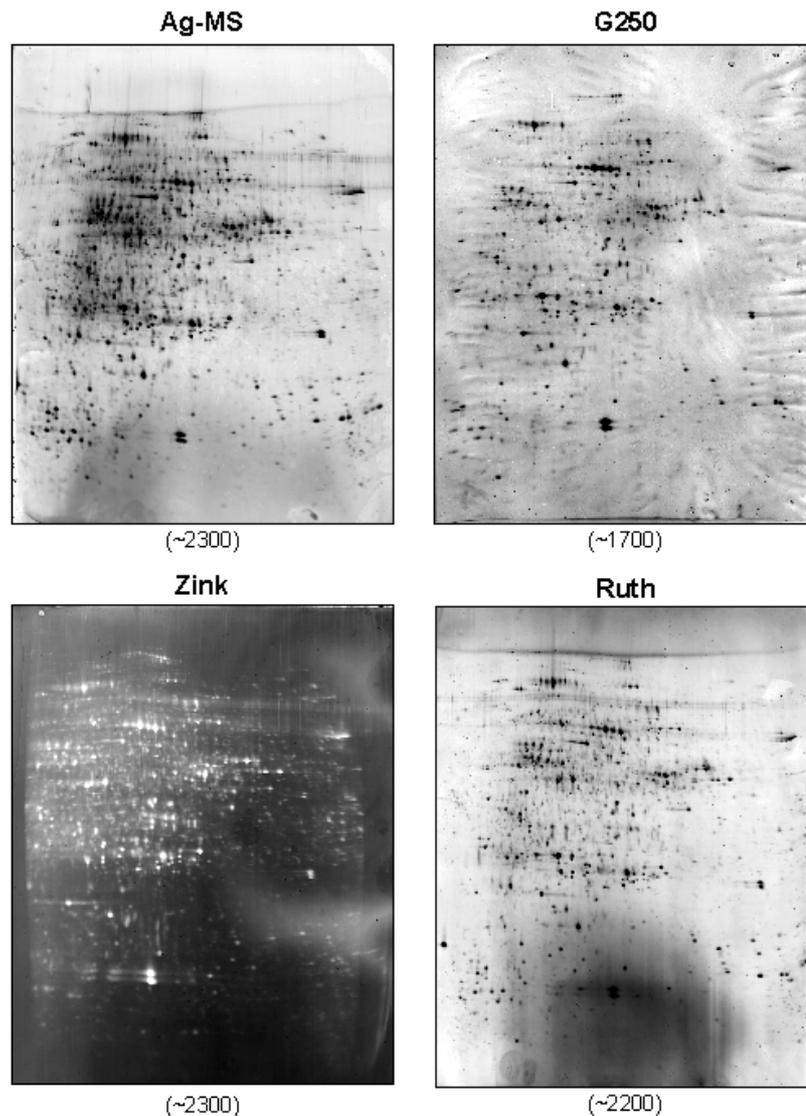
Nachdem die Sensitivität der einzelnen Färbungen festgestellt wurde, wurden diese Werte in Tabelle 3 in Korrelation zu Parametern wie Handhabbarkeit und Kosteneffizienz der Färbung gesetzt.

<b>Färbung</b>	<b>Sensitivität (ng)</b>	<b>Zeitaufwand</b>	<b>Arbeitsaufwand relativ</b>	<b>Kosten</b>
<b>analyt. Ag</b>	0,78	1 Tag	hoch	normal
<b>Ag-MS</b>	3,13	3,5 h	normal	normal
<b>Shev-Ag</b>	3,13	1,5 h	normal	normal
<b>Zn</b>	3,13	30 min	gering	gering
<b>Ruth</b>	3,13	1 Tag	normal	gering
<b>SYPRO®-Ruby</b>	3,13	7,5 h	normal	sehr hoch
<b>G250</b>	6,26	5 Tage	gering	normal
<b>R250</b>	25	1 Tag	gering	gering

**Tabelle 3:** Vergleich unterschiedlicher Färbemethoden für 2-DE-Gele.

Anhand dieser Tabelle lassen sich die geeignetsten präparativen Färbungen auswählen. Hierbei handelte es sich um die MS-taugliche Silber-Färbung Ag-MS, die Zink/Imidazol-Färbung, die Silber-Färbung Shev-Ag, um die Fluoreszenz-Färbung Ruth und die Coomassie-G250-Färbung.

Diese 5 Färbungen wurden in einem folgenden Experiment auf Fraktion 1-Blattextrakte angewendet, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Verdünnungsreihe aus Abbildung 20 ähnliche Ergebnisse bei 2-DE-Proben aufweisen. Abbildung 21 zeigt 4 dieser 5 2-DE-Gele.



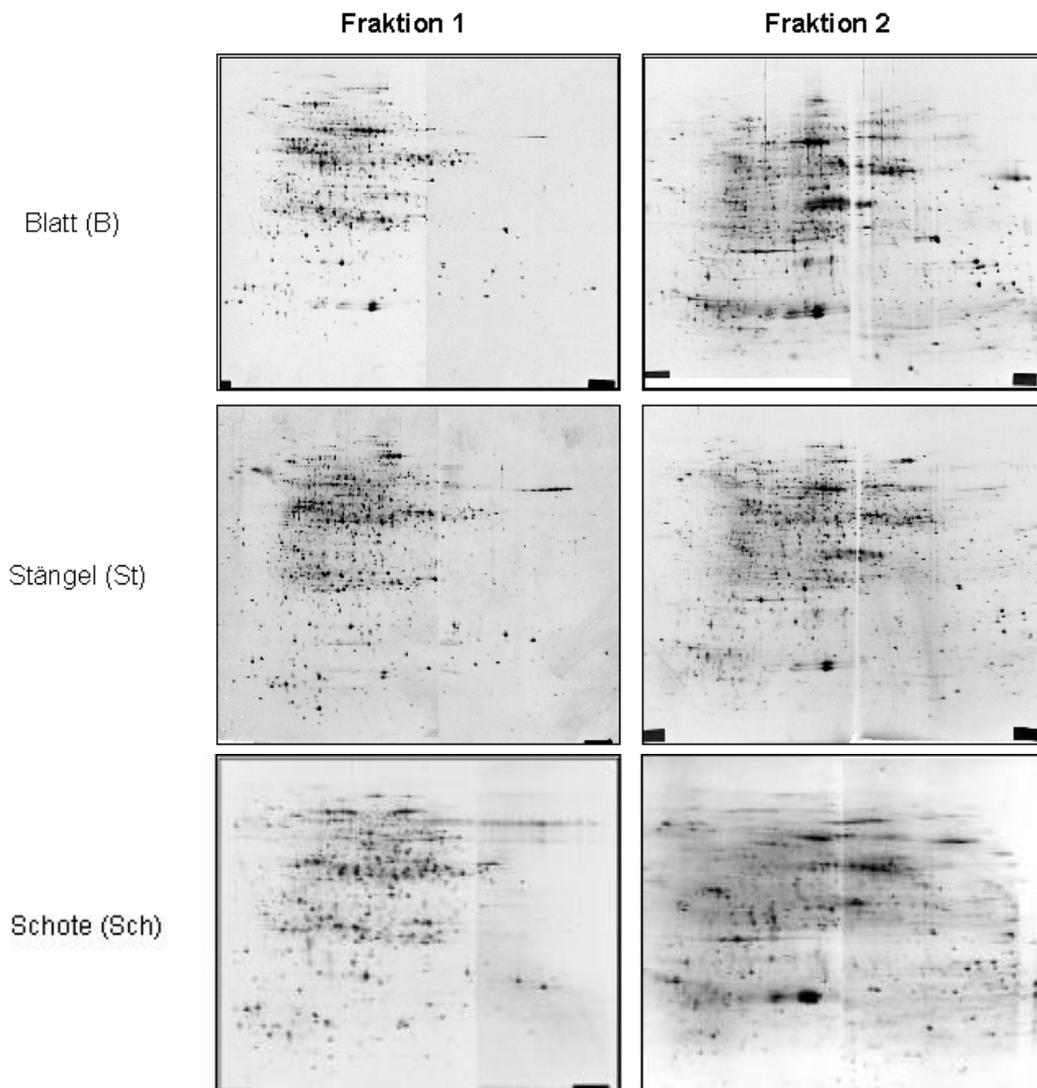
**Abbildung 21:** Vergleich verschiedener Färbemethoden mittels 2-DE-Gelen von Blatt-Fraktion 1-Extrakten. In Klammern unterhalb des jeweiligen Gels ist die Anzahl detektierter Proteinspots angegeben.

Wie man den Zahlen unter den 2-DE-Gelen in dieser Abbildung entnehmen kann, zeigen das Silber gefärbte (Ag-MS) 2-DE-Gel und das Zink/Imidazol-2-DE-Gel mit ca. 2300 Proteinspots die höchste Anzahl detektierbarer Proteinspots. Gefolgt werden sie knapp von dem Fluoreszenz gefärbten 2-DE-Gel (Ruth), das ca. 2200 Proteinspots aufweist. Die geringste Anzahl detektierbarer Proteinspots zeigt das Coomassie-G250 gefärbte 2-DE-Gel, das ca. 1700 Proteinspots aufweist.

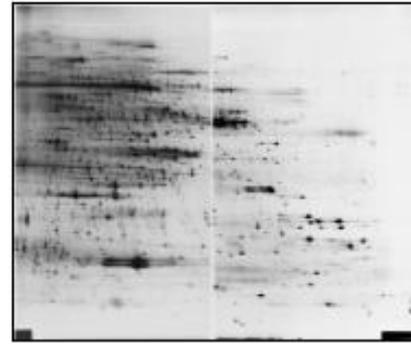
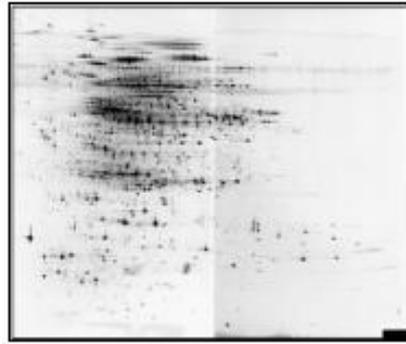
So konnte man nach dem gegenwärtigen Stand der Untersuchung, basierend auf Handhabbarkeit und Färbesensitivität eine Reihenfolge der Färbungen wie folgt festlegen: 1. Ag-MS, Shev-Ag- und Zink/Imidazol-Färbung, 2. Ruthenium-Fluoreszenz-Färbung und 3. Coomassie-G250-Färbung.

### 3.5 Etablierung von *Arabidopsis thaliana*-Standardmustern

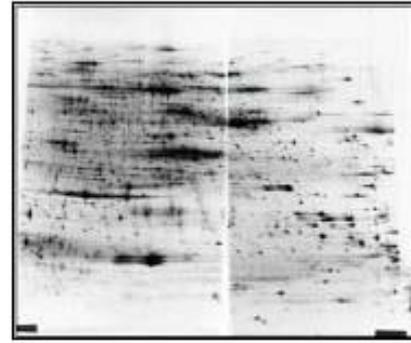
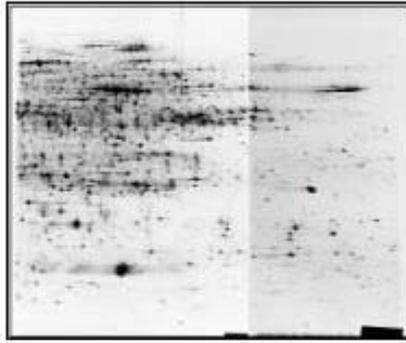
Wie gezeigt werden konnte, ist die fraktionierte Proteinextraktion, so wie sie für Pflanzengewebe entwickelt wurde, in Verbindung mit dem CA-basierten Riesengel-2-DE-System der effektivste Weg, Pflanzenproteine aufzutrennen. Im Folgenden wurden diese Methoden auf verschiedene *Arabidopsis thaliana*-Gewebe angewendet, um in einem ersten Schritt analytische Referenzgele zu erzeugen. Diese Referenzgele stellen die Proteinzusammensetzung von verschiedenen *Arabidopsis thaliana*-Geweben zu definierten Zeitpunkten und unter definierten Bedingungen dar. Abbildung 22 zeigt 2-DE-Gele der Fraktion 1 und Fraktion 2 von den Geweben Blatt, Stängel, Schote, Keimling, Rosettenblatt, Samen, Wurzel und Blüte. Zusätzlich ist jeweils am Ende der Abbildung ein SDS-PAGE-Gel mit 2 Verdünnungen der Fraktion 3 dargestellt.



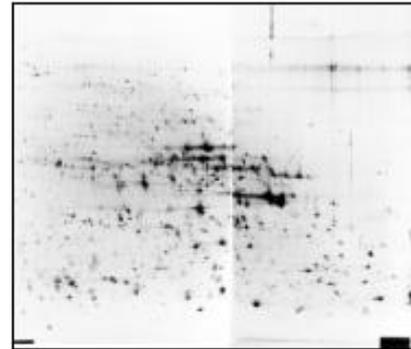
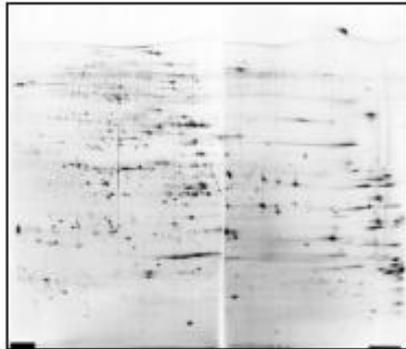
Keimling (Ke)



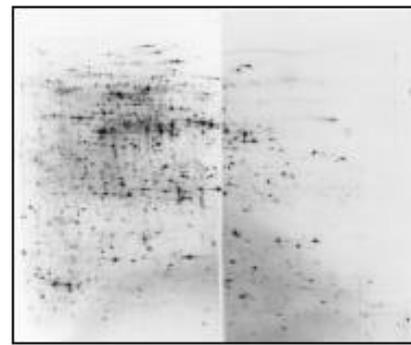
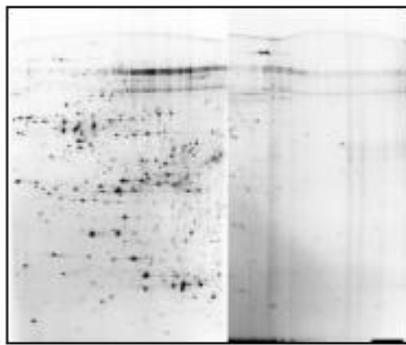
Rosette (Ro)



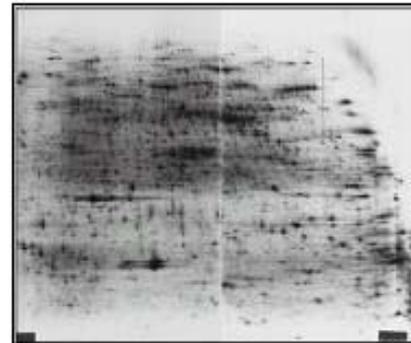
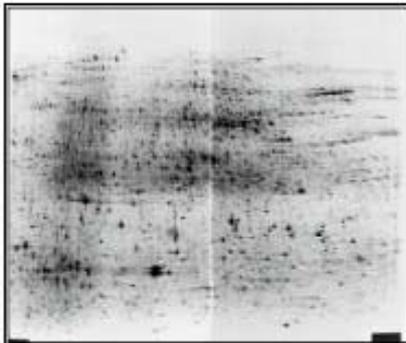
Samen (Sa)

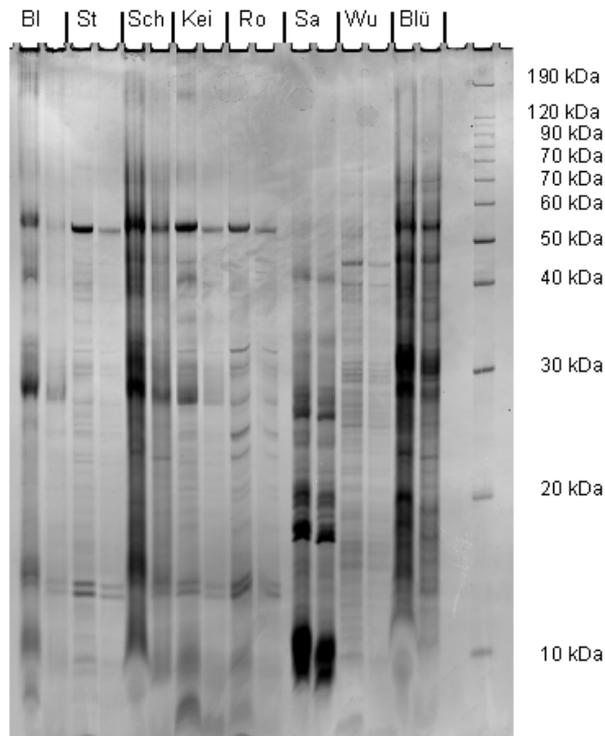


Wurzel (Wu)



Blüte (Blü)





**Abbildung 22:** Übersicht aller extrahierten und auf 2-DE- bzw. SDS-PAGE-Gelen getrennten Proteinextrakte aus verschiedenen *Arabidopsis thaliana*-Gewebe.

Wie sich anhand Abbildung 22 erkennen lässt, zeigen die verschiedenen Gewebe unterschiedliche 2-DE-Muster mit sowohl variierender Spotverteilung, variierenden Spotintensitäten gleicher Spots als auch divergenter Spotdichte. Darüber hinaus zeigen auch die SDS-PAGE-Gele klar unterschiedliche und eindeutige Bandenmuster, die noch massenspektrometrisch auswertbar sind.

Diese Serie von Geweben dient als Basis für eine zu etablierende 2-DE-Datenbank, in der aus jedem dieser Proteinmuster möglichst viele Proteine identifiziert werden sollen, um somit einen Einblick in das Proteom von *Arabidopsis thaliana* zu erhalten. Dieses Projekt ist jedoch nicht Teil der hier vorliegenden Arbeit, sondern gehört zu einem durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Pflanzen-Proteomprojekt.

### 3.6 MALDI-MS

Im Folgenden werden systematische Experimente aufgeführt, die eine Optimierung des Einsatzes der MALDI-MS dokumentieren. Hierbei wurden Kriterien wie die Wahl einer geeigneten MALDI-Matrix und deren Präparation ebenso betrachtet wie die Massenspektrometrietauglichkeit verschiedener Proteinfärbungen. Abschließend wird gezeigt, wie die hieraus hervorgegangenen Protokolle in die automatisierte Hochdurchsatz-Probenpräparation und Massenspektrometrie eingebaut wurden.

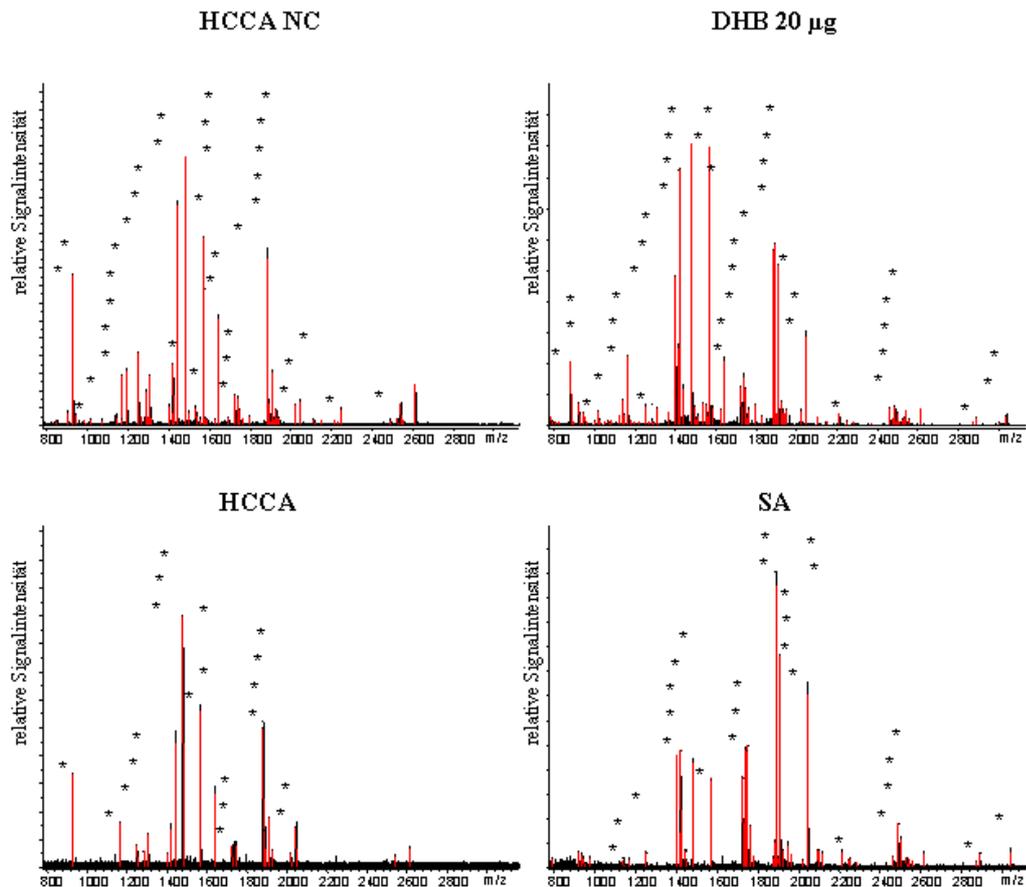
### 3.6.1 MALDI-MS-Probenpräparation

Bei der Probenpräparation für die MALDI-MS steht man vor einer Vielzahl verschiedener Möglichkeiten und Protokolle. Die Bandbreite reicht von der Wahl der Matrix, über die Zusammensetzung des Lösungsmittels bis hin zu verschiedenen Methoden der Probenapplikation. All diese Parameter wurden in einer Vielzahl von Publikationen<sup>172,205-208</sup> widersprüchlich diskutiert, sodass sich im Rahmen dieser Arbeit die Notwendigkeit der Evaluierung der verschiedenen Parameter zwingend ergab.

#### 3.6.1.1 Wahl der MALDI-Matrix

Bei der Wahl der passenden MALDI-Matrix stehen viele Kandidaten zu Verfügung, ohne dass auf chemisch-mechanistischer Ebene geklärt wurde, was eine gute Matrix von einer weniger guten unterscheidet<sup>209</sup>. Die 3 zur Zeit am häufigsten verwendeten MALDI-Matrices für Proteine und Peptide sind zum einen  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA)<sup>171</sup>, 2,5-Dihydroxybenzoesäure bzw. Gentiansäure (DHB)<sup>173</sup> und Trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure bzw. Sinapinsäure (SA)<sup>174</sup>. Aufgrund ihrer häufigen Verwendung und den mit ihnen erzielten guten Ergebnissen wurden diese 3 Matrices auch im Rahmen dieser Arbeit für erste Experimente eingesetzt. Die HCCA wurde sowohl in reiner Form als auch in Verbindung mit dem Additiv Nitrocellulose (NC) verwendet<sup>85</sup>.

Zu Beginn der Untersuchung wurden auf den 3 genannten Matrices 2 tryptisch verdaute Standardproteine (BSA und Lysozym) präpariert. Ziel war es festzustellen, ob die Wahl einer dieser Matrices an sich schon signifikante Unterschiede in der Qualität der Massenspektren lieferte. In Abbildung 23 werden die repräsentativen BSA-Peptidmassenspektren dargestellt. Tabelle 4 fasst die Ergebnisse der verwendeten Standardproteine zusammen.



**Abbildung 23:** Vergleich verschiedener MALDI-Matrices anhand eines tryptischen Verdaus von BSA. Mit \* markierte Peptidmassen korrespondieren mit den theoretisch erwarteten tryptischen BSA-Peptidmassen.

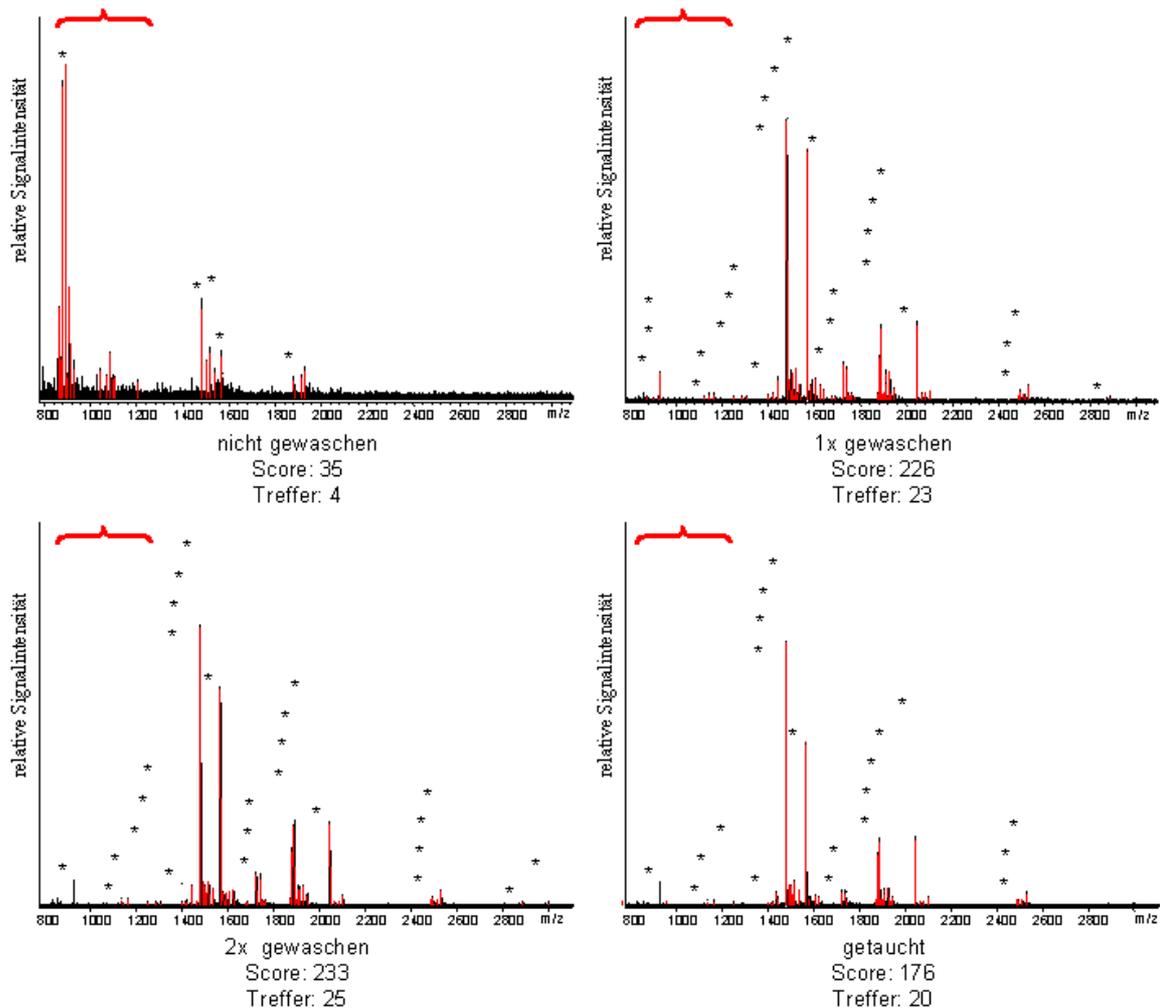
Protein	Matrix	Scorewert	übereinstimmende Peptide
BSA	HCCA NC	363	36
BSA	DHB	364	41
BSA	HCCA	262	21
BSA	SA	252	30
Lysozym	HCCA NC	161	12
Lysozym	DHB	147	13
Lysozym	HCCA	141	12
Lysozym	SA	129	12

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener MALDI-Matrices.

Wie sich anhand Tabelle 4 erkennen lässt, zeigten die Spektren bezüglich des Scorewertes – der je höher er ausfällt, ein Indikator für die Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit der Identifikation darstellt – einen eindeutigen Trend: HCCA NC und DHB liefern die besten Ergebnisse.

### 3.6.1.2 Waschen der HCCA-Matrix

Einige Matrices wie DHB und SA erfordern bei der Probenpräparation keinen expliziten Waschschriff nach der Probenapplifikation. Bei der HCCA-Probenpräparation ist die Situation jedoch eine andere. Wie in Abbildung 24 dargestellt, kommt dem Waschen der HCCA-Matrix ein hoher Stellenwert zu. So sieht man in dieser Abbildung Spektren eines tryptischen BSA-Verdaus, der sich lediglich in der Art bzw. der Häufigkeit der Spülung der Matrix nach Probenapplifikation unterscheidet.



**Abbildung 24:** Auswirkung verschiedener Waschprozeduren auf die Spektrumsqualität von HCCA-Matrix. Mit \* markierte Peptidmassen korrespondieren mit den theoretisch erwarteten tryptischen BSA-Peptidmassen. Die rote Klammer markiert den Bereich des Spektrums, in dem die bekannten Matrixcluster auftreten.

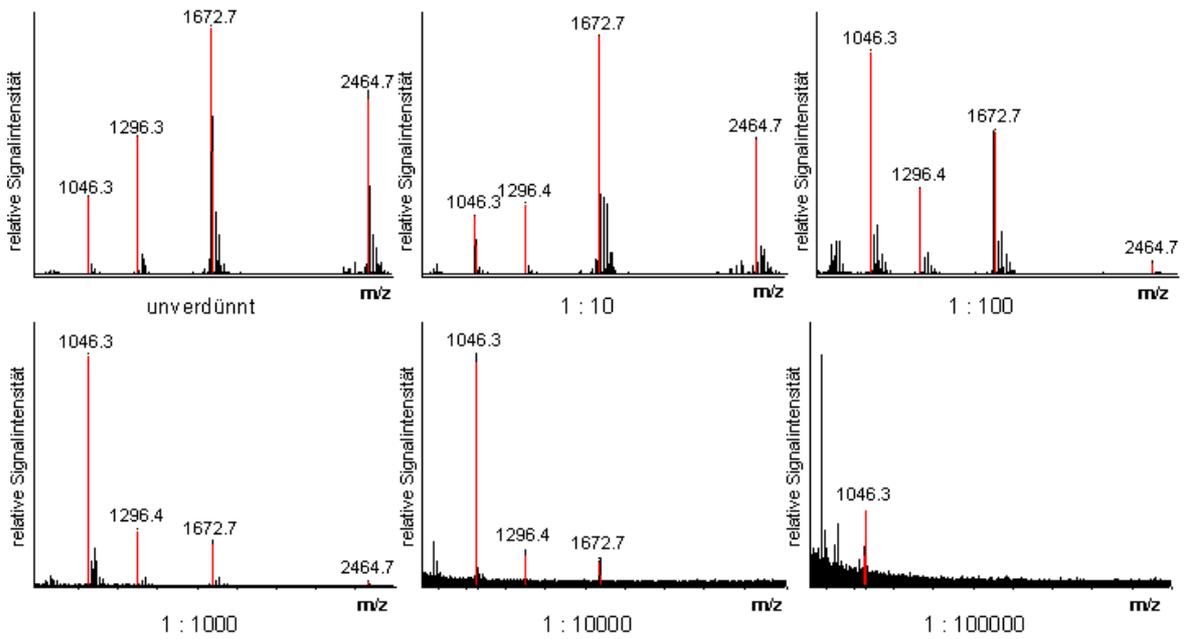
Wie man anhand der Massenspektren und den angegebenen Scorewerten sehen kann, ist das Spülen nach Probenapplifikation dringend angeraten. Das Massenspektrum der nicht gewaschenen Probe zeigt eine Vielzahl von Signalen im Bereich zwischen 750 und 1100 m/z (rote Klammer), die in der Literatur als „HCCA-Matrixcluster“ bekannt sind<sup>210,211</sup>. Diese „Matrixcluster“ sind so dominant, dass sie die restlichen BSA-Signale fast gänzlich unterdrücken.

Bereits einmaliges Spülen der Probe – wobei ein 5 µl Volumen 0,1 % TFA zweimal auf dem Matrixkristall auf- und abpipetiert wird – bewirkt eine Verminderung der „*Matrixcluster*-Signale“ und somit eine Verbesserung des Peptidnachweises, sodass eine klare Identifikation des Proteins möglich wurde. Eine Wiederholung dieses Waschschrilles verbesserte noch einmal die Qualität des Spektrums und somit auch die Qualität der Identifikation, wie man anhand des Scorewertes unter dem Spektrum ablesen kann. Weitere Wiederholungen der Waschschrille verbesserten die Qualität hingegen nicht mehr.

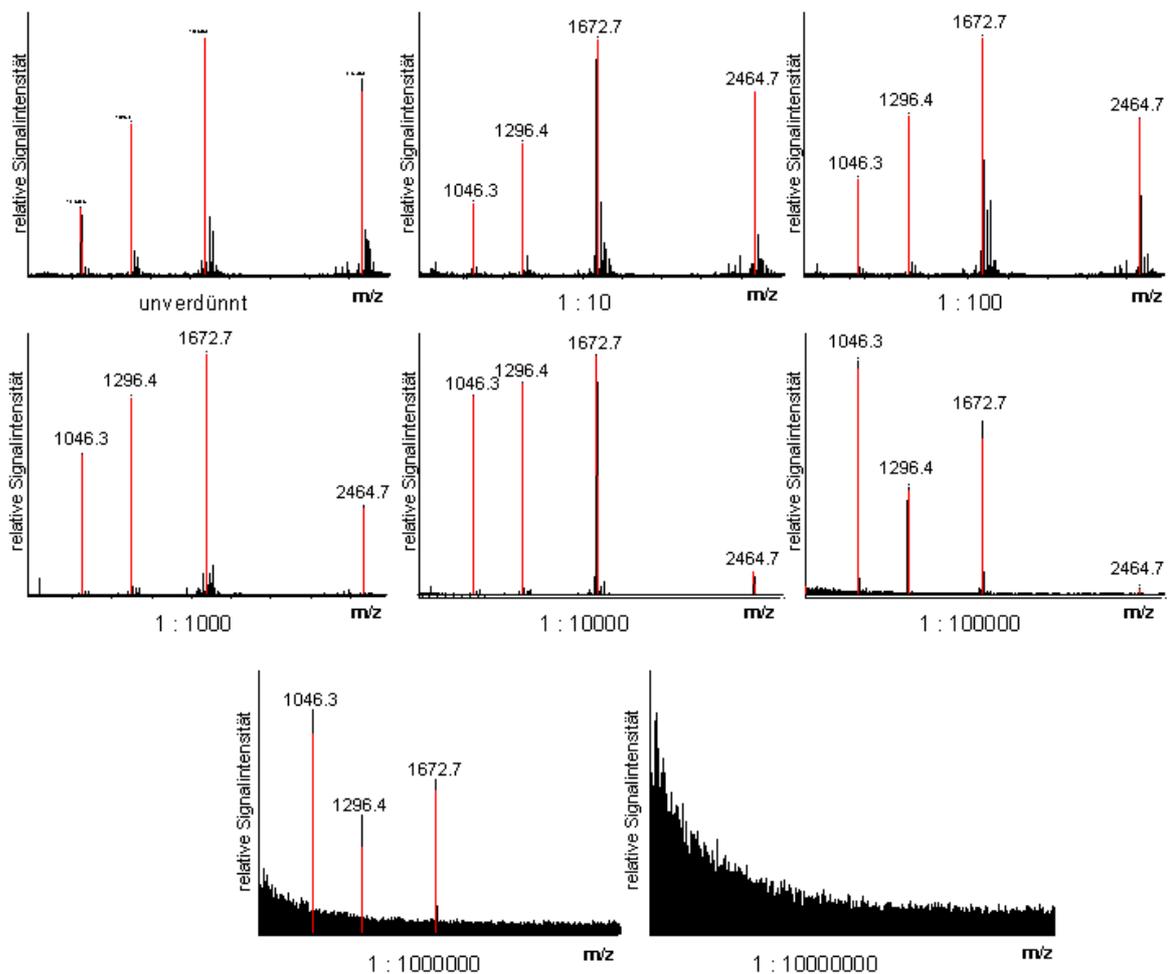
Eine weitere auf ihre Tauglichkeit überprüfte Methode war die von Nordhoff et al., die es erlaubte, alle 384 Positionen auf einem Probensteller gleichzeitig zu waschen<sup>170</sup>. Hierbei wird der gesamte Probensteller vertikal in ein 1l-Reagenzglas mit 0,1 % TFA getaucht. Der Probensteller verbleibt für 15 Sekunden in der Waschlösung und wird anschließend mit Druckluft von überschüssiger Waschlösung befreit. Das Spektrum einer auf diese Weise gewaschenen komplexen Peptidprobe ist ebenfalls in Abbildung 24 dargestellt. Wie sich erkennen lässt, ist das Spektrum von „*Matrixclustern*“ befreit und eine eindeutige Identifikation des Proteins möglich. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieser Tauchansatz nur für extrem verdünnte Proben möglich ist. Bei höher konzentrierten Peptidproben zeigte sich, dass durch das Eintauchen des Probenstellers in das Reagenzglas eine Übertragung von Peptiden von einem Probenanker auf die umliegenden Probenanker stattfindet.

### **3.6.2 Sensitivität der MALDI-TOF-MS**

Nachdem bislang die Sensitivität der verschiedenen Färbungen von Proteinen auf 2-DE-Gelen evaluiert wurde, wurde im Folgenden die Sensitivität der verwendeten MALDI-Massenspektrometriemethode untersucht. Hierfür wurde eine 25 picomolare Peptidmischung, die aus 4 Peptiden (Angiotensin II 1046 Da, Angitensin I 1296 Da, Neurotensin 1672 Da, ACTH 2465 Da) zusammengesetzt ist, mit 2 unterschiedlichen Puffern so weit verdünnt, dass deren Nachweisgrenze erreicht wurde. Hierzu wurden 2 unterschiedliche Puffer verwendet, um zu überprüfen, ob die Verwendung eines detergenzienhaltigen Puffers (n-Octylglycopyranosid) die Tendenz zur Oberflächenadsorption von Proteinproben verringert und somit die MALDI-Sensitivität erhöht. In Abbildung 25 und 26 sind die Spektren dieser beiden Verdünnungsreihen dargestellt.



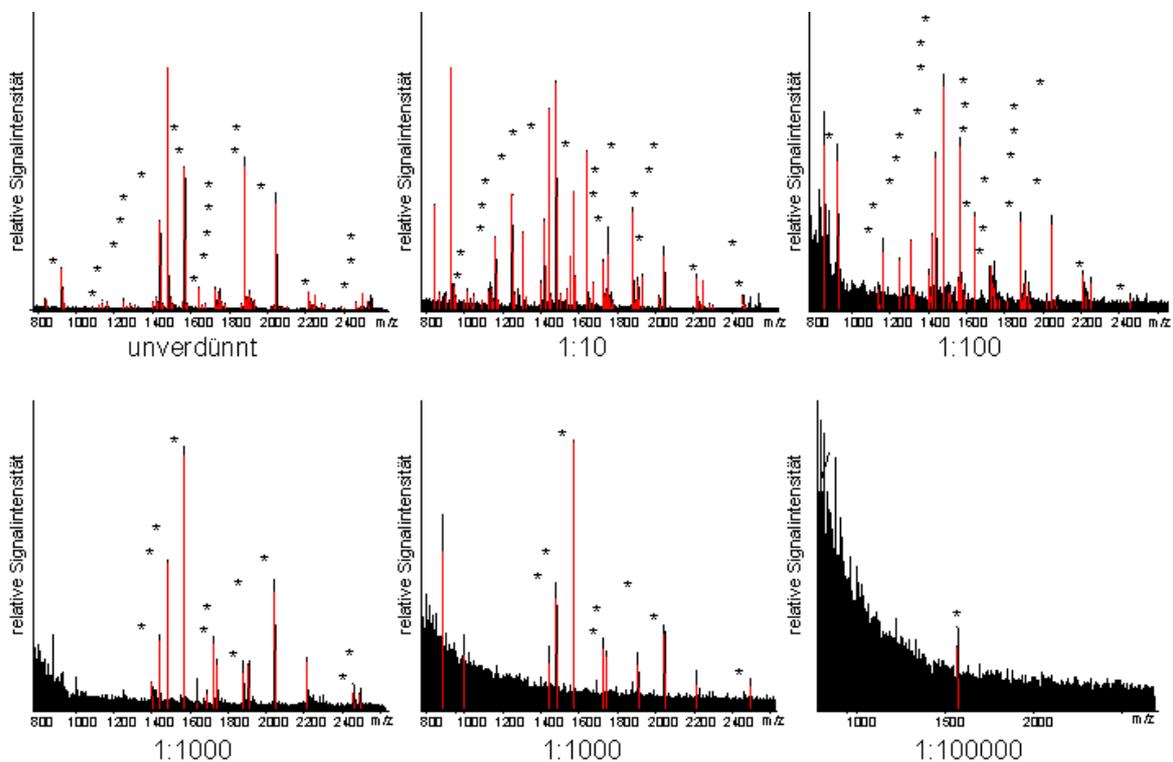
**Abbildung 25:** Verdünnungsreihe einer Peptidmischung (1046 Da, 1296 DA, 1672 Da und 2465 Da) in 0,25 % TFA.



**Abbildung 26:** Verdünnungsreihe der Peptidmischung aus Abb. 25 in 0,25 % TFA und 4 mM nOGP. Wie in diesen Abbildungen zu erkennen ist, ließ sich die Probe mit dem n-Otylglycopyranosid im Verdünnungspuffer 100mal stärker verdünnen, als dies die Kontrollprobe zuließ. Im

Verlauf der Verdünnung beider Reihen fiel auf, dass beide mit etwa den gleichen absoluten Werten der Signalintensität in der unverdünnten Proben begannen, wobei dann die mit n-Octylglycopyranosid verdünnte Probe einen Intensitätszuwachs aller Peptide bis zu einer tausendfachen Verdünnung zeigte, während die „normal“ verdünnte Probe nur einen Intensitätszuwachs bis zu einer zehnfachen Verdünnung aufwies. Das zeigt, dass die optimale Verdünnung der Probe mit n-Octylglycopyranosid bereits hundertmal geringer konzentriert ist als die Kontrollprobe. Diese Korrelation zwischen optimaler Verdünnung und absoluter Sensitivität entsprach somit exakt dem Abstand der Nachweisgrenze beider Proben.

Um diese Befunde an tryptisch verdauten Proteinproben aus Acrylamidgelen zu überprüfen, wurde eine ähnliche Verdünnungsreihe mit Coomassie gefärbten BSA-Spots durchgeführt. Abbildung 27 zeigt die Massenspektren dieser Verdünnungsreihen, während in Tabelle 5 die Scorewerte und die Anzahl der Treffer zusammengefasst sind.



**Abbildung 27:** Verdünnung eines tryptischen In-Gel-Verdau von Coomassie gefärbter BSA. Mit \* markierte Peptidmassen korrespondieren mit den theoretisch erwarteten tryptischen BSA-Peptidmassen. Die Verdünnung erfolgte in 0,25 % TFA und 4 mM nOGP.

Protein	Verdünnung	Scorewert	Peptide Treffer
---------	------------	-----------	-----------------

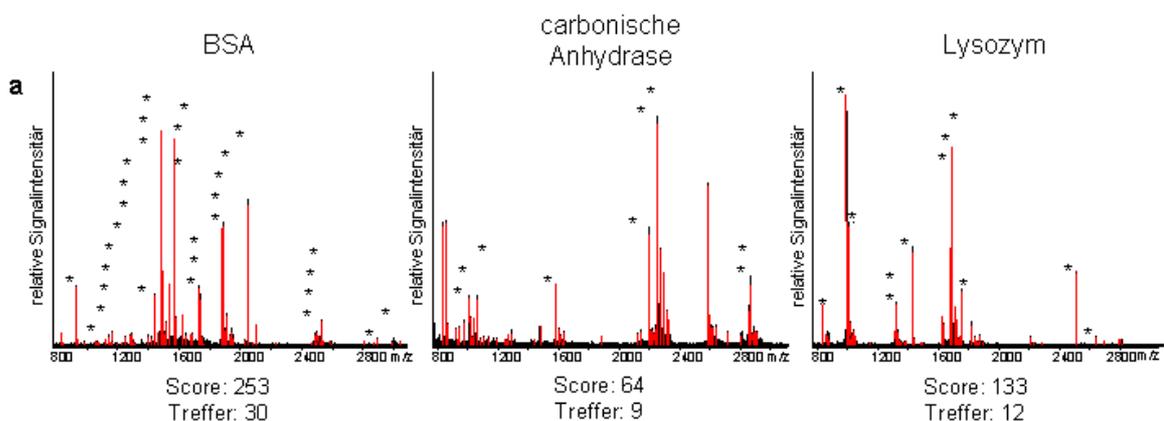
BSA	unverdünnt	261	31
BSA	1 zu 10	314	34
BSA	1 zu 100	240	25
BSA	1 zu 1000	119	11
BSA	1 zu 10000	85	8
BSA	1 zu 100000	n.A.	1

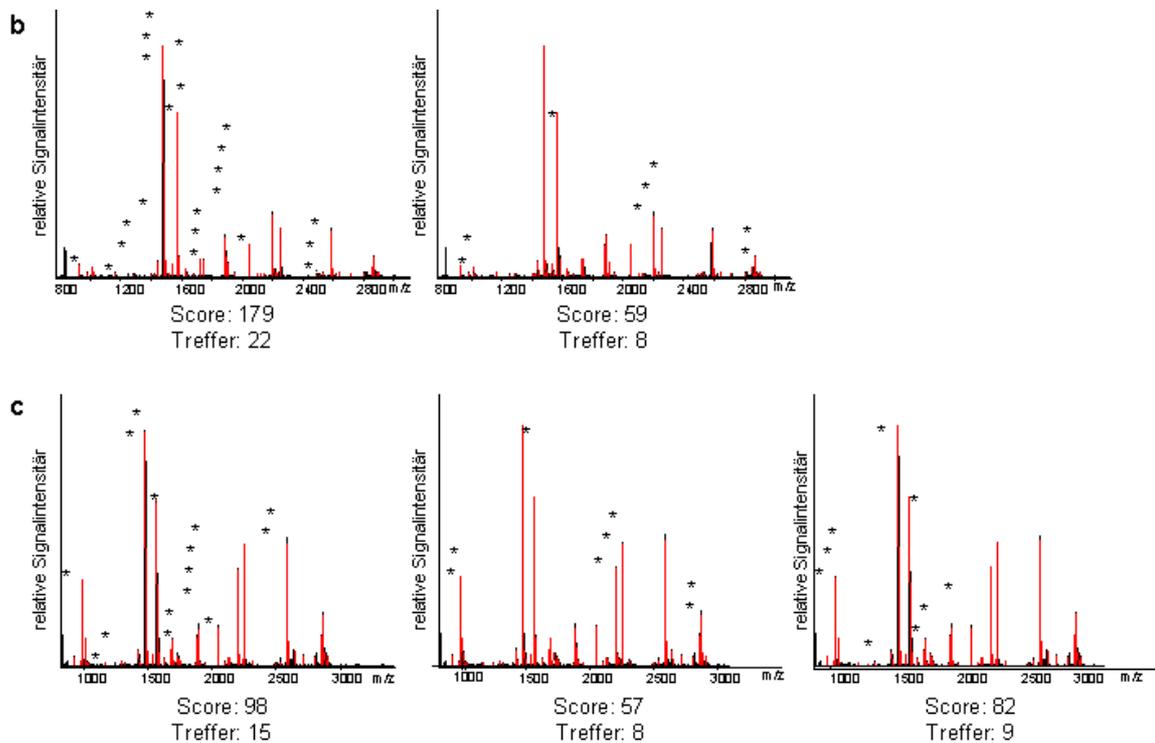
**Tabelle 5:** Ergebnisse der Verdünnungsreihe von BSA.

Wie sich aus den Werten der Tabelle 5 ablesen lässt, sind auch beim tryptischen Verdau der BSA-Proben ähnliche Phänomene wie bei der Peptidmischung zu beobachten: Zum einen kann man die Probe sehr stark (zehntausendmal) verdünnen und hat immer noch genügend Peptide, die zur eindeutigen Identifikation des Proteins ausreichen. Darüber hinaus trifft man auch bei diesem Experiment auf die bereits in der Peptidmischung gemachte Beobachtung, dass eine verdünntere Probe mitunter bessere Spektren als die konzentrierteren Proben aufweist. So zeigt die Probe mit einer zehnfachen Verdünnung den höchsten Scorewert und hat auch die größte Anzahl übereinstimmender Peptide – ein weiterer Befund, der die Wichtigkeit der Konzentration der Peptide für die erfolgreiche Identifikation unterstreicht.

### 3.6.3 Identifizierung aus Proteingemischen

Um zu evaluieren, inwieweit die hier verwendete MALDI-Massenspektrometriemethode ermöglicht, aus Proteinmischungen die einzelnen Bestandteile zu identifizieren, wurden 2 verschiedene Mischungen In-Gel-verdauter Standardproteine hergestellt. Hierbei handelte es sich um eine Mischung von BSA und carbonischer Anhydrase (1:1) sowie um eine Mischung von BSA, carbonischer Anhydrase und Lysozym (1:1:1). Diese Mischungen wurden auf HCCA NC präpariert und dann im MALDI-Massenspektrometer gemessen. In Abbildung 28 sind die Spektren der jeweils einzelnen Proteine (Abb. 28a) und der Proteinmischungen (Abb. 28b, c) dargestellt.





**Abbildung 28:** Spektren von tryptischen In-Gel-Verdauen. (a) Einzelspektren von BSA, carbonischer Anhydrase und Lysozym. (b) Spektren der Mischung von BSA und carbonischer Anhydrase in einer Präparation. (c) Mischung von BSA, carbonischer Anhydrase und Lysozym in einer Präparation. Die Spektren in (b) und (c) sind jeweils untereinander identisch; sie unterscheiden sich nur hinsichtlich der markierten Peptidmassen der identifizierten Proteine. Mit \* markierte Peptidmassen korrespondieren mit den theoretisch erwarteten tryptischen Peptidmassen.

Dieses Experiment zeigte, dass sich selbst aus Mischungen dreier Proteine die einzelnen Bestandteile der Mischung korrekt identifizieren lassen. Vergleicht man die Scorewerte, die bei der Identifikation der Proteine in ungemischter Form erzielt wurden, mit denen der gemischten Spektren, so fällt auf, dass die Mischspektren signifikant schlechtere Scorewerte aufweisen. Dies verdeutlicht, dass die Mischspektren pro Protein eine geringere Menge an Treffern aufweisen als die ungemischten Peptidspektren. Dieses Phänomen lässt sich hinreichend mit der Theorie erklären, dass die MALDI-Messmethode eine gewisse „Signalkapazität“ aufweist, die nicht überschritten werden kann<sup>212</sup>. Diese „Signalkapazität“, die in Abhängigkeit zur Konzentration der Probe und zur Verfügbarkeit der ionisierenden Ladungen steht, ist somit auch der begrenzende Parameter für die Komplexität der Mischung, die im MALDI-Massenspektrometer gemessen werden kann.

### 3.6.4 Tryptischer In-Gel-Verdau

Ebenso wie es viele Protokolle für die MALDI-Probenpräparation gibt, existieren verschiedene Publikationen mit mehr oder weniger unterschiedlichen Protokollen für den In-Gel-Verdau von Proteinen aus 2-DE-Gelen<sup>157,170,213-215</sup>. Bei diesen Protokollen variieren die verwendeten Trypsinkonzentrationen, die Salzkonzentrationen der verwendeten Puffer, die

Länge der Reaktionszeiten, die Waschlösungen, die Anzahl und Länge der Waschschriffe und viele Parameter mehr.

So galt es im Rahmen der vorliegenden Arbeit, ein Protokoll zu etablieren, das es erlaubt, möglichst schnell und in zuverlässiger Weise Proteine tryptisch zu spalten. Dieses Protokoll sollte sich in einem folgenden Schritt so weit automatisieren lassen, dass Hunderte von Proteinspots parallel bearbeitet werden können.

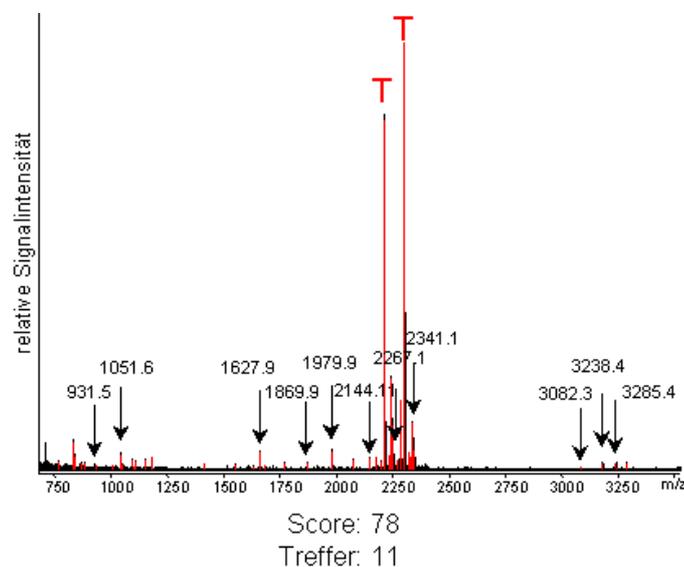
Zu Beginn der Evaluierung des In-Gel-Verdau-Protokolls wurden Standardproteine (BSA, carbonische Anhydrase, Lysozym und Myoglobin) jeweils einzeln in 0,5 ml Eppendorfgefäßen bearbeitet. Hierbei wurden Trypsinkonzentrationen zwischen 6 und 20 ng/µl in Volumina zwischen 2 µl und 20 µl verwendet. Der tryptische Verdau wurde zwischen 3 und 20 Stunden bei 30° C–37° C durchgeführt. Der pH-Wert wurde mit Tris-Base oder Ammoniumhydrogencarbonat in Konzentrationen zwischen 2 und 100 mM gepuffert. Die Dehydratation der Gelstücke wurde sowohl mit 100 % Ethanol als auch mit 100 % Acetonitril durchgeführt. Die Elution der Peptide aus dem Gelstück wurde mit TFA-saurem Acetonitril, mit TFA-saurem Wasser oder aber auch mit HCCA-haltigem, TFA-saurem Acetonitril durchgeführt. All diese Variationen führten bei dem tryptischen Verdau von Standardproteinen zu keinen signifikanten bzw. konsistenten Verbesserungen oder Verschlechterungen, sodass als Konsequenz ein Minimalprotokoll etabliert wurde, bei dem möglichst wenig Pipetierschritte und Pufferwechsel notwendig waren. Bei diesem Protokoll wurde jeder Inkubationsschritt mit möglichst kleinen Volumina durchgeführt und die Inkubationszeiten wurden so kurz wie möglich gehalten.

Es stellte sich bei dem Wechsel von Standardproteinen zu Proteinspots aus 2-DE-Gelen eine Verschlechterung der Ergebnisse ein, da plötzlich nicht mehr jedes Protein in Mikrogramm-Mengen vorlag, sondern z. T. nur noch in kleinen Nanogramm-Mengen. Aufgrund dessen galt es nun, ausgehend von dem etablierten Minimalprotokoll sukzessive ein Protokoll zu erarbeiten, das zuverlässig unterschiedlich gefärbte Proteine variierender Intensität tryptisch verdaut. Dies erwies sich als eine langwierige Methodenentwicklung, da neben der reinen Protokolletablierung eine Automatisierung etabliert werden musste.

Das letztendlich etablierte Protokoll zeigte einige Kernschritte, die mit größter Sorgfalt eingehalten werden müssen; dazu gehören ausgiebige und mehrmalige Spülungen der Gelstücke vor dem tryptischen Verdau. Diese Spülungen sind überaus wichtig, da hierbei Kontaminationen von SDS und anderen Chemikalien, die den tryptischen Verdau und die MALDI-Messung stören können, aus dem Gelstück gewaschen werden.

Ein weiterer wichtiger Schritt beim tryptischen In-Gel-Verdau ist das vollständige Dehydrieren des Gelstücks vor der Trypsinzugabe. Hierbei wurde eine Dehydratation mittels

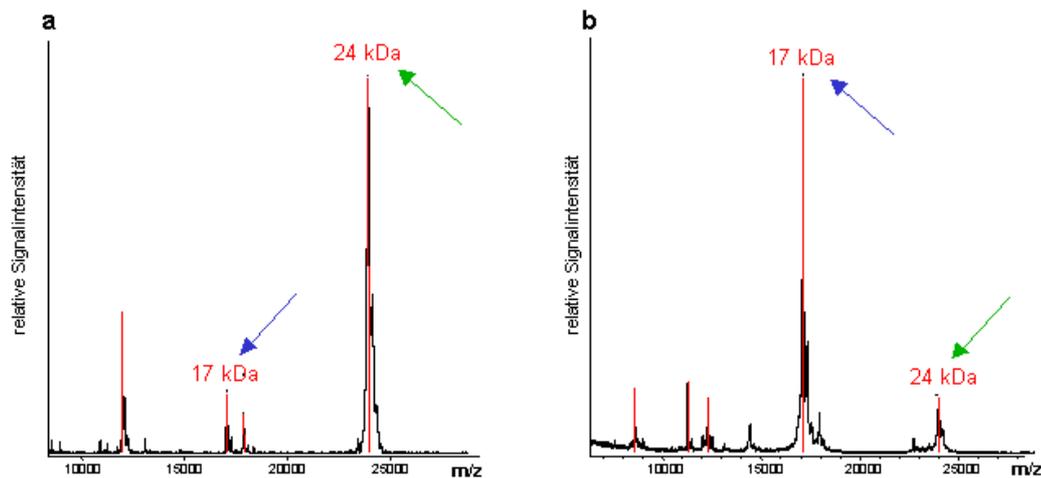
100 % Ethanol durchgeführt, der eine 15minütigen Vakuumzentrifugation folgte. Dies war deshalb unverzichtbar, da nur ein komplett dehydriertes Gelsstück in der Lage ist, ein möglichst großes Volumen Trypsinlösung aufzunehmen und somit ins Innere des Gelstücks, wo sich das Zielprotein befindet, zu transportieren. Trypsin, das nicht im Inneren des Gelstücks – bei dem Protein – endet, verdaut sich nur selbst und produziert somit störende autoprotolyse Produkte. Im selben Zuge galt es, zu hohe Trypsinmengen im Verdauerpuffer zu vermeiden. Dies ist wichtig, da Trypsinpeptide bei der Elution der Peptide des verdauten Proteins miteluiert werden. Wenn also die Konzentration des Trypsins zu hoch ist, so sieht man in den resultierenden Spektren sehr intensive Trypsinsignale, während die Peptide des Proteins fast im Grundrauschen des Massenspektrums verschwinden. Ein Beispiel eines solchen Massenspektrums zeigt Abbildung 29.



**Abbildung 29:** Beispiel der Identifikation eines Proteins (F5O11.2) in einer stark trypsinhaltigen Peptidmischung. Die Trypsinsignale sind mit T markiert, während die tryptischen Peptide des identifizierten Proteins mit ihren Peptidmassen gekennzeichnet sind.

Um zu große Trypsinmengen im finalen Eluat zu vermeiden, kann man zu 2 verschiedenen Strategien greifen: Zum einen gibt man ein kleines Volumen Trypsinlösung auf ein dehydriertes Gelsstück und lässt diese Lösung einquellen, sodass das Trypsin ins Innere des Gelstücks gelangt. Anschließend kann man zur vollständigen Rehydratation des Gelstücks ein ausreichendes Volumen Verdauerpuffer nachpipetieren. Die zweite mögliche Strategie besteht darin, das dehydrierte Gelstück mit einem größeren Volumen Trypsinlösung zu bedecken, die Rehydratation für ca. 40 Minuten bei 4° C stattfinden zu lassen, anschließend überschüssige Trypsinlösung zu entfernen und durch trypsinfreien Verdauerpuffer zu ersetzen. Beide Strategien vermeiden eine Präsenz von zuviel Trypsin außerhalb des Gelstücks und werden im Rahmen der Automatisierung des In-Gel-Verdaus noch einmal besprochen.

Ein letzter Aspekt, der für den tryptischen In-Gel-Verdau von großer Wichtigkeit war, betrifft die Qualität des verwendeten Enzyms – im vorliegenden Fall – des Trypsins. Wie sich herausstellte, gibt es nach wie vor große Schwankungen in der Qualität der gelieferten Chargen ein- und desselben Enzyms durch ein- und denselben Hersteller. In Abbildung 30 sind Massenspektren unterschiedlicher Chargen von Trypsin dargestellt, die solche Schwankungen dokumentieren.



**Abbildung 30:** Vergleich einer intakten (a) und einer degradierten (b) Charge Trypsin.

Die Abbildungen 30a und 30b zeigen die Massenspektren von „intakten“ Trypsinmolekülen ein- und desselben Herstellers, die sich jeweils in der Produktionsnummer unterscheiden. Wie sich erkennen lässt, zeigt das Massenspektrum in Abbildung 30a ein Hauptsignal der Masse 24 kDa (grüner Pfeil). Diese Masse entspricht dem erwarteten Molekulargewicht des intakten Trypsinmoleküls. Im Massenspektrum 30b hingegen ist das Massensignal von 24 kDa (grüner Pfeil) nur ein schwaches Signal; hier dominiert ein Fragment der Masse 17 kDa (roter Pfeil). Aus diesem Befund resultiert, dass – gerade wenn man Hochdurchsatz-Messungen plant – ein Test auf die Funktion und Intaktheit des Enzyms einer jeden neuen Charge unvermeidbar ist.

### 3.6.5 Vergleich der Proteinfärbungen auf MS-Ebene

Um die Tauglichkeit der einzelnen Proteinfärbemethoden auf MALDI-MS zu überprüfen, wurden 2 experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen wurde eine Mischung von 4 Standardproteinen (BSA, CA, Lysozym, Myoglobin) auf SDS-PAGE-Gelen getrennt und mit 5 der im Abschnitt 2.6 beschriebenen Färbemethoden (Ag-MS, Shev-Ag, Zn, Ruth, G250) gefärbt. Es wurden jeweils 2 Gelstücke pro Proteinbande und Färbung ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Die Scorewerte und die Anzahl der Peptidtreffer für die verglichenen Proteine sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

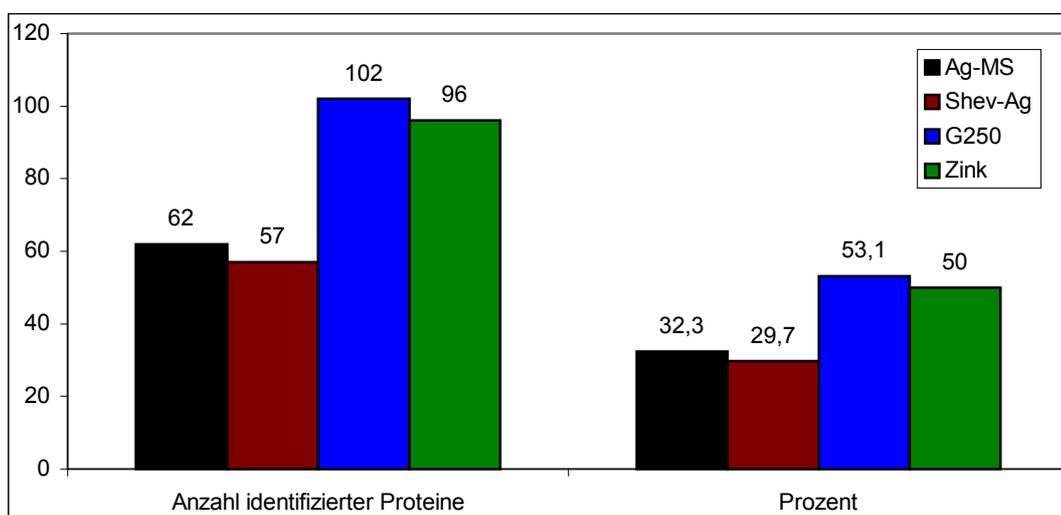
	Ag-MS	Shev-Ag	G250	Ruthenium	Zn
<b>BSA</b>	247 (26)	201 (21)	261 (26)	122 (16)	162 (17)
<b>carbonische Anhydrase</b>	57 (8)	91 (9)	78 (9)	103 (10)	92 (10)
<b>Lysozym</b>	101 (10)	115 (10)	133 (12)	96 (9)	108 (10)
<b>Myoglobin</b>	117 (10)	111 (10)	126 (11)	75 (7)	90 (9)

**Tabelle 6:** Vergleich der Scorewerte und der übereinstimmenden Peptide (in Klammern) unterschiedlicher Färbemethoden.

Wie sich Tabelle 6 entnehmen lässt, lieferte bei diesem Vergleich Coomassie G250 eindeutig das beste Ergebnis. Dies bedeutet, 3 der 4 Spektren der G250 gefärbten Proteine zeigten sowohl die höchsten Scorewerte als auch die höchste Anzahl an Peptidtreffern. Die Reihenfolge der anderen Färbungen war nicht so klar festzulegen. So lieferte die Ruthenium-Färbung in diesem Vergleich knapp die schlechtesten Ergebnisse, während die Zink/Imidazol- und die beiden Silber-Färbungen in etwa gleich gute Ergebnisse zeigten.

Dies ist ein ungewöhnlicher Befund, da gerade die Fluoreszenz-Färbungen in der Literatur für ihre gute Massenspektrometrietauglichkeit bekannt sind <sup>164,165</sup>, während Silber-Färbungen für eher schlechte Massenspektrometrietauglichkeit bekannt sind <sup>216</sup>.

Um die Gültigkeit dieser Ergebnisse nunmehr auf 2-DE-Gelen zu überprüfen, wurde ein Vergleich durchgeführt, bei dem aus 4 2-DE-Gelen, die aus Fraktion 1-Blattextrakten hergestellt wurden, 192 Proteinspots, die über das gesamte 2-DE-Gel verteilt lagen, ausgeschnitten wurden. Die Proteine wurden tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Leider musste bei diesem Vergleich auf die Fluoreszenz-Färbung verzichtet werden, da keine Möglichkeit bestand, Fluoreszenz gefärbte 2-DE-Proteinspots in geeigneter Form in größeren Umfang auszuschneiden. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der Proteinidentifikation dargestellt, während Tabelle 7 die Ergebnisse des gesamten Versuchs nochmals zusammenfasst.



**Abbildung 31:** Vergleich der massenspektrometrischen Erfolgsquote verschiedener Färbemethoden.

	<b>Ag-MS</b>	<b>Shev-Ag</b>	<b>G250</b>	<b>Zink</b>	<b>Ruthenium</b>
<b>Automatisch erkannt</b>	5075	5056	5339	5387	4642
<b>Detektiert nach Editieren</b>	2302	2334	1689	2350	2198
<b>Ausgestanzte Spots</b>	192	192	192	192	0
<b>Identifiziert</b>	58	57	102	96	0
<b>Prozent identifiziert</b>	32,3	29,7	53,1	46,4	0
<b>Theoretisch identifizierbar</b>	<b>743</b>	<b>693</b>	<b>895</b>	<b>1092</b>	<b>???</b>

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der Ergebnisse des Färbevergleichs von 2-DE-Gelen.

Wie man der Abbildung und der Tabelle entnehmen kann, zeigt Coomassie G250 auch in diesem Vergleich mit 53 % das beste Ergebnis in Bezug auf die Erfolgsquote identifizierter Proteine. An zweiter Stelle rangiert nach dieser Untersuchung die Zink/Imidazol-Färbung mit 46 % Erfolgsquote. Beide Silber-Färbungen liegen mit etwa 30 % Erfolgsquote gleich auf dem dritten Platz.

Dies war ein überraschend eindeutiger Befund, da der Färbevergleich der Standardproteine verhältnismäßig geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Färbungen aufwies. So konnten letztlich alle Standardproteine mit allen verwendeten Färbungen klar identifiziert werden. Die Unterschiede in der Erfolgsquote bei den 2-DE-Gelen waren dagegen erheblich. Diese Eindeutigkeit der Differenzen drehte die allein aufgrund der 2-DE-Färbetests zusammengefassten Ergebnisse aus Tabelle 3 gänzlich um. Aus diesem Grund erschien es notwendig, aus der Kombination der Ergebnisse des reinen 2-DE-Sensitivitätsvergleichs (vgl. 3.4.2) und der im vorliegenden Abschnitt ermittelten Massenspektrometrietauglichkeit eine zusammenfassende Aussage zu folgender Frage zu treffen: Welche der Färbungen eignet sich für die Proteomanalyse am besten?

Hierfür wurde ein „theoretischer Erfolgsquotient“ für jede Färbung ermittelt, der sich aus dem Produkt der Anzahl detektierbarer Proteinspots und dem Erfolgsquotienten der Massenspektrometrie ergab. Die Ergebnisse dieses abgeleiteten Erfolgsquotienten sind in der Tabelle 7 in der Spalte „theoretisch identifizierbar“ aufgeführt. Betrachtet man den „theoretisch identifizierbar“-Wert in Tabelle 7, so zeigt plötzlich die Zink/Imidazol-Färbung mit einem theoretischen Erfolgsquotienten von 1100 identifizierbaren Proteinspots aus dem Fraktion 1-Blattextrakt-2-DE-Gel den höchsten Wert. An zweiter Stelle rangiert aufgrund der bei weitem besten Massenspektrometrietauglichkeit die Coomassie-G250-Färbung mit etwa 900 theoretisch identifizierbaren Proteinen. Die beiden Silber-Färbungen befinden sich gleichauf auf dem dritten Platz mit etwa 700 theoretisch identifizierbaren Proteinen.

### **3.7 Automatisierung**

Nachdem die grundlegenden Protokolle für die Proteinextraktion, die 2-DE-Proteintrennung und die MALDI-Probenpräparation entwickelt wurden, stand nunmehr die Aufgabe an, diese Techniken zu automatisieren. Die Angriffspunkte dieser Automatisierungen sind in erster Linie das Ausstanzen der Proteinspots aus dem 2-DE-Gel, der tryptische In-Gel-Verdau der Proteine, die Präparation der Peptide auf dem MALDI-Probenteller und deren massenspektrometrischer Analyse. Im Folgenden werden einige der hierfür durchgeführten Entwicklungen näher beleuchtet.

#### **3.7.1 Automatisierung des Ausstanzens von Proteinspots**

Zum Ausstanzen der Proteinspots wurde ein Spotausstanzer von Bruker Daltonik verwendet. Dieses Gerät, das ausführlich unter 2.9.2 beschrieben wurde, weist eine hohe Ortgenauigkeit auf und zeigt darüber hinaus eine große Zuverlässigkeit beim Spotausschneiden (Fehlerquote unter 2 %). Des Weiteren vermag dieses Gerät ca. 250 Proteinspots pro Stunde auszustanzen. Die Koordinaten der Spots müssen hierzu vorher festgestellt werden. Dies funktioniert bei dem Bruker Spotausstanzer in der vorliegenden Version lediglich manuell, sodass für diesen Vorgang ein Zeitaufwand von ca. 60 Minuten für tausend Proteinspots eingeplant werden muss. In der Summe bedeutet dies, dass sich etwa 1000 Proteinspots in 5 Stunden auspicken lassen.

#### **3.7.2 Automatisierung des In-Gel-Verdau**

Nachdem in 3.6.4 der In-Gel-Verdau besprochen wurde, wird im Folgenden auf die Entwicklung des semiautomatischen In-Gel-Verdau-Protokolls eingegangen. Eine Vorläufervariante der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Prozedur wurde bereits bei Nordhoff et al. beschrieben<sup>175</sup>. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode basiert ebenfalls auf einem Durchflusszentrifugationsansatz in 96 Positionen-MTPs. Hierbei handelt es sich um die unter 2.8 beschriebenen doppelt gelöcherten MTPs, die anfangs manuell, später unter Verwendung eines Roboters (Abb. 4), zweimal am Boden jedes Reaktionsgefäßes gelocht wurden. Diese MTPs, die im automatischen Proteinspotausschneider zum Einsatz kommen, bilden das Kernstück der gesamten Prozedur. Um die Durchflusszentrifugationschritte kontaminationsfrei zu gewährleisten, wurde der unter 2.11 beschriebene Aufbau von 3 MTPs und einem Abstandhalter konzipiert. Dieser Aufbau und die damit verbundene mögliche Parallelisierung der Probenhandhabung bilden die Grundlage für das im Folgenden beschriebene System.

Unvermeidbarerweise war eine Verschlechterung der Erfolgsquoten der Proteinidentifikation zu beobachten, wenn statt der kontrollierten, einzelnen Probenpräparation in 0,5 ml Eppendorfgläsern eine hochparallele Probenpräparation in 96er MTPs vorgenommen wurde. Dies lag primär daran, dass sich jetzt nicht mehr für jede einzelne Probe überprüfen lässt, ob der neu zugegebene Puffer das Gelstück vollständig bedeckt bzw. ob der alte Puffer vollständig entfernt wurde. Dementsprechend wurde es zunehmend wichtiger, die Prozedur den aufkommenden Problemen anzupassen.

Hieraus resultierte, Inkubationen, die zuvor in extrem kleinen Volumina durchgeführt wurden, so zu modifizieren, dass sie sich – wenn möglich – mit größeren Volumina durchführen ließen. Kleinere Flüssigkeitsvolumina (von 3 µl oder weniger) bergen bei der Verwendung der 96 Positionen MTPs die Gefahr, das kleine dehydrierte Gelstück gar nicht zu treffen, womit die erwünschte Reaktion oder Inkubation ausbleibt. Dieses Problem betrifft in erster Linie die bereits in 3.6.4 erwähnte Applikation der Trypsinlösung auf das dehydrierte Gelstück. Wie in 3.6.4. dargelegt, ist die absolute Menge Trypsin im endgültigen Peptideluat von größter Bedeutung, da Trypsin-Autoprotolyseprodukte einen Teil der im Massenspektrum messbaren Peptide darstellen. Wie beschrieben, können daher 2 Strategien verfolgt werden, um die absolute Trypsinmenge im finalen Peptideluat zu kontrollieren: Zum einen lassen sich kleine Volumina von Trypsinlösungen verwenden. Zum anderen kann – als Variante für die Automatisierung – mit großen Volumina, einem 40minütigen Rehydrierungsschritt bei 4° C und der anschließenden Abzentrifugation überschüssiger Trypsinlösung gearbeitet werden. Letztere Vorgehensweise birgt allerdings zweierlei Schwierigkeiten: Trypsin ist, sobald es auf das Gelstück aufgetragen wird, aktiv. Wird diese Probe zu lange bei Raumtemperatur aufbewahrt, beginnt entsprechend die tryptische Spaltung des Proteins in dem Gelstück, was bei der anschließenden Entfernung der überschüssigen Trypsinlösung zu Probenverlusten führen kann. Darüber hinaus erhöht sich durch die Verwendung eines größeren Volumens der Verbrauch an Trypsin, was mit einer Kostensteigerung einhergeht. Die Volumenerhöhung der anderen Inkubationsschritte erweist sich hingegen als unproblematisch.

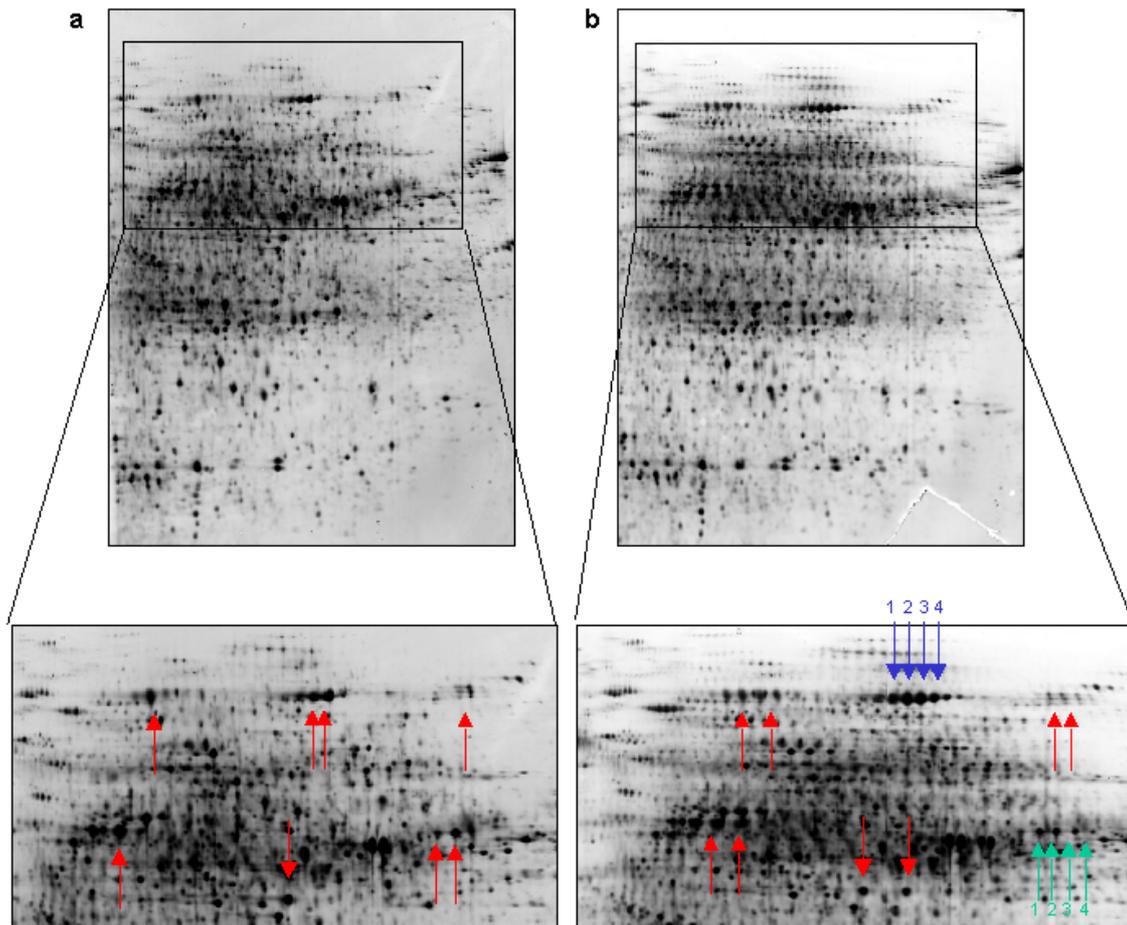
### **3.7.3 2-DE und In-Gel-Verdau voralkylierte Proteine**

Wie in 3.7.1.2 dargelegt, konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll für den MTP-basierten In-Gel-Verdau etabliert werden. Nichtsdestotrotz bot sich eine Möglichkeit an, die Prozedur durch eine Modifikation der 2-DE-Probenpräparation weiter zu vereinfachen und somit die Komplexität und den Zeitaufwand des eigentlichen In-Gel-Verdaus zu reduzieren. Bei dieser Vereinfachung handelte es sich um die Reduzierung und Alkylierung der Proteinextrakte vor der 2-DE-Trennung<sup>217-220</sup>. Hierfür existiert ein klassischer Ansatz, der

ebenso angelegt ist wie die Reduzierung und Alkylierung der Proteine beim tryptischen In-Gel-Verdau. Dieser Ansatz basiert auf einer 30–60minütigen Reduktion unter Verwendung von DTT, gefolgt von einer 30minütigen Alkylierung unter Verwendung von Iodacetamid<sup>218</sup>. Der zweite Ansatz basiert auf der Verwendung von Tri-Butylphosphine (TBP) als Reduktionsmittel<sup>221</sup> und Acrylamid als alkylierendes Agens. Diese beiden Chemikalien können aufgrund der geringen Reaktivität von Phosphinen gegenüber Acrylamid in einer gemeinsamen Inkubation eingesetzt werden, sodass nur ein 90minütiger Inkubationsschritt notwendig ist<sup>222</sup>.

Um die beiden erwähnten Ansätze experimentell zu erproben, wurden 3 2-DE-Gele von Stängel-Fraktion 1-Extrakten hergestellt: Eines, bei dem die Proteine mittels TBP und Acrylamid in einer einschrittigen Reaktion reduziert und alkyliert wurden, eines, bei dem die Proteine in einer zweischrittigen Reaktion mittels DTT und Iodacetamid reduziert und alkyliert wurden, und ein Kontrollgel. Anschließend wurden korrespondierende Proteinspots aus den einzelnen Gelen ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Hierbei wurden die Spots aus dem Kontrollgel gemäß dem Protokoll in 2.11 tryptisch verdaut, während die Proteinspots aus den beiden voralkylierten Gelen ohne den DTT-Reduktionsschritt und den Iodacetamid-Alkylierschritt tryptisch verdaut wurden.

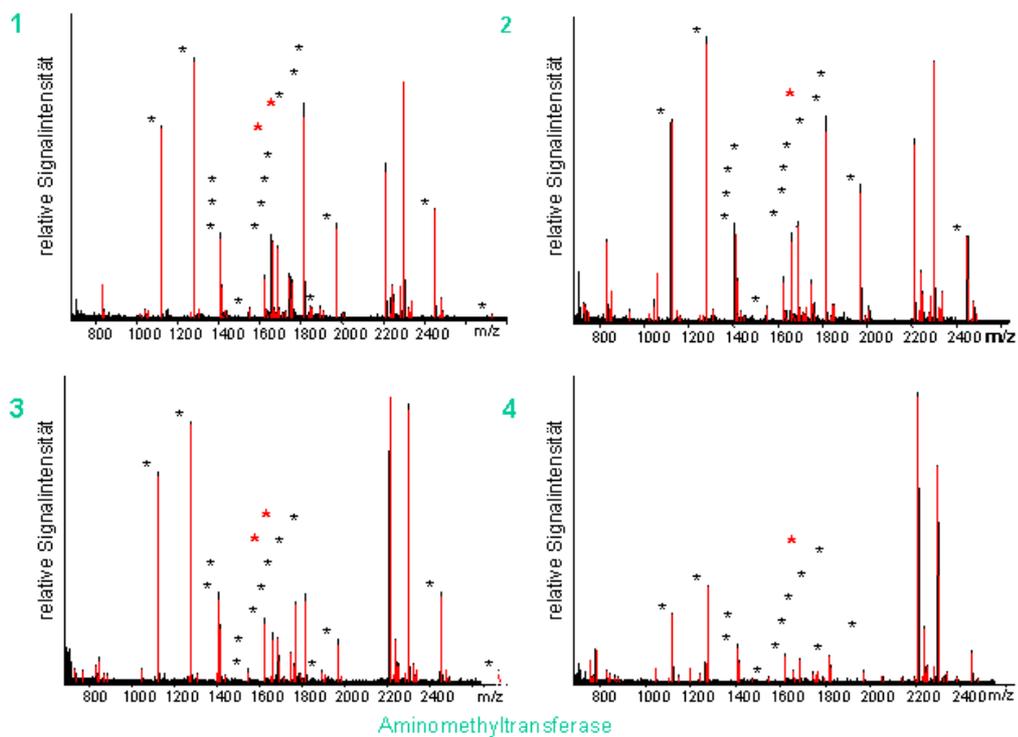
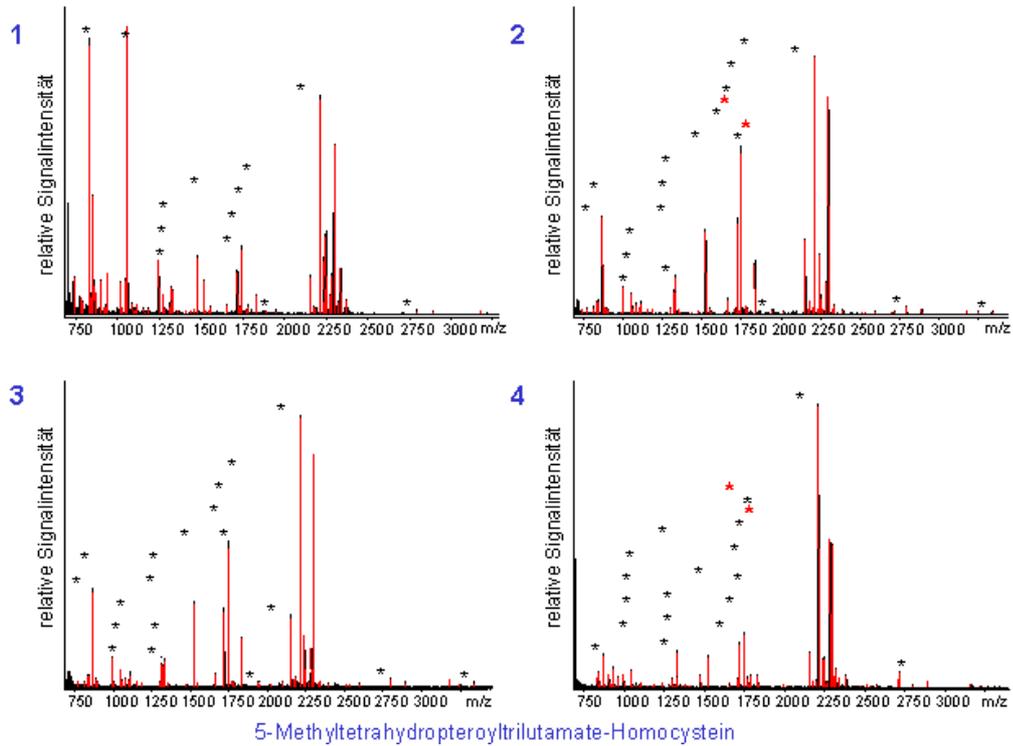
Bei der massenspektrometrischen Analyse stellte sich heraus, dass die Proteine aus dem Acrylamid alkyliertem 2-DE-Gel gar keine Alkylierung aufwiesen, da das Einschrittprotokoll offensichtlich unter den verwendeten Bedingungen nicht in der Lage war, Cysteine hinreichend zu alkylieren. Aus diesem Grund wurde auf eine weitere Verwendung dieser Methode vorerst verzichtet. Abbildung 32 zeigt das Kontrollgel und das Iodacetamid-alkylierte 2-DE-Gel.



**Abbildung 32:** Vergleich von 2-DE-Mustern eines Stängel-Fraktion 1-Proteinextrakts (a) mit einem vor der Trennung reduzierten und alkylierten Proteinextrakt (b) des gleichen Gewebes. Die farbigen Pfeile markieren unterschiedliche ausgeprägte Proteinspots. Die mit blauen bzw. grünen Pfeilen und Zahlen markierten Proteinspots wurden massenspektrometrisch identifiziert.

Wie sich dieser Abbildung entnehmen lässt, ist die Ähnlichkeit des Kontrollgels zum Iodacetamid-alkylierten 2-DE-Gel gerade im hochmolekularen Bereich (schwarzer Kasten) aufgrund einer Doppelung der Proteinspotketten stark verändert. Dieser Doppelungseffekt, der eine Verlängerung der Spotkette zur basischen Seite bedeutet, nimmt mit abnehmenden Molekulargewicht deutlich ab. Das Ungewöhnliche an dieser Verdoppelung von Proteinspots ist, dass man selbst bei einer partiellen Alkylierung durch Iodacetamid keine Präsenz ladungsverschobener Spots erwarten würde, da eine Carbamidometylierung eigentlich keine zusätzliche Ladung hinzufügt, noch eine vorhandenen Ladung entfernt. Dies bestätigte sich auch bei der massenspektrometrischen Analyse, da sowohl die positionsidentischen Proteinspots aus dem voralkylierten Gel als auch die positionsverschobenen Doppelgänger Alkylierungen aufwiesen. Dementsprechend lag die Vermutung nahe, dass die Positionsverschiebung nicht auf die Alkylierung der Cysteine des Proteins zurückzuführen wird. In Abbildung 33 sind die Massenspektren zweier Spotketten die in Abbildung 32 mit

farbigen Pfeilen und Zahlen markiert sind (5-Methyltetrahydropteroyltrilutamate-Homocystein blauer Pfeil und Aminomethyltransferase grüner Pfeil).



**Abbildung 33:** Massenspektren der in Abb. 32 mit farbigen Pfeilen und Nummern markierten Proteinspots. Mit \* markierte Peptidmassen korrespondieren mit den theoretisch erwarteten tryptischen Peptidmassen. Mit \* markierte Peptidmassen weisen Carbamidomethylierung auf.

Wie man sieht, weisen einige dieser Massenspektren cysteinhaltige Peptide mit Alkylierungen auf (mit einem roten Stern markiert). Bei genauer Betrachtung der Alkylierungsmuster dieser

Peptide ist festzustellen, dass die Alkylierungsmuster der aus der Verdoppelung der Proteinspots hervorgegangenen Spots sich gleichen. So weist etwa der Spot 1 aus Reihe 1 (mit blauen Pfeilen in Abb. 31 markiert) das gleiche Alkylierungsmuster wie sein „Doppelgänger“ Spot 3 auf. Ebenfalls gleiche Alkylierung zeigen die Spots 2 und 4 aus Reihe 1. Eben dieser Befund findet sich bei den Alkylierungsmustern der Reihe 2 (mit grünen Pfeilen in Abb. 31 markiert), bei der die Spots 1 und 3 sowie die Spots 2 und 4 die gleiche Alkylierung aufweisen.

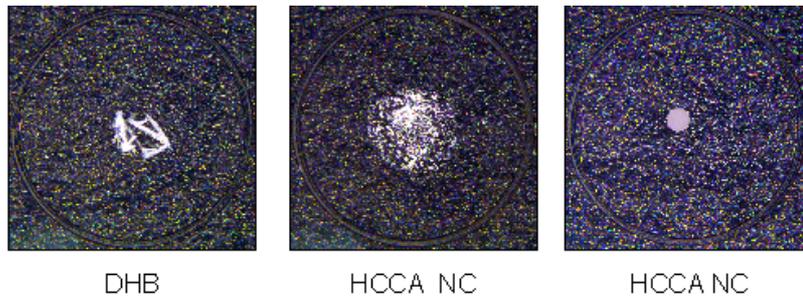
Eine hieraus resultierende Frage lautete: Welche Modifikation wird durch die Reduktion und Alkylierung der Proteinprobe in das 2-DE-Gel eingeführt, die scheinbar nichts mit der Alkylierung der Cysteine zu tun hat? Eine Frage, die leider im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig beantwortet werden konnte. Eine Vermutung ging dahin, dass anhand der Iodacetamidbehandlung eine einzige negative Ladung aus dem Protein entfernt wurde, sodass die beobachtete Positionsveränderung zu einem basischeren pI erfolgte. Da es sich um eine einfache Verdoppelung der Proteinspots handelte, schien es unwahrscheinlich, dass es sich um eine Modifikation einer bestimmten Aminosäure handelt, sondern eher um die Modifikation eines bestimmte, einmaligen Proteinbereichs, wie z. B. des N- oder C-Terminus der Proteine<sup>223</sup>.

#### **3.7.4 Automatisierung der MALDI-Probenpräparation**

Die MALDI-Probenpräparation erfolgte mit Ausnahme einiger wichtiger Modifikationen so, wie sie bei Nordhoff et al. beschrieben wurde<sup>175</sup>. Im Wesentlichen betreffen die Modifikationen die Wahl der MALDI-Matrix ebenso wie das Waschen der Matrix nach der Probenapplikation.

#### **3.7.5 Wahl der MALDI-Matrix unter Automatisierungsaspekten**

Im Abschnitt 3.6.1.1 hatte sich ergeben, dass HCCA NC und DHB diejenigen Matrices sind, welche die besten Massenspektren liefern. Dementsprechend lag es nahe, eine dieser beiden Matrices für die automatisierte Probenpräparation zu verwenden. Da beide Matrices in etwa gleich gut Ergebnisse lieferten, fungierte als Auswahlkriterium ihre Präparierbarkeit und die daraus resultierende Möglichkeit, sie für automatische Messungen einzusetzen. Abbildung 34 zeigt Aufnahmen von Matrixkristallen dreier Matrix-Präparationen von DHB und HCCA NC.



**Abbildung 34:** Vergleich verschiedener Matrixpräparationen. Die Probe DHB und HCCA NC (Mitte) wurden mittels „*dried-droplet*“ präpariert, während die HCCA NC (rechts) mittels „*fast-evaporation*“ präpariert wurde.

Die Aufnahmen 34a und 34b zeigen „*dried-droplet*“-Präparationen von DHB und HCCA NC auf einem *Anchor Chip*-Probenhalter, während die Aufnahme 34c eine „*fast-evaporation*“-Präparation von HCCA NC zeigt. Wie man anhand der Aufnahmen sehen kann, zeigt die DHB-Präparation große, unregelmäßig verteilte Kristalle, die nicht direkt auf dem hydrophilen Probenanker des Probenhalters auskristallisieren. Bei den Matrixkristallen der HCCA NC „*dried-droplet*“-Präparation sind die Kristalle zwar kleiner, verteilen sich jedoch flächig und inhomogen über die Grenzen des 400 µm großen Probenankers hinaus. Die „*fast-evaporation*“-Präparation der HCCA NC-Matrix hingegen zeigt eine ausgesprochen feine und homogene Kristallisation, die sich auf den 400 µm Probenanker beschränkt.

Die Kombination dieser ortsgenauen Kristallisation in Verbindung mit der beschriebenen Dünnschicht-Matrixpräparation und die guten massenspektrometrischen Ergebnisse machen die HCCA NC-Matrix somit zur bevorzugten Matrix für den vollautomatisierten Messbetrieb.

### **3.8 Anwendung der Methoden auf biologische Systeme**

Als Abschluss des Ergebnisteils dieser Arbeit werden im Folgenden Anwendungsbeispiele der entwickelten und evaluierten Techniken dargestellt. Hierbei geht es in erster Linie darum, an bestimmten pflanzlich-biologischen Fragestellungen die Einsatzmöglichkeiten der entwickelten Methoden zu demonstrieren.

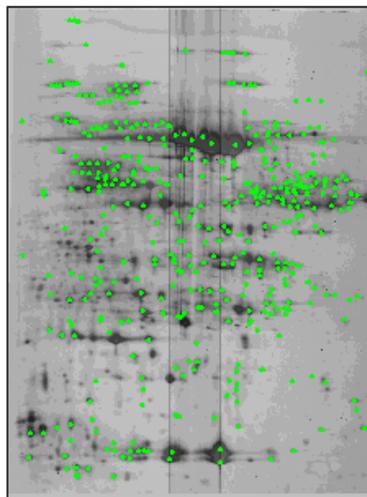
In der ersten Anwendung, die sich mit der Analyse von fraktionierten Blattextrakten beschäftigt, sollen möglichst viele Proteine aus den Fraktion 1- und Fraktion 2-2-DE-Gelen ausgeschnitten und identifiziert werden.

In einem weiteren Beispiel soll eine differentielle Analyse von Pflanzenproteinextrakten dargestellt werden. Dieses Beispiel basiert auf einer klassischen Perturbationsanalyse, d.h. es wurden Proteinextrakte von „normalen“ und von „behandelten“ Pflanzen hergestellt und per 2-DE verglichen. Anschließend wurden die differentiellen Proteinspots ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert. Bei dem verwendeten Beispiel ging es darum, den Einfluss von Trockenstress auf die Zusammensetzung des Phloemsafte zu untersuchen.

Das letzte Beispiel stellt eine Kombination der Hochdurchsatzanalytik in Verbindung mit einer erweiterten Proteinextraktionsmethode dar. Hierbei sollen cytosolische 80S Ribosomen mittels einer Gradientendichte-Zentrifugation aus *Arabidopsis thaliana*-Blattextrakten aufgereinigt und mittels 40 cm-2-DE-Gelen aufgetrennt werden. Aus diesen Gelen sollen dann möglichst viele der getrennten Proteine mittels MALDI-MS analysiert werden.

### 3.8.1 Hochdurchsatzanalytik von fraktionierten *Arabidopsis thaliana*-Blattextrakten

In diesem ersten Anwendungsbeispiel sollte die Verwendung der zuvor beschriebenen Hochdurchsatzmethode zur Analyse von Proteinspots aus 2-DE-Gelen anhand von Fraktion 1- und Fraktion 2-Blattextrakten gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurden 768 Proteinspots aus einem Fraktion 1-2-DE-Gel und 672 Proteinspots aus einem Fraktion 2-2-DE-Gel ausgeschnitten und gemäß dem Protokoll für den automatisierten In-Gel-Verdau präpariert und per MALDI-TOF-MS identifiziert. Die Auswahl der Proteinspots erfolgte zufällig und war über die gesamte Gelfläche verteilt. In Abbildung 35 ist als Beispiel das Fraktion 1-2-DE-Gel, das für die Exzision der Gelspots verwendet wurde, dargestellt.



**Abbildung 35:** 2-DE-Gel eines Blatt-Fraktion 1-Proteinextrakts. Grün markierte Spots konnten mittels MALDI-MS identifiziert werden.

Die identifizierten Proteinspots sind in dieser Abbildung grün markiert. Die Ergebnisse der Identifikation sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Gewebe	Blatt	Blatt
Fraktion	F1	F2
Anzahl ausgestochener Proteinspots	768	672
davon identifiziert	415	266

<b>Erfolgsquote Identifikation</b>	54%	40%
<b>davon unterschiedlich</b>	183	155
<b>Spots pro Datenbankeintrag</b>	2,3	1,7

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifikation aus den Blatt-Fraktion 1- und Fraktion 2-2-DE-Gelen.

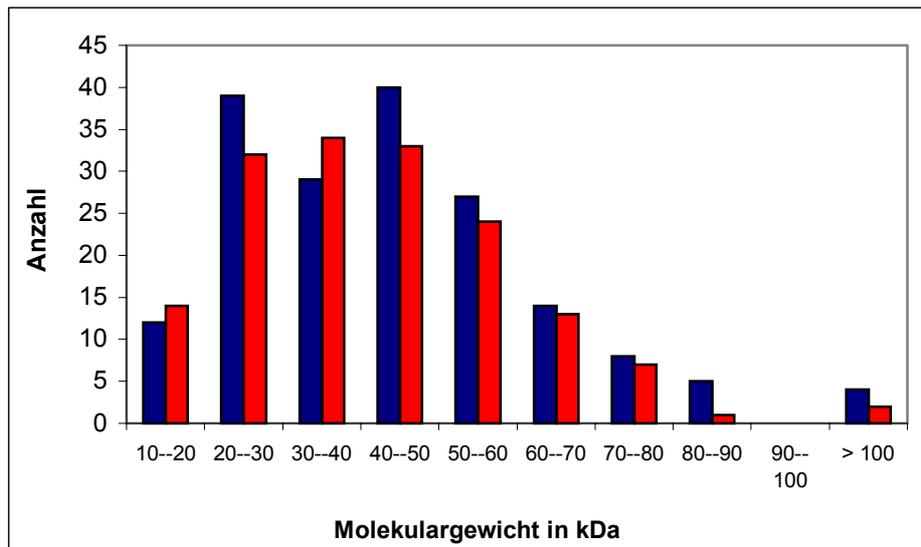
Wie in Tabelle 8 dargestellt, ließen sich von den 768 ausgestanzten Proteinspots aus dem Fraktion 1-Gel 415 Proteinspots identifizieren. Von diesen 415 identifizierten Proteinspots wiesen 183 unterschiedliche Datenbankeinträge auf. Bei den Fraktion 2-Gelen ließen sich von den 672 ausgeschnittenen Proteinspots 266 Proteinspots identifizieren, die 155 unterschiedliche Datenbankeinträge aufwiesen.

Dies bedeutet, dass man bei der Fraktion 1 etwa 2,3 unterschiedliche Proteinspots pro Datenbankeintrag fand, während das Verhältnis bei Fraktion 2 etwa 1,7 Proteinspots pro Datenbankeintrag ausmachte.

Vergleicht man in einem nächsten Schritt die Übereinstimmung der unterschiedlichen Proteine in den beiden Fraktionen, war Folgendes festzustellen: Aus der Summe der unterschiedlichen Proteine beider Fraktionen (338) stimmten 59 Proteine überein. Dies entsprach einer Übereinstimmung von 17,4 %. Dieses Ergebnis bestätigte den Befund aus 3.2, wo beide Fraktionen der Blattextrakte rein visuell verglichen wurden. Dabei stellte sich ebenfalls heraus, dass ca. 20 % der Fraktion 1- und Fraktion 2-Proteinspots positionsidentisch sind und sich somit voraussichtlich als Proteine gleicher Identität klassifizieren lassen.

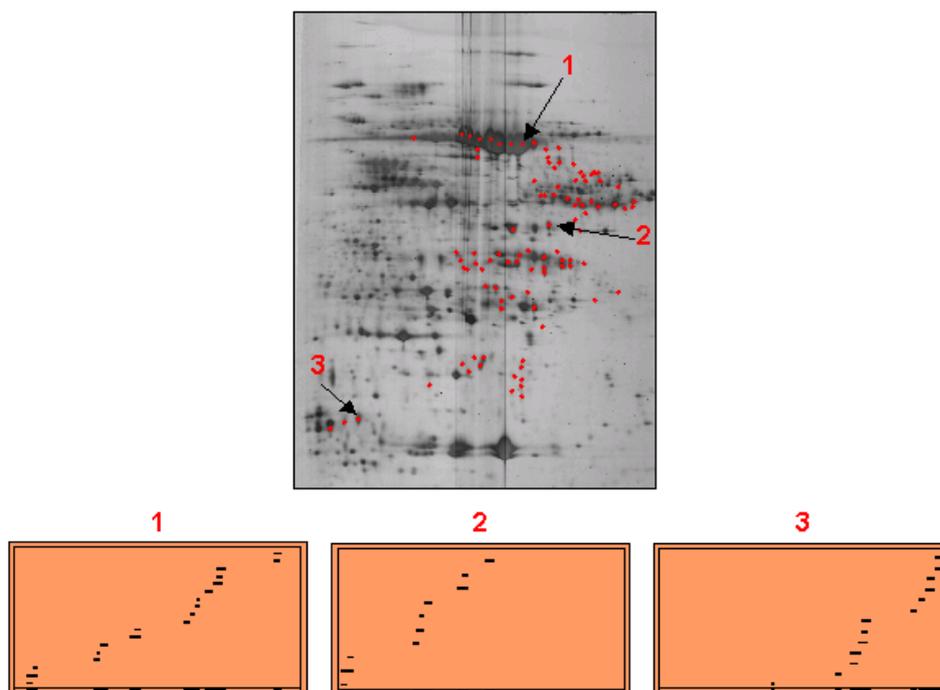
### **3.8.1.1 Auswertung identifizierter Blattproteine**

Das kleinste Protein, das aus Fraktion 1 des Blattproteinextrakts identifiziert werden konnte, ist 13,3 kDa groß. Das größte identifizierte Protein wies hingegen eine Molekülmasse von 117 kDa auf. Die Werte für die Fraktion 2 der Blattextrakte sahen mit 9,4 kDa und 136 kDa recht ähnlich aus. Abbildung 36 zeigt die Molekulargewichtsverteilung der identifizierten Proteine aus den Fraktionen 1 und 2 des Blattgewebes.



**Abbildung 36:** Molekulargewichtsverteilung der identifizierten Proteine aus den Blatt-Fraktion 1- (blau) und Blatt-Fraktion 2- (rot) 2-DE-Gelen.

Fast Dreiviertel der identifizierten Proteine fielen sowohl bei Fraktion 1 als auch bei Fraktion 2 in den Massenbereich zwischen 20 und 60 kDa – ein Befund, der mit dem publizierten Wert der Massenverteilung bei einer extensiven Proteomanalyse mittels 2-DE-Gelen von humanem Gehirn<sup>215</sup> bzw. Rattenleber<sup>224</sup> übereinstimmt. Das am häufigsten identifizierte Protein aus Fraktion 1 war die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/Oxygenase (RubisCO)<sup>225</sup>. Allein 99 Proteinspots konnten diesem Protein zugeschrieben werden. Abbildung 37 zeigt das Fraktion 1-2-DE-Gel des Battextrakts, in dem die als RubisCO-Vorläuferprotein identifizierten Proteinspots als rote Punkte dargestellt sind.



**Abbildung 37:** Verteilung der Proteinspots der großen Untereinheit der RubisCO auf dem Blatt-Fraktion 1-2-DE-Gel. Die 3 nummerierten Diagramme unterhalb des 2-DE-Gels zeigen die lineare Verteilung der

identifizierten Peptide relativ zur Aminosäuresequenz. Hierbei stellt die Grundlinie, angefangen mit dem N-Terminus auf der linken Seite, das linearisierte Protein dar.

Wie sich erkennen lässt, sind diese Spots über einen großen Teil der Gelfläche verteilt. Das RubisCO-Vorläuferprotein hat eine Masse von 53 kDa; es finden sich aber zahlreiche trunkierte, d.h. in ihrem Molekulargewicht reduzierte Proteinspots. Anhand von Peptidkarten der MALDI-Massenspektren wird der fehlende Proteinteil ersichtlich, da aus dem entsprechenden Bereich Peptide bei der Identifikation fehlen. So sind im unteren Teil von Abbildung 37 3 Peptidkarten gezeigt, welche die Sequenzabdeckung massenspektrometrisch detektierter Peptide in Bezug auf die gesamte Proteinsequenz darstellen. Hierbei ist die Grundlinie der Abbildung als lineare Darstellung der Proteinsequenz zu verstehen, während die darüber verteilten Striche Peptide widerspiegeln, die in diesem Proteinbereich gefunden werden. Bei der Peptidkarte mit der Überschrift 1 handelt es sich um eine Karte eines intakten Proteins (Abb. 37 Spot 1), bei dem die Massen der treffenden Peptide über das gesamte Protein verteilt sind. Die anderen beiden Beispiele zeigen jeweils C-Terminal- (Abb. 37 Spot 2) bzw. N-Terminal- (Abb. 37 Spot 3) trunkierte Proteine. Weitere, häufiger in der Ergebnisliste auftretende Proteine sind die Aminomethyltransferase, die aus 9 Spots identifiziert werden konnte und die ebenfalls aus 9 Spots identifizierte ATP Synthase  $\beta$ -Untereinheit.

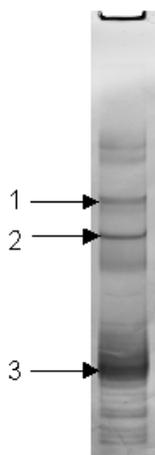
Für die Fraktion 2 war das am häufigsten auftauchende Protein ebenfalls die große Untereinheit der RubisCO. Bei dieser Fraktion war jedoch die Anzahl von unterschiedlichen RubisCO-Proteinspots mit 27 Stück wesentlich geringer. Das zweithäufigste Protein war die kleine Untereinheit der RubisCO mit 10 Identifikationen, während das dritthäufigste Protein ein hypothetisches Protein mit 9 Identifikationen darstellte. Verglich man nun in einem nächsten Schritt die identifizierten Proteine unter dem Aspekt ihrer funktionellen Zugehörigkeit, zeigte sich, dass es sich bei ihnen in erster Linie um Enzyme des zentralen Blattmetabolismus handelte. So fanden sich z. B. fast alle Enzyme aus dem reduktiven und oxydativen Pentosephosphatzyklus. Des weiteren fand man Proteine der Photosynthese, der Aminosäuresynthese und vieler weiterer zentraler Stoffwechselkreisläufe.

### **3.8.1.2 Proteinidentifikation aus Fraktion 3-Blattextrakten**

Obwohl bei eukariotischen Genomen etwa 20–30 % der kodierten Gene mögliche Transmembranproteine darstellen <sup>226,227</sup> bzw. 500–750 unterschiedliche Transmembranproteine in der *Arabidopsis thaliana*-Plasmamembran erwartet werden <sup>228,229</sup>, konnte unter den bislang identifizierten Proteinen der Fraktion 1 und Fraktion 2 kein Transmembranprotein gefunden werden. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein Fraktion

3-Blattextrakt per SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Abbildung 38 zeigt ein solches SDS-PAGE-Gel, während die Ergebnisse der Identifikation der 3 markierten Proteine in Tabelle 9 zusammengefasst sind.



**Abbildung 38:** SDS-PAGE-Gel eines Blatt-Fraktion 3-Proteinextrakts.

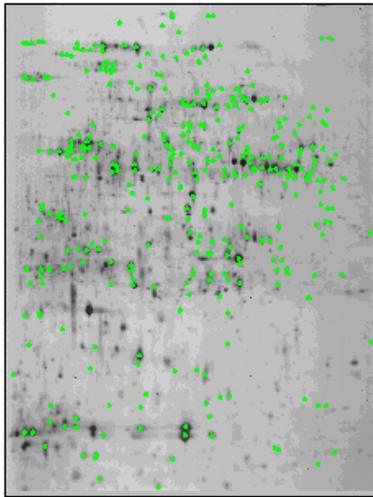
Spot Nr.	Proteinname	Masse	Putative Transmembrandomänen
1	PHOTOSYSTEM II P680 CHLOROPHYLL A APOPROTEIN	56172	3
2	PHOTOSYSTEM II 44 KDA REACTION CENTER PROTEIN	52063	6
3	6 chlorophyll a/b-binding protein CP29	31231	3

**Tabelle 9:** Massenspektrometrisch identifizierte Transmembranproteine aus Blatt Fraktion 3.

Bei der Analyse der identifizierten Proteine traten die 3 aufgeführten Proteine deutlich aufgrund ihres hydrophoben Charakters, der auf Membranproteine hindeutete, hervor. Eine Überprüfung auf mögliche Transmembrandomänen erfolgte hierbei anhand des Vorhersageprogramms Sosui (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>), das anhand der Aminosäuresequenz mögliche Transmembrandomänen erkennen kann. So zeigten 2 der Proteine, wie in Tabelle 9 dargestellt, jeweils 3 mögliche Transmembranbereiche, während das dritte Protein sogar 6 mögliche transmembrangängige Bereiche aufwies. Dieser Befund unterstreicht die gängige These aus der 2-DE-Literatur, dass 2-DE-Gele gerade bei hydrophoben Proteinen eine Unterrepräsentation zeigen, die wahrscheinlich systembedingt mit der IEF zusammenhängt<sup>123</sup>

### 3.8.1.3 Zusammensetzung von Schoten-Fraktion 1 und Blattgewebe-Fraktion 1

Um zu überprüfen, ob die Zusammensetzung der Proteine, die bei Blattgewebe-Fraktion 1 festgestellt wurde, repräsentativ ist, wurde als Referenz eine ähnliche Analyse mit einem Fraktion 1-Extrakt von *Arabidopsis thaliana*-Schoten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde erneut eine repräsentative Anzahl zufällig ausgewählter Proteinspots aus dem 2-DE-Gel ausgeschnitten. Abbildung 39 stellt das verwendete 2-DE-Gel dar. Die Daten der identifizierten Proteine sind in Tabelle 10 zusammengefasst.



**Abbildung 39:** 2-DE-Gel eines Schote-Fraktion 1-Proteinextrakts. Grün markierte Spots konnten mittels MALDI-MS identifiziert werden.

<b>Gewebe</b>	<b>Schote</b>
<b>Fraktion</b>	F1
<b>Anzahl ausgestochener Proteinspots</b>	768
<b>davon identifiziert</b>	352
<b>Erfolgsquote Identifikation</b>	45,8%
<b>davon unterschiedlich</b>	198
<b>Spots pro Datenbankeintrag</b>	1,8

**Tabelle 10:** Zusammenfassung der massenspektrometrischen Ergebnisse aus dem Schote-Fraktion 1-2-DE-Gel.

Wie sich Tabelle 10 entnehmen lässt, konnten von den 768 ausgeschnittenen Proteinspots 352 identifiziert werden. Diese 352 Identifikationen entsprechen 198 unterschiedlichen Proteinen; bei der Auswahl traten also ca. 1,8 Proteinspots pro Protein auf. Hierbei fielen erneut etwa 75 % der identifizierten Proteine in den Massenbereich 20–60 kDa. Bei dem am häufigsten exprimierten Protein zeigte sich ebenfalls die große Untereinheit der RubisCO, die mit 36

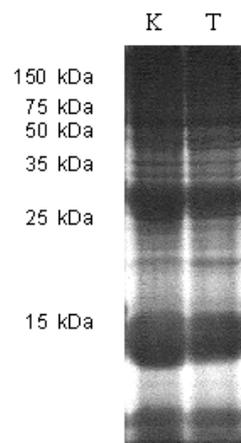
Proteinspots in Fraktion 1 identifiziert werden konnte, als das dominanteste Protein im 2-DE-Muster.

Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Proteine der Fraktion 1 von Schote und Blatt, war dagegen festzustellen, dass 18 % der Proteine beider Gewebe übereinstimmen. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies, dass 68 der 381 differentiellen Proteine aus beiden Geweben identisch sind – ein sehr erfreulicher Befund, da er eine hohe Diversität der in Zukunft zu vergleichenden Gewebe erwarten lässt (Abb. 22).

### 3.8.2 Differentielle 2-DE-Analyse von *Curcubita sativa* Phloemexsudaten

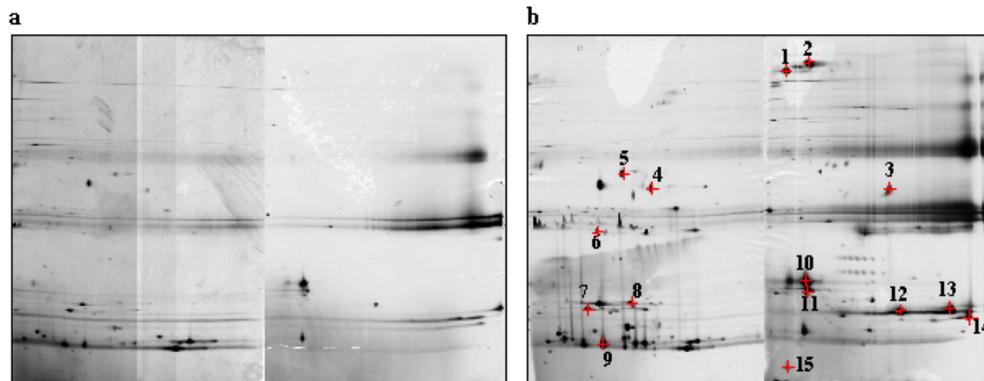
Ziel dieses differentiellen Anwendungsbeispiels war, es die Auswirkung von Trockenstress auf die Proteinzusammensetzung von Phloemexsudaten (Phloemsaft aus den Siebelementen der Leitbündel) <sup>148,230</sup> in Gurkenpflanzen zu zeigen. Die Inhaltsstoffe der Exsudate sind in erster Linie Kohlenhydrate, Nukleinsäuren und Proteine <sup>231</sup>. Diese werden in einer sehr viskosen Flüssigkeit von den photosynthetisch aktiven Organen (Erzeugerorganen) wie z. B. Blättern zu den photosynthetisch inaktiven Organen (Nutzerorganen) wie z. B. Wurzeln transportiert. Die Proteinkonzentration im Phloemexsudat von Curcubitaceen beträgt etwa 10–60 mg/ml <sup>147</sup>. Neben den bereits erwähnten Inhaltsstoffen werden auch Vitamine und Phytohormone über das Leitungssystem transportiert. Denkbar ist also, dass Letzteres nicht nur als Nährstoff-, sondern auch als Informationsleitungssystem fungiert.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Phloemexsudate von Gurkenpflanzen, die eine Woche unter Wassermangel litten, mit den Exsudaten von Kontrollpflanzen verglichen. In einem ersten Experiment wurden die beiden unterschiedlichen Phloemexsudate mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und gefärbt. Die hieraus resultierenden Muster sind in Abbildung 40 dargestellt.



**Abbildung 40:** SDS-PAGE-Gel von Phloemexsudaten aus Gurkenpflanzen. K entstammt der Kontrollpflanze, während T aus der trocken-gestressten Pflanze extrahiert wurde.

Unübersehbar ist, dass sich ein Unterschied zwischen den beiden Proben nicht erkennen lässt. Daher wurden in einem folgende Schritt die beiden Phloemexsudate mittels hochauflösender 2-DE-Gele aufgetrennt und Silber gefärbt. Abbildung 41 zeigt die resultierenden Gelbilder.



**Abbildung 41:** (a) 2-DE-Kontrollgel, (b) 2-DE-Gel aus Phloemexsudat einer trockengestressten Gurkenpflanze. Mit Nummern markierte Proteinspots konnten massenspektrometrisch identifiziert werden.

Abbildung 41 zeigt nunmehr, dass diese beiden Zustände deutliche Unterschiede aufweisen. So ist eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine in den Gelen der trockengestressten Pflanzen zu erkennen, die zuvor gar nicht oder nur schwach exprimiert waren. Diese differentiellen Proteinspots, die in dem 2-DE-Gel der trockengestressten Gurkenpflanze mit einem Kreuz markiert sind, wurden in einem abschließenden Schritt ausgeschnitten und mittels massenspektrometrischer Methoden identifiziert (Arbeit von C. Walz am MPI für Pflanzenphysiologie mittels eines Q-TOF Massenspektrometers durchgeführt).

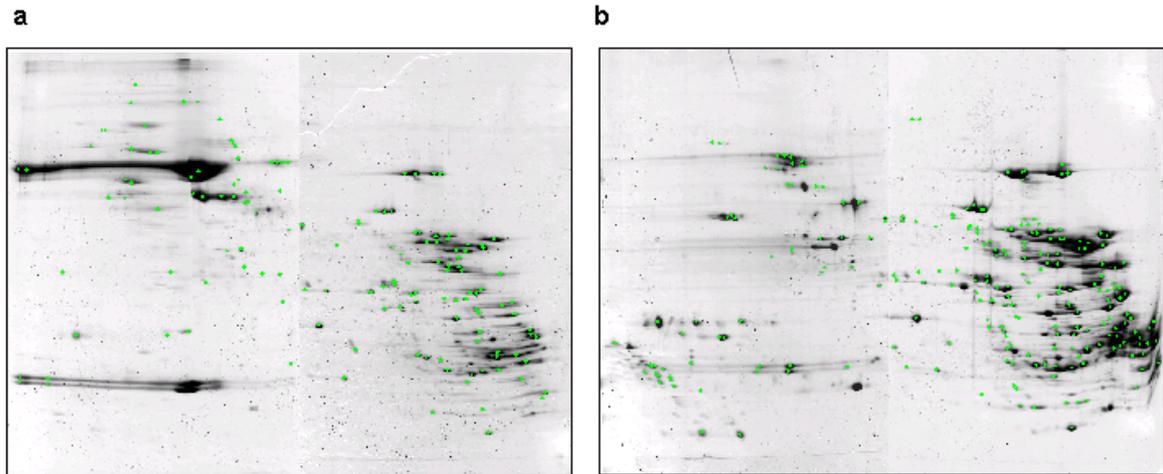
Tabelle 11 fasst die Resultate der Identifikationen der mit Kreuzen und Nummern markierten Proteinspots zusammen.

Spot Nr.	Proteinidentität
1	Lektin
2	Lektin
3	Lektin
4	Cystatin
5	Cystatin
6	Monodehydroascorbate Reductase
7	Cystatin
8	Superoxyddismutase
9	Cystatin
10	CSF 2
11	SN 1
12	Cystatin
13	Cystatin
14	Cystatin
15	Ubiquitin

**Tabelle 11:** Hochregulierte Proteine aus trockengestressten Phloemexsudaten von Gurke.

### 3.8.3 Extraktion und Analyse von *Arabidopsis thaliana*-80S Ribosomen

Nachdem bislang gezeigt werden konnte, dass das verwendete 2-DE-Trennsystem in Verbindung mit der Proteinextraktion, Proteinfärbung und der folgenden massenspektrometrischen Charakterisierung gute – wenn auch sehr auf den zentralen Pflanzenmetabolismus beschränkte – Resultate zeigte, galt es in einer abschließenden Anwendung, die Analyse zu vertiefen. Das folgende Beispiel veranschaulicht, dass sich durch eine Vorfraktionierung von Organellen oder Komplexen eine gute Anreicherung spezifischer Proteine erreichen lässt. Diese Anreicherung kann schließlich zur Identifikation von Proteinen führen, die sich in Gesamtzellextrakten nur sporadisch oder gar nicht finden lassen. Das Experiment, das in Zusammenarbeit mit Daniel Wilson und Paola Fuccini vom Max Plank Institut für molekulare Genetik durchgeführt wurde, basiert auf einer Vorfraktionierung von 80S Ribosomen aus dem Cytosol von *Arabidopsis thaliana*-Blättern (vgl. 2.2.4). Hierbei wurden 2 unterschiedlich aufgereinigte Extrakte der 80S Ribosomen mittels Gradientendichtezentrifugation isoliert und anhand hochauflösender 2-DE-Gele aufgetrennt. Abbildung 42 stellt die 2-DE-Gele dieser beiden Extrakte dar.



**Abbildung 42:** 2-DE-Gele mit weniger intensiv aufgereinigtem 80S ribosomalem Proteinextrakt (a) und (b) mit intensiver aufgereinigtem 80S ribosomalem Proteinextrakt. Grün markierte Spots konnten mittels MALDI-MS identifiziert werden.

Wie der Vergleich beider Muster zeigt, weisen die basischen Seiten der 2-DE-Gele grundsätzlich große Ähnlichkeit auf. So lässt sich beispielsweise eine große Anhäufung basischer Proteinspots, die für ribosomalen Proteine typisch sind <sup>131,132,232</sup>, auf beiden Gelen feststellen. Das Verteilungsmuster dieser basischen Proteine ist ebenfalls sehr ähnlich. Ein großer Unterschied ist jedoch in der Menge der jeweiligen Proteine festzustellen: So sind die Proteinspots auf dem E2 2-DE-Gel wesentlich intensiver und größer. Betrachtet man im Gegensatz dazu die sauren Seiten der 2 2-DE-Gele, so ist hier die Ähnlichkeit geringer. Darüber hinaus lässt sich im Bereich von etwa 50 kDa auf dem E1-Gel (weniger intensiv aufgereinigt) ein dominierender Proteinspot erkennen. Des Weiteren findet man im selben Gel einen ebenfalls sehr intensiven Proteindoppelspot im Bereich von ca. 20 kDa. Im intensiver aufgereinigten Extrakt 2 (E2) sind an dieser Stelle zwar auch Proteinspots, jedoch wesentlich geringer ausgeprägt. Die massenspektrometrische Analyse dieser Proteinspots zeigt, dass es sich hierbei um die große und kleine Untereinheit der RubisCO handelt, die offensichtlich in weiten Teilen bei der erweiterten Aufreinigung bei E2 entfernt werden konnte. In Tabelle 12 sind weitere Ergebnisse der Identifikation zusammengefasst.

<b>Proteinextrakt</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
<b>Anzahl identifizierter Proteinspots</b>	142	224
<b>davon 80S ribosomal</b>	69	162
<b>davon nichtribosomal</b>	60	36
<b>Anzahl unterschiedlicher 80S ribosomaler Proteine</b>	38	54
<b>Anzahl unterschiedlicher nichtribosomaler Proteine</b>	42	19

**Tabelle 12:** Zusammenfassung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifikation aus den 80S ribosomalen 2-DE-Gelen.

Wie man der Tabelle 12 entnehmen kann, zeigt die Präparation E1, neben der starken Präsenz an RubisCO, einen größeren Anteil an nichtribosomalen 80S Proteinen als Präparation E2. So sind etwa 42 % der identifizierten Proteine aus E1 nichtribosomal, während der Anteil in Präparation E2 nur 24 % beträgt. Ein Vergleich dieser nichtribosomalen Proteine beider Präparationen förderte einen weiteren interessanten Befund zutage: So stimmen unter den identifizierten nichtribosomalen Proteinen aus beiden Extrakten nur 6 überein, sodass man 13 zusätzliche nichtribosomale Proteine in der Extraktion E2 findet. Vergleicht man dann diese nichtribosomalen Proteine beider Fraktionen mit den unterschiedlichen Proteinen aus Fraktion 1 und Fraktion 2 der Gesamtextraktion aus Blättern, so kann für 23 der 42 unterschiedlichen nichtribosomalen Proteine aus E1 eine Übereinstimmung gefunden werden, während die 19 unterschiedlichen nichtribosomalen Proteine aus E2 8 Übereinstimmung in den Extrakten F1 und F2 aus dem Blatt zeigen. Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass sich insgesamt 82 ribosomale 80S Proteine aus E 1 identifizieren lassen, von denen 38 unterschiedliche ribosomale Proteine darstellen. Im Vergleich dazu findet man unter den 162 identifizierten ribosomalen Proteinen aus E2 54 unterschiedliche Proteine. Diese Steigerung der Ausbeute an ribosomalen 80S Proteinen in Verbindung mit der Verminderung des Anteils unspezifischer nichtribosomaler 80S Proteine zeigt also: Durch die zusätzlich durchgeführte Aufreinigung von E2 werden zum einen Kontaminationen oder lose assoziierte Proteine entfernt. Zum anderen findet eine starke Anreicherung ribosomaler und spezifischer nichtribosomaler Proteine weit über dem Auflösungsvermögen von Gesamtextrakten statt.