

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Techniken ebenso wie Methoden evaluiert und entwickelt, die basierend auf der Verwendung von zweidimensionaler Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS Proteomanalysen von pflanzlichen Geweben ermöglichen.

Hierbei wurden zunächst optimierte Methoden für die Proteinextraktion, Proteintrennung und die Proteinfärbung für die 2-DE erarbeitet. So konnte z. B. eine neue fraktionierte Gesamtproteinextraktionsmethode für Pflanzengewebe entwickelt werden, die eine bis zu 300 % verbesserte Ausbeute an Proteinspots auf 2-DE-Gelen im Vergleich zu Standardextraktionsmethoden zulässt. Diese optimierten Methoden wurden in einem weiterführenden Schritt für die Herstellung von 2-DE-Standardmustern aus 8 unterschiedlichen *Arabidopsis thaliana*-Geweben eingesetzt.

Neben der Methodenentwicklung im 2-DE-Bereich wurden im Bereich der MALDI-Probenpräparation und der MALDI-Analyse stabile und automatisierte Protokolle für die Identifikation von 2-DE-Gel-getrennten Proteinen etabliert. Diese Protokolle ermöglichen es, mehr als 1000 Proteinspots pro Tag massenspektrometrisch zu analysieren.

Um die reelle Anwendbarkeit und Tauglichkeit der entwickelten Methoden zu dokumentieren, wurden anhand dreier charakteristischer pflanzenspezifischer Fragestellungen Beispielerperimente durchgeführt. So ließen sich in einem ersten Ansatz 681 Proteinspots aus 2 unterschiedlichen *Arabidopsis thaliana*-Blattproteinextrakten und 352 Proteinspots aus einem *Arabidopsis thaliana*-Schotenproteinextrakt identifizieren. Die hierbei identifizierten Proteine, die aus nur 3 2-DE-Gelen stammten, übersteigen in ihrer Summe bereits alle bis dato publizierten Daten im Bereich der *Arabidopsis thaliana*-2-DE-basierten Proteomforschung.

In einem zweiten Anwendungsexperiment wurden differentiell regulierte Phloemproteine aus trockengestressten Gurkenpflanzen in 2-DE-Gelen dargestellt und identifiziert. Hierbei zeigte sich, dass diese Art der differentiellen Analyse komplexerer Proteinmischungen das Auflösungsvermögen von herkömmlichen eindimensionalen Trennsystemen übersteigt und somit fast ausschließlich mittels zweidimensionalen Trennsystemen durchgeführt werden sollte.

In einem letzten Anwendungsbeispiel, dessen Fokus auf der Analyse des cytosolischen 80S Ribosoms aus *Arabidopsis thaliana*-Blättern lag, konnte durch die Kombination einer Gewebsvorfraktionierung und der 2-DE ein Großteil (70 %) der bekannten Komponenten des cytosolischen Ribosoms bestimmt werden. Insgesamt ließen sich hierbei 224 Proteinspots aus einem einzigen 2-DE-Gel identifizieren.