

**Neue Strategien zur massenspektrometrischen und
gelelektrophoretischen Identifizierung von
Membranproteinkomplexen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Isam Rais

aus Gehrden

Frankfurt am Main (2005)

(DF1)²

² (DF 1: D = Dissertation / F1 = Bibliothekskennzeichen)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Professor Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Herr Professor Dr. Michael Karas
Herr Professor Dr. Hermann Schägger

Datum der Disputation: 10.08.2005

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Problemstellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Die Rolle der Massenspektrometrie in der modernen Bioanalytik	2
2.1.1	Grundlagen der Massenspektrometrie	2
2.1.2	Ionisierungstechniken	3
2.1.2.1	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - MALDI	3
2.1.2.2	Elektrospray Ionisation - ESI	6
2.1.3	Massenanalytoren	9
2.1.3.1	Time of Flight - Flugzeitmassenanalysator	9
2.1.3.2	Tandem-Massenspektrometer	12
2.1.4	Sequenzanalyse von Peptiden	13
2.1.4.1	Collision Induced Dissociation (CID)	13
2.1.4.2	Post Source Decay (PSD)	15
2.2	Proteomics	17
2.2.1	Strategien zur Analytik von komplexen Proteomen	19
2.2.2	Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie	23
2.2.2.1	Peptide Mass Fingerprint	23
2.2.2.2	Proteinidentifizierung mittels MS/MS Experimenten	25
2.2.2.3	ShotGun Proteomics und LC-MS/MS	26
2.2.2.4	Quantifizierung von Proteinen	28
2.3	Membranproteine und Membranproteinkomplexe	29
2.3.1	Mitochondriale Atmungskette	34
2.4	Membrane Proteomics	38
2.4.1	Gelelektrophoretische Techniken	38
2.4.2	Massenspektrometrische Analytik von Membranproteinen	43
2.4.3	Massenspektrometrische Bestimmung von intakten Membranproteinen	45
3	Zielsetzung	46
4	Material und Methoden	48
4.1	Chemikalien	48
4.1.1	Enzyme für die proteolytischen Verdaus	48
4.1.2	Matrizes für die Massenspektrometrie	48

4.1.3	Peptid- und Proteinstandards.....	48
4.2	Gelelektrophorese.....	49
4.2.1	Blau-Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	49
4.2.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
4.2.3	dSDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (dSDS-PAGE).....	49
4.2.4	Elution von Proteinkomplexen aus dem BN-Gel.....	50
4.3	Färbeprotokolle	50
4.3.1	Coomassie-Blau Färbung	50
4.3.2	Silberfärbung.....	50
4.4	Verdau und Extraktion.....	52
4.4.1	Protokoll für den enzymatischen Verdau	52
4.4.2	Sonstige Lösungen und Puffer	52
4.5	Massenspektrometrie	53
4.5.1	Aufreinigung per ZipTip	53
4.5.2	Präparationstechniken	53
4.5.3	Massenspektrometer	53
4.5.4	BN-MALDI-MS/MS und LC-ESI-MS/MS	54
4.6	Bioinformatik.....	55
4.6.1	Datenbankrecherche und MOWSE-Score.....	55
4.6.2	Gravy-Score	55
4.6.3	Transmembrane Helices (TMH)	56
5	Ergebnisse	57
5.1	doppel SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (dSDS-PAGE)	57
5.1.1	Prinzipien der dSDS-PAGE	57
5.1.2	dSDS - Standard Mode.....	61
5.1.2.1	1D mit Harnstoff	61
5.1.2.2	1D ohne Harnstoff.....	66
5.1.3	Umkehr Versionen der dSDS-PAGE	69
5.1.3.1	16% Tricin → 10% Tricin.....	69
5.1.3.2	1D Laemmli → 10 % Tricin.....	71
5.2	Proteomics von integralen Membranproteinen.....	73
5.2.1	Identifizierung von hydrophoben Membranproteinen und Peptiden	73
5.2.2	Untersuchungen zur Erhöhung der Verdauereffektivität	78
5.2.2.1	Verdau mit Trypsin	85

5.2.2.2	Verdau mit Chymotrypsin.....	87
5.2.2.3	Sequentieller Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin	92
5.2.2.4	Parallel-Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin.....	93
5.2.3	Einfluß der Gelkonzentration auf die Identifizierung von Membranproteinen	96
5.3	BN-MALDI-MS/MS von Komplex I, III, IV und V.....	98
5.3.1	Komplex I.....	99
5.3.2	Komplex III.....	103
5.3.3	Komplex IV.....	106
5.3.4	Komplex V.....	111
5.4	LC-ESI-MS/MS von Komplex I, III, IV und V.....	114
6	Diskussion.....	116
6.1	dSDS-PAGE zur Analyse von Membranproteinkomplexen.....	116
6.1.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von Membranproteinkomplexen	116
6.1.2	Massenspektrometrische Auswertung der dSDS-Gele	121
6.2	Proteomics von integralen Membranproteinen.....	128
6.2.1	Einfluß der Gelkonzentration auf die Identifizierung	135
6.3	BN-MALDI-MS/MS und BN-LC-ESI-MS/MS	136
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	141
8	Anhang.....	144
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	144
8.2	Referenzen zu den untersuchten Proteinen	146
8.3	Referenztabellen zu den identifizierten Untereinheiten	149
9	Literaturverzeichnis.....	161
	Publikationen.....	177
	Posterpräsentationen und Vorträge.....	178
	Lebenslauf.....	179
	Danksagung.....	181

1 Problemstellung

Das bioanalytische Arbeiten mit integralen Membranproteinen ist aufgrund der hohen Hydrophobizität dieser Proteine stark eingeschränkt. Allgemein anwendbare Arbeitsvorschriften für die Analyse mittels Gelelektrophorese und Massenspektrometrie lassen sich für diese besonderen Proteine bislang nicht angeben. Infolge ihrer Schwerlöslichkeit in typischen wäßrigen Lösungsmittelsystemen erfordert die Isolierung von integralen Membranproteinen stets den Einsatz von Detergentien und häufig eine individuelle Anpassung der Solubilisierungsprotokolle. Hydrophobe Membranproteine mit einer hohen Anzahl an Transmembran-Helices und somit einem hohen Gravy-Score können unter den Bedingungen der für die Proteomanalyse eingesetzten zweidimensionalen IEF/SDS-Gelelektrophorese häufig nicht aufgetrennt werden. Ihre hohe Aggregationsneigung und die Inkompatibilität zu den Lösungsmittelsystemen der isoelektrischen Fokussierung sind unter anderem der Grund, weshalb Membranproteine bei der Gesamtstatistik von Proteomanalysen häufig unterrepräsentiert sind. Neben den Limitierungen bei der gelelektrophoretischen Auftrennung stellen Membranproteine auch für die massenspektrometrische Analyse und Identifizierung eine besondere Herausforderung dar. Hohe Sequenzabdeckungen und damit eindeutige Datenbankidentifizierungen, wie sie nach einem enzymatischen Verdau von wasserlöslichen Proteinen häufig erreichbar sind, werden bei Membranproteinen in der Regel nicht beobachtet. Insbesondere integrale Membranproteine mit einem hohen Anteil an Transmembran-Helices haben häufig nur wenige Schnittstellen für die routinemäßig eingesetzte Protease Trypsin; dies führt zu wenigen und großen Peptiden, die darüber hinaus in den verwendeten Lösungsmittelsystemen schwerlöslich sind. Verstärkt wirkt sich dieses Problem bei kleinen Membranproteinen aus. Oftmals erlaubt nur der Einsatz von Fragmentierungstechniken der Massenspektrometrie die Identifizierung eines solchen Proteins anhand eines oder zweier Peptide.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, durch die Entwicklung und Etablierung von neuen Protokollen und Methoden eine verbesserte gelelektrophoretische Trennung und massenspektrometrische Identifizierung dieser besonderen Proteine zu erreichen.

2 Einleitung

2.1 Die Rolle der Massenspektrometrie in der modernen Bioanalytik

2.1.1 Grundlagen der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten zu einer Schlüsseltechnik in der modernen Biowissenschaft entwickelt. Sie ist heute ein zuverlässiges, hochgenaues und hochempfindliches Verfahren zur Bestimmung molekularer Massen von Biomolekülen. Im Rahmen der LifeScience-Forschung tragen die neuen Möglichkeiten der Massenspektrometrie heute maßgeblich dazu bei, Proteine, Peptide oder Nukleinsäuren zu untersuchen und deren biochemischen Funktionen besser zu verstehen. Das Anwendungsspektrum dieser Technik ist breit gefächert: Neben der Bestimmung des Molekulargewichtes ist es mit Hilfe der Massenspektrometrie auch möglich, Strukturinformationen von Peptiden oder Proteinen zu ermitteln und so gleichzeitig Aminosäuresequenz und eventuelle posttranslationale Modifikationen zu bestimmen. Disulfidbrückenbindungen, Phosphorylierungen oder Glykosilierungen können dank der Massenspektrometrie routinemäßig detektiert werden. Darüber hinaus erlaubt die Methode eine Quantifizierung der untersuchten Analyten.

Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Analyse freier Ionen im Hochvakuum. Dazu werden die Probenmoleküle in einer Ionenquelle ionisiert und in einem Massenanalysator nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis aufgetrennt. Der Detektor verstärkt und registriert Ionen und liefert ein elektrisches Signal, das in Form eines Massenspektrums graphisch dargestellt wird. Neben der Entwicklung von neuen Ionisationsverfahren sind im Laufe der Jahre eine Vielzahl von verschiedenen Gerätetypen konstruiert worden, mit denen sich unterschiedlichste analytische Fragestellungen bearbeiten lassen. Prinzipiell sind Massenspektrometer jedoch aus 3 Komponenten aufgebaut: (1.) einer Ionenquelle, die die Probenmoleküle in einfach oder mehrfach geladene Ionen überführt mit entweder positiver oder negativer Polarität, (2.) einer Massenanalytoreinheit zur Massenbestimmung, Selektierung und Fragmentierung der Ionen sowie (3.) einem Ionendetektor, der die ankommenden Ionen verstärkt (Abb. 2.1).

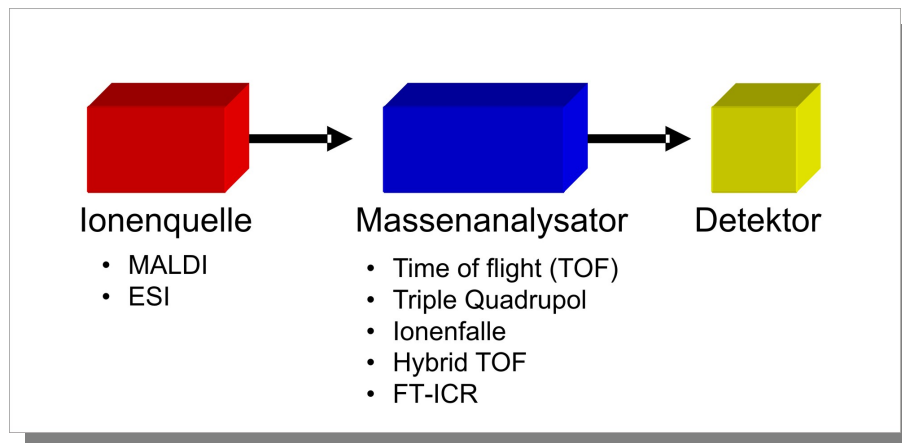


Abb. 2.1 Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers Die drei zentralen Elemente sind die Ionenquelle, der Massenanalysator und der Detektor.

2.1.2 Ionisierungstechniken

Der entscheidende Schritt bei der massenspektrometrischen Analyse von hochmolekularen Verbindungen wie Proteinen oder Peptiden ist die schonende Überführung des Analyten in die Gasphase ohne Degradation oder Fragmentierung. Ionisierungstechniken wie Elektronenstoßionisation (EI) oder chemische Ionisation (CI) bedingen eine starke thermische Belastung der Probenmoleküle. Infolgedessen kommt es bei ihrer Überführung ins Vakuum häufig zu Zersetzungsprozessen. Die Anwendung dieser Ionisationsverfahren bleibt daher vor allem auf kleine, organische Verbindungen beschränkt. Mit der Entwicklung schonender Ionisationsverfahren wie der **Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)** durch Karas und Hillenkamp (Karas *et al.* (1985), Karas *et al.* (1987), Karas *et al.* (1988)) oder der Entdeckung der **Elektrospray Ionisation (ESI)** durch Fenn und Mitarbeiter (Fenn *et al.* (1989)) wurde es erstmals möglich, Proteine intakt aus der kondensierten oder flüssigen Phase ins Vakuum eines Massenspektrometers zu überführen. Die beiden Techniken eröffnen die Analyse von Substanzen in einen Massenbereich von über 100 kDa bei einem Probenbedarf, der einen Nachweis noch im pico- bis femtomol Bereich erlaubt.

2.1.2.1 Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - MALDI

Bei der MALDI-Präparation wird der Analyt mit einem 1000 bis 10000fachen Überschuss einer niedermolekularen organischen Verbindung, der sogenannten Matrix auf einem MALDI-Probenteller co-kristallisiert. Dazu wird der in einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch gelöste Analyt mit der Matrixlösung vermischt und auf den Probenteller aufgetragen. Durch Verdunsten des Lösungsmittels kommt es zu einem

Auskristallisieren der Matrix, in dessen Verlauf die Analytmoleküle in die Matrixkristalle inkorporiert werden. Eine saubere Kristallisation der Matrix zusammen mit den Analyten bildet eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche MALDI-Analyse. Die feste MALDI-Präparation wird nach Einbringen in die Ionenquelle des Massenspektrometers im Hochvakuum mit kurzen Pulsen (3ns) eines UV- oder IR-Lasers (in der Regel Stickstoff-Laser mit einer Wellenlänge von 337nm) bestrahlt. Neben dem Stickstoff-Laser kommen auch ND-YAG Laser zum Einsatz, die bei einer Wellenlänge von 355nm eingesetzt werden. Das Prinzip der MALDI-Ionisation basiert auf der Absorption von Laserenergie durch die Matrix und einer dadurch ausgelösten explosiven Ablation einer dünnen oberflächenschicht, in deren Verlauf neben Matrixmolekülen auch ionisierte Analytmoleküle freigesetzt und in die Gasphase überführt werden (Abb. 2.2).

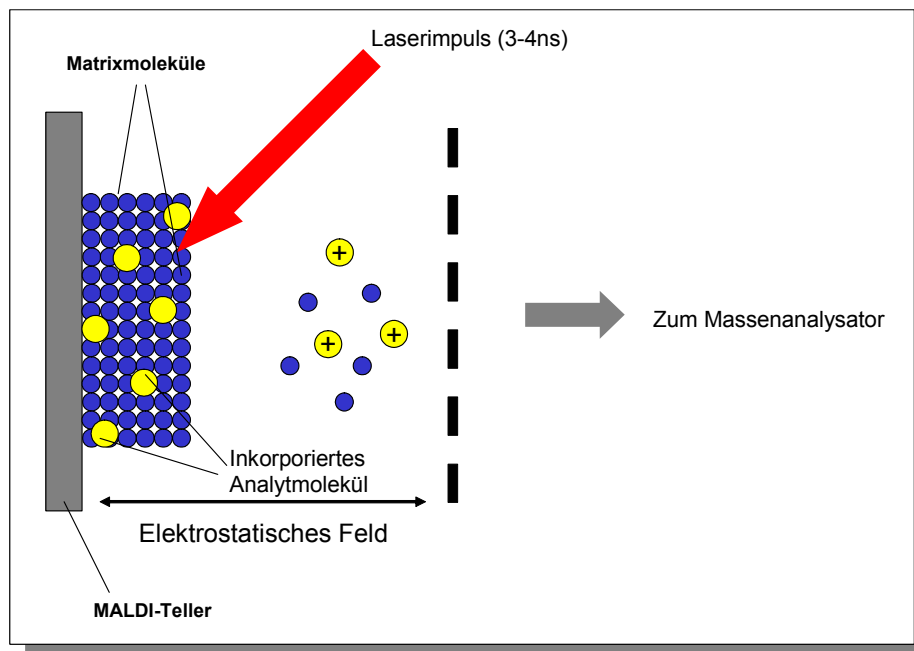


Abb. 2.2 Schematische Ansicht des MALDI-Prozesses

Die geringe thermischen Belastung des Analyten während dieses Prozesses ermöglicht eine fragmentierungsarme Ionisation, bei der für Peptide und Proteine mehrheitlich einfach geladene Analytionen vom Typ $[M+H]^+$ entstehen (Karas *et al.* (2000)). Nach ihrer Freisetzung werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und im angeschlossenen Massenanalysator nach ihrem Masse-Ladungsquotienten aufgetrennt. Die zentrale Rolle des MALDI-Prozesses nimmt die Matrix ein. Während des Ionisationsprozesses sorgt sie für die (1.) Absorption der Laserenergie und Einleitung des Desorptionsprozesses, (2.) Isolation der Analytmoleküle zur Reduzierung der

intermolekularen Wechselwirkungen und (3.) Ionisation der Analytmoleküle. Der genaue Prozeß der Ionenbildung, bei dem es durch Photoionisation und Protonentransfer zu einer Ionisierung des Analyten kommt, ist noch nicht vollständig geklärt und zur Zeit noch Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. In Abhängigkeit von der Natur des Analyten sind für die MALDI-Präparation empirisch verschiedene Matrizes eingeführt worden (Tabelle 2.1). Gemeinsames strukturelles Merkmal aller Matrizes ist ein typischerweise mit Hydroxyl- und Carboxylgruppen funktionalisiertes aromatisches Ringsystem, welches für die Absorption der Laserenergie verantwortlich ist.

Tabelle 2.1 Übersicht der gängigsten MALDI-Matrizes für die Untersuchung von Biomolekülen

Abkürzung	Vollständiger Name	Anwendung	Literatur
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure	Proteinverdaus, Proteine, Glykoproteine und Peptide	Beavis <i>et al.</i> (1992)
Sinapinsäure	4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtsäure	Große Polypeptide & Proteine (>10kDa)	Beavis <i>et al.</i> (1989)
HCCA	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure	Peptidanalyse & Proteinverdaus (<10kDa)	Strupat <i>et al.</i> (1991)
THAP	2, 4, 6-Trihydroxyacetophenon	Oligonukelotide (<3kDa)	Pieles <i>et al.</i> (1993)
HPA	3-Hydroxypicolinsäure	Oligonukleotide (>3kDa)	Taranenko <i>et al.</i> (1994)

Während HCCA überwiegend bei der Analyse von Peptiden eingesetzt wird, findet Sinapinsäure Anwendung bei großen Molekülen und intakten Proteinen. DHB erweist sich sowohl für Peptide als auch Proteine und Glykoproteine als anwendbar, bildet allerdings vergleichsweise inhomogene Kristalle aus, wodurch die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Messungen vermindert wird. Einen Überblick über die Verwendung der einzelnen Matrizes und den verschiedenen Präparationstechniken geben Glückmann *et al.* (1999). Als Nachteil erweist sich bei der MALDI-Technik unter Umständen die Wechselwirkung des Analyten mit Matrixmolekülen während des Desorptionsprozesses. Anlagerungen von Matrixmolekülen an die Analyten können vor allem im hohen Massenbereich zu einer Verbreiterung der Signale und Verminderung der Auflösung führen. Im niedrigen Massenbereich (<500Da) stören Matrixsignale die Detektion niedermolekularer Verbindungen.

Die MALDI-Technik hat sich zu einer Schlüsseltechnik für die Identifizierung von Proteinen im Rahmen der *Proteomics*-Forschung entwickelt (2.2.2). Neben der schnellen und einfachen Probenpräparation zeichnet sich die MALDI-Technik vor allem durch eine hohe Sensitivität und eine vergleichsweise hohe Toleranz gegenüber organischen und anorganischen Kontaminationen wie Puffern (bis zu 200mM) oder Detergentien aus. Da sich

Probenpräparation und Probenmessung problemlos automatisieren lassen, findet MALDI bei der Durchführung von Hochdurchsatzanalysen breite Anwendung. Eingeschränkt ist die Möglichkeit, MALDI „online“ mit chromatographischen Systemen zu verbinden. Technische Lösungen ermöglichen es jedoch mittlerweile, HPLC-Fraktionen tropfenweise mit Matrixlösung zu vermischen und auf einen MALDI-Probenteller aufzutragen. Die chromatographisch getrennten Peptidfraktionen lassen sich anschließend in MALDI-Massenspektrometern vollautomatisch analysieren, mit dem entscheidenden Vorteil, daß die massenspektrometrische Analyse nicht an den zeitlichen Ablauf der chromatographischen Trennung gebunden ist.

Bei der technischen Umsetzung wird die MALDI-Technik häufig mit Flugzeit (TOF)-Massenanalytoren gekoppelt. Der gepulste Laserstrahl sorgt entsprechend seiner Frequenz für die Entstehung diskreter Ionenpakete, welche sich leicht mit Hilfe des Flugzeitanalysators auftrennen lassen. Sobald die nach der Flugzeit aufgetrennten Ionenpakete am Detektor registriert wurden, kann der nächste der Laserschuss erfolgen und ein weiteres Ionenpaket wird generiert und beschleunigt. Durch die Nutzung der Technik der verzögerten Extraktion (siehe unten) eignet sich die MALDI-TOF Technik ideal für die Messung exakter Massen von Peptiden oder Proteinen, wobei der axiale TOF-Massenanalysator dafür am häufigsten Verwendung findet. Darüber hinaus sind Analysatorsysteme zur Sequenzanalyse von Peptiden mittels MALDI entwickelt worden, wie z.B. der TOF-TOF oder Q-TOF-Analysator. Da bei der Elektrospray-Ionisation ein kontinuierlicher Ionenstrom erzeugt wird, ist diese Technik im Gegensatz zur MALDI-Technik nicht mit einem axialen Flugzeitdetektor zu koppeln (Kombinationen sind hier in Form von orthogonalen Flugzeitmassenspektrometern realisiert worden).

2.1.2.2 *Elektrospray Ionisation - ESI*

Bei der Elektrospray-Ionisation wird das Phänomen der Dispersion einer Lösung in einem elektrischen Feld analytisch genutzt. Der in einem Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel (i. d. R. Methanol oder Acetonitril) unter Zusatz von Säure gelöste Analyt wird über eine HPLC- oder Spritzenpumpe mit einem kontinuierlichen Fluß (Standard-Flußrate ca. 5 µl/min) unter Atmosphärendruck aus einer dünnen Kapillare versprüht. Zwischen der Kapillare und einer gegenüberliegenden Elektrode liegt dabei ein elektrisches Feld von einigen Kilovolt, was bei richtiger Wahl der elektrischen Potentialdifferenz und Flußrate die Zerstäubung der Flüssigkeit in einen feinen Flüssigkeitsnebel zur Folge hat (Abb. 2.3).

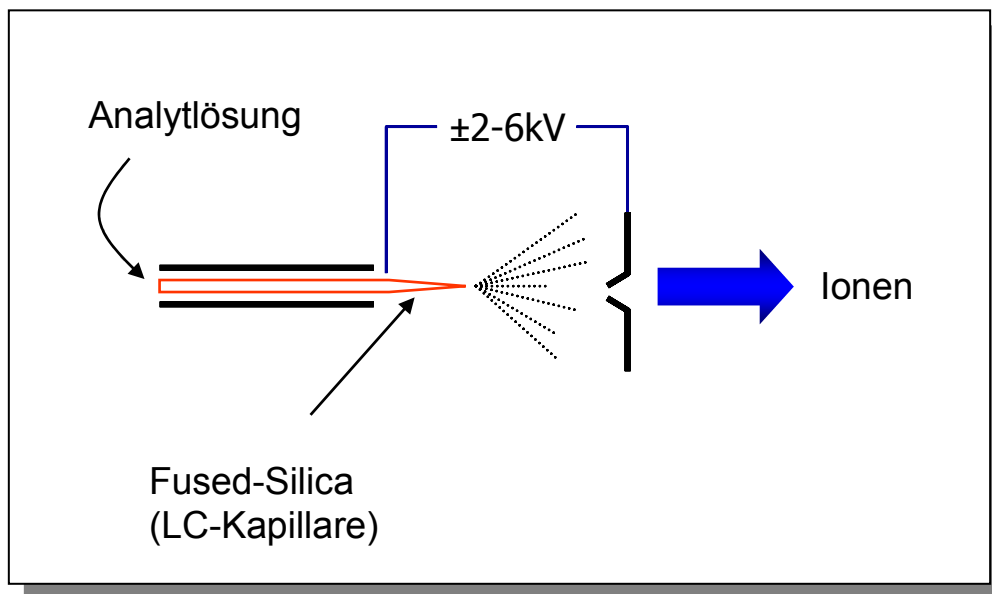


Abb. 2.3 Schematischer Aufbau einer ESI-Ionenquelle

Eine kontinuierliche Lösungsmittelverdampfung läßt die Tröpfchen schrumpfen wodurch die Ladungsdichte zunehmend ansteigt. Aufgrund der sich vergrößernden Ladungsdichte nehmen die Coulomb-Abstoßungskräfte immer mehr zu. Überschreitet die Ladungsdichte einen bestimmten Grenzwert, das sog. *Rayleigh-Limit*, kommt es infolge der starken Abstoßungskräfte zu einem explosionsartigen Zerfall in kleine Tröpfchen (Coulomb-Explosion) und schließlich zu einer Freisetzung von Ionen durch den Verlust ihrer Solvathülle. Diese Prozesse laufen beim Transfer des Tröpfchennebel in einem differentiell gepumptes Vakuumsystem in das Hochvakuum des Massenanalysators ab, wo sie nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis getrennt und analysiert werden können. Der Vorteil dieses Ionisationsverfahrens ist die Bildung mehrfach geladener Ionen nach der allgemeinen Formel $[M+nH^+]^{n+}$, wobei M der Masse des Analyten und n der Anzahl der Ladungen entspricht. Proteine und Peptide tragen ca. eine Ladung pro 1000 Dalton. Mit ESI werden im m/z-Bereich <1000 Da hauptsächlich einfach geladene Ionen erzeugt. Ist m/z >2000 Da, so entstehen vorzugsweise mehrfach geladene Ionen. Da in Massenanalysatoren die Analyten stets nach dem Masse zu Ladungsverhältnis aufgetrennt werden, ermöglicht die ESI-Technik auch die Analyse von großen Biomolekülen in Massenanalysatoren, die nur einen kleinen m/z-Bereich abdecken können (z.B. Quadrupole, Quadrupol-Ionenfallen). Die Serie an gebildeten Ionen $[M+nH^+]^{n+}$ erlaubt nach einer mathematischen Transformation, der sogenannten Dekonvolution eine sehr genaue Bestimmung des Molekulargewichts des Analyten. Ein Nachteil der mehrfach geladenen Ionen ergibt sich bei der Analyse von

Mischungen, da es infolge der Ladungsverteilungen zu Überlagerungen kommt, was die Auswertung der Spektren kompliziert (vgl. MALDI). Bei der Elektrospray Ionisierung ist die Intensität der Signale von der Konzentration der zerstäubten Probe und der Flußrate abhängig. Eine Erhöhung der Empfindlichkeit kann somit durch die Erniedrigung der Flußrate und/oder der Erhöhung der Konzentration der Probenlösung erreicht werden. Diese Beobachtungen haben zu den Weiterentwicklung des mikro-ESI (Flußrate ca. 500nl/min; (Emmett *et al.* (1994)) und nano-ESI (Flußrate ca. 10-50nl/min) (Wilm *et al.* (1996)) geführt.

Der Nachteil der ESI-Technik besteht in der hohen Reinheitsanforderung an die Proben, da Verunreinigungen wie Salze oder Detergentien die Ausbildung eines kontinuierlichen Sprühflusses verhindern. Die Kombination der Elektrospray Ionisierung mit der flüssigkeitchromatographischen Trennung von Protein- oder Peptidmischungen ist eine wichtige Methode in der Proteomanalytik. Aufgrund des kontinuierlichen Ionenstroms bei ESI-Ionenquellen werden diese hauptsächlich mit Quadrupol-oder Ionenfallen-Analysatoren kombiniert. Mittels ESI ist es zudem gelungen, intakte nicht-kovalente Komplexe in die Gasphase zu überführen und anschließend nachzuweisen (Loo (1997)).

2.1.3 Massenanalysatoren

Der Massenanalysator stellt das zentrale Element des Massenspektrometers dar. Seine primäre Aufgabe besteht in der Auftrennung der in der Ionenquelle erzeugten Analytionen mit Hilfe von elektrischen und/oder magnetischen Feldern sowie deren selektiver Zuführung zum Detektorsystem. Die entscheidenden Parameter eines Massenspektrometers wie Massengenauigkeit, Sensitivität und Qualität von Fragmentierungsexperimenten werden von seiner Leistungsfähigkeit bestimmt. Je nach Geometrie und Funktionsprinzip teilt man Analysatoren in Flugzeit- (engl. *Time of flight*, *TOF*), Quadrupol- (Q), Quadrupol-Ionenfallen- (engl. *Iontrap*, *IT*) oder Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron-Resonanz- (FT-ICR) Massenanalysatoren ein.

2.1.3.1 *Time of Flight* - Flugzeitmassenanalysator

Der TOF (*Time-of-Flight*)-Analysator zählt zu den einfachsten heute im Gebrauch befindlichen Massenanalysatoren. Zu den Stärken eines TOF-Analysators zählen sein theoretisch unbegrenzter Massenbereich in Verbindung mit einer hohen Sensitivität und Massengenauigkeit. Durch eine nahezu quantitative Ionentransmission können auch Ionen mit sehr geringer Intensität nachgewiesen werden.

Das Prinzip der Flugzeitmessung basiert auf der Bestimmung der Flugzeit von Ionen auf einer feldfreien Flugstrecke. Nach erfolgter Beschleunigung werden die in der Ionenquelle gebildeten Ionenpakete während des Fluges in einem evakuierten Flugrohr in Abhängigkeit ihres Masse-Ladungsverhältnisses aufgetrennt (Abb. 2.4). Nach dem Verlassen der Ionenquelle besitzen die ionisierten Analytmoleküle eine annähernd gleiche kinetische Energie, welche bei Molekülen mit verschiedenen Massen zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten führt. Aus der Gleichung

$$E_{kin} = U_{acc} \cdot e \cdot z = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

läßt sich unter Einbeziehung von $v = L/t$ durch Umformen die Proportionalität zwischen dem Masse-Ladungsquotienten m/z zu dem Quadrat der Flugzeit ableiten:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U_{acc}}{L^2} t^2$$

Ionenpakete mit einem großen m/z -Quotienten benötigen eine längere Zeit zum Durchqueren des Analysators als solche mit kleineren m/z -Werten.

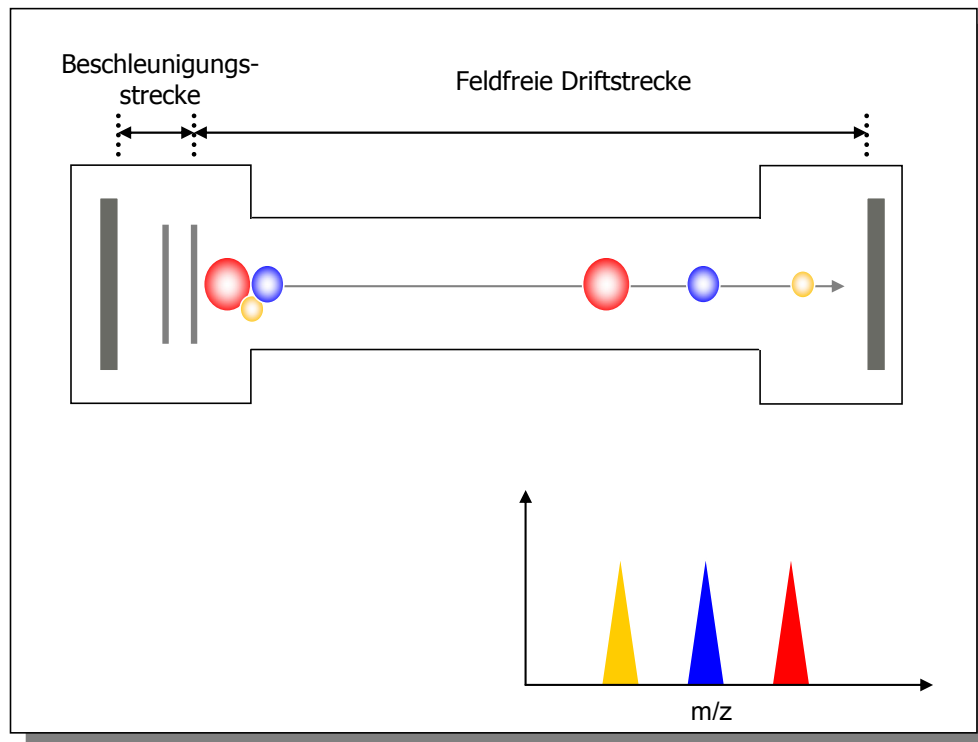


Abb. 2.4 Prinzip eines linearen Flugzeitmassenspektrometers Analyten mit einer größeren molekularen Masse benötigen eine längere Zeit zum Durchqueren der feldfreien Flugstrecke

Anhand der gemessenen Flugzeiten (bis zu einigen $100\mu\text{s}$) kann unter Einbeziehung der Flugstrecke (je nach Gerät zwischen $0,5$ und 3m) und der auf die Ionen übertragenen kinetischen Energie (zwischen 1 und 30keV) die Masse der Molekülonen errechnet werden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Masse-zu-Ladungsverhältnis in die Gleichung einfließt. Dieses Phänomen ist vor allem bei der Analytik von größeren Molekülen mittels Elektrospray-Ionisation von Vorteil, da die hier verwendeten Quadrupol- oder Ionenfallen-Analysatoren nur m/z -Werte von bis zu 4000 Thomson aufzutrennen in der Lage sind. Zwar sind auf den ersten Blick gepulste Ionenerzeugung und Flugzeit-Massenspektrometer ideale Partner, allerdings hängt die erreichbare Auflösung und Genauigkeit der Flugzeit- und damit Massenbestimmung in komplexer Weise von den effektiven Eigenschaften der Ionen ab. Unterschiede im Startort, in Startgeschwindigkeit und -richtung (Startimpuls) sowie Stöße während der Beschleunigung führen in Systemen mit konstant anliegender Beschleunigungsspannung zu deutlich unterschiedlichen Flugzeiten für Ionen gleicher Masse. Durch eine verzögerte Extraktion (engl. *delayed extraction*, *pulsed ion extraction*), bei der in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Analyten die Beschleunigungsspannung zwischen

100 und 1000 nsec zeitversetzt nach dem Laserimpuls eingeschaltet wird, gelingt es, die Laufzeitdispersion der Ionen deutlich zu reduzieren. Ein zweiter wichtiger Schritt zur Erhöhung der Auflösung bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie ist die Integration eines Reflektors in das Flugrohr. Der Reflektor erzeugt ein zweites, der Flugrichtung entgegengerichtetes elektrisches Feld. Ionenpakete mit der gleichen Masse aber unterschiedlicher kinetischer Energie dringen dabei unterschiedlich tief in dieses elektrische Feld ein und werden in entgegengesetzter Richtung der ursprünglichen Flugbahn beschleunigt. Ionen mit höherer kinetischer Energie verbringen somit mehr Zeit im Reflektor, so daß damit bei richtiger Dimensionierung ihre kürzere Laufzeit in der feldfreien Driftstrecke kompensiert werden kann. (Abb. 2.5).

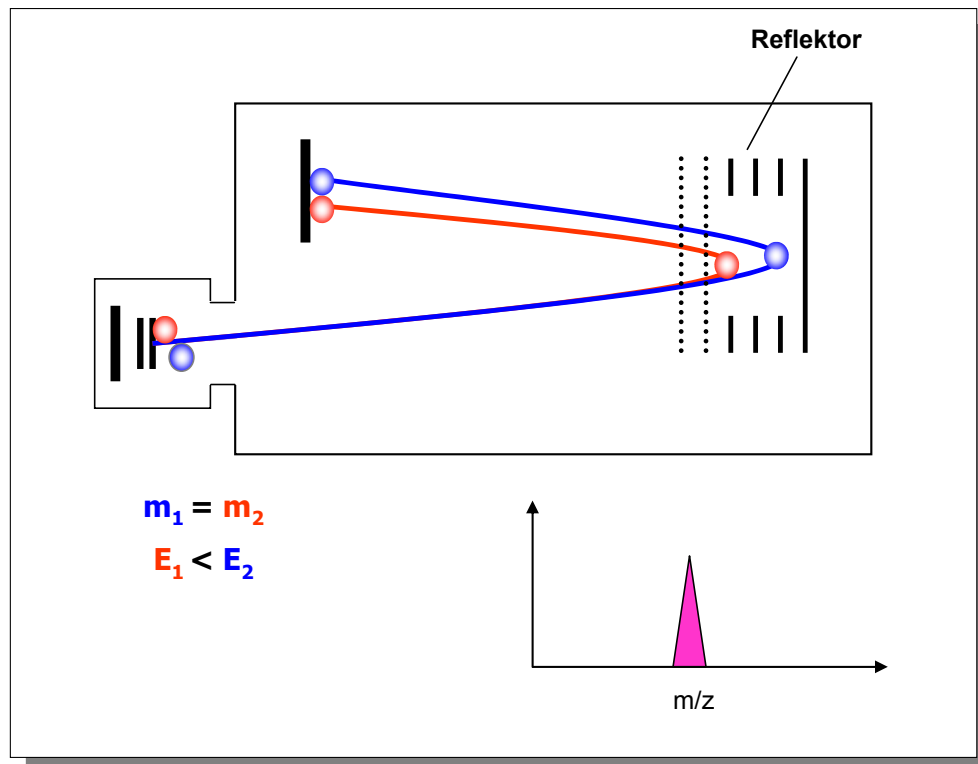


Abb. 2.5 Prinzip eines Reflektor-Flugzeitmassenspektrometers

Durch Verwendung des Reflektor-TOF Massenanalysators können für MALD-Ionen Auflösungen von bis zu 25000 (FWHM¹) für Peptide mit einer Masse zwischen 1 und 6 kDa erreicht werden.

¹ Die Auflösung wird in der TOF-MS als Quotient aus Masse und Halbwertsbreite eines Ionensignals definiert ($m/\Delta m$, *full width half maximum*, FWHM)

2.1.3.2 Tandem-Massenspektrometer

Für die Durchführung von Fragmentierungsexperimenten werden hauptsächlich sogenannte Tandem-Massenspektrometer eingesetzt, die in der Lage sind, nach Fragmentierung von ausgewählten Vorläuferionen ein weiteres Massenspektrum aufzunehmen und die Massen der entstandenen Bruchstücke zu messen. Dazu werden die gewünschten Ionen (engl. *Precursor-Ions*) zunächst isoliert und von den weiteren Peptiden je nach Gerätetyp zeitlich (*tandem-in-time*) oder räumlich (*tandem-in-space*) getrennt. Bei *tandem in space*-Massenspektrometern sind die Bereiche für Fragmentierung und Messung räumlich getrennt (Bsp. Tripel-Quadrupol). Dagegen findet bei *tandem in time*-Massenspektrometern die Fragmentierung und Messung in derselben Zelle statt (Bsp. Ionenfalle). In einem nächsten Schritt wird das gewünschte Ion fragmentiert und von den entstandenen Fragmenten die Massen ermittelt. Aus den Differenzen der gemessenen Fragmentmassen läßt sich anschließend die Aminosäuresequenz des untersuchten Peptids ableiten (s. auch *CID*, 2.1.4.1, S. 13). Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht das Prinzip:

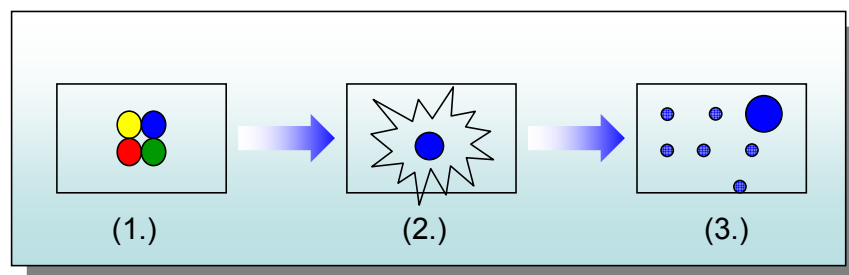


Abb. 2.6 Abschnitte des Prozesses zur Fragmentationanalytik

(1.) Aufnahme eines Gesamtspektrums des Proteinverdau (2.) Isolierung und Fragmentierung eines Peptids (3.) Messung der Fragmentmassen

Technisch betrachtet sind *tandem-in space* Massenspektrometersysteme als eine funktionelle Hintereinanderreihung mehrerer Einzelanalysatoren zu verstehen (z.B. Tripel-Quadrupol (QqQ (Goodlett *et al.* (2001)) oder TOF-TOF (Medzihradzky *et al.* (2000)). Überdies sind Geräte entwickelt worden, die eine Kombination aus verschiedenen Analysatortypen darstellen und deswegen als Hybridgeräte bezeichnet werden. Zu solchen Geräten zählen unter anderem Quadrupol-Ionenfallen (q-IT; Stafford *et al.* (1984)) oder Quadrupol-o-TOF-Geräte (q-o-TOF; Chernushevich *et al.* (2001)).

Tabelle 2.2 gibt eine kurze Übersicht über die Parameter einiger Gerätetypen zur Fragmentationanalytik. In den Erläuterungen von Aebersold *et al.* (2003), Hager (2004),

Cristoni *et al.* (2003), Yates (2004) finden sich weitere Ausführungen zu den einzelnen Gerätetypen.

Tabelle 2.2 Vergleich einiger Parameter von Tandem- bzw. Hybridmassenspektrometer (Yates (2004))

Instrument	Auflösung	Massengenauigkeit	Scangeschwindigkeit im MS-Modus	Scangeschwindigkeit im MS/MS Modus
Linear Ion Trap	2-15000	100-300ppm	Moderat bis schnell	Moderat bis schnell
Q-QIT	2000	300-500ppm	Moderat	Moderat
TOF-TOF	20-25000	10-20ppm	Schnell	Langsam
FTMS	50-100000	1-2ppm	Moderat	Moderat

Neben den Tandem-Massen- und Hybrid-Massenspektrometer kann auch ein TOF-Analysator im Reflektorbetrieb für die Fragmentationanalytik eingesetzt werden.

2.1.4 Sequenzanalyse von Peptiden

Die Fragmentierung von Peptiden zur Sequenzierung mittels Massenspektrometrie erfolgt in Tandem-Massenspektrometern sowohl bei MALDI als auch bei ESI hauptsächlich durch eine kollisionsinduzierte Fragmentierung (engl. *Collision Induced Dissociation*; CID). Neben der CID-Methode kommt in MALDI-Massenspektrometern auch die Sequenzierung von Biomolekülen in TOF-Analysatoren mittels der *Post Source Decay (PSD)*-Methode² zum Einsatz.

2.1.4.1 *Collision Induced Dissociation (CID)*

Beim *CID*-Verfahren werden zuvor isolierte und selektierte Peptide in einer Kollisionszelle des Massenspektrometers durch Zusammenprall mit einem sogenannten Stoßgas (in der Regel Helium oder Argon) in Fragmente gespalten. Ursache ist die beim Stoß übertragene Energie, die in sehr kurzer Zeit in Schwingungsenergie transformiert wird und schließlich zu einem Bindungsbruch führt. Bei Stoßenergien im Bereich von bis zu ca. 100eV (sog. Niederstoßenergien), wie sie in Tripelquadrupol-, Ionenfallen und Q-TOF-Geräten typischerweise eingesetzt werden führt dies in der Regel zu einem Zerfall entlang der Peptidkette (engl. *Peptide Backbone*), und es entstehen Fragmente unterschiedlicher Peptidlänge. Aus der Massendifferenz der Fragmente läßt sich anschließend im besten Fall

² Obwohl die Terminologie nicht korrekt ist, werden die Begriffe MS/MS und PSD in der vorliegenden Arbeit synonym verwendet.

die Aminosäuresequenz eines Peptids ermitteln. Auch im Falle eines nicht durchgehenden Zerfalls werden wichtige Informationen über die Struktur des Peptids gewonnen.

Die Bezeichnung der charakteristischen Fragmente erfolgt nach einer Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann (Roepstorff *et al.* (1984)). Verbleibt bei der Spaltung die Ladung an den Fragmenten der N-terminalen Serie, so werden die entsprechenden Fragmente mit *a*, *b*, *c* bezeichnet. Verbleibt die Ladung dagegen an den Fragmenten der C-terminalen Serie, werden sie *x*, *y*, *z* genannt. Ein zusätzlicher Index gibt die Zahl der in dem Fragmentation enthaltenen Aminosäurereste an, daher läuft dieser Index für die *a*-, *b*- und *c*-Serien in umgekehrter Reihenfolge wie für die *x*-, *y*- und *z*-Serien. Abb. 2.7 (A) zeigt das Fragmentierungsschema für ein Modellpeptid sowie die Strukturen der entstandenen Ionen (B).

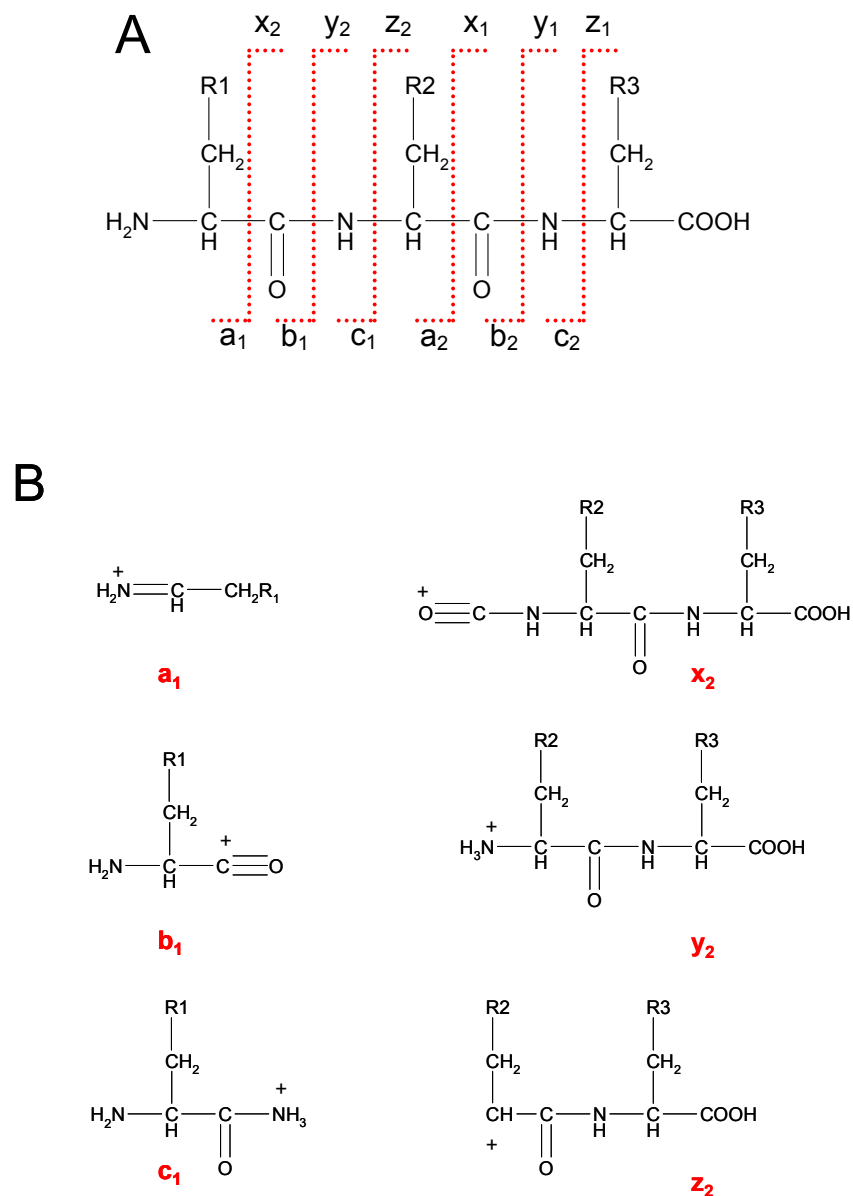


Abb. 2.7 Schema der Fragmentierung von Peptiden (Nomenklatur nach Roepstorff *et al.* (1984))

Die Literatur bezeichnet die Spektren dieser Experimente als MS/MS-Spektren, was die Neuaufnahme des Massenspektrums eines vorher isolierten und fragmentierten Peptids bedeutet. Bei *tandem-in-time* Analysatoren wie zum Beispiel dem FT-ICR- oder Ionenfallen-Systemen ist es möglich, die entstandenen Bruchstücke noch weiter zu fragmentieren, so daß man zu sogenannten MSⁿ-Experimenten kommt. Solche Experimente sind vor allem für die Analyse posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen sinnvoll. Dabei erweist sich allerdings eine Analyse über die dritte Stufe (MS³) hinaus häufig als nicht mehr praktikabel, insbesondere bei den typischerweise vorliegenden geringen Probenmengen, da mit diesen Experimenten ein deutlicher Verlust der Signalintensität verbunden ist. Für die Durchführung von CID-Experimenten werden die weiter oben bereits erwähnten Tandem- oder Hybridmassenspektrometer eingesetzt. Aufgrund der geringen Kollisionsenergie entstehen bei CID-Experimenten hauptsächlich Ionen der *b*- und *y*-Reihe (Abb. 2.7, (B)), was eine einfache manuelle wie auch computergestützte Auswertung der Fragmentspektren erlaubt. Bestimmte Nebenreaktionen wie die Abspaltung von H₂O (-18 Da), CO (-28Da) oder NH₃ (-17Da) liefern weitere charakteristische Hinweise auf das Vorkommen bestimmter Aminosäuren oder verschiedener Ionensorten. So weist z.B. ein Abstand von 28 Da auf den Verlust von CO aus einem *b*-Ion hin. Ionen, die durch Abspaltung von CO aus einem *b*-Ion entstehen, bilden die *a*-Serie. Daneben können mit Erhöhung der Kollisionsenergie zusätzliche Fragmentierungen der Seitenketten erfolgen. Solche Spaltungen erlauben zum Beispiel die Unterscheidung zwischen den isobaren Aminosäuren Leucin und Isoleucin, obwohl beide identische Molmassen besitzen. Die hochenergiekollisionsbedingte Zunahme an Signalen erschwert allerdings die Auswertung der Spektren, da hier noch weitere Nebenreaktionen auftreten können.

Kollisionsinduzierte Fragmentierungen werden vorwiegend in Geräten mit Elektrospray-Ionisierung betrieben. Bei MALDI-Systemen werden kollisionsinduzierte Zerfälle hauptsächlich in TOF/TOF-oder Q-TOF-Analysatoren durchgeführt.

2.1.4.2 Post Source Decay (PSD)

Obwohl der MALDI-Prozeß als eine „sanfte“ und fragmentierungsarme Ionisationstechnik gilt, lassen sich hier Zerfälle der gebildeten Analytionen während der Flugphase beobachten (sogenannte metastabile Zerfälle). In Abhängigkeit vom Ort und Zeitpunkt des Zerfalls unterscheidet man zwischen prompter Fragmentierung, die nicht von intakten Ionen unterschieden werden kann (*In-Source-Decay* (ISD)) oder *Post-Source-Decay* (PSD). Im Gegensatz zum *In-Source-Decay*, bei dem es bereits in der Ionenquelle zu einem Zerfall der

Ionen kommt, geschieht dies beim *Post-Source-Decay* erst nach deren Beschleunigung in der feldfreien Flugstrecke. Dieses Phänomen wurde erstmals von Kaufmann und Spengler beobachtet (Spengler *et al.* (1992), Kaufmann *et al.* (1993)). Beim Zerfall eines Molekül-Ions entstehen ein geladenes Fragmention und ein neutrales Fragmentmolekül. Einflußfaktoren für diesen Fragmentierungsschritt sind zum einen die Matrix und die Dichte der desorbierten Ionenwolke und somit die eingesetzte Laserenergie sowie die Beschleunigung (elektrische Feldstärke), die auf die Analytioneinwirkt. Der Zerfall der Ionen während der feldfreien Driftstrecke verleiht den gebildeten Fragmenten in Abhängigkeit von der Masse der Produkte unterschiedliche kinetische Energien, ihre Geschwindigkeit verändert sich dabei jedoch nicht (1. Newtonsches Axiom)³. Solange kein neues Kraftfeld auf sie einwirkt, sind die Signale der gebildeten Fragmente nicht von denen intakter Molekülionen zu unterscheiden. Ein lineares Flugzeitmassenspektrometer ist daher nicht für die Messung von Fragmentionen und zur Sequenzierung von Peptiden geeignet. Durch Beeinflussung der kinetischen Energie der Ionen in Form eines zweiten elektrischen Feldes ist es möglich, PSD-Ionen abzulenken und auf ihr „neues“ Masse-Ladungs-Verhältnis abzubilden. Moderne Reflektoren erlauben durch Einsatz variabler Reflektorspannungen die stufenweise Aufnahme von PSD-Spektren. Dazu werden die Reflektorspannungen den kinetischen Energien der Fragmentionen schrittweise angepaßt, so daß diese zeitfokussiert auf dem Detektor erscheinen. Die Kombination aller Teilspektren ergibt schließlich das komplette PSD-Fragmentspektrum. Wie bei den CID-Kollisionen werden auch bei der PSD-Analytik vorwiegend *a*, *b* und *y*-Ionen beobachtet. Die optionale Einleitung eines Kollisionsgases macht aus der PSD-Methode eine kollisionsinduzierte Hochenergiefragmentierung, in deren Folge auch Seitenkettenbrüche und weitere unspezifische Zerfälle auftreten. Wie bereits weiter oben erwähnt, läßt sich die PSD-Technik zur Peptidsequenzanalyse einsetzen (Spengler (1997), Gevaert *et al.* (2001)) Durch Einbau eines sogenannten *precursor ion selector* in das Massenspektrometer ist es möglich, Ionen einer bestimmten Masse zu selektieren um deren Fragmente anschließend zu analysieren. Wie bei allen MS/MS-Techniken bietet die PSD-Methode bei nicht zu komplexen Peptidmischungen die Möglichkeit, Sequenzanalysen von Peptiden auch ohne vorherige chromatographische Trennung wie bei der LC-ESI-MS/MS Technik durchzuführen. In einer technisch weiterentwickelten Konfiguration eines MALDI-PSD-Flugzeitsystems ist es heute durch nachträgliche Anhebung der Gesamtenergie der intakten Molekülionen und

³ Lex Prima: Ein Körper verharrt in seinem Zustand der Ruhe oder gleichförmigen geradlinigen Bewegung, solange die Summe aller auf ihn einwirkenden Kräfte Null ist. Die Geschwindigkeit *v* ist in Betrag und Richtung konstant.

Fragmentationen möglich, Fragmentationen-Massenspektren in einem Schritt und mit deutlich verbesserter Performance aufzunehmen. Hauptnachteil beider Techniken, TOF/TOF und PSD/TOF, ist die deutlich begrenzte Massenauflösung für die Verlänger-Ionen, die noch weit von den Leistungsdaten konventioneller MS/MS-Systeme entfernt ist.

Da beim *ISD*-Prozess der Zerfall bereits in der Ionenquelle - kurz nach dem Laserimpuls und vor der verzögerten Extraktion - erfolgt, besitzen alle gebildeten Ionen nach ihrer Beschleunigung die gleiche kinetische Energie und führen als eigenständig desorbierte und ionisierte Teilchen zu Signalen am Detektor. Das Fehlen der Möglichkeit, eine Vorauswahl des zu untersuchenden Peptids zu treffen, verhindert bei der *ISD*-Technik die Sequenzierung von Peptiden. *ISD* ist daher nur für sehr reine Proben geeignet, da durch den Laserbeschuss sämtliche in der Probe enthaltenen Peptide fragmentiert würden. Die Sequenzanalyse von intakten Proteinen mittels *ISD* hat Katta *et al.* (1998) beschrieben.

2.2 Proteomics

Der Begriff „Proteom“ wurde Mitte der Neunziger Jahre von Marc Wilkins eingeführt, um die Verbindung zwischen dem bis dahin im Zentrum der modernen Bioanalytik stehenden Genom und den daraus entstehenden Proteinen zu knüpfen (**PROTE**in und **GenOM**). Das Proteom umfaßt die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, einem Kompartiment oder einem Organismus unter bestimmten Bedingungen zu einem bestimmten Zeitpunkt (Wilkins *et al.* (1996)). Unter dem aus der Definition des Proteoms abgeleiteten Terminus *Proteomics* ist die Analyse des Proteoms einer Zelle oder eines Gewebes unter Einbeziehung der verschiedenen Expressionslevel und Interaktionen des Proteoms zu verstehen (Patterson *et al.* (2003), de Hoog *et al.* (2004)). *Proteomics* ist die konsequente Fortsetzung der Sequenzierung des Genoms, wobei das Proteoms eine sehr viel höhere Komplexität aufweist. Während das Genom als ein statisches System beschrieben werden kann, unterliegt das Proteom in Abhängigkeit des Entwicklungsprozesses der Zelle oder seiner Stoffwechsellage einer starken und dynamischen Veränderung. Der Begriff *Proteomics* schließt darüber hinaus auch Aspekte der Physiologie oder Pathophysiologie von Zellen unter Einbeziehung von quantitativen und dynamischen Prozessen wie Hoch- und Abregulierungen von Proteinexpressionen mit ein. Bei der Untersuchung des Proteoms eines Gewebes oder Organismus wird stets versucht, exogene wie auch endogene Einflüsse auf die Zelle mit einzubeziehen und die Auswirkung nicht nur isoliert auf ein einzelnes Protein bezogen zu betrachten. Vor allem in höheren Eukaryonten ist durch eine Vielzahl von Modifizierungen der Proteine das Proteomprofil

wesentlich komplexer als in Prokaryonten. *Proteomics* spielt eine bedeutende Rolle bei der biologischen, biomedizinischen und pharmazeutischen Forschung sowohl in der Wissenschaft als auch in der Industrie. Die drei Säulen zur Analyse eines Proteoms sind neben der Gelelektrophorese und Chromatographie insbesondere die moderne Massenspektrometrie, deren Entwicklung das Fundament dieser jungen Wissenschaft bildet. Dabei ist zu betonen, daß nur der gemeinsame Einsatz aller bioanalytischen Techniken in der Lage ist, die enorme Komplexität eines Proteoms qualitativ wie auch quantitativ zu erfassen. Komplettiert werden die drei Techniken durch die moderne Bioinformatik, die die Auswertung und das Verständnis der Erkenntnisse aus Proteom- wie auch Genomforschung erst zu verstehen hilft. *Proteomics*-Forschung läßt sich unabhängig vom Design der Experimente in eine *globale* und eine *gezielte* Strategie unterteilen. Hinter der *globalen Strategie* steht das Ziel, das gesamte Proteom eines Organismus zu analysieren und funktionell beschreiben zu können. Dagegen setzt sich die *gezielte Strategie* mit der Analytik definierter Subproteome wie spezieller Organellen oder Kompartimente der Zelle und/oder des Gewebes auseinander. Darüber hinaus findet auch eine Einteilung nach chemischen Gesichtspunkten statt, wonach z.B. das Phosphoproteom, Glykoproteom oder Membranproteom einer Zelle Gegenstand der Untersuchungen sein kann. Dabei werden folgende Aspekte berücksichtigt:

- a) Komplette Analyse des Proteoms der untersuchten Einheit im Sinne einer Bestandsaufnahme und Kartierung
- b) Quantifizierung des Proteinprofils in verschiedenen Stadien
- c) Analytik von Protein-Protein Interaktionen innerhalb der Zelle mit dem Ziel makromolekulare Komplexe und somit funktionelle Proteinmaschinerien zu untersuchen

Allerdings hat der *Proteomics*-Ansatz bisher nicht den erhofften/versprochenen schnellen Durchbruch in Bereichen wie der biomedizinischen Forschung gebracht. Der entscheidende Vorteil eines nicht-voreingenommenen (*non-biased*) Forschungsansatzes und der (immer noch eingeschränkte) Blick auf die biologische Komplexität führen zunächst zur Generierung großer Datenmengen und im besten Fall zur Generierung neuer Arbeitshypothesen. Vermutlich werden im Bereich der Biomarkersuche für diagnostische Ansätze in naher Zukunft erste Erfolge zu verzeichnen sein.

2.2.1 Strategien zur Analytik von komplexen Proteomen

Zu Beginn der Proteomanalytik ist das zu untersuchende Gewebe oder Zellmaterial aufzuschließen und von nicht proteinogenen Zellbestandteilen wie Lipiden oder Nukleinsäuren zu befreien. Mit Hilfe einer anschließenden Fraktionierung des aus den Zellen oder Gewebe isolierten Proteoms kann die Anzahl der Proteine gesenkt und somit die Komplexizität des zu untersuchenden Systems vermindert werden (Stasyk *et al.* (2004)). In Abhängigkeit von der Stoffwechsellage des Kompartiments oder der Funktion des Proteins kommt es in einer Zelle zu einer unterschiedlich starken Expression verschiedener Proteine. Hoch exprimierte (engl. *high abundant*) Proteine können dabei die Detektion von gering exprimierten (engl. *low abundant*) Proteine verzerren oder gar unmöglich machen. Die gezielte Isolierung und Anreicherung der zu untersuchenden Kompartimente oder Proteinkomplexe bietet somit einen eleganten Ansatz zur Vermeidung dieser Probleme.

Die Literatur beschreibt verschiedene Protokolle anhand derer es möglich ist, Mitochondrien (Smith (1967)), Chloroplasten (Peltier *et al.* (2000)) oder Zellkerne (Lamond *et al.* (1998)) gezielt zu isolieren und von den übrigen Proteinen abzutrennen. Solubilisierete Organellen oder Proteinkomplexe lassen sich durch Methoden wie z. B. Dichtegradienten-Zentrifugation schonend vom Rest der Zellbestandteile trennen und für weiterführende Untersuchungen isolieren. In Anbetracht der Vielfalt und unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine oder Organellen ist es angezeigt, die Protokolle jeweils individuell an das zu untersuchende Gewebe bzw. Kompartiment anzupassen. Außer der Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation bilden u.a. die Immunopräzipitation (Bauer *et al.* (2003)) oder die trägerfreie Elektrophorese (engl. *free-flow electrophoresis, FFE*) (Kuhn *et al.* (1989)) weitere Möglichkeiten, Proteine oder Multiprotein-Komplexe spezifisch anzureichern. Daneben finden auch chromatographische Techniken wie die Ionenaustauschromatographie (IEX) oder die Größenausschlußchromatographie (SEC) Anwendung bei der Isolierung von Proteinkomplexen. Auf die BN-PAGE zur Isolierung intakter Membranproteinkomplexe aus Mitochondrienmembranen wird in Kapitel (2.4, *Membrane Proteomics*) genauer eingegangen. Nach der Aufkonzentrierung einzelner Subproteome folgen weitere Stufen, um die Komplexe oder Proteome in ihre Bestandteile aufzutrennen.

Die einfachste und am weitesten verbreitete Technik zur Auftrennung von Proteinmischungen ist die 1D-SDS-PAGE. Die stark denaturierende Wirkung von SDS erlaubt es, neben wasserlöslichen Proteinen selbst hydrophobe Membranproteine zu solubilisieren und im Gel aufzutrennen (Jones (1999)). Ein Nachteil dieser Methode ist bei hochkomplexen Proben die mitunter nicht ausreichende Trennleistung, welche in einem Überschneiden der einzelnen

Proteinbanden resultiert. Abb. 2.8 gibt eine graphische Übersicht über die verschiedenen Vorgehensweisen und Methoden bei der Proteom-Analytik bis hin zu Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie.

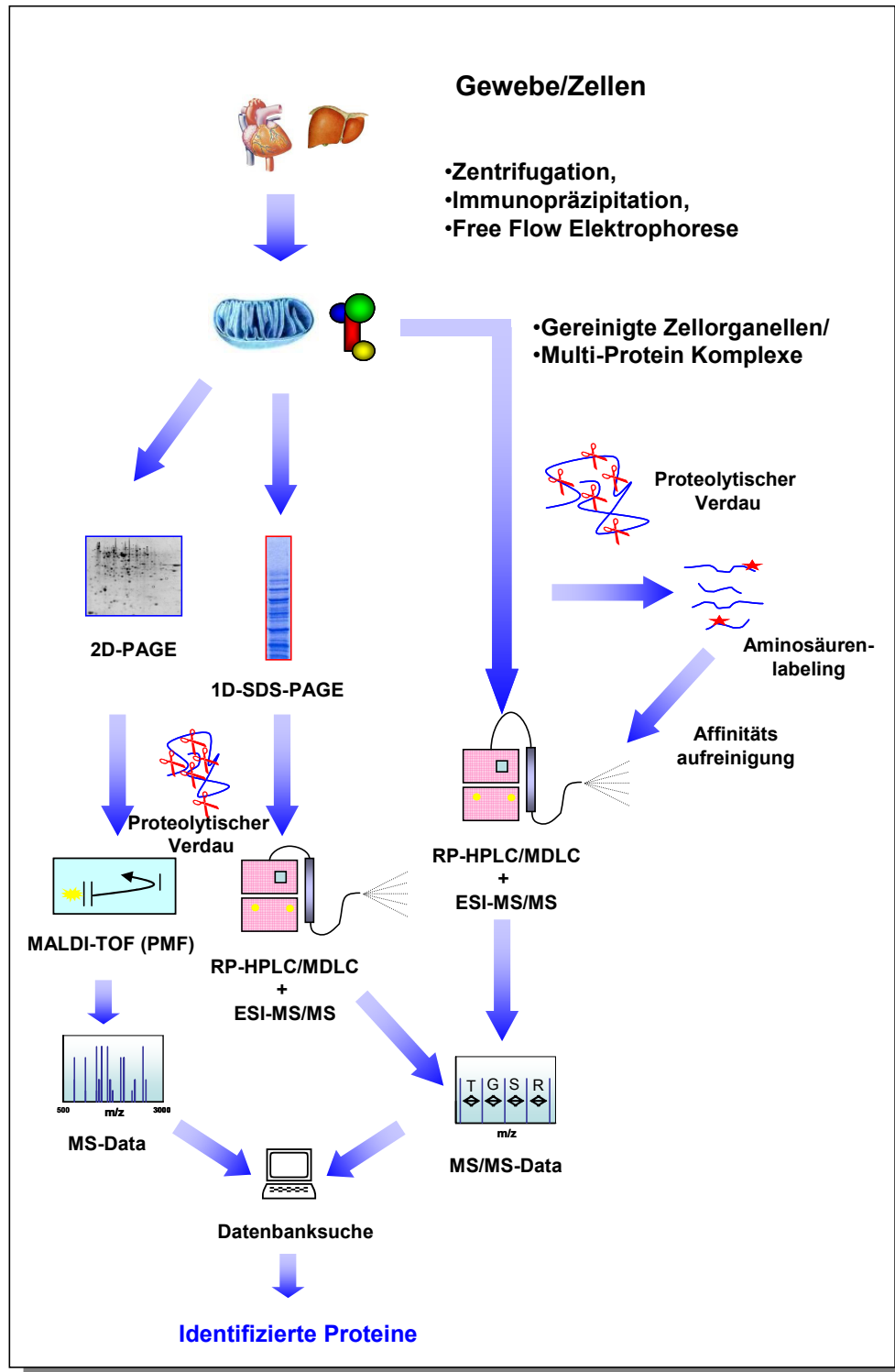


Abb. 2.8 Arbeitsschema der Proteomanalytik ausgehend vom intakten Gewebe oder Zellverband (modifiziert nach Reinders *et al.* (2004))

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinkomplexen bis hin zu ganzen Zelllysaten oder Geweben wird heute routinemäßig mit der zweidimensionalen IEF/SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Neben allen technischen Weiterentwicklungen und der Etablierung des *Shot-Gun Proteomics* (2.2.2.3) ist das auf der Differenzierung nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht der Proteine basierende System die leistungsfähigste und weitverbreiteste Methode in der Proteomanalytik. Eine detaillierte Beschreibung über den Einsatz und den Stellenwert der 2D-PAGE für die *Proteomics*-Forschung findet sich in Görg *et al.* (2004). Das auf die Entwicklung von Stegemann (Macko *et al.* (1970)) und O'Farrell (1975) zurückgehende Prinzip wurde durch die Entwicklung der immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) für die erste Dimension hinsichtlich Handhabung und Reproduzierbarkeit enorm verbessert. Vor allem gegenüber der früher eingesetzten IEF mit löslichen Carrier-Ampholyten, welche nicht im Gel fixiert waren, zeigen sich die IPG-Streifen als überlegen. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), wandern die Proteine in einem elektrischen Feld entlang eines immobilisierten pH-Gradienten bis zu dem ihrem isoelektrischen Punkt entsprechenden pH-Wert. Da am isoelektrischen Punkt (pI) die Nettoladung definitionsgemäß null ist, werden die Proteine an diesem Punkt fokussiert. Die sich anschließende zweite Dimension ist eine klassische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die Proteine nach ihrem Molekulargewicht, genauer elektrophoretischen Mobilität, auftrennt und somit auch Proteine, die einen ähnlichen pI besitzen, separiert. Das Auflösungsvermögen der 2D-Technik liegt im Routinebetrieb bei rund 2000 Proteinen, ist jedoch abhängig von der Größe des Gels und des zu betrachtenden pH-Bereichs. Nach erfolgter Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine durch verschiedene Färbetechniken sichtbar gemacht. Die gängigsten Färbungen sind die Coomassie- oder Silberfärbung, die eine Detektion der Proteine bis in den unteren Nanogramm-Bereich erlauben. Darüber hinaus finden Fluoreszenzfarbstoffe wie die Cy-Farben im Rahmen des Differential-Displays (*DIGE: Differential Imaging Gel Electrophoresis*) in der *Proteomics*-Forschung Anwendung. Durch Einsatz von Farbstoffderivaten, die verschiedene Anregungs- oder Emissionswellenlängen besitzen ist es möglich, differentielle dynamische Prozesse wie Expressionsraten in einer Zelle zu quantifizieren (Unlu *et al.* (1997), Gharbi *et al.* (2002), Zhou *et al.* (2002)). Ein weiterer Vorteil der 2D-PAGE Technik ist die Möglichkeit, posttranslationale Modifikationen von Proteinen zu detektieren. Durch Phosphorylierungen oder Sulfonierungen verändert sich der pI eines Proteins, während sich das Molekulargewicht nur relativ marginal verschiebt. In

einem 2D-Gel ergeben solche Modifikationen für die getrennten Proteine nach Sichtbarmachung ein perlschnurartiges Aussehen.

Die Grenzen der 2D-PAGE liegen in der Analyse von stark basischen Proteinen oder bei Polypeptiden mit sehr großen (>120 kDa) und/oder sehr kleinen Molekulargewichten (<15 kDa). Vor allem bei der Untersuchung von hydrophoben Membranproteinen erweist sich die Methode als nicht brauchbar. Bedingt durch ihre geringe Löslichkeit in wäßrigen Puffersystemen und ihrer hohen Aggregationsneigung unter den Bedingungen der isoelektrischen Fokussierung entziehen sich integrale Membranproteine einer Detektion im 2D-Gel (Klein *et al.* (2004)). Einen Überblick über weitere gelelektrophoretische Techniken und deren Kombination zur Analyse von komplexen Proteinmischungen gibt Manabe (2000). In einer Säugerzelle werden zu einem Zeitpunkt bis zu 10000 Gene exprimiert, was zeigt, daß mit den 1000 bis 2000 durch die 2D-PAGE in einem Gel zugänglichen Proteinen nur ein Bruchteil des Gesamtproteoms analytisch verfügbar ist. Proteine, die in nur einer sehr geringen Kopienzahl von 100 – 1000 Molekülen pro Zelle vorliegen, können in Ermangelung ausreichend sensitiver Detektionsmethoden nicht identifiziert werden. Parallel dazu erschweren Proteine, die in einer hohen Anzahl von bis zu 10^8 Kopien in der Zelle vorliegen die Detektion solcher Proteine zusätzlich (Corthals *et al.* (2000)). Technisch lassen sich störende Proteine wie HSA oder IgG, die bis zu 75% des Gesamtproteingehalts der zu untersuchenden Probe ausmachen können, mit Hilfe der Affinitätschromatographie abreichern (*Depletion-Kits*).

2.2.2 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Den Kern einer Proteomanalyse von Zellen oder Geweben bildet die nach erfolgter gelelektrophoretischer oder chromatographischer Auftrennung sich anschließende Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie. Dazu werden die gewünschten Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und einem enzymatischen In-Gel-Verdau unterzogen. Als Spaltungsenzym wird in der Regel die Endopeptidase Trypsin eingesetzt, die mit hoher Spezifität (Olsen *et al.* (2004)) C-terminal zu den Aminosäuren Arginin und Lysin schneidet. Die aus der Spaltung resultierenden Peptide werden mit Lösungsmitteln aus dem Gel eluiert und für die Massenspektrometrie präpariert. Die hohe Spezifität und die durch die basischen Aminosäuren leicht ionisierbaren Peptide machen Trypsin zu einem idealen Enzym für die Massenspektrometrie. Einen Überblick über die Rolle und die Bedeutung der Massenspektrometrie in der *Proteomics*-Forschung geben Reinders *et al.* (2004), Aebersold *et al.* (2003), Aebersold *et al.* (2001). Für die Proteinidentifizierung haben sich zwei typische MS Methoden etabliert: *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) oder *Peptide Mass Mapping* (Pappin *et al.* (1993), Shevchenko *et al.* (1996a)) und die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bzw. Fragmentationanalytik (Mann *et al.* (1994), Shevchenko *et al.* (1997)).

2.2.2.1 *Peptide Mass Fingerprint*

Peptide Mass Fingerprint (PMF) basiert auf dem Vergleich von gemessenen Peptidmassen aus MALDI-TOF oder ESI-MS Experimenten mit berechneten Massen aus in silico Verdauexperimenten bekannter Protein- oder Gensequenzen unter zuvor definierten Bedingungen wie z.B. Spaltenzym oder Massentoleranz (Abb. 2.9). Sämtliche in einer Datenbank annotierten Proteine werden dabei von der Recheneinheit der Datenbank einem theoretischen Verdau mit dem in dem Versuch eingesetzten Enzym oder Reagenz unterzogen. Als Ergebnis resultieren Tausende theoretischer Peptide, deren Massen im Rahmen der zuvor festgelegten Definitionen mit den gemessenen Daten verglichen werden. Aus der Anzahl der Übereinstimmungen aus errechneten und gemessenen Peptiden ermittelt die Bioinformatik-Software eine Wahrscheinlichkeit für die Signifikanz des identifizierten Proteins („MOWSE-Score“ oder „Probability-MOWSE-Score“)⁴. Das Protein, welches die größte Übereinstimmung zwischen theoretischen und gemessenen Daten zeigt, wird als Ergebnis mit der höchsten Wahrscheinlichkeit aufgelistet. Bei einer hohen Massengenauigkeit genügen in Abhängigkeit von der damit erreichten Sequenzabdeckung bereits 4 bis 6 Peptide, um eine

⁴ MOWSE-Score: **MO**lecular **WE**ight **SE**arch; Details s. 4.6; S. 55

erfolgreiche Proteinidentifizierung zu erreichen. Faktoren, die die Signifikanz von Datenbanksuchergebnissen verkleinern, sind unter anderem eine hohe Anzahl an Signalen, die aus Kontaminationen des gesuchten Proteins stammen. Diese können neben Keratin-Spuren auch Autoproteolyse-Produkte des eingesetzten Enzyms sein. Posttranslationale Modifikationen an Proteinen schränken die Identifizierungswahrscheinlichkeit zusätzlich ein, da durch Einbeziehung eventueller Modifikationen die Wahrscheinlichkeit an Zufallstreffern noch erhöht ist.

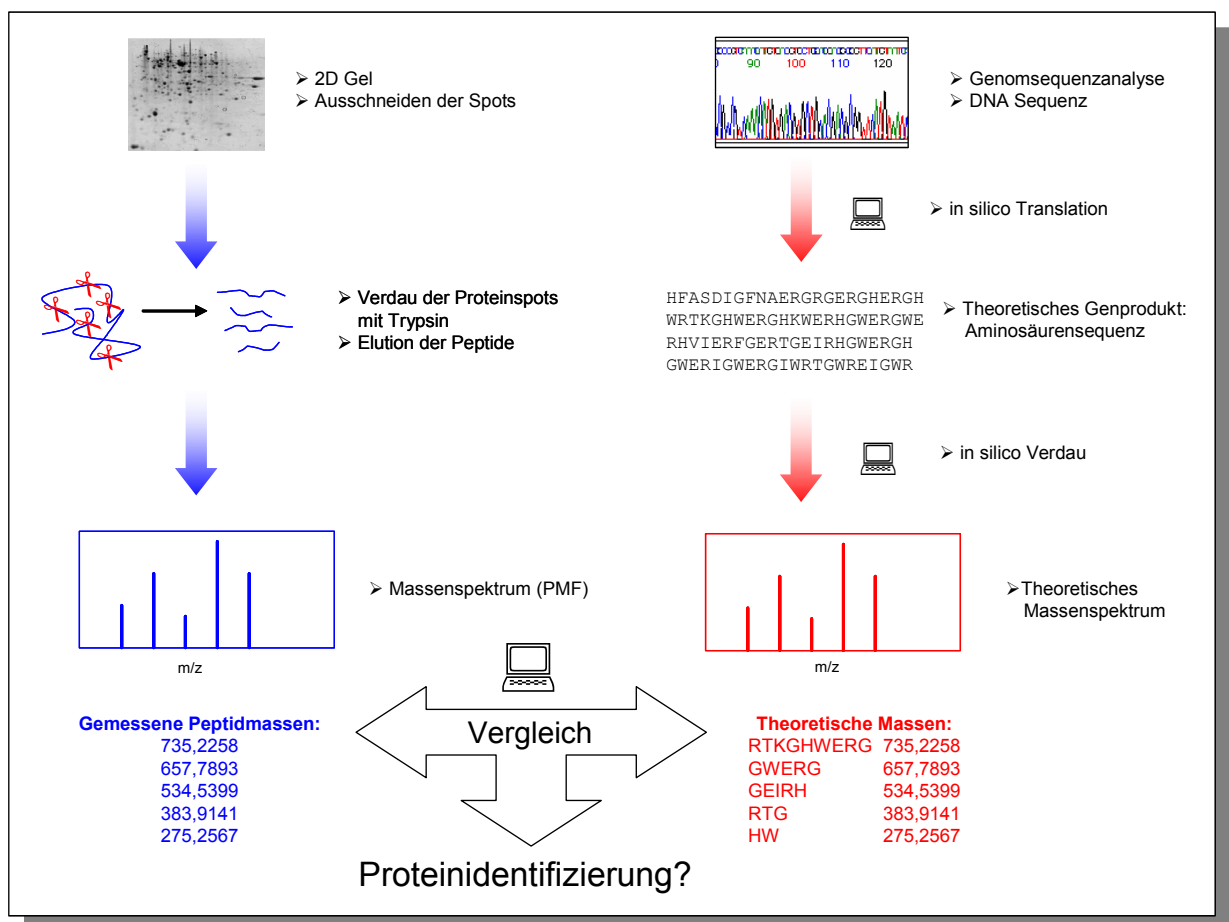


Abb. 2.9 Schematischer Ablauf der Proteinidentifizierung mittels *Peptide Mass Fingerprint*

Die Massen, die aus dem Verdau eines Proteins erzeugten Peptide werden mit theoretischen Peptidmassen aus der Datenbank verglichen. Der Grad der Übereinstimmung ergibt die Signifikanz der Datenbanksuche.

Da das Prinzip des PMF auf dem Vergleich von *Massen* einzelner Peptide und nicht auf deren *Aminosäuresequenz* basiert, ist die Gefahr eines falsch positiven Datenbanksuchergebnisses bei ungenügender Massengenauigkeit und ungenauer Kalibrierung stark erhöht. Die wichtigsten Parameter, die bei einer Datenbanksuche eine Rolle spielen sind:

- Peptidmassenliste (wird in der Regel durch die Gerätesoftware generiert)
- Definition des verwendeten Spaltungsreagenz (z.B. Trypsin, Chymotrypsin, CNBr)
- Fehlertoleranz (in ppm oder Da)
- Fixe oder variable chemische Modifikationen von Peptiden (z.B. Methionin-Oxidation oder alkylierte Cysteine)
- Auswahl der Datenbank

2.2.2.2 *Proteinidentifizierung mittels MS/MS Experimenten*

Unterschiede in den Aminosäurezusammensetzungen oder chemische Modifikationen innerhalb der Sequenz können zu Peptiden mit gleicher molekularer Masse führen. Für eine sichere Proteinidentifizierung mittels *Peptide Mass Fingerprinting* ist daher die gleichzeitige Messung mehrerer Peptide aus einem Protein erforderlich, da die Identifizierungswahrscheinlichkeit mit der erreichten Sequenzabdeckung ansteigt. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz von Peptiden ermöglicht dagegen den eindeutigen Nachweis eines Proteins. Sie wird vor allem in Fällen eingesetzt, wo eine Identifizierung mittels PMF aufgrund nicht ausreichender Menge an Peptiden keine eindeutigen Ergebnisse liefert. Dabei ist die hier erreichte Sequenzabdeckung des Proteins sekundär, da die Information über die Aminosäurereihenfolge gegenüber anderen Peptiden eine gewisse Filterfunktion besitzt. Für die Sequenzierung von Peptiden werden die weiter oben bereits beschrieben Tandem- oder Hybridmassenspektrometer eingesetzt. Nach Auswahl der gewünschten Peptide werden diese zunächst im Massenspektrometer selektiert und anschließend fragmentiert. Von den dabei entstandenen Fragmenten wird erneut ein Massenspektrum aufgenommen, anhand dessen sich die Sequenz des untersuchten Peptids, bzw. Partialsequenzen, ermitteln lassen (vgl. CID). Bei einer Datenbankabfrage erreicht man anschließend durch Angabe der zuvor bestimmten Masse des Vorläuferions und der gemessenen Massen der Fragmentionen (in der Regel Ionen der *y*- und *b*-Ionenserie) ein eindeutiges Suchergebnis. Durch genaues Studium der Ionenmassen lassen sich zudem auch posttranslationale Modifikationen ermitteln, da die Differenzen der Fragmentionen Rückschlüsse auf weitere, chemisch bedingte Masseverschiebungen erlauben (Mann *et al.* (1994), Shevchenko *et al.* (1996b), Shevchenko *et al.* (1997), Mann *et al.* (2003)).

Die Massenspektrometrie hat die chemische Sequenzierung mittels Edman-Chemie nicht nur im Hinblick auf die Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Zeitaufwand nahezu verdrängt. Darüber hinaus bedarf die Sequenzierung mittels CID bis zu einem gewissen Grad keine vorherige Isolierung und Auftrennung der Peptidmischung, da die Selektion der Peptide durch

das Massenspektrometer erfolgen kann. Allerdings basiert der Einsatz der Massenspektrometrie in der Regel auf der Kenntnis der Proteinsequenz oder der Genomsequenz und der Nutzung bioinformatischer Werkzeuge, da häufig nur eine unvollständige Sequenzinformation erhalten wird, die aber in der Regel zusammen mit der Massenbestimmung zu einer Identifizierung des Peptids oder zur Untersuchung und Verifizierung posttranslationaler Modifikationen ausreicht. De-novo-Sequenzierung ist auch heute noch mit größerem Aufwand verbunden.

2.2.2.3 *ShotGun Proteomics und LC-MS/MS*

Ein Nachteil aller gelbasierten Strategien zur Proteomanalyse ist die schlechte Automatisierbarkeit und mitunter mangelnde Reproduzierbarkeit der Elektrophoresegele, was vor allem für die Hochdurchsatzanalyse (*engl.: high-throughput*) von Bedeutung ist. Der individuelle Identifizierungsprozeß für jeden einzeln aufgelösten Proteinspot bleibt auch bei einem vollautomatisierten Arbeitsablauf ein zeitaufwendiges Unterfangen. Weitere Limitierungen wie das z.B. Vorliegen der Proteine in zu geringer Kopienzahl, Inkompatibilitäten besonders hydrophober oder basischer Proteine schränken die Anwendung von 2D-Gelen zusätzlich ein.

Als eine besonders effektive Alternative zu der gelbasierten Analyse hat sich die chromatographische Auftrennung von Proteinverdau mit einer anschließenden massenspektrometrischen Identifizierung erwiesen. Ohne vorherige Auftrennung der Proteine findet in diesem auch „bottom up“ genannten Verfahren ein kompletter in-solutio-Verdau *aller* Proteine statt. Die entstandene (hochkomplexe) Peptidmischung wird in einem nächsten Schritt chromatographisch aufgetrennt und direkt („*on-line*“) in einem Massenspektrometer analysiert. Ziel dieser Methode ist, das gesamte Proteom ohne die Limitierungen des 2D-Gel-Ansatzes qualitativ wie auch quantitativ zu erfassen und charakterisieren zu können.

Auf Grund der Komplexität der Peptidlösung sind die Anforderungen an das Auftrennungs- bzw. Auflösungsvermögen der vorgeschalteten Chromatographie-Einheit sehr hoch. Je schärfer einzelne Peptide auf der Säule getrennt und anschließend eluiert werden, desto übersichtlicher werden die Fragmentspektren und desto signifikanter die Datenbanksuchergebnisse, wobei zu berücksichtigen ist, daß auch eine gewisse Meßzeit zur Erzeugung eines aussagekräftigen MS/MS-Spektrums erforderlich ist. In einer eindimensionalen Chromatographie werden die Peptide mittels Umkehrphasenchromatographie (*Reversed Phase-HPLC, RP-HPLC*) nach ihrer Lipophilie

getrennt und in einem Acetonitril-Gradienten mit steigendem Acetonitril-Gehalt kontinuierlich eluiert.

Hinter der *multidimensional protein identification technology* (MudPIT) steht ein Analysekonzept, welches die komplette Analyse von Proteomen ganzer Zellysate zum Ziel hat. Für diese Applikationen wird die zweidimensionale Flüssigkeitschromatographie eingesetzt. Durch die Vorschaltung einer Ionenaustauschchromatographie (*Strong Cation Exchange, SCX*) zu der RP-HPLC ist es möglich, Peptidgemische zusätzlich nach ihrer Ionenladung aufzutrennen. Dazu wird das Gemisch zunächst an einen stark sauren Kationentauscher gebunden und anschließend in einem stufenweisen Salzgradienten schrittweise eluiert. Die einzelnen Fraktionen können anschließend auf einer RP-Säule entsalzt und in einem Acetonitrilgradienten nach ihrer Hydrophobizität getrennt und analysiert werden. Link *et al.* (1999) demonstrierten anhand der zweidimensionalen Chromatographie die parallele Identifizierung von über 100 verschiedenen Proteinen aus *S. cerevisiae* in einem Reaktionsansatz. Die Ionisierung der Peptide erfolgt bei dem System mittels Elektrospray, da hier eine direkte Kopplung zwischen der Flüssigkeitschromatographie und der Ionisierung der Peptide aus einer Lösung heraus möglich ist. Die Analyse von Proteomen ganzer Organismen mit der zweidimensionalen Chromatographie wurde am Beispiel von *S. cerevisiae* demonstriert (Washburn *et al.* (2001), Washburn *et al.* (2003)). In einem Arbeitsansatz gelang es, knapp 1500 Proteine parallel zu identifizieren. Knapp 10% der analysierten Proteine wurden als integrale Membranproteine identifiziert, was das Potential dieser Technik auch für *Membrane Proteomics* demonstriert (s. Kapitel 2.4.2, „Massenspektrometrische Analytik von Membranproteinen“). Durch Einsatz verschiedener Spaltreagenzien ist es zudem möglich, schwer analysierbare Proteine in die Identifizierung mit einzubeziehen. Darüber hinaus können mit der LC/LC/MS/MS-Technik auch posttranslationale Modifikationen bestimmt werden. Aufgrund der kompletten Erfassung des Proteoms durch einen Verdau ganzer Organismen wird dieses Analyseverfahren auch als *ShotGun-Proteomics* bezeichnet. Neben den Vorteilen des MudPIT-Verfahrens muß berücksichtigt werden, daß zweidimensionale LC-MS/MS Studien ebenfalls sehr zeitaufwendig sind, allerdings mit dem Vorteil, daß das ganze Verfahren automatisierbar ist. Die Auswertung der Meßergebnisse erfordert zudem eine leistungsfähige Bioinformatik-Einheit.

Die flüssigkeitschromatographische Trennung von Peptidmischungen wird sowohl mit einem In-Lösung-Verdau als auch mit einem In-Gel-Verdau nach eindimensionaler SDS-PAGE gekoppelt. Diese Verbindung vereint die Trennleistung und Solubilisierungskapazität der

SDS-PAGE mit den Vorteilen der LC-MS/MS Methode wie Sensitivität und Sequenzierung (Ferro *et al.* (2002), Galeva *et al.* (2002), Simpson *et al.* (2000), Schirle *et al.* (2003), Lasonder *et al.* (2002)).

2.2.2.4 *Quantifizierung von Proteinen*

Obwohl die Massenspektrometrie auch in Kombination mit der Flüssigchromatographie als eine sehr sensitive Methode betrachtet werden kann, bietet sie nicht die Möglichkeit zur Quantifizierung des Analyten. Während bei der Gelelektrophorese durch Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen und speziellen Scannern densitometrische Messungen möglich sind, scheidet diese Option hier aus. Zwar findet man in einem gewissen Konzentrationsbereich einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalintensität, allerdings ergibt sich für jedes Peptid in Abhängigkeit von seiner chemischen Struktur ein unterschiedlicher *Response*-Faktor und Unterdrückungs- und Diskriminierungseffekte durch andere Peptide sind nicht vorhersagbar.

Quantifizierungsstrategien basieren daher stets auf einer vergleichenden Messung zweier Proben unter dem Einsatz stabiler Isotope. Dabei können die Isotope (nachträglich) chemisch an die Probe gebunden werden oder bereits durch den Stoffwechsel in die Proteine inkorporiert werden (z.B. durch Verfüttern von ^{15}N oder ^{13}C haltigen Stickstoffverbindungen, *SILAC – stable isotope labeled amino acids in cell culture*). Das eingebaute Isotop verändert die Masse des Moleküls, ohne dabei die chemischen Eigenschaften des Analyten zu beeinflussen. Im gleichen Meßschritt wird eine zweite, unbehandelte Probe gemessen. Gleiche Peptide oder Proteine erscheinen im Massenspektrum also als Doppelsignale. Bei der Auftrennung über die HPLC eluieren das modifizierte und das nicht modifizierte Peptid nach der gleichen Retentionszeit, geben im Massenspektrometer jedoch zwei Signale. Aus der Integration der Peakflächen läßt sich die Quantität einer Hoch- oder Runterregulierung für ein entsprechenden Proteins schließen. Gygi *et al.* (1999) publizierte mit der *Isotope Coded Affinity Tag*-Methode (ICAT) als erster ein Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie. Weitere Methoden und Anwendungen werden in Lill (2003), Julka *et al.* (2004), Han *et al.* (2001) und Smolka *et al.* (2002) beschrieben.

2.3 Membranproteine und Membranproteinkomplexe

Rund ein Drittel des Genoms speichert die Bauanleitung für Membranproteine (Wallin *et al.* (1998)). Diese bedeutungsvolle Klasse von Proteinen nimmt eine zentrale Rolle bei biochemischen Prozessen wie der Zellhomöostase, des Stofftransports (Ionenkanäle), der Signaltransduktion, den immunologischen Reaktionen oder der Energiegewinnung ein. Besonders aus pharmakologischer Sicht sind Membranproteine in ihrer Eigenschaft als Rezeptoren (z.B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren) oder Ionenkanäle (z.B. Ca^{2+} -Ionenkanal) als Angriffspunkt für Pharmaka pharmazeutisch und medizinisch von hohem Interesse. Die Tatsache, daß zwei Drittel der pharmakologischen Effekte von Arzneistoffen durch Membranproteine vermittelt werden, unterstreicht ihre Bedeutung für den Zellstoffwechsel (Hopkins *et al.* (2002)). Membranproteine lassen sich je nach Struktur und Lokalisation in die zwei Klassen der (1.) peripheren (extrinsischen) und (2.) integralen (intrinsischen) Membranproteine unterteilen. Während integrale Membranproteine in die Lipiddoppelschicht eingelagert sind und einen hohen Anteil an transmembranen Bereichen aufweisen, sind periphere Membranproteine meist nur mit der Membran assoziiert. Die Klassifizierung der Membranproteine wurde in den letzten Jahren etwas verfeinert, so daß zu den beiden Hauptklassen noch weitere Subtypen definiert worden sind. Abb. 2.10 zeigt die Unterschiede zwischen den einzelnen Typen von Membranproteinen.

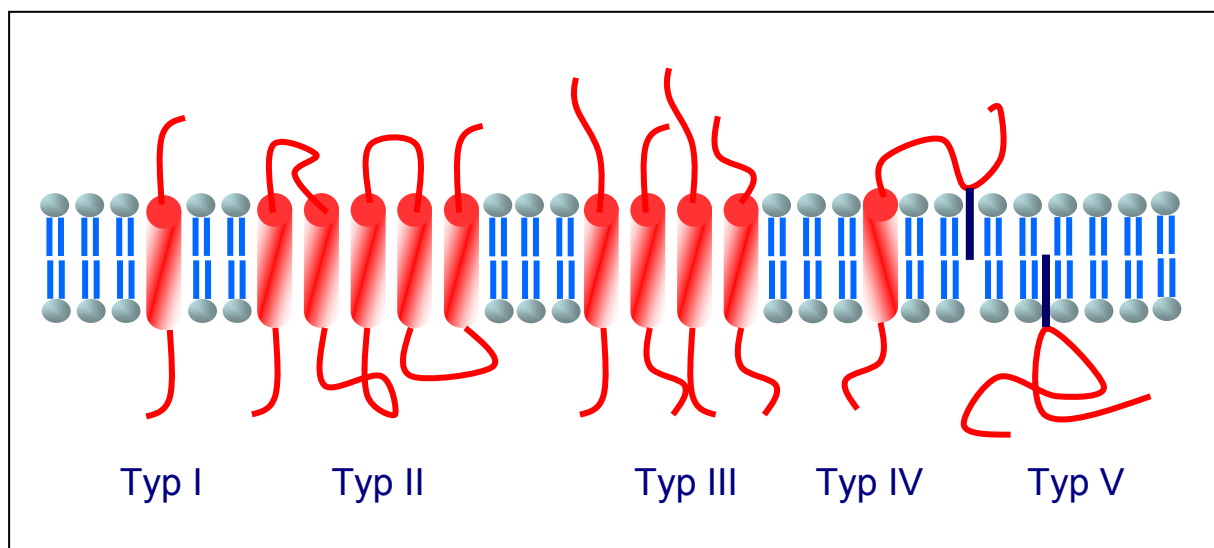


Abb. 2.10 Verschiedene Typen von Membranproteinen

Typ I-IV besitzen transmembrane Segmente und werden als integrale Membranproteine bezeichnet. Typ V ist ein peripheres Membranprotein, welches einen hydrophilen Charakter besitzt und über eine posttranslationale Modifikation mit der Membran assoziiert ist. Beim Typ III organisieren sich die Membrandomänen mehrerer unterschiedlicher Polypeptide, um eine bestimmte Quartärstruktur wie z.B. einen Ionenkanal zu bilden.

Integrale (intrinsische) Membranproteine (Typ I-IV) sind durch transmembrane Domänen charakterisiert, welche vorwiegend aus lipophilen Aminosäuren wie Alanin, Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin bestehen und die Lipiddoppelschicht ein- oder mehrfach durchziehen. Diese aus 22 bis 25 hydrophoben Aminosäuren bestehenden Bereiche verankern über hydrophobe Wechselwirkungen das Protein in der Membran, wobei die Zahl der membrandurchziehenden Segmente von Protein zu Protein stark variieren kann. So findet sich zum Beispiel in *E. coli* die Cytochrom *c* Oxidase I mit 15 Segmenten (Chepuri *et al.* (1990)) neben der NADH Dehydrogenase Untereinheit NuoA (Weidner *et al.* (1993)), welche nur 3 transmembrane Bereiche besitzt.

Strukturell lassen sich die in die Lipiddoppelschicht eingelagerten Polypeptidketten in α -Helices oder β -Faltblätter aufteilen. Bei beiden Strukturmotiven erlaubt die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen eine Stabilisierung der Polypeptidketten. Während die Struktur der α -Helix die Bildung von intramolekularen Wasserstoffbrücken ermöglicht, stabilisieren sich β -Faltblätter über die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Polypeptidketten. Sind die Seitengruppen aller Aminosäuren einer Helix unpolar, so erlauben die hydrophoben Wechselwirkungen mit den umgebenden Lipiden eine Stabilisierung der Helix in der Membran. Wie bei allen Proteinen ist die am häufigsten vorkommende Sekundärstruktur die α -Helix. In diesem Motiv winden sich die Aminosäuren um eine imaginäre Achse, wobei sich in einem Umlauf (360°) 3,6 Aminosäurenreste anordnen. Die Ganghöhe beträgt dabei 0,54 nm. Eine α -helikale Sequenz aus 22 bis 25 Resten ist somit lang genug, um die ca. 3nm dicke Lipiddoppelschicht einmal zu durchziehen. Die Verbindung zwischen den einzelnen hydrophoben Abschnitten der Proteine bilden die hydrophilen Schlaufen (engl. *loops*). Ihre Länge beträgt meist zwischen 10 und 15 Aminosäuren und weist keine geordneten Struktur motive auf (Wallin *et al.* (1998)). Mit Hilfe der Bioinformatik sind verschiedene Algorithmen programmiert und Modelle entwickelt worden, anhand derer die Existenz von α -transmembranen Helices in Membranproteinen vorhergesagt und berechnet werden kann (Moller *et al.* (2001)). Das TMHMM-Programm erlaubt die Vorhersage von TransMembrandomänen anhand des Hidden-Markow-Modell⁵ (HMM) (Krogh *et al.* (2001)). Abb. 2.11 zeigt die graphische Darstellung für die Vorhersage der α -helikalen Domänen der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Untereinheit 4 aus *Bos taurus*. Für das Protein werden 12 membrandurchziehende Abschnitte vorausgesagt. Darüber

⁵ Das Hidden-Markow-Modell ist benannt nach dem russischen Mathematiker A.A. Markow (1856-1922) (Quelle: Wikipedia.com)

hinaus erlaubt die Auswertung der Sequenz mit Hilfe des TMHMM-Programms eine Vorhersage über die Topologie des Proteins.

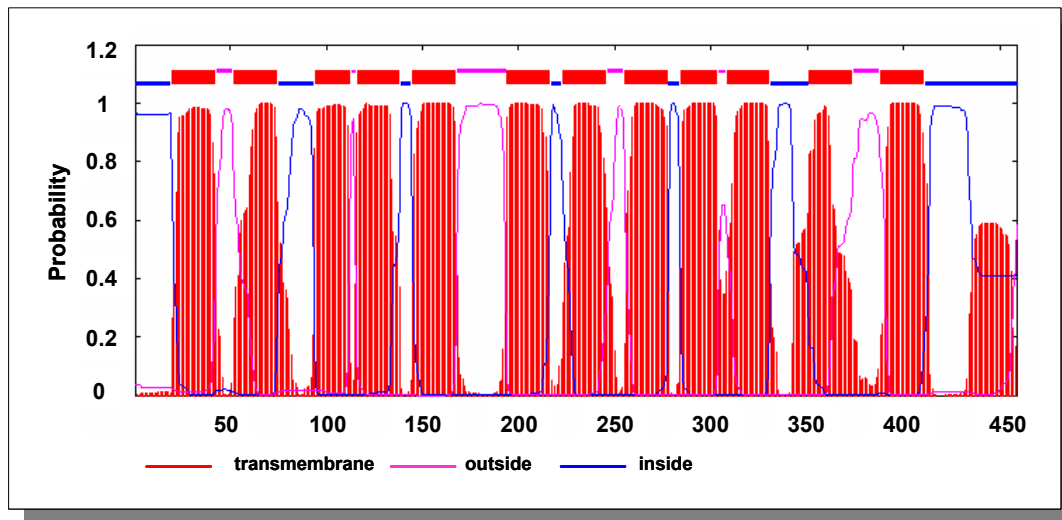


Abb. 2.11 Graphische Ausgabe des TMHMM-Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)

Obwohl die mathematischen Algorithmen eine hohe Zuverlässigkeit erreichen, bilden ihre Ergebnisse nur approximativ die wirkliche Struktur wieder. So kann eine Unterscheidung zwischen einer hydrophoben Signalsequenz und einer wirklichen transmembranen Domäne unter Umständen zu einer Fehlinterpretation der Aminosäuresequenz führen.

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Charakterisierung von Membranproteinen ist der von Kyte und Doolittle vorgestellte Gravy-Score (GRand AVerage hydropathY; (Kyte *et al.* (1982)). Er errechnet sich als arithmetisches Mittel aus sämtlichen Hydrophobizitäten der im Protein enthaltenen Aminosäuren. Je nach ihrer Aminosäurezusammensetzung weisen Proteine positive oder negative Werte auf. Positive GRAVY-Scores deuten auf einen hohen hydrophoben Gesamtcharakter des Proteins hin. Membranproteine, die aus vielen α -helikalen Strukturen aufgebaut und in die Membran eingelagert sind, weisen aufgrund ihrer Lipophilie hohe Werte auf. Zudem ermöglicht der von Kyte und Doolittle vorgestellte Hydropathie-Index die Vorhersage von transmembranen Helices. Finden sich in einem Protein entlang der Aminosäuresequenz ausgedehnte hydrophobe Abschnitte, so deuten diese auf das Vorliegen einer transmembranen Sequenz oder eines hydrophoben Ankers hin. Der Wechsel zwischen hydrophoben und hydrophilen Abschnitten in der Primärstruktur verleiht dem Membranprotein einen amphiphilen Charakter. Mit steigendem Anteil unpolarer Aminosäuren bekommt das Protein einen zunehmenden hydrophoben Gesamtcharakter. Integrale Membranproteine lassen sich nur mit Hilfe von Detergentien, organischen

Lösungsmitteln oder denaturierenden Stoffen aus der Membran herauslösen, wobei diese dabei in ihrer Struktur zerstört wird (Bordier (1981), Fricke (1993)).

Als Detergens werden Verbindungen bezeichnet, die durch einen amphiphilen Charakter in der Lage sind, hydrophile und hydrophobe Phasen zu verbinden. Chemisch lassen sich Detergentien oder Seifen nach verschiedenen Gesichtspunkten sortieren. Der hydrophobe Teil eines Detergensmoleküls kann aus Phenylderivaten (Triton X-100), aliphatischen Kohlenwasserstoffketten (SDS, Octylglucosid) oder einem Steroidgerüst (Chaps, Digitonin) bestehen. Die chemische Natur der polaren Kopfgruppen erlaubt eine Sortierung der Lösungsvermittler in ionische (SDS, CTAB) und nichtionische (Octylglucosid, Digitonin) sowie zwitterionische Moleküle (Chaps, Sulfobetain 3-12). Eine detaillierte Übersicht der zahlreichen Detergentien mit weiterführenden Informationen zu ihrem Einsatz bei der Isolierung von integralen Membranproteinen findet sich in Hunte *et al.* (2003). Ein wichtiger Parameter für den Einsatz von Detergentien bei der Solubilisierung von Membranproteinen ist die kritische Mizellenkonzentration (*engl.: Critical Micelle Concentration, CMC*), ab der sich einzelne Detergenzmoleküle in Lösung zu Mizellen zusammenlagern. Für die Isolierung von integralen Membranproteinen bedarf es Konzentrationen oberhalb der CMC, was bei einer nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchung zu Interferenzen führen kann. Erforderlich ist zuvor die Abtrennung des Detergens, da es ansonsten in Abhängigkeit von der Art und der Konzentration zu einer Reduzierung der Signalstärke, bzw. vollständigem Versagen der massenspektrometrischen Analyse kommen kann (Breux *et al.* (2000), Loo *et al.* (1994); *s. auch 2.4.3, Massenspektrometrische Bestimmung von intakten Membranproteinen*). Die Solubilisierung von hydrophoben Membranproteinen oder Membranproteinkomplexen wird neben der chemischen Natur des Detergens auch von weiteren Faktoren wie Ionenstärke oder pH-Wert des Solubilisierungsmediums bestimmt. Allgemein gültige Regeln für die Isolierung von Membranproteinkomplexen existieren nicht und müssen für jedes System individuell angepaßt werden.

Neben den klassischen α -Helices, die sich spiralförmig durch die Membran ziehen, existiert das β -Faß als ein weiteres häufiges Strukturmotiv von integralen Membranproteinen. In ihm formieren sich 20 oder mehr Transmembransegmente zu β -Faltblattstrukturen, die in ihrer Gesamtheit einen Zylinder bilden. Wie bei der α -Helix stabilisiert sich auch das β -Faß durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Diese Bindungen sind hier jedoch nicht wie bei der α -Helix innerhalb eines Polypeptidstranges zu finden, sondern zwischen benachbarten Strängen. Eine spezielle Klasse von integralen Membranproteinen, die Porine, besitzen vielsträngige β -Fässer, die die polare Pore durch die Membran auskleiden. Auf diese

Weise ist es der Zelle oder dem Subkompartiment möglich, für einen Stoffaustausch mit der Umgebung zu sorgen. So sind Aquaporine zum Beispiel für den Wassertransport durch die Membran verantwortlich. Die Sequenzanalyse solcher Proteine ergab, daß die transmembranen Bereiche neben den hydrophoben Aminosäuren auch polare Aminosäuren enthalten. Die räumliche Anordnung ergibt letztlich einen hydrophilen Kanal, während die nichtpolaren Aminosäuren über die hydrophoben Wechselwirkungen das Protein in der Lipiddoppelschicht verankern. Integrale Membranproteine, deren Sekundärstruktur aus β -Faltblättern aufgebaut ist, zeigen im Vergleich zu α -helikalen Membranproteinen größtenteils nur einen moderat hydrophoben Gesamtcharakter (Gravy-Score) (Santoni *et al.* (2000)). Methoden zur Berechnung und Vorhersage von β -Faltblattmotiven als transmembrane Domäne finden sich in Bigelow *et al.* (2004).

Periphere oder membranassoziierte Membranproteine vom Typ V sind nur im weiteren Sinne als Membranprotein zu definieren. Diese Polypeptide können über posttranslationale Modifikationen, wie z.B. über einen Lipidrest mit der Membran verbunden sein. Zur Isolierung dieser Proteine, muß der Lipidanker zunächst enzymatisch vom Protein abgelöst werden, wobei die Struktur der Lipiddoppelschicht erhalten bleibt. In ihrer chemischen Natur entsprechen die peripheren Membranproteine eher den cytosolischen, löslichen Proteinen und zeigen auch bei ihrer Isolierung ein entsprechendes Verhalten. Weitere periphere Membranproteine sind nur über elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken zu den hydrophilen Domänen der integralen Membranproteine oder den polaren Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht mit der Membran verbunden. Einflüsse wie pH-Wertänderungen, die Variation der Ionenstärke oder die Zugabe von EDTA zu der solubilisierten Membran schwächen diese Wechselwirkungen und sind in der Lage, solche Proteine von der Membran abzulösen (Taylor *et al.* (2000), Howell *et al.* (1982)). Eine ausführliche Anleitung zur Isolierung und Reinigung von Membranproteinen geben Hunte *et al.* (2003). Der Unterschied zwischen integralen und peripheren Membranproteinen kann mit dem Aufbau des *bc₁-Komplexes* aus dem Rinderherzmitochondrium verdeutlicht werden. Die Core Proteine 1 und 2 zeigen keinerlei Interaktion mit der Lipidmembran, sind aber nonkovalent mit dem in die Membran eingelagerten integralen Protein Cytochrom *b* assoziiert (Iwata *et al.* (1998)). Das Cytochrom *b* besitzt 9 transmembrane Helices und zählt zu den besonders hydrophoben integralen Membranproteinen.

2.3.1 Mitochondriale Atmungskette

Die fünf Proteinkomplexe der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) sind in der inneren Membran des Mitochondriums lokalisiert und haben ihre Funktion in der zellulären Energieumwandlung. Dabei wird das aus der Glykolyse oder Fettsäureoxidation gewonnene Acetyl-Coenzym A zunächst im Citratzyklus unter Gewinnung von Reduktionsäquivalenten wie NADH und FADH₂ verstoffwechselt. Die finale Energiegewinnung erfolgt durch die Übertragung der Elektronen von NADH oder FADH₂ auf das Multienzymkomplexsystem. Die Synthese des Energieäquivalentes Adenosintriphosphat (ATP) in der oxidativen Phosphorylierung wird durch den letzten Komplex der Atmungskette, der F₁F₀-ATP Synthase (Komplex V) katalysiert (Hatefi (1985)). Abb. 2.12 zeigt den dritten und letzten Schritt der ATP-Synthese, die Transportkaskade der Elektronen von Komplex I (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase) bis hin zur ATP-Gewinnung durch den Komplex V. Die weiteren Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette bilden die Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), die Ubichinol:Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Komplex III) sowie die Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV).

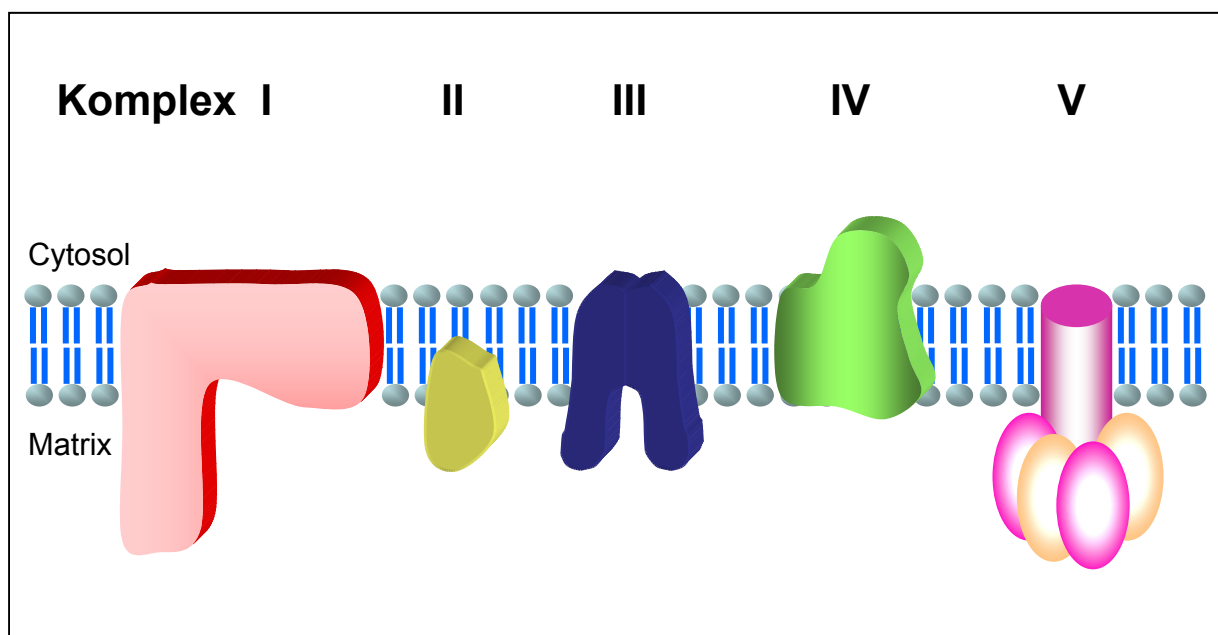


Abb. 2.12 Mitochondriale Atmungskette

NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), Ubichinol:Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Komplex III), Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV), F₁F₀-ATP Synthase (Komplex V)

Die einzelnen Enzymsysteme bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl an Untereinheiten. Während der Komplex I mit 46 Polypeptidketten und einer Masse von rund 1000kDa die größte funktionelle Einheit bildet (Carroll *et al.* (2003)), sind die weiteren Enzyme beim Säuger aus 4, 11, 13 bzw. 16 Untereinheiten zusammengesetzt (Kadenbach *et al.* (1983), Walker *et al.* (1991), Schägger *et al.* (1986)). Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die stöchiometrische Zusammensetzung sämtlicher Atmungskettenkomplexe.

Tabelle 2.3 Tabellarischer Vergleich der Zusammensetzung der einzelnen Atmungskettenkomplexe
(mtDNS: mitochondriale DNS; nukDNS: nukleäre DNS)

	Proteine	mtDNS	nukDNS	Bakterien
Komplex I	46	7	39	7+7
Komplex II	4	0	4	0+3
Komplex III	11	1	10	1+2
Komplex IV	13	3	10	3+1
Komplex V	16	2	14	2+6
Total	90	13	77	13+19

Als eine biologische Besonderheit sind die Atmungskettenkomplexe der Säugermitochondrien (mit Ausnahme des Komplexes II) aus Untereinheiten zusammengesetzt, die von zwei verschiedenen Genomen kodiert werden. Während 77 der insgesamt 90 Proteine durch die nukleäre DNS codiert sind und erst nach erfolgter Proteinbiosynthese im Cytosol zu den Mitochondrien transportiert werden, trägt die mitochondriale DNS die Information für die 13 restlichen Untereinheiten. Diese mitochondrial kodierten Proteine sind ND1-ND6, ND4L (Komplex I), Cytochrom *b* (Komplex III), COX I-III (Komplex IV) sowie Protein 6 und 8 (Komplex V). Allen Untereinheiten aus der mitochondrialen DNS sind ein starker hydrophober Gesamtcharakter und eine hohe Zahl transmembraner Segmente gemeinsam. Sie bilden somit die integralen Anker der Komplexe, während die anderen Komponenten sich in der Klasse der assoziierten Membranproteine einordnen lassen. Neben den mitochondrial kodierten Proteinen finden sich auch Komplexproteine, die nur über eine transmembrane Helix verfügen. Eine Tabelle mit der Übersicht aller in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine findet sich im Anhang (Tabelle 8.1). Eine tabellarische Übersicht über die mitochondrial kodierten Untereinheiten aus den Komplexen I, III, IV und V des Rinderherzmitochondriums folgt in Tabelle 2.4.

Tabelle 2.4 Übersicht über die mitochondrial kodierten hydrophoben Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V

Komplex	Protein	Swiss-Prot	MW (kDa)	Gravy-Score	TMH	TMH/kDa
I	ND1	P03887	35,7	0,798	8	0,22
I	ND2	P03892	34,7	0,785	8	0,23
I	ND3	P03898	13,1	0,863	3	0,23
I	ND4	P03910	52,1	0,826	12	0,23
I	ND5	P03920	68,3	0,637	14	0,21
I	ND6	P03924	19,1	1,031	5	0,26
I	ND4L	P03902	10,8	1,259	2	0,19
III	Cytochrom <i>b</i>	P00157	42,7	0,680	9	0,21
IV	COX I	P00396	56,9	0,685	12	0,21
IV	COX II	P00404	26,0	0,247	2	0,08
IV	COX III	P00415	29,9	0,413	6	0,20
V	Protein 6	P00847	24,8	0,924	6	0,24
V	Protein 8	P03929	7,9	0,083	1	0,13

Aufgrund des Fehlens von Mitochondrien bei Bakterien sind die Enzymkomplexe hier in der Zellmembran lokalisiert. Der entscheidende Unterschied zwischen den Säuger- und Bakterienenzymssystemen besteht neben der Lokalisation in der Anzahl der Untereinheiten. Aus Tabelle 2.3 ist zu entnehmen, daß Säuger im Vergleich zu Bakterien über eine komplexere Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe verfügen. Die Variabilität beschränkt sich dabei jedoch nur auf die Anzahl der nukleär kodierten Komponenten, was einen Hinweis auf die Endosymbiontentheorie⁶ liefert.

Frühe Untersuchungen an den Komplexen der Atmungsketten gaben erste Hinweise auf die Organisation der Enzymsysteme in supramolekularen Strukturen (Fowler *et al.* (1963), Ragan *et al.* (1978)). Neuere Studien an isolierten Atmungskettenkomplexen aus Rinderherzmitochondrien, *Saccharomyces cerevisiae* oder *Paracoccus denitrificans* stützen die Theorie, wonach sich Atmungskettenkomplexe in der Membran zu Membranproteinsuperkomplexen assemblieren und nicht zufällig in der Membran verteilt sind (Schägger *et al.* (2000), Schägger (2001), Schägger (2002) Stroh *et al.* (2004)). Darüber

⁶ Die Endosymbiontentheorie besagt, daß eine Reihe von Zellorganellen in den Zellen von Eukaryonten durch Einverleiben oder Fusion von verschiedenen Organismen entstanden seien. Danach haben frühe eukaryontische Zellen aerobe Prokaryonten einverleibt, woraus die Mitochondrien entstanden sind. Die Hypothese wurde erstmals 1905 von dem russischen Evolutionsbiologen Konstantin Sergejewitsch Mereschkowski formuliert. Doch erst seit ihrer Verbreitung durch Lynn Margulis seit 1971 wurde sie bekannter.

hinaus konnte auch an *Arabidopsis thaliana* und *Solanum tuberosum* gezeigt werden, daß Superkomplexe auch in Pflanzen existieren (Eubel *et al.* (2004), Eubel *et al.* (2003)). Die physiologische Bedeutung dieser auch als Respirasom bezeichneten supramolekularen Organisation der Komplexe ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Erste Arbeiten deuten auf den Aspekt des *Substrat Channelings* hin, wonach die enge räumliche Bindung den Ablauf von enzymatischen Reaktionen und die Weiterleitung von Substraten stark verbessert (Spivey *et al.* (1999), Schägger (2001), Bianchi *et al.* (2004)). Die Bedeutung der Assemblierung von Einzelkomplexen zu Superkomplexen für ihre biologische Aktivität zeigen z.B. Schägger (2001) und Stroh *et al.* (2004). Ohne die Ausbildung von Superkomplexen ist keine stabile Assemblierung des Komplexes I möglich (Schägger *et al.* (2004), Acin-Perez *et al.* (2004)).

Auch aus medizinischer Sicht besitzt die Forschung am mitochondrialen Proteom einen hohen Stellenwert. Die Enzymsysteme dieser Organelle spielen eine zentrale Rolle beim Energiestoffwechsel der Zelle, und eine Vielzahl von Krankheiten sind mit Mutationen und Defekten in der mitochondrialen Erbsubstanz bzw. deren Proteinzusammensetzung assoziiert (Westermann *et al.* (2003), Schapira (1998), Robinson (1998)).

2.4 Membrane Proteomics

Membrane Proteomics beschreibt eine Spezialisierung oder Subgruppierung innerhalb der globalen *Proteomics-Forschung*. In ihr sind ausschließlich Membranproteine und deren Interaktionspartner Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Gemessen an dem hohen Anteil an genetischer Information, der den Membranproteinen zuzuordnen ist, sind hydrophobe Membranproteine bei den Identifizierungen jedoch stark unterrepräsentiert (Santoni *et al.* (2000)).

Analytisch bedient sich der Zweig *Membrane Proteomics* nahezu komplett aus dem Methodenspektrum der Proteomanalytik löslicher Proteine, das auch für die Analyse hydrophober Proteine eingesetzt wird. Integrale Membranproteine - besonders solche mit einem hohen Anteil an transmembranen Domänen - sind jedoch auch massenspektrometrisch um ein Vielfaches schwieriger zu analysieren als wasserlösliche Proteine. Die Probleme bei der Anwendung gängiger Protokolle zur Probengewinnung und Präparation bedingt durch ihre schlechte Löslichkeit sowie ihre hohe Aggregationsneigung machen diese Proteine bis heute zu einer besonderen Herausforderung für die Wissenschaft (Wu *et al.* (2003b)). Neben der speziellen Analytik ausgewählter Membranproteine findet sich in der Literatur auch die Erfassung ganzer Membranproteome verschiedener Organismen oder Zelllinien (Aivaliotis *et al.* (2004), Blonder *et al.* (2004c), Blonder *et al.* (2004a), Klein *et al.* (2004)). Dabei spielen neben gelelektrophoretischen Techniken auch zunehmend HPLC-MS/MS- bzw. *ShotGun*-Methoden für die Identifizierung besonders hydrophober Membranproteine zunehmend eine Rolle (Rabilloud (2003)).

2.4.1 Gelelektrophoretische Techniken

Die 1D-SDS-PAGE ist das einfachste und effektivste System zur Auftrennung einfacherer Proteinmischungen. Da die stark denaturierende Wirkung von SDS selbst hydrophobe Membranproteine solubilisiert, lassen sich Membranproteine ohne besonderen Aufwand im Gel auftrennen. Die weiter oben bereits vorgestellte zweidimensionale Gelelektrophorese, Methode der Wahl für die Auftrennung komplexer Proteinmischungen, ist für die Analyse von integralen Membranproteinen allerdings nur begrenzt einsetzbar (Santoni *et al.* (2000)). Ihre begrenzte Anwendbarkeit ist in erster Linie auf die geringe Löslichkeit der integralen Membranproteine unter den Bedingungen der isoelektrischen Fokussierung zurückzuführen. Durch die Verwendung von hohen Konzentrationen an Harnstoff bzw. Thioharnstoff in Kombination mit Detergenzien im Probenpuffer gelingt es zwar, die Proteine in wäßrigen

Medien in Lösungen zu halten, doch treten während der isoelektrischen Fokussierung Komplikationen auf, die zu einem Aggregieren und Ausfällen der Proteine führen. Natriumdodecylsulfat (SDS), welches als das effektivste Detergenz zur Solubilisierung von Proteinen (einschließlich der Membranproteine) gilt, läßt sich aufgrund seiner negativen Ladung und der damit verbundenen Ionenstärke nur bis zu einer maximalen Konzentration von 0,25% für die isoelektrische Fokussierung einsetzen (Harder *et al.* (1999)). Während der isoelektrischen Fokussierung löst sich das Detergenz im elektrischen Feld aufgrund seines anionischen Charakters vom Protein, was im schlimmsten Fall zu einem Ausfällen der Proteine führen kann. Um dieses Problem zu umgehen, werden neben den „klassischen“ IEF-kompatiblen Detergenzien wie Triton X-100, NP-40 oder CHAPS vermehrt neue zwitterionische Detergenzien vom Amidosulfobetain-Typ erfolgreich eingesetzt (Chevallet *et al.* (1998), Luche *et al.* (2003)). Hinzu kommt, daß Membranproteine für ihre Solubilisierung mit Detergentien hohe Ionenstärken benötigen, welche zu Interferenzen mit der isoelektrischen Fokussierung führen. Die Autoren betonen zwar die Fortschritte durch die Kombination von Harnstoff und Thioharnstoff mit diesen neuen Lösungsvermittlern, doch gelang es ihnen bislang nur, moderat hydrophobe Proteine mit GRAVY-Werten von maximal 0,37 im 2D-Gel zu detektieren. So konnten durch den Einsatz von Sulfobetainen verschiedene integrale Membranproteine der äußeren Membran (*OMP - Outer Membrane Protein*) von *E. coli* isoliert werden. Diese zu der Klasse der β -Faltblattproteine gehörenden integralen Membranproteine weisen trotz einer hohen Anzahl an Helices nur eine geringe Hydrophobizität auf oder zeigen negative GRAVY-Scores (Molloy *et al.* (2000)), Molloy *et al.* (2001)). Die Detektion von zwei hydrophoben Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* gelang nur durch Detektion mittels Western-Blot, nicht aber durch eine massenspektrometrische Identifizierung (Santoni *et al.* (1999)). Eine Aufstellung über bisher mit 2D-PAGE aufgetrennte und identifizierte Membranproteine geben Molloy (2000) und Santoni *et al.* (2000). Die Mehrheit der identifizierten Membranproteine besitzt trotz eines hohen Anteils an transmembranen Domänen negative oder moderat hydrophobe Gravy-Scores. Bei vielen der isolierten Proteine gelang es erst, sie durch modifizierte Protokolle oder nach besonderen Aufkonzentrationsschritten zu detektieren. Andere wurden nach erfolgter Fokussierung im IPG-Streifen nachgewiesen, entzogen sich aber in der 2. Dimension der Detektion. Untersuchungen anhand von farbstoffmarkierten Membranproteinen belegen, daß in der ersten Dimension zwar eine gewisse Fokussierung stattfindet, jedoch sämtliche Proteine beim Übergang in die zweite Dimension verloren gehen (Klein *et al.* (2004)). In der Literatur finden sich eine Vielzahl von Studien zur gelelektrophoretischen Analyse von

Membranproteomen, doch zeigt der Vergleich der identifizierten Proteine, daß dabei nahezu ausschließlich extrinsische Membranproteine detektiert werden, die einen negativen Gravy-Score besitzen (Lehner *et al.* (2003), Lescuyer *et al.* (2003), Galeva *et al.* (2002), Molloy *et al.* (2000), Molloy *et al.* (2002)). Die gelelektrophoretische Auftrennung der integralen Membranproteine des Atmungskettenkomplexes I aus *B. taurus* gelang auch nach Aufkonzentrierung und dem Einsatz von zwitterionischen Detergenzien vom Amidosulfobetain-Typ im 2D-Gel nicht (Carroll *et al.* (2003)). Die sieben integralen Proteine vom „ND“-Typ, die zwischen 2 und 14 transmembrane Helices besitzen und Gravy-Scores zwischen 0,6 und 1,3 aufweisen, konnten nur im klassischen 1D-SDS Gel aufgetrennt und detektiert werden. Gleiches wurde bei der Analyse des Komplex I aus *Yarrowia lipolytica* beobachtet (Abdrakhmanova *et al.* (2004)). In der Literatur findet sich bis heute kein Experiment, welches besonders hydrophobe Membranproteine mit Gravy-Scores größer als 0,4 zweidimensional gelelektrophoretisch auftrennt und eine massenspektrometrische Identifizierung beschreibt. Der GRAVY-Score als Hydrophobizitätsindex eignet sich somit als ein sehr guter Parameter zur Einschätzung des Auflösungsvermögen von integralen α -helikalen Membranproteinen in einem 2D-Gel (Wilkins *et al.* (1998)). Proteine, die einen GRAVY-Score größer als 0,4 besitzen, sind auf 2D-Gelen nicht zu detektieren (Pedersen *et al.* (2003)). Abb. 2.13 zeigt am Beispiel des Hefe-Proteoms, daß die Hydrophobizitätsverteilung eines Proteoms annähernd einer Gauss'schen Normalverteilung entspricht. Der rot eingerahmte Bereich zeigt den Auflösungsbereich der IEF/SDS-2D-PAGE als eine Funktion des GRAVY-Scores. Der Hauptanteil des Hefe-Proteoms erstreckt von ca. -1,1 bis ca. +0,3, was für einen überwiegend wasserlöslichen Charakter der Proteine spricht. Die ungefähre Grenze bei +0,3 liefert somit eine mögliche Erklärung für das Fehlen von integralen Membranproteinen mit hohen Gravy-Scores in einem 2D-Gel.

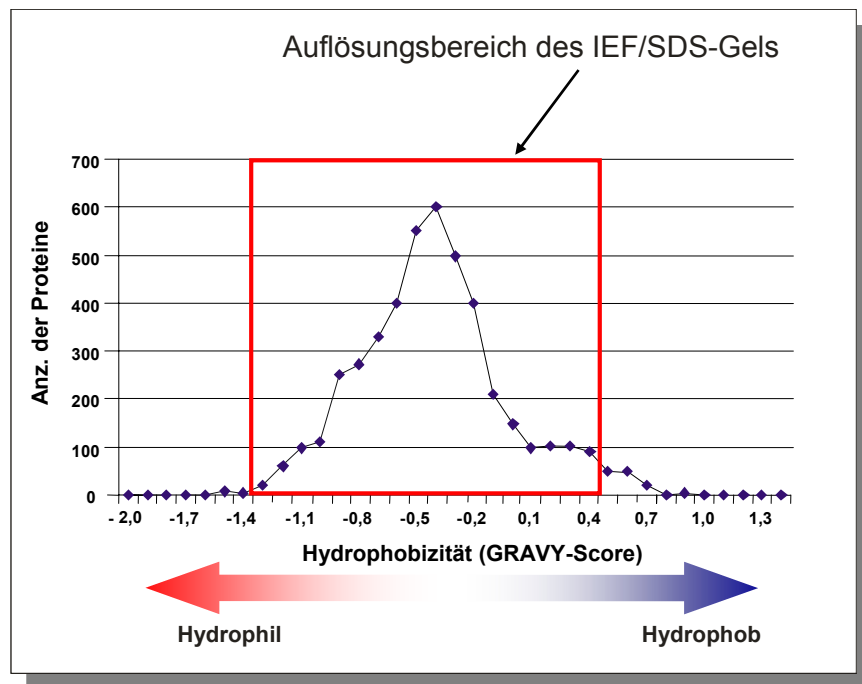


Abb. 2.13 Hydrophobizitätsverteilung des Hefe-Proteoms

Die Mehrheit des Proteoms besitzt hydrophilen oder moderat hydrophoben Charakter. Der rote Rahmen grenzt den Auflösungsbereich der 2D-PAGE ein. Besonders hydrophobe Proteine lassen sich mit der Kombination aus IEF und SDS nicht mehr auftrennen (modifiziert nach Pedersen *et al.* (2003)).

Eine leistungsstarke und weitverbreitete Gelelektrophorese-Technik zur Isolierung von Membranproteinkomplexen ist die von Schägger entwickelte Blau-Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE) (Schägger & von Jagow, 1991/1994). Das Prinzip der BN-PAGE basiert auf der Beeinflussung der Nettoladung von solubilisierten Proteinkomplexen durch den blauen, negativ geladenen Coomassie-Farbstoff und deren Auftrennung im Acrylamidgel. Proteine bzw. Membranproteinkomplexe aus biologischen Membranen werden zunächst mit nichtdenaturierenden Detergentien wie Digitonin oder Laurylmaltosid solubilisiert und anschließend mit dem negativ geladenen, hydrophoben Farbstoff Coomassie Blau versetzt. Alle Proteine, die diesen Farbstoff binden, wandern unter Beibehaltung ihrer Quartärstruktur und enzymatischen Aktivität bei einem pH von 7,5 nach Anlegen einer Spannung zur Anode. Durch die Abwesenheit von denaturierenden Detergentien können die intakten Komplexe in einem Gradientengel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Eine nachfolgende orthogonale Kombination der BN-PAGE mit einem denaturierendem SDS-Gel als zweite Dimension ermöglicht es, die nativ aufgetrennten Komplexe in ihre Untereinheiten auftrennen (Schägger *et al.* (1994), Devreese *et al.* (2002), Brookes *et al.* (2002)). Sun *et al.* (2003) demonstrierte anhand des Komplex III aus dem Rattenherzmitochondrium die massenspektrometrische

Analyse des intakten Komplexes nach Auftrennung im BN-Gel. Neben den OXPHOS-Komplexen aus *B. taurus* wurden anhand der BN-PAGE auch die Atmungskettenkomplexe aus Hefe und Pflanzen über BN-SDS-PAGE aufgetrennt und massenspektrometrisch identifiziert (Arnold *et al.* (1998), Jansch *et al.* (1996), Eubel *et al.* (2004), Burrows *et al.* (1998), Rexroth *et al.* (2003)). Neben der Anwendung zur Auftrennung von Membranproteinkomplexen findet die BN-Gelelektrophorese auch bei der Analyse von nukleären oder cytosolischen Proteinkomplexen Anwendung (Camacho-Carvajal *et al.* (2004), Claeys *et al.* (2005)). Eine weitere zweidimensionale Gelelektrophoresetechnik zur Auftrennung von Membranproteinen ist die 16-BAC/SDS-PAGE. Diese orthogonale Kombination aus zwei Acrylamidgelen mit den denaturierenden Detergentien 16-BAC in der ersten und SDS in der zweiten Dimension erlaubt die Isolierung von Membranproteinen aus komplexen Proteinmischungen (Hartinger *et al.* (1996), Langen *et al.* (2000), Coughenour *et al.* (2004), Dreger *et al.* (2001)). Problematisch scheint bei dieser Form der 2D-PAGE der Wechsel vom kationischen 16-BAC aus der ersten Dimension zu dem anionischen SDS in der zweiten Dimension zu sein. Durch Interaktionen beim Detergenzwechsel kann es beim Übergang von der ersten zur zweiten Dimension zu Proteinverlusten kommen (Santoni *et al.* (2000)). Neben den gelelektrophoretischen Isolierungsverfahren finden auch Methoden wie die Sucrosegradientenzentrifugation in Kombination mit der ein- oder zweidimensionalen Gelelektrophorese Anwendung (Hanson *et al.* (2001), Taylor *et al.* (2002), Taylor *et al.* (2003), Gaucher *et al.* (2004)). Membranproteinkomplexe aus den Fraktionen des Sucrosegradienten lassen sich nach ihrer Isolierung gelelektrophoretisch auftrennen und anschließend massenspektrometrisch nachweisen.

Wie das gesamte Proteom, werden auch Membranproteine in Abhängigkeit von Zellstatus, Stoffwechsellage und weiteren Faktoren unterschiedlich stark exprimiert. Während die Atmungskettenkomplexe des Säugermitochondriums oder die Photosynthesekomplexe aus den Chloroplasten der Pflanzen zur Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes stets in hoher Kopienzahl vorliegen, werden bestimmte Membranproteine wie Rezeptoren nur fakultativ exprimiert. Bei der Untersuchung von Membranproteomen ist zu berücksichtigen, daß auch hier nicht alle Komponenten zu einem bestimmten Zeitpunkt mit gleicher Quantität exprimiert werden oder in hoher Kopienzahl pro Zelle vorliegen, was die Analyse von Membranproteinen zusätzlich erschwert. *Low abundant*-Proteine, die in geringer Kopienzahl vorliegen, benötigen für eine Visualisierung im 2D-Gel sehr sensitive Detektionsmethoden. Eine vorgeschaltete selektive Fraktionierung und Anreicherung von niedrig konzentrierten Proteinen erleichtert auch bei Membranproteinen die Detektion und Identifizierung.

2.4.2 Massenspektrometrische Analytik von Membranproteinen

Die vielfach diskutierte Problematik bei der Arbeit mit Membranproteinen erfordert auch für die massenspektrometrische Analyse besondere Vorgehensweisen. Bedingt durch den hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren kommt es zu Inkompatibilitäten mit etablierten Präparations- und Analyseprotokollen. Einen umfassenden Überblick über den Einsatz der Massenspektrometrie im Bereich *Membrane Proteomics* findet sich in Wu *et al.* (2003a) und Wu *et al.* (2003b).

Wie zu Beginn von Kapitel 2.4 erwähnt, verwendet *Membrane Proteomics* Techniken herkömmlicher Proteomics-Analysen. Gelelektrophoretisch isolierte Proteine können mit Hilfe von Enzymen oder chemischen Spaltungsreagenzien in Fragmente zerlegt und diese massenspektrometrisch mittels MALDI- oder ESI-MS identifiziert werden. Problematisch ist hierbei jedoch folgender Aspekt: Das für die Proteomanalytik am häufigsten eingesetzte Enzym Trypsin schneidet nur C-terminal von Arginin und/oder Lysin. Die positiven Eigenschaften von Trypsin (hohe Effizienz und sehr gute Spezifität) als Enzym zur Spaltung der Proteine spielen bei der Analytik von integralen Membranproteinen nur eine untergeordnete Rolle. Ein hoher Anteil an transmembranen α -Helices bedingt das Vorliegen von langen, hydrophoben Abschnitten, die aus neutralen bzw. lipophilen Aminosäuren aufgebaut sind und sich daher der Analyse entziehen. Durch den Mangel an Schnittstellen entstehen hydrophobe Fragmente mit einem großen Molekulargewicht, die sich massenspektrometrisch nur schwer analysieren lassen. Positive Identifizierungen von Membranproteinen basieren daher meistens auf der Sequenzierung von kleinen wasserlöslichen Fragmenten, die aus den hydrophilen Kontaktsequenzen zwischen den Helices entstammen. Intakte transmembrane Helices oder Fragmente davon finden sich nur vereinzelt unter den identifizierten Peptiden. Systematische Studien belegen, daß Fragmente aus α -helikalen Domänen im Vergleich zu Peptiden aus Proteinen mit β -Faltblatt-Strukturmotiven bei massenspektrometrischen Analysen unterrepräsentiert sind. Als Grund hierfür wird die Länge und die Hydrophobizität der tryptischen Peptide angeführt (Eichacker *et al.* (2004)). Die Verwendung von Bromcyan für eine massenspektrometrische Analyse von Rhodopsin als integrales Membranproteinen demonstrieren Kraft *et al.* (2001) und Ablonczy *et al.* (2001). Aufgrund des häufigen Vorkommens der Aminosäure Methionin eignet sich dieses Spaltungsreagenz besonders bei der Anwendung bei integralen Membranproteinen. Van Montfort *et al.* (2002a, b) kombinieren das Enzym Trypsin mit dem chemischen Spaltungsreagenz Bromcyan, welches C-terminal von Methionin schneidet. Große tryptische Fragmente werden so erneut an einer anderen Position gespalten. Als Ergebnis konnte die

Sequenzabdeckung der α -helikalen transmembranen Helices gesteigert werden, während der Anteil an hydrophilen Peptiden gleich blieb. Der Einsatz des nichtionischen Detergenz Octyl- β -Glucosid (OBG) zum Zwecke einer verbesserten Elution von hydrophoben Peptiden hatte nur auf die hydrophilen Peptide Einfluß, führte aber nicht zu einem Anstieg der Sequenzabdeckung von transmembranen Helices (van Montfort *et al.* (2002)).

Basierend auf dem von Washburn *et al.* (2001) vorgestellten *MudPIT*-Ansatz zur Erfassung komplexer Proteome, in dem mehr als hundert integrale Membranproteine identifiziert wurden, sind *ShotGun*-Applikationen auch auf die Analyse von Membranproteinen angewendet worden. Im Gegensatz zu der Solubilisierung der Proteine in 90% Ameisensäure und ihrer nachfolgenden Spaltung mit Bromcyan (Washburn *et al.* (2001)) findet bei den *ShotGunProteomics* Untersuchungen von Membranproteinen auch Trypsin Verwendung. Die Proteine werden dazu vorher entweder in Detergenz gelöst (Han *et al.* (2001)) oder durch Einsatz von 60% Methanol extrahiert und in Lösung gebracht (Blonder *et al.* (2002), Blonder *et al.* (2004c), Goshe *et al.* (2003)). Eine Kombination aus verschiedenen Enzymen und Reagenzien zur Identifizierung der integralen Membranproteine evaluieren Wu *et al.* (2003b). Die aus der kombinierten Spaltung mit Trypsin, LysC und Bromcyan entstandenen Fragmente werden mittels LC-MS/MS aufgetrennt und analysiert. In anderen Protokollen werden Membranproteine oder ihre tryptischen Spaltprodukte in Säuren solubilisiert und anschließend mit der unspezifischen Protease Pepsin erneut gespalten (Han *et al.* (2004)). Das Umgehen der gelelektrophoretischen Auftrennung und die damit verbundene problematische Elution der Peptide aus dem Gel macht diese Methode unentbehrlich für die Analyse großer, hydrophober Fragmente. Dabei werden unter Einsatz von flüssigkeitchromatographische Systemen Sequenzabdeckungen von 100% erreicht, was die gleichzeitige Detektion und Analyse von transmembranen Helices bedeutet (Han *et al.* (2004), Hixson *et al.* (2002)). Neben dem Ziel der Identifizierung eines Proteins, zeigten Wu *et al.* (2003a) in einem besonderen Verdauprotokoll auch das Potential dieser *ShotGun*-Technik zur Charakterisierung von (Membran)Proteinen, was die Erfassung von posttranslationalen Modifikationen mit einschließt. Die Verwendung der unspezifischen Protease Proteinase *K* unter stark alkalischen Bedingungen generiert Peptide, die sich in ihren Sequenzabdeckungen stark überlappen. Die Durchführung von MS/MS-Experimenten ermöglicht die genaue Sequenzermittlung der zuvor chromatographisch getrennten Peptide und führt somit zu einer kompletten Sequenzabdeckung des untersuchten Proteins. Die Anwendung dieser Methode eignet sich neben wasserlöslichen Proteinen vor allem für integrale Membranproteine, da die Proteinase *K* (unspezifisch) auch in Bereichen der transmembranen Helices spaltet.

Die sequentielle Analyse der Innen- und Außenseite der Membran erlaubt darüber hinaus eine Bestimmung der Topologie von Membranproteinen. Methoden zur Affinitätsaufreinigung und Quantifizierung von Membranproteinen beschreiben Han *et al.* (2001), Goshe *et al.* (2003), Zhao *et al.* (2004), Prinz *et al.* (2004), Kuhn *et al.* (2003). Die Analytik von Membranproteinen in Lipid-Rafts demonstrieren Blonder *et al.* (2004d), Borner *et al.* (2005).

2.4.3 Massenspektrometrische Bestimmung von intakten Membranproteinen

Um ein Aggregieren und Ausfällen infolge der Hydrophobizität bei integralen Membranproteinen zu vermeiden bedarf es für ihre Isolierung der Verwendung von Detergentien oder organischen Lösungsmitteln. Die begrenzte Einsatzfähigkeit vieler Lösungsvermittler in den für die Solubilisierung notwendigen Konzentrationsbereichen mit der Massenspektrometrie erlaubt jedoch nur eine eingeschränkte massenspektrometrische Analyse von integralen Membranproteinen. Um intakte Membranproteine analysieren zu können, bedarf es daher des Einsatzes von MS-kompatiblen Detergentien oder alternativen Protokollen, die eine detergentenfreie Präparation ermöglichen. Sowohl bei der Messung mit ESI- als auch mit MALDI führt der Einsatz von Lösungsvermittlern zu Interferenzen bei der Ionenbildung oder Matrixpräparation. Über den Einfluß von ionischen, zwitterionischen und nicht ionischen Detergentien auf die Analyse von Membranproteinen mittels Elektrospray-Ionisierung berichten Loo *et al.* (1994), wobei sich die nichtionischen Detergentien n-Dodecyl- β -D-glucopyranosid (NBG) und Octyl- β -glukopyranosid (OBG) als am vorteilhaftesten für die Massenspektrometrie erwiesen.

Den Einfluß von Detergentien auf die Analyse von integralen Membranproteinen mit MALDI untersuchten Rosinke *et al.* (1995). Auch hier erwiesen sich die nichtionischen Detergentien OBG und Triton X-100 als geeignet, um eine MALDI-Präparation hinreichender Qualität zu erreichen. Studien zur Analyse von integralen Membranproteinen und Membranproteinkomplexen mittels MALDI-TOF MS finden sich in Marx *et al.* (1998), Cadene *et al.* (2000), Ghaim *et al.* (1997). Untersuchungen zur Analyse von intakten Membranproteinen und Membranproteinkomplexen mittels ESI-MS finden sich in Whitelegge *et al.* (1998), Musatov *et al.* (1994), Huber *et al.* (2004).

3 Zielsetzung

Anhand der Membranproteinkomplexe aus der mitochondrialen Atmungskette des Rinderherzens sollten vor allem im Hinblick auf die hydrophoben Untereinheiten neue Methoden erarbeitet werden, die eine reproduzierbare und verbesserte massenspektrometrische Identifizierung der Membranproteine ermöglichen. Die Komplexe lassen sich mit hoher Reinheit und großer Ausbeute isolieren, und ihr definiertes Subproteom ermöglicht eine genaue bioinformatische Auswertung und Analyse der Experimente. Ihre heterogene Zusammensetzung aus hydrophilen und hydrophoben Proteinen lieferte ein ideales Testsystem zur Entwicklung einer neuen Gelelektrophoresetechnik, mit der die Limitierungen der herkömmlichen 2D-Technik umgangen werden können und die für die Auftrennung von hydrophoben Proteinen geeignet ist.

Für die Etablierung des neuen Gelsystems wurde ein zuvor über die Blau-Native Gelelektrophorese isolierter Membranproteinsuperkomplex eingesetzt. Die Verwendung der Detergentien Digitonin oder Triton ermöglichen die Solubilisierung von Komplexstrukturen aus der Mitochondrienmembran, die eine Assoziation aus verschiedenen Einzelkomplexen darstellen (Abb. 3.1; Schägger *et al.* (2000), Schägger (2001), Schägger (2002)).

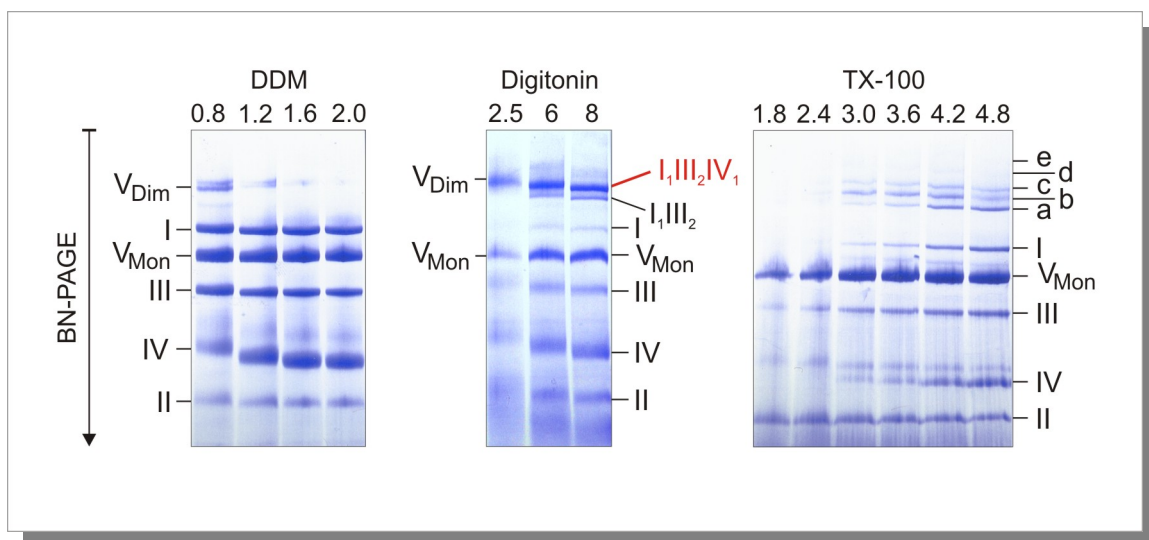


Abb. 3.1 BN-Gelelektrophorese von Atmungskettenkomplexen aus *B. taurus* (aus Schägger (2001))

In Abhängigkeit des Detergenz und des Protein-Detergenz-Verhältnisses werden bei der Isolierung von Membranproteinkomplexen aus den Mitochondrienmembranen unterschiedliche Assemblierungsgrade erfaßt. Neben den monomeren Komplexen lassen sich Assoziate der Komplexe I, III und IV sowohl in der Digitonin-Präparation als auch in den Triton-Fractionen (a-e) finden. Untersuchungsobjekt für die folgenden Analysen ist der mit Digitonin solubilisierter Superkomplex I₁III₂IV₁ (rot markiert)

Der mit Digitonin isolierte Superkomplex $I_1III_2IV_1$ besteht aus einem Monomer des Komplex I, der dimären Form des Komplex III und einem Monomer des Komplex IV. Von den 70 Proteinen des Komplexes zählten die 11 mitochondrial kodierten Untereinheiten mit positiven Gravy-Scores zu den besonders hydrophoben Proteinen. Die restlichen 59 Proteine besitzen moderat hydrophoben oder gar wasserlöslichen Charakter. Diese Kombination bietet ein ideales System, mit der die Trennleistung des neuen Gelsystems in Hinblick auf die Isolierung von integralen Membranproteinen untersucht werden konnte.

Bedingt durch den Verlust an Peptiden infolge unvollständiger Spaltungsreaktionen oder ungenügender Elution aus dem Gel werden in der Praxis für intrinsische Proteine Sequenzabdeckungen zwischen 5 und 15% erreicht, was in den meisten Fällen nicht für eine statistisch abgesicherte Identifizierung mittels Massenspektrometrie ausreicht. Zwar ermöglicht die Analyse von ein oder zwei Peptiden mit MS/MS-Techniken bereits eine eindeutige Identifizierung des Proteins, doch reicht die geringe Anzahl von Peptiden im Hinblick auf eine vollständige Charakterisierung des Proteins nicht aus. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit anhand von hydrophoben Modellsystemen Lösungsansätze zur Analyse von Membranproteinen und Membranproteinkomplexen weiterentwickelt und etabliert werden. Dazu zählten die Verwendung von alternativen Spaltenzymen sowie die Variation der Verdau- und Extraktionsprotokolle von gelelektrophoretisch aufgetrennten Membranproteinkomplexen.

Abschließend sollte die Möglichkeit der Analyse von intakten Membranproteinkomplexen durch In-Gel-Verdau von Blau-Nativ aufgetrennten Atmungskettenkomplexen im Hinblick auf ihre hydrophoben Bestandteile untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders erwähnt in der höchsten Reinheitsklasse verwendet:

Acetonitril, Acrylamid, Ameisensäure, Aminocapronsäure, Ammoniumhydrogencarbonat, Bisacrylamid, Calciumchlorid, Coomassie Blau G-250, Digitonin, Dodecyl- β -D-maltosid, EDTA, Essigsäure, Ethanol, Formaldehyd, Glycerin, Guanidinium-Hydrochlorid, Harnstoff, Imidazol, Kalium-Hexacyanoferrat(III), β -Mercaptoethanol, Methanol, Natriumcarbonat, Natriumthiosulfat, Salzsäure, Silbernitrat, SDS, Trifluoressigsäure (zur Proteinanalyse), TEMED, Tris, Tricin, Triton X-100, Wasser (MilliQ H₂O_{ddist})

4.1.1 Enzyme für die proteolytischen Verdaus

- Porcine Modified Trypsin (Sequencing Grade) (Promega, Mannheim)
- Bovine Chymotrypsin (Sequencing Grade) (Roche, Mannheim)

4.1.2 Matrizes für die Massenspektrometrie

- α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure (Bruker, Bremen)

4.1.3 Peptid- und Proteinstandards

Die folgenden Peptid- und Proteinstandards wurden zur externen Kalibrierung des MALDI-TOF-MS eingesetzt. Die Peptide oder Proteine wurden dazu 50% Acetonitril/0,1% TFA gelöst und neben den Analyten auf den MALDI-Proben-teller präpariert.

- ProteoMass Protein MALDI-MS Calibration Kit „MS-Cal 3“ (Sigma-Aldrich)
- Sequazyme™ Peptide Mass Standards Kit (Applied Biosystems)
- Precision Plus Protein Unstained Standards (Biorad #161-0363)

4.2 Gelelektrophorese

4.2.1 Blau-Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die Blau-Native Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde zur Isolierung der untersuchten Membranproteinsuperkomplexe aus *B. taurus* verwendet. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte wie in Schägger *et al.* (1991) beschrieben. Die mit dem nichtionischen Detergenz Digitonin solubilisierten Komplexe (4g Digitonin / g Protein) wurden in einem 4 % → 13% Acrylamid-Gradientengel aufgetrennt (Schägger *et al.* (2000)).

4.2.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Tricin SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese diente zur Auftrennung der Untereinheiten von Proteinkomplexen sowie zur Überprüfung von Elutionsexperimenten von Membranproteinkomplexen aus Blau-Nativen Gelen (Schägger *et al.*, 1994; Schägger und von Jagow, 1987).

4.2.3 dSDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (dSDS-PAGE)

Für die Standard-Version der dSDS-PAGE wurden 10% Acrylamidgele ± 6M Harnstoff für die 1D-Tricin SDS-PAGE und 16% Acrylamidgele für die 2D-Tricin SDS-PAGE verwendet (Gelgröße 0,15 x 14 x 14 cm) (Schägger und von Jagow, 1987).

Für die Umkehr-Version (*Inverted Mode*) wurden in der ersten Dimension 16% Acrylamid Tricin-SDS Gele oder alternativ 18% Laemmli-Gele (bzw. optional 16% mit 6M Harnstoff) verwendet. Für die zweite Dimension wurde jeweils das Tricin-System mit 10% Tricin-Acrylamidgelen verwendet. Nach erfolgtem Lauf in der ersten Dimension wurde das Gel ohne vorherige Fixierung und Färbung in 3-10 mm breite Streifen geschnitten und für 30 Minuten in einer sauren Lösung (50-100faches Volumen des Gelstreifens) bestehend aus 100mM Tris, 150mM HCl (pH ~2) inkubiert. Anschließend wurde der Gelstreifen zwischen 2 Glasplatten fixiert und die Acrylamidlösung für die zweite Dimension eingefüllt. Nach erfolgter Polymerisation der zweiten Dimension wurde der Gelstreifen vorsichtig auf das Gel der zweiten Dimension geschoben. In die Lücken zwischen dem Gel der ersten Dimension und den seitlichen Spacern wurde eine Acrylamid-Lösung für Nativ-Gele einpolymerisiert. In ihrer Zusammensetzung entsprach diese im wesentlichen dem Gel der ersten Dimension, allerdings mit 150mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4). Der Puffer sorgt für eine elektrische Leitfähigkeit ähnlich der des Gelstreifens. Die Laufbedingungen wurden wie in Hunte *et al.* (2003) beschrieben gewählt.

4.2.4 Elution von Proteinkomplexen aus dem BN-Gel

Die den Proteinkomplex enthaltende Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und durch mehrmaliges Zerquetschen in einer Spritze in einen Gelbrei verwandelt. Die Inkubation des Gelbreis in einem 5fachen Volumen an Wasser für 4 Stunden bei 4°C erlaubte eine quantitative Elution der intakten Membranproteinkomplexe unter Beibehaltung ihrer enzymatischen Aktivität. Nach SpeedVac-Konzentrierung des Eluats und Auftragen auf ein denaturierendes SDS-Gel konnte die Zusammensetzung der eluierten Komplexe überprüft werden.

4.3 Färbeprotokolle

4.3.1 Coomassie-Blau Färbung

Die Proteine im Gel wurden für 30 Minuten fixiert (50 % Methanol / 10 % Essigsäure), und ebenfalls für 30 Minuten in Färbelösung (0,025 % Serva Blau G / 10 % Essigsäure in MilliQ) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mit 10 % Essigsäure für mindestens 30 Minuten. Der Nachteil der Coomassie-Färbung ist ihre geringe Empfindlichkeit.

4.3.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine der empfindlichsten Methoden zur Detektion von Proteinen. Sie erlaubt Proteinfärbungen noch bis in den unteren Nanogrammbereich. Durch nichtkovalente Wechselwirkungen binden Silberionen an Glu-, Asp- und Cys-Reste der Proteine. Formaldehyd reduziert in alkalischer Lösung Ag^+ zu Ag^0 , was zu einer rotbraunen bis schwarzen Färbung führt. Da Silberionen unspezifische Wechselwirkungen mit den Proteinen eingehen, können die Ionen auch mit entsprechenden funktionellen Gruppen aus Lipiden, Zuckern oder Nukleinsäuren reagieren und diese sichtbar machen. Somit ist bei der Silberfärbung auf ein besonders sauberes Arbeiten zu achten.

Die Literatur beschreibt eine Vielzahl von Protokollen zur Silberfärbung, wobei sich das Protokoll von Shevchenko *et al.* (1996) aufgrund seiner Kompatibilität zur Massenspektrometrie bewährt hat. In der vorliegenden Arbeit wurde abweichend ein nach Blum *et al.* (1987) modifiziertes Silberfärbeprotokoll verwendet:

1. Fixierung der Gele in 50% Methanol, 10% Essigsäure (60 Minuten)
2. Waschen der Gele mit MilliQ (2 x 60 Minuten)
3. Inkubation in 0,005% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (60 Minuten)

4. Inkubation in kalter 0,1% AgNO₃-Lösung (60 Minuten)
5. Kurzes Waschen des Gels mit MilliQ (Sekunden)
6. Entwicklung des Gels mit 0,04% Formaldehyd in 2% Na₂CO₃ (1-2 Minuten)
7. Beendigung des Entwicklungsprozesses durch Zugabe von 50mM EDTA (60 Minuten)
8. Waschen des Gels mit MilliQ

Die Vorfärbung des Gels mit Coomassie verstärkt die Silberfärbung (De Moreno *et al.* (1985)). Ein Nachteil der Silberfärbung ist, daß verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität färben (Poehling *et al.* (1981)). Während sich hydrophile Proteine ohne gravierende Unterschiede in der Intensität mit Coomassie-Blau oder Silber färben lassen, ergeben hydrophobe Proteine mit Silber in der Regel eine intensivere Färbung. Eine eventuelle Erklärung könnte in der Wechselwirkung der Silberionen mit der Elektronenwolke von aromatischen und aliphatischen Aminosäuren liegen.

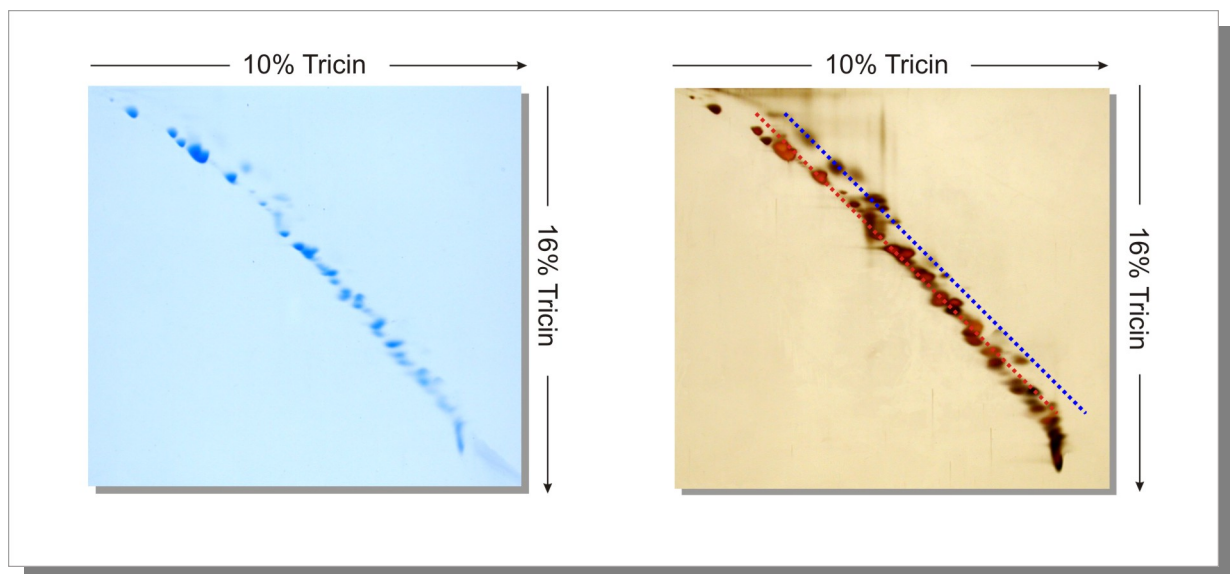


Abb. 4.1 Vergleich der Coomassie- und Silberfärbung bei der Auftrennung von Membranproteinkomplexen

Hydrophile Proteine können sowohl mit Coomassie als auch mit Silber deutlich sichtbar gemacht werden (Hauptdiagonale •••••), während hydrophobe Membranproteine besonders gut in der Silberfärbung detektiert werden können (2. Diagonale ••••• oberhalb der Hauptdiagonale)

4.4 Verdau und Extraktion

4.4.1 Protokoll für den enzymatischen Verdau

	Silber-Färbung	Coomassie-Färbung
1.	Gelstückchen kleinschneiden (Kantenlänge ca. 1 mm) und in Eppendorff-Gefäß überführen	
2.	Entfärben in 100 µl einer Mischung aus 30 mM Kalium-Hexacyanoferrat (III)-Lösung und 100 mM Natriumthiosulfat-Lösung (2 x 10 Minuten bei RT)	Entfärben in 200µl 50 ACN / 100 mM AHC 2 x 45 Minuten bei 37°C
3.	Waschen in 400ml MilliQ (2 x 10 Minuten bei RT)	
4.	Schrumpfen in 100µl 100% ACN (2 x 10 Minuten bei RT)	
5.	Trocknen der Gelstückchen in der SpeedVac 10 Minuten bei RT	
6.	Getrocknete Gelstückchen für max. 1 Stunde auf Eis in 10-20µl Enzym-Lösung (20ng/µl) inkubieren und quellen lassen. Für den Fall, daß die Gelstückchen danach noch weiß sind, erneut 10-20µl Enzym-Lösung zugeben und inkubieren	
7.	Überschüssige Enzym-Lösung abnehmen und Gelstückchen mit 40mM AHC überschichten und für 6-12h bei 37°C inkubieren	
8.	Überstand abnehmen und mit 3µl 10 % TFA ansäuern (Extraktionsschritt 1)	
9.	Extraktion der Gelstückchen mit 100µl 100% ACN (2 x 10 Minuten bei RT) (Extraktionsschritt 2)	
10.	Vereinigen der Extrakte und Einrotieren in der SpeedVac bei RT	
11.	Lösen des Pellets in 5µl 70% ACN/0,1%TFA	
12.	Präparation für die Massenspektrometrie	

Für den Einsatz von Chymotrypsin wurde das Protokoll wie folgt abgeändert:

- Die Enzym-Lösung und der Reaktionspuffer enthielten zusätzlich 2mM CaCl₂.
- Die Reaktionstemperatur betrug soweit nicht anders angegeben 25°C

4.4.2 Sonstige Lösungen und Puffer

- Puffer und Lösungen für die Massenspektrometrie
 - 70%ACN/0,1%TFA: 700µl Acetonitril, 10µl TFA 10% ad 1000µl mit MilliQ
- Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese:
 - 3 x SDS Gelpuffer 0,3% SDS, 3M Tris, 1M HCl, pH 8,5
 - 3 x Probenpuffer 150 mM Tris, 12 % SDS, 30% Glycin, 0,03% ServaBlue G, 6 % Mercaptoethanol (frisch zugegeben)
 - Anodenpuffer 100mM Tris / HCl pH 8,9
 - Kathodenpuffer 100mM Tris, 100mM Tricin, 0,1% SDS

- | | |
|-------------------|---------------------------------------|
| Fixierlösung | 50 % Methanol, 10% Essigsäure |
| Färben /Entfärben | 10 % Essigsäure (0,025 % ServaBlue G) |
- Puffer für native Gelelektrophorese

Anodenpuffer	25 mM Imidazol / HCl (pH 7)
Kathodenpuffer	50 mM Tricin / 7,5mM Imidazol (pH ~ 7 nicht korrigiert) / 0,02% Serva Blau G
3 x Gelpuffer	1,5M Aminocapronsäure; 75mM Imidazol / HCl pH 7
 - Acrylamid / Bisacrylamid Mischung (49,5% T, 3% C)

48 g Acrylamid	
1,5 g Bisacrylamid	ad 100ml

4.5 Massenspektrometrie

4.5.1 Aufreinigung per ZipTip

Die Aufreinigung von Peptiden mittels ZipTips[®] erfolgte analog der Produktbeschreibungen und Firmenprotokolle.

4.5.2 Präparationstechniken

Die Probenpräparation erfolgte soweit nicht anders erwähnt als eine Dried-Droplet-Präparation. Als Matrix wurde für die Messung von enzymatischen Verdaus eine 0,5%ige Lösung von α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure in 70% Acetonitril/0,1% TFA verwendet. 0,5 μ l der Probenlösung wurden auf dem Probensteller mit 0,5 μ l Matrix-Lösung gemischt und an der Luft kristallisiert. Die fertige Präparation wurde abschließend mit kalter 5% Ameisensäure gewaschen.

4.5.3 Massenspektrometer

In dieser Arbeit wurden folgende MALDI-TOF Massenspektrometer verwendet:

- Voyager DE-Pro STR (Applied Biosystems, Framingham, USA)
- Ultraflex LIFT-TOF/TOF (Bruker, Bremen, Deutschland)

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit folgenden Software-Systemen:

- DataExplorer 4.0
- FlexAnalysis 2.0
- BioTools 2.2

Die verwendeten Datenbanken und Internetsuchmaschinen zur Proteinidentifizierung werden in Abschnitt 4.6.1 erläutert.

4.5.4 BN-MALDI-MS/MS und LC-ESI-MS/MS

Für die BN-MALDI-MS/MS Untersuchungen wurden pro Komplex zwei Verdauexperimente parallel durchgeführt: In einer ersten Untersuchungsreihe wurde das komplette Peptideluat in der SpeedVac einrotiert und anschließend in 10µl 70%ACN/0,1%TFA wieder aufgenommen. 0,5µl dieser Lösung wurden mit 0,5µl Matrix-Lösung gemischt und auf dem MALDI-Probenteller präpariert. Die getrockneten Dried-Droplet-Präparationen wurden anschließend mit jeweils 5µl 5% (kalter) Ameisensäure gewaschen.

In einer zweiten Untersuchungsreihe wurde die Peptidlösung ebenfalls einrotiert und anschließend in 10µl 0,1% TFA aufgenommen. Mit Hilfe einer µC18-ZipTip®-Pipettenspitze wurde die Peptidlösung von Salzen und weiteren Kontaminationen gereinigt und die Probe aufkonzentriert. Die Peptide wurden anschließend nacheinander in jeweils 5µl Elutionslösung mit unterschiedlichem Acetonitrilanteil fraktioniert eluiert. 0,5µl dieser Lösung wurden ebenfalls mit 0,5µl Matrixlösung vermischt und auf dem Probenteller präpariert. Der Waschschrift wurde hier weggelassen. Die Acetonitrilkonzentrationen betragen 10%, 30%, 50% und 70% in 0,1% TFA.

Alle Spektren wurden am Bruker Ultraflex LIFT-TOF/TOF im PMF- bzw. LIFT-PSD-Mode aufgenommen. Die Spektren wurden extern kalibriert und die Datenbanksuche erfolgte mit 50 ppm Massengenauigkeit. Als Datenbank wurden für die Fingerprint-Spektren das Tool „MS-Fit“ der Internetplattform ProteinProspector v4.0.5 verwendet, die Auswertung der PSD-Spektren erfolgte mit „MASCOT Sequence Query“ von Matrixscience. Die Einstellungen für die Auswertung der PMF-Spektren mit MS-Fit waren: Datenbank: SwissProt; Spezies: Bos Taurus; Massentoleranz: 50ppm; Minimum an Peptiden: 3; Anzahl an gelisteten Treffern: max. 300; Mögliche Modifikationen: Oxidation von Methionin; Verdauenzym: Trypsin; Mögliche Anzahl überlesener Schnittstellen: 1

Die Einstellungen für die Auswertung der PSD-Spektren mit MASCOT SEQUENCE QUERY waren: Datenbank: SwissProt; Spezies: Other Mammalia; Massentoleranz Vorläufer

4.6.3 Transmembrane Helices (TMH)

Die Berechnung der transmembranen Helices erfolgte über das Webinterface des TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>).

5 Ergebnisse

5.1 doppel SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (dSDS-PAGE)

5.1.1 Prinzipien der dSDS-PAGE

Die im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelte doppel-SDS-PAGE (dSDS-PAGE, engl. *double*-SDS-PAGE) basiert auf der orthogonalen Kombination von zwei SDS-Gelen mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen in der ersten und zweiten Dimension. Stark hydrophobe Proteine zeigen in niedrig konzentrierten Gelen im Vergleich zu Proteinen mit moderat hydrophobem oder gar wasserlöslichem Charakter ein beschleunigtes Wanderungsverhalten. In hochkonzentrierten Gelen erreichen Membranproteine dagegen eine ihrem Molekulargewicht entsprechende „normale“ elektrophoretische Mobilität (Schägger *et al.* (1987)).

Bei der Kombination von unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen in einem zweidimensionalen Gel, kann man das abweichende Laufverhalten der Proteine analytisch nutzen, um hydrophobe Proteine neben hydrophilen Proteinen gelelektrophoretisch aufzutrennen.

Die entscheidenden Aspekte der neuen dSDS-PAGE-Technik sind:

- 1) Stark differierende Acrylamidkonzentrationen in der ersten und zweiten Dimension erzeugen ein stark abweichendes Migrationsverhalten hydrophober Proteine (Gravy-Score >0,4) gegenüber hydrophilen oder mäßig hydrophoben Untereinheiten.
- 2) Protein-abhängige Variation der elektrophoretischen Mobilität erlaubt eine Auftrennung im 2D-Gel entlang zweier paralleler Diagonalen, ähnlich der Auftrennung im 16BAC/SDS- oder CTAB/SDS-Gelsystem (Hartinger *et al.* (1996), Navarre *et al.* (2002)) oder dem orthogonalen SDS-System von Ludwig *et al.* (1980).
- 3) Die Aufkonzentrierung und Separierung der hydrophoben Proteine gegenüber den wasserlöslichen Komponenten erhöht die Effektivität der anschließenden massenspektrometrischen Identifizierung.
- 4) Der Einsatz des Detergenz SDS sowie das Umgehen der isoelektrischen Fokussierung in der ersten Dimension minimiert das Risiko der Aggregation der Membranproteine während der Gelelektrophorese.

Für den Einsatz der dSDS-PAGE wurden zwei Protokolle entwickelt:

Das Standard-Protokoll benutzt in der ersten Dimension ein niedrig konzentriertes 10% Acrylamid Tricin-SDS-Gel, gekoppelt mit einem hochprozentigen 16% Acrylamid Tricin-SDS-Gel in der zweiten Dimension (Standard dSDS-PAGE). In der zweiten Variante, dem Umkehr-Modus (*inverted* dSDS-PAGE), wird in der ersten Dimension ein hochprozentiges und in der zweiten Dimension ein niedrigprozentiges Acrylamidgel verwendet. Beide Varianten können optional durch den Zusatz von 6M Harnstoff in der ersten Dimension und/oder dem Wechsel zwischen den verschiedenen Elektrophorese-Systemen Tricin- oder Glycin-SDS-PAGE in der ersten Dimension in ihrem Anwendungsbereich erweitert werden. Als Ergebnis dieser neuartigen Kombination zeigte sich, daß hydrophobe Membranproteine in der Standardmethode eine zweite Diagonale oberhalb der Hauptdiagonalen der hydrophilen Proteine bilden. Führt man diese Technik im umgekehrten Modus durch, d.h. bei einer hohen Acrylamidkonzentration in der ersten Dimension, so ordnen sich die hydrophoben Proteine unterhalb der Diagonale aus hydrophilen Proteinen an (Abb. 5.1). Eine ausführliche Anleitung zur Herstellung und Durchführung der dSDS-PAGE ist in Kapitel 4.2.3 (dSDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (dSDS-PAGE)) beschrieben.

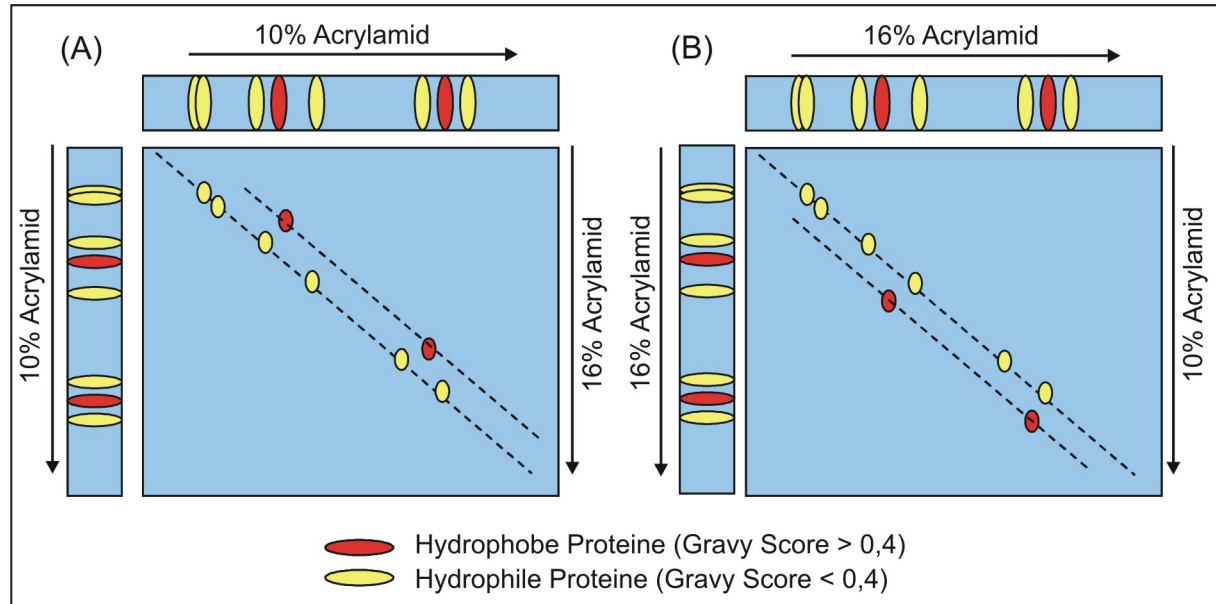


Abb. 5.1 Schematische Darstellung der Auftrennung eines Gemisches aus hydrophoben und hydrophilen Proteinen mittels der dSDS-PAGE.

(A) Bei der Standard-Methode laufen die hydrophoben Proteine oberhalb

(B) Bei der Umkehr-Methode laufen die hydrophoben Proteine unterhalb

Für die Etablierung des dSDS-PAGE Systems wurde der D_2Ant -Subkomplex der Ubichinol: Oxidoreduktase (bc_1 -Komplex) eingesetzt (Schägger *et al.* (1995)). Dem D_2Ant -Komplex (Delipidiert; der Subkomplex ist durch die Bindung des Hemmstoffes Antimycin stabilisiert) fehlen die 2 Proteine Rieske Eisen Schwefel Protein (RISP) und die 6,4kDa Untereinheit fast völlig. Da das RISP noch in Spuren entdeckt werden konnte, mußte bei den Untersuchungen von maximal 10 Untereinheiten ausgegangen werden.

Von den 10 Polypeptidketten ist das Cytochrom b mit 9 transmembranen Helices in die Membran eingelagert und zählt mit einem Gravy-Score von 0,680 zu den extrem hydrophoben Proteinen (Tabelle 8.2). In den Vorversuchen wurden folgende Gelkombinationen mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen in den Gelen erprobt: 1D 16% Tricin-SDS-PAGE mit 2D 16% Tricin-SDS-PAGE, 1D 10% Tricin-SDS-PAGE mit 2D 16% Tricin-SDS-PAGE sowie 1D 16% Tricin-SDS-PAGE mit 1D 10% Tricin-SDS-PAGE. Bei der Kombination von zwei 16% Acrylamid-SDS-Gelen ordneten sich alle Proteine in der zweiten Dimension entlang einer Diagonale an (Abb. 5.2).

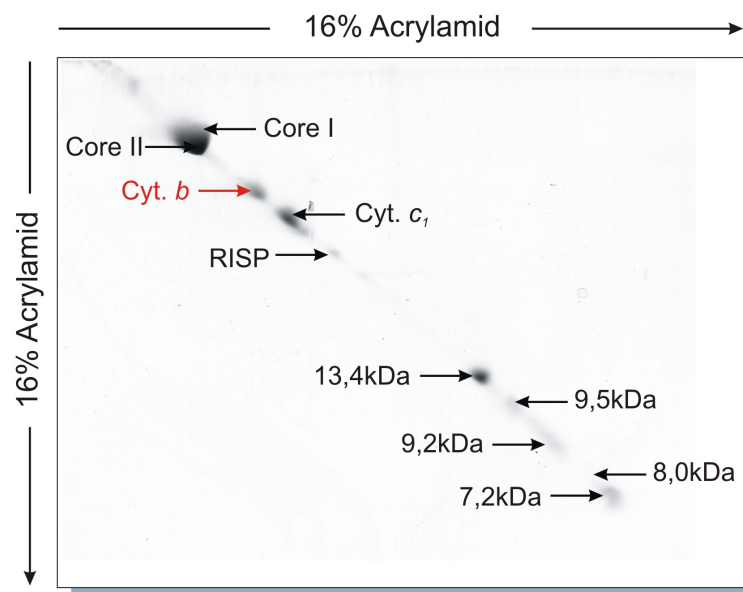


Abb. 5.2 dSDS von D_2Ant (16% → 16%) Es sind alle 10 Hauptbestandteile des D_2Ant -Komplexes zu sehen. Das hydrophobe Cytochrom b (rot) kann innerhalb der Diagonalen aus hydrophilen Proteinen detektiert werden.

Die Veränderung der Acrylamidkonzentrationen für die erste oder zweite Dimension, ergab für das hydrophobe Cytochrom b im Vergleich zu den anderen 9 hydrophilen Untereinheiten ein unterschiedliches Laufverhalten. In der Standard-Variante (10%→16%) war das Cytochrom b oberhalb der Diagonale zu finden (Abb. 5.3).

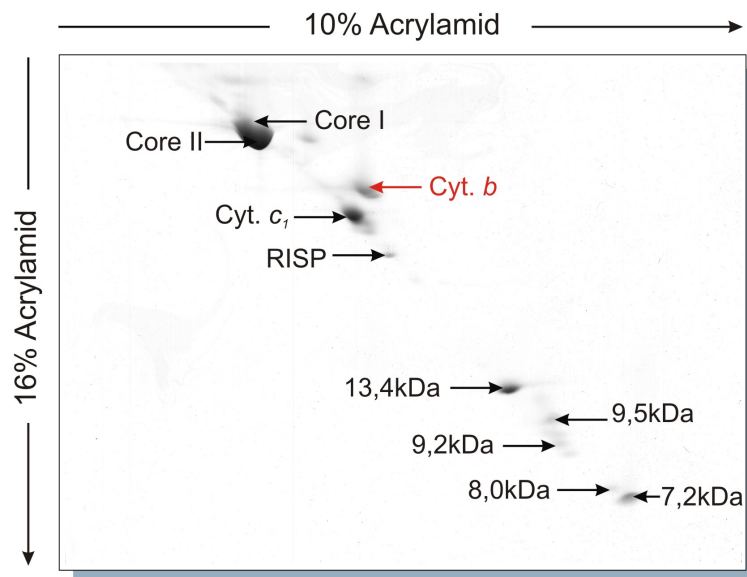


Abb. 5.3 dSDS von D₂Ant im Standard-Mode (10% → 16%) Im sogenannten *Standard Mode* ist das hydrophobe Cytochrom *b* außerhalb der Diagonalen lokalisiert. Alle anderen Proteine ordneten sich entlang einer Diagonalen an.

Dagegen wurde das Cytochrom *b* bei Durchführung der umgekehrten Methode (16%→10%) unterhalb der Diagonalen detektiert:

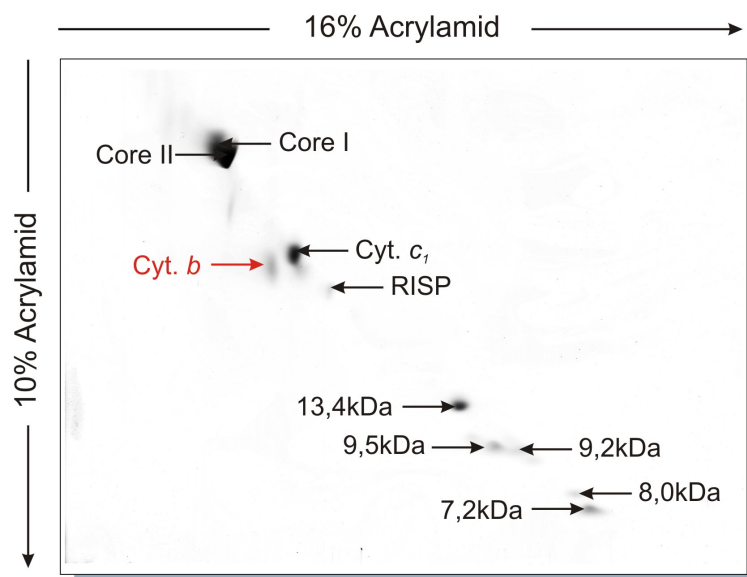


Abb. 5.4 dSDS des D₂Ant Komplexes im Inverted Mode (16% → 10%) Im sogenannten *Inverted Mode* ordnet sich das hydrophobe Cytochrom *b* unterhalb der Diagonalen an. Alle anderen hydrophilen Proteine bildeten auch hier eine Diagonale.

Alle 10 aufgetrennten Proteine des Modellkomplexes (inkl. der Spuren des restlichen RISP) wurden eindeutig mittels MALDI-TOF PMF und MALDI-PSD Massenspektrometrie identifiziert.

5.1.2 dSDS - Standard Mode

Für die dSDS-PAGE wurden in der Standard Methode 10% Acrylamidgele \pm 6M Harnstoff als 1D Tricin-SDS-PAGE und 16% Acrylamidgele als 2D Tricin-SDS-PAGE verwendet (siehe 4.2.3). Die Verwendung der Tricin-Gele ermöglichte bei einer Auflösung der Proteine über einen Massenbereich von 2 – 100kDa auch die Auftrennung kleinerer Komponenten aus der Proteinmischung. Die Trennleistung einer eindimensionalen SDS-PAGE erwies sich bei der Analyse des Superkomplexes $I_1III_2IV_1$ als nicht ausreichend, um die 70 Untereinheiten umfassende Proteinmischung aufzutrennen. In der Folge kam es zu einer starken Überlagerung der Proteinbanden, so daß nur eine Auflösung der Proteinmischung in 20 – 25 Banden erreicht werden konnte (Abb. 5.5).

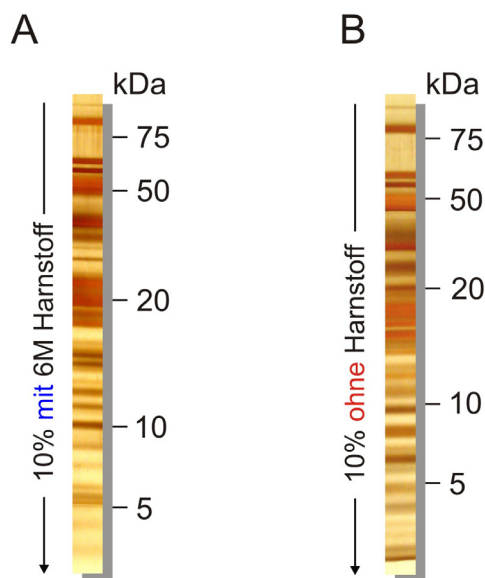


Abb. 5.5 Silbergefärbte 1D-SDS Gele des Superkomplexes $I_1III_2IV_1$

(A) mit 6M Harnstoff in der ersten Dimension

(B) ohne Harnstoff in der ersten Dimension

5.1.2.1 1D mit Harnstoff

Bei der Durchführung der dSDS-PAGE in der Standard-Version unter Verwendung von 6M Harnstoff in der ersten Dimension ordneten sich die Proteine in der zweiten Dimension entlang zweier paralleler Diagonalen an.

In Folge der hohen Harnstoffkonzentration, die wahrscheinlich die SDS-Bindung an Proteinen modifiziert, kam es in der zweiten Dimension proteinabhängig zu einer starken Streuung einzelner Proteine entlang der Diagonalen, was zu einer Trennung in über 60 auflösbare Proteinspots führte (Abb. 5.6). Die massenspektrometrische Identifizierung der einzelnen Proteinbanden zeigte die Anordnung der mitochondrial kodierten hydrophoben Untereinheiten entlang einer zweiten Diagonalen oberhalb der „Hauptdiagonalen“. Von den

11 integralen Membranproteinen des Superkomplexes I₁III₂IV₁ mit hohen Gravy-Scores (Komplex I: ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6 und ND4L; Komplex III: Cyt. *b*; Komplex IV: COX I, II und III) konnten bis auf die beiden Untereinheiten ND4L und ND6 sämtliche Proteine mittels MALDI-TOF *Peptide Mass Fingerprinting* oder MALDI-TOF-PSD Fragmentierungsexperimenten identifiziert werden (Tabelle 5.1).

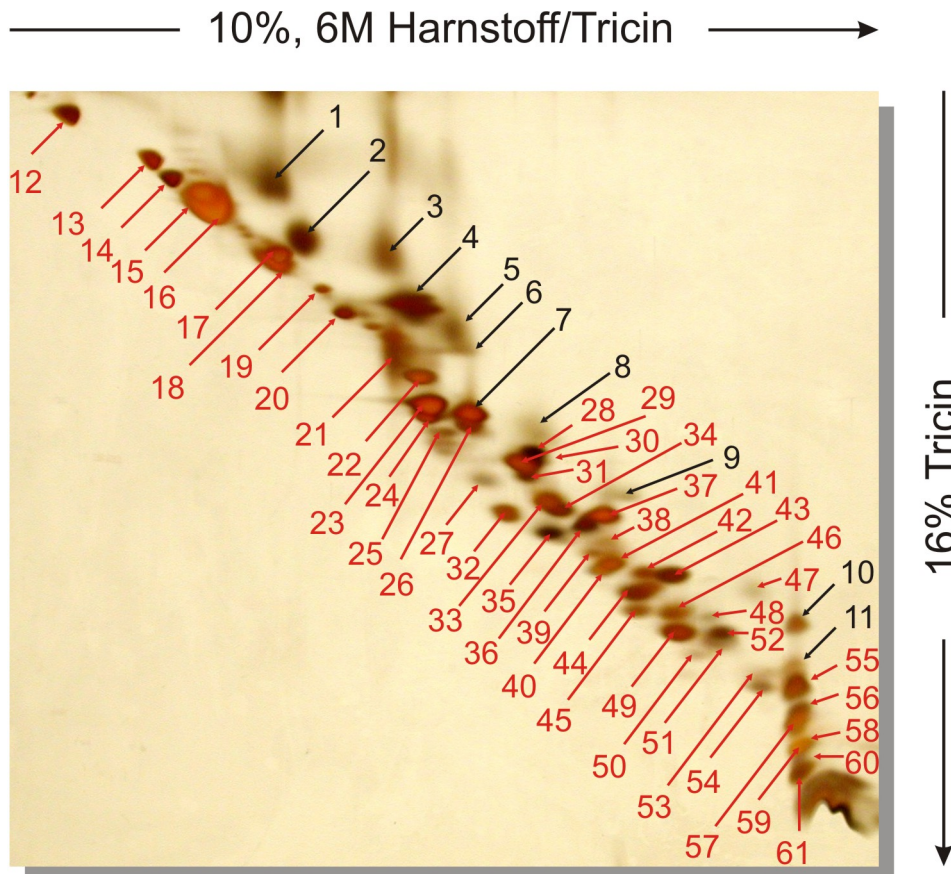


Abb. 5.6 dSDS-PAGE im Standard Mode unter Verwendung von Harnstoff in der ersten Dimension (10%H**→16%)** Diese Variante erlaubt eine Abgrenzung der hydrophoben Proteine (schwarz) von den hydrophilen Komponenten (rot). Durch den Einfluß von Harnstoff verändert sich das Laufverhalten kleinerer Proteine im unteren Massenbereich

Tabelle 5.1 Identifizierte hydrophobe Untereinheiten des Superkomplexes I₁III₂IV₁ (10%H**→16%)**

Spot Nr.	Protein	Gravy ¹⁾	TMH ²⁾	Anzahl Peptide (Sequenzabdeckung)	MOWSE ³⁾	MS Protokoll ⁴⁾
1	KI – ND5	0,637	14	10 (13%)	2,13E+05	PMF; PSD
2	KIV – COX I	0,685	12	4 (7%)	2,62E+02	PMF; PSD
3	KI – ND4	0,826	12	12 (21%)	7,21E+04	PMF; PSD

4	KIII – Cytochrom <i>b</i>	0,680	9	5 (7%)	1,88E+02	PMF; PSD
5	KI – ND2	0,785	8	7 (10%)	1,05E+04	PMF
6	KI – ND1	0,798	8	5 (11%)	5,83E+02	PMF
7	KIV – COX II	0,247	2	10 (26%)	2,46E+06	PMF; PSD
8	KIV – COX III	0,413	6	2 (6%)	1,97E+01	PMF; PSD
10	KI – ND3	0,863	3	4 (13%)	1,88E+03	PMF

¹⁾ s. Kapitel 4.6.2 ²⁾ s. Kapitel 4.6.3 ³⁾ s. Kapitel 4.6.1 ⁴⁾ PMF: Peptide Mass Fingerprint; PSD: Identifizierung durch Fragmentierung mittels MALDI-LIFT-PSD ausgewählter Peptide

Bei der Isolierung des Superkomplexes mittels BN-PAGE kam es zu einer Kontamination durch die dimere Form der ATP-Synthase (Komplex V). Mit einer Masse von ca. 1400 kDa erscheint dieser Komplex unter den gewählten Elektrophoresebedingungen sehr nahe am Superkomplex I₁III₂IV₁ (ca. 1700kDa). Bei der Gesamtanalyse der dSDS-Gele wurden neben den Komponenten aus Komplex I, III und IV auch Untereinheiten des Komplex V identifiziert (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2 Übersicht über die im 10%*H*→16% dSDS-Gel identifizierten Untereinheiten des Superkomplexes I₁III₂IV₁

Spot Nr.	Protein	Gravy ¹⁾	TMH ²⁾	Anzahl Peptide (Sequenzabdeckung)	MOWSE ³⁾	MS Protokoll ⁴⁾
9				nicht identifiziert		
11				nicht identifiziert		
12	KI-75kDa	-0.115	0	40 (53%)	8,87E+20	PMF; PSD
13	KV α -Untereinheit ⁵⁾	-0.072	0	20 (30%)	5,04E+12	PMF; PSD
14	KV β -Untereinheit ⁵⁾	0.042	0	30 (67%)	1,23E+17	PMF; PSD
15	KI-49kDa	-0.338	0	22 (58%)	3,40E+12	PMF; PSD
	KI-51kDa	-0.259	0	8 (19%)	1,17E+04	PMF; PSD
16	KIII-Core I Protein	-0.235	0	12 (30%)	3,86E+06	PMF; PSD
	KIII-Core II Protein	-0.063	0	11 (32%)	1,88E+07	PMF; PSD
17	KI-39kDa	-0.154	3	12 (32%)	9,68E+06	PMF; PSD
18	KI-42kDa	-0.421	0	7 (20%)	7,76E+03	PMF; PSD
19	ANT 1 ⁶⁾	0.069	3	14 (44%)	9,40E+04	PMF
20	KV γ -Untereinheit ⁵⁾	-0.226	0	15 (53%)	5,57E+04	PMF
21	KIII-Cytochrom <i>c</i> ₁	-0.426	1	16 (58%)	6,11E+08	PMF; PSD
22	KI-30kDa	-0.311	0	18 (63%)	5,90E+08	PMF; PSD

23	KV B-Untereinheit ⁵⁾	-0,276	0	12 (42%)	1,62E+06	PMF; PSD
	KI-RISP	-0.125	1	11 (35%)	1,20E+04	PMF; PSD
24	KI-B22	-1.078	0	18 (74%)	5,58E+07	PMF
	KI-24kDa	-0.263	0	10 (31%)	1,16E+06	PMF; PSD
25	KI-TYKY	-0.326	0	13 (42%)	4,91E+04	PMF; PSD
26	KI-PDSW	-0.989	0	10 (48%)	1,49E+05	PMF; PSD
27	KI-ASHI	-0.763	1	14 (52%)	1,03E+08	PMF
28	KI-PSST	0.018	2	9 (28%)	6,73E+03	PMF
29	KI-PGIV	-0.717	0	6 (36%)	3,95E+03	PMF; PSD
30	KV D-Untereinheit ⁵⁾	-0,674	0	8 (54%)	1,22E+06	PMF
	KI-PSST	0.018	2	12 (39%)	1,44E+04	PMF
31	KI-PGIV	-0.717	0	14 (56%)	1,50E+06	PMF
32	KI-AQDQ	-0.593	0	12 (39%)	2,34E+05	PMF; PSD
33	KI-B18	-1.003	0	14 (59%)	7,97E+08	PMF
34	KI-B17.2	-0.804	0	11 (62%)	3,03E+05	PMF
35	COX IV	-0.378	1	15 (55%)	1,11E+06	PMF; PSD
36	KI-B17	-0.613	1	13 (59%)	5,48E+06	PMF; PSD
37	KI-SGDH	-0.180	1	14 (38%)	4,21E+05	PMF; PSD
38	KI-ESSS	-0.638	1	14 (66%)	1,96E+09	PMF; PSD
39	KI-GRIM-19	-0.322	1	22 (61%)	4,82E+09	PMF
40	KI-B15	-0.688	1	9 (69%)	1,30E+04	PMF
41	KI-GRIM-19	-0.322	1	23 (56%)	2,10E+11	PMF
42	KI-B14	-0.591	0	6 (45%)	1,17E+03	PMF; PSD
43	KI-B14.5a	-0.528	0	13 (78%)	1,15E+06	PMF; PSD
44	KI-15kDa	-1.015	0	13 (68%)	1,88E+07	PMF; PSD
45	KI-B14.5b	-0.350	1	12 (52%)	1,23E+06	PMF; PSD
46	KIII-13,4kDa	-1.107	0	11 (58%)	4,86E+03	PMF; PSD
47	KI-B13	-0.424	0	7 (50%)	2,39E+04	PMF; PSD
48	KI-B14.7	0.257	3	7 (43%)	7,78E+04	PMF
49	KIV-Vb	-0,499	0	4 (52%)	3,01E+02	PMF
50	KI-13k-A	-0.357	0	9 (61%)	1,63E+05	PMF; PSD
51	KIV-Va	-0.450	0	12 (85%)	2,08E+06	PMF
52	KI-B12	-0.692	1	7 (50%)	6,26E+02	PMF
53	KV e-Untereinheit ⁵⁾	-0.896	0	6 (77%)	1,36E+02	PMF
54	KIV-VIa	-0.388	0	4 (51%)	9,78E+02	PMF; PSD
54	KIV-VIb	-0.895	0	5 (48%)	8,80E+02	PMF; PSD
55	KIII-9,5kDa Protein	-0,536	1	4 (61%)	1,48E+03	PMF; PSD
	KIII-9,2kDa Protein	-1,014	0	6 (57%)	1,30E+03	PMF; PSD

56	KV g-Untereinheit ⁵⁾	0.214	0	4 (42%)	1,53E+03	PMF
57	KI-B9	-0.093	1	9 (63%)	3,48E+04	PMF; PSD
58	KIV-COX VIIb	-0,362	1	3 (31%)	2,31E+02	PMF
	KI-KFYI	-0.239	0	3 (34%)	3,20E+02	PMF
59	KI-MWFE	-0.211	1	6 (30%)	5,86E+03	PMF; PSD
60	KIII-7,2kDa Protein	-0,121	1	6 (80%)	1,07E+04	PMF; PSD
	KIII-8,0kDa Protein	-0.043	1	7 (22%)	3,76E+04	PMF; PSD
61	KI-MNLL	-0.489	0	4 (42%)	2,20E+02	PMF; PSD

¹⁾ ermittelt über ProtParam (4.6.2) ²⁾ ermittelt über TMHMM 2.0 (4.6.3) ³⁾ MOWSE-Score ermittelt über das Internet-Tool MS-Fit (4.6.1) ⁴⁾ PMF: Peptide Mass Fingerprint; PSD: Identifizierung durch Fragmentierung mittels MALDI-LIFT-PSD ausgewählter Peptide ⁵⁾ Untereinheiten des kontaminierenden ATP-Synthase (Komplex V) ⁶⁾ kontaminierender Adenin Nucleotid Tranlocator aus dem Mitochondrienproteom

In der Summe konnten in der 10% $\text{H} \rightarrow 16\%$ -Variante 57 Untereinheiten des 70 Proteine umfassenden Respirasoms identifiziert werden. Daneben wurden 7 der 16 Untereinheiten der kontaminierenden ATP-Synthase nachgewiesen. Folgende Komponenten des Superkomplexes konnten nicht identifiziert werden:

Tabelle 5.3 Nicht identifizierte Untereinheiten des Superkomplexes I₁III₂IV₁

Komplex	Protein	MW (kDa)	Erklärung
I	ND4L	10,8	nur 1 tryptische Schnittstelle; zu hydrophob
	ND6	19,1	wenige tryptische Schnittstellen; zu hydrophob
	AGGG	8,5	< 10kDa; zu wenige tryptische Peptide
	SDAP	10,1	< 10kDa; zu wenige tryptische Peptide
	B8	10,9	< 11kDa; zu wenige tryptische Peptide
	MLRQ	9,3	< 10kDa; zu wenige tryptische Peptide
	10 kDa	8,4	< 10kDa; zu wenige tryptische Peptide
	46. Untereinheit		Existenz fraglich (Caroll <i>et al.</i> (2003))
III	6,4 kDa	6,5	< 10kDa; abdissoziiert?
IV	Untereinheit VIc	8,5	< 10kDa; zu wenige tryptische Peptide
	Untereinheit VIIa	6,7	< 10kDa; zu wenige tryptische Peptide
	Untereinheit VIIc	5,5	< 10kDa; zu wenige tryptische Peptide
	Untereinheit VIII	4,9	< 10kDa; zu wenige tryptische Peptide

5.1.2.2 1D ohne Harnstoff

Diese einfache Form der dSDS-Technik zeigte im Vergleich zu der in Kapitel 5.1.2.1 vorgestellten Harnstoff-Variante eine geringere Anzahl an aufgelösten Proteinbanden. Der Wegfall der harnstoffbedingten Mobilitätsveränderung resultierte in einem verstärkten Überlappen der Proteinbanden vor allem im unteren Massenbereich. Als Folge lagen die hydrophilen Proteine enger zusammen, was zu einer deutlicheren Abgrenzung von den hydrophoben Untereinheiten führte (Abb. 5.7).

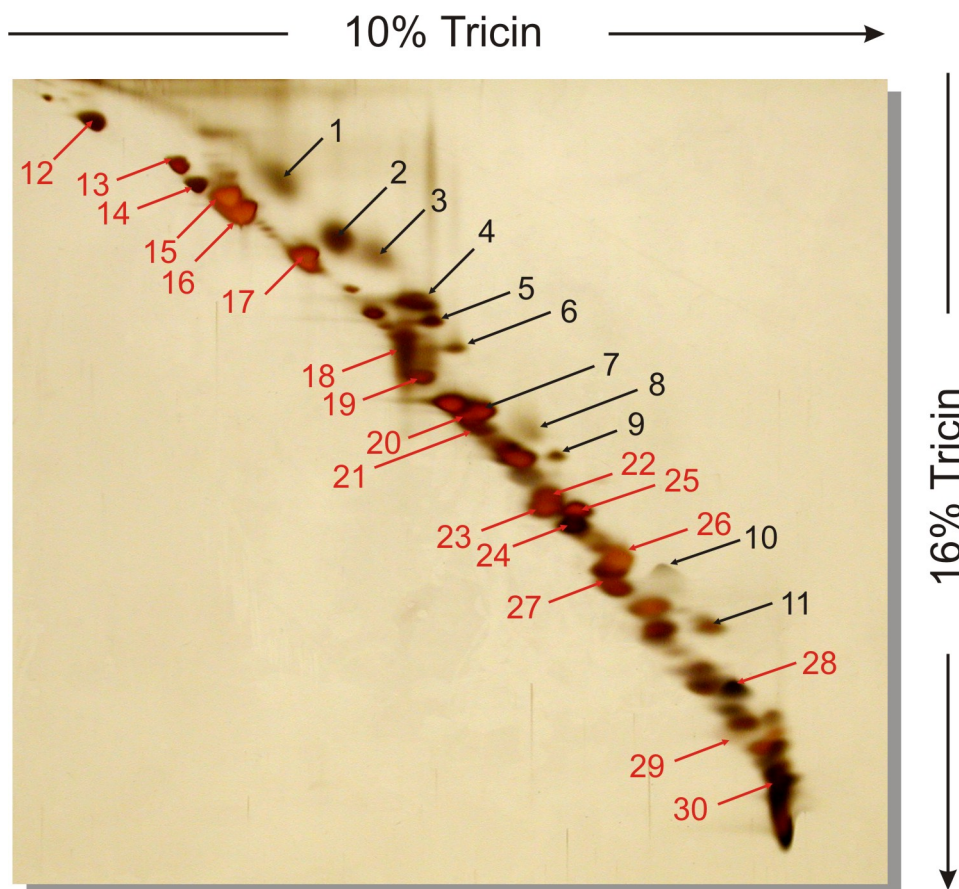


Abb. 5.7 dSDS-PAGE im Standard Mode ohne Verwendung von Harnstoff (10%→16%) in der ersten Dimension Diese Variante zeigte eine deutliche Abgrenzung der hydrophoben Proteine (schwarz) von den hydrophilen Proteinen (rot). Diese Variante eignet sich vor allem für die selektive Identifizierung von stark hydrophoben Proteinen mit einem Gravy-Score größer als 0,3.

Im Gegensatz zu der Versuchsanordnung mit Harnstoff wurden in diesem Fall nicht alle Gelbanden untersucht. Wie auch bei der Durchführung mit Harnstoff konnten auch hier sämtliche hydrophobe Untereinheiten mit Ausnahme von ND4L und ND6 massenspektrometrisch identifiziert werden (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4 Übersicht über die im 10% Tricin→16% Tricin dSDS-Gel identifizierten Untereinheiten des Superkomplexes I₁III₂IV₁

Spot Nr.	Protein ID	Gravy ¹⁾	TMH ²⁾	Anzahl Peptide (Sequenzabdeckung)	MOWSE ³⁾	MS Protokoll ⁴⁾
1	KI-ND5	0,637	14	12 (22%)	7,97E+06	PMF; PSD
2	KIV-COX I	0,685	12	5 (14%)	4,12E+02	PMF; PSD
3	KI-ND4	0,826	12	12 (24%)	1,42E+05	PMF; PSD
4	KIII-Cyt <i>b</i>	0,680	9	4 (6%)	9,48E+01	PMF; PSD
5	KI-ND2	0,785	8	8 (10%)	4,31E+04	PMF
6	KI-ND1	0,798	8	10 (18%)	1,82E+04	PMF
7	KIV-COX II	0,247	2	11 (42%)	1,08E+07	PMF
8	KIV-COX III	0,413	6	2 (6%)	1,34E+01	PMF; PSD
9,10			Nicht identifiziert			
11	KI-ND3	0,863	3	4 (18%)	3,41E+03	PMF
12	KI-75kDa	-0,124	0	41 (57%)	6,78E+22	PMF
13	KV α -Untereinheit ⁵⁾	-0,108	0	16 (35%)	3,58E+11	PMF
14	KV β -Untereinheit ⁵⁾	-0,008	0	28 (66%)	5,20E+15	PMF
	KI-49kDa	-0,338	0	18 (46%)	1,80E+10	PMF
15	KIII Core I-Protein	-0,235	0	13 (26%)	9,28E+05	PMF
	KI-51kDa	-0,297	0	9 (26%)	1,21E+05	PMF
16	KIII Core II-Protein	-0,063	0	12 (38%)	2,14E+08	PMF
	KI-39kDa	-0,190	3	18 (55%)	1,19E+11	PMF
17	KI-42kDa	-0,480	0	15 (52%)	8,27E+08	PMF
18	KIII-Cytochrom <i>c</i> ₁	-0,426	1	14 (61%)	2,58E+09	PMF; PSD
19	KI-30kDa	-0,456	0	16 (59%)	4,11E+09	PMF
20	KI-24kDa	-0,294	0	6 (26%)	1,19E+04	PMF
21	KI-PDSW	-0,989	0	8 (43%)	1,35E+05	PMF
22	KI-18kDa	-0,929	0	6 (26%)	9,21E+02	PMF
	KI-B18	-1,003	0	12 (63%)	3,78E+07	PMF
23	KI- B17.2	-0,804	0	9 (53%)	4,36E+05	PMF
24	KI-SGDH	-0,330	1	14 (43%)	8,63E+05	PMF
	KI-B17	-0,613	1	13 (75%)	2,07E+08	PMF
25	KIV-COX IV	-0,555	1	16 (59%)	3,90E+07	PMF
	KI-15kDa	-1,015	0	9 (49%)	2,88E+04	PMF; PSD
26	KI-B14	-0,591	0	9 (58%)	3,25E+04	PMF; PSD
	KI-B16.6	-0,322	1	18 (53%)	2,69E+09	PMF
27	KI-B15	-0,688	1	11 (59%)	1,71E+05	PMF
28	KIV-COX VIc	-0,274	1	9 (53%)	1,99E+03	PMF

29	KI-MWFE	-0,211	1	6 (30%)	5,86E+03	PMF
	KI-SDAP	-0,225	0	9 (60%)	3,10E+04	PMF
	KIII-7,2kDa Protein	-0,121	1	4 (67%)	2,74E+03	PMF; PSD
30	KV c-Untereinheit ⁵⁾	1,143	2	- ⁶⁾	- ⁶⁾	PSD
	KIV-COX VIIc	-0,028	1	- ⁶⁾	- ⁶⁾	PSD

¹⁾ ermittelt über ProtParam (4.6.2) ²⁾ ermittelt über TMHMM 2.0 (4.6.3) ³⁾ MOWSE-Score ermittelt durch das Internet-Tool MS-Fit (4.6.1) ⁴⁾ PMF: Peptide Mass Fingerprint; PSD: Identifizierung durch Fragmentierung mittels MALDI-LIFT-PSD ausgewählter Peptide ⁵⁾ Untereinheiten des kontaminierenden Komplex V ⁶⁾ keine Daten verfügbar, da nur anhand eines einzigen Peptides identifiziert

5.1.3 Umkehr Versionen der dSDS-PAGE

5.1.3.1 16% Tricin → 10% Tricin

Abb. 5.8 zeigt ein silbergefärbtes dSDS-Gel, in dem ein 16% Tricin-Gel als erste Dimension mit einem 10% Tricin-Gel als zweite Dimension kombiniert worden ist. Wie im *Standard Mode* sind auch hier zwei deutliche Diagonalen zu erkennen. Die massenspektrometrische Analyse der tryptischen In-Gel-Verdaus ergab die Identifizierung der hydrophoben Proteinen ND1, ND2, ND3, ND4 und ND5 aus Komplex I sowie der Untereinheiten Cytochrom *b* aus Komplex III und COX I und COX II aus Komplex IV. Tabelle 5.5 gibt eine Gesamtübersicht über sämtliche aus Abb. 5.8 identifizierte Proteine.

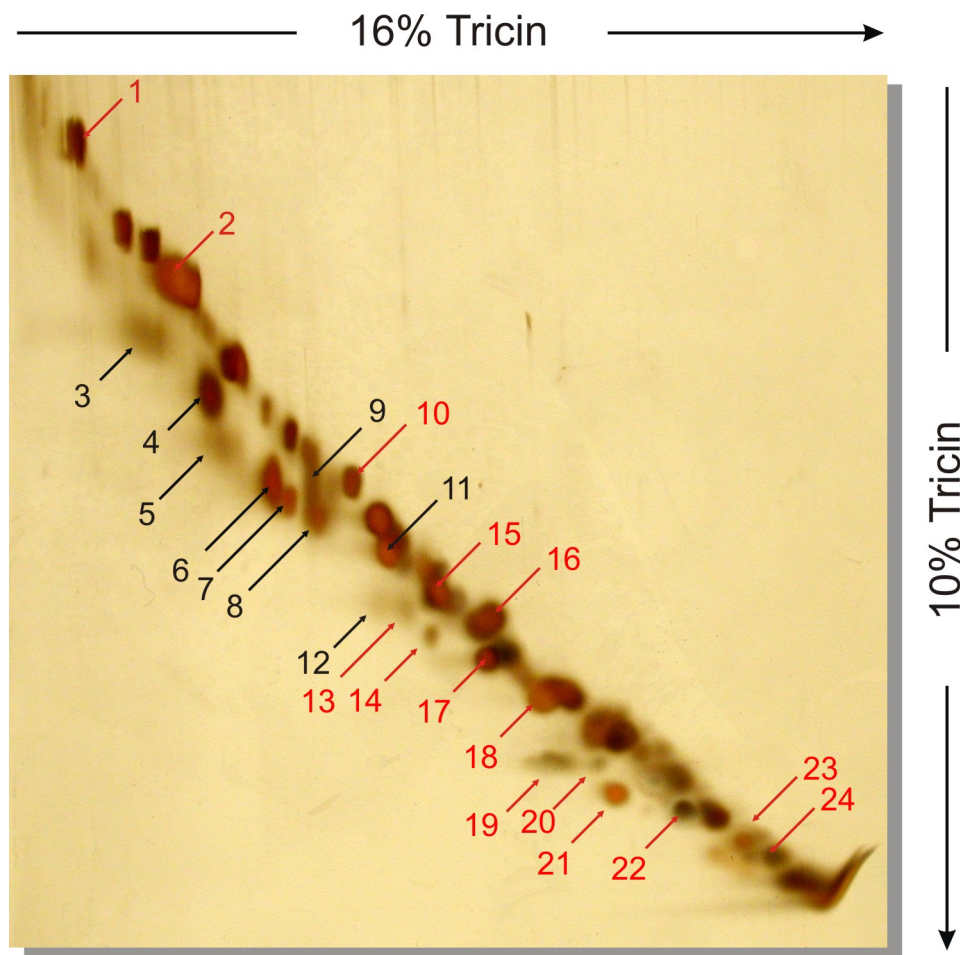


Abb. 5.8 dSDS im *Inverted Mode* mit einem Tricin-Gel (16%) als erste Dimension Die Spotverteilung innerhalb dieses Gels zeigt, daß sich hydrophobe Proteine (schwarz) in der 2. Dimension unterhalb der Diagonalen aus wasserlöslichen Proteinen (rot) aufreihen. Tabelle 5.5 listet die aus dem Gel identifizierten Proteinspots auf.

Tabelle 5.5 Identifizierte Untereinheiten aus der 16% Tricin → 10% Tricin Variante

Spot Nr.	Protein ID	Gravy ¹⁾	TMH ²⁾	Anzahl Peptide (Sequenzabdeckung)	MOWSE ³⁾	MS Protokoll ⁴⁾
1	KI-75kDa	-0,124	0	38 (49%)	4,99E+05	PMF
	KIII-Core I	-0,235	0	11 (22%)	5,66E+05	PMF
2	KIII-Core II	-0,063	0	7 (23%)	9,70E+04	PMF
	KI-51kDa	-0,259	0	13 (25%)	2,40E+06	PMF
	KI-49kDa	-0,338	0	20 (51%)	3,37E+11	PMF
3	KI-ND5	0,637	14	9 (13%)	2,13E+05	PMF
4	KIV-COX I	0,685	12	4 (7%)	2,34E+02	PMF
5	KI-ND4	0,826	12	7 (9%)	7,02E+02	PMF
6	KIII-Cytochrom <i>b</i>	0,680	9	5 (7%)	1,12E+02	PMF
7	KI - ND2	0,785	8	6 (6%)	5,65E+02	PMF
8	KI-ND1	0,798	8	5 (11%)	1,64E+02	PMF
9	KIII-Cyt. <i>c</i> ₁	-0,426	1	15 (63%)	9,46E+08	PMF
10	CI-30kDa	-0,456	0	19 (62%)	5,06E+09	PMF
11	KIV-COX II	0,247	2	8 (35%)	1,08E+05	PMF
12	Nicht identifiziert (COX III?)					
13	KI-PGIV	-0,717	0	4 (37%)	7,50E+02	PMF
14	Nicht identifiziert					
15	CI-ASHI	-0,958	1	12 (60%)	3,61E+06	PMF
	KI-B17.2	-0,804	0	10 (53%)	2,32E+05	PMF
16	KI-B18	-1,003	0	16 (71%)	3,29E+08	PMF
	KI-AQDQ	-0,929	0	8 (28%)	1,37E+03	PMF
17	KI-SGDH	-0,330	1	12 (37%)	8,58E+04	PMF
	KI-B17	-0,613	1	8 (44%)	5,83E+04	PMF
	KI-B15	-0,688	1	10 (59%)	1,26E+04	PMF
18	KI-GRIM-16.6	-0,322	1	17 (49%)	2,29E+07	PMF
	KI-B14.7	0,245	3	6 (58%)	2,94E+04	PMF
20	Nicht identifiziert					
21	KI-ND3	0,863	3	5 (18%)	3,77E+03	PMF
22	KIV-COX VIc	-0,274	1	11 (53%)	1,40E+03	PMF
23	KIV-COX VIIb	-0,362	1	4 (21%)	3,01E+01	PMF
24	KIII-8.0kDa	0,374	1	5 (25%)	2,52E+03	PMF
	KI-MNLL	-0,489	0	4 (42%)	2,29E+02	PMF

¹⁾ ermittelt über ProtParam (4.6.2) ²⁾ ermittelt über TMHMM 2.0 (4.6.3) ³⁾ MOWSE-Score ermittelt durch das Internet-Tool MS-Fit (4.6.1) ⁴⁾ PMF: Peptide Mass Fingerprint; PSD: Identifizierung durch Fragmentierung mittels MALDI-LIFT-PSD ausgewählter Peptide ⁵⁾ Untereinheiten des kontaminierenden Komplex V

5.1.3.2 1D Laemmli → 10 % Tricin

Bei Verwendung des Laemmli-Systems in der ersten Dimension wurde ein harnstofffreies und harnstoffhaltiges Gel der ersten Dimension eingesetzt. Abb. 5.9 vergleicht die beiden silbergefärbten Gele.

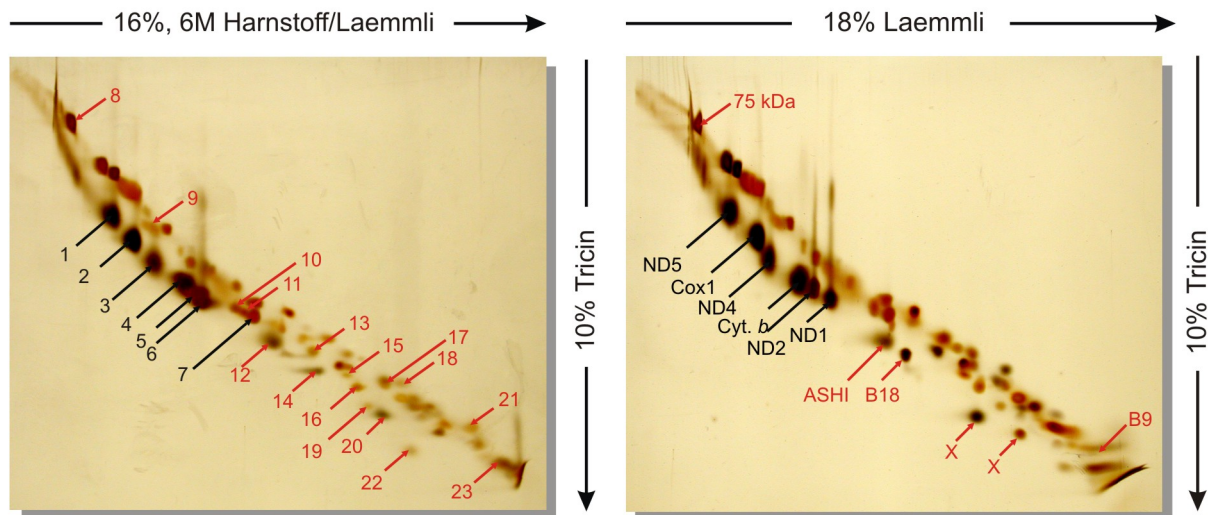


Abb. 5.9 Auftrennung des Superkomplexes I₁III₂IV₁ im Inverted Mode mit dem Laemmli System für die erste Dimension (16%LH→10% bzw. 18%→10%)

Beide Varianten zeigten eine deutliche Streuung der Proteine entlang der Diagonalen, wobei die hydrophoben Proteine sich wie in dem Tricin-System unter den Hauptdiagonalen sammelten. Ausgewählte Proteinspots wurden massenspektrometrisch untersucht. Im Folgenden sind die Ergebnisse des Laemmli-Gels unter Verwendung von Harnstoff aufgelistet.

Tabelle 5.6 Identifizierte Untereinheiten des 16% 6M Harnstoff Laemmli → 10 % Tricin Gelsystems

Spot Nr.	Protein ID	Gravy ¹⁾	TMH ²⁾	Anzahl Peptide (Sequenzabdeckung)	MOWSE ³⁾	MS Protokoll ⁴⁾
1	KI-ND5	0,637	14	13 (18%)	7,05E+09	PMF
2	KIV-COX I	0,685	12	4 (7%)	5,57E+02	PMF
3	KI-ND4	0,826	12	13 (22%)	1,20E+08	PMF
4	KIII-Cyt. b	0,680	9	5 (8%)	5,28E+01	PMF
5	KI-ND2	0,785	8	13 (18%)	7,46E+06	PMF
6	KI-ND1	0,798	8	13 (19%)	4,04E+05	PMF
7	KIV-COX II	0,247	2	14 (26%)	3,00E+08	PMF
8	KI-75kDa	-0,124	0	13 (27%)	5,30E+10	PMF
9	KI-42kDa	-0,480	0	17 (61%)	1,57E+08	PMF
10	KI-24kDa	-0,294	0	11 (45%)	1,02E+10	PMF

11	KI-B22	-1,078	0	11 (51%)	2,98E+05	PMF
12	KI-ASHI	-0,958	1	4 (33%)	1,65E+03	PMF
13	KI-AQDQ	-0,929	0	8 (33%)	2,68E+04	PMF
	KI-B18	-1,003	0	18 (65%)	5,36E+10	PMF
14	nicht identifiziert					
15	KI-B16.6	-0,322	1	17 (48%)	3,61E+06	PMF
16	KI-B15	-0,688	1	8 (48%)	1,95E+03	PMF
17	KI-15kDa	-1,015	0	9 (57%)	5,32E+03	PMF
	KI-14.5a	-0,700	0	10 (77%)	1,12E+03	PMF
18	KI-B14	-0,591	0	7 (59%)	1,86E+03	PMF
19	KI-B14.5b	-0,350	1	12 (60%)	4,08E+06	PMF
20	KI-13kDa-A	-0,672	0	4 (31%)	3,20E+03	PMF
21	KIII-9,5kDa	-0,536	0	8 (74%)	2,12E+05	PMF
22	KI-SDAP	-0,225	0	9 (60%)	3,10E+04	PMF
23	KI-MWFE	-0,211	1	6 (30%)	5,86E+03	PMF
	KIII-7,2kDa	-0,121	1	4 (76%)	4,34E+03	PMF

¹⁾ ermittelt über ProtParam (4.6.2) ²⁾ ermittelt über TMHMM 2.0 (4.6.3) ³⁾ MOWSE-Score ermittelt durch das Internet-Tool MS-Fit (4.6.1) ⁴⁾ PMF: Peptide Mass Fingerprint; PSD: Identifizierung durch Fragmentierung mittels MALDI-LIFT-PSD ausgewählter Peptide ⁵⁾ Untereinheiten des kontaminierenden Komplex V

5.2 Proteomics von integralen Membranproteinen

5.2.1 Identifizierung von hydrophoben Membranproteinen und Peptiden

Mit den hydrophoben Membranproteinen der untersuchten Proteinkomplexe lagen ideale Modellsysteme zur Optimierung und Weiterentwicklung von *Proteomics*-Protokollen vor. 9 der 11 analytisch schwer zugänglichen Proteine wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung massenspektrometrisch nachgewiesen. Dabei ergab ein genaues Studium der gefundenen Peptide, daß ihre transmembranen Helices nahezu ausgespart blieben. Die Identifizierung sämtlicher integraler Membranproteine basierte in erster Linie auf den Fragmenten aus den wasserlöslichen Verbindungssequenzen.

Die Polypeptide 4 und 5 der „ND“-Gene des Komplex I zählten mit einem Gravy-Score von 0,826 bzw. 0,637 und 12 bzw. 14 transmembranen Helices zu den lipophilsten Proteinen. Gleichzeitig sind sie mit einem Molekulargewicht von 52 bzw. 68kDa auch die größten Proteine aus den Atmungskettenkomplexen. Bei einem tryptischen Verdau von Proteinen dieser Größe entstehen neben hydrophoben Peptiden auch eine Vielzahl hydrophiler Spaltprodukte. Beide Untereinheiten wurden mit sehr hoher Signifikanz sowohl durch die Messung der tryptischen Verdau als auch über die Sequenzierung ausgewählter Peptide identifiziert. Trotz der deutlichen Ergebnisse bei der Bestimmung dieser Proteine belegte die Auswertung, daß der Nachweis dieser intrinsischen Proteine primär auf der Messung kleiner, hydrophiler Peptide beruht. Gleiches wurde bei der Identifizierung der restlichen mitochondrial kodierten Bestandteile beobachtet.

Die Einstufung der nachgewiesenen Peptide in Hinblick auf ihre Hydrophobizität zeigte, daß hydrophobe Sequenzen nicht nur auf transmembrane Helices beschränkt sind. Abb. 5.10 zeigt das PSD-Spektrum eines Peptids der ND4-Untereinheit mit der Sequenz «ENALMSLHILPLLLLTLNPK». Obwohl es mit einem Gravy-Score von 0,861 als sehr hydrophob eingestuft werden kann, ist das Peptid nicht in einer der 12 transmembranen Helices lokalisiert.

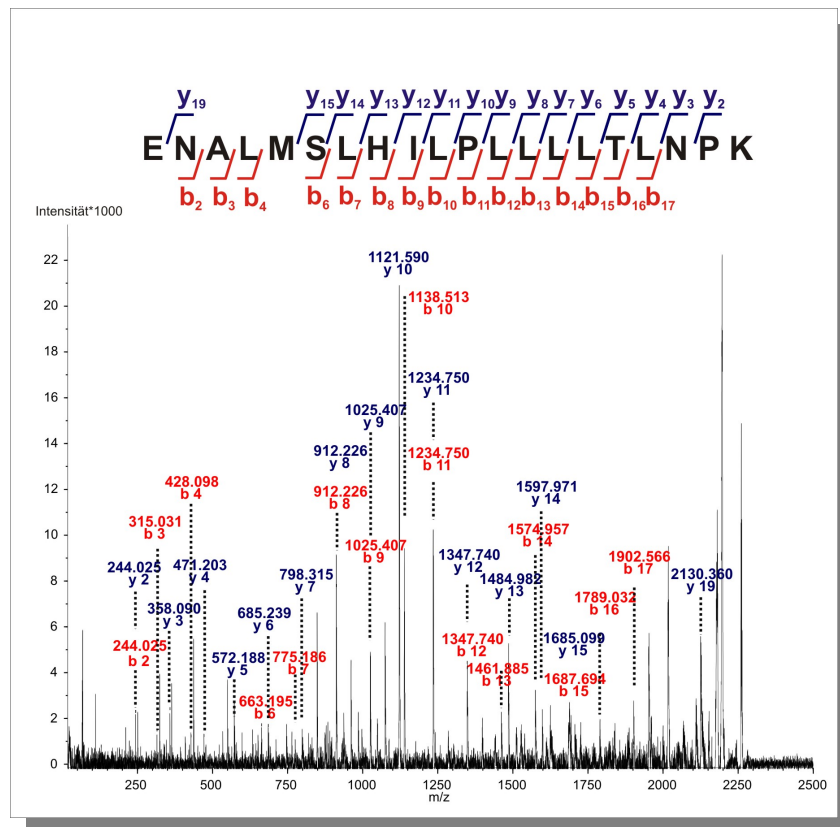


Abb. 5.10 MALDI-PSD Spektrum des Peptids ENALM*SLHILPLLLLLTLNPK (MH_{gem}^+ 2259,3931) Anhand der y - und b -Ionenserie konnte die ND4-Untereinheit eindeutig identifiziert werden (Mascot Score 74). Das M* bedeutet ein oxidiertes Methionin.

Eine ähnliche Situation findet sich bei dem ND5-Protein. Das identifizierte Peptid mit der Sequenz «IIFALLGQPR» ist nur an der Position 1 bis 8 in die Membran eingebettet. Die Aminosäuren QPR ragen bereits aus der Membran heraus. Trotz des hohen Gravy-Scores von 1,273 war dieses tryptische Peptid gut zu analysieren und ermöglichte die Identifizierung der 68kDa großen Untereinheit des Komplex I.

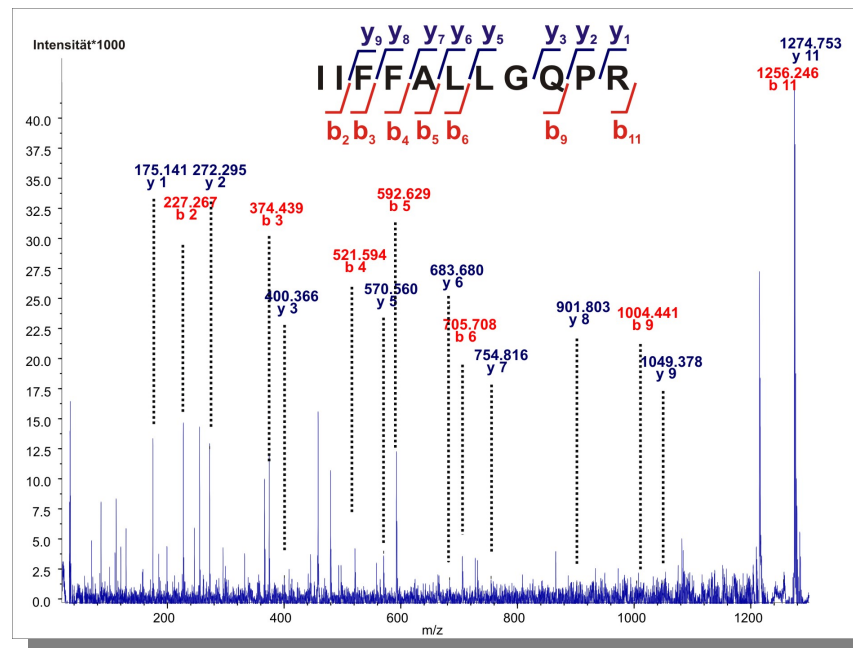


Abb. 5.11 MALDI-PSD Spektrum des Peptids IIFFALLGQPR ($MH^+_{\text{gem}} 1274,7729$) Anhand der y - und b -Ionenserie konnte die ND5-Untereinheit eindeutig identifiziert werden (Mascot Score 47)

Neben den mitochondrial kodierten Proteinen finden sich in den Membranproteinkomplexen auch eine Vielzahl von Proteinen, die mit einem negativen Gravy-Score zwar einen hydrophilen Gesamtcharakter zeigten, deren Aminosäuresequenz jedoch auch Bereiche hoher Hydrophobizität aufwiesen oder sogar transmembrane Helices besaßen⁸. Das 7,2 kDa Protein der Ubichinol:Oxidoreduktase besitzt eine transmembrane Helix weist aber einen negativen Gravy-Score auf. Die Analyse der Aminosäuresequenz mittels der Internet-Programme TMHMM v2.0 und ProtParam sagten den stark hydrophoben Bereich zwischen den Positionen 12 und 31 voraus (Abb. 5.12).

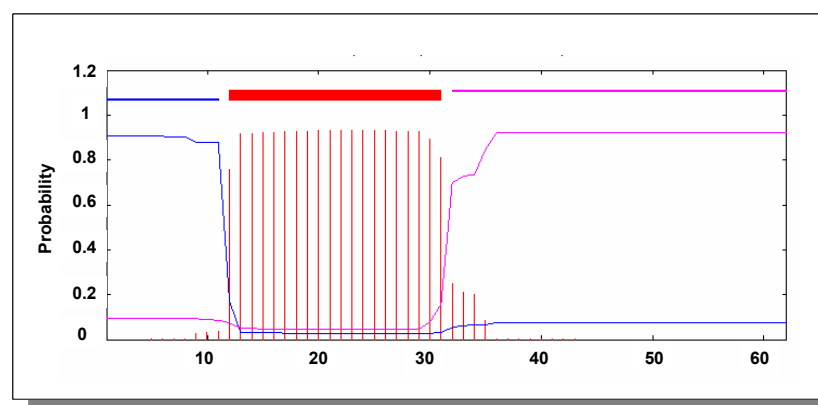


Abb. 5.12 Graphische Darstellung der Hydrophobizitätsverteilung innerhalb der 7,2kDa Untereinheit

Der rot schraffierte Bereich zwischen der Position 12 und 31 deutet auf eine transmembrane Helix hin

⁸ Hydrophobe Sequenzabschnitte treten nicht nur in transmembranen Bereichen auf.

Die massenspektrometrische Untersuchung des tryptischen Verdaus dieser hydrophilen Untereinheit lieferte nach der Extraktion der Peptide mit verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedliche Peptidmuster. Den signifikanten Unterschied zwischen den Fraktionen verdeutlicht Abb. 5.13 (A und B). In Spektrum A ist die Peptidmischung nach Extraktion mit einem Lösungsmittelgemisch aus 50% ACN und 0,1% TFA vermessen worden. Spektrum B zeigt das Peptidspektrum nach abschließender Extraktion mit 100% Acetonitril. Reines Acetonitril entzieht dem Gelsystem Wasser und „trocknet“ die Gelstückchen aus. Auf diese Weise werden weitere Peptide aus dem Gel „herausgequetscht“ (*forced extraction*). Die Ausschnitte der Massenspektren dieser zwei Fraktionen im Bereich von m/z 1860 und 1930 zeigen zwei isotopenaufgelöste Peptidsignale, die ca. 5 Da auseinander liegen (Abb. 5.13).

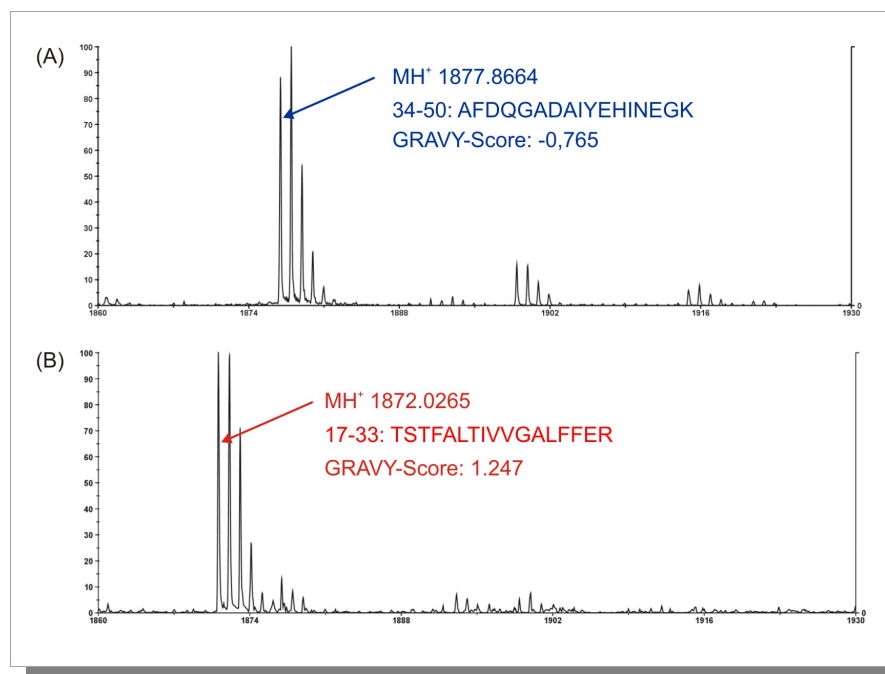


Abb. 5.13 Ausschnitt aus einem PMF Spektrum des In-Gel Verdaus des 7,2kDa Proteins unter verschiedenen Extraktionsbedingungen

(A) Messung des Peptidextrakts aus dem Pufferüberstand

(B) Messung der Peptidmischung nach Extraktion mit 100% Acetonitril

Anhand der b - und y -Ionenserien aus den Fragmentationenspektren der beiden Peptide MH_{gem}^+ 1872,0970 und MH_{gem}^+ 1877,9375 ließen sich die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der Peptide ableiten (Abb. 5.14 /Abb. 5.15). Die Sequenzierung des tryptischen Peptids mit der Masse MH_{gem}^+ 1872,0970 bestätigte dieses Fragment als transmembrane Helix des untersuchten Proteins (MH_{mi}^+ 1872,0265; Δppm 37). Das zweite tryptische Fragment mit der Masse MH_{gem}^+ 1877,9375 deckt die Sequenz zwischen den Positionen 34 und 50 hinter der

Membrandomäne ab (MH^+_{mi} 1877,8664; Δppm 38). Die ppm-Angaben in den Klammern stehen für die Massenabweichung zwischen gemessenen und monoisotopischen Massen der Fragmente.

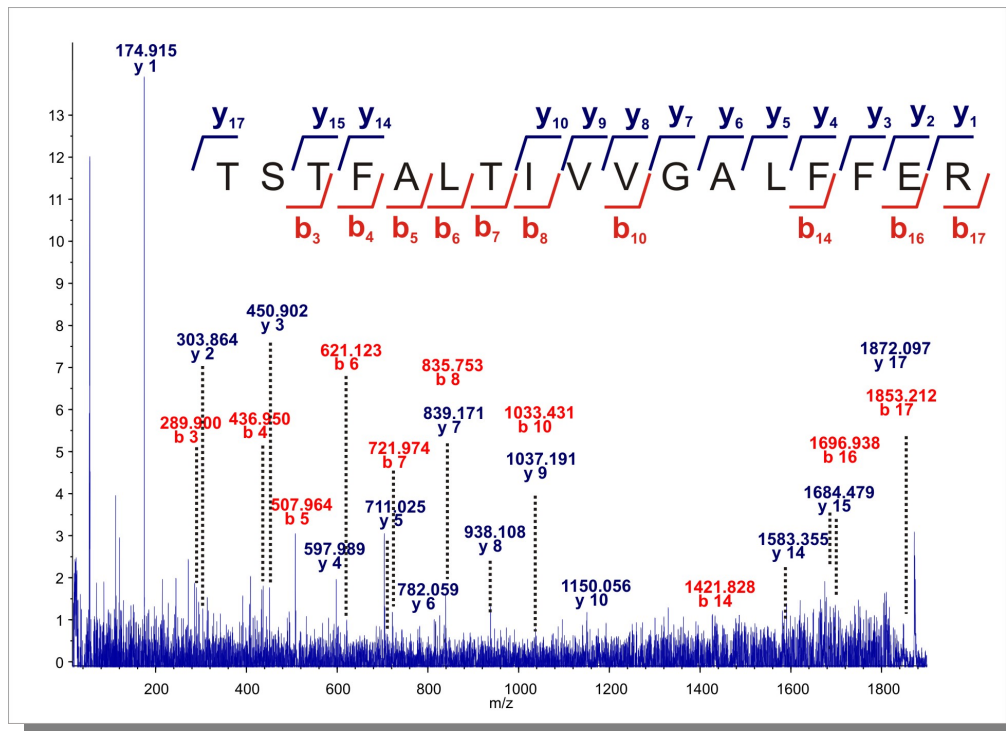


Abb. 5.14 MALDI-PSD Spektrum des Peptids TSTFALTIVVGALFFER (MH^+_{gem} 1872,0970) Anhand der y - und b -Ionenserie konnte die 7,2kDa-Untereinheit eindeutig identifiziert werden (Mascot Score 57)

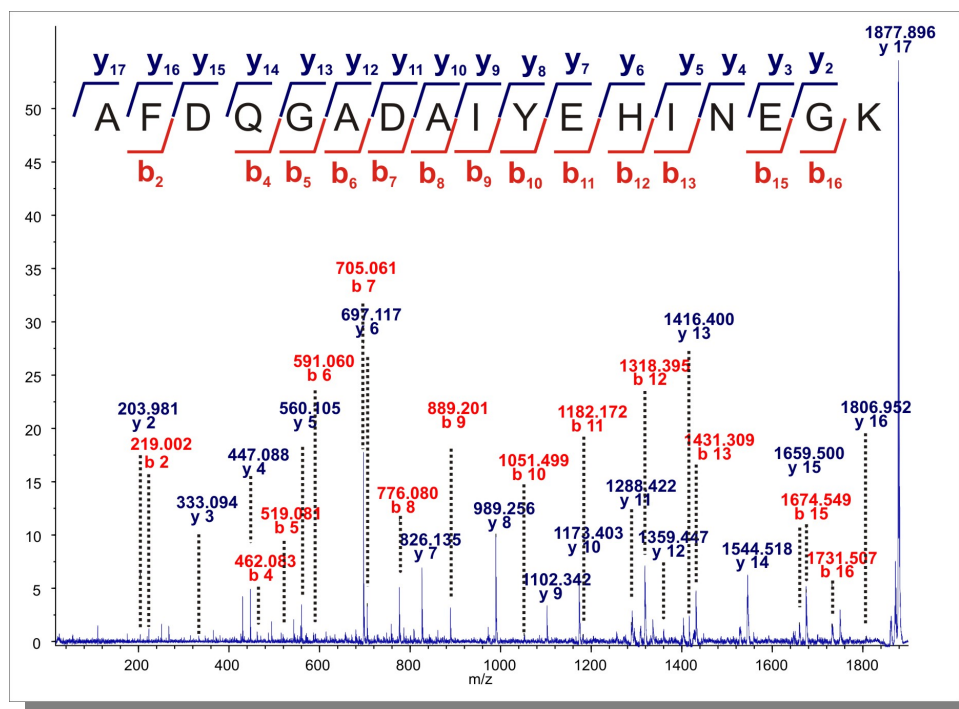


Abb. 5.15 MALDI-PSD Spektrum des Peptids AFDQGADAIYEHINEGK (MH^+_{gem} 1877,9375) Anhand der y - und b -Ionenserie konnte die 7,2kDa-Untereinheit eindeutig identifiziert werden (Mascot Score 137)

Mittels Fragmentierung eines einzigen Peptids gelang es im Rahmen der Untersuchungen der dSDS-Gele auch die Untereinheiten COX VIIc und das Lipid-bindende-Protein der ATP-Synthase zu identifizieren (Daten nicht gezeigt). In beiden Fällen handelt es sich bei den identifizierten Peptiden um transmembrane Helices und somit um stark lipophile Peptide.

5.2.2 Untersuchungen zur Erhöhung der Verdaueffektivität

Für die Untersuchungen zur Erhöhung der Verdaueffektivität wurde das stark hydrophobe integrale Membranprotein Cytochrom *b*⁹ verwendet. Durch Vergleich der gemessenen Peptide und der damit erreichten Sequenzabdeckungen ließen sich Rückschlüsse auf die Fortschritte und Verbesserungen der Protokollvariationen ableiten.

Für die Optimierung der Verdauprotokolle von integralen Membranproteinen wurden folgende Kriterien untersucht:

- Einsatz von Chymotrypsin als alternatives Verdauenzym ohne und in Kombination mit Trypsin
- Einfluß der chaotropen Substanzen Harnstoff und Guanidinium-Hydrochlorid zur Denaturierung der Proteine zum Zwecke der Erhöhung der Verdaueffektivität
- Vergrößerung der Kontaktfläche für Enzym- und Extraktionslösung der Probe durch Zerreiben der Gelstückchen
- Einsatz von Detergenzien und organischen Lösungsmitteln zur Steigerung der Enzym- und Elutionsaktivität von Peptiden

⁹ Die komplette Aminosäuresequenz findet sich im Anhang

Zur Isolierung des Cytochrom *b* wurde der D₂Ant-Subkomplex zunächst gelelektrophoretisch mittels 16% 1D Tricin SDS-PAGE in seine Komponenten aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung sind alle Bestandteile des Komplexes deutlich voneinander getrennt im Gel zu erkennen. Der tryptische Verdau der dem Cytochrom *b* entsprechenden Coomassie-Bande lieferte folgendes Übersichtsspektrum (Abb. 5.16):

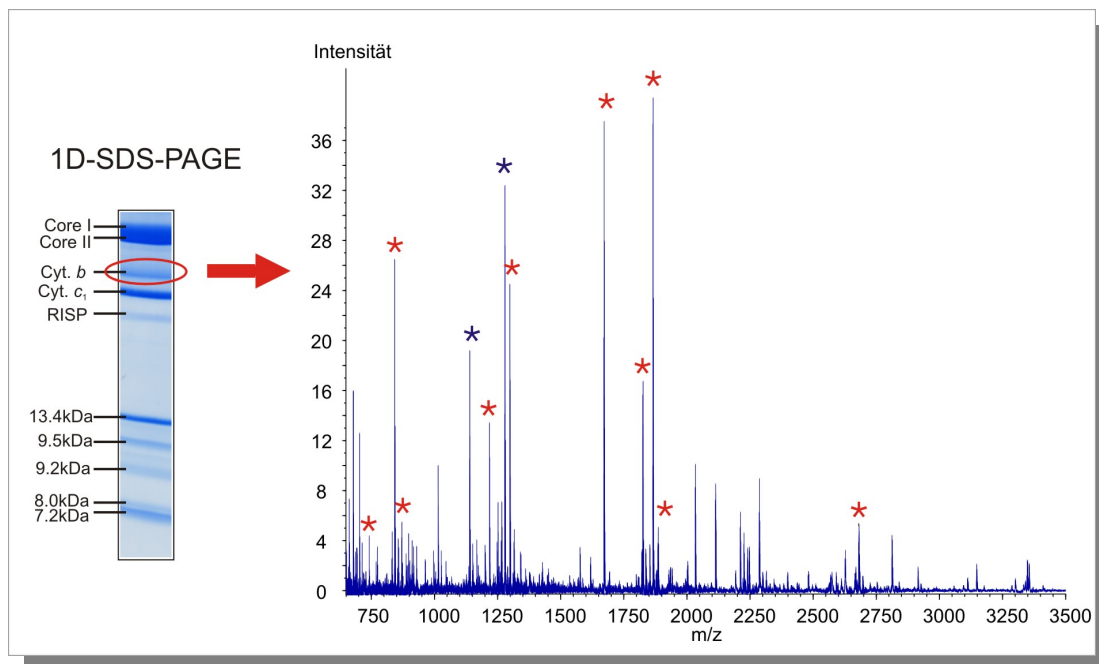


Abb. 5.16 MALDI-TOF PMF Übersichtsspektrum des In-Gel-Verdau der Cytochrom *b* Bande

Die Auswertung des Spektrums zeigt eine Vielzahl an falsch positiven Signalen (*), die dem Cytochrom *c*₁ zugeordnet werden konnten. Die mit (*) gekennzeichneten Signale bei MH^+_{gem} 1278,6899 und 1135,5843 wurden nicht dem Cytochrom *c*₁ zugeordnet

Die Auswertung des tryptischen Verdau durch den Mascot-Datenbank Server ordnete 10 Peptide dem Cytochrom *c*₁ zu, was einer Sequenzabdeckung von 51% und einem signifikanten Score von 74 entsprach (Abb. 5.17). Außerdem wurden die Proteine Core I und Core II gefunden, jedoch war ihre Identifizierung nicht signifikant. Das Cytochrom *b* wurde nicht identifiziert.

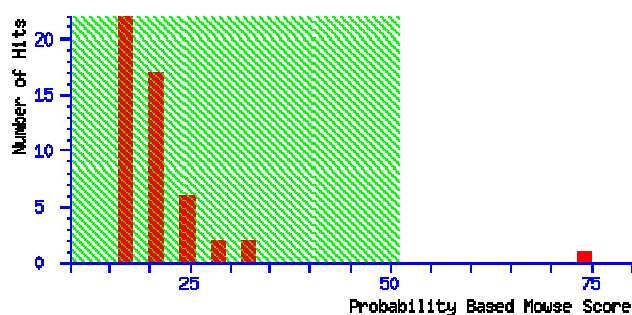


Abb. 5.17

Datenbanksuchergebnis des Cytochrom *b*-Verdau

Das Cytochrom *c*₁ wurde mit einem signifikanten Mascot-MOWSE-Score von 74 identifiziert. Das Cytochrom *b* konnte nicht identifiziert werden. Die Suchparameter waren wie folgt: Enzym: Trypsin; Datenbank: Swiss-Prot; Organismus: Andere Säuger; Massengenauigkeit 20ppm; Anzahl überlesener Schnittstellen: 1; variable Modifikationen: Oxidation des Methionins

Die beiden intensiven Signale bei $MH^+_{\text{gem}} 1135,5843$ und $MH^+_{\text{gem}} 1278,6899$ konnten nicht dem Cytochrom *c*₁ zugeordnet werden. Eine nachfolgende Sequenzierung dieser Peptide mittels MALDI-PSD bestätigte ihre eindeutige Zugehörigkeit zu dem Membranprotein Cytochrom *b* (Abb. 5.18 / Abb. 5.19).

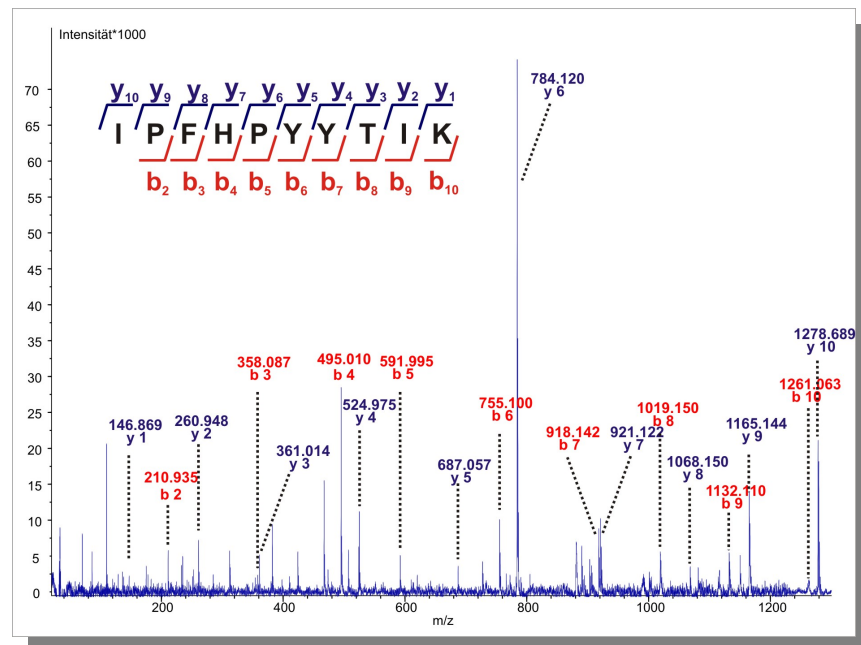


Abb. 5.18 MALDI- PSD Spektrum des Peptids IPFHPYYTIK ($MH^+_{\text{gem}} 1278,6899$) Die komplette y -Ionen Serie erlaubte eine Identifizierung mit einem signifikanten Mascot-Score von 72

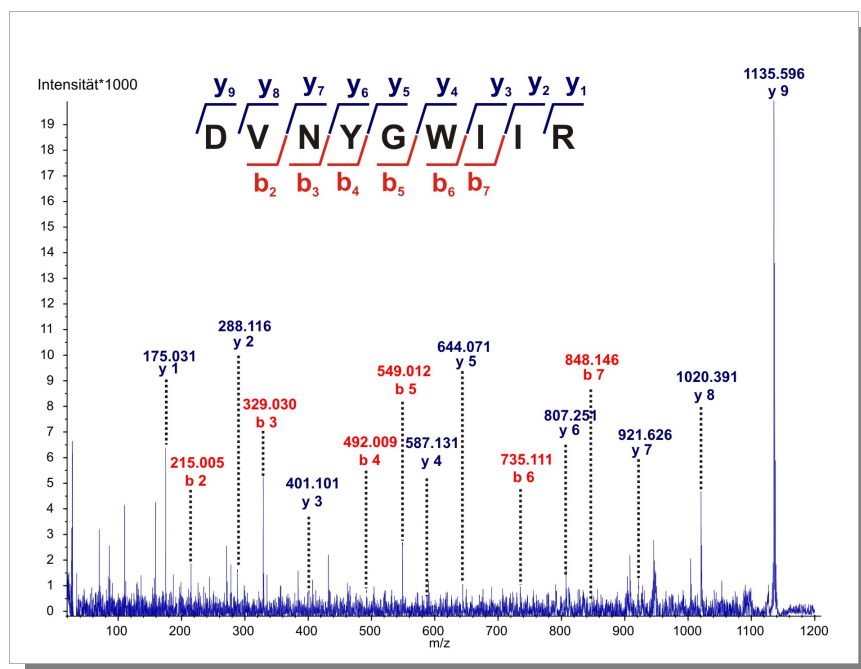


Abb. 5.19 MALDI- PSD Spektrum des Peptids DVNYGWIIR ($MH^+_{\text{gem}} 1135,5843$) Die komplette y -Ionen Serie erlaubte eine Identifizierung mit einem signifikanten Mascot-Score von 47

Außerdem wurden in dem Verdau-Übersichtsspektrum zwei Signale im unteren Massenbereich bis 800 Da registriert, die im Rahmen der Massengenauigkeit von 20 ppm als N-terminale Peptide des Cytochrom *b* identifiziert wurden. Eine Sequenzierung war aufgrund der geringen Intensität der Signale nicht möglich. Die Zuordnung der 4 gefundenen Peptide zu der hydrophoben Untereinheit III deckte die in der folgenden Abbildung blau eingefärbten Bereiche ab. Die mit MALDI-TOF gemessenen Peptide ergaben für das gesuchte Protein zusammen eine maximale Sequenzabdeckung von 8%, von denen nur 2% mittels Sequenzanalyse eindeutig bestätigt wurden.

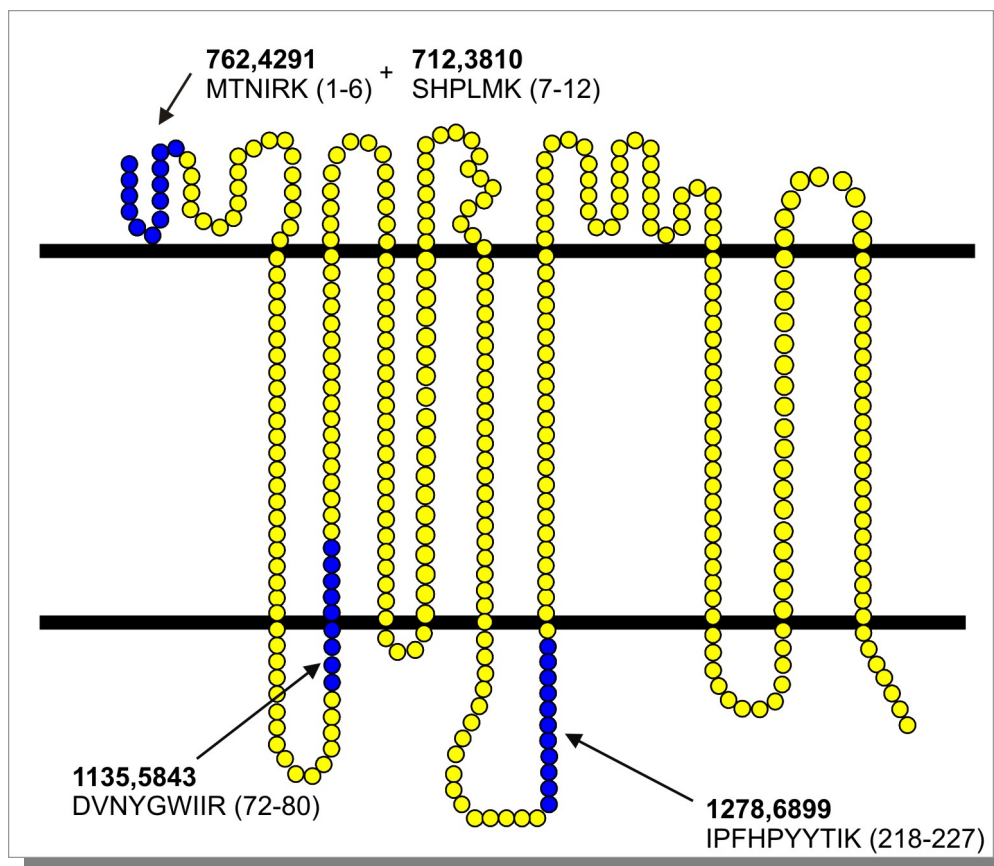


Abb. 5.20 Maximal erreichte Sequenzabdeckung des Cytochrom *b* bei Verwendung von Trypsin als Verdauenzym

Um eine höhere Sequenzabdeckung des Membranproteins zu erreichen, wurde der Einsatz eines alternativen Spaltungsenzyms ohne oder in Kombination mit Trypsin untersucht. Die Aminosäuresequenz des Cytochrom *b* gibt Auskunft über die Häufigkeit und Verteilung von Spaltstellen für verschiedene Verdauenzymen. Ein Sequenzvergleich zeigt bei der 42,7kDa großen Untereinheit für Chymotrypsin gegenüber Trypsin eine höhere Anzahl an enzymatischen Spaltstellen (Abb. 5.21). Mit Hilfe eines *in silico*-Verdaus wurden für das

Cytochrom *b* durch Verwendung von Chymotrypsin gegenüber Trypsin eine größere Anzahl an Spaltprodukten vorausgesagt. Die Durchschnittsmasse der chymotryptischen Peptide lag bei 1658,1821 Da und somit deutlich niedriger als die tryptischer Peptide (\bar{M} 4359,6828 Da, Abb. 5.22). Neben der deutlichen Verschiebung in der Massenverteilung zeigte sich auch eine Veränderung der Hydrophobizitäten der Peptide (\bar{H} 0,629 bei Chymotrypsin gegenüber \bar{H} 0,425 bei Trypsin, Abb. 5.23).

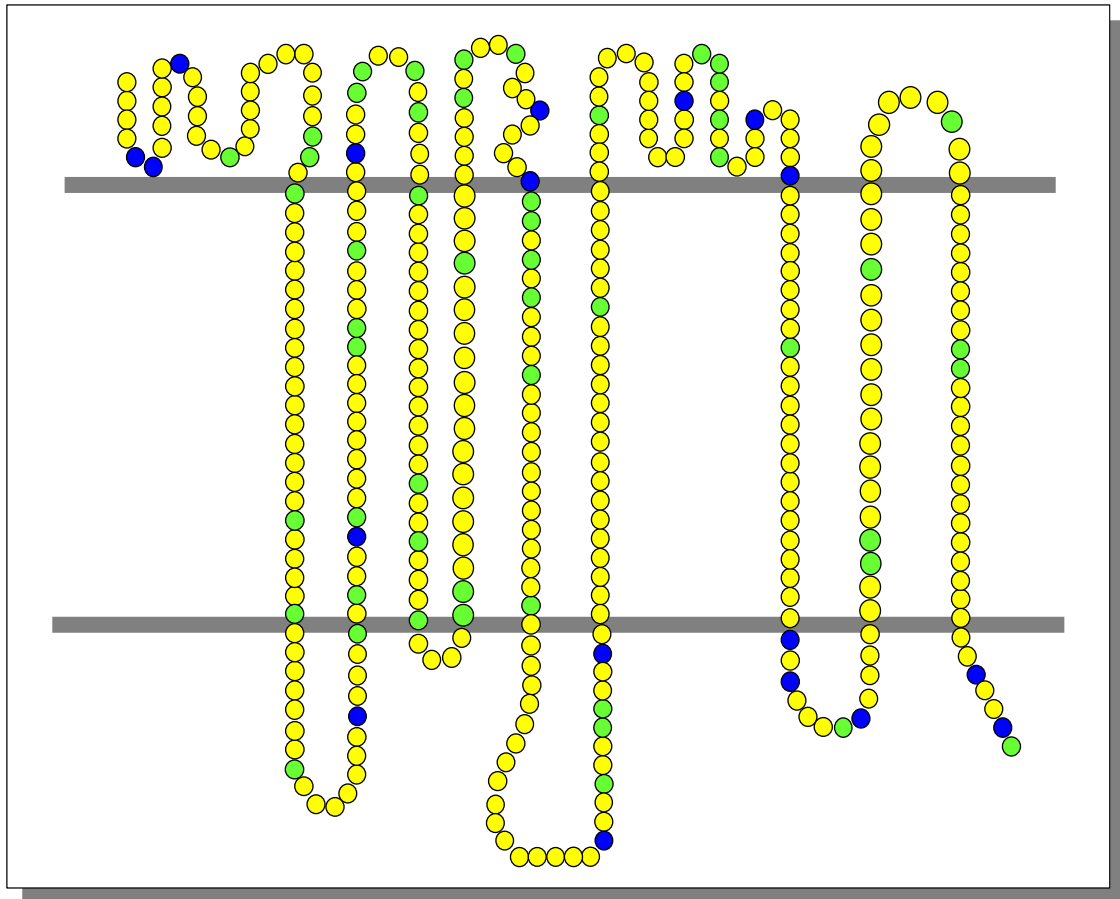


Abb. 5.21 Verteilung der enzymatischen Schnittstellen von Trypsin (●) und Chymotrypsin (●) innerhalb des Cytochrom *b*. Trypsin schneidet C-terminal von Arginin und Lysin; Chymotrypsin schneidet hinter Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan.

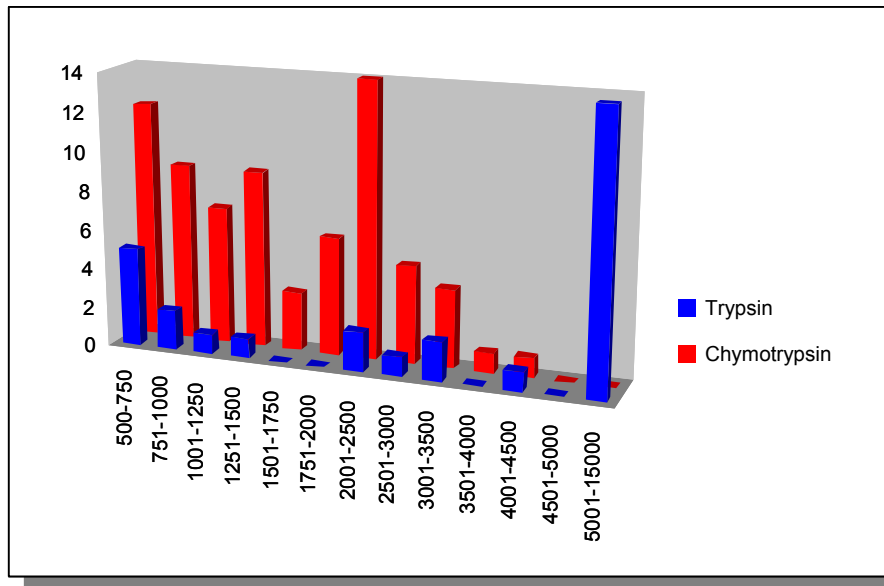


Abb. 5.22 Verteilung der Molekulargewichte der Peptide nach einem *in silico* Verdau von Cytochrom *b* mit Trypsin (■) und Chymotrypsin (■). Die gewählte Anzahl überlesener Schnittstellen ist 0, was einen idealen, kompletten Abbau bedeutet.

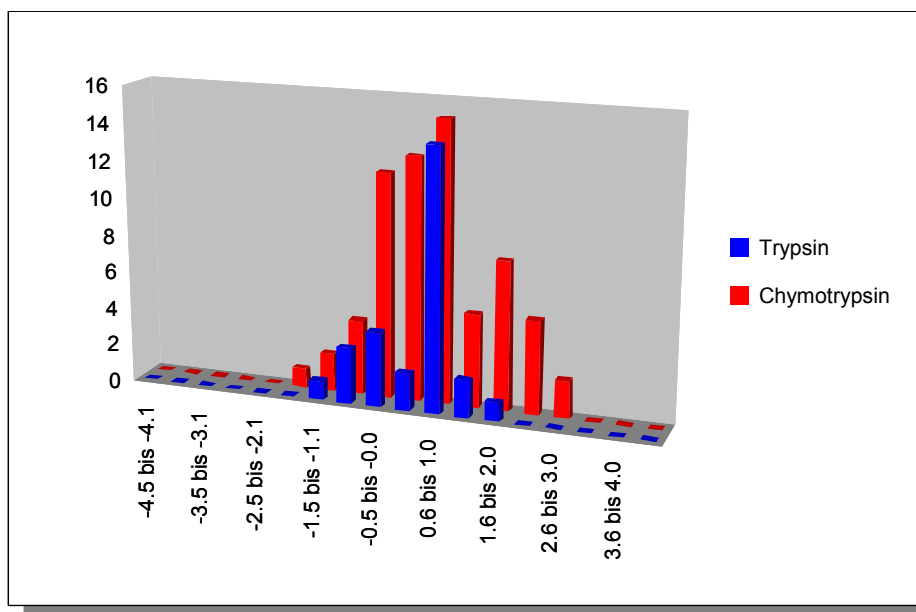


Abb. 5.23 Verteilung der Hydrophobizitäten der Peptide nach einem *in silico* Verdau des Cytochrom *b* mit Chymotrypsin (■) und Trypsin (■). Der Verdau mit Chymotrypsin bedingt eine Verschiebung der GRAVY-Scores einzelner Peptide zu größeren Werten. Die Anzahl an überlesenen Schnittstellen ist 0, was einen idealen, kompletten Abbau bedeutet.

Für die Experimente wurden die dem Cytochrom *b* entsprechende Bande des 16% 1D Tricin SDS-Gels des D₂Ant-Subkomplex verwendet (Abb. 5.16). In Abb. 5.24 ist der typische Arbeitsablauf für einen In-Gel-Verdau in Form eines Flußdiagramms skizziert. Eine

detaillierte Anleitung und Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte findet sich in Kapitel 4.4.1, Seite 52. Um das Standardarbeitsprotokoll hinsichtlich der Verdaueffektivität für integrale Membranproteine zu verbessern, wurde die Versuchskonzeption neben dem Einsatz von Chymotrypsin systematisch um das Zermahlen des Gels und/oder die Inkubation mit chaotropen Reagenzien erweitert. Mit dem Zerreiben des Gels sollte zum einen der Kontakt mit dem Enzym verbessert werden, zum anderen sollte hierdurch die Extraktionseffizienz der Peptide aus den Gelresten gesteigert werden. Die optionale Inkubation der Gele in Lösungen stark chaotroper Substanzen sollte die Denaturierung und Entfaltung der Proteine fördern.

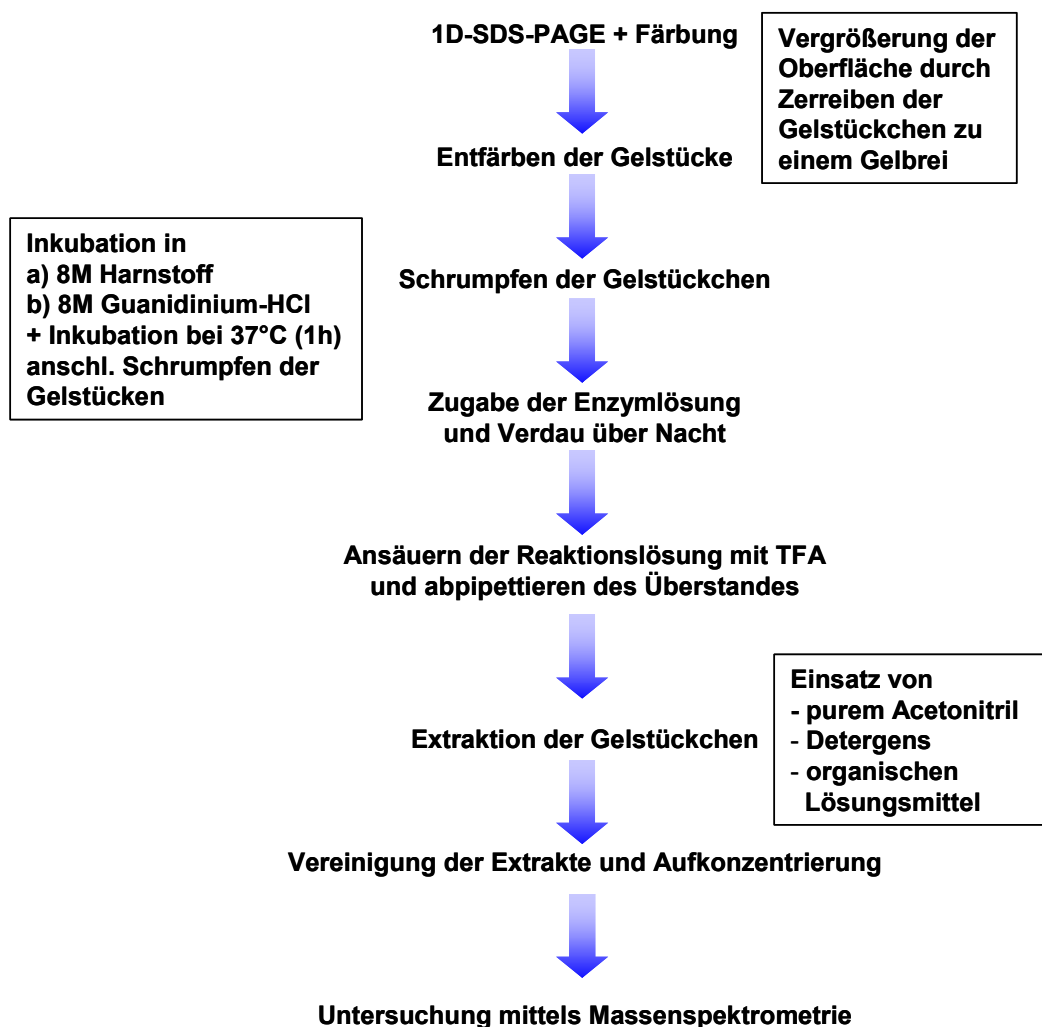


Abb. 5.24 Arbeitsschritte eines In-Gel-Verdaus bei der Proteinanalytik Neben den typischen Arbeitsschritten sind noch zusätzlich das Zerreiben der Gele zwecks Kontaktflächenvergrößerung sowie die Inkubation mit Harnstoff oder Guanidinium-HCl zur stärkeren Denaturierung optional aufgeführt. Bei der Extraktion wurden verschiedene Lösungsmittelsysteme evaluiert.

5.2.2.1 Verdau mit Trypsin

Vier gleichgroße Gelstückchen wurden nach dem in Tabelle 5.7 aufgelisteten System präpariert.

Tabelle 5.7 Einteilung der einzelnen Trypsin-Verdauexperimente

	Zerreiben	8 M Harnstoff
Cyt. <i>b</i> – T1	✘	✘
Cyt. <i>b</i> – T2	✘	✓
Cyt. <i>b</i> – T3	✓	✘
Cyt. <i>b</i> – T4	✓	✓

✓ = durchgeführt

✘ = nicht durchgeführt

Die nachfolgenden Spektren sind am Voyager DE-STR™ mit 1500 Schuß aufgenommen und intern auf zwei Autoproteolysepeaks des Trypsins (MH^+_{mi} 842,5100 und MH^+_{mi} 2211,1046) kalibriert worden. Die Datenbankauswertung wurde über die Internet-Plattform „MASCOT-Peptide Mass Fingerprint“ von Matrixscience durchgeführt.

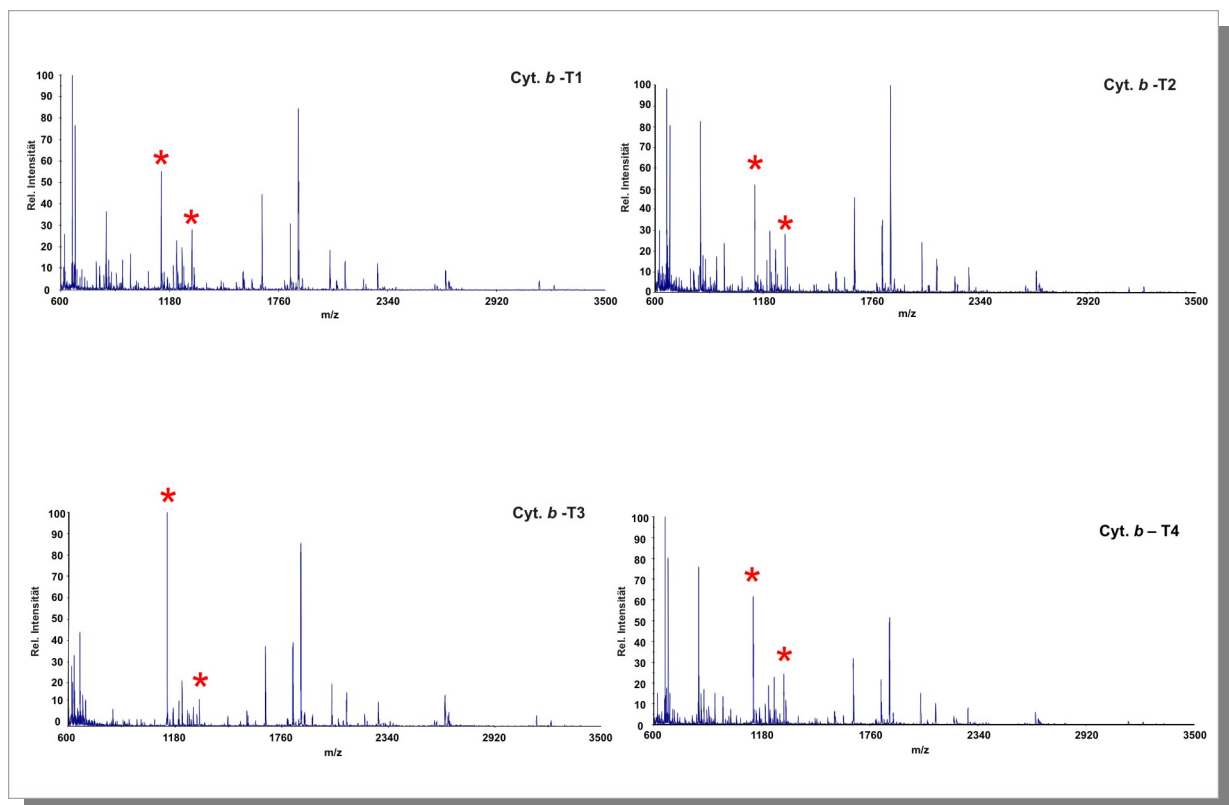


Abb. 5.25 MALDI ToF-Übersichtsspektren der 4 tryptischen Verdau der Cytochrom *b*-Bande Die mit einem (*) gekennzeichneten Signale konnten dem Cytochrom *b* zugeordnet werden. Die restlichen Peptide resultieren aus Kontaminationen durch andere Untereinheiten des D₂Ant-Komplexes

Der Vergleich der Peaklisten aus den vier Versuchen Cyt. *b* T1-T4 ergab eine nahezu vollständige Übereinstimmung der gemessenen Peptide. Die Datenbanksuche identifizierte in allen 4 Spektren eine Mischung der Proteine Core I, Core II und Cytochrom *c*₁, welche alle zu dem gelelektrophoretisch aufgetrennten Komplex zählten. Die Untereinheit III, das Cytochrom *b*, wurde nicht entdeckt (Abb. 5.26). In allen vier Spektren wurden zwei dominante Signale bei *m/z* 1135 Da und 1278 Da registriert. Die Analyse mittels *Post-Source-Decay* ergab für die Peptide in allen 4 Fällen die Sequenzen «DVNYGWIIR» und «IPFHPYYTIK», welche sie als Spaltprodukte des Cytochrom *b* bestätigten.

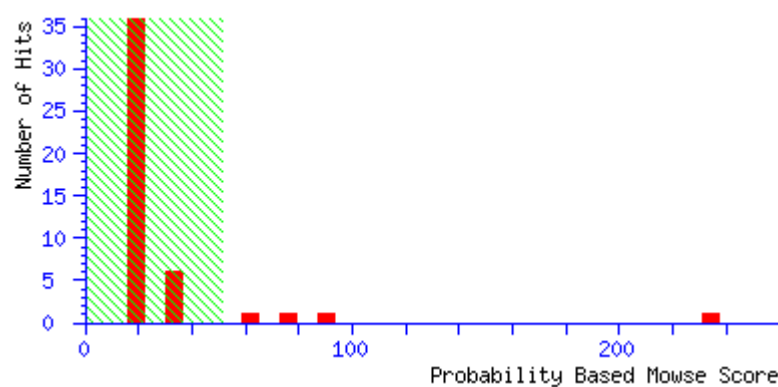


Abb. 5.26 MASCOT-Datenbanksuchergebnis des tryptischen Verdaus der Cytochrom *b*-Bande

Als Datenbank wurde die aktuellste Version von SwissProt verwendet. Der gewählte Organismus war „Other Mammalia“, die Suche wurde bei einer überlesenen Schnittstelle mit einer Massengenauigkeit von 50 ppm durchgeführt. Als variable Modifikationen wurden „Methionin-Oxidiert“ sowie „N-Formylierung“ eingestellt

	Accession	Mass	Score	Description
1.	Mixture 1		232	P00125 + P31800 + P23004
2.	P00125	27269	93	Cytochrome <i>c</i>₁, heme protein, mitochondrial
3.	P31800	52702	76	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein I
4.	P23004	48119	68	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein II

5.2.2.2 *Verdau mit Chymotrypsin*

Neben dem Einfluß von Harnstoff und der Zerreibung des Gels wurde bei den Verdauexperimenten mit Chymotrypsin zusätzlich die denaturierende und chaotrope Wirkung von 8 M Guanidinium-Hydrochlorid untersucht (Tabelle 5.8).

Tabelle 5.8 Einteilung der einzelnen Chymotrypsin-Verdauexperimente

	Zerreiben	8 M Harnstoff	8 M Guanidinium-HCl
Cyt. <i>b</i> – CT1	✘	✘	✘
Cyt. <i>b</i> – CT2	✘	✓	✘
Cyt. <i>b</i> – CT3	✓	✘	✘
Cyt. <i>b</i> – CT4	✓	✓	✘
Cyt. <i>b</i> – CT5	✘	✘	✘
Cyt. <i>b</i> – CT6	✘	✘	✓
Cyt. <i>b</i> – CT7	✓	✘	✘
Cyt. <i>b</i> – CT8	✓	✘	✓

✓ = durchgeführt

✘ = nicht durchgeführt

Alle Verdau wurden mit dem Bruker Ultraflex MALDI-LIFT-TOF/TOF massenspektrometrisch untersucht und intern auf ein Autoproteolysepeptid des Chymotrypsins kalibriert (MH_{mi}^+ 1523,8176). Die nachfolgende Datenbankrecherche wurde mit der Internet-Plattform „MASCOT Peptide Mass Fingerprint“ von Matrixscience durchgeführt. Die ausgewählte Datenbank war die aktuellste Version von *SwissProt*. Der Organismus konnte nur auf *Other Mammalia* eingeschränkt werden. Die Suche erfolgte unter Berücksichtigung *zweier überlesener Schnittstellen* und einer Massengenauigkeit von 50 ppm. Als variable Modifikationen wurden „*Methionin-Oxidiert*“ sowie „*N-Formylierung*“ berücksichtigt.

In allen 8 Experimenten wurde als Ergebnis der Datenbanksuche Cytochrom *b* an erster Stelle der gefundenen Proteine aufgelistet. Abb. 5.27 vergleicht die einzelnen Experimente hinsichtlich der Anzahl an gefundenen Peptiden sowie der damit erreichten Sequenzabdeckungen. Zum Vergleich ist das Ergebnis des Versuches Cyt. *b*-T1 aufgeführt, das repräsentativ für alle tryptischen Verdauversuche des Cytochrom *b* steht, da mit Trypsin in keinem der vier Experimente (T1-T4) eine höhere Sequenzabdeckung erreicht wurde.

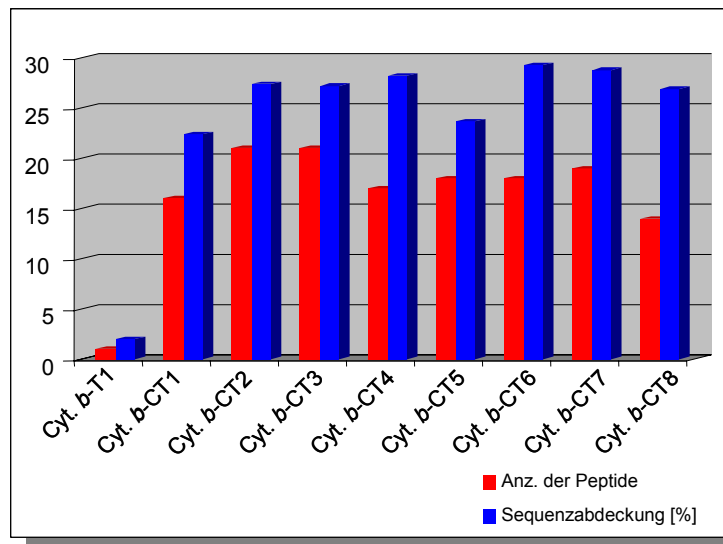


Abb. 5.27 Verteilung der Peptid- und Sequenzabdeckung der identifizierten Untereinheit Cytochrom *b*

In allen 8 Experimenten wurden ausreichend chymotrypsische Peptide gemessen, die Sequenzabdeckungen zwischen 20 und 30% ermöglichten. Außerdem ist das Resultat von Trypsin mit aufgeführt (links). Der Unterschied gegenüber Chymotrypsin ist deutlich anhand der geringen Sequenzabdeckung zu erkennen

Das nachfolgende Spektrum zeigt den chymotrypsischen Verdau CT-3 (Zerreißung; ohne Harnstoff; ohne Guanidinium-HCl) von Cytochrom *b*. Neben der Auswertung des Verdauspektrums mit „MASCOT Peptide Mass Fingerprint“ wurde die Identität der markierten Peptide vom Cytochrom *b* zusätzlich mit MALDI-TOF-PSD und „MASCOT Sequence Query“ verifiziert. Die Sequenzen der markierten Signale aus diesem Verdau wurden mittels MALDI-PSD bestätigt und dem Cytochrom *b* zugeordnet.

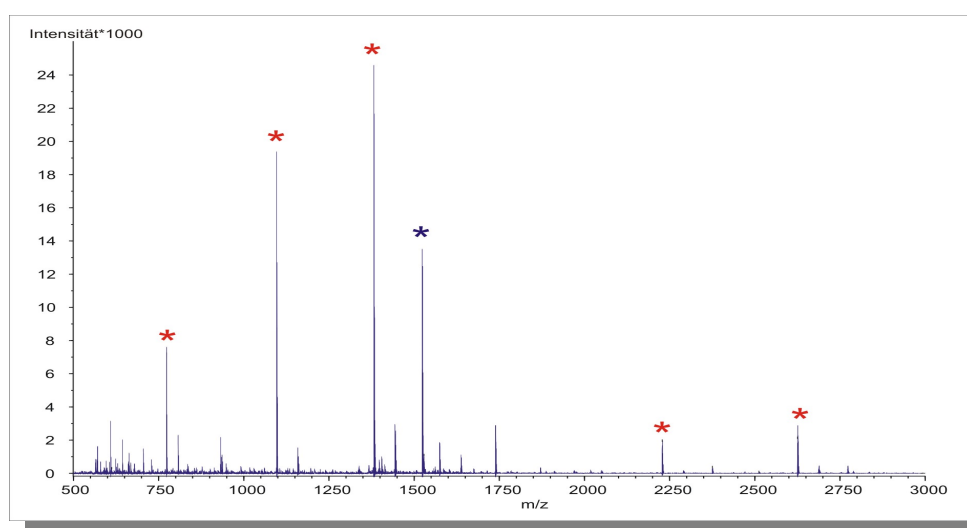


Abb. 5.28 MALDI-TOF Spektrum des Cytochrom *b* Verdau mit Chymotrypsin (Versuch CT-3)

Das Spektrum wurde intern auf den Autolysepeak des Chymotrypsins (*) (MH^+_{mi} 1523,8176) kalibriert. Intensive Signale (*) wurden mittels PSD sequenziert und dem Cytochrom *b* zugeordnet

Als Ergebnis der Mascot-Datenbanksuche wurde anhand der Daten aus den chymotryptischen Verdaus die Untereinheit Cytochrom *b* aus dem Rind eindeutig identifiziert. Der erreichte Mascot MOWSE-Score lag bei 69.

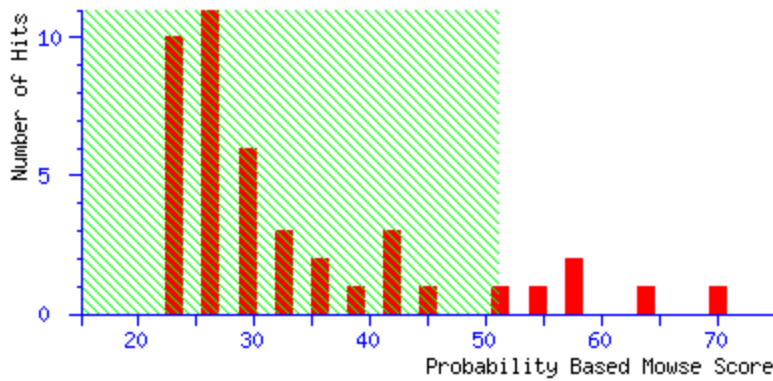
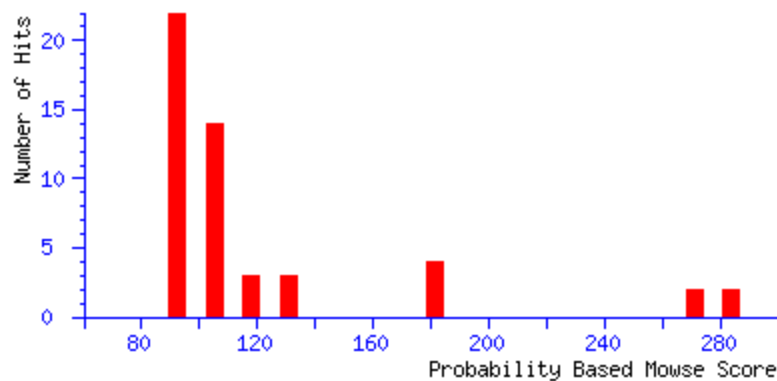


Abb. 5.29
Datenbanksuchergebnis des chymotryptischen Cytochrom *b*-Verdaus

Die hydrophobe Untereinheit konnte eindeutig mit einem Score von 69 identifiziert werden. Neben dem Cytochrom *b* wurden auch die homologen Proteine aus anderen Säugern identifiziert, da die Datenbank nur eine Eingrenzung auf „Andere Säuger“, nicht aber *Bos taurus* zuließ.

	Accession	Mass	Score	Description
1.	P00157	42514	69	CYB_BOVIN

Die Software BioTools™ erlaubt die Verknüpfung von PMF-Spektren mit Fragmentspektren von Peptiden derselben Probe. Die zusätzliche Sequenzierung der in Abb. 5.28 markierten Signale ergab in Kombination mit den Meßdaten des *Peptide Mass Fingerprints* einen noch höheren und signifikanteren Score für den chymotryptischen Verdaus dieses integralen Membranproteins:



Accession	Mass	Score	Expect	Queries matched	Protein
P00157	42562	284	2,8E-25	26	CYB_BOVIN

Abb. 5.30 Kombiniertes Datenbanksuchergebnis aus *Peptide Mass Fingerprint* und PSD-Sequenzanalyse

Abbildung 5.31 und 5.32 zeigen zwei Fragmentspektren des chymotryptischen Cytochrom *b* Verdaus mit deren Hilfe das integrale Membranprotein identifiziert wurde.

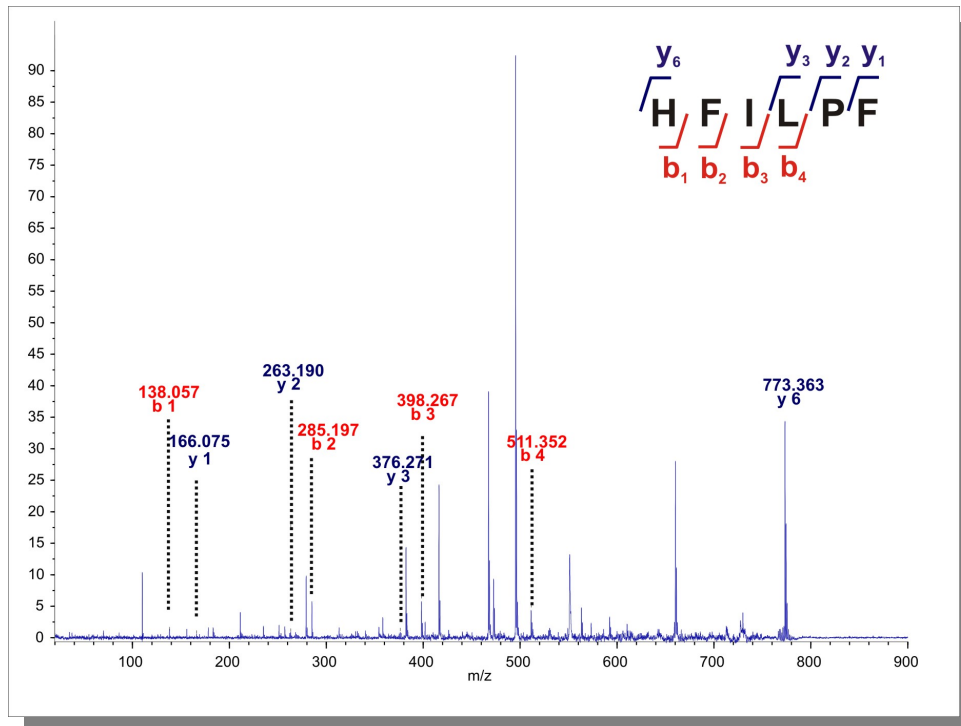


Abb. 5.31 MALDI-PSD Spektrum des Peptids HFILPF ($MH^+_{\text{gem}} 773,3630$) Anhand der *y*- und *b*-Ionenserie konnte das Cytochrom *b* eindeutig identifiziert werden (Mascot Score 58)

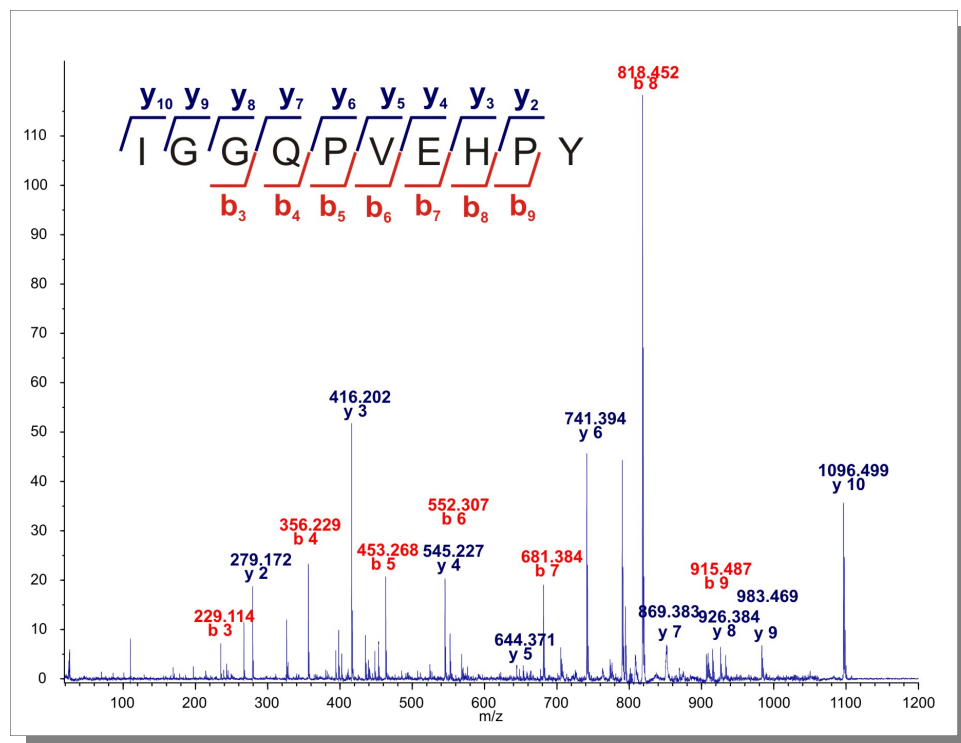


Abb. 5.32 MALDI-PSD Spektrum des Peptids IGGQPVEHPY ($MH^+_{\text{gem}} 1096,4989$) Anhand der *y*- und *b*-Ionenserie konnte das Cytochrom *b* eindeutig identifiziert werden (Mascot Score 78)

Einen detaillierten Vergleich der in den Untersuchungsserien zugeordneten und identifizierten Peptide geben Abb. 5.33 und Abb. 5.34. Die detaillierte Aufstellung aller dem Cytochrom *b* zugeordneten Peptide der einzelnen Verdauexperimente mit ihren Sequenzen und Gravy-Scores findet sich im Anhang (Tabelle 8.3 / Tabelle 8.4). Anhand der graphischen Darstellung der abgedeckten Sequenzbereiche der Cytochrom *b* Untereinheit ist die Erhöhung der Sequenzabdeckung für dieses Protein durch Verwendung von Chymotrypsin gegenüber Trypsin zu erkennen (vgl. Abb. 5.20, S. 81). Eine Erhöhung der Sequenzabdeckung durch das Zerreiben der Gelstückchen und/oder der Behandlung mit stark denaturierenden Stoffen hatte keinen systematischen Einfluß auf die Anzahl der gefundenen Peptide.

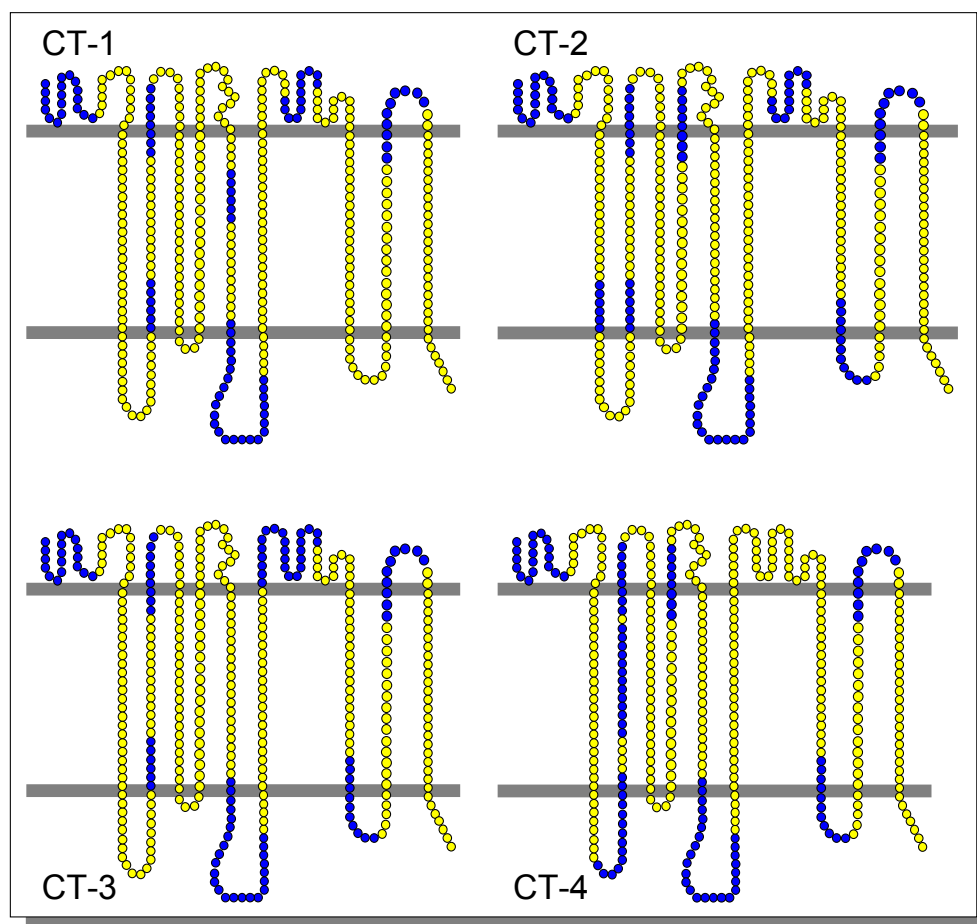


Abb. 5.33 Vergleich der Sequenzabdeckungen von Cytochrom *b* nach Inkubation mit 8M Harnstoff und enzymatischem Verdau mit Chymotrypsin Massenspektrometrisch identifizierte Sequenzen sind blau eingefärbt, nicht abgedeckte Bereiche sind gelb gehalten

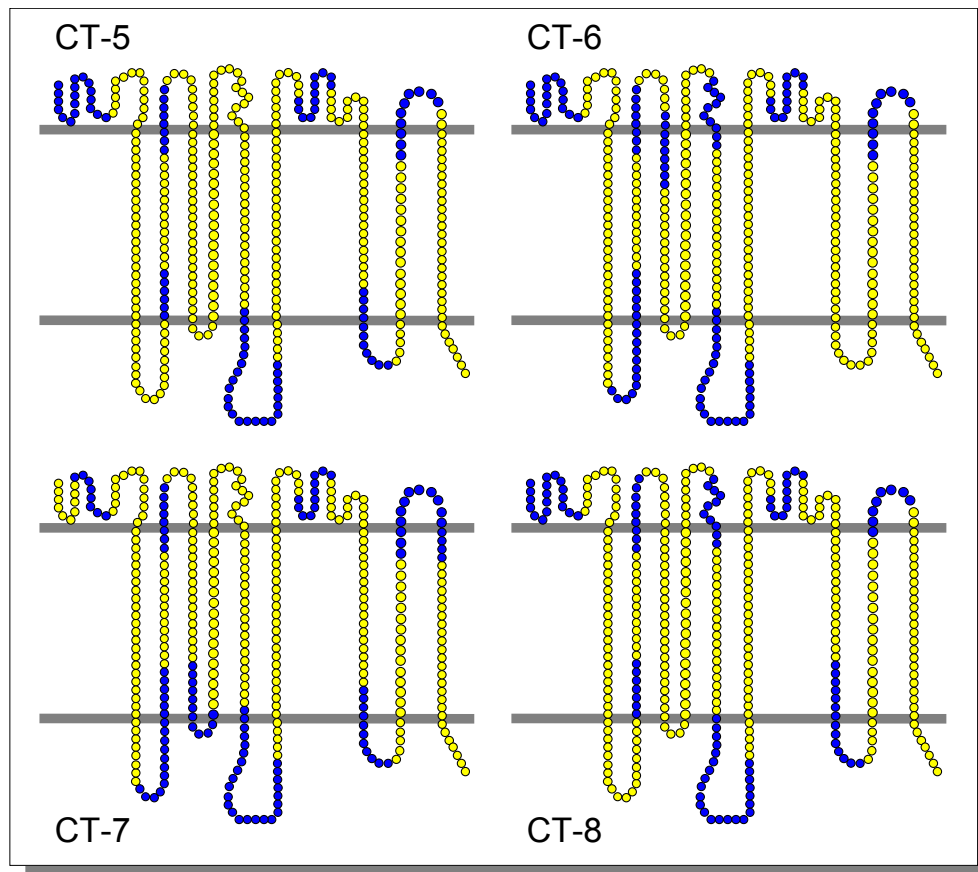


Abb. 5.34 Vergleich der Sequenzabdeckungen von Cytochrom *b* nach Inkubation mit Guanidinium-Hydrochlorid und enzymatischen Verdau mit Chymotrypsin. Massenspektrometrisch identifizierte Sequenzen sind blau eingefärbt, nicht abgedeckte Bereiche sind gelb gehalten.

5.2.2.3 Sequentieller Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin

Die bearbeiteten Gelstücke aus der Trypsin-Versuchsreihe (Cyt. *b* T1-T4) wurden nach Extraktion und Trocknung zusätzlich mit Chymotrypsin inkubiert. Mit Ausnahme von Probe Nr. 1, wo in allen Experimenten weder eine Zerreißung der Gelstückchen noch eine Denaturierung durchgeführt wurde, konnte in den restlichen 3 Proben eine Sequenzabdeckung von über 30% erzielt werden. (Tabelle 5.9).

Tabelle 5.9 Vergleich der Sequenzabdeckungen der Cyt. *b* Verdauerserien mit Chymotrypsin

	Trypsin	Chymotrypsin		Trypsin (1.) Chymotrypsin (2.)
		Harnstoff	Guanidinium-Hydrochlorid	
Cyt. <i>b</i> – 1	7,0%	22,4%	23,7%	29,0%
Cyt. <i>b</i> – 2	7,0%	27,4%	29,3%	30,9%
Cyt. <i>b</i> – 3	7,0%	27,2%	28,8%	35,1%
Cyt. <i>b</i> – 4	7,0%	28,2%	26,9%	31,9%

In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der identifizierten Abschnitte nach dem sequentiellen Verdau der Gelbanden mit Trypsin (1.) und Chymotrypsin (2.) zu sehen. Gegenüber dem alleinigen Einsatz von Chymotrypsin mit oder ohne Zusatz von Harnstoff/Guanidinium-HCl ist eine weitere Zunahme der Sequenzabdeckung zu beobachten. Die Sequenzabdeckung in Bereichen der transmembranen Helices konnte nicht gesteigert werden (Abb. 5.35).

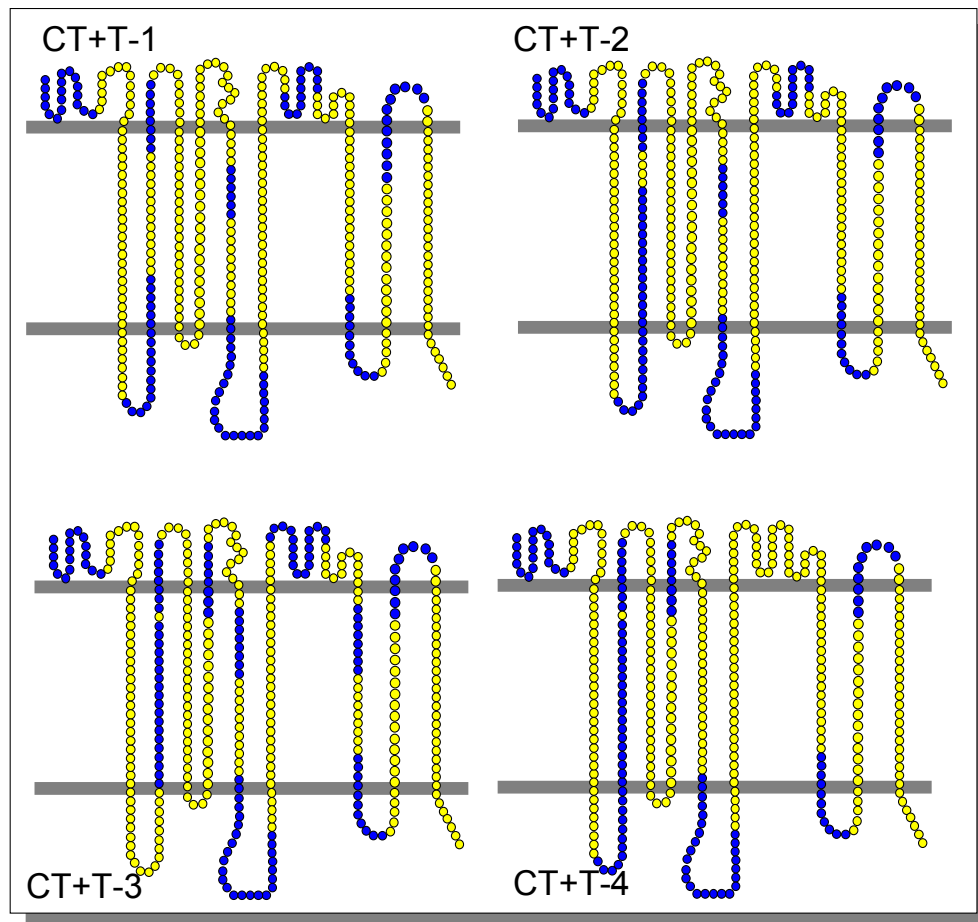


Abb. 5.35 Übersicht der durch den sequentiellen Verdau erreichten Sequenzabdeckungen

5.2.2.4 Parallel-Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin

Abschließend wurde der Effekt der gleichzeitigen Einwirkung von Trypsin und Chymotrypsin auf das Protein untersucht. Dazu wurden die beiden Enzyme im Verhältnis 1:1 (Endkonzentration jeweils 10ng/ μ l) zugesetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Genau wie in den Versuchen Cyt. *b*-T1, Cyt. *b*-CT1 und Cyt. *b*-CT5 wurden die Gelstückchen dabei vorher weder zerrieben noch in Harnstoff- bzw. Guanidinium-Lösung inkubiert. Das dazugehörige MALDI-TOF Übersichtsspektrum ist im Folgenden abgebildet.

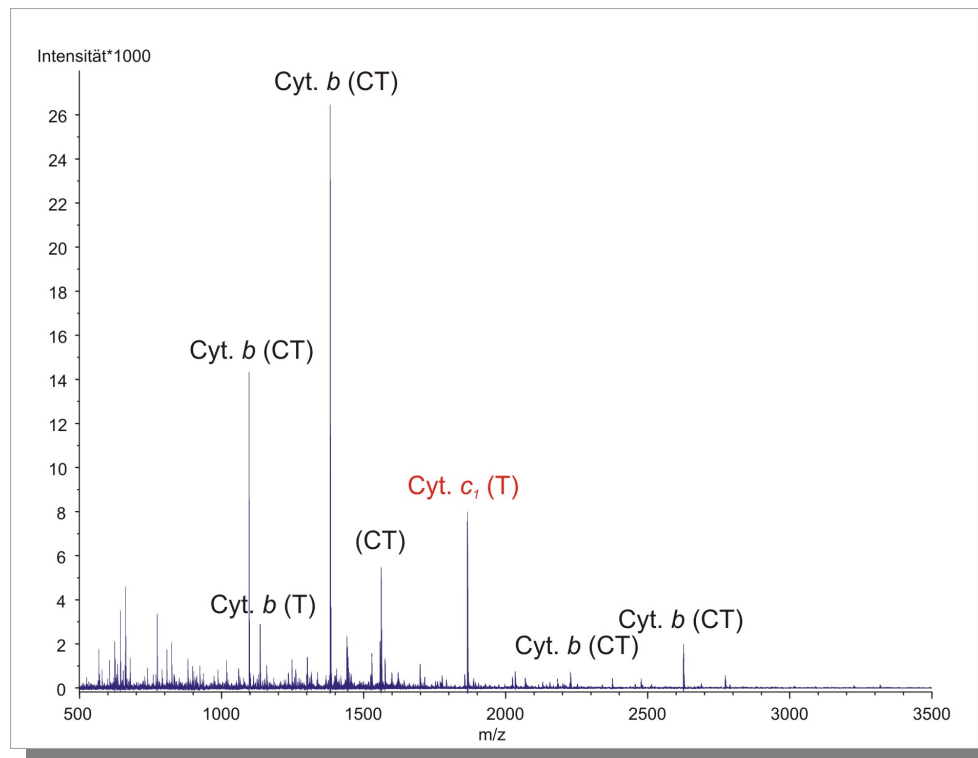


Abb. 5.36 Peptide Mass Fingerprint Spektrum des Parallel-Verdaus von Cytochrom *b* mit Trypsin und Chymotrypsin

Neben einigen chymotryptischen Peptiden findet sich auch ein tryptisches Peptid des Cytochrom *b* (MH_{gem}^+ 1135,5856). Darüber hinaus konnte anhand des intensiven Signals bei MH_{gem}^+ 1864,9430 die Anwesenheit des Cytochrom *c₁* bestätigt werden. Außer diesem Peptid wurden keine weiteren tryptischen oder chymotryptischen Peptide der kontaminierenden Untereinheiten nachgewiesen werden. Das Spektrum wurde intern auf das Autoproteolysepeptid (MH_{mi}^+ 1523,8176) der eingesetzten Endopeptidase Chymotrypsin nachkalibriert. Die Datenbanksuche ergab für das Cytochrom *b* bei einer Massengenauigkeit von 50ppm für beide Enzyme in der Summe eine Trefferquote von 19 Peptiden, was einer Sequenzabdeckung von 39,6% entsprach. Mit einem signifikanten Score von 73 wurde das Cytochrom *b* aus *Bos taurus* an Position 1 der identifizierten Proteine aufgeführt. Die Identität der beiden tryptischen Peptide des Cytochrom *b* und *c₁* konnte mittels MS/MS bestätigt werden. Neben dem zur internen Kalibrierung verwendeten Autoproteolysepeak des Chymotrypsins wurden keine weiteren Autoproteolyseeffekte beobachtet. Ein zu erwartender gegenseitiger Verdau der beiden Endopeptidasen konnte nicht festgestellt werden.

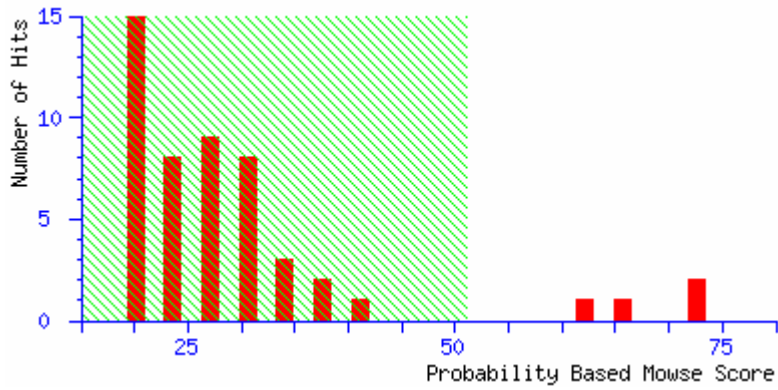


Abb. 5.37

Datenbanksuchergebnis des Cytochrom *b*-Verdau mit einer Enzymkombination aus Trypsin und Chymotrypsin

Die hydrophobe Untereinheit konnte eindeutig mit einem Score von 73 identifiziert werden.

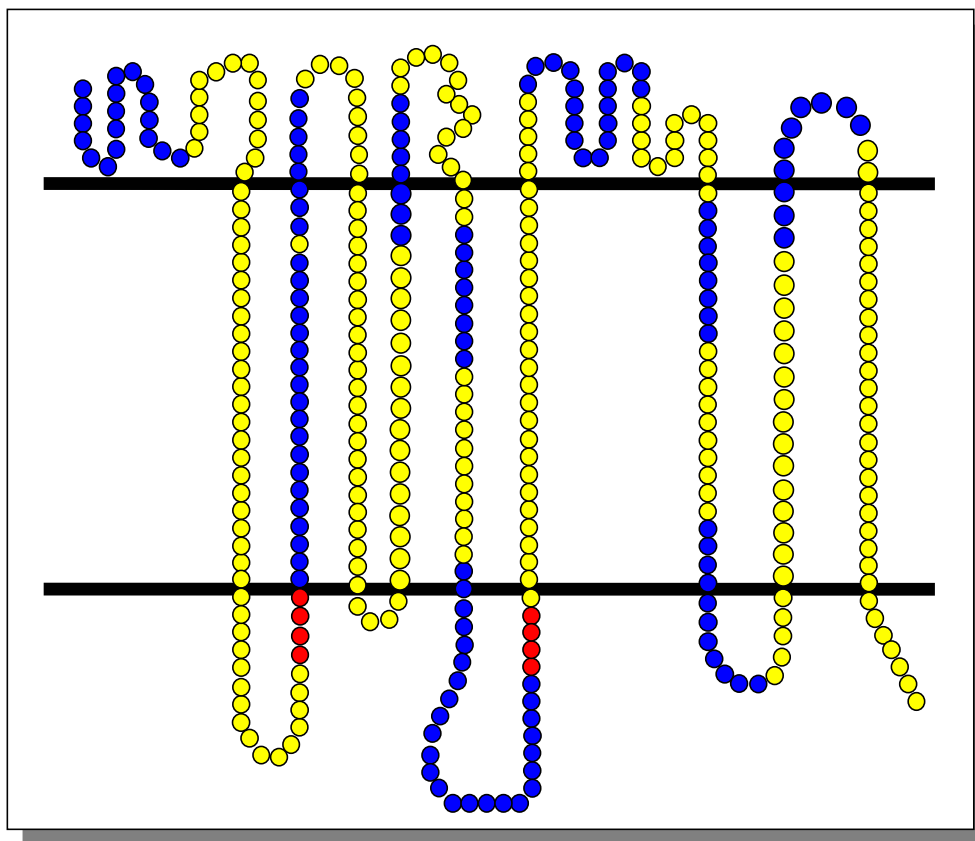


Abb. 5.38 Übersicht der maximal erreichten Sequenzabdeckung von Cytochrom *b* nach einem In-Gel-Verdau Die mit Chymotrypsin generierten Peptide sind blau eingefärbt (•), die durch einen tryptischen Verdau abgedeckten Sequenzen sind zusätzlich rot eingefärbt (•). Von den zwei tryptischen Peptiden wurde nur das an der Position 72-80 eindeutig per MS/MS identifiziert

5.2.3 Einfluß der Gelkonzentration auf die Identifizierung von Membranproteinen

Um den Einfluß der Acrylamidkonzentration bzw. Porengröße des Gels auf die Sequenzabdeckung zu untersuchen wurde der D₂Ant-Komplex in verschiedenen Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die eingesetzten Acrylamidkonzentrationen im Gel betragen: 10% T und 16,5% T bei einer Cross-Linker Konzentration von 3,3% sowie 10% T und 16,5% T bei einer Cross-Linker Konzentration von 2,6%.

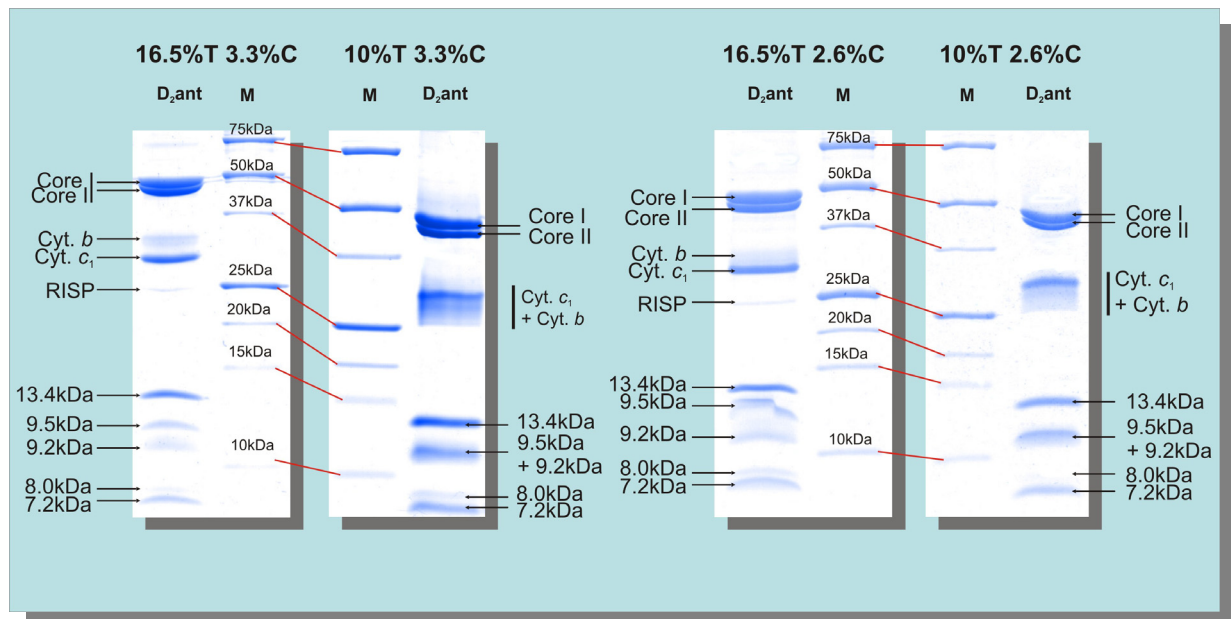


Abb. 5.39 Vergleich des Migrationsverhalten der Proteine aus dem D₂Ant-Komplex in einem 1D-SDS-Tricin-Gel in Abhängigkeit von der Gelkonzentration (M: Molekularer Größenmarker)

Die Auswertung der Gele zeigte, daß in 16,5%igen Gelen gegenüber solchen mit 10% T ein wesentlich deutlicherer Trenneffekt für die einzelnen Untereinheiten der Komplexe erreicht wird. In der Kombination aus 16,5% T und 2,6% C war die Bande des Cytochrom *b* noch deutlich von der des Cytochrom *c*₁ zu differenzieren, doch erwies sich die Kombination aus 16,5% T und 3,3% C als die Variante mit der höchsten Trennleistung. Von der Konzentration des Crosslinkers unabhängig erreichten die Gele mit 10% T in Hinblick auf die Trennung der hydrophoben Untereinheit Cytochrom *b* nur eine ungenügende Auflösung. Neben dem Verschwinden der höherlaufenden Bande der 42,7 kDa großen Untereinheit zeigt sich unterhalb des Cytochrom *c*₁ ein „Schmier“. Auch die Bande des Eisen-Schwefel-Proteins (*engl. Rieske-Iron-Sulfur-Protein, RISP*) verschwamm mit der des Cytochrom *c*₁-Proteins. Unabhängig von den Gelkonzentrationen zeigten die hydrophilen Untereinheiten ein ihren Molekulargewichten entsprechendes Laufverhalten. Dagegen wanderte Cytochrom *b* selbst bei hoher Acrylamidkonzentration und kleiner Porengröße schneller als aus seinem

Molekulargewicht zu schließen ist. Die den einzelnen Untereinheiten entsprechenden Banden wurden aus den vier Gelen ausgeschnitten und einem enzymatischen Verdau mit Trypsin unterzogen. Zusätzlich wurden die Bereiche oberhalb und unterhalb des Cytochrom c_1 ausgeschnitten und untersucht. Abb. 5.40 vergleicht die erreichten Sequenzabdeckungen der einzelnen Untereinheiten für alle verwendeten Gelkonzentrationen. In allen Fällen standen die untersuchten Proteine an Position 1 der Datenbanksuche und wiesen signifikante MOWSE-Scores auf.

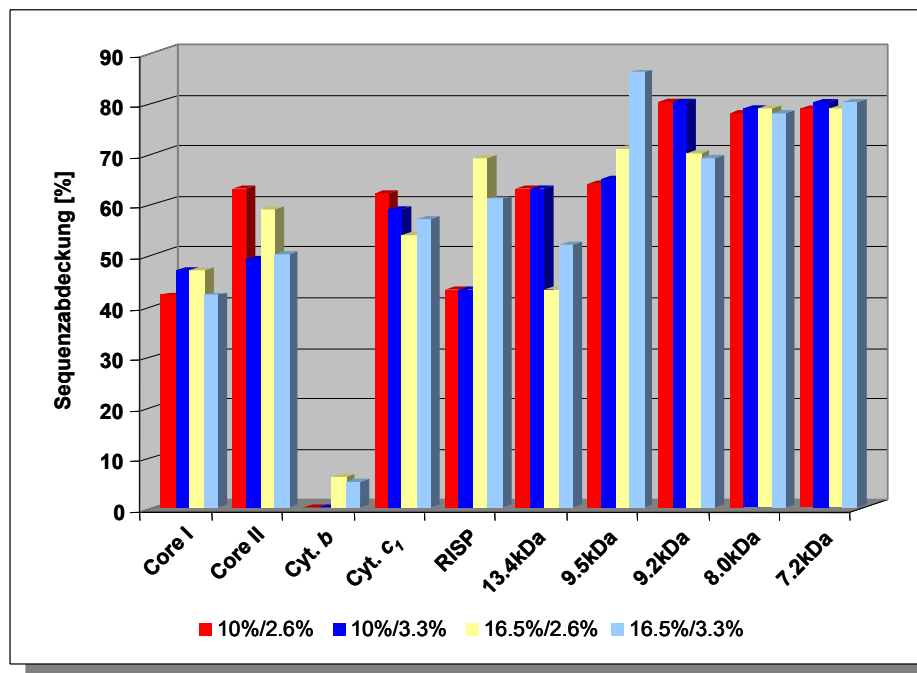


Abb. 5.40 Erreichte Sequenzabdeckung der einzelnen Untereinheiten des Komplexes in Abhängigkeit von der Gelkonzentration

Cytochrom b wurde nur in den Gelvarianten mit 16,5% Acrylamidkonzentration eindeutig nachgewiesen. In den 10% Gelen konnte das Cytochrom b unterhalb der Cytochrom c_1 -Bande nur anhand eines einzigen tryptischen Peptids durch MS/MS-Experimente identifiziert werden. Die Bereich oberhalb des Cytochrom c_1 ergaben keine Hinweise auf das Vorliegen des Cytochrom b .

5.3 BN-MALDI-MS/MS von Komplex I, III, IV und V

Für *Proteomics*-Studien wurde die Blau-Native-Gelelektrophorese bislang nur als erste Stufe in mehrdimensionalen Gelsystemen eingesetzt. Die massenspektrometrische Identifizierung der über die BN-PAGE isolierten Proteinkomplexe erfolgte stets nach weiterer gelelektrophoretischer Auftrennung in denaturierenden SDS-Gelen. Ohne weitere Separierung sollten die intakten Enzymkomplexe durch In-Gel-Verdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse auf ihre Zusammensetzung hin untersucht werden. Für die BN-MALDI-MS/MS Untersuchungen wurden pro Komplex zwei parallele Verdauexperimente durchgeführt: In einer ersten Untersuchungsreihe wurde die komplette Peptidmischung aus dem jeweiligen Komplex vermessen. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Peptidmischungen mittels Festphasenextraktion in vier Fraktionen mit 10, 30, 50 und 70% Acetonitril aufgeteilt. Ziel der Fraktionierung mittels ZipTips[®] war eine Reduktion der Komplexität der MALDI-Spektren. Durch die Verminderung an Peptidsignalen war es möglich, einzelne Peptide leichter für die anschließende Sequenzierung mittels MALDI-PSD zu isolieren. Zudem wurde so eine Verbesserung bei der Auswertung der Fragmentspektren sowie eine deutlichere Signifikanz bei der Proteinidentifizierung erzielt. Alle Spektren wurden am Bruker Ultraflex LIFT-TOF/TOF im PMF- bzw. LIFT-PSD-Mode aufgenommen.

5.3.1 Komplex I

Mittels *Peptide Mass Fingerprinting* wurden aus dem In-Gel-Totalverdau der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase 25 der 46 Untereinheiten identifiziert. Abb. 5.41 zeigt das zugehörige MALDI-TOF Übersichtsspektrum des Totalextraktes des tryptischen Verdau.

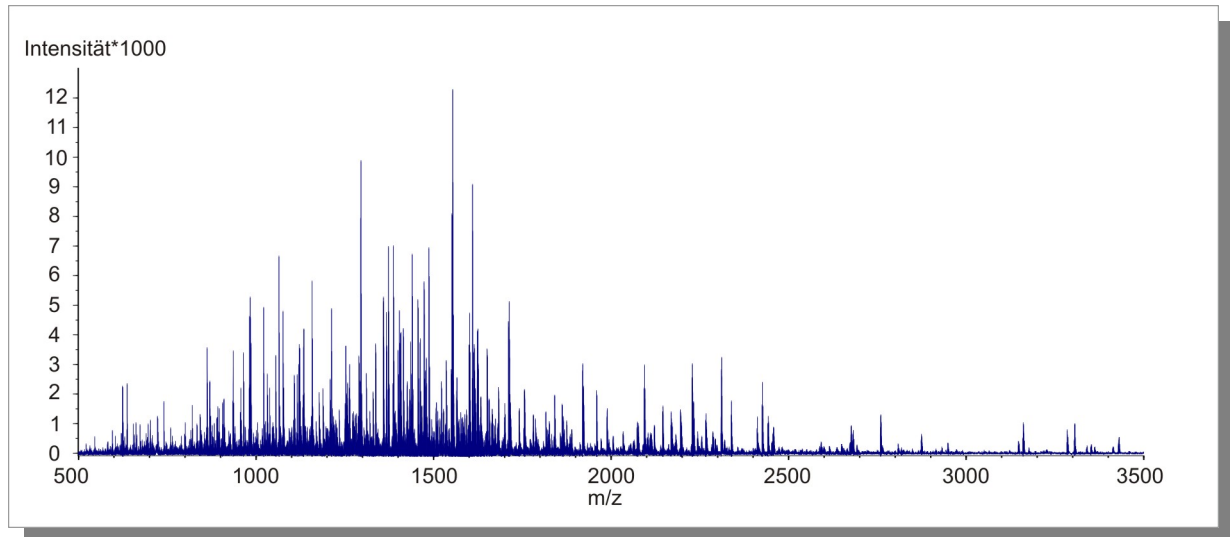


Abb. 5.41 MALDI-TOF Übersichtsspektrum des In-Gel-Verdau von Komplex I

Als Folge der großen Anzahl an generierten Peptiden aus dem 46 Untereinheiten umfassenden Komplex, kam es bei der Datenbanksuche zu nicht mehr signifikanten Suchergebnissen. Außerdem identifizierte die Datenbank eine Vielzahl falsch positiver Proteine (Daten nicht gezeigt), da eine große Anzahl von Peptiden auch die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von anderen Proteinen des untersuchten Organismus erhöht. Durch die Auftrennung der Peptidmischung in vier einzelne Fraktionen mit Hilfe unterschiedlicher Acetonitril-Elutionskonzentrationen konnten die Resultate aus den Messungen des Totalextrakts bestätigt werden (Abb. 5.42; A-D). Tabelle 5.10 zeigt einen Vergleich der in den einzelnen Fraktionen identifizierten Untereinheiten des Komplexes.

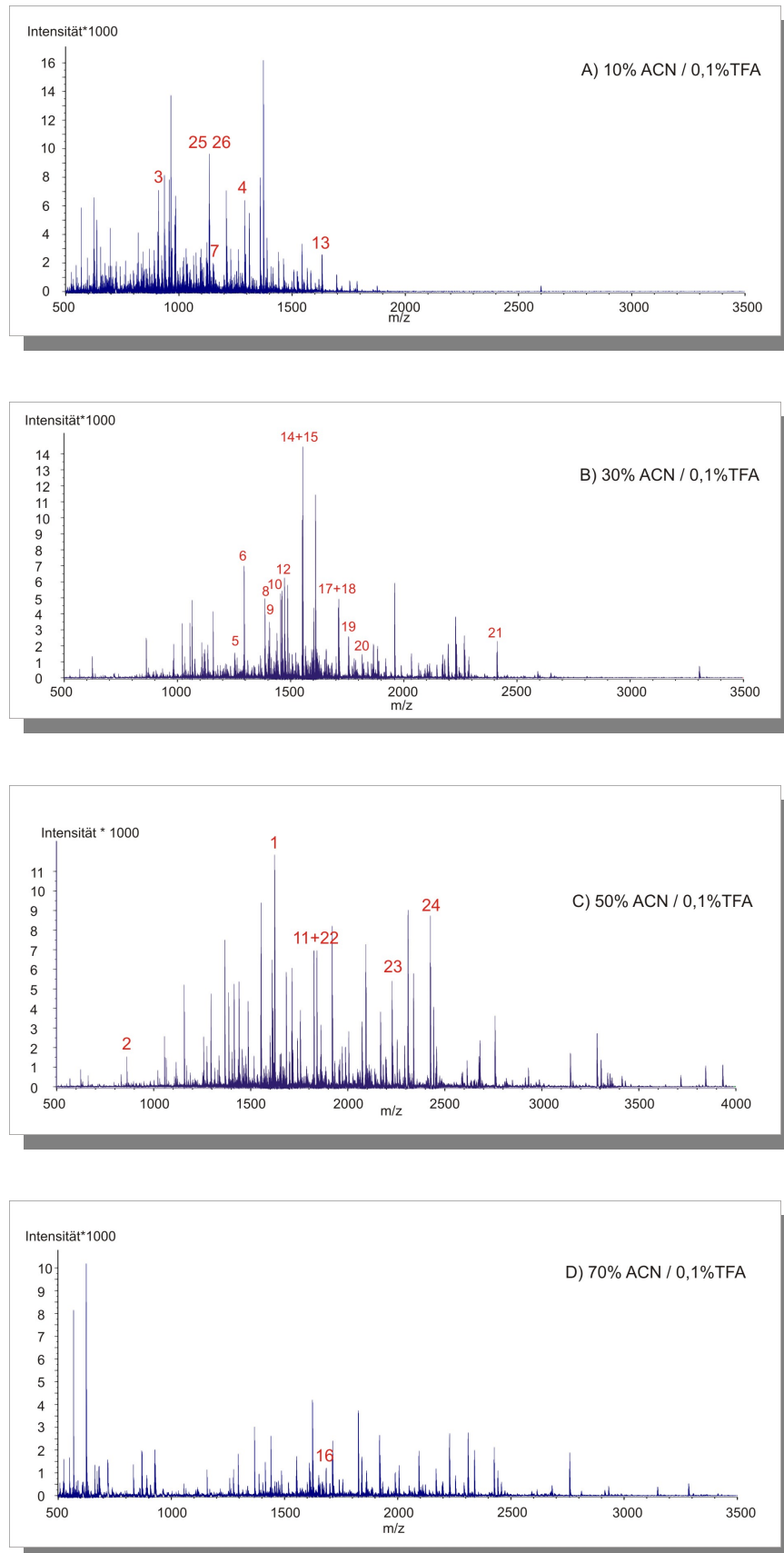


Abb. 5.42 MALDI-TOF Übersichtsspektren der einzelnen Fraktionen aus dem Komplex I Verdau mit steigendem Acetonitril-Gehalt (A-D) Die Sequenz der nummerierten Peptide wurde zusätzlich mittels MALDI-PSD Fragmentierung verifiziert

Tabelle 5.10 Übersicht der mit MALDI-TOF und Peptide Mass Fingerprinting identifizierten Untereinheiten der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) Hydrophobe Untereinheiten sind **rot** markiert

Gesamteluat	Fraktion			
	10% Acetonitril	30% Acetonitril	50% Acetonitril	70% Acetonitril
75kDa	75kDa	75kDa	75kDa	75kDa
51kDa	51kDa	51kDa	51kDa	51kDa
49kDa	49kDa	49kDa	49kDa	49kDa
42kDa	42kDa	42kDa	42kDa	42kDa
39kDa	39kDa	39kDa	39kDa	39kDa
30kDa	30kDa	30kDa	30kDa	30kDa
24kD	24kD	24kDa	24kDa	24kDa
B17	B17	B17	B17	B17
ASHI	ASHI	ASHI	ASHI	ASHI
GRIM-19	GRIM-19	GRIM-19	GRIM-19	GRIM-19
PSST	PSST	PSST	PSST	PGIV
B22	B22	B22	B22	B17.2
B18	B18	B18	B18	PDSW
PGIV	PGIV	PGIV	B17.2	TYKY
B14.5b	B14.5b	B14.5b	PDSW	B13
B17.2	B17.2	B8	SGDH	ND1
B8	B8	B14	TYKY	ND5
B14	B14	AQDQ	B13	
PDSW	PDSW	B14.5a	B9	
AQDQ	AQDQ	B15	ND5	
SGDH	SGDH	15 kDa	ND2	
B14.5a	B14.5a	ND5	ND1	
B15	B15	ESSS		
TYKY	15kDa	AGGG		
B13	ND 5	ND4		
	ESSS			
	AGGG			

Neben der Reduzierung der Komplexizität des Peptidgemischs wurde auch die Isolierung einzelner Precursor-Peptide verbessert, so daß mit Hilfe von Sequenzanalysen der Ursprung der Peptide bzw. Proteine eindeutig geklärt werden konnte. Tabelle 5.11 listet die aus den verschiedenen Fraktionen sequenzierten Peptide und die dazugehörigen Proteine der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase auf.

Tabelle 5.11 Mittels MALDI-PSD sequenzierte Peptide des Komplex I In-Gel-Verdaus (identifiziert aus den Fraktionen 10%, 30%, 50% oder 70% ACN / 0,1% TFA)

Signal ^{a)}	MH ⁺ _{gem}	Sequenz	Position	Protein
1	1622,8219	LFEISPFEPWTTR	304-316	39kDa
2	862,4564	FIQWLR	7-12	B14.5a
3	935,5334	EPVLPPQR	31-38	B17
4	1208,6653	GLQQVSGHGGLR	10-21	B17.2
5	1240,6196	SDAPPLTLEGIK	1-12	SDAP
6	1294,6525	ATFQFLPDEAR	9-19	B14.5b
7	1310,6675	QLQEETPVGGPR	139-150	B22
8	1386,7309	TYLQALPYFDR	95-105	49kDa
9	1425,7798	NRLEEVSPLNLR	644-655	75kDa
10	1455,7910	VDQEIVNIIQER	98-109	PDSW
11	1862,0082	DYKVDQEIVNIIQER	95-109	PDSW
12	1486,8156	VVAEPVELAQEFR	221-233	30kDa
13	1542,7865	ESSAADTRPTVRPR	39-52	30kDa
14	1551,7837	ILTDYGFEGHPFR	189-201	30kDa
15	1553,7668	MPTFPPDYGFPER	71-83	B18
16	1682,9310	FSTLLGYFPTIMHR	522-535	ND5
17	1712,8566	YTYHINNISPSFTR	419-432	ND4
18	1710,8659	GEFYNEASNLQVAIR	160-174	51kDa
19	1755,7958	VAHYPYQWYLMER	38-50	MWFE
20	2411,1031	DTPENNPETPFDFTPENYKR	43-62	24kDa
21	2195,0966	LSSLPTTLDPAEYDISSETR	10-29	B15
22	2425,3573	LLQYADALEHLLSTGQGVVLER	128-149	42kDa
23	1132,5832	VGESVFHTTR	106-115	GRIM19
24	1134,5332	VYDQMPEPR	140-148	PSST

^{a)} Peptide entsprechend der Zuordnung in Abb. 5.42 (A-D)

In der Summe ist es gelungen, 33 der 46 Komponenten der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase massenspektrometrisch durch einen direkten In-Gel-Verdau der BN-Bande nachzuweisen, was einem Anteil von 72% entsprach. Dabei konnte die Identität von 21 Proteinen eindeutig über die Fragmentationanalytik ausgewählter Peptide bestätigt werden. Dazu zählten auch die stark hydrophoben Proteine ND4 und ND5 sowie Proteine mit einem geringen Molekulargewicht wie z.B. die MWFE-Untereinheit. Details zu den einzelnen Komponenten finden sich im Anhang (Tabelle 8.5 – Tabelle 8.9).

5.3.2 Komplex III

Im Vergleich zu dem in Kapitel 5.1 bereits vorgestellten D₂Ant Komplex beinhaltet der über die BN-Gelelektrophorese isolierte Komplex III alle 11 Untereinheiten, was das 6,4kDa Protein (Swiss Prot P07552) mit einschließt. Dieses Polypeptid konnte jedoch auch in einem Kontroll-SDS-Gel eines BN-Eluats des *bc₁*-Komplexes nicht detektiert werden (Abb. 5.43). Da sich alle Banden auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Kontrollgel wiederfinden und auch massenspektrometrisch identifiziert wurden, muß von einem Verlust dieser Komponente während der BN-Gelelektrophorese ausgegangen werden.

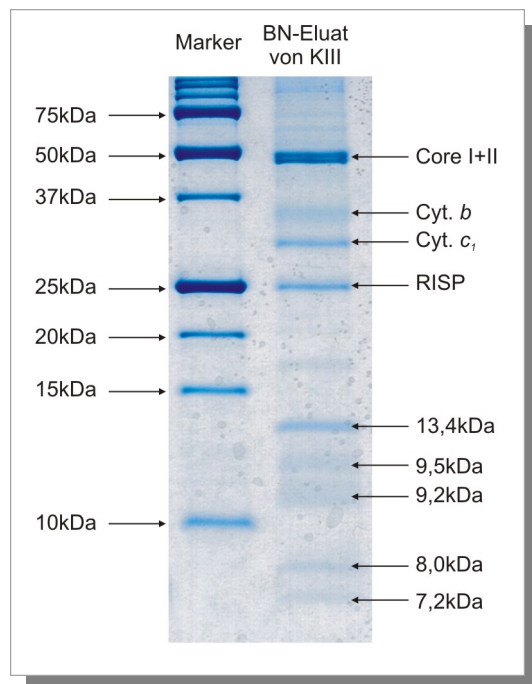


Abb. 5.43 1D-Tricin-SDS-Gel des Eluats der Ubichinol: Cytochrom *c* Oxidoreduktase

Nach erfolgter Elution aus dem Gel konnten alle 10 Untereinheiten des Komplexes im Gel wiedergefunden und massenspektrometrisch identifiziert werden. Das 6,4kDa Protein konnte in dem Gel nicht identifiziert werden.

In Abb. 5.44 ist das Übersichtsspektrum des Komplettverdaus der Ubichinol: Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Komplex III) zu sehen. Mittels MALDI-TOF PMF des Totalextraktes konnten 7 der 11 Untereinheiten identifiziert werden (Tabelle 5.12). Außer dem 6,4kDa Protein fehlen auch die Untereinheit VI (13,4kDa Protein), Untereinheit VII (9,2kDa Protein) sowie die hydrophobe Untereinheit III (Cytochrom *b*). Das Signal bei MH_{gem}^+ 1135,5862, deutet mit einer Massenabweichung von 3 ppm auf das Cytochrom *b*-Fragment mit der Sequenz «DVNYGWIIR» hin, doch konnte aufgrund der geringen Signalintensität keine Überprüfung der Sequenz mittels der Massenspektrometrie durchgeführt werden. Die in Abb. 5.44 markierten Signale wurden bei der Ermittlung der Datenbankergebnisse zusätzlich mittels Sequenzierung verifiziert und auch in den Einzelfractionen nachgewiesen. Wie auch bei der Untersuchung des Komplex I, führte die fraktionierte Elution der Peptidmischung aus Komplex III zu verschiedenen Spektrenprofilen. Während bei niedriger

Acetonitrilkonzentration vorwiegend kleine Peptide eluiert wurden, nimmt mit steigendem Anteil an Acetonitril die Molmasse der Peptide zu (Abb. 5.45). Die untersuchten Peptide und ihre Sequenzen werden in Tabelle 5.13 aufgeführt. Details zu den einzelnen Komponenten finden sich im Anhang (Tabelle 8.10 – Tabelle 8.14).

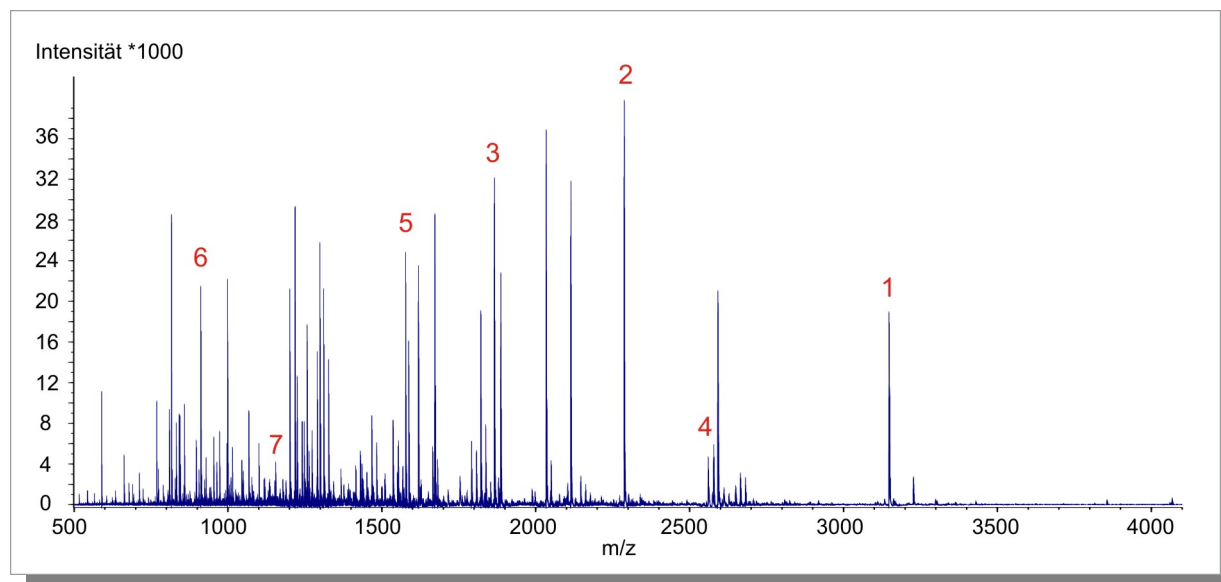


Abb. 5.44 MALDI-TOF Übersichtspektrum des In-Gel-Verdaus von Komplex III Die Sequenzen der nummerierten Peptide wurden zusätzlich mittels MALDI-PSD untersucht

Tabelle 5.12 Übersicht der mit MALDI-TOF und *Peptide Mass Fingerprinting* identifizierten Untereinheiten der Ubichinol:Oxidoreduktase (Komplex III)

Gesamteluat	Fraktionierte Eluate			
	10 % Acetonitril	30% Acetonitril	50% Acetonitril	70% Acetonitril
Core I Protein	Core I Protein	Core I Protein	Core I Protein	Core I Protein
Core II Protein	Core II Protein	Core II Protein	Core II Protein	Core II Protein
Cytochrom <i>c</i> ₁	Cytochrom <i>c</i> ₁	Cytochrom <i>c</i> ₁	Cytochrom <i>c</i> ₁	Cytochrom <i>c</i> ₁
RISP	RISP	RISP	RISP	RISP
9,5kDa Protein	13,4kDa Protein	13,4kDa Protein	8,0 kDa Protein	8,0 kDa Protein
8,0kDa Protein	9,5kDa Protein	9,5kDa Protein		
7,2kDa Protein	8,0kDa Protein	8,0kDa Protein		

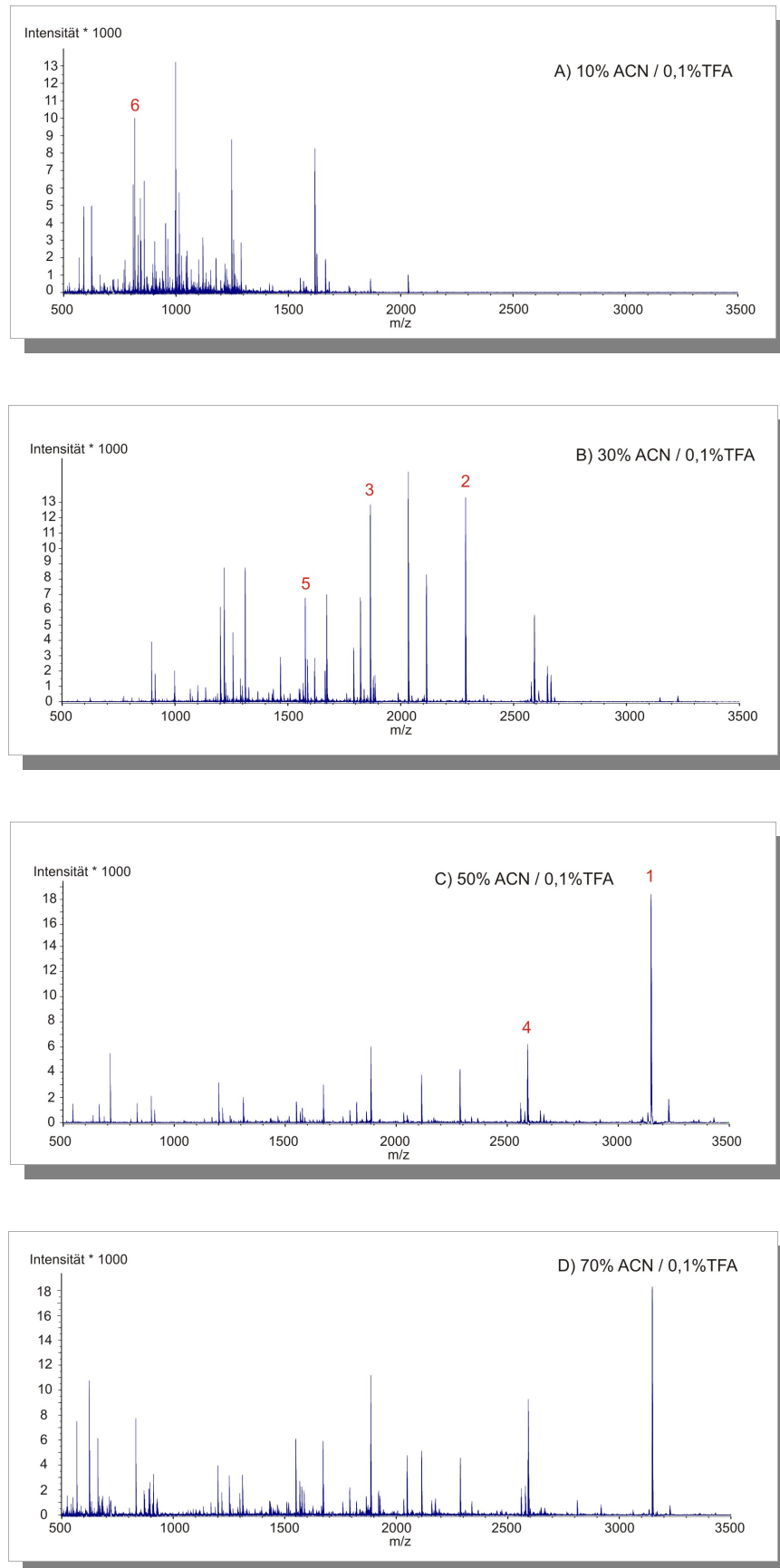


Abb. 5.45 MALDI-TOF Übersichtsspektren der einzelnen Fraktionen aus dem Komplex III Verdau mit steigendem Acetonitril-Gehalt (A-D) Die Sequenz der nummerierten Peptide wurde zusätzlich mittels MALDI-PSD Fragmentierung verifiziert

Tabelle 5.13 Mittels MALDI-PSD identifizierte Peptide des Komplex III In-Gel-Verdaus

Signal ^{a)}	MH ⁺	Sequenz	Position	Protein
1	3146,5645	DVVFNYLHATAFQGTPLAQSVEGPSENV	181-209	Core I Protein
2	2286,2101	AVALQNPQAHVIENLHAAAYR	163-183	Core II Protein
3	1864,9234	LSDYFPKYPNPEAAR	87-102	Cytochrom c1
4	2559,4222	GVAGALRPLVQAAVPATSESPVLDLK	21-46	RISP
5	1576,8076	HVITYSLSPFEQR	13-25	9,5kDa Protein
6	911,5298	LYSLLFR	9-15	7,2kDa Protein
7	1135,5862	Sequenz konnte nicht verifiziert werden	72-80	Cytochrom b

^{a)} Peptide entsprechend der Zuordnung in Abb. 5.42 (A-D)

5.3.3 Komplex IV

In der Summe gelang es, die Existenz von 10 der 13 Proteine aus der Cytochrom *c* Oxidase nachzuweisen, was einem Anteil von 77% entsprach. Anhand des tryptischen Gesamt-Verdaus der nativ aufgetrennten Cytochrom *c* Oxidase konnten durch Auswertung des MALDI-TOF *Fingerprints* 8 Untereinheiten bestimmt werden (Abb. 5.46). Die hydrophoben Untereinheiten COX I und COX III wurden hierbei nicht erfaßt (Tabelle 5.12).

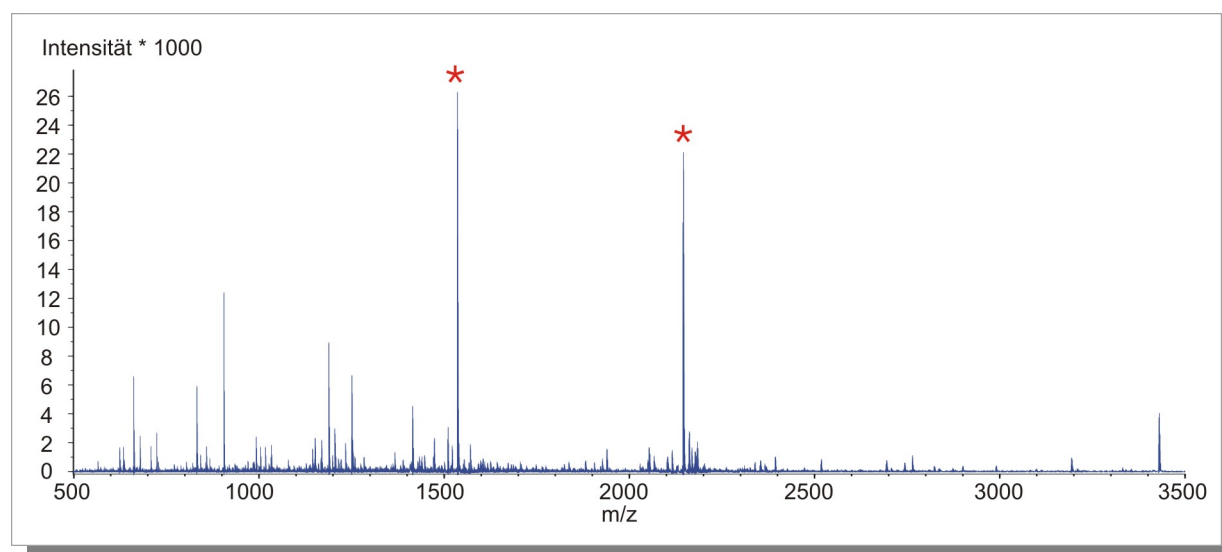


Abb. 5.46 PMF Übersichtsspektrum des In-Gel-Verdaus der Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV) Die hohe Signalintensität der Peptide (*) bei MH⁺_{gem} 1535,8235 und 2145,0055 mindert die Intensität der anderen Signale.

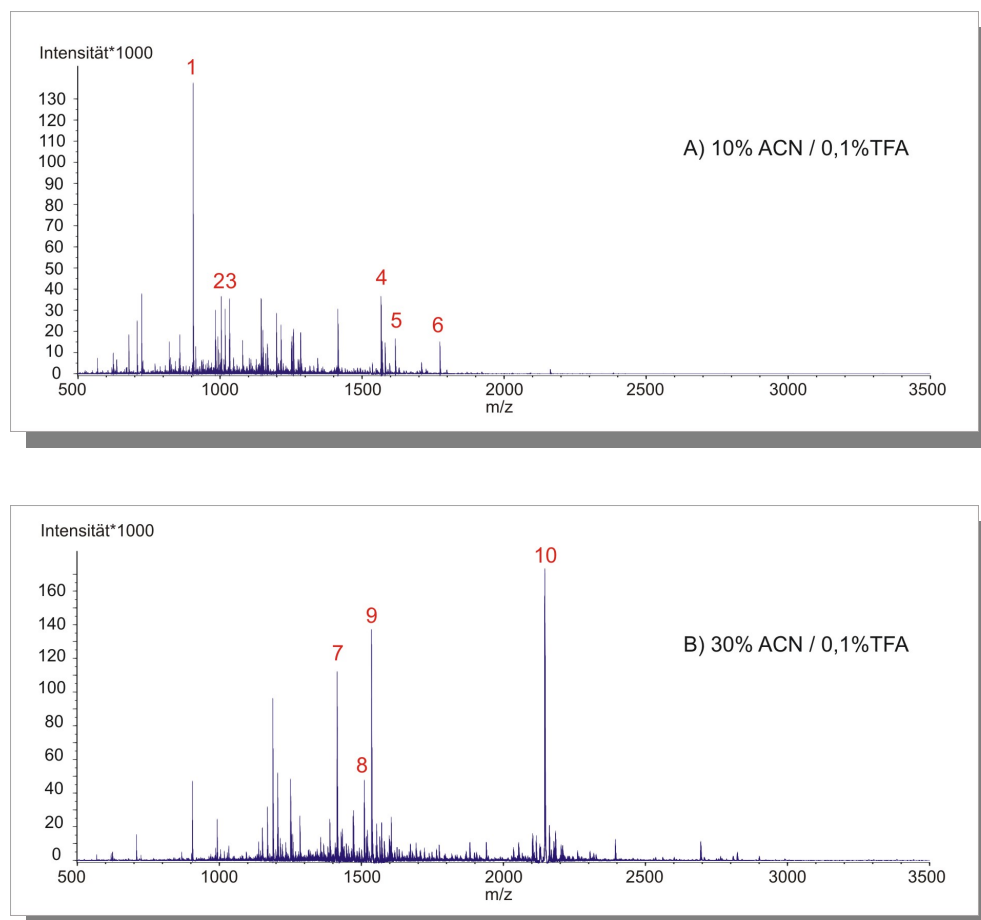
Die Auswertung der Messungen aus den einzelnen Acetonitrilfraktionen ergaben mittels *Peptide Mass Fingerprint* keine zusätzlichen Nachweise weitere Enzymuntereinheiten. Von den beiden hydrophoben Untereinheiten COX I und COX III konnte nur die COX I nach erfolgter Fraktionierung in der Fraktion mit 10% Acetonitril anhand von 3 Peptiden mittels PMF entdeckt werden.

Tabelle 5.14 Übersicht der mit MALDI-TOF und Peptide Mass Fingerprinting identifizierten Untereinheiten der Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV) Hydrophobe Untereinheiten sind rot markiert

Fraktionierte Eluate			
Gesamteluat	10 % Acetonitril	30% Acetonitril	70% Acetonitril
COX II	COX I^{a)}	COX II	COX II
COX IV-1	COX II	COX IV-1	COX IV-1
COX Va	COX III^{b)}	COX Va	COX Va
COX Vb	COX IV-1	COX Vb	COX VIa
COX VIa	COX Va	COX VIa	
COX VIb	COX VIb	COX VIb	
COX VIc	COX VIc	COX VIc	
COX VIIa	COX VIIa	COX VIIa	

^{a)} mittels PMF + PSD identifiziert ^{b)} nur mittels PSD identifiziert

Abb. 5.47 (A-C) zeigt die MALDI-TOF Spektren der einzelnen Fraktionen. Für die Fraktion 50% ACN / 0,1%TFA wurde kein Spektrum aufgenommen. Infolgedessen eluierten eine größere Menge an Peptiden in der Fraktion mit 70 % Acetonitril, was sich jedoch nicht erhöhend auf die Anzahl identifizierter Proteine auswirkte.



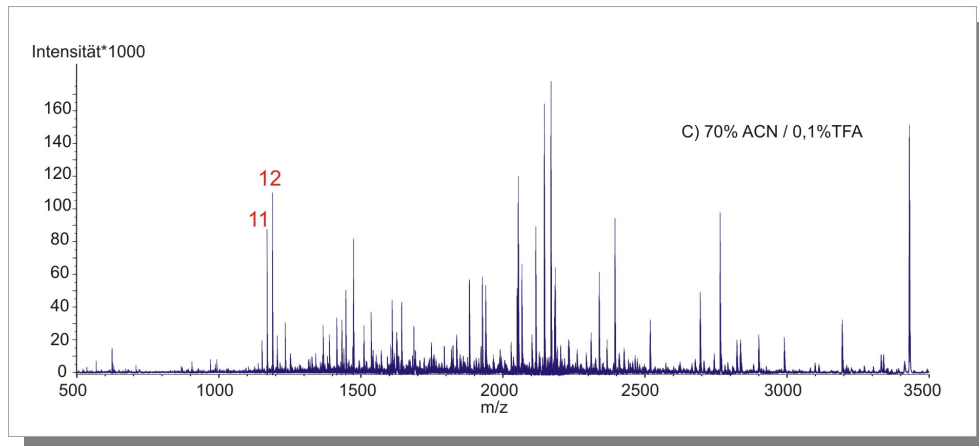


Abb. 5.47 MALDI-TOF Übersichtsspektren der einzelnen Fraktionen aus dem Komplex IV Verdau mit steigendem Acetonitril-Gehalt (A-C) Die Sequenz der nummerierten Peptide wurde zusätzlich mittels MALDI-PSD Fragmentierung verifiziert

Eine genauere Untersuchung von 2 aus der Cytochrom *c* Oxidase Untereinheit I stammenden Peptide bestätigte ihren Ursprung aus der 68kDa Untereinheit. In der ersten Fraktion mit 10% Acetonitril gelang die Fragmentierung des Peptids mit der Masse MH_{gem}^+ 1032,5392 (Peak Nr. 3, Sequenz «WLFSTNHK»). Die nachfolgende Datenbankauswertung bestätigte das Ergebnis.

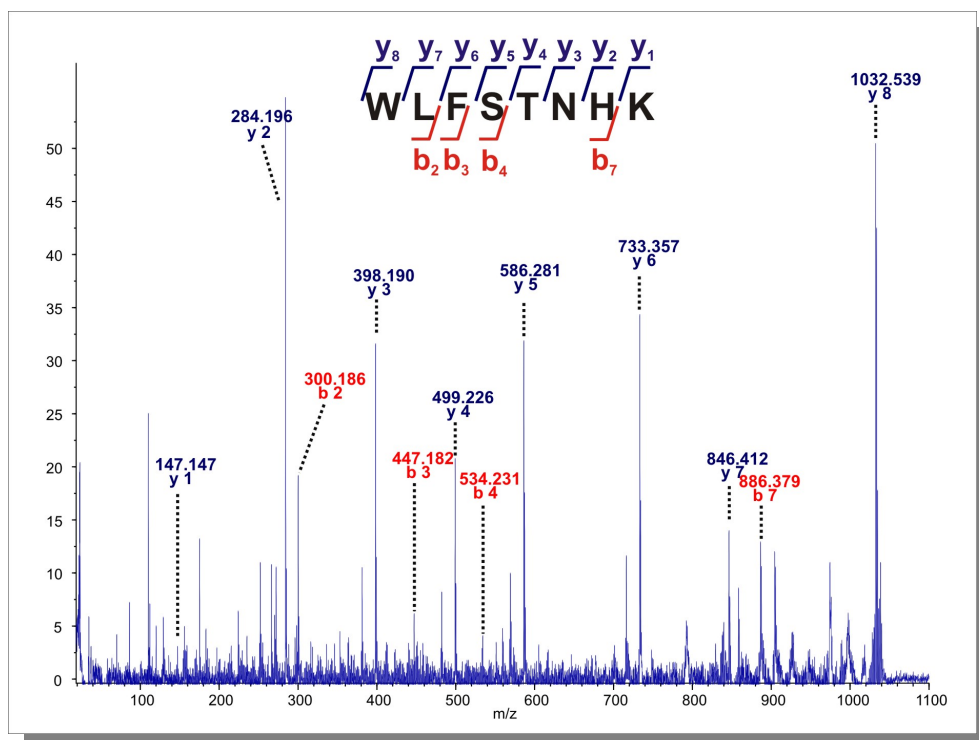


Abb. 5.48 MALDI-PSD Spektrum des Peptids WLFSTNHK (MH_{gem}^+ 1032,5392) Anhand der *y*- und *b*-Ionenserie konnte die COX I-Untereinheit eindeutig identifiziert werden (Mascot Score 74)

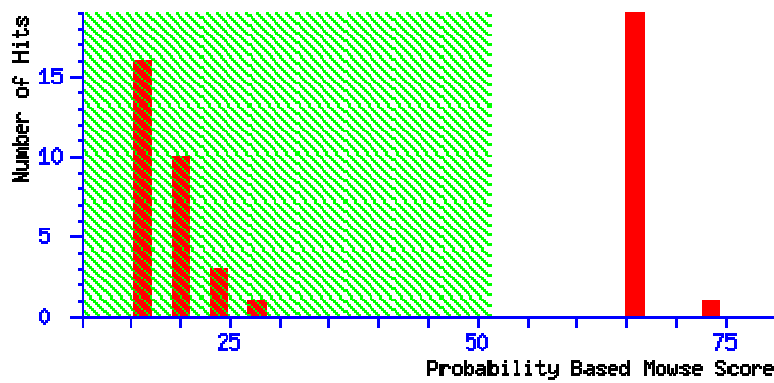


Abb. 5.49

Mascot Datenbanksuchergebnis für das Fragmentspektrum des Peptids WLFSTNHK aus der COX I Untereinheit

	Accession	Mass	Score	Description
1.	Q36347	6421	73	(COX1_CAPHI) Cytochrome c oxidase polypeptide I
8.	P00396	56994	65	(COX1_BOVIN) Cytochrome c oxidase polypeptide I

Der Umstand, daß die COX I aus Rind erst an Position 8 gelistet erscheint, resultiert aus dem hochkonservativen Charakter dieser Sequenz. Auf den Positionen 1-7 finden sich Treffer weiterer Cytochrom *c* Oxidase I Untereinheiten verschiedener Säugetierorganismen, zu denen der hier analysierte Ausschnitt homolog ist.

Im Eluat mit 10% Acetonitrilanteil wurde aufgrund der Entzerrung der Peptidmenge ein weiteres Peptid isoliert, das keinem der mittels Datenbanksuche gefundenen Proteine zugewiesen werden konnte. Das Signal bei der Masse MH_{gem}^+ 1566,7626 (Peak Nr. 4) ergab nach Untersuchung mittels MALDI-PSD die Sequenz «ESTFQGHHTPAVQK». Die nachfolgenden Abbildungen zeigen das Fragmentspektrum des Peptids sowie das Ergebnis der Datenbanksuche. Die Analyse dieses Peptids ergab mit MASCOT Sequence Query eine eindeutige Zuordnung zu dem COX III-Protein der Cytochrom *c* Oxidase.

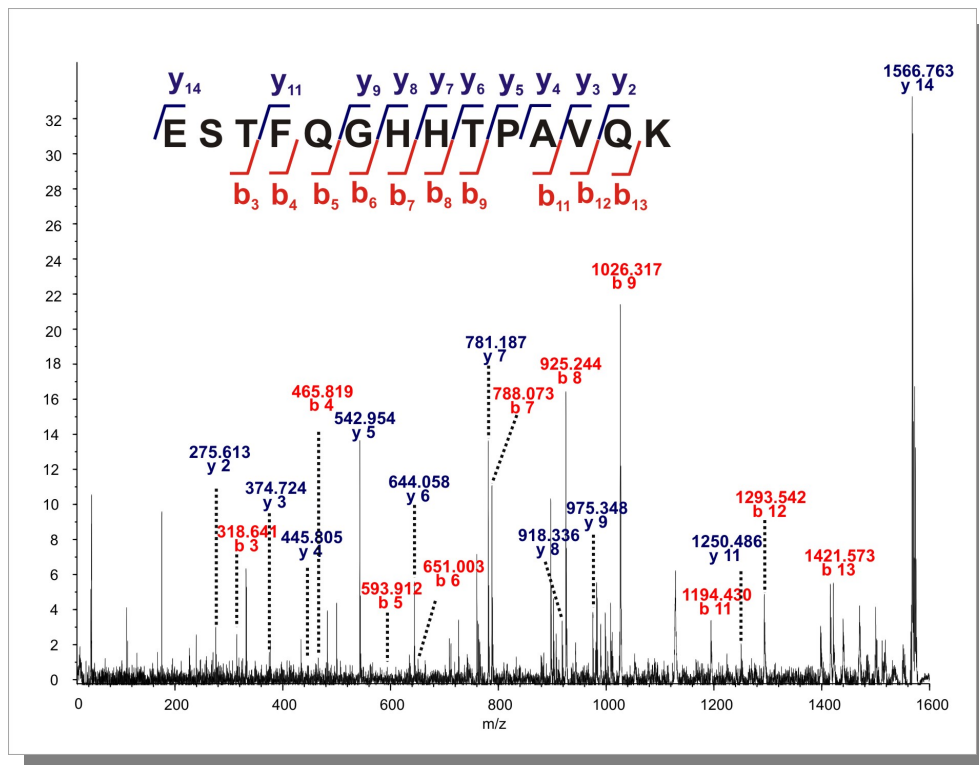


Abb. 5.50 Fragmentationenspektrum des Peptids ESTFQGHHTPAVQK ($MH^+_{\text{gem}} 1566,7626$) Anhand der y - und b -Ionenserie konnte die COX III-Untereinheit eindeutig identifiziert werden (Mascot Score 60)

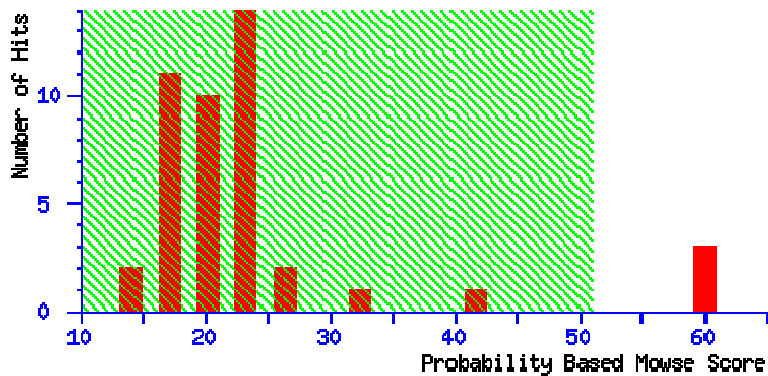


Abb. 5.51

Mascot Datenbanksuchergebnis für das Fragmentspektrum des Peptids ESTFQGHHTPAVQK aus der COX III Untereinheit.

	Accession	Mass	Score	Description
1.	P00415	29913	60	(COX3_BOVIN) Cytochrome c oxidase polypeptide III)

Neben den beiden hydrophoben Untereinheiten COX I und COX III wurden weitere Komponenten aus der Cytochrom *c* Oxidase per MS/MS identifiziert und verifiziert. Tabelle 5.15 listet alle mittels Fragmentationanalytik identifizierten Untereinheiten auf. Zusammen mit den Ergebnissen aus den MALDI-TOF-Messungen konnten von der Cytochrom *c* Oxidase 10 der 13 Untereinheiten identifiziert werden, was einem Anteil von knapp 77 % entsprach. Details zu den einzelnen Komponenten finden sich im Anhang (Tabelle 8.15 – Tabelle 8.18).

Tabelle 5.15 Mittels MALDI-PSD identifizierte Peptide des Komplex IV In-Gel-Verdaus

Signal ^{a)}	MH ⁺	Sequenz	Position	Protein
1	905,4094	AYADFYR	46-52	Cytochrom c oxidase VIc
2	1017,5606	VAPIQGFSAK	150-159	Cytochrom c oxidase IV-1
3	1032,5392	WLFSTNHK	6-13	Cytochrom c oxidase I
4	1566,7626	ESTFQGHHTPAVQK	64-77	Cytochrom c oxidase III
5	1616,7070	SHGSHETDEEFDAR	1-14	Cytochrom c oxidase Va
6	1773,8186	ASGGGVPTDEEQATGLER	1-18	Cytochrom c oxidase Vb
7	1414,6571	SEDYALPSYVDR	30-41	Cytochrom c oxidase IV-1
8	1509,7935	LFQEDNGLPVHLK	32-44	Cytochrom c oxidase VIIa
9	1535,8169	ERPAFIPYHHLR	55-66	Cytochrom c oxidase VIa
10	2145,0194	TKPFSWGDGNHTFFHNPR	69-86	Cytochrom c oxidase VIa
11	1188,6521	VVLPMENTIR	142-151	Cytochrom c oxidase II
12	1198,5521	NYQTAPFDSR	11-20	Cytochrom c oxidase VIb

^{a)} Peptide entsprechend der Zuordnung in Abb. 5.47 (A-C)

5.3.4 Komplex V

Durch den direkten In-Gel-Verdau der ATP Synthase aus dem Blau-Nativen-Gel gelang es, 8 der 16 Untereinheiten des terminalen Atmungskettenkomplexes zu identifizieren.

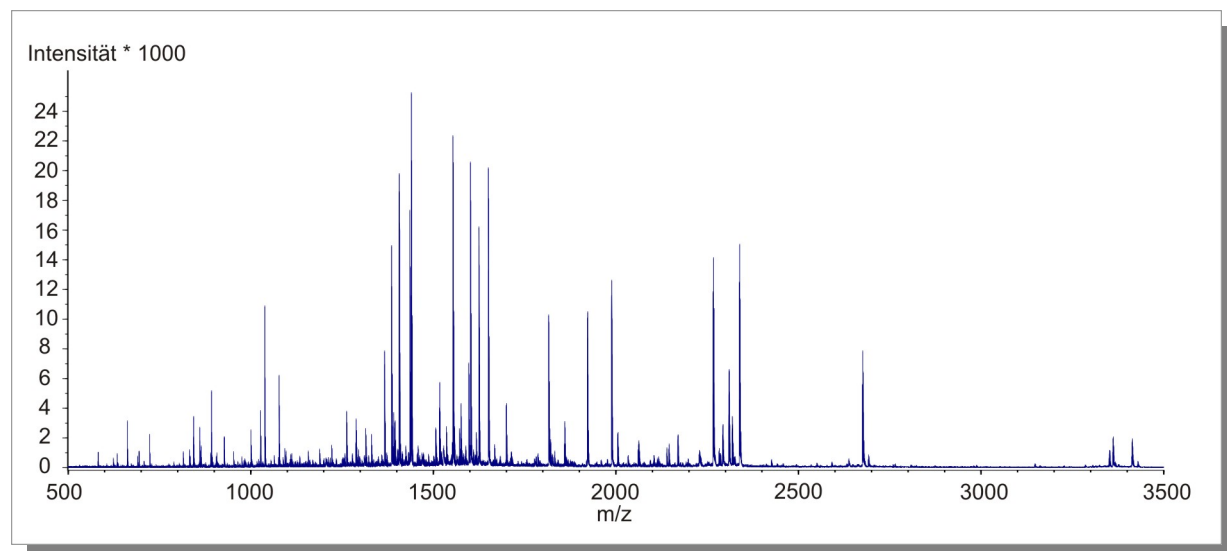
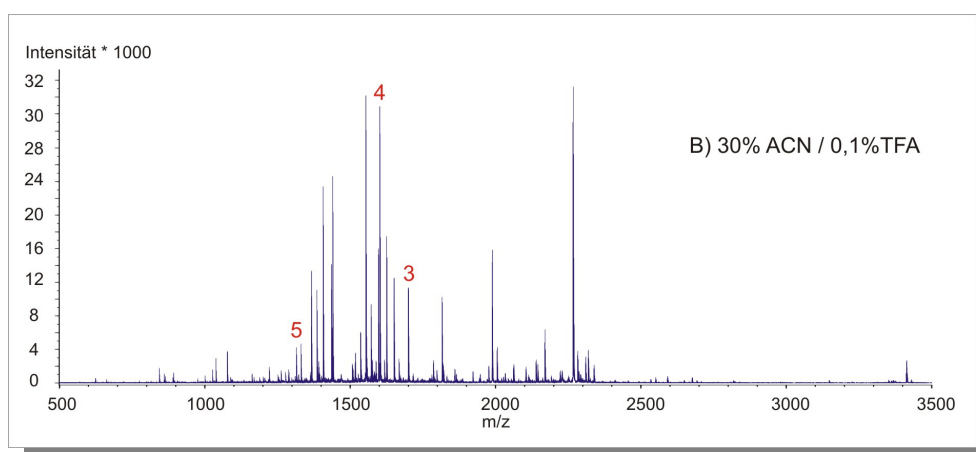
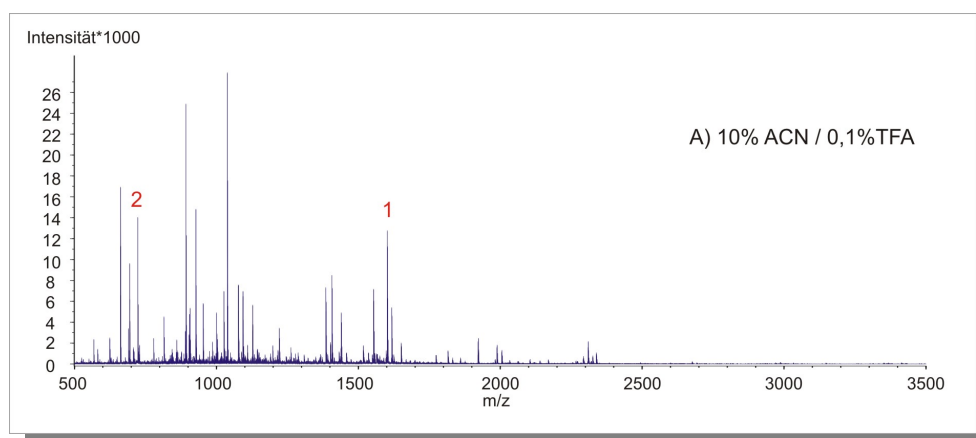


Abb. 5.52 MALDI-TOF Übersichtsspektrum des In-Gel-Verdaus der ATP-Synthase (Komplex V)

Von den hydrophoben Untereinheiten konnten nur die mit einem Gravy-Score von 0,214 moderat hydrophobe Untereinheit g (Swiss-Prot Q28852) sowie die Protein 8-Untereinheit (P03929; Gravy-Score 0,083) identifiziert werden. Die besonders hydrophoben Untereinheiten ATPase protein 9 (Swiss-Prot P07926) und ATPase protein 6 (Swiss-Prot P00847) konnten nicht gefunden werden.

Tabelle 5.16 Anhand von MALDI-TOF über Peptide Mass Fingerprinting identifizierte Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V) Hydrophobe Untereinheiten sind rot markiert

Fraktionierte Eluate				
Gesamteluat	10 % Acetonitril	30% Acetonitril	50% Acetonitril	70% Acetonitril
β Untereinheit	β Untereinheit	β Untereinheit	β Untereinheit	β Untereinheit
α Untereinheit	α Untereinheit	α Untereinheit	α Untereinheit	α Untereinheit
D Untereinheit	D Untereinheit	D Untereinheit	D Untereinheit	D Untereinheit
OSCP Untereinheit	OSCP Untereinheit	OSCP Untereinheit	OSCP Untereinheit	OSCP Untereinheit
B Untereinheit	B Untereinheit	B Untereinheit	B Untereinheit	B Untereinheit
γ Untereinheit	γ Untereinheit	γ Untereinheit	γ Untereinheit	γ Untereinheit
f - Untereinheit	e Untereinheit	f Untereinheit	f Untereinheit	f Untereinheit
e Untereinheit	Protein 8 Untereinheit	g Untereinheit	Protein 8 Untereinheit	g Untereinheit
		Coupling factor 6 ¹⁰		c Untereinheit ¹¹



^{10, 11} Setzt man bei der Auswertung des Spektrums die Anforderung bei der Suchmaske auf 2 Peptide, so findet man die Untereinheit „Coupling Factor 6“ bzw. „c-Untereinheit“ mit einer Sequenzabdeckung von 43% bzw. 46%. Die Auswertung des dazugehörigen Spektrums läßt den Schluß zu, daß die Signale in Bezug auf Auflösung und S/N-Verhältnis von ausreichender Qualität sind. Aufgrund zu geringer Intensität war es jedoch nicht möglich, diese Proteine mittels MS/MS Techniken eindeutig zu identifizieren

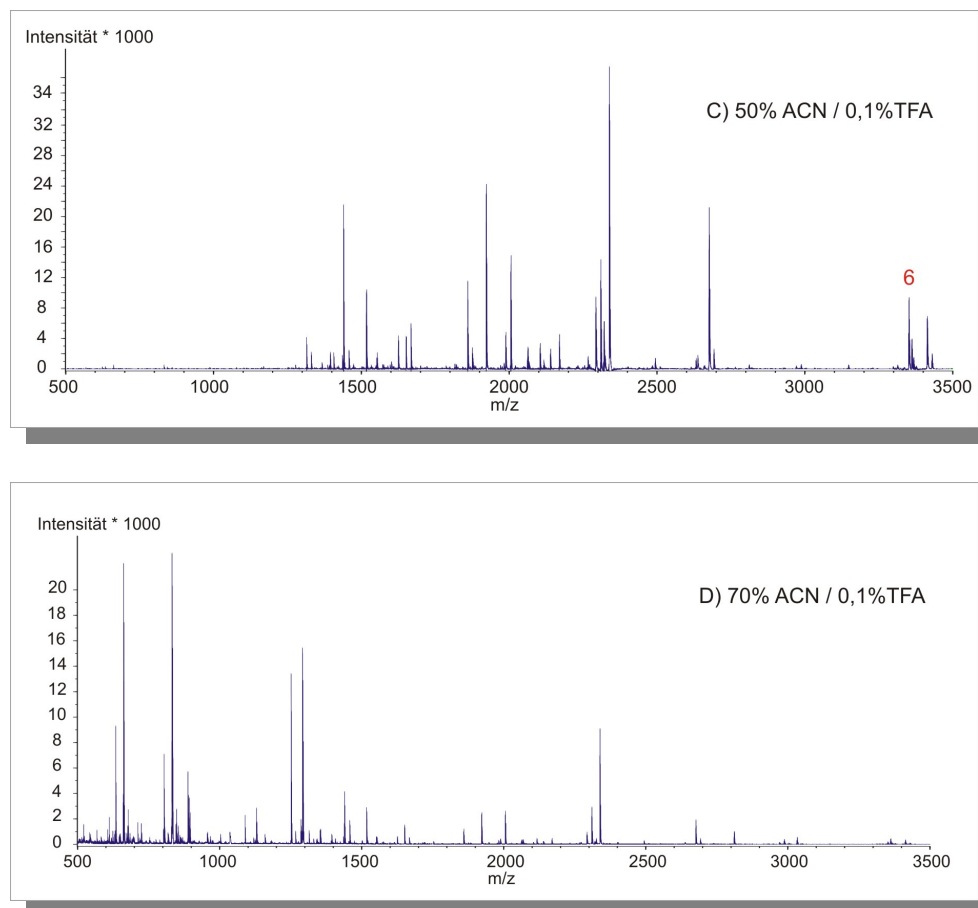


Abb. 5.53 MALDI-TOF Übersichtsspektren der einzelnen Fraktionen aus dem Komplex V Verdau mit steigendem Acetonitril-Gehalt (A-D) Die Sequenz der nummerierten Peptide wurde zusätzlich mittels MALDI-PSD Fragmentierung verifiziert

Neben den Ergebnissen der PMF-Datenbanksuche wurde mit Hilfe von Fragmentierungsexperimenten die Identität von 6 der über PMF identifizierten Untereinheiten bestätigt (Tabelle 5.17). Details zu den einzelnen Komponenten finden sich im Anhang (Tabelle 8.19 – Tabelle 8.23).

Tabelle 5.17 Mittels MALDI-PSD identifizierte Peptide des Komplex V In-Gel Verdaus

Signal ^{a)}	MH+	Sequenz	Position	Protein
1	1601,8576	VALVYGMNEPPGAR	265-279	β chain
2	723,4385	APGIIPR	176-182	α chain, heart
3	1699,9375	KYPYWPHRPIETL	149-161	D chain
4	1596,9573	LVRPPVQIYGIEGR	27-40	OSCP-Protein
5	1314,7392	LGELPSWILMR	17-27	f chain
6	3360,7598	TEEPPIFSLDTISSAESMSIYDDIDADVLR	198-227	γ chain

^{a)} Peptide entsprechend der Zuordnung in Abb. 5.53 (A-D)

5.4 LC-ESI-MS/MS von Komplex I, III, IV und V

In einer Kooperation mit Dr. Fandiño von der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) wurden die tryptischen Verdau der Komplexe I, III, IV und V für eine Vergleichsstudie mittels nanoLC-ESI-MS/MS analysiert. Im Gegensatz zu dem in Kapitel 5.3 beschriebenen Vorgehen, wo die hochkomplexen Peptidmischungen der einzelnen Enzyme nur komplett oder nach Auftrennung in 4 Fraktionen vermessen wurden, stand hier das Trennvermögen und die Sensitivität der nano-Flüssigkeitschromatographie zur Verfügung. Die Präparation und der Verdau der Proben erfolgte analog der in Kapitel 5.3 vorgestellten Protokolle. Eine detaillierte Beschreibung der chromatographischen und massenspektrometrischen Parameter zur Identifizierung der einzelnen Proben finden sich in Fandiño *et al.* (2005).

Tabelle 5.18 listet die mittels der nanoLC-ESI-MS/MS Methode identifizierten Untereinheiten der untersuchten Atmungskettenkomplexe auf. Von den 46 Proteinen der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase wurden 35 (76%) identifiziert, darunter auch die 5 der mitochondrial codierten Proteine ND1-ND5. Bei der Ubichinol: Cytochrom *c* Oxidoreduktase konnten 10 der 11 (91%) Bestandteile gefunden werden. Aus den beiden letzten Komplexen der Atmungskette, der Cytochrom *c* Oxidase bzw. ATP-Synthase wurden 10 von 13 (77%) bzw. 14 von 16 (88%) Proteinen entdeckt. Dabei befinden sich auch hier sämtliche hydrophoben Proteine unter den identifizierten Komponenten. Die Zahlen in den Klammern beziffern den prozentualen Anteil an identifizierten Proteinen des jeweiligen Komplexes. In der Summe wurde mit dieser Technik eine durchschnittliche Identifizierungsquote von 84% erreicht.

Tabelle 5.18 Mittels nanoLC-MS/MS identifizierte Untereinheiten der vier Atmungskettenkomplexe I, III, IV, und V Hydrophobe Untereinheiten sind **rot** markiert

NADH:Ubichinon oxidoreduktase		Ubichinol: Cytochrom <i>c</i> Oxidoreduktase	Cytochrom <i>c</i> Oxidase	ATP-Synthase
Komplex I		Komplex III	Komplex IV	Komplex V
75 kDa	B22	Core Protein I	COX I-Untereinheit	α Untereinheit
51 kDa	B18	Core Protein II	COX II-Untereinheit	β Untereinheit
49 kDa	B17	Cytochrom <i>b</i>	COX III-Untereinheit	b Untereinheit
30 kDa	B17.2	Cytochrom <i>c</i> _I	COX IV-Untereinheit	c Untereinheit
24 kDa	B16.6	RISP-Untereinheit	Va-Untereinheit	e Untereinheit
15 kDa	B15	13,4 kDa Protein	Vb-Untereinheit	d Untereinheit
PSST	B14.7	9,5 kDa Protein	VIa-Untereinheit	γ Untereinheit
TYKY	B14.5a	9,2 kDa Protein	VIb-Untereinheit	OSCP- Untereinheit
42 kDa	B14.5b	8,0 kDa Protein	VIc-Untereinheit	coupling factor 6

39 kDa	B14	7,2 kDa Protein	VIIa-Untereinheit	f Untereinheit
13 kDa	B12			g Untereinheit
ASHI	B8			δ Untereinheit
ESSS	ND1			a Untereinheit
PDSW	ND2			A6L-Untereinheit ⁺⁾
PGIV	ND3			
SDAP	ND4			
SGDH	ND5			
	MLRQ ^{a)}			

^{a)}in Komplex III+IV-Bande gefunden

Sämtliche Bestandteile des Komplexes wurden durch Sequenzierung mehrerer Peptide identifiziert. Dagegen konnte das Cytochrom *b* nur anhand eines Peptides (DVNYGWIIR; MH⁺_{gem} 1135.5900) nachgewiesen werden. Wie auch in anderen vorliegenden *Proteomics*-Studien, fehlen auch hier die Untereinheiten ND4L und ND6 aus Komplex I und das 6,4kDa Protein des Komplex III.

Tabelle 5.19 Liste der nicht identifizierten Untereinheiten der untersuchten Komplexe I, III, IV und V

Komplex	Protein	MW (kDa)	Erklärung
I	ND4L	10,8	nur 1 tryptische Schnittstelle; zu hydrophob
	ND6	19,1	wenige tryptische Schnittstellen; zu hydrophob
	AGGG	8,5	< 10kDa
	KFYI	5,8	< 10kDa
	B9	9,2	< 10kDa
	B13	13,2	
	MWFE	8,1	< 10kDa
	MNLL	7,0	< 10kDa
	10 kDa	8,4	< 10kDa
	AQDQ	15,3	
	46. Untereinheit		Existenz fraglich (Caroll <i>et al.</i> (2003))
III	6,4 kDa	6,5	< 10kDa; abdissoziiert während BN-PAGE?
IV	Untereinheit VIIb	6,4	< 10kDa
	Untereinheit VIIc	5,5	< 10kDa
	Untereinheit VIII	4,9	< 10kDa
V	ε-Untereinheit	5,7	< 10kDa; zu kleine tryptische Fragmente?

Informationen zu den identifizierten Untereinheiten der einzelnen Komplexe finden sich im Anhang (Tabelle 8.24 bis Tabelle 8.27).

6 Diskussion

Neben der in dieser Arbeit vorgestellten neu entwickelten zweidimensionalen dSDS-PAGE zur Auftrennung von Membranproteinkomplexen wurden weitere methodische Strategien zur Analytik von Membranproteinkomplexen systematisch untersucht und miteinander verglichen.

6.1 dSDS-PAGE zur Analyse von Membranproteinkomplexen

6.1.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Membranproteinkomplexen

Die gelelektrophoretische Analyse von integralen Membranproteinen ist aufgrund der schlechten Löslichkeit dieser besonderen Proteinklasse mit einer Vielzahl von Limitierungen verbunden (Santoni *et al.* (2000)). Die Kombination der zwitterionischen Detergentien vom Amidosulfobetain-Typ mit hochkonzentrierten Harnstofflösungen erlaubt zwar eine Verbesserung bei der Solubilisierung der Proteine, doch belegen Studien, daß die Technik in Hinblick auf integrale Membranproteine mit hohen Gravy-Scores nur eingeschränkt anwendbar ist. Stark hydrophobe Analyten, wie z.B. die durch die mitochondriale DNS kodierte Komponenten der Atmungskette sind mit Hilfe der 2D-PAGE nicht zu detektieren (Lescuyer *et al.* (2003), Carroll *et al.* (2003)). Ihre schlechte Löslichkeit unter den Bedingungen der isoelektrischen Fokussierung sowie die Aggregation mit Erreichen ihres isoelektrischen Punktes machen diese Proteine nur sehr schwer zugänglich. *Proteomics*-Analysen zu integralen Membranproteinen basieren daher vornehmlich auf einer eindimensionalen Auftrennung der Proteinmischung in einem SDS-Gel in Verbindung mit einer massenspektrometrischen Identifizierung oder einer Detektion durch Antikörper (Western Blot). Um Membranproteine isolieren und analysieren zu können, ist der Umgang mit ihnen stets an den Zusatz von Detergenz gebunden, wobei sich das stark denaturierende SDS als besonders wirkungsvoll bei der Solubilisierung von integralen Membranproteinen erweist. Mit seinem aliphatischen Kohlenwasserstoffrest interagiert es bevorzugt mit den hydrophoben Bereichen des Proteins, den transmembranen Helices und zerstört hierdurch ihre Tertiär- und Quartärstruktur. Der Nachteil der eindimensionalen SDS-PAGE ist ihr begrenztes Auflösungsvermögen, was in der Folge die Auswertung und die Signifikanz der massenspektrometrischen Analyse reduziert. Zudem wird in einem eindimensionalen System die zu untersuchende Probe nur anhand einer Eigenschaft, nämlich ihrer molekularen Masse, aufgetrennt. Ein mehrdimensionales Trennsystem erlaubt darüber hinaus, die aufgetrennten

Proteine nach weiteren Kriterien zu sortieren und so die Übersicht des untersuchten Systems zu steigern.

Mit Hilfe der doppel-SDS-PAGE (dSDS-PAGE, engl. *double-SDS-PAGE*) ist es gelungen, Membranproteinkomplexe gelelektrophoretisch zweidimensional in ihre Untereinheiten aufzutrennen und massenspektrometrisch zu identifizieren. Hydrophobe, schwer lösliche Membranproteine wurden dabei deutlich von wasserlöslichen Komponenten separiert und konnten deshalb massenspektrometrisch identifiziert werden. Im Gegensatz zu der bekannten 2D-PAGE werden die Proteine bei dieser Technik nicht nach ihrem isoelektrischen Punkt bzw. Molekulargewicht aufgetrennt; vielmehr bewirkt die orthogonale Kombination zweier SDS-Gele mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration eine Differenzierung der Proteinmischung in Abhängigkeit von Molekulargewicht und Hydrophobizität. Ein Einfluß des isoelektrischen Punktes auf das Laufverhalten der Proteine konnte bei der Auswertung der dSDS-Gele nicht festgestellt werden. Basierend auf den Erkenntnissen, nach denen die eindimensionale SDS-PAGE mit der Analyse von Membranproteinen kompatibel ist, wurde sie als Grundlage für das neue Trennsystem genommen. Dabei erreicht das stark denaturierende Detergenz SDS eine quantitative Solubilisierung sämtlicher Proteine bei der Probenvorbereitung, wie auch während des Elektrophoreselaufs. Limitierungen der klassischen IEF/SDS-PAGE infolge von Löslichkeitsproblemen ließen sich auf diese Weise umgehen. Vorarbeiten zu der Entwicklung der dSDS-Gelelektrophorese anhand des D₂Ant-Subkomplexes haben gezeigt, daß Proteine mit einem hohen Anteil an transmembranen α -Helices und vielen unpolaren Aminosäuren (vgl. GRAVY-Score) ein differenziertes und von der Gelkonzentration abhängiges Laufverhalten zeigen (Abb. 5.2 bis Abb. 5.4, S. 59ff). Während integrale Membranproteine in hochkonzentrierten Gelen in einem ihrem Molekulargewicht weitgehend entsprechende Wanderungsgeschwindigkeiten aufweisen, zeigen sie in niedrigkonzentrierten Gelen eine verstärkte Mobilität. Dieses physikochemisch unterschiedliche Verhalten der Proteine ermöglicht der neuen dSDS-Technik, hydrophobe von hydrophilen Komponenten zu trennen. Wasserlösliche Proteine zeigen von der Acrylamidkonzentration des Gels unbeeinflusst ein ihrem Molekulargewicht entsprechendes Migrationsverhalten.

Nach der Sichtbarmachung der Proteinspots durch Coomassie- und/oder Silberfärbung, verdeutlichte die Anordnung der Proteine in zwei übereinanderliegenden Diagonalen, daß Proteine mit Gravy-Scores von über 0,4 selektiv von einer großen Menge an hydrophilen Proteinen getrennt und identifiziert werden können. Als Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten werden vor allem zwei Gründe diskutiert:

- 1) Hydrophobe Membranproteine weisen eine im Vergleich zu Standardproteinen erhöhte SDS-Bindungskapazität auf (Reynolds *et al.* (1970a), Reynolds *et al.* (1970b)). Infolge der erhöhten Detergenzbindung verschiebt sich das Masse/Ladungsverhältnis pro Polypeptid. Die erhöhte Ladungsdichte bewirkt nun vor allem in niedrigkonzentrierten Gelen ein beschleunigtes Laufverhalten der hydrophoben Membranproteine. Dagegen dominiert in höherkonzentrierten Gelen ein molekularer Siebeffekt, welcher bremsend auf die Proteine wirkt und somit ein dem Molekulargewicht entsprechendes Laufverhalten verursacht.
- 2) Daneben scheint die Beibehaltung von globulären Domänen in Gegenwart von SDS bei hydrophoben Proteinen eine Rolle zu spielen. Dies konnte zum Beispiel für die c-Untereinheit der ATP-Synthase (Meier *et al.* (2002)) oder das Cytochrom *b* aus Komplex III des Rinderherzmitochondriums (Marres *et al.* (1977)) gezeigt werden.

Das System ähnelt in seiner Konzeption dem zweidimensionalen 16-BAC/SDS-System (Hartinger *et al.* (1996)) oder dem orthogonalen SDS-Gelsystem von Ludwig *et al.* (1980). Durch Umgehen des Detergenzwechsels vom kationischen 16-BAC zu dem anionischen SDS, sollten in der dSDS-Technik eventuelle Inkompatibilitäten wie die Aggregation oder Ausfällung der Proteine vermieden werden. Publiizierte Anwendungen zu dem 16BAC/SDS-System belegen die Separierung von integralen Membranproteinen, doch ist dort die Trennung von hydrophoben und hydrophilen Proteinen im Vergleich zu der dSDS-PAGE nicht so deutlich. Die Verwendung der zwei SDS-Gele nach Ludwig *et al.* (1980) führte zwar zu einer verbesserten Auftrennung der Untereinheiten aus der untersuchten ATPase, jedoch wurde keine deutliche Separierung zwischen hydrophoben und hydrophilen Proteinen beobachtet, da die Acrylamidkonzentrationen (13% und 15%) der eingesetzten Gele zu ähnlich waren. Auch die Variation der Dimensionen durch Zusatz von Harnstoff war bereits vorweggenommen, obgleich die Gele nach Weber *et al.* (1969) und Swank *et al.* (1971) nicht die Auflösung der heute verwendeten Laemmli oder Tricin Gele erreichten.

Anhand der etablierten dSDS-Technik wurde ein über die BN-PAGE isoliertes Respirasom der mitochondrialen Atmungskette des Rinderherzens analysiert. Dieser Membranproteinsuperkomplex ist ein Assoziat aus den Komplexen I, III und IV mit insgesamt 70 Untereinheiten. Von diesen 70 Proteinen weisen die 11 mitochondrial kodierten Proteine ND1-ND6, ND4L, Cyt. *b* sowie COX I-III zwischen 2 und 14 transmembrane Segmente auf, und sie sind mit Gravy-Scores von bis zu 1,26 stark lipophil. Anhand der

heterogenen Zusammensetzung dieses Modellrespirasoms wurden die Trenneigenschaften der dSDS-PAGE in ihren verschiedenen Variationen für die Analyse von Membranproteinsuperkomplexen untersucht.

Für die Anwendung der dSDS-Technik wurden die zwei Varianten *Standard Mode* und *Inverted Mode* (Kapitel 5.1, Seite 57ff) entwickelt. Verglichen mit der harnstofffreien Variante, führte der Zusatz von 6M Harnstoff bei der ersten Dimension in den Gelen im *Standard Mode* zu einer stärkeren Streuung der Proteine um die Diagonalen (Abb. 5.6 / Abb. 5.7). Die horizontale Aufspaltung der aufgetrennten Proteine unter Zusatz von Harnstoff läßt sich mit einer empirischen Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der Polypeptide vor allem im kleinen Massenbereich erklären. Durch die harnstoffbedingte Verschiebung der Proteinspots empfiehlt sich dieses Protokoll in erster Linie für die Gesamtanalyse einer zu untersuchenden Proteinmischung. Eine Überlagerung verschiedener Proteine zu einer Bande konnte so vermieden werden, wodurch es gelang, einzelne Proteine besser zu isolieren und massenspektrometrisch nachzuweisen. In der Praxis verursacht das Weglassen von Harnstoff ein stärkeres Ineinanderlaufen der hydrophilen Proteine, wodurch der Abgrenzungseffekt zu den hydrophoben Proteinen in der zweiten, oberhalb gelegenen Diagonalen verstärkt wird. Das harnstofffreie Protokoll eignet sich deshalb besonders für die selektive Anreicherung und Hervorhebung der hydrophoben Proteine.

Eine Durchführung der dSDS-PAGE im *Inverted Mode* führte zu einer Anreicherung der hydrophoben Proteine unterhalb der Hauptdiagonalen, da hier das Gel der ersten Dimension 16% Acrylamid und die zweite Dimension 10% Acrylamid enthält. Die Lokalisation der integralen Membranproteine unterhalb der Hauptdiagonalen bestätigt die Überlegungen hinsichtlich des unterschiedlichen Laufverhaltens. Integrale Membranproteine zeigen eine erhöhte Mobilität und entfernen sich daher stärker von der restlichen Menge aus hydrophilen Proteinen. Die *inverted Mode-dSDS* kann eingesetzt werden, um eventuelle Kontaminationen der hydrophoben Proteine durch wasserlösliche Proteine im dSDS-Gel zu vermeiden. Durch eine Immobilisierung hydrophiler Proteine während der Elektrophorese (ein kleiner Anteil jeder aufgetragenen Proteinmenge bleibt bei der Wanderung im Acrylamidmaschenwerk hängen) kommt es zu einer Verteilung dieser Proteine in dem oberen Bereich des Gels. Hydrophobe Proteine, die sich im *Standard Mode* oberhalb der Diagonale anordnen, könnten somit verunreinigt werden.

Im *Standard Mode* erfolgte beim Übergang der Proteine in die zweite Dimension aufgrund des steilen Konzentrationsanstiegs des Acrylamids von 10 auf 16 % Acrylamid eine Aufkonzentrierung der Proteinbanden. Dieser Effekt fällt im *inverted Mode* weg. Um eine

deutliche Fokussierung der Proteinbanden in der zweiten Dimension zu erreichen, war die Einführung eines besonderen Arbeitsschrittes notwendig: Der Gelstreifen aus der ersten Dimension wurde in einer Lösung aus 150mM HCl und 100mM Tris (pH 1,5) für die Dauer von 30 Minuten inkubiert. Durch die Inkubation des Gelstreifens kam es zu einer Immobilisierung des SDS-Protein-Komplexes infolge einer Neutralisierung (Protonierung) des Detergenz. Mit Beginn des Elektrophoreseprozesses führte die Wanderung von Tricin aus dem Kathodenpuffer zu einer kontinuierlichen pH-Erhöhung und Deprotonierung des SDS, wodurch die Proteine sukzessive in Richtung Anode zu wandern begannen und zu einer Gelbände aufkonzentriert wurden. Die nachfolgende Abb. 6.1 veranschaulicht das Prinzip:

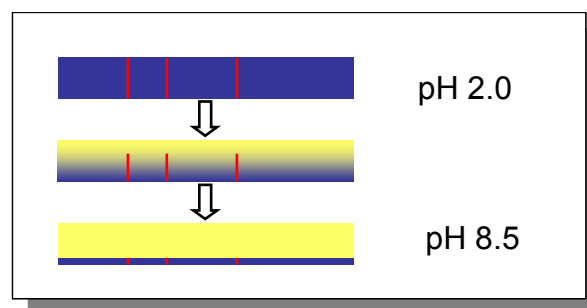


Abb. 6.1 Aufkonzentrierung der Proteinbanden durch kontinuierlichen pH-Wechsel

Für den *Inverted Mode* wurde neben dem Tricin-Gelsystem nach Schägger auch das Laemmli-System in der ersten Dimension verwendet (Abb. 5.9; S. 71). Genau wie im Standard-Modus wurden die Proteine in der ersten Dimension optional in einem harnstoffhaltigen (16% Acrylamid, 6M Harnstoff) oder harnstofffreiem Gel (18% Acrylamid) aufgetrennt. Für die zweite Dimension kam in beiden Fällen wegen der besseren Auflösung der Proteine unterhalb 10 kDa eine Tricin-SDS-PAGE zum Einsatz. Während in dem Standardprotokoll erst unter Zusatz großer Mengen an Harnstoff in der ersten Dimension eine stärkere Verteilung der Proteine entlang der Diagonale erreicht wurde, gelang dies im Laemmli-System auch ohne Harnstoff. Die beiden Laemmli-Systeme sind optional einzusetzen, da in beiden Protokollen die gleichen Massenbereiche abgedeckt wurden.

Obwohl die Proteinverteilung in der umgekehrten Variante eine ebenso deutliche Abgrenzung von hydrophoben Untereinheiten erlaubte, empfiehlt sich für die Praxis die Anwendung des Tricin-Systems im Standard Modus - mit oder ohne Harnstoff. Der Auflösungsbereich dieses Gelsystems lag in dem vorliegenden Modellsystem zwischen 6 und 75 kDa, lässt sich aber mit Hilfe des Tricin-Systems theoretisch auf 2-100 kDa erweitern (Schägger *et al.* (1987)). Da für eine reproduzierbare Auflösung der Proteine und deren Fokussierung in der zweiten Dimension des *Inverted Mode* die Inkubation des Gelstreifens essentiell ist, bedarf es hier

eines höheren Zeitaufwands zur Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Zudem konnte durch die Umkehrung der Dimensionen keine verbesserte massenspektrometrische Identifizierung der Proteine erreicht werden (vgl. dazu Peptidzahl und erreichte Sequenzabdeckung der untersuchten Proteine).

6.1.2 Massenspektrometrische Auswertung der dSDS-Gele

Nach erfolgter zweidimensionaler Auftrennung im *Standard Mode* ist es gelungen, in der Summe 60 der 70 Proteine des Komplexsystems massenspektrometrisch zu identifizieren, was einem Anteil von 86% entsprach. Zu betonen ist, daß sich unter den 60 nachgewiesenen Proteinen 9 der 11 schwer analysierbaren Proteine befanden. Mit den Polypeptiden Cytochrom *b*, COX I, COX II und COX III wurden aus der Ubichinol:Oxidoreduktase und der Cytochrom *c* Oxidase sämtliche hydrophoben Komponenten nachgewiesen. Aus dem Komplex I wurden die Polypeptide ND1, ND2, ND3, ND4 sowie ND5 nach einem tryptischen In-Gel-Verdau sowohl mittels MALDI-TOF als auch durch MALDI-TOF-PSD bestätigt. Die zwei Proteine ND4L und ND6 konnten nicht detektiert werden.

Obwohl die neue dSDS-Technik nicht das Auflösungsvermögen der in der Proteom-Analytik weitverbreiteten konventionellen zweidimensionalen Gelelektrophorese erreicht, zeigt sie aber besonders bei der Analyse von hydrophoben Proteinen ihr Anwendungspotential. Anhand der zweiten Untereinheit der Cytochrom *c* Oxidase, dem COX Polypeptid II, läßt sich die Selektivität des Systems belegen: Die Untereinheit besitzt 2 transmembrane Helices und ist mit einem Gravy-Score von 0,247 nur als moderat hydrophob einzustufen. Bei der Zuordnung der identifizierten Proteine in den bearbeiteten Gelen fällt auf, daß diese 26kDa schwere Komponente sich innerhalb der Hauptdiagonalen wiederfindet und folglich zusammen mit den hydrophilen Komponenten des Respirasoms wandert. Obwohl das Protein von der mitochondrialen DNS kodiert wird und über zwei transmembrane Helices verfügt, kann es nicht zusammen mit den anderen hydrophoben Proteinen detektiert werden. Der Gravy-Score wirkt wie bei der IEF/SDS-PAGE als Filter für die Separierung und Auftrennung der Membranproteine. Im Gegensatz zu der IEF/SDS-PAGE zeigt sich die dSDS-PAGE jedoch unabhängig gegenüber der Hydrophobizität der Proteine, was die Auftrennung des Analyten auch bei Gravy-Scores über 0,4 erlaubt. Ein weiteres Beispiel für die Selektivität des dSDS-Systems demonstriert die Lokalisation des Adenin Nucleotid Translocator 1 aus dem Mitochondrium, welcher als Kontamination in dem 10% $\text{H} \rightarrow 16\%$ -dSDS-Gel entdeckt wurde (Abb. 5.6, Spot 19). Dieses 33kDa schwere Protein verfügt über 6 transmembrane Helices und weist einen Gravy-Score von 0,069 auf. In dem dSDS-Gel wurde

es mit einem signifikanten MOWSE-Score zusammen mit anderen wasserlöslichen Bestandteilen innerhalb der Diagonalen der Atmungskette lokalisiert. Wie Taylor (2003) berichtet, erwies sich dieses Protein bislang bei der Analytik mit einem herkömmlichen 2D-Gel als nicht zugänglich. In den massenspektrometrischen Studien zur Identifizierung der in den dSDS-Gelen aufgetrennten Proteine, wurde nicht für alle Banden eines Geles ein enzymatischer Verdau durchgeführt. Um die Trennleistung der neuen Technik einschätzen zu können, war zu Beginn der Analysen das Ziel, sämtliche Proteinbanden des 10%H→16%-dSDS-Gels zu identifizieren, um so eine Referenzkarte für die weiteren dSDS-Gele zu bekommen. In den folgenden Untersuchungen bestand das vordringliche Ziel in der Bestimmung der hydrophoben Proteine neben den hydrophilen Komponenten. Somit standen bei sämtlichen Gelen zunächst die Proteine außerhalb der Diagonalen im Fokus der Proteomics-Analyse. Identifizierte hydrophile Proteine dienten primär als molekulare Größenmarker, um die dynamische Breite des entwickelten Trennsystems zu ermitteln. Die Untereinheiten VIc und VIIc (beide Komplex IV) sowie das Acyl Carrier Protein aus Komplex I wurden nur in der Standard-Variante ohne Harnstoff (10%→16%) bzw. im Laemmli-Gel (16%LH→10%) nachgewiesen. Das COX VIIb-Protein wurde im Gel 16%→10% identifiziert. Ferner wurde auch das stark hydrophobe Lipid-bindende Protein (Untereinheit c, Gravy-Score 1,143) der kontaminierenden ATP-Synthase mittels MS/MS nur anhand eines einzigen Peptids aus dem 10%H→16% Gel identifiziert.

Wie bereits erläutert, eignet sich die harnstofffreie Variante vor allem für eine deutliche Abgrenzung von besonders hydrophoben Membranproteinen gegenüber wasserlöslichen Bestandteilen. Eine Verbesserung der massenspektrometrischen Identifizierung der intrinsischen Proteine durch den Wechsel zu der harnstofffreien Variante konnte jedoch nicht beobachtet werden. Erreichte Sequenzabdeckungen und MOWSE-Scores wiesen in parallelen Verdauerserien keine bedeutenden Variationen auf.

Auch die Identifizierung der einzelnen Komponenten des Superkomplexes durch Einsatz des *inverted Mode*-dSDS-Systems führte nicht zu einer Verbesserung bei der Proteinidentifizierung. Obwohl die zweite Dimension in Form eines weitmaschigeren 10%-Gels vorliegt, verbesserte die größere Porenweite nicht die Extraktion der Peptide aus dem Gel. Der Zusammenhang zwischen Porengröße und Sequenzabdeckung wurde in einer eigenen Versuchsanordnung untersucht, wobei sich herausstellte, daß die Porengröße keinen unmittelbaren Einfluß auf die Sequenzabdeckung hat (Kapitel 5.2.3 und 6.2).

Bezogen auf alle bei der Analyse des Gels im *Standard Mode* unter Zusatz von 6M Harnstoff identifizierten Proteine, konnte eine durchschnittliche Sequenzabdeckung von 46% erreicht

werden (Tabelle 5.1 / Tabelle 5.2). Die erreichten Sequenzabdeckungen der Proteine mit einem hohen Anteil transmembraner Domänen erwiesen sich im Vergleich zu denen, hydrophiler Proteine als gering. Die intrinsischen Proteine der drei Komplexe konnten nur anhand weniger Peptide aus ihren Verdaus massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Ergebnisse, die bedingt durch die geringe Anzahl an Peptiden als nicht eindeutig eingeschätzt wurden, wurden zusätzlich mit Hilfe von MS/MS Experimenten untermauert. Eine Erklärung für die im Vergleich zu den hydrophilen Proteinen erreichte geringe Sequenzabdeckung kommt der hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren in Betracht. Die transmembranen Helices der Proteine bestehen nahezu ausschließlich aus unpolaren, ungeladenen Aminosäuren wie Leucin, Alanin, Isoleucin oder Phenylalanin. Polare Aminosäuren wie Lysin oder Arginin, die gleichzeitig auch die Schnittstellen der massenspektrometrisch wichtigen Enzyme Trypsin oder LysC darstellen, finden sich dort nur sehr selten. Als eine Folge der wenigen Spaltstellen resultieren bei einem tryptischen Verdau sehr große Fragmente, die zudem aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung stark hydrophob und somit in wäßrigen Medien schwer löslich sind. Die Kombination aus Größe und Lipophilie erweist sich bei der massenspektrometrischen Analyse von Proteinverdaus als besonders anspruchsvoll. Fragmente, die aufgrund ihrer Größe oder schlechten Löslichkeit nicht aus der Gelmatrix extrahiert werden können, entziehen sich der massenspektrometrischen Analyse. Die Peptidsequenzen, die als Verbindungen zwischen den einzelnen Membrandomänen fungieren, bestehen dagegen fast ausschließlich aus polaren Aminosäuren. Ihr Kontakt zu der wäßrigen Umgebung auf beiden Seiten der Lipiddoppelschicht bedingt ihren hydrophilen Charakter. Enzyme wie Trypsin können die Proteine in diesen Bereich spalten, was zu einer Entstehung von kleinen und wasserlöslichen Proteinfragmenten führt. In Proteinen, deren hydrophile Verbindungssequenzen zu kurz sind oder zu wenige tryptische Schnittstellen ausweisen, sind einer massenspektrometrischen Analyse nur sehr schwer zugänglich. Besonders deutlich zeigen sich die Limitierungen von Trypsin für die Analyse von Membranproteinen am Beispiel der beiden Untereinheiten ND4L und ND6 der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase. Beide Proteine konnten in sämtlichen durchgeführten Studien nicht nachgewiesen werden. Die Auswertungen der identifizierten Proteinbanden aus dSDS-Gelen ergaben, daß einzelne Proteinbanden mit einem tryptischen Verdau nicht identifiziert werden konnten. Die Lokalisation dieser Proteine außerhalb der Diagonalen läßt auf einen hydrophoben Charakter dieser Proteine schließen (Spot 9+11 (Abb. 5.6 S.62ff) / Spot 9 + 10 (Abb. 5.7) / Spot 12, 14, 20 (Abb. 5.8)). Da die Positionen der restlichen 9 Membranproteine aus dem Respirasom mittels MALDI-TOF eindeutig bestimmt wurden,

deuten diese Proteinbanden außerhalb der Diagonalen auf die fehlenden Proteine aus dem Komplex I hin. Die gescheiterte Identifizierung dieser Gelbanden ist auf die geringe Anzahl an tryptischen Schnittstellen zurückzuführen. Das ND4L-Protein besitzt nur ein Arginin, was mit einer molaren Masse von 10,8 kDa zwei Peptide mit der Masse 2,7 kDa und 8,1 kDa ergibt. Das 19,1 kDa schwere ND6-Protein läßt sich zwar an 5 Positionen spalten, doch sind dessen Schnittstellen innerhalb der Sequenz so verteilt, daß bei einer vollständigen Spaltung nur 3 tryptische Peptide mit einer Masse von 2,5 kDa, 6,8 kDa und 9,3 kDa entstehen. Aufgrund der geringen Anzahl an massenspektrometrisch verwertbaren Peptiden, erweisen sich diese beiden Untereinheiten als Problemfälle für eine Analyse. Mit den bislang etablierten und routinemäßig eingesetzten *Proteomics*-Techniken konnten diese beiden Proteine bislang in keinen Arbeiten zur mitochondrialen Atmungskette nachgewiesen werden (Carroll *et al.* (2003), Schilling *et al.* (2005), Taylor *et al.* (2003)). Carroll *et al.* (2003) gelang es aus einer hochkonzentrierten und aufgereinigten Komplexpräparation neben den Untereinheiten ND1 bis ND5 auch das hydrophobe Protein ND4L zu identifizieren. Dies war jedoch nur durch Einsatz von Bromcyan möglich, das Proteine chemisch an der Aminosäure Methionin spaltet. Durch das zahlreiche Vorkommen von Methionin in ND4L, entstanden so Fragmente, die sich leicht massenspektrometrisch untersuchen ließen. Die letzte Untereinheit, das ND6 Protein, konnte nur mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern detektiert werden.

Nicht identifizierte Untereinheiten

Neben den beiden bereits diskutierten „ND“-Untereinheiten wurden in den Untersuchungsserien der analysierten dSDS-Gele folgende Proteine aus den Komplexen I, III und IV nicht entdeckt: Aus Komplex I wurden die Untereinheiten MLRQ, 10kDa, B8, AGGG sowie die 46. Untereinheit nicht erfaßt. Die Existenz der 46. Untereinheit der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase wurde bislang nur von Carroll *et al.* (2003) postuliert, konnte aber bislang nicht sequenziert oder genauer charakterisiert werden. So gehen einige Autoren bei der Anzahl des Komplexes I aus dem Säugtierorganismus von nur 45 Untereinheiten aus (Schilling *et al.* (2005), Taylor *et al.* (2003)). Aus den Komplexen III und IV konnten die beiden kleinsten Untereinheiten, das 6,4kDa Protein sowie die VIIa und die VIIIb-Untereinheit nicht bestimmt werden. Sämtliche nicht identifizierte Untereinheiten wiesen Molekulargewichte unter 10kDa auf, was neben einer hohen Hydrophobizität einen ebenfalls wichtigen Einfluß auf die Durchführung eines enzymatischen Verdaus haben kann. Dafür können im wesentlichen zwei Gründe als Erklärung herangezogen werden: Die

Verwendung des Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli führt bei der Auftrennung von Proteinen mit Molekulargewichten unter 10kDa nur zu unbefriedigenden Ergebnissen, so daß eine Auflösung hier nicht mehr möglich ist. Die Substitution des Glycins gegen Tricin führt zu Laufbedingungen, die die Trennung von Proteinen unterhalb von 10kDa verbessert und somit eine Auflösung der kleinen Polypeptide ermöglicht (Schägger *et al.* (1987)).

Eine zweite Erklärung für die unvollständige Erfassung der Komplexbestandteile ist die geringe Anzahl an Peptiden, die nach Spaltung des Proteins mit Trypsin entstehen können. Ähnlich wie bei besonders hydrophoben Proteinen, kann es vorkommen, daß aus einer zu kurzen Polypeptidkette nicht ausreichend Peptide entstehen, um eine eindeutige Bestimmung mittels MS zu ermöglichen. Eine tryptische Spaltung dieser kleinen Proteine würde auch im Falle eines unvollständigen Verdaus, d.h. bei Annahme einer oder zweier überlesener Schnittstellen, zu einer zu geringen Anzahl an Peptiden führen.

Der mit der neuen dSDS-Technik untersuchte Superkomplex I₁III₂IV₁ enthielt 18 Untereinheiten, die ein Molekulargewicht kleiner als 10 kDa besaßen, was einem Anteil von 27% entspricht. Aus dieser Gruppe gelang es, 14 massenspektrometrisch durch einen tryptischen In-Gel-Verdau zu identifizieren. Je nach Protein reichte ihre Identifizierung mittels *Peptide Mass Fingerprinting* aus, in einigen Fällen konnte die Existenz der Untereinheit in Folge einer zu geringen Menge an tryptischen Peptiden nur mit Hilfe von Fragmentierungsexperimenten eindeutig belegt werden (Tabelle 5.2, Spot 54-61). Der Nachweis der Untereinheit VIIc (P00430) aus der Cytochrom *c* Oxidase und der c-Untereinheit (Lipid Bindendes Protein; P07926) aus der kontaminierenden ATP-Synthase gelang nur aufgrund der Sequenzierung eines einzigen Peptids aus dem tryptischen Verdau der entsprechenden Bande. Sowohl das Lipid-Bindende Protein als auch das VIIc-Protein lieferten keine ausreichende Anzahl an Peptiden für eine Identifikation mittels *Peptide Mass Fingerprint*.

Stellenwert und Limitierungen der dSDS-PAGE

Mit Hilfe der neuen dSDS-PAGE ist es möglich, hydrophobe Proteine von hydrophilen Proteinen zu separieren und in einem zweidimensionalen Gelsystem darzustellen. Dabei basiert das Trennvermögen in erster Linie auf einer Differenzierung der Proteine anhand ihrer Hydrophobizität (Gravy-Score). Neben den diskutierten Vorteilen und Fortschritten bei der Entwicklung und der Durchführung der dSDS-Technik muß jedoch eingeräumt werden, daß die neue Methode der herkömmlichen 2D-PAGE in punkto Trennleistung unterlegen ist. Nach

Anfärbung der Gele mittels Silber- oder Coomassie-Färbung zeigte sich, daß viele Proteine aufgrund ihrer ähnlichen molekularen Masse sehr nah beieinander laufen und es oftmals zu Überlagerungen der Proteinbanden kommt. Eine genaue Unterscheidung zwischen den Proteinbanden war in der Folge nicht mehr genau durchzuführen, wodurch bei der massenspektrometrischen Identifizierung der Proben es mitunter zu mehrfach positiven Datenbanksuchergebnissen pro Bande kam. Durch Einsatz von Harnstoff konnte jedoch vor allem im unteren Massenbereich eine Streuung der Proteine um die Diagonale beobachtet werden, wodurch eine gezielte Identifizierung möglich wurde.

Die vorgestellte dSDS-Technik erlaubt eine Auftrennung von gering bis mittelkomplexen Proteingemischen aus etwa 100 Bestandteilen. Der Versuch, komplette Mitochondrien mittels der dSDS-Technik aufzutrennen erwies sich in Folge der enormen Komplexität der Proteinzusammensetzung als unpraktikabel. Hier demonstrieren die Ergebnisse mit der IEF/SDS-2D-PAGE, daß bei einer Trennung des (Sub)proteoms nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht eine größere Anzahl an Proteinen dargestellt werden können. Die dSDS-PAGE eignet sich daher bevorzugt für die Untersuchung isolierter Enzymsysteme oder von kleineren Subproteomen. Im Gegensatz zu der hier vorgestellten gelbasierten Analyse ist in der Literatur auch die Analyse mitochondrialer Subproteome aus verschiedenen Organismen mittels LC-MS/MS dokumentiert (Sickmann *et al.* (2003), Taylor *et al.* (2003)). Der Vorteil dieser *ShotGun* Ansätze ist die große Menge an identifizierten Proteinen, die parallel in einem Reaktionsansatz ermittelt werden können. Da dort zuvor keine Isolierung der Atmungskettenkomplexe über BN-PAGE stattgefunden hat, wurde nahezu das gesamte Mitochondrienproteom analysiert. Die Auswertungen belegen, daß die besonders hydrophoben Untereinheiten - die in dem dSDS-Gel deutlich separiert und identifiziert wurden – nicht oder nur anhand eines oder zweier Peptide nachgewiesen wurden.

Die nicht gelungene Identifizierung aller Untereinheiten des Superkomplexes muß nicht zwangsläufig in der gelelektrophoretischen Trennung oder einem Verlust der Proteine während der dSDS-PAGE begründet sein. Durch eine nicht ausreichende Auflösung des Gels ist davon auszugehen, daß es aufgrund von Überlagerungen mehrerer Proteine innerhalb einer Bande zu einer gegenseitigen Unterdrückung der Peptide aus den Proteinen kam. Proteine, die infolge der Einstellungen bei der Datenbanksuchabfrage nicht entdeckt wurden, können dennoch im Gel vorliegen. Die weiter oben bereits diskutierten Beispiele, in denen Proteine nur anhand eines einzigen Peptids identifiziert wurden, stützen diese Vermutung. Die Methode der Wahl um solche fehlenden Proteine aufzuspüren wäre hier die flüssigkeitchromatographische Auftrennung der aus dem Gel gewonnenen Verdauextrakte.

Auf diese Weise würden sämtliche eluierten Peptide separiert und mittels ESI-MS/MS die Sequenz ermittelt werden. Eine solche Vorgehensweise findet in der Praxis bei der Kombination aus 1D-SDS-PAGE und LC-MS/MS bereits vielfach Anwendung. Der Vorteil dieser Verbindung ist neben der kompletten Auftrennung aller Bestandteile mittels 1D-SDS-PAGE und der hohen Sensitivität der Methode, die Möglichkeit, Proteine anhand von 1 oder 2 Peptiden nachzuweisen. Greift man zuvor auf ein mehrdimensionales Trennverfahren wie die dSDS-PAGE zurück, könnten Überlagerungen nahezu ausgeschlossen werden oder zumindest minimiert werden. Zudem stiege infolge der Reduzierung der Peptidkomplexizität auch die Signifikanz bei der anschließenden Datenbankabfrage. Im vorliegenden Fall erlaubt die dSDS-Technik die Abtrennung der besonders diffizilen hydrophoben Untereinheiten von einer großen Menge an hydrophilen Komponenten. Gelingt es nicht, einen isolierten Proteinspot mit Trypsin zu verdauen und massenspektrometrisch zu analysieren, so wäre zu überlegen, auf ein alternatives Verdauprotokolle auszuweichen. Blicke die Separierung jedoch auf eine eindimensionale SDS-PAGE beschränkt, so bestünde die Gefahr, wichtige Proteine zu „übersehen“. Letztlich hängt die Identifizierung der Proteine auch bei Verwendung der LC-MS/MS Technik von der Anzahl an generierten und eluierten Peptiden aus dem Protein ab.

Eine wie in der vorliegenden Arbeit auf dem GRAVY-Score basierende Trennung von hydrophilen und hydrophoben Proteinen mittels der dSDS-PAGE gelingt nur bei α -helikalen Membranproteinen. β -Faltblatt-Membranproteine lassen sich mit der neuen Methode nicht selektiv auftrennen (Malte Schürken, persönliche Anmerkung). Ein Grund hierfür mag in der moderaten Hydrophobizität dieses Typs von Membranproteinen liegen. Molloy *et al.* (2000) konnten anhand zahlreicher *outer membrane proteins* (OMP) aus *E. coli* die positiven Eigenschaften der klassischen IEF/SDS-2D-PAGE für die Analytik dieser β -Faltblatt-Proteine demonstrieren. Zu ähnlichen Ergebnisse kam man bei Untersuchungen an Aquaporinen. Trotz einer hohen Anzahl an transmembranen Helices ist dieser Typ von Membranproteinen reich an hydrophilen Aminosäuren, was ihrer Funktion als Wasserkanal entspricht. Ausführliche gelelektrophoretische Studien zum Zwecke der Kartierung des mitochondrialen Proteoms aus dem Säugerorganismus finden sich in einer Vielzahl in der Literatur, wobei sich unter den identifizierten Proteinen nur die hydrophilen und wasserlöslichen Proteine finden. Eine auf die mitochondriale Atmungskette beschränkte, systematische gelelektrophoretische Untersuchung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse findet sich bislang nur bei Devereese *et al.* (2002) sowie Brookes *et al.* (2002). Die Autoren beschreiben die Bestimmung zahlreicher Komplexbestandteile mittels Massenspektrometrie, doch liegt im

Vergleich zur dSDS-PAGE die Anzahl gefundener Untereinheiten aus Komplex I, III, IV und V weit niedriger. Besonders bei den hydrophoben Proteinen kamen die Autoren zu keinem positiven Ergebnis. Darüber hinaus scheiterte auch die Identifizierung einer Vielzahl gut wasserlöslicher Polypeptide.

Die dSDS-PAGE ist in ihrer Anwendung mit einer Vielzahl von Techniken kompatibel. Unabhängig von der Methode der Probengewinnung können die Proteinmischungen mittels dSDS aufgetrennt werden. Neben der BN-PAGE können auch andere Verfahren zur Probengewinnung wie z.B. die Dichtezentrifugation vorgeschaltet werden. Abdrakhmanova *et al.* (2004) verwenden die dSDS-Methode zur Auftrennung und Analyse der Untereinheiten des chromatographisch isolierten Komplex I aus *Y. lipolytica*.

Das geringe Auflösungsvermögen der neuentwickelten dSDS-PAGE limitiert dieses Verfahren gegenüber der 2D-PAGE bei der Durchführung von globalen Proteomanalyse. Jedoch erlaubt das Trennprinzip der dSDS-PAGE eine gezielte Analyse von Subproteomen oder isolierten Membranproteinkomplexen zum Zwecke der Identifizierung von integralen Membranproteinen.

6.2 Proteomics von integralen Membranproteinen

Außer den beiden Proteinen ND4L und ND6 konnten in der vorliegenden Arbeit alle 9 hydrophoben integralen Membranproteine des untersuchten Membranproteinsuperkomplexes identifiziert werden. Die Auswertungen und der Vergleich zu den Ergebnissen mit anderen Proteinen belegten jedoch, daß eine Identifizierung auch nach einer guten Separierung und Fokussierung nur anhand einer vergleichsweise geringen Anzahl von Peptiden möglich ist. Periphere oder assoziierte Membranproteine sind dagegen mit den verwendeten Techniken oder Methoden der Proteinanalytik eindeutig und mit hoher Sequenzabdeckung zu identifizieren. Die Bestimmung integraler Membranproteine wird in erster Linie durch die Menge an massenspektrometrisch verwertbaren Peptiden aus einem enzymatischen Verdau limitiert. Im Falle einer positiven Datenbankabfrage ergibt die genaue Auswertung des Spektrums, daß die gemessenen Peptide vorwiegend in Bereichen außerhalb der Membran lokalisiert sind. Intakte, die Lipiddoppelschicht komplett oder auch teilweise durchziehende Sequenzen finden sich nur vereinzelt unter den untersuchten Peptiden. Hauptgrund hierfür ist die begrenzte Anzahl von Spaltstellen der eingesetzten Enzyme. Selbst im Falle einer vollkommenen Zerlegung¹² führt dies bei einigen Membranproteinen zu einer nicht

¹² Spaltung des Proteins an jeder möglichen Schnittstelle des Enzyms

ausreichenden Menge an massenspektrometrisch verwertbaren Peptiden. Ein eindeutiger Nachweis ist somit nur durch den Einsatz von Sequenzierungstechniken erreichbar. Hinzu kommt bei α -helikalen Membranproteinen mit einem hohen TMH/kDa-Quotienten, daß die entstandenen Peptide einen ausgeprägten lipophilen Charakter besitzen und schlechte Lösungseigenschaften aufweisen. Solche Fragmente sind mit herkömmlichen Vorschriften für die enzymatische und massenspektrometrische Identifizierung bislang nicht oder nur sehr schwer zu detektieren. Überdies entziehen sich Peptide mit einer Masse von mehr als 3 kDa häufig der Detektion, da sie nur unvollständig aus der Gelmatrix extrahiert werden können (Eichacker *et al.* (2004)). In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Optimierung des Extraktionsprozesses diskutiert wie z.B. die Mikrowellen-Bestrahlung oder die Verwendung spezieller Lösungsmittel- oder Detergenzmischungen (Soskic *et al.* (2001), Ferro *et al.* (2000), Katayama *et al.* (2004)). Erfolge mit diesen Methoden ergaben sich nur für hydrophile Peptide, sie versagten aber bei der Anwendung auf hydrophobe Analyten.

Desweiteren kann es während des Analyseprozesses bereits vor Zugabe der Enzym-Lösung zu Interferenzen kommen, da mit dem Herauswaschen des Detergens die Solubilisierungshilfe für die (Membran-)proteine entfernt wird. Eine irreversible Aggregation der Analyten in der Gelmatrix kann so die Folge sein.

Das integrale Membranprotein Cytochrom *b* der Ubichinol:Oxidoreduktase ist ein ideales Modellprotein zum Studium von Methoden der Analytik integraler Membranproteine. Die 9 transmembranen Helices des 42kDa Proteins verleihen ihm eine hohe Gesamthydrophobizität. Wie aus Abb. 5.21 zu ersehen, enthält das Protein nur sehr wenige Lysine und Arginine, so daß ein tryptischer Verdau zu wenigen und großen Peptiden führt. Das Cytochrom *b* konnte dementsprechend nach einem tryptischen Verdau mittels PMF nicht identifiziert werden (Abb. 5.16 / Abb. 5.17). Wie die Auswertungen der tryptischen Verdaus ergaben, kam es im Falle des Cytochrom *b* sogar zu einem falsch positiven Hinweis auf ein anderes Protein. Das Cytochrom *c*₁, die vierte Untereinheit des *bc*₁-Komplexes läuft mit einer Masse von 27 kDa viel niedriger als das Cytochrom *b*. Beide Banden scheinen in dem 16,5% T Gel deutlich aufgelöst, jedoch verteilt sich das Cytochrom *c*₁ in dem Gel auch über Bereiche anderer Untereinheiten. Diese falsch positive Identifizierung des kontaminierenden Cytochrom *c*₁ demonstriert eindrucksvoll ein Hauptproblem bei der *Proteomics*-Analyse von gelelektrophoretisch aufgetrennten Membranproteinen: Kontaminierende hydrophile Untereinheiten, die sich leicht mit Trypsin spalten lassen, ergeben signifikante Datenbanksuchergebnisse, während andere hydrophobe Proteine leicht „übersehen“ werden können. Dieser Aspekt ist auch bereits im Zusammenhang mit der Entwicklung der dSDS-

Technik diskutiert worden. Durch die zweidimensionale Auftrennung der Proteinmischungen wurden sowohl bei der Anwendung auf den Superkomplex, als auch in Vorversuchen mit dem D₂Ant-Subkomplex bei der Identifizierung des Cytochrom *b* keine Kontaminationen durch das Cytochrom *c*₁ beobachtet. Zwar erbrachte die Separierung keine deutlichen Fortschritte hinsichtlich der Anzahl an verwertbaren Peptiden, doch wurde so der Einfluß kontaminierender Peptide minimiert.

In dem verwendeten Modellsystem des D₂Ant-Komplexes war die Existenz der Cytochrom *b*-Untereinheit bekannt, so daß die Spektren wiederholt manuell auf mögliche Peptide dieser Untereinheit abgesucht wurden. Die zwei intensiven Signale bei MH⁺_{gem} 1278,6899 und MH⁺_{gem} 1135,5843 ließen sich nicht mit der Aminosäuresequenz des Cytochrom *c*₁ oder anderer Komplexbestandteile in Deckung bringen. Eine Sequenzierung dieser beiden Peptide mit Hilfe der MALDI-TOF-PSD Massenspektrometrie bewies ihre Zuordnung zu dem ursprünglich erwarteten Cytochrom *b*. Zwei weitere Peptide konnten im Rahmen der Massengenauigkeit von 20ppm dem Protein zugeordnet werden, was einer Gesamtsequenzabdeckung von 8% entsprach (Abb. 5.20).

Chymotrypsin als alternatives Spaltenzym

Durch Einsatz eines alternativen Spaltungsenzyms wurde versucht, die Menge an analysierbaren Peptiden zu erhöhen und somit die Sicherheit bei einer Identifizierung zu steigern. Ein *in silico* Verdau des Cytochrom *b* ergab, daß Chymotrypsin neben Bromcyan die größte Anzahl an Peptiden aus diesem Protein generiert. Die Ergebnisse aus den Verdaureihen bestätigten in der Praxis die Überlegenheit von Chymotrypsin gegenüber Trypsin bei der Analyse von integralen Membranproteinen. Während mit Trypsin unter günstigen Bedingungen 8% Sequenzabdeckung erreicht wurden, ließ sich diese durch Verwendung von Chymotrypsin auf durchschnittlich 23% steigern (Abb. 5.27, Tabelle 5.9). Sowohl die MALDI-TOF-Spektren des Gesamtverdaus, als auch die individuelle Analyse ausgewählter Peptide mittels MS/MS-Experimenten bestätigte die Identifizierung des Cytochrom *b* aus *Bos taurus*. Eine weitere Zunahme der Sequenzabdeckung wurde durch die Abwandlungen der Arbeitsprotokolle erzielt. Hier lag die durchschnittliche Sequenzabdeckung bei 28%. Abb. 5.33 und Abb. 5.34 geben eine graphische Übersicht über die erreichten Sequenzabdeckungen aller Verdauxperimente mit Chymotrypsin. In allen 8 Fällen ist die deutliche Zunahme der mittels Chymotrypsin abgedeckten Regionen gegenüber den mit Trypsin erreichten Ergebnissen zu erkennen (Abb. 5.20). Bei der überwiegenden Zahl

der Spaltprodukte gelang es neben der Zuordnung im Rahmen der Massengenauigkeit von 20 bis 50ppm, sie mit Hilfe von Fragmentierungsexperimenten eindeutig dem Cytochrom *b* zuzuordnen. Ein detaillierter Vergleich der Positionen dieser Peptide innerhalb des Proteins ließ den Schluß zu, daß bestimmte identifizierte Regionen des Proteins zu „Kernsequenzen“ zählen, da sie bei sämtlichen Varianten der Verdauvorschriften nachgewiesen wurden. So wie das Peptid mit der Sequenz «DVNYGWIIR» in jedem tryptischen Verdau des Cytochrom *b* nachgewiesen werden kann, wurden diese Fragmente («IGGQPVEHPY», «NTPPHIKPEWY», «LHETGSNNPTGISSDVDPKIPF») in nahezu jedem chymotryptischen Verdau detektiert. Zudem ließen sich diese Spaltstücke massenspektrometrisch besonders leicht untersuchen, da jeweils mindestens eine basische Aminosäure eine effektive Protonierung erlaubte. Genau wie das Peptid bei m/z 1135 mit der Sequenz «DVNYGWIIR» sind auch die weiteren untersuchten Sequenzen größtenteils außerhalb der Membran lokalisiert und besitzen hydrophilen Charakter.

Obwohl in den Versuchsserien die Überlegenheit von Chymotrypsin gegenüber Trypsin bei der Analyse von integralen Membranproteinen bewiesen werden konnte, besitzt es für die Massenspektrometrie gegenüber Trypsin zwei Nachteile: Neben der geringeren Spezifität des Chymotrypsins, welche bei einer Datenbanksuche aufgrund der erhöhten Anzahl möglicher Peptide die Wahrscheinlichkeit des identifizierten Proteins reduziert, besteht ein weiterer Nachteil in der Natur der Aminosäuren, hinter denen die Protease schneidet. Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin (sowie ggf. Leucin) sind im Gegensatz zu Arginin und Lysin nicht basisch, was bei der Ionisierung keine Protonierung am C-Terminus begünstigt. Die Kombination aus Spezifität und der Basizität der generierten Peptide machen Trypsin zu dem wichtigsten Enzym bei der Proteomics-Analyse. In dem vorliegenden Beispiel reichten die Intensitäten der chymotryptischen Peptide aus, um die hydrophobe Untereinheit der Ubichinol:Oxidoreduktase mittels *Peptide Mass Fingerprint* und *Post Source Decay* zu identifizieren. Eine systematische Untersuchung der analysierten Sequenzen ergab für jedes sequenzierte Peptid mindestens eine basische Aminosäure, was somit die Signalintensität verstärkte. Desweiteren fördert eine basische Aminosäure die Lokalisation der positiven Ladung, was die Ausbildung von γ - und b -Ionenserien bei Fragmentierungsexperimenten zusätzlich förderte. Folglich war eine verbesserte Ionisierung gegenüber chymotryptischen Peptiden ohne basische Aminosäure gewährleistet. Weitere Peptidsignale des chymotryptischen Verdau besaßen für eine Fragmentierung eine zu niedrige Intensität, wurden aber aufgrund der Qualitätskriterien ($S/N > 6$; Isotopenverteilung; Auflösung) im

Rahmen der vorgegebenen Massengenauigkeit eindeutig dem Cytochrom *b* zugeordnet (im Spektrum nicht markiert).

Ein sequentieller Einsatz von Trypsin und Chymotrypsin ermöglichte ebenfalls eine eindeutige Identifizierung von Cytochrom *b*. Trotz der „Vorbehandlung“ mit Trypsin befand sich noch ausreichend Substrat für das Chymotrypsin in den Gelstückchen. Die erreichte Sequenzabdeckung bei dieser Versuchsreihe lag um durchschnittlich 5% höher (bei einer durchschnittlichen Peptidzahl von 20), als es bei der alleinigen Verwendung von Chymotrypsin der Fall war. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß Trypsin zunächst auf das Protein einwirkt und es aufgrund der wenigen Schnittstellen nur in einzelne große Fragmente spaltet. Diese Peptide sind aufgrund ihrer Größe und Hydrophobizität nicht aus dem Gel zu eluieren, doch ist der Zugang für das nachfolgende Enzym durch Vergrößerung der Proteinoberfläche verbessert. Bei dem anschließenden Einsatz von Chymotrypsin konnten in den Spektren neben den Peptiden des Cytochrom *b* nur sehr wenige Signale der kontaminierenden Untereinheiten Cyt. *c*₁ bzw. Core I + II zugeordnet werden. Vergleichsstudien mit Trypsin allein belegten jedoch eindeutig die Existenz dieser kontaminierenden Proteine in der Cytochrom *b*-Bande. Somit liegt die Vermutung nahe, daß aus der Vorbehandlung der Gelbanden mit Trypsin ein gewisser „Reinigungseffekt“ resultiert. Hydrophile Proteine werden demnach mit Trypsin effektiver gespalten und die entstandenen Fragmente anschließend nahezu quantitativ aus dem Gel eluiert. Das in den Gelen verbleibende Cytochrom *b* bzw. dessen tryptische Bruchstücke werden anschließend mit Chymotrypsin weiter zerkleinert. Während nach Zugabe von Trypsin die wasserlöslichen Kontaminationen eindeutig nachgewiesen werden konnten, wurden sie nach Behandlung mit Chymotrypsin nicht mehr gemessen. Gleichzeitig kann auch eine erhöhte Affinität des Chymotrypsins zu den hydrophoben Regionen eines Proteins vermutet werden. Dies hätte im Falle einer Proteinmischung zur Folge, daß vermehrt Proteine mit hydrophoben Sequenzen durch Chymotrypsin angegriffen würden. Diese Hypothese ließ sich in einem Parallelverdau mit einer Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin belegen. Die Gelbande, welche neben Cytochrom *b* nachweislich auch Cytochrom *c*₁ und Spuren des Core I- und Core II Proteins enthielt, wurde mit einer Mischung aus Trypsin und Chymotrypsin inkubiert (5.2.2.4). Auch hier konnte die Sequenzabdeckung gegenüber dem alleinigen Einsatz von Chymotrypsin um 17% auf über 39% gesteigert werden (Abb. 5.38). Von den hydrophilen Kontaminationen des Komplexes wurde nur das Cytochrom *c*₁ anhand eines einzigen tryptischen Peptids identifiziert (Abb. 5.36).

Die wiederholte Spaltung des Cytochrom *b* mit Trypsin machte deutlich, daß der Einsatz von Trypsin nur zu einer sehr geringen Sequenzabdeckung bei diesem Protein führt. Allerdings darf vermutet werden, daß das Enzym nicht nur an zwei oder vier Stellen im Protein aktiv ist. Vielmehr muß – auch im Hinblick auf die Ergebnisse mit Chymotrypsin – davon ausgegangen werden, daß die geringe Sequenzabdeckung in erster Linie auf eine mangelnde Elution der Peptide aus dem Gel zurückzuführen ist.

Trotz der deutlich verbesserten Sequenzabdeckungen von annähernd 40% und einer gesteigerten Signifikanz bei der Datenbanksuche, blieb das Ergebnis hinsichtlich der transmembranen Helices auch unter Einsatz von Chymotrypsin unbefriedigend. Peptide aus den membrandurchziehenden Abschnitten des Proteins wurden kaum gefunden. Zwar gelang die vereinzelte Detektion von Peptiden, die mit wenigen Aminosäuren in die Membran hineinragen, doch ist damit keine Gesamtaussage über die Erfassung transmembraner Helices möglich. Die Tatsache, daß Chymotrypsin trotz einer Vielzahl von Spaltstellen, nicht den erwarteten Fortschritt gebracht hat, läßt folgenden Schluß zu: Nach Entfernen des SDS aus dem Gel kommt es durch Aggregation zu einer Art „Verkleben“ der lipophilen Bereiche in der Gelmatrix, so daß das Protein nur an einzelnen Stellen außerhalb der Helices für das Enzym zugänglich ist. Eine zweite Erklärung wäre die Schwerlöslichkeit der entstandenen Spaltprodukte. In diesem Fall würde auch eine quantitative Degradation des Proteins durch Chymotrypsin eine Elution der Peptide aus den Gelresten verhindern. Der Versuch, die Verdaueffektivität von Trypsin und Chymotrypsin oder die Elution der entstandenen Peptide durch Zugabe von SDS-haltigen Verdaupuffer zu steigern ergab bei Trypsin keine Verbesserung. Chymotrypsin wurde bei einer SDS-Konzentration von 0,1% bereits inaktiviert (Daten nicht gezeigt). Der Einsatz von organischen Lösungsmitteln hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die erreichte Sequenzabdeckung. Die Erweiterung der Verdauanleitungen hinsichtlich der Inkubation mit denaturierenden Substanzen oder dem Zerreiben des Gels zum Zwecke der besseren Elution, ergaben ebenfalls keine signifikante Steigerung der Sequenzabdeckung in Hinblick auf die transmembranen Bereiche. Eine Aufspaltung der hydrophoben Bereiche durch Harnstoff oder Guanidinium-Ionen erbrachte keinen sichtlichen Erfolg zur Erfassung dieser Abschnitte.

Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von Chymotrypsin für die Identifizierung von integralen Membranproteinen demonstriert werden. Negative Ergebnisse nach Einsatz von Trypsin bedingen also nicht zwangsläufig das Verschwinden oder Fehlen von hydrophoben Membranproteinen. Das Risiko, Proteine bei der massenspektrometrischen Analyse aufgrund zu weniger Peptide „zu übersehen“, besteht vor allem bei der Durchführung

von *ShotGun* Proteomics Experimenten. In-Lösung-Verdaus bergen bei Unkenntnis der genauen Zusammensetzung der untersuchten Probe stets das Risiko, wichtige Komponenten zu verlieren, wohingegen eine zuvor durchgeführte Gelelektrophorese Aufschluß über die Zusammensetzung der Probe geben kann. Der Vorteil eines In-Lösung-Verdaus ergibt sich umgekehrt aus dem Umgehen des notwendigen Extraktionsschrittes der Peptide aus dem Gel. In der Literatur finden sich Ergebnisse, bei denen integrale Membranproteine nach einem tryptischen In-solutio-Verdau durch LC-MS/MS Experimente mit 100% Sequenzabdeckung nachgewiesen wurden, was folglich auch transmembrane Helices mit einschließt (Hixson *et al.* (2002), Blonder *et al.* (2004b)). Diese Ergebnisse sind allerdings nur annähernd mit den Resultaten aus In-Gel-Verdaus zu vergleichen, da dort die Elution der Peptide aus dem Gel als entscheidender Schritt wegfällt. Einen wichtigen Schritt zur Erhöhung der Sequenzabdeckung nach einem In-Gel-Verdau erreichten van Montfort *et al.* (2002) durch Einsatz von Bromcyan. Mit Hilfe dieses Spaltungsreagenz gelang es, ausreichend kleine Fragmente integraler Membranproteine zu generieren und sie anschließend aus dem Gel zu eluieren. Weitere Beispiele zum Einsatz von Bromcyan mit oder ohne Kombination von Trypsin finden sich bei Quach *et al.* (2003), Zischka *et al.* (2004). Der Einsatz von Bromcyan für die Proteine der mitochondrialen Atmungskette wird bislang nur für die ND4L-Untereinheit des Komplex I aus *Bos taurus* demonstriert (Caroll *et al.* (2003)).

Unter den analysierten und identifizierten Proteinen finden sich allerdings neben besonders hydrophoben Proteinen auch solche, die trotz eines negativen Gesamt-Gravy-Scores die Lipidmembran durchziehen. So besitzt z.B. das 7,2 kDa Protein des Komplex III eine transmembrane Helix, welche mit Hilfe der Massenspektrometrie sequenziert wurde und eindeutig als transmembrane Helix dem Protein zugeordnet werden konnte. Die Identifizierung der beiden hydrophoben Untereinheiten VIIc (P00430) und der *c*-Untereinheit (Lipid Bindendes Protein; P07926) aus der kontaminierenden ATP-Synthase aus dem dSDS-Gel gelang ebenfalls nach einem tryptischen Verdau. Bei beiden Proteinen ermöglichte die Sequenzierung der transmembranen Helices den eindeutigen Nachweis der Proteine. Die tryptischen Schnittstellen lagen hier in Bereichen, in denen das Enzym exakt den hydrophoben Bereich „herausschneiden“ konnte. Auch andere Proteine konnten anhand von hydrophoben tryptischen Peptiden mit Gravy-Scores über 0,8 mittels Fragmentionenanalytik eindeutig identifiziert werden (ND4: Abb. 5.10 / ND5: Abb. 5.11). Diese Beispiele zusammen belegen, daß es keine allgemeingültigen Vorhersagen für die Analyse von hydrophoben Peptiden oder transmembrane Helices mittels Massenspektrometrie gibt. Der Grad, bis zu dem Membranproteine bzw. deren enzymatische Verdaus massenspektrometrisch problemlos

analysiert werden können, variiert von Peptid zu Peptid bzw. Protein zu Protein. Trypsin, bei *Membrane Proteomics* nur als begrenzt einsetzbar angesehen, ist unter bestimmten Bedingungen in der Lage, Peptide zu erzeugen, die einen hohen Gravy-Score besitzen, aber dennoch für die MALDI-TOF Analyse gut geeignet sind. Durch eine oder mehrere basische Aminosäuren können hydrophobe Peptide leicht ionisiert werden, was ihren Nachweis im Massenspektrum erleichtert. Kleine, ausschließlich aus unpolaren Aminosäuren zusammengesetzte Peptide sind unter Umständen in den gängigen Lösungsmittelsystemen löslich, so daß sie bei der Extraktion mit aus dem Gelrest herausgelöst werden und für die Massenspektrometrie präpariert werden können. Membranproteine zu identifizieren, ist heute Routine und Stand der Technik, da durch die Leistungsfähigkeit der heutigen Massenspektrometriesysteme Proteine anhand von ein oder zwei Peptiden identifiziert werden können. Dagegen kann eine *Charakterisierung* der Proteine, vor allem im Hinblick auf posttranslationale Modifikationen, nur durch eine komplette Sequenzabdeckung bzw. die Messung der intakten Masse des Proteins erreicht werden. Eine 100%ige Sequenzabdeckung würde demnach auch gleichzeitig die Problematik um die Detektion der transmembranen Helices lösen.

6.2.1 Einfluß der Gelkonzentration auf die Identifizierung

Da die Extraktion der Peptide aus dem Gel als ein sensibler Schritt eines In-Gel-Verdaus verstanden werden kann, sollte ermittelt werden, in wie weit die Porengröße einen Einfluß auf die eluierten Peptide und somit die Sequenzabdeckung hat. Die eindimensionale Auftrennung des D₂Ant-Komplexes im SDS-Tricin-Gel (Abb. 5.39) und die anschließende massenspektrometrische Auswertung der tryptischen Verdaus ließ keinen direkten Zusammenhang zwischen Porengröße und erreichter Sequenzabdeckung erkennen (Abb. 5.40). Die Graphik beweist, daß bei sämtlichen Komplexbestandteilen die maximale Sequenzabdeckung unabhängig von der Gelkonzentration gleich hoch ist. Im Fall des hydrophoben Cytochrom *b* betrug sie in allen Gelen unter 5%.

Auffällig ist das unterschiedliche Laufverhalten des hydrophoben Cytochrom *b* in Abhängigkeit von der Gelkonzentration. Dieses Phänomen ist bereits von Schägger (1987) beschrieben worden und bildet zudem die Basis für die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte dSDS-PAGE. Auf die eindimensionale Trennung unbekannter Proteinmischungen oder Subproteome hat dies einen enormen Einfluß. Sind in der Probe stark hydrophobe Proteine enthalten, so kann das unterschiedliche Laufverhalten von Membranproteinen zu falsch negativen Ergebnissen führen. Ein Protein, welches aufgrund seiner Masse in einem

bestimmten Bereich des Gels vermutet wird, kann folglich in einem niedrigkonzentrierten Gel in einem ganz anderen Massenbereich erscheinen. So findet sich das Cytochrom *b* (42,7kDa) in einem 10% Gel unterhalb des Cytochrom *c_I* (27kDa), wohingegen es im 16% Gel deutlich separiert von der Bande des Cytochrom *c_I* über diesem erscheint. Aufgrund der ungenügenden Auflösung des Cytochrom *b* in den Gelen mit 10% Acrylamidkonzentration, war das negative Ergebnis bei der Auswertung der tryptischen Verdaus zu erwarten. Die marginal verbesserte Abdeckung bei höheren Acrylamidkonzentrationen war durch eine schärfere Trennung und Fokussierung des Proteins bei diesem Geltyp bedingt. Daraus ergaben sich optimalere Verdaubedingungen, die letztlich die Identifizierung des Proteins anhand von 2 Peptiden ermöglichte.

Die wiederholte Messung tryptischer und chymotryptischer Peptide des Cytochrom *b* unter verschiedenen Bedingungen war ein eindeutiger Beleg für dessen Existenz in der Probe. Anhand des Einsatzes von Chymotrypsin gelang es wiederholt, das integrale Membranprotein signifikant und reproduzierbar zu identifizieren. Die gewonnenen Ergebnisse aus den verschiedenen Untersuchungsserien ließen sich auch auf andere hydrophobe Proteine der Atmungskettenkomplexe übertragen und ermöglichten deren eindeutige Bestimmung.

6.3 BN-MALDI-MS/MS und BN-LC-ESI-MS/MS

Die Blau-Native Gelelektrophorese erlaubt neben der Isolierung von intakten Membranproteinkomplexen die gleichzeitige Analyse funktioneller Interaktionen zwischen Komplexen. So konnte die Erforschung des Respirasoms bzw. der Superkomplexe und deren Einfluß auf pathophysiologische Zustände im Organismus anhand der BN-PAGE genauer erforscht werden (Schägger *et al.* (2000)). Die der massenspektrometrischen Analyse vorgeschaltete Auftrennung von Proteinmischungen mittels SDS-PAGE ist eine gute und wichtige Möglichkeit Membranproteine zu trennen, allerdings im Hinblick auf die nachfolgende Analytik sehr zeitaufwendig. Der Einsatz von mehrdimensionalen Gelsystemen wie der IEF/SDS-PAGE ist zudem mit einer Vielzahl an Limitierungen verbunden. Neben der Inkompatibilität von Membranproteinen mit der isoelektrischen Fokussierung führt auch der Übergang in die zweite Dimension zu einem Verlust an Sensitivität.

Durch den direkten Zugriff auf die Komplexe im BN-Gel lassen sich zudem gelbedingte Modifikationen der Proteine und eventuelle Artefakte vermeiden. Chemische Reaktionen der Aminosäuren wie z.B. Cystein mit freien Acrylamid-Monomeren oder die Oxidation von Methioninen können so minimiert oder ausgeschlossen werden. In Analogie zu den In-Lösung-Verdaus von *Shot-Gun* Experimenten erfolgte hier die Untersuchung von tryptischen

Verdau intakter Proteinkomplexe nach vorheriger Isolierung im BN-Gel. Dazu wurden die Methoden MALDI-MS/MS und LC-ESI-MS/MS miteinander verglichen. Die Verbindung aus Gelelektrophorese, Chromatographie und Massenspektrometrie ist in der Literatur bereits vielfach auf die Analytik von Membranproteinen(-komplexen) angewendet worden (Taylor *et al.* (2003), Devreese *et al.* (2002), Carroll *et al.* (2003)). Eine direkte Verbindung aus BN-PAGE mit LC-MS/MS oder MALDI-MS/MS findet sich bislang jedoch in keiner beschriebenen Anwendung.

In der Summe ist es mit Hilfe der LC-MS/MS Technik gelungen, knapp 79% der vorhergesagten Komplexbausteine zu identifizieren. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich bis auf das ND4L und ND6 sämtliche hydrophoben Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V (Tabelle 5.18). Die Analyse der intrinsischen Untereinheiten und der daraus entstandenen hydrophoben Peptide zeigt die Einsatzfähigkeit der LC-MS/MS Technik auch für die Analytik von integralen Membranproteinkomplexen. Dagegen wurden 13 der 23¹³ Untereinheiten mit Massen unter 10kDa nicht mit der LC-MS/MS Technik erfaßt (Tabelle 5.19). Bei der Untersuchung mittels MALDI-TOF-(PSD) wurden in den Untersuchungen nur 67% der erwarteten Proteine wiedergefunden. Unter den identifizierten Proteinen fanden sich auch hier die hydrophoben Proteine ND1, ND2, ND4, ND5 sowie COX I und COX III. Da die LC-MS/MS-Kopplung die sofortige Identifizierung der Peptide mittels Sequenzierung erlaubt, vermitteln die Resultate dort eine verlässliche Angabe über die Leistungsfähigkeit der Methode. Dagegen basierte die Identifizierung mittels MALDI primär auf dem Nachweis durch *Peptide Mass Fingerprinting*. Der Anteil, der über Sequenzanalyse verifizierten Proteine lag bei der MALDI-Analyse mit 53% knapp über der Hälfte der vorhandenen Proteine.

Die fraktionierte Elution der Peptide mit verschiedenen Acetonitrilkonzentrationen für die MALDI-MS ist in keiner Hinsicht mit der Trennleistung des HPLC-Systems zu vergleichen. Der Anstieg der durchschnittlichen Masse der eluierten Peptide infolge der verschiedenen Acetonitrilkonzentrationen war nur tendenziell zu beobachten. Zwar wurden mit zunehmender Acetonitrilkonzentration Peptide mit größerer molekularer Masse eluiert und somit die Komplexizität der Spektren entzerrt, doch erwies sich diese Verschiebung als nicht quantitativ. Kleine Peptide fanden sich auch noch in Fraktionen mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel. Der Vergleich, der pro Fraktion identifizierten Untereinheiten ergab zudem, daß die Anzahl und Identität der identifizierten Proteine innerhalb eines

¹³ Hierzu zählen auch die Untereinheiten des Komplex V, da die ATP-Synthase im Gegensatz zum dSDS-Gel ebenfalls untersucht wurde

einzelnen Versuchs nicht wesentlich variierte. Bis auf einzelne Ausnahmen wurden die Proteine in jeder Acetonitrilstufe anhand von Peptiden aus dem gleichen Sequenzbereich nachgewiesen. Die Fraktionierung erleichterte jedoch die Auswahl für die anschließende Sequenzierung. Die Isolierung von geeigneten Peptiden mit dem Ziel der Sequenzierung scheiterte bei den Totalextrakten der einzelnen Komplexverdau in Folge der hohen Komplexizität. So wurden bei der Auswertung der Spektren z.B. dem 75kDa Protein des Komplex I allein 20 Peptide zugeordnet. Extrapoliert auf alle 46 Untereinheiten des Komplexes bedeutet dies bei einer durchschnittlichen Anzahl von 5 Peptiden pro Protein über 200 Signale in einem Spektrum. Bei der Analyse des Komplex V ließen sich über 50% der im Totalextrakt gemessenen Peptide allein den beiden hydrophilen α - und β -Untereinheiten der ATP-Synthase zuordnen.

Der Vorteil der MALDI-MS zeigte sich in der schnellen und robusten Probenvorbereitung, was vor allem bei der Hochdurchsatzanalyse ein Vorteil gegenüber der ESI-MS wäre. Während ein eindimensionaler Chromatographie-Lauf mit knapp 3h sehr zeitaufwendig ist, läßt sich die MALDI-Präparation innerhalb kürzester Zeit durchführen. Bedingt durch Interaktionen oder Löslichkeitsproblemen kommt es bei HPLC-Trennungen stets zu Verlusten an Peptiden, was letztlich eine verringerte Sequenzabdeckung bedeutet, wie die Tabellen im Anhang belegen. Sowohl die PMF- als auch die PSD-Spektren wurden in der vorliegenden Arbeit manuell aufgenommen. Die Auswahl der Precursor-Peptide erfolgte durch Sequenzstudium und manuellen Abgleich. Mittlerweile stehen Software-Lösungen zur Verfügung, die diesen Prozeß vollautomatisiert durchführen. Durch die semi-automatisierte Auswertung der Messungen ist nicht auszuschließen, daß weitere Untereinheiten im Falle einer Vollautomatisierung durch MALDI-MS nachgewiesen worden wären. Der Einsatz leistungsfähigerer MALDI-Massenspektrometriesysteme würde es darüber hinaus erlauben, Nachteile in punkto Sensitivität, Geschwindigkeit und Identifikation der Methode auszugleichen, da sich die MALDI-Methode bei Verunreinigungen durch Salze oder Detergentien im Vergleich zur ESI-Technik als robuster erweist.

Bei den untersuchten Komplexen, handelt es sich in ihrer stöchiometrischen Zusammensetzung und Sequenz um genau definierte Proteinsysteme. Die Kenntnis über die genaue stöchiometrische Zusammensetzung der zu untersuchenden Komplexe kann dazu verleiten, Untersuchungsergebnisse nicht objektiv zu bewerten. Alle identifizierten Proteine wurden jedoch eindeutig nachgewiesen, wobei angemerkt werden muß, daß neben den vorausgesagten Proteinen auch weitere Bestandteile des Mitochondrienproteoms eindeutig nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt). Desweiteren wurden Kreuzkontaminationen

durch Komponenten aus den einzelnen Atmungskettenenzymen untereinander beobachtet. Da die Datenbanksuchergebnisse bei Fragmentierungsexperimenten mittels MALDI-PSD als oder LC-ESI-MS/MS als eindeutig eingestuft werden konnten, muß daher von einer Kontaminationen der Atmungskettenkomplexe bei dem Isolierungsprozeß über die BN-PAGE ausgegangen werden. Übertrüge man das Versuchsdesign auf unbekannte Systeme, könnte dies unter Umständen zu falschen Rückschlüssen auf vorhandene Protein-Interaktionen oder Komplexzusammensetzungen verleiten.

Die Komplexität der in den durchgeführten Versuchen analysierten war mit 11 bis 46 Proteinen noch nicht sehr hoch. *ShotGun-Proteomics* Untersuchungen an dem mitochondrialen Proteom aus Hefe oder Säugern (Sickmann *et al.* (2003), Taylor *et al.* (2003)) zählten über 500 positive Datenbanknachweise, darunter auch integrale Membranproteine. Der Einsatz der BN-PAGE mit anschließender LC-MS/MS Analytik könnte somit die Untersuchung von isolierten Proteinsystemen mit weit höherer Anzahl an Bestandteilen eröffnen. Die direkte Untersuchung der Komplexe aus dem BN-Gel war ein erster Schritt zur Evaluierung dieser neuen Vorgehensweise. Mit der Anwendung auf mitochondriale Atmungskettenkomplexe wurde zudem die Anwendung auf integrale Membranproteine und deren hydrophobe Peptide demonstriert. Ein Nachteil gegenüber der Analyse der Komplexe nach erfolgter ein- oder zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung ist jedoch auch hier das Risiko, Proteine zu übersehen. Besonders kleine und hydrophobe Proteine, die eine vergleichsweise geringe Anzahl an Peptiden ergeben, können sich leicht der Untersuchung entziehen. Hier wird wiederum der Vorteil eines gelelektrophoretischen Zwischenschritts deutlich, ein fokussierter Proteinspot ist ein klares Indiz für die Anwesenheit eines Proteins, auch wenn es bei der Standardidentifizierung nicht erfolgreich identifiziert werden kann. Durch die Vorgabe der Datenbanksuche, wonach mindestens 3 Peptide einem Treffer zugeordnet werden müssen, wurden solche Proteine oftmals nicht entdeckt. Jedoch konnten durch die chromatographische Fraktionierung Peptide registriert werden, die in Folge der großen Menge an Fragmenten im Gesamtverdau und die intensivsten Signale im Übersichtsspektrum unterdrückt worden sind. So gelang es z.B. aus der Fraktion mit 10% Acetonitril die Untereinheit COX I anhand von 3 Peptiden mittels PMF und PSD nachzuweisen (Tabelle 4.14). Für das zweite hydrophobe Protein des Komplex IV, der COX III war dies ebenfalls möglich. Bei diesem 29kDa schweren Protein ergeben sich unter Annahme von maximal einer überlesener Schnittstelle bei einem tryptischen Verdau nur 4 Peptide im Massenbereich von 500 bis 2500 Da. Die Wahrscheinlichkeit, dieses Protein bei der Datenbanksuche in der großen Peptidmenge als signifikant identifiziertes Proteinen

aufgelistet zu finden, erweist sich als sehr gering. Sowohl durch LC-ESI-MS/MS als auch MALDI-TOF-PSD-Methode ist es gelungen, dieses Protein anhand eines signifikanten Peptids zu identifizieren (s. Tabellen im Anhang). Das Problem einer zu geringen Anzahl an enzymatischen Spaltprodukten spiegelt sich auch bei der Analyse von Proteinen mit Molekulargewichten kleiner als 10kDa wieder, die sowohl mit MALDI als auch LC-ESI nicht nachgewiesen werden konnten. Der Nachweis dieser Proteine in dSDS-Experimenten unterstreicht die Überlegenheit einer gelbasierten Auftrennung von Proteinen. Wie weiter oben bereits angemerkt, war das Modellproteom in seiner Zusammensetzung wohl definiert, was die Interpretation der Messungen erleichterte.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Probleme bei der Analyse von Membranproteinkomplexen und die Möglichkeiten ihrer Identifizierung dargestellt. Mit der Etablierung der dSDS-Technik wurde erstmals eine zweidimensionale Gelelektrophoresetechnik vorgestellt, die eine Fokussierung von hydrophoben integralen Membranproteinen und Separierung von hydrophilen, wasserlöslichen Proteinen ermöglicht. Anhand eines Membranproteinsuperkomplexes aus dem Rinderherzmitochondrium wurde die Leistungsfähigkeit der dSDS-Technik zur Auftrennung dieser Proteine demonstriert. Bei der orthogonalen Kombination zweier SDS-Gelsysteme mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration kommt es infolge des unterschiedlichen Laufverhaltens der Proteine unter diesen Bedingungen zu einer Auftrennung der Proteine in zwei Diagonalen. Dabei finden sich die hydrophoben Proteine mit einem Gravy-Score $> 0,4$ getrennt von der aus hydrophilen Proteinen bestehenden Hauptdiagonalen. Besonders die Fortschritte auf dem Gebiet der Massenspektrometrie haben dazu beigetragen, diese Membranproteine sicher, schnell und reproduzierbar zu identifizieren. 60 der 70 aus dem Superkomplex I₁III₂IV₁ stammenden Untereinheiten konnten mittels der dSDS-Technik aufgetrennt und durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen werden. Unter den identifizierten Untereinheiten befanden sich auch 9 der 11 mitochondrial kodierten Proteine aus den Komplexen I, III und IV. Diese 11 Untereinheiten besitzen alle positive Gravy-Scores und gelten als extrem hydrophob. Für die Proteomanalyse wurden für die Standardvariante zwei Protokolle entwickelt. In der Variante ohne Zusatz von Harnstoff zu der ersten Dimension kommt es zu einer deutlichen Trennung von hydrophoben und hydrophilen Proteinen. Dagegen kommt es in der Variante mit Harnstoff zu einer stärkeren Streuung der Proteinspots. Eine Abgrenzung zwischen hydrophoben und hydrophilen Proteinen ist nicht mehr so deutlich zu erkennen, doch eröffnet sich trotzdem ein besserer Überblick über die zu untersuchenden Proteinmischung. Sämtliche in der Arbeit identifizierten Proteine wurden nach enzymatischer Spaltung massenspektrometrisch durch MALDI-TOF *Peptide Mass Fingerprinting* oder mit Hilfe der MALDI-TOF-PSD Technik ausgewählter Peptide eindeutig und mit hoher Signifikanz per Datenbanksuche nachgewiesen. Neben der Etablierung der dSDS-Technik stand auch die Evaluierung und systematische Auswertung von allgemeingültigen Strategien zur Identifizierung von Membranproteinkomplexen im Mittelpunkt der Arbeit. Ausgehend von Komplexen, die über die Blau-Native-Gelelektrophorese isoliert wurden, konnte mittels BN-MALDI-MS/MS und/oder LC-ESI-

MS/MS nach enzymatischem Verdau ihre Zusammensetzung ohne vorherige gelelektrophoretische Vortrennung ermittelt werden. Verglichen mit den Daten aus der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigte sich jedoch deutlich, daß die Anzahl an identifizierten Untereinheiten und deren Signifikanz bei Datenbanksuchen ohne weitere gelelektrophoretische Auftrennung niedriger und weniger verlässlich ist. Außerdem erlaubte die Auftrennung der Membranproteinkomplexe mittels dSDS-PAGE neben der Information über das Auftreten von hydrophoben und hydrophilen Untereinheiten auch eine sicherere massenspektrometrische Identifizierung der Membranproteine. Verglichen mit den zwei anderen Methoden, erweist sich die Kombination aus BN und dSDS mit anschließender MALDI-TOF-(PSD) Identifizierung der In-Gel-Verdaus im Hinblick auf Anzahl und Signifikanz der identifizierten Untereinheiten am verlässlichsten (Abb. 7.1)

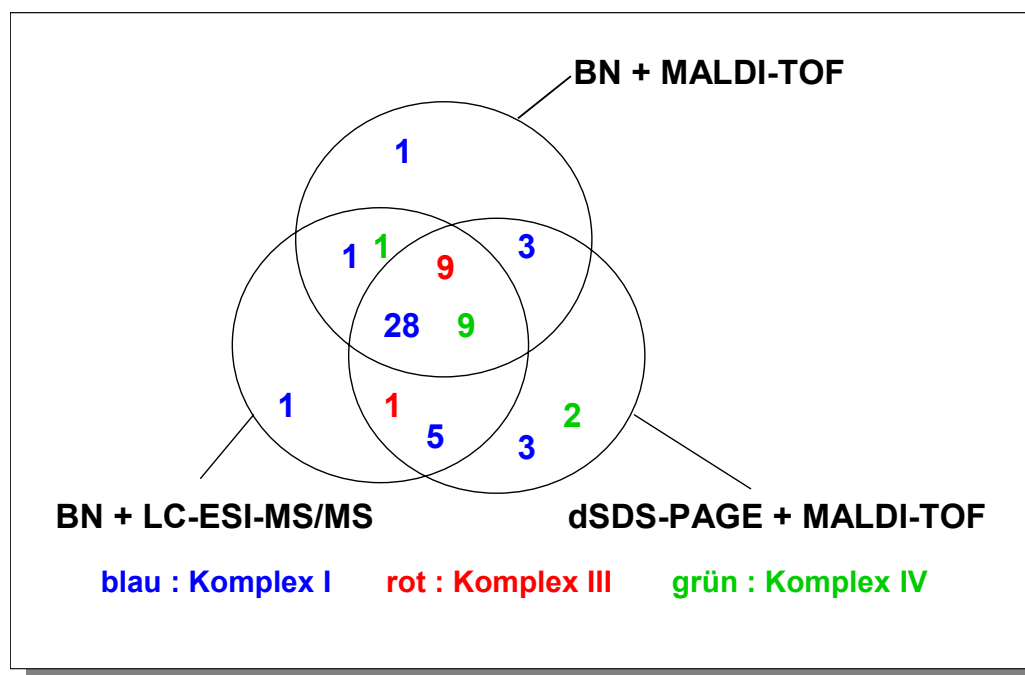


Abb. 7.1 Vergleich der identifizierten Untereinheiten der Komplexe I, III und IV mit Hilfe der verschiedenen Techniken

Untersuchungen zur allgemeinen Verbesserung und Optimierung von Arbeitsvorschriften zur massenspektrometrischen Untersuchungen von Membranproteinen wurden ebenfalls durchgeführt. Der Einsatz von Chymotrypsin als alternatives Spaltungsenzym sowie Variationen der Elektrophorese- und Verdauprotokolle erlauben es, die Sequenzabdeckung und Signifikanz der Datenbankergebnisse bei besonders hydrophoben Untereinheiten zu steigern. Die weiterentwickelten Protokolle wurden zudem genutzt, hydrophobe Membranproteine aus anderen Organismen zu identifizieren.

Die Arbeiten auf dem Gebiet *Membrane Proteomics* demonstrierten, daß die komplette Analytik von komplexen Systemen stets ein Ineinandergreifen und Zusammenspiel verschiedenster Techniken und Methoden ist. Mit der dSDS-Technik und den Erkenntnissen aus der Analyse von Membranproteinen sollte versucht werden, das Methodenspektrum der bioanalytischen Arbeitstechniken zu erweitern und eine neue Methode zur Analytik von Membranproteinkomplexen zu etablieren.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausschrift/Bedeutung
10% → 16%	dSDS-Gel im Standard Mode ohne 6M Harnstoff in der 1. Dimension
10%H → 16%	dSDS-Gel im Standard Mode mit 6M Harnstoff in der 1. Dimension
16% → 10%	dSDS-Gel im Umkehr-Modus; Tricin Gel als 1. Dimension
16%LH → 10%	dSDS-Gel im Umkehr-Modus; Laemmli Gel mit 6M Harnstoff als 1. Dimension
18%L → 10%	dSDS-Gel im Umkehr-Modus; Laemmli Gel ohne 6M Harnstoff als 1. Dimension
16-BAC	Benzyl-dimethyl- <i>n</i> -hexadecylammoniumchlorid
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AHC	Ammoniumhydrogencarbonat
ATP	Adenosintriphosphat
BN-PAGE	Blau-Native Polyacrylamid Gelelektrophorese
CID	Collision Induced Decay (kollisionsinduzierter Zerfall der Ionen)
CMC	Critical Micelle Concentration; kritische Mizellenkonzentration
COX	Cytochrom <i>c</i> Oxidase
CT	Chymotrypsin
Cyt. <i>c</i> ₁ / Cyt. <i>b</i>	Cytochrom <i>c</i> ₁ / Cytochrom <i>b</i>
D ₂ Ant	<i>bc</i> ₁ -Komplex; <u>D</u> elipidiert, <u>2</u> Untereinheiten fehlen, mit <u>A</u> ntimycin stabilisiert
Da	Dalton
ddist	doppeldestilliert
DDM	Dodecylmaltosid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dSDS-PAGE	doppel SDS Polyacrylamidgelelektrophorese
E _{kin}	Kinetische Energie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray Ionisierung
eV	Elektronenvolt
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid, reduziert
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron-Resonanz

HCCA	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IT	Ion-Trap (Ionenfalle)
k	kilo
KI	Komplex I; NADH:Ubichinon Oxidoreduktase
KII	Komplex II; Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase
KIII	Komplex III; Ubichinol:Cytochrom <i>c</i> Oxidoreduktase
KIV	Komplex IV; Cytochrom <i>c</i> Oxidase
KV	Komplex V; F ₁ F ₀ -ATP Synthase
L	Flugstrecke
m	Masse
M	Molarität
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MH ⁺ _{gem}	Gemessene Ionenmasse
MH ⁺ _{mi}	Monoisotopische Ionenmasse
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer
NADH	Nicotinsäureamifadenindinukleotid, reduziert
ND	NADH Dehydrogenase
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMF	Peptide Mass Fingerprint
ppm	parts per million
PSD	Post Source Decay
Q-TOF	Quadrupol-Time of flight
RP	Reversed Phase
RISP	Rieske Iron Sulfur Protein
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
S/N	Signal-zu-Rauschen Verhältnis
t	Zeit
T-1/2/3/4	Trypsin Verdau Nr. 1...4 von Cytochrom <i>b</i>
Tab.	Tabelle
Tricin	N-Tris[hydroxymethyl]methylglycerin
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan

TEMED	N, N, N', N' - Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMH	Transmembrane Helix
TOF	Time-of-flight (Flugzeit)
U_{acc}	Beschleunigungsspannung
v	Geschwindigkeit
z	Ladung

8.2 Referenzen zu den untersuchten Proteinen

Tabelle 8.1 Übersicht der im Superkomplex I₁III₂IV₁ sowie Komplex V enthaltenden Untereinheiten

Komplex	Protein	Swiss-Prot	MW	Gravy	pI	Anzahl an TMH
I	75kDa	P15690	77,0	-0,124	5,4	0
I	ND5	P03920	68,3	0,637	9,2	14
I	ND4	P03910	52,1	0,826	9,4	12
I	49kDa	P17694	49,2	-0,338	5,9	0
I	51kDa	P25708	48,5	-0,297	7,1	0
I	39kDa	P34943	39,1	-0,190	9,2	3
I	42kDa	P34942	36,7	-0,480	5,8	0
I	ND1	P03887	35,7	0,798	7,8	8
I	ND2	P03892	34,7	0,785	10	8
I	30kDa	P23709	26,4	-0,456	5,4	0
I	24kDa	P04394	23,8	-0,294	5,7	0
I	B22	Q02369	21,8	-1,078	8,8	0
I	PDSW	Q02373	20,9	-0,989	8,8	0
I	TYKY	P42028	20,2	-0,487	5,2	0
I	PSST	P42026	20,1	-0,153	9,7	2
I	PGIV	P42029	20,0	-0,717	8,3	0
I	ND6	P03924	19,1	1,031	4,2	5
I	ASHI	Q02372	18,7	-0,958	4,9	1
I	B17.2	O97725	17,1	-0,804	9,7	0
I	SGDH	Q02380	16,7	-0,330	7,0	1
I	GRIM-19	Q95KV7	16,5	-0,322	9,2	1
I	B18	Q02368	16,3	-1,003	8,4	0
I	B17	Q02367	15,5	-0,613	9,6	1
I	AQDQ	Q02375	15,4	-0,929	9,5	0
I	B15	P48305	15,1	-0,688	9,7	1
I	B14	Q02366	14,9	-0,591	10,0	0
I	B14.7	Q8HXG6	14,6	0,245	9,0	3
I	ESSS	Q8HXG5	14,5	-0,679	4,6	1

I	B14.5b	Q02827	14,1	-0,350	9,1	1
I	B13	P23935	13,2	-0,424	8,0	0
I	ND3	P03898	13,1	0,863	4,5	3
I	B14.5a	Q05752	12,5	-0,700	10,1	0
I	15kDa	Q02379	12,5	-1,015	9,0	0
I	B12	Q02365	11,1	-0,692	9,2	1
I	B8	Q02370	11,0	-0,372	9,9	0
I	ND4L	P03902	10,8	1,259	5,3	2
I	13kDa-A	P23934	10,5	-0,672	7,9	0
I	SDAP	P52505	10,1	-0,225	4,2	0
I	MLRQ	Q01321	9,3	-0,433	9,6	0
I	B9	Q02371	9,2	-0,093	8,3	1
I	AGGG	Q02374	8,5	-0,603	4,4	0
I	10kDa	P25712	8,4	-1,347	9,4	0
I	MWFE	Q02377	8,1	-0,211	9,6	1
I	MNLL	Q02378	7,0	-0,489	9,5	0
I	KFYI	Q02376	5,8	-0,465	8,3	1
I	46. Untereinheit			<i>Nicht bekannt</i>		
III	Core I	P31800	49,2	-0,528	5,5	0
III	Core II	P23004	46,5	-0,068	7,8	0
III	Cytochrom <i>b</i>	P00157	42,7	+0,680	7,8	9
III	Cytochrom <i>c₁</i>	P00125	27,3	-0,426	6,5	1
III	RISP	P13272	21,6	-0,323	7,0	0
III	13,4 kDa	P00129	13,4	-1,107	9,1	0
III	9,5 kDa	P13271	9,6	-0,536	10,5	1
III	9,2 kDa	P00126	9,2	-1,041	4,5	0
III	8,0 kDa	P13272	8,0	+0,374	11,5	0
III	7,2 kDa	P00130	7,2	-0,121	9,5	1
III	6,4kDa	P07552	6,5	-0,043	10,2	1
IV	Untereinheit I	P00396	57,0	0,685	6,1	12
IV	Untereinheit III	P00415	29,9	0,413	6,5	6
IV	Untereinheit II	P00404	26,0	0,247	4,8	2
IV	Untereinheit IV	P00423	17,2	-0,555	8,7	1
IV	Untereinheit Va	P00426	12,4	-0,450	5,0	0
IV	Untereinheit Vb	P00428	10,7	-0,499	6,1	0
IV	Untereinheit VIb	P00429	10,0	-0,895	8,8	0
IV	Untereinheit VIa	P07471	9,5	-0,524	10,5	0
IV	Untereinheit VIIb	P13183	9,4	-0,237	10,0	1
IV	Untereinheit VIc	P04038	8,5	-0,274	10,3	1
IV	Untereinheit VIII	P10175	7,4	0,114	10,5	1
IV	Untereinheit VIIa	P07470	6,7	-0,215	8,7	1

IV	Untereinheit VIIc	P00430	5,4	-0,028	9,8	1
V	α Untereinheit	P19483	55,3	-0,108	5,4	0
V	β Untereinheit	P00829	51,6	-0,008	5,0	0
V	γ Untereinheit	P05631	30,3	-0,259	9,2	0
V	Protein 6	P00847	24,8	0,924	10,0	6
V	b Untereinheit	P13619	24,7	-0,276	9,1	0
V	OSCP- Untereinheit	P13621	21,0	-0,050	9,8	0
V	d Untereinheit	P13620	18,6	-0,674	6,0	0
V	δ Untereinheit	P05630	15,1	0,186	4,5	0
V	g Untereinheit	Q28852	11,3	0,214	9,4	0
V	f Untereinheit	Q28851	10,2	-0,259	9,9	1
V	Coupling Factor 6	P02721	9,0	-1,111	5,4	0
V	e Untereinheit	Q00361	8,2	-0,896	9,5	0
V	Protein 8	P03929	7,9	0,083	9,5	1
V	c Untereinheit	P07926	7,6	1,143	6,1	2
V	ε Untereinheit	P05632	5,7	-0,288	10,1	0

Tabelle 8.2 Übersicht der Untereinheiten des D_2 Ant-Subkomplexes aus dem Rinderherzmitochondrium

Untereinheit	Protein	Swiss-Prot	MW (kDa)	pI	TMH	Gravy
I	Core I	P31800	49,2	5,5	0	-0,528
II	Core II	P23004	46,5	7,8	0	-0,068
III	Cytochrom <i>b</i>	P00157	42,7	7,8	9	+0,680
IV	Cytochrom <i>c</i> ₁	P00125	27,3	6,5	1	-0,426
V	RISP	P13272	21,6	7,0	0	-0,323
VI	13,4 kDa	P00129	13,4	9,1	0	-1,107
VII	9,5 kDa	P13271	9,6	10,5	1	-0,536
VIII	9,2 kDa	P00126	9,2	4,5	0	-1,041
IX	8,0 kDa	P13272	8,0	11,5	0	+0,374
X	7,2 kDa	P00130	7,2	9,5	1	-0,121
XI	6,4kDa	P07552	6,5	10,2	1	-0,043

Sequenz von Cytochrom *b*(P00157)

1	MTNIRKSHPL MKIVNNAFID LPAPSNISSW WNFGLLGIC LILQILTGLF LAMHYTSDTT	60
61	TAFSSVTHIC RDVNYGWIIR YMhangasMF FICLYMHVGR GLYYSYTFLE ETWNIGVILL	120
121	LTVMATAFMG YVLPWQMSF WGATVITNLL SAIPYIGTNL VEWIWGGFSV DKATLTRFFA	180
181	FHFILPFIIM AIAMVHLLFL HETGSNNPTG ISSDVKIPF HPYYTIKDIL GALLLILALM	240
241	LLVLFAPDLL GDPDNYTPAN PLNTPPHIKP EWYFLFAYAI LRSIPNKLGG VLALAFSILI	300
301	LALIPLLHTS KQRSMMFRPL SQCLFWALVA DLLTLTWIGG QPVEHPYITI GQLASVLYFL	360
361	LILVLMPTAG TIENKLLKW	

8.3 Referenztabellen zu den identifizierten Untereinheiten

Tabelle 8.3 Dem Cytochrom *b* zugeordnete Peptide der Verdauerserie CT1-CT4 (Denaturierung mit 8M Harnstoff)

MH ⁺¹)	Position	GRAVY-Score	Sequenz	CT1	CT2	CT3	CT4
2625,2585	200-223	-0,779	LHETGSNNPTGISSDVKIPFHPY	✓	✓	✓	✓
2512,1745	201-223	-0,978	HETGSNNPTGISSDVKIPFHPY	✓	✓	✓	✓
2375,1513	199-220	-0,445	FLHETGSNNPTGISSDVKIPF	✓	✓	✓	✓
2228,0829	200-220	-0,600	LHETGSNNPTGISSDVKIPF	✓	✓	✓	✓
773,4344	182-187	1,517	HFILPF	✓			
807,4512	76-81	0,317	GWIIRY	✓	✓	✓	
932,4771	96-103	0,013	MHVGRGLY	✓	✓	✓	✓
1096,5427	338-347	-0,680	IGGQPVEHPY	✓	✓	✓	✓
1196,6568	1-10	-0,800	MTNIRKSHPL	✓	✓	✓	✓
1381,6899	263-273	-1,573	NTPPHIKPEWY	✓	✓	✓	
1528,7583	263-274	-1,208	NTPPHIKPEWYF	✓	✓	✓	
781,3701	50-55	0,967	FLAMHY		✓		
931,4889	156-163	0,438	IGTNLVEW		✓		✓
936,4971	11-18	0,537	MKIVNNAF		✓	✓	✓
1065,6163	2-10	-1,100	TNIRKSHPL		✓	✓	
1365,6771	307-317	-0,636	LHTSKQRSMMF		✓	✓	✓
2114,9989	201-220	-0,820	HETGSNNPTGISSDVKIPF		✓	✓	✓
1095,5410	96-104	-0,133	MHVGRGLYY			✓	
1273,5695	251-262	-1,300	GDPDNYTPANPL			✓	
1393,6529	64-75	-0,242	SSVTHICRDVNY				✓
1441,6431	82-94	1,233	MHANGASMFFICL				✓
1636,7536	64-77	-0,300	SSVTHICRDVNYGW				✓

¹⁾ theoretische monoisotopische Massen (incl. Modifikationen) in Da

Tabelle 8.4 Dem Cytochrom *b* zugeordnete Peptide der Verdauerserie CT5-CT8 (Denaturierung mit 8M Guanidinium-Hydrochlorid)

MH ⁺¹)	Position	GRAVY-Score	Sequenz	CT5	CT6	CT7	CT8
2625,2585	200-223	-0,779	LHETGSNNPTGISSDVKIPFHPY	✓	✓	✓	✓
2512,1745	201-223	-0,978	HETGSNNPTGISSDVKIPFHPY	✓	✓	✓	
2375,1513	199-220	-0,445	FLHETGSNNPTGISSDVKIPF	✓	✓	✓	
2228,0829	200-220	-0,600	LHETGSNNPTGISSDVKIPF	✓	✓	✓	✓
773,4344	182-187	1,517	HFILPF				
807,4512	76-81	0,317	GWIIRY	✓	✓	✓	✓

932,4771	96-103	0,013	MHVGRGLY	✓	✓	✓	✓
1096,5427	338-347	-0,680	IGGQPVEHPY	✓	✓	✓	✓
1196,6568	1-10	-0,800	MTNIRKSHPL	✓	✓		
1381,6899	263-273	-1,573	NTPPHIKPEWY	✓	✓	✓	✓
1528,7583	263-274	-1,208	NTPPHIKPEWYF	✓	✓		
781,3701	50-55	0,967	FLAMHY				
931,4889	156-163	0,438	IGTNLVEW				
936,4971	11-18	0,537	MKIVNNAF	✓	✓	✓	✓
1365,6771	307-317	-0,636	LHTSKQRSMMF	✓		✓	
2114,9989	201-220	-0,820	HETGSNNPTGISSDVKIPF	✓		✓	
1095,5410	96-104	-0,133	MHVGRGLYY				
1273,5695	251-262	-1,300	GDPDNYTPANPL				
1393,6529	64-75	-0,242	SSVTHICRDVNY		✓		
1441,6431	82-94	1,233	MHANGASMFFICL				
1636,7536	64-77	-0,300	SSVTHICRDVNYGW				
1044,5724	111-119	0,889	ETWNIGVIL		✓		
1284,6946	169-179	0,118	SVDKATLTRFF		✓		✓
1415,6492	129-140	0,475	MGYVLPWGQMSF			✓	
2009,0490	336-353	-0,011	TWIGGQPVEHPYITIGQL			✓	
1065,6163	2-10	-1,100	TNIRKSHPL				✓
1688,8980	304-317	-0,021	IPLLHTSKQRSMMF				✓

¹⁾ theoretische monoisotopische Massen (incl. Modifikationen) in Da

Tabelle 8.5 Identifizierte Untereinheiten der 10% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex I

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
2,05e+06	14	14 %	KI-75kDa
1,84e+05	14	21 %	KI-51kDa
1,04E+03	6	29 %	KI-PGIV
7,44E+02	5	28 %	KI-ESSS
6,81E+02	7	64 %	KI-B14.5a
5,34E+02	7	17 %	KI-PSST
4,14E+02	6	31 %	KI-B17
3,22E+02	5	8 %	KI-39kDa
2,71E+02	8	14 %	KI-49kDa
2,24E+02	5	22 %	KI-AQDQ
2,17E+02	5	35 %	KI-B15
2,04E+02	6	32 %	KI-B14
1,60E+02	4	27 %	KI-15kDa

1,52E+02	4	41 %	KI-B8
1,49E+02	5	17 %	KI-24kDa
1,44E+02	5	20 %	KI-B22
1,28E+02	4	12 %	KI-30kDa
1,21E+02	5	31 %	KI-B18
8,42E+01	5	29 %	KI-ASHI
6,39E+01	5	25 %	KI-AGGG
5,09E+01	3	12 %	KI-PDSW
4,31E+01	3	3 %	KI-ND 5
3,85E+01	3	25 %	KI-B17.2
3,57E+01	5	31 %	KI-B16.6
3,37E+01	3	22 %	KI-B14.5b
2,27E+01	4	14 %	KI-SGDH
2,63E+01	5	9 %	KI-42kDa

Tabelle 8.6 Identifizierte Untereinheiten der 30% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex I

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
1,16e+05	13	14 %	KI-75kDa
9,76E+04	12	20 %	KI-51kDa
4,62E+03	10	20 %	KI-49kDa
1,04E+03	6	29 %	KI-PGIV
7,44E+02	5	28 %	KI-ESSS
7,21E+02	7	31 %	KI-B17
6,82E+02	7	24 %	KI-AQDQ
6,81E+02	7	64 %	KI-B14.a
5,34E+02	7	17 %	KI-PSST
4,17E+02	6	37 %	KI-B18
4,04E+02	4	37 %	KI-B8
3,22E+02	5	8 %	KI-39Kd
2,17E+02	5	35 %	KI-B15
2,04E+02	6	32 %	KI-B14
1,60E+02	4	27 %	KI-15 kDa
1,46E+02	6	20 %	KI-B22
7,96E+01	4	12 %	KI-24kDa
6,21E+01	4	23 %	KI-ASHI
4,79E+01	3	9 %	KI-30kDa
4,31E+01	3	3 %	KI-ND5
3,59E+01	5	25 %	KI-AGGG
3,57E+01	5	31 %	KI-B16.6
3,37E+01	3	22 %	KI-B14.b
2,47E+01	4	7 %	KI-42KD

Tabelle 8.7 Identifizierte Untereinheiten der 50% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex I

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
6,63E+09	14	45 %	KI-49kDa
1,49E+09	13	26 %	KI-75kDa
6,43E+06	10	37 %	KI-39kDa
7,76E+05	11	52 %	KI-30kDa
1,95E+05	13	35 %	KI-51kDa
8,04E+03	8	37 %	KI-42KD
4,95E+03	7	46 %	KI-PDSW
4,55E+03	6	43 %	KI-ASHI
4,54E+03	7	28 %	KI-24kDa
1,04E+03	4	39 %	KI-B17
5,29E+02	4	25 %	KI-TYKY
4,07E+02	3	33 %	KI-B17.2
3,25E+02	3	41 %	KI-B13
1,97E+02	3	29 %	KI-B18
1,88E+02	7	17 %	KI-ND2
1,53E+02	3	33 %	KI-B16.6
1,03E+02	3	19 %	KI-SGDH
7,79E+01	3	13 %	KI-PSST
6,83E+01	6	16 %	KI-ND5
6,64E+01	4	50 %	KI-B9
4,87E+01	5	11 %	KI-ND1
4,64E+01	4	34 %	KI-B22

Tabelle 8.8 Identifizierte Untereinheiten der 70% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex I

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
5,30E+10	13	27 %	KI-75kDa
6,20E+08	11	34 %	KI-49kDa
5,81E+07	11	42 %	KI-39kDa
2,50E+06	10	41 %	KI-30kDa
3,51E+03	8	33 %	KI-24kDa
2,77E+03	5	21 %	KI-42kDa
2,70E+03	6	22 %	KI-51kDa
2,61E+03	4	33 %	KI-B17
1,21E+03	5	27 %	KI-PDSW
5,65E+02	3	33 %	KI-B17.2
4,88E+02	5	8 %	KI-ND5
4,51E+02	3	41 %	KI-13Kd-B
2,73E+02	4	25 %	KI-TYKY
7,31E+01	4	20 %	KI-ND1
5,30E+01	3	20 %	KI-ASHI

2,82E+01	3	18 %	KI-PGIV
1,35E+01	3	20 %	KI-B16.6

Tabelle 8.9 Identifizierte Untereinheiten des In-Gel-Verdaus von Komplex I ohne Fraktionierung (Einrotiertes Gesamteluat in 5µl 70% ACN / 0,1 % TFA aufgenommen)

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
3,99E+10	20	33 %	KI-75kD
1,45E+07	18	44 %	KI-49kD
3,64E+06	13	38 %	KI-51kD
7,13E+05	12	48 %	KI-24kD
3,24E+05	11	34 %	KI-39 kD
1,31E+05	10	37 %	KI-30 kD
2,92E+04	11	70 %	KI-B18
1,00E+04	6	58 %	KI-B15
6,35E+03	8	47 %	KI-PDSW
5,38E+03	8	27 %	KI-42 kD
2,78E+03	5	37 %	KI-ASHI
2,67E+02	6	51 %	KI-B17.2
2,12E+03	7	34 %	KI-19 kD (PGIV)
1,92E+03	7	39 %	KI-B14.5b
1.19E+03	8	52 %	KI-B22
1,09E+03	5	43 %	KI-B8
1,05E+03	5	39 %	KI-B16.6
9,11E+02	8	36 %	KI-B14
2,01E+02	3	43 %	KI-B13
2,01E+02	5	28 %	KI-B17
1,31E+02	4	18 %	KI-23 kD (TYKY)
1,22E+02	5	12 %	KI-20 kD (PSST)
1,18E+02	4	20 %	KI-18 kDa (AQDQ)
1,06E+02	4	25 %	KI-SGDH
7,98E+01	4	30 %	KI-B14.5a

Tabelle 8.10 Identifizierte Untereinheiten der 10% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex III

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
5,00E+07	18	27 %	Core Protein I
1,71E+07	14	34 %	Core Protein II
2,76E+03	8	23 %	Cytochrom <i>c</i> ₁
2,04E+03	6	54 %	9,5kDa Protein
1,19E+03	7	21 %	RISP + 8kDa Protein
2,43E+02	5	35 %	13,4kDa Protein

Tabelle 8.11 Identifizierte Untereinheiten der 30% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex III

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
2,40E+08	12	36 %	Core Protein II
4,25E+06	9	43 %	Cytochrom <i>c_I</i>
2,00E+06	15	29 %	Core Protein I
1,78E+04	7	26 %	RISP + 8kDa Protein
4,39E+02	6	46 %	13,4kDa Protein
1,41E+02	3	34 %	9,5kDa Protein

Tabelle 8.12 Identifizierte Untereinheiten der 50% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex III

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
1,92E+09	18	41 %	Core Protein I
7,54E+08	14	49 %	Core Protein II
1,16E+06	8	43 %	Cytochrom <i>c_I</i>
6,72E+05	7	35 %	RISP + 8kDa Protein

Tabelle 8.13 Identifizierte Untereinheiten der 70% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex III

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
3,83E+10	16	51 %	Core Protein II
1,55E+06	12	34 %	Core Protein I
1,36E+04	6	41 %	Cytochrom <i>c_I</i>
7,14E+09	12	41 %	RISP + 8kDa Protein

Tabelle 8.14 Identifizierte Untereinheiten des In-Gel-Verdaus von Komplex III ohne Fraktionierung (Gesamteluat in 5µl 70% ACN / 0,1 % TFA aufgenommen)

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
3,89E+09	23	71 %	Core Protein II
2,22E+09	22	36 %	Core Protein I
5,35E+07	17	67 %	Cytochrom <i>c_I</i>
2,18E+05	11	44 %	RISP + 8kDa Protein
7,78E+02	7	54 %	9,5kDa Protein
1,40E+02	3	51 %	7,2kDa Protein

Tabelle 8.15 Identifizierte Untereinheiten des In-Gel-Verdaus von Komplex IV ohne Fraktionierung
(Gesamteluat in 5µl 70% ACN / 0,1 % TFA aufgenommen)

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
7,31E+05	12	55 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase IV
7,03E+05	9	26 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase II
7,68E+03	7	71 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Va
2,58E+03	4	51 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIa
2,20E+02	3	33 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Vb
1,80E+02	4	40 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIb
9,80E+01	3	38 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIIa
6,10E+01	3	21 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIc

Tabelle 8.16 Identifizierte Untereinheiten der 10% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex IV

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
7,02E+04	13	40 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase IV-1
1,83E+03	6	59 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Vb
7,45E+02	5	41 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIb
6,85E+02	9	53 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIc
2,16E+02	4	28 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Va
1,06E+02	4	41 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIIa
3,52E+01	4	10 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase II
7,02E+01	3	7 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase I

Tabelle 8.17 Identifizierte Untereinheiten der 30% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex IV

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
2,52E+04	9	44 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase IV-1
6,40E+03	6	54 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIc
1,68E+03	5	14 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase II
9,73E+02	3	42 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIa
4,11E+02	3	23 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Va
1,80E+02	4	40 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIb
1,73E+02	3	38 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIIa

Tabelle 8.18 Identifizierte Untereinheiten der 70% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex IV

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
3,15E+04	8	40 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase II
1,33E+03	5	29 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase IV-1
9,73E+02	3	42 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIa
4,11E+02	5	51 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Va

Tabelle 8.19 Identifizierte Untereinheiten des In-Gel-Verdaus von Komplex V ohne Fraktionierung (Gesamteluat in 5µl 70% ACN / 0,1 % TFA aufgenommen)

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
6,29E+18	32	69 %	ATP Synthase β Untereinheit
1,48E+15	28	50 %	ATP Synthase α Untereinheit (Herz)
2,15E+08	16	45 %	ATP Synthase α Untereinheit (Leber)
1,88E+04	7	45 %	ATP Synthase D Untereinheit
7,66E+03	7	39 %	ATP Synthase OSCP- Untereinheit
3,81E+03	9	34 %	ATP Synthase B Untereinheit
4,02E+02	5	60 %	ATP Synthase f Untereinheit
3,48E+02	10	37 %	ATP Synthase γ Untereinheit
1,10E+02	4	38 %	ATP Synthase e Untereinheit

Tabelle 8.20 Identifizierte Untereinheiten der 10% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex V

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
1,66E+20	36	73 %	ATP Synthase β Untereinheit
1,99E+17	33	54 %	ATP Synthase α Untereinheit (Herz)
3,70E+10	22	47 %	ATP Synthase α Untereinheit (Leber)
4,79E+05	9	49 %	ATP Synthase D Untereinheit
1,19e+05	11	40 %	ATP Synthase B Untereinheit
8,81E+03	8	42 %	ATP Synthase (OSCP) Untereinheit
3,67e+02	6	19 %	ATP Synthase γ Untereinheit
1,10E+02	4	38 %	ATP Synthase e Untereinheit
1,05E+02	3	36 %	ATP Synthase Protein 8

Tabelle 8.21 Identifizierte Untereinheiten der 30% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex V

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
3,41E+19	35	72%	ATP Synthase β Untereinheit
5,71E+12	22	45%	ATP Synthase α Untereinheit, Herz

2,51E+07	14	42%	ATP Synthase α Untereinheit, Leber
4,26E+04	6	45%	ATP Synthase D Untereinheit
1,44E+04	6	31%	ATP Synthase (OSCP) Untereinheit
1,25E+03	8	33%	ATP Synthase γ Untereinheit
5,71E+02	6	21%	ATP Synthase B Untereinheit
4,02E+02	5	60%	ATP Synthase f Untereinheit
3,33E+02	5	54%	ATP Synthase g Untereinheit

Tabelle 8.22 Identifizierte Untereinheiten der 50% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex V

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
2,63E+16	30	77%	ATP Synthase β Untereinheit
4,15E+09	17	42%	ATP Synthase α Untereinheit (Herz)
4,36E+05	11	41%	ATP Synthase α Untereinheit (Leber)
1,91E+04	5	29%	ATP Synthase D Untereinheit
6,01E+03	6	34%	ATP Synthase (OSCP) Untereinheit
2,18E+03	7	28%	ATP Synthase B Untereinheit
8,44E+02	6	34%	ATP Synthase γ Untereinheit
4,02E+02	4	51%	ATP Synthase f Untereinheit
7,18E+01	3	36%	ATP Synthase Protein 8 Untereinheit

Tabelle 8.23 Identifizierte Untereinheiten der 70% ACN/0,1% TFA-Fraktion des In-Gel-Verdaus von Komplex V

MOWSE-Score	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
2,23E+16	31	75 %	ATP Synthase β Untereinheit
4,17E+13	22	47 %	ATP Synthase α Untereinheit (Herz)
4,14E+07	13	37 %	ATP Synthase α Untereinheit (Leber)
1,59E+03	3	21 %	ATP Synthase D Untereinheit
4,72E+02	3	23 %	ATP Synthase (OSCP) Untereinheit
4,02E+02	4	51 %	ATP Synthase f Untereinheit
2,53E+02	4	15 %	ATP Synthase B Untereinheit
2,16E+02	5	27 %	ATP Synthase γ Untereinheit
16,1E+02	3	34 %	ATP Synthase g Untereinheit

Tabelle 8.24 Mittels LC-ESI/MS/MS identifizierte Untereinheiten des Komplex I

Score ¹⁾	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
301,43	19	40 %	75 kDa
230,09	16	46 %	51 kDa
126,97	9	24 %	49 kDa
123,66	7	32 %	30 kDa
61,22	5	18 %	24 kDa
7,23	1	16 %	15 kDa
58,27	4	20 %	PSST
47,28	3	19 %	TYKY
138,84	9	33 %	42 kDa
169,7	11	33 %	39 kDa
95,88	6	60 %	13 kDa
34,35	2	14 %	ASHI
22,17	2	19 %	ESSS
106,31	7	46 %	PDSW
41,04	2	16 %	PGIV
20,8	2	14 %	SDAP
14,89	2	12 %	SGDH
38,87	3	15 %	B22
48,79	3	30 %	B18
15,62	1	7 %	B17
54,9	4	35 %	B17.2
94,09	8	53 %	B16.6
71,47	5	56 %	B15
66,68	5	43 %	B14.7
96,30	7	63 %	B14.5a
44,78	3	27 %	B14.5b
48,2	3	27 %	B14
25,70	2	15 %	B12
46,70	3	34 %	B8
39,22	3	11 %	ND1
9,59	1	2 %	ND2
12,32	1	13 %	ND3
18,82	2	4 %	ND4
17,05	1	1 %	ND5
30,94	2	26 %	MLRQ ⁺

¹⁾Spectrum Mill Score (Fandiño *et al.* (2005)) ⁺ in Komplex III+IV-Bande gefunden

Tabelle 8.25 Mittels LC-ESI/MS/MS identifizierte Untereinheiten des Komplex III

Score ¹⁾	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
537,11	32	66 %	Core Protein I
412,67	24	55 %	Core Protein II
16,88	1	2 %	Cytochrom <i>b</i>
214,72	14	69 %	Cytochrom <i>c_I</i>
192,94	11	59 %	RISP + 8kDa Protein
99,51	8	52 %	13,4 kDa Protein
57,61	4	38 %	9,5 kDa Protein
65,48	4	76 %	9,2 kDa Protein
31,53	2	38 %	7,2 kDa Protein

¹⁾Spectrum Mill Score (Fandiño *et al.* (2005))

Tabelle 8.26 Mittels LC-ESI/MS/MS identifizierte Untereinheiten des Komplex IV

Score ¹⁾	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
24,17	2	6 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase I
35,10	2	11 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase II
8,06	1	5 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase III
59,94	5	31 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase IV
61,04	4	37 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Va
58,22	4	47 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Vb
12,65	1	11 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIa
64,38	4	53 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIb
24,16	2	21 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIc
31,44	2	28 %	Cytochrom <i>c</i> Oxidase VIIa

¹⁾Spectrum Mill Score (Fandiño *et al.* (2005))

Tabelle 8.27 Mittels LC-ESI/MS/MS identifizierte Untereinheiten des Komplex V

Score ¹⁾	Anzahl der Peptide	Sequenzabdeckung	Protein
398,72	22	64 %	ATP Synthase β Untereinheit
332,07	19	44 %	ATP Synthase α Untereinheit
105,95	8	36 %	ATP Synthase b Untereinheit
63,26	4	21 %	ATP Synthase c Untereinheit
25,83	2	35 %	ATP Synthase e Untereinheit
76,05	5	35 %	ATP Synthase d Untereinheit
62,75	5	25 %	ATP Synthase γ Untereinheit
55,83	4	25 %	ATP Synthase OSCP- Untereinheit
55,39	3	32 %	ATP Synthase coupling factor 6
41,19	2	27 %	ATP Synthase f Untereinheit

39,72	3	41 %	ATP Synthase γ Untereinheit
27,93	2	13 %	ATP Synthase δ Untereinheit
22,00	1	6 %	ATP Synthase Untereinheit 6
19,76	1	19 %	ATP Synthase Untereinheit 8 ¹⁾

¹⁾Spectrum Mill Score (Fandiño *et al.* (2005)) ⁺ wurde in der Komplex III Bande identifiziert

9 Literaturverzeichnis

- Abdrakhmanova, A., V. Zickermann, M. Bostina, M. Radermacher, H. Schägger, S. Kerscher, and U. Brandt (2004). Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* **1658**, 148-56.
- Ablonczy, Z., M. Kono, R.K. Crouch, and D.R. Knapp (2001). Mass spectrometric analysis of integral membrane proteins at the subnanomolar level: application to recombinant photopigments. *Anal Chem* **73**, 4774-9.
- Acin-Perez, R., M.P. Bayona-Bafaluy, P. Fernandez-Silva, R. Moreno-Loshuertos, A. Perez-Martos, C. Bruno, C.T. Moraes, and J.A. Enriquez (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* **13**, 805-15.
- Aebersold, R. and D.R. Goodlett (2001). Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* **101**, 269-95.
- Aebersold, R. and M. Mann (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207.
- Aivaliotis, M., C. Corvey, I. Tsirogianni, M. Karas, and G. Tsiotis (2004). Membrane proteome analysis of the green-sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Electrophoresis* **25**, 3468-74.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R.A. Stuart, and H. Schägger (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *Embo J* **17**, 7170-8.
- Bauer, A. and B. Kuster (2003). Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem* **270**, 570-8.
- Beavis, R.C. and R.T. Chait (1989). Cinnamic acid Derivatives as Matrices for UV-Laser Desorption Mass Spectrometry of Proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2**, 432-435.
- Beavis, R.C., T. Chaudhary, and B.T. Chait (1992). α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid as a matrix for Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **27**, 156-158.
- Bianchi, C., M.L. Genova, G. Parenti Castelli, and G. Lenaz (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* **279**, 36562-9.
- Bigelow, H.R., D.S. Petrey, J. Liu, D. Przybylski, and B. Rost (2004). Predicting transmembrane beta-barrels in proteomes. *Nucleic Acids Res* **32**, 2566-77.

- Blonder, J., M.B. Goshe, R.J. Moore, L. Pasa-Tolic, C.D. Masselon, M.S. Lipton, and R.D. Smith (2002). Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* **1**, 351-60.
- Blonder, J., A. Terunuma, T.P. Conrads, K.C. Chan, C. Yee, D.A. Lucas, C.F. Schaefer, L.R. Yu, H.J. Issaq, T.D. Veenstra, and J.C. Vogel (2004a). A proteomic characterization of the plasma membrane of human epidermis by high-throughput mass spectrometry. *J Invest Dermatol* **123**, 691-9.
- Blonder, J., T.P. Conrads, L.R. Yu, A. Terunuma, G.M. Janini, H.J. Issaq, J.C. Vogel, and T.D. Veenstra (2004b). A detergent- and cyanogen bromide-free method for integral membrane proteomics: application to Halobacterium purple membranes and the human epidermal membrane proteome. *Proteomics* **4**, 31-45.
- Blonder, J., M.B. Goshe, W. Xiao, D.G. Camp, 2nd, M. Wingerd, R.W. Davis, and R.D. Smith (2004c). Global analysis of the membrane subproteome of Pseudomonas aeruginosa using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* **3**, 434-44.
- Blonder, J., M.L. Hale, D.A. Lucas, C.F. Schaefer, L.R. Yu, T.P. Conrads, H.J. Issaq, B.G. Stiles, and T.D. Veenstra (2004d). Proteomic analysis of detergent-resistant membrane rafts. *Electrophoresis* **25**, 1307-18.
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* **256**, 1604-7.
- Borner, G.H., D.J. Sherrier, T. Weimar, L.V. Michaelson, N.D. Hawkins, A. Macaskill, J.A. Napier, M.H. Beale, K.S. Lilley, and P. Dupree (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* **137**, 104-16.
- Breaux, G.A., K.B. Green-Church, A. France, and P.A. Limbach (2000). Surfactant-aided, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of hydrophobic and hydrophilic peptides. *Anal Chem* **72**, 1169-74.
- Brookes, P.S., A. Pinner, A. Ramachandran, L. Coward, S. Barnes, H. Kim, and V.M. Darley-Usmar (2002). High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of mitochondria and signaling complexes. *Proteomics* **2**, 969-77.
- Burrows, P.A., L.A. Sazanov, Z. Svab, P. Maliga, and P.J. Nixon (1998). Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid ndh genes. *Embo J* **17**, 868-76.

- Cadene, M. and B.T. Chait (2000). A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins. *Anal Chem* **72**, 5655-8.
- Camacho-Carvajal, M.M., B. Wollscheid, R. Aebersold, V. Steimle, and W.W. Schamel (2004). Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* **3**, 176-82.
- Carroll, J., I.M. Fearnley, R.J. Shannon, J. Hirst, and J.E. Walker (2003). Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* **2**, 117-26.
- Chamrad, D.C., G. Korting, K. Stuhler, H.E. Meyer, J. Klose, and M. Bluggel (2004). Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. *Proteomics* **4**, 619-28.
- Chepuri, V. and R.B. Gennis (1990). The use of gene fusions to determine the topology of all of the subunits of the cytochrome o terminal oxidase complex of Escherichia coli. *J Biol Chem* **265**, 12978-86.
- Chernushevich, I.V., A.V. Loboda, and B.A. Thomson (2001). An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **36**, 849-65.
- Chevallet, M., V. Santoni, A. Poinas, D. Rouquie, A. Fuchs, S. Kieffer, M. Rossignol, J. Lunardi, J. Garin, and T. Rabilloud (1998). New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 1901-9.
- Claeys, D., K. Geering, and B.J. Meyer (2005). Two-dimensional Blue Native/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for analysis of multimeric proteins in platelets. *Electrophoresis* **26**, 1189-1199.
- Clauser, K.R. (1996). ProteinProspector. *44th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Portland, USA*.
- Corthals, G.L., V.C. Wasinger, D.F. Hochstrasser, and J.C. Sanchez (2000). The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* **21**, 1104-15.
- Coughenour, H.D., R.S. Spaulding, and C.M. Thompson (2004). The synaptic vesicle proteome: a comparative study in membrane protein identification. *Proteomics* **4**, 3141-55.
- Cristoni, S. and L.R. Bernardi (2003). Development of new methodologies for the mass spectrometry study of bioorganic macromolecules. *Mass Spectrom Rev* **22**, 369-406.

- de Hoog, C.L. and M. Mann (2004). Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **5**, 267-93.
- De Moreno, M.R., J.F. Smith, and R.V. Smith (1985). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. *Anal Biochem* **151**, 466-70.
- Devreese, B., F. Vanrobaeys, J. Smet, J. Van Beeumen, and R. Van Coster (2002). Mass spectrometric identification of mitochondrial oxidative phosphorylation subunits separated by two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 2525-33.
- Dreger, M., L. Bengtsson, T. Schoneberg, H. Otto, and F. Hucho (2001). Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11943-8.
- Eichacker, L.A., B. Granvogel, O. Mirus, B.C. Muller, C. Miess, and E. Schleiff (2004). Hiding behind hydrophobicity. Transmembrane segments in mass spectrometry. *J Biol Chem* **279**, 50915-22.
- Emmett, M.R. and R.M. Caprioli (1994). Micro-Electrospray mass spectrometry: Ultrahigh sensitivity analysis of peptides and proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 605-613.
- Eubel, H., L. Jansch, and H.P. Braun (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* **133**, 274-86.
- Eubel, H., J. Heinemeyer, and H.P. Braun (2004). Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol* **134**, 1450-9.
- Fandiño, A., I. Rais, M. Vollmer, H. Elgass, H. Schägger, and M. Karas (2005). LC-nanospray-MS/MS analysis of hydrophobic proteins from membrane protein complexes isolated by blue-native electrophoresis. *J. Mass. Spectrom.*, in press.
- Fenn, J.B., M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
- Ferro, M., D. Seigneurin-Berny, N. Rolland, A. Chapel, D. Salvi, J. Garin, and J. Joyard (2000). Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis* **21**, 3517-26.
- Ferro, M., D. Salvi, H. Riviere-Rolland, T. Vermaat, D. Seigneurin-Berny, D. Grunwald, J. Garin, J. Joyard, and N. Rolland (2002). Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11487-92.

- Fowler, L.R. and S.H. Richardson (1963). Studies on the electron transfer system. L. On the mechanism of reconstitution of the mitochondrial electron transfer system. *J Biol Chem* **238**, 456-63.
- Fricke, B. (1993). Phase separation of nonionic detergents by salt addition and its application to membrane proteins. *Anal Biochem* **212**, 154-9.
- Galeva, N. and M. Altermann (2002). Comparison of one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis as a separation tool for proteomic analysis of rat liver microsomes: cytochromes P450 and other membrane proteins. *Proteomics* **2**, 713-22.
- Gaucher, S.P., S.W. Taylor, E. Fahy, B. Zhang, D.E. Warnock, S.S. Ghosh, and B.W. Gibson (2004). Expanded coverage of the human heart mitochondrial proteome using multidimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* **3**, 495-505.
- Gevaert, K., H. Demol, L. Martens, B. Hoorelbeke, M. Puype, M. Goethals, J. Van Damme, S. De Boeck, and J. Vandekerckhove (2001). Protein identification based on matrix assisted laser desorption/ionization-post source decay-mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**, 1645-51.
- Ghaim, J.B., P.H. Tsatsos, A. Katsonouri, D.M. Mitchell, R. Salcedo-Hernandez, and R.B. Gennis (1997). Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of membrane proteins: demonstration of a simple method to determine subunit molecular weights of hydrophobic subunits. *Biochim Biophys Acta* **1330**, 113-20.
- Gharbi, S., P. Gaffney, A. Yang, M.J. Zvelebil, R. Cramer, M.D. Waterfield, and J.F. Timms (2002). Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol Cell Proteomics* **1**, 91-8.
- Glückmann, M. and M. Karas (1999). The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **34**, 467-477.
- Goodlett, D.R., A. Keller, J.D. Watts, R. Newitt, E.C. Yi, S. Purvine, J.K. Eng, P. von Haller, R. Aebersold, and E. Kolker (2001). Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation. *Rapid Commun Mass Spectrom* **15**, 1214-21.
- Görg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-85.
- Goshe, M.B., J. Blonder, and R.D. Smith (2003). Affinity labeling of highly hydrophobic integral membrane proteins for proteome-wide analysis. *J Proteome Res* **2**, 153-61.

- Gygi, S.P., B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, and R. Aebersold (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-9.
- Hager, J.W. (2004). Recent trends in mass spectrometer development. *Anal Bioanal Chem* **378**, 845-50.
- Han, D.K., J. Eng, H. Zhou, and R. Aebersold (2001). Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **19**, 946-51.
- Han, J. and K.L. Schey (2004). Proteolysis and mass spectrometric analysis of an integral membrane: aquaporin 0. *J Proteome Res* **3**, 807-12.
- Hanson, B.J., B. Schulenberg, W.F. Patton, and R.A. Capaldi (2001). A novel subfractionation approach for mitochondrial proteins: a three-dimensional mitochondrial proteome map. *Electrophoresis* **22**, 950-9.
- Harder, A., R. Wildgruber, A. Nawrocki, S.J. Fey, P.M. Larsen, and A. Gorg (1999). Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 826-9.
- Hartinger, J., K. Stenius, D. Hogemann, and R. Jahn (1996). 16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal Biochem* **240**, 126-33.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* **54**, 1015-69.
- Hixson, K.K., N. Rodriguez, D.G. Camp, 2nd, E.F. Strittmatter, M.S. Lipton, and R.D. Smith (2002). Evaluation of enzymatic digestion and liquid chromatography-mass spectrometry peptide mapping of the integral membrane protein bacteriorhodopsin. *Electrophoresis* **23**, 3224-32.
- Hopkins, A.L. and C.R. Groom (2002). The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 727-30.
- Howell, K.E. and G.E. Palade (1982). Hepatic Golgi fractions resolved into membrane and content subfractions. *J Cell Biol* **92**, 822-32.
- Huber, C.G., W. Walcher, A.M. Timperio, S. Troiani, A. Porceddu, and L. Zolla (2004). Multidimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography-mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 3909-20.

- Hunte, C., H. Schägger, and G. von Jagow (2003). A Practical Guide to Membrane Protein Purification. *Academic Press London*.
- Iwata, S., J.W. Lee, K. Okada, J.K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T.A. Link, S. Ramaswamy, and B.K. Jap (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science* **281**, 64-71.
- Jansch, L., V. Kruft, U.K. Schmitz, and H.P. Braun (1996). New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J* **9**, 357-68.
- Jones, M.N. (1999). Surfactants in membrane solubilisation. *Int J Pharm* **177**, 137-59.
- Julka, S. and F. Regnier (2004). Quantification in proteomics through stable isotope coding: a review. *J Proteome Res* **3**, 350-63.
- Kadenbach, B., J. Jarausch, R. Hartmann, and P. Merle (1983). Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal Biochem* **129**, 517-21.
- Karas, M., D. Bachmann, and F. Hillenkamp (1985). Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal Chem* **57**, 2935-2939.
- Karas, M., D. Bachmann, U. Bahr, and F. Hillenkamp (1987). Matrix-assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-volatile Compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **78**, 53-68.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**, 2299-301.
- Karas, M., M. Gluckmann, and J. Schafer (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* **35**, 1-12.
- Katayama, H., T. Tabata, Y. Ishihama, T. Sato, Y. Oda, and T. Nagasu (2004). Efficient in-gel digestion procedure using 5-cyclohexyl-1-pentyl-beta-D-maltoside as an additive for gel-based membrane proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 2388-94.
- Katta, V., D.T. Chow, and M.F. Rohde (1998). Applications of in-source fragmentation of protein ions for direct sequence analysis by delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* **70**, 4410-6.
- Kaufmann, R., B. Spengler, and F. Lutzenkirchen (1993). Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer

- using matrix-assisted laser desorption ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* **7**, 902-10.
- Klein, C., C. Garcia-Rizo, B. Bisle, B. Scheffer, H. Zischka, F. Pfeiffer, F. Siedler, and D. Oesterhelt (2004). The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics* **5**, 180-197.
- Kraft, P., J. Mills, and E. Dratz (2001). Mass spectrometric analysis of cyanogen bromide fragments of integral membrane proteins at the picomole level: application to rhodopsin. *Anal Biochem* **292**, 76-86.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E.L. Sonnhammer (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-80.
- Kuhn, K., A. Thompson, T. Prinz, J. Muller, C. Baumann, G. Schmidt, T. Neumann, and C. Hamon (2003). Isolation of N-terminal protein sequence tags from cyanogen bromide cleaved proteins as a novel approach to investigate hydrophobic proteins. *J Proteome Res* **2**, 598-609.
- Kuhn, R. and H. Wagner (1989). Free flow electrophoresis as a method for the purification of enzymes from *E. coli* cell extract. *Electrophoresis* **10**, 165-72.
- Kyte, J. and R.F. Doolittle (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-32.
- Lamond, A.I. and W.C. Earnshaw (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* **280**, 547-53.
- Langen, H., B. Takacs, S. Evers, P. Berndt, H.W. Lahm, B. Wipf, C. Gray, and M. Fountoulakis (2000). Two-dimensional map of the proteome of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis* **21**, 411-29.
- Lasonder, E., Y. Ishihama, J.S. Andersen, A.M. Vermunt, A. Pain, R.W. Sauerwein, W.M. Eling, N. Hall, A.P. Waters, H.G. Stunnenberg, and M. Mann (2002). Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature* **419**, 537-42.
- Lehner, I., M. Niehof, and J. Borlak (2003). An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. *Electrophoresis* **24**, 1795-808.
- Lescuyer, P., J.M. Strub, S. Luche, H. Diemer, P. Martinez, A. Van Dorsselaer, J. Lunardi, and T. Rabilloud (2003). Progress in the definition of a reference human mitochondrial proteome. *Proteomics* **3**, 157-67.

- Lill, J. (2003). Proteomic tools for quantitation by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **22**, 182-94.
- Link, A.J., J. Eng, D.M. Schieltz, E. Carmack, G.J. Mize, D.R. Morris, B.M. Garvik, and J.R. Yates, 3rd (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **17**, 676-82.
- Loo, J.A. (1997). Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* **16**, 1-23.
- Loo, R.R., N. Dales, and P.C. Andrews (1994). Surfactant effects on protein structure examined by electrospray ionization mass spectrometry. *Protein Sci* **3**, 1975-83.
- Luche, S., V. Santoni, and T. Rabilloud (2003). Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3**, 249-53.
- Ludwig, B., L. Prochaska, and R.A. Capaldi (1980). Arrangement of oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase in the mitochondrial inner membrane. *Biochemistry* **19**, 1516-23.
- Macko, V. and H. Stegemann (1970). Free electrofocusing in a coil of polyethylene tubing. *Anal Biochem* **37**, 186-90.
- Manabe, T. (2000). Combination of electrophoretic techniques for comprehensive analysis of complex protein systems. *Electrophoresis* **21**, 1116-22.
- Mann, M. and M. Wilm (1994). Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem* **66**, 4390-9.
- Mann, M. and O.N. Jensen (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**, 255-61.
- Marres, C.M. and E.C. Slater (1977). Polypeptide composition of purified QH2:cytochrome c oxidoreductase from beef-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **462**, 531-48.
- Marx, M.K., F. Mayer-Posner, T. Soulimane, and G. Buse (1998). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis and thiol-group determination of isoforms of bovine cytochrome c oxidase, a hydrophobic multisubunit membrane protein. *Anal Biochem* **256**, 192-9.
- Medzihradszky, K.F., J.M. Campbell, M.A. Baldwin, A.M. Falick, P. Juhasz, M.L. Vestal, and A.L. Burlingame (2000). The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* **72**, 552-8.

- Meier, T. and P. Dimroth (2002). Intersubunit bridging by Na⁺ ions as a rationale for the unusual stability of the c-rings of Na⁺-translocating F1F0 ATP synthases. *EMBO Rep* **3**, 1094-8.
- Moller, S., M.D. Croning, and R. Apweiler (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **17**, 646-53.
- Molloy, M.P. (2000). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem* **280**, 1-10.
- Molloy, M.P., B.R. Herbert, M.B. Slade, T. Rabilloud, A.S. Nouwens, K.L. Williams, and A.A. Gooley (2000). Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane. *Eur J Biochem* **267**, 2871-81.
- Molloy, M.P., N.D. Phadke, J.R. Maddock, and P.C. Andrews (2001). Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis* **22**, 1686-96.
- Molloy, M.P., N.D. Phadke, H. Chen, R. Tyldesley, D.E. Garfin, J.R. Maddock, and P.C. Andrews (2002). Profiling the alkaline membrane proteome of Caulobacter crescentus with two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **2**, 899-910.
- Musatov, A. and N.C. Robinson (1994). Subunit analysis of bovine cytochrome bc1 by reverse-phase HPLC and determination of the subunit molecular masses by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* **33**, 10561-7.
- Navarre, C., H. Degand, K.L. Bennett, J.S. Crawford, E. Mortz, and M. Boutry (2002). Subproteomics: identification of plasma membrane proteins from the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Proteomics* **2**, 1706-14.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **10**, 4007-4021.
- Olsen, J.V., S.E. Ong, and M. Mann (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* **3**, 608-14.
- Pappin, D.J., P. Hojrup, and A.J. Bleasby (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* **3**, 327-32.
- Patterson, S.D. and R.H. Aebersold (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* **33 Suppl**, 311-23.
- Pedersen, S.K., J.L. Harry, L. Sebastian, J. Baker, M.D. Traini, J.T. McCarthy, A. Manoharan, M.R. Wilkins, A.A. Gooley, P.G. Righetti, N.H. Packer, K.L. Williams, and B.R. Herbert (2003). Unseen proteome: mining below the tip of the iceberg to find low abundance and membrane proteins. *J Proteome Res* **2**, 303-11.

- Peltier, J.B., G. Friso, D.E. Kalume, P. Roepstorff, F. Nilsson, I. Adamska, and K.J. van Wijk (2000). Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* **12**, 319-41.
- Perkins, D.N., D.J. Pappin, D.M. Creasy, and J.S. Cottrell (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-67.
- Pieles, U., W. Zürcher, M. Schär, and H.E. Moser (1993). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **21**, 3191-3196.
- Poehling, H. and V. Neuhoff (1981). Visualization of proteins with a silver stain: a critical analysis. *Electrophoresis* **2**, 141-147.
- Prinz, T., J. Muller, K. Kuhn, J. Schafer, A. Thompson, J. Schwarz, and C. Hamon (2004). Characterization of low abundant membrane proteins using the protein sequence tag technology. *J Proteome Res* **3**, 1073-81.
- Quach, T.T., N. Li, D.P. Richards, J. Zheng, B.O. Keller, and L. Li (2003). Development and applications of in-gel CNBr/tryptic digestion combined with mass spectrometry for the analysis of membrane proteins. *J Proteome Res* **2**, 543-52.
- Rabilloud, T. (2003). Membrane proteins ride shotgun. *Nat Biotechnol* **21**, 508-10.
- Ragan, C.I. and C. Heron (1978). The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Evidence for stoichiometric association. *Biochem J* **174**, 783-90.
- Reinders, J., U. Lewandrowski, J. Moebius, Y. Wagner, and A. Sickmann (2004). Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics* **4**, 3686-703.
- Rexroth, S., J.M. Meyer zu Tittingdorf, F. Krause, N.A. Dencher, and H. Seelert (2003). Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis* **24**, 2814-23.
- Reynolds, J.A. and C. Tanford (1970a). Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**, 1002-7.
- Reynolds, J.A. and C. Tanford (1970b). The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J Biol Chem* **245**, 5161-5.
- Robinson, B.H. (1998). Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 271-86.

- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**, 601.
- Rosinke, B., K. Strupat, F. Hillenkamp, J. Rosenbusch, N. Dencher, U. Krüger, and H.J. Galla (1995). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) of Membrane Proteins and Non-covalent Complexes. *Journal of Mass Spectrometry* **30**, 1462-1468.
- Santoni, V., T. Rabilloud, P. Doumas, D. Rouquie, M. Mansion, S. Kieffer, J. Garin, and M. Rossignol (1999). Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* **20**, 705-11.
- Santoni, V., M. Molloy, and T. Rabilloud (2000). Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21**, 1054-70.
- Schägger, H., T.A. Link, W.D. Engel, and G. von Jagow (1986). Isolation of the eleven protein subunits of the bcl complex from beef heart. *Methods Enzymol* **126**, 224-37.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-31.
- Schägger, H., W.A. Cramer, and G. von Jagow (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**, 220-30.
- Schägger, H., U. Brandt, S. Gencic, and G. von Jagow (1995). Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Methods Enzymol* **260**, 82-96.
- Schägger, H. and K. Pfeiffer (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* **19**, 1777-83.
- Schägger, H. (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* **52**, 119-28.
- Schägger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1555**, 154-9.
- Schägger, H., R. de Coo, M.F. Bauer, S. Hofmann, C. Godinot, and U. Brandt (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* **279**, 36349-53.
- Schapira, A.H. (1998). Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 261-70.

- Schilling, B., M.M.S. Bharath, R.H. Row, J. Murray, M.P. Cusack, R.A. Capaldi, C.R. Freed, K.N. Prasad, J.K. Andersen, and B.W. Gibson (2005). Rapid Purification and Mass Spectrometric Characterization of Mitochondrial NADH Dehydrogenase (Complex I) from Rodent Brain and a Dopaminergic Neuronal Cell Line. *Mol Cell Proteomics* **4**, 84-96.
- Schirle, M., M.A. Heurtier, and B. Kuster (2003). Profiling Core Proteomes of Human Cell Lines by One-dimensional PAGE and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1297-305.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann (1996a). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-8.
- Shevchenko, A., O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, H. Boucherie, and M. Mann (1996b). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14440-5.
- Shevchenko, A., M. Wilm, and M. Mann (1997). Peptide sequencing by mass spectrometry for homology searches and cloning of genes. *J Protein Chem* **16**, 481-90.
- Sickmann, A., J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H.E. Meyer, B. Schonfisch, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, P. Rehling, N. Pfanner, and C. Meisinger (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13207-12.
- Simpson, R.J., L.M. Connolly, J.S. Eddes, J.J. Pereira, R.L. Moritz, and G.E. Reid (2000). Proteomic analysis of the human colon carcinoma cell line (LIM 1215): development of a membrane protein database. *Electrophoresis* **21**, 1707-32.
- Smith, A.L. (1967). Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria: Slaughterhouse material, small scale. *Methods in Enzymology* **10**, 81-86.
- Smolka, M., H. Zhou, and R. Aebersold (2002). Quantitative protein profiling using two-dimensional gel electrophoresis, isotope-coded affinity tag labeling, and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **1**, 19-29.
- Soskic, V. and J. Godovac-Zimmermann (2001). Improvement of an in-gel tryptic digestion method for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry peptide mapping by use of volatile solubilizing agents. *Proteomics* **1**, 1364-7.

- Spengler, B., D. Kirsch, and R. Kaufmann (1992). Fundamental Aspects of Postsource Decay in Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Journal of Physical Chemistry* **24**, 9678-9683.
- Spengler, B. (1997). Post-source Decay Analysis in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules. *J Mass Spectrom* **32**, 1019-1036.
- Spivey, H.O. and J. Ovadi (1999). Substrate channeling. *Methods* **19**, 306-21.
- Stafford, G.C., P.E. Kelley, J.E.P. Syka, W.E. Reynolds, and J.F.J. Todd (1984). Recent improvements in analytical applications of advanced ion trap technology. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **60**, 85-98.
- Stasyk, T. and L.A. Huber (2004). Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* **4**, 3704-16.
- Stroh, A., O. Anderka, K. Pfeiffer, T. Yagi, M. Finel, B. Ludwig, and H. Schägger (2004). Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* **279**, 5000-7.
- Strupat, K., M. Karas, and F. Hillenkamp (1991). 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **111**, 89-102.
- Sun, G., M.T. Kinter, and V.E. Anderson (2003). Mass spectrometric characterization of mitochondrial electron transport complexes: subunits of the rat heart ubiquinol-cytochrome c reductase. *J Mass Spectrom* **38**, 531-9.
- Swank, R.T. and K.D. Munkres (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* **39**, 462-77.
- Taranenko, N.I., K. Tang, S.L. Allman, L.Y. Ch'ang, and C.H. Chen (1994). 3-Aminopicolinic acid as a matrix for laser desorption mass spectrometry of biopolymers. *Rapid Commun Mass Spectrom* **8**, 1001-6.
- Taylor, R.S., C.C. Wu, L.G. Hays, J.K. Eng, J.R. Yates, 3rd, and K.E. Howell (2000). Proteomics of rat liver Golgi complex: minor proteins are identified through sequential fractionation. *Electrophoresis* **21**, 3441-59.
- Taylor, S.W., D.E. Warnock, G.M. Glenn, B. Zhang, E. Fahy, S.P. Gaucher, R.A. Capaldi, B.W. Gibson, and S.S. Ghosh (2002). An alternative strategy to determine the mitochondrial proteome using sucrose gradient fractionation and 1D PAGE on highly purified human heart mitochondria. *J Proteome Res* **1**, 451-8.

- Taylor, S.W., E. Fahy, B. Zhang, G.M. Glenn, D.E. Warnock, S. Wiley, A.N. Murphy, S.P. Gaucher, R.A. Capaldi, B.W. Gibson, and S.S. Ghosh (2003). Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* **21**, 281-6.
- Unlu, M., M.E. Morgan, and J.S. Minden (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-7.
- van Montfort, B.A., B. Canas, R. Duurkens, J. Godovac-Zimmermann, and G.T. Robillard (2002). Improved in-gel approaches to generate peptide maps of integral membrane proteins with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **37**, 322-30.
- Walker, J.E., R. Lutter, A. Dupuis, and M.J. Runswick (1991). Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* **30**, 5369-78.
- Wallin, E. and G. von Heijne (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* **7**, 1029-38.
- Washburn, M.P., D. Wolters, and J.R. Yates, 3rd (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**, 242-7.
- Washburn, M.P., R.R. Ulaszek, and J.R. Yates, 3rd (2003). Reproducibility of quantitative proteomic analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology. *Anal Chem* **75**, 5054-61.
- Weber, K. and M. Osborn (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**, 4406-12.
- Weidner, U., S. Geier, A. Ptock, T. Friedrich, H. Leif, and H. Weiss (1993). The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. *J Mol Biol* **233**, 109-22.
- Westermann, B. and W. Neupert (2003). 'Omics' of the mitochondrion. *Nat Biotechnol* **21**, 239-40.
- Whitelegge, J.P., C.B. Gundersen, and K.F. Faull (1998). Electrospray-ionization mass spectrometry of intact intrinsic membrane proteins. *Protein Sci* **7**, 1423-30.
- Wilkins, M.R., C. Pasquali, R.D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J.C. Sanchez, J.X. Yan, A.A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K.L. Williams, and D.F. Hochstrasser (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* **14**, 61-5.

- Wilkins, M.R., E. Gasteiger, J.C. Sanchez, A. Bairoch, and D.F. Hochstrasser (1998). Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* **19**, 1501-5.
- Wilm, M. and M. Mann (1996). Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* **68**, 1-8.
- Wu, C.C., M.J. MacCoss, K.E. Howell, and J.R. Yates, 3rd (2003a). A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat Biotechnol* **21**, 532-8.
- Wu, C.C. and J.R. Yates, 3rd (2003b). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol* **21**, 262-7.
- Yates, J.R., 3rd (2004). Mass spectral analysis in proteomics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 297-316.
- Zhao, Y., W. Zhang, and Y. Kho (2004). Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins. *Anal Chem* **76**, 1817-23.
- Zhou, G., H. Li, D. DeCamp, S. Chen, H. Shu, Y. Gong, M. Flaig, J.W. Gillespie, N. Hu, P.R. Taylor, M.R. Emmert-Buck, L.A. Liotta, E.F. Petricoin, 3rd, and Y. Zhao (2002). 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol Cell Proteomics* **1**, 117-24.
- Zischka, H., C.J. Gloeckner, C. Klein, S. Willmann, M. Swiatek-de Lange, and M. Ueffing (2004). Improved mass spectrometric identification of gel-separated hydrophobic membrane proteins after sodium dodecyl sulfate removal by ion-pair extraction. *Proteomics* **4**, 3776-82.

Publikationen

Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification.

Rais I., Karas M., Schägger H.

Proteomics (2004) 4, 2567-2571

LC-nanospray-MS/MS analysis of hydrophobic proteins from membrane protein complexes isolated by blue-native electrophoresis.

Fandiño, A., Rais, I., Vollmer, M., Elgass, H., Schägger, H., Karas, M.

J. Mass Spectrom. (2005) 40, 1223-1231

Processing of the 24 kDa subunit mitochondrial import signal is not required for assembly of functional complex I in *Yarrowia lipolytica*.

Kerscher, S., Bénit, P., Abdrakhmanova, A., Zwicker, K., Rais, I., Karas, M., Rustin, P. and Brandt, U.

Eur. J. Biochem. (2004) 279, 36349-36353.

Physicochemical characterisation of cationic polybutylcyanoacrylat-nanoparticles by fluorescence correlation spectroscopy.

Weyermann J., Lochmann D., Georgens C., Rais I., Kreuter J., Karas M., Wolkenhauer M., Zimmer A.

Eur J Pharm Biopharm. (2004) 58, 25-35.

Arzneibuchkommentare zum Europäischen Arzneibuch zu den Monographien Amisulprid, Benzalkoniumchlorid, Benzoesäure, Cetylpyridiniumchlorid, Chlorocresol, Enoxolon, Risperidon und Tiaprid Hydrochlorid

Posterpräsentationen und Vorträge

Identification of Membrane Protein Complexes by nanoLC-ESI-MS/MS

Rais, I., Fandiño, A., Vollmer, M., Elgass, H., Karas M.

52th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, USA, 09.06. – 12.06.2004 (Posterbeitrag)

Strategies and steps to improve the tools for membrane proteomics

Rais, I., Schägger, H., Karas, M.

37. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS) Leipzig, Deutschland, 07.03.-10.03.2004 (Vortrag)

dSDS – eine neue Methode zur Identifizierung von Membranproteinkomplexen

Rais, I., Schägger, H., Karas, M.

DPhG-Jahrestagung, Würzburg, 2003 (Vortrag)

New Strategies towards the identification and Characterization of Membrane Proteins from Membrane Protein Supercomplexes

Rais, I., Schägger, H., Karas, M.

51th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, Canada, 09.06. – 12.06.2003 (Posterbeitrag)

Strategies and steps to improve the tools for membrane proteomics

Rais, I., Schägger, H., Karas, M.

36. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS) Münster, Deutschland, 09.03.-12.03.2003 (Posterbeitrag)

Lebenslauf

Persönliche Angaben

- Name: Isam Rais
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 20.09.1973 in Gehrden
- Eltern: Dr. med. Farouk Rais
Brigitte Rais, geb. Walther

Schulbildung

- 1980 – 1984 Grundschule, Bredenbeck
- 1984 – 1986 Orientierungsstufe, Wennigsen
- 1986 – 1993 Matthias-Claudius-Gymnasium, Gehrden
- Mai 1993 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung

- 10/1993 – 10/1997 Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig
- Januar 1999 Approbation zum Apotheker

Wissenschaftlicher Werdegang

- 01/1999 bis 12/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig Maximilian Universität München unter Leitung von Herrn Prof. F. Bracher
- Seit 09/2001 Beginn der Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt unter Leitung von Herrn Prof. M. Karas

Dissertationsthema:

„Neue Strategien zur massenspektrometrischen und gelelektrophoretischen Identifizierung von Membranproteinkomplexen“

Zusatzqualifikationen und Praktika

- 02/2003: Beginn der Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik am Institut für Pharmazeutische Chemie der J. W. Goethe Universität, Frankfurt/Main
- Leitung und Organisation des Praktikums „Quantitative anorganische Analytik“ für Studenten des 2. Semesters Pharmazie an der J. W. Goethe Universität, Frankfurt/Main
- 09/95 bis 11/97 Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Instrumentelle Analytik der TU Braunschweig unter der Leitung von Prof. Görlitzer
- 01.12.1997 bis zum 31.05.1998 Tätigkeit als Pharmaziepraktikant bei Hoechst Marion Roussel in der Abteilung Preclinical Development Analytics, Gruppe Quality Control Drug Products (Frankfurt/Main)
- 01.06.1998 bis zum 30.11.1998 Tätigkeit als Pharmaziepraktikant in der Bredenbecker Apotheke (Wennigsen)

Außeruniversitäre Aktivitäten

- Referent zum Thema „Proteomics in der Bioanalytik“ und „Chiroptische Methoden in der Pharmazeutischen Analytik“ bei Weiterbildungsseminaren der Bayerischen Landesapothekerkammer

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2001 bis Mai 2005 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael Karas angefertigt.

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Karas, möchte ich mich dafür bedanken, die hochinteressante Technik der Massenspektrometrie und der Proteomics-Wissenschaft auch als Pharmazeut kennengelernt und mir im Rahmen des Sonderforschungsbereiches „Functional Membrane Proteomics“ Gelegenheit gegeben zu haben, auf diesem Sektor meine Dissertation anzufertigen. Durch die motivierenden Diskussionen, die hervorragenden experimentellen Arbeitsbedingungen, sowie seine großzügige Unterstützung meiner Arbeit war es mir möglich, weit über die Grenzen der Pharmazie hinauszublicken und mit großem Interesse und viel Freude in diesem interdisziplinären Feld tätig zu sein.

Des weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Hermann Schägger für die Kooperation und die Betreuung während meiner Promotion danken. Durch das gemeinsame Teilprojekt von Prof. Karas und Prof. Schägger im SFB 628 „Functional Membrane Proteomics“ wurde er für mich zu einem zweiten Doktorvater und hat mit seinen Ratschlägen, seiner Erfahrung und seiner steten Diskussionsbereitschaft in hohem Maße zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinem Arbeitskreis, namentlich Frau Dr. Ute Bahr, Frau Dr. Sieglinde Überall, Herrn Dr. Thomas Russ, Marianne André, Sabrina Baltruschat, Tobias Beckhaus, Sandra Bornemann, Carsten Corvey, Jeremy Hack, Martin Hampel, Tri Hoang, Sandra Hofmann, Corina Hunger, Thorsten Jaskolla, Björn Meyer, Eric Schulz und Markus Weidlich sowie Walter Eckhard möchte ich für die erfahrungs- und lehrreiche Zeit am Institut sowie den steten Gedankenaustausch und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Brandt sowie seiner Arbeitsgruppe, im besonderen Dr. Volker Zickermann, Dr. Stefan Kerscher, Dr. Anke Stroh sowie Karin Siegmund danke ich für die angenehme Zusammenarbeit im Rahmen der wissenschaftlichen Kooperationen.

Frau Dr. Anabel Fandiño von der Firma Agilent danke ich für die Kooperation und wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Danksagung

Besonderer Dank geht an meine lieben Kollegen Marianne, Eric und Tri aus dem Zweitsemesterpraktikum, ohne die die Studentenbetreuung nur halb soviel Spaß gemacht hätte.

Christian Bach danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der Gele. Des weiteren bedanke ich mich bei meinem zukünftigen Kollegen Malte Schürken für seine Unterstützung bei der Untersuchung und Bearbeitung der Elektrophoresegele.

Alexander Schreiner und Marco Morciano danke ich für die schöne Zeit während der SFB-Summer-Retreats und die zahlreichen Diskussionen bis spät in die Nacht.

Meinen alten Freunden und Laborkollegen Dr. Wolfram Eisenreich, Dr. Peter Beck, Dr. Hans-Jürgen Krauss, Dr. Dirk Lochmann und Dr. Jörg Weyermann danke ich für die produktive, wie auch erlebnisreiche Zeit inner- und außerhalb des Labors.

Besonderer Dank gebührt meiner Schwester Dr. Mona Rais für die kritische Durchsicht meiner Arbeit sowie für die moralische Unterstützung während meiner Promotion.

Ein ganz herzliches Dankeschön widme ich meinen Eltern, die mir sowohl finanziell, als auch moralisch immer eine Stütze gewesen sind und die auf meinem Weg stets hinter mir standen und meine Entscheidungen jederzeit mitgetragen haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Dissertation über „Neue Strategien zur massenspektrometrischen und gelelektrophoretischen Identifizierung von Membranproteinkomplexen“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 31.05.2005

Isam Rais

