

**Charakterisierung und Identifizierung  
von Membranproteinen  
auf der Ebene von Peptiden**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe – Universität  
in Frankfurt am Main

von Björn Meyer  
aus Hannover

Frankfurt (2007)

(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
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: 23.04.2008

*Für meine Eltern*

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.  
Man muß sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.*

*Johann Wolfgang von Goethe, „Italienreise“ (1787)*

## **Danksagung**

*Wen die Dankbarkeit geniert,*

*Der ist übel dran;*

*Denke, wer dich erst geführt,*

*Wer für dich getan!* (Johann Wolfgang von Goethe)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Karas in der Zeit vom Januar 2003 bis September 2007 angefertigt. Ohne eine Vielzahl weiterer Menschen wäre diese Dissertation aber niemals möglich gewesen. Die folgenden Zeilen sollen versuchen, den Dank an diese Personen in Worte zu fassen, können es aber naturgemäß nur im begrenzten Maße, wie mir beim Verfassen dieser Danksagung immer wieder klar wurde. Oder um es mit einer Frage auszudrücken, die sich ein unbekannter, schlauer Mensch einmal selbst gestellt hat: Warum sind die Worte, die wir für uns selbst schreiben, immer um so vieles besser als die Worte, die wir für andere schreiben?

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Karas danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die gewährte Freiheit bei deren Bearbeitung. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die von ihm zur Verfügung gestellt wurden, und eine stets offene Tür, wenn Probleme zu klären waren, haben zum richtigen Zeitpunkt immer den nötigen Impuls gesetzt, um bei der Bearbeitung des Themas einen Schritt weiterzukommen. Auch die Teilnahme an einer Vielzahl von nationalen und internationalen Tagungen, die durch ihn ermöglicht wurden, haben viele neue Ideen zur Problemlösung geliefert. Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Karas für das Vertrauen und Verständnis, das er mir bei der Bearbeitung zu jeder Zeit entgegengebracht hat. Seine Betreuung mit ruhiger Hand hat entscheidend dazu beigetragen, immer wieder die Motivation zu finden, das schwierige Thema Membranproteine anzugehen.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Hermann Schägger. Die Zusammenarbeit mit Ihm im Rahmen des gemeinsamen Teilprojekts mit Prof. Dr. Michael Karas im SFB 628 „Functional Membrane Proteomics“ hat zu Ergebnissen geführt, die einen großen Teil dieser Arbeit

ausmachen. Ohne seine Erfahrungen auf dem Gebiet der Membranproteine und seinem Know-how auf der gelelektrophoretischen Seite wären die massenspektrometrischen Experimente mit dem Komplex V der mitochondrialen Atmungskette nicht in der Art und Weise möglich gewesen, wie sie in Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Vor allem die entgegengebrachte Geduld, da einige Dinge auf der massenspektrometrischen Seite lange Zeit nicht funktionierten, aber auch die schnelle Reaktion auf Probleme jeglicher Art wird mir immer in guter Erinnerung bleiben. Im Allgemeinen haben die Erfahrungen, die Prof. Dr. Hermann Schägger während der Mitarbeit an diesem Projekt vermittelt hat, einen stark prägenden Eindruck bei mir hinterlassen, wofür ich mich besonders bedanken möchte. Ein großes Dankeschön geht im Zusammenhang mit dem Komplex V-Projekt natürlich ebenfalls an seine Mitarbeiter Dr. Ilka Wittig und Christian Bach. Außerdem möchte ich an dieser Stelle auch dafür danken, dass ich an einem Projekt eines Kooperationspartners von Prof. Dr. Hermann Schägger beteiligt wurde, das die systematische massenspektrometrische Analyse einer unbekanntes Untereinheit von Komplex I der Atmungskette erforderte. Mein Dank gilt allen Beteiligten gleichermaßen, namentlich Alexander Galkin, Dr. Ilka Wittig, Prof. Dr. Hermann Schägger, Prof. Dr. Andrei Vinogradov und Prof. Dr. Ulrich Brandt.

Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten und die stete Diskussionsbereitschaft. Bei Khalid Siddiqui, Hans-Werner Müller und Daniela Mooser möchte ich mich für die praktische Hilfe bei dem Einbau von Membranproteinen in Phospholipidvesikel und für die Aufreinigung des Membranproteins Cytochrom  $c_1$  (*Thermus thermophilus*) und des Membranproteinkomplexes Cytochrom  $c$  Oxidase (*Paracoccus denitrificans*) bedanken. Ohne diese Modellproteine wären viele Experimente dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Dr. Jörg Simon danke ich für die tolle Zusammenarbeit bei der massenspektrometrischen Charakterisierung eines bakteriellen Multihäm  $c$ -Typ Cytochroms. Weiterer Dank geht an seine Mitarbeiterin Melanie Kern und seine Kooperationspartner, namentlich Robert Hartshorne, Dr. Thomas Clark, Prof. Dr. David Richardson.

Dr. Ansgar Poetsch danke ich dafür, dass durch Ihn noch einige Tore am Ende der Arbeit geöffnet worden sind. Die ersten Experimente mit Membranen von *Halobacterium salinarium* und *Corynebacterium glutamicum* haben viel Aufschluss darüber gegeben, was von weniger spezifischen Enzymen wie Elastase in der praktischen Anwendung zu halten ist.

Prof. Dr. Clemens Glaubitz, Ines Lehner und Daniel Basting danke ich für die Bereitstellung von Membranproteinen der Smr-Familie, die für einige massenspektrometrische Experimente in dieser Arbeit verwendet wurden.

Dr. Ingo Paarmann möchte ich für die Möglichkeit danken, dass ich bei einem interessanten Projekt, das sich mit Gephyrin-Spleißvarianten beschäftigte, auf der massenspektrometrischen Seite mitarbeiten konnte. Ebenfalls nicht unerwähnt bleiben dürfen in diesem Zusammenhang Dr. Bertram Schmitt und Prof. Dr. Heinrich Betz.

Dr. Michalis Aivaliotis danke ich für seine Unterstützung bei den vielen Herausforderungen, die sich im Laufe der Arbeit ergeben haben. Besonders am Anfang der Arbeit war er es, der maßgeblich dazu beigetragen hat, dass ich mich in das komplexe Thema einarbeiten konnte. Seine Hilfsbereitschaft bei praktischen Problemen und immer guten Ratschlägen bei scheinbaren Sackgassen haben großen Anteil daran, dass mir auf halber Strecke nicht die Luft ausgegangen ist.

Bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Karas-Gruppe, namentlich Dr. Ute Bahr, Tabiwang Arrey, Sabrina Baltruschat, Tobias Beckhaus, Sandra Bornemann, Daniel Hierl, Tri Hoang, Thorsten Jaskolla, Markus Persike, Benjamin Rietschel, Malte Schürken, Dorothea Urbanek, Markus Weidlich, Walter Eckhard, Andreas Münch, Dr. Thomas Russ, Dr. Ralf Krüger, Dr. Mona Tawab, Dr. Andrea Schmidt, Dr. Valerie Gabelica, Dr. Jan-Henning Keller, Frank Dannenberg, Dr. Isam Rais, Dr. Carsten Corvey, Dr. Eric Schulz, Dr. Corina Hunger, Dr. Sieglinde Überall, Dr. Martin Hampel, Dr. Marianne André, Dr. Sandra Hack und Jeremy Hack, möchte ich mich für die einmalige Arbeitsatmosphäre bedanken. Die Zusammenarbeit in den letzten Jahren war ein Erlebnis der besonderen Art, die nicht nur erfahrungs- und lehrreich war, sondern auch meistens Spaß gemacht hat. Unvergesslich werden mir sicherlich die legendären Weihnachtsfeiern, das Arbeitskreiseminar in Dänemark und der extrem hohe Kaffeekonsum bleiben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Marianne, Corina und Eric. Die nicht in Worte fassbare Stimmung mit Euch im Büro war immer eine Quelle der Erfrischung, die einen selbst bei miesester Laune wieder lächeln ließ. An die vielen guten Gespräche mit Euch werde ich mich mein Leben lang gerne zurückerinnern. Dank gebührt auch dem inzwischen komplett

veränderten Gesicht des Büros, das durch seine eigene, unvergleichliche Mimik wirklich ein würdiger Nachfolger geworden ist. Vielen Dank dafür Tabi, Benny und Doro.

Markus, Thorsten und Tri möchte ich an dieser Stelle einfach für die gute Zeit danken. Ihr wisst, was ich meine.

Ein großes Dankeschön geht an Benjamin Rietschel und Tobias Beckhaus für ihre kritische Korrektur dieser Arbeit.

Bei Walter Eckhard bedanke ich mich für all die wichtigen verwaltungstechnischen Dinge, die er wie selbstverständlich im Hintergrund für mich erledigt hat. Von den meisten habe ich wahrscheinlich noch nicht einmal etwas mitbekommen. Noch einmal vielen Dank dafür.

Vielen Dank an Dawid Krenc, der mich durch sein Engagement während eines Studentenpraktikums dabei unterstützt hat, ein paar weitere Schritte in die richtige Richtung bei der Analyse von Membranproteinen zu gehen.

Vielen Dank auch an die Verantwortlichen des Erstsemesterpraktikums Dr. Mario Wurglics und Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz sowie den dortigen Kollegen während meiner aktiven Zeit, namentlich Antje Winter, Dr. Oliver Rau, Dr. Alexander Paulke, Frank Dannenberg, Yvonne von Coburg, Tabiwang Arrey und Jessica Zitzkowski. Die Betreuung der Studenten mit Euch zusammen war zwar auch immer viel Arbeit, besonders in den Anfängen, als die Besetzung des ersten Semesters mit Assistenten noch sehr dünn war, der Spaß hat aber immer klar überwogen. Das Ganze war für mich persönlich daher auch immer ein wertvoller Ausgleich zum wissenschaftlichen Arbeiten im Labor. Die zahlreichen Anekdoten die sich bei der Studentenbetreuung angesammelt haben, werde ich wohl niemals vergessen. Danke deshalb auch an alle Studenten, die durch ihr Verhalten dazu beigetragen haben, dass die Lehre keine Pflicht war, sondern auch wirklich Freude gemacht hat.

Bedanken möchte ich mich bei Silvia von Hohenfels Lohe für die vielen Finanzspritzen. Ihr Sponsoring begleitet mich jetzt schon seit frühester Jugend. Besonders während der Studien- und Promotionszeit war es von unschätzbarem Wert.

Meinen Großeltern danke ich für die finanzielle Förderung während des Studiums und der Promotion. Vieles ist dadurch leichter gewesen.

Ein ganz herzliches Dankeschön widme ich abschließend meinen Eltern, die auf meinem bisherigen Lebensweg immer hinter mir standen und mich unterstützt haben. In den kritischen Momenten meines Lebens waren sie immer da und haben mir die nötige Kraft gegeben, um die Hürde letztendlich doch noch zu überwinden. Ohne ihren Glauben an mich würde ich daher nicht da stehen, wo ich heute stehe. Dafür kann man eigentlich keine ausreichenden Dankesworte finden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Allgemeine Anmerkungen zum Thema.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Massenspektrometrie.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Ionisierungstechniken.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation.....	19
2.1.2 ESI – Elektrospray Ionisation.....	21
<b>2.2 Massenanalytoren.....</b>	<b>23</b>
2.2.1 <i>Time of Flight</i> – Flugzeitmassenanalysator.....	24
2.2.2 TOF – Detektoren.....	26
2.2.3 Weiterentwicklungen bei MALDI-TOF.....	26
2.2.4 Von MALDI-TOF-PSD zu MALDI-TOF/TOF.....	31
2.2.4.1 PSD.....	31
2.2.4.2 TOF/TOF.....	32
2.2.4.3 CID.....	34
2.2.4.4 Peptidsequenzierung mittels LID und CID.....	35
2.2.5 Andere Massenanalytoren.....	36
<b>3. Proteomics.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Analyse komplexer Proteome.....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Dynamischer Bereich.....	41
3.1.2 Fraktionieren.....	42
3.1.3 Proteinanalyse.....	43
3.1.3.1 Gel-basierte <i>bottom up</i> Analyse.....	45
3.1.3.2 LC-basierte <i>bottom up</i> Analyse.....	46
3.1.3.3 Gel-basierte oder LC-basierte <i>bottom up</i> Analytik – was ist besser?.....	48
3.1.3.4 Enzymatische und chemische Spaltung.....	49
3.1.3.5 Auswertung von <i>bottom up</i> Analysen.....	51
3.1.3.5.1 <i>Peptide Mass Fingerprint</i> .....	52
3.1.3.5.2 <i>MS/MS-Ion Search</i> .....	55
3.1.3.5.3 <i>Sequence Query</i> .....	57
3.1.3.6 <i>Top down</i> Analyse.....	58

<b>3.2 Membran Proteomics</b> .....	<b>59</b>
3.2.1 Detergenzien.....	60
3.2.2 Fortschritte bei integralen Membranproteinen.....	62
3.2.3 Die Atmungskette – ein wirklich perfekt erforschtes Modellsystem für Membran Proteomics?.....	66
<b>4. Zielsetzung</b> .....	<b>69</b>
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>71</b>
<b>5.1 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase</b> .....	<b>71</b>
5.1.1 Vorgeschichte.....	71
5.1.2 Massenspektrometrische Analyse der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase.....	73
5.1.3 MLQ- & AGP-Protein – zwei neue ATP-Synthase assoziierte Proteine.....	78
5.1.4 Aktivitätstest.....	81
5.1.5 Strukturelle Analyse und Suche nach Homologen.....	84
<b>5.2 Massenspektrometrische Identifizierung eines unkonventionell gebundenen         Häm bei einem neu entdeckten bakteriellen Cytochrom c</b> .....	<b>86</b>
5.2.1 Einführung und Vorgeschichte.....	86
5.2.2 Massenspektrometrische Untersuchungen.....	88
<b>5.3 Einfluss von Detergenzien auf MALDI &amp; ESI</b> .....	<b>93</b>
<b>5.4 Weniger spezifische Enzyme</b> .....	<b>101</b>
5.4.1 Enzymspezifität.....	101
5.4.2 Reproduzierbarkeit.....	104
5.4.3 Auswertung von Verdau von weniger spezifischer Enzyme mittels PMF.....	107
5.4.4 Elastaseverdau des Membranproteins Cytochrom c <sub>1</sub> .....	114
5.4.5 Cytochrom c <sub>1</sub> und Cytochrom c Oxidase in Phospholipidvesikeln.....	122
5.4.6 Bacteriorhodopsin in Purpirmembranen.....	126
5.4.7 Identifikation von ND3 aus einem 16%igen Polyacrylamidgel.....	129
<b>5.5 Ausblick</b>	
5.5.1 Polyacrylamidgele mit alternativen Quervernetzern.....	137
5.5.2 Elastaseverdau der Membran von <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	139

<b>6. Diskussion.....</b>	<b>140</b>
<b>6.1 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase.....</b>	<b>140</b>
<b>6.2 Neu entdecktes bakterielles Cytochrom c mit unkonventionell gebundenen Häm.....</b>	<b>146</b>
<b>6.3 Detergenzien.....</b>	<b>148</b>
<b>6.4 Weniger spezifische Enzyme.....</b>	<b>150</b>
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>161</b>
<b>8. Methoden &amp; Materialien.....</b>	<b>163</b>
<b>8.1 Allgemeines.....</b>	<b>163</b>
8.1.1 Chemikalien.....	163
8.1.2 Enzyme.....	163
8.1.3 Matrices für MALDI.....	164
8.1.4 Peptid- und Proteinstandards.....	164
8.1.5 Massenspektrometer.....	164
8.1.6 Software.....	165
<b>8.2 Allgemeine Methoden.....</b>	<b>165</b>
8.2.1 SDS-PAGE.....	165
8.2.1.1 Materialien.....	165
8.2.1.2 Ablauf.....	166
8.2.1.3 Alternative Quervernetzer.....	166
8.2.1.4 Mischen von alternativen Quervernetzern mit Bisacrylamid.....	167
8.2.2 Färbeprotokolle für Gele.....	167
8.2.2.1 Coomassie-Blau-Färbung.....	167
8.2.2.2 Silberfärbung.....	168
8.2.3 Proteinverdau.....	168
8.2.3.1 In Lösung.....	168
8.2.3.1.1 Materialien.....	168
8.2.3.1.2 Protokoll.....	169
8.2.3.2 Im Gel.....	170
8.2.4 MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF von Proteinverdaus.....	171

<b>8.3 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase</b> .....	<b>173</b>
8.3.1 Mitochondrienreinigung.....	173
8.3.2 Elektrophoretische Techniken.....	173
8.3.3 Antikörper und Westernblott.....	174
8.3.4 Methode zur Bestimmung der ATP-Hydrolyse im Gel.....	174
8.3.5 Edmanabbau.....	175
8.3.6 Massenspektrometrie.....	176
8.3.7 Programme für strukturelle Analyse und Homologiesuche.....	177
<b>8.4 Bakteriell gebundenes Cytochrom <i>c</i> mit unkonventionell gebundenen Häm</b> .....	<b>178</b>
<b>8.5 Detergenzien</b> .....	<b>179</b>
<b>8.6 Weniger spezifische Enzyme</b> .....	<b>180</b>
8.6.1 <i>Biotools</i> -Berechnungen.....	180
8.6.2 Einbau von Cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> und Cytochrom <i>c</i> Oxidase in Phospholipidvesikel.....	181
8.6.3 Vorschrift für den Verdau von Bacteriorhodopsin in Purpormembranen.....	182
8.6.4 Vorschrift für den Verdau der Membranen von <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	183
8.6.5 Identifizierung von ND3.....	183
<b>9. Anhang</b> .....	<b>186</b>
<b>9.1 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase</b> .....	<b>186</b>
<b>9.2 Multihäm <i>c</i>-Typ Cytochrom</b> .....	<b>229</b>
<b>9.3 Detergenzien</b> .....	<b>236</b>
<b>9.4 Weniger spezifische Enzyme</b> .....	<b>244</b>
9.4.1 Reproduzierbarkeit.....	244
9.4.2 Auswertung von Verdau weniger spezifischer Enzyme mittels PMF.....	275
9.4.3 Elastaseverdau des Membranproteins Cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> .....	295
9.4.4 Bacteriorhodopsin in Purpormembranen.....	296
9.4.5 Identifikation von ND3 aus einem 16%igen Polyacrylamidgel.....	300

<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>303</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>336</b>
<b>Publikationen &amp; Posterpräsentationen.....</b>	<b>340</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>342</b>
<b>Schlussgedanke – 21 Punkte zum wissenschaftlichen Arbeiten.....</b>	<b>344</b>

## 1. Allgemeine Anmerkungen zum Thema

Der Wissenschaftler T. Rabilloud fasste die Herausforderung der Analytik von Membranproteinen mit dem trefflichen Schlagwort *un amour impossible* zusammen (Rabilloud *et al.*, 2000). Sei es nun die Vorfraktionierung aus dem Proteom eines Organismus, die weiterführende Trennung der Fraktionen, die Identifizierung oder letztendlich die Charakterisierung der gefundenen Proteine, um ihre Bedeutung für den untersuchten Organismus zu verstehen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, das Unmögliche dem Möglichen etwas anzunähern. Genauer gesagt, einige Bausteine der Membranproteinanalytik neu zu überdenken, um eine Verbesserung zu erreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die ATP-Synthase von Säugetieren (Komplex V der mitochondrialen Atmungskette) massenspektrometrisch untersucht. Dafür wurde eine Strategie für die Isolierung und Trennung dieses Membranproteinkomplexes entwickelt, der eine vernünftige massenspektrometrischen Analyse zulässt. Dabei ist es auch gelungen, neue Informationen über die Zusammensetzung der ATP-Synthase zu erhalten.

Aus der Analyse der ATP-Synthase wurde offensichtlich, dass die Charakterisierung von Membranproteinen mit Hilfe der Massenspektrometrie immer noch in weiter Ferne liegt. Eigentlich gilt dieses nicht nur für Membranproteine, sondern für die Charakterisierung von Proteinen nach ihrer Identifizierung im Allgemeinen. Charakterisierung bedeutet hierbei u. a. die Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen, Isoformen und Mutationen in der Primärsequenz. Zwar ist auch die massenspektrometrische Analyse der Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen möglich, aber anderen Techniken wie der Röntgenstrukturanalyse und NMR noch klar unterlegen.

Die Realisierbarkeit solcher Ansprüche ist natürlich eine Hürde, die nicht so ohne weiteres überwunden werden kann. Die Kluft zwischen Anspruch und Wirklichkeit wäre aber erheblich geringer, wenn standardmäßig 100% Sequenzabdeckung bei der massenspektrometrischen Charakterisierung von Proteinen erreicht werden könnte. Meistens gibt man sich heute immer noch mit deutlich weniger zufrieden. Für die Analyse eines bakteriellen *c*-Typ Cytochroms in dieser Arbeit hat ebenfalls solch eine lückenhafte Sequenzabdeckung ausgereicht, um neue Erkenntnisse über Häm-Modifikationen bei diesem Protein zu gewinnen. Trotzdem muss man die provokante Frage stellen, ob man überhaupt von massenspektrometrischer Charakterisierung sprechen darf, wenn meistens ein Großteil der Proteinsequenz nicht zugänglich ist. Denn ohne 100% Sequenzabdeckung wird man wie ein Kurzsichtiger vieles nur erahnen können. Die Arbeit beschäftigt sich deshalb auch

## 1. Allgemeine Anmerkungen zum Thema

schwerpunktmäßig damit, ob weniger spezifisch schneidende Proteasen wie Elastase die Sehkraft bei der Charakterisierung von Membranproteinen auf der Peptidebene verbessern können. Sie setzt sich aber auch kritisch damit auseinander, welche Faktoren in diesem Zusammenhang sonst noch problematisch sind (z. B. Detergenzien und die Effektivität der Geextraktion).

## 2. Massenspektrometrie

*Zehn Blatt zählte ich ab, der Rest wurde im Nachttischchen versorgt, den Füllfederhalter fand ich in der Schublade neben dem Fotoalbum: er ist voll, an seiner Tinte soll es nicht fehlen, wie fange ich an?* (Günter Grass, Weilheimer Hefte zur Literatur, Nr. 42)

Wie fängt man also an? Dass die Massenspektrometrie eine Kerntechnologie in der modernen Bioanalytik geworden ist, sollte inzwischen überall hinreichend bekannt sein. Das Anwendungsspektrum beginnt bei der Urkompetenz der Massenspektrometrie, der einfachen Molekulargewichtsbestimmung. In sogenannten Tandem-Massenspektrometern, bzw. MS/MS-Systemen eröffnet sie die Möglichkeit zur Strukturbestimmung von DNA, RNA, Zuckern, Peptiden und Proteinen, um nur einige Beispiele zu nennen. Proteine beispielsweise können auf posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen routinemäßig untersucht werden – so will es uns zumindestens die Literatur glauben machen. Und mit der Quantifizierung von Analyten ist die Liste sicherlich noch nicht zu Ende.

Wie sieht diese Wunderwaffe „Massenspektrometer“ also aus? Bei näherer Betrachtung wird offensichtlich, dass es eine Vielzahl unterschiedlicher Geräte gibt, denn nach dem Baukastenprinzip werden aus den drei Hauptkomponenten Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor so ziemlich alle Möglichkeiten zusammengesetzt (Abb. 2.1). Häufig entstehen dabei dann auch Tandem- oder Hybrid-Massenspektrometer. Gerne kombiniert werden beispielsweise lineare Ionenfalle und FT-ICR (Hybrid-Massenspektrometer) oder zwei TOF-Analysatoren (Tandem-Massenspektrometer). Aufgrund der Vielzahl der Ionisierungsarten, Analysatoren und Detektoren ist es notwendig, um die zehn Blatt des Grass-Zitats nicht allzu sehr zu überschreiten, sich im Folgenden auf die verwendeten Techniken zu beschränken.

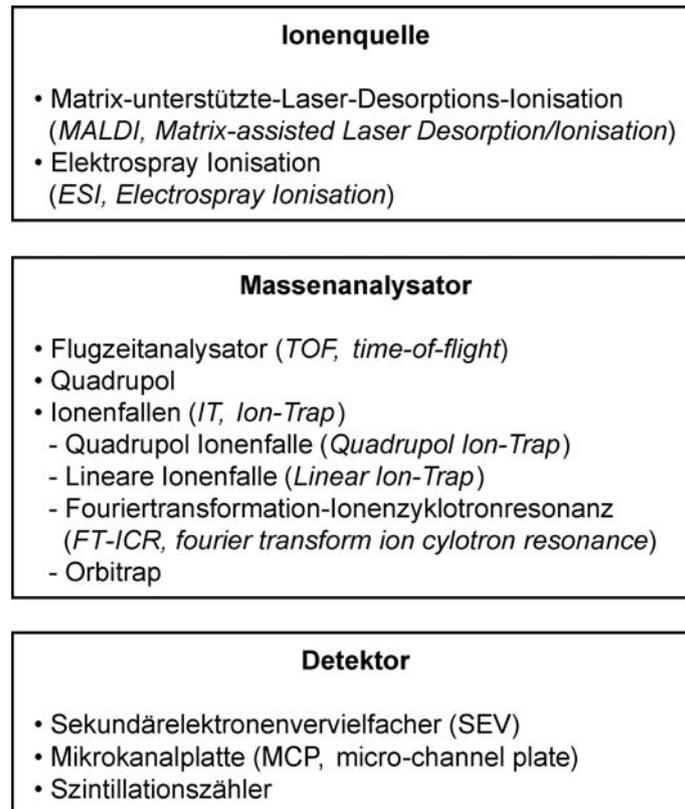


Abb. 2.1 Komponenten eines Massenspektrometers – Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor

## 2.1 Ionisierungstechniken

Die erste entscheidende Voraussetzung für den Siegeszug der Massenspektrometrie in der Bioanalytik ist die intakte Überführung hochmolekularer Analyten ins Vakuum und die Ladungsübertragung während dieses Prozesses gewesen. Ionisierungstechniken wie Elektronenstoßionisation (EI), chemische Ionisation (CI) oder *Fast atom bombardement* (FAB) sind dafür aufgrund der starken thermischen Belastung der Probenmoleküle nur bedingt geeignet gewesen. Wie überführt man aber einen Elefanten ohne Schaden in die Gasphase? Fenn hat mit der Etablierung der Elektrospray Ionisation (ESI) seine eigene Frage erfolgreich beantwortet (Fenn et al., 1988; Fenn et al., 1989). Karas und Hillenkamp (Karas et al., 1985; Karas et al., 1987; Karas et al., 1988) steuerten mit der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) das zweite entscheidende Ionisationsverfahren bei.

### 2.1.1 MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation

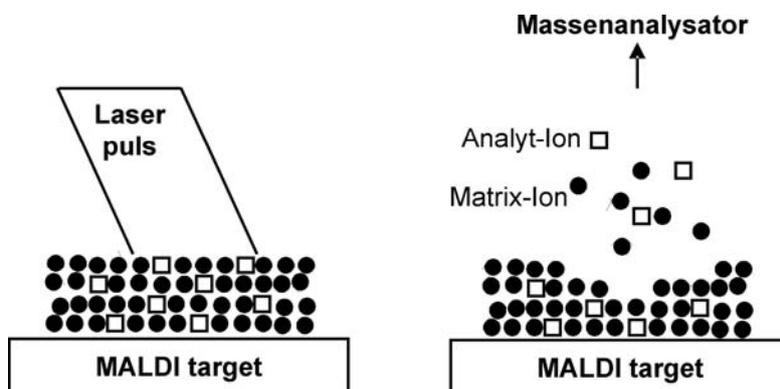
Die Geburtsstunde von MALDI war der Laserbeschuss eines Gemisches von Alanin und Tryptophan im Vakuum (Karas *et al.*, 1985). Bei einer Laserwellenlänge von 266 nm konnte das nicht absorbierende Alanin zusammen mit dem absorbierenden Tryptophan ionisiert detektiert werden. Tryptophan fungierte hier als die erste Matrix, was letztendlich zu den Namen *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation* führte (Karas *et al.*, 1985; Karas *et al.*, 1987). In der darauf folgenden Zeit wurde der Massenbereich stetig erweitert (Karas *et al.*, 1988; Karas *et al.*, 1989; Karas *et al.*, 1990). Immer neue Matrizes mit besseren Eigenschaften als Tryptophan haben zu dieser Verschiebung der Detektionsgrenze zu höheren Massen beigetragen und teilweise auch zu einer Erhöhung der Auflösung und Nachweisgrenze von bestimmten Analyten geführt. Tabelle 2.1 fasst die Matrizes zusammen, die sich in der Analyse von Biomolekülen durchgesetzt haben.

Abkürzung	Vollständiger Name	Anwendung	Literatur
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure	Peptide, Proteine, Glykosylierung, Phosphorylierung	Strupat <i>et al.</i> , 1991
Sinapinsäure	4-Hydroxy-3,5- dimethoxyzimtsäure	Proteine (> 10 KDa)	Beavis <i>et al.</i> , 1989
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure	Peptide, Proteine (< 10 KDa)	Beavis <i>et al.</i> , 1992
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon	Oligonucleotide (< 3 KDa)	Pieles <i>et al.</i> , 1993
HPA	3-Hydroxypicolinsäure	Oligonucleotide (> 3 KDa)	Taranenko <i>et al.</i> , 1994

**Tabelle 2.1** Verbreitete MALDI-Matrizes für Biomoleküle

Zusätzlich haben Matrixzusätze die Leistungsfähigkeit entscheidend verbessert. Der bekannteste ist wohl 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure (Karas *et al.*, 1993) zu DHB (DHBs), welcher die Massengenauigkeit von größeren Proteinen aufgrund schonender Ionisierung und verminderter Adduktbildung erhöht. Ein weiteres sinnvolles Beispiel in der langen Reihe von Additiven ist der Einsatz von Ammoniumsalzen zusammen mit der Matrix HCCA, denn er

führt in der Peptidanalytik zu einer deutlichen Unterdrückung von Alkalimetallmatrixclustern und einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Zhu *et al.*, 2002); Smirnov *et al.*, 2003). Auch bei der Analyse von Oligonucleotiden nutzt man häufig Ammoniumsalze, um Kationenanlagerungen an deren saure Funktionen zu reduzieren (Pieles *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1996).



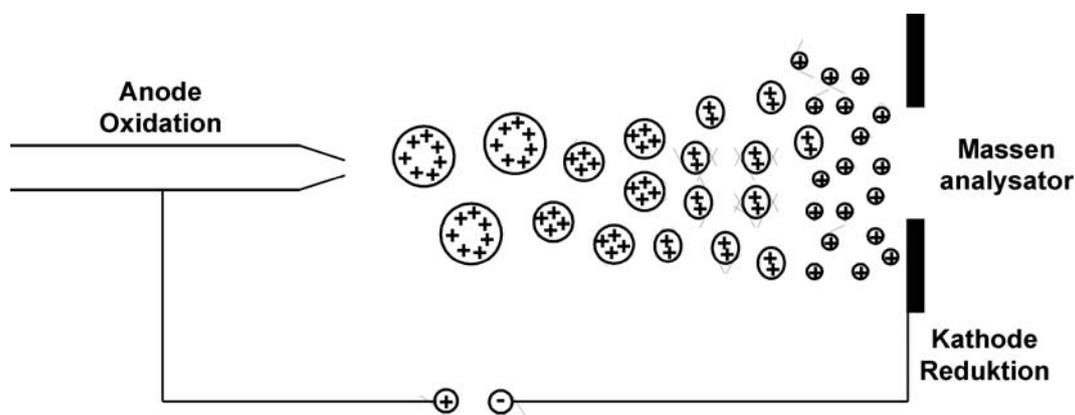
**Abb. 2.2** Schematische Darstellung des MALDI-Prozesses

Alle Matrices, Zusätze oder verbesserten Präparationstechniken wurden aber meistens mehr oder weniger durch Ausprobieren gefunden. Das mag auch daran liegen, dass der MALDI-Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist (Abb. 2.2). Man erkannte schnell, dass der Einbau des Analyten in die Matrix beim MALDI-Prozess extrem wichtig ist (Strupat *et al.*, 1991). Es ist inzwischen auch bekannt, dass der Analyt nach der Kristallisation in Flüssigkeitseinschlüssen zu finden ist (Krüger *et al.*, 2001; Horneffer *et al.*, 2003). Der Ladungszustand des Analyten wird dabei durch Gegenionen konserviert und maßgeblich durch die verwendete Matrix und Zusätze beeinflusst (Krüger *et al.*, 2001; Krüger *et al.*, 2002; Friess *et al.*, 2001). Nach einem kurzen Laserpuls (3 ns) kommt es dann zu einer sich schnell ausdehnenden Wolke aus Matrix- und Analytmolekülen (Dreisewerd, 2003). Am häufigsten werden heute für die Bestrahlung Laser im UV-Bereich (Stickstoff-Laser 337 nm; ND-YAG Laser 355 nm) verwendet. Ab einer bestimmten Bestrahlungsstärke, die von der eingesetzten Matrix abhängt, bilden sich dann Ionen (Strupat *et al.*, 1991; Ens *et al.*, 1991; Mowry *et al.*, 1993, Quist *et al.*, 1994). Eine zu hohe Überschreitung des Schwellenwertes sollte man aber vermeiden, um eine gute Spektrenqualität gewährleisten zu können (Strupat *et al.*, 1991). Leider ist der genaue Vorgang, der in mehrheitlich einfach geladenen Ionen resultiert, noch nicht vollständig klar. Am nachvollziehbarsten ist aber das Cluster-Modell

von Karas und Krüger (Karas *et al.*, 2003). In aller Kürze: Der Analyt wird im Cluster mit der Matrix desorbiert, Ionenbildung findet dann durch unterschiedliche Prozesse statt z.B. Ladungstrennung oder Photoionisation. Protonen und/oder Elektronentransfer im Cluster neutralisieren anschließend einen Großteil der mehrfach geladenen Ionen. Die detektierten, überwiegend einfach geladenen Ionen sind somit die „lucky survivors“ (Karas *et al.*, 2000).

### 2.1.2 ESI – Elektrospray Ionisation

Malcolm Dole, John Fenn, Matthias Mann und Matthias Wilm müssen einem wohl spontan bei Elektrospray in den Sinn kommen: Dole wegen der grundlegenden Arbeiten zur Erzeugung von Ionen aus Flüssigkeiten, aber insbesondere auch wegen seiner ersten Erklärungsansätze für diese Technik (Dole *et al.*, 1968), Fenn für den „Elefanten namens Protein in der Gasphase“ und somit dem Einläuten des Siegeszuges von ESI in der modernen Bioanalytik (Yamashita *et al.*, 1984; Fenn *et al.*, 1988; Fenn *et al.*, 1989), sowie natürlich auch Mann und Wilm für die Weiterentwicklung zum Nano-ESI (Wilm *et al.*, 1994; Wilm *et al.*, 1996), denn eine hohe Probenmenge hat man in der modernen Bioanalytik niemals zur Verfügung.



**Abb. 2.3** Schematische Darstellung des Elektrosprayprozesses (positiver Ionenmodus)

Sowohl beim klassischen Elektrospray als auch beim nano-ESI versprüht man die Analytlösung aus einer leitfähigen Kapillare im elektrischen Feld (Abb. 2.3). Die wesentlichen Unterschiede sind hierbei die Flussrate, der Innendurchmesser der Kapillarspitze, der Abstand zur Gegenelektrode und die angelegte Spannung (Tab. 2.2). Beim Nano-ESI verwendet man mit Gold bedampfte Glas- oder Quarzkapillaren, um die benötigten

	ESI	Nano-ESI
Flussrate	ca. 5 $\mu\text{L}/\text{min}$	20 – 40 nL/min
Kapillarspitzendurchmesser	ca. 100 $\mu\text{m}$	1 – 5 $\mu\text{m}$
Abstand zur Gegenelektrode	1 – 3 cm	1 – 3 mm
Spannung	3 – 5 kV	500 – 1000 V

**Tab. 2.2 Parameter ESI und Nano-ESI (Schmidt, 2000)**

Bedingungen zu schaffen. Die Flussrate wird nur von dem Kapillarspitzendurchmesser und der angelegten Spannung festgelegt (Schmidt *et al.*, 2003). Beim konventionellen ESI erreicht man eine kontinuierliche Flussrate mit Hilfe einer Pumpe, ggf. wird die Spraybildung durch einen Stickstoffstrom, der die Kapillare umspült, pneumatisch unterstützt.

Die Versprühung an der Kapillare bei Atmosphärendruck wird durch eine Destabilisierung der Flüssigkeitsoberfläche an der Spitze aufgrund der Akkumulation von positiven bzw. negativen Ladungen (abhängig von der Polarität der Gegenelektrode) erreicht. Die sich ausbildende Taylor-Konus ist instabil (Taylor *et al.*, 1964), so dass sich ein Flüssigkeitsstrahl ausbildet, der in hochgeladene Tröpfchen zerfällt, die ihrerseits weiter zerfallen. Die elektrostatische Aufladung der Kapillare und ein damit verbundenes Abreißen des Sprays wird durch Oxidation (Gegenelektrode ist Kathode) bzw. Reduktion (Gegenelektrode ist Anode) der Kapillare vermieden. Bereits unter Atmosphärendruck und beim stufenweisen Transfer in das Hochvakuum des Analysators verdampfen neutrale Lösungsmittelmoleküle aus den hochgeladenen Flüssigkeitströpfchen. Wird die Oberflächenspannung beim Schrumpfen der Tröpfchen durch die Ladungsabstoßung überwunden (*Rayleigh-Limit*), entstehen kleinere Tröpfchen. Für die letztendliche Freisetzung des Analyten als Ion werden zwei Mechanismen vorgeschlagen. Das *Ion-Evaporation-Modell* (Iribarne *et al.*, 1976; Thomson *et al.*, 1979) geht von einer Ionenemission aus kleinen hochgeladenen Tröpfchen aus, die nicht weiter zerfallen können. Das *Charged-Residue-Modell* (CRM) bzw. die *Single Ion Droplet-Theorie* (SIDT) postulieren dagegen, dass selbst diese kleinen hochgeladenen Tröpfchen noch einmal unsymmetrisch zerfallen (Dole *et al.*, 1968; Mack *et al.*, 1970, Röllgen *et al.*, 1987). Das Produkt kann man als Analyt-Lösungsmittelcluster ansehen, der zusätzlich noch überschüssige Ladungsträger und Gegenionen enthält. Lösungsmittel und leicht flüchtige Bestandteile des Clusters verdampfen

zunächst, danach können Gegenionen die Ladungsträger des Analyten neutralisieren. Damit sind auch die unterschiedlichen Ladungszustände im ESI-Spektrum erklärbar. Proteine und Peptide können beispielsweise ca. eine Ladung pro 1000 Dalton tragen. Obwohl Fenn mit dem *Ion-Evaporation-Modell* auch die Entstehung von Mehrfachladungen bei Makromolekülen schlüssig erläutert hat (Fenn *et al.*, 1993; Fenn *et al.*, 1997), ist der Mechanismus bei größeren Molekülen wie Proteinen eher unwahrscheinlich. Trotzdem ist die Frage noch nicht erschöpfend beantwortet, welches Modell der Wirklichkeit am nächsten kommt bzw. in der Realität überwiegt. In der Literatur gibt es daher auch Kombinationen aus beiden Vorstellungen (Kearle *et al.*, 2000; Gamero-Castano *et al.*, 2000).

### 2.2 Massenanalysatoren

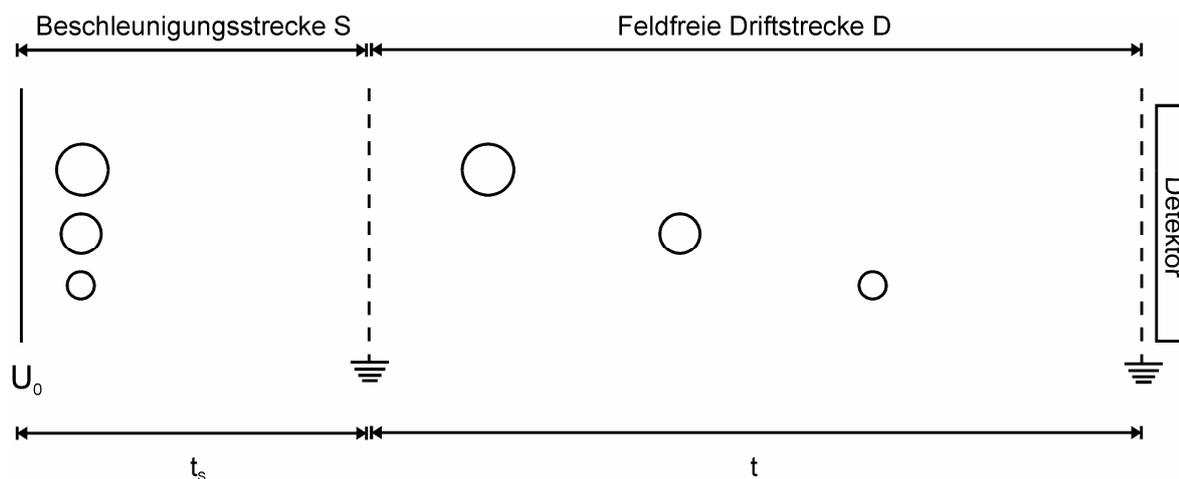
*Wir gäben uns schon mit einem Geschichtsbuch zufrieden, das uns unterhielte, statt uns zu quälen* (Hans Magnus Enzensberger, Weilheimer Hefte zur Literatur, Nr. 38)

Um den „Quälfaktor“ möglichst niedrig zu halten und sich nicht in der Geschichte der Massenanalysatoren zu verlieren, soll nachfolgend nur der hauptsächlich verwendete Flugzeitmassenanalysator (engl. *time-of-flight*, *TOF*) und die zugehörigen Detektionsmethoden etwas ausführlicher dargestellt werden. Da MALDI-TOF-MS schwerpunktmäßig in dieser Arbeit zum Einsatz kam, wird auch auf Weiterentwicklungen eingegangen, welche die hohe Auflösung und hervorragende Massengenauigkeit bei dieser Kopplung ermöglichen. Wie die Sequenzanalyse von Biomolekülen mit Hilfe eines MALDI-TOF realisierbar ist bzw. welche Erweiterungen dafür nötig sind, wird in dem sich anschließenden Kapitel „Von MALDI-TOF-PSD zu MALDI-TOF/TOF“ geklärt.

Die anderen Analysatoren Quadrupol (Q), Quadrupol Ionenfalle und lineare Ionenfalle (engl. *quadrupol ion trap*, *QIT* und *linear ion trap*, *LIT*), Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz (engl. *fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR) und Orbitrap werden abschließend nur kurz besprochen.

### 2.2.1 *Time of Flight* – Flugzeitmassenanalysator

Die Erfindung von MALDI ist ganz bestimmt der Durchbruch für den Flugzeitmassenanalysator gewesen, denn um die Flugzeit exakt zu ermitteln, muss ein definierter Startpunkt der Messung gegeben sein. Das diskontinuierliche Ionisationsverfahren MALDI liefert mit jedem Laserpuls, also zu einem definierten Zeitpunkt, ein Ionenpaket. Allerdings lässt sich der TOF-Analysator auch mit dem kontinuierlichen Ionenstrom von ESI koppeln. Man kann beispielsweise durch eine orthogonale Extraktion aus dem kontinuierlichen Ionenfluss die notwendigen Ionenpakete generieren. Es sei aber an dieser Stelle nur auf die Arbeiten von den Gruppen Dodonov (Mirgorodskaya *et al.*, 1994; Laiko *et al.*, 1994) und Guilhaus (Dawson *et al.*, 1989) verwiesen. In einem TOF-MS wird das Ionenpaket in einem Potentialgefälle beschleunigt (siehe Abb. 2.4). Unterschiedliche Massen erhalten unterschiedliche kinetische Energien  $E_{\text{kin}}$  ( $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$ ) bzw. Geschwindigkeiten  $v$ . Die Ionen werden anschließend gemäß ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) beim Durchlaufen einer definierten feldfreien Driftstrecke  $D$  getrennt. Die Flugzeit  $t$  für jedes Ion kann gemessen werden. Ionen mit einem großen  $m/z$ -Quotienten benötigen für die gleiche Strecke mehr Zeit als solche mit kleineren  $m/z$ -Werten (Stephens *et al.*, 1946, Cameron *et al.*, 1948).



**Abb. 2.4 Schematische Darstellung des Flugzeitmassenanalysators.** Die Analyten werden durch Kreise symbolisiert. Der Durchmesser der Kreise ist ein Maß für die Größe des  $m/z$ -Quotienten. Legende: Beschleunigungsspannung,  $U_0$ ; Beschleunigungszeit,  $t_s$ ; Verweildauer in der feldfreien Driftstrecke,  $t$ . Weitere Details, siehe Text.

Zusammenfassen lässt sich das Gesagte mit folgender Gleichung:

$$E_{kin} = U_0 \cdot e \cdot z = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = \frac{1}{2} \cdot m \cdot \left(\frac{D}{t}\right)^2$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U_0}{D^2} \cdot t^2$$

$$t \sim \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Neben der Flugzeit  $t$  in der feldfreien Driftstrecke  $D$  muss man noch die Verweildauer  $t_s$  im Beschleunigungsbereich  $S$  (Ionenquelle) berücksichtigen, die aber im Vergleich zur Flugzeit  $t$  klein ist.

$$t_s = \sqrt{\frac{S}{2 \cdot e \cdot U_0}} * \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Die Umwandlung der Messzeit in eine  $m/z$ -Skala erfolgt im einfachsten Fall mit Hilfe von zwei oder mehreren Ionen bekannter Masse anhand einer quadratischen Gleichung (sog. Kalibration;  $a$  und  $b$  sind die Kalibrationskonstanten).

$$m/z = a \cdot t^2 + b$$

Aber bereits beim Einsatz der verzögerten Extraktion für MALDI-Ionenquellen (siehe Kapitel 2.2.3) müssen Abweichungen von der quadratischen Abhängigkeit berücksichtigt werden.

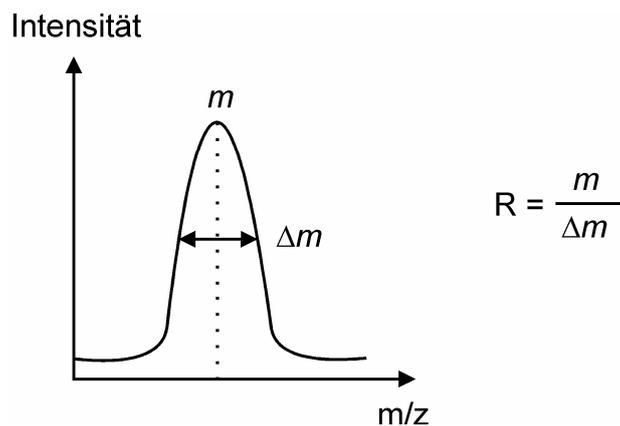
### 2.2.2 TOF – Detektoren

Manche Wörter    *steigen*                      *schwer zu fangen*  
*leicht*                      *vom Wind gedreht*    *tragen weit*  
*wie Pappelsamen*    *sinken*                      *wie Pappelsamen* (aus dem Gedicht „Windgriff“  
von Hans Magnus Enzensberger)

Die Flugzeitmassenspektrometrie hat zumindestens theoretisch einen unbegrenzten Massenbereich. „Leicht wie Pappelsamen“ sind die bereits detektierten Ionen mit einem m/z-Quotienten von über 1 MDa zwar nicht (Nelson *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1995) aber die Detektion wird aufgrund des gleichzeitig abnehmenden Impulses immer schwieriger. Mit den üblichen *multi-channel-plates* (MCPs) sind solche Ionen nur „schwer zu fangen“. Die auftreffenden Ionen lösen an den MCPs eine Kaskade von Sekundärelektronen aus. Die Effektivität hängt hierbei entscheidend von der Geschwindigkeit der Ionen ab, die bei hohen m/z-Quotienten zu niedrig ist. Bei Hochmassendetektoren werden deshalb die Ionen beispielsweise kurz vor der Detektion noch einmal beschleunigt oder ein Photomultiplier mit Photokathode, Szintillationsdetektor und Multiplier einer ersten MCP nachgeschaltet. Hauptziel ist beim Einsatz eines "Photomultipliers" Sättigungseffekte des Detektorsystems durch intensive Ionen niedriger Masse zu reduzieren. Der Strompuls wird danach in einen Spannungspuls umgewandelt. Durch schnelle *analog-to-digital converter* in einem Transientenrekorder bzw. *time-to-digital converter* findet die nötige Prozessierung statt, um die Ausgabe als Spektrum zu ermöglichen. *Time-to-digital converter* finden nur Anwendung bei geringem Ionenstrom z.B. bei TOF's mit orthogonaler Extraktion.

### 2.2.3 Weiterentwicklungen bei MALDI-TOF

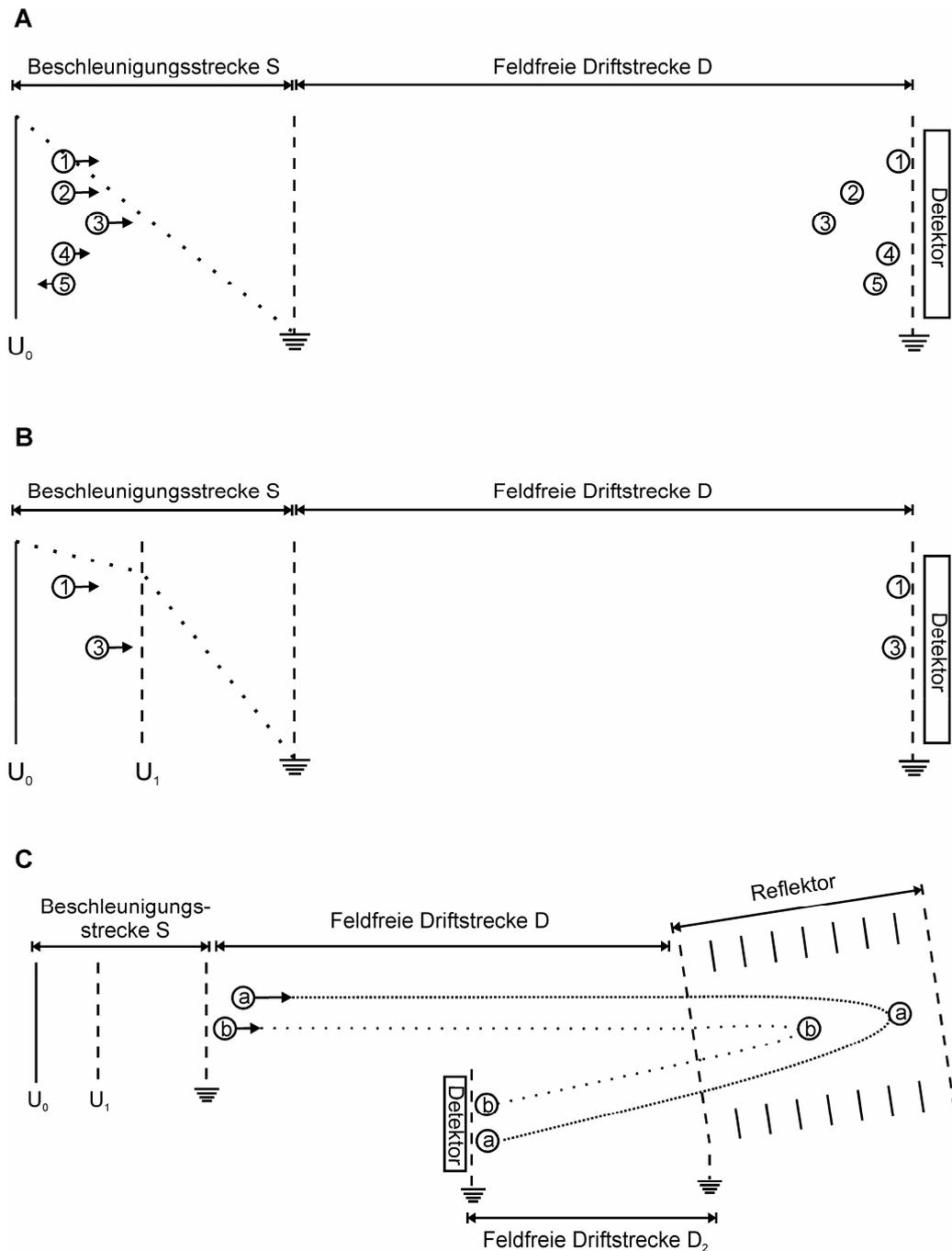
Leider generiert das einfache TOF-Gerät aus Abb. 2.4 nur Spektren mit einer sehr schlechten Auflösung. Die Auflösung R gibt man in der MS meist nach der FWHM-Definition (*full widths at half maximum*) an (Guilhaus *et al.*, 1995). Sie ist definiert als der Quotient aus einem m/z-Wert (*m* in Abb. 2.5) und der Breite des Signals bei halber Höhe ( $\Delta m$ ).



**Abb. 2.5 Definition der Auflösung**

Die Ursache für eine begrenzte oder sogar schlechte Auflösung in TOF-MS-Systemen lässt sich immer auf Unterschiede in der Zeit-, Raum- und Energie- bzw. Geschwindigkeitsverteilung von Ionen gleicher  $m/z$ -Verhältnisse zurückführen (siehe Abb. 2.6A). Bilden sich zwei Ionen mit identischem  $m/z$ -Quotient zwar am gleichen Ort und mit derselben Energie, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb. 2.6A, Ionen 1 und 2), treffen sie natürlich nicht zum gleichen Zeitpunkt am Detektor ein, denn das später gebildete Ion (Abb. 2.6A, Ion 2) wird auch später beschleunigt. Dies gilt auch für unterschiedliche Wegstrecken, die sich z.B. durch unterschiedliche Dicke der Probe (Abb. 2.6A, Ionen 1 und 3), aber auch durch nie vollständig vermeidbare Fehler im technischen Aufbau und Anordnung der Komponenten des TOF-Systems ergeben. Unterschiedliche Anfangsgeschwindigkeiten (Abb. 2.6A, Ionen 1, 4 und 5) führen logischerweise ebenfalls dazu, dass Ionen gleicher  $m/z$ -Verhältnisse nicht gleichzeitig den Detektor erreichen. Zur Kompensation der Flugzeitfehler, die sich durch die Variationsbreite einzelner Ioneneigenschaften ergeben, wurden daher verschiedene Maßnahmen entwickelt.

Eine entscheidende Frage ist: Wie kann man der Raumverteilung von Ionen mit identischem  $m/z$ -Verhältnis Herr werden (Abb. 2.6A, Ionen 1 und 3), denn auch sie sollen letztendlich zum gleichen Zeitpunkt am Detektor ankommen, um ein schmales Signal zu gewährleisten? Schon sehr früh in der TOF-Geschichte mussten sich Wiley und McLaren mit diesem Problem auseinandersetzen, als sie ein Flugzeit-MS mit einer Elektronenstoß-Ionenquelle koppelten. Die Ionen entstehen dabei zu unterschiedlichen Zeiten mit einer Ortsverteilung. Ionen, die einen längeren Weg in der Beschleunigungsstrecke zurücklegen (Ion 1 in Abb. 2.6A), erhalten aber eine höhere Endenergie als die Ionen, die eine kürzere Beschleunigungsstrecke durchlaufen (Ion 3 in Abb. 2.6A). Die Ionen erreichen den Detektor



**Abb. 2.6 Weiterentwicklungen zur Auflösungsverbesserung.** (A) TOF-MS mit einstufiger Beschleunigung. Die gepunktete Linie skizziert den Spannungsabfall ( $U_0$ , Beschleunigungsspannung). Ionen werden in der Quelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 2) und an unterschiedlichen Orten (1, 3) gebildet. Sie besitzen unterschiedliche (1, 4) und entgegengesetzte (4, 5) Anfangsenergien bzw. -geschwindigkeiten. (B) TOF-MS mit gepulster Ionenextraktion (Wiley *et al.*, 1955) zur Minimierung der Ortsunschärfe (1, 3). Die gepunktete Linie skizziert den Spannungsabfall ( $U_1$ , zweite Beschleunigungsspannung) (C) Reflektor zur Minimierung der Energieunterschiede von Ionen. Fokussierung von zwei Ionen (a, b) mit gleichem  $m/z$ , aber unterschiedlicher kinetischer Energien, auf den Detektor mit Hilfe des Reflektors.

daher zu unterschiedlichen Zeiten, was zu einer schlechten Auflösung führt. Wiley's und McLaren's Lösung für die Kompensation der Ortsverteilung war die gepulste Ionenextraktion (Wiley *et al.*, 1955). Die Quelle wird hierbei in zwei Beschleunigungsregionen aufgeteilt (siehe Abb. 2.6B). Im ersten Beschleunigungsbereich, wo die Ionen generiert werden, ist das Potentialgefälle (siehe gepunktete Linie in Abb. 2.6B) vergleichsweise gering. Die Energieunterschiede, welche Ionen an unterschiedlichen Orten (Ion 1 und 3 in Abb. 2.6B) bei der Beschleunigung erhalten, sind somit im Vergleich zu einer einstufigen Beschleunigung (Abb. 2.6A) niedriger. Durch die Optimierung beider Potentialabfälle kann erreicht werden, dass Ionen mit unterschiedlichen Startpunkten und somit Beschleunigungsstrecken (Ion 1 und 3 in Abb. 2.6B) auf den Detektor fokussiert werden. Durch die zweistufige Extraktion sind auch wesentlich längere Driftstrecken  $D$  möglich, was die Auflösung verbessert. Begrenzt ist die Auflösung aber weiterhin durch bestehende Geschwindigkeitsunterschiede der Ionen (Abb. 2.6A, Ionen 1, 4, 5), insbesondere durch "negative" Ionengeschwindigkeiten (Ion 5 in Abb. 2.6A), die sich in dieser Konfiguration nicht kompensieren lassen. Die zeitliche Startunschärfe (Ion 2 in Abb. 2.6A) lässt sich mit der gepulsten Ionenextraktion ebenfalls nicht ausgleichen.

Eine weitere große Herausforderung stellt daher die Energieverteilung der Ionen dar (Abb. 2.6A, Ionen 1, 4 und 5). Am gleichen Ort, zur gleichen Zeit, aber mit unterschiedlicher Anfangsenergie und somit Anfangsgeschwindigkeit gebildete Ionen mit identischem  $m/z$  fliegen nach der Beschleunigung in der Quelle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in der feldfreien Flugstrecke. Das Mittel, um Energieunterschiede von Ionen mit übereinstimmenden  $m/z$  in der Driftstrecke zu kompensieren, ist der Einsatz eines Reflektors (Abb. 2.6C) (Mamyryin *et al.*, 1973). Hierbei handelt es sich um ein Bauteil mit einem elektrischen Feld, welches der Flugrichtung entgegengerichtet ist. Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis, aber unterschiedlicher kinetischer Energie, dringen unterschiedlich tief in das elektrische Feld vor und werden dann in die entgegengesetzte Richtung der ursprünglichen Flugbahn beschleunigt. Bei richtiger Wahl der Reflektorspannungen und Analysatorgeometrie treffen die Ionen zur selben Zeit auf den Detektor. Die zeitliche Startunschärfe (Ion 1 und 2 in Abb. 2.6A) und die Ortsverteilung von Ionen (Ion 1 und 3 in Abb. 2.6A) lassen sich mit einem Reflektor aber nicht kompensieren.

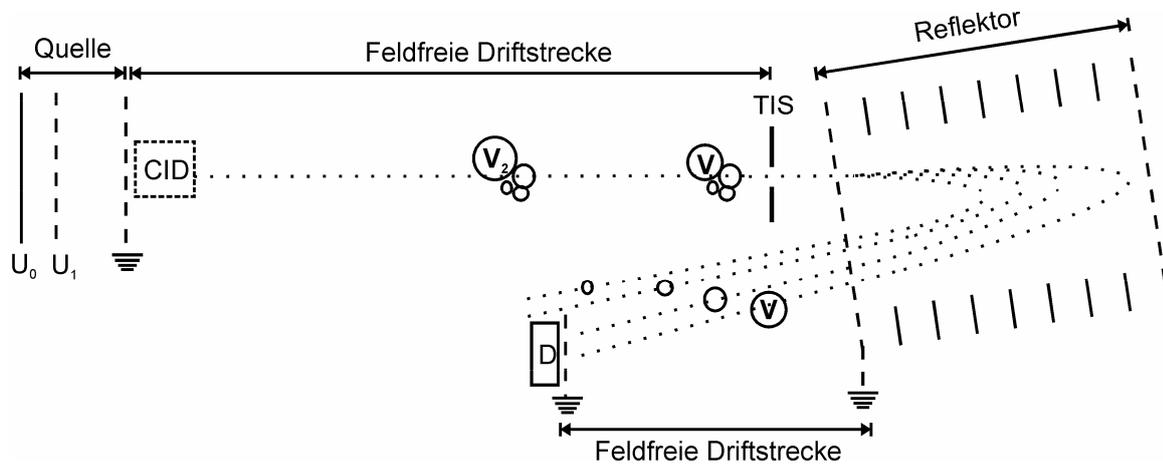
Der Einsatz beider technischen Prinzipien, gepulste Ionenextraktion und Ionenreflektor, haben für die MALDI-Ionenquelle zu einer dramatischen Verbesserung der massenspektrometrischen Auflösung geführt. Voraussetzung dafür sind die besonderen Eigenschaften der MALDI-Ionen, die sie durch den Ablationsprozeß erhalten, und zwar eine

weitgehend massenunabhängige Anfangsgeschwindigkeit mit einer großen Verteilungsbreite. Diese führt auch dazu, dass der alleinige Einsatz eines Reflektors nur eine mäßige Verbesserung brachte. Als wirkungsvoller, um die Verteilung der Anfangsgeschwindigkeiten der Ionen in der MALDI-Ionenquelle zu korregieren, erwies sich die verzögerte Extraktion (*delayed extraction*, *DE*; Brown *et al.*, 1995), eine Weiterentwicklung der gepulsten Extraktion von Wiley und McLaren. Hierbei erzeugt man die Ionen im feldfreien Raum und die Beschleunigungsspannungen ( $U_0$ ;  $U_1$ ) werden 50 – 1000 ns (DE-Zeit) zeitverzögert nach dem Laserschuss eingeschaltet. Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfangsgeschwindigkeit unterschiedlich weit in den ersten Teil der Beschleunigungsstrecke expandiert sind, nehmen wie bei der gepulsten Extraktion unterschiedlich viel Beschleunigungsenergie auf, so dass sie sich bei entsprechender Wahl der Potentiale am Ort des Detektor auch zeitlich treffen. Die Kompensation ist aufgrund der verbleibenden Unterschiede der Anfangsgeschwindigkeiten und deren Massenunabhängigkeit allerdings nicht ideal, führt zu einer verbesserten, aber begrenzten Auflösung und bringt eine Massenabhängigkeit der Fokussierungsbedingungen mit sich.

Durch Kombination beider Komponenten (*delayed extraction* und Reflektor) können die Leistungsdaten für das MALDI-TOF-System noch einmal deutlich verbessert werden, so dass im Massenbereich zwischen 1 und 5 kDa Auflösungen von bis zu 30000 und Massengenauigkeiten von 5 – 10 ppm erreicht werden. Auf jeden Fall sind die Isotopen aber aufgelöst (monoisotopische Auflösung). Jenseits der 5 kDa beginnt der positive Einfluss des Reflektors auf die Auflösung aber rapide zu sinken. Zusätzlich verliert man auch Sensitivität, bedingt durch das Auftreten metastabiler Ionenzerfälle (siehe Kapitel 2.2.4). Deshalb wird der alleinige Einsatz von *delayed extraction* immer sinnvoller, je weiter man sich von den 5 kDa entfernt (Linearer Modus). Mit zunehmender Masse wird es schwerer, noch monoisotopische Auflösungen zu erzielen. Im Massenbereich 10 – 30 kDa erreicht man noch maximal Auflösungen von 1000 – 2000 (Bahr *et al.*, 1997), also keine Isotopenauflösung. Die Massengenauigkeit liegt dann maximal bei 100 ppm, d.h. Proteinmassen lassen sich im Bereich von 10 bis etwa 30 kDa auf 1-5 Da genau bestimmen.

## 2.2.4 Von MALDI-TOF-PSD zu MALDI-TOF/TOF

### 2.2.4.1 PSD



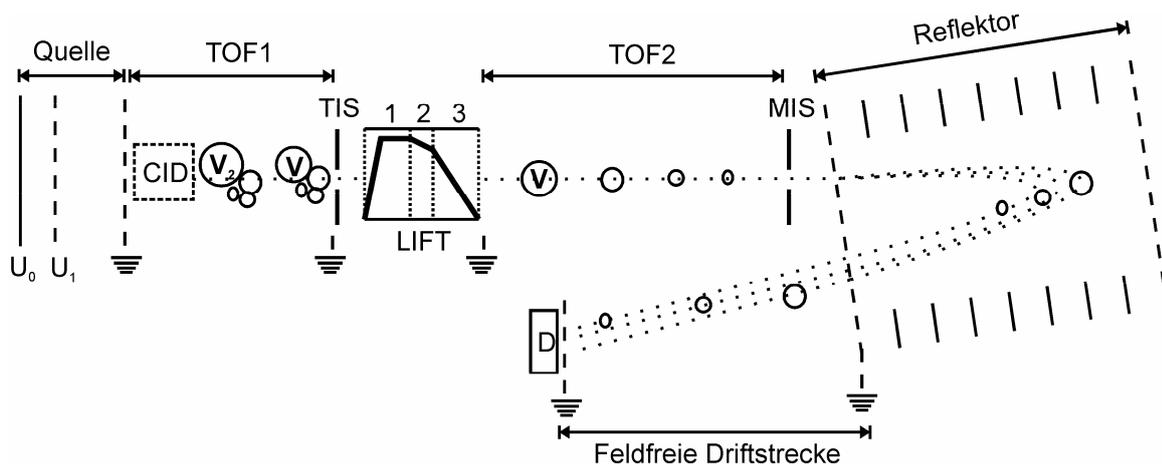
**Abb. 2.7 Prinzip von MALDI-TOF-PSD.** Die Vorläuferionen  $V$  und  $V_2$  werden zusammen mit den entstehenden Fragmenten in der feldfreien Driftstrecke getrennt. Der *time ion selector* (TIS) lässt den Vorläufer  $V$  und seine Fragmente passieren, der Vorläufer  $V_2$  und seine Fragmente werden aussortiert. Bei der gewählten Reflektorspannung kann aber nur der Vorläufer  $V$  und das schwerste Fragment auf den Detektor  $D$  fokussiert werden (weitere Details, siehe Text). Die CID-Zelle ist optional (siehe Kapitel 2.2.4.3).

Metastabile Zerfälle nach der Beschleunigung in der Quelle während der feldfreien Driftphase (engl. *post source decay*, PSD) ermöglichen die Sequenzanalyse von Biomolekülen wie Peptiden, Oligosacchariden, DNA und RNA mit Hilfe eines MALDI-TOF, vorausgesetzt es handelt sich um ein Gerät mit Reflektor und der Analyt überschreitet die 5 kDa nicht (Abb. 2.7). Kaufmann und Spengler erkannten als erste das Potential hinter den metastabilen Zerfällen (Spengler *et al.*, 1992; Kaufmann *et al.*, 1993; Spengler *et al.*, 1997). Im Flugrohr können die Analytionen, auch Vorläuferionen genannt (engl. *precursor*), in jeweils ein geladenes und neutrales Fragment zerfallen. Die Häufigkeit der Zerfälle ist probenabhängig und liegt typisch zwischen 0 und 50%, abhängig von der verwendeten Matrix, der eingesetzten Laserenergie und Beschleunigungsspannung. Abgesehen von einem geringen Rückstoß (unter Impulserhaltung) fliegen aber die Vorläuferionen und zugehörigen Fragmente weiter mit derselben Geschwindigkeit zusammen. Die Fragmente sind also bei

einer linearen Messung unsichtbar, denn die Vorläufer-Fragment-Pakete treffen nach ihrer Trennung im Flugrohr zeitgleich auf den Detektor. Wirkt aber das elektrische Feld eines Reflektors auf sie ein, das Ionen nach ihrer Energie ( $1/2 \cdot m \cdot v^2$ ) trennt, werden die Vorläuferionen von den geladenen Fragmenten separiert. Die neutralen Fragmente gehen dabei natürlich verloren. Der Reflektor kann aber nur Fragmentionen mit einem  $m/z$ -Verhältnis auf den Detektor fokussieren, die im Bereich vom Vorläufer liegen (ab ca. 80% des  $m/z$ -Quotienten vom Vorläufer). Die Energie kleinerer Fragmentionen ist zu gering, um in einem Winkel reflektiert zu werden, der sie letztendlich auch auf den Detektor treffen lässt. Fragmentionen im 80% Bereich treffen zwar auf den Detektor, die Auflösung und Massengenauigkeit der zugehörigen Signale im Spektrum ist aber schlecht, da Ionenreflektoren Energieunterschiede nur in einem begrenzten Intervall kompensieren können. Durch schrittweises Reduzieren der Reflektorspannung kann man aber auch Fragmentionen jenseits der  $m/z$ -Grenze nacheinander auf den Detektor lenken. Die generierten Einzelsegmente werden nachträglich zu einem Spektrum zusammengefügt. Damit aber auch nur ein Vorläufer-Fragment-Paket den Reflektor erreicht, ist noch als zusätzliches Bauteil ein *timed ion selector* (TIS) nötig. Es handelt sich dabei um ein ionenoptisches Bauteil, das den Ionenstrahl stark ablenkt und nur kurz abgeschaltet wird, um das Vorläufer-Fragment-Paket von Interesse passieren zu lassen. Das „kurze Abschalten“ zum richtigen Zeitpunkt, um bei zwei Vorläufern mit ähnlichem  $m/z$  wirklich nur ein Paket durchzulassen, ließ sich zunächst technisch nicht zufriedenstellend umsetzen. Wegen des inakzeptablen Zeitaufwandes und dem hohen Probenverbrauch für ein PSD-Spektrum sowie der schlechteren Spektrenqualität und Isolation des Vorläuferions verglichen mit den Fragmentierungsmöglichkeiten bei anderen MS-Geräten (siehe Kapitel 2.2.5) fristete diese Methode zunächst ein Schattendasein in der Sequenzanalytik.

### 2.2.4.2 TOF/TOF

Erst eine kleine, aber feine Idee katapultierte PSD aus dem Dunkeln heraus ans Licht. Das Grundübel von PSD ist nur der oben beschriebene Energieunterschied von *Precursor* und generierten Fragmenten. Das Ziel muss daher sein, diesen zu minimieren, was durch nachträgliches Beschleunigen eines selektierten Vorläufer-Fragment-Paketes zu erreichen ist (detaillierte Beschreibung, siehe Abb. 2.8) (Medzihradsky *et al.*, 2000; Suckau *et al.*, 2003).



**Abb. 2.8 Prinzip MALDI-TOF/TOF.** In der ersten feldfreien Driftregion (TOF1) werden die Vorläufer-Fragment-Pakete ( $V$  und  $V_2$ ) getrennt. Der *time ion selector* (TIS) lässt nur den Vorläufer  $V$  und seine Fragmente passieren. Die Beschleunigungszelle (LIFT) besteht aus vier Ringelektroden (3 Kammern; Linie skizziert die potentielle Energie des Vorläufer-Fragment-Pakets). In Kammer 1 wird das Vorläufer-Fragment-Paket auf ein höheres potentielles Energieniveau normiert. Kammer 2 und 3 entspricht einer zweiten Quelle (siehe auch Kapitel 2.2.3). Die potentielle Energie wird hier in kinetische umgewandelt. In der zweiten feldfreien Driftregion (TOF2) werden Vorläufer und Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeiten getrennt. Der *metastable ion suppressor* (MIS) lässt nur die Fragmente passieren (Grund, siehe Text). Die CID-Zelle ist optional und kann unterschiedlich positioniert sein (siehe Kapitel 2.2.4.3)

Die Energieunterschiede sind jetzt so gering, dass eine optimale Fokussierung des *Precursors* und der Fragmente auf den Detektor bei einer festen Reflektorspannung stattfinden kann. *Precursor* und metastabile Fragmente werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Endgeschwindigkeiten nach der Beschleunigung im zweiten Flugrohrabschnitt vor Eintritt in den Reflektor getrennt. Dabei zerfällt der *precursor* natürlich weiter, d.h. es entstehen niederenergetische metastabile Fragmente, die zusammen mit dem *precursor* weiterfliegen. Diese dürfen natürlich nicht im Reflektor ankommen, da sie zum Teil auf den Detektor fokussiert werden und zu breiten Signalen im Spektrum führen (vgl. Ausführungen zum PSD). Ein weiterer *timed ion selector* vor dem Reflektor entfernt deshalb den *precursor* zusammen mit den unbeschleunigten Fragmenten, indem nach Passage aller beschleunigten Fragmente ein elektrisches Feld aufgebaut wird (sog. *metastable ion suppressor*, MIS).

Der Probenverbrauch und Zeitaufwand wird durch diese Weiterentwicklung extrem reduziert, denn das lästige schrittweise Aufnehmen eines Spektrums entfällt. Die Auflösung und Massengenauigkeit der Fragmente wird durch den sehr geringen Energieunterschied zum

*precursor* extrem verbessert. Auch die Isolation des *precursor* ist inzwischen aufgrund sehr schnell ab- und einschaltbarer elektrischer Felder zu anderen MS-Geräten konkurrenzfähig. Da durch die Beschleunigungszelle (LIFT in Abb. 2.8) aus einem Flugrohr zwei Flugrohre werden, spricht man von einem TOF/TOF. Im ersten TOF findet die Isolation des *precursor* und die Fragmentierung statt, im zweiten TOF werden die entstandenen Ionen getrennt. Allgemein bezeichnet man eine Kombination von zwei oder mehr baugleichen Massenanalysatoren als Tandem-Massenspektrometer.

### 2.2.4.3 CID

Beim CID (engl. *collision induced dissociation*) wird durch Zusammenprall der Analyten mit einem Stoßgas (z. B. Helium, Argon, Stickstoff) eine Fragmentierung erreicht. Man unterscheidet *low energy CID* (ca. 0.1 keV) und *high energy CID* (ca. 1 – 2 keV). Schon beim klassischen PSD hat man CID-Zellen kurz hinter der Quelle eingebaut, um durch stoßinduzierten Zerfall zusätzliche Fragmente zu erhalten, die beim PSD nicht erzeugt werden. Die Stoßenergie liegt aber wesentlich höher als bei allen anderen MS-Geräten, weshalb vorwiegend Produkte mit kleinen  $m/z$ -Quotienten entstehen (*high energy CID*). Beim TOF/TOF wird die CID-Zelle entweder auch nahe der Quelle (Abb. 2.8) oder hinter den *timed ion selector* (TIS) installiert. Für die zweite Variante muss das isolierte Vorläufer-Fragment-Paket aber auf ca. 1 – 2 keV abgebremst werden, bevor in der *CID-Zelle* kollisionsinduzierte Hochenergiefragmentierung stattfinden kann. Das Paket aus Vorläufer, metastabilen und *CID-Fragmenten* wird anschließend, wie bereits besprochen, beschleunigt und im zweiten Flugrohrabschnitt getrennt.

Es stellt sich natürlich jetzt die Frage, ob eine der beiden Varianten besser ist. Durch Lokalisation der *CID-Zelle* hinter dem *timed ion selector* (TIS) und dem vorangegangenen Abbremsvorgang ist die Effektivität der *CID-Zelle* hier sicherlich etwas besser. Man sollte aber nicht dem Irrglauben verfallen, dass nur eine kontrollierten Fragmentierung in der Hochenergie-*CID-Zelle* stattfindet, denn ein Großteil der Fragmente resultiert auch hier immer noch aus den laserinduzierten metastabilen Fragmenten (engl. *laser induced dissociation, LID*). Außerdem ist bei dieser Variante durch das Abbremsen vor der *CID-Zelle* die Synchronisation mit der nachfolgenden Beschleunigungszelle einfacher. Die andere Variante (Abb. 2.8) hat daher anfänglich für Analyten mit niedrigen (kleiner 800 Da) und hohen Massen (größer als 3000 Da) eine deutlich schlechtere Fragmentauflösung und

Sensitivität erreicht. Auch der mittlere Massenbereich schnitt etwas schlechter ab. Bessere Anpassungsmöglichkeiten der *pulsed ion extraction* und DE-Zeit in der Beschleunigungszelle auf die jeweilige Analytgröße haben diesen Nachteil aber inzwischen ausgemerzt (Kammer 2 und 3 in Abb. 2.8). Keine der beiden Varianten hat daher gravierende Vorteile.

#### 2.2.4.4 Peptidsequenzierung mittels LID und CID

Die Bezeichnung der Fragmente erfolgt nach der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann (Roepstorff *et al.*, 1984). Erhält das C-terminale Fragment bei einem Bindungsbruch der Peptidkette die Ladung, kann ein x-, y- oder z-Ion entstehen, verbleibt die Ladung N-terminal, resultiert ein a, b oder c-Ion (Abb 2.9.), je nachdem, ob der Bindungsbruch vor, in oder nach der Peptidbindung erfolgt ist. Bei der Fragmentierung von Peptiden mit LID entstehen überwiegend a, b und y-Ionen sowie Immoniumionen. Der Einsatz von CID erhöht insbesondere den Anteil an gebildeten Immoniumionen und führt zu Seitenkettenbrüchen, die eine Differenzierung der isomeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin ermöglichen (Johnson *et al.*, 1987). Außerdem können Satellitenpeaks an a, b und y-Ionen durch Wasser- (-18 u; Serin, Threonin) oder Ammoniakverlust (-17 u; Arginin) gebildet werden. Leicht abspaltbare posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen an Serin oder Threonin ergeben ein intensives Signal nahe dem *precursor* (-80 u) und ebenfalls Satellitenpeaks (-80 u) (Schmidt *et al.*, 2006).

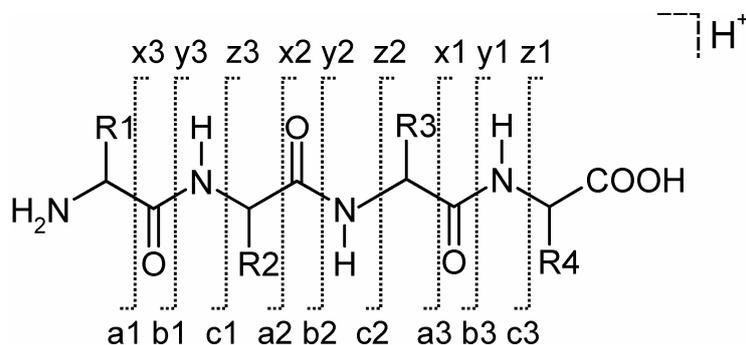


Abb. 2.9 Nomenklatur der Fragmente nach Roepstorff und Fohlmann (Roepstorff *et al.*, 1984)

### 2.2.5 Andere Massenanalysatoren

*Was ich ergreife, das ist heut führwahr nur skizzenweise; doch ich bereite mich bei Zeit zur italien'schen Reise* (aus Faust I, J. W. von Goethe)

Getreu dem obigen Motto, beschäftigt sich dieses Unterkapitel nur sehr oberflächlich mit den übrigen Massenanalysatoren. Gerade nur so tief, wie es nötig ist, um sich auf die Reise in die Proteomicswelt zu begeben. Deshalb werden auch nicht die technischen Details wie beim TOF-Analysator behandelt, sondern nur die Möglichkeiten der Massenanalysatoren dargestellt.

Ein Quadrupol kann man am ehesten mit einem Filter vergleichen. Es lässt entweder alle Ionen, nur Ionen in einem bestimmten  $m/z$ -Bereich oder sogar nur ein Ion mit einem definierten  $m/z$ -Wert durch. Zur Ionisation verwendet man meistens ESI (siehe Kapitel 2.1.2). Ein Spektrum erhält man, indem man den Massenbereich von Interesse in  $m/z$ -Schritten durchscant. Meistens werden aber Tripel-Quadrupol (QqQ) (Yost *et al.*, 1978) eingesetzt, wobei der zweite Quadrupol (q) nur als CID-Zelle fungiert (*low energy CID*, 0,1 keV). Durch Selektion eines Analyten im ersten Quadrupol ( $Q_1$ ), Fragmentierung in q mittels CID und Massenbestimmung im dritten Quadrupol ( $Q_3$ ) ist beispielsweise die Sequenzanalyse von Peptiden (überwiegend a, b und y-Ionen) möglich. Heute wird aber beim Triple-Quadrupol das dritte Quadrupol häufig durch einen orthogonalen Flugzeitanalysator (Qq-oTOF; siehe letzter Absatz) oder eine lineare Ionenfalle ersetzt (Qq-LIT; LIT, siehe nächster Absatz). Eine solche Hintereinanderreihung unterschiedlicher Massenanalysatoren (Quadrupol, oTOF oder LIT) nennt man Hybridmassenspektrometer. Beim konventionellen Tripel-Quadrupol spricht man logischerweise wie beim TOF/TOF von einem Tandem-Massenspektrometer. Neben der beschriebenen Produkt-Ionen-Analyse kann mit der Neutralverlust-Analyse oder Vorläufer-Ionen-Analyse nach post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen gesucht werden (Hoffmanlow *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005).

Die Quadrupol Ionenfalle und lineare Ionenfalle (Paul *et al.*, 1953; Stafford *et al.*, 1984, March *et al.*, 2005) sind beide in der Lage Ionen zu sammeln und dann eine massenabhängige Analyse aller akkumulierten Ionen durchzuführen (sog. MS-Experiment). Der  $m/z$ -Bereich liegt dabei zwischen 50 und 4000. Daher hat sich die Kopplung mit MALDI auch nicht durchgesetzt, denn aufgrund der Einfachladung sind nur Analyten bis 4 kDa analysierbar. Die Mehrfachladung macht somit ESI zur optimalen Ionisierungsart. Aus den gespeicherten Ionen lässt sich aber auch ein Ion mit einem definierten  $m/z$ -Quotienten

(*Precursor*) isolieren und anschließend mit unterschiedlichen Anregungsmethoden fragmentieren (sog. MS/MS- oder MS<sup>2</sup>-Experiment). Der m/z-Bereich hierfür beträgt 50 – 2000. Entstandene Bruchstücke kann man dann erneut selektieren und fragmentieren (sog. MS<sup>3</sup>-Experiment). Bei genügend hoher Probenmenge ist das Spiel „Selektieren und Fragmentieren“ noch einige Male wiederholbar (MS<sup>n</sup>-Experiment). *Low energie CID* wird dabei als Fragmentierungsmethode bei Peptiden am häufigsten eingesetzt. Daraus resultieren überwiegend a, b und y-Ionen. Inzwischen ist auch eine Anregung durch Elektronentransfer (engl. *electron transfer dissociation, ETD*) möglich (Syka *et al.*, 2004a), die nur c und z Fragmente generiert. Da der Elektroneneinfang entlang der Peptidkette mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit erfolgt, bilden sich auch alle c, z-Fragmente mit derselben Wahrscheinlichkeit, was eine regelmäßige Fragmentierung als bei CID ergibt. Die Chancen, die Peptidsequenz zu ermitteln, sind verglichen mit CID-Spektren bei ETD-Spektren besser, denn es ist mehr durchgehender Zerfall entlang des Peptidgerüsts an den c, z-Sollbruchstellen vorhanden. Auch verbleiben nur bei ETD leicht abspaltbare posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen beim Zerfall an den Fragmenten, was eine Lokalisation ermöglicht. Beim sehr wichtigen Faktor der Zeitdauer für einen Fragmentierungsprozess neigt sich die Waagschale aber zugunsten CID. Deshalb sind mit ETD auch nur MS/MS-Experimente möglich. Für die Analyse von bestimmten posttranslationalen Modifikationen beispielsweise Glykosylierungen sind MS<sup>n</sup>-Experimente aber unerlässlich, um Informationen über die Zuckerzusammensetzung und die Peptidsequenz zu erhalten (Zhang *et al.*, 2005).

Mit einem FT-ICR (Comisarow *et al.*, 1974; Henry *et al.*, 1989) oder einer Orbitrap (Makarov, 2000) ist momentan die höchste Auflösung und Massengenauigkeit erreichbar (1-2 ppm). Der m/z-Bereich entspricht in beiden Fällen etwa dem der Ionenfalle, weshalb auch hier ESI und nicht MALDI als Ionisierungstechnik erste Wahl ist. Die am häufigsten eingesetzten Fragmentierungsarten beim FT-ICR sind CID (*collision induced dissociation*), IRMPD (*InfraRed MultiPhoton Dissociation*) und ECD (*electron capture dissociation*) (Reid *et al.*, 2002). Die Geschwindigkeit für MS- und MS/MS-Experimente im FT-ICR ist aber verglichen mit vielen anderen Massenanalysatoren sehr gering. In der Orbitrap ist keine Fragmentierung möglich. In der Proteomforschung nutzt man daher meistens die Kombination von LIT und FT-ICR bzw. Orbitrap. Im FT-ICR bzw. der Orbitrap wird jetzt nur das MS-Spektrum mit hoher Auflösung und Massengenauigkeit generiert, während gleichzeitig mehrere MS/MS-Experimente in der LIT aufgrund deren hohen Geschwindigkeit stattfinden können (Syka *et al.*, 2004b; Olsen *et al.*, 2005; Scigelova *et al.*, 2006).

Ein weiteres verbreitetes Hybridmassenspektrometer ist das Quadrupol-o-TOF (Qq-oTOF) (Chernushevich *et al.*, 2001). Im ersten Quadrupol (Q) wird beim Qq-oTOF der *precursor* isoliert, im zweiten (q) wird meistens stoßinduziert fragmentiert (CID) und nach orthogonaler Extraktion (o) findet die Massenbestimmung des Vorläufers und der CID-Fragmente im TOF statt. Das Qq-oTOF wird sowohl mit MALDI- als auch mit ESI-Quellen kombiniert, wobei ESI aufgrund der einfacheren Kopplung weiter verbreitet ist. Ein Qq-oTOF erreicht fast die Massengenauigkeit eines FT-ICR bzw. einer Orbitrap (2 – 5 ppm).

### 3. Proteomics

*Wir tranken schön Tee und lösten dabei*

*Mal wieder die letzten Probleme*

*Der Menschheit. Und dann machten wir*

*Es uns vor der Glotze bequeme* (aus dem Lied „Wir tranken schön Tee“,  
von W. Biermann)

Nach dem anfänglichen Enthusiasmus zu Beginn des Proteomzeitalters Mitte der Neunziger Jahre ist inzwischen eine gewisse Ernüchterung eingetreten. Denn die Zielvorgabe der Definition von Proteomics, die Analyse des Proteoms einer Zelle oder eines Gewebes unter Einbeziehung der Expressionslevel und Interaktionen des Proteoms (Patterson *et al.*, 2003), scheint schwieriger erreichbar, als anfänglich gedacht. Die analytische Machbarkeit könnte man sogar als scheinbar widersprüchlich bezeichnen. Das Proteom umfasst schließlich nach der Urdefinition die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, einem Kompartiment oder einem Organismus unter bestimmten Bedingungen zu einem bestimmten Zeitpunkt (Wilkins *et al.*, 1996). Aber nur „wer dem Paradoxen gegenübersteht, setzt sich der Wirklichkeit aus“, wie es Friedrich Dürrenmatt in seiner Komödie „Die Physiker“ so schön auf den Punkt bringt. Natürlich ist der dynamische Bereich des Proteoms einer Zelle jenseits der analytischen Zugänglichkeit (Corthals *et al.*, 2000; Pederson *et al.*, 2003; siehe Kapitel 3.1). Selbstverständlich ist das Proteom komplexer als das Genom eines Organismus, insbesondere wenn man sich nicht für Prokaryonten, sondern für höhere Eukaryonten mit ihren mannigfaltigeren Isoformen und Modifikationen interessiert. Offensichtlich ist auch, dass die heutigen analytischen Techniken wie Gelelektrophorese, Chromatographie und Massenspektrometrie sowie die moderne Bioinformatik nicht ausreichen, um den oben genannten Herausforderungen gerecht zu werden. Zutreffend ist aber auch, dass viele solcher scheinbarer Paradoxa wie die Analyse des Proteoms in der Vergangenheit bereits gelöst worden sind. Immer ist dabei wohl auch folgende These von Dürrenmatt eingetreten: „Planmäßig vorgehende Menschen wollen ein bestimmtes Ziel erreichen. Der Zufall trifft sie dann am schlimmsten, wenn sie durch ihn das Gegenteil ihres Ziels erreichen: Das, was sie befürchten, was sie zu vermeiden suchten (z.B. Oedipus)“ (Die Physiker). Der Zufall trifft die Proteomforschung momentan sicherlich immer noch hart, weil das Gegenteil des Zieles, das Patterson formuliert hat, immer noch einzutreten scheint. Die analytischen Techniken reichen wahrscheinlich aber aus, um eine globale Strategie zu realisieren, mit dem Ziel das Proteom

eines gesamten Organismus zu analysieren und funktionell zu beschreiben. Die unliebsame Auseinandersetzung mit den Ursachen für die Limits der unterschiedlichen Techniken und die Suche nach Lösungsansätzen rückt daher immer mehr in den Vordergrund. Es ist die Notwendigkeit erkannt worden, einige Schritte zurückzugehen d.h. anhand einer gezielten Analytik von bereits gut charakterisierten Subproteomen oder bekannten Modellproteinkomplexen auch Ursachenforschung zu betreiben. Ein differenzierterer Blick auf die Proteine einer Zelle nach chemischen Gesichtspunkten beispielsweise Glykoproteom, Membranproteom und Phosphoproteom ist in letzter Zeit immer wichtiger geworden (Morandell *et al.*, 2006; Morelle *et al.*, 2006; Schindler *et al.*, 2006). Von dem Punkt *es uns vor der Glotze bequeme* zu machen, sind wir zwar bei der Analyse von komplexen Proteomen sicherlich heute noch weit entfernt, trotzdem sieht es bei näherer Betrachtung gar nicht so schlecht aus.

#### **3.1 Analyse komplexer Proteome**

*(...) in all these years each one of us using 2D map analysis looked quite like the protagonist of the bone-chilling novel of Rudyard Kipling “The Strange Ride of Morrowbie Jukes” (...) No way out from the horseshoe-shaped crater: the steeply-graded sand wall would prevent any climbing, the only open side, at the mouth of the river, being heavily guarded by troops (...) There was a cryptic irony underlying the name of the protagonist: Morrowbie seems to stress the conditions with someone of no future (...) Well, just as rescue came from without to poor Morrowbie, it seems that today, with the panoply of tools available in proteome analysis (...) the Morrow-bye-bye might soon be changed into Morrow-now or Morrow-today. A bountiful harvest seems to be hiding around the corner. (Righetti *et al.*, 2005a)*

Eine „reichliche Ernte“ wartet also laut Righetti in der Zukunft auf die Proteomforschung. Wie die „Rüstung an Methoden“ aussieht, um die vielfältigen Herausforderungen wie den dynamischen Bereich oder die Variabilität eines Proteoms zu lösen, soll in den folgenden Kapiteln kurz dargestellt werden.

### 3.1.1 Dynamischer Bereich

Für die scheinbar aussichtslose Lage beim dynamischen Bereich eines Proteoms hat man jedenfalls inzwischen einige wenige, aber viel versprechende Ansatzpunkte gefunden. Je nach Stoffwechsellage eines Organismus entsteht bekanntlich ein unterschiedliches Nebeneinander von Proteinen, in dem von hoch exprimierten (engl. *high abundant*) bis hin zu sehr gering exprimierten (engl. *low abundant*) Proteinen alles vertreten ist. Das ergibt beim menschlichen Plasmaproteom beispielsweise einen dynamischen Bereich von mindestens  $10^{10}$ , wenn man der Literatur hier Glauben schenken darf (Righetti *et al.*, 2005b). Mit Affinitätschromatographie lassen sich aber höher konzentrierte Proteine, wie z.B. Humanes Serum Albumin (HSA) oder IgG beim humanen Plasma, entfernen oder zumindestens vermindern (Tirumalai *et al.*, 2003; Leatherbarrow *et al.*, 1980; Lindmark *et al.*, 1983). Die vorher unsichtbare, darunter liegende Konzentrationsschicht von Proteinen wird dadurch der Analytik zugänglich gemacht. Es soll jedoch hier nicht unerwähnt bleiben, dass durch Protein-Protein-Bindung auch andere Proteine verloren gehen können (Guerrier *et al.*, 2005; Mehta *et al.*, 2002). Natürlich wird Affinitätschromatographie nicht nur zur Entfernung unerwünschter Proteine eingesetzt, sondern auch, um Proteine oder Proteinkomplexen von Interesse aufzureinigen (siehe Fraktionierung). Eine weitere sehr elegante Methode, den dynamischen Bereich zu reduzieren, ist der Einsatz von *combinatorial ligands* (Righetti *et al.*, 2006; Righetti *et al.*, 2005a; Righetti *et al.*, 2005b), an denen höher konzentrierte Proteine verdünnt, während gleichzeitig niedrig konzentrierte angereichert werden. Die dabei verwendete Idee, synthetische Peptidbibliotheken als Liganden einzusetzen, ist aber schon etwas älter (Lam *et al.*, 1991) und auch nur durch die enormen Fortschritte in der Festphasensynthese möglich gewesen (Merrifield *et al.*, 1963; Furka *et al.*, 1991). Auch eine Vorfraktionierung der Probe verbessert natürlich die schlechte Situation beim dynamischen Bereich (siehe Fraktionierung). Zusammenfassend muss man aber zugeben, dass ein Äquivalent zu PCR, die Basis für den enormen Höhenflug in der Genomforschung, bis jetzt für niedrig exprimierte Proteine sicherlich noch nicht entdeckt worden ist. (Righetti *et al.*, 2005b)

### 3.1.2 Fraktionieren

Selbst wenn die Konzentrationsverteilung der Proteine eines Proteoms nicht so breit wäre, stellt bereits das oben erwähnte Nebeneinander von normalerweise nicht gerade wenigen Proteinen eine enorme Hürde für die Analytik dar. Um ein Beispiel zu nennen: Geht man von der Hypothese aus, dass die gewaltige, aber noch überschaubare Anzahl von 25000 bis 30000 Genen des *Homo sapiens* zu 50000 Genprodukten führt, von dem jedes im Mittel ungefähr 10 Spleißvarianten, Spaltprodukte und posttranslationale Modifikationen hat, endet man bei 500000 Proteinformen (Righetti *et al.*, 2005b). Dabei ist nicht berücksichtigt, dass einzelne Proteine wie Antikörper bis zu 1 Mio. verschiedene Epitopsequenzen ausbilden können. Eine Fraktionierung ist daher natürlich ratsam. Leider muss diese aber individuell auf jedes Problem angepasst werden. Immer sollte die Methode aber robust gegen hohe Probenmengen sein und aufkonzentrierte Fraktionen liefern (mehr Details und weitere Literatur zum folgenden Überblick, siehe Righetti *et al.*, 2005b).

Ein Klassiker des letzten Jahrhunderts, aber häufig immer noch erste Wahl, ist dabei die Zentrifugation (de Duve *et al.*, 1955; de Duve *et al.*, 1965). Organellen wie Zellkern, Mitochondrien, Lysosome, Peroxisome, *microbodies* etc. lassen sich so aufgrund unterschiedlicher Größe und Dichte relativ sauber isolieren. Eine weitere Subfraktionierung der Organellen oder die Trennung von Proteinkomplexen mittels Zentrifugation ist natürlich auch möglich (Taylor *et al.*, 2002).

Nicht wegedenkbar sind auch chromatographische Techniken in der Proteinfractionierung nach Zell- bzw. Organell-Lyse. Am häufigsten werden Größenausschluss-, Ionenaustausch- und *Reversed Phase*-Chromatographie (RP) eingesetzt, sowie Affinitätschromatographie für bestimmte Proteingruppen wie z. B. glykosylierte oder phosphorylierte Proteine. Ein weiterer Anwendungsschwerpunkt der Affinitätschromatographie ist die Aufreinigung von getaggtten Proteinen (HA-, His-, Strep-tag etc.). Eigentlich wird aber jeder existierende Chromatographietyp auch angewendet. Die Erfolge von exotischen Materialien hierbei wie Heparin oder Hydroxyapatit, insbesondere auch bei niedrig exprimierten Proteinen, verdeutlichen die noch teilweise ungenutzten Möglichkeiten in der breiten Anwendung (Karlsson *et al.*, 1999; Fountoulakis *et al.*, 2000). Die noch offenen Freiräume zeigt auch eine serielle Schaltung von mehreren unterschiedlichen Chromatographiematerialien. Die üblicherweise recht hohe Redundanz in den Proteinfractionen klassischer chromatographischer Methoden wird bei gleichem

Zeitaufwand erheblich reduziert, die Anzahl an identifizierten Proteinen dagegen erheblich erhöht (Guerrier *et al.*, 2005).

Als letztes Schwergewicht neben Zentrifugation und Chromatographie sind noch die elektrophoretischen Methoden anzuführen, wie z.B. *Free flow electrophoresis* (FFE), mit der sehr sauber Zellen und Organellen aufreignet werden können. Bei der Proteinvorfractionierung wird FFE aber meistens nicht eingesetzt, sondern *Free flow isoelectric focussing* (FF-IEF) findet nach Zellaufschluss hier fast ausschließlich Anwendung. *Multicompartment electrolyzers* (MCEs) basieren ebenfalls auf der isoelektrischen Fokussierung (IEF) von Proteinen. Unter Einsatz von *carrier ampholytes*, *isoelectric membranes* oder *isoelectric beads* werden Proteinfractionen mit einem engen *pI*-Bereich in unterschiedlichen Kammern des Gerätes gespeichert. Görg hat inzwischen auch wieder eine Methode reanimiert, die komplexe Proteinmischungen durch IEF auf Sephadex-Material fraktioniert. Im Gegensatz zu der Vielzahl der IEF-Methoden wird Zonen-Elektrophorese nur eher selten verwendet. Auf den besonderen Stellenwert der Nativen- (CN-PAGE) und Blau-Nativen Gelelektrophorese (BN-PAGE) für die Aufreinigung von Proteinkomplexen wird später noch eingegangen (siehe Kapitel 3.2.2).

Zwar wichtig, aber nur ein Federgewicht im Vergleich zu den anderen Methoden ist die Immunopräzipitation, insbesondere für die Erforschung von Proteinkomplexen.

#### 3.1.3 Proteinanalyse

*Mining below the tipp of the iceberg to find low abundance and membrane proteins* (Pederson *et al.*, 2003)

Ein Kernziel der Proteomanalytik ist selbstverständlich die Identifikation einer möglichst hohen Anzahl an Proteinen eines Gewebes, einer Zelle, einer Organelle etc. Das beinhaltet im erweiterten Sinne auch die Aufdeckung der Isoformen und Modifikationen der Proteine. Ob für das von Pederson formulierte Ziel eine Vorfractionierung nötig ist oder eine Trennung in einem Schritt ausreicht, wird aber immer noch diskutiert (Righetti *et al.*, 2005b). Proteomics umfasst aber natürlich wesentlich mehr. Zum Kartieren des Proteoms gehört neben der Identifikation auch die Quantifizierung der Proteine bzw. des Modifikationsgrades beim vorliegenden Zustand des Systems. Es handelt sich allerdings meistens um relative Quantifizierungen z.B. der Vergleich von gesunden und kranken Zellen (Metabolisches

Labeling von Proteinen z. B. SILAC: Oda *et al.*, 1999; Krijgsveld *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2002; Oong *et al.*, 2003; Trester-Zedlitz *et al.*, 2005; ICAT: Gygi *et al.*, 1999; MassTag: Peters *et al.*, 2001; iTRAQ: Ross *et al.*, 2004; ICPL: Schmidt *et al.*, 2004; Enzymkatalysierte Inkorporation von  $^{18}\text{O}$  in Carboxyl-Gruppen: Schnolzer *et al.*, 1996; Mirgorodskaya *et al.*, 2000; DIGE: Unlü *et al.*, 1997; Viswanathan *et al.*, 2006). Absolute Quantifizierungen sind aber auch möglich (Kirkpatrick *et al.*, 2005). Außerdem hat man nach der Identifikation natürlich auch ein hohes Interesse daran, die Funktion der Proteine aufzudecken: Was für eine Aufgabe hat ein Protein in einem komplexen Netzwerk innerhalb einer Organelle, einer Zelle oder eines Gewebes? Gehört das identifizierte Protein zu einem bereits bekannten Proteinkomplex oder ist es Teil von etwas gänzlich Neuem? Mit unterschiedlichsten Techniken versucht man daher ein Bild von Protein-Protein-Interaktionen zu bekommen (Downard *et al.*, 2006; Chevet *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006a; Lisacek *et al.*, 2006). Die Anforderungen an die Trennung sind dabei extrem hoch, da die Proteine länger in einer nativen Umgebung verbleiben müssen.

Hier soll jedoch nur die Proteinidentifikation beschrieben werden. Neben Massenspektrometrie sind natürlich in einigen Fällen auch andere Methoden wie z.B. Edmann-Sequenzierung denkbar, aber nicht so weit verbreitet. Für die Massenspektrometrie gibt es zwei Identifikationswege: *bottom up* und *top down* (Reid *et al.*, 2002). Bei *bottom up* misst man immer Peptide, die enzymatisch oder chemisch aus der Probe generiert werden (siehe Kapitel 3.1.3.4). Bei *top down* fängt man direkt bei der getrennten Probe (Proteine oder Peptide) mit der massenspektrometrischen Messung an. Da nur *bottom up* in der Proteomicsgemeinde verbreitet ist, wird auch nur diese Technik ausführlich beschrieben, *top down* nur sehr kurz (siehe Kapitel 3.1.3.6).

*Bottom up* kann man letztendlich erneut grob in zwei Richtungen aufteilen: Den gel-basierten oder den LC-basierten Ansatz (LC, *liquid chromatography*). Der Hauptunterschied zwischen beiden Strategien ist, was getrennt wird. Beim gel-basierten Ansatz wird erst getrennt und dann enzymatisch oder chemisch gespalten, beim LC-basierten Ansatz geht man umgekehrt vor.

### 3.1.3.1 Gel-basierte *bottom up* Analyse

O'Farrell, einer der Väter der 2D-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE), konnte bereits mit einem 2-D-Gel ca. 1100 Proteine eines *E. Coli*-Zellysats auflösen und detektieren (Macko *et al.*, 1970; Farrell *et al.*, 1975). Entscheidend ist dann durch die Einführung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) die Reproduzierbarkeit verbessert und die Handhabung vereinfacht worden (Wenger *et al.*, 1987; Righetti *et al.*, 1990). Die Differenzierung nach isoelektrischem Punkt in der ersten Dimension und Molekülgröße mit einem SDS-Polyacrylamidgel in der zweiten Dimension ist wohl auch deshalb heute eine der am meisten verbreiteten Methoden (Görg *et al.*, 2004). Das Auflösungsvermögen liegt bei ca. 2000 Proteinen. Es kann aber abhängig von der Größe des Gels erhöht werden, oder man verwendet IPG-Streifen mit einem sehr engen pH-Bereich und setzt die Puzzlestücke danach wieder zusammen (Corthals *et al.*, 2000; Wildgruber *et al.*, 2000; Hoving *et al.*, 2000; Westbrook *et al.*, 2001). Das immer präsente Übel der Überlappung einzelner Proteinspots (Pietrogrande *et al.*, 2001; Pietrogrande *et al.*, 2002; Campostrini *et al.*, 2005) kann dadurch in beiden Fällen deutlich reduziert werden. Bei IEF in einem engen pH-Bereich erhöht man aber ohne Vorfraktionierung komplexer Proben das Risiko, dass Proteine in der ersten Dimension vermehrt präzipitieren (Herbert *et al.*, 2004). Im Allgemeinen neigen auch stark basische und Membranproteine ganz besonders zur Aggregation bei der IEF, weshalb diese Technik für beide Proteingruppen ungeeignet ist (Lescuyer *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2003). Ebenfalls sind sehr große (ca. über 120 kDa) und kleine Massen (ca. unter 5 kDa) nicht auflösbar. Der Austausch des Laemmli-Systems (Laemmli, 1970) in der zweiten Dimension durch Tricin-Gele (Schägger *et al.*, 1987; Schägger, 2006) bzw. Bicin-Gele (Wiltfang *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 2006) erweitert den unteren Massenbereich aber bis auf ca. 1-3 kDa. Ein schöner Nebeneffekt der IEF ist, dass posttranslationale Modifikationen, die den *pI* eines Proteins ändern, sichtbar werden. Bei Modifikationen wie Phosphorylierungen, die das Molekulargewicht nur geringfügig ändern, ergeben sich so nach dem Anfärben perlenschnurartige Spotsmuster in der zweiten Dimension. Von der Vielzahl der verwendeten Färbungen sind Coomassie- und Silberfärbung die gängigsten (Miller *et al.*, 2006). Man kann mit ihnen Sensitivitäten von ca. 50 ng (Coomassie) bzw. ca. 5 ng (Silber) erreichen.

Alternativen für Problemfälle in der 2D-SDS-PAGE sind *doubled* SDS-PAGE (dSDS-PAGE; Rais *et al.*, 2004), 16BAC/SDS- oder CTAB/SDS-Gelsysteme (Hartinger *et al.*, 1996; Navarre *et al.*, 2002) oder das orthogonale SDS-System von Ludwig (Ludwig *et al.*, 1980).

1-D-SDS-PAGE ist aufgrund der zu geringen Trennleistung nur für sehr gut vorfraktionierte Proben geeignet.

Nach Ausschneiden der Spots und einem In-Gel-Verdau findet dann die Proteinidentifikation mittels *peptide mass fingerprint* (PMF) und/oder *MS/MS-Ion Search* bzw. *Sequence Query* statt (siehe Kapitel 3.1.3.5). Prinzipiell ist jedes Massenspektrometer verwendbar, MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF sind aber mit weitem Abstand auf Platz 1.

### 3.1.3.2 LC-basierte *bottom up* Analyse

*MudPit* (*multidimensional protein identification technology, a most unfortunate acronym, since, according to the Webster's New World Dictionary, it conveys the following meaning: Mud: "wet, soft, sticky earth", or even "defamatory remarks, libel or slander"; Pit: "a hole or cavity in the ground", "an abyss", "hell", "any concealed danger, trap, snare"*)

(Righetti *et al.*, 2005a)

Mit diesem ironischen Seitenhieb hat Righetti auf einen einseitigen Vergleich von 2D-SDS-PAGE zugunsten der multidimensionalen Flüssigkeitschromatographie geantwortet (Gygi *et al.*, 2000), natürlich unter Betonung der Stärken und Schwächen beider Techniken. Der LC-basierte Ansatz bedeutet zwar nicht zwangsläufig *MudPit* (*multidimensional protein identification technology*), aber es ist durchaus zulässig ihn als Quasisynonym zu gebrauchen. Durch die von Yates und Washburn (Washburn *et al.*, 2000; Washburn *et al.*, 2001) entwickelte Technik ist nämlich die Hochdurchsatzanalyse (engl. *high-throughput*) mittels HPLC (*High pressure liquid chromatography*) als zweiter Stützpfeiler in der Proteomanalyse extrem populär geworden. Nach enzymatischen Verdau aller Proteine einer Zelle, Organelle, Proteinfraction etc. wird beim klassischen MudPit das Peptidgemisch zunächst an einen stark sauren Kationenaustauscher (*Strong Cation Exchange, SCX*) gebunden und anschließend mit einem stufenweise ansteigenden Salzgradienten schrittweise auf eine RP-Säule (*Reversed Phase*) eluiert. Dort werden die Salzfraktionen dann mit einem Acetonitrilgradienten nach ihrer Hydrophobizität getrennt. Das Eluat der Flüssigkeitschromatographie wird dabei kontinuierlich über eine Elektrospray-Quelle in ein Massenspektrometer überführt (sog. *on-line* Messung). Beim klassischen Versuchsaufbau hat es sich hierbei um eine Quadrupol-Ionenfalle (siehe Kapitel 2.2.5) gehandelt. Heute werden meistens die schnellere lineare Ionenfalle (LIT), ein Quadrupol-o-TOF (qQ-oTOF) oder als

Luxusversion LIT-FT-ICR bzw. LIT-Orbitrap verwendet, um möglichst viele Spektren in der sehr limitierten Messzeit aufzunehmen. Denn das ankommende Eluat enthält zu jedem Zeitpunkt immer noch viele Peptide von unterschiedlichen Proteinen, die möglichst alle mit MS/MS-Experimenten erfasst werden sollen. Die Proteinidentifikation kann daher wie bei allen LC-basierten *bottom up* Analysen nur mittels *MS/MS-Ion Search* bzw. *Sequence Query* (siehe Kapitel 3.1.3.5) erfolgen. Zudem wird eine enorme Datenmenge produziert. Nicht nur, aber auch deswegen wird die Auswertung eine Herausforderung (siehe Kapitel 3.1.3.5).

Inzwischen gibt es selbstverständlich vielfältige Weiterentwicklungen, die auf bestimmte Problemstellungen angepasst worden sind z.B. *Yin-Yang Multidimensional Liquid Chromatography* für die Analyse der Peptidmischung einer Zelle, Organelle etc. unter besonderer Berücksichtigung der phosphorylierten Peptide (Dai *et al.*, 2007). Immer beliebter wird auch die Kombination von 1D-SDS-PAGE und RP-HPLC (Schirle *et al.*, 2003). Nach der Trennung wird das Gel in ca. 50 Stücke aufgeteilt und die Proteine im Gel enzymatisch oder chemisch gespalten. Die erhaltenen Peptidextrakte aus den Fraktionen werden dann auf der RP-HPLC einzeln aufgetrennt. IEF von Protein- oder proteolytisch generierten Peptidgemischen mit nachfolgender RP-HPLC findet auch vermehrt Anwendung (Cargile *et al.*, 2005). Beide Methoden liefern eine wertvolle Zusatzinformation für die Proteinidentifikation, die ansonsten bei RP-HPLC verloren geht: Das ungefähre Molekulargewicht bzw. den *pI*-Bereich der aufgetrennten Fraktion. Das reduziert auf jeden Fall die Anzahl der falsch positiv identifizierten Proteine (siehe Kapitel 3.1.3.5).

Aufgrund des oben erwähnten Zeitproblems bei *on-line* Messungen sind inzwischen auch *off-line* Techniken entwickelt worden. Beim MALDI-Spotting wird alle 10-20 sek. automatisch auf einer Platte das Eluat von der HPLC mit Matrix kristallisiert. So eine Platte kann für bis zu ca. 1500 Spots Platz haben. Diese können danach an einem MALDI-TOF/TOF abgearbeitet werden. Ein Zeitfenster für die MS/MS-Analyse eines bestimmten Peptides wie bei *on-line* Messungen existiert nicht, da die Probe quasi eingefroren ist (Bodnar *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2005). Für Nano-ESI ist von der Firma Advion ebenfalls ein *off-line* System entwickelt worden, auf dessen Funktion hier aber nicht näher eingegangen werden soll (Advion Nanomate 100; Van Pelt *et al.*, 2002).

### 3.1.3.3 Gel-basierte oder LC-basierte *bottom up* Analytik – was ist besser?

Um den Kreis zu schließen und auf die einleitenden Worte des vorangegangenen Kapitels zurückzukommen: Gel-basiert oder LC-basiert? LC-basiert hat sicherlich den Vorteil, dass man hydrophobe, sehr basische, extrem große sowie sehr kleine Proteine einfacher analysieren kann, denn man trennt Peptide (Righetti *et al.*, 2005a; Washburn *et al.*, 2001; Washburn *et al.*, 2003; Speers *et al.*, 2006). Auch die Automatisierbarkeit ist leicht zu realisieren. Man darf aber nicht vergessen, dass aus einem ohnehin schon komplexen Trennproblem durch die Spaltung der Proteine zu Peptiden ein noch komplexeres entsteht. Man verliert immer auch die wertvolle Molekulargewichtsinformation (siehe Kapitel 3.1.3.5), es sei denn man verwendet eine Gel-LC-Kombination, und nur mit 2D-Gelelektrophorese erfolgt auch die Auftrennung und Visualisierung von Proteinisoformen. Die eben genannten Nachteile der LC-basierten Methode sind die Vorteile der gel-basierten und umgekehrt. Der Zeitaufwand ist bei beiden Methoden vergleichbar und multidimensional wird der LC-basierte Ansatz meist auch nicht eingesetzt, sondern nur zweidimensional wie die meisten gelelektrophoretischen Ansätze auch. Die können im Übrigen natürlich auch multidimensional sein (z.B. BN-dSDS-PAGE). Das nur bei LC vorhandene Zeitproblem wird man durch die *off-line* Methoden zukünftig auch immer besser in den Griff bekommen (siehe Kapitel 3.1.3.2). Und wenn man die harten Fakten anschaut, ist auch die Trennleistung bei beiden Strategien gleich, wenn die Methoden auf das jeweilige Problem angepasst werden (Görg *et al.*, 2004; Righetti *et al.*, 2005b; Issaq *et al.*, 2005). Trotzdem identifiziert man mit LC-basierten Methoden meistens mehr Proteine, dafür ist die Gelstrategie bei der Identifizierung von Proteinisoformen beispielsweise wesentlich besser (Li *et al.*, 2005; Hunzinger *et al.*, 2006). Außerdem ist neben einer Schnittmenge an Identifikationen ein beträchtlicher Anteil nicht gleich, was den parallelen Einsatz unterschiedlichster Methoden rechtfertigt (Li *et al.*, 2005). Die Gründe hierfür sind vielfältig, z.B. führt alleine schon der Wechsel von ESI (*on-line*) zu MALDI (*off-line*) bei Beibehaltung der LC-Trennmethode zu den im vorangegangenen Satz erwähnten Unterschieden und somit zusätzlichen Informationen (Bodnar *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007). Als Quintessenz gilt daher inzwischen, dass eine Kombination von Techniken entscheidend für das effektive Graben nach niedrig exprimierten und problematischen Proteinen unterhalb der Eisbergspitze ist.

### 3.1.3.4 Enzymatische und chemische Spaltung

*God made trypsin for the mass spectrometrists.* (Pappin *et al.*, 1993)

Grundlage der erfolgreichen *bottom up* Analyse ist eine effektive Zerkleinerung der Proteine in einer Gelmatrix bzw. in Lösung. Die optimale Peptidmasse liegt dabei im Bereich 800 – 3500 Da. Wie schwierig es sein kann, die Peptide quantitativ ins Massenspektrometer zu überführen, soll hier auch kurz aufgezeigt werden.

Wie der Ausspruch von Darryl Pappin schon vermuten lässt, *everybodies darling* in der Proteomanalyse ist Trypsin, das Proteine hochspezifisch C-terminal nach den Aminosäuren Arginin und Lysin schneidet (Olsen *et al.*, 2004a). Für PMF (*peptide mass fingerprint*) ist Trypsin deshalb die optimale Wahl (siehe Kapitel 3.1.3.5). Außerdem generiert es für den Großteil der Proteine genügend theoretische Peptide im optimalen Massenbereich. In der Realität ist zwar nur ein Bruchteil der theoretischen Peptide präsent, diese tryptischen Fragmente reichen aber meistens noch aus, um die Proteinsequenz zu 30 bis 50% abzudecken. Da basische Peptide auch leicht protoniert werden, sind sie mit ESI und MALDI gut ionisierbar und folglich mit jedem Massenspektrometer leicht detektierbar. Das C-terminale Arginin bzw. Lysin bietet außerdem Vorteile beim Fragmentieren von Peptiden. Insbesondere Peptide mit C-terminalen Arginin sind bei MALDI-MS klar bevorzugt (Krause *et al.*, 1999; Schlosser *et al.*, 2005). Deshalb gibt es inzwischen schon Strategien, um Peptide mit einem C-terminalen Lysin konkurrenzfähig zu machen, z.B die Umwandlung in Homoarginin mit O-Methylisoharnstoff (Beardsley *et al.*, 2000; Hale *et al.* 2000; Keough *et al.*, 2000).

Eher selten werden die spezifischen Enzyme Endoproteinase Glu-C (Enzymspezifität: E, teilweise D (pufferabhängig), C-terminal; Running *et al.*, 2007), Endoproteinase Asp-N (Enzymspezifität: D, N-terminal; Matsumoto *et al.*, 2006), Endoproteinase Lys-C (Enzymspezifität: K, C-terminal; Stroop, 2007) oder Endoproteinase Arg-C (Enzymspezifität: R, C-terminal; da Cunha *et al.*, 2006) eingesetzt. Der Einsatz von Arg-C und Lys-C hat aber keine Vorteile gegenüber Trypsin, es sei denn man möchte ein extrem basisches Protein analysieren, bei dem in einem Verdau mit Trypsin zu viele kleine Fragmente entstehen würden. Der seltene Einsatz dieser Proteasen rührt wahrscheinlich auch daher, dass Peptide mit einem C-terminalen Arginin für die massenspektrometrische Analyse mit MALDI so gut geeignet sind (siehe oben). Eine Kombination der Verdaudaten von Trypsin und diesen alternativen Proteasen kann aber die Sequenzabdeckung wesentlich verbessern (Wa *et al.*, 2006).

Enzyme mit geringerer Spezifität wie Proteinase K (Wu *et al.*, 2003a; Wu *et al.*, 2003b), Pepsin (Han *et al.*, 2004), Elastase (Schlosser *et al.*, 2002) oder Chymotrypsin bzw. die Kombination von Trypsin und Chymotrypsin (Fischer *et al.*, 2006a) kommen vergleichsweise sehr selten zum Einsatz, z. B. wurden Proteinase K, Pepsin bzw. die Trypsin-Chymotrypsin-Kombination für Membranproteine (siehe auch Kapitel 3.2.2) und Elastase für die Analyse von phosphorylierten Proteinen eingesetzt. Die Datenlage über gesicherte Schnittpositionen ist außer für Chymotrypsin (FWY) aber sehr dünn, weshalb nur *MS/MS-Ion Search* oder *Sequence Query* zur Identifikation sinnvoll sind (siehe Kapitel 3.1.3.5). Trotzdem scheint der sporadische Einsatz seltsam, weil Morris und Batley bereits 1974 prophezeit haben, dass Elastase in der Zukunft ein hervorragendes Enzym für massenspektrometrische Untersuchungen sein könnte (Morris *et al.*, 1974). Bei allen unspezifischen Enzymen wird zudem auch das Potential von 100% Sequenzabdeckung diskutiert (McCoss *et al.*, 2002), was die Tür zu einer wesentlich seriöseren Charakterisierung von Proteinen hinsichtlich Modifikationen und Isoformen öffnen würde.

Chemische Spaltungen werden ebenfalls nur sporadisch eingesetzt. Es gibt die Möglichkeit an Asparaginsäure, Methionin, Cystein, und Tryptophan spezifisch zu spalten. Für eine hohe Spezifität und Effektivität muss aber auch hier wie bei Enzymen das richtige Puffersystem verwendet werden (Sutphen *et al.*, 2006). Auch die unspezifische Spaltung durch Säurehydrolyse hat fast keine Bedeutung (Swatkoski *et al.*, 2007). Praktisch angewendet wird eigentlich nur eine Kombination von Cyanobromid mit Trypsin z. B. für Membranproteine (siehe auch Kapitel 3.2.2; van Montfort *et al.*, 2002). Als eine Art Zusammenfassung soll abschließend auf eine interessante theoretische Betrachtung von Fischer und Poetsch hingewiesen werden, die das Potential von Enzymen und chemischen Reagenzien bzw. von unterschiedlichen Kombinationen für die *bottom up* Analyse von verschiedenen Proteomen berechnet hat (Fischer *et al.*, 2006b). Sie kommen beispielsweise zu dem Schluss, dass die Kombination von Chymotrypsin und Endoproteinase Glu-C theoretisch bei vielen Membranproteomen sehr gute Ergebnisse liefern würde.

Neben der Suche nach neuen geeigneten Enzymen oder chemischen Spaltungsreagenzien ist die Suche nach effektiveren Verdaumethoden zur Erzielung kürzerer Verdauezeiten und/oder höherer Sequenzabdeckung ein anderer Schwerpunkt. Die Effektivitätssteigerung versucht man beispielsweise durch Zusatz von Methanol (Blonder *et al.*, 2002; Goshe *et al.*, 2003; Blonder *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2006a) oder Detergenzien (Katayama *et al.*, 2001; van Montfort *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2003; Suder *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2004) bei Membranproteinen, durch Mikrowelleneinsatz

(Pramanik *et al.*, 2002; Vesper *et al.*, 2005; Juan *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006), durch Temperaturoptimierung und Enzymmodifikationen wie Alkylierung oder Glykosylierung (Havelis *et al.*, 2003) zu erreichen. Eine spontan etwas seltsam anmutende Idee soll hier auch kurz angesprochen werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Einpolymerisieren von Membranproteinen in eine Gelmatrix einen effektiveren enzymatischen Verdau ermöglicht (Lu *et al.*, 2005), da die Sequenzabdeckung wesentlich verbessert werden konnte. Warum ist diese Idee auf den ersten Blick schwer nachvollziehbar? Häufig sind bei niedrigen Proteinmengen im Gel keine Peptide nach einem Trypsinverdau im Gelextrakt massenspektrometrisch detektierbar, obwohl die eingesetzte Proteinmenge noch ausreichend weit über der Detektionsgrenze jedes modernen Massenspektrometers gelegen hat. Speicher *et al.* (2000) haben zwar bereits gezeigt, dass Peptide mit 70% Effektivität aus einem Gel extrahiert werden können, dafür aber vergleichsweise hohe Proteinmengen eingesetzt werden müssen. Von Lu *et al.* (2005) wurden sogar noch wesentlich höhere Mengen verwendet. Die Ergebnisse sind deshalb zwar nachvollziehbar, die Anwendbarkeit der Methode dürfte aber begrenzt sein, da so viel Protein für eine Analyse häufig nicht zur Verfügung steht.

#### 3.1.3.5 Auswertung von *bottom up* Analysen

*Da steh ich nun, ich armer Tor,  
und bin so klug als wie zuvor.* (aus Faust I, J. W. von Goethe)

Ähnlich wie Faust, der getrieben von innerer Unruhe nach der Erkenntnis, wie schwer die Natur doch zu verstehen ist, diese inzwischen geflügelten Worte herausschreit, könnte es der Proteomforscher bei der Auseinandersetzung mit den MS-Daten auch tun. Denn es kann schnell passieren, dass man nach Auswertung mit den klassischen Methoden *Peptide Mass Fingerprint* (PMF), *MS/MS-Ion Search* und *Sequence Query* nicht viel klüger da steht als vorher. Deshalb werden auch einige Erweiterungen angesprochen, die uns vom *armen Tor* vielleicht schon zum *Tor* werden lassen.

### 3.1.3.5.1 *Peptide Mass Fingerprint (PMF)*

*Peptide Mass Fingerprint (PMF)* ist die einfachste Methode, um ein Protein zu identifizieren (Henzel *et al.*, 1989; Henzel *et al.*, 1993; Pappin *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 1993; Henzel *et al.*, 2003). Wie der Name schon vermuten lässt, ist jedes MS-Spektrum einer enzymatischen oder chemischen Spaltung einzigartig für ein Protein, wie es der Fingerabdruck eines Menschen auch ist. Aber genauso, wie es schwierig wird, den richtigen Mörder auszumachen, wenn zu viele Fingerabdrücke am Tatort sind, ist es fast nicht möglich signifikante Identifikationen zu bekommen, wenn noch mehrere Proteine vor der Proteolyse nebeneinander vorliegen. Deshalb funktioniert PMF auch nur bei gel-basierten Analysen, aber auch nur dann, falls die Trennleistung ausreichend hoch gewesen ist. Ansonsten würden sich zu viele Proteine hinter einem Spot verbergen, oder bildlich gesprochen, sich zu viele Fingerabdrücke am Tatort überlagern. Beim LC-basierten *bottom up* Ansatz kann PMF natürlich überhaupt nicht funktionieren, da durch die Proteinspaltung vor der Trennung ein MS-Spektrum zu einem bestimmten Zeitpunkt nur Signale enthält, die zu den unterschiedlichsten Proteinen gehören. Um wie viele Signale es sich noch handelt, ist von der Leistungsfähigkeit der verwendeten Trennstrategie abhängig. Die Situation ist mit einer Mischung von Puzzleteilen aus Puzzeln mit unterschiedlichen Motiven vergleichbar, aus der man 10 Teile willkürlich herausnimmt, und dann versucht zu beantworten, zu welchen Motiven die 10 Teile gehören.

Aber selbst wenn die Proteinmischung gut aufgetrennt worden ist, wird die Identifikation mittels PMF sehr schwierig oder unmöglich, wenn das MS-Spektrum des enzymatischen oder chemischen Verdau zu keinem Datenbankeintrag passt. Oder um auf das Beispiel der Mördersuche zurückzukommen: Für den Fingerabdruck am Tatort wird niemand in der Verbrecherdatei gefunden. Die Verbrecherdateien in der Proteomforschung sind die Proteindatenbanken eines Organismus, die die Sequenz jedes Proteins im FASTA-Format enthalten. Voraussetzung für die Vollständigkeit der Proteindatenbank ist die komplette Sequenzierung des Organismus. Die Fehlerrate liegt aber hier bei ca. 1 Nukleotid/kb, die aber inzwischen durch unterschiedliche Korrekturstrategien immer geringer wird (Roberts *et al.*, 1991; Clark *et al.*, 1992; Gajer *et al.*, 2004). Die codierenden Sequenzen können dann in Proteinsequenzen übersetzt werden. Das bedeutet aber, dass Proteine aus Splicing und mit posttranslationalen Modifikationen nicht berücksichtigt sind (Godovac-Zimmermann *et al.*, 2005). Und natürlich ist eine eindeutige Übersetzung auch nicht immer möglich. Es befinden sich also auch Fingerabdrücke in der Datenbank, die mehr oder weniger nicht mit dem Zustand in der Realität übereinstimmen (unscharfer Fingerabdruck). Beim PMF werden jetzt

alle Proteineinträge einer Datenbank theoretisch verdaut, und die theoretischen Spektren mit dem gemessenen verglichen d.h. man vergleicht die gemessene Massenliste mit allen theoretisch möglichen Massenlisten der Datenbank. Wenn also der Organismus nur teilweise sequenziert ist, kann es sein, dass das gesuchte Protein fehlt. Eine Identifizierung wird unmöglich. Handelt es sich um einen fehlerhaften Proteineintrag, eine gespleißte oder modifizierte Variante (unscharfer Fingerabdruck), kann PMF noch funktionieren oder auch nicht. Das hängt davon ab, wie gut das reale Spektrum mit dem theoretischen noch übereinstimmt. Erschwerend kommt noch hinzu, dass der reale Verdau eines Proteins nur einen Bruchteil der theoretisch möglichen Fragmente ergibt. Die Schuld hierfür liegt aber nicht nur am Verdau selbst (siehe auch Kapitel 3.1.3.4). Der reale Fingerabdruck, der am Tatort gefunden wird, ist also alles andere als vollständig. Bei einer hohen Massengenauigkeit (30 – 50 ppm) und in Abhängigkeit von der Proteingröße können aber 4 – 6 Signale im realen Massenspektrum schon ausreichen, die zum theoretischen Verdau eines Datenbankeintrages passen (Mann *et al.*, 1993). Also ein sehr kleiner Ausschnitt vom Fingerabdruck reicht zur Zuordnung aus. Stimmt deshalb bereits nur so ein kleiner Bereich des realen Fingerabdrucks mit einem unscharfen Fingerabdruck der Datenbank überein, ist auch eine Identifikation bei fehlerhaften Proteineinträgen, gespleißten oder modifizierten Proteinen möglich.

Eine Grundvoraussetzung für PMF ist leider aber immer noch ein spezifischer Verdau. Weniger spezifische Enzyme kreieren zu viele mögliche theoretische Fragmente für ein Protein, weshalb neben dem richtigen Kandidaten viele andere Einträge einer Datenbank ebenfalls gut auf das gemessene Spektrum passen (falsch positive Identifikationen). Eine eindeutige Zuordnung zum richtigen Eintrag ist nicht mehr realisierbar. Aufgrund der bereits besprochenen Eigenschaften ist das Enzym Trypsin daher die erste Wahl (siehe Kapitel 3.1.3.4).

Neben dem von Perkins *et al.* entwickelten Suchalgorithmus (MOWSE: Molecular Weight Search) gibt es inzwischen einige Alternativen z.B. MS-Fit, Profound, Aldente (Palagi *et al.*, 2006). Das auf MOWSE basierende Mascot ist aber immer noch die Nummer eins (Perkins *et al.*, 1999). Das Prinzip ist bei allen Suchalgorithmen das bereits beschriebene, der Vergleich einer gemessenen Massenliste mit allen möglichen theoretischen Massenlisten einer Datenbank. Unterschiedlich ist die Art und Weise, wie beurteilt wird, ob eine Identifikation signifikant richtig ist. Vor dem Massenvergleich muss man aber einige Einstellungen vornehmen, die ebenfalls bei allen Suchprogrammen sehr ähnlich sind, z. B. permanente Modifikationen, variable Modifikationen wie Phosphorylierungen, Massengenauigkeit etc. (Thiede *et al.*, 2005). MOWSE gruppiert dann die gemessenen Massen, die mit theoretischen

Massen eines Proteins übereinstimmen, in relevante (*scoring matches*) und nicht-relevante Treffer (*non-scoring matches*). Nicht-relevant sind alle Massenübereinstimmungen, die auf variablen Modifikationen basieren, es sei denn die Masse des unmodifizierten Peptides ist auch vorhanden. Nicht passende Massen werden bei der Suche nicht berücksichtigt. Abhängig von der Datenbankwahl und der Organismuseinstellung (d.h. der Anzahl der Proteineinträge), der erlaubten Anzahl von überlesenen Schnittstellen (*missed cleavage sites*), dem ausgewählten Enzym, den gesetzten variablen Modifikationen und der Massengenauigkeit, kann die Anzahl an theoretisch möglichen Verdaufragmenten in dem gegebenen Fehlerbereich für einen gemessenen Massenwert ermittelt werden, z.B. bei 1 Da Massengenauigkeit für die gemessene Masse 1001 Da die Anzahl der theoretisch möglichen Fragmente im Bereich 1000 bis 1002 Da. Daraus lässt sich dann natürlich berechnen, wie wahrscheinlich die gemessene Masse einem Protein in diesem Massenfenster zugeordnet werden kann. Falls z. B. 100 Proteine aller Datenbankeinträge eine Masse nach theoretischem Verdau innerhalb des Fehlerbereiches 1000 bis 1002 Da ergeben, ist die Wahrscheinlichkeit eines richtigen Treffers für ein Protein 1%. Aus der Summe aller Wahrscheinlichkeiten von relevanten Treffern (*scoring matches*) für ein Protein lässt sich mit einer gewissen Irrtumswahrscheinlichkeit (meistens 5%) ermitteln, ob die Proteinzuzuordnung signifikant richtig ist. Zusätzlich kann auch noch gegen eine randomisierte Datenbank gesucht werden. Solch eine Suche liefert einen Anhaltspunkt dafür, wie hoch der prozentuale Anteil an falsch positiv identifizierten Proteinen in einem Datensatz ist. Randomisierte Datenbanken werden aber eher nicht bei PMF-Suchen, sondern beim *MS/MS-Ion Search* von LC-basierten *bottom up* Analysen eingesetzt (siehe Kapitel 3.1.3.5.2).

Die Strategie des MOWSE-Suchalgorithmus zur Signifikanzbeurteilung führt aber dazu, dass besonders die Berücksichtigung vieler variabler Modifikationen, der Einsatz weniger spezifischer Enzyme oder ein hoher Wert für *missed cleavage sites* die Wahrscheinlichkeit für einen richtigen Treffer in einem Fehlerbereich extrem reduziert (im Beispiel: 1%), da die Anzahl der theoretisch möglichen Massen rasch explodiert (im Beispiel: 100). Die Menge der Proteineinträge hat zwar auch Einfluss, ist bei weitem aber nicht so kritisch. Eine Suche mit vielen variablen Modifikationen ist aber meistens nicht notwendig, wie z.B. Phosphorylierung an S, T und Y. Hier ist es sinnvoll zuerst ohne Modifikationen zu suchen, was meistens auch das richtige Protein identifiziert (siehe weiter oben, unscharfer Fingerabdruck). Nachträglich kann man dann Modifikationen einfacher zuweisen, da man nur noch mit einer Proteinsequenz vergleichen muss. Falls jetzt immer noch eine hohe Anzahl an gemessenen Massenwerten nicht signifikant einem Protein zugeordnet worden ist, kann man

mit nur diesen Werten noch einmal suchen (Jensen *et al.*, 1997). In aller Regel sind aber mehr als drei Proteine nebeneinander nicht signifikant nachweisbar. Schwer identifizierbar sind auch kleine Proteine (>10 kDa), da sie bei spezifischen Verdauungen nur wenige Peptide generieren. Dadurch wird es bei der beschriebenen Strategie zur Signifikanzbeurteilung schwerer über die Hürde zu springen, da nur wenige *scoring matches* zur Verfügung stehen. Nicht lösbar ist mit MOWSE die Suche mit weniger spezifischen Enzymen. Hervorragend arbeitet Mascot für Enzyme mit zwei Schnittstellen und einem Wert für *missed cleavage sites* von bis zu 2. Bei weniger spezifischen Enzymen benötigt man aber in beiden Fällen wesentlich höhere Werte. Daher erhält man auch meistens keine signifikanten Treffer, selbst bei sehr guten Massenspektren mit einer hohen Massengenauigkeit (5-10 ppm).

Die anderen Suchmaschinen MS-Fit, ProFound und Aldente ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) bieten teilweise mehr Einstellungsmöglichkeiten, die für Mascot erläuterten Probleme werden aber auch nicht gelöst. Eine sinnvolle zusätzliche Einstellungsmöglichkeit bei Aldente (Tuloup *et al.*, 2003) ist beispielsweise, dass auch die Intensität der Signale bei der Suche berücksichtigt werden kann. Die Intensität von Signalen für ein bestimmtes Peptid vorherzusagen, um ihr dann einen Zahlenwert für die Berechnung eines *Scores* zuzuweisen, ist aber schwierig. Um die Intensität in die PMF-Suche mit einfließen zu lassen, gibt es aber inzwischen schon einige weiterführende Bemühungen (Gay *et al.*, 2002; Parker, 2002; Monigatti *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2007). Die stabilen Methoden basieren aber alle sinnvollerweise auf Suchen gegen Datenbanken mit Referenzspektren, was natürlich die Identifikation von unbekanntem Proteinen nicht möglich macht.

#### **3.1.3.5.2 MS/MS-Ion Search**

*Interpretation of proteomic data remains a possible bottleneck in the identification of proteins using the MudPIT technique* (Yates III in Delahunty *et al.*, 2005)

*MS/MS-Ion Search* ist natürlich nicht beschränkt auf MudPIT bzw. LC-basierte *bottom up* Analysen, sondern wird auch bei gel-basierten standardmäßig gebraucht, um Identifikationen mittels PMF zu bestätigen oder nicht zugeordnete Signale Proteinen oder Modifikationen bzw. Spleißvarianten zuzuordnen. Die Strategie ist bei allen Suchprogrammen wie schon beim PMF ziemlich ähnlich, aber bei der Bewertung der Signifikanz einer Identifikation gibt es auch hier die wesentlichen Unterschiede. Die beliebtesten

Suchalgorithmen unter vielen sind SEQUEST (Delahunty *et al.*, 2005) und Mascot (Perkins *et al.*, 1999). Zunächst wird beim *MS/MS-Ion Search* immer die *Precursor*-Masse mit allen Massen verglichen, die durch theoretischen Verdau der Proteineinträge in der ausgewählten Datenbank (z.B. NCBI, Organismus Ratte) entstehen können. Von allen zugeordneten Massen im festgesetzten Fehlerbereich wird von jeder zugehörigen Peptidsequenz ein theoretisches MS/MS-Spektrum erzeugt. Abhängig vom verwendeten Massenspektrometer sind unterschiedliche Brüche entlang der Peptidkette zu erwarten (Wysocki *et al.*, 2005), was natürlich heute bei der Erzeugung der theoretischen MS/MS-Spektren berücksichtigt wird. Meistens gibt es aber auch eine Standardeinstellung (*default*), die auf alle Geräte einigermaßen gut passt. Das MS/MS-Spektrum, das am besten mit den theoretischen Ionen-Serien übereinstimmt, hat die höchste Wahrscheinlichkeit richtig zu sein. Bei der Gewichtung der unterschiedlichen Serien liegen dann auch die Hauptunterschiede der Suchalgorithmen, worauf aber hier nicht näher eingegangen werden soll. Es soll nur darauf hingewiesen werden, dass alle Algorithmen Schwierigkeiten mit der Beurteilung der Höhe der Wahrscheinlichkeit haben, wie leicht ein bestimmtes Fragment gebildet wird, da noch nicht genug Regeln hierzu bekannt sind [z.B. Fragmentierung von X-Pro-Bindungen (X, beliebige Aminosäure); Brexi *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Tabb *et al.*, 2004; Tabb *et al.*, 2003]. Zwei der wichtigsten Hauptkriterien für einen möglichst signifikanten Treffer sind daher die Massengenauigkeit des *Precursor* oder die Enzymauswahl. Eine hohe Massengenauigkeit des Vorläuferions oder ein spezifisches Enzym wie Trypsin garantiert weniger passende Massen beim theoretischen Verdau der Datenbank und somit weniger theoretische MS/MS-Spektren. Auch schlechte MS/MS-Spektren d.h. solche, die noch nicht einmal kurze Ionenserien, sondern nur einzelne Fragmentationen enthalten, können so zu signifikanten Identifikationen führen. Und schlechte Spektren sind die Regel und nicht die Ausnahme. Deshalb sind FT-ICR und Orbitrap mit Massengenauigkeiten von ca. 1 ppm für die *Precursor*-Masse Mittel der Wahl, wenn keine Enzymspezifität angegeben werden kann (siehe Kapitel 2.2.5). Auch führt die Interpretation der MS- und MS/MS-Daten von LC-basierten *bottom up* Analysen dieser Instrumente zu deutlich mehr signifikanten Proteinidentifizierungen und weniger falsch positiv identifizierten Proteinen (Olsen *et al.*, 2004). Die Auswertungsgeschwindigkeit wird außerdem auch verbessert, was kein unwichtiger Faktor ist. Bei einer MudPIT-Analyse werden beispielsweise mehr als 70000 MS/MS-Spektren aufgenommen. Je weniger theoretische Spektren aufgrund einer genauen *Precursor*-Masse verglichen werden müssen, desto schneller ist die Auswertung natürlich. Zusammengefasst mit der Abhängigkeit von den Computerressourcen und der Grösse der Datenbank kann die Auswertung sonst von einigen

Stunden auf einige Tage für eine MudPIT-Analyse anwachsen. Immer ist dann zusätzlich eine sehr mühselige manuelle Durchsicht der Daten an der Signifikanzgrenze nötig, die leider immer noch einen beträchtlichen Anteil ausmachen und häufig die interessanten Informationen enthalten. Die Gruppe von Andrej Shevchenko hat aber eine Strategie entwickelt, mit der sie durchschnittlich 70% der grenzwertigen Identifikationen automatisch verifizieren konnten (Wielsch *et al.*, 2006). Außerdem lässt sich letztendlich auch nur ein geringer Bruchteil von den aufgenommenen Spektren Proteinen zuordnen (ca. 20% laut Sadygov *et al.*, 2004). Wenn man *on-line* durch *off-line* Messung austauscht, verbessert sich die Situation des Datenmülls deutlich (Bodnar *et al.*, 2003). *Off-line* Messungen sind aber noch nicht so weit verbreitet, da es sich noch um eine relativ neue Technik handelt. Auch ist es allgemein anerkannt, dass zwei identifizierte Verdaufragmente, die zu einem Protein gehören, zur Proteinidentifikation ausreichen. Bei zwei wirklich signifikanten MS/MS-Spektren ist das auch absolut legitim. Um falsch positive Identifikationen zu vermeiden, wird aber heute der Datensatz zusätzlich noch gegen eine randomisierte Datenbank gesucht (Elias *et al.*, 2005). Bei den Gel-LC-Kombinationen hilft die zusätzliche Information von *pI* oder Masse besonders Daten an der Signifikanzgrenze schneller und sicherer als richtig oder falsch zu beurteilen (siehe Kapitel 3.1.3.2).

Auch die Herausforderung, den Datenmüll beim *MS/MS-Ion Search* von LC-basierten Analysen zu reduzieren, ist inzwischen angegangen worden. Beispielsweise überprüft man alle nicht zugeordneten MS/MS-Spektren auf alle bekannten posttranslationalen Modifikationen (gelisted in UNIMOD; [www.unimod.org](http://www.unimod.org)) gegen eine Subdatenbank, die alle bereits identifizierten Proteine enthält (Tanner *et al.*, 2006; Savitski *et al.*, 2006). Gegen eine normale Datenbank wäre das aufgrund der Anzahl der Proteineinträge nicht möglich. Auch sind die Filtermechanismen zum Entfernen von zu schlechten MS/MS-Spektren vor der eigentlichen Datenbanksuche sehr verbessert worden (Delahunty *et al.*, 2005).

Man kann sich Yates Worten daher nur anschließen, dass die Schwächen der ansonsten guten Technik besonders in der Interpretation zu suchen sind.

#### **3.1.3.5.3 Sequence Query**

Das Prinzip der *Sequence Query*-Suche basiert auf einer Idee von Matthias Mann (Mann *et al.*, 1994). Die Suche mit kurzen Aminosäuresequenzen (sog. *sequence tags*) gegen eine Datenbank identifiziert in aller Regel das richtige zugehörige Protein, insbesondere wenn man

Zusatzinformationen wie *pI* und/oder die Masse des Proteins hat. Die Aminosäuresequenzen kann man dabei aus MS/MS-Spektren von Peptiden manuell oder mit Hilfe von Algorithmen automatisch ermitteln (*de-novo-sequencing*; Palagi *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2005; Wysocki *et al.*, 2005). Die manuelle und/oder automatische *De-Novo*-Sequenzierung resultiert aber nur bei MS/MS-Spektren hoher Qualität in sinnvollen Ergebnissen, d.h. intensive Fragmentationensignale, klare Ionenserien (z.B. *y*-Serie) und gute Massengenauigkeit der einzelnen Fragmentationen (100 - 300 mDa). Am besten ist natürlich ein Instrument mit einer hohen Auflösung und Massengenauigkeit der Fragmentationen (1 – 10 ppm; FT-ICR bzw. Orbitrap). Damit sind auch MS/MS-Spektren von Proteinen, die im Vergleich zu Peptiden hochkomplexe Fragmentspektren ergeben, auswertbar (*top down*, siehe Kapitel 3.1.3.6).

Die Identifikation mit *sequence tags* bietet besonders bei gar nicht oder unvollständig sequenzierten Organismen Vorteile. Da *MS/MS-Ion Search* gegen theoretisch berechnete MS/MS-Spektren sucht, kann der Austausch einer Aminosäure das Fragmentationenspektrum häufig so ändern, dass eine signifikante Identifikation nicht mehr möglich ist. Abhängig von der Länge des *sequence tags* ist selbst der Austausch mehrerer Aminosäuren in einem homologen Protein an der entsprechenden Stelle für eine korrekte Zuordnung häufig kein Hindernis. Eine *Sequence Query*-Suche gegen eine Datenbank eines Organismus mit befriedigender Homologie zur nicht oder nur teilweise sequenzierten Spezies würde daher signifikante Ergebnisse liefern. Die Anforderungen an die MS/MS-Spektrenqualität sind aber höher als beim *MS/MS-Ion Search*.

#### **3.1.3.6 Top down Analyse**

*While protein mass is fundamentally informative, it alone is generally not useful in identifying an a priori unknown protein* (McLuckey in Reid *et al.*, 2002)

Die Masse allein verkleinert zwar immer die Anzahl der möglichen Proteine, aber Spleißen und posttranslationale Modifikationen sind zwei Ursachen für den Unterschied der gemessenen Masse zu dem von der Datenbank vorhergesagten Wert. Sequenzinformation ist daher notwendig. Prinzipiell kann man diese auch durch Fragmentieren ganzer Proteine mit jedem Massenspektrometer erhalten. Sinnvoll ist das aber nur für Geräte die MS/MS-Spektren von Proteinen in sehr hoher Qualität produzieren. Ein FT-ICR erfüllt die Anforderungen voll, Quadrupol-o-TOF und TOF/TOF nur bedingt (Reid *et al.*, 2002). Die Orbitrap kann

wahrscheinlich auch eine gute Alternative zum FT-ICR werden (Macek *et al.*, 2006; Scigelova *et al.*, 2006). Aber ohne MS/MS-Spektren von hervorragender Qualität ist eine sinnvolle Auswertung nicht realisierbar. Wenn der Fortschritt in der Kopplung von Massenspektrometrie mit der chromatographischen Trennung unverdauter Proteine weiterhin voranschreitet, können *top down* Analysen zukünftig eine konkurrenzfähige Alternative zu *bottom up* werden. Die Geschwindigkeit bei der Fragmentierung von Proteinen in hochauflösenden Massenspektrometern müsste dafür aber noch zunehmen. Außerdem sollte die Trennleistung der chromatographischen Methoden für Proteine noch erheblich verbessert werden. Die gestartete Etablierung von zweidimensionalen Trennungen ist aber ein erster Schritt in die richtige Richtung (Simpson *et al.*, 2006). Die Datenauswertung ist aber immer noch extrem schwierig. Die Artikel zur ProSight-Software von Kelleher geben einen guten Überblick über die Strategien und Herausforderungen (LeDuc *et al.* 2004; Zamdborg *et al.*, 2007). Ein Review von 2005 über *top down* und *bottom up* mittels FT-ICR fasst die Vor- und Nachteile beider Strategien gut zusammen (Bogdanov *et al.*, 2005). Ein kleiner Schritt in die richtige Richtung ist die Erweiterung des Massenbereichs auf 200 KDa durch McLafferty's Gruppe (Han *et al.*, 2006b). Es wird aber wohl noch eine Weile dauern, bis *top down* eine breit angewendete Technik wie *bottom up* wird (Wysocki *et al.*, 2005).

### 3.2 Membran Proteomics

*Lieber begeistert hoffen und wieder auf die Schnauze fallen, als tatenarm und gedankenvoll jammern* (Wolf Biermann, Weilheimer Hefte zur Literatur, Nr. 37)

Da ca. 30% des menschlichen Genoms Membranproteine kodieren (Wallin *et al.*, 1998), ist die Notwendigkeit schnell erkannt worden, sich mit dieser speziellen Proteinklasse tiefer auseinander zu setzen. Obwohl zu den bereits angesprochenen Herausforderungen bei Membranproteinen nur der amphiphile Charakter hinzukommt, ist sehr schnell klar geworden, dass sie gerade deswegen in der Proteomanalyse extrem unterrepräsentiert sind.

Periphere Membranproteine sind aber meistens unproblematisch, da sie entweder nur mit einem hydrophoben Anker (Lipid oder hydrophobe Aminosäuren) mit der Lipidmembran oder direkt bzw. indirekt (d.h. über ein oder mehrere Proteine) mit einem integralen Membranprotein assoziiert sind. Sie sind also noch weitestgehend hydrophil. Integrale Membranproteine sind dagegen in die Lipiddoppelschicht eingelagert. In der Primärsequenz

wecheln sich daher hydrophobe und hydrophile Abschnitte ab, was abhängig von der Proteingröße und Anzahl der Transmembransegmente einen ausgeprägten amphiphilen Charakter bedingt. Hinsichtlich der Sekundärstruktur lassen sich die eingelagerten Aminosäureabschnitte in  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter aufteilen (Wallin *et al.*, 1998).  $\alpha$ -Helices sind aber das dominierende Strukturmotiv. Die verbindenden hydrophilen Abschnitte (engl. *loops*) haben meistens keine Sekundärstruktur. Alternativ dazu können sich mehrere Transmembranabschnitte mit  $\beta$ -Faltblattstruktur zu einem Zylinder gruppieren (sog.  $\beta$ -Fass). Verwirklicht ist dies bei den Porinen, die so eine Pore in der Membran für den Stoffaustausch ausbilden können, z.B. Aquaporine für den Wassertransport durch die Membran. Für die Vorhersage von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern anhand der Proteinsequenz sind inzwischen verschiedenste Algorithmen verfügbar, die zwar recht zuverlässig sind, aber natürlich nur einen Strukturhinweis geben können (Moller *et al.*, 2001; Krogh *et al.*, 2001; Bigelow *et al.*, 2004).

Die Hydrophobizität von Membranproteinen wird meistens mit dem GRAVY-Score (*grand average hydropathy*) abgeschätzt (Kyte *et al.*, 1982). Je positiver der GRAVY-Score desto hydrophober ist ein Protein. Integrale Membranproteine mit  $\beta$ -Faltblättern resultieren dabei im Vergleich zu solchen mit  $\alpha$ -Helices häufiger in einem moderateren GRAVY-Score (Santoni *et al.*, 2000). Nicht immer, aber in vielen Fällen führt aber ein positiver GRAVY-Score (größer 0.4) dazu, dass man mit konventionellen Proteomicsstrategien zunächst bei der Suche nach neuen Erkenntnissen auf die Schnauze fällt (Pederson *et al.*, 2003). Die vielfältigen Alternativen müssen den Optimisten aber begeistert hoffen lassen, während der Pessimist bei der Vorstellung gedankenvoll jammert, was alles variiert werden kann.

#### **3.2.1 Detergenzien**

Der amphiphile Charakter von Membranproteinen macht den Einsatz von Detergenzien notwendig, um ein Aggregieren und Ausfallen zu vermeiden. Der Detergenzienwahl kommt daher bei der Isolation von Membranproteinen, Membranproteinkomplexen oder noch größeren Membranassoziaten eine hohe Bedeutung zu. Grob unterscheidet man nicht-ionische, ionische und zwitterionische Detergenzien. Damit eine Solubilisierung erfolgreich ist, muss die eingesetzte Konzentration aber mindestens über der kritischen Mizellenkonzentration (CMC, engl. *critical micelle concentration*) liegen, d.h. die Konzentration muss so hoch sein, dass sich Mizellen in dem Lösungsmittel ausbilden.

Daneben sind natürlich auch pH-Wert und die Ionenstärke der Lösung zwei weitere wichtige Faktoren. Die Wahl des Solubilisierungsmediums entscheidet letztendlich darüber, ob die Aufreinigung vollständig ist oder ob man assoziierte Proteine verliert (Hunte *et al.*, 2003; Taylor, 2000; Howell, 1982). Allgemeine Vorschriften gibt es leider nicht, sondern die Aufreinigung muss immer auf das jeweilige Problem angepasst werden, d.h. durch Ausprobieren ermittelt werden. Ist das Ziel beispielsweise eine möglichst native Isolation eines Membranproteinkomplexes, sollte man es zunächst mit nicht-ionischen Detergenzien versuchen, welche die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen im Vergleich zu zwitterionische und ionische Detergenzien kaum beeinflussen (sog. nicht-denaturierenden Detergenzien). Die optimale Pufferzusammensetzung (Detergenz, pH, Ionenstärke etc.) zu ermitteln, ist aber ein zeitaufwendiges Unterfangen. Falls man jedoch nicht *Functional Proteomics* betreibt, sondern nur neue Proteine identifizieren oder quantifizieren möchte, kann man auch zu härteren Methoden greifen (denaturierende Detergenzien wie z.B. das potente ionische Detergenz SDS oder Extraktion mit organischen Lösungsmitteln).

Aufschlussreich ist natürlich auch die direkte Analyse von isolierten Membranproteinen bzw. Membranproteinkomplexen. Diese kann mit unterschiedlichen Zielen erfolgen, entweder um die Qualität der Aufreinigung zu beurteilen und einen groben Überblick über die Komplexzusammensetzung zu erhalten oder sogar mit dem Versuch, *top down* Analytik (siehe Kapitel 3.1.3.6) durchzuführen. Interferenzen von MALDI und ESI mit dem verwendeten Detergenz sind aber häufig und können eine massenspektrometische Analytik sogar unmöglich machen. Aussagen über die Eignung bestimmter Detergenzien für eine direkte MALDI- bzw. ESI-Analyse nach der Aufreinigung sind aber in der Literatur schon vorhanden (ESI: Loo *et al.*, 1994; Ishihama *et al.*, 2000; MALDI: Cadene *et al.*, 2000; Rosinke *et al.*, 1995; Vorm *et al.*, 1993). Bei richtiger Detergenzienwahl ist somit eine Analyse von intakten Membranproteinen bzw. Membranproteinkomplexen durchaus mit beiden Ionisierungstechniken möglich. Strategien, die eine wirkliche *top down* Analytik ermöglichen würden, sind aber immer noch rar und basieren sinnvollerweise auf organischen Lösungsmittelsystemen (Whitelegge, 1998; Barnidge *et al.*, 1999; Huber *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2006; siehe auch Kapitel 3.2.2). Die Art und Weise der Wechselwirkungen von Detergenzien und verschiedene Modellproteine ist durch NMR-Studien inzwischen auch teilweise untersucht worden, z.B. BSA und SDS (Nicholas *et al.*, 1995). Die Kenntnisse über die Anlagerungsarten lassen vermuten, dass es auch bei *bottom up* Analysen zu Schwierigkeiten kommen kann, da bestimmte Proteinregionen für die Spaltreagenzien dann sicherlich nicht zugänglich sein werden.

### 3.2.2 Fortschritte bei integralen Membranproteinen

Durch die enormen Weiterentwicklungen der Werkzeuge in der Proteomforschung (siehe Kapitel 3.1) scheint die Herausforderung der Analyse von integralen Membranproteinen fast gelöst zu sein. Neue Strategien zur Extraktion, Aufkonzentrierung, Reinigung und Trennung von Membranproteinen hat die Identifikation von integralen Membranproteinen deutlich vereinfacht (z. B. Lehner *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003a; Wu *et al.*, 2003b; Olsen *et al.*, 2004b; Zhang *et al.*, 2004; Schluesener *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2006a; Zahedi *et al.*, 2005; Blonder *et al.*, 2006; Wittig *et al.*, 2006a; Speers *et al.*, 2007; Wittig *et al.*, 2007). Besonders kreativ ist beispielsweise die Affinitätschromatographie von biotinylierten Membranproteinen zur Aufkonzentrierung (Goshe *et al.*, 2003; Nunomura *et al.*, 2005; Scheurer *et al.*, 2005a; Scheurer *et al.*, 2005b). So einfache Ideen wie der Einsatz von Trifluorethanol zur Extraktion von Membranproteinen (Deshusses *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007) oder die Suche nach LC-kompatiblen Detergenzien (Chen *et al.*, 2007) hat die Situation aber ebenfalls entscheidend verbessert. Theoretische Untersuchungen verschiedener Organismen lassen inzwischen auch darauf hoffen, dass bei richtiger Enzymwahl deren Membranproteome besser zu erfassen sind (Eichacker *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2006b). Bei einzelnen integralen Membranproteinen ist inzwischen sogar eine komplette oder hohe Sequenzabdeckung durch *bottom up* Analyse möglich (Han *et al.*, 2004; Ablonczy *et al.*, 2005). Die nicht endende Weiterentwicklung der Instrumente (siehe Kapitel 2) ist dann sicherlich das Zünglein an der Waage für das Resümee gewesen, dass heute schon alles möglich sein müsste.

Hinsichtlich der Anwendbarkeit der 2D-SDS-PAGE für die Trennung von Membranproteinen trifft dies nicht zu. Im Gegenteil, sie sind notorisch unterrepräsentiert in der 2D-Gelelektrophorese. Der Einsatz von IEF-kompatiblen Detergenzien wie Triton X-100, CHAPS oder Detergenzien vom Amidosulfobetain-Typ in Kombination mit Harnstoff und Thioharnstoff, um die benötigte hohe Ionenstärke für eine Membranproteinlöslichkeit zu erreichen, hat nur bedingt zum Erfolg geführt. Meistens wurden nur extrinsische bzw. integrale Membranproteine mit moderaten GRAVY-Score (maximal 0,4) oder vom  $\beta$ -Faltblatttyp (meistens negativer GRAVY-Score) identifiziert (Chevallet *et al.*, 1998; Santoni *et al.*, 1999; Santoni *et al.*, 2000; Molloy *et al.*, 2000; Molloy *et al.*, 2001a; Molloy *et al.*, 2001b; Galeva *et al.*, 2002; Lehner *et al.*, 2003; Lescuyer *et al.*, 2003; Luche *et al.*, 2003; Aivaliotis *et al.*, 2006a). Neben Interferenzen mit der isoelektrischen Fokussierung aufgrund der hohen Ionenstärke konnte gezeigt werden, dass in der ersten Dimension zwar eine

Fokussierung, aber ein Transfer der Membranproteine in die zweite Dimension häufig nicht stattfindet (Klein *et al.*, 2004). Integrale Membranproteine jenseits der GRAVY-Score-Grenze 0,4 lassen sich somit nicht trennen (Carrol *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2003).

Eine mögliche Technik zur zweidimensionalen gelelektrophoretischen Trennung von sehr hydrophoben Membranproteinen (GRAVY-Score > 0,4) ist die 16-BAC/SDS-PAGE (Hartinger *et al.*, 1996; Langen *et al.*, 2000; Dreger *et al.*, 2001; Coughenour *et al.*, 2004; Zahedi *et al.*, 2005; Burré *et al.*, 2006a; Burré *et al.*, 2006b). Lediglich der Detergenzwechsel von der ersten zur zweiten Dimension ist kritisch, da er zu Proteinverlusten führen kann (Santoni *et al.*, 2000). Die Kompatibilität mit der häufig verwendeten Quantifizierungsmethode DIGE ist ebenfalls schon gezeigt worden (Burré *et al.*, 2006b; Bisle *et al.*, 2006). Die Technik erreicht aber nur ungefähr ein Zehntel der Auflösung einer 2D-SDS-PAGE.

Eine weitere Alternative für die Trennung von Membranproteinkomplexen ist die Blau-Native Gelelektrophorese von Schägger und v. Jagow (1D- bzw. 2D-BN-PAGE, 1D- bzw. 2D-Blue-Native PAGE; Schägger *et al.*, 1991; Schägger *et al.*, 1994; Wittig *et al.*, 2006a) kombiniert mit einem denaturierenden SDS-Gel (Schägger *et al.*, 1994; Jansch *et al.*, 1996; Arnold *et al.*, 1998; Burrows *et al.*, 1998; Devreese *et al.*, 2002; Brookes *et al.*, 2002; Rexroth *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003; Eubel *et al.*, 2004; Reifschneider *et al.*, 2006; Aivaliotis *et al.*, 2006b; Aivaliotis *et al.*, 2007). Quantifizierungstechniken wie DIGE sind damit natürlich auch kompatibel (Gillardon *et al.*, 2007). Ebenso entwickelte Schägger die dSDS-PAGE (*doubled* SDS-PAGE), die alleine oder in Kombination mit BN-PAGE verwendet wird (Rais *et al.*, 2004; Wittig *et al.*, 2006a; Burré *et al.*, 2006a; Williams *et al.*, 2006), um Membranproteinkomplexe oder andere supramolekulare Strukturen mit extrem hydrophoben Proteinen aus einer Fraktion zu separieren. Das Auflösungsvermögen der dSDS-PAGE liegt dabei im Vergleich zur 2D-SDS-PAGE aber nur bei ca. 10%.

Der Einsatz von Nativer Gelelektrophorese (CN-PAGE, Clear-Native PAGE) anstatt BN-PAGE in der ersten Dimension hätte zwar hinsichtlich der Detektion von fluoreszenzmarkierten Proteinen oder der Analyse der Funktion der getrennten physiologischen Proteinverbände direkt aus der ersten Dimension des Gels heraus erhebliche Vorteile, hat sich aber aufgrund der sehr geringen Auflösung im Vergleich zu BN-PAGE bis jetzt noch nicht durchgesetzt (Wittig *et al.*, 2005). Eine Verbesserung der Auflösung der CN-PAGE ist deshalb dringend erforderlich gewesen (hrCN-PAGE, *high resolution clear native gel electrophoresis*; Wittig *et al.*, 2007). Außerdem ist CN-PAGE wesentlich milder als BN-PAGE, was die vollständige Abtrennung von sehr großen Proteinassoziaten unter Erhalt

ihres natürlichen Zustandes wesentlich wahrscheinlicher macht. Die Massengrenze der Gelelektrophorese liegt heute leider aber noch bei ca. 10 MDa (Hunte *et al.*, 2003; Gavin *et al.*, 2005; Bustos *et al.*, 2005; Wittig *et al.*, 2006b). Daher ist es zukünftig nötig, neue großporige Gelsysteme zu entwickeln, um auch in den interessanten Bereich jenseits der 10 MDa vorzustoßen. Erst dann würden sich auch größere Proteinassoziate aus einer Membran gelelektrophoretisch analysieren lassen.

LC-basierte *bottom up* Ansätze unterliegen zwar keinem Massenlimit, da eine Peptidmischung getrennt wird, sie sind aber nur hinsichtlich der Proteinidentifikation sehr hilfreich. Es konnte vielfach gezeigt werden, dass eine Vielzahl an integralen Membranproteinen auf diese Art und Weise identifiziert werden kann (Washburn *et al.*, 2001; Blonder *et al.*, 2002; Gosh *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Blonder *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2006a; Blonder *et al.*, 2006; Speers *et al.*, 2007). Häufig ist die Ursache hierfür auch der Einsatz neuer Spaltungsstrategien gewesen (z.B. unspezifische Enzyme, siehe weiter unten), da erkannt worden ist, dass integrale Membranproteine zu wenig Schnittstellen für das Enzym Trypsin enthalten. Eine Quantifizierung ist bei LC-basierten *bottom up* Ansätzen natürlich auch machbar (Han *et al.*, 2001; Goshe *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 2004b; Bisle *et al.*, 2006; Ramus *et al.*, 2006; Blonder *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2007). Leider gibt es aber bis jetzt keine Studien, die sich mit der Eignung von HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) auseinandersetzen, von der bekannt ist, dass sie für die Fraktionierung von unverdauten Membranproteinen gut geeignet ist (Carroll *et al.*, 2006; Garbis *et al.*, 2005; Jenö *et al.*, 1993). Dass HILIC für Peptidtrennungen und MudPIT geeignet ist, wurde bereits gezeigt (Boersema *et al.*, 2007; Hemström *et al.*, 2006). Ähnlich wie neue Chromatographietypen in der Analyse des Phosphoproteoms viel bewegt haben (z.B. mit Titandioxid: Thingholm *et al.*, 2006; Mazanek *et al.*, 2007), könnte mit HILIC vielleicht zukünftig enorme Fortschritte erzielt werden.

Für die Einordnung neu identifizierter Proteine mit unbekannter Funktion in einen biologischen Zusammenhang bleibt aber bei der LC-basierten *bottom up* Analyse meistens nur der Weg der Bioinformatik, z. B. die Suche nach Homologen. Eine Alternative hierzu ist beispielsweise LOPIT (*Localization of Organelle Proteins by Isotope Tagging*; Dunkley *et al.*, 2004; Sadowski *et al.*, 2006). Bei Einsatz Nativer bzw. Blau-Nativer Gelelektrophorese kombiniert mit einem 1D-SDS- oder dSDS-Gel sind neu entdeckte Proteine als Spot direkt sichtbar und können somit einem Komplex zugeordnet werden. Außerdem sind Funktionsstudien in einem nativen Gel möglich. Eine Kombination aus Nativer bzw. Blau-Nativer Gelelektrophorese und LC sollte somit optimal sein. Bis jetzt konnten aber trotz

höheren Trennvermögens und Sensitivität bei dieser Kombination keine signifikant besseren Ergebnisse produziert werden (Fandiño *et al.*, 2005).

Um die Quantifizierung und Charakterisierung der integralen Membranproteine bei *bottom up* Analysen weiter voran zu bringen, ist eine höhere Sequenzabdeckung jedoch unerlässlich. Inzwischen gibt es hier auch schon einige viel versprechende Ansätze mit unspezifischen Enzymen (Proteinase K, Pepsin oder Chymotrypsin, teilweise unter Zusatz organischer Lösungsmittel zum Puffersystem), chemischen Reagenzien (CNBr) oder einer Kombination aus beidem (Trypsin & CNBr), die bei ausreichender Aufkonzentrierung für einzelne Membranproteine wie z.B. Rhodopsin sogar 100% Sequenzabdeckung erreichen können (Kraft, 2001; Hixson, 2002; Montfort *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003a; Han *et al.*, 2004; Ablonczy, 2005; Fischer, 2006a). Zudem ist behauptet worden, dass eine Spaltung von Membranproteinen im Gel effektiver ist (Lu *et al.*, 2005). Inwieweit das wirklich zutrifft, muss die Zukunft zeigen, insbesondere weil die Extraktion von Peptiden aus dem Gel immer noch problematisch ist (siehe Kapitel 3.1.3.4). Verbreiteten Einsatz finden aber viele dieser Techniken noch nicht (siehe Kapitel 3.1.3.4). Auch fehlen tiefgehende systematische Untersuchungen bei den neuen, Erfolg versprechenden Enzymalternativen (u.a. Enzymspezifität und Zugänglichkeit zum integralen Membranprotein in einer Lipiddoppelschicht).

*Top down* Ansätze scheinen auf den ersten Blick daher Vorteile zu haben, da eine Spaltung in kleinere Bruchstücke nicht nötig ist. Das Membranprotein müsste in diesem Fall aber möglichst „nackt“ vorliegen d.h. in organischen Lösungsmitteln oder mit MS-kompatiblen Detergenzien gelöst sein, um es dann massenspektrometrisch untersuchen zu können. Deswegen und aufgrund der bereits diskutierten Schwierigkeiten von *top down* Ansätzen (siehe Kapitel 3.1.3.6) gibt es fast keine Beispiele für Membranproteine in der Literatur. Diese beschränken sich meistens nur auf die Messung der Proteinmasse, die Identifikation findet immer noch mittels *bottom up* statt (Carroll *et al.*, 2006). Die wirklichen *top down* Analysen mit Sequenzierung beschränken sich vor allem auf aufgereinigte, kleine Membranproteine (Whitelegge *et al.*, 2006a; Whitelegge *et al.*, 2006b; Zabrouskov *et al.*, 2007)

Abschließend muss aber noch einmal darauf hingewiesen werden, dass andere ungelöste Herausforderungen in der Proteomforschung wie die Erweiterung des dynamischen Bereichs und die Charakterisierung von Glykosylierung eine viel größere Hürde darstellen (siehe Kapitel 3.1). Da diese ausnahmslos natürlich auch für Membranproteine Gültigkeit

haben, wird es bis zu einer erschöpfenden Analytik des Membranproteoms einer Zelle wohl noch ein langer Weg sein.

### **3.2.3 Die Atmungskette – ein wirklich perfekt erforschtes Modellsystem für Membran Proteomics?**

Die mitochondriale Atmungskette setzt sich bei Säugetieren aus fünf Proteinkomplexen zusammen. Die vier Komplexe NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), Ubichinol:Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Komplex III) und Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV) generieren ein elektrochemisches Potential quer durch die Innenmembran. Die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase (Komplex V) katalysiert daraus die ATP-Synthese (Hatefi *et al.*, 1985; Saraste *et al.*, 1999; Boyer *et al.*, 1999; Abrahams *et al.*, 1994). Kodiert werden die Proteine von zwei verschiedenen Genomen, der Hauptteil durch nukleäre DNS, ein kleiner Teil überwiegend extrem hydrophober Untereinheiten durch mitochondriale DNS. Ein Transport in die Mitochondrien wäre wohl für diese hydrophoben Proteine auch schwierig. Bei Bakterien fehlen Mitochondrien. Aufgrund dessen sind die Enzymkomplexe in der Zellwand lokalisiert, außerdem sind die fünf Komplexe einfacher zusammengesetzt (siehe Tabelle 3.1). Alle mitochondrial kodierten Untereinheiten der Säugetiere sind aber auch bei einigen aeroben Bakterien vorhanden, was auf die Richtigkeit der Endosymbiontentheorie hinweist (Schimper, 1883; Mereschkowsky, 1905; Margulis/Sagan, 1967). Inzwischen ist auch bekannt, dass die Komplexe bei Säugetieren, Pilzen, Bakterien und Pflanzen nicht zufällig in der Membran verteilt sind, sondern sich zu Superkomplexen zusammenlagern (u.a. Fowler *et al.*, 1963; Ragan *et al.*, 1978; Schägger *et al.*, 2000; Schägger, 2001; Schägger, 2002; Stroh *et al.*, 2004; Eubel *et al.*, 2003, Eubel *et al.*, 2004). Die Bedeutung hiervon wird zur Zeit noch diskutiert, die bisherigen Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass supramolekulare Strukturen einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Funktionalität haben, z. B. erhöhte Elektronentransferraten (*electron channeling*), Stabilitätserhöhung der OXPHOS-Komplexe (OXPHOS, *oxidative phosphorylation*), Einflussnahme auf die Struktur der inneren Mitochondrienmembran etc. (aktueller Review: Boekema *et al.*, 2007). Außerdem wurde kürzlich vorgeschlagen, dass noch größere, kettenartige Anordnungen *in vivo* existieren müssen (Wittig *et al.*, 2006c).

	Eukaryoten			Prokaryoten		
	Proteine	mtDNS	nukDNS	Proteine	mtDNS	nukDNS
<b>Komplex I</b>	46	7	39	14	7	7
<b>Komplex II</b>	4	0	4	3	0	3
<b>Komplex III</b>	11	1	10	3	1	2
<b>Komplex IV</b>	13	3	10	4	3	1
<b>Komplex V</b>	16	2	14	8	2	6
<b>Total</b>	90	13	77	32	13	19

**Tabelle 3.1 Zusammensetzung einzelner Atmungskettenkomplexe (nach Rais, 2005).** Die Anzahl der Proteine von *Bos taurus* bzw. *Paracoccus denitrificans* ist für Eukaryoten bzw. für Prokaryoten als Beispiel angegeben. mtDNS, mitochondriale DNS; nukDNS, nukleäre DNS.

Besonders das fundierte Wissen über die Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe bei einigen Säugetieren (z.B. Rinderherzmitochondrien) und Bakterien (z.B. *Paracoccus denitrificans*), die Anzahl an extrem hydrophoben Untereinheiten sowie etablierte Aufreinigungsmethoden für die einzelnen Komplexe lassen die Proteinkomplexe zu optimalen Modellsystemen werden, um Methoden für Membranproteome gezielt zu entwickeln. Trotz allem sind natürlich immer noch viele interessante Fragen unbeantwortet geblieben oder nur ansatzweise geklärt, wie beispielsweise die bereits erwähnte Bedeutung von supramolekularen Strukturen. Ein Fokus der Arbeit ist deshalb die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase (Komplex V) von Säugetieren gewesen. Nach aktuellem Wissen setzt sich beispielsweise die monomere  $F_1F_0$ -ATP-Synthase von Rindermitochondrien aus 16 Proteinuntereinheiten zusammen, wobei das Inhibitor Protein  $IF_1$  in variabler Stöchiometrie gebunden vorliegt (Collinson *et al.*, 1994; Pullman *et al.*, 1963; Schwerzmann *et al.*, 1986; Cabezon *et al.*, 2000a; Cabezon *et al.*, 2000b). Wie der Name schon vermuten lässt, wird zwischen einer membrangebundenen  $F_0$  und wasserlöslichen  $F_1$ -Untereinheit unterschieden. Die  $F_1$ -Untereinheiten  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  fungieren als zentrales Bindeglied (Gibbons *et al.*, 2000; Karrasch *et al.*, 1999; Rubinstein *et al.*, 2003; Rubinstein *et al.*, 2005). Sie sind mit einem Ring von  $F_0$ -Untereinheiten c assoziiert (Cabezon *et al.*, 2003). Zusammen bilden diese Untereinheiten den Rotor der ATP-Synthase. Protonen führen zur Rotation des c-Rings, die natürlich auch auf das zentrale Bindeglied übertragen wird. Daraus resultierende Konformationsänderungen in der

katalytischen  $\alpha_3\beta_3$ -Domäne der  $F_O$ -Untereinheit ermöglichen die ATP-Synthese (Sabbert *et al.*, 1996; Noji *et al.*, 1997; Stock *et al.*, 1999).

Aufgrund verbesserter Aufreinigungsstrategien der ATP-Synthase mit dem milden Detergenz Digitonin und nachfolgender nativer Gelelektrophorese (BN-PAGE bzw. CN-PAGE) ist inzwischen bekannt, dass die ATP-Synthase nicht nur als Dimer, sondern sogar in noch höheren oligomeren Formen in der inneren Mitochondrienmembran vorliegt (Schägger *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2005; Wittig *et al.*, 2005; Wittig *et al.* 2006c). Eine gründliche Studie, die sich mit Unterschieden zur monomeren Form bei Säugetieren hinsichtlich der Zusammensetzung, auch im Hinblick auf noch unbekannte Proteine, auseinandersetzt, ist aber bis jetzt leider noch nicht vorhanden. Bereits vorhandene Kenntnisse aus anderen Organismen zu übertragen, wäre allerdings gefährlich. Die Untereinheiten e und g in Hefe sind beispielsweise spezifisch für das Dimer (Arnold *et al.*, 1998). Für beide ist aber bereits bei Säugetieren bekannt, dass sie fest an die monomere Form gebunden sind. Allerdings weisen Vergleiche mit anderen Organismen wie Hefe wohl darauf hin, dass wahrscheinlich noch nicht alle Untereinheiten bzw. assoziierten Proteinen der  $F_1F_O$ -ATP Synthase für Säugetiere identifiziert worden sind (siehe auch [www.mitop.de](http://www.mitop.de)).

#### 4. Zielsetzung

Zu behaupten, ein weites Feld, wie es die Charakterisierung und Identifizierung von Membranproteinen auf der Ebene von Peptiden nun einmal ist, mit einem klaren Endziel vor Augen betreten zu haben, wäre an dieser Stelle ganz sicher etwas vermessen. Eher haben sich einige realisierbare Ziele im Laufe der Zeit herauskristallisiert.

Ein Hauptziel der Arbeit ist die Charakterisierung der Proteinzusammensetzung der monomeren und dimeren  $F_1F_0$ -ATP-Synthase von Säugetieren unter der Regie von Prof. Dr. Hermann Schägger geworden (siehe auch Kapitel 3.2.3). Mit Hilfe der Massenspektrometrie und Edman-Sequenzierung sollte nach noch unbekanntem Proteinen, die mit der ATP-Synthase assoziiert sind, gesucht werden. Bereits bekannte und ggf. neu gefundene Proteine sollten mit Hilfe multidimensionaler Gelelektrophorese, Massenspektrometrie und immunologischen Techniken als Dimer spezifisch, sowie neu entdeckte Proteine zusätzlich als Untereinheiten oder als assoziierte Proteine der ATP-Synthase verifiziert oder aussortiert werden.

Als ein interessantes Nebenziel der Arbeit hat sich die Charakterisierung eines bakteriellen *c*-Typ Cytochroms herausgestellt. Es sollte hier die Anzahl der gebundenen Häm-Gruppen und die Art der Bindung massenspektrometrisch ermittelt werden.

Bei der Analyse dieses *c*-Typ Cytochroms wurde vor allem auch erkannt, dass die vorherige Kenntnis der genauen Proteinmasse für die Charakterisierung von Proteinen auf der Peptidebene ein enormer Vorteil ist. Da der Einsatz von Detergenzien bei der Arbeit mit Membranproteinen aber unerlässlich ist, sollten verschiedene Detergenziengruppen hinsichtlich ihrer Eignung für die intakte Proteinmessung mittels MALDI und ESI überprüft werden.

Auch trat bei beiden Projekten immer wieder das aus der Literatur bekannte Hauptproblem der unzureichenden Sequenzabdeckung auf. Deshalb sollte über Methoden nachgedacht werden, die dieses Grundübel in der *bottom up* Analytik verbessern könnten. Besonders bei integralen Membranproteinen führt häufig ein Einbruch in der Sequenzabdeckung dazu, dass selbst eine Identifizierung des Proteins unmöglich wird. Reproduzierbare Protokolle zur Spaltung von Proteinen mit weniger spezifischen Enzymen als Trypsin sollten daher aufbauend auf den bereits erkennbaren Fortschritten in der Literatur etabliert werden (siehe Kapitel 3.1.3.4 und 3.2.2). Für die Herausforderungen bei der Auswertung der massenspektrometrischen Daten sollten natürlich Lösungen erarbeitet werden (siehe Kapitel 3.1.3.5). Als Testsystem hierfür wurden zunächst wasserlösliche Proteine, dann

#### 4. Zielsetzung

das Membranprotein Cytochrom  $c_1$  (*Thermus thermophilus*) verwendet. Außerdem wurde die Leistungsfähigkeit der neuen Spaltstrategien durch Tests mit dem aufgereinigten Membranprotein Cytochrom  $c_1$  (*Thermus thermophilus*) bzw. dem Membranproteinkomplex Cytochrom  $c$  Oxidase (*Paracoccus denitrificans*), die in Phospholipidvesikeln eingebaut worden sind, überprüft, um die Probenvorbereitung einer LC-basierten *bottom up* Analytik zu simulieren. Als weiteres Testsystem hierfür wurde Bacteriorhodopsin in Purpormembranen verwendet. Die Leistungsfähigkeit und Limits der weniger spezifischen Enzyme gegenüber Trypsin bei der gel-basierten *bottom up* Analyse wurde an einem Projekt getestet, in dem ein unbekanntes Membranprotein von Komplex I (Atmungskette) identifiziert werden musste.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

Die nachfolgenden Ergebnisse sind aus einer Kooperation der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Hermann Schägger (Gelelektrophorese, Aktivitätstest) und Prof. Dr. Michael Karas (Massenspektrometrie) entstanden.

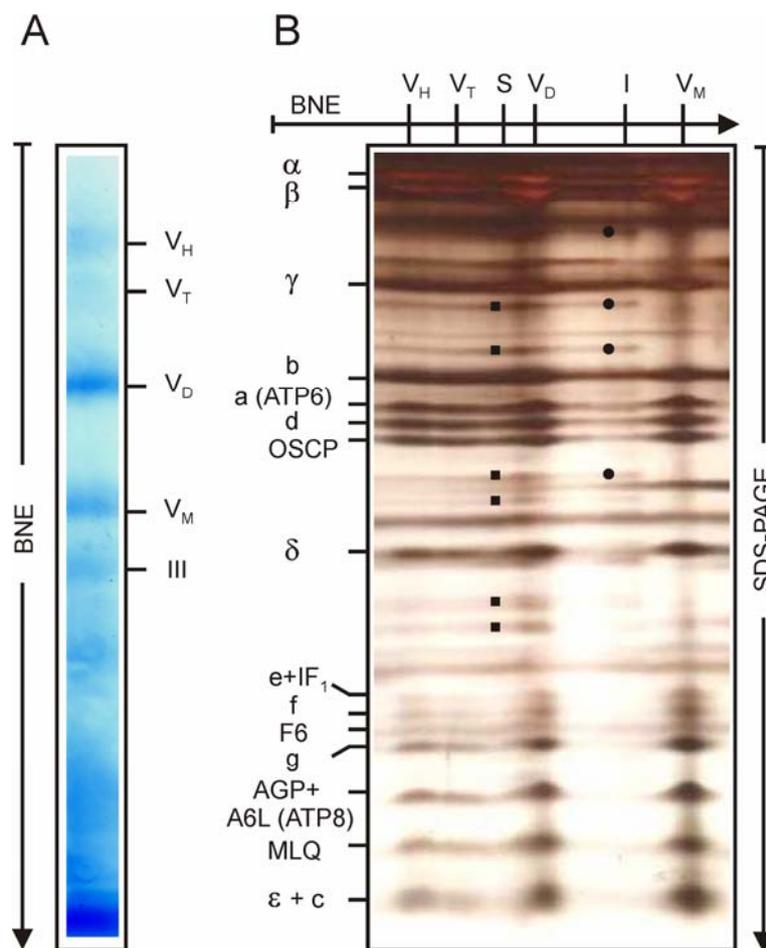
#### 5.1.1 Vorgeschichte

Aus der Literatur ist bekannt, dass Digitonin die ATP-Synthase aus Säugetiermitochondrien in unterschiedlichen oligomeren Formen herauslöst (Krause *et al.*, 2005; Wittig *et al.*, 2005; siehe auch Kapitel 3.2.3). Das hier eingesetzte niedrige Digitonin-Protein-Verhältnis von 2:1 (g/g) für die Extraktion der Rinderherzmitochondrien hat überraschenderweise zu einer überwiegenden Isolation von Komplex V geführt. Das Blau-Nativ-Gel zeigt intensive Banden der monomeren und dimeren Form (Abb. 5.1A). Zusätzlich sind auch noch signifikant geringere Mengen der tetrameren und hexameren ATP-Synthase zu erkennen. Abgesehen von einer geringfügigen Verunreinigung mit Komplex III sind aber keine weiteren Atmungskettenkomplexe oder Superkomplexe im Blau-Nativ-Gel detektierbar. Eine anschließende Trennung mit einem Tricin-SDS-Gel hat aber Untereinheiten von Komplex I (Kreise) und Superkomplexe der Atmungskette (Quadrate) sichtbar gemacht (Abb. 5.1B).

Die gleiche Trennstrategie, nur im präparativen Maßstab, gefolgt vom Blotting der Proteine auf PVDF-Membranen und nachfolgender Edman-Sequenzierung, hat dann neben der Identifikation von bereits bekannten Untereinheiten von Komplex V auch Hinweise auf zwei potentiell neue Kandidaten mit der N-terminalen Sequenz MLQSLIKKVVWIPMKPYYTQAYQEI (MLQ-Protein) und AGPEADAQFHFTGIKKYFN (AGP-Protein) geliefert (Abb. 5.1B). Datenbanksuchen konnten das MLQ-Protein und AGP-Protein zwei Proteinen zuordnen, die früher bereits beschrieben worden sind (siehe auch Kapitel 5.1.5). Das MLQ-Protein ist als *6.8-kDa mitochondrial proteolipid* wegen seiner Extrahierbarkeit aus der Mitochondrienmembran mit Chloroform/Methanol in der NCBI-Datenbank gelistet (Terzi *et al.*, 1990). Das AGP-Protein ist als *diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue* (DAPIT) in der gleichen Datenbank annotiert (Paivarinne *et al.*, 2001).

Eine Zugehörigkeit zur Atmungskette oder Komplex V wird aber in der Literatur nicht geäußert.

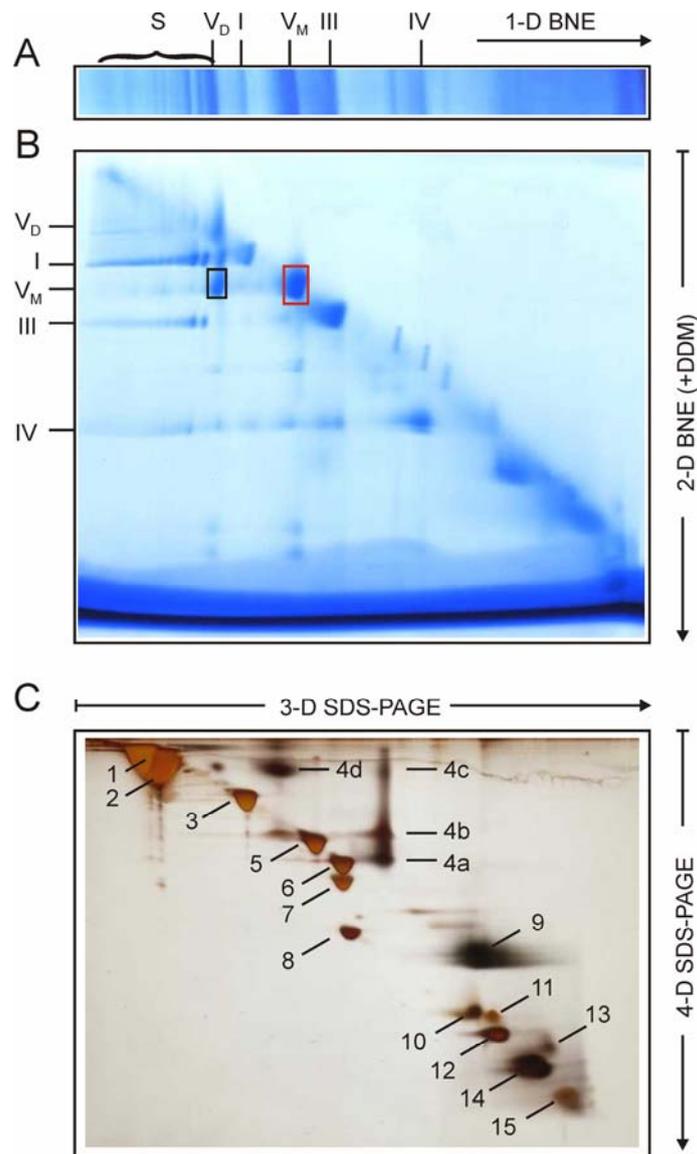
Eine zweifelsfreie Beurteilung, ob es sich beim MLQ-Protein und AGP-Protein nur um Verunreinigungen oder um Proteine handelt, die mit der ATP-Synthase wirklich assoziiert sind, ist allerdings so nicht möglich gewesen, da die Aufreinigung nicht sauber genug gewesen ist. Sicher lässt sich aber schlussfolgern, dass beide Proteine nicht spezifisch für die dimere Form sind, da sie nicht nur in der dimeren ATP-Synthase sondern auch der monomeren identifiziert worden sind (Abb. 5.1B).



**Abb. 5.1 1-D- und 2-D-Trennung der ATP-Synthase (Rind) für Edmanabbau.** (A) Komplex V bzw. ATP-Synthase wurde als Monomer ( $V_M$ ), Dimer ( $V_D$ ), Tetramer ( $V_T$ ) und Hexamer ( $V_H$ ) von Digitonin (2 g/g Protein) gelöst und mittels BNE getrennt. (III), Komplex III der Atmungskette. (B) 2. Dimension: Tricine-SDS-PAGE (16% T, 6% C Acrylamidgele), Silberfärbung. Die Untereinheiten wurden mittels Edmanabbau zugeordnet. Zwei neue Proteine mit der N-terminalen Sequenz AGP und MLQ wurden für die monomere und dimere Form von Komplex V ( $V_M$  bzw.  $V_D$ ) identifiziert. Die geringfügigen Verunreinigungen von Komplex I (●) und des Superkomplexes S (■) sind markiert.

### 5.1.2 Massenspektrometrische Analyse der $F_1F_0$ -ATP-Synthase

Um aussagekräftige Ergebnisse über die Proteinzusammensetzung von Komplex V mit einer massenspektrometrischen Analyse zu erhalten, müssen höchste Reinheitsanforderungen erfüllt werden, da bereits schon geringfügige Verunreinigungen aufgrund der hohen Sensitivität der Massenspektrometrie detektiert werden. Daher sind Rattenherzmitochondrien zunächst mit einem hierfür optimierten Saccharosestufengradient separiert worden, um zunächst einmal eine hochreine Mitochondrienpräparation zu erhalten. Die  $F_1F_0$ -ATP Synthase daraus möglichst sauber und ohne Verluste von Untereinheiten bzw. assoziierten Proteinen abzutrennen, ist mit den bekannten mehrstufigen Isolationsprotokollen für Proteinkomplexe aber fraglich gewesen. Die dort gängigen Detergenzien bzw. Detergenzienkonzentrationen sind insbesondere wegen der schwächeren Interaktionen von assoziierten Proteinen oder potentiellen regulatorischen Faktoren mit dem Komplex innerhalb der Membran kritisch. Diese Proteine würden deshalb bei der Aufreinigung aus der Membran heraus sofort dissoziieren und jede Chance sie zu identifizieren wäre somit verloren. Daher ist eine spezielle zweidimensionale Blau-Native Elektrophoresetechnik etabliert worden (siehe nächste Seite, Abb. 5.2). Zum Herauslösen der Komplexe aus der hochreinen Mitochondrienpräparation für die erste Dimension der Blau-Nativen Elektrophorese ist Digitonin verwendet worden. Die Anwesenheit von supramolekularen Strukturen der Atmungskettenkomplexe I, III und IV (S), sowie der dimeren ATP synthase ( $V_D$ ) verdeutlichen die sehr milden Trennbedingungen in der ersten Dimension (Abb. 5.2A). Bei der nachfolgenden zweiten Blau-Nativen Dimension wird zusätzlich dem Kathodenpuffer 0.02% Dodecylmaltosid zugesetzt (Abb. 5.2B). Das Detergenz und der ebenfalls enthaltene Coomassiefarbstoff im Kathodenpuffer bilden negative Mizellen aus, welche die supramolekularen Strukturen in die individuellen Komplexe auftrennen, abgesehen von einem kleinen Anteil von Komplex V, der in dimerer Form verbleibt ( $V_D$  in Abb. 5.2B). Die Coomassie-Detergenz-Mizellen haben natürlich auch das Potential assoziierte Proteine teilweise oder sogar ganz von Komplexen zu entfernen (siehe Kapitel 5.1.3). Falls aber auch nur ein kleiner Rest vom MLQ- und AGP-Protein an Komplex V verbleiben sollte, könnten die Proteine wegen der hohen Empfindlichkeit massenspektrometrisch identifiziert werden.



**Abb. 5.2** Multidimensionale elektrophoretische Trennung von ATP-Synthase (Rattensherz) für die massenspektrometrische Analyse. I, III, IV, Atmungskettenkomplexe I, III und IV; S, Superkomplex aus den Komplexen I, III und IV; V<sub>D</sub> und V<sub>M</sub>, dimere und monomere Form von Komplex V. (A) Rattensherzmitochondrien wurden mit Digitonin (2 g/g Protein) gelöst und die mitochondrialen Komplexe mittels BNE getrennt (1-D BNE). (B) Der Gelstreifen von der 1. Dimension wurde einer erneuten BNE unterzogen. Um die Superkomplexe der 1. Dimension zu dissoziieren, wurde dem Kathodenpuffer 0,02% Dodecylmaltosid (DDM) zugesetzt (2-D BNE (+DDM)). (C) Der monomere Komplex V (V<sub>M</sub>, rot eingerahmt in B) wurde mittels dSDS-PAGE in seine Untereinheiten getrennt (3. Dimension: Tricin-SDS-PAGE mit 11% T, 3% C Acrylamidgelen und 6 M Harnstoff; 4. Dimension: Tricin-SDS-PAGE mit 16% T, 6% C Acrylamidgelen). Die Untereinheiten wurden massenspektrometrisch identifiziert (siehe Tab. 5.1 und Anhang 9.1)

Nr.	Untereinheit	Datenbank-Nr.	Proteinmasse (Da)	TMH	pI
1	Alpha	gi 6729934	55361	0	8.9
2	Beta	gi 1374715	51171	0	4.8
3	Gamma	gi 728931	30229	0	9.4
4a-4d	ATP6 (od. Su a)	gi 110189668	25050	6	9.6
5	Su b	gi 19705465	28965	0	9.9
6	OSCP	gi 20302061	23440	0	10.5
7	Su d	gi 9506411	18809	0	6.2
8	Delta	gi 20806153	17584	0	5.0
9	Su c	gi 8392939	14235	2	11.4
10	F6	gi 16758388	12487	0	9.9
	Su f	gi 109495163	10503	1	10.5
11	Su e	gi 17978459	8249	0	9.5
12	Su g	gi 47058994	11453	0	9.9
13	AGP (od. DAPIT)	gi 19424210	6460	1	10.4
14	ATP8 (od. A6L)	gi 110189667	7637	1	9.8
	MLQ (od. 6.8 kDa proteolipid)	gi 109478763	6910	1	10.4
15	Epsilon	gi 258789	5689	0	10.6

**Tabelle 5.1** Massenspektrometrisch identifizierte Proteine (abgesehen von ATP6) von hoch aufgereinigter ATP-Synthase (siehe auch Abb. 5.2C, Abb. 5.3 und Anhang 9.1). Die Anzahl der Transmembranhelices (TMH) wurde mit TMHMM ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) ermittelt. Der pI wurde mit Biotoools 2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) berechnet. Abkürzungen: Su, Untereinheit (*subunit*).

Der monomere Komplex V, der sowohl in der ersten als auch in der zweiten Blau-Nativen Dimension in monomerer Form vorgelegen hat (rote Box in Abb. 5.2B), und derjenige, der erst in der zweiten Blau-Nativen Dimension durch Dissoziation aus der dimeren Form entstanden ist (schwarze Box in Abb. 5.2B), sind sehr gut von den anderen Komplexen abgetrennt worden und somit für die Massenspektrometrie optimal geeignet. Diese Bereiche sind ausgeschnitten worden, um die Proteinzusammensetzung jeweils mit einer doppel SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (dSDS-PAGE) darzustellen (Abb. 5.2C). Die silbergefärbten

Positionen sind ausgeschnitten, tryptisch verdaut, mit MALDI-TOF-Experimenten analysiert und mittels *peptide mass fingerprint* (PMF) identifiziert und falls notwendig mit MALDI-TOF/TOF-Experimenten verifiziert worden. Tabelle 5.1 fasst nur das wesentliche zusammen, im zugehörigen Anhang 9.1 sind weitere wichtige Details aufgeführt. Immer wenn das Ergebnis der PMF-Suche knapp unterhalb oder nahe der Signifikanzgrenze war (Mascot Score 65), wurde die Proteinidentität mit MS/MS-Experimenten verifiziert (Abb. 5.2C, Positionen 8 und 9; siehe Anhang Tab. 9.1.2; Abb. 9.1.9 und 9.1.11). Daten aus Gelbereichen, die mehrere Proteine enthielten, wurden ebenfalls mit MS/MS-Experimenten verifiziert (Abb. 5.2C, Positionen 10 und 14; siehe Anhang, Tab. 9.1.2). Keine PMF- bzw. MS/MS-Datenbanksuche gegen eine randomisierte Datenbank (*decoy database*) hat zu einem Ergebnis geführt (siehe Anhang, Tab. 9.1.2 und 9.1.5). Außerdem war das erste nicht-homologe Protein bei der PMF-Suche immer weit unterhalb der Signifikanzgrenze (Tab. 9.1.4) und die Molekulargewichte von allen identifizierten Proteinen passen zu der Laufhöhe in der dSDS-PAGE (siehe Abb. 5.2C und Tab. 5.1).

Die nicht zugeordneten Positionen 4a – 4d repräsentieren wahrscheinlich verschiedene Konformationen und Aggregationszustände der Untereinheit a, auch ATP6 genannt, welche die hydrophobste Untereinheit der ATP-Synthase ist. Die typische Lokalisation hydrophober Proteine in der dSDS-PAGE oberhalb der Diagonalen und eine für sie charakteristische schnelle und intensive Silberfärbung sind zwei gute Gründe für diese Annahme. Außerdem ist eine massenspektrometrische Identifikation aufgrund der zu erwartenden geringen Anzahl an tryptischen Fragmenten eher unwahrscheinlich (siehe Anhang, Abb. 9.1.4). Das MS-Spektrum hat dann auch nur Signale enthalten, von denen alle intensiveren Signale dem Hintergrund (Selbstverdau vom Trypsin, Matrixsignale) zugeordnet werden konnten. Kein Signal hat zu einem tryptischen Fragment von ATP6 gepasst. Der darauf logische Versuch, für den Verdau von ATP6 Chymotrypsin einzusetzen, hat zum gleichen negativen Resultat geführt.

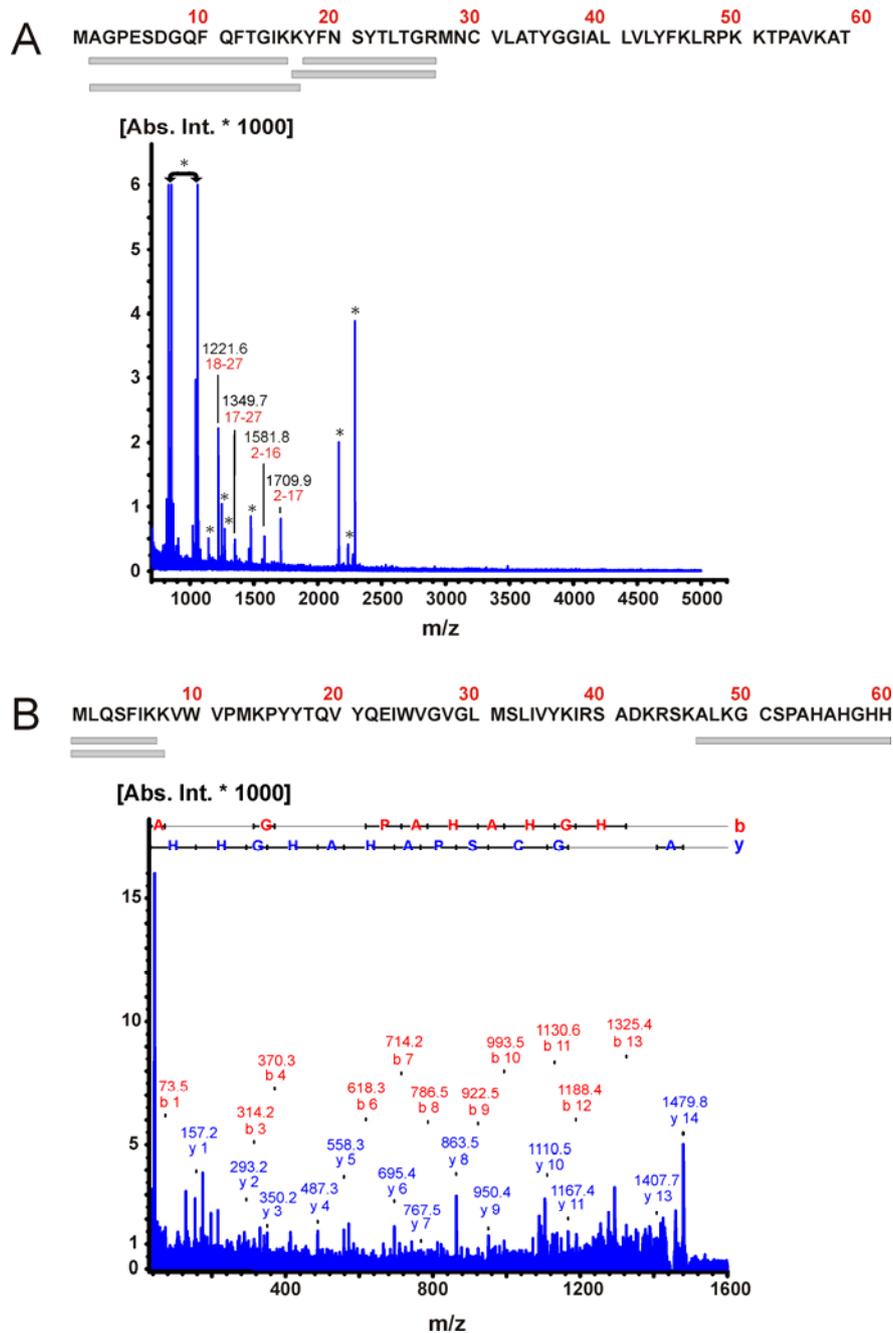
Position 13 konnte mittels PMF dem AGP-Protein zugeordnet werden (siehe Abb. 5.3A am Kapitelende). Drei MS/MS Experimente bestätigen die Signalzuordnung (siehe auch Anhang, Tab. 9.1.1 und Abb. 9.1.17 – 9.1.19). Die Vielzahl an basischen Aminosäuren am C-Terminus des AGP-Proteins kann die Abwesenheit von tryptischen Fragmenten im MS-Spektrum für diese Proteinregion erklären. Ebenso fehlt der zentrale Cluster von hydrophoben Aminosäuren. Das große tryptische Peptid (Abb. 5.3A, Aminosäuren 28-46) ist wahrscheinlich nicht aus dem Gel extrahierbar gewesen. Vielleicht sind auch Suppressionseffekte während MALDI zusätzlich dafür verantwortlich, dass ein

entsprechendes Signal im MS-Spektrum fehlt. Alle gängigen Vorhersageprogramme für Transmembranhelices berechnen auf jeden Fall eine Helix für diesen Bereich (siehe auch Kapitel 5.1.5).

Das MLQ-Protein ist zusammen mit der Untereinheit ATP8 auf Position 14 des Gels gefunden worden. Drei Signale passen auf den tryptischen Verdau der MLQ-Proteinsequenz (Abb. 5.3B). Ein Signal ist eindeutig mittels MS/MS-Experiment dem C-Terminus des MLQ-Proteins zugeordnet worden. Die beiden Signale im niedrigen Massenbereich haben nicht zu signifikanten MS/MS-Spektren geführt, was aber aufgrund der kurzen Aminosäuresequenzen und der Lokalisation in der Matrixregion nicht ungewöhnlich ist (siehe auch Anhang, Tab. 9.1.1, Abb. 9.1.20 und Abb. 9.1.21). Ähnlich dem AGP-Protein ist auch der C-Terminus des MLQ-Proteins reich an basischen Aminosäuren. Daher konnte der tryptische Verdau nur zu einem C-terminalen Peptid mit einer optimalen Grösse für die massenspektrometrische Analytik führen. Außerdem resultiert aus der vorhergesagten Transmembranhelix und der übersprungenen tryptischen Schnittstelle an Sequenzposition 14 (Aminosäure Prolin an Position 15) ein sehr langes hydrophobes Peptid (Aminosäuren 9-37), das ebenfalls vermutlich nicht aus dem Gel extrahiert werden konnte. In Kapitel 5.1.3 wird zudem noch gezeigt, dass die verwendete niedrige Dodecylmaltosidkonzentration in der zweiten Blau-Nativen Dimension im Vergleich zum AGP-Protein bereits einen Großteil des MLQ-Proteins von der ATP-Synthase dissoziiert hat. Nicht nur dies erschwert die Identifikation natürlich erheblich, sondern auch die Tatsache, dass die beiden kleinen integralen Membranproteine MLQ und ATP8, beide jeweils mit einer hypothetischen Transmembranhelix, selbst durch die multidimensionale Elektrophoresestrategie nicht getrennt werden konnten.

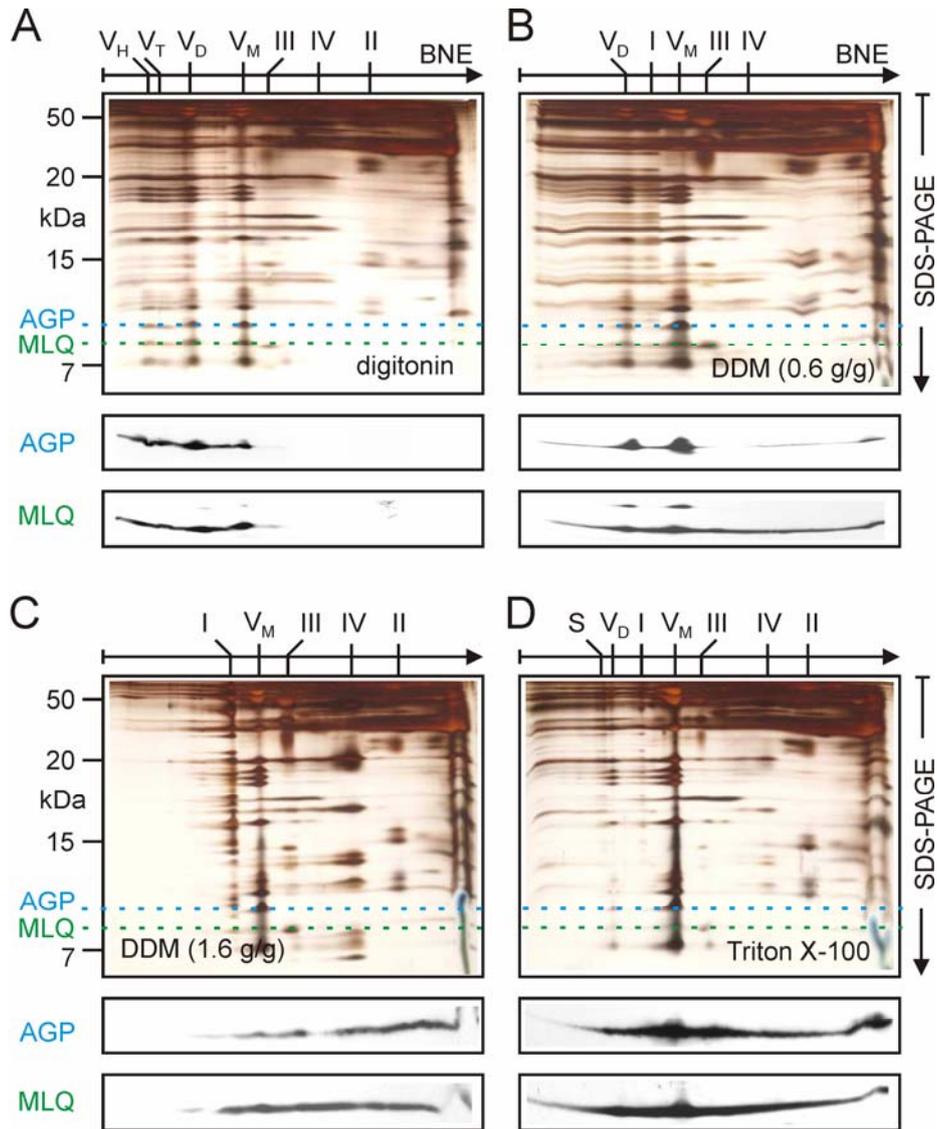
**Abb. 5.3 Massenspektrometrische Analyse des AGP- und MLQ-Proteins (siehe nächste Seite).** (A) MS-Spektrum des tryptischen Verdau vom AGP-Protein (Position 13 in Abb. 5.2C). Mit Massen versehene Signale gehören zum AGP-Protein. Die Sterne markieren Hintergrundsignale. Das Balkendiagramm ordnet die PMF-Fragmente den entsprechenden Regionen in der Proteinsequenz zu (siehe auch Anhang, Tab. 9.1.1 und Abb. 9.1.17 – 9.1.19). (B) MS/MS-Spektrum von dem C-terminalen tryptischen Fragment ALKGCSPAHAHGHGHH des MLQ-Proteins (Position 14 in Abb. 5.2C). Nur Fragmente der b- und y-Ionen sind im MS/MS-Spektrum markiert. Das Balkendiagramm stellt den Zusammenhang von PMF-Fragmenten und der MLQ-Proteinsequenz her (siehe auch Anhang, Tab. 9.1.1, Abb. 9.1.20 und Abb. 9.1.21).

## 5. Ergebnisse



### 5.1.3 MLQ- & AGP-Protein – zwei neue ATP-Synthase assoziierte Proteine

Um die beiden neu identifizierten Proteine zweifelsfrei als ATP-Synthase assoziierte Proteine zu verifizieren, ist nach zweidimensionaler Trennung (BNE/SDS-PAGE) der Atmungskette von Rinderherzmitochondrien und nachfolgendem Blotten auf PVDF-Membranen mit Hilfe von Antikörpern die quantitative Bindung des MLQ- und AGP-Proteins an die ATP-Synthase in der Blau-Nativen Dimension überprüft worden (Abb. 5.4).



**Abb. 5.4 Das MLQ- und AGP-Protein sind ATP-Synthase assoziierte Proteine.**

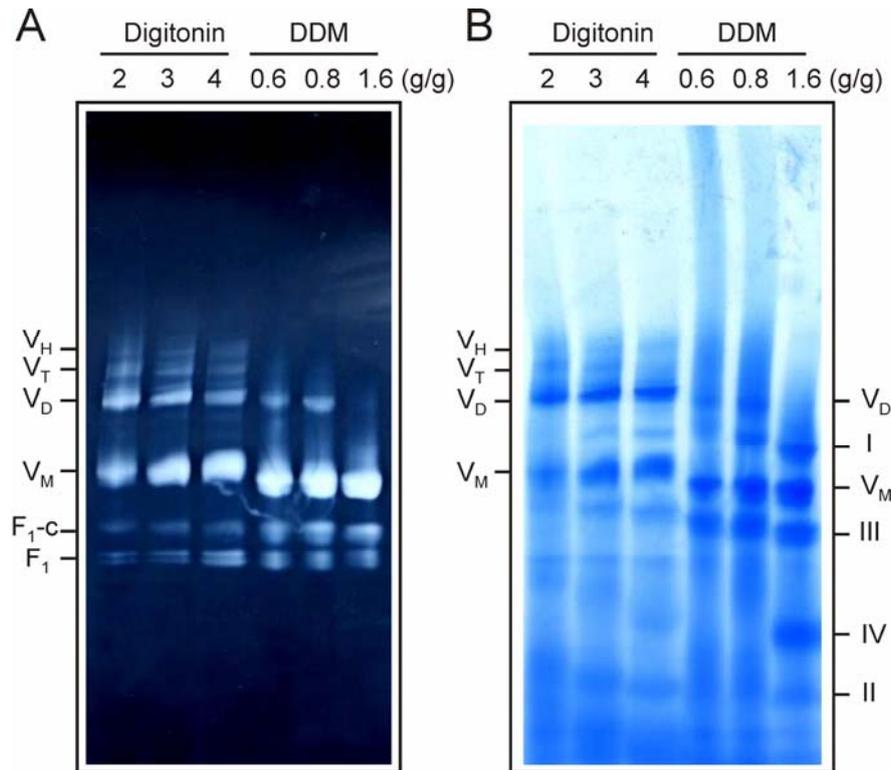
Rinderherzmitochondrien wurden mit verschiedenen Detergenzien gelöst und danach zweidimensional getrennt (1. Dimension: BNE; 2. Dimension: Tricin-SDS-PAGE, 16% T, 6% C Acrylamidgele). Das Detergenz-Protein-Verhältnis für die BNE war: (A) Digitonin (2g/2g), (B) Dodecylmaltosid (0.6 g/g), (C) Dodecylmaltosid (1.6 g/g), (D) Triton X-100 (2.4 g/g). Die 2-D-Gele wurden auf PVDF-Membranen geblottet und mittels Antikörper gegen MLQ und AGP analysiert. Die Position des MLQ- und AGP-Proteins sind im 2-D-Gel durch gepunktete Linien gekennzeichnet. I, II, III, IV, Atmungskettenkomplexe I, II, III und IV; S, Superkomplex aus Komplex I, III, IV; V<sub>M</sub>, V<sub>D</sub>, V<sub>T</sub>, V<sub>H</sub>, Monomer, Dimer, Tetramer, Hexamer von Komplex V bzw. ATP-Synthase.

Ein polyklonaler Antikörper gegen das MLQ-Protein (Terzi *et al.*, 1990) und ein N-terminaler Antikörper gegen das AGP-Protein sind hierfür verwendet worden. Für niedrige Digitoninkonzentrationen in der Blau-Nativen Dimension, was noch am ehesten physiologischen Bedingungen nahe kommt, ist das MLQ- und AGP-Protein von den Antikörpern in der zweiten Geldimension ausschließlich in gebundener Form an die unterschiedlichen oligomeren Zustände der ATP Synthase detektiert worden ( $V_M - V_H$  in Abb. 5.4A). Geringe Dodecylmaltosid-Protein-Verhältnisse (0,6 g/g) anstatt Digitonin für die Blau-Native Dimension haben bereits zur teilweisen Dissoziation geführt, wobei das AGP-Protein im Gegensatz zum MLQ-Protein noch überwiegend an die ATP-Synthase gebunden vorgelegen hat ( $V_D, V_M$  in Abb. 5.4B). Aufgrund ihres isoelektrischen Punktes ( $pI = 10$ ) und der Fähigkeit, genügend Coomassie zu binden, wandert der dissoziierte Anteil beider Proteine in der Blau-Nativen Dimension bis zur Lauffront. Das Auftreten von Schmierern ist hierbei für solch basische Proteine ebenfalls typisch. Dieses Schmierern bis zur Lauffront in der Blau-Nativen Dimension ist bei der Antikörperdetektion des AGP- und insbesondere des MLQ-Proteins nach Blotten der zweiten Dimension (SDS-PAGE) detektiert worden. Der Einsatz von sonst gängigen Dodecylmaltosid-Protein-Verhältnissen (1,6 g/g) bei Aufreinigungen von Membranproteinkomplexen hat die Situation noch weiter verschlechtert (Abb. 5.4C). Die beiden Proteine sind jetzt zum Großteil dissoziiert von der ATP-Synthase nachgewiesen worden. Das ebenfalls häufig verwendete Triton X-100 ist nur unwesentlich besser im Vergleich zu den hohen Dodecylmaltosidkonzentrationen (Abb. 5.4D). Die weniger milden Eigenschaften von Dodecylmaltosid und Triton X-100 gegenüber Digitonin sind ebenfalls an dem Verlust der höheren Oligomere der ATP-Synthase zu erkennen gewesen.

Aufgrund der physiologischen Digitoninaufreinigung ist geschlussfolgert worden, dass das MLQ- und AGP-Protein quantitativ an die ATP-Synthase in der Mitochondrienmembran bindet. Freies MLQ- und AGP-Protein scheint in der Membran nicht zu existieren, da bei dieser sehr milden Aufreinigungsstrategie kein Schmierern auf der PVDF-Membran mit der Antikörperdetektion zu erkennen gewesen ist (Abb. 5.4A). Die Kontrollen mit harscheren Reinigungsstrategien haben dagegen die Dissoziation des AGP- und MLQ-Proteins aufgezeigt (Abb. 5.4B-D). Insbesondere das Ergebnis, dass geringe Dodecylmaltosidkonzentrationen schon zu einer verstärkten Dissoziation des MLQ-Proteins geführt haben, bestätigt noch einmal die Sensitivität der Massenspektrometrie (Kapitel 5.1.2). Auch konnte gezeigt werden, dass die Bindung des AGP- und MLQ-Proteins nicht auf dimere oder höhere oligomere Formen der ATP-Synthase beschränkt ist (Abb. 5.4A-C).

#### 5.1.4 Aktivitätstest

Die Atmungskette von Rinderherzmitochondrien ist mit unterschiedlichsten Digitonin- bzw. Dodecylmaltosid-Protein-Verhältnissen herausgelöst worden und mittels BNE in Superkomplexe und individuelle Komplexe aufgetrennt worden. Die Lösungsbedingungen sind so gewählt worden, dass das AGP- bzw. MLQ-Protein quantitativ an die ATP-Synthase bindet (Digitonin-Protein-Verhältnis = 2–4 g/g), teilweise dissoziiert (Dodecylmaltosid-Protein-Verhältnis = 0,6 g/g) oder komplett entfernt wird (Dodecylmaltosid-Protein-Verhältnis = 1,6 g/g) (siehe auch Kapitel 5.1.3). Die spezifischen In-Gel-ATP-Hydrolyseaktivitäten sind für die An- und Abwesenheit der neuen Proteine bestimmt worden (Abb. 5.5 und Tab. 5.2 auf den folgenden zwei Seiten). Sie sind für den monomeren Komplex V bei hohen und niedrigen Dodecylmaltosidkonzentrationen fast identisch gewesen, so dass eine Dissoziation des MLQ-Proteins wohl keinen Effekt auf die katalytische Aktivität von Komplex V hat. Ebenso konnten keine Unterschiede zwischen Dodecylmaltosid und Digitonin festgestellt werden. Das ist ungewöhnlich, da unterschiedliche Detergenzien in verschiedener Art und Weise den Anteil von gebundenem Lipid bei Proteinen verändern, was die katalytische Aktivität beeinflussen sollte. Da das AGP-Protein bei hohen Dodecylmaltosidkonzentrationen ebenfalls quantitativ dissoziiert und bei niedrigen Digitoninkonzentrationen sicher am Komplex V verbleibt, lässt sich hinsichtlich der Aktivität das gleiche folgern wie für das MLQ-Protein. Beide neuen Proteine sind somit nicht unmittelbar in die Regulation der Aktivität von Komplex V involviert.



**Abb. 5.5 In-Gel-ATP-Hydrolyseaktivität von ATP-Synthasebanden, bei denen das MLQ- und AGP-Protein noch enthalten bzw. entfernt worden ist.** Rinderherzmitochondrien wurden mit verschiedenen Digitonin-Protein- bzw. Dodecylmaltosid(DDM)-Protein-Verhältnissen (2, 3, 4 bzw. 0.6, 0.8, 1.6 g/g) gelöst und dann mittels BNE getrennt. **(A)** In-Gel-ATP-Hydrolyse-Prüfung ergibt Bleiphosphatpräzipitate für den monomeren (V<sub>M</sub>), dimeren (V<sub>D</sub>), tetrameren (V<sub>T</sub>) und hexameren (V<sub>H</sub>) Komplex V. Das Bandenduplett (F<sub>1</sub>) im niedrigeren Massenbereich repräsentiert den F<sub>1</sub>-Unterkomplex, der noch das Inhibitorprotein IF<sub>1</sub> gebunden bzw. nicht gebunden hat (Wittig *et al.*, 2006c). Die Bande darüber (F<sub>1</sub>-c) enthält zusätzlich einen Ring von c-Untereinheiten. Das MLQ- und AGP-Protein fehlen beim monomeren Komplex V, wenn 1.6 g DDM pro Gramm Protein verwendet wird. Dagegen sind beide Proteine unter Digitoninbedingungen an alle Komplex V-Banden gebunden. **(B)** Das Gel in A wurde mit Coomassie angefärbt. Die Atmungskettenkomplexe I-IV (I-IV) und der monomere (V<sub>M</sub>) bzw. dimere (V<sub>D</sub>) Komplex V sind gekennzeichnet.

	Detergenz	Detergenz/ Protein (g/g)	Präsenz von MLQ	Präsenz von AGP	Spezifische ATPase- Aktivität
Monomere Komplex V	DDM	0.6	+	+++	0.36±0.05
		0.8	+	+++	0.26±0.03
		1.6	---	---	0.28±0.06
Monomere Komplex V	Digitonin	2	+++	+++	0.34±0.01
		3	+++	+++	0.32±0.02
		4	+++	+++	0.30±0.04
Dimere Komplex V	Digitonin	2	+++	+++	0.27±0.03
		3	+++	+++	0.32±0.06
		4	+++	+++	0.29±0.06
Tetramere Komplex V	Digitonin	2	+++	+++	0.35±0.08

**Tab. 5.2 Unveränderte, MLQ- und AGP-unabhängige, spezifische ATP-Hydrolyseaktivität von verschiedenen oligomeren Formen des Komplex V.** Als Wert für die spezifische ATP-Hydrolyse-Aktivität ist das Verhältnis aus der Aktivitätsfärbung des blaunativen Gels (Abb. 5.5A) und der Intensität der Proteinfärbung in der zweiten Geldimension (Tricine-SDS-PAGE) gegeben (siehe Kapitel 8.3.4). (+++) und (+) markieren Komplexe mit hohen bzw. reduzierten Mengen von gebundenem MLQ- und AGP-Protein. (---) bedeutet den fast vollständigen Verlust des MLQ- und AGP-Proteins.

### 5.1.5 Strukturelle Analyse und Suche nach Homologen

Beide Proteine enthalten eine potentielle Transmembranhelix (Abb. 5.6A,C). Abhängig von der verwendeten Vorhersagesoftware (www.expasy.org; TMPred, SOSUI, TMHMM, HMMTOP) variiert die Position geringfügig. Für das AGP-Protein sagt das Programm NetPhos (www.expasy.org) zwei Phosphorylierungsstellen und für das MLQ-Protein eine voraus.

#### A

```
R.n. MAGPESDGQFQFTGIKKYFNSYTLTGRMNCVLATYGGIALLVLYFKLRPKKTPAVKAT
B.t. MAGPEADAQFHFTGIKKYFNSYTLTGRMNCVLATYGSIALIVLYFKLRSKKTTPAVKAT
H.s. MAGPESDAQYQFTGIKKYFNSYTLTGRMNCVLATYGSIALIVLYFKLRSKKTTPAVKAT
S.b. MAGAEAE---KLSGLSKYFNGTTMAGRANVAKATYAVIGLIITAYNVMKPKK-----
```

#### B

```
R.n. -----MAG---PESDGQF---QFTGIKKYFNSYTLTG--RMNCVLATYGGIALLVLYFKLRPKKTPAVKAT
S.b. -----MAG---AEAE-----KLSGLSKYFNGTTMAG--RANVAKATYAVIGLIITAYNVMKPKK-----
S.c. MGAAYHFMGKALPPHQLAIGTLGLLGLLVVVPNPFKSAKPKTVDIKTDNKDEEKFIENYLKKHSEKQDA-----
```

#### C

```
R.n. MLQSFIKKVVVPMKPYQTQVYQEIWVGVLMSLIVYKIRSA DKRSKALKGCS PAHAHGHH
B.t. MLQSLIKKVVVPMKPYQTQAYQEIWVGTGLMAYIVYKIRSA DKRSKALKASSAAPAHGHH
H.s. MLQSIIKNIWIPMKPYTKVYQEIWIGMGLMGFIVYKIRSA DKRSKALKAS-APAPGHH
D.r. -MAGAFNVWAKMSPYYAKANVEMFVGLGIMSEFFYKLSYGGKK-KAVQSK---PAH---
```

**Abb. 5.6 Sequenzabgleich und strukturelle Analyse des MLQ- und AGP-Proteins.** Die Proteinsequenzen wurden mit ClustalW abgeglichen (www.ebi.ac.uk). Die Transmembranhelices (rot markiert) wurden mit TMPred (www.expasy.org) vorhergesagt, potentielle Phosphorylierungsstellen (blau markiert) mit NetPhos (www.expasy.org). Die grün, gelb bzw. unmarkierten Aminosäuren kennzeichnen identische, ähnliche bzw. verschiedene Aminosäuren (A) Sequenzabgleich des AGP-Proteins von *Rattus norvegicus* R.n. (gi|19424210), *Bos taurus* B.t. (gi|91207977), *Homo sapiens* H.s. (gi|14249376) und *Sarcophaga bullata* S.b. (gi|23505740). (B) Sequenzabgleich des AGP-Proteins von *Rattus norvegicus* R.n., *Sarcophaga bullata* S.b. und ATP-Synthase subunit k von *Saccharomyces cerevisiae* S.c. (gi|6324495). (C) Sequenzabgleich des MLQ-Proteins von *Rattus norvegicus* R.n. (gi|109478763), *Bos taurus* B.t. (gi|112834), *Homo sapiens* H.s. (gi|4758940) und *Danio rerio* D.r. (gi|68394446).

Protein-Protein-Blastsuchen (blastp) mit der Proteinsequenz des AGP-Proteins von *Rattus norvegicus* gegen die NCBI-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ordnen neben Säugetierproteinen mit durchschnittlich 90% Identität ebenfalls einige Insektenorthologe zu (z.B. in Abb. 5.6A, R.n. zu S.b. mit 40% Identität und 60% Ähnlichkeit). Eine WU-BLAST2-Suche mit der homologen Proteinsequenz des Insekts *Sarcophaga bullata* gegen die Genomdatenbank von *Saccharomyces cerevisiae* ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) hat die Untereinheit k der Hefe-ATP-Synthase auf Position 6 in der Ergebnisliste aufgeführt. Die Sequenzähnlichkeit zwischen dem AGP-Protein von *Sarcophaga bullata* und der Untereinheit k von *Saccharomyces cerevisiae* ist aber gering (13% Identität, 16% Ähnlichkeit). Dies gilt auch für den Vergleich der Sequenzen von *Rattus norvegicus* und *Saccharomyces cerevisiae* (12% Identität, 19% Ähnlichkeit). Außerdem ist die vorhergesagte Transmembranhelix verschoben (Abb. 5.6B).

Homologiesuchen mit der Proteinsequenz des MLQ-Proteins von *Rattus norvegicus* gegen die NCBI-Datenbank identifizieren mehrere homologe Säugetierproteine, sowie ein Homolog (35% Identität, 50% Ähnlichkeit) des Zebrafischs *Danio rerio* (Abb. 5.6C). Es sind aber keine Homologe zu den Säugetier-MLQ-Proteinen bzw. dem Zebrafisch-MLQ-Protein bei einer Suche gegen die Genomdatenbank von *Saccharomyces cerevisiae* gefunden worden. Auch direkte Vergleiche mit bekannten Untereinheiten von Hefe-ATP-Synthase haben keine aussagekräftigen Ähnlichkeiten aufgedeckt.

## 5.2 Massenspektrometrische Identifizierung eines unkonventionell gebundenen Häm bei einem neu entdeckten bakteriellen Cytochrom *c*

### 5.2.1 Einführung und Vorgeschichte

Die massenspektrometrische Identifikation und Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen ist immer noch extrem schwierig, unabhängig davon, ob es sich um Membranproteine handelt, da das Erreichen von 100% Sequenzabdeckung bis jetzt standardmäßig noch nicht möglich ist. Das folgende Beispiel zeigt anhand der *bottom up* Analytik basierend auf einem Trypsinverdau eines Proteins die Möglichkeiten und Grenzen. Zusätzlich konnte durch diese massenspektrometrische Untersuchung dazu beigetragen werden, neue Erkenntnisse über die Häm-Bindung an Proteine zu gewinnen. Obwohl es sich in dem untersuchten Beispiel nicht um ein Membranprotein gehandelt hat, sind die Ergebnisse von allgemeinem Interesse, da diese Phänomene der Häm-Bindung natürlich auch bei Membranproteinen vorkommen können (siehe nächster Absatz).

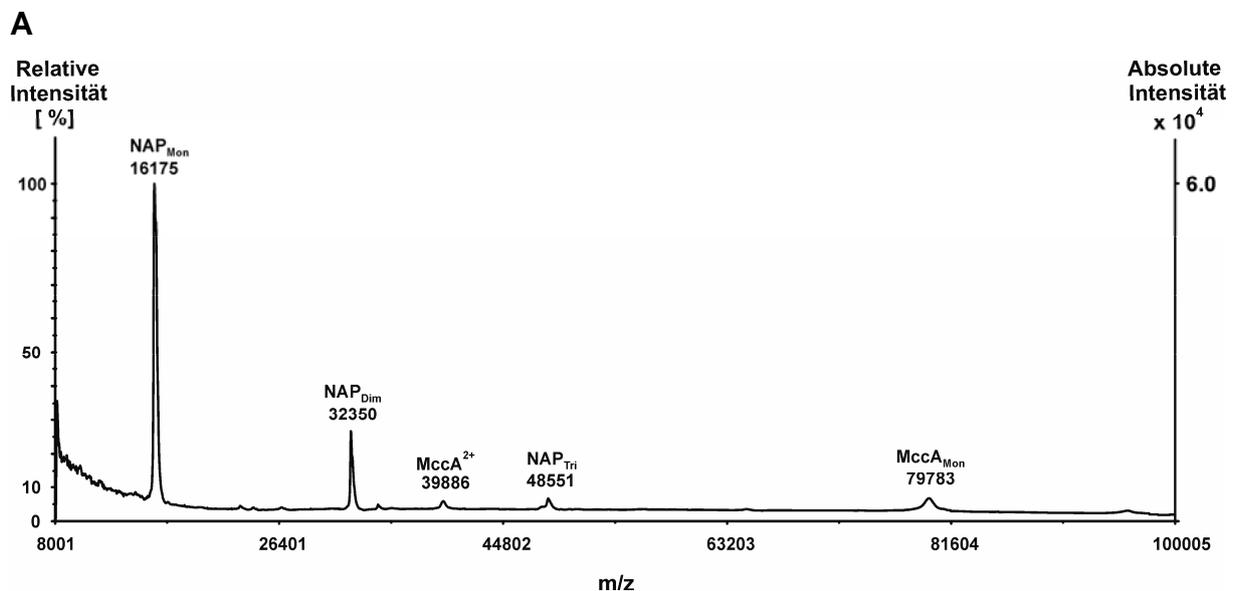
In Kooperation mit Dr. Jörg Simon (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Universität Frankfurt a. M.) sollte in diesem Projekt ein neues, bakterielles *c*-Typ Cytochrom hinsichtlich Anzahl und Ort der Häm-Gruppen massenspektrometrisch charakterisiert werden. C-Typ Cytochrome sind eine weit verbreitete Klasse von Proteinen und essenziell für das Leben von fast allen Organismen (Moore *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1995). Bakterielle *c*-Typ Cytochrome sind entweder an der Außenseite der Cytoplasmamembran oder, falls es sich um gram-negative Bakterien handelt, in periplasmatischen Kompartimenten oder an der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert. Charakteristisch für bakterielle *c*-Typ Cytochrome ist, dass Häm (Fe-Protoporphyrin IX) mittels zweier Thioether-Bindungen kovalent mit dem Peptidgerüst verknüpft ist. Zwei reduzierte Cystein-Reste reagieren dabei mit den zwei Häm *b*-Vinyl-Gruppen. Die zwei Cystein-Reste sind in der Aminosäuresequenz im sogenannten Häm *c*-Bindemotiv angeordnet (CXXCH oder sehr selten CX<sub>3</sub>CH, CX<sub>4</sub>CH bzw. CXXCK; X repräsentiert eine beliebige Aminosäure). Zwei verschiedene Cytochrom *c*-Biogenesysteme für diese Reaktion wurden in Bakterien bereits identifiziert, die sich aber deutlich in ihren Enzymkomponenten unterscheiden (Thöny-Meyer *et al.*, 1997; Kranz *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 2003; Stevens *et al.*, 2004). Für das stereospezifische kovalente Einfügen von Häm ist im letzten Schritt das Enzym *cytochrome c haem lyase* (CCHL) zuständig. Für die unterschiedlichen Häm *c*-Bindemotive gibt es natürlich unterschiedliche CCHLs.

Bei dem hier zu charakterisierenden *c*-Typ Cytochrom handelte es sich um ein neues MccA protein (*multihæm c-type cytochrome*). 17 Homologe und eine partielle MccA-Primärstruktur wurden im bakteriellen Genomen von Epsilon-Proteobakterien (*Wolinella succinogenes*, *Campylobacter spp.*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*) und verschiedenartigen *Shewanella*-Spezien identifiziert (siehe Anhang, Abb. 9.2.1). Die Proteinsequenzen stimmen in mindestens 50% ihrer Aminosäuren überein (sog. Sequenzidentität). Alle Sequenzen enthalten ein typisches Signalpeptid für die Sekretion (vorhergesagt mit dem SignalP-Algorithmus von Bendtsen *et al.*, 2004) und 7 konventionelle Häm *c*-Bindemotive (CXXCH). Zusätzlich gibt es vier konservierte Cysteine in allen Homologen. Eines davon ähnelt einem Häm *c*-Bindemotiv, das bei Eukaryoten sehr selten auftritt und sich dadurch auszeichnet, dass das Häm nur an ein Cystein gebunden ist (CH-Signatur, siehe Allen *et al.*, 2004). Der Abstand zwischem diesem Cystein und einem anderen konservierten Cystein ist aber in allen homologen Sequenzen sehr ähnlich (15 bzw. 17 Aminosäuren), was die Existenz eines neuen Häm *c*-Bindemotivs wahrscheinlich macht (CX<sub>15</sub>CH bzw. CX<sub>17</sub>CH). Bis jetzt wurden nur Abstände zwischen den beiden Cysteinen des Häm *c*-Bindemotivs in der Literatur beschrieben, die 2 bis 4 Aminosäuren umfassten.

In der Gruppe von Jörg Simon wurde für das neue MccA Protein bereits eine Strategie entwickelt, um es in ausreichenden Mengen zu gewinnen (15 mg reines MccA pro Liter Zellkultur). Als Vertreter wurde das MccA Protein des Bakteriums *W. succinogenes* DSMZ 1740 (Datenbankbezeichnung in NCBI: WS0379, *accession code* NP\_906626) aufgereinigt. Zusätzlich wurde ein neues Gen gefunden, dass eine CCHL kodiert. Diese CCHL könnte auch für das Einfügen einer Häm-Gruppe an einem unkonventionellen Häm *c*-Bindemotiv verantwortlich sein. Ziel der massenspektrometrischen Untersuchung war es deshalb herauszufinden, ob mehr als sieben Häm-Gruppen an dem Protein hängen. Wenn dieses der Fall wäre, sollte zusätzlich die Art und Weise der neuen Häm-Bindung an die konservierten Cysteine ermittelt werden. Leider gibt es bis jetzt aber kaum Anhaltspunkte in der Literatur für die massenspektrometrische Analyse von Multihäm Cytochrom *c*'s (Yang *et al.*, 2005).

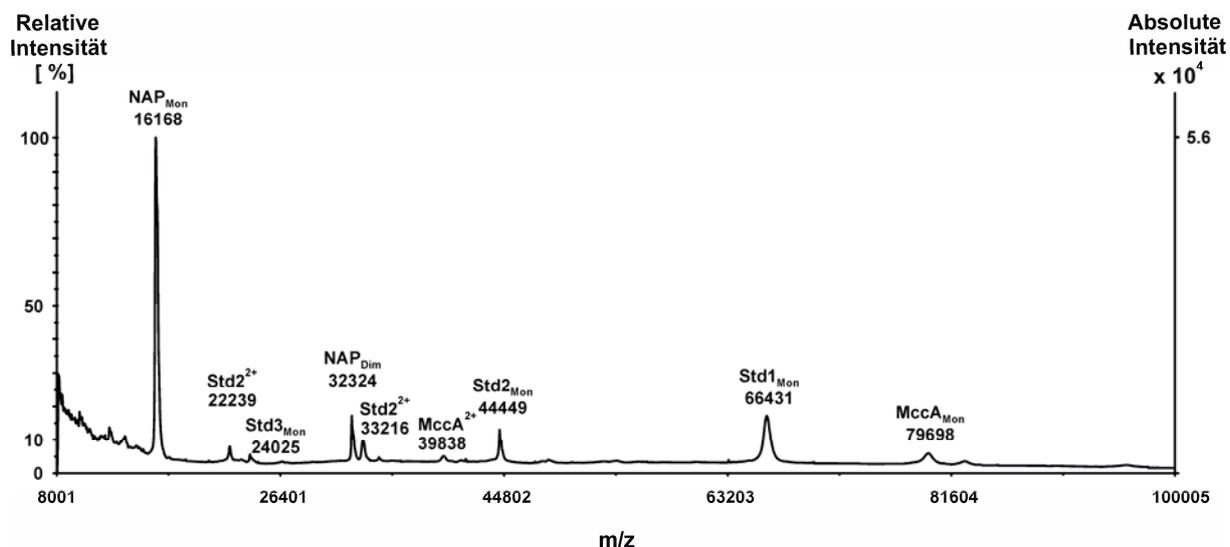
### 5.2.2 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die Masse von prozessierten apo-MccA (663 Aminosäuren, siehe nächster Absatz) ist 74756, aber es wurde eine Masse von 79683 (+/- 72) bzw. 79.766 (+/- 72) für das aufgereinigte Protein mittels MALDI-MS gemessen (interne bzw. externe Kalibrierung, siehe Abb. 5.7 und Anhang, Tabelle 9.2.1). Da eine kovalent gebundene Häm-Gruppe zu einer Massenzunahme von 616 führt, deutet dieses auf acht (berechnete Masse von 79684) Häm-Gruppen hin. Es sind aber nur sieben anerkannte Häm-Motive (CXXCH) vorhanden (berechnete Masse von 79.068) Das achte Häm muss deshalb auf eine noch unbekannte Art und Weise kovalent an das MccA gebunden sein.



**Abb. 5.7 Repräsentative MALDI-TOF-Spektren von aufgereinigtem MccA.** (A) Externe Kalibration. (B) Interne Kalibration (siehe nächste Seite). Die hohe Signalintensität von der Verunreinigung (NAP-Protein, siehe Anhang, Tab. 9.2.2C) spiegelt sich nicht in den PMF-Daten (siehe Abb. 5.8 und Anhang, Tab. 9.2.2) wieder. Der Interne Standard ist mit Std1, Std2 und Std3 abgekürzt. In beiden Massenspektren sind die Ladungszustände der identifizierten Analyten (+1 oder +2) und Oligomere (Mon, Monomer; Dim, Dimer; Tri, Trimer) markiert.

## 5.7B



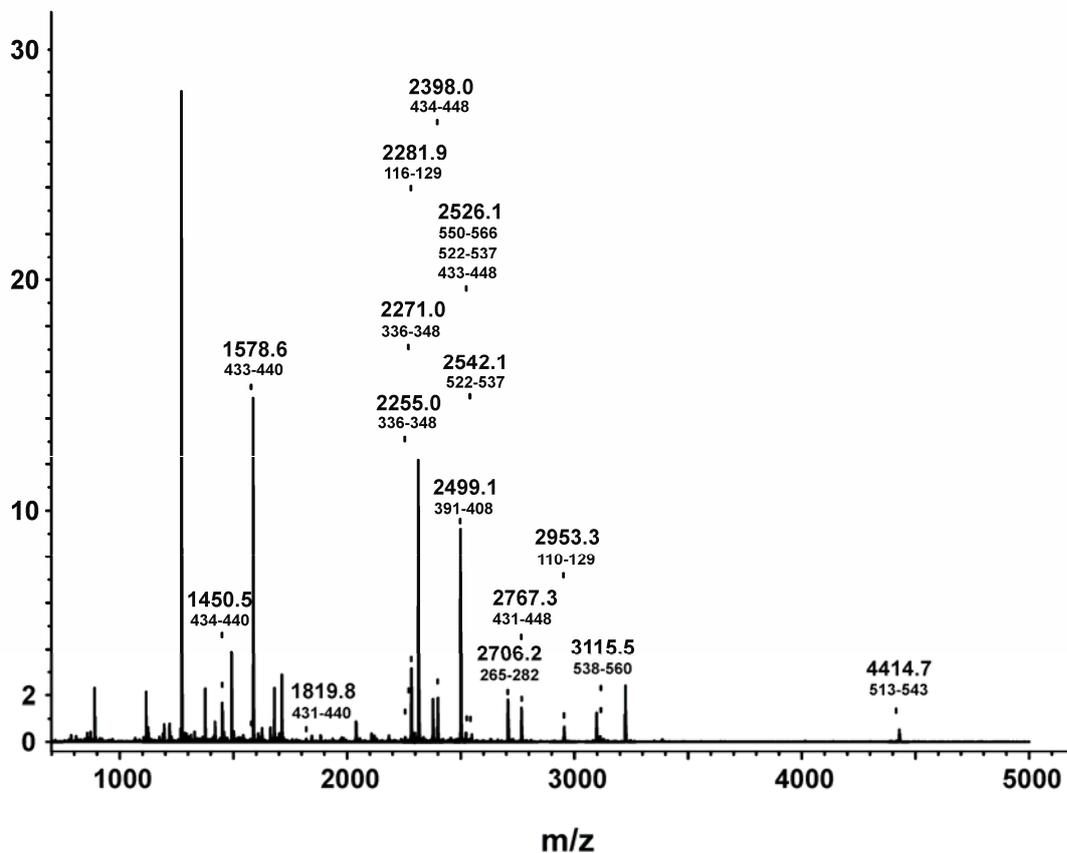
Um das unkonventionelle Häm *c*-Motiv zu lokalisieren, wurde MccA mit Trypsin verdaut. Die Analyse resultierte in einer ausreichend hohen Sequenzabdeckung für MccA (siehe Abb. 5.8 auf der nächsten Seite und Anhang, Tab. 9.2.2A). Die Anwesenheit des N-terminalen Fragments MEGMQMTK belegt, dass ein Signalpeptid von 27 Aminosäuren während der Proteinreifung abgespalten wird (prozessiertes MccA). Das sogenannte NAP-Protein von *W. succinogenes* DSMZ 1740 (Datenbankbezeichnung WS1589, *accession code* NP\_907728) wurde als geringfügige Verunreinigung identifiziert (siehe Anhang, Tab. 9.2.2C). Die Verunreinigung war natürlich auch bei der Bestimmung der Proteinmasse von MccA sichtbar (siehe Abb. 5.7).

Fünf von sieben konventionellen Häm *c*-Bindemotiven wurden im MS-Spektrum als Häm-modifizierte Fragmente detektiert und mittels MALDI-MS/MS verifiziert (siehe Abb. 5.8 und Abb. 5.9 auf den folgenden Seiten und Anhang, Tab. 9.2.2B). Häm-modifizierte Fragmente ab ca. 2000 Da sind zusätzlich noch aufgrund der abweichenden Isotopenverteilung des Signals im MS-Spektrum deutlich erkennbar. Diese Tatsache erhöhte aber auch die Fehlerquote bei der Berechnung der korrekten monoisotopischen Masse, so dass teilweise manuell nachkorrigiert werden musste. Die Wahrscheinlichkeit, dass die zwei fehlenden Häm *c*-Bindemotive Nr. 3 und 7 als tryptisches Fragment im MS-Spektrum auftauchen, ist aber als gering zu beurteilen, da nur sehr große Fragmente von Trypsin generiert werden können (siehe Abb. 5.8). Das Gleiche gilt für zwei der fünf übrigen Cysteine, die in der MccA-Sequenz vorhanden sind. Nur drei Cysteine waren daher durch den tryptischen Verdau zugänglich (siehe Abb. 5.8).



A

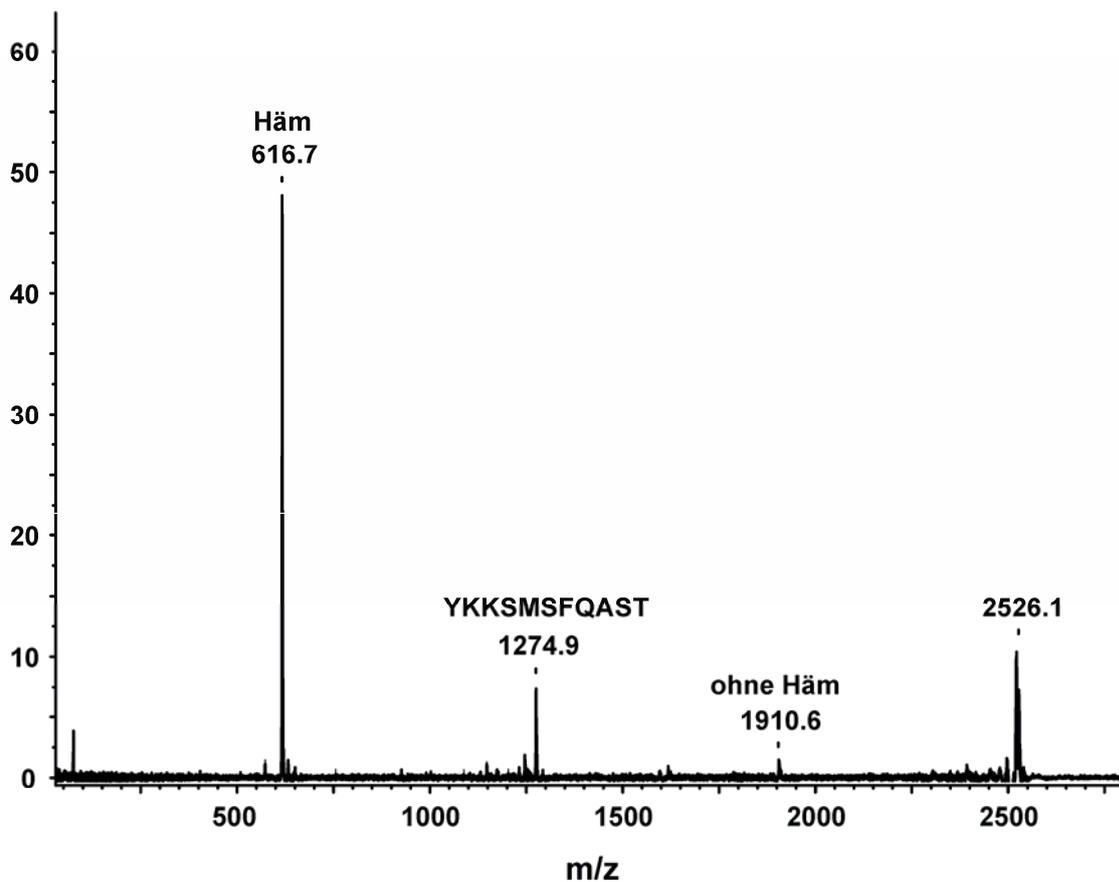
[Abs. Int. \* 1000]



**Abb. 5.9 Repräsentative MS- und MS/MS-Daten.** (A) MS-Spektrum (MALDI-TOF). Nur Häm-modifizierte Fragmente sind beschriftet (siehe Anhang, Tab. 9.2.2B). Abgesehen von dem Signal bei der Masse 2526.1 wurden alle tryptischen Fragmente eindeutig einem Signal zugeordnet. (B) MS/MS-Spektrum (MALDI-TOF/TOF) des Signals bei der Masse 2526.1 (siehe nächste Seite). Sowohl der Häm-Verlust ( $m/z = 616.7$ ) als auch das Fragment ohne Häm ( $m/z = 1910.6$ ) ist sichtbar (Carraway et al., 1993). Eine Sequenzinformation ist kaum aus dem Spektrum ersichtlich. Das tryptische Fragment bei 2526.1 passt zu drei Häm-modifizierten Fragmenten und zwei anderen tryptischen Fragmenten (siehe Anhang, Tab. 9.2.2; Fehlertoleranz, 50 ppm). Das intensive Signal bei 1274.9 gehört zu dem nicht-häm-modifiziertem Fragment YKKSMSFQASTSYCEVCHPWK (siehe Anhang, Tab. 9.2.2). Aber kleinere Peaks im MS/MS-Spektrum lassen sich auch Fragmenten von den vier anderen möglichen tryptischen Peptiden zuordnen.

## 5.9B

[Abs. Int. \* 1000]



Dem Cystein mit der CH-Signatur und dem Cystein, das diesem 15 Aminosäuren vorgelagert ist, konnten ebenfalls Häm-modifizierte Fragmente zugeordnet werden (eingerahmt in Abb. 5.8). Ein Fragment für diese Stelle, in dem Häm zwei tryptische Fragmente verbrückt, wurde nicht detektiert. Diese Tatsache lässt sich durch die zu erwartende Größe des Fragments begründen. Außerdem ist aus den MS-Daten ersichtlich, dass die Häm-Gruppe der tryptischen Fragmente dazu tendiert, durch *in-source decay* bzw. *post-source decay* abgespalten zu werden. Denn es waren auch unmodifizierte tryptische Peptide von Häm-modifizierten Sequenzregionen im MS-Spektrum sichtbar (siehe Anhang, Tab. 9.2.2A). Das MS-Spektrum der Massenbestimmung des unverdauten Proteins zeigt aber, dass die Häm *c*-Bindemotive zu 100% modifiziert sind (siehe Abb. 5.7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die achte Häm-Gruppe kovalent an zwei Cysteine mit der Sequenz CX<sub>15</sub>CH gebunden ist. Der Vergleich mit homologen MccA-Sequenzen aus anderen Organismen zeigt, dass sich in der gleichen Region der Sequenz entweder ein CX<sub>15</sub>CH- oder CX<sub>17</sub>CH-Motiv befindet (siehe Anhang, Abb. 9.2.1).

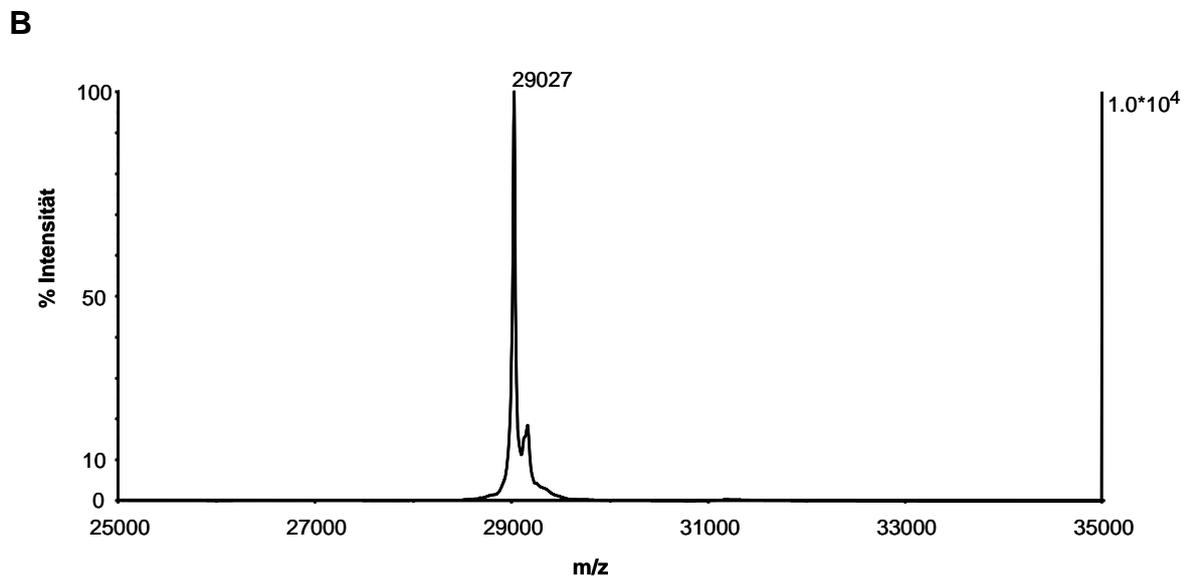
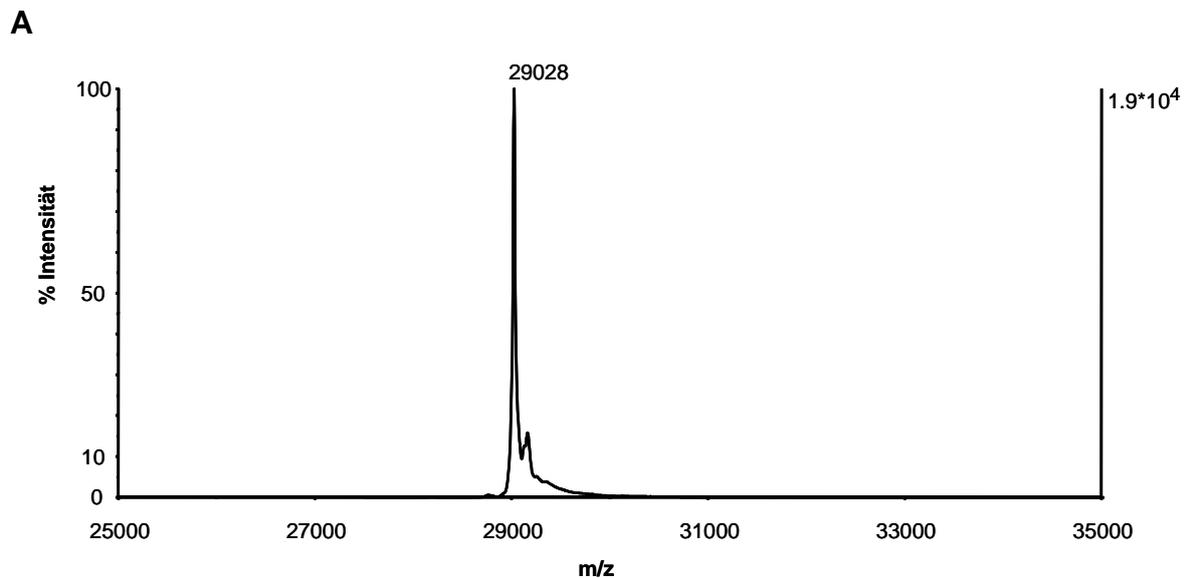
### 5.3 Einfluss von Detergenzien auf MALDI & ESI

Die allgemeine Einstufung von gängigen Detergenzien hinsichtlich der Eignung für MALDI in gut und schlecht, wie es in der Literatur häufig gemacht worden ist, konnte nur teilweise bestätigt werden (siehe auch Kapitel 3.2.1). Auch ist aus der bisherigen Datenlage nicht klar ersichtlich, wie die Kompatibilität von ionischen Detergenzien mit MALDI zu beurteilen ist. Sie wird meist nur als wesentlich schlechter oder ungeeignet im Vergleich zu den meisten nicht-ionischen Vertretern bewertet oder die Beurteilung ist widersprüchlich. Für die Überprüfung der Literaturangaben sind daher repräsentative Vertreter von anionischen, kationischen, zwitterionischen und nicht-ionischen Detergenzien untersucht worden (siehe auch Methoden, Kapitel 8.5).

Vergleicht man Carboanhydrase, die entweder in Wasser oder in einer wässrigen Decylmaltosid-Lösung (Konzentration = CMC; siehe Anhang, Tab. 9.3.1) gelöst worden ist, zeigen sich bei Präparation mit DHBs kaum sichtbare Unterschiede in der Qualität der MALDI-Spektren (z. B. Auflösung oder unruhige Basislinie; siehe Abb. 5.10A-B auf der nächsten Seite). DHBs ist Sinapinsäure vorzuziehen, da für Proteinsignale erheblich bessere Auflösungen erreicht werden können, wie in der Literatur früher schon gezeigt worden ist (Bahr *et al.*, 1997). Durch die geringere Oberflächenspannung der Präparationslösung kommt es jedoch zu einer stärkeren Spreitung der Lösung und somit zu einer großflächigeren Kristallisation im Vergleich zur wässrigen Probenlösung. Trotzdem lässt sich die Kristallisation für Decylmaltosid noch ganz gut reproduzieren (z. B. Spotgröße, gleiche Kristallform). Die Intensität des Signals bzw. das Signal-zu-Rauschen ist aber bei gleicher Proteinmenge immer reduziert. Wechselt man zu dem ebenfalls nicht-ionischen Detergenz MEGA-11, lässt sich das Gleiche beobachten (siehe Abb. 5.10C). Der Einsatz von dem zwitterionischen Detergenz CHAPS zur Solubilisierung von Carboanhydrase zeigt dagegen deutlich die Anlagerungen des Detergenz an das Protein im MALDI-Spektrum (siehe Abb. 5.10D). Die Qualität des Spektrums ist nicht schlechter als die MALDI-Spektren von Carboanhydrase/Decylmaltosid bzw. Carboanhydrase/MEGA-11. Die Intensität des Signals verteilt sich auf die verschiedenen Anlagerungszustände. Die Kristallisationsbedingungen sind aber aufgrund der höheren CMC deutlich schlechter, d.h. man muss nach guten Kristallen in der Präparation suchen. Kationische und anionische Detergenzien wie die untersuchten Vertreter Dodecyltrimethylammoniumbromid oder SDS ergeben ein ähnliches Bild wie CHAPS. MALDI-Spektren guter Qualität zu produzieren ist aber für Präparationen mit SDS und Dodecyltrimethylammoniumbromid sehr schwer, da die CMC relativ hoch ist

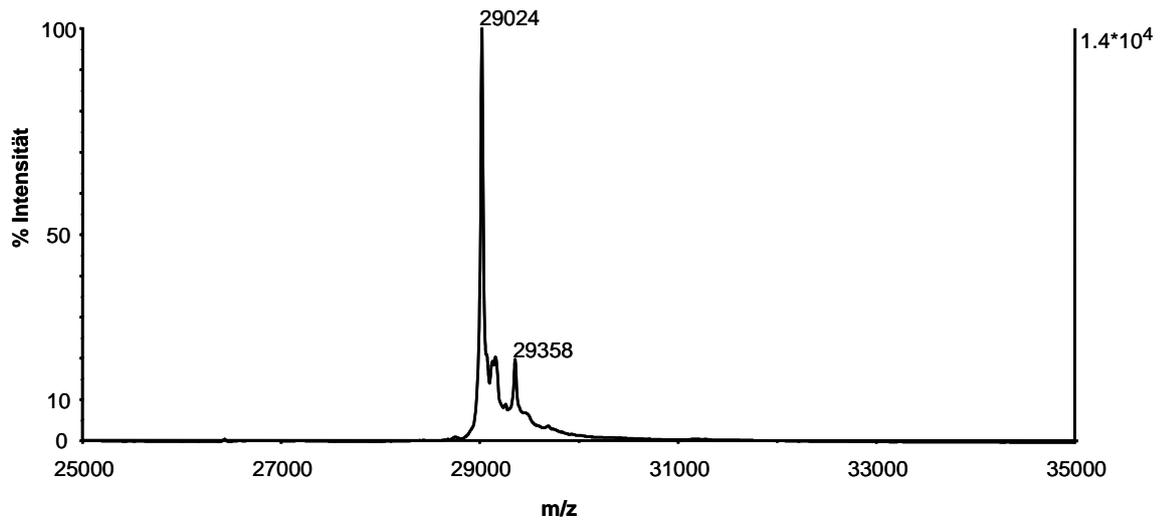
(10 mM). Die Aufnahme eines MALDI-Spektrums mit SDS kann sogar als reine Glückssache eingestuft werden, da häufig gar keine Kristallisation erfolgt. Selbst eine Erhöhung der Matrixkonzentration ist selten hilfreich. Wahrscheinlich ist die hohe Konzentration von Natriumionen dafür verantwortlich. In beiden Fällen kommt es aber auch hier zur Anlagerung der Detergenzien an die Carboanhydrase. Nur im Falle von Dodecyltrimethylammoniumbromid gelang es jedoch diese noch aufzulösen.

**Abb. 5.10 Einfluss von Detergenzien auf MALDI (siehe nächsten zwei Seiten).** Modellprotein war Carboanhydrase (Rind). (A) ohne Detergenz (B) Decylmaltosid (C) MEGA-11 (D) CHAPS (E) Dodecyltrimethylammoniumbromid (F) SDS (weitere Details zu den Detergenzien, siehe Text und Anhang, Tab. 9.3.1)

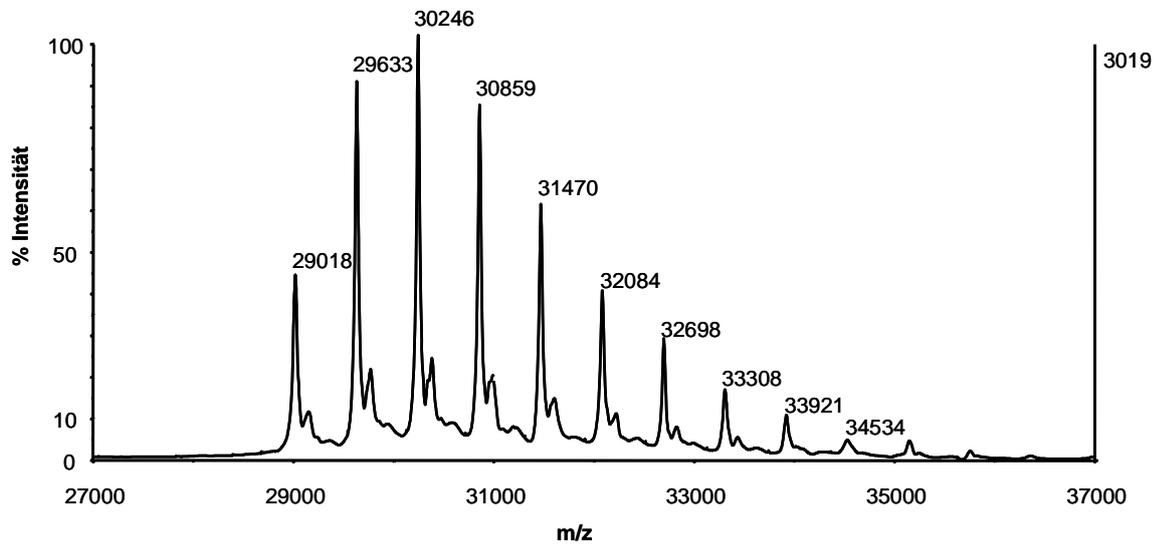


5. Ergebnisse

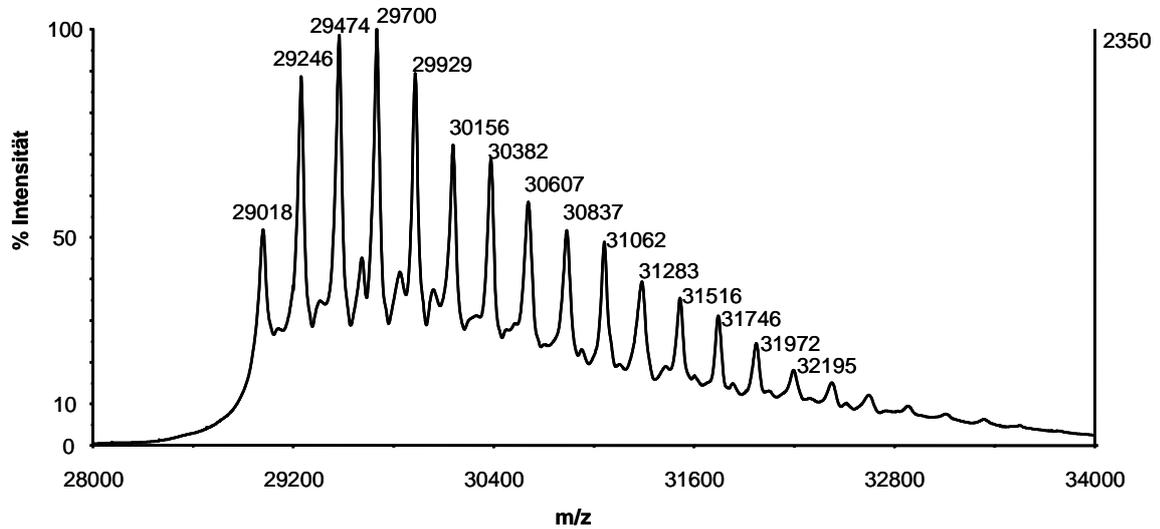
C



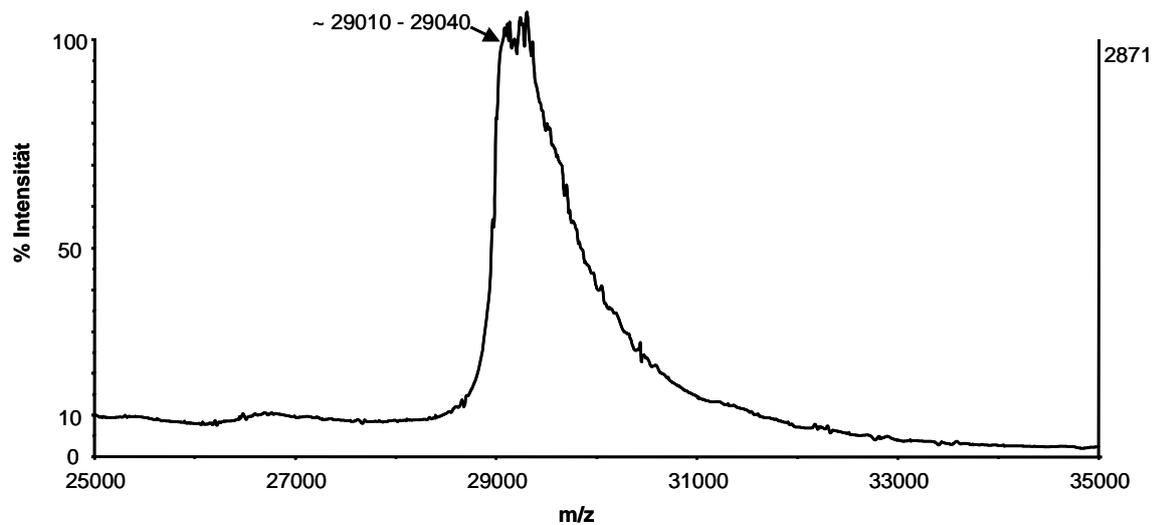
D



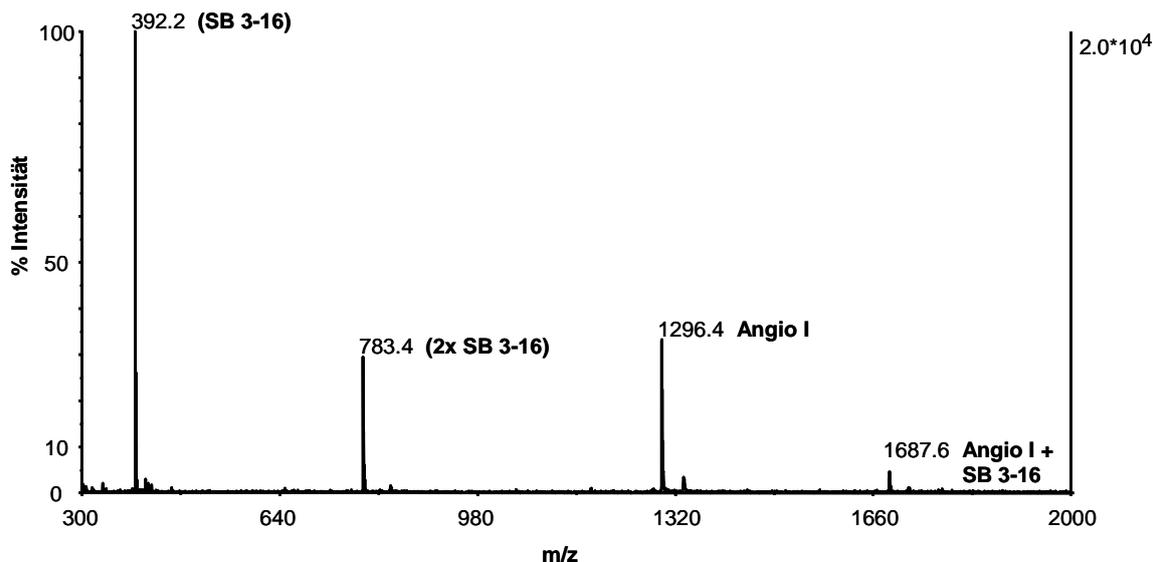
E



## 5.10F



Als weiteres wichtiges Beispiel aus der Vielzahl von zwitterionischen Detergenzien sind die häufig eingesetzten Zwittergent-Varianten (Zwittergent 3-08, 3-12, 3-14 und 3-16) untersucht worden. An der Zwittergentreihe lässt sich außerdem besonders gut die Einflussnahme der Detergenzienkonzentration untersuchen, da die CMC von Zwittergent 3-08 zu Zwittergent 3-16 schrittweise deutlich abnimmt, wobei die chemische Struktur nahezu gleich bleibt. Proben mit Zwittergent 3-08 ergeben keine Spektren. Die CMC ist mit 330 mM zu hoch und deshalb eine Kristallisation nicht mehr möglich. Bei Zwittergent 3-12 kann man die bereits bekannten Detergenzienanlagerungen erahnen. Die Qualität der Kristallisation ist gerade noch ausreichend (siehe Anhang, Abb. 9.3.1). Der Einsatz von Typen dieses Detergenz mit längeren hydrophoben Seitenketten (Zwittergent 3-14, Zwittergent 3-16) verbessert die Situation schrittweise zum Positiven, da die CMC herabgesetzt wird (siehe Anhang, Abb. 9.3.2 und 9.3.3). Die Kristallisationsbedingungen werden dadurch merklich verbessert. Daraus resultiert eine bessere Spektrenqualität und die bereits bekannten Detergenzieninteraktionen mit der Carboanhydrase werden deutlicher sichtbar. Verwendet man andere Modellanalyten wie Cytochrom *c* (Pferd) bzw. Angiotensin I (Mensch) ergibt sich ein ähnliches Bild (siehe nächste Seite, Abb. 5.11 und Anhang, Abb. 9.3.4 – 9.3.8). Wie bei den Angiotensin I-Spektren sind natürlich auch verschiedene oligomere Zustände der Zwittergente im niedrigen Massenbereich der Cytochrom *c*- und Carboanhydrase-Spektren sichtbar.



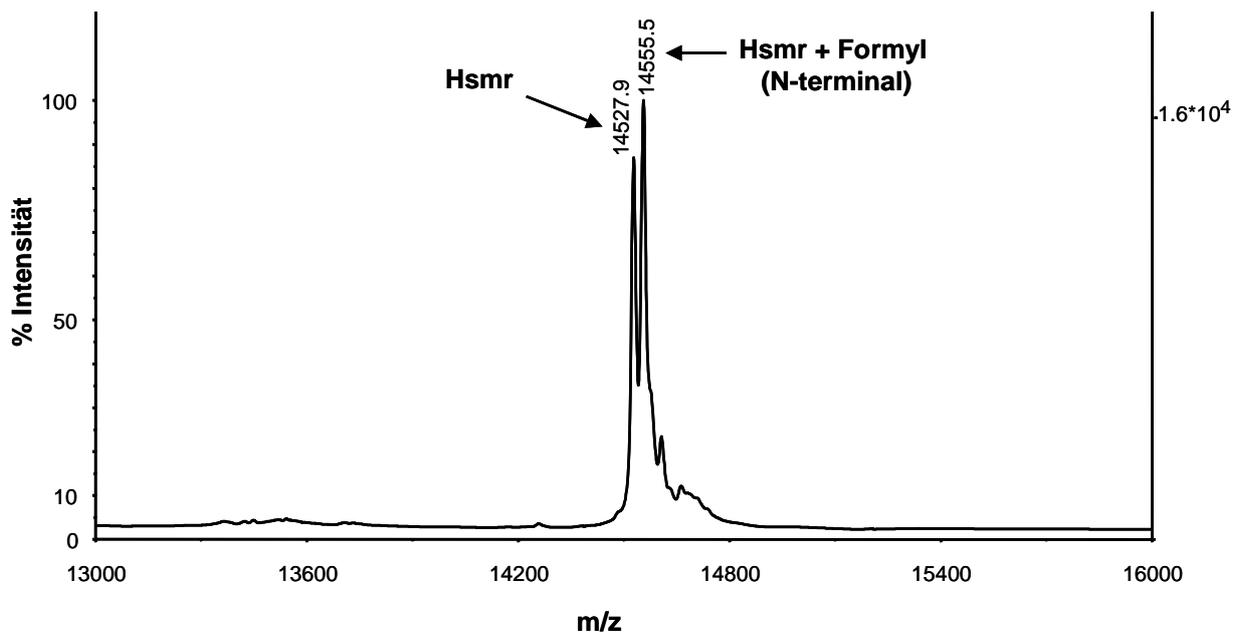
**Abb. 5.11 MALDI-TOF-Spektrum von Angiotensin I/Zwittergent 3-16 (Linearer Modus).** Es ist das Monomer (SB 3-16) und Dimer (2x SB 3-16) von Zwittergent 3-16 sichtbar. Neben dem Angiotensin I-Signal (Angio I) ist auch die einfache Detergenzienanlagerung deutlich sichtbar (Angio I + SB 3-16)

Abb. 5.12 (siehe nächste Seite) verdeutlicht an einem MALDI-Spektrum von einem aufgereinigten Membranprotein, solubilisiert in realen Lösungsmittelsystemen (Puffer, Salz und Detergenz), die gute MALDI-Kompatibilität von nicht-ionischen Detergenzien am Beispiel Dodecylmaltosid. Die N-terminale Modifikation des Proteins ist deutlich aufgelöst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht-ionische Detergenzien mit Zuckergruppen als hydrophile Gruppe für MALDI-Messungen besonders empfehlenswert sind, da keine Interaktionen mit Proteinen im MALDI Spektrum sichtbar sind. Besonders in höheren Massenbereichen, wo sich die Anlagerungen irgendwann nicht mehr in einzelne Signale auflösen lassen, ist dies von Vorteil. Die negative Beurteilung von vielen ionischen Detergenzien ist aber ungerechtfertigt, da unter bestimmten Bedingungen vergleichbare Ergebnisse zu erzielen sind. Wenn die CMC bei einem zwitterionischen, kationischen oder anionischen Detergenz noch eine Kristallisation zulässt, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, ein gutes Spektrum zu erhalten. Sobald sich die häufig auftretenden Anlagerungen aber nicht mehr auflösen lassen, sind sie ungeeignet. Viele Lösungsmittelsysteme von Membranproteinen enthalten neben dem Detergenz aber Puffersubstanzen und Salze, um einen pH-Wert und eine Ionenstärke einzustellen, die das Membranprotein oder die Membranproteine stabil in Lösung halten. Das verschlechtert natürlich zusätzlich die Wahrscheinlichkeit beim Einsatz ionischer Tenside, die Anlagerungen noch in einzelne

Signale aufzulösen. Detergenzien mit zu hohen CMC's sollte man daher grundsätzlich meiden, da bei diesen Tensidmengen meistens keine Kristallisation mehr möglich ist. Die Grenze liegt grob bei 10 mM.

**A**



**B**

MHPYAYLAAAIAAEVAGTTALKLSEGFSPAPSVVVLVGYVSSFYFLGLVLEELPVGVVYGTWAAVGIVATALVG  
VVVFEESVDVAGVVGLALIVAGVVVLNVASDAYTPAHEFEAYVEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

**Abb. 5.12 Beispiel für MALDI-Kompatibilität mit Dodecylmaltosid.** (A) MALDI-TOF-Spektrum von dem aufgereinigten Membranprotein Hsmr (Proteinkonzentration, 10 pmol/μl; Pufferzusammensetzung, 60 mM Tris, pH = 8, 0.1% Dodecylmaltosid; Matrix, 40 mg/ml DHBs in 33% ACN/0.1% TFA). Das Spektrum wurde extern mit Apomyoglobin (16951,6) kalibriert (1-Punkt-Kalibrierung) (B) Proteinsequenz von Hsmr (14526,4 Da). Transmembranhelices, wie mit TMPred ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) berechnet, sind fett markiert. Das N-terminale Methionin (unterstrichen) liegt formyliert und unformyliert vor.

Geeignete Detergenzien für ESI konnten nicht gefunden werden, wenn von realistischen Konzentrationen des Detergenz, d.h. der CMC, ausgegangen worden ist. In allen Fällen ist nur das Detergenz im ESI-Spektrum sichtbar. Auch Perfluoroktansäure (Ishihama *et al.*, 2000), die als besonders tauglich für ESI beschrieben wird, lieferte das gleiche Ergebnis (Beispiele,

siehe Anhang, Abb. 9.3.9-9.3.11). Aussagekräftige ESI-Spektren erhält man nur bei sehr hohen Proteinkonzentrationen. Abb. 5.13 verdeutlicht dies am Beispiel Cytochrom *c* und Digitonin. ESI ist deshalb hinsichtlich der Kompatibilität zu Detergenzien als kritisch eingeordnet worden.

**Abb. 5.13 ESI-QIT-Spektrum von Cytochrom *c*/Digitonin.** Die Digitoninkonzentration entspricht immer der CMC (0.2 mM). +15, 15-fach geladenes Cytochrom *c*; Digitonin + Na, durch Natriumanlagerung 1-fach geladenes Digitonin; - Glucose, Glucoseverlust von der Digitonin-Zuckerseitenkette. **(A)** Hohe Cytochrom *c*-Konzentration (100 pmol/μl = 0.1 mM) **(B)** Cytochrom *c*-Konzentration, 10 pmol/μl. **(C)** Cytochrom *c*-Konzentration, 1 pmol/μl.

**A**

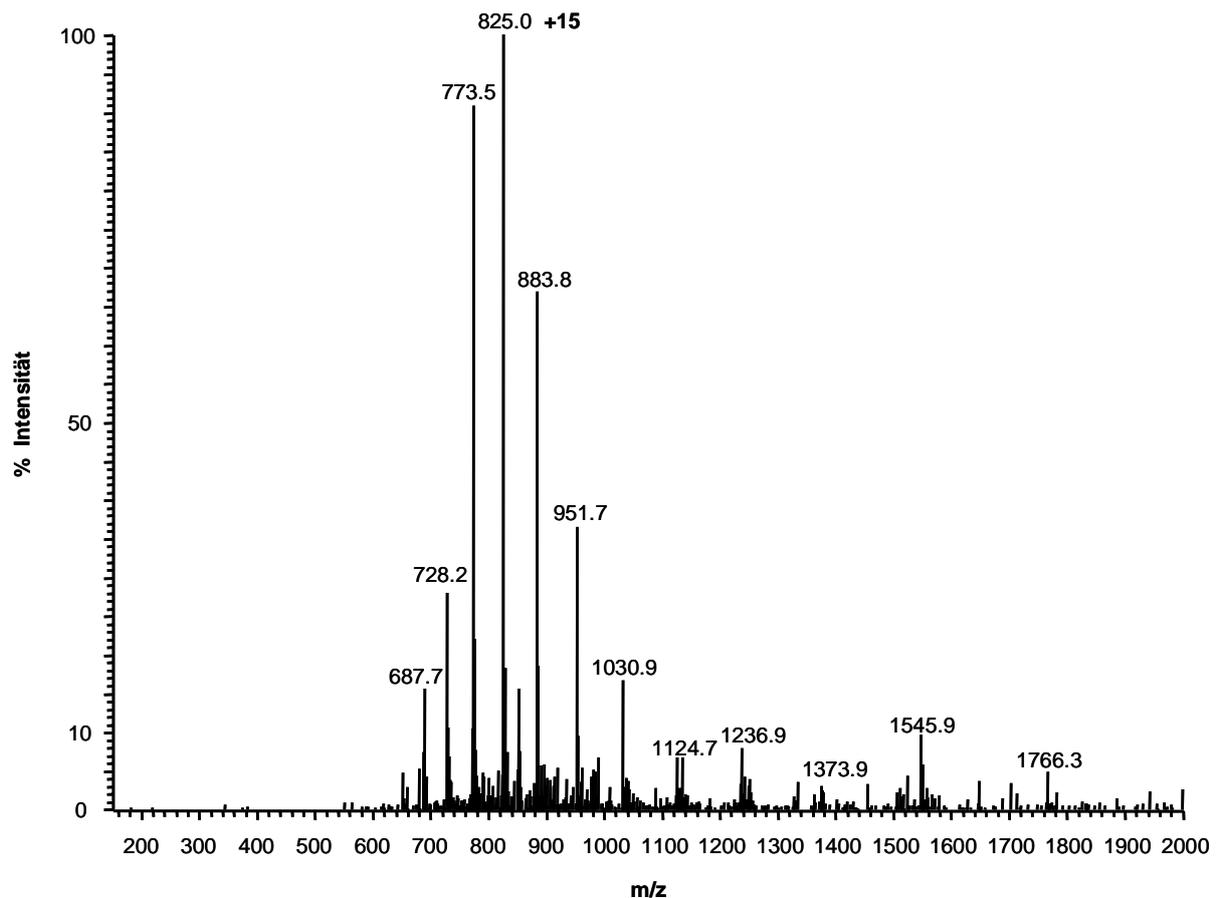
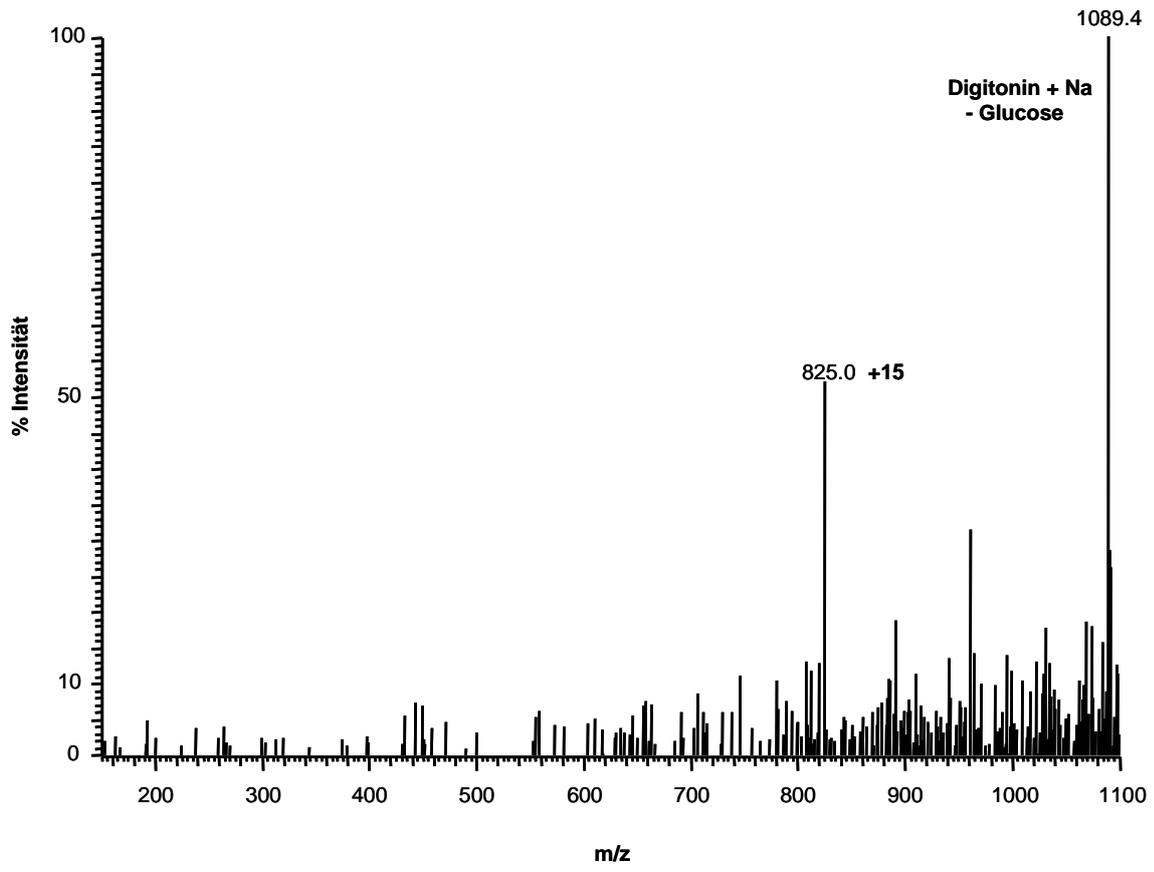
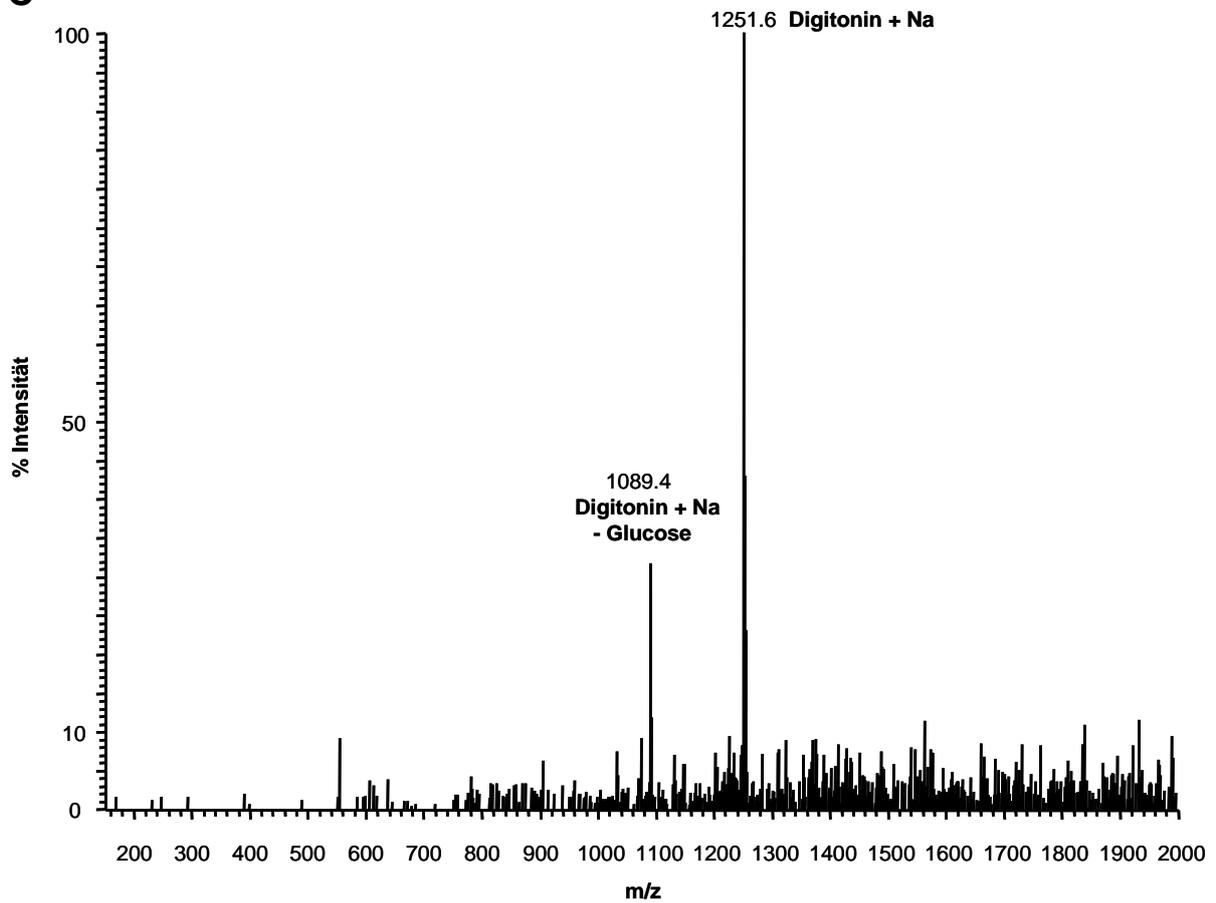


Abb. 5.13B



C



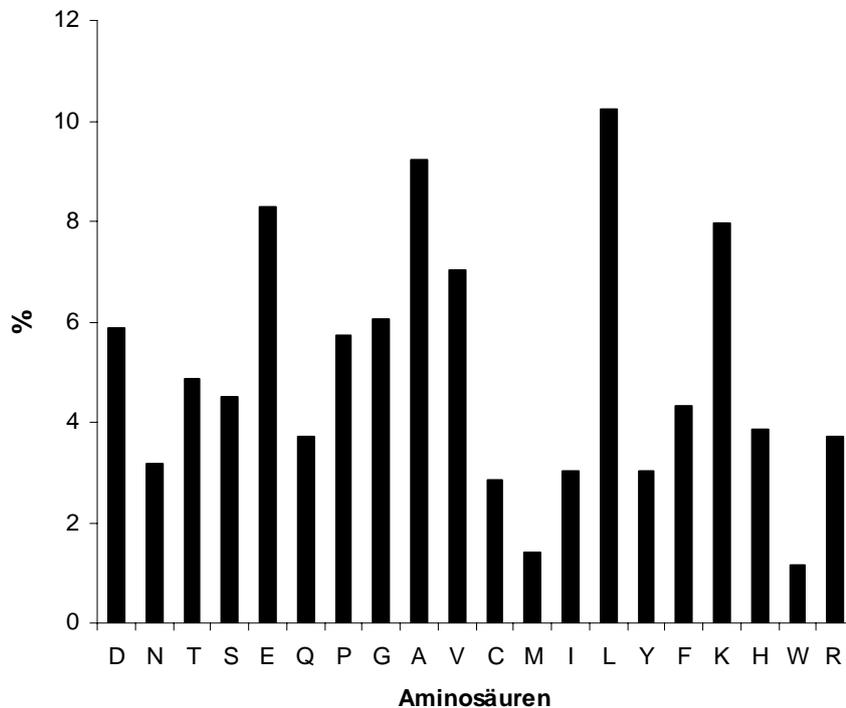
## 5.4 Weniger spezifische Enzyme

### 5.4.1 Enzymspezifität

Aus der Literatur ist bekannt, dass Chymotrypsin überwiegend C-terminal an den Aminosäuren F, W und Y schneidet, mit geringerer Spezifität soll es aber auch an L, M, A, D und E spalten (Blow *et al.*, 1971; Kamp *et al.*, 1986). Pepsin soll bei den gewählten Pufferbedingungen (10% Ameisensäure; pH = 1) hauptsächlich C-terminal an F und L schneiden. Zusätzlich wurden aber auch Schnitte an G, A, E, W und M beobachtet (Schey *et al.*, 2004). Elastase soll Proteine C-terminal an allen ungeladenen, nicht-aromatischen Aminosäuren spalten (Barret *et al.*, 1998). Außerdem ist bekannt, dass Alanin-, Valin-, Leucin- und Isoleucindipeptide als kompetitive Inhibitoren wirken (Shirasu *et al.*, 1986; Shotton, 1970; Dzialosznysky *et al.*, 1973). Elastase wird trotzdem wie Proteinase K als unspezifisch eingestuft (Schlosser *et al.*, 2001; Schlosser *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2003a; Wu *et al.*, 2003b).

Um die Enzymspezifität von Chymotrypsin, Pepsin, Elastase und Proteinase K zu überprüfen bzw. enger einzugrenzen, wurden 4 Modellproteine verdaut, die hydrophilen Proteine BSA, Carboanhydrase und Myoglobin, sowie das Membranprotein Cytochrom  $c_1$ . Die vier Proteine haben zusammengenommen eine vergleichbare Aminosäurehäufigkeit zu der Datenbank SwissProt (siehe Abb. 5.14 für die vier Proteine und <http://www.expasy.org/sprot/relnotes/> für SwissProt). Danach wurden möglichst viele Signale von enzymatischen Fragmenten mit MS/MS-Experimenten ihrer Sequenz zugeordnet, so dass die zwei Aminosäuren ermittelt werden konnten, zwischen denen das Enzym gespalten hatte (ca. 200 MS/MS-Spektren; Beispiel für Elastaseverdau, siehe Kapitel 5.4.4, Abb. 5.22 und Abb. 5.23). Für Chymotrypsin, Elastase und Pepsin ergab sich eine 70%ige Spezifität für jeweils 3 – 4 Aminosäuren (Tab. 5.3). Für Proteinase K konnte keine Präferenz für bestimmte Aminosäuren ermittelt werden, weshalb Proteinase K hinsichtlich der praktischen Anwendbarkeit für weitere Untersuchungen als uninteressant eingestuft wurde. Insgesamt korreliert das aus der Literatur bekannte Wissen somit ziemlich gut mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Experimente. Wenn man beispielsweise berücksichtigt, dass Alanin-, Valin-, Leucin- und Isoleucindipeptide als kompetitive Inhibitoren bei Elastase wirken, ist die 70%ige Spezifität für A, V und L auch nicht verwunderlich. Da die Häufigkeit von Isoleucin in den vier Modellproteinen gering war (Abb. 5.14), bräuchte man aber eine deutlich höhere Anzahl an MS/MS-Experimenten, um eine Spezifität zu verifizieren. Das Gleiche gilt

beispielsweise für die Spezifität von Chymotrypsin für W, die bereits sehr sicher in der Vergangenheit bewiesen wurde.



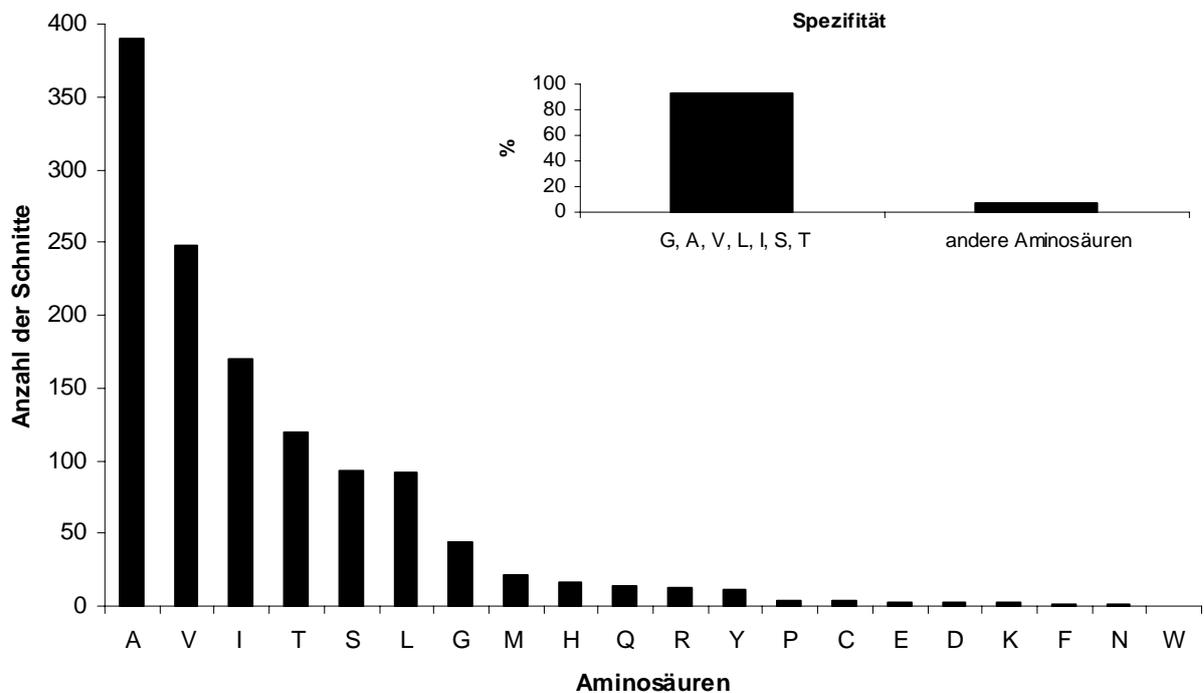
**Abb. 5.14** Häufigkeit der Aminosäuren in den vier ausgewählten Modellproteinen BSA, Carboanhydrase, Myoglobin und Cytochrom  $c_1$ .

<b>Elastase</b>	<b>V, A, L</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>H</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>andere</b>
%	72.0	4.9	4.9	3.7	3.7	2.4	2.4	6.0
<b>Chymotrypsin</b>	<b>F, L, Y</b>	<b>W</b>	<b>M</b>	<b>H</b>	<b>andere</b>			
%	77.7	4.6	5.4	5.4	6.9			
<b>Pepsin</b>	<b>F, L, E, A</b>	<b>M</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>andere</b>			
%	73.6	5.6	5.6	4.2	11.0			

**Tab. 5.3** Ermittelte Spezifität der drei Enzyme Elastase, Chymotrypsin und Pepsin. Alle drei Enzyme schneiden C-terminal. Grundlage für die Bestimmung der Spezifität waren Verdaus der vier Modellproteine BSA, Carboanhydrase, Myoglobin und Cytochrom  $c_1$ . Für weitere Details, siehe Text.

Bei den ersten Elastaseverdaus der Membran von *Corynebacterium glutamicum* fiel aber eine so hohe Menge an verwertbaren MS/MS-Daten an (ca. 800 MS/MS-Spektren, denen

sicher Peptidsequenzen zugeordnet wurden), dass die Spezifität von Elastase offensichtlich wurde (siehe auch Methoden, Kapitel 8.6.4 und Ausblick, Kapitel 5.5.2). Da die genaue Massenbestimmung des Vorläuferions (Fehler < 5 ppm) aus der Orbitrap neben den MS/MS-Daten der linearen Ionenfalle (LIT) vorlag, ist die Zuordnung der Fragmentsequenzen sehr sicher. Die ermittelte Enzymspezifität lag letztendlich zu über 90% bei G, A, V, L, I, S, T (Abb. 5.15). Damit konnte gezeigt werden, dass Elastase Proteine spezifischer schneidet, als bis jetzt in der Literatur angenommen wurde. Nicht nur aufgrund der besseren Spezifität, sondern auch wegen der bevorzugten Spaltung an den häufigen Aminosäuren G, A, V, L, I, S und T, wurde Elastase als sehr interessantes Enzym für die Analyse von Membranproteinen eingestuft. Es wurde deshalb schwerpunktmäßig auf seine Eignung für Anwendungen in der Proteomforschung geprüft.



**Abb. 5.15 Enzymspezifität von Elastase (C-terminal).** Grundlage für die Bestimmung der Spezifität war die Analyse der Membran von *Corynebacterium glutamicum* (siehe auch Kapitel 5.5.2). Für weitere Details, siehe Text.

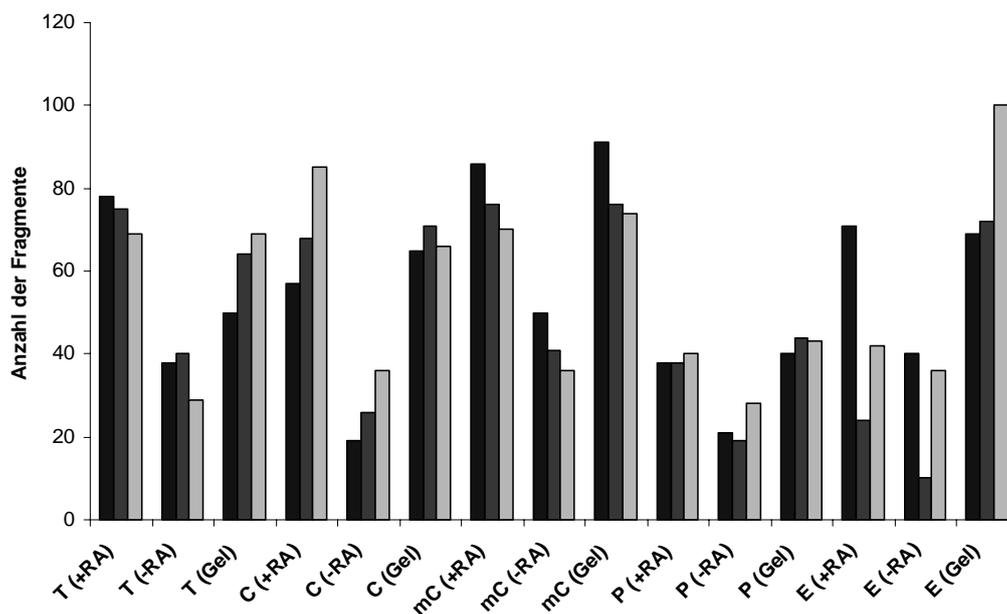
### 5.4.2 Reproduzierbarkeit

Um weniger spezifische Enzyme in der Proteomforschung standardmäßig einzusetzen, ist natürlich die Reproduzierbarkeit von Experimenten zwingend notwendig. Inwieweit das für die Enzyme Chymotrypsin, Pepsin und Elastase zutrifft, wurde an den Verdau von den drei Proteinen BSA (Abb. 5.16), Carboanhydrase (Abb. 5.17) und Myoglobin (Abb. 5.18) überprüft (MS-Spektren der Verdau, siehe Anhang Abb. 9.4.1 – Abb. 9.4.5). Für Chymotrypsin wurden zwei Hersteller getestet (normales Chymotrypsin von Roche und modifiziertes Chymotrypsin von Princeton Separations). Trypsin wurde als Referenz verwendet. Die drei Proteine wurden vor dem Verdau in Lösung sowohl reduziert und alkyliert als auch unbehandelt verdaut. Die Verdau aus dem Gel (14% Polyacrylamid) wurden grundsätzlich reduziert und alkyliert. Die eingesetzte Proteinmenge lag bei 1 pmol/μl für die Verdau in Lösung und bei 1 pmol pro Gelstück. Die Verdauzeit für alle Experimente war identisch (ca. 12h). Um Informationen über den Hintergrund des Verdau zu generieren, wurden die reinen Pufferlösungen bzw. Gelstücke ohne Protein auf die gleiche Art und Weise behandelt. Die verwendeten Enzymdefinitionen für die Biotoools-Berechnungen (siehe auch Kapitel 8.4.1) waren K, R (C-terminal) für Trypsin, F, W, Y, L (C-terminal) für Chymotrypsin, F, L (C-terminal) für Pepsin und A, V, L, I (C-terminal) für Elastase. Vor der Berechnung wurden die Hintergrundsignale entfernt (MS-Spektren des Hintergrunds, siehe Anhang, Abb. 9.4.1J-L bis Abb. 9.4.5J-L). Die verwendete Massengenauigkeit für die Berechnungen war 50 ppm, da die Spektren nur extern kalibriert waren. Natürlich werden dadurch auch falsch positive berechnet, die Anzahl sollte aber nach Entfernung der Hintergrundsignale und bei den gewählten Enzymdefinitionen sehr gering sein (siehe Kapitel 5.4.3).

Bei allen Modellproteinen fällt auf, dass die Anzahl der Fragmente bei allen Enzymen für den Verdau im Gel rapide einbricht (siehe Abb. 5.16 – Abb. 5.18). Das Gleiche gilt für die BSA-Proben, die nicht reduziert und alkyliert wurden, d. h. BSA lag aufgrund seiner hohen Anzahl an Disulfidbrücken relativ unzugänglich vor. Bei den Verdau von Carboanhydrase und Myoglobin gab es keine Unterschiede. Es muss also geschlussfolgert werden, dass für alle Enzyme die Zugänglichkeit zum Protein im Gel oder die Extraktion der enzymatischen Fragmente kritisch zu sehen ist. Das Gleiche gilt für stärker gefaltete Proteine in Lösung. Allgemein ist die Spektrenqualität bei den Verdau im Gel trotz 1 pmol pro Bande für die beiden kleinen Proteine Carboanhydrase und Myoglobin schlecht, da die zugehörigen Signale

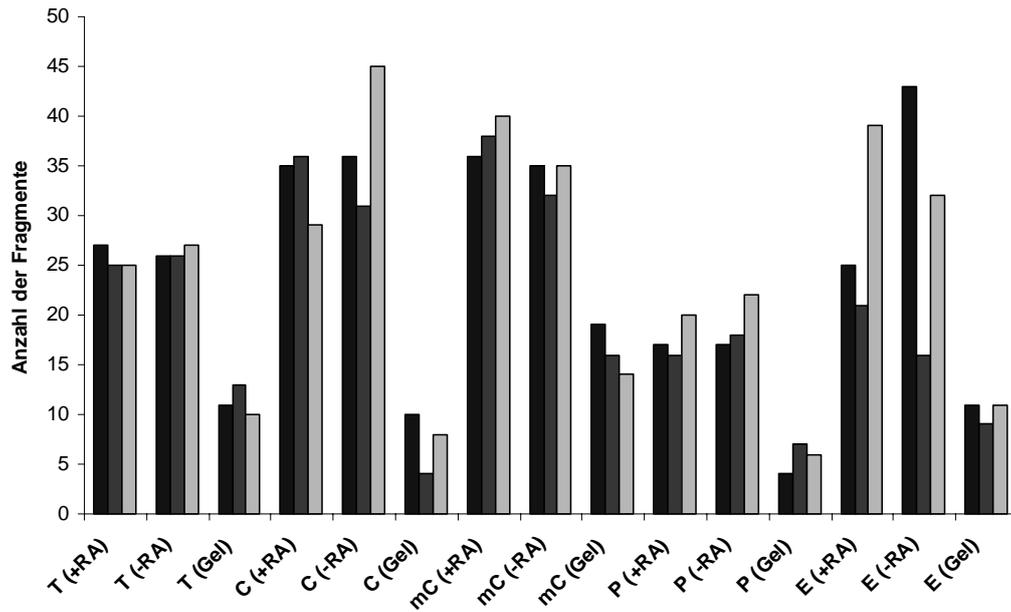
zum Protein sehr klein sind und von den intensiveren Hintergrundsignalen überdeckt werden (siehe Anhang, Abb. 9.4.1*F,I* – Abb. 9.4.5*F,I*).

Ansonsten sieht die Reproduzierbarkeit für die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin aber gut aus. Der Einbruch in der Anzahl der zugeordneten Signale bei Pepsin lässt sich durch die sehr enge Enzymdefinition erklären, die aber gewählt wurde, da die Spezifität zu anderen Aminosäuren noch nicht klar ersichtlich gewesen ist. Die Schwankungen bei den Verdaus von Myoglobin in Lösung, die nicht reduziert und alkyliert wurden, sind wahrscheinlich auf die noch koordinativ gebundene Häm-Gruppe zurückzuführen. Das scheint daher logisch, weil die Schwankungen beim Pepsinverdaus nicht auftreten. Die Verdaubedingungen haben das Häm hier wahrscheinlich vollständig entfernt (10% Ameisensäure, pH = 1). Bei Elastase scheint die Reproduzierbarkeit auf den ersten Blick allerdings nicht gegeben zu sein. Die Schwankungen rühren aber wahrscheinlich nur daher, dass die Verdauszeit noch nicht ausreichend hoch genug war, was zu einem etwas stärker variierenden Spektrenbild geführt hat (MS-Spektren, siehe Anhang Abb. 9.4.4; Beispiel für Zeitverlauf, siehe Kapitel 5.4.4 und Anhang, Abb. 9.4.7).

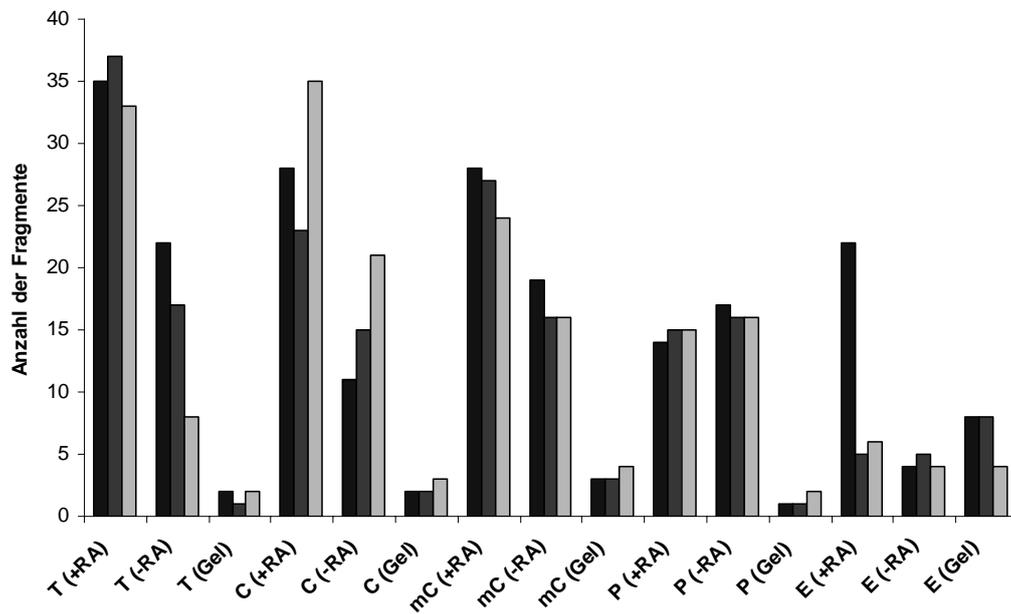


**Abb. 5.16** Reproduzierbarkeit von BSA-Verdaus mit Trypsin (T), Chymotrypsin (C), modifiziertem Chymotrypsin (mC), Pepsin (P) und Elastase (E). Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (schwarz, grau, hellgrau). Als Maßstab für die Reproduzierbarkeit ist die Anzahl der zugeordneten Fragmente im MS-Spektrum angegeben. Das Protein wurde vor dem Verdaus in Lösung bzw. im Gel reduziert und alkyliert (+RA bzw. Gel). Die Verdaus in Lösung wurden auch ohne Reduktion und Alkylierung des Proteins durchgeführt (-RA). Für weitere Details z. B. die verwendeten Enzymdefinitionen, siehe Text. Für die zugehörigen MS-Spektren, siehe Anhang Abb. 9.4.1 – 9.4.5.

## 5. Ergebnisse



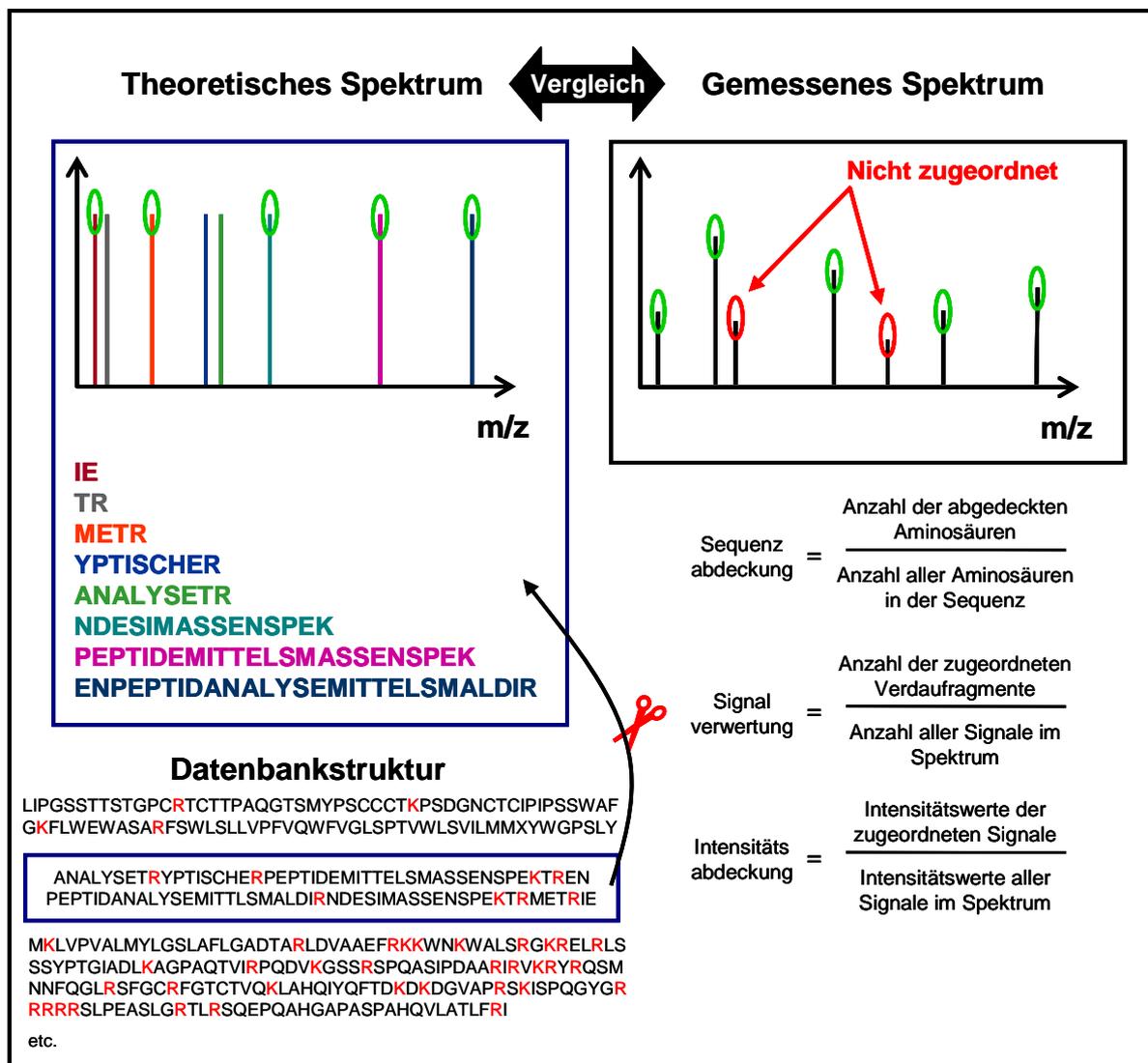
**Abb. 5.17** Reproduzierbarkeit von Carboanhydraseverdaus mit Trypsin (T), Chymotrypsin (C), modifiziertem Chymotrypsin (mC), Pepsin (P) und Elastase (E). Legende und weitere Details, siehe Abb. 5.16 und Text.



**Abb. 5.18** Reproduzierbarkeit des Myoglobinverdaus mit Trypsin (T), Chymotrypsin (C), modifiziertem Chymotrypsin (mC), Pepsin (P) und Elastase (E). Legende und weitere Details, siehe Abb. 5.16 und Text.

### 5.4.3 Auswertung von Verdau weniger spezifischer Enzyme mittels PMF

Da Chymotrypsin, Pepsin und Elastase eigentlich nur an mehr Positionen als Trypsin schneiden, wenn von der geringen Rate an unspezifischen Schnitten einmal abgesehen wird (siehe Kapitel 5.4.1), sollte eine Auswertung mittels PMF eigentlich möglich sein, insbesondere weil eine vergleichbare Reproduzierbarkeit wie beim Trypsin vorhanden ist (siehe Kapitel 5.4.2). Datenbanksuchen mit Suchmaschinen führen aber häufig nicht zum Erfolg oder zu Ergebnissen mit fragwürdiger Signifikanz, da nur Massenlisten abgeglichen werden (siehe Kapitel 3.1.3.5.1 und Abb. 5.19).

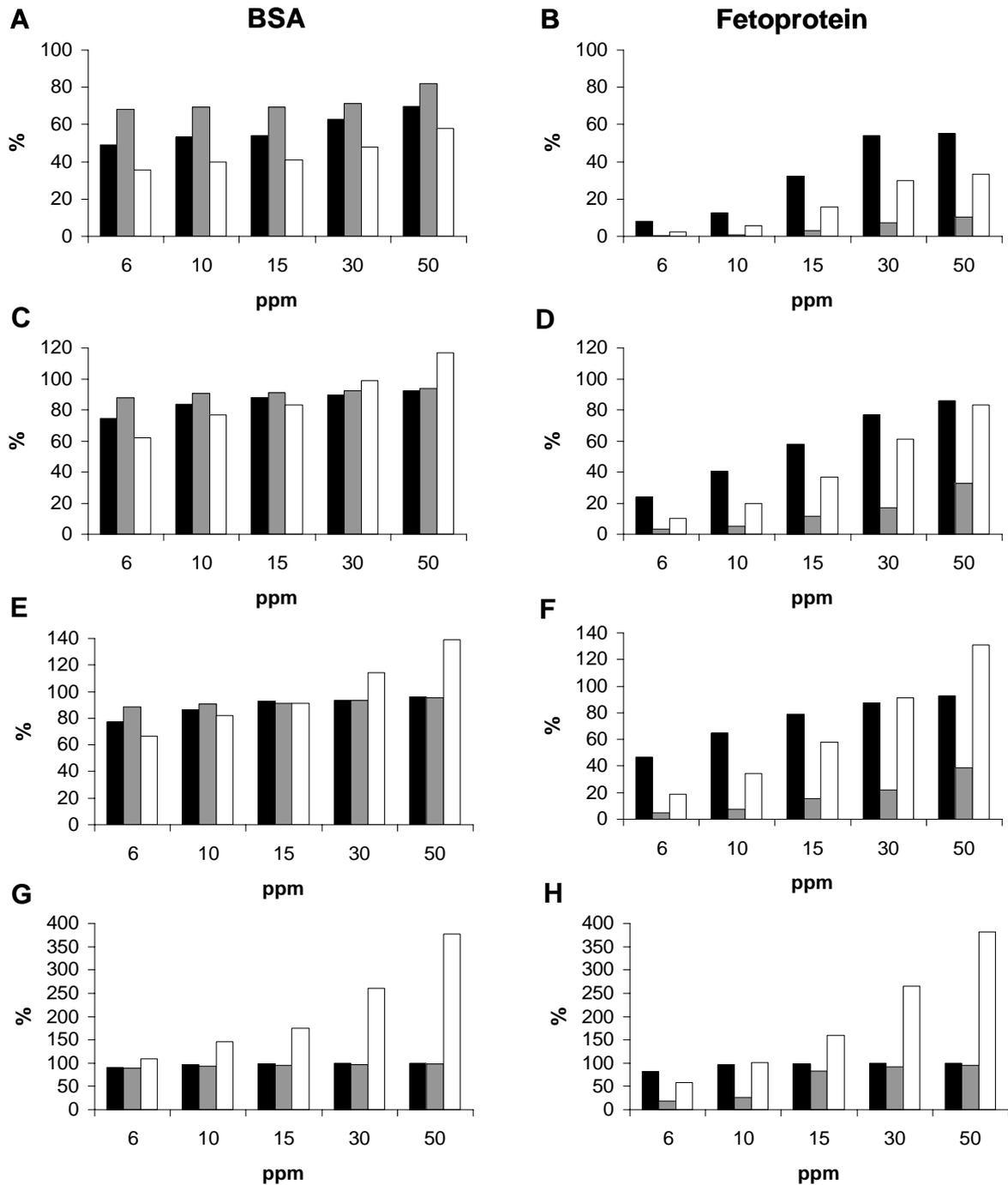


**Abb. 5.19 Peptide Mass Fingerprint (PMF).** Das MS-Spektrum, das durch den theoretischen Verdau eines Proteins in der Datenbank berechnet wird (Enzym in der Abbildung ist Trypsin), wird mit dem gemessenen verglichen. Sequenzabdeckung, Signalverwertung und Intensitätsabdeckung sind sinnvolle Parameter, um eine signifikante Übereinstimmung zu ermitteln. Weitere Details, siehe Text.

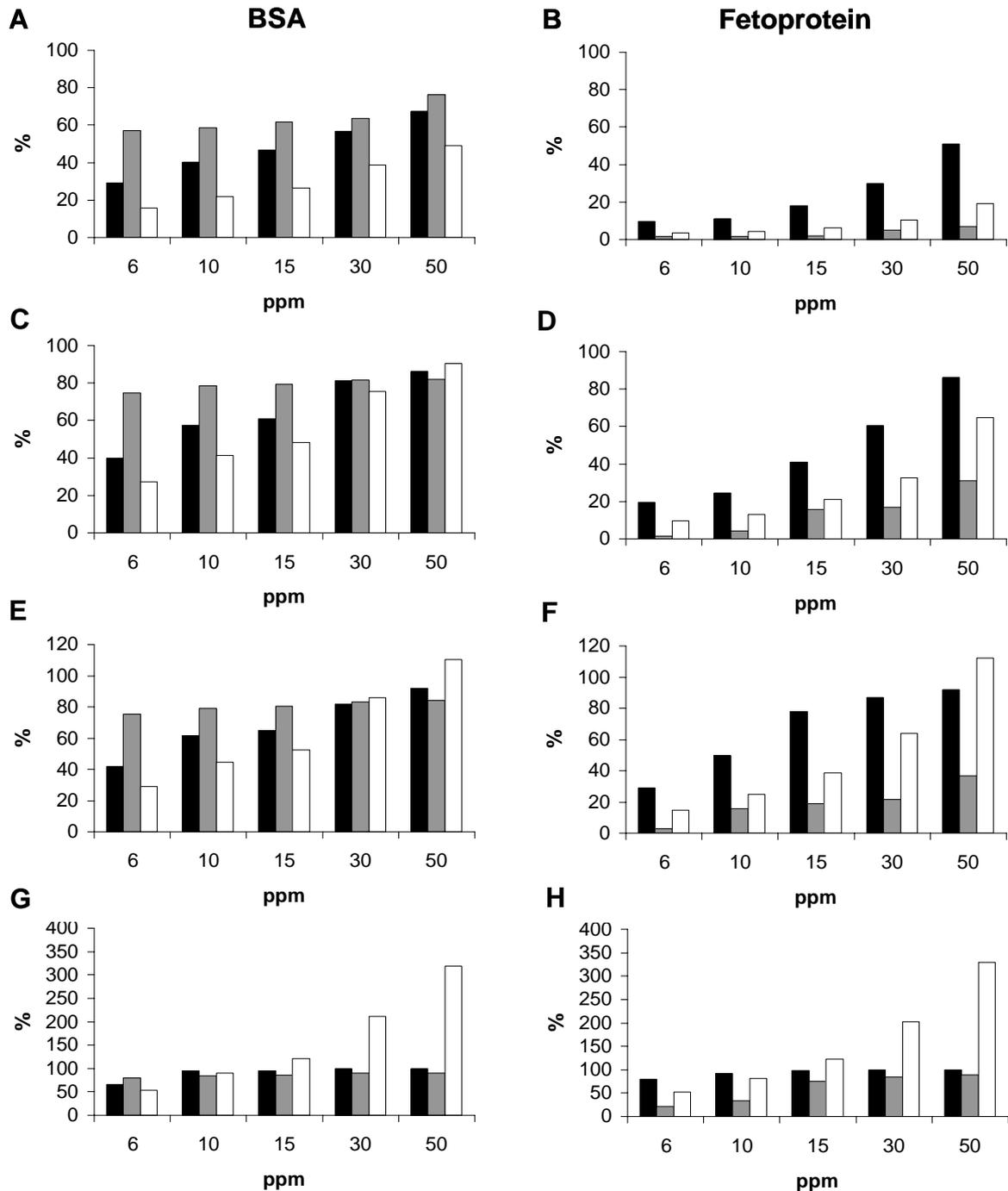
Bei einem Verdau mit einem spezifischen Enzym wie Trypsin ist der Massenabgleich unproblematisch, da man noch eine übersichtliche Anzahl an möglichen Verdaufragmenten erhält. In dem Beispiel von Abb. 5.19 sind es nur acht Stück für das Protein, bei dem sich das theoretische Spektrum mit dem gemessenen Spektrum am besten deckt. Wenn aber überlesene Schnittstellen (*missed cleavage sites*) oder Modifikationen berücksichtigt werden, steigt die Zahl der möglichen Fragmente natürlich rasch an. Den sieben Signalen im gemessenen Spektrum im Beispiel können fünf tryptische Fragmente zugeordnet werden, was einer Signalverwertung von 71% entspricht. Die Sequenzabdeckung beträgt 76%, da 70 der 92 Aminosäuren von den fünf Fragmenten abgedeckt werden. Die Intensitätsabdeckung beträgt im Beispiel ungefähr 70%, wenn man die Intensitätswerte der zugeordneten Signale abschätzt.

Mit Biotoools v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) wurde die oben beschriebene Datenbanksuche simuliert (siehe auch Kapitel 8.4.1), da die Algorithmen von den gängigen Datenbanken wie Mascot<sup>TM</sup> Probleme mit der PMF-Suche haben. Die definierten Parameter Sequenzabdeckung und Signalverwertung stehen dabei zusammengenommen stellvertretend für eine signifikante Identifikation bei einer herkömmlichen Datenbanksuche, in der nur Massen verglichen werden. Je höher die Sequenzabdeckung und je höher die Anzahl der zugeordneten Fragmente zu Massen in der Massenliste, desto eindeutiger die Identifikation. Die 76% Sequenzabdeckung und 71% Signalverwertung aus dem Beispiel würden somit zu einem signifikanten Ergebnis für den spezifischen Trypsinverdau führen. Die Intensitätsabdeckung ist eine Zusatzinformation, aber nicht nötig für die Identifikation.

Bei weniger spezifischen Enzymen ist es jedoch sinnvoll, nach dem Massenabgleich zusätzlich die Intensität als Parameter zu berücksichtigen, um das MS-Spektrum dem gesuchten Protein eindeutig zuzuordnen. Die Abbildungen 5.20 und 5.21 zeigen dies für einen zwölfstündigen Elastaseverdau von BSA in Lösung und im Gel (1 pmol/ $\mu$ l bzw. 10 pmol pro Gelstück). Die enge Enzymdefinition A, V, L, I (C-terminal) ermöglicht bei Massengenauigkeit unterhalb 15 ppm durchaus noch eine signifikante Identifikation, wie die Biotooolsberechnungen zeigen (Abb. 5.20A-B und Abb. 5.21A-B). Ab 30 ppm wird dies aber kritischer, wenn die Intensitätsabdeckung nicht berücksichtigt wird. Der theoretische Verdau einer falschen Proteinsequenz (Fetoprotein in Abb. 5.20B und Abb. 5.21B) resultiert ebenfalls in einer guten Sequenzabdeckung und Signalverwertung. Werden die Aminosäuren G, A, V, L, I, S, T (Abb. 5.20C-D und Abb. 5.21C-D) oder alle ungeladenen, nicht-aromatischen Aminosäuren (G, A, V, L, I, M, S, T, N, Q, C; Abb. 5.20E-F und Abb. 5.21E-F) als Schnittpositionen definiert, erhält man das gleiche Ergebnis. Die Intensitätsabdeckung ist ein



**Abb. 5.20** *Biotoools*-Berechnungen eines Elastaseverdau in Lösung (1 pmol/ $\mu$ L; Verdauzeit 12 h, RA) von BSA (falsch positive Identifikation: Fetoprotein) mit den Enzymdefinitionen AVLI (A, B), GAVLIST (C, D), GAVLIMSTNQC (E, F) bzw. alle 20 Aminosäuren (G, H) und unterschiedlichen Massengenauigkeiten. Schwarz, Sequenzabdeckung; grau, Intensitätsabdeckung; weiß, Signalverwertung (Definitionen, siehe Abb. 5.19); Kalibrierung der MS-Spektren, intern mit zugesetzten Standard (siehe Kapitel 8.2.4); Erklärungen, siehe Text; zugehörige Tabellen im Anhang, siehe Tab. 9.4.24C,D für AVLI (A, B), Tab. 9.4.32C,D für GAVLIST (C, D), Tab. 9.4.32A,B für GAVLIMSTNQC (E, F) und Tab. 9.4.24A,B für alle Aminosäuren (G, H). Informationen zum Fetoprotein, siehe Anhang, Abb. 9.4.6.



**Abb. 5.21** *Biotoools*-Berechnungen eines Elastaseverdauung im Gel (10 pmol in der Bande, Verdauzeit 12 h, RA) von BSA (falsch positive Identifikation: Fetoprotein) mit den Enzymdefinitionen AVLI (A, B), GAVLIST (C, D), GAVLIMSTNQC (E, F) bzw. alle 20 Aminosäuren (G, H) und unterschiedlichen Massengenauigkeiten. Schwarz, Sequenzabdeckung; grau, Intensitätsabdeckung; weiß, Signalverwertung (Definitionen, siehe Abb. 5.19); Kalibrierung der MS-Spektren, intern mit zugesetzten Standard (siehe Kapitel 8.2.4); Erklärungen, siehe Text; zugehörige Tabellen im Anhang, siehe Tab. 9.4.26C,D für AVLI (A, B), Tab. 9.4.34C,D für GAVLIST (C, D), Tab. 9.4.34A,B für GAVLIMSTNQC (E, F) und Tab. 9.4.26A,B für alle Aminosäuren (G, H). Informationen zum Fetoprotein, siehe Anhang, Abb. 9.4.6.

entscheidender Parameter für die Abgrenzung der richtigen Identifikation (BSA) von einem Irrtum (Fetoprotein). Ohne Enzymdefinition scheint es, dass man bis zu einer Massengenauigkeiten von 10 ppm beurteilen kann, ob eine Proteinzuzuordnung signifikant richtig ist, wenn die Intensitätsabdeckung berücksichtigt wird (Abb. 5.20G-H und Abb. 5.21G-H). Die Massengenauigkeit von 10 ppm ist aber eher noch zu niedrig (siehe weiter unten). Denn die Anzahl der falsch positiven Zuordnungen von Signalen im MS-Spektrum zu enzymatischen Fragmenten steigt mit sinkender Massengenauigkeit bzw. mit steigender Anzahl an definierten Schnittpositionen explosionsartig an. Dies ist in den Abb. 5.20 und 5.21 auch bereits daran erkennbar, dass der Parameter Signalverwertung die 100% teilweise übersteigt (d.h. einem Signal im MS-Spektrum werden mehrere Fragmente zugeordnet) und dass der theoretische Verdau der falschen Proteinsequenz (Fetoprotein) immer besser auf das MS-Spektrum des BSA-Verdaus passt. Aus den Zahlenwerten der zugehörigen Tabellen im Anhang wird diese Problematik noch deutlicher, als es die Diagramme in Abb. 5.20 und 5.21 zeigen können.

Im Anhang sind zusätzlich zu den Tabellen, die die Zahlenwerte zu Abb. 5.20 und 5.21 liefern, noch *Biotoools*-Berechnungen von allen hier besprochenen Elastasedefinitionen für BSA-Verdaus in Lösung mit kürzeren Verdauzeiten angefügt (1h, 3h, 6h, 12h, Gel/12h; siehe Tab. 9.4.21 – 9.4.36 bzw. Inhaltsverzeichnis zu Tab. 9.4.1 – 9.4.36 im Anhang). Zusätzlich sind Berechnungen für Trypsin (1h, 3h, 6h, 12h, Gel/12h; Tab. 9.4.1 – 9.4.8) und Chymotrypsin (1h, 3h, 6h, 12h, Gel/12h; Tab. 9.4.9 – 9.4.20) vorhanden, um ein spezifisches und ein weiteres weniger spezifisches Enzym zum Vergleich zu haben. Außerdem enthält der Anhang die Berechnungen für den Verdauhintergrund in Lösung und im Gel für alle drei Enzyme (siehe Inhaltsverzeichnis zu Tab. 9.4.1 – 9.4.36 im Anhang).

Werden alle Berechnungen zur Elastase verglichen (siehe Anhang, Tab. 9.4.21 – 9.4.36), zeigt sich, dass die bis jetzt gemachten Schlussfolgerungen auch für kürzere Verdauzeiten von Elastase Gültigkeit haben. Die Werte von Sequenzabdeckung, Intensitätsabdeckung und Signalverwertung sind vergleichbar. Auch zwischen silber- und coomassiegefärbten Gelen konnte kein großer Unterschied gefunden werden.

Da die Massenlisten der Elastaseverdaus von BSA vor den *Biotoools*-Berechnungen nicht von den Hintergrundmassen bereinigt wurden, werden die Hintergrundsignale im MS-Spektrum sich negativ auf die Berechnungen auswirken. Aus den Berechnungen mit der BSA- bzw. Fetoproteinsequenz ohne Enzymdefinition ist offensichtlich, dass sich die Werte für Sequenzabdeckung und Signalverwertung des Hintergrundes relativ schnell an die Werte des BSA-Verdaus (1h, 3h, 6h, 12h, Gel) angleichen. Nur die Intensitätsabdeckung ist

beispielsweise mit 50 – 60% beim Hintergrund (50 ppm Massengenauigkeit) deutlich niedriger als der Wert von 90 - 100% bei den BSA-Verdaus (siehe Tab. 9.4.27A-B und 9.4.28A-B für Hintergrund und Tab. 9.4.21A-B bis Tab. 9.4.26A-B für die BSA-Verdaus). Berechnungen mit dem Ziel der Proteinzuzuordnung sollten daher mindestens eine Massengenauigkeit von 6 ppm haben, um die falsch positiv berechneten Signalzuzuordnungen noch in einem akzeptablen Bereich zu behalten, auch wenn die Intensitätsabdeckung selbst bei 10 ppm immer noch eine Unterscheidung zwischen falsch und richtig zulässt (Abb. 5.20G-H und Abb. 5.21G-H). Ansonsten kann selbst die Proteinidentifikation schnell mehrdeutig werden. An eine zweifelsfreie Zuordnung von Fragmenten zu MS-Signalen ist sowieso erst ab einer Massengenauigkeit von 1 – 2 ppm für den gesamten gemessenen Massenbereich zu denken, was mit einem MALDI-TOF nicht erreichbar ist. Ähnlich wie Berechnungen ohne Enzymdefinition verhalten sich sehr weite Enzymdefinitionen, wie eine Spezifität für alle ungeladenen, nicht-aromatischen Aminosäuren (G, A, V, L, I, M, S, T, N, Q, C in Abb. 5.20E-F und Abb. 5.21E-F). Die Massengenauigkeit für die Proteinzuzuordnung kann man zwar aufgrund der Unterschiede in der Intensitätsabdeckung bei der richtigen und falschen Proteineinsequenz problemlos heraufsetzen (z. B. bis auf 50 ppm), eine Zuordnung von Fragmenten ist aber auch hier erst ab 1 – 2 ppm Massengenauigkeit sinnvoll (siehe auch Anhang, Abb. 9.4.29A-B – 9.4.36A-B)

Für die Enzymdefinition A, V, L, I ist die Anzahl der falsch Positiven selbst bei einer Massengenauigkeit von 50 ppm akzeptabel. Die Werte für die Intensitätsabdeckung und Signalverwertung betragen 70 – 80% bzw. 50 – 60% für Berechnungen mit der BSA-Sequenz bei den BSA-Verdaus, aber nur 5 – 10% bzw. 20 – 30% für Berechnungen mit der Fetoproteinsequenz (Tab. 9.4.21C-D bis Tab. 9.4.26C-D). Die Intensitätsabdeckung und Signalverwertung von den Berechnungen der Hintergrundspektren liegt jeweils bei ca. 20% für die BSA- und Fetoproteinsequenz (Tab. 9.4.27C-D und 9.4.28C-D). Wird also als Elastasedefinition A, V, L, I ausgewählt, sind die Zuordnungen von enzymatischen Fragmenten zu MS-Signalen überwiegend richtig, wenn die Massengenauigkeit 50 ppm oder besser ist. Eindeutig wird die Zuordnung erst ab 15 ppm (siehe Anhang, Tab. 9.4.21C-D bis Tab. 9.4.26C-D für die berechnete Intensitätsabdeckung und Signalverwertung bei 15 ppm), da A, V, L sehr häufig Aminosäuren sind. Es kommt durchaus vor, dass bei 50 ppm manchmal zwei Fragmente auf eine Masse passen (siehe auch Kapitel 5.4.4). Eine Bereinigung der gemessenen Massenliste von Hintergrundmassen verringert aber zusätzlich die Möglichkeit von falsch Positiven erheblich. Dies ist zwingend erforderlich, wenn die Hintergrundsignale zu prominent werden, was hier nicht zutraf.

Die Berechnungen mit der ermittelten Enzymspezifität G, A, V, L, I, S, T (siehe Kapitel 5.4.1) nehmen eine Zwischenstellung ein. Bei 10 ppm Massengenauigkeit beträgt die Intensitätsabdeckung und die Signalverwertung 80 – 90% bzw. 60 – 80% (Gel ca. 40%) für Berechnungen mit der BSA-Sequenz und 5 – 10% bzw. 10 – 20% für Berechnungen mit der Fetoproteinsequenz (Tab. 9.4.29C-D bis Tab. 9.4.34C-D). Die Berechnungen für den Hintergrund (BSA und Fetoprotein) ergeben 5 – 10% für die Intensitätsabdeckung und 10 – 20% für die Signalverwertung (Tab. 9.4.35C-D bis Tab. 9.4.36C-D). Die Zuordnung von Fragmenten zu MS-Signalen ist somit bei 10 ppm Massengenauigkeit zwar nicht immer komplett eindeutig, aber zufrieden stellend für eine sinnvolle Auswertung (siehe auch Kapitel 5.4.4 und 5.4.6). Der schlechtere Wert von 40% bei der Signalverwertung verdeutlicht noch einmal, dass Hintergrundsignale bei Gelverdaus stärker auftreten.

Die Auswertung der BSA-Verdaus mit Chymotrypsin führt zu ähnlichen Ergebnissen wie die Berechnungen der BSA-Verdaus von Elastase. Da die Aminosäuren F, W, Y, die Chymotrypsin bevorzugt spaltet (Blow *et al.*, 1971; Kamp, 1986), seltener sind als die Aminosäuren A, V und L, an denen Elastase schneidet, ist die Zuordnung von Fragmenten zu MS-Signalen etwas unproblematischer. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei theoretische Fragmente bei den Berechnungen entstehen, die auf einen gemessenen Massenwert passen, ist geringer. Berechnungen mit der Enzymdefinition F, W, Y, L führen deshalb bereits bei einer Massengenauigkeit von 50 ppm zu eindeutigeren Zuordnungen (Tab. 9.4.9C-D bis Tab. 9.4.16C-D). Wenn man die Enzymdefinition F, W, Y, L, M, A, D, E verwendet, wird ein vergleichbares Ergebnis hinsichtlich Sequenzabdeckung, Intensitätsabdeckung und Signalverwertung erhalten wie für die Berechnungen mit der Elastasedefinition G, A, V, L, I, S, T (Tab. 9.4.17 – Tab. 9.4.20). Gleiches gilt für Berechnungen ohne Enzymdefinition, wenn die BSA-Verdaus von Chymotrypsin und Elastase verglichen werden (Tab. 9.4.9A-B bis Tab. 9.4.16A-B).

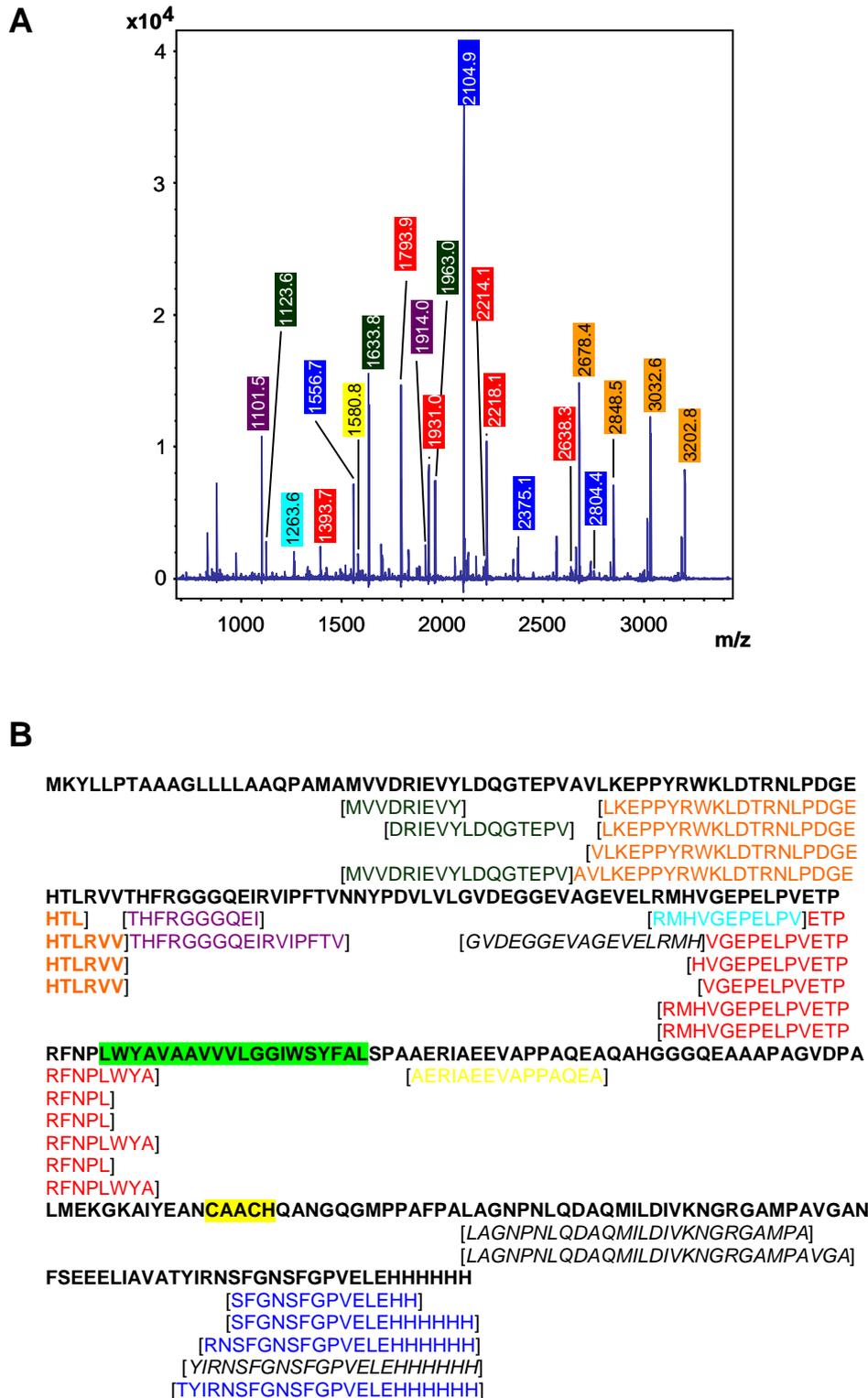
Erwartungsgemäß ergeben die Berechnungen der Trypsinverdaus von BSA ohne Enzymdefinition ebenfalls die gleiche Situation, wie bei Chymotrypsin und Elastase. Der theoretische Verdau der BSA-Sequenz lässt sich nur mit Hilfe der Intensitätsabdeckung bei einer verwendeten Massengenauigkeit von 6 ppm von der falschen Sequenz des Fetoproteins unterscheiden (Tab. 9.4.1A-B bis Tab. 9.4.8A-B). Verwendet man die übliche Schnittspezifität von Trypsin an K und R für die Berechnungen erhält man für den Hintergrund des BSA-Verdaus Werte zwischen 2 – 8% für die Intensitätsabdeckung bzw. Signalverwertung (Massengenauigkeit 50 ppm; siehe Tab. 9.4.7C-D und Tab. 9.4.8C-D). Für die Berechnungen der BSA-Verdaus (1h, 3h, 6h, 12h, Gel/12h) mit der Sequenz des Fetoproteins ergeben sich

Werte für die Intensitätsabdeckungen und Signalverwertung von jeweils ca. 5%, Berechnungen mit der BSA-Sequenz resultieren in Werten von ca. 90% (70% bei Gel) bzw. ca. 50% (30% bei Gel) (siehe Abb. 9.4.1C-D bis Abb. 9.4.6C-D). Der deutlichere Abstand der Signalverwertung zwischen den Berechnungen für die BSA-Sequenz und den Berechnungen für den Hintergrund bzw. der falschen Proteinsequenz (Fetoprotein) ist ein Grund, weshalb bei Trypsin eine signifikante Identifizierung ohne die Intensitätsabdeckung möglich ist.

Die Quintessenz ist somit, dass bei weniger spezifischen Enzymen, die Proteine überwiegend an 4 – 8 Aminosäuren spalten, ein zusätzlicher Parameter für die Signifikanzbeurteilung einer PMF-Suche nötig wird. Die Intensitätsabdeckung ist einfach zu ermitteln und bietet sich daher hierfür an. Es ist aber auch aus den Ergebnissen erkennbar, dass PMF-Suchen mit weniger spezifischen Enzymen kein Problem darstellen werden, wenn bei der massenspektrometrischen Datenaufnahme eine hohen Massengenauigkeit von 1 – 2 ppm für den gesamten Massenbereich erreicht worden wäre. Ob die Prüfung der Intensitätsabdeckung dann noch nötig ist, kann noch nicht beantwortet werden. Sie ist aber auf jeden Fall ein einfacher zusätzlicher Parameter für die Richtigkeit der Proteinzuzuordnung zu einem MS-Spektrum, wenn weniger spezifische Enzyme verwendet werden.

#### 5.4.4 Elastaseverdau des Membranproteins Cytochrom $c_1$

Weniger spezifische Enzyme bilden überlappende Fragmentcluster, weil sie an mehr Aminosäuren als Trypsin schneiden können. Den richtigen Zeitpunkt zu finden, an dem das MS-Spektrum den höchsten Informationsgehalt hat, ist aber schwieriger als bei Trypsin. Der Verdau von Cytochrom  $c_1$  (*Thermus thermophilus*) mit Elastase zeigt dies beispielhaft (Abb. 5.22). Nach 24h war das MS-Spektrum hier am besten. Abb. 9.4.7 im Anhang demonstriert, wie sich der Verdau im Laufe der Zeit verändert hatte. Die Übersicht zu der Sequenzabdeckung in Abb. 5.22B enthält nur durch MS/MS-Experimente abgesicherte Fragmente. Das MS/MS-Spektrum in Abb. 5.23 gibt einen Eindruck von der Qualität der verwendeten MS/MS-Spektren. Dieses Fragment war nach 24 h allerdings nicht mehr sichtbar. Da das Membranprotein mit dem nicht-ionischen Detergenz Dodecylmaltosid in Lösung gehalten wurde, ist das Optimum nach einer längeren Verdauzeit aber nachvollziehbar. Das Membranprotein lag noch unter relativ nativen Bedingungen gelöst vor. Es war daher noch gefaltet und schwerer zugänglich für das Enzym. Cytochrom  $c_1$  konnte aber nicht denaturiert werden, weil es ansonsten ausgefallen wäre.



**Abb. 5.22 Elastaseverdau von Cytochrom  $c_1$  (ca. 1 pmol/ $\mu$ L).** (A) MALDI-Spektrum eines 24-stündigen Verdaus. (B) Durch MS/MS-Experimente verifizierte Fragmente, die während des Verdaus generiert wurden (repräsentatives MS/MS-Spektrum, siehe Abb. 5.23). Kursiv gedruckte Fragmente waren nach 24 h nicht mehr im MS-Spektrum sichtbar (Zeitverlauf, siehe Anhang, Abb 9.4.7). Die korrespondierenden Signale im MS-Spektrum zu bestimmten Fragmentgruppen sind mit der gleichen Farbe markiert. Die Transmembranhelix ist grün, das Häm  $c$ -Typ Bindemotiv gelb hervorgehoben.

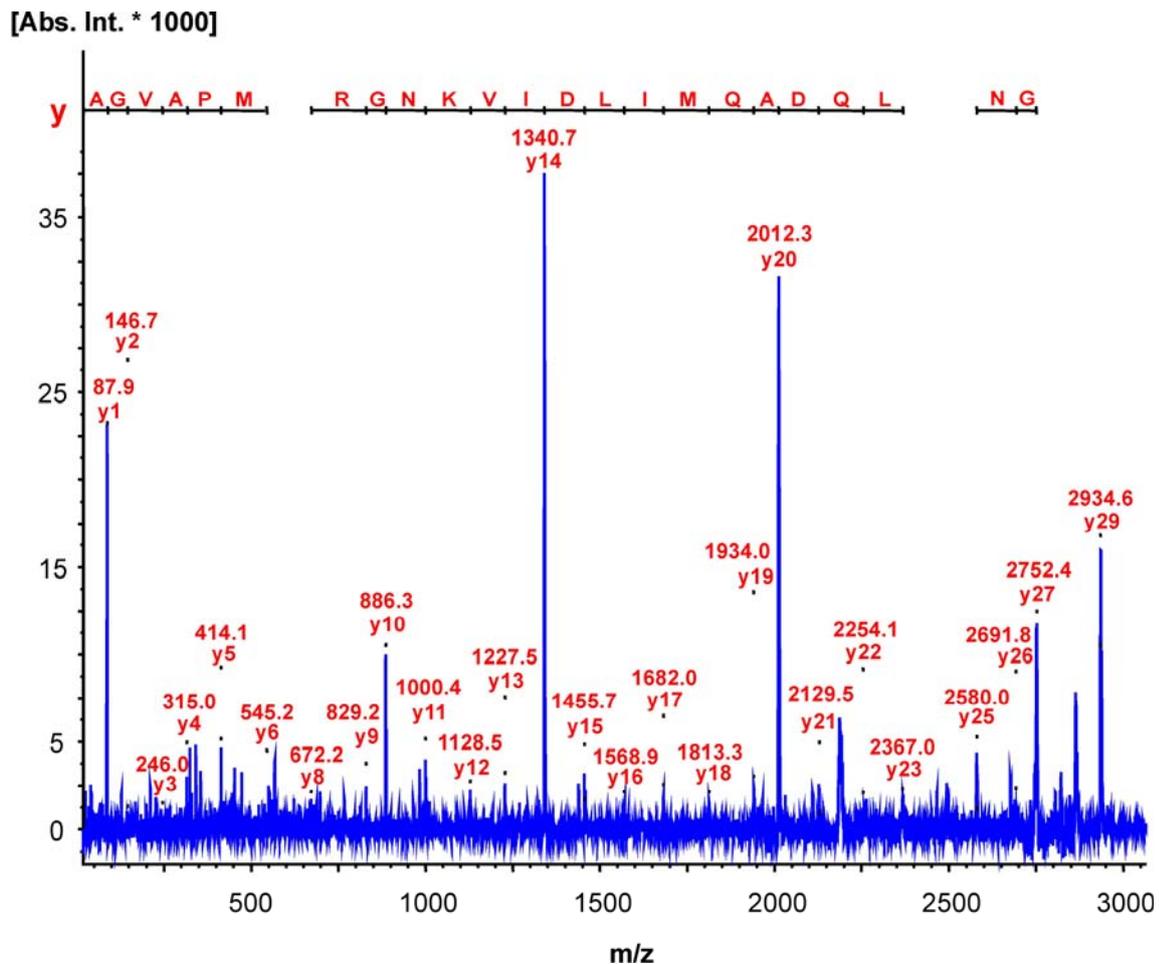
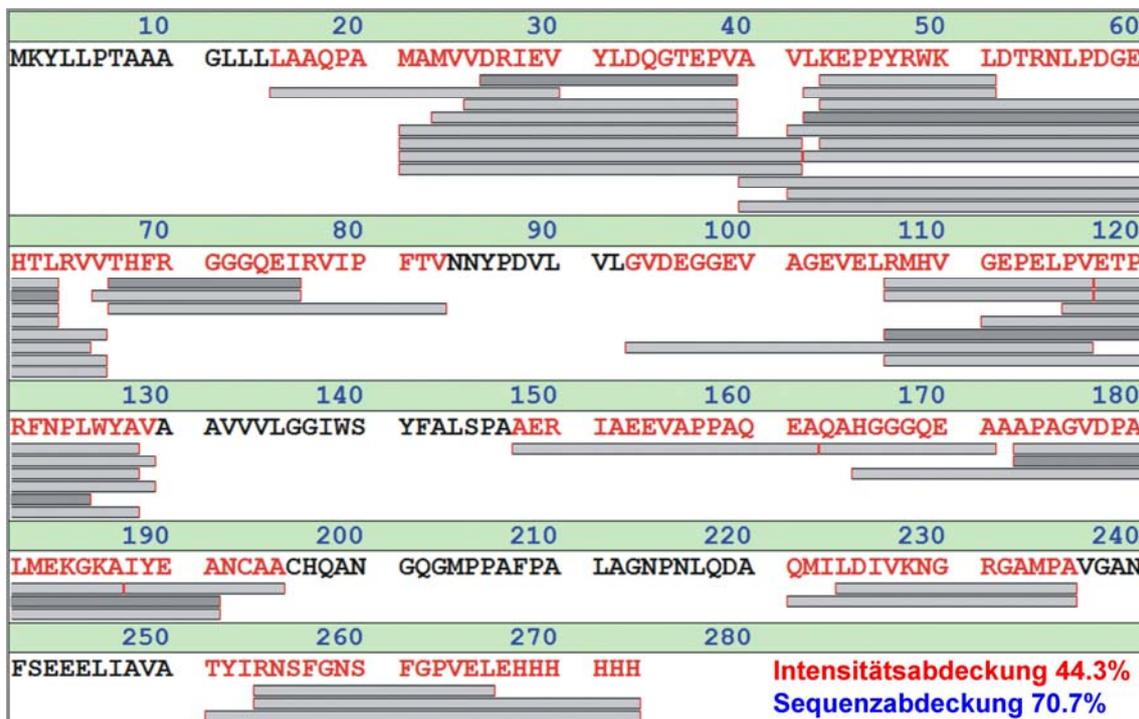


Abb. 5.23 MS/MS-Spektrum des Fragments *LAGNPNLQDAQMILDIVKNGRGAMPAVGA* (siehe Abb. 5.22). Es sind nur die y-Ionen markiert.

Die fehlenden Fragmentcluster im mittleren Bereich sind auf die Transmembranhelix und die Häm-Gruppe zurückzuführen (grün bzw. gelb hervorgehoben in Abb. 5.22B). Die Transmembranhelix war durch die stärkere Interaktion mit dem Detergenz Dodecylmaltosid wahrscheinlich schwerer zugänglich. Für die Proteinregion mit der Häm-Gruppe herrschte wahrscheinlich eine ähnlich schlechte Enzymzugänglichkeit vor (Ergebnisse zur Häm-Modifikation, siehe auch übernächster Absatz).

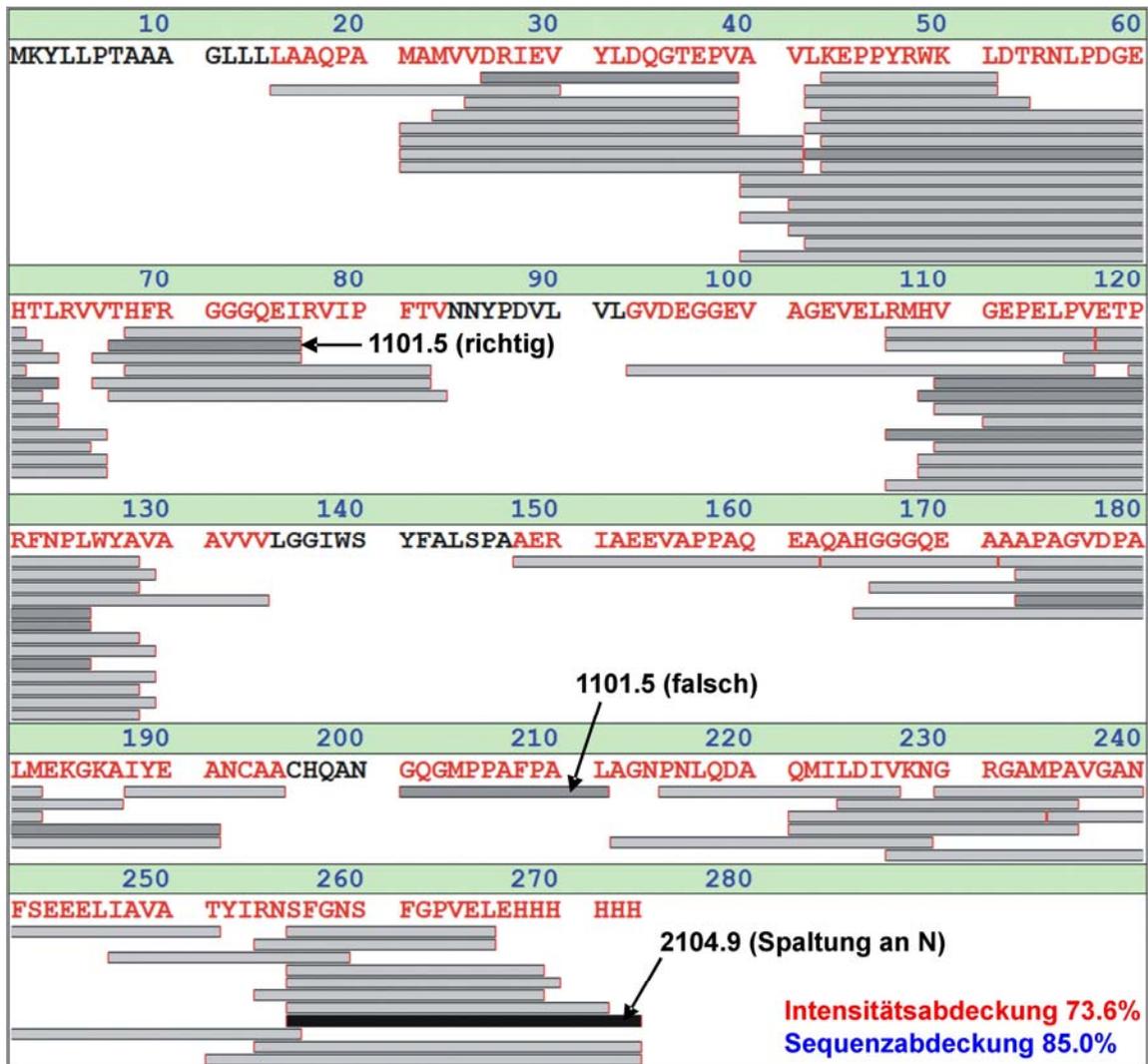
Die *Biotoools*-Berechnung mit 10 ppm Massengenauigkeit und der Enzymdefinition A, V, L, I stimmt mit den Fragmentclustern, die durch MS/MS-Experimente abgesichert sind, gut überein, was die Präferenz der Elastase für diese vier Aminosäuren zeigt (Abb. 5.24). Aus der Intensitätsabdeckung von 44.3% ist aber offensichtlich, dass einige intensive Signale noch fehlen (z. B. das Fragment SFGNSFGPVELEHHHHHHH bei 2104.9; siehe Abb. 5.22 und Abb. 5.25). Es ist erkennbar, dass neben den Aminosäuren G, A, V, L, I, S, T (siehe Kapitel

5.4.1) auch noch vereinzelt an H, M und N geschnitten wurde (siehe Abb. 5.22B). Die Berechnung mit der Enzymdefinition A, V, L, I, S, T, N, H, M gibt daher ein etwas besseres Bild von den anwesenden Fragmenten im MS-Spektrum (Abb. 5.25). G wurde aus der Definition getilgt, da die Schnittwahrscheinlichkeit an G im Vergleich zu A, V, L, I, S, T wesentlich geringer ist (siehe Kapitel 5.4.1). Damit werden die falsch positiven Zuordnungen bei der Berechnung mit 10 ppm Massengenauigkeit und bei der relativ weiten Enzymdefinition etwas reduziert, d. h. sie liegen noch im Rahmen für eine sinnvolle Berechnung (siehe Kapitel 5.4.3). Neben dem Fragment THFRGGGQEI wird beispielsweise auch das Fragment GQGMPPAFPAL falsch dem m/z-Wert 1101.5 zugeordnet (siehe Abb. 5.22 und Abb. 5.25). Schon aufgrund der Intensität des MS-Signals ist aber das Fragment THFRGGGQEI wahrscheinlicher, da nur bei diesem ein Arginin enthalten ist. Gerade solche Argininpeptide sind bei MALDI besonders bevorzugt (siehe Kapitel 3.1.3.4). Deshalb gruppieren sich die Fragmentcluster auch vorzugsweise um die Arginine.



**Abb. 5.24** *Biotoools*-Berechnung mit der Enzymdefinition A, V, L, I (10 ppm Massengenauigkeit). Für das zugehörige MS-Spektrum, siehe Abb. 5.22A. Die zugeordneten Fragmente sind durch Balken unterhalb der Sequenz dargestellt. Die Einfärbung der Balken ist ein grobes Maß für die Intensität der MS-Signale (schwarz, sehr hoch; dunkelgrau, hoch; grau, mittel oder schwach). Weitere Details zur Abbildung, siehe Text.

## 5. Ergebnisse



**Abb. 5.25** *Biotoools*-Berechnung mit der Enzymdefinition A, V, L, I, S, T, N, H, M (10 ppm Massengenauigkeit). Für das zugehörige MS-Spektrum, siehe Abb. 5.22A. Legende, siehe Abb. 5.24. Weitere Details zur Abbildung, siehe Text.

Diese Cluster könnte man für das Aufspüren von Punktmutationen oder Modifikationen nutzen. Bei der *Biotoools*-Berechnung in Abb. 5.26 wurde theoretisch eine Phosphorylierung für das Tyrosin an Position 47 eingefügt. Da diese natürlich nicht vorhanden ist, fehlt jetzt der komplette Fragmentcluster an dieser Stelle und die Intensitätsabdeckung sinkt deutlich von 73.6% auf 59.4%. Umgekehrt wäre dieser Fragmentcluster nur dann anwesend gewesen, wenn das Protein an dieser Stelle wirklich modifiziert gewesen wäre. Natürlich funktioniert die Strategie nur, wenn die Modifikation an der Aminosäure im Bereich von 100% liegt. Das könnte natürlich auch der Grund sein, warum der Fragmentcluster bei der Häm-Modifikation fehlt. Wurde diese Modifikation bei

der *Biotoools*-Berechnung (Enzymdefinition: A, V, L, I, S, T, N, H, M) berücksichtigt, wurden aber nur drei passende Signale mit geringer Intensität im höheren Massenbereich mit einer Massengenauigkeit von 30 ppm oder besser gefunden (Abb. 5.27). Diese Signale konnten auch bei *Biotoools*-Berechnungen (Enzymdefinition: A, V, L, I, S, T, N, H, M) mit einer Massengenauigkeit von 50 ppm nicht zugeordnet werden, wenn die Häm-Modifikation nicht berücksichtigt wurde. Zusätzlich sind alle Fragmente durch Spaltung an der Aminosäure Alanin entstanden, die von Elastase bevorzugt geschnitten wird (siehe Kapitel 5.4.1). Die geringe Intensität ist darauf zurückzuführen, dass es sich um hohe m/z-Werte handelt, die Peptide nur Lysin als basische Aminosäure enthalten und die Zugänglichkeit der Elastase zum Protein für diese Region schwerer ist, weshalb auch nur große Fragmente entstehen. Die Wahrscheinlichkeit ist daher äußerst gering, dass es sich hier nicht um diese Häm-modifizierte Fragmente handelt.

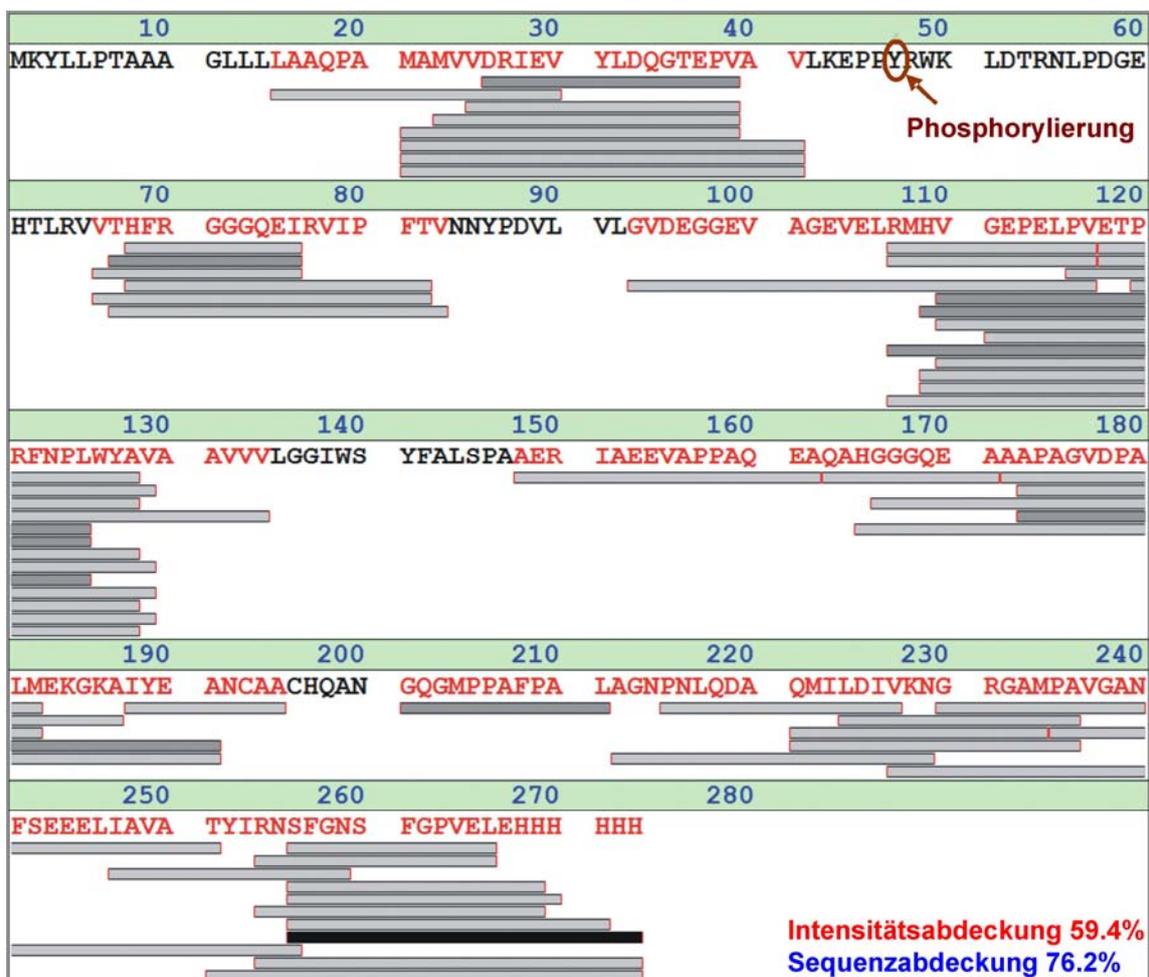
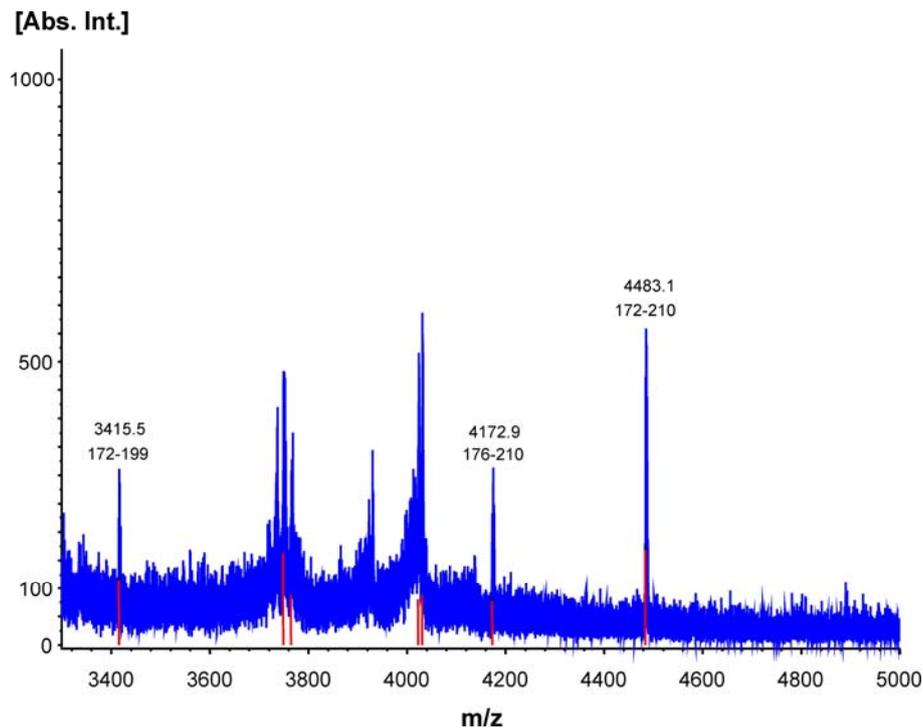


Abb. 5.26 *Biotoools*-Berechnung nach Einfügen einer theoretischen Phosphorylierung an Position 47. Enzymdefinition, Massengenauigkeit etc., siehe Abb. 5.25. Weitere Details zur Abbildung, siehe Text.

**A****B**

m/z	M (theor.)	Fehler (ppm)	Position	Sequenz
3415.468	3415.4937	-7	172 - 199	(A)AAPAGVDPALMEKGKAIYEANCAACHQA(N)
4172.8624	4172.8155	12	176 - 210	(A)GVDPALMEKGKAIYEANCAACHQANGQGMPPAFPA(L)
4483.1066	4482.9796	29	172 - 210	(A)AAPAGVDPALMEKGKAIYEANCAACHQANGQGMPPAFPA(L)

**Abb. 5.27 Häm-modifizierte Fragmente des Elastaseverdaus von Cytochrom  $c_1$ .** (A) Massenbereich 3300 - 5000 des MS-Spektrums in Abb. 5.22A. Allen MS-Signalen, für die bei den ausgewählten Qualitätskriterien eine monoisotopische Masse berechnet werden konnte, sind mit einem roten Strich markiert (siehe Kapitel 8.2.4). Ein m/z-Wert und eine Positionsangabe in der Proteinsequenz sind nur für die MS-Signale angegeben, denen ein Häm-modifiziertes Fragment bei der *Biotoools*-Berechnung zugeordnet werden konnte (siehe B). (B) Durch *Biotoools*-Berechnung zugeordnete Fragmente, die Häm-modifiziert sind (Enzymdefinition: A, V, L, I, S, T, N, M, H; Massengenauigkeit: mindestens 50 ppm). Abkürzungen: m/z, gemessene Masse; M (theor.), theoretische Masse des Fragments (Anmerkung: Die Ladung trägt bereits die Häm-Gruppe d. h. beim gemessenen m/z-Wert muss nicht die Masse eines Protons addiert werden.); Fehler, Abweichung der gemessenen von der theoretischen Masse in ppm; Position, Position des Fragments in der Cytochrom  $c_1$ -Sequenz (Proteinsequenz, siehe z. B. Abb. 5.26); Sequenz, Sequenz des Fragments (Anmerkung: In Klammern ist die benachbarte Aminosäure angegeben, um die Spaltung der Elastase nachvollziehbar zu machen).

Die alles entscheidende Frage für die Analyse von Membranproteinen ist aber, ob man mit weniger spezifischen Enzymen wie Elastase, die mehr Fragmente produziert, eine bessere Sequenzabdeckung als mit Trypsin erhält. Die Frage muss man mit nein beantworten, wenn noch genügend Schnittstellen für Trypsin vorhanden sind, was für Cytochrom  $c_1$  der Fall ist (Abb. 5.28). Beim 24-stündigen Trypsinverdau war sogar die Transmembranhelix im MS-Spektrum als Signal sichtbar, die Häm-Modifikation allerdings nicht. Jenseits der 5000 Da waren allerdings keine Signale mehr im MS-Spektrum detektierbar, weshalb die Zuordnung eines Häm-modifizierten Fragments auch nicht möglich war. Weniger spezifische Enzyme sollten daher nur als Alternative eingesetzt werden, wenn Trypsin die analytische Fragestellung nicht beantworten kann, wie z. B. hier die Identifizierung der Häm-Modifikation. Denn die Zugänglichkeit zum Membranprotein ist für alle Enzyme vergleichbar, die Intensitätsschwankungen der MS-Signale ebenfalls (z. B. aufgrund der Bevorzugung von Argininpeptiden in MALDI). Kapitel 5.4.6 und 5.4.7 geben aber zwei Beispiele, wo der Einsatz weniger spezifischer Enzyme vorteilhaft ist.

10	20	30	40	50	60
MKYLLPTAAA	GLLLLAQA	MAMVVDRIEV	YLDQGTPEVA	VLKEPPYRWK	LDTRNLPDGE
70	80	90	100	110	120
HTLRVVTHFR	GGGQEIRVIP	FTVNNYPDVL	VLGVDEGGEV	AGEVELRMHV	GPELPPVETP
130	140	150	160	170	180
RFNPLWYAVA	AVVVLGGIWS	YFALSPAAR	IAEEVAPPAQ	EAQAHGGGQE	AAAPAGVDPA
190	200	210	220	230	240
LMEK GKAIYE	ANCAACHDAN	GQGMPPAFPA	LAGNPNLQDA	QMILDIVKNG	RGAMPAVGAN
250	260	270	280		
FSEEELIAVA	TYIRNSFGNS	FGPVELEHHH	HHH		

Intensitätsabdeckung 80.1%  
Sequenzabdeckung 75.8%

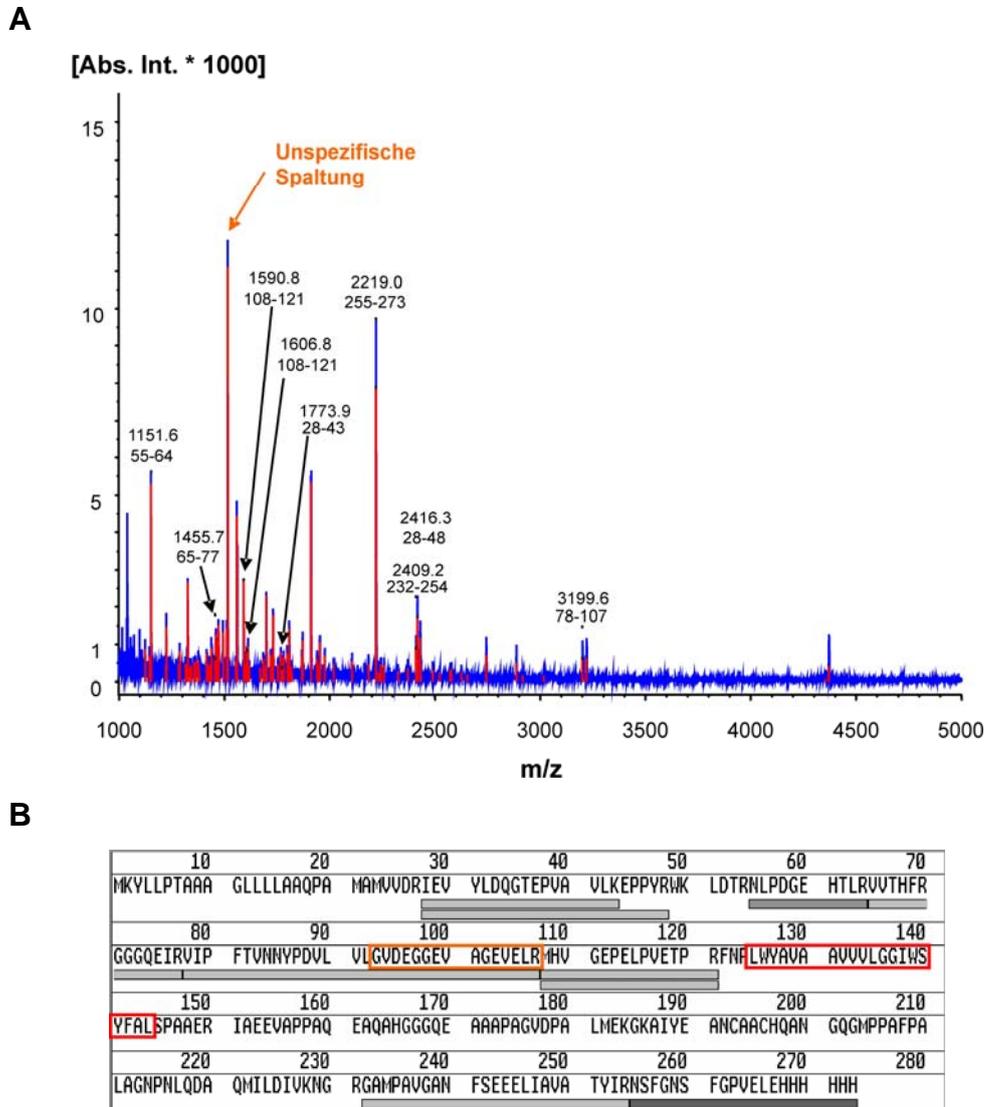
**Abb. 5.28** *Biotoools*-Berechnung für einen 24-stündigen Trypsinverdau von Cytochrom  $c_1$ . Die Enzymdefinition war K und R, die Massengenauigkeit 50 ppm. Die Transmembranhelix ist mit einem Doppelpfeil markiert. Das Häm  $c$ -Typ Bindemotiv ist eingerahmt. Legende, siehe Abb. 5.24. Weitere Details zur Abbildung, siehe Text.

### 5.4.5 Cytochrom $c_1$ und Cytochrom $c$ Oxidase in Phospholipidvesikeln

Um den Einfluss einer Membran zu simulieren, wurde das Membranprotein Cytochrom  $c_1$  und der Membranproteinkomplex Cytochrom  $c$  Oxidase (COX; *Paracoccus denitrificans*) in Phospholipidvesikel eingebaut und danach enzymatisch verdaut (siehe Methoden 8.6.2). COX wäre ein optimales Modellsystem, da sie aus vier extrem hydrophoben Proteinen aufgebaut ist (Datenbanknummern von SwissProt: COX I, P08305 bzw. P98002; COX II, P08306; COX III, P06030; COX IV, P77921). Weil aber im Laufe der Experimente neben dem Membranproteinkomplex COX noch Untereinheiten vom Komplex I der Atmungskette von *Paracoccus denitrificans* bzw. das wasserlösliche Enzym Methanoldehydrogenase (hochabundantes Protein in *Paracoccus denitrificans*) massenspektrometrisch nachgewiesen wurden, wurde COX letztendlich als ungeeignetes Modellsystem beurteilt. Eine Optimierung der Aufreinigung für die Massenspektrometrie wurde nicht durchgeführt.

Aber auch das einfache Membranprotein Cytochrom  $c_1$  lieferte unbefriedigende Ergebnisse. Eingebaute Membranproteine in Phospholipidvesikel scheinen daher kein gutes Modellsystem für Verdauexperimente zu sein. Abb. 5.29 bzw. Abb. 5.30 zeigen die Ergebnisse für den Trypsinverdau für den Verdauüberstand und für den Phospholipidrückstand. Die Transmembranhelix konnte zwar nur im Phospholipidpellet nachgewiesen werden, viele Peptide der wasserlöslichen Proteinregionen waren aber auch hier im MS-Spektrum sichtbar. Eine vollständige Abtrennung von Verdaufragmenten der wasserlöslichen Regionen von Membranproteinen von den Transmembranhelices ist daher vermutlich auch bei realen Membranen nicht so ohne weiteres möglich, wenn es schon bei so einem einfachen Modellsystem problematisch ist. Die Zugänglichkeit des Trypsins zur Membranhelix war zudem behindert. Der Verdau von Cytochrom  $c_1$  in Dodecylmaltosid hat im Vergleich zum Verdau in Phospholipidvesikeln ein kürzeres tryptisches Fragment geliefert (siehe Abb. 5.30 für Phospholipidvesikel; siehe Kapitel 5.4.4, Abb. 5.28 für Dodecylmaltosid). Außerdem ließen sich einige intensive Signale des MS-Spektrums nicht zuordnen. Hierbei handelte es sich um scheinbar unspezifische Spaltungen von Trypsin (siehe Abb. 5.29, Abb. 5.30, Abb. 5.31). Für Trypsin ist aber bekannt, dass es nur äußerst selten unspezifisch schneidet (siehe Kapitel 3.1.3.4). Wahrscheinlicher ist es, dass ein Teil des Cytochrom  $c_1$  wegen der Ultraschallbehandlung während des Einbaus in die Phospholipidvesikel bzw. während des Verdau an einigen Stellen gebrochen ist. Wenn dies auch nur ein geringer Anteil gewesen ist, kann dies massenspektrometrisch mit hoher Wahrscheinlichkeit detektiert werden. Aufgrund dieser unspezifischen Spaltungen war eine

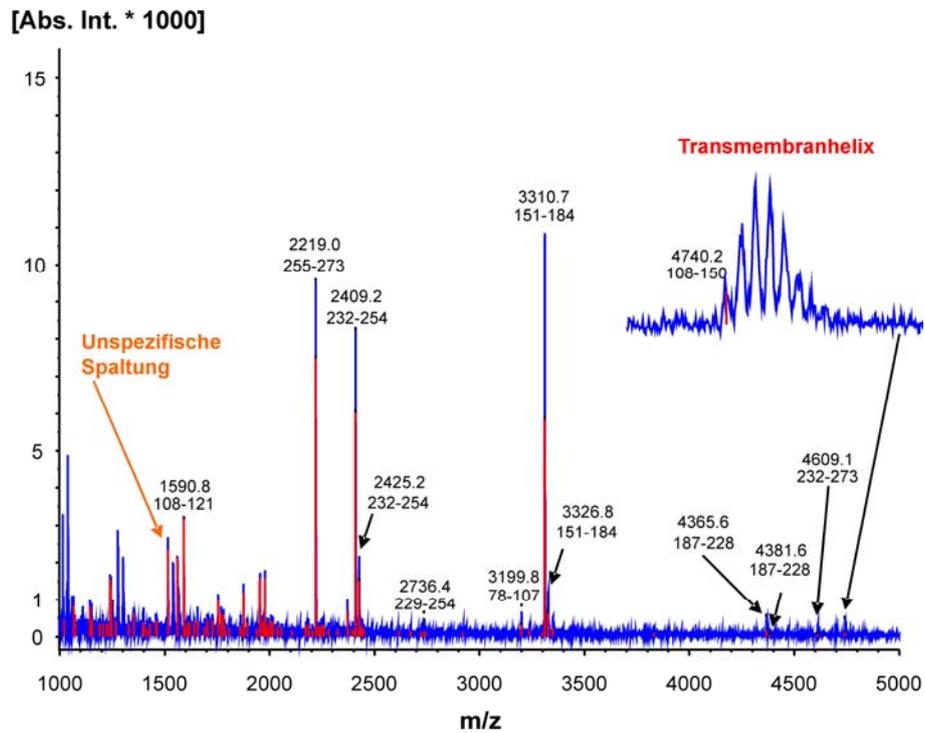
Auswertung der weniger spezifischen Verdau mit Chymotrypsin und Elastase bei den erreichbaren Massengenauigkeiten mit einem MALDI-TOF letztendlich auch nicht möglich.



**Abb. 5.29 Verdau von Cytochrom  $c_1$  in Phospholipidvesikeln mit Trypsin (Verdauüberstand).**

(A) MS-Spektrum des Verdaus. Allen MS-Signalen, für die bei den ausgewählten Qualitätskriterien eine monoisotopische Masse berechnet werden konnte, sind mit einem roten Strich markiert (siehe Kapitel 8.2.4). Ein m/z-Wert und eine Positionsangabe in der Proteinsequenz sind nur für die MS-Signale angegeben, denen ein tryptisches Fragment bei der *Biotoools*-Berechnung zugeordnet werden konnte (siehe B). (B) *Biotoools*-Berechnung mit der Enzymdefinition K und R (50 ppm Massengenauigkeit). Die zugeordneten Fragmente sind durch Balken unterhalb der Sequenz dargestellt (Einfärbung der Balken, siehe Abb. 5.24). Die Position der Transmembranhelix ist rot markiert. Ein Fragment, das durch unspezifische Spaltung entstanden ist, ist orange eingerahmt (MS/MS-Spektrum, siehe Abb. 5.31)

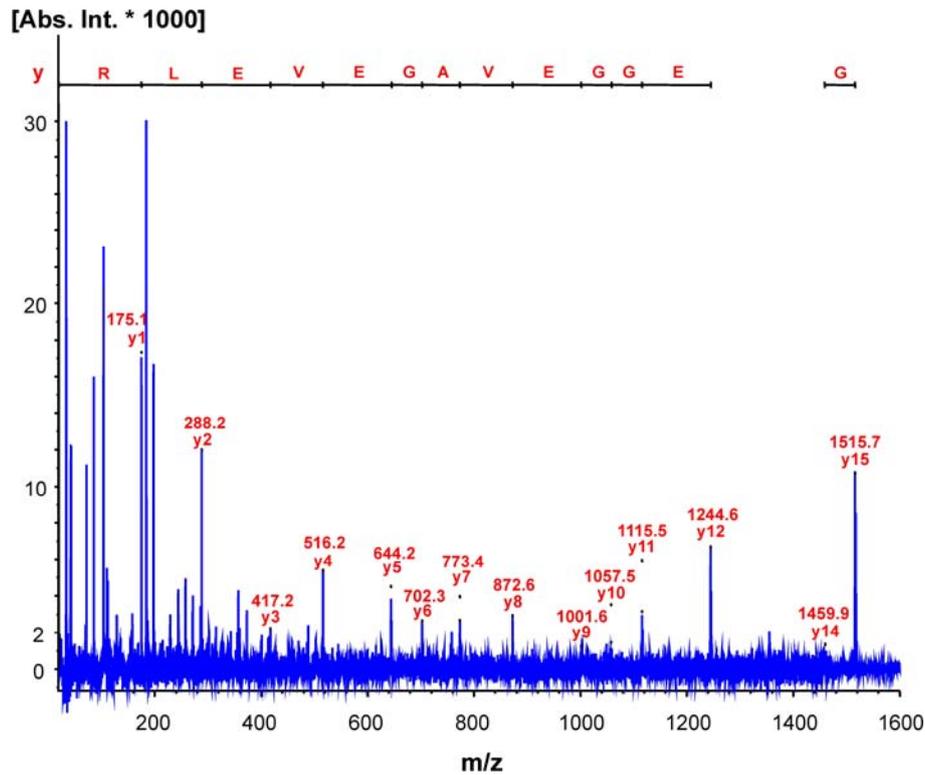
A



B

10	20	30	40	50	60	70
MKYLPTAAA	GLLLAAQPA	MAMVVDRIEV	YLDQGTPEVA	VLKEPPVRWK	LDTRNLDPGE	HTLRVUTHFR
80	90	100	110	120	130	140
GGGQEIIRVIP	FTVNNYVDVL	VLGVDEGGEV	AGEVELRMHV	GEPELPVETP	RFNHLWYAVA	AVVVLGGIWS
150	160	170	180	190	200	210
YFALSPAAER	IAEEVAPPAQ	EAQAHGGGQE	AAAPAGVDPA	LMEK GKAIYE	ANCAACHQAN	GQGMPPAFPA
220	230	240	250	260	270	280
LAGNPNLQDA	QMILDIVKNG	RGAMPVGVAN	FSEEELIAVA	TYIRNSFGNS	FGPVELEHHH	HHH

**Abb. 5.30 Verdau von Cytochrom  $c_1$  in Phospholipidvesikeln mit Trypsin (Phospholipid-rückstand).** (A) MS-Spektrum des Verdauungsprodukts. (B) *Biotoools*-Berechnung. Das Fragment beim Häm  $c$ -Typ Bindemotiv (Position 187 – 228) trägt nicht mehr die Hämgruppe. Es enthält aber zwei Methionine. Einer der zwei Methionine lag im oxidierten Zustand vor. Für die 2 Signale im MS-Spektrum wurden daher drei theoretische Fragmente berechnet (4365.6 und 4381.6). Die Häm-Gruppe wurde wahrscheinlich teilweise während des Einbaus von Cytochrom  $c_1$  in die Phospholipidvesikel, teilweise während des Verdauungsprozesses (mehrfache Ultraschallbehandlung) bzw. teilweise durch ISD (*in-source decay*) in der MALDI-Quelle abgespalten. Detektierbare Fragmente mit Häm-Gruppe sind bei Trypsinverdau von Cytochrom  $c_1$  aber sowieso nicht zu erwarten (siehe auch Kapitel 5.4.4). Weitere Informationen zur Abbildung, siehe Abb. 5.29.



**Abb. 5.31 MS/MS-Spektrum des Fragments *GVDEGGEVAGEVELR*.** Das zugehörige MS-Signal bzw. die Position in der Cytochrom  $c_1$ -Sequenz ist in Abb. 5.29 und 5.30 orange markiert. Aus Übersichtsgründen sind nur die y-Ionen im MS/MS-Spektrum aufgeführt.

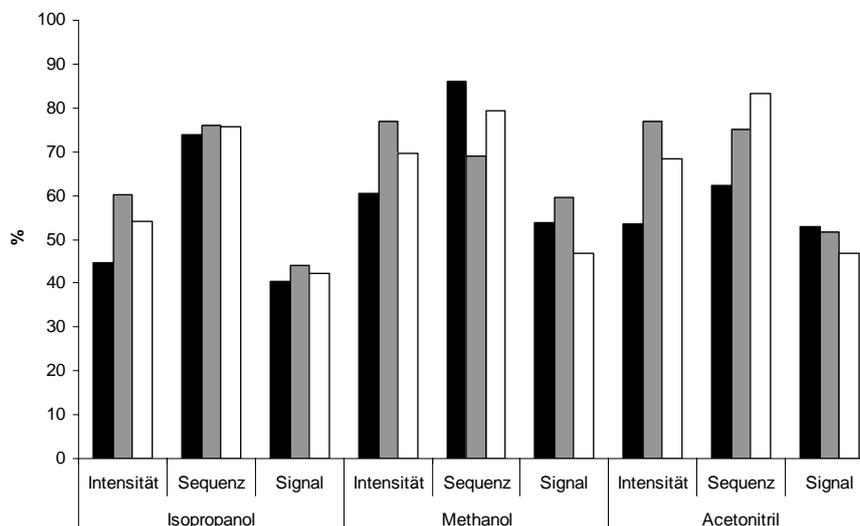
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dieses Modellsystem auch nicht weiter verfolgt. Die Ergebnisse der Experimente zeigen aber, dass Membranproteine extrem vorsichtig während der Aufreinigung und des Verdauens behandelt werden sollten, die Enzymzugänglichkeit bei realen Membranfraktionen durch die Lipiddoppelschicht wahrscheinlich noch stärker beeinflusst wird und die Transmembranhelices eigentlich wie jedes andere enzymatische Fragment mittels MALDI-TOF detektierbar sind, wenn sie nicht durch das Fehlen einer basischen Aminosäure (vorzugsweise Arginin) diskriminiert werden.

### 5.4.6 Bacteriorhodopsin in Purpurmembranen

Die Purpurmembranen von *Halobacterium salinarium* wurden mit den drei organischen Lösungsmitteln Acetonitril, Isopropanol und Methanol extrahiert. Die Membranen enthalten fast ausschließlich das Membranprotein Bacteriorhodopsin (Datenbanknummer in SwissProt: P02945). Deshalb ist eine direkte Messung ohne weitere Trennung möglich. Danach wurde mit Ammoniumbicarbonatpuffer verdünnt, um den Anteil des organischen Lösungsmittels auf 60% einzustellen, und mit Elastase verdaut. Die aufgenommenen MALDI-Spektren wurden dann vor der Auswertung von Hintergrundsignalen bereinigt (Details zur Methodik, siehe Kapitel 8.6.3).

Die *Biotoools*-Berechnungen mit 10 ppm Massengenauigkeit und der Enzymdefinition G, A, V, L, I, S, T zeigen, dass der Verdau in den drei organischen Lösungsmitteln reproduzierbar ist. Die Schwankungen in der Sequenzabdeckung, Intensitätsabdeckung und Signalverwertung (Definitionen, siehe Kapitel 5.4.3) liegen im Rahmen der Qualitätsschwankungen, die bei MALDI-Messungen auftreten (Abb. 5.33). Abbildung 5.34 zeigt ein MS-Spektrum der Acetonitrilextraktion (siehe auch Anhang, Tab. 9.4.37). Die Ergebnisse der anderen Verdaus sind im Anhang ebenfalls als Diagramme beigelegt (siehe Abb. 9.4.8 bis Abb. 9.4.10). Sie demonstrieren die Ähnlichkeit der Verdaus noch etwas detailreicher als die Abbildung 5.33. Die Sequenzabdeckungen der 10 ppm Berechnungen müssten aber für alle Berechnungen korrigiert werden, denn es sind bereits ca. 30% der zugeordneten Fragmente bei dieser Massengenauigkeit mehrdeutig (siehe auch Kapitel 5.4.3). In Abbildung 5.34 sind die entsprechenden Massen im Spektrum (*A*) bzw. die zugehörigen Fragmente (*B*) farblich gekennzeichnet, um das Ausmaß der Mehrdeutigkeit zu verdeutlichen. Häufig könnten die falsch Positiven aber einfach beseitigt werden. Bei der Masse 1469.8 (blau gekennzeichnet in Abb. 5.34) handelt es beispielsweise mit ziemlicher Sicherheit um eines der beiden Fragmente im Sequenzbereich 20 – 30, da nur diese beiden ein Arginin enthalten. Für die anderen drei möglichen Fragmente ist dies nicht gegeben, so dass die Signalintensität im MALDI-Spektrum sehr gering sein sollte. Ob es zutreffen könnte, dass sich auch mehr Fragmente hinter einem MS-Signal verbergen, konnte aber in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Das wäre beispielsweise für das MS-Signal bei der Masse 2330.3 (orange gekennzeichnet in Abb. 5.34) interessant, da beide Fragmente Arginin enthalten. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hier aber um das leichter zugängliche C-terminale Fragment handelt, ist hoch. Auch ist das isolierte Fragment am N-Terminus eine falsch positive Zuordnung, da das Signalpeptid nicht mehr vorhanden ist.

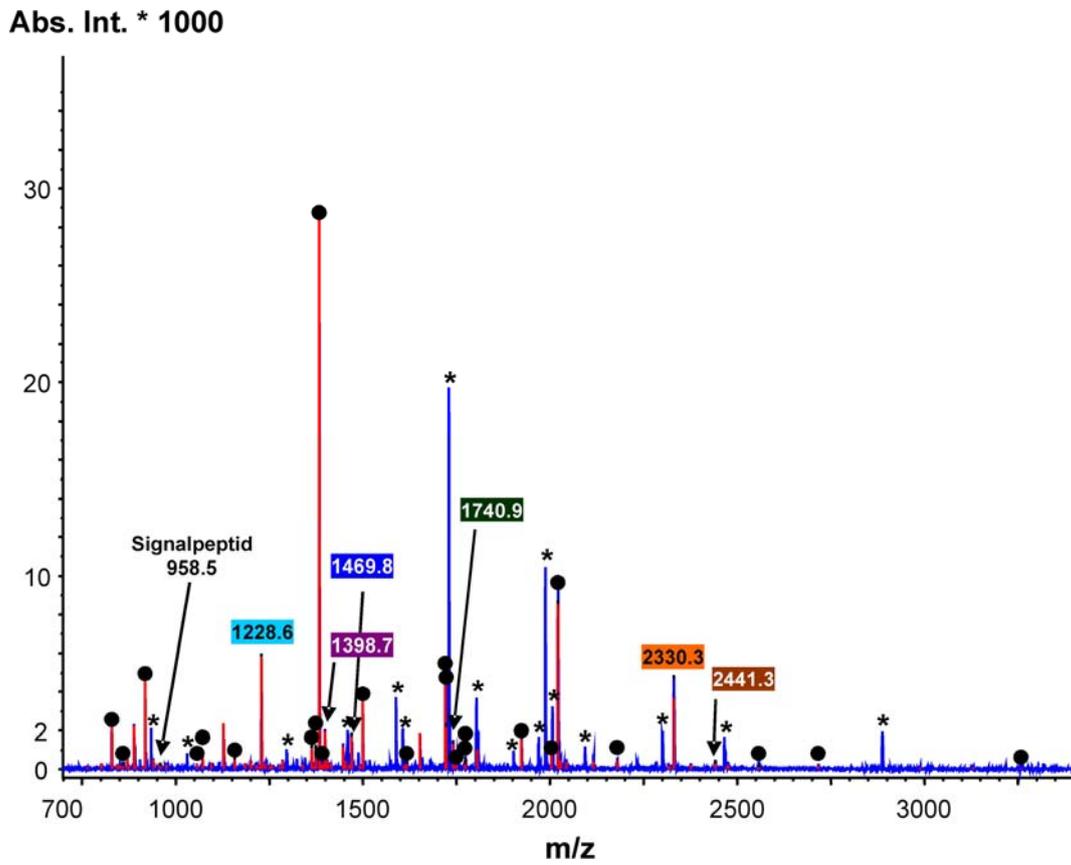
Die Sequenzabdeckung weist aber leider noch unübersehbare Löcher auf (Abb. 5.34B). Die Verbesserung zum Trypsinverdau, der nur sehr wenige Fragmente liefert, ist aber offensichtlich (Fischer *et al.*, 2006b).



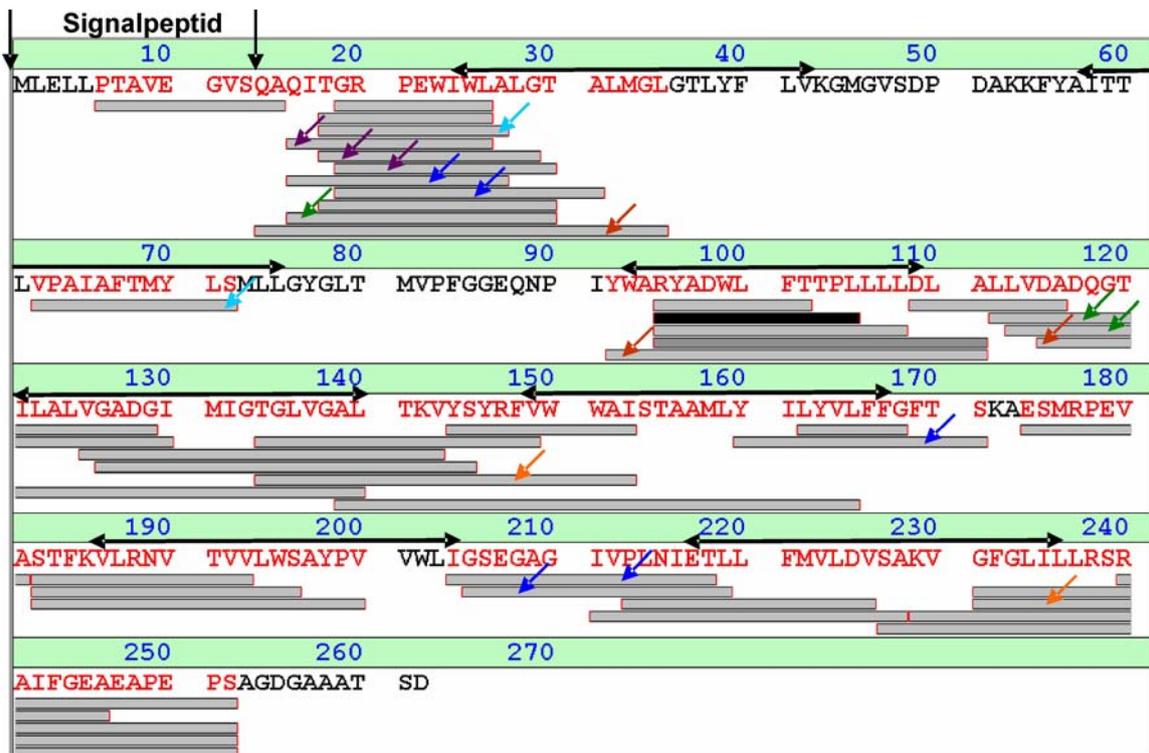
**Abb. 5.33 Bacteriorhodopsinverdau mit Elastase in 60%igen Isopropanol, Methanol bzw. Acetonitril.** Es ist die Intensitätsabdeckung (Intensität), Sequenzabdeckung (Sequenz) und Signalverwertung (Signal; Definitionen, siehe Kapitel 5.4.3) von drei unabhängigen Experimenten angegeben (schwarzer, grauer bzw. weißer Balken). Die *Biotoools*-Berechnungen erfolgten mit der Enzymdefinition G, A, V, L, I, S, T und einer Massengenauigkeit von mindestens 10 ppm. Abb 5.34 zeigt eines von den MS-Spektren (Acetonitril, grauer Balken). Die anderen Spektren sind nur in Diagrammform (vgl. Abb. 5.34B) im Anhang beigefügt (siehe Abb. 9.4.8 – Abb. 9.4.10).

**Abb. 5.34 MS-Spektrum und *Biotoools*-Berechnung eines Bacteriorhodopsinverdaus in Acetonitril (siehe nächste Seite).** (A) MS-Spektrum (siehe auch Abb. 5.33). Allen MS-Signalen, für die bei den ausgewählten Qualitätskriterien eine monoisotopische Masse berechnet werden konnte, sind mit einem roten Strich markiert (siehe Kapitel 8.2.4). MS-Signalen, denen ein enzymatisches Fragment bei der *Biotoools*-Berechnung zugeordnet werden konnte, sind mit einem Punkt gekennzeichnet (siehe Anhang, Tab. 9.4.37). Mehrdeutige Signale sind farblich markiert und der  $m/z$ -Wert ist angegeben (siehe B). MS-Signale des internen Standards bzw. besonders intensive Hintergrundsignale sind mit einem Stern versehen. (B) *Biotoools*-Berechnung (siehe auch Abb. 5.33). Mehrdeutige Fragmente sind mit einem Pfeil in der korrespondierenden Farbe zum MS-Signal markiert (siehe A). Die Positionen der Transmembranhelices sind mit Doppelpfeilen verdeutlicht. Das Signalpeptid ist ebenfalls gekennzeichnet.

Abb. 5.34A



B



### 5.4.7 Identifikation von ND3 aus einem 16%igen Polyacrylamidgel

Es soll an dieser Stelle nicht näher auf die biologische Fragestellung eingegangen werden, die in dieser Kooperation (Liste der Beteiligten, siehe Kapitel 8.6.5) beantwortet werden sollte. Die massenspektrometrischen Ergebnisse sind aber ein gutes Beispiel für einen Fall, in dem nur der Einsatz weniger spezifischer Enzyme zum Erfolg führen konnte.

In der mitochondrialen Atmungskette von Rindern wurden zunächst alle zugänglichen Cysteine der Proteinuntereinheiten von den fünf Komplexen mit NEM (nicht-fluoreszierender Label) abgesättigt. Danach wurde Komplex I in eine andere Konformation überführt und mit NFM (fluoreszierender Label) inkubiert, um ggf. neu zugängliche Cysteine zu modifizieren. Nach Blau-Nativ Abtrennung von Komplex I von den anderen Komplexen der Atmungskette und Auftrennung des Komplexes in seine Proteinuntereinheiten mit einer dSDS-PAGE fluoreszierte nur ein Spot im Gel (Spot 1 in Abb. 5.35). Die bis hier beschriebenen Arbeiten wurden alle von den Kooperationspartnern durchgeführt. Die unbekannte Untereinheit von Komplex I sollte dann massenspektrometrisch identifiziert werden (siehe auch Kapitel 8.6.5).

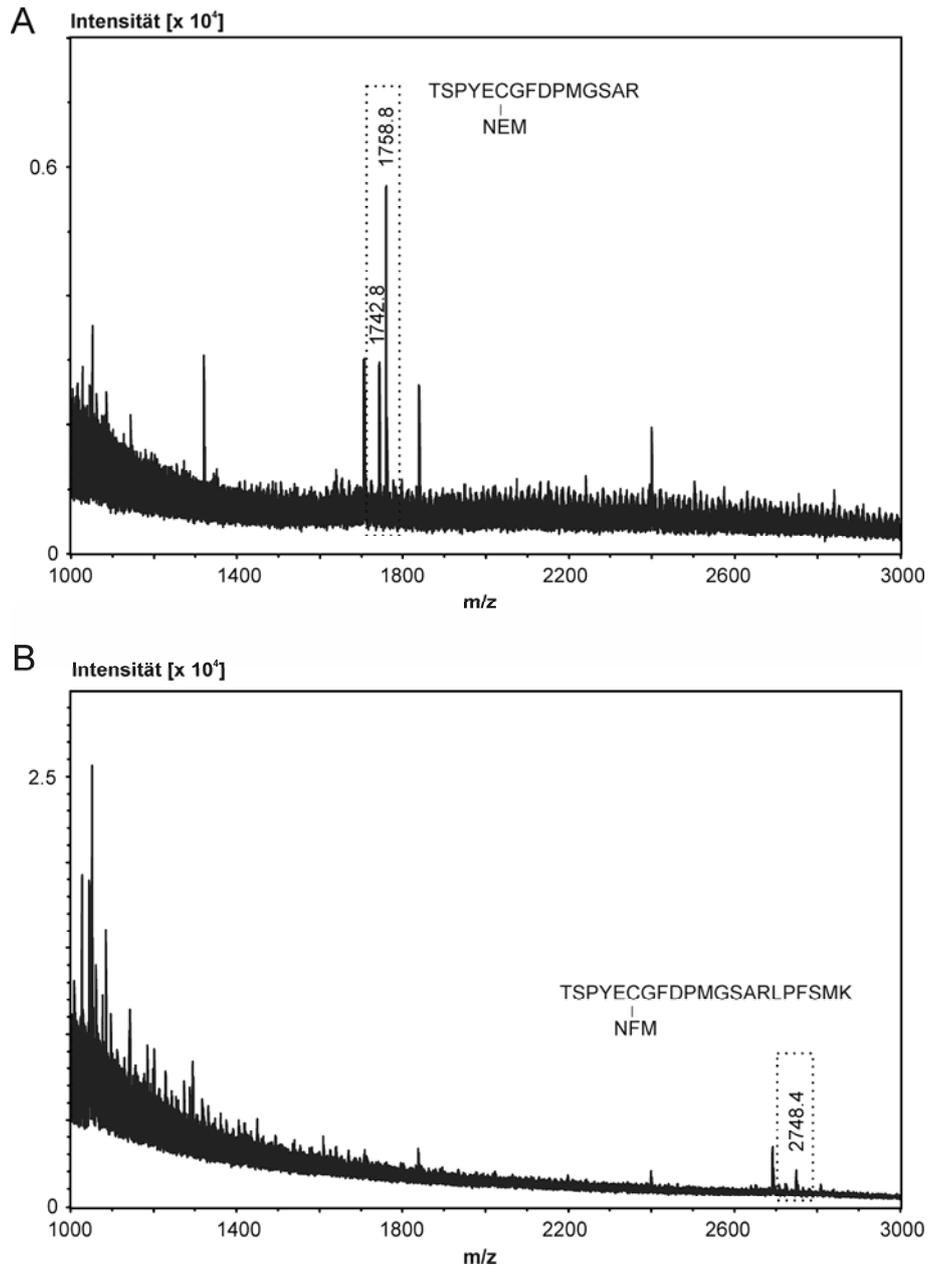


**Abb. 5.35** dSDS-PAGE von Komplex I nach der Modifizierung mit NEM und NFM (Silberfärbung). Spot 1 fluoresziert bei 488/520 nm (Anregung/Fluoreszenz). Details zur Methodik, siehe Kapitel 8.6.5. Weitere Informationen zur Abbildung, siehe Text.

Das MS-Spektrum des Trypsinverdaus vom fluoreszierenden Spot 1 enthielt ein Signal, das einem NFM-gelabelten Peptid von der hydrophoben Untereinheit ND3 zugeordnet werden konnte (siehe Abb. 5.36 und Abb. 5.37B). Hinter dem diagonal verschobenen Spot 2 verbarg sich das gleiche Protein, das mit dem leichteren NEM-Label modifiziert worden war.

MNMLALLTNFTLATLLVIAFWLPQLNVYSEKTSPYECGFDPMGSARLPFSMKFFLVAITFLLFDLEIAL  
 LLPLPWASQTANLNTMLTMALFLIILLAVSLAYEWTQKGLEWTE

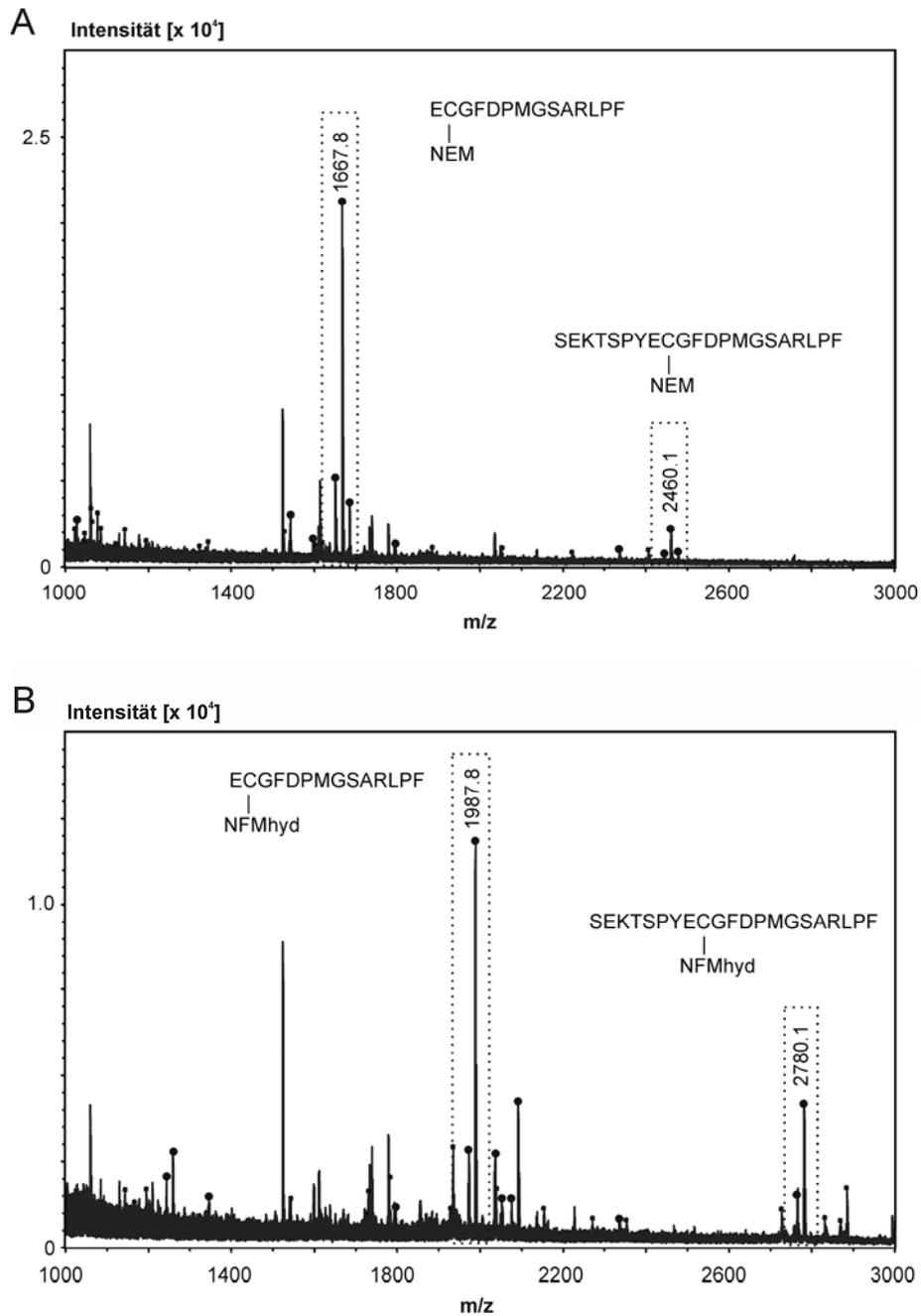
**Abb. 5.36 ND3-Sequenz (Datenbanknummer in Swiss-Prot, P03898).** Die Transmembranhelices sind unterstrichen. Die Schnittmöglichkeiten für Trypsin sind fett gedruckt. Das Cystein, das mit NFM bzw. NEM modifiziert wurde, ist fett und unterstrichen hervorgehoben.



**Abb. 5.37 MS-Spektren des Trypsinverdaus von ND3.** (A) Spot 2 (siehe auch Anhang, Tab. 9.4.38). (B) Spot 1 (siehe auch Anhang, Tab. 9.4.39). Die Signale, die tryptischen Fragmenten zugeordnet werden konnten, sind mit einem Kasten markiert.

Das Spektrum von Spot 2 enthielt zwei Signale, die als NEM-gelabelte Peptide von ND3 identifiziert werden konnten (Abb. 5.37A). Da eine intensive Silberfärbung und eine Lokalisation außerhalb der Diagonale auf ein extrem hydrophobes Protein hinweist, war es sehr wahrscheinlich, dass es sich wirklich um ND3 handeln könnte. Außerdem resultiert ein theoretischer Trypsinverdau von ND3 in nur 5 möglichen tryptischen Fragmenten für den  $m/z$ -Bereich 700 – 5000 (siehe Abb. 5.36; Parameter für die Berechnung mit Biotoools 2.2, siehe Kapitel 8.6.5). Kleine Peptide unterhalb 800 sind aber häufig in MALDI nicht sichtbar (Matrixregion). Die großen Peptide oberhalb 3000 sind aus einem 16%igen Gel meistens nicht extrahierbar. Es bleiben somit die beiden tryptischen Fragmente TSPYECGFDPMG SAR (Fragment 1) und TSPYECGFDPMG SARLPFSMK (Fragment 2) übrig. Fragment 2 ist als NFM-gelabeltes Peptid im MS-Spektrum von Spot 1 sichtbar, Fragment 1 als NEM-gelabeltes Peptid im MS-Spektrum von Spot 2 (2 Signale, Methionin oxidiert/reduziert). Allerdings ist die Massengenauigkeit für das NFM-gelabelte Fragment mit 120 ppm außerhalb der Massentoleranz der externen Kalibrierung.

Um das Protein in Spot 1 und 2 eindeutig zu identifizieren, ist deshalb das Enzym Chymotrypsin verwendet worden. Mit diesem Enzym besteht eine höhere Chance, mehr Fragmente zu erhalten, die die optimale Größe von 800 – 3000 Da haben. Der Nachteil ist, dass konventionelle PMF-Suchen (*peptide mass fingerprint*) aufgrund der geringeren Spezifität des Enzyms nicht zu signifikanten Identifikationen führen können (siehe Kapitel 5.4.3), denn Chymotrypsin spaltet nur überwiegend an den aromatischen Aminosäuren F, W, Y (C-terminal); zusätzlich schneidet Chymotrypsin mit geringerer Rate an den Aminosäuren L, M, A, D und E (C-terminal; siehe Kapitel 5.4.1). Da längere Verdauzeiten aufgrund des 16%igen Gels nötig gewesen sind, sind chymotryptische Fragmente mit diesen Schnitten im MS-Spektrum natürlich auch sichtbar. *Biotoools*-Berechnungen mit der Enzymdefinition F, W, Y für die Verdau von Spot 1 und 2 zeigen aber schon eindeutig, dass es sich um ND3 handelt (Abb. 5.38A für Spot 2 bzw. Abb. 5.38B für Spot 1). Zwei der intensivsten Signale in Abb. 5.38B (1987,8 bzw. 2780,1, eingerahmt) lassen sich mit einer Massengenauigkeit von unter 20 ppm (siehe Anhang, Tab. 9.4.40) den NFMhyd-gelabelten ND3-Peptiden ECGFDPMG SARLPF bzw. SEKTSPYECGFDPMG SARLPF zuordnen. Die chymotryptischen Fragmente tauchen als Signalkaare mit einem Massenshift von 16 Da im MS-Spektrum auf, weil das Methionin in oxidiert und reduzierter Form vorliegen kann. Für beide Fragmente ist auch das ungelabelte Fragment als kleines Signal im MS-Spektrum enthalten (siehe Anhang, Tab. 9.4.41). Hierbei handelt es sich wohl um ein MALDI-Artefakt, das durch ISD (*in-source decay*) entstanden ist.

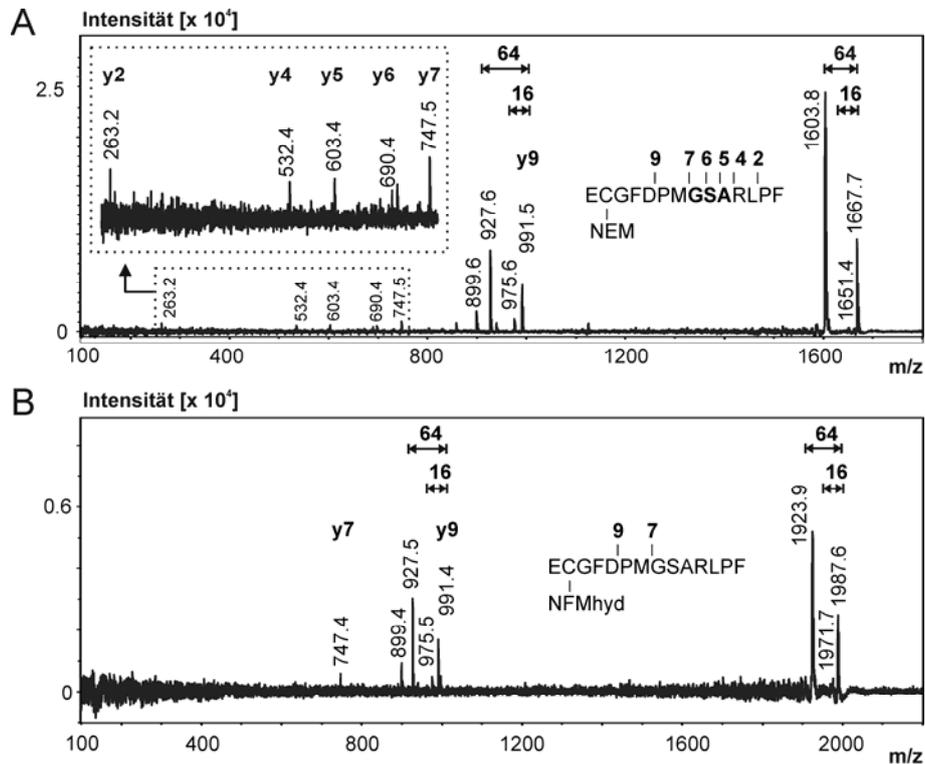


**Abb. 5.38 MS-Spektren des Chymotrypsinverdaus von ND3.** (A) Spot 2 (siehe Anhang, Tab. 9.4.40). (B) Spot 1 (siehe Anhang, Tab. 9.4.41). Signale, die chymotryptischen Fragmenten zugeordnet werden konnten, sind mit einem großen Punkt markiert. Signale, die nicht zugeordnet werden konnten, sind mit einem kleinen Punkt markiert. Nicht markierte Signale sind Hintergrundsignale (siehe Anhang, Tab. 9.4.42). Signale, die den modifizierten Fragmenten ECGFDPMGSARLPF bzw. SEKTSPYECGFDPMGSARLPF zuzuordnen sind, die in den Chymotrypsinverdaus von Spot 1 und 2 auftreten, sind mit einem Kasten markiert (siehe auch MS/MS-Experimente, Abb. 5.39).

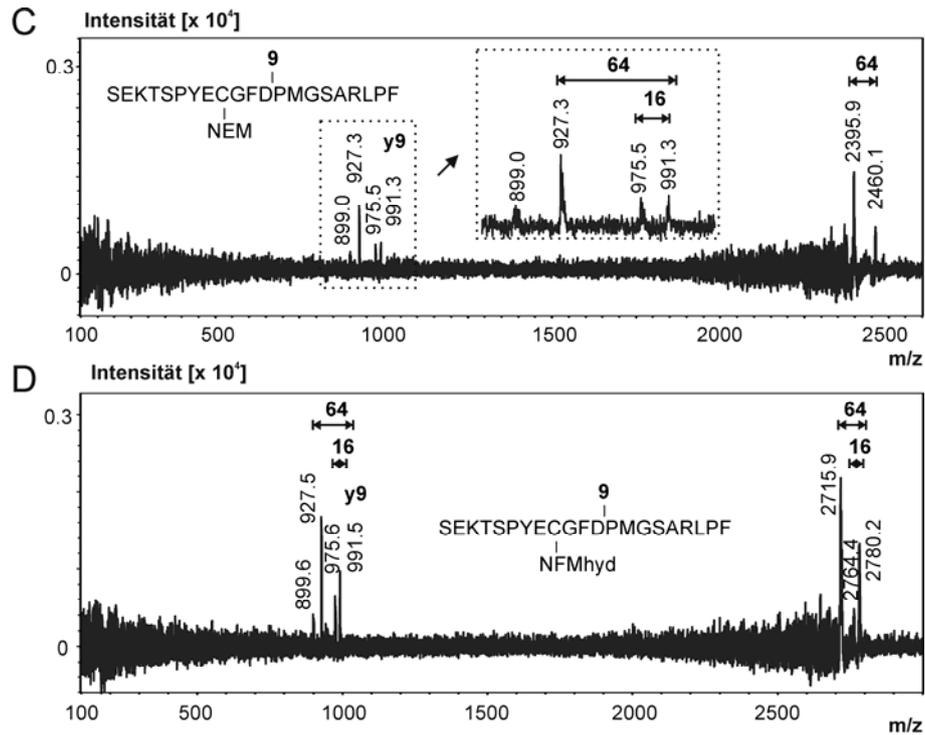
Beide Peptide finden sich auch im MS-Spektrum des Chymotrypsinverdaus von Spot 2 mit dem erwarteten Massenshift von - 320,02 Da wieder (1667,8 bzw. 2460,1 in Abb. 5.38A; Massengenauigkeit, siehe Anhang, Tab. 9.4.40). Hier ist ein Signaltuplett sichtbar (Signalzuordnung, siehe Tab. 9.4.40). Zusätzlich treten die ungelabelten, chymotryptischen Fragmente als schwache Signale auf. Außerdem sind im MS-Spektrum von Spot 1 noch zwei Signalaare sichtbar, die NFMhyd-gelabelten Peptiden von ND3 zugeordnet werden können, die an einer Seite an L, M, A, D, E geschnitten worden sind (ECGFDPM und SEKTSPYECGFDPM in Tab. 9.4.40). Zusätzlich findet sich noch ein NFMhyd-gelabeltes Fragment, das auf einer Seite unspezifisch gespalten worden ist (SEKTSPYECGFDPMG, Tab. 9.4.40). Im Verdau von Spot 2 konnten keine weiteren Signale gelabelten Fragmenten zugeordnet werden. Ungelabelte Peptide von ND3 sind in den Verdaus von Spot 1 und 2 kaum generiert worden (siehe Anhang, Tab. 9.4.40 und Tab. 9.4.41). Diese möglichen Fragmente könnten nur aus den Transmembranregionen generiert werden. Die zu erwartende schwierige Enzymzugänglichkeit zu Transmembranregionen, die schlechte Extrahierbarkeit von hydrophoben Peptiden aus einem 16%igen Gel und die Bevorzugung von Peptiden in MALDI, die eine basische Aminosäure enthalten, erklären die Abwesenheit bzw. geringe Intensität der Signale im MS-Spektrum für die übrigen Regionen der ND3-Sequenz.

MS/MS-Experimente von Signalen der gelabelten, am Methionin oxidierten Peptide ECGFDPMGSARLPF bzw. SEKTSPYECGFDPMGSARLPF (Abb. 5.39) belegen die Richtigkeit der *Biotoools*-Berechnungen für den Chymotrypsinverdau. Aus dem MS/MS-Spektrum von dem Signal 1667,8 (Abb. 5.39A, ECGFDPMGSARLPF, NEM gelabelt) lässt sich aus der kurzen  $y$ -Ionen-Serie die Sequenz GSA herauslesen (Abb. 5.39A). Außerdem muss das  $y_9$ -Ion als sehr intensives Signal im MS/MS-Spektrum auftreten, da Peptide C-terminal zur Aminosäure D und N-terminal zur Aminosäure P besonders gut in MS/MS-Experimenten brechen. Auch das trifft zu. Es ist sogar das  $y_9$ -Ion der unoxidierten Peptidsequenz sichtbar (Massenshift 16 Da), da es bei der Selektion des *Precursor* nicht vermeidbar war, dass auch ein geringer Anteil des reduzierten Peptides fragmentiert wird. Das Signal der unoxidierten Variante ist als Satellitenpeak des *Precursor* 1667,7 mit einem Massenshift von 16 Da erkennbar (Abb. 5.39A). Auch ist der Massenverlust von 64 Da beim *Precursor* und dem  $y_9$ -Ion deutlich zu sehen (Methansulfensäure,  $\text{CH}_3\text{SOH}$ ), der für methioninoxidierte Sequenzen charakteristisch ist (Schmidt *et al.*, 2006). Außer der  $y$ -Ionen-Serie findet sich im MS/MS-Spektrum des korrespondierenden Signals des NFMhyd-gelabelten Peptides bei 1987,8 alles wieder (Abb. 5.39B). Von der  $y$ -Ionen-Serie ist nur das  $y_7$ -Ion übrig geblieben. In den MS/MS-Spektren des Peptides

SEKTSPYECGFDPMG SARLPF (2460,1, Abb. 5.39C und 2780,2, Abb. 5.39D) ist nur noch das charakteristische Fragmentprofil im Massenbereich 900 – 1000 Da erkennbar, dass sich aus der Methioninoxidation, der Sollbruchstelle DP und dem 64 Da Massenverlust des *Precursor* ergibt.



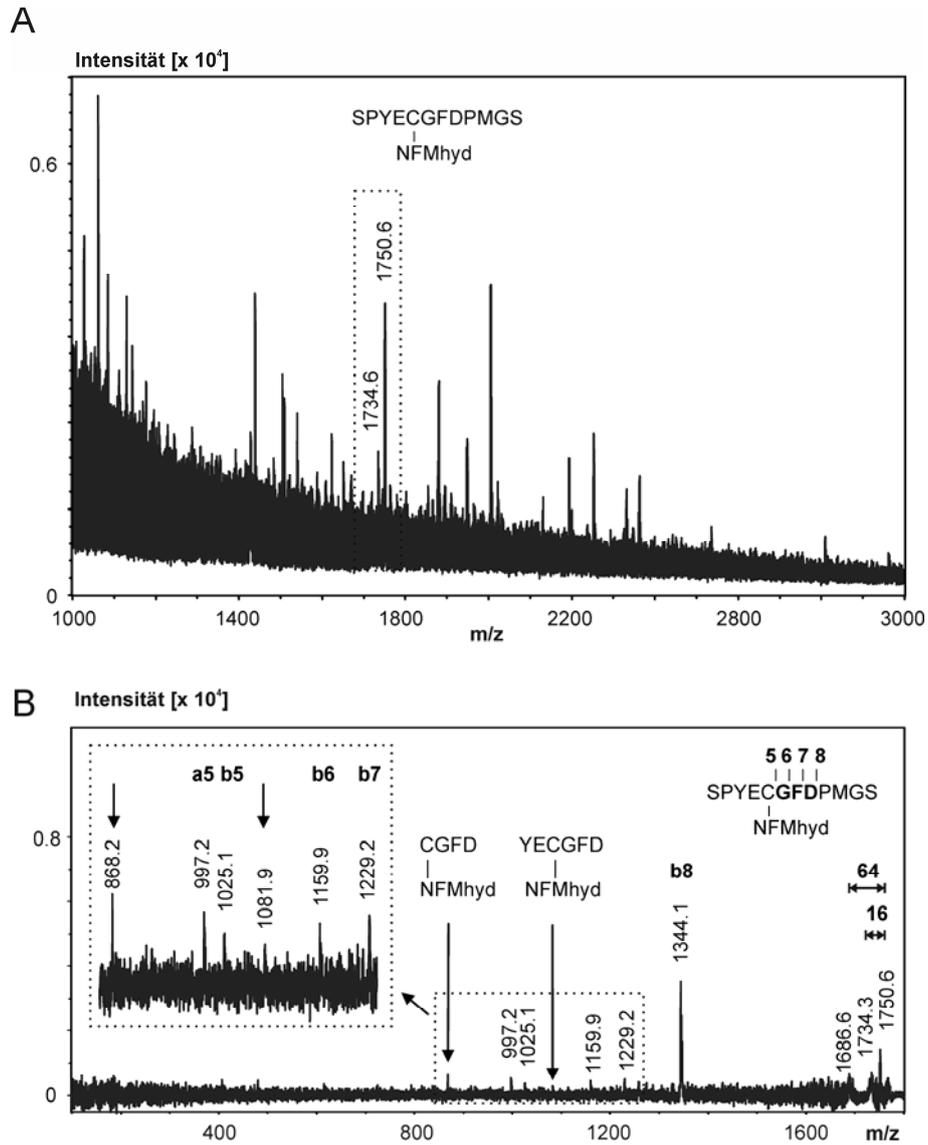
**Abb. 5.39 MS/MS-Experimente der Fragmente ECGFDPMGSARLPF und SEKTSPYECGFDPMG SARLPF (siehe Abb. 5.38). (A) Signal bei 1667,8 in Abb. 5.38A, ECGFDPMGSARLPF mit NEM modifiziert. (B) Signal bei 1987,8 in Abb. 5.38B, ECGFDPMGSARLPF mit NFMhyd modifiziert. (C) Signal bei 2460,1 in Abb. 5.38A, SEKTSPYECGFDPMG SARLPF mit NEM modifiziert (siehe nächste Seite). (D) Signal bei 2780,1 in Abb. 5.38B, SEKTSPYECGFDPMG SARLPF mit NFMhyd modifiziert (siehe nächste Seite). Vergrößerungen sind mit einem Kasten eingerahmt. Ein Methansulfensäureverlust von oxidiertem Methionin ist markiert (64 Da). Ebenso sind Verschiebungen um 16 Da hervorgehoben, die durch Fragmentation des unoxidierten *Precursor* (analog markiert, falls im MS/MS-Spektrum sichtbar) entstanden sind. In der Peptidsequenz sind die jeweiligen Positionen des Bruches, die als Fragmentsignale im MS/MS-Spektrum sichtbar sind, durch die Nummern ersichtlich. *Sequence tags*, die aus dem MS/MS-Spektrum ersichtlich sind, sind in der Peptidsequenz fett gedruckt.**



**Abb. 5.39 Fortsetzung.** Beschreibungen, siehe vorherige Seite.

Zur weiteren Verifizierung der Untereinheit ND3 ist Spot 1 mit Elastase verdaut worden. Elastase schneidet bevorzugt an den kleinen, hydrophoben Aminosäuren G, A, V, L, I, S, T (siehe Kapitel 5.4.1). Im MS-Spektrum war ein Signalpaar mit einem Massenshift von 16 Da enthalten, dass sich mit einer Massengenauigkeit von 15 ppm dem NFMhyd-gelabelten Fragment SPYECGFDPMG SARLPF zuordnen lässt (Abb. 5.40A). Das MS/MS-Experiment des Signals enthält eine kurze b-Ionen-Serie, der man die Sequenz GFD zuordnen kann (Abb. 5.40B). Außerdem sind zwei interne Fragmente enthalten, die noch den NFMhyd-Label tragen. Die Sollbruchstelle zwischen D und P ist als intensives b8-Ion sichtbar. Zusätzlich tritt auch der Massenverlust von 64 Da für den methioninoxidierten *Precursor* auf.

Zusammenfassend lässt sich aus den MS- und MS/MS-Daten eindeutig sagen, dass Spot 1 die Untereinheit ND3 enthält, die mit NFM gelabelt wurde. In Spot 2 lässt sich ebenfalls signifikant ND3 nachweisen, das mit NEM gelabelt wurde. Da nicht nur NFM-modifiziertes ND3, sondern auch NEM-modifiziertes ND3 im dSDS-Gel sichtbar war, hatte ein Anteil des Komplex I bereits beim Modifizieren mit NEM in der Konformation vorgelegen, in welche Komplex I eigentlich überführt werden sollte.



**Abb. 5.40 MS- und MS/MS-Daten des Elastaseverbaus von Spot 1.** (A) MS-Spektrum. Die beiden Signale, die dem NFMhyd-gelabelten Fragment SPYECGFDPMGS zugeordnet werden können, sind eingerahmt. (siehe auch Anhang, Abb. 9.4.43 un Abb. 9.4.44) (B) MS/MS-Spektrum zur Verifizierung der Zuordnung. Erklärungen, siehe Abb. 5.39.

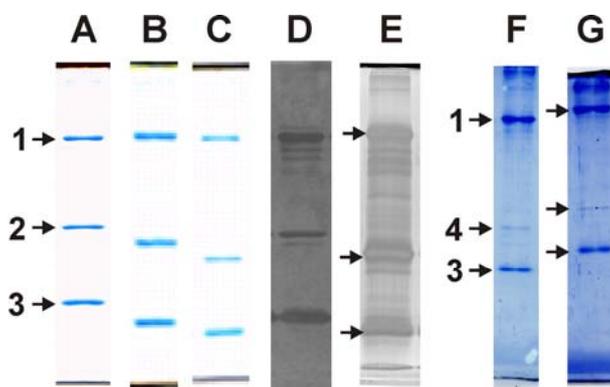
## 5.5 Ausblick

### 5.5.1 Polyacrylamidgele mit alternativen Quervernetzern

Aus den Ergebnissen von Kapitel 5.1.2, 5.4.2 und 5.4.7 ist offensichtlich, dass die Zugänglichkeit der Enzyme und die Effektivität der Extraktion nach dem Verdau bei Polyacrylamidgelen unbefriedigend ist. Um das Acrylamid während der Polymerisation quer zu vernetzen, wird ausschließlich der Quervernetzer  $N,N'$ -Methylenbisacrylamid (MBA) in der Proteomforschung eingesetzt. In der Vergangenheit wurden aber bereits Alternativen zu diesem Quervernetzer entwickelt, die aber im Laufe der Zeit vergessen wurden (Paus, 1971; O'Connell *et al.*, 1976; Tas *et al.*, 1979; Hames *et al.*, 1998).  $N,N'$ -(1,2-dihydroxyethylen)-bisacrylamid (DHEBA) bzw. Ethylendiacylat (EDA) sind von diesen Alternativen zwei sehr interessante Kandidaten, da sie durch Periodsäure ( $HIO_4$ ) bzw. im basischen Milieu gespalten werden können. Die Geldichte lässt sich so vor dem Verdau reduzieren. Die Hypothese, dass dadurch die Zugänglichkeit eines Enzyms zum Protein bzw. die Effektivität der Extraktion der enzymatischen Fragmente höher ist, sollte nachvollziehbar sein.

Die ersten Versuche demonstrierten aber, dass die Trennung bei den beiden alternativen Quervernetzern voraussichtlich etwas schlechter sein wird (Abb. 5.41A-E; Herstellung der Gele, siehe Kapitel 8.2.1.3). Die Gelbanden waren nach der Färbung etwas unschärfer als bei MBA-Polyacrylamidgelen. Die Porengröße war zwangsläufig aufgrund der chemischen Struktur der beiden Quervernetzer etwas größer, weshalb die Proteine deutlich weiter laufen. Beide Quervernetzer sind kompatibel mit einer Coomassiefärbung (siehe Kapitel 8.2.2.1). Die Silberfärbung ist problematischer, da ein relativ stark basisches Milieu nötig ist (siehe Kapitel 8.2.2.2). EDA-Polyacrylamidgele lösen sich rasch während des Entwickelns auf und sind daher nicht für Silberfärbungen geeignet. DHEBA-Polyacrylamidgele sind zwar stabil, färben sich aber sehr schnell an, was Überfärbung unvermeidbar macht (Abb. 5.41E). Die DHEBA- und EDA-Gele konnten vollständig aufgelöst werden. 10 mM Periodsäure spaltete den Quervernetzer DHEBA in ca. 1 h (Malaprade-Reaktion). Natriumhydroxidlösung (10 mM) bzw. Ammoniaklösung (6 M) lösten EDA-Gele innerhalb 1 h vollständig auf. Dabei entstand aufgrund der resultierenden Polyacrylamidfäden in beiden Fällen eine zähflüssige Lösung. Eine Strategie für die Abtrennung dieser hydratisierten Fäden konnte nicht gefunden werden. Ohne sie zu entfernen, ist aber eine massenspektrometrische Messung nicht möglich. Außerdem stören die nicht unerheblichen Mengen Ethylenglykol die Massenspektrometrie, die bei der basischen

Spaltung von EDA-Gelen entstehen. Bei DHEBA-Gelen könnte die unverbrauchte Periodsäure bzw. die bei der Malaprade-Reaktion entstehende Iodsäure ( $\text{HIO}_3$ ) ebenfalls Probleme in der Massenspektrometrie verursachen.



**Abb. 5.41 Polyacrylamidgele (14%) mit unterschiedlichen Quervernetzern.** (A)  $N,N'$ -Methylenbisacrylamid (MBA), Coomassiefärbung. (B) Ethylendiacylat (EDA), Coomassiefärbung. (C)  $N,N'$ -(1,2-dihydroxyethylen)-bisacrylamid (DHEBA), Coomassiefärbung. (D) MBA, Silberfärbung. (E) DHEBA, Silberfärbung. (F) MBA, Coomassiefärbung. (G) MBA/EDA, Coomassiefärbung. Modellproteine für Trennung: BSA, ca. 67 kDa (1), Carboanhydrase, ca. 29 kDa (2), Myoglobin, ca. 17 kDa (3), Bacteriorhodopsin, ca. 27 kDa (4). Details zur Anfertigung der Gele, siehe Kapitel 8.2.1.

Mischt man EDA mit MBA, wurde nur die Geldichte bei der Inkubation mit Natriumhydroxid- bzw. Ammoniaklösung verringert (siehe auch Kapitel 8.2.1.4). Die Zugänglichkeit des Enzyms zum Protein bzw. die Effektivität der Extraktion der enzymatischen Fragmente aus dem Gel sollte durch die verringerte Geldichte verbessert werden. Zwar entstehen jetzt die problemverursachenden Polyacrylamidfäden durch den gleichzeitigen Einsatz von EDA und MBA als Quervernetzer nicht mehr, das freigesetzte Ethylenglykol beeinträchtigt die Massenspektrometrie aber immer noch zu stark. Eine sinnvolle Strategie zur Entfernung dafür konnte noch nicht entwickelt werden. Deshalb konnten aussagekräftige massenspektrometrische Studien auch noch nicht verwirklicht werden, um die aufgestellte Hypothese zu bestätigen. Auch die Ermittlung vergleichbarer Porengrößen von MBA/EDA-Gelen zu den konventionellen MBA-Gelen wurde noch nicht angegangen. Diese sind natürlich dringend notwendig, um letztendlich ein vergleichbares Trennsystem zum etablierten MBA-Polyacrylamidsystem in der Hand zu haben. Die

Porendichte war bei der gewählten MBA- und EDA-Menge beispielsweise sichtbar höher als bei dem konventionellen MBA-Gel (Abb. 5.40F-G). Auch MBA/EDA-Gele sind wie EDA-Gele nur mit Coomassie anfärbbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die wenigen bisherigen Erkenntnisse darauf hindeuten, dass weiterführende Untersuchungen eine realistische Chance haben, ein Tor zu öffnen, das den enzymatischen Verdau im Gel verbessert.

### **5.5.2 Elastaseverdau der Membran von *Corynebacterium glutamicum***

Im Labor von Dr. Ansgar Poetsch (Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Ruhr-Universität Bochum) wurde bereits ein erster Versuch unternommen, der zeigte, dass die Strategie des Bacteriorhodopsinverdau (siehe Kapitel 5.4.6) auch bei der komplexen Membranfraktion von *Corynebacterium glutamicum* äußerst vielversprechend ist. Die aufgereinigten Membranen wurden zunächst mit Elastase "rasiert", um Reste von zytosolischen Proteinen und exponierte Domänen der Membranproteine zu entfernen. Danach erfolgte der Verdau der Membranen in 60%igen Methanol mit Elastase. Das komplexe Gemisch aus enzymatischen Fragmenten wurde danach mit einer nano-LC getrennt. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mit einer Orbitrap (siehe auch Kapitel 8.6.3).

Die identifizierten Proteine sollen an dieser Stelle nicht angegeben werden, da es sich nur um erste Versuche handelt und die Aufreinigung der Membran, der Verdau und die Messungen ausschließlich vom Kooperationspartner durchgeführt wurden. Eine sehr kurze Zusammenfassung soll an dieser Stelle nur eine Vorstellung von dem Potential geben, welches das Enzym Elastase für die Membranproteinanalytik hat. Insgesamt wurden 173 Proteine bei der Analyse der Membranfraktion identifiziert. Davon waren 44% integrale Membranproteine. Ungefähr 22% der integralen Membranproteine wurden durch Peptide nachgewiesen, die Transmembrandomänen zugewiesen werden konnten.

## 6. Diskussion

*Daß ich nicht mehr mit saurem Schweiß*

*Zu sagen brauche, was ich nicht weiß;*

*Daß ich erkenne, was die Welt*

*Im Innersten zusammenhält.* (aus Faust I, J.-W. v. Goethe)

Was die Welt „Membranproteomics“ im Innersten zusammenhält, kann hier natürlich nicht beantwortet werden. Die Seele für diese Erkenntnis aber an den Teufel zu verkaufen, wäre letztendlich auch etwas übertrieben. Deshalb werden die im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckten Erkenntnisbruchstücke im Folgenden kritisch beleuchtet, getreu dem aufgestellten Punkt 21 in den Schlussgedanken: Eine Dissertation kann den Menschen überlisten, sich der Wirklichkeit auszusetzen, aber nicht zwingen, ihr standzuhalten oder sie gar zu bewältigen.

### 6.1 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

Es konnte gezeigt werden, dass die Identifikation komplexassoziierter Proteine mit dafür optimierten Aufreinigungsprotokollen möglich ist. Die Prüfung, ob es sich bei den neuen Proteinen auch wirklich um komplexassoziierte handelt, ist am einfachsten zu bewältigen, wenn Antikörper gegen die neuen Proteine und eine native Trenntechnik wie BNE vorhanden sind. Denn es wird immer nur dann ein neues Protein mit Hilfe eines Antikörpers zusammen mit dem Komplex von Interesse im Blau-Nativen Gel an einem Ort detektiert, wenn das neue Protein wirklich an den Komplex gebunden ist. Andernfalls ist das Protein auch noch an anderen Positionen mit dem Antikörper nachweisbar. Für zwei kleine, hydrophobe Proteine, dem AGP- und MLQ-Protein, konnte so erstmalig belegt werden, dass sie mit der ATP-Synthase assoziiert sind. Natürlich können mit der hier verwendeten Methode nur permanent gebundene Proteine gefunden werden. Dynamische Protein-Protein-Interaktionen würden ein chemisches Quervernetzen in einer nativen Umgebung vor der Komplex- und Proteintrennung sowie der massenspektrometrischen Proteinanalyse erfordern. Das wäre zwar interessant, ist aber nicht Gegenstand dieser Arbeit gewesen.

Die vorangegangene massenspektrometrische Identifikation von extrem hydrophoben Proteinen und Proteinen kleiner als 10 kDa bei der Analyse von Komplex V war teilweise

eine Herausforderung, da bei solchen Proteinen die Anzahl der generierten tryptischen Fragmente, die im optimalen Bereich für eine massenspektrometrische Analyse bzw. Extraktion aus einem Gel liegen (ca. 1000 – 2500 Da), häufig niedrig ist. Eine Identifikation mittels PMF ist daher meistens sehr schwierig oder sogar unmöglich. MS/MS-Experimente können zwar immer noch einen signifikanten Nachweis gewährleisten, es besteht aber auch immer die Gefahr, dass die wenigen Signale bei der Auswahl der Vorläuferionen übersehen werden, insbesondere bei unvollständiger Abtrennung von anderen Proteinen (siehe weiter unten, MLQ-Protein). Noch schwieriger wird die Sache, wenn es sich um kleine, hydrophobe Proteine handelt, wie es beispielsweise für die bereits bekannte Untereinheit 8 (ATP8), aber auch für die beiden neu identifizierten Proteine, dem AGP- und MLQ-Protein, zutreffend ist. Für alle drei wird bei einem Molekulargewicht von 6 – 7 kDa eine Transmembranhelix vorhergesagt. Membranproteine wie die Untereinheit a bzw. ATP6 vom Komplex V, die bei einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa sechs Transmembranhelices enthält, entziehen sich meistens vollständig dem massenspektrometrischen Nachweis (siehe auch Anhang, Abb. 9.1.4).

Für diese hydrophobste Untereinheit der ATP-Synthase, der Untereinheit a bzw. ATP6, sind daher auch erwartungsgemäß keine Signale im MS-Spektrum detektiert worden, obwohl im optimalen Analysenbereich mehrere tryptische Fragmente theoretisch vorhergesagt werden. Das dichte 16%ige SDS-Gel hat aber vermutlich die Extraktion der generierten Peptide erschwert oder sogar verhindert. Solch ein Gel ist aber zwingend notwendig, um in dem Molekulargewichtsbereich unterhalb von 10 kDa, der hier vom Hauptinteresse gewesen ist, eine gute Proteintrennung zu realisieren. Auch lässt sich nicht beantworten, ob die Untereinheit a für Enzyme überhaupt noch zugänglich war. Die verschiedenen sichtbaren Aggregationszustände der ATP6 auf dem Gel lassen aber zusammen mit der dichten Gelmatrix Schwierigkeiten in dieser Richtung nicht unwahrscheinlich erscheinen. Als eine weitere Bestätigung für die schlechte Zugänglichkeit für Enzyme und Probleme bei der Extraktion aus dem Gel lässt sich auch der tryptische Verdau der kleineren, sehr hydrophoben Untereinheit c (ATP9) anführen, der nur ein wirklich gut extrahierbares Peptid ergeben hat. Ein MS/MS-Experiment hat das Peptid in diesem Fall aber hochsignifikant der Untereinheit c zugeordnet (siehe Anhang, Tab. 9.2.2 und Abb. 9.1.10-9.1.11).

Die beiden neuen Proteine, das AGP- und MLQ-Protein, sind aber nicht nur hydrophob, sondern auch kleiner als 7 kDa. Kleine Proteine enthalten, wie bereits oben angedeutet, meistens auch dann nur eine niedrige Anzahl an theoretisch möglichen

tryptischen Spaltstellen, wenn sie hydrophil sind. Dazu kommt zusätzlich noch erschwerend hinzu, dass sie in einer Proteindatenbank oft nicht oder falsch annotiert sind. Für diese Arbeit ist aber die problematischere Suche gegen eine DNA-Datenbank nicht nötig gewesen, da die beiden neuen Proteine bereits richtig in der NCBI-Datenbank eingetragen worden waren. Es hat sich aber herausgestellt, dass die eingesetzte multidimensionale gelelektrophoretische Trennung der Proteine von Komplex V entscheidend dafür ist, eine eindeutige Datenbanksuche mit den massenspektrometrischen Daten hinsichtlich der neuen assoziierten Proteine zu gewährleisten, da selbst kleinste Verunreinigungen im niedrigen Molekulargewichtsbereich häufig signifikante Proteinnachweise für eine angefarbte Positionen verhindern. Das AGP-Protein konnte so schon bereits mittels PMF identifiziert werden, da es sauber in der dSDS-PAGE abgetrennt worden ist. MS/MS-Experimente haben die Zuordnung eindeutig bestätigt. Das MLQ-Protein läuft mit der Untereinheit 8 der ATP Synthase, auch ATP8 oder A6L Untereinheit genannt, zu einem Punkt auf dem Gel. Eine signifikante Identifikation aus dem Proteingemisch ist erst mit MS/MS-Experimenten möglich gewesen. Ohne die Hinweise aus der Edman-Sequenzierung, die natürlich viel größere Mengen an ATP-Synthase benötigt hat, wäre diese neue Untereinheit vielleicht dem massenspektrometrischen Nachweis entgangen. Die Edman-Sequenzierung sollte deshalb in Zeiten von MALDI- und ESI-MS nicht vergessen und immer dann eingesetzt werden, falls die Proteinmengen es zulassen.

Ob eine Kombination der eingesetzten zweidimensionalen Blau-Nativen Gelelektrophorese mit einer nachfolgenden Auftrennung des tryptischen Verdau in einer dritten Dimension mittels nano-HPLC besser gewesen wäre, ist nicht überprüft worden. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von BN-dSDS-PAGE (Rais, 2005) bei der Analyse von Komplex I, III, IV und V mit denen von Fandiño *et al.* (2005), die eindimensionale Blau-Native Gelelektrophorese und nano-LC koppelt, lässt aber keine allzu großen Unterschiede erwarten. Der Einsatz des weniger spezifischen Enzymes Elastase in Kombination mit der Trennmethode von Fandiño hätte aber hinsichtlich der neu gewonnenen Erkenntnisse in dieser Arbeit zu interessanten Ergebnissen führen können (siehe Kapitel 5.4.6 und 5.5.2). Eine massenspektrometrische Analyse der kleinen Untereinheiten nach einer Trennung der intakten Proteine von Komplex V mittels HPLC ist sicherlich auch eine ernsthafte Option in jüngster Zeit geworden. Eine vor kurzem veröffentlichte Strategie, die organische Lösungsmittelextrakte von Rinderherzmitochondrien nach Trennung mittels HILIC (*hydrophilic liquid interaction chromatography*) mit ESI-MS analysiert, lässt dies vermuten (Carrol *et al.*, 2006).

Vor allem für die Charakterisierung möglicher posttranslationaler Modifikationen der beiden neu identifizierten Proteine wird am ehesten der kombinierte Einsatz verschiedenster Techniken erfolgversprechend sein. Denn NetPhos ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) sagt zwei Phosphorylierungen für das AGP-Protein und eine für das MLQ-Protein voraus. Diese Vorhersage konnte aber massenspektrometrisch noch nicht bestätigt werden. Der Nachweis von posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen an solch kleinen, hydrophoben Proteinen muss aber als eine erhebliche zusätzliche Herausforderung eingeordnet werden, die hier nicht gezielt angegangen worden ist. Ohne vorherige bessere Kenntnisse über die Funktion der beiden neuen Proteine ist die aufwendige Überprüfung der Vorhersagen zunächst auch als weniger wichtig zu beurteilen. Dem AGP- bzw. DAPIT-Protein (Paivarinne *et al.*, 2001) und dem MLQ-Protein bzw. 6.8 kDa proteolipid (Terzi *et al.*, 1990) kann daher bei vorsichtiger Beurteilung der Datenlage erst einmal keine posttranslationale Modifikation zugesprochen werden. Reversible metabolische Phosphorylierung lässt sich aber nicht ausschließen.

Eine gründliche Analyse der Untereinheiten hat bis jetzt nur für die monomere, aber nicht für die dimere ATP-Synthase vorgelegen. Nur über die dimere Form der ATP-Synthase von *Saccharomyces cerevisiae* ist bekannt, dass sie die drei Dimer-spezifischen Untereinheiten e, g und k enthält. Bei Säugetieren ist jedoch gewiss, dass die homologen Untereinheiten fest an die monomere Form gebunden sind. Daher muss nur die Untereinheit k von Hefe hinsichtlich einer möglichen Homologie zu den zwei neu identifizierten ATP-Synthase assoziierten Proteinen bei Säugetieren überprüft werden. Eine WU-BLAST2-Suche gegen das Hefegenom mit einer orthologen Insektensequenz zum AGP-Protein der Ratte hat ergeben, dass eine geringe Ähnlichkeit vom AGP-Protein zur Untereinheit k vorhanden ist (12% Identität, 19% Ähnlichkeit). Der Vergleich der theoretischen Analyse der Sekundärstruktur vom AGP-Protein und der Hefeuntereinheit k resultiert aber in einer verschobenen Transmembranhelix. Ein Zufallstreffer bei der Homologiesuche ist also auch nicht auszuschließen. Zum MLQ-Protein ist letztendlich noch nicht einmal der Hinweis auf eine Ähnlichkeit zu bekannten Untereinheiten bzw. assoziierten Proteinen des Komplex V nachgewiesen worden. Über die Funktion des AGP-Protein und besonders des MLQ-Proteins lässt sich daher im Folgenden nur spekulieren. Aber selbst eine eindeutig nachgewiesene Homologie des AGP-Proteins zur Untereinheit k wäre für die Aufklärung der funktionellen Rolle des Säugetier-AGP-Proteins nicht hilfreich, da die Deletion der Untereinheit k den Phänotyp von Hefe nicht verändert (Arnold *et al.*, 1998). Wie lassen sich also die beiden neu

entdeckten, Komplex V assoziierten Proteine in das aktuelle Bild der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase einfügen?

Wie bereits in Kapitel 3.2.3 erwähnt, ist die mitochondriale ATP-Synthase bereits als Monomer, Dimer und in höheren oligomeren Zuständen mittels Chromatographie, Dichtegradientenzentrifugation und nativer Elektrophorese isoliert worden (Schägger *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2005; Wittig *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 1998; Wittig *et al.*, 2006c; Paumard *et al.*, 2002a; Paumard *et al.*, 2002b; Gavin *et al.*, 2005; Van Lis *et al.*, 2003; Everard-Gigot *et al.*, 2005; Dienhart *et al.*, 2002; Dudinka *et al.*, 2005; Dudinka *et al.*, 2006; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005; Fronzes *et al.*, 2006). Der dimere Zustand scheint dabei mit der Morphologie der Innenmembran der Mitochondrien (sog. Cristae-Typ; Crista (lat.) = Kamm) und dem Stoffwechszustand der Zelle direkt zusammen zu hängen, da die Deletion einer der Dimer-spezifischen Hefeuntereinheiten e und g schwerwiegende Änderungen in der Innenmembran bewirken (Paumard *et al.*, 2002a). Zudem ist beobachtet worden, dass besonders die Hefeuntereinheiten b, i und h (Paumard *et al.*, 2002b; Fronzes *et al.*, 2006) in die Vernetzung zweier benachbarter ATP-Synthasen involviert sind. Daraus resultiert ein Modellvorschlag in der Literatur, der von zwei Kopplungszuständen zwischen monomeren ATP-Synthasen ausgeht. Der eine stabilisiert das anfängliche Dimer, der andere ist für die Oligomerisierung des Eingangsdimers zuständig (Fronzes *et al.*, 2006). Das Modell wird weiterhin von elektronenmikroskopischen Untersuchungen der dimeren Form der Hefe-ATP-Synthase gestützt, die zwei unterschiedliche Winkel zwischen den Monomeren der dimeren Form identifiziert haben (Dudkina *et al.*, 2006).

Das lässt sich auch gut mit älteren elektronenmikroskopischen Daten von Allen (Allen *et al.*, 1989; Allen, 1995) in Einklang bringen, die Doppelreihen der ATP-Synthase zeigen, welche sich als Helix um die Einstülpungen der Innenmembran der Mitochondrien von *Paramecium multimicronucleatum* winden. Daher ist es verführerisch zu spekulieren, dass nicht die Dimerisierung sondern die weitere Oligomerisierung der dimeren ATP-Synthase mit der Morphologie der Innenmembran und dem Stoffwechszustand der Zelle direkt in Beziehung steht (Wittig *et al.*, 2006c; Allen, 1995). Kürzlich konnte auch die dimere ATP-Synthase von Rinderherzmitochondrien elektronenmikroskopisch charakterisiert werden (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005). Eine Diskussion über potentielle Proteine in der dimeren Struktur, welche die anfängliche Monomer-Monomer- oder die Dimer-Dimer-Kopplung in der oligomeren ATP-Synthase-Doppelreihe stabilisieren, ist dort aufgrund der unvollständigen Liste der ATP-Synthase-Zusammensetzung aber nur begrenzt möglich gewesen. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die dort analysierte dimere ATP-Synthase

auch das AGP- und MLQ-Protein enthalten hat, da die Präparation mit einem wesentlich milderen nativen Gelelektrophoreseprotokoll ohne Einsatz von Coomassie erfolgt ist.

Es ist in dieser Arbeit aber auch gezeigt worden, dass die beiden neuen Proteine keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität von Komplex V haben. Um generelle Effekte auf den metabolischen Zustand der Zelle auszuüben, ist dies aber auch nicht zwingend notwendig. Die Beteiligung der AGP- und MLQ-Proteine an der strukturellen Organisation der ATP-Synthase in den Mitochondrien könnten diese regulatorisch metabolischen Funktionen bedingen. Sehr neue Erkenntnisse von Hoppel (Hoppel *et al.*, 2006) zeigen, dass die Einstülpungen von der Innenmembran der Mitochondrien sich zusammen mit dem Wechsel vom aktiven (Zustand 3) zum inaktiven (Zustand 4) metabolischen Zustand der Mitochondrien schnell ändern. Mit der Annahme, wie von Allen erstmals aufgrund seiner elektronenmikroskopischen Daten vorgeschlagen (Allen, 1995), dass die Innenmembranfaltung der Mitochondrien direkt von der Assoziation dimerer ATP-Synthase zu helikalen Strukturen abhängig ist, steht der metabolische Zustand der Zelle mit dem oligomeren Zustand der ATP-Synthase in enger Beziehung. Das AGP- und MLQ-Protein würden somit durch einen Beitrag bei der Oligomerisierung der ATP-Synthase den metabolischen Zellzustand modulieren. Diese potenzielle Rolle des AGP- und/oder MLQ-Proteins muss natürlich erst noch durch weitere Studien bestätigt werden. Hierfür wäre zunächst eine Trennung von oligomerer ATP-Synthase unter aktiven und inaktiven metabolischen Bedingungen der Mitochondrien mittels nativer Gelelektrophorese nötig. Danach könnten die neuen Proteine mittels *electron microscopic single particle analysis* von antikörpermarkierter oligomerer ATP-Synthase in der dimeren und oligomeren ATP-Synthase lokalisiert werden. Nach Ausschalten der neuen Proteine durch post-transkriptionelles Gen-Silencing (engl. *RNA silencing*) müssten dann noch vergleichende Studien folgen.

Alternative Namen der Datenbanken für das AGP-Protein, die bereits auf die diskutierte Funktion hinweisen, sind: *usmg5 protein (up-regulated during skeletal muscle growth protein 5)* und *DAPIT protein (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue)*. Eine Hochregulation als Antwort auf Muskeldehnung und die Herunterregulierung von DAPIT in insulinempfindlichem Rattengewebe nach einem mit Streptozotocin induzierten Diabetes lassen eine Rolle im Energiemetabolismus der Zellen, im Glukosemetabolismus und/oder in der oxidativen Phosphorylierung sehr sinnvoll erscheinen.

## 6.2 Neu entdecktes bakterielles Cytochrom *c* mit unkonventionell gebundenen Häm

Es konnte für ein neues bakterielles Multihäm *c*-Typ Cytochrom (MccA) massenspektrometrisch gezeigt werden, dass es auf eine unkonventionelle Weise Häm bindet. Eine der acht Häm-Gruppen wird von zwei Cysteinen gebunden, die Teil der Sequenz CX<sub>15</sub>CH bzw. CX<sub>17</sub>CH (X repräsentiert eine beliebige Aminosäure) von verschiedensten MccA Proteinen ist (Abb. 9.3.1). Allerdings wäre für eine vollständige massenspektrometrische Charakterisierung 100% Sequenzabdeckung nötig gewesen. Zwei konventionelle Häm *c*-Bindemotive konnten deshalb nicht massenspektrometrisch identifiziert werden. Außerdem konnten nicht alle anderen Cysteine der Proteinsequenz, die nicht einem konventionellen Häm *c*-Bindemotiv zuzuordnen sind, als Trypsinfragmente im MS-Spektrum identifiziert werden (MALDI-TOF). Ein Cystein konnte aber als potentielle Bindungsstelle ausgeschlossen werden, da es nicht in den MccA-Sequenzen der verschiedenen Spezies konserviert vorliegt (Abb. 9.3.1). Es ist als reiner Glücksfall zu bezeichnen, dass um das neue Häm *c*-Bindemotiv CX<sub>15</sub>CH bzw. CX<sub>17</sub>CH genügend Schnittstellen für Trypsin (K, R) vorhanden waren. Somit wurde eine ausreichende Anzahl von Häm-modifizierten Fragmenten generiert. Ein hochspezifisches Enzym ist in diesem Fall aber nötig gewesen, um auf eine einfache Art und Weise eine signifikante Zuordnung der Signale zu den Häm-modifizierten Peptiden aus dem MS-Spektrum bei einer Massengenauigkeit von 50 ppm zu ermöglichen. Aufgrund der Isotopenverteilung der Häm-Signale und deren teilweise deutlich geringeren Intensität war eine höhere Massengenauigkeit aber nicht erreichbar. Und in den MS/MS-Spektren der Häm-Signale war erwartungsgemäß nur der Häm-Verlust als intensives Signal sichtbar (MALDI TOF/TOF). Zusammengenommen war die Zuordnung der Peptidsequenz zu einem Signal aber signifikant eindeutig, abgesehen von dem Signal bei 2526 (m/z; z = 1; Tab. 9.3.2A und B). Der zusätzliche Einsatz weniger spezifischer Enzyme wie Chymotrypsin und Elastase könnte die erwähnten Lücken wahrscheinlich füllen (siehe Kapitel 5.4). In den MS-Spektren von Verdauung weniger spezifischer Enzyme müsste die Massengenauigkeit für eine signifikante Signalzuordnung aber wesentlich höher sein (siehe auch Kapitel 5.4.3). Auch muss man beachten, dass eine Spezifität nur zu ca. 70% vorhanden ist (siehe auch Kapitel 5.4.1). Signale von unspezifischen Schnitten müsste man daher mittels MS/MS-Experimenten zuordnen. Für Häm-modifizierte Peptide wird dies schwierig, da die MS/MS-Experimente keine Sequenzinformation enthalten. MS<sup>3</sup>-Experimente von der Peptidkette nach dem Häm-Verlust in einer Ionenfalle könnten aber zu Sequenzinformation führen. Auch mit ETD-Experimenten

in einer Ionenfalle als Fragmentierungstechnologie könnte man dies erreichen, da zu erwarten ist, dass die Häm-Gruppe während der Fragmentierung an der Peptidkette gebunden bleibt. Bei Phosphorylierung der Aminosäure S und T, die ebenfalls ein intensives Signal für den Phosphatverlust bei PSD und CID im MS/MS-Spektrum zeigt, verbleibt bei ETD die Phosphatgruppe jedenfalls während der Fragmentierung an der Peptidkette (siehe auch Kapitel 2.2.5). Allerdings wäre jetzt auch die Entfernung des Puffers und der Salze des Verdauers nötig, da ESI zwingend notwendig ist. Dabei ist zu erwarten, dass einige Häm-modifizierte Verdaufragmente verloren gehen. Da die Fragestellung nach dem neuen Häm *c*-Bindemotiv aber durch die gute Sequenzabdeckung des Trypsinverdauers für dieses Protein eindeutig beantwortet werden konnte, sind solche Experimente nicht nötig gewesen. Man muss sich aber bewusst sein, dass ein besseres Verständnis der weniger spezifischen Enzyme nötig ist, um passende Alternativen zu haben, wenn Trypsin einmal nicht die gewünschte Fragestellung beantworten kann (siehe auch Kapitel 5.4.7). Ein ausreichendes Wissen, um weniger spezifische Enzyme standardmäßig wie Trypsin anzuwenden, ist bis jetzt aber noch nicht vorhanden.

Für die Molekularbiologie und Bioinformatik führt das massenspektrometrische Ergebnis, dass es nicht nur die Häm *c*-Bindemotive CX<sub>2-4</sub>CH und CXXCK, sondern auch Häm *c*-Bindemotive der Form CX<sub>n</sub>CH gibt, insbesondere zu der schwierigen Aufgabe, die Korrelation von neuen *c*-Typ Cytochromen wie MccA und den zugehörigen CCHLs (*cytochrome c haem lyase*) aufzudecken (siehe auch Kapitel 5.2.1). Ist beispielsweise die in der Gruppe von Dr. Jörg Simon neu entdeckte CCHL von MccA wirklich substratspezifisch zu dem Häm *c*-Bindemotiv CX<sub>15</sub>CH bzw. CX<sub>17</sub>CH? Problematisch bei der Beantwortung dieser Frage ist, dass alle bekannten CCHLs analog zu dem neu entdeckten CCHL von MccA bis jetzt immer nur als Gen identifiziert wurden. Deshalb ist auch kein Reaktionsmechanismus für CCHL in der Literatur zu finden und es gibt bis jetzt keine Aufreinigung einer CCHL, die in der Literatur beschrieben wurde.

Neben diesen Herausforderungen für die Molekularbiologie sollte man die computerbasierte Vorhersage von *c*-Typ Cytochromen überdenken. Wenn man einmal annimmt, dass eine spezifische CCHL für die Bindung von Häm an das häufigste Motiv CXXCH in einem Bakterium verantwortlich ist, sollten viele CCHL-Gene in bakteriellen Genomen auf unkonventionelle Häm *c*-Bindemotive hinweisen. Besonders ORFs (*open reading frames*), die Proteine mit Signalsequenzen für ihre Sekretion kodieren und in der Nachbarschaft von möglichen CCHL-Genen sind, was beides für das untersuchte bakterielle

Multihäm *c*-Typ Cytochrom zutrifft, sollten deshalb bei Genomanalysen von Bakterien besonders hinsichtlich neuer theoretischer Häm *c*-Bindemotive untersucht werden.

### 6.3 Detergenzien

Bei der Charakterisierung des bakteriellen Cytochrom *c* konnte gezeigt werden, wie wertvoll die Kenntnis der genauen Proteinmasse für die Charakterisierung von Proteinen ist (siehe Kapitel 5.2.2). Nur so wurde schnell erkannt, dass das Protein mit acht Häm-Gruppen modifiziert ist. Bei der Massenbestimmung von Membranproteinen ist es natürlich sinnvoll, möglichst direkt die Lösung zu verwenden, in der das Membranprotein nach der Isolation vorliegt, da es in dieser am besten stabilisiert ist. Der Einsatz von Detergenzien ist für diese Stabilisierung aber unerlässlich. Die Untersuchungen hinsichtlich der Kompatibilität von Detergenzien mit MALDI und ESI sind deshalb natürlich in der Literatur schon vorhanden (siehe Kapitel 3.2.1).

Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen aber in einigen Punkten den bisherigen Aussagen über Detergenzien hinsichtlich ihrer Eignung für MALDI und ESI. Für ESI kompatible Detergenzien zu finden, wird aufgrund der Experimente in dieser Arbeit als sehr unwahrscheinlich beurteilt, auch wenn die bisher umfangreichsten Untersuchungen von Loo zu einem anderen Ergebnis kommen (Loo *et al.*, 1994). Denn aufgrund der Oberflächenaktivität sind Detergenzien bei ESI immer bevorzugt (siehe auch Kapitel 2.1.2). Erst wenn sich die Proteinkonzentration der Detergenzkonzentration annähert, werden die unterschiedlichen Ladungszustände des Proteins deutlicher als die Detergenzsignale sichtbar. Da solche Konzentrationsverhältnisse in der Realität selten vorkommen, ist ESI für reale Fragestellungen eher nicht geeignet. Außerdem muss man berücksichtigen, dass ESI in der Wahl der Pufferzusammensetzung aufgrund der höheren Salzempfindlichkeit mehr limitiert ist (Juraschek *et al.*, 1999).

MALDI ist im Vergleich zu ESI nicht nur bei Puffern und Salzen (Kallweit *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1998) wesentlich toleranter, sondern auch gegenüber bestimmten Detergenzien. Das Ergebnis der MALDI-Experimente, dass nicht-ionische Detergenzien meistens gut mit MALDI kompatibel, aber anionische, kationische oder zwitterionische Tenside kritisch sind, ist dabei nichts Neues (Cadene *et al.*, 2000; Rosinke *et al.*, 1995; Vorm *et al.*, 1993). Trotzdem konnte hier deutlicher als bisher in der Literatur gezeigt werden, dass mit DHBs und den richtigen Instrumenteneinstellungen (Bahr *et al.*, 1997) auch mit ionischen

Detergenzien wie CHAPS oder Zwittergent 3-16 MALDI-Spektren von vergleichbarer Qualität möglich sind. Nicht-ionische Detergenzien wie Dodecylmaltosid sind aber natürlich erste Wahl.

Prinzipiell führt aber jeder Detergenzieneinsatz unabhängig von der chemischen Struktur des Tensides zu ungünstigeren Kristallisationsbedingungen. Es liegt also nahe, wie bei ESI die Oberflächenaktivität von Tensiden für den negativen Einfluss auf MALDI verantwortlich zu machen. Dann müssten aber nicht-ionische Detergenzien, welche die Oberflächenspannung immer stärker als ionische Detergenzien reduzieren, auch schlechtere Ergebnisse produzieren (Kaufmann *et al.*, 2006). Decylmaltosid verringert die Oberflächenspannung beispielsweise stärker als CHAPS und SDS. Trotzdem stören ionische Tenside wie CHAPS und SDS die Kristallisation stärker. Die Spreitung der Probenlösung hat also nur einen geringen Einfluss auf die Kristallisationsbedingungen. Sie führt aber natürlich zu einem Empfindlichkeitsverlust, da sich die Probe zwangsläufig über eine größere Spotfläche verteilt. Wegen den sehr geringen Lösungsmittelvolumina bei der Kristallisation scheint sich aber die stärkere Reduktion der Oberflächenspannung bei nicht-ionischen Detergenzien nicht besonders negativ auszuwirken. Die Herabsetzung der Oberflächenspannung stört den Kristallisationsprozess also nur am Rande.

Vielleicht liefert die Beobachtung, dass Interaktionen zwischen Proteinen und ionischen Detergenzien eher MALDI überstehen, einen plausiblen Hinweis dafür, dass nicht-ionische Detergenzien den Kristallisationsprozess vergleichsweise weniger beeinflussen. Da der MALDI-Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, lässt sich natürlich an dieser Stelle nur spekulieren (siehe Kapitel 2.1.1). Die Tenside konkurrieren selbstverständlich mit dem Analyt um den Einbau in die Kristalle. Die elektrostatischen Wechselwirkungen von ionischen Tensiden könnten dabei für eine effektivere Verdrängung des Analyt als die vergleichsweise schwachen Van-der-Waals-Kräfte von nicht-ionischen Tensiden führen, da sich stabile Ionenpaare zwischen Matrix und ionischen Tensid ausbilden können. Auch könnte es dadurch zu einer effektiveren gegenseitigen Abschirmung der Matrixmoleküle durch ionische Detergenzien bei bereits geringerer Tensidkonzentration kommen, wodurch die Kristallisation erheblich beeinflusst wäre. Das die Wechselwirkungen von ionischen Tensiden stärker sind als von nicht-ionischen, lässt sich durch sichtbare Protein-Detergenzinteraktionen im MALDI-Spektrum vermuten. Werden die Tensidkonzentrationen jedoch zu hoch, ist eine ausreichende Kristallisation grundsätzlich nicht möglich. Der Detergenzientyp ist dann nicht mehr entscheidend. Die Situation verhält sich hier ähnlich wie bei Salzen.

Als ungeeignet sind Detergenzien daher immer dann zu beurteilen, wenn die CMC zu hoch ist, da das Detergenz zunehmend den Analyt bei der Inkorporation in die Matrixkristalle zu verdrängen scheint. Falls ein ionisches Detergenz als Lösungsvermittler unvermeidbar ist, kann aber meistens immer auf einen Kandidaten mit sehr ähnlicher chemischer Struktur und vergleichbaren Solubilisierungseigenschaften zurückgegriffen werden, der eine wesentlich geringere CMC hat (z. B. die Zwittergenz-Reihe). Eine möglichst niedrige CMC gewährleistet dann meistens auch eine ausreichend gute Kristallisation. Die Signalverbreiterung durch die höhere Wahrscheinlichkeit von Protein-Detergenz-Interaktionen ist natürlich ein Nachteil. Da diese selbst bei löslichen Proteinen wie Carboanhydrase und Cytochrom *c* auftreten, sind für Membranproteine natürlich vermehrte Interaktionen zu erwarten. Interessant sind die Ergebnisse auch hinsichtlich der Bindungsstärke der Detergenzien an Proteine. Wenn die nicht-kovalenten Wechselwirkungen von Detergenzien im MALDI-Spektrum noch sichtbar sind, besitzen sie wahrscheinlich eine erhebliche Stabilität. Daher lässt sich insbesondere auf die Zugänglichkeit von detergenzmaskierten Proteinregionen nichts Gutes für die nötige Enzymzugänglichkeit bei der *bottom up* Strategie erwarten. Da die Lipide von biologischen Membranen Detergenzien natürlich ähnlich sind, gilt dies auch für die Untersuchung von Proteinen aus Membranfraktionen. Auch die Möglichkeit der Detergenzienanlagerung an Peptide, wie es für Angiotensin I gezeigt worden ist, und die sichtbaren Detergenzienoligomere im MALDI-Spektrum könnten die Spektreninterpretation bei der *bottom up* Strategie zusätzlich erschweren. Auch ist es eher unwahrscheinlich, dass durch eine Reinigung des generierten Peptidgemisches mit beispielsweise RP- oder SCX-Chromatographie das Detergenz vollständig zu entfernen ist. Ein Verlust von bestimmten Peptiden ist aufgrund der gesehenen Detergenzieninteraktionen bei jeder Aufreinigungsstrategie ebenfalls nicht unwahrscheinlich.

### 6.4 Weniger spezifische Enzyme

Das Ziel, mit weniger spezifischen Enzymen bei Membranproteinen eine höhere Sequenzabdeckung zu erreichen, kann mit den bisherigen Experimenten nur als bedingt erfolgreich beurteilt werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass weniger spezifische Enzyme eine wertvolle Alternative zu Trypsin sind und dass deren Einsatz bei der Analyse von Membranproteinen zu besseren Ergebnissen führen kann (z. B. Kapitel 5.4.6 und 5.4.7). Ob die Reproduzierbarkeit bei weniger spezifischen Enzymen gegeben ist, kann man

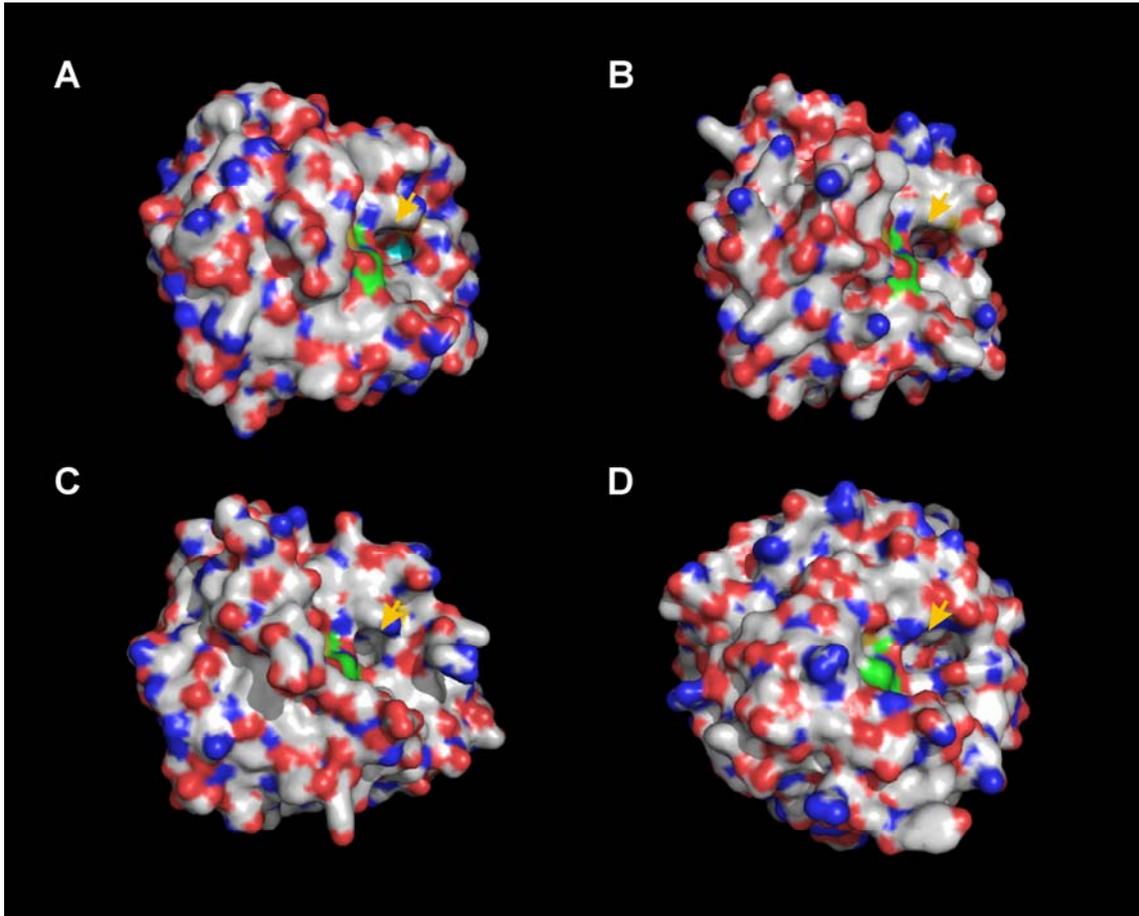
aufgrund der Ergebnisse in dieser Arbeit aber sicherlich auch kritisch hinterfragen (siehe Kapitel 5.4.2). Nur vier bzw. drei Modellproteine zur Überprüfung der Enzymspezifität von Chymotrypsin, Pepsin, Elastase und Proteinase K bzw. zur Verifizierung der Reproduzierbarkeit des jeweiligen Enzyms zu untersuchen, scheint zunächst wenig aussagekräftig. Auch die geringe Anzahl der MS/MS-Experimente für die Festlegung der Enzymspezifität ist ein nicht zu leugnender Kritikpunkt (siehe Kapitel 5.4.1). Trotzdem sind die erhaltenen Daten mehr als nur ein Trend.

Für Chymotrypsin ist bekannt, dass es relativ spezifisch an aromatischen Aminosäuren schneidet (Blow, 1971; Kamp, 1986). Das lässt sich ohne Zweifel durch die Verdauung der vier Modellproteine bestätigen (siehe Kapitel 5.4.1). Wie glaubhaft allerdings die geringere Spezifität für L, M, A, D und E bei längeren Verdauungszeiten ist, die in der Literatur auch angegeben wird, könnte nur durch die massenspektrometrische Analyse einer wesentlich höheren Anzahl von Modellproteinen bestätigt werden. Auch wäre hierfür eine große Anzahl an MS/MS-Experimenten nötig, die eine hohe Qualität (d. h. klare y- oder b-Ionenserien) aufweisen. Zusätzlich wäre eine automatische Datenaufnahme der MS/MS-Daten bei der Menge der zu analysierenden Proben zwingend erforderlich. Da nur ein MALDI-TOF/TOF der ersten Generation (siehe Kapitel 2.2.4) verwendet werden konnte, waren die beiden Anforderungen Automatisierung der MS/MS-Experimente und ausreichende Qualität der MS/MS-Spektren aber nicht gleichzeitig realisierbar. Die zwei Hauptgründe hierfür waren die noch unausgereifte Isolation des Vorläuferions und die Schwächen der ersten LIFT-Version bei der Fragmentierung von kleineren und größeren Peptiden (siehe Kapitel 2.2.4.3). Besonders die saubere Isolation des Vorläuferions ist sehr wichtig, da weniger spezifische Enzyme mehr Fragmente generieren, was häufig zu dicht zusammenstehenden Signalen im MS-Spektrum führt. Ohne ein ausreichend enges Fenster für das Vorläuferion wären die MS/MS-Spektren somit nicht eindeutig auswertbar, da bereits eine simultane Fragmentierung von zwei Peptiden zu sehr komplexen MS/MS-Spektren führt. Deshalb war eine zeitaufwendige manuelle Aufnahme erforderlich, um eine einigermaßen gute Isolation des Vorläufers zu gewährleisten. Mit einem aktuelleren MALDI-TOF/TOF-Gerät ist aber eine Automatisierung und eine ausreichend hohe Qualität bei der Isolation des Vorläuferions ohne weiteres gleichzeitig möglich. Ein Aufbau einer Bibliothek mit MS- und MS/MS-Spektren von Verdauung unterschiedlichster Proteine mit Chymotrypsin, Elastase, Pepsin und Proteinase K wäre somit inzwischen in einer realistischen Zeit zu bewältigen. Die Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der MS-Spektren in Kapitel 5.4.2 würden mit hoher Wahrscheinlichkeit durch solch eine Bibliothek bestätigt werden. Durch die hohe Anzahl an MS/MS-

Experimenten könnte dann auch die Unspezifität von Proteinase K belegt und die Spezifität von Chymotrypsin, Pepsin und Elastase so eingegrenzt bzw. Schnittwahrscheinlichkeiten an einzelnen Aminosäuren für das jeweilige Enzym ermittelt werden, dass diese drei Enzyme letztendlich in der Proteomforschung zu Trypsin konkurrenzfähig wären.

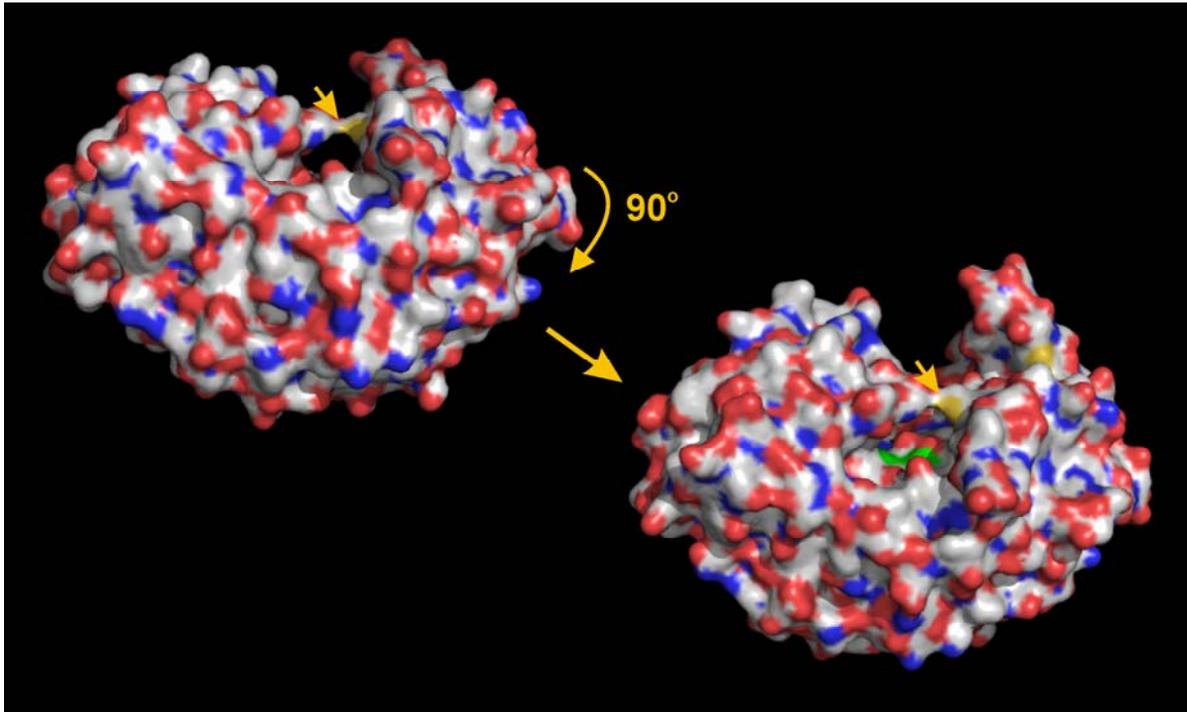
Für das Enzym Elastase konnte schon anhand einer hohen Anzahl von MS/MS-Experimenten, die bei der Analyse der Membranfraktion vom *Corynebacterium glutamicum* angefallen war, eine sehr hohe Spezifität für G, A, V, L, I, S und T nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.4.1). Da es sich nur um die Membranfraktion handelte, sind die Ergebnisse aber kritisch zu beurteilen. Die Analyse des aufgereinigten Membranproteins Cytochrom  $c_1$  hat eindeutig gezeigt, dass diese Enzymdefinition nicht unbedingt ausreichen muss (siehe Kapitel 5.4.4). Vergleicht man das aktive Zentrum des Enzyms Elastase mit dem hochspezifischen Trypsin, dem vergleichbar spezifischen Chymotrypsin und der unspezifischen Proteinase K wird offensichtlich, warum eine Enzymdefinition für Elastase und Chymotrypsin problematisch und für Proteinase K unmöglich ist (siehe Abb. 6.1). Alle vier Enzyme gehören zur Gruppe der Serinproteasen. Verantwortlich für die Spaltung der Peptidkette ist die sog. katalytische Triade, die aus den Aminosäuren Histidin, Serin und Asparaginsäure aufgebaut ist (grün eingefärbt in Abb. 6.1). Die Aminosäure, nach der im aktiven Zentrum gespalten wird, wird durch eine mehr oder weniger passende Tasche für die Aminosäureseitenkette stabilisiert (Pfeil in Abb. 6.1). Beim Trypsin interagiert die positiv geladene Seitenkette von Arginin und Lysin mit der Asparaginsäure am Boden der Tasche, woraus die hohe Spezifität für diese beiden Aminosäuren resultiert (hellblau eingefärbt in Abb. 6.1A). Chymotrypsin hat eine Tasche, die vor allem für sperrige Aminosäuren optimal ist, womit die bevorzugte Spezifität für Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan erklärbar ist (Abb. 6.1B). Aminosäuren wie Leucin und Methionin passen aber natürlich auch ohne Probleme in die Enzymtasche, werden aber weniger gut stabilisiert. Auch sehr kleine Aminosäuren wie z. B. Glycin oder Alanin können in seltenen Fällen gespalten werden. Sie erfahren aber natürlich kaum eine Stabilisierung durch die Tasche. Der Einsatz von Chymotrypsin für die Identifizierung des Membranproteins ND3 (Komplex I der Atmungskette; siehe Kapitel 6.4.7) belegt die hier ausgeführten Postulate an einem realistischen Beispiel. Hauptsächlich fand hier eine Spaltung an F, W, und Y statt. Ähnlich wie beim Chymotrypsin ist auch bei der Elastase eine bestimmte Gruppe von Aminosäuren bevorzugt. Da die Tasche nicht so tief wie beim Chymotrypsin ist (siehe Abb. 6.1C), ist es nachvollziehbar, dass vorwiegend Aminosäuren wie Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin und Threonin gespalten werden (siehe Kapitel 5.4.1). Natürlich ist aufgrund der

Taschenstruktur auch eine Spaltung am Asparagin begründbar, wie sie beispielsweise beim Cytochrom  $c_1$  sicher nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 5.4.4). Bei Proteinase K ist die Tasche im Vergleich zu Chymotrypsin und Elastase so schwach ausgebildet, dass eine höhere Spezifität für eine begrenzte Anzahl von Aminosäuren ziemlich unwahrscheinlich ist (siehe Abb. 6.1D).



**Abb. 6.1 3D-Modelle von Serinproteasen.** (A) Trypsin (McGrath *et al.*, 2006). (B) Chymotrypsin (Yennawar *et al.*, 1994). (C) Elastase (Wright *et al.*, 2001). (D) Proteinase K (Muller *et al.*, 1994). Verwendete Software, PyMOL v1.0 (<http://pymol.sourceforge.net/>). Das aktive Zentrum der Enzyme ist grün eingefärbt. Der orange Pfeil deutet auf die Tasche, welche die Seitenkette der Aminosäure während der Spaltung stabilisiert (Bedeutung hellblaue Einfärbung bei A, siehe Text). Die Ladungsverteilung auf der Oberfläche wird durch graue (ungeladen), rote (negativ) und blaue (positiv) Einfärbung dargestellt. Schwefelhaltige Aminosäureseitenketten sind gelb hervorgehoben.

Pepsin gehört nicht zur Gruppe der Serinproteasen, sondern es handelt sich um eine Aspartatprotease. Asparaginsäure befindet sich als funktionelle Aminosäure im aktiven Zentrum (grün eingefärbt in Abb. 6.2). Die in der Literatur beschriebene höhere Spezifität für Phenylalanin und Leucin bei pH 1 – 2 (Han *et al.*, 2004) ist aus der Enzymstruktur nicht ohne weiteres ableitbar (Abb. 6.2), konnte aber durch Experimente in dieser Arbeit auch bestätigt werden (siehe Kapitel 5.4.1).



**Abb. 6.2 3D-Modelle von Pepsin.** Zwei verschiedene Ansichten sind dargestellt (Cooper *et al.*, 1990). Kennzeichnungen und Einfärbungen, siehe Abb. 6.1.

Es ist also offensichtlich, dass die Verdauung mit Chymotrypsin, Elastase und Pepsin reproduzierbar sind. Außerdem war aus der Literatur für Chymotrypsin und Pepsin bekannt bzw. wurde es für Elastase in dieser Arbeit ermittelt, dass diese drei Enzyme ausgewählte Aminosäuren nur bevorzugen, anstatt dort spezifisch wie Trypsin zu spalten. Die gängigen Strategien zur Auswertung von gel-basierten und LC-basierten *bottom up* Analysen sollten daher nach einigen Modifikationen durchführbar sein (siehe Kapitel 3.1.3.5). Für die Auswertung von MS-Daten mittels PMF wurde dies ausführlich für die Enzyme Elastase und Chymotrypsin im Vergleich zu Trypsin in Kapitel 5.4.3 gezeigt. Der Intensitätswert (Intensitätsabdeckung) von allen zugeordneten Signalen des MS-Spektrums ist neben der

Anzahl der zugeordneten Massen der zusätzlich notwendige Parameter, der eine richtige Identifikation ermöglicht. Kritisieren könnte man noch, dass ein Test gegen eine komplette Datenbank fehlt. Dass die Ergebnisse in Kapitel 5.4.3 komplett zufällig sind, muss aber als sehr unwahrscheinlich eingestuft werden, da BSA und das Fetoprotein eine nicht unerhebliche Homologie aufweisen (siehe Anhang, Abb. 6.1.1). Und trotz dieser Homologie funktioniert die vorgeschlagene Strategie problemlos. Inwieweit 1 – 2 ppm Massengenauigkeit zukünftig den zusätzlichen Parameter der Intensität überflüssig machen könnten, kann nicht beantwortet werden, da MALDI-Kopplungen mit Analysatoren wie FT-ICR und Orbitrap selten bzw. momentan noch in der Entwicklung sind. Die Generierung von MS-Daten für PMF-Suchen wird aber wahrscheinlich auch weiterhin überwiegend MALDI-Instrumenten vorbehalten bleiben, da nur hier ein Hochdurchsatz ohne weitere Aufreinigung (z. B. Entfernung von Salzen) einfach realisierbar ist. Mit einem MALDI-TOF ist bei einer internen Kalibrierung aber nur eine Massengenauigkeit im Bereich von 15 ppm routinemäßig erreichbar. Eine externe Kalibrierung resultiert in einer Massengenauigkeit von 50 ppm.

Auch wenn die PMF-Suche inzwischen als weniger interessant beurteilt werden könnte, da 2 – 3 MS/MS-Experimente das richtige Protein ebenfalls und wahrscheinlich auch sicherer identifizieren, besonders bei weniger spezifischen Enzymen wie z. B. Elastase, sollte sie zukünftig trotzdem nicht vergessen werden. Denn mit einem äußerst geringen Probenverbrauch (z. B. ca. 1000 Laserschüsse bei einem MALDI-TOF) und in sehr kurzer Zeit kann im Vergleich zu MS/MS-Experimenten viel Information erhalten werden. MS/MS-Experimente sind nach der Identifikation des Proteins natürlich anhand der vorgeschlagenen Fragmente für einzelne MS-Signale besser planbar, um gezielt Fragestellungen wie beispielsweise die Identifizierung von bestimmten Modifikationen anzugehen. Aufgrund der höheren Fragmentanzahl bei einem weniger spezifischen Enzym wie Elastase ist solch eine Planung auch dringend erforderlich, um die Probe nicht unnötig aufzubrechen. Sinnvoll ist deshalb für die Auswertung von einem großen PMF-Datensatz eines Elastaseverdaus (z. B. MS-Daten einer kompletten MALDI-Probenplatte mit 384 Proben) mit mehreren unterschiedlichen Enzymdefinitionen wie A, V, L, I bzw. A, V, L, I, S, T bzw. G, A, V, L, I, S, T bzw. A, V, L, I, S, T, N die generierten Massenlisten gegen eine Datenbank abzugleichen. Eine semispezifische Suche mit G, A, V, L, I, S, T ist sicherlich auch notwendig, da es als äußerst unwahrscheinlich zu beurteilen ist, dass Elastase Peptide generiert, die an beiden Seiten nicht an Aminosäuren mit bevorzugter Spezifität gespalten worden sind. Nicht berücksichtigen lassen sich dabei natürlich N- und C-terminale Peptide. Für die ersten 100 Proteine in der Ergebnisliste sollte dann jeweils die Intensitätsabdeckung

berechnet werden und als Ergebnis der PMF-Suche die Sequenzabdeckung, Intensitätsabdeckung und Signalverwertung angegeben werden (Definitionen, siehe Kapitel 5.4.3). Durch diese drei Parameter und dem Vergleich von Datenbanksuchen mit leicht variierenden Enzymdefinitionen könnte man sicher den Großteil der MS-Spektren bei 50 ppm Massengenauigkeit signifikant einem Protein zuordnen. Ab einer Massengenauigkeit von 10 ppm erhält man ebenfalls sehr aussagekräftige Signalzuordnungen (siehe Kapitel 5.4.3). Löcher in den Sequenzregionen eines identifizierten Proteins bei MALDI-Spektren, die ein Arginin enthalten, deuten dann besonders deutlich bei weniger spezifischen Enzymen wie Elastase auf Modifikationen oder Punktmutationen in der Sequenz hin. Denn es gruppieren sich immer um Arginin mehrere Fragmente, die dann natürlich alle fehlen und eine deutliche Lücke hinterlassen (sog. Fragmentcluster, siehe Kapitel 5.4.4).

Die Auswertung von LC-basierten *bottom up* Analysen von Proben, die beispielsweise mit Elastase verdaut worden sind, könnte durch die hier erarbeiteten Erkenntnisse deutlich beschleunigt und signifikanter werden. Eine Datenbanksuche eines großen MS/MS-Datensatzes ist mit der Enzymdefinition G, A, V, L, I, S, T natürlich schneller als eine Suche ohne Enzymdefinition, die zugeordneten Fragmente sind selbstverständlich glaubhafter. Aus den identifizierten Proteinen könnte dann eine Datenbank generiert werden, gegen die semispezifisch mit der Definition G, A, V, L, I, S, T mit den noch nicht zugeordneten MS/MS-Spektren gesucht wird, was weitere MS/MS-Spektren relativ sicher bereits identifizierte Proteine zuordnen würde. Danach könnte eine erneute Suche ohne Enzymdefinition gegen die kleine Datenbank der identifizierten Proteine den MS/MS-Datensatz mit den immer noch nicht zugeordneten Spektren weiter verringern. Abschließend könnte noch mit allen bekannten Modifikationen bzw. einer sinnvollen Auswahl zunächst mit der Spezifität G, A, V, L, I, S, T, dann mit der semispezifischen Variante und zum Abschluss ohne Enzymdefinition gegen die Datenbank der bereits identifizierten Proteine gesucht werden, indem man den jeweils durch die vorangegangene Suche reduzierten MS/MS-Datensatz verwendet. Abhängig von der Anzahl und Qualität der noch verbleibenden MS/MS-Spektren könnte man erneut mit der semispezifischen Variante (G, A, V, L, I, S, T) gegen eine gesamte Datenbank suchen, um weitere neue Proteine zu identifizieren. Damit könnte wieder eine kleine Datenbank mit neu identifizierten Proteinen zusammengestellt werden, mit der wie bereits beschrieben zu verfahren wäre. Wenn der jetzt verbleibende Datensatz noch aussagekräftige MS/MS-Spektren zu enthalten scheint, wäre eine Wiederholung der beschriebenen Strategie ohne Enzymdefinition ebenfalls noch sinnvoll. Mit dieser Vorgehensweise in kleinen Schritten wäre eine Auswertung LC-basierter *bottom up*

Analysen von weniger spezifischen Verdaus mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer akzeptablen Zeit und mit einer hohen Signifikanz realisierbar. Wie gut solch eine Strategie funktioniert, wurde bereits für die simultane Identifikation verschiedenster Modifikationen bei LC-basierter *bottom up* Analysen von spezifischen Verdaus demonstriert (siehe auch Kapitel 3.1.3.5.2).

Reproduzierbarkeit, eine gewisse Spezifität und die Auswertbarkeit der Verdaus von Enzymen wie Elastase sind somit gegeben. Da Pepsin im Magen sowie Trypsin, Chymotrypsin und Elastase im Pankreas für den Eiweißabbau der Nahrung verantwortlich sind, was natürlich auch Membranproteine einschließt, sollte durch diese vier Enzyme auch alles abgedeckt werden können. In der Realität der Proteomforschung liegen Membranproteine vor dem Verdau aber in Umgebungen vor, die ausnahmslos ungünstig sind. Um die Situation zu verbessern, kann man beispielsweise Membranproteine durch organische Lösungsmittel aus der Phospholipidmembran extrahieren, wie es für die Purpormembran von *Halobacterium salinarum*, die nur das Membranprotein Bacteriorhodopsin enthält, in dieser Arbeit demonstriert wurde (siehe Kapitel 5.4.6). Das Protein liegt praktisch nackt vor, die Enzymzugänglichkeit sollte daher gut sein. Voraussetzung ist natürlich, dass das Enzym in dem organischen Milieu noch arbeitet. Für Elastase konnte dies für Methanol, Isopropanol und Acetonitril gezeigt werden (60% v/v). Die Reproduzierbarkeit und Spezifität ist nicht beeinträchtigt. Die gute Stabilität von Elastase selbst in Acetonitril rührt wahrscheinlich von dem hohen Glykosylierungsgrad des Enzyms. Inwieweit die unterschiedlichen Lösungsmittel die Konformation des Bacteriorhodopsins beeinflussen und wie sich aufgrund dessen die Zugänglichkeit ändert, wurde hier aber nicht untersucht. Es könnte natürlich aber auch sein, dass die Entfernung der Membranlipide vom Protein nicht vollständig ist, was die Zugänglichkeit des Enzyms für diese Regionen extrem verschlechtern würde. Oder ein Lösungsmittel unterscheidet sich vom anderen Lösungsmittel hinsichtlich der Effektivität, bestimmte Proteinregionen von Membranlipiden zu befreien. Einflüsse in dieser Richtung sind aber zu erwarten, was entscheidend für den Einsatz unterschiedlicher organischer Lösungsmittel bei der Extraktion vor dem Verdau spricht, um letztendlich eine möglichst hohe Sequenzabdeckung zu erhalten. Ebenfalls wäre es natürlich interessant gewesen, weitere organische Lösungsmittel zu testen, wie z. B. Trifluorethanol, der ein besonders gutes Extraktionsmittel für Membranproteine sein soll (Deshusses *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007). Auch ist es notwendig, Chymotrypsin und Pepsin eingehend hinsichtlich ihrer Lösungsmittelkompatibilität zu testen. Dass Chymotrypsin in 60%igen Methanol (v/v) arbeitet, wurde bereits gezeigt (Fischer *et al.*, 2006a). Je höher die Anzahl der kompatiblen

Lösungsmittel für die einzelnen Enzyme letztendlich wäre, desto mehr Membranproteine eines Proteoms wären bei einer *bottom up* Analyse erfassbar. Denn es sollte logisch erscheinen, dass sich in unterschiedlichen Lösungsmittelsystemen die einzelnen Membranproteine des Proteoms unterschiedlich gut lösen. Dadurch erhält man eine Fraktionierung, was zu mehr Identifikationen und besseren Sequenzabdeckungen führen sollte.

Detergenzien sind ein weiteres unverzichtbares Hilfsmittel, um Membranproteine zu lösen. Dodecylmaltosid ist mit den getesteten Enzymen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase gut kompatibel, wie es für den Verdau des Membranproteins Cytochrom  $c_1$  gezeigt wurde (siehe Kapitel 5.4.4). Dodecylmaltosid würde Pepsin wahrscheinlich auch nicht negativ beeinflussen. Da Pepsin aber nur im stark sauren Milieu arbeitet, macht der Einsatz von Detergenzien hier wenig Sinn. Zusätzlich ist es legitim zu spekulieren, dass andere nicht-ionische Detergenzien vom Dodecylmaltosid-Typ mit diesen Enzymen sicherlich auch problemlos einsetzbar sind. Wahrscheinlich gilt dies sogar für alle nicht-ionischen Detergenzien. Die Zugänglichkeit des Enzyms zum Membranprotein wird durch Detergenzien aber vermutlich auch behindert (siehe Kapitel 5.4.4).

Wie verhält sich aber ein direkter Verdau einer Membran. Der Verdau des Membranproteins Cytochrom  $c_1$  mit Trypsin, dass in Phospholipidvesikel eingebaut worden war, ergab trotz einiger Probleme Hinweise darauf, was beim Verdau von realen Membranen zu erwarten ist (siehe Kapitel 5.4.5). Die Transmembranhelix verblieb in der Membran, war aber im Vergleich zum Cytochrom  $c_1$ , das durch Dodecylmaltosid in Lösung gehalten wurde, wesentlich schlechter zugänglich. Die enzymatischen Fragmente der löslichen Proteinregionen von Cytochrom  $c_1$  waren nicht abtrennbar. Bei realen Membranen wäre die Situation noch komplexer. Dort haften selbst nach intensiven Waschen vor dem enzymatischen Verdau noch cytosolische Proteine an der Membran (Fischer *et al.*, 2006a). Nach dem Verdau würde der Überstand Fragmente dieser cytosolischen Proteine und der exponierten Domänen der Membranproteine enthalten. Der abgetrennte Membranpellet würde aufgrund der erhaltenen Ergebnisse für das Modellsystem „Cytochrom  $c_1$  in Phospholipidvesikel“ mit hoher Wahrscheinlichkeit noch einen nicht unerheblichen Anteil von Fragmenten enthalten, die nicht Transmembranregionen zugeordnet werden können. Die ersten Versuche von Elastaseverdau der Membran von *Corynebacterium glutamicum* belegen diese Vermutung bereits ansatzweise (siehe Kapitel 5.5.2). Inwieweit zusätzliches Waschen des Membranpellets nach dem Verdau die Situation verbessern könnte, darüber kann an dieser Stelle noch nicht einmal spekuliert werden.

Der Verdau von Membranproteinen in Gelen wird aufgrund der Untersuchungen in dieser Arbeit inzwischen als extreme Herausforderung eingestuft. Aber selbst bei wasserlöslichen Proteinen erhält man bei einem Verdau im Gel schon schlechtere Ergebnisse als bei einem vergleichbaren Verdau in Lösung (siehe auch Kapitel 5.4.2). Beim Verdau von Membranproteinen im Gel sind dann meistens nur noch die Fragmente im MS-Spektrum sichtbar, die nicht zu Transmembranregion gehören. Dies ist selbst für weniger spezifische Enzyme wie Chymotrypsin zutreffend, die eigentlich genügend Spaltnöglichkeiten im Bereich der Transmembranhelices haben sollten. Die Analyse des extrem hydrophoben Membranproteins ND3 (Untereinheit von Komplex I der Atmungskette) belegt dies beispielhaft (siehe Kapitel 5.4.7). Eine Verbesserung könnte wahrscheinlich durch eine Reduzierung der Geldichte vor dem Verdau erreicht werden, da dadurch voraussichtlich die Zugänglichkeit zum Membranprotein besser und die Extraktion der enzymatischen Fragmente effektiver wäre. Erste Versuche mit alternativen Quervernetzern für Polyacrylamidgelen wurden bereits gemacht (siehe Kapitel 5.5.1). Das Trennvermögen der Gele ist voraussichtlich aber etwas schlechter. Außerdem stören einige wenige Nebenprodukte die Massenspektrometrie, die bei der Verringerung der Geldichte zwangsläufig entstehen (siehe Kapitel 5.5.1). Ob diese effektiv beseitigt werden können, muss die Zukunft zeigen. Auf jeden Fall sind hier noch viele Experimente nötig, insbesondere um vergleichbare Trennbedingungen zum etablierten System zu ermitteln. Die bisherigen Erkenntnisse weisen deshalb nur darauf hin, dass durch den Einsatz alternativer Quervernetzer eine Chance für eine Verbesserung der Situation bestehen könnte.

100% Sequenzabdeckung bei der *bottom up* Analyse von Membranproteinen ist also aufgrund der erläuterten schwierigen Ausgangsbedingungen (erschwerter Proteinzugänglichkeit und schlechte Effektivität bei der Extraktion aus dem Gel) scheinbar unerreichbar. Zwar haben die weniger spezifischen Enzyme Chymotrypsin, Elastase und Pepsin im Vergleich zu Trypsin auch bei Membranproteinen genügend Schnittmöglichkeiten, eine ausreichend große Anzahl an Fragmenten mit akzeptabler Masse für die Massenspektrometrie wird aber auch hier nicht generiert ( $m/z = 800 - 5000$ ;  $z = 1$ ). Vielleicht sind die Fragmente aber doch da und nur im MS-Spektrum nicht sichtbar. Dafür spricht beispielsweise, dass sich bei MALDI die Hauptfragmentcluster um Arginin gruppieren (siehe Kapitel 5.4.4 und 5.4.6). Die Signalintensität von Fragmenten mit den beiden anderen basischen Aminosäuren Lysin und Histidin ist meistens wesentlich geringer, Fragmente ohne basische Aminosäure tauchen nur sehr selten als Signal im MALDI-Spektrum auf. ESI könnte hier höchstwahrscheinlich komplementäre Information liefern und somit die Sequenzabdeckung verbessern (siehe

Kapitel 3.1.3.3). Enzymatische Fragmente, die aber schon während der Probenhandhabung verloren gehen, lassen sich natürlich niemals massenspektrometrisch detektieren. Besonders die hydrophoben Fragmente der Transmembranregionen sollten eine hohe Affinität zu allen möglichen Probengefäßen und dem Polyacrylamidgel haben. Dieses Problem ist wahrscheinlich auch in der Zukunft nicht so ohne weiteres lösbar. Die massenspektrometrische Erfassung wird aber ebenfalls kritisch, wenn von einem Fragment zu wenige Kopien entstehen. Da weniger spezifische Enzyme an mehr Aminosäuren schneiden, ist dies zwangsläufig der Fall. Es werden daher immer etwas höhere Probenmengen für enzymatische Verdaus mit Chymotrypsin, Elastase und Pepsin benötigt.

100% Sequenzabdeckung ist daher erst dann möglich, wenn diese noch offenen Herausforderungen gelöst werden. Das Enzympaket Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Pepsin hat aber auf jeden Fall das Potential, dass jedes Protein, also auch jedes Membranprotein, optimal für massenspektrometrische Experimente zerkleinert werden könnte. Denn die *bottom up* Analysen des Membranproteins Cytochrom  $c_1$  (siehe Kapitel 5.4.4), der Purpurmembran von *Halobacterium salinarum* (siehe Kapitel 5.4.6), des Membranprotein ND3 (siehe Kapitel 5.4.7) und der Membran des *Corynebacterium glutamicum* (siehe Kapitel 5.5.2) zeigen trotz der noch vielen offenen Herausforderungen einen deutlichen Trend zu einer erfolgreicherer Analytik und besseren Sequenzabdeckung bei Membranproteinen. Dass weniger spezifische Enzyme wie Chymotrypsin, Elastase und Pepsin, die hauptsächlich dafür verantwortlich sind, genauso unkompliziert wie Trypsin in der Proteomforschung angewendet werden könnten, wurde in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt. Auf die Auswertung solcher *bottom up* Analysen abgestimmte Suchmaschinen fehlen bis jetzt aber noch. Die Anpassung wäre aber nicht sonderlich kompliziert (siehe weiter oben).

Abschließend muss für den Kritiker noch angemerkt werden, dass alle Experimente und Auswertungsstrategien zu weniger spezifischen Enzymen in dieser Arbeit nur ein bescheidener Anfang sind. Zukünftig ist noch einiges zu tun, besonders wenn es um Membranproteine geht.

## 7. Zusammenfassung

Die Arbeit überprüft die Zusammensetzung der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase in Säugetiermitochondrien, dem Enzymkomplex, der das meiste ATP für den Energiebedarf einer Zelle liefert. Es sind zwei neue Proteine identifiziert und als ATP-Synthase assoziiert verifiziert worden, das sog. *dapit protein* (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue; Datenbanknummer in NCBI für *Rattus norvegicus*, gi|19424210) bzw. *6.8 kDa mitochondrial proteolipid* (Datenbanknummer in NCBI für *Rattus norvegicus*, gi|109478763). Bis jetzt sind beide Proteine nicht zusammen mit dem Komplex V detektiert worden, da es sich bei beiden Proteinen um sehr kleine Membranproteine (kleiner 7 kDa) handelt und sie sehr leicht in Gegenwart von Detergenzien verloren gehen. Die etablierte Strategie zur milden Aufreinigung von Komplex V, die eingesetzte gelelektrophoretische Trennung und die gewonnenen Erkenntnisse zur Identifizierung solch kleiner Proteine können sicherlich auch Lösungsansätze für andere ungelöste Problemfälle in der Proteinkomplexanalytik liefern. Da beide neuen Proteine in die Modulation des metabolischen Zellzustandes involviert sein könnten, sind die erarbeiteten Daten für weitere funktionelle und biochemische Untersuchungen der ATP-Synthase äußerst nützlich. Außerdem könnten die Ergebnisse für neurologische und klinische Studien hinsichtlich der Ursachenforschung von Funktionsstörungen in den Mitochondrien von Interesse sein, da eines der zwei neuen Proteine früher schon mit Diabetes in Zusammenhang gebracht worden ist (*dapit*, diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue).

Für ein bakterielles Multihäm *c*-Typ Cytochrom konnte massenspektrometrisch gezeigt werden, dass es auf eine unkonventionelle Weise Häm bindet. Durch massenspektrometrische Charakterisierung des Proteins konnte erstmals nachgewiesen werden, dass es nicht nur die Häm *c*-Bindemotive  $CX_{2-4}CH$  und  $CXXCK$ , sondern auch Häm *c*-Bindemotive der Form  $CX_nCH$  in Bakterien gibt. Diese Erkenntnis führt in der Molekularbiologie zu neuen Fragen, z. B. welche speziellen Lyasen (*cytochrome c haem lyases*) letztendlich für das Einfügen der Häm-Gruppe an solche neuen Motive verantwortlich sind. Auch die computerbasierte Vorhersage von *c*-Typ Cytochromen wird dieses Wissen wohl zukünftig in Suchstrategien umsetzen, um die neuen Häm *c*-Bindemotive bei der Genomanalyse von Organismen nicht zu übersehen.

In dem Feld der Identifizierung und Charakterisierung von Membranproteinen im Allgemeinen konnten grundlegende Erkenntnisse zum Umgang mit alternativen Enzymen und deren Potential für einen zukünftigen Einsatz erarbeitet werden. Schwerpunktmäßig wurden

die Enzyme Chymotrypsin, Elastase und Pepsin untersucht. Es konnte für alle drei Kandidaten gezeigt werden, dass sie bevorzugt an einer begrenzten Anzahl von Aminosäuren spalten. Besonders für Elastase ist diese Erkenntnis neu, da sie in der Literatur bisher als unspezifisches Enzym wie Proteinase K geführt wurde. Auch wenn die Spezifität der drei Enzyme nicht zu 100% wie bei Trypsin festgelegt werden kann, sondern es sich nur um eine Bevorzugung gewisser Aminosäuren handelt, sind die enzymatischen Spaltungen reproduzierbar. Selbst eine Auswertung der MS-Spektren mittels *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) ist deshalb auch bei diesen weniger spezifischen Enzymen möglich. Die Intensität der MS-Signale muss aber berücksichtigt werden, was bei bisherigen PMF-Suchen jedoch nicht in der Art und Weise geschieht, wie es für diese Enzyme nötig wäre.

An einigen Membranproteinen konnte letztendlich bereits beispielhaft gezeigt werden, dass der Einsatz von weniger spezifischen Enzymen für die Identifizierung des Proteins und der nachfolgenden Charakterisierung (z. B. Identifizierung von posttranslationale Modifikationen) vorteilhaft ist. Für Elastase konnte in diesem Zusammenhang auch demonstriert werden, dass sie problemlos in Lösungsmittelsystemen mit einem hohen organischen Anteil (Acetonitril, Isopropanol, Methanol) einsetzbar ist. 100% Sequenzabdeckung lassen sich aber auch bei weniger spezifischen Enzymen trotz der größeren Anzahl an Schnittmöglichkeiten nur erahnen. Zwei Hauptursachen hierfür sind wahrscheinlich die schlechte Zugänglichkeit des Enzyms zum Membranprotein bzw. die Bevorzugung bestimmter enzymatischer Fragmente in MALDI und ESI. Polyacrylamidgele mit alternativen Quervernetzern, bei denen sich die Geldichte vor dem Verdau verringern lässt, könnten die Zugänglichkeit zum Membranprotein zukünftig vielleicht positiv beeinflussen. Der Einsatz von organischen Lösungsmitteln und bestimmter Detergenzien beim Verdau verbessert ebenfalls die Zugänglichkeit zum Membranprotein. Die Zahl der Tenside, die mit der Massenspektrometrie sehr gut kompatibel sind, ist aber sehr gering, wie Untersuchungen in dieser Arbeit ebenfalls ergeben haben. Außerdem beschränkt sich die Anwendung von diesen Detergenzien ausschließlich auf MALDI.

Die zu erwartenden Fortschritte bei der Identifizierung und Charakterisierung von Membranproteinen umschreibt daher besonders gut ein Aphorismus von Christian Morgenstern (deutscher Schriftsteller; 1871 – 1914): „Es gibt nur ein Neues: Die Nuance.“ Einige Nuancen sind in dieser Arbeit enthalten. In der Zukunft werden aber viele weitere solcher Nuancen das Überwinden der Hürde „Membran Proteomics“ immer realistischer werden lassen.

## 8. Material und Methoden

### 8.1 Material

#### 8.1.1 Chemikalien

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

Aceton, Acetonitril, Ameisensäure, 6-Aminohexansäure, Ammoniak, Ammoniumhydrogencarbonat, Ammoniumsulfat, APS, Asolectin, ATP, Bleinitrat, Bromphenolblau, Calciumchlorid, CHAPS, Coomassie Blau G-250, DHEBA [N,N'-(1,2-dihydroxyethylen)-bisacrylamid], Diethylether, Digitonin, Decyl- $\beta$ -D-maltosid, Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTAB), DTT, EDA (Ethylendiacylat), EDTA, Essigsäure, Ethanol, Formaldehyd, Glycerin, Glycin, Harnstoff, HEPES, Imidazol, Iodoacetamid, 2-Iodoxybenzoesäure, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kalium-Hexacyanoferrat(III), Magnesiumsulfat, MBA (N,N'-Methylenbisacrylamid), MEGA-11,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Methanol, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumthiosulfat, Oligomycin, Perfluoroktansäure, Periodsäure (HIO<sub>4</sub>), Phosphorsäure, Saccharose, Salzsäure, Silbernitrat, SDS, TEMED, Trichloressigsäure, Tricin, Trifluoressigsäure, Tris, Triton X-100, Tween-20, Wasser (MilliQ H<sub>2</sub>O<sub>ddist</sub>), Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-12, Zwittergent 3-14, Zwittergent 3-16.

#### 8.1.2 Enzyme

- Trypsin, Rinderpankreas (*Sequencing Grade*); Hersteller, Roche.
- Chymotrypsin, Rinderpankreas (*Sequencing Grade*); Hersteller, Roche.
- Modifiziertes Chymotrypsin, Rinderpankreas (*Sequencing Grade*); Hersteller, Princeton Separations, Inc.
- Elastase, Schweinepankreas; Hersteller, Roche.
- Pepsin, Magenschleimhaut vom Schwein; Hersteller, Roche.
- Proteinase K, rekombinant (*PCR Grade*); Hersteller, Roche.

### 8.1.3 Matrices für MALDI

- $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure; Hersteller, Bruker Daltonics
- DHBs; Hersteller, Bruker Daltonics

### 8.1.4 Peptid- und Proteinstandards

Zur Kalibration der Massenspektrometer wurde der *Sequazyme<sup>TM</sup> Peptide Mass Standards Kit* (Applied Biosystems, MDS SCIEX), der *Protein calibration standard I* (Bruker Daltonics, Bremen) und der *Protein calibration standard II* (Bruker Daltonics) verwendet.

Für die Experimente der Kapitel 5.3 (Detergenzien) und 5.4 (Weniger spezifische Enzyme) wurden folgende Proteine als Standards eingesetzt. BSA (Rinderserumalbumin; Swiss-Prot-Datenbanknr., P02769), Carboanhydrase (Rind; P00921), Myoglobin (Pferd; P68082), Cytochrom *c* (Pferd; P00004), Angiotensin I (Mensch; P01019) wurden bei Sigma gekauft (mindestens 95% Reinheit). Das Membranprotein Cytochrom *c*<sub>1</sub> (*Thermus thermophilus*) und der Membranproteinkomplex Cytochrom *c* Oxidase (*Paracoccus denitrificans*) wurden von Prof. Dr. Bernd Ludwig (Institut für Biochemie, Universität Frankfurt a. M.) bereitgestellt (Mooser *et al.*, 2005; Hendler *et al.*, 1991). Bacteriorhodopsin in Purpurmembranen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Dencher (Institut für Biochemie, TU Darmstadt) präpariert (Bauer *et al.*, 1976) und von Dr. Ansgar Poetsch (Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt. Die Membranen vom *Corynebacterium glutamicum* (Fischer *et al.*, 2006a) wurden im Labor von Dr. Ansgar Poetsch aufgereinigt. Das Membranprotein Hsmr wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Glaubitz (Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Frankfurt a. M.) isoliert.

### 8.1.5 Massenspektrometer

- Voyager DE-Pro (Applied Biosystems, MDS SCIEX)
- LCQ classic (Thermo Finnigan)
- Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics)

### 8.1.6 Software

- DataExplorer v4.9 (Applied Biosystems, MDS SCIEX)
- Xcalibur v1.3 (Thermo Finnigan)
- Flex Analysis v2.2 (Bruker Daltonics)
- Biotools v2.2 (Bruker Daltonics)

## 8.2 Allgemeine Methoden

### 8.2.1 SDS-PAGE (Laemmli)

#### 8.2.1.1 Materialien

##### Acrylamid-Stammlösung (30.8 %):

300 g Acrylamid, 8 g N,N'-Methylenbisacrylamid mit Wasser (MilliQ) auf 1 l auffüllen.

##### 4 x Trenngelpuffer (pH 8.8):

91 g Tris, 2 g SDS in 500 ml Wasser lösen, mit HCl pH-Wert einstellen.

##### 4 x Sammelgelpuffer (pH 6.8):

91 g Tris-HCl, 2 g SDS in 500 ml Wasser lösen, mit HCl pH-Wert einstellen.

##### Trenngel (15 ml für 2 x 1mm Minigele):

	8 %	10 %	12 %	14 %	16 %
Wasser	7.33	6.20	5.37	4.39	3.41
Acrylamid-Stammlösung	3.92	4.90	5.88	6.86	7.84
4 x Trenngelpuffer	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Zum Starten der Polymerisation zugeben:					
10 % APS	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150
TEMED	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015

Sammelgel (4%, 10 ml):

1.3 ml Acrylamid-Stammlösung, 2.5 ml Sammelgel-Puffer, 6.1 ml Wasser, 0.1 ml 10% APS und 0.01 ml TEMED

1 x Probenpuffer (pH 6.8):

121 mg Tris, 2 g SDS, 20 ml Glycerin, 0.5 ml 1% Bromphenolblau-Lösung mit Wasser (MilliQ) auf 100 ml auffüllen. Mit HCl auf pH 6.8 einstellen.  $\beta$ -Mercaptoethanol (5 %, d.h. 0.05 ml / ml) oder DTT (26 mM, d.h. 5 mg / ml) erst vor Verwendung des Puffers zugeben.

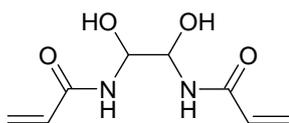
10 x Elektrodenpuffer:

144 g Glycin, 30.3 g Tris, 10 g SDS mit Wasser (MilliQ) auf 1 l auffüllen.

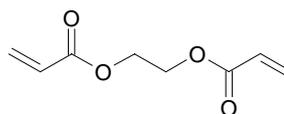
**8.2.1.2 Ablauf**

Das Trenngel wurde ca. 12 h auspolymerisiert, danach das Sammelgel darüber gegossen (Polymerisationszeit ca. 2 h). Die Proben wurden in der zehnfachen Menge Probenpuffer aufgenommen und soweit nicht anders angegeben 5 min bei 95°C denaturiert. Pro Tasche wurden 10  $\mu$ l geladen. Die Bedingungen für zwei Minigele betragen (Biorad-ProteanII): ca. 10 min bei 120 V, 40 mA, 12 W im Sammelgel vorfokussieren. Die Trennung erfolgte bei 200 V, 40 mA, 12 W.

**8.2.1.3 Alternative Quervernetzer**



N,N'-(1,2-dihydroxyethyl)-bisacrylamid  
(DHEBA)



Ethylendiacyrylat (EDA)

**Abb. 8.1** Alternative Quervernetzer

Das Gel wird analog dem klassischen Trenngel hergestellt, nur die klassische Acrylamid-Stammlösung tauscht man aus (Ergebnisse, siehe Kapitel 5.5.1). Das Sammelgel wird auf konventionelle Methode polymerisiert.

### DHEBA

2,4 g Acrylamid, 128 mg DHEBA in 8 ml Wasser lösen. Das entspricht einer 30%igen Acrylamidlösung mit 1,6% Quervernetzer.

### EDA

2,4 g Acrylamid, 142 µl EDA (90%ige Lösung, Sigma, #480797) mit Wasser auf 8 ml auffüllen. Das entspricht einer 30%igen Acrylamidlösung mit 1,6% Quervernetzer.

#### **8.2.1.4 Mischen von alternativen Quervernetzern mit Bisacrylamid**

### MBA/EDA

2,4 g Acrylamid, 71 µl EDA (90%ige Lösung, Sigma, #480797), 64 mg MBA mit Wasser auf 8 ml auffüllen. Das entspricht einer 30%igen Acrylamidlösung mit 1,6% Crosslinker.

## **8.2.2 Färbeprotokolle für Gele**

### **8.2.2.1 Coomassie-Blau Färbung**

Die Proteine wurden zunächst im Gel fixiert (30 min; 50% Methanol/10% Essigsäure) und danach für 30 min mit der Färbelösung behandelt (0,025% Coomassie Blau G-250/10% Essigsäure in MilliQ). Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde 10%ige Essigsäure verwendet (ca. 30 min). Da diese Coomassiefärbung eine geringe Empfindlichkeit hat, wurde manchmal auch die kolloidale Coomassiefärbung von Neuhoff *et al.* (1988) eingesetzt.

### 8.2.2.2 Silberfärbung

Von den vielen unterschiedlichen Silberfärbungen hat sich das Protokoll von Shevchenko *et al.*, 1996 hinsichtlich seiner Kompatibilität zur Massenspektrometrie bewährt. Als Variation fand es auch hier Anwendung.

1. Fixierlösung, 30 min (Methanol : Essigsäure : Wasser = 45 : 5 : 45)
2. Zweimal jeweils 60 min mit Wasser waschen
3. Inkubation in 0,02%iger Natriumthiosulfatlösung (ca. 2 min)
4. Gel zweimal kurz mit Wasser waschen (jeweils ca. 1 min)
5. Inkubation mit kalter 0,1%iger Silberlösung (30 min)
6. Gel zweimal kurz mit Wasser waschen (jeweils ca. 1 min)
7. Entwickler, ca. 1 – 5 min (0,04% Formaldehyd; 2% Natriumcarbonat)
8. Entwicklungsprozess mit 1%iger Essigsäure abstoppen, bevor der Hintergrund gelb wird (Überfärbung).

### 8.2.3 Proteinverdau

#### 8.2.3.1 In Lösung

##### 8.2.3.1.1 Materialien

###### Reduktionsmittel

30 mg DTT in 1,0 mL 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (200mM DTT-Lösung)

###### Alkylierungsmittel

36 mg Iodoacetamid in 1 mL 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (200 mM Iodoacetamid-Lösung)

###### Enzympuffer:

Trypsin, Chymotrypsin: 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung (pH = 8 – 9)

modifiziertes Chymotrypsin, Elastase: 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH = 8 – 9)

Proteinase K: 25 mM Natriumcarbonat-Lösung (pH = 11 – 12)

Pepsin: 10% (v/v) Ameisensäure (pH = 1 – 2)

### **8.2.3.1.2 Protokoll**

#### Reduzieren/Alkylieren (optional)

1. Reduktionsmittel mit Probelösung im Verhältnis 1 zu 20 mischen (z. B. 5 µl Reduktionsmittel bei 100 µl Probe). Die Probelösung muss einen pH-Wert zwischen 6 – 9 haben. Gemisch für 1 h bei 37°C reduzieren.
2. Alkylierungsmittel zugeben: Vierfache Menge des Reduktionsmittels (d. h. 20 µl Alkylierungsmittel bei 5 µl Reduktionsmittel). 1 h bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubieren.
3. Äquivalente Menge Reduktionsmittel zugeben, um überschüssiges Alkylierungsreagenz abzubauen (d. h. 20 µl Reduktionsmittel). Ungefähr 30 min inkubieren. Ohne diesen Schritt könnten die Enzyme in ihrer Aktivität durch Alkylierung beeinträchtigt werden.

#### Bedingungen

Die Probe mit der jeweiligen Pufferlösung für das gewünschte Enzym lösen oder bereits gelöste Probe mit Pufferlösung verdünnen, um das nötige Verdaumilieu zu schaffen. Auf jeden Fall pH-Wert kontrollieren. Enthält die Probe hohe Harnstoffmengen (6M – 8M) sollte mindestens um den Faktor 10 verdünnt werden. Enzym im Massenverhältnis 1:30 [m(Enzym)/m(Protein)] zugeben. Bei 37°C (Trypsin, Pepsin) bzw. 25°C (Chymotrypsin, modifiziertes Chymotrypsin, Elastase, Proteinase K) 1 h – 24 h inkubieren (Details zu Verdauzeiten, siehe spezielle Methoden 8.3 – 8.6 bzw. Ergebnisteil).

### 8.2.3.2 Im Gel

Das Protokoll ist an den Trypsinverdau aus silbergefärbten Gelen von Shevchenko *et al.*, 1996 angelehnt.

#### Probenvorbereitung:

1. Gel in kleine Stücke schneiden ( $\varnothing \approx 1$  mm).

#### Nur bei Silberfärbung:

1. 1 x 10 min mit 100  $\mu$ l einer Mischung aus 30 mM Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung und 100 mM Natriumthiosulfat-Lösung (1:1) entfärben.
2. Lösung vorsichtig abnehmen und 3 x 15 min mit 400  $\mu$ l Wasser (MilliQ) waschen.

#### Nur bei Coomassiefärbung:

1. 2 x 45 min mit 400  $\mu$ l 50 % Acetonitril/25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung entfärben.

#### Waschen und Trocknen für Reduzieren und Alkylieren (optional):

1. 3 x 15 min mit 400  $\mu$ l 50 % Acetonitril/25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung waschen.
2. 2 x 10 min mit 100  $\mu$ l Acetonitril dehydrieren.
3. Gelstücke für 10-15 min in der Vakuumzentrifuge trocknen.

#### Reduzieren und Alkylieren (optional):

1. Die Gelstücke mit 10 mM DTT in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung bedecken (etwa 100  $\mu$ l). 1 h bei 56°C inkubieren.
2. Alkylieren mit 55 mM Iodoacetamid in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung (100  $\mu$ l, 45 min, Dunkelheit, Raumtemperatur)

#### Waschen und Trocknen:

1. 3 x 5 min mit 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung waschen
2. 2 x 5 min mit 100  $\mu$ l Acetonitril dehydrieren, dazwischen mit 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung kurz quellen lassen (ggf. Gelstücke vor der Dehydrierung zermusen).
3. Gelstücke für 10 – 15 min in der Vakuumzentrifuge trocknen

### Verdau :

1. Getrocknete Gelstücke in Enzymlösung (ca. 6 ng/μl im entsprechenden Verdaupuffer<sup>\*</sup>) quellen (ca. 20 – 40 μl je nach Gelvolumen; mindestens 45 min; mit Eis kühlen)
2. Überschüssige Verdaulösung entfernen, durch Verdaupuffer<sup>\*</sup> ersetzen (50 – 70 μl je nach Gelvolumen). Mindestens 12 h inkubieren.
3. Überstand abnehmen.

<sup>\*</sup> Angaben zur Zusammensetzung der Verdaupuffer und Temperatur, siehe Verdau in Lösung.

### Extraktion:

1. 2 x 50% Acetonitril/5% Ameisensäure (jeweils 70 μl, 30 min)
2. 2 x 95% Acetonitril/5% Ameisensäure (jeweils 70 μl, 30 min)

Überstand und Extrakte vereinen, danach in der Vakuumzentrifuge trocknen.

## **8.2.4 MALDI-TOF und MALDI TOF/TOF von Proteinverdaus**

Getrocknete Proben wurden in 5 μl 50% (v/v) ACN, 0,5% (v/v) TFA gelöst, wenn nichts anderes angegeben ist. 1 μl Probe wurde mit 1 μl alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (3 mg/ml; 50% (v/v) Acetonitril, 0,5% (v/v) TFA) gemischt und an der Luft getrocknet. Bei der Präparation von Proben im wässrigen Milieu (z.B. Verdaus in Lösung) wurde der Acetonitrilgehalt der Matrixlösung auf 70% erhöht. Getrocknete Präparationen wurden immer mit 5% (v/v) Ameisensäure gewaschen. Alle MS-Experimente wurden am Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen) im Reflektor-Modus durchgeführt (Details zur Funktion, siehe Kapitel 2.2.3). Das *low mass gate* wurde auf 650 Da, der Aufnahmebereich auf 700 – 5000 Da gesetzt. Ungefähr 1200 Schuss wurden für jedes MS-Spektrum aufsummiert. Die Auflösung war ungefähr 15000 bei  $m/z = 2000$ . Alle MS-Spektren von Proteinverdaus wurden extern kalibriert, soweit nicht anders angegeben. Mit einer externen Kalibration wurde eine Massengenauigkeit von mindestens 50 ppm oder besser erreicht, in Ausnahmefällen lag die Obergrenze bei 100 ppm (z. B. Proben mit hohem Salzgehalt, sehr niedrig konzentrierte Proben). Die enthaltenen Peptide des verwendeten Standards (Applied Biosystems, MDS SCIEX) sind im Anhang in der Tabelle 9.1.6A aufgelistet. Wenn intern kalibriert wurde, resultierte daraus eine Massengenauigkeit von 5 – 15 ppm, aber nur falls der

zugesetzte Standard ungefähr im Konzentrationsbereich der Probe lag. Die gleiche Genauigkeit wurde erreicht, wenn intern auf 6 MS-Signale, die den Massenbereich von Interesse abdecken, kalibriert wurde. Die Peptidsequenzen der Kalibranten und somit Massen wurden hierfür vorher mit MS/MS-Experimenten ermittelt.

MS/MS-Experimente wurden mit der LIFT-Methode durchgeführt (Details zur Funktion, siehe Kapitel 2.2.4.2). Die Massengenauigkeit des Vorläuferions (*Precursor*) betrug 50 – 100 ppm, die Massengenauigkeit der Fragmente 0.5 – 1.0 Da. Die Isolationsweite für das Vorläuferion (*Precursor-Ion-Selector*) wurde manuell justiert (0.5% - 1% der Masse des Vorläuferions). Die Fragmentierung war laserinduziert, wenn nichts anderes angegeben ist. Abhängig von der Intensität und dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis des *Precursor* wurden 2000 – 20000 Schuss aufsummiert.

Die Prozessierung erfolgte mit Flex Analysis v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen). Es wurden für alle Spektren die Einstellungen der ATP-Synthase-Analyse (Kapitel 8.3) verwendet. In der Tabelle 9.1.6B-C sind die Prozessierungsparameter von MS- und MS/MS-Spektren für Datenbanksuchen bzw. Biotools v2.2-Auswertungen (Bruker Daltonics, Bremen) angegeben.

Die Auswertung erfolgte mit Biotools v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) oder mittels Mascot-Datenbanksuche (siehe auch Kapitel 3.1.3.5). Weitere Informationen sind bei den jeweiligen speziellen Methoden (siehe Kapitel 8.3 – 8.6) angegeben, wenn Proteinverdaus gemessen worden sind.

### 8.3 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

#### 8.3.1 Mitochondrienaufreinigung

Die Rattenherzmitochondrien wurden nach der Methode vom Jacobus und Saks (Jacobus *et al.*, 1982) isoliert. BSA und Trypsin wurden dabei nicht eingesetzt. Die erhaltenen Mitochondrien wurden dann zusätzlich mit einem Saccharosestufengradient (15%, 23%, 32%, 37%, 47%, 55% und 60%) aufgereinigt (Meisinger *et al.*, 2000). Die Bande bei 47% enthält die sauberen Mitochondrien. Aliquots mit einem Gehalt von ungefähr 400 µg Protein oder einem Vielfachen davon wurden durch Zentrifugation (10.000 x g, 10 min) erhalten. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

Rinderherzmitochondrien wurden präpariert nach dem Verfahren von Smith (Smith *et al.*, 1967).

#### 8.3.2 Elektrophoretische Techniken

400 µg Aliquots der Mitochondrienproteine wurden mit 40 µl Puffer (50 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 2 mM 6-Aminohexansäure, 1 mM EDTA, pH 7) gelöst, dem eine definierte Detergenzmenge zugesetzt wurde, um ein optimales Detergenz/Protein-Verhältnis einzustellen z.B. 4 µl 20%ige Digitoninlösung, was einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 2 (g/g) entspricht. Die eingesetzten Verhältnisse zur Solubilisierung sind im Ergebnisteil für das jeweilige Gel angegeben. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 100.000 x g wurde dem Überstand Coomassie-Farbstoff (2 µl einer 5%igen Coomassie G250-Lösung in 750 mM 6-Aminohexansäure) zugesetzt. Das Detergenz/Coomassie-Verhältnis war somit 8:1. Die erhaltene Lösung wurde auf zwei Geltaschen (0.15 x 0.5 cm) verteilt.

Puffer und Trennbedingungen für 1-D-BNE und 2-D-BNE/BNE wurden gewählt, wie bei Wittig *et al.*, 2006a beschrieben. Lineare 3-13% Acrylamid-Gradientengele wurden für die erste Dimension und 4-16% Acrylamid-Gradientengele für die zweite Dimension verwendet. Dem Kathodenpuffer wurde für die zweite Dimension 0.02% Dodecylmaltosid zugesetzt. SDS-PAGE wurde nach dem Protokoll von Schagger *et al.*, 2006 durchgeführt. Die optimale Trennung für die Untereinheiten der ATP Synthase von Rind erreicht man mit 16% T, 6% C Gelen. Elektrobotten auf PVDF-Membranen und dSDS-PAGE erfolgte nach aktuellen Protokollen (Schagger *et al.*, 2006; Rais *et al.*, 2004).

### 8.3.3 Antikörper und Westernblott

PVDF Membranen wurden 5 min mit Methanol entfärbt. Danach wurde 30 min mit PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*; 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4), der zusätzlich noch 0,5% Tween-20 enthielt, gewaschen. Nach erneutem Waschen mit PBS, 0,1% Tween-20 für 5 min wurden die PVDF Membranen 16 h mit spezifischen Antikörpern (Lösungsmittel: PBS, 0,1% Tween-20) inkubiert (siehe nächster Absatz). Der Inkubation folgten drei 10 minütige Waschschritte mit PBS, 0,1% Tween-20. Die Blots wurden dann für 1 h mit Anti-Rabbit IgG-Peroxidase-Antikörper (aus Ziegen Serum gewonnen; Sigma, A0545) behandelt. Vor der Anwendung wurde die Antikörperlösung 1:20000 mit PBS, 0,1% Tween-20 verdünnt. Nach fünf Waschschritten (jeweils 5 min) mit Wasser erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz.

Für das MLQ-Protein aus Rind wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Verdünnung 1:2500) verwendet (Terzi *et al.*, 1990). Die N- und C-terminale Sequenz des AGP-Proteins (AGPEADAQFHFTGIK und YFKLRSKKTPAVKAT) wurde mittels Cystein an ein Trägerprotein (*Keyhole limpet hemocyanin* (KLH); Protein aus der Hämolymphe der Schlüssellochschncke; 8 – 32 Mio Dalton) gekoppelt. Antisera wurden dann in Kaninchen produziert (Eurgentec, Seraing, Belgien). 1:10000 – 1:40000 Verdünnungen wurden für die Immunodetektion verwendet.

### 8.3.4 Methode zur Bestimmung der ATP-Hydrolyse im Gel

Die Methode wurde von Zerbetto *et al.*, 1997 entwickelt. Phosphat, das durch die ATP-Hydrolyseaktivität von der Komplex V-Bande im Blau-Nativen Gel (BN-Gel) produziert wird, wird mit Blei gefällt. Das weiße Präzipitat wird danach densitometrisch quantifiziert. Ergänzend zum Protokoll von Zerbetto wurde das BN-Gel 1 h in einem speziellen Puffer (35 mM Tris, 270 mM Glycin, pH 8.3) vorinkubiert. Danach wurde erst mit dem Reaktionspuffer (8 mM ATP, 0,2% Bleinitrat und 14 mM Magnesiumsulfat) getauscht. Die Vorbehandlung erhöht die Sensitivität der Aktivitätsbestimmung in BN-Gelen deutlich an die Sensitivität in CN-Gelen an, für welche die Methode entwickelt wurde. Da die ATP-Hydrolyseaktivität von Komplex V im BN-Gel nicht mit dem Inhibitor Oligomycin gestoppt werden konnte (Zusatz von 5 µg/ml), wurde die Reaktion durch eine 30-minütige Behandlung mit 50% Methanol abgestoppt. Danach wurde das BN-Gel in Wasser überführt. Optimale Scanergebnisse der

weißen Präzipitate wurden mit einem handelsüblichen Farbscanner erhalten, wenn man einen schwarzen Hintergrund verwendet. Chemi Doc XRS (Bio-Rad) und Quantity One Software (BioRad) wurden für die Densitometrische Quantifikation der Präzipitate im BN-Gel eingesetzt. Die verwendeten tiff-Files dürfen dabei nicht gepackt sein.

Die Bleiphosphatbanden des BN-Gels wurden danach mit 10%iger Essigsäure wieder aufgelöst und mit Coomassie-Farbstoff gefärbt, um die anderen mitochondrialen Atmungskettenkomplexe sichtbar zu machen. Da die coomassiegefärbten Banden aus dem Blau-Nativen Gel nicht besonders nützliche densitometrische Daten für Referenzen lieferten, wurden die Komplexe mit einem SDS-Gel in ihre Untereinheiten getrennt. Nach Coomassie-Färbung wurden ausgewählte Untereinheiten z. B. die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  von Komplex V für die Quantifizierung verwendet (gleicher Scanner, gleiche Software). Zusammen mit den densitometrischen Daten der Phosphatpräzipitate, wurden die spezifischen Aktivitäten für die unterschiedlichen Oligomere von Komplex V berechnet.

### 8.3.5 Edmanabbau

Die Proteine wurden auf PVDF-Membranen geblottet und anschließend mit dem 473A Protein Sequencer (Applied Biosystems) sequenziert. Deformylierung (24h bei 37°C) und teilweise Deacetylierung (57 h bei 37°C) erfolgte durch Inkubation mit Trifluoressigsäure und Methanol (1:1 v/v; Gheorghe *et al.*, 1997). Interne Proteinfragmente wurden folgendermaßen generiert (Hunte *et al.*, 2003): Komplex V wurde mittels BN-SDS-PAGE in die Untereinheiten getrennt. Ausgewählte Untereinheiten wurden mittels Elektroelution extrahiert und mit 2-Iodoxybenzoesäure in 80% Essigsäure am Tryptophan gespalten (Mahoney *et al.*, 1981). Die Essigsäure wurde mit neun Teilen Wasser verdünnt und dann durch Lyophilisieren entfernt. Die trockenen Proben wurden anschließend in dem kleinstmöglichen Volumen Wasser (Zusatz: 0.5% Mercaptoethanol) wieder gelöst. Die erhaltenen Proteinfragmente wurden mittels Tricin-SDS-PAGE getrennt und nach Elektroblotten auf PVDF-Membranen sequenziert.

### 8.3.6 Massenspektrometrie

Der Verdau erfolgte nach dem allgemeinen Protokoll (siehe Kapitel 8.2.3.2). Das verwendete Enzym war Trypsin (Roche). Die Proteine wurden reduziert und alkyliert. Die Aufnahmebedingungen der MS- und MS/MS-Spektren für den Trypsinverdau sind in Kapitel 8.2.4 erläutert. Alle MS-Spektren wurden mit Hilfe von Flex Analysis v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) geglättet und monoisotopisch gelabelt. Nur monoisotopische Signale mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis  $> 3$  wurden mittels SNAP-Algorithmus berechnet (siehe Anhang, Tab. 9.1.6). Signale wurden dann als Verunreinigungen definiert, wenn sie in dem Großteil der aufgenommenen Spektren enthalten waren, auch wenn die Signale nicht Trypsin, Matrixclustern oder anderen üblichen Laborverunreinigungen wie Keratin zugeordnet werden konnten. Diese Signale wurden vor der Datenbanksuche aus der Massenliste getilgt (siehe Anhang, Tab. 9.1.3). Die generierten Massenlisten wurden gegen NCBI Nr 20070326 (4.761.919 Proteineinträge) gesucht. Die verwendete Suchmaschine war Mascot (Version 2.2, Matrix Science Ltd., UK; Perkins *et al.*, 1999). Die Datenbanksuche erfolgte mit tryptischer Spezifität. Zwei übersprungene Schnittstellen (engl. *missed cleavages*) waren erlaubt. Massenspektren unterhalb 15 kDa wurden zusätzlich mit fünf übersprungenen Schnittstellen geprüft (z. B. Anhang Tab. 9.1.1 und Abb. 9.1.22). Die Massentoleranz betrug 50 ppm. Carbamidomethylierung der Cysteine und Oxidation am Methionin waren zugelassene Modifikationen. Als Organismengruppe wurden Nagetiere (engl. *rodentia*) ausgewählt (163.720 Proteineinträge). Mascot-Scores größer als 65 waren signifikant. Zusätzlich wurden die Mascot-Scores von dem ersten nicht-homologen Protein geprüft (siehe Anhang, Tab. 9.1.4). Der Abstand zu dem identifizierten Protein gibt Aufschluss über die Glaubwürdigkeit der Identifikation. Alle PMF-Suchen wurden deshalb auch noch einmal gegen eine randomisierte Datenbank wiederholt (siehe Anhang, Tab. 9.1.5). Zur Visualisierung der Suchergebnisse wurde Biotools 2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) verwendet (siehe Anhang, Tab. 9.1.1 und Abb. 9.1.1 – 9.1.22).

MS/MS-Spektren wurden ähnlich prozessiert und gegen die Datenbank gesucht. Nur der Schwellenwert für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Berechnung der monoisotopischen Massenliste wurde auf 6 heraufgesetzt. Die Länge der Massenliste wurde auf 50 Signale begrenzt (siehe Anhang, Tab. 9.1.6C). Diese strikten Einstellungen wurden gewählt, um eine hohe Qualität der Massenlisten für die Datenbanksuche zu gewährleisten. Die Suchen wurden mit einzelnen MS/MS-Spektren durchgeführt (Instrumenten Typ: MALDI TOF/TOF; 50 ppm Massentoleranz für den Vorläufer und 0,6 Da für die Fragmente; siehe

Anhang, Tab 9.1.2). Datenbank, Suchmaschine und die anderen Suchparameter wurden analog der PMF-Suche gewählt. Eine Suche gegen eine randomisierte Datenbank wurde ebenfalls durchgeführt (siehe Anhang, Tab 9.1.2). Biotoools 2.2 wurde zur Darstellung der MS/MS-Datenbanksuchergebnisse verwendet. Die strikten Bedingungen für die Berechnung der monoisotopischen Signale wurden für die Darstellung der Fragmentierungsmuster (y, b-Ionen) herabgesetzt (Signal-zu-Rausch-Verhältnis > 1.5; maximale Anzahl an erlaubten Signalen = 200; siehe Anhang, Tabelle 9.1.6C). Peptididentifizierungen wurden nur dann akzeptiert, wenn der Score (sog. *Ions score*) einen der beiden Signifikanzschranken, die Mascot berechnet, überschritten hatte (*identity- or extensive homology* bzw. *significant homology*). MS/MS-Spektren nahe oder unterhalb der Grenze *significant homology* wurden manuell überprüft. Peptide wurden ebenfalls als signifikant identifiziert eingeordnet, wenn mittels Berechnungen mit Biotoools 2.2 die prominenten Signale des MS/MS-Spektrums dem Muster der laserinduzierten Fragmentierung des Peptides (y-, b-, a- und Immoniumionen) zugeordnet werden konnten (siehe auch Abb. 5.3B und Anhang, Abb. 9.1.9, Abb. 9.1.11 und Abb. 9.1.17 – 9.1.19).

### 8.3.7 Programme für strukturelle Analyse und Homologiesuche

Für die Analyse wurde Freeware vom ExPASy Proteomics Server (Swiss Institute of Bioinformatics; [www.expasy.org](http://www.expasy.org)), NCBI (National Center for Biotechnology Information; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und der *Saccharomyces Genome Database* (SGD; [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) verwendet. Transmembranregionen wurden mit den Programmen TMPred, SOSUI, TMHMM v2.0 und HMMTOP v2.2 vorhergesagt, potentielle Phosphorylierungsstellen wurden mit NetPhos v2.0 berechnet ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). BLASTP-Suchen wurden gegen die NCBI-Datenbank und SGD durchgeführt (Suchdatum: März 2007; Einstellungen, siehe Anhang Tab. 9.1.7). ClustalW v1.83 ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) wurde für den direkten Abgleich von Proteinsequenzen verwendet (engl. *alignment*).

#### 8.4 Bakteriell es Cytochrom *c* mit unkonventionell gebundenen Häm

Das aufgereinigte MccA-Protein (*multi haem cytochrome c*) des Bakteriums *W. succinogenes* DSMZ 1740 wurde gegen 10 mM Ammoniumbicarbonatpuffer (pH 8-9) dialysiert und lyophilisiert. DHBs wurde in 33% ACN/0.1% TFA gelöst. 1 µl Matrixlösung wurde mit 1 µl MccA gemischt (10 µM in 25 mM Ammoniumbicarbonatpuffer, pH = 8-9) und an der Luft getrocknet. Eine kommerzielle Kalibrationslösung (1 µM; Bruker Daltonics, Bremen) wurde für die interne und externe Kalibration verwendet. Die Proteinmasse wurde mit dem Voyager DE-Pro (Applied Biosystems, MDS SCIEX) bestimmt. Die MS-Spektren wurden im Linear-Modus aufgenommen (25 KV Beschleunigungsspannung; 92.5% Gitterspannung d.h. ca. 23 kV für die verzögerte Extraktion; DE-Zeit, 750 ns; Erklärungen zu Spannungen und DE-Zeit, siehe auch Kapitel 2.2.3). Die MS-Spektren wurden mit der Data Explorer Software (Applied Biosystems, MDS SCIEX) prozessiert d.h. Basislinienkorrektur, Glättung, Berechnung der Massenliste und interne bzw. externe Kalibration. Für die Massenregion oberhalb 60000 ergab sich für die externe und interne Kalibration eine Massengenauigkeit von ca. +/- 100 Da (siehe Anhang, Tab. 9.2.1)

Die gleiche MccA-Lösung wurde mit Trypsin (*sequencing grade*, Sigma-Aldrich) verdaut (ohne reduzieren/alkylieren). Das Enzym-Protein-Verhältnis war 1 zu 40, die Verdauzeit betrug 24 h (37°C). Abgestoppt wurde der Verdau durch Ansäuern mit 10% (v/v) Ameisensäure. 1 µl verdaute Probe wurde mit 1 µl Matrix (3 mg/ml HCCA in 70% (v/v) ACN/0.5% (v/v) TFA) kristallisiert und danach mit 5% (v/v) Ameisensäure gewaschen. Die Aufnahmebedingungen für MS- und MS/MS-Spektren und deren Prozessierung sind in Kapitel 8.2.4 beschrieben. Die Auswertung der MS-Spektren erfolgte mit Biotools v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen; siehe auch Kapitel 8.6.1). Die erlaubten Schnittstellen für Trypsin waren K und R (C-terminal). Die Häm-Modifikation und die Oxidation am Methionin (Massenzunahme, 15.999 Da) wurden als variable Modifikationen definiert. Die Massenzunahme durch eine Häm-Modifikation wurde auf 615.169 Da festgesetzt. Das Molekulargewicht von Häm ist zwar 616.177 Da, die Häm-Gruppe ist aber schon positiv geladen d. h. es muss die Masse des Protons, das normalerweise für die Ladung des Peptides sorgt, abgezogen werden. Weitere Details sind in Tabelle 9.2.2 zu finden. In der Tabelle sind auch die Parameter für die zusätzlich durchgeführte PMF-Suche mit Mascot angegeben. Alle MS/MS-Spektren der Häm-modifizierten Peptide wurden manuell ausgewertet. Die möglichen Fragmentationen des zugeordneten Peptids bei laserinduzierter Fragmentierung wurden mit Biotools v.2.2 berechnet.

## 8.5 Detergenzien

Als Modellproteine wurden Carboanhydrase (Rind), Cytochrom *c* (Pferd) und Angiotensin I (Mensch) verwendet. Das Membranprotein Hsmr wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Glaubitz (Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Frankfurt a. M.) aufgereinigt. Die Proteine wurden für die MALDI-Experimente in Wasser oder einem Detergenz/Wasser-Gemisch gelöst. Die Konzentration der Proteine betrug immer 10  $\mu\text{M}$ , wenn nichts anderes angegeben ist. Die Konzentration des Detergenz wurde auf die CMC (*critical micellar concentration*) eingestellt (CMC's der eingesetzten Detergenzien, siehe Anhang, Tab. 9.3.1). Für ESI-Experimente wurde der Probelösung zusätzlich 1% (v/v) Ameisensäure zugesetzt.

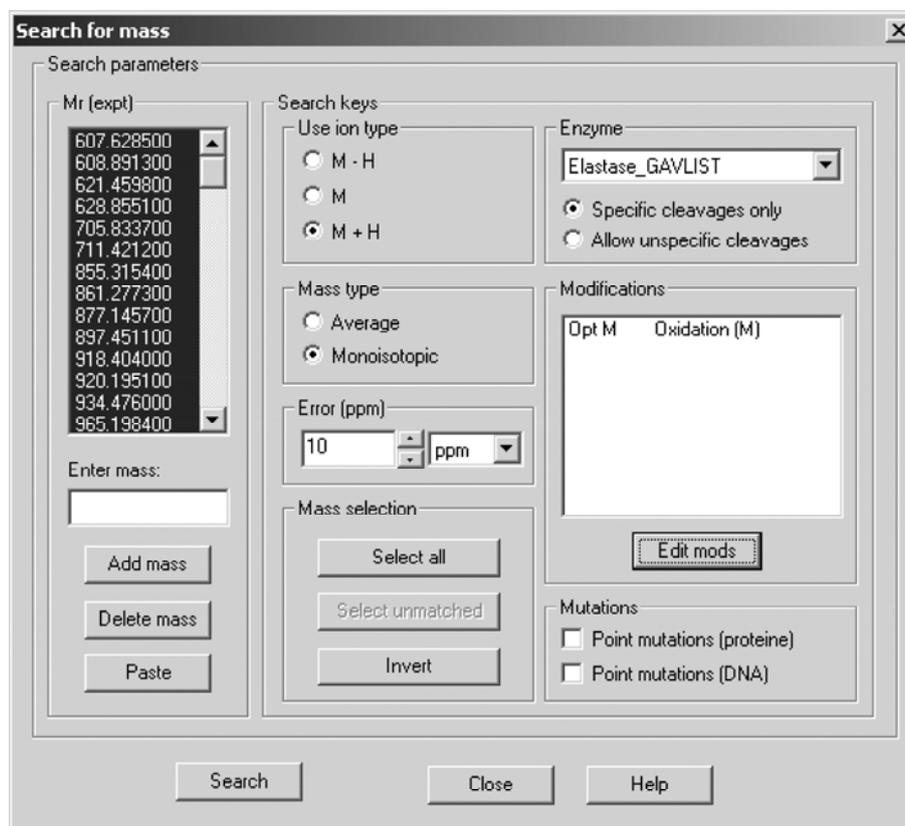
Für die MALDI-Präparation wurde DHBs (40 mg/ml; Lösungsmittel, 33% ACN/0.1% TFA) verwendet. 1  $\mu\text{l}$  Probelösung wurde mit 1  $\mu\text{l}$  Matrix direkt auf der MALDI-Platte gemischt und an der Luft getrocknet (*dried droplet preparation*). Alle MALDI-Messungen wurden am Voyager DE-Pro (Applied Biosystems, MDS SCIEX) im Linear Modus durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.2.3). Die Instrumenteneinstellungen des MALDI-TOF orientierten sich an der Publikation von Bahr *et al.*, 1997. Die Prozessierung erfolgte genauso wie im Kapitel 8.4. Es wurde allerdings nicht extern oder intern kalibriert, sondern nur die *Default*-Kalibrierung des Instruments verwendet, da die Massengenauigkeit für die Untersuchungen nicht relevant war.

Alle ESI-Messungen wurden am LCQ classic (Thermo Finnigan) mit einer nano-ESI-Quelle durchgeführt. Die verwendete nano-ESI-Quelle beruht auf dem Konzept der Firma Protana, Dänemark. Die Positionierung der Sprayquelle erfolgt mit Hilfe eines Präzisions-Verschiebetisches. Die aktuelle Position der Sprayquelle kann dabei mit einem Stereomikroskop verfolgt werden. Als Sprayquelle dienten Borosilikatglas-Kapillaren (Sutter Instrument Co., 1.2 mm Außendurchmesser, 0.69 mm Innendurchmesser). Diese wurden mit einem Kapillarenzuggerät (Sutter Instruments Co., Modell P-97) zu Spraykapillaren ausgezogen. Die Goldbedampfung der Kapillaren erfolgte mit einem Sputter-Gerät (Fa. Emitech, Modell K 550). Die Temperatur der Transferkapillare betrug 180°C.

## 8.6 Weniger spezifische Enzyme

### 8.6.1 *Biotools*-Berechnungen

Um eine schnelle Berechnung in *Biotools* v2.2 zu ermöglichen, kann nicht die *Enzymatic Digest*-Option des *Sequence Editor* genutzt werden. Ansonsten dauert die Berechnung für ein MS-Spektrum eines weniger spezifischen Enzyms teilweise 1 h. Beim Einfügen von optionalen Modifikationen wird sie häufig unmöglich. Außerdem ist die Anzahl der überlesenen Schnittstellen (*missed cleavage sites*) begrenzt. Die *Search for mass*-Option bietet die gleichen Einstellungsmöglichkeiten, ist aber wesentlich schneller und die Anzahl der möglichen überlesenen Schnittstellen ist immer unendlich (siehe Abb. 8.2). Die Berechnungszeit liegt normalerweise unterhalb 1 min. Der Gebrauch von *Biotools* v2.2 ist aber zwingend notwendig, da in aktuelleren Versionen die *Search for mass*-Option limitiert wurde.



**Abb. 8.2** *Search for mass*-Option von *Biotools* v2.2. Beschreibung, siehe Text.

Um ein MS-Spektrum auszuwerten, wird das Spektrum nach der Prozessierung in Flex Analysis (siehe Kapitel 8.2.3.2) in Biotoools v2.2 und die zugehörige Proteinsequenz des verdauten Proteins im *Sequence Editor* geöffnet. Die Massenliste, die von Flex Analysis generiert wurde, wird in das *Search for mass*-Fenster ( $M_r(expt)$  in Abb. 8.2) kopiert und komplett markiert (*Select all* in Abb. 8.2). Zusätzlich werden Ladungszustand, Massentyp, Fehlertoleranz, das Enzym und die Modifikationen angegeben (*Search keys* in Abb. 8.2). Wie Enzyme und Modifikationen definiert werden, wird in der Anleitung von Biotoools ausführlich beschrieben. Die Parameter für die jeweiligen Berechnungen sind meistens direkt in den Kapiteln des Ergebnisteils angegeben. Wenn es aber für das Verständnis der durchgeführten Berechnung eines Experiments nötig ist, wird in einem zugehörigen Methodenteil näher darauf eingegangen. Biotoools ordnet aus der Gesamtheit aller theoretisch möglichen Fragmente bei der definierten Enzymdefinition diejenigen automatisch Signalen im MS-Spektrum zu, die in der gesetzten Fehlertoleranz liegen. Die daraus resultierende Sequenzabdeckung und Intensitätsabdeckung wird automatisch berechnet (Definitionen, siehe Kapitel 5.4.3, Abb. 5.19). Die Signalverwertung wurde manuell berechnet, wie in Abb. 5.19 definiert. Außerdem wird das Ergebnis auch als Diagramm ausgegeben (siehe z. B. Kapitel 5.4.4, Abb. 5.24)

### 8.6.2 Einbau von Cytochrom $c_1$ und Cytochrom $c$ Oxidase in Phospholipidvesikel

Cytochrom  $c_1$  (*Thermus thermophilus*) und Cytochrom  $c$  Oxidase (*Paracoccus denitrificans*) wurden, wie in der Literatur beschrieben, im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Ludwig (Institut für Biochemie, Universität Frankfurt a. M.) isoliert (Mooser *et al.*, 2005; Hendler *et al.*, 1991). Der Einbau von Cytochrom  $c_1$  bzw. Cytochrom  $c$  Oxidase in Phospholipidvesikel erfolgte nach dem Protokoll von Darley-Usmer *et al.*, 1987. Das verwendete Phospholipid-Protein-Verhältnis war 80:1 (g/g), was einer Proteinkonzentration von 25  $\mu\text{mol/L}$  bei Cytochrom  $c_1$  bzw. 5  $\mu\text{mol/L}$  bei Cytochrom  $c$  Oxidase entspricht. Als Phospholipidgemisch wurde Asolectin von Sojabohnen (Sigma) verwendet, das vorher nach dem Protokoll von Darley-Usmer aufgereinigt wurde. Das Gesamtvolumen der Vesikellösung nach dem Einbau betrug 5 ml (HEPES-Puffer 10 mmol/L, pH 7.3). Freies Lipid und uneingebautes Protein wurden mit einem kontinuierlichen Saccharosegradienten (0-60%; HEPES-Puffer 10 mmol/L, pH 7.3) von den Phospholipidvesikeln abgetrennt (Zentrifugationsbedingungen: 80000 x g; 4°C; ca. 12 h). Die Vesikelfraktion wurde mit einer Kanüle entnommen (rote Bande bei

Cytochrom  $c_1$  bzw. blaßgrüne Bande bei Cytochrom  $c$  Oxidase) und auf 50 ml mit HEPES-Puffer (10 mmol/L, pH 7.3) verdünnt. Danach wurde mit 100.000 x g 1h zentrifugiert (4°C). Das Pellet wurde wieder in 5 ml HEPES-Puffer (10 mmol/L, pH 7.3) resuspendiert. Die erhaltene Vesikellösung ist 1 Woche bei 4°C stabil.

Der Verdau erfolgte nach dem allgemeinen Protokoll (siehe Kapitel 8.2.3.1). Es wurde vorher 10-fach mit der dementsprechenden Pufferlösung verdünnt (500 µl Vesikellösung auf 5 ml). Die Probe wurde nicht reduziert und alkyliert. Das gewählte Enzym-Protein-Verhältnis war 1 zu 50 (g/g). Damit das Enzym auch in den Innenraum der Vesikel gelangt, wurden sie mit Hilfe von Ultraschall kurz geöffnet d.h. 10 kurze Behandlungen (1-2 sek.) mit einem Ultraschallfinger unter Eiskühlung (Nach jedem Schock die Probe wieder kurz abkühlen lassen!). Die Verdauzeit betrug ungefähr 12 h. Danach wurden die Vesikel in analoger Weise mit Ultraschall behandelt, um die Peptide aus dem Innenraum der Vesikel zu erhalten. Der Verdauüberstand wurde durch Zentrifugation mit 300.000 x g gewonnen (1h; 4°C). Danach wurde 10%ige TFA-Lösung zum Überstand zugegeben, um einen sauren pH-Wert einzustellen (keine Enzymaktivität im sauren Milieu). Das Pellet wurde dreimal in 600 µl Diethylether resuspendiert und jeweils 1 h mit 13000 rpm zentrifugiert (4°C), um das Lipid zu reduzieren.

Das Pellet wurde in 100 µl 50% ACN/0.5% TFA gelöst und danach 1 µl mit 1 µl Matrixlösung (40 mg/ml DHBs, gleiches Lösungsmittel) präpariert. 1 µl Verdauüberstand wurde mit 1 µl alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (3 mg/ml in 70% ACN/ 0.5% TFA) kristallisiert.

### 8.6.3 Vorschrift für den Verdau von Bacteriorhodopsin in Purpurmembranen

Purpurmembranen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Dencher (Institut für Biochemie, TU Darmstadt) präpariert (Bauer *et al.*, 1976) und von Dr. Ansgar Poetsch (Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt. Für den Verdau wurden Purpurmembranen mit ca. 100 µg Bacteriorhodopsin mit 200 µl 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung gemischt und 1-2 min mit einer Tischzentrifuge (ca. 12.000 rpm) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Bei der kurzen Zentrifugation ging zwar ein Teil der Membranen verloren, zu langes Zentrifugieren resultierte aber in einem zu festen Pellet, der sich danach nur schwer dispergieren ließ. Nach Zugabe von 120 µl Methanol, Isopropanol oder Acetonitril und zweifacher Beschallung von jeweils 10 min im Ultraschallbad waren die Membranen dispergiert. Die Lösung war leicht

gelb gefärbt. Die Probe durfte jetzt auf keinen Fall stärker geschüttelt werden (d.h. nicht Vortexen), da sonst Membranen an der Gefäßwand präzipitierten. Nach Zugabe von 80 µl 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung wurde deshalb auch nur vorsichtig mit einer Pipette gemischt. Das verwendete Bacteriorhodopsin/Elastase-Verhältnis war 10:1 (m/m). Sicherheitshalber wurde der pH-Wert kontrolliert. Wenn er nicht bei 8 – 9 lag, wurde mit Ammoniak oder HCl nachtitriert. Der Verdau erfolgte bei 30°C unter leichtem Schütteln. Die Verdauzeit betrug ca. 14 – 16 h. Der Überstand mit den Peptiden wurde durch Zentrifugation bei 100.000 x g erhalten.

### **8.6.4 Vorschrift für den Verdau der Membranen von *Corynebacterium glutamicum***

Die Membranen von *Corynebacterium glutamicum* wurden gewonnen, wie bereits beschrieben (Fischer *et al.*, 2006a). Die aufgereinigten Membranen (ca. 200 µg Protein) wurden mit 500 µl 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung (AmBic) gemischt und 30 min bei 100.000 x g (4°C) zentrifugiert. Danach wurden die Membranen in 200 µl AmBic mit einer Pipette resuspendiert und 5 min geschüttelt (1500 rpm). Nach Zugabe von Elastase (20 µg) wurde 24h bei 30°C verdaut. Dann wurde 30 min bei 100.000 x g (4°C) zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen (Anmerkung: Der Überstand enthielt die Reste von cytosolischen Proteinen und exponierte Domänen der Membranproteine). Der Pellet wurde in 120 µl Methanol gelöst und danach zweimal jeweils 10 min im Ultraschallbad beschallt. Das Volumen wurde mit AmBic auf 200 µl aufgefüllt, 20 µg Elastase zugegeben und 48h bei 30°C verdaut. Nach 48h wurde 30 min bei 100.000 x g (4°C) zentrifugiert. Vor der Chromatographie wurde entweder mit einem präparativen Zip-Tip C18 gereinigt oder erneut zentrifugiert, um die Chromatographiesäule nicht mit Membrantrümmerresten zu verstopfen (Details zur Chromatographie, siehe Fischer *et al.*, 2006a; MS-Instrument: Orbitrap).

### **8.6.5 Identifizierung von ND3**

Alle Experimente vor der Massenspektrometrie wurden von den Arbeitsgruppen der Kooperationspartner [Prof. Dr. Hermann Schägger und Prof. Dr. Ulrich Brandt (Gustav-Emden Zentrum der Biologischen Chemie, Molekulare Bioenergetik, J. W. Goethe-

Universität, Frankfurt a. M.); Prof. Dr. Andrei Vinogradov (Department of Biochemistry, Moscow State University)] durchgeführt. Deshalb wird darauf an dieser Stelle nur sehr kurz und nicht im Detail eingegangen. SMP's aus Rinderherzen wurden nach einem Standardprotokoll aufgereinigt (Kotlyar *et al.*, 1990). Die Überführung von Komplex I von einem Konformationszustand in den anderen und die Modifikation mit NEM und NFM wurde durchgeführt, wie bereits beschrieben (Gavrikova *et al.*, 1999). Die Aufreinigung von Komplex I erfolgte mittels Blau-Nativer Gelelektrophorese (Wittig *et al.*, 2006a), nachdem die SMP's mit Dodecylmaltosid gelöst worden waren (3 mg pro mg Protein). Der isolierte Komplex I wurde danach mittels dSDS-PAGE (1. Dimension 10% Polyacrylamidgele; 2. Dimension 16% Polyacrylamidgele) in seine Untereinheiten getrennt (Schägger *et al.*, 2006; Rais *et al.*, 2004).

Der Verdau (ohne reduzieren und alkylieren) und die MS- bzw. MS/MS-Messungen erfolgten, wie im allgemeinen Methodenteil beschrieben. Alle MS-Spektren wurden mit Flex Analysis v2.2 Software (Bruker Daltonics, Bremen) monoisotopisch gelabelt (SNAP-Algorithmus). Nur Signale mit einem höheren Signal-zu-Rausch Verhältnis als 3 wurden akzeptiert. Die MS-Spektren der Chymotrypsin- und Elastaseverdau wurden zusätzlich noch von Hintergrundsignalen bereinigt. Als Hintergrund wurden alle Signale eines MS-Spektrums von einem Chymotrypsin- bzw. Elastaseverdau eines leeren Gelstücks definiert (siehe Anhang, Tab. 9.4.42 und Tab. 9.4.44). Mittels Biotoools v2.2 Software (Bruker Daltonics, Bremen) wurden für die vermutete Proteinsequenz die theoretisch möglichen enzymatischen Fragmente für den Massenbereich 700 bis 5000 berechnet und automatisch mit der gemessenen Massenliste verglichen (siehe Kapitel 8.6.1). Die Massentoleranz für den Abgleich betrug 100 ppm. Als variable Modifikationen der Proteinsequenz wurden NEM (N-Ethyl-Maleimid; M = 125,048), NEMhyd (N-Ethyl-Maleimid + H<sub>2</sub>O; M = 143,058), NFM (N-Fluoresceinyl-Maleimid; M = 427,069), NFMhyd (N-Fluoresceinyl-Maleimid + H<sub>2</sub>O; M = 445,08), M (Oxidation am Methionin; M = 15,999) definiert. Die Enzymspezifität für Trypsin wurde folgendermaßen festgesetzt: C-terminal, K und R (kein Schnitt bei folgendem P). Für die C-terminale Chymotrypsin-Spaltung wurden zwei Definitionen verwendet (F, W, Y und F, W, Y, L, M, A, D, E, jeweils kein Schnitt bei folgendem P). Eine Enzymdefinition von Elastase, die bei der vorhandenen Massengenauigkeit des MS-Spektrums für die *Biotoools*-Berechnung ein sinnvolles Ergebnis liefern könnte, gibt es nicht. Deshalb wurde das Elastasespektrum nur manuell ausgewertet d.h. es wurde auf die charakteristischen Signalabfolgen der gelabelten Fragmente geprüft (siehe Kapitel 5.4.7). Um aber für die Auswertung der MS/MS-Daten eine Übersicht der möglichen Peptide zu bekommen, wurden

alle möglichen Massen für die vermutete Proteinsequenz berechnet und mit den gemessenen Massen im MS-Spektrum verglichen (d.h. Enzymdefinition, alle Aminosäuren). Natürlich wurden auch die Chymotrypsin- und Trypsindaten nachträglich auf diese Weise untersucht, um ggf. weitere gelabelte Peptide zu identifizieren, die durch unspezifische Schnitte entstanden sind.

Alle MS/MS-Spektren wurden analog wie die MS-Spektren mit Flex Analysis v2.2 Software (Bruker Daltonics, Bremen) prozessiert. Sie wurden aber zusätzlich noch geglättet und die Basislinie wurde korrigiert. Mit Biotools v2.2 Software (Bruker Daltonics, Bremen) wurde dann auf der Grundlage der MS-Daten das theoretische Fragmentierungsmuster für das Peptid, das dem MS-Signal zugeordnet wurde, berechnet. Die Glaubwürdigkeit der Übereinstimmung zwischen theoretischer Berechnung und gemessenen Spektrum wurde manuell überprüft (siehe Kapitel 5.4.7).

## 9. Anhang

### 9.1 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

**Tab. 9.1.1 Identifikation der ATP-Synthase-Untereinheiten (siehe nächste Seite).** Die Nummerierung entspricht den Positionen im dSDS-Gel (siehe Abb. 5.2C). Wenn ein Rattenprotein nicht identifiziert wurde, ist das homologe Mausprotein der NCBI-Datenbank gelistet. Mascot v2.2-Suchparameter für *peptide mass fingerprint* (PMF): Datenbank, NCBI; Organismus, *Rodentia* (Nagetiere); Enzym, Trypsin; überlesene Schnittstellen (*missed cleavage sites*), 2 (ausgenommen Untereinheit epsilon, 5); unveränderliche Modifikationen, *Carbamidomethyl*; variable Modifikationen, Oxidation am Methionin; Massengenauigkeit, 50 ppm; *automatic decoy database search* (Suche gegen randomisierte Datenbank), ja (siehe Tab 9.1.5); Irrtumswahrscheinlichkeit (*significance threshold*) < 0.05. Die Anzahl der Transmembranhelices (TMH) wurden mit TMHMM ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) bestimmt. Die *Gravy Scores* wurden mit ProtParam ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) berechnet. Die Sequenzabdeckung und der *pI* wurden mit Biotoools 2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) ermittelt.

## 9. Anhang

Tab 9.1.1

Nr.	Untereinheit	Datenbank-nummer	Name	Molekulargewicht (Da)	Mascot-Score	Zugeordnete Peptide	Sequenzabdeckung (%)	TMH	Gravy Score	pI
1	Alpha	gi 6729934	Chain A, Rat Liver F1-AtPase	55361	151	24	49.6	0	-0.118	8.9
		gi 93279422	Chain A, Rat Liver F1-AtPase	55347	151	24	49.6	0	-0.118	8.9
		gi 40538742	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1 [Rattus norvegicus]	59831	144	24	45.8	0	-0.090	9.7
		gi 203055	ATP synthase alpha subunit precursor (EC 3.6.1.3)	58904	144	24	46.6	0	-0.138	9.7
		gi 57029	H(+)-transporting ATP synthase [Rattus norvegicus]	25639	61	10	48.9	0	-0.084	7.7
2	Beta	gi 1374715	ATP synthase beta subunit	51171	290	42	82.7	0	-0.008	4.8
		gi 6729935	Chain B, Rat Liver F1-AtPase	51321	289	42	82.0	0	0.000	4.8
		gi 54792127	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta subunit [Rattus norvegicus]	56318	278	42	74.3	0	0.034	5.1
		gi 203033	F1-ATPase beta subunit	38747	217	32	84.9	0	0.000	4.9
		gi 89574017	mitochondrial ATP synthase, H+ transporting F1 complex beta subunit [Rattus norvegicus]	37228	185	29	77.3	0	-0.014	4.8
3	Gamma	gi 728931	ATP synthase gamma chain, mitochondrial	30229	180	23	62.3	0	-0.211	9.4
		gi 39930503	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma subunit [Rattus norvegicus]	33089	179	22	54.4	0	-0.173	9.6
		gi 6729936	Chain G, Rat Liver F1-AtPase	29972	170	22	60.0	0	-0.243	9.3
		gi 45478238	LRRGT00199 [Rattus norvegicus]	68590	122	23	28.0	0	-0.231	9.0
4a-4d	ATP6 (od. Su a)	gi 110189668	ATP synthase F0 subunit 6 [Rattus norvegicus]	25050	nicht id.*	0	0	6	0.949	9.6
5	Su b	gi 19705465	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1 [Rattus norvegicus]	28965	179	30	55.5	0	-0.137	9.9
6	OSCP	gi 20302061	mitochondrial ATP synthase, O subunit [Rattus norvegicus]	23440	109	16	66.2	0	-0.022	10.5
7	Su d	gi 9506411	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d [Rattus norvegicus]	18809	139	19	93.2	0	-0.702	6.2
		gi 220904	subunit d of mitochondrial H-ATP synthase [Rattus norvegicus]	18827	126	18	88.8	0	-0.718	5.7
8	Delta	gi 20806153	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit precursor [Rattus norvegicus]	17584	49**	6	24.4	0	0.197	5.0
9	Su c	gi 27923925	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 3 [Mus musculus]	14907	27**	4	40.4	2	0.567	11.4
10	F6	gi 16758388	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6 [Rattus norvegicus]	12487	92	9	59.3	0	-0.546	9.9
		gi 258790	H(+)-ATP synthase coupling factor 6 {N-terminal} [rats, liver, Peptide Partial, 34 aa]	3811	33	3	41.2	0	-0.906	9.2
	Su f	gi 109495163	PREDICTED: similar to ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2 [Rattus norvegicus]	10503	66	9	48.9	1	-0.348	10.5
		gi 109496584	PREDICTED: similar to ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2 [Rattus norvegicus]	24338	60	9	20.6	1	-0.499	10.1
11	Su e	gi 17978459	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit E [Rattus norvegicus]	8249	211	20	81.7	0	-0.494	9.5
		gi 258788	H(+)-ATP synthase subunit e {N-terminal} [rats, liver, Peptide Mitochondrial Partial, 44 aa]	4964	158	15	76.0	0	0.166	9.7
12	Su g	gi 47058994	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G [Rattus norvegicus]	11453	111	12	73.8	0	0.217	9.9

## 9. Anhang

13	AGP (od. DAPIT)	gi 19424210	dapit protein [Rattus norvegicus]	6460	69	4	44.8	1	-0.012	10.4
14	ATP8	gi 110189667	ATP synthase F0 subunit 8 [Rattus norvegicus]	7637	72	7	40.3	1	-0.093	9.8
		gi 110189719	ATP synthase F0 subunit 8 [Rattus norvegicus]	7625	45	5	25.4	1	-0.170	9.8
	gi 896471	unknown protein [Rattus norvegicus]	7672	45	5	25.4	1	-0.227	9.8	
	gi 19577318	ATPase subunit 8 [Rattus norvegicus]	7627	45	5	25.4	1	-0.081	9.8	
	MLQ (od 6.8 kDa)	gi 109478763	PREDICTED: similar to 6.8 kDa mitochondrial proteolipid [Rattus norvegicus]	6910	nicht id.*	3	36.7	1	-0.135	10.4
15	Epsilon	gi 258789	H(+)-ATP synthase epsilon-subunit [rats, liver, Peptide Mitochondrial, 50 aa]	5689	115	12	86.0	0	-0.412	10.6
		gi 20806139	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit [Rattus norvegicus]	5820	101	12	84.3	0	-0.367	10.6

\* Nicht mittels PMF identifiziert.

\*\* Mascot-Score nicht signifikant (Scores größer als 65 sind signifikant)

**Tab. 9.1.2 Liste der MS/MS-Daten.** Die Mascot v2.2-Suchparameter entsprechen den angegebenen Einstellungen von Tab. 9.1.1. Zusätzliche Parameter: Massengenauigkeit des Vorläuferions (*Precursor*), 50 ppm; Massengenauigkeit der Fragmente, 0.6 Da; Instrument, MALDI TOF/TOF.

Nr.	Datenbank-nummer	Name	Ions score*	Grenzwert 1**	Grenzwert 2***	Gemessene Masse [M+H]	Peptidsequenz
8	gi 20806153	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit precursor [Rattus norvegicus]	28	24	36	2086.0553	AQSELSGAADEAARAEIQIR
9	gi 8392939	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c, isoform 1 [Rattus norvegicus]	64	35	36	2010.4175	FIGAGAATVGVAGSGAGIGTVFGSLIIGYAR
10a	gi 16758388	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6 [Rattus norvegicus]	21	15	36	2018.0066	LASGGPVDTGPEYQQEVDR
			12	18	35	2535.1784	LASGGPVDTGPEYQQEVDRELFK
10b	gi 109495163	PREDICTED: similar to ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2 [Rattus norvegicus]	40	23	37	1394.7352	DFTPSGIAGAFRR
			37	22	36	1238.6262	DFTPSGIAGAFR
13	gi 19424210	dapit protein [Rattus norvegicus]	32	19	36	1581.8	AGPESDGGQFQFTGIK
			18	17	36	1709.9433	AGPESDGGQFQFTGIKK
			19	21	37	1221.6345	YFNSYTLTGR
14a	gi 110189667	ATP synthase F0 subunit 8 [Rattus norvegicus]	46	28	34	1140.6784	IYLPPLSLPPQ
			35	20	35	1652.7548	TMATEKTNNPWESK
14b	gi 109478763	PREDICTED: similar to 6.8 kDa mitochondrial proteolipid [Rattus norvegicus]	21	20	37	1479.8096	ALKGCSPAHAHGH

\* Keine Treffer für die Datenbanksuche gegen eine randomisierte Datenbank (*automatic decoy database search*)

\*\* Ions Score > Grenzwert 1 kennzeichnet Peptididentifikationen mit signifikanter Homologie (*significant homology*).

\*\*\* Ions Score > Grenzwert 2 kennzeichnet Peptididentifikationen mit Identitätsgarantie (*identity or extensive homology*).

## 9. Anhang

**Tab. 9.1.3 Hintergrundsignale.** Diese Signale waren in fast allen aufgenommenen MS-Spektren präsent und wurden daher vor der Datenbanksuche eliminiert.

[M+H<sup>+</sup>]

789.34; 817.21; 833.14; 837.11; 839.13; 855.06; 871.01; 881.25; 892.45; 908.40; 1022.07; 1023.40; 1044.05; 1046.07; 1060.03; 1064.02; 1066.05; 1178.65; 1249.08; 1271.06; 1287.06; 1460.12; 1476.07; 2163.07; 2235.17; 2273.17; 2289.14; 3262.43; 3300.75; 3316.78

**Tab. 9.1.4 Das erste nicht-homologe Protein in der Ergebnisliste der PMF-Suche (zugehörig zu Tab. 9.1.1).** Die Mascot v2.2-Suchparameter entsprechen den Einstellungen von Tab. 9.1.1.

Nr.	Datenbanknummer	Name	Molekulargewicht (Da)	Mascot-Score	Zugeordnete Peptide
1	gi 109472262	PREDICTED: hypothetical protein [Rattus norvegicus]	21357	42	6
2	gi 74203310	unnamed protein product [Mus musculus]	12752	46	5
3	gi 109467173	PREDICTED: similar to Tuftelin [Rattus norvegicus]	45002	63	11
4	-	-	-	-	-
5	gi 62078569	galactokinase 2 [Rattus norvegicus]	51135	38	10
6	gi 82898739	PREDICTED: similar to CG15643-PA [Mus musculus]	24317	47	6
7	gi 70909345	sciellin [Mus musculus]	73611	45	15
8	gi 471981	uridine kinase	29831	26	5
9	gi 26348503	unnamed protein product [Mus musculus]	20693	44	8
10	gi 62663427	PREDICTED: similar to U11/U12 snRNP 48K [Rattus norvegicus]	39858	43	7
11	gi 68341995	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4, 18kDa (NADH-coenzyme Q reductase) [Rattus norvegicus]	19785	39	6
12	gi 28972818	mKIAA1720 protein [Mus musculus]	41848	46	9
13	gi 26892066	retinoblastoma-binding protein 1 [Mus musculus]	2797	38	2
14	gi 13928417	vascular endothelial cell specific protein 18 [Rattus norvegicus]	47335	35	11
15	gi 26330364	unnamed protein product [Mus musculus]	13842	33	6

9. Anhang

**Tab. 9.1.5 Proteinidentifikation mit dem höchsten Mascot-Score bei der Suche gegen die randomisierte Datenbank (zugehörig zu Tab. 9.1.1).** Die Mascot v2.2-Suchparameter entsprechen den Einstellungen von Tab. 9.1.1.

Nr.	Datenbanknummer	Name	Molekulargewicht (Da)	Mascot-Score*	Zugeordnete Peptide
1	gi 32171175	Random sequence, was G10 protein [Homo sapiens]	16426	15	4
2	gi 18765702	Random sequence, was engulfment and cell motility 1 isoform 2 [Homo sapiens]	26996	10	2
3	gi 4758448	Random sequence, was guanine nucleotide binding protein gamma 11 precursor [Homo sapiens]	8340	7	1
4	-	-	-	-	-
5	gi 5453640	Random sequence, was candidate for split hand/foot malformation type 1 [Homo sapiens]	7797	17	2
6	gi 4507783	Random sequence, was ubiquitin-conjugating enzyme E2H isoform 1 [Homo sapiens]	20848	6	1
7	gi 7305139	Random sequence, was histone 1, H3f [Mus musculus]	15445	9	2
8	gi 7706425	Random sequence, was U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm8 [Homo sapiens]	10655	12	2
9	gi 4758448	Random sequence, was guanine nucleotide binding protein gamma 11 precursor [Homo sapiens]	8340	11	2
10	gi 11560065	Random sequence, was SREB2 [Rattus norvegicus]	40497	9	2
11	gi 7305139	Random sequence, was histone 1, H3f [Mus musculus]	15445	12	2
12	gi 5453640	Random sequence, was candidate for split hand/foot malformation type 1 [Homo sapiens]	7797	7	1
13	gi 11560065	Random sequence, was SREB2 [Rattus norvegicus]	40497	7	1
14	gi 7706425	Random sequence, was U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm8 [Homo sapiens]	10655	5	1
15	gi 4502209	Random sequence, was ADP-ribosylation factor 5 [Homo sapiens]	20233	11	3

\*Mascot-Scores größer als 65 sind signifikant.

**Tab. 9.1.6 Datenprozessierung (A)** Peptide für die externe Kalibration der MS-Spektren (Applied Biosystems, SCIEX). **(B)** Einstellungen von Flex Analysis v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) für die Prozessierung der MS-Spektren. **(C)** Einstellungen von Flex Analysis v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) für die Prozessierung der MS/MS-Spektren

**A**

Peptid	Monoisotopische Masse [M+H]
Des-Arg-Bradykinin	904.4681
Angiotensin I	1296.6853
Glu-Fibrinopeptide B	1570.6774
ACTH_clip (1-17)	2093.0867
ACTH_clip (18-39)	2465.1989
ACTH_clip (7-38)	3657.9294

**B**

Datenbanksuche & Biotools v2.2	
Peak detection algorithm	SNAP
Signal to noise threshold	3
Relative intensity threshold	0%
Maximal number of peaks	200
Quality factor threshold	50
Building block	Averagine
Smoothing algorithm (Savitzky Golay)	Width = 0.2 m/z; 1 cycle
Baseline subtraction (Median)	Flatness = 0.8

**C**

	Datenbanksuche	Biotools v2.2
Peak detection algorithm	SNAP	SNAP
Signal to noise threshold	6	1.5
Relative intensity threshold	0%	0%
Maximal number of peaks	50	200
Quality factor threshold	0	0
Building block	Averagine	Averagine
Fragment peak width	0.75 m/z	0.75 m/z
Smoothing algorithm (Savitzky Golay)	Width = 0.2 m/z; 1 cycle	Width = 0.2 m/z; 1 cycle
Baseline subtraction (Median)	Flatness = 0.8	Flatness = 0.8

**Tab. 9.1.7 Homologiesuche (A)** Einstellungen der WU-BLAST2-Suche (SGD; [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). **(B)** Einstellungen der NCBI-BLAST-Suche ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

**A**

BLAST Program	BLASTP - Protein query to protein database
Sequence Datasets	Genes: Protein encoding ...Open Reading Frames (DNA or Protein) ...Genomics (Coding and Introns) sequences of defined ORFs (DNA) ...Open Reading Frames + 1000 bp Up & Downstream (DNA)
Comparison Matrix	BLOSUM62
Cutoff Score (S value)	3
Word Length (W value)	3
Expect threshold (E threshold)	3
Filter options	On (SEG filter)

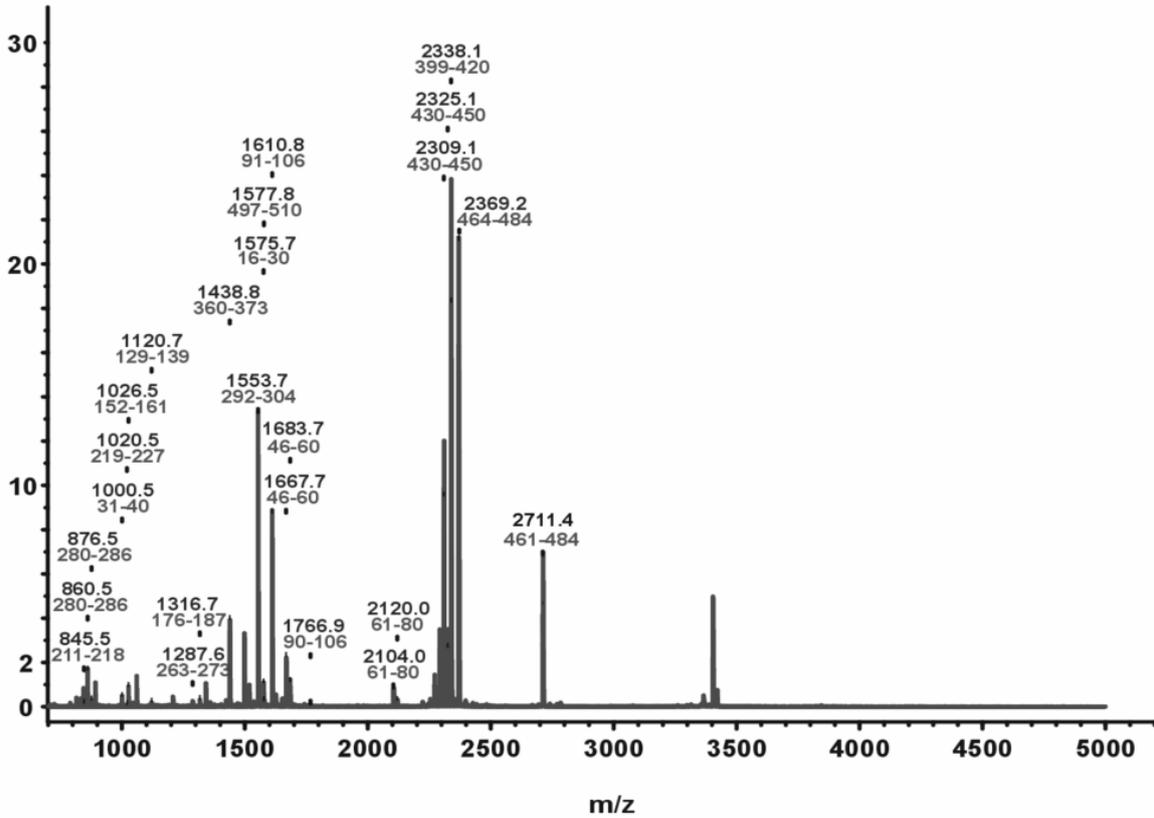
**B**

BLAST Program	BLASTP - Protein query to protein database
Database	nr
CD-Search	yes
Organisms	all
Compositional adjustments	Composition-based statistics
Filter	no
Expect threshold (E threshold)	10
Word size	3
Matrix	BLOSUM62 (Gap Costs = Existence: 11 Extension: 1)

Abb. 9.1.1

A

[Abs. Int. \* 1000]



B

10	20	30	40	50	60	70
QKTGTAEMSS	ILEERILGAD	TSVDLEETGR	VLSIGDGIAR	VHGLRNVQAE	EMVEFSSGLK	GMSLNLEPDN
80	90	100	110	120	130	140
VGVVVFGNDK	LIKEGDIVKR	TGAIVDVPG	DELLGRVDA	LGNAIDGKGP	VGSKIRRRVG	LKAPGIIPRI
150	160	170	180	190	200	210
SVREPMQTGI	KAVDSLVPIG	RGQRELIIGD	RQTGKTSIAI	DTIINQKRFN	DGTDEKKKLY	CIYVAIGQKR
220	230	240	250	260	270	280
STVAQLVKRL	TDADAMKYTI	VVSATASDAA	PLQYLAPYSG	CSMGEYFRDN	GKHALIIYDD	LSKQAVAYRQ
290	300	310	320	330	340	350
MSLLLRPPG	REAYPGDVFY	LHSRLLEAA	KMNDSFGGGS	LTALPVIETQ	AGDVSAYIPT	NVISITDGQI
360	370	380	390	400	410	420
FLETIFYK	IRPAINVGLS	VSRVGSAAQT	RAMQVAGTM	KLELAQYREV	AAFAQFGSDL	DAATQQLLSR
430	440	450	460	470	480	490
GVRITELLKQ	GQYSPMAIEE	QVAVIYAGVR	GYLDKLEPSK	ITKFESAFLS	HVVSQHQSLI	GNIRTDGKIS
500	510					
EQSDAKLKEI	VTNFLAGFEP					

C

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
845.5174	0.0083	211	218	0	
860.4906	-0.0116	280	286	0	
876.468	-0.0291	280	286	0	M
1000.5355	-0.043	31	40	0	
1020.4695	-0.0448	219	227	1	
1026.5443	-0.0499	152	161	0	
1120.6715	-0.0486	129	139	1	
1287.6455	-0.0488	263	273	0	
1316.6855	-0.0565	176	187	0	
1438.8105	-0.0383	360	373	0	
1553.7011	-0.0372	292	304	0	
1575.7436	-0.0424	16	30	0	
1577.8074	-0.0499	497	510	1	
1610.8279	-0.0469	91	106	0	
1667.7401	-0.0543	46	60	0	
1683.7341	-0.0552	46	60	0	M
1766.9199	-0.0559	90	106	1	
2103.9645	-0.0733	61	80	0	
2119.9609	-0.0719	61	80	0	M
2309.0823	-0.0771	430	450	0	
2325.0877	-0.0665	430	450	0	M
2338.1035	-0.0638	399	420	0	
2369.1798	-0.0562	464	484	0	
2711.3965	-0.0662	461	484	1	

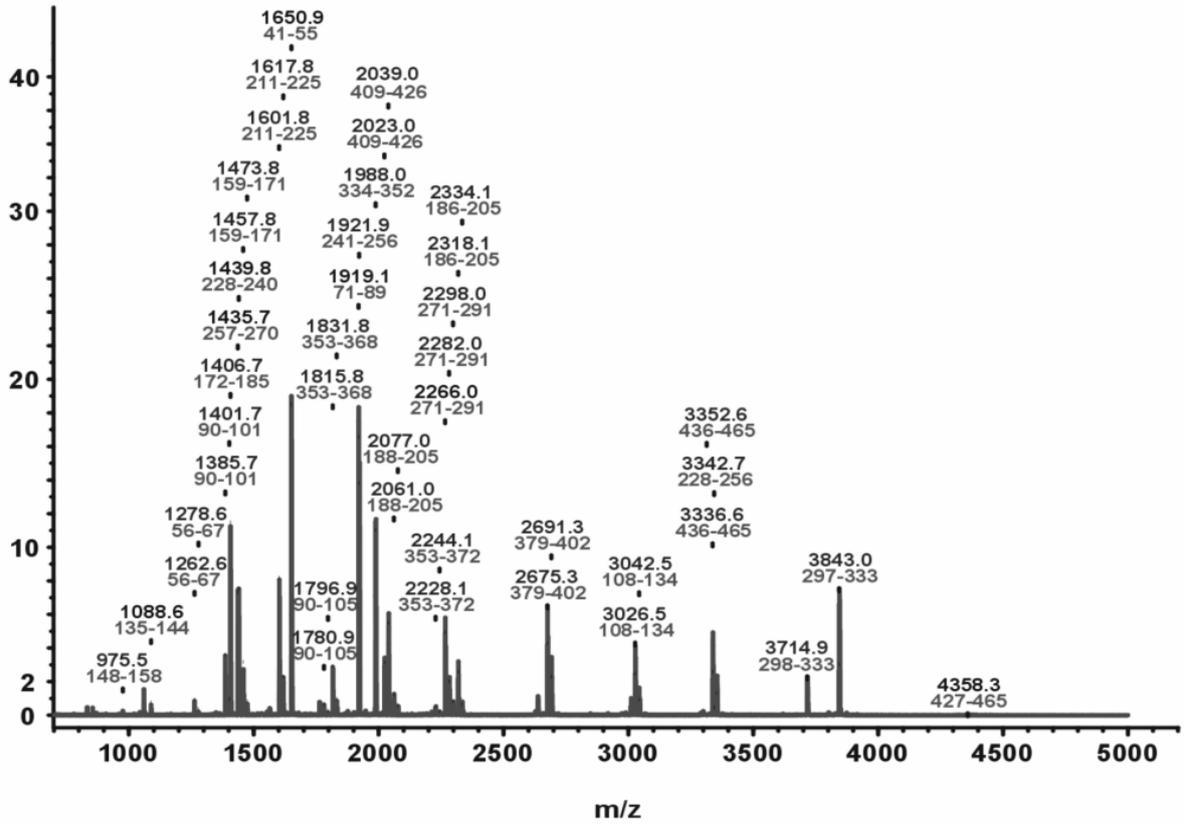
**Nicht zugeordnet:** 789.6652, 815.5583, 843.4907, 1143.5107, 1207.4396, 1341.6778, 1358.6767, 1423.5422, 1424.3535, 1424.6092, 1469.7656, 1497.7817, 1509.7012, 1517.7791, 1535.6789, 1568.8109, 1625.8701, 1630.0860, 1651.6886, 1662.7538, 1679.5920, 2222.1080, 2254.0786, 2271.1036, 2292.0610, 2351.1535, 2397.1698, 2426.2036, 2693.3739, 2739.4010, 2768.4062, 2782.4241, 3364.1335, 3402.5198, 3418.5128, 3843.9593

**Abb. 9.1.1 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit alpha.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 1 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit alpha. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit alpha (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums (m/z, gemessene Masse [M+H]; Error [Da], Abweichung von der theoretischen Masse in Dalton; Start/Ende, Position in der Proteinsequenz; Miss, Anzahl der überlesenen Schnittstellen (*missed cleavage sites*); Mod., Modifikation (M, ein oxidiertes Methionin, 2M, zwei oxidierte Methionine etc.).

Abb. 9.1.2

A

[Abs. Int. \* 1000]



B

10	20	30	40	50	60	70
EFRTATGQIV	AVIGAVVDVQ	FDEGLPPILN	ALEVQGRESR	LVLEVAQHLG	ESTVRTIAMD	GTEGLVRGQK
80	90	100	110	120	130	140
VLDSGAPIKI	PVGPETLGR	MNVIGEPIDE	RGP IKTKQFA	PIHAEAPEFI	EMSVEQEILV	TGIKVVDDLLA
150	160	170	180	190	200	210
PYAKGGKIGL	FGGAGVGKT	LIMELINNVA	KAHGGYSVFA	GVGERTREGN	DLYHEMIESG	VINLKDATSK
220	230	240	250	260	270	280
VALVYQMNNE	PPGARARVAL	TGLTVAEYFR	DQEGQDVLLF	IDNIFRFTQA	GSEVSALLGR	IPSAVGYQPT
290	300	310	320	330	340	350
LATDMGTMQE	RITTTKKGSI	TSVQAIYVPA	DDLTD PAPAT	TFAHLDATTV	LSRAIAELGI	YPAVDPLDST
360	370	380	390	400	410	420
SRIMDPNIVG	SEHYDVARGV	QKILQDYKSL	QDIIAILGMD	ELSEEDKLT	SRARKIQRFL	SQPFQVAEVF
430	440	450	460	470		
TGHMGKLVPL	KETIKGFQOI	LAGDYDHLPE	QAFYVMVPIE	EAVAKADKLA	EEHGS	

C

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
975.5311	-0.031	148	158	0	
1088.605	-0.0299	135	144	0	
1262.6182	-0.0226	56	67	0	
1278.6135	-0.0223	56	67	0	M
1385.6803	-0.0289	90	101	0	
1401.6721	-0.032	90	101	0	M
1406.6575	-0.0235	172	185	0	
1435.7272	-0.0267	257	270	0	
1439.7634	-0.0258	228	240	0	
1457.811	-0.0286	159	171	0	
1473.8032	-0.0312	159	171	0	M
1601.7807	-0.0297	211	225	0	
1617.774	-0.0313	211	225	0	M
1650.895	-0.0223	41	55	0	
1780.9328	-0.0297	90	105	1	
1796.9264	-0.031	90	105	1	M
1815.8426	-0.0268	353	368	0	
1831.831	-0.0333	353	368	0	M
1919.0689	-0.0271	71	89	1	
1921.9373	-0.0281	241	256	0	
1988.005	-0.0285	334	352	0	
2022.9779	-0.0326	409	426	0	
2038.9734	-0.032	409	426	0	M
2060.9664	-0.0293	188	205	0	
2076.9552	-0.0354	188	205	0	M
2228.0885	-0.0243	353	372	1	
2244.058	-0.0497	353	372	1	M
2266.048	-0.0361	271	291	0	
2282.0398	-0.0393	271	291	0	M
2298.0344	-0.0396	271	291	0	2 M
2318.1122	-0.0322	186	205	1	
2334.1002	-0.0392	186	205	1	M
2675.3457	-0.0351	379	402	1	
2691.3415	-0.0341	379	402	1	M
3026.5221	-0.0322	108	134	0	
3042.5241	-0.0251	108	134	0	M
3336.6008	-0.0236	436	465	0	
3342.7066	-0.0302	228	256	1	
3352.5978	-0.0216	436	465	0	M
3714.8575	-0.0286	298	333	0	
3842.959	-0.022	297	333	1	
4358.3041	0.0262	427	465	2	

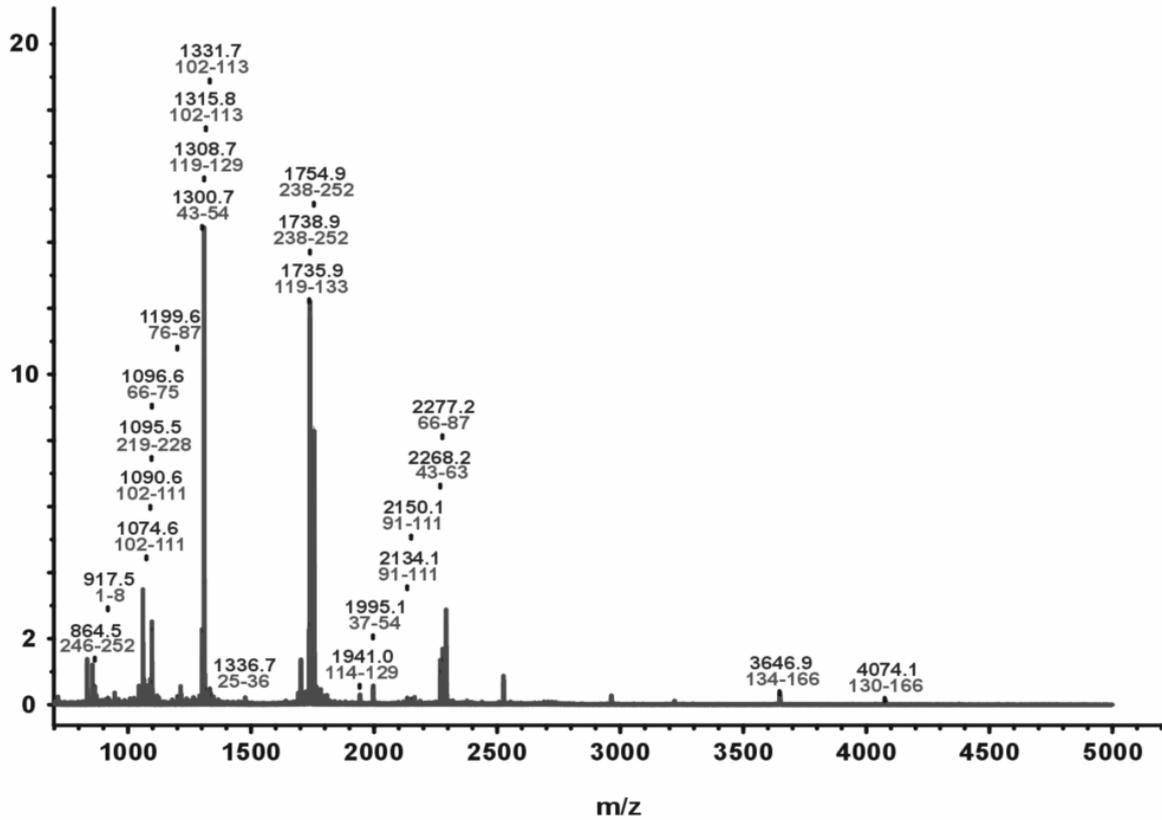
**Nicht zugeordnet:** 1348.3307, 1362.6776, 1391.7039, 1463.7187, 1553.7717, 1564.2144, 1606.8795, 1762.9200, 1777.9586, 1875.0628, 1947.0614, 1985.1178, 2211.9969, 2218.0494, 2338.1349, 2627.3375, 2637.2250, 2989.3135, 3009.4783, 3011.9998, 3028.9945, 3288.5926, 3298.2570, 3618.9049, 3798.9499, 3872.9674

**Abb. 9.1.2 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit beta.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 2 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit beta. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit beta (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

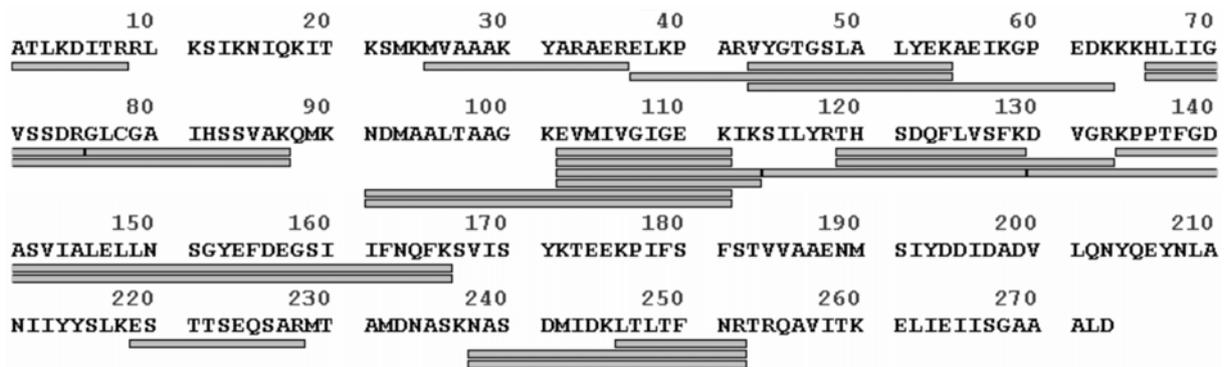
Abb. 9.1.3

A

[Abs. Int. \* 1000]



B



C

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
864.5053	0.0116	246	252	0	
917.5207	-0.0207	1	8	1	
1074.5723	-0.014	102	111	0	
1090.5638	-0.0174	102	111	0	M
1095.4642	-0.027	219	228	0	
1096.5932	-0.0177	66	75	0	
1199.6179	-0.0022	76	87	0	
1300.6738	-0.0044	43	54	0	
1308.6537	-0.0045	119	129	0	
1315.7531	-0.0122	102	113	1	
1331.7479	-0.0124	102	113	1	M
1336.6516	-0.0638	25	36	2	
1735.8726	-0.0036	119	133	1	
1738.8795	0.0003	238	252	1	
1754.8795	0.0054	238	252	1	M
1941.033	0.0102	114	129	1	
1995.096	0.0051	37	54	1	
2134.0923	0.0042	91	111	1	M
2150.0843	0.0012	91	111	1	2 M
2268.1818	0.0061	43	63	2	
2277.2229	0.0098	66	87	1	
3646.8716	0.0401	134	166	0	
4074.1384	0.0891	130	166	1	

**Nicht zugeordnet:** 920.5324, 945.5074, 1008.5055, 1024.4924, 1117.5813, 1124.5968, 1179.5637, 1213.6309, 1221.6610, 1237.6284, 1264.6615, 1290.6361, 1293.6325, 1330.6265, 1346.6069, 1365.6793, 1690.8712, 1694.8716, 1701.2091, 1720.8660, 1763.8799, 1766.8801, 1777.8825, 1781.8834, 1792.8860, 1806.9134, 2291.2368, 2437.3387, 2524.3761, 2962.6102, 3218.7965

**Abb. 9.1.3 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit gamma.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdau von Spot 3 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit gamma. (B) Diagramm des Trypsinverdau von Untereinheit gamma (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

## Abb. 9.1.4

A

MNENLFASFITPTMMGLPIVVTIIMFPSILFPSSERLISNRLHSFQHWLIKLIKQMMLIHT  
 PKGRTWALMIVSLIMFIGSTNLLGLLPHTFTPTTQLSMDLSMAIPLWAGAVILGFRHKLKNS  
 LAHFSPQGTPISLIPMLIIIIETISLFIQPMALAVRLTANITAGHLLMHLIGGATLVLMDISP  
 PTATITFIILLLLTVLEFAVALIQAYVFTLLVSLYLHDNT

B

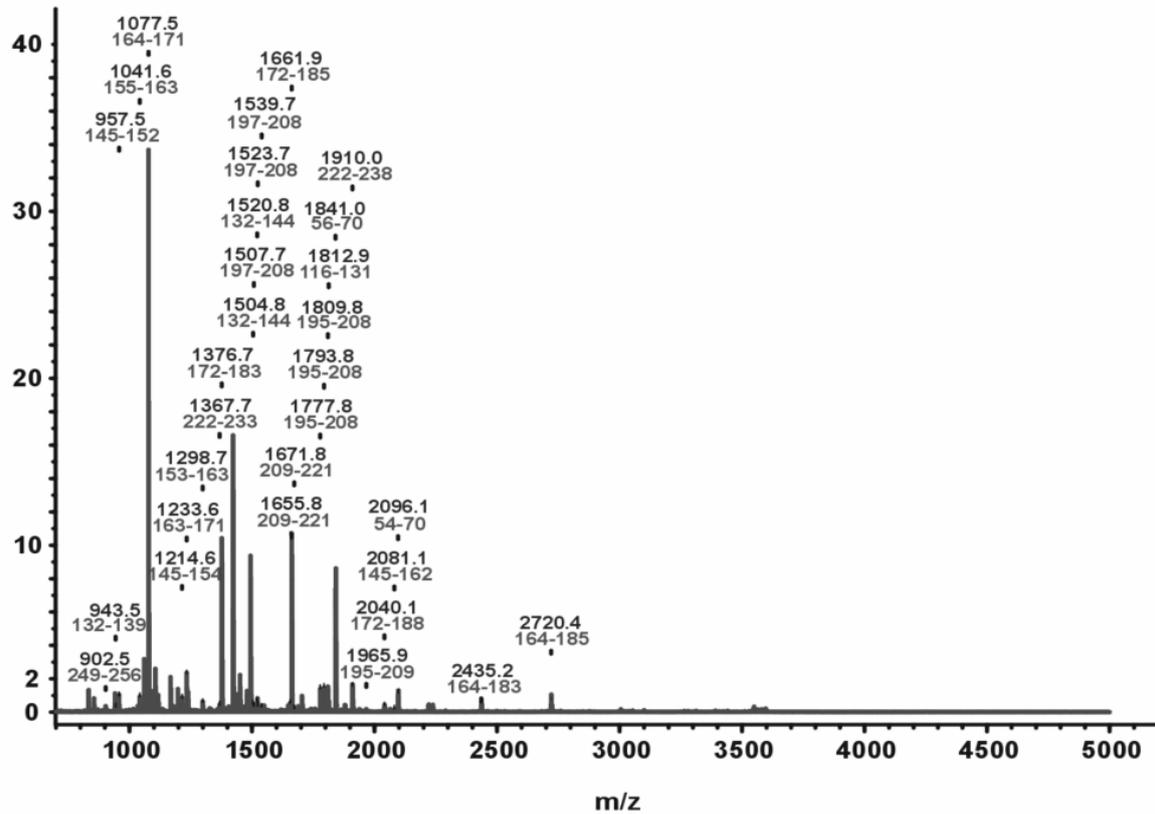
m/z	Miss	Sequenz
4044.0757	0	MNENLFASFITPTMMGLPIVVTIIMFPSILFPSSER
4627.4199	1	MNENLFASFITPTMMGLPIVVTIIMFPSILFPSSERLISNR
1892.0654	1	LISNRLHSFQHWLIK
2359.4125	2	LISNRLHSFQHWLIKLIK
1308.7212	0	LHSFQHWLIK
1776.0683	1	LHSFQHWLIKLIK
2855.6303	2	LHSFQHWLIKLIKQMMLIHTPK
1565.927	1	LIKQMMLIHTPK
1779.0496	2	LIKQMMLIHTPKGR
1098.5798	0	QMMLIHTPK
1311.7024	1	QMMLIHTPKGR
4538.5758	2	HKLKNSLAHFSPQGTPISLIPMLIIIIETISLFIQPMALAVR
4273.4219	1	LKNSLAHFSPQGTPISLIPMLIIIIETISLFIQPMALAVR
4032.2429	0	NSLAHFSPQGTPISLIPMLIIIIETISLFIQPMALAVR

**Abb. 9.1.4 Theoretischer Verdau der ATP-Synthase, ATP6 Untereinheit (oder Untereinheit a).** (A) Proteinsequenz der ATP6 Untereinheit. Transmembranregionen, wie von TMHMM ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) berechnet, sind unterstrichen. Schnittstellen von Trypsin (R, K) sind schwarz hervorgehoben. (B) Potentielle Trypsinfragmente im Massenbereich von 700 – 5000 Da, wie von Biotoools 2.2 (Bruker Daltonics) berechnet.

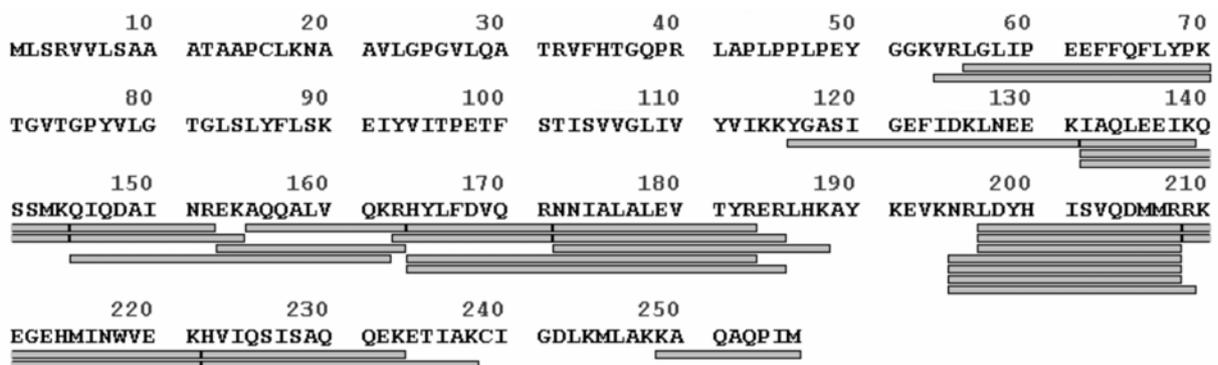
Abb. 9.1.5

A

[Abs. Int. \* 1000]



B



C

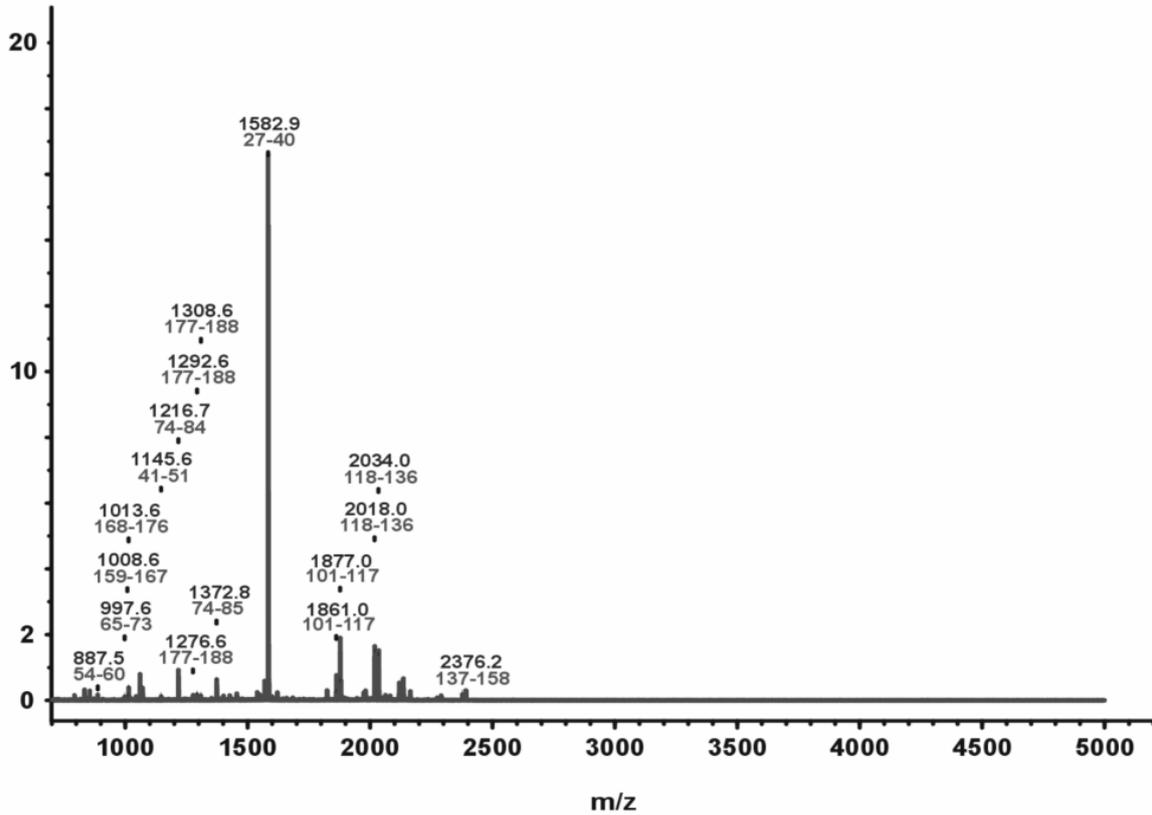
m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
902.4647	-0.0117	249	256	1	M
943.5191	-0.0267	132	139	0	
957.4898	-0.0214	145	152	0	
1041.5942	-0.0221	155	163	1	
1077.5255	-0.0221	164	171	0	
1214.6281	-0.0207	145	154	1	
1233.6228	-0.0259	163	171	1	
1298.7344	-0.0194	153	163	2	
1367.7076	-0.0201	222	233	0	
1376.7373	-0.0158	172	183	0	
1504.7834	-0.0205	132	144	1	
1507.6729	-0.0303	197	208	0	
1520.798	-0.0008	132	144	1	M
1523.6731	-0.025	197	208	0	M
1539.6818	-0.0112	197	208	0	2 M
1655.8083	-0.0239	209	221	2	
1661.8835	-0.0133	172	185	1	
1671.8265	-0.0006	209	221	2	M
1777.8272	-0.02	195	208	1	
1793.8281	-0.0141	195	208	1	M
1809.8237	-0.0133	195	208	1	2 M
1812.8831	-0.0182	116	131	1	
1840.9711	-0.0172	56	70	0	
1910.0267	-0.0074	222	238	1	
1965.9105	-0.0276	195	209	2	2 M
2040.1219	-0.0129	172	188	2	
2081.1203	-0.0258	145	162	2	
2096.1311	-0.0267	54	70	1	
2435.2478	-0.0351	164	183	1	
2720.3965	-0.0302	164	185	2	
<b>Nicht zugeordnet:</b> 940.4643, 1015.6883, 1033.5338, 1059.5069, 1062.5080, 1089.5278, 1105.5217, 1109.5201, 1115.4911, 1117.5162, 1134.5381, 1167.6227, 1179.6126, 1195.6152, 1197.6059, 1203.4065, 1205.5622, 1238.6580, 1326.7235, 1332.7219, 1388.7279, 1404.7403, 1419.5895, 1422.7925, 1434.7883, 1437.7805, 1450.7800, 1465.7969, 1478.7763, 1479.8035, 1493.8287, 1521.8130, 1547.6962, 1647.4181, 1673.8870, 1687.8097, 1703.7957, 1740.1318, 1756.1065, 1878.9040, 1916.8662, 1938.0083, 2064.0935, 2220.1932, 2237.2250, 2706.9323, 3004.5140, 3052.5049, 3098.6359, 3279.5851, 3390.7328, 3546.8347, 3562.7907, 3578.7939, 3594.7864					

**Abb. 9.1.5 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit b.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 5 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit b. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit b (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.6

A

[Abs. Int. \* 1000]



B

10	20	30	40	50	60	70
MAAPATSVLS	RQVRSFSTSV	VRPFSKLVLP	PVQVYGIIEGR	YATALYSAAS	KQKRLDQVEK	ELLRVGQLLK
80	90	100	110	120	130	140
DPKVS LAVLN	PYIKRSIKVK	SLKDITTEK	FSPLTANLMN	LLAENGR LGN	TQGVISAFST	IMSVHRGEVP
150	160	170	180	190	200	210
CTVTTAFPLD	EAVLSELKTV	LNSFLSKGQI	LNLEVKTDPS	IMGGMIVRIG	EKYVDMSAKS	KIQKLSKAMR

DLL

C

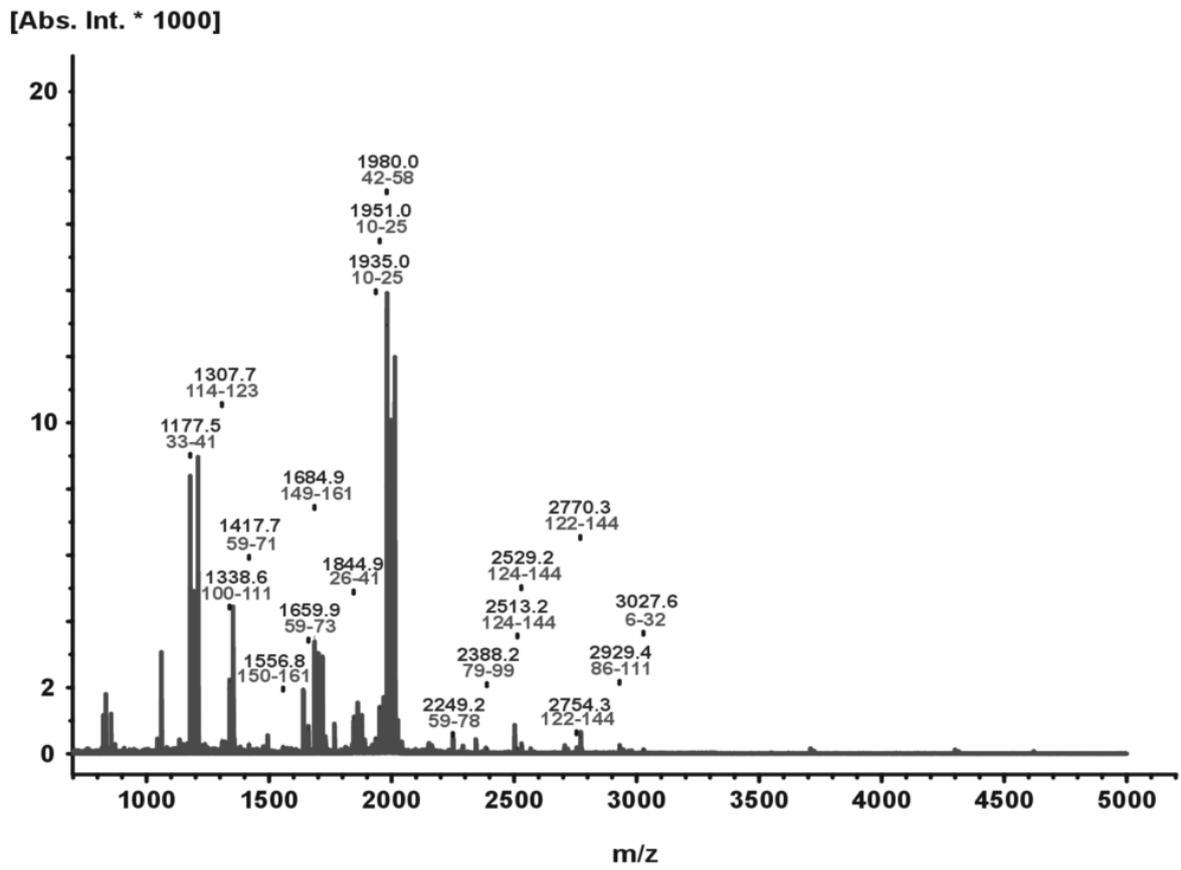
m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
887.4911	-0.0034	54	60	1	
997.5836	-0.0204	65	73	1	
1008.5682	-0.0042	159	167	0	
1013.5903	-0.0086	168	176	0	
1145.5764	-0.0073	41	51	0	
1216.7299	-0.0001	74	84	0	
1276.6209	-0.0178	177	188	0	
1292.628	-0.0056	177	188	0	M
1308.6264	-0.0022	177	188	0	2 M
1372.8271	-0.004	74	85	1	
1582.9099	0.0036	27	40	0	
1860.9717	0.0082	101	117	0	
1876.9624	0.0039	101	117	0	M
2018.0442	-0.0045	118	136	0	
2034.0414	-0.0022	118	136	0	M
2376.1929	-0.0073	137	158	0	

**Nicht zugeordnet:** 1020.4872, 1062.0510, 1070.6277, 1400.8232, 1426.8049, 1454.8813, 1538.8935, 1547.5672, 1564.8812, 1566.8858, 1568.4783, 1599.9065, 1620.8431, 1683.9813, 1824.2462, 1861.9553, 1877.9505, 1973.0987, 1980.2337, 2061.0573, 2081.1868, 2119.0891, 2133.0729, 2135.0817, 2390.2116

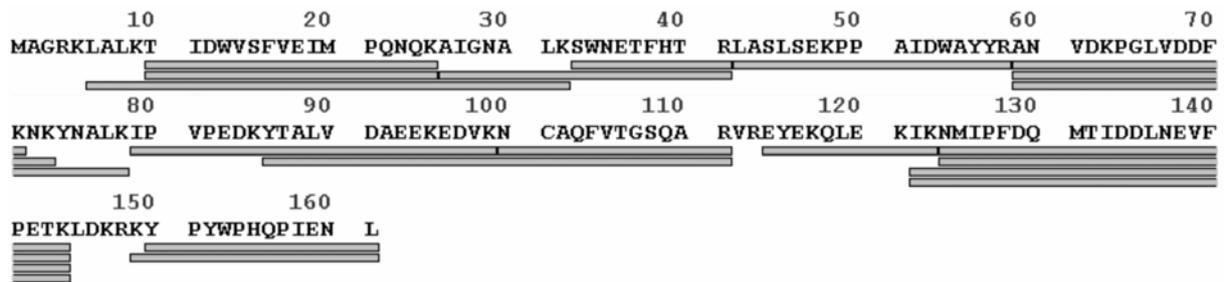
**Abb. 9.1.6 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit OSCP.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 6 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit OSCP. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit OSCP (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.7

A



B



C

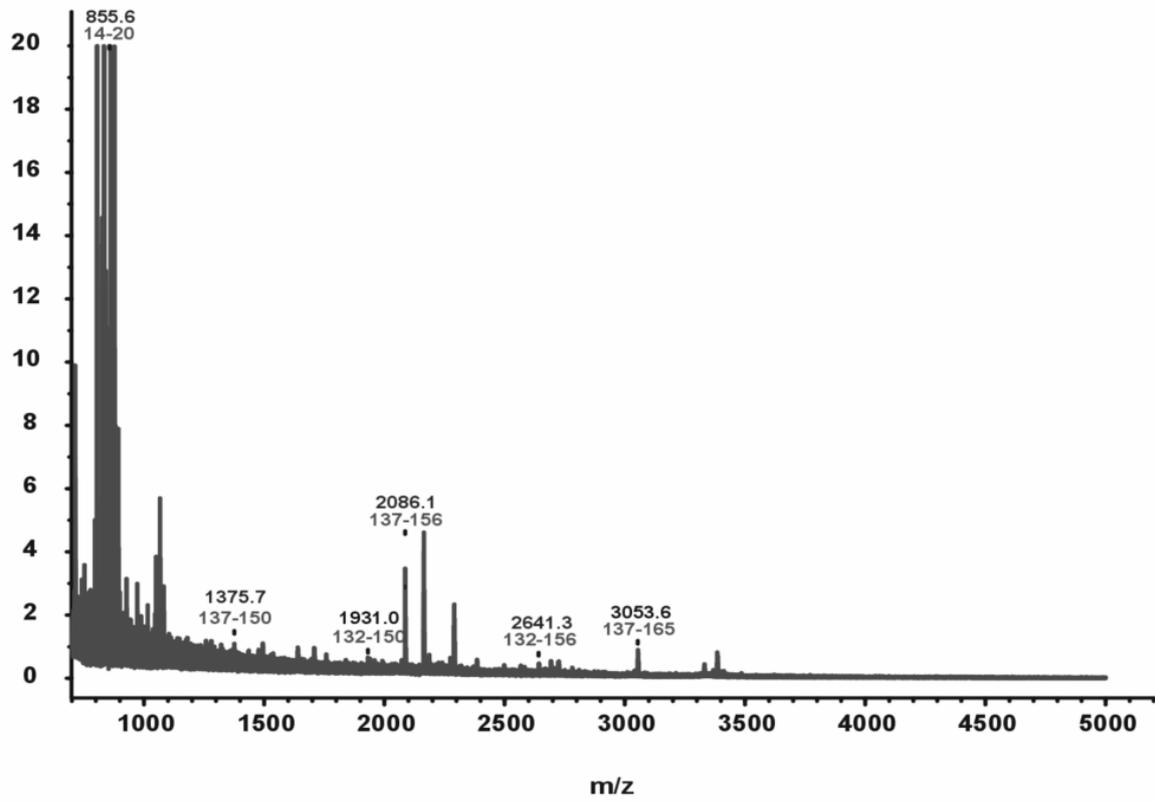
m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
1177.5422	0.0037	33	41	0	
1307.6805	-0.04	114	123	2	
1338.6259	0.0041	100	111	0	
1417.7336	0.0015	59	71	0	
1556.7664	0.0132	150	161	0	
1659.8792	0.0092	59	73	1	
1684.8608	0.0126	149	161	1	
1844.946	0.0058	26	41	1	
1934.9887	0.0206	10	25	0	
1950.9774	0.0145	10	25	0	M
1980.0345	0.012	42	58	0	
2249.2045	0.0122	59	78	2	
2388.2215	0.0035	79	99	2	
2513.154	-0.0034	124	144	0	M
2529.1564	0.004	124	144	0	2 M
2754.3394	0.0029	122	144	1	M
2770.3354	0.004	122	144	1	2 M
2929.4091	0.0096	86	111	2	
3027.6154	-0.0545	6	32	2	
<b>Nicht zugeordnet:</b> 823.5429, 1082.5760, 1133.5381, 1148.5410, 1160.5185, 1162.5336, 1165.5405, 1175.5203, 1181.5412, 1190.5353, 1192.5445, 1205.5312, 1209.5350, 1220.5461, 1237.5426, 1320.6065, 1323.6591, 1334.6580, 1352.6479, 1357.6382, 1364.6382, 1380.6394, 1475.7568, 1487.7557, 1493.7439, 1572.7688, 1638.8689, 1657.7977, 1688.8616, 1699.8630, 1707.7896, 1716.8552, 1728.8566, 1765.7468, 1810.8783, 1813.9011, 1838.9333, 1848.9499, 1851.9383, 1857.9418, 1860.9452, 1872.9491, 1876.9410, 1888.9325, 1965.9782, 1983.9999, 1995.0400, 1998.0542, 2008.0315, 2012.0309, 2024.0348, 2096.0303, 2139.0731, 2150.0914, 2160.1152, 2167.0426, 2342.9868, 2383.9536, 2501.2593, 2566.2730, 2705.1691, 2716.1023, 2943.4258, 2964.5008, 2977.5468, 3707.8182, 3721.8277, 4297.2428, 4311.2474, 4618.5499					

**Abb. 9.1.7 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit d.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 7 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit d. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit d (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

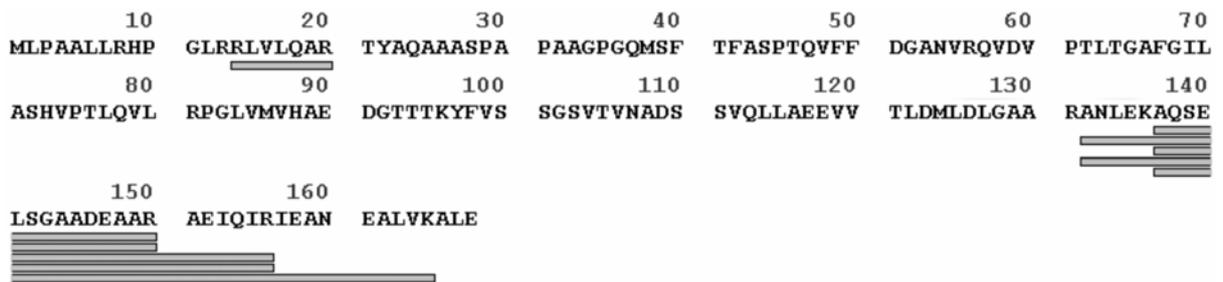
Abb. 9.1.8

A

[Abs. Int. \* 1000]



B



**C**

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
855.5739	0.0217	14	20	1	
1375.6644	0.0196	137	150	0	
1930.9552	0.0088	132	150	1	
2086.0517	-0.0005	137	156	1	
2641.328	-0.0259	132	156	2	
3053.5698	-0.0163	137	165	2	
<b>Nicht zugeordnet:</b> 704.8624, 710.9558, 713.5912, 723.4152, 726.7446, 741.0862, 752.0629, 795.7490, 804.4547, 806.4270, 823.6259, 824.5807, 825.1872, 832.3857, 834.3779, 839.6278, 841.1308, 842.5675, 845.1414, 854.3329, 857.0914, 861.1021, 870.5477, 876.3369, 877.0654, 878.5301, 883.6066, 892.3584, 893.0360, 899.5629, 927.6184, 971.6427, 987.6029, 1015.6549, 1034.1275, 1049.6020, 1050.1058, 1052.0777, 1059.6816, 1065.6046, 1081.6069, 1084.0564, 1098.0298, 1277.0801, 1279.7318, 1493.7287, 1638.8631, 1707.7647, 2185.0398, 2383.9397, 2691.2987, 2723.2698, 3329.7417, 3383.5877					

**Abb. 9.1.8 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit delta.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 8 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit delta. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit delta (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.9

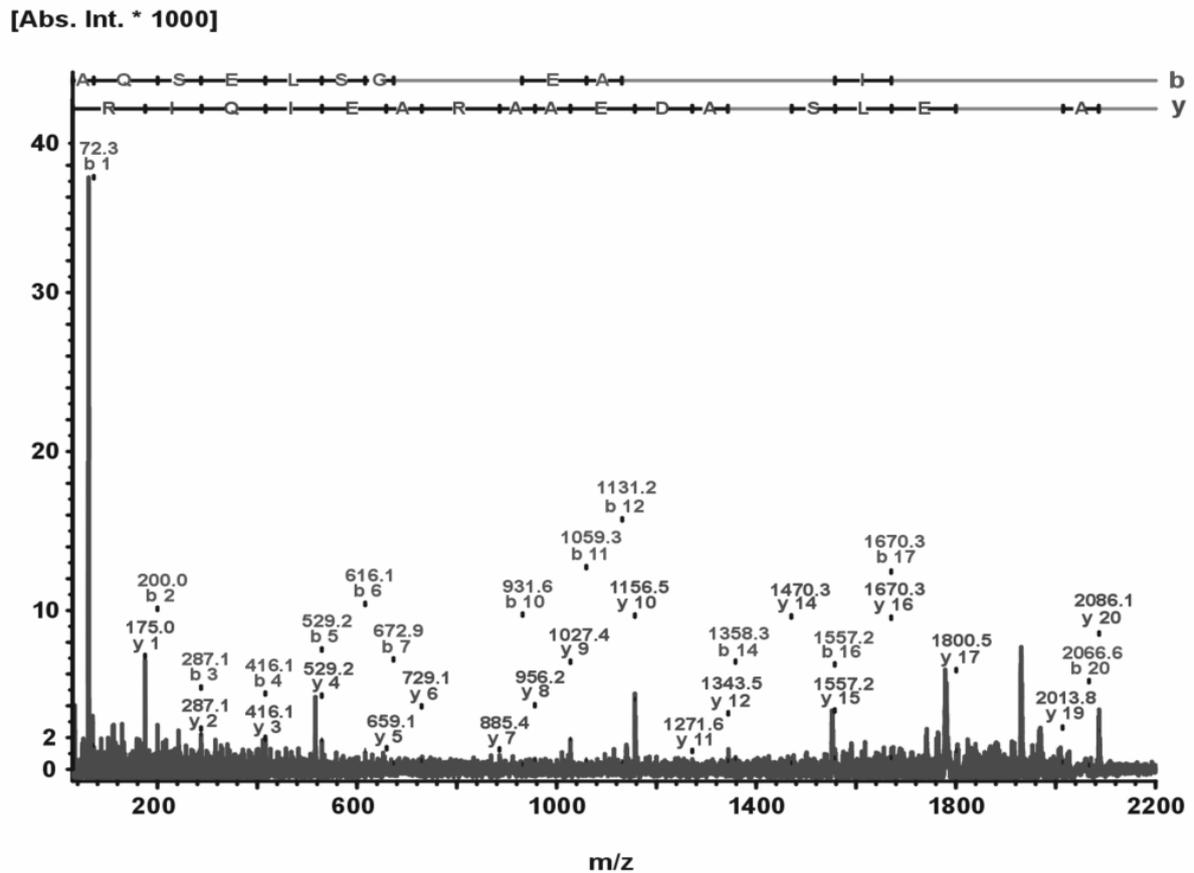
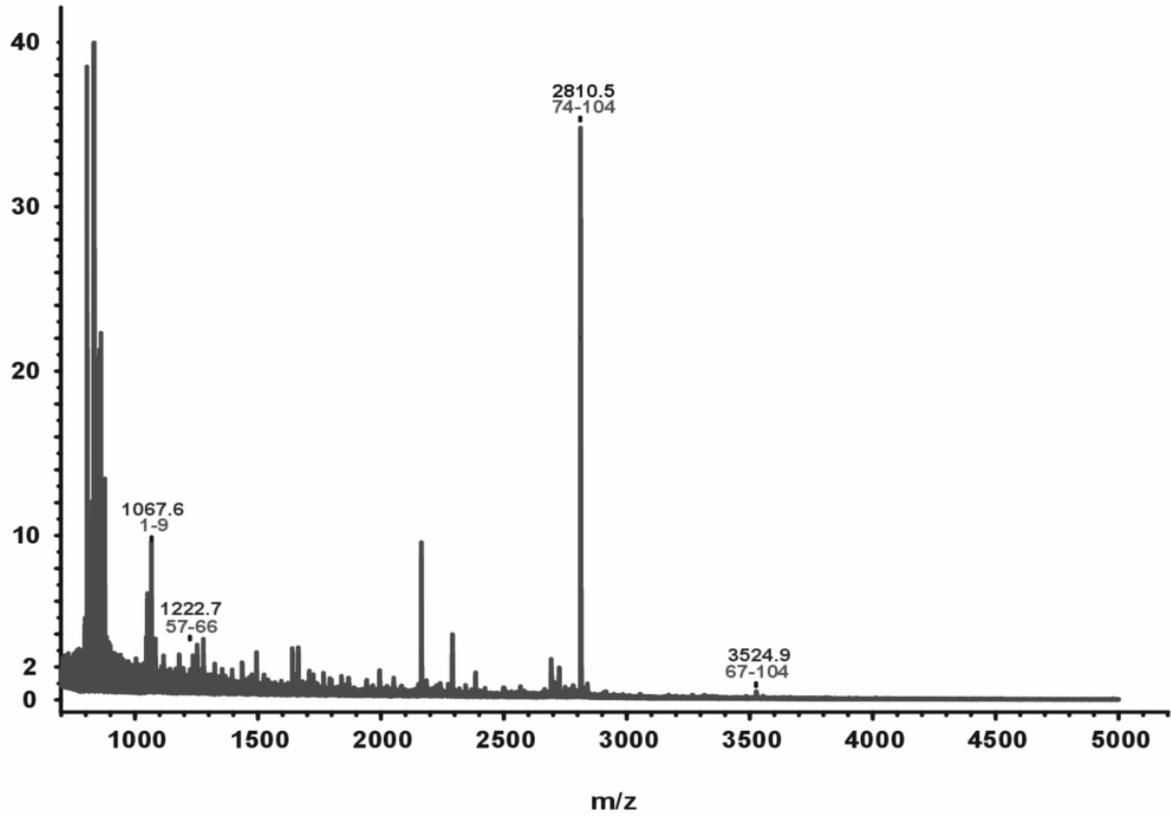


Abb. 9.1.9 MS/MS-Spektrum des tryptischen Fragments AQSELSGADEAARAEIQIR (Untereinheit delta, Spot 8; Abb. 5.2C). Nur Fragmente, die als b- und y-Ionen identifiziert worden sind, sind im Spektrum markiert.

Abb. 9.1.10

A

[Abs. Int. \* 1000]



B

10	20	30	40	50	60	70
<u>MFACAKLART</u>	<u>PALIRAGSRV</u>	<u>AYRPISASVL</u>	<u>SRPETRTGEG</u>	<u>STVFNGAQNG</u>	<u>VCQLIRREFQ</u>	<u>TSVISRDIDT</u>
80	90	100	110	120	130	140
<u>AAKFIGAGAA</u>	<u>TVGVAGSGAG</u>	<u>IGTVFGSLII</u>	<u>GYARNPSLKQ</u>	<u>QLFSYAILGF</u>	<u>ALSEAMGLFC</u>	<u>LMVAFLILFA</u>

M

**C**

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
1067.556	0.0071	1	9	1	
1222.6982	0.0444	57	66	1	
2810.5475	0.0278	74	104	0	
3524.8765	0.0019	67	104	1	
<b>Nicht zugeordnet:</b> 704.9933, 713.5417, 728.3564, 795.7446, 796.7230, 804.4655, 806.4432, 823.6208, 825.2003, 832.3924, 834.3908, 839.6072, 841.1420, 842.5816, 845.1535, 854.3336, 855.5690, 861.1146, 870.2876, 870.5614, 876.4545, 877.0795, 878.5555, 883.5943, 893.0459, 927.6115, 940.5779, 971.6146, 1003.3370, 1030.1207, 1034.1370, 1036.6331, 1045.5889, 1049.6289, 1050.1158, 1051.5563, 1065.6143, 1081.6257, 1082.0633, 1115.6721, 1179.6289, 1194.6690, 1232.6542, 1234.7089, 1238.6340, 1252.7263, 1256.6593, 1263.7273, 1266.7110, 1277.1118, 1277.7343, 1323.7093, 1353.7811, 1366.7577, 1394.7414, 1434.7932, 1475.7970, 1487.7757, 1493.7531, 1523.8785, 1594.9313, 1638.8854, 1651.9344, 1662.9774, 1707.7907, 1723.8808, 1765.7531, 1791.7469, 1796.0015, 1838.9552, 1867.9483, 1940.9568, 1993.9952, 2051.1911, 2152.1016, 2184.1139, 2225.1438, 2239.1369, 2342.9994, 2383.9630, 2497.2495, 2501.2510, 2566.2575, 2663.3506, 2691.3119, 2695.2944, 2705.2079, 2723.2951, 2748.3334, 2780.3208, 2826.5298, 2838.5182					

**Abb. 9.1.10 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit c.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdau von Spot 9 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit c. (B) Diagramm des Trypsinverdau von Untereinheit c (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.11

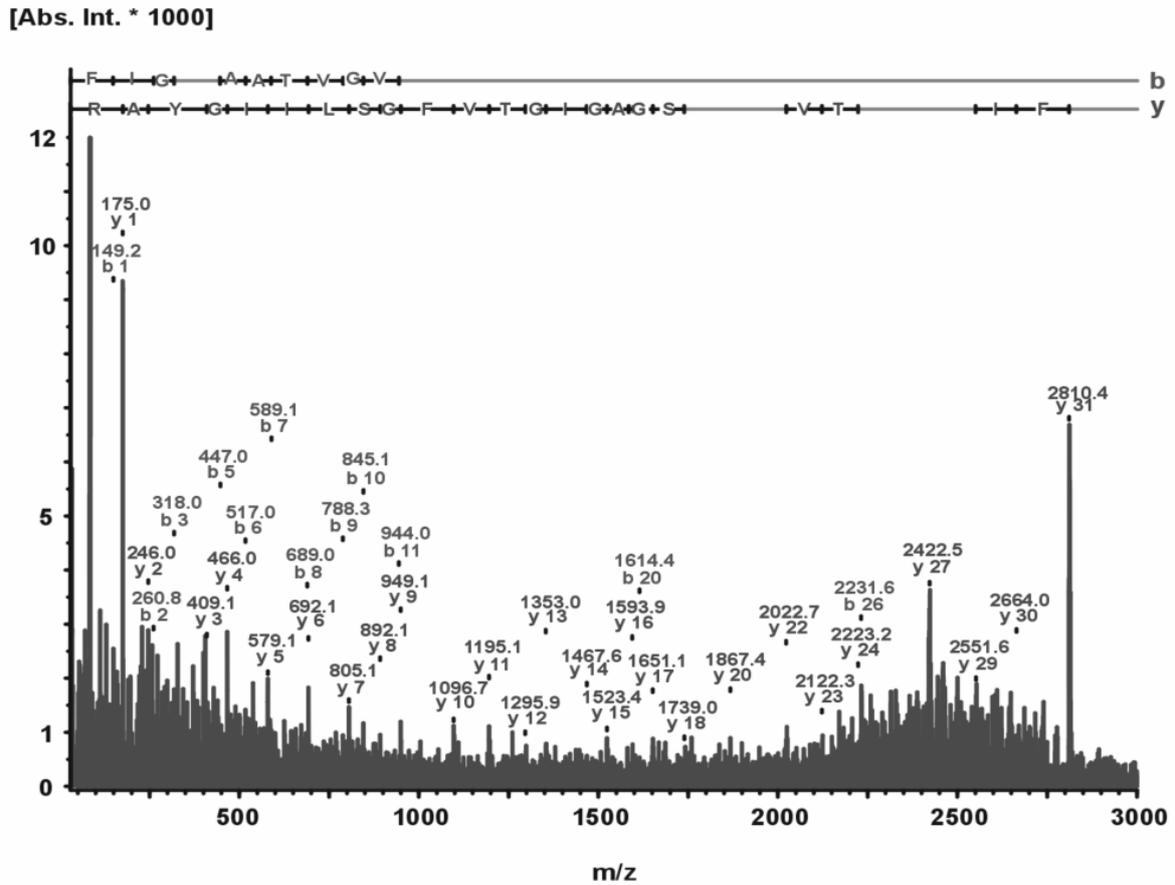
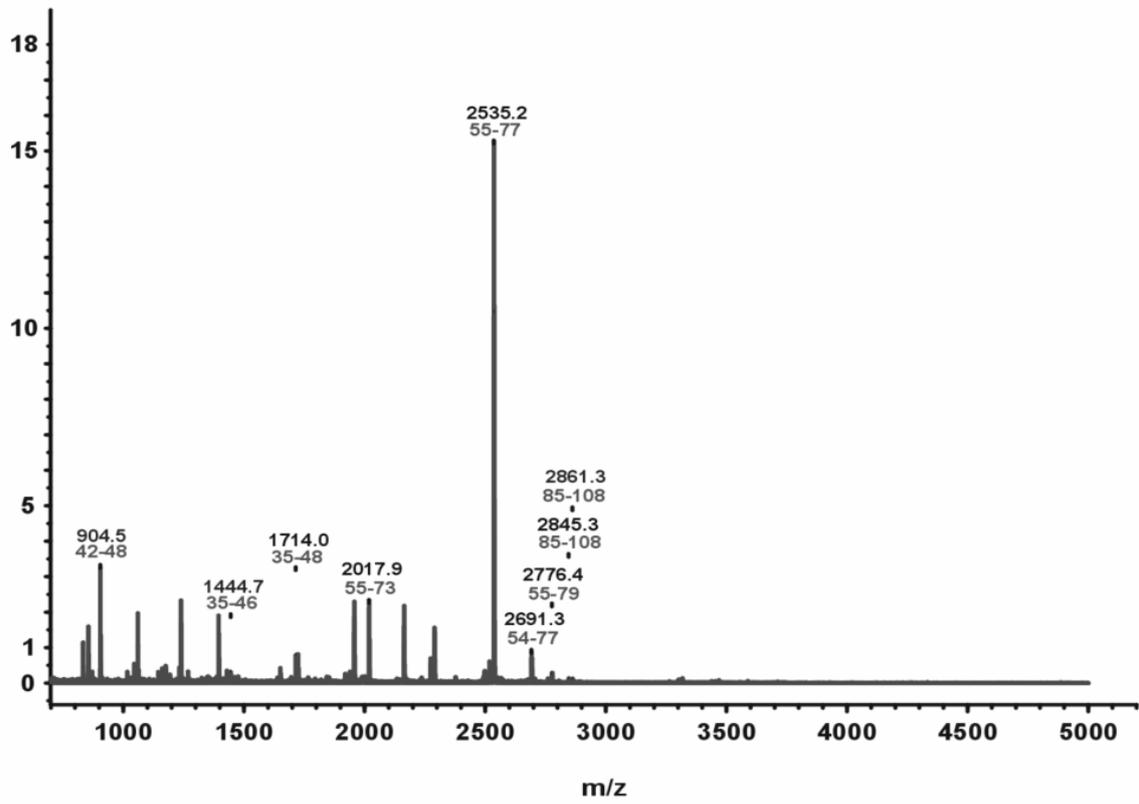


Abb. 9.1.11 MS/MS-Spektrum des tryptischen Fragments FIGAGAATVGVAGSGAGIGTVFGLIIGYAR (Untereinheit c, spot 9; Abb. 5.2C). Nur Fragmente, die als b- und y-Ionen identifiziert worden sind, sind im Spektrum markiert.

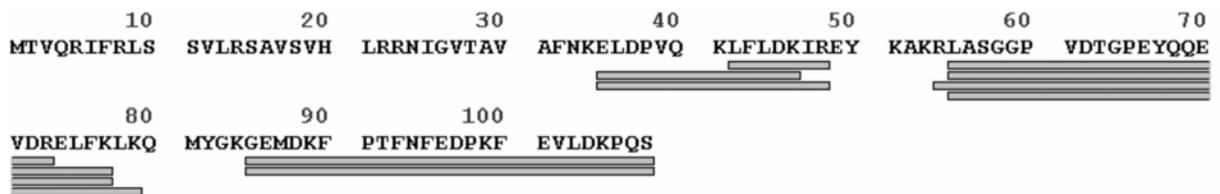
Abb. 9.1.12

A

[Abs. Int. \* 1000]



B



**C**

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
904.5398	-0.0216	42	48	1	
1444.7394	-0.0652	35	46	1	
1713.9586	-0.0311	35	48	2	
2017.9174	-0.0287	55	73	0	
2535.197	-0.0391	55	77	1	
2691.2977	-0.0395	54	77	2	
2776.3702	-0.0449	55	79	2	
2845.2953	-0.0435	85	108	2	
2861.2964	-0.0373	85	108	2	M

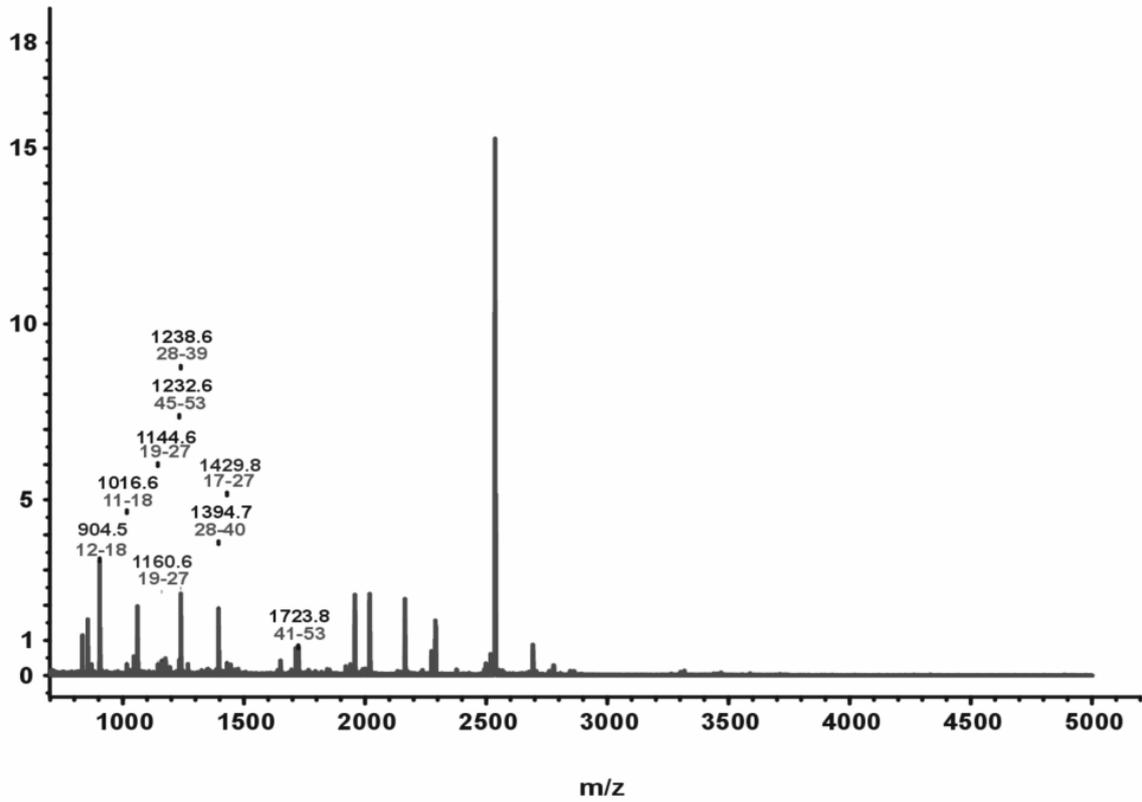
**Nicht zugeordnet:** 1016.5786, 1030.5807, 1044.6097, 1058.6311, 1144.5831, 1160.5844, 1175.5633, 1192.5694, 1232.6061, 1238.5887, 1350.6572, 1394.6913, 1429.7669, 1461.7570, 1638.8284, 1650.8798, 1723.8210, 1765.7004, 1843.0513, 1919.0697, 1938.0766, 1956.0951, 1989.9007, 2376.2840, 2492.1826, 2497.1895, 2517.1776, 2675.8606, 2705.1249, 2760.3533

**Abb. 9.1.12 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit F6.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 10 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit F6. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit F6 (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

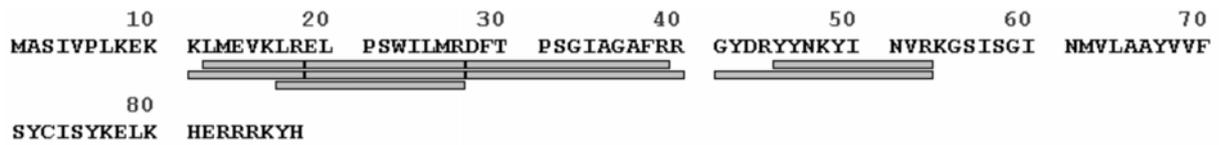
Abb. 9.1.13

A

[Abs. Int. \* 1000]



B



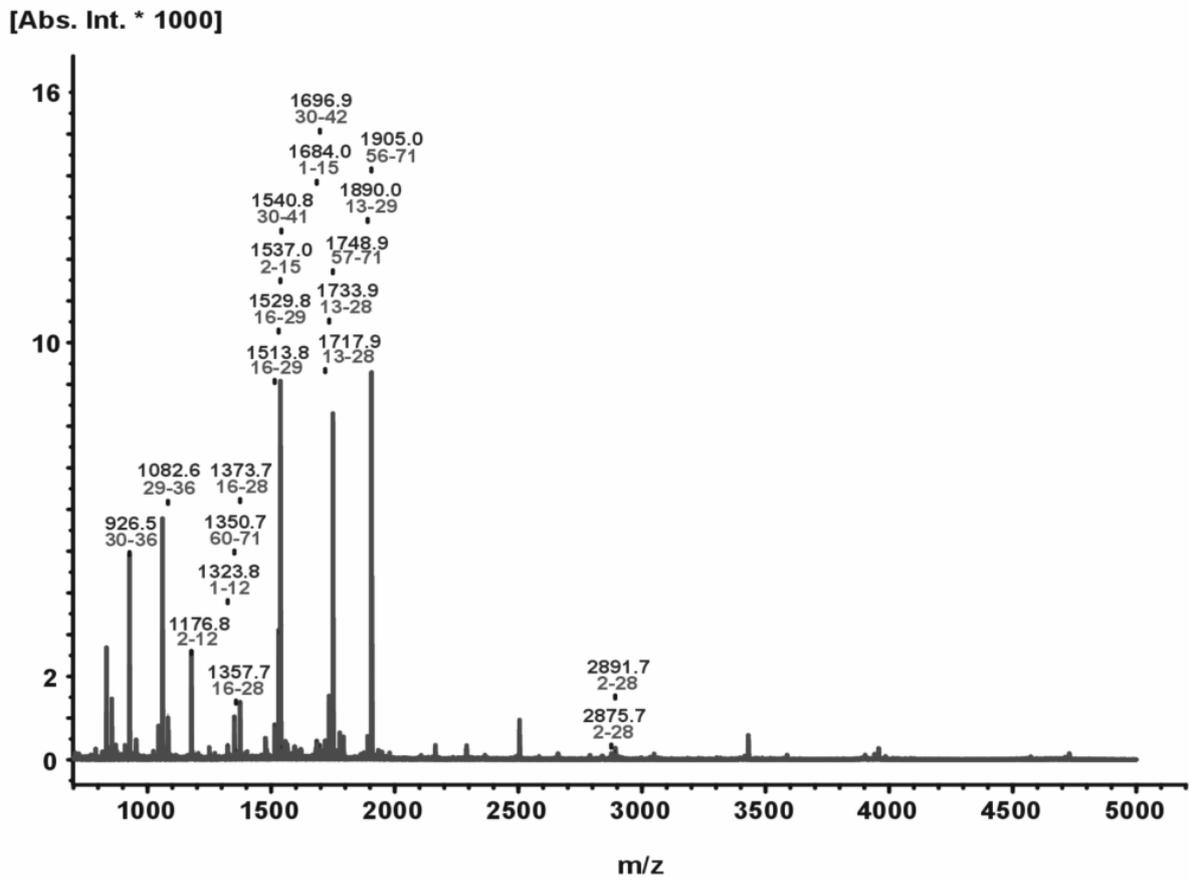
**C**

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
904.5398	0.0114	12	18	1	M
1016.5786	-0.0499	11	18	2	
1144.5831	-0.0352	19	27	0	
1160.5844	-0.0288	19	27	0	M
1232.6061	-0.0361	45	53	1	
1238.5887	-0.0276	28	39	0	
1394.6913	-0.0262	28	40	1	
1429.7669	-0.0315	17	27	1	M
1723.821	-0.034	41	53	2	
<b>Nicht zugeordnet:</b> 1030.5807, 1044.6097, 1058.6311, 1175.5633, 1192.5694, 1350.6572, 1444.7394, 1461.7570, 1638.8284, 1650.8798, 1713.9586, 1765.7004, 1843.0513, 1919.0697, 1938.0766, 1956.0951, 1989.9007, 2017.9174, 2376.2840, 2492.1826, 2497.1895, 2517.1776, 2535.1970, 2675.8606, 2691.2977, 2705.1249, 2760.3533, 2776.3702, 2845.2953, 2861.2964					

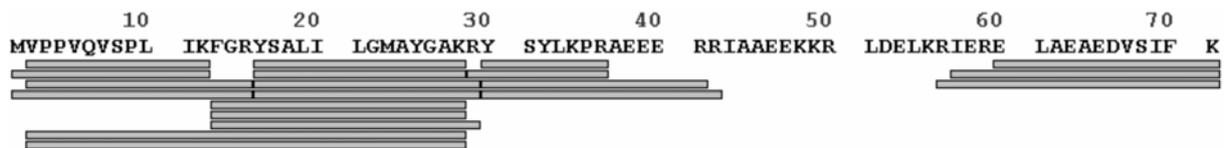
**Abb. 9.1.13 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit f.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 10 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit f. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit f (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.14

A



B



C

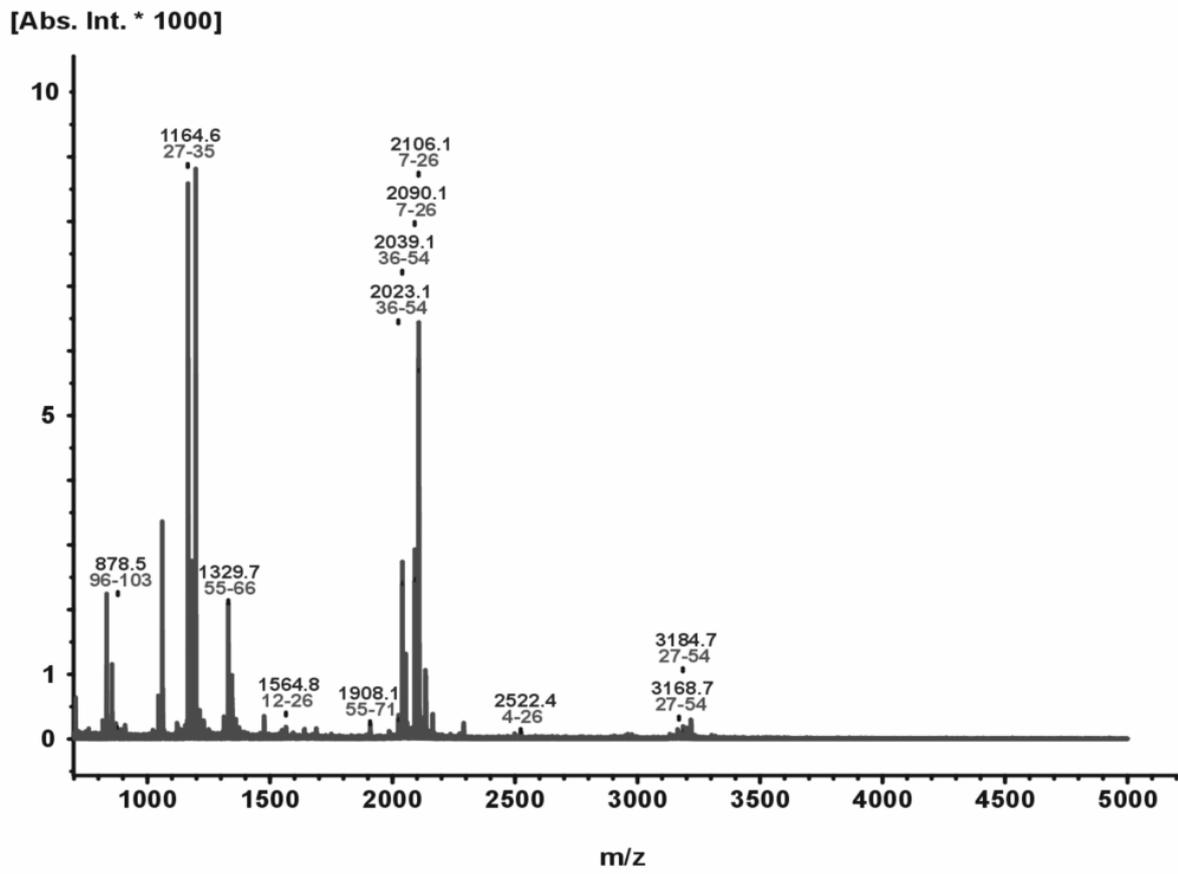
m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
926.5248	0.0154	30	36	0	
1082.6225	0.012	29	36	1	
1176.755	0.02	2	12	0	
1323.7789	0.0085	1	12	0	M
1350.7005	0.0218	60	71	0	
1357.7349	0.0166	16	28	0	
1373.7345	0.0212	16	28	0	M
1513.843	0.0235	16	29	1	
1529.841	0.0266	16	29	1	M
1536.9574	0.0314	2	15	1	
1540.8117	0.0363	30	41	1	
1683.9811	0.0197	1	15	1	M
1696.9053	0.0289	30	42	2	
1717.9401	0.0308	13	28	1	
1733.9335	0.0292	13	28	1	M
1748.9424	0.0359	57	71	1	
1890.0297	0.0244	13	29	2	M
1905.0455	0.0379	56	71	2	
2875.6581	0.0316	2	28	2	
2891.671	0.0495	2	28	2	M

**Nicht zugeordnet:** 789.6733, 874.9832, 875.4941, 1401.7336, 1476.2795, 1481.8393, 1542.9182, 1545.8360, 1556.8519, 1564.9564, 1593.9783, 1607.9928, 1619.8460, 1680.2760, 1730.9265, 1760.9406, 1775.9544, 1776.9416, 1791.0391, 1933.0322, 1947.1357, 2498.2585, 2503.3693, 2659.4817, 2836.4674, 3047.7625, 3414.4576, 3428.9255, 3585.0459, 3900.7715, 3939.2683, 3955.2607, 4725.8269

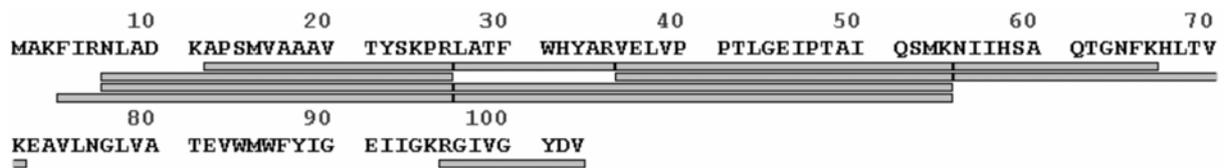
**Abb. 9.1.14 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit e.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 11 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit e. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit e (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.15

A



B



C

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
878.4855	0.0126	96	103	1	
1164.6115	0.0166	27	35	0	
1329.7137	0.0228	55	66	0	
1564.8445	0.0293	12	26	0	M
1908.061	0.0161	55	71	1	
2023.1379	0.0235	36	54	0	
2039.139	0.0298	36	54	0	M
2090.1361	0.0299	7	26	1	
2106.1375	0.0364	7	26	1	M
2522.3789	0.0242	4	26	2	M
3168.7089	0.0175	27	54	1	
3184.7195	0.0332	27	54	1	M

**Nicht zugeordnet:** 760.0484, 1120.5951, 1152.5976, 1154.5751, 1168.6010, 1177.6018, 1179.6107, 1180.6175, 1186.5841, 1196.6018, 1208.6042, 1210.5822, 1212.5941, 1221.6332, 1228.5985, 1311.6980, 1341.6891, 1343.6650, 1344.7032, 1357.6967, 1360.7010, 1372.6946, 1639.9176, 1687.6864, 1985.2307, 2052.2570, 2058.1198, 2118.1256, 2122.1319, 2133.1452, 2134.1334, 2957.5329, 2976.5257, 3162.3952, 3199.7247, 3216.7105

**Abb. 9.1.15 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit g.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 12 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit g. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit g (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.16

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
1221.5953	0.0055	18	27	0	
1349.6904	0.0056	17	27	1	
1581.7772	0.0229	2	16	0	
1709.869	0.0198	2	17	1	

**Nicht zugeordnet:** 705.1007, 805.5781, 841.1016, 859.0611, 892.5537, 1028.0985

**Abb. 9.1.16 Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale im PMF des AGP Proteins (Fig. 3A; Tabelle 9.1.1).** Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.17

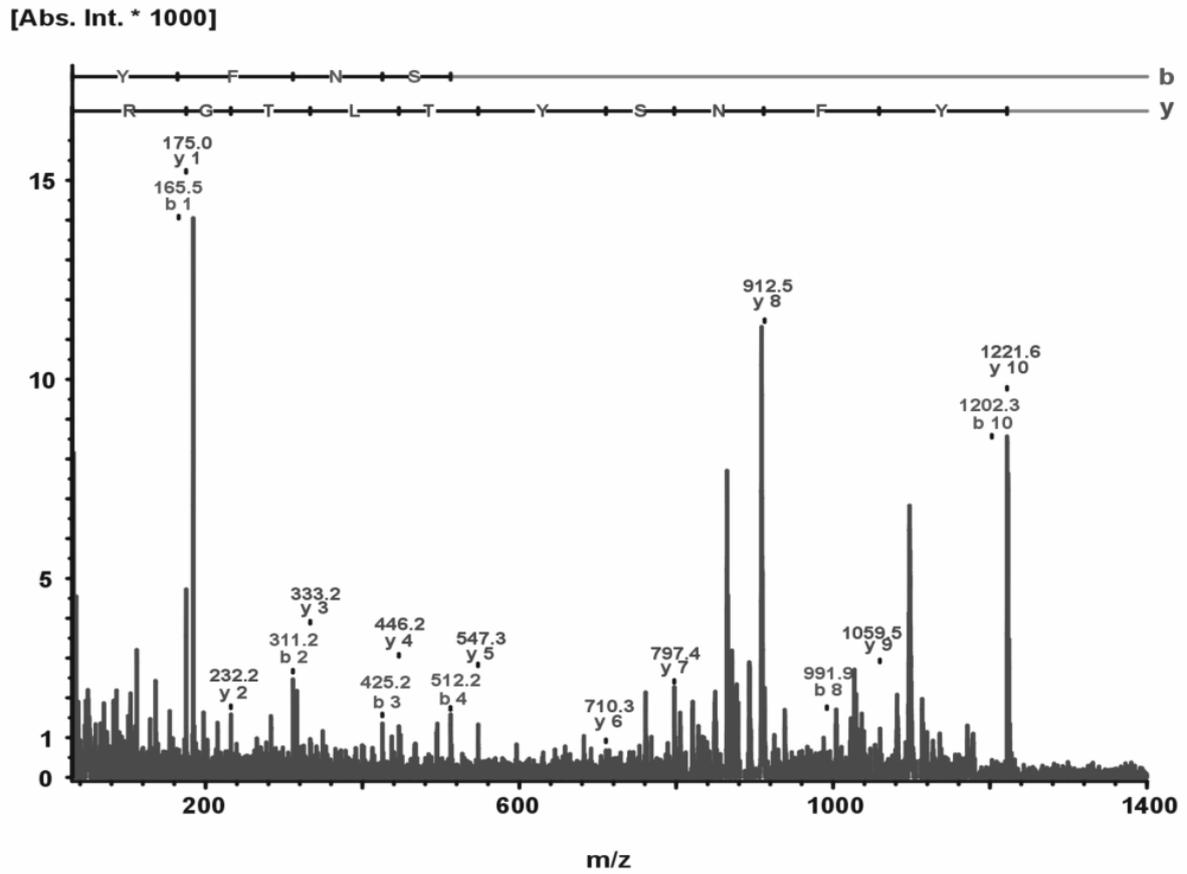


Abb. 9.1.17 MS/MS-Spektrum des tryptischen Fragments YFNSYTLTGR (AGP Protein, spot 13; Abb. 5.2C). Nur Fragmente, die als b- and y-Ionen identifiziert worden sind, sind im Spektrum markiert.

Abb. 9.1.18

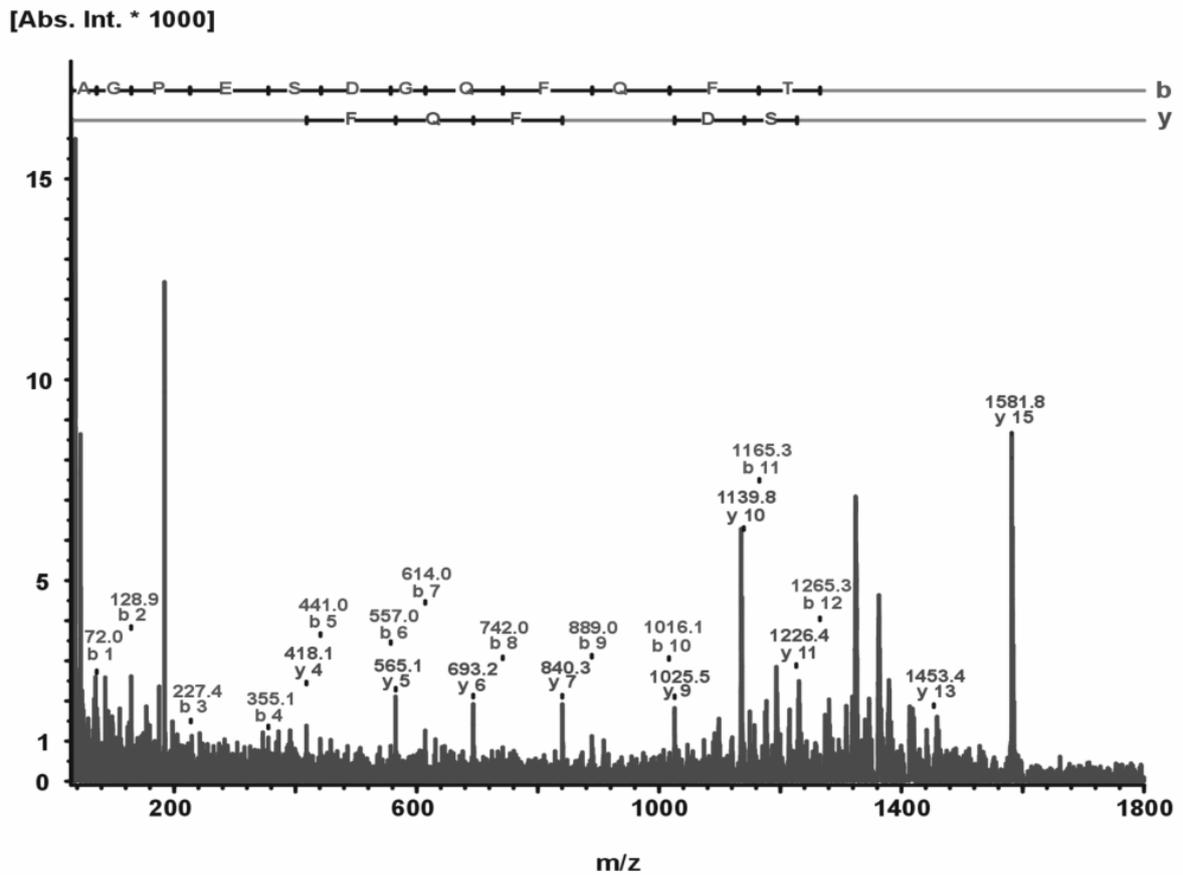


Abb. 9.1.18 MS/MS-Spektrum des tryptischen Fragments AGPESDYGQFQFTGIK (AGP Protein, spot 13; Abb. 5.2C). Nur Fragmente, die als b- and y-Ionen identifiziert worden sind, sind im Spektrum markiert.

Abb. 9.1.19

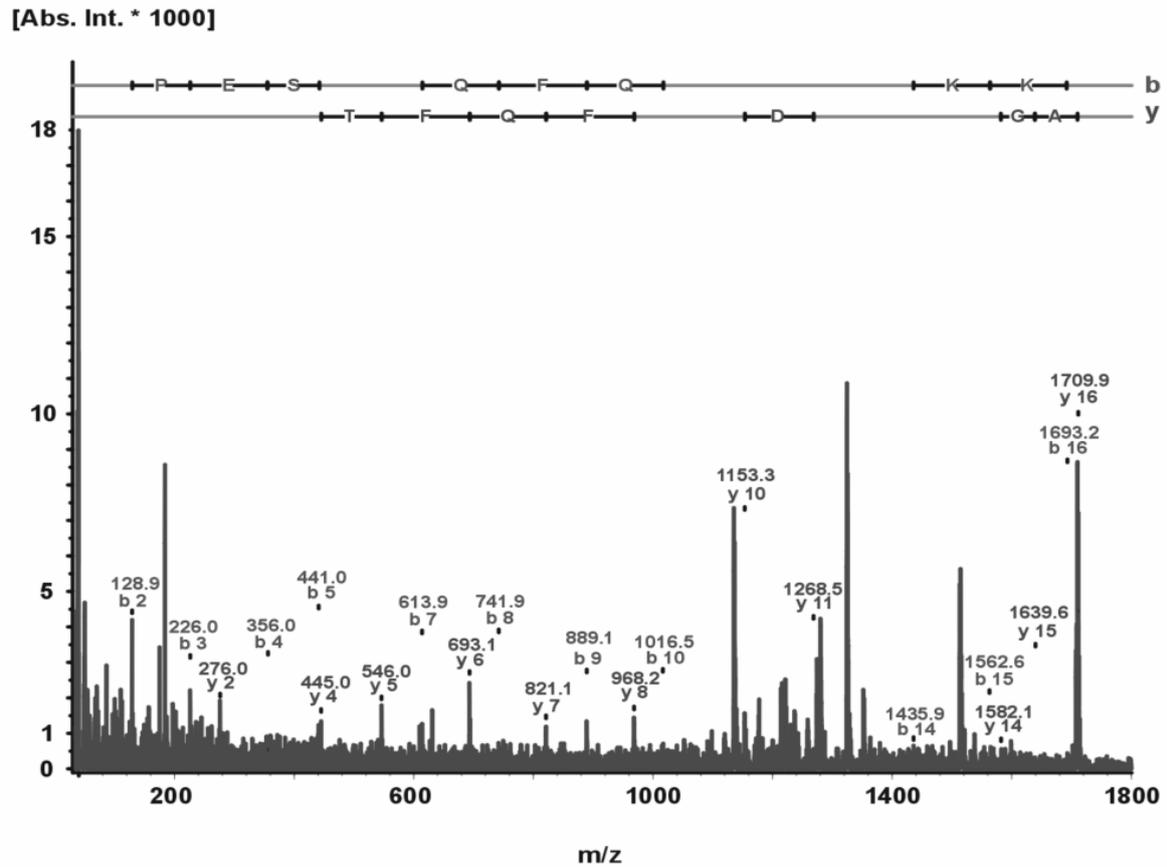
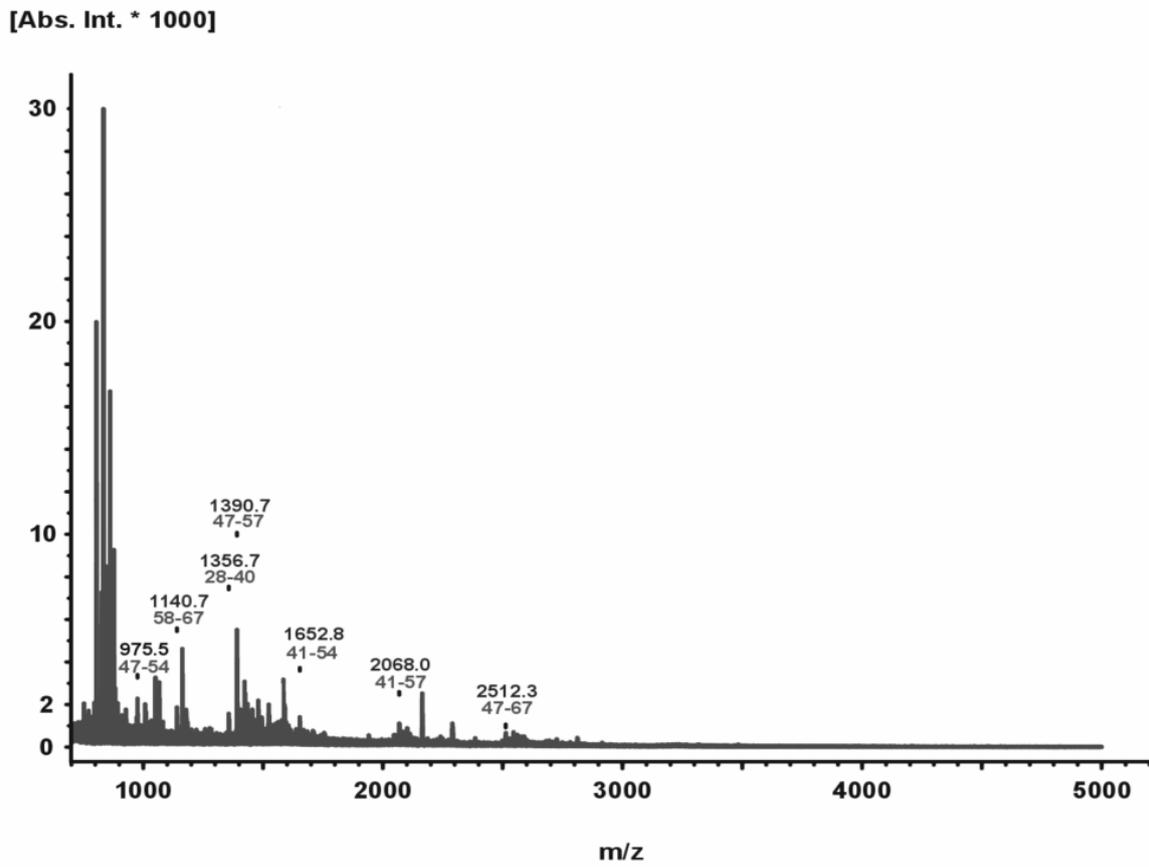


Abb. 9.1.19 MS/MS-Spektrum des tryptischen Fragments AGPESDGQFQFTGIKK (AGP Protein, Spot 13; Abb. 5.2C). Nur Fragmente, die als b- and y-Ionen identifiziert worden sind, sind im Spektrum markiert.

Abb. 9.1.20

A



B



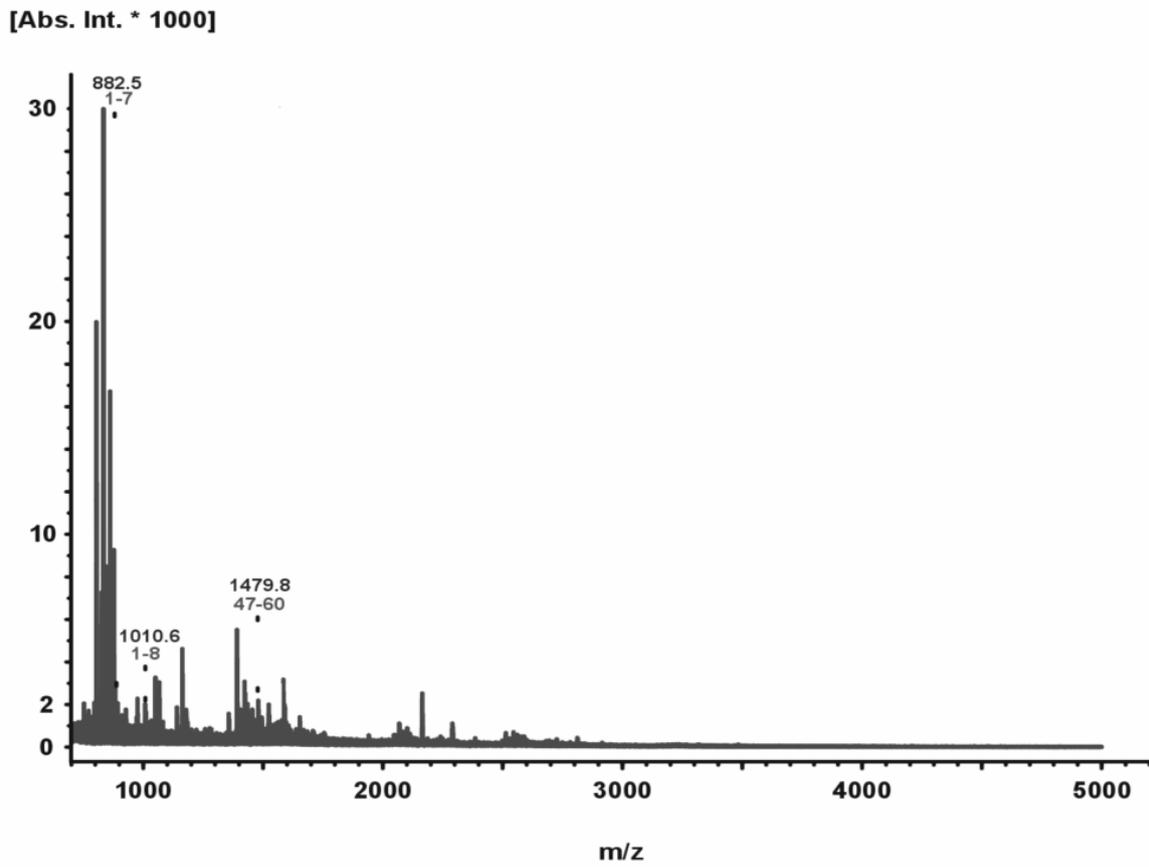
C

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
975.4534	0.0004	47	54	0	
1140.6602	-0.0061	58	67	0	
1356.7116	-0.0042	28	40	0	
1390.6682	-0.0068	47	57	1	
1652.7555	-0.0029	41	54	1	M
2067.972	-0.0084	41	57	2	M
2512.2954	-0.0281	47	67	2	
<b>Nicht zugeordnet:</b> 752.0411, 771.809, 796.7105, 804.4415, 805.4453, 806.4186, 824.5786, 825.1794, 832.3736, 834.3757, 839.6168, 841.1237, 842.5564, 845.1378, 854.3185, 861.0963, 876.2848, 877.0614, 882.4922, 893.0287, 927.5483, 971.6336, 1007.4413, 1010.5722, 1015.6454, 1034.1241, 1038.5659, 1045.565, 1050.0975, 1051.5519, 1052.0966, 1065.59, 1162.6434, 1184.625, 1277.0927, 1404.6535, 1406.6643, 1418.6604, 1420.6443, 1422.6597, 1433.6366, 1434.6555, 1437.6466, 1450.6558, 1454.6466, 1466.6541, 1479.7563, 1493.7097, 1521.7171, 1523.7319, 1537.716, 1551.7175, 1567.7412, 1572.7519, 1581.7166, 1583.7359, 1589.7158, 1595.735, 1598.744, 1707.7705, 1754.7717, 1940.9239, 2046.0108, 2052.9871, 2080.9923, 2083.9756, 2095.9682, 2099.9631, 2111.9586, 2239.1081, 2544.2877, 2556.2742, 2559.2792, 2576.276, 2723.2486, 2809.4739					

**Abb. 9.1.20 PMF von ATP-Synthase, ATP8 Untereinheit.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 14 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der ATP8 Untereinheit. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von der ATP8 Untereinheit (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.21

A



B

10 20 30 40 50 60  
MLQSFIKKQW VPMKPYTQV YQEIWVGVGL MSLIVYKIRS ADKRSKALKG CSPAHAHGHH

**C**

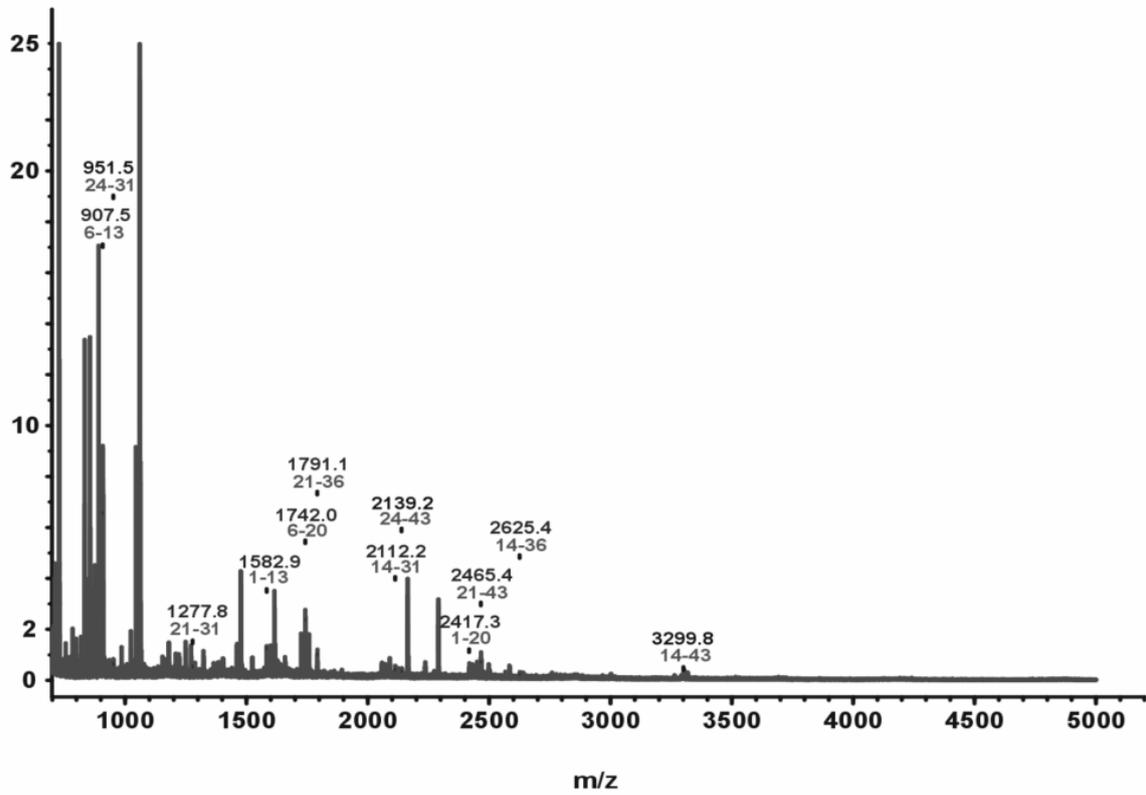
m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
882.4922	0.0169	1	7	0	M
1010.5722	0.0019	1	8	1	M
1479.7563	0.0541	47	60	1	
<b>Nicht zugeordnet:</b> 752.0411, 771.809, 796.7105, 804.4415, 805.4453, 806.4186, 824.5786, 825.1794, 832.3736, 834.3757, 839.6168, 841.1237, 842.5564, 845.1378, 854.3185, 861.0963, 876.2848, 877.0614, 893.0287, 927.5483, 971.6336, 975.4534, 1007.4413, 1015.6454, 1034.1241, 1038.5659, 1140.6602, 1045.565, 1050.0975, 1051.5519, 1052.0966, 1065.59, 1162.6434, 1184.625, 1277.0927, 1356.7116, 1390.6682, 1404.6535, 1406.6643, 1418.6604, 1420.6443, 1422.6597, 1433.6366, 1434.6555, 1437.6466, 1450.6558, 1454.6466, 1466.6541, 1493.7097, 1521.7171, 1523.7319, 1537.716, 1551.7175, 1567.7412, 1572.7519, 1581.7166, 1583.7359, 1589.7158, 1595.735, 1598.744, 1652.7555, 1707.7705, 1754.7717, 1940.9239, 2046.0108, 2052.9871, 2067.9720, 2080.9923, 2083.9756, 2095.9682, 2099.9631, 2111.9586, 2239.1081, 2512.2954, 2544.2877, 2556.2742, 2559.2792, 2576.276, 2723.2486, 2809.4739					

**Abb. 9.1.21 PMF von dem ATP-Synthase assoziierten MLQ Protein.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 14 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente des MLQ Proteins. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von dem MLQ Protein (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1

Abb. 9.1.22

A

[Abs. Int. \* 1000]



B



C

m/z	Error [Da]	Start	Ende	Miss	Mod.
907.5343	0.0348	6	13	0	
951.5327	0.0182	24	31	1	
1277.783	0.0618	21	31	2	
1582.8955	0.0467	1	13	1	
1741.9564	0.0511	6	20	1	
1791.0534	0.0776	21	36	3	
2112.1781	0.0511	14	31	3	
2139.1814	0.0522	24	43	3	
2417.2797	0.0251	1	20	2	
2465.4056	0.0699	21	43	4	
2625.4095	0.0279	14	36	4	
3299.7804	0.0389	14	43	5	
<b>Nicht zugeordnet:</b> 701.0584, 705.2958, 708.9576, 710.8834, 721.2320, 727.5160, 751.0666, 755.0055, 764.8928, 778.7665, 783.7273, 797.6470, 819.2228, 834.5385, 852.3256, 853.4855, 867.5079, 871.4607, 873.4994, 874.5060, 875.0725, 880.4684, 887.0272, 888.4901, 889.5292, 890.5214, 902.4886, 913.4372, 930.4937, 935.5328, 947.5177, 985.0273, 1007.4868, 1028.1224, 1030.1304, 1048.1019, 1062.5637, 1153.6214, 1163.0627, 1178.8178, 1207.6921, 1221.6983, 1224.7073, 1322.2975, 1364.7723, 1381.7934, 1386.4854, 1401.1418, 1462.1430, 1464.8449, 1523.8568, 1586.8712, 1589.2240, 1595.8885, 1597.8892, 1614.8870, 1626.8638, 1639.9099, 1658.8962, 1724.9365, 1738.9512, 1755.9738, 2057.1394, 2061.1254, 2070.1634, 2073.1123, 2089.1323, 2126.1847, 2431.2874, 2449.2785, 2463.2907, 2497.2898, 2501.3310, 2565.2763, 2582.2606					

**Abb. 9.1.22 PMF von ATP-Synthase, Untereinheit epsilon.** (A) MS-Spektrum des Trypsinverdaus von Spot 15 (Abb. 5.2C; Tabelle 9.1.1). Gekennzeichnete Signale sind tryptische Fragmente der Untereinheit epsilon. (B) Diagramm des Trypsinverdaus von Untereinheit epsilon (Zuordnung der PMF-Signale zur Proteinsequenz). (C) Liste der zugeordneten und nicht zugeordneten Signale des MS-Spektrums. Abkürzungen, siehe Abb. 9.1.1



9. Anhang

WS0379 QYETWSRSRHATTIRFPGEHP--EVNN---KLNDPVFDKDTASILPQGITPDVYVCTVGH 204  
CCC13826\_1871 QYEVWSRSRHATTMRFPGEHP--EVNN---NLTEPVFDKDTASILPKGITPDVYIATVGH 202  
ShewspPV-4DRAFT\_3245 QYEKWSRSRHAKTIRFPGEHP--EVDN---DLNKTMYGKTDTSILPDGITPDVYIATVGT 202  
SpeaDRAFT\_2409 QYEKWQRSRHAKTIRFPGEHP--EVDN---DIEKTMYNKTDTSILPDGITPDMIYATVGT 201  
SwoODRAFT\_3597 QYEKWQRSRHAKTIRFPGEHP--EVDN---DIEKTMYNKTDTSILPDGITPDMIYATVGT 201  
Sbal195DRAFT\_3331 QYEKWQRSRHAKTIRFPGEHP--EVDN---DLNKTMYGKTDTSILPDGITPDVYIATVGT 212  
SwoODRAFT\_3615 QYEKWQRSRHANVVRFPSEITDKVEPN--GDLNAPLYGS-EASMLPDGVRANDVYAIIGT 204  
SpeaDRAFT\_2386 QFEKWQRSRHANVVRFPSEITDKVEPN--GDLNAPLYGS-EASMLPDGVRANDVYAIIGT 204  
SO0479 QYEKWRRSRHSKTIRFPGEHP--EVDN---DLKPKMYTKDTSILPSGITPDVYIATVGT 235  
Shewmr4\_0488 QYEKWRRSRHSKTIRFPGEHP--EVDN---DLKKTMYGKTDTSILPSGITADAIYATVGT 234  
Shewmr7\_3542 QYEKWRRSRHSKTIRFPGEHP--EVDN---DLKKTMYGKTDTSILPSGITPDVYIATVGT 234  
Shewana3\_0489 QYEKWRRSRHSKTIRFPGEHP--EVDN---DLKKTMYGKTDTSILPSGITPDVYIATVGT 234  
Sputcn32DRAFT\_2482 QYEKWRRSRHSKTIRFPGEHP--EVEN---NLDKTMYGKTDTSILPDGITPDVYIATVGT 234  
CJJ81176\_0063 QYKAWERSRHAKTVRFDFEDEF--EVG--N-DLKKPMYNS-QSTILPDGIYPPDDVYAVIGT 192  
Adeh\_2963 QYEKWRRSRHNLVVRFPSEITDKVEPN--ETK---DLTKPQFG--EAPILPPGITPDVYIATVGT 187  
CJJHB9313\_0042 QYKAWERSRHAKTVRFDFEDEF--EVG--N-DLKKPMYNS-QSTILPDGIYPPDDVYAVIGT 125  
CLA1177 QYASWERSRHAKTVRFDFEDEF--EVGGAE--GLKKPMYNS-QATILPDGIYPPDDVYAVIGT 179  
Ccur5\_01001045 QYAQWERSRHAKTIRWPEELS--EVN--G-DPKQGMGT-KTPILTTGIRPDDTYGIIGT 196  
\*: \* \*\*\*\* .:\*\*\* : \* . : :.:. \* : . : \* : \*

WS0379 IRTKFGFFDAWLLRGTYHVEGGLLKNGTGQIVAGGNQWQRTWALNLSPEVAKKIKKWVPD 264  
CCC13826\_1871 LRTKMGYVDWLLRGTYHVEGGLLRDGTGQIVAGGNQWQRTWALNLDATVKKIKELVPE 262  
ShewspPV-4DRAFT\_3245 PRTKYGFIDAWLVRGTYHIEGGLLKDGTGKMGVAGANQFSRGWAEWLTPEMAKINKAIP 262  
SpeaDRAFT\_2409 PRTKYGFIDAWLVRGTYHIRDGLLRDGTGKMGVAGANQFSRGWAEWLTPEMSKINDV 261  
SwoODRAFT\_3597 PRTKYGFIDAWLVRGTYHIRDGLLRDGTGKMGVAGANQFSRGWAEWLTPEMSKINDV 261  
Sbal195DRAFT\_3331 PRTKYGFIDSWLVRGTYHVKDGLLKDGTGTMVAGGNQFSRGWAEWLTPEIAKKIQKV 272  
SwoODRAFT\_3615 PRTKYGFIDSWLVRGTYHVKDGLLSEGTGKMGVAGANQFSRGWAEWLTPEMAKINKA 264  
SpeaDRAFT\_2386 PRTKYGFIDSWLVRGTYHVKDGLLSEGTGKMGVAGANQFSRGWAEWLTPEMAKINKA 264  
SO0479 PRTKYGFIDAYLVRGTYHVKDGLLKDGTGTMVAGGNQFSRGWAEWLTPEMAKINKA 295  
Shewmr4\_0488 PRTKYGFIDAYLVRGTYHVKDGLLKDGTGTMVAGGNQFSRGWAEWLTPEMAKINKA 294  
Shewmr7\_3542 PRTKYGFIDAYLVRGTYHVKDGLLKDGTGTMVAGGNQFSRGWAEWLTPEMAKINKA 294  
Shewana3\_0489 PRTKYGFIDAYLVRGTYHVKDGLLKDGTGTMVAGGNQFSRGWAEWLTPEMAKINKA 294  
Sputcn32DRAFT\_2482 PRTKYGFIDGVLVRGTYHVKDGLLKDGTGTMVAGGNQFSRGWAEWLTPEMAKINKA 294  
CJJ81176\_0063 PRTKYGFIDRWLVRGTYHVEDGNLSNMTGKIVAGGNQFSRLWSEFLTPEMCKIAEF 252  
Adeh\_2963 PRTKYGFIDRWLVRGTYHVEGGLLRDGTGTLVAGGNQHSRTWABSLTPEVAKINKA 247  
CJJHB9313\_0042 PRTKYGFIDRWLVRGTYHVEDGNLSNMTGKIVAGGNQFSRLWSEFLTPEMCKIAEF 185  
CLA1177 PRTKYGFIDKWLVRGTYHVEDGNLSDLGKLTAGGNQFSRLWSEFLTPEMAKIAFA 239  
Ccur5\_01001045 PRTKYGFVDKWLVRGTYHVIDGTLDDPNSKIVAGGNQFSVNWTKNITPEVAKKIK 256  
\*\*\* :. : \* : : : : : : . \* \* : . . : : \* \* . \* : : : \* \* \*

WS0379 FVPTLEEYGDNGGYVVRGLASIAAKYKKSMSFQASTSYCEVCHPWKFDKNESEFYAALGN 324  
CCC13826\_1871 FPGTLEEYGDNGGYVVRGLASIAAKHKKSMFFQANSSYCEVCHPWKFDKSKAEFYAALGN 322  
ShewspPV-4DRAFT\_3245 FPTTLEAYGGSGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEVCHTFKFDKQKQEFFDALGD 322  
SpeaDRAFT\_2409 FPITLLEGFGGSGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEVCHTFKFDKQKQEFFDALGD 321  
SwoODRAFT\_3597 FPITLLEGFGGSGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEVCHTFKFDKQKQEFFDALGD 321  
Sbal195DRAFT\_3331 FPTTMEFGFTSGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGN 332  
SwoODRAFT\_3615 FVPTLEEFGDTGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGD 324  
SpeaDRAFT\_2386 FVPTLEEFGATGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGD 324  
SO0479 FPLKMEDFGTSGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGN 355  
Shewmr4\_0488 FVVKMEDFGTSGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGN 354  
Shewmr7\_3542 FVVKMEDFGTSGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGN 354  
Shewana3\_0489 FVVKMEDFGTSGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGN 354  
Sputcn32DRAFT\_2482 FPTKMEDFGGSGSHQWGMSSYGAKEYEKLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGN 354  
CJJ81176\_0063 FPTTMEQFQGGNGSQVWGTNSYAAQYRKNMLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGN 312  
Adeh\_2963 FPTKLEDFGDNQSGKTLWGLTNSYAGYKRNKSMFPATAYCEVCHTFKFDKQKQEFFDALGN 307  
CJJHB9313\_0042 FPTTMEQFQGGNGSQVWGTNSYAAQYRKNMLFPASSYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGN 245  
CLA1177 FPTKMEDFGGNGSQVWGTNSYAAQYKAVFPATAYCEMCHTFKFDKQKQEFFDALGN 299  
Ccur5\_01001045 FPTKMEDFGGNGSHMWMGNSYSTYQNKMLFPASSYCEVCHTFKFDKQKQEFFDALGN 316  
\*\* : : \* : \* . \* \* \* : . : \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

WS0379 AKELQKHTISKGVSCEECHGAGGHLGGGSL-LISNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 383  
CCC13826\_1871 AKELQKHTISKGVSCEECHGAGGHLGGGSL-RTSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 381  
ShewspPV-4DRAFT\_3245 PKKLQEHHTISKGIACEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 380  
SpeaDRAFT\_2409 PKKLQEHHTISRGIACEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 379  
SwoODRAFT\_3597 PKKLQEHHTISRGIACEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 379  
Sbal195DRAFT\_3331 PKELQKHTVSLGITCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 391  
SwoODRAFT\_3615 AKKLQEHHTISKGIACEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 382  
SpeaDRAFT\_2386 AKKLQEHHTISKGISCCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 382  
SO0479 PKELQKHTISKGITCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 414  
Shewmr4\_0488 PKELQKHTISKGITCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 414  
Shewmr7\_3542 PKELQKHTIAKGITCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 413  
Shewana3\_0489 PKELQKHTIAKGITCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 413  
Sputcn32DRAFT\_2482 PKELQKHTISKGITCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 413  
CJJ81176\_0063 TQELRKHTISKGISCCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 366  
Adeh\_2963 PEELRKHTINKGISCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 360  
CJJHB9313\_0042 TQELRKHTISKGISCCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 299  
CLA1177 PKELQKHTISKGITCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 353  
Ccur5\_01001045 AKELRKHTVARGISCCEECHGAGGHLGGGSL-MQSNCECHQRFQYDPMRNNPLNAGK 370  
.: : : : \* : \* : \*





**Tab. 9.2.1 Massenbestimmung des intakten MccA Proteins von sechs unabhängigen MALDI-TOF-Experimenten (extern oder intern kalibriert).** Nur die einfach geladenen Massenwerte (*average mass*) von MccA sind aufgeführt (siehe auch Abb. 5.7).

	Externe Kalibration	Interne Kalibration
<b>Probe 1</b>	79,783	79,698
<b>Probe 2</b>	79,768	79,649
<b>Probe 3</b>	79,746	79,701
<b>Mittelwert</b>	79,766	79,683
<b>Relative Standardabweichung</b>	$9 \times 10^{-4}$	$9 \times 10^{-4}$

**Tab. 9.2.2 MALDI TOF-Ergebnisse des Trypsinverdaus von dem aufgereinigten MccA Protein (siehe folgende Seiten).** (A) Fragmente des MccA-Proteins ohne Häm-Gruppe. (B) Häm-modifizierte Fragmente des MccA-Proteins. (C) Fragmente des NAP-Proteins (Verunreinigung). Die Berechnungen wurden mit Biotools 2.2 (Bruker Daltonik, Bremen) gemacht. Häm-modifizierte Fragmente wurden mittels MS/MS-Experiment überprüft (Beispiel, siehe Abb. 5.9B). Das MccA-Protein (Score = 135) und NAP-Protein (Score = 44) wurden zusätzlich eindeutig mittels PMF identifiziert (Suchmaschine: Mascot<sup>TM</sup>; Suchparameter: Datenbank, NCBI; Organismus, Proteobakterien; Enzym, Trypsin; überlesene Schnittstellen, maximal 2; variable Modifikation, Oxidation von Methionin; Massengenauigkeit, 50 ppm). Einzelne Cysteine, die CH-Signatur und das klassische CXXCH-Motive vom MccA-Protein sind schwarz hinterlegt. Die CXXCH-Motive sind wie in Abb. 5.8 numeriert. Abkürzungen: m/z, gemessene Masse [M+H]; Theor. Masse, theoretische monoisotopische Masse (enthält die Masse von einer Häm-Gruppe in **B**, d.h. + 615.169; ausführliche Erklärung, siehe auch Kapitel 8.4); Fehler [Da], Abweichung von der theoretischen monoisotopischen Masse in Dalton; Miss, Anzahl der überlesenen Schnittstellen (*missed cleavage sites*); Start und Ende, Position in der Primärstruktur von prozessierten MccA (siehe Abb. 5.8) bzw. NAP; Mod., Modifikation (M, oxidiertes Methionin); Sequenz, Peptidsequenz des tryptischen Fragments.

## 9. Anhang

A

m/z	Theor. Masse	Fehler [Da]	Start	Ende	Miss	Mod	Sequenz
849.5052	848.4603	0.0376	501	509	0		SLVAGSTSK
856.5026	855.4603	0.035	46	52	0		NHPFTK
889.417	888.3879	0.0219	516	521	0		DWHFER
892.5495	892.4906	-0.0067	613	619	0		VYELIEK
955.4134	954.3973	0.0089	1	8	0		MEGMQMTK (N-terminus von prozessiertem MccA)
1064.548	1063.5298	0.0109	101	109	0		NSTLQYPNK
1104.5069	1103.4884	0.0112	67	75	0		GEEWIEGR
1115.535	1114.5117	0.016	340	348	0		FSYSPDLMR
1121.4968	1120.476	0.0136	630	639	0		DGSWGMHGFK
1131.5449	1130.5066	0.031	340	348	0	M	FSYSPDLMR
1131.5449	1130.5819	-0.0443	620	629	0		AQDTVDLIEK
1173.6308	1172.619	0.0046	192	202	0		GTYHVEGGLLK
1189.5515	1188.5312	0.013	513	521	1		DGKDWHER
1267.6268	1266.5993	0.0202	138	148	0		FPGEHPEVNNK
1271.6839	1270.6499	0.0268	182	191	0		FGFFDAWLLR
1308.5788	1307.5275	0.0441	86	97	0		SGGEGFSSMMYR
1325.6402	1324.6056	0.0273	527	537	0		NFVDLMWAGAR <sup>a</sup>
1328.7492	1327.7136	0.0283	218	229	0		TWALNLSPEVAK
1375.6618	1374.6164	0.0381	65	75	1		DRGEEWIEGR
1413.7048	1412.6572	0.0403	287	299	0		NESEFYAALGNAK
1418.8643	1417.8181	0.039	591	603	0		VGIQGLYSLLEVK
1491.7881	1490.7365	0.0443	645	657	0		LDAAVEYINEAQR
1499.808	1499.7925	0.0335	180	191	1		TKFGFFDAWLLR
1585.8366	1584.7757	0.0536	203	217	0		NGTGQIVAGGNQWQR
1678.8884	1677.8185	0.0627	570	583	0		QVYNEVMGWQTPVK
1694.8776	1693.8134	0.0569	570	583	0	M	QVYNEVMGWQTPVK
1881.9676	1880.8792	0.0811	412	428	0		GVSYNSEQGYLSSLYSK
2107.1271	2106.0269	0.0929	412	430	1		GVSYNSEQGYLSSLYSKPK
2182.0557	2180.9943	0.0542	391	411	1		<b>CATCH</b> DPHDVTGNVTGEKGIK <sup>a</sup> (Motiv 5)
2313.175	2312.075	0.0927	234	253	0		WVPDFPVTLEEYGDNGGYVR
2526.1319	2525.1178	0.0184	301	321	2	M	YKKSMSFQASTSY <b>CEVCH</b> PWK <sup>a</sup> (Motiv 2)
2526.1319	2525.1573	-0.0211	427	450	2		GMR <b>CATCH</b> DPHDVTGNVTGEKGIK <sup>a</sup> (Motiv 5)
2547.3632	2546.2403	0.1156	25	45	0		GVISLQDYIVIEEQAMYDWLFK
3383.8682	3382.7231	0.1378	149	179	1		LNDPVFDKDTASILPQGITPDVVY <b>C</b> TVGHIR

## 9. Anhang

4426.0078 4425.008 -0.0102 513 549 5 DGKDWHFERNEEGRNFVDLMWAGARTTWADKDQAEAK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Häm-Verlust durch *In-Source Decay (ISD)* bzw. *Post-Source Decay (PSD)*

## B

m/z	Theor. Masse	Fehler [Da]	Start	Ende	Miss	Mod	Sequenz
1450.5203	1449.4695	0.0435	434	440	0		<b>ECTDCHK</b> (Motiv 6)
1578.6292	1577.5645	0.0575	433	440	1		KE <b>CTDCHK</b> (Motiv 6)
1819.8181	1818.7435	0.0673	431	440	2		LKKE <b>CTDCHK</b> (Motiv 6)
2254.9559	2253.909	0.0396	336	348	1		<b>CH</b> QRFSYSPDLMR (Teil von Motiv 4)
2270.9887	2269.9039	0.0775	336	348	1	M	<b>CH</b> QRFSYSPDLMR (Teil von Motiv 4)
2281.938	2280.8359	0.0948	116	129	0		<b>CGECH</b> PAQYETWSR (Motiv 1)
2398.0395	2396.9407	0.0915	434	448	1		<b>ECTDCH</b> KEQAYIQSK (Motiv 6)
2499.0717	2497.9633	0.1011	391	408	0		<b>CATCH</b> DPHDVTGNVTGEK (Motiv 5)
2526.1319	2525.0357	0.0889	433	448	2		KE <b>CTDCH</b> KEQAYIQSK (Motiv 6)
2526.1319	2525.1415	-0.0169	550	566	1		<b>GCH</b> SPVSELKETLHFK (CH-Signatur)
2526.1319	2525.0258	0.0988	522	537	1		NEEGRNFVDLMWAGAR
2542.0649	2541.0207	0.0369	522	537	1	M	NEEGRNFVDLMWAGAR
2706.1794	2705.0391	0.133	265	282	0		SMSFQASTSY <b>CEVCH</b> PWK (Motiv 2)
2767.3401	2766.2147	0.1181	431	448	3		LKKE <b>CTDCH</b> KEQAYIQSK (Motiv 6)
2953.334	2952.2001	0.1266	110	129	1		FIGPEK <b>CGECH</b> PAQYETWSR (Motiv 1)
3115.4864	3114.3759	0.1033	538	560	2		TTWADKDQAEAKG <b>CH</b> SPVSELK (CH-Signatur)
4414.6861	4413.8751	-0.1963	513	543	4	M	DGKDWHFERNEEGRNFVDLMWAGARTTWADK

## C

m/z	Theor. Masse	Fehler [Da]	Start	Ende	Miss	Mod	Sequenz
870.5912	869.5839	0.0254	91	98	0		VIVEAVLK
1194.6382	1193.6309	0.0215	22	30	0		LHNFHWNVK
1218.5905	1217.5832	0.0228	99	108	0		DYEFLAGEFK
1339.719	1338.7118	0.0265	10	21	0		SLQADSTVLFMK
1457.9061	1456.8988	0.0335	59	71	0		VLQLGDKPFVTLK
3222.5588	3221.5515	0.1446	31	58	0		GMDFHPVHGATEEMYDQFADLLDDLAER

### 9.3 Detergenzien

**Tab. 9.3.1 Übersicht der verwendeten Detergenzien.** M, Molekulargewicht in g/mol; CMC, *critical micellar concentration* in mM (Bhairi, S.M., 2001); Typ, nicht-ionisch (N), zwitterionisch (Z) bzw. ionisch (I).

Abkürzung	Name	M (g/mol)	CMC (mM)	Typ
DM	Decyl- $\beta$ -D-maltosid	482.6	1.6	N
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid	510.6	0.1 - 0.6	N
MEGA-11	N-Undecanoyl-N-methylglucamin	363.5	6 - 7*	N
Digitonin	Digitonin	1229	0.2	N
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat	614.9	6 - 10	Z
Zwittergent 3-08 od. SB 3-08	Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat	279.6	330	Z
Zwittergent 3-12 od. SB 3-12	Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat	335.6	2 - 4	Z
Zwittergent 3-14 od. SB 3-14	Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat	363.6	0.1 - 0.4	Z
Zwittergent 3-16 od. SB 3-16	Hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat	391.6	0.01 - 0.06	Z
DTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid	308.35	10.0	I
SDS	Natriumdodecylsulfat	288.5	7 - 10	I

\* Es ist die CMC von MEGA-10 (N-Decanoyl-N-methylglucamin) verwendet worden, da zu MEGA-11 keine Angaben in der Literatur zu finden sind. Die CMC von MEGA-11 ist aber auf jeden Fall niedriger, da die CMC in der MEGA-Serie wie bei der Zwittergent-Reihe schrittweise mit zunehmender Seitenkettenlänge abnimmt (MEGA-8, 58 mM > MEGA-9, 19 – 25 mM > MEGA-10, 6 – 7 mM)

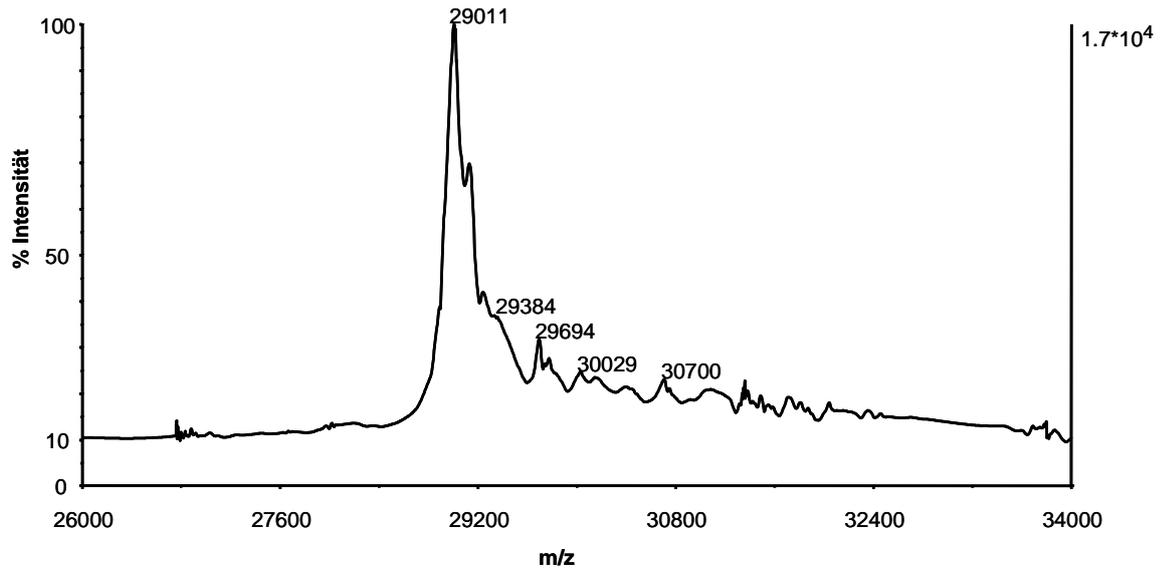


Abb. 9.3.1 MALDI-TOF-Spektrum von Carboanhydrase/Zwittergent 3-12 (SB 3-12)

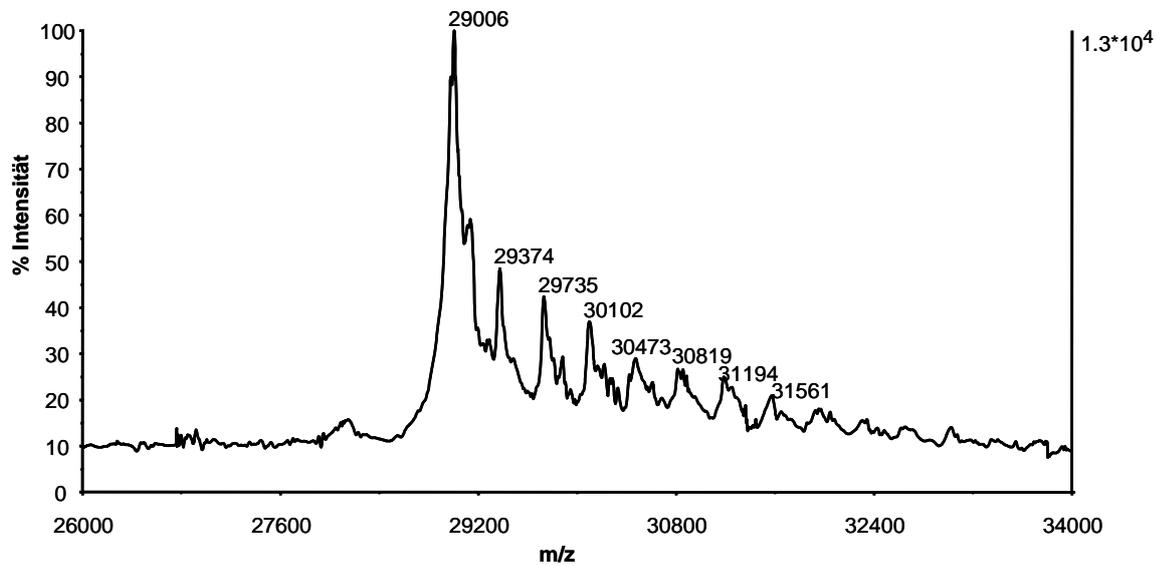


Abb. 9.3.2 MALDI-TOF-Spektrum von Carboanhydrase/Zwittergent 3-14 (SB 3-14)

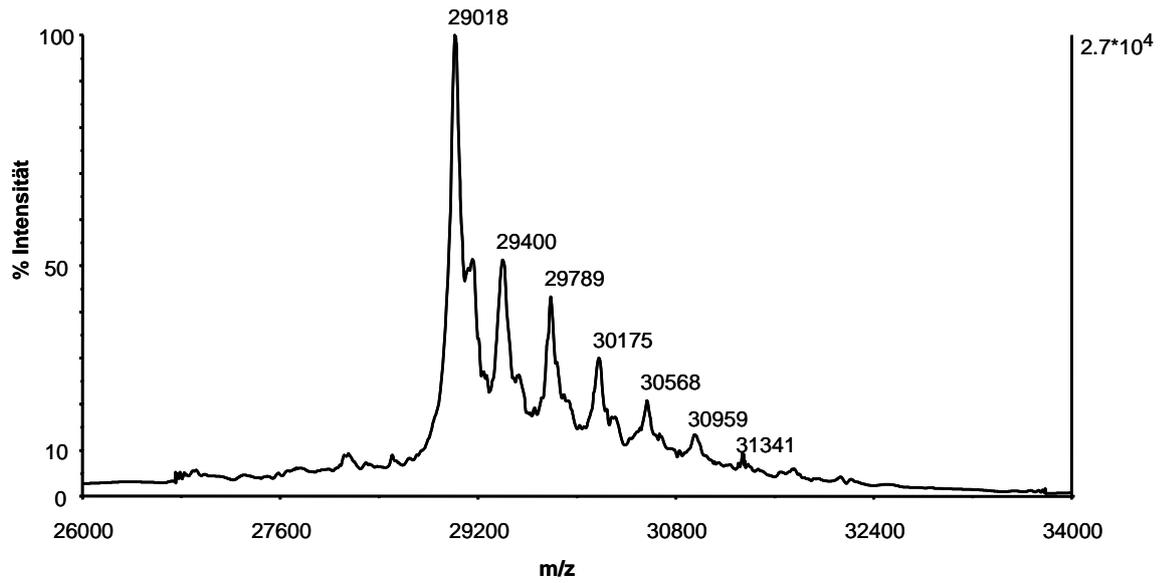


Abb. 9.3.3 MALDI-TOF-Spektrum von Carboanhydrase/Zwittergent 3-16 (SB 3-16)

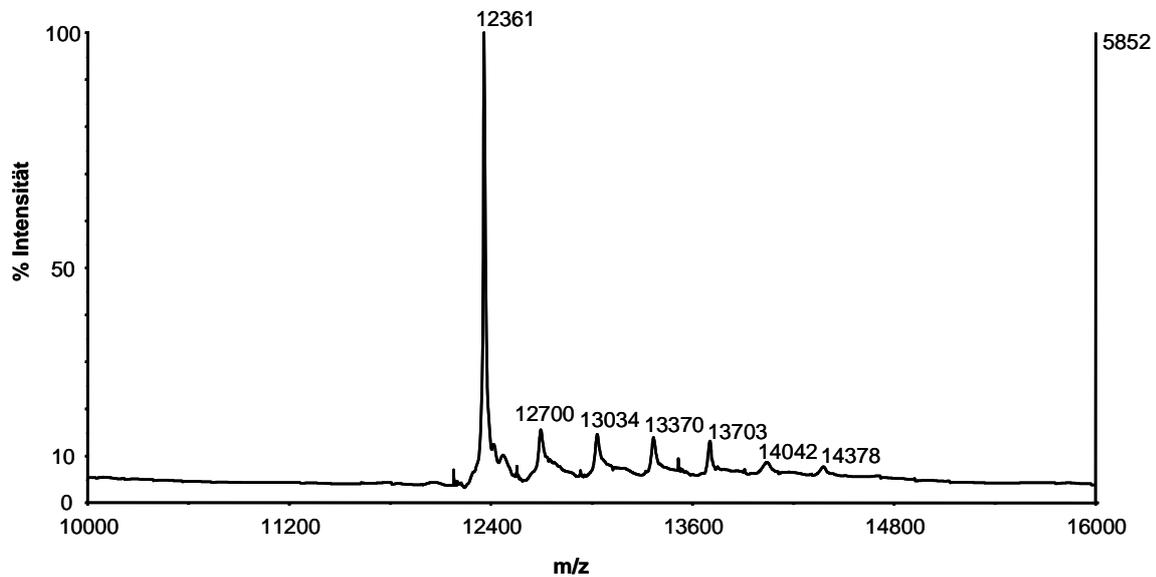


Abb. 9.3.4 MALDI-TOF-Spektrum von Cytochrom c/Zwittergent 3-12 (SB 3-12)

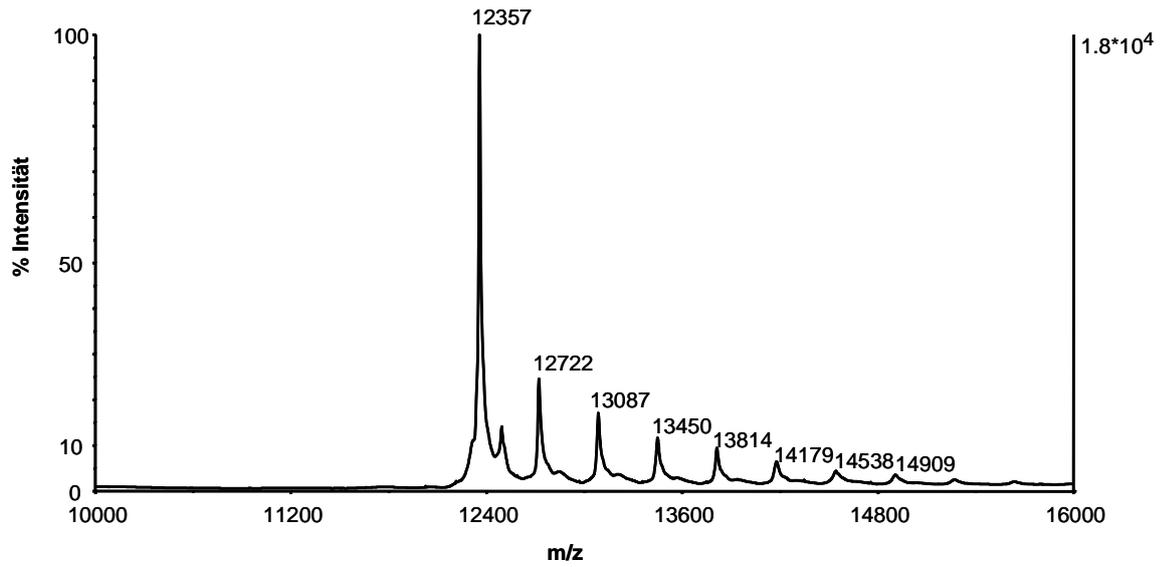


Abb. 9.3.5 MALDI-TOF-Spektrum von Cytochrom *c*/Zwittergent 3-14 (SB 3-14)

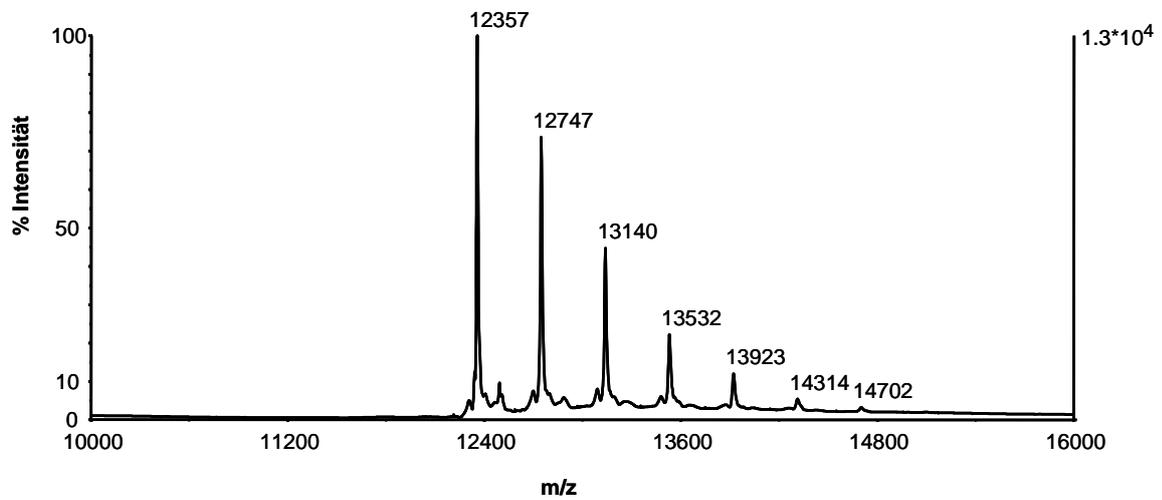


Abb. 9.3.6 MALDI-TOF-Spektrum von Cytochrom *c*/Zwittergent 3-16 (SB 3-16)

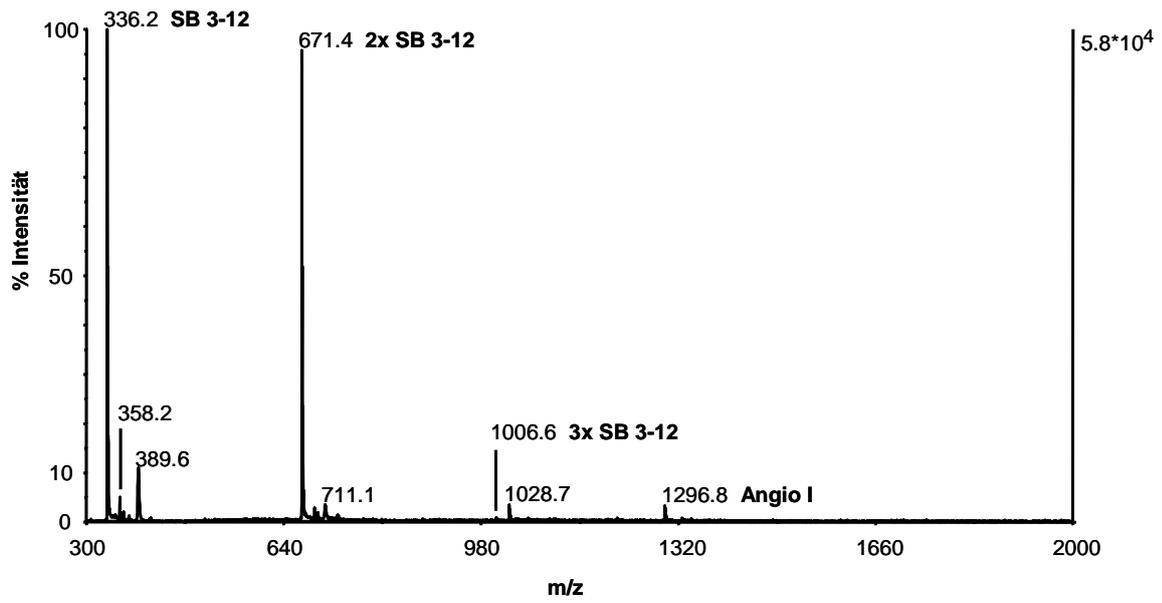


Abb. 9.3.7 MALDI-TOF-Spektrum von Angiotensin I/Zwittergent 3-12 (SB 3-12)

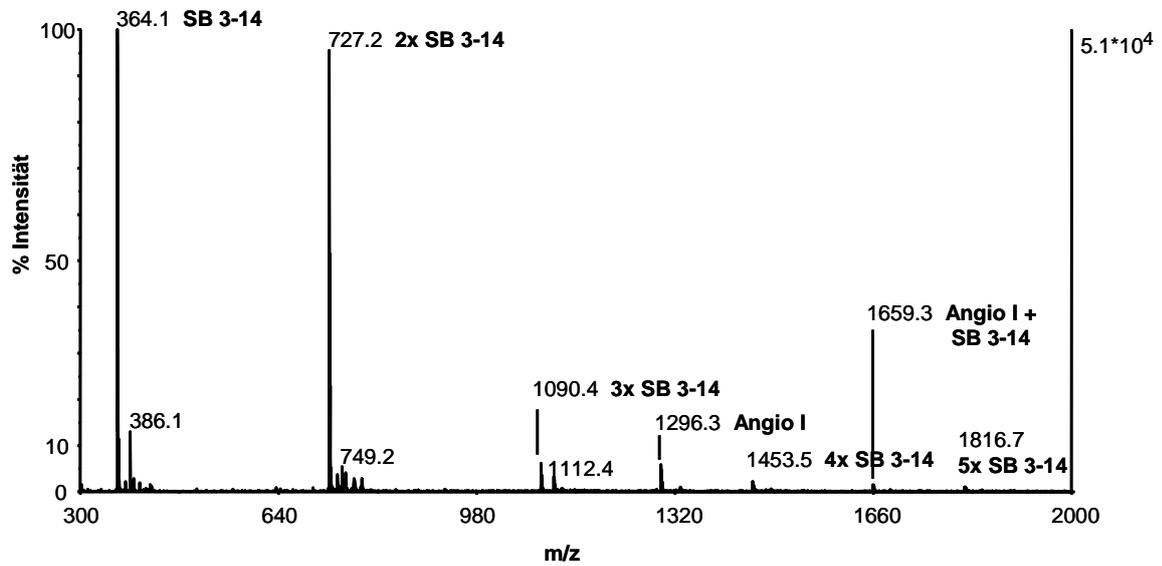
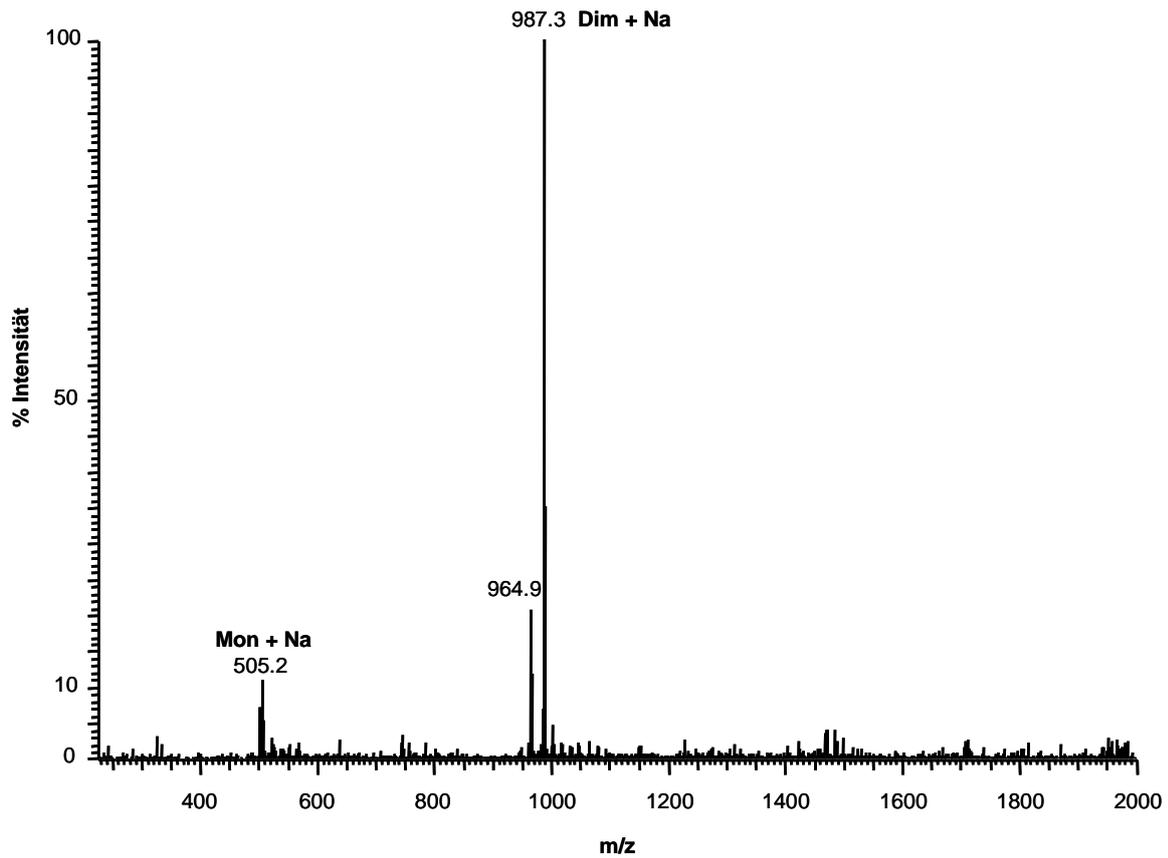
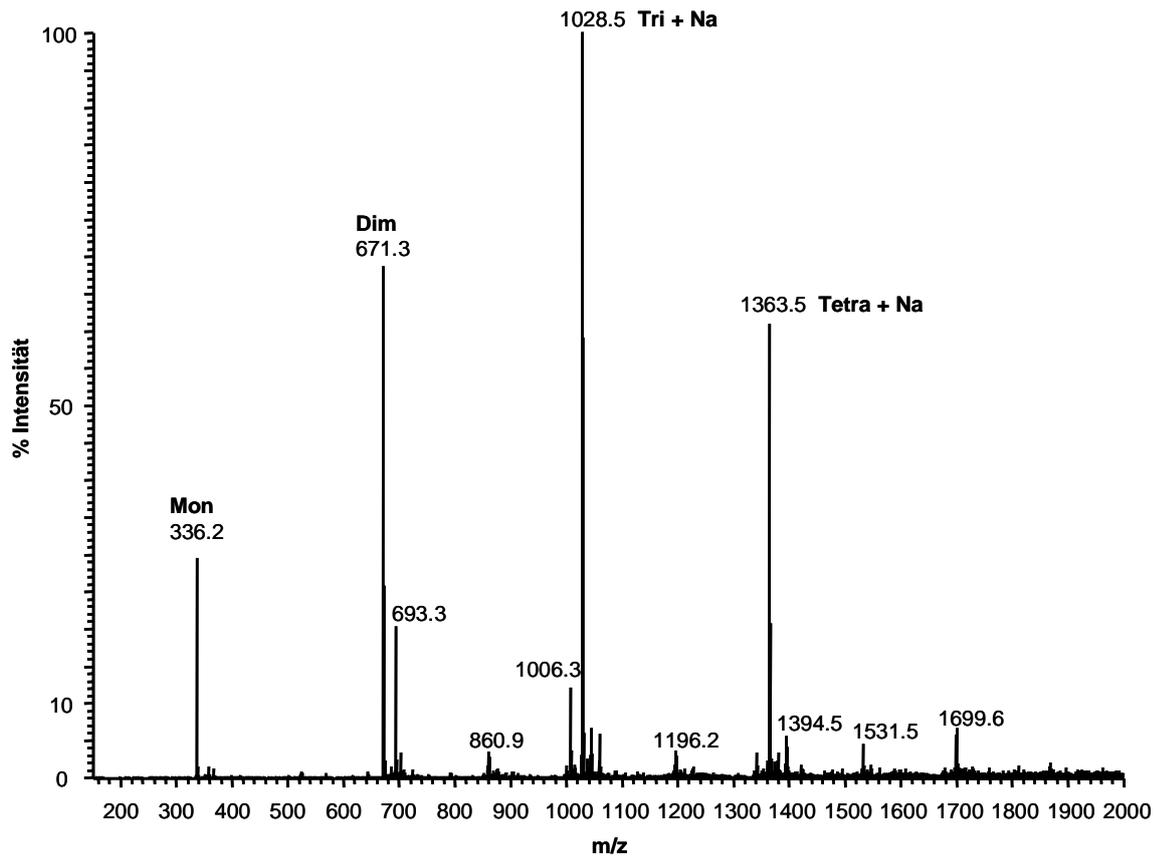


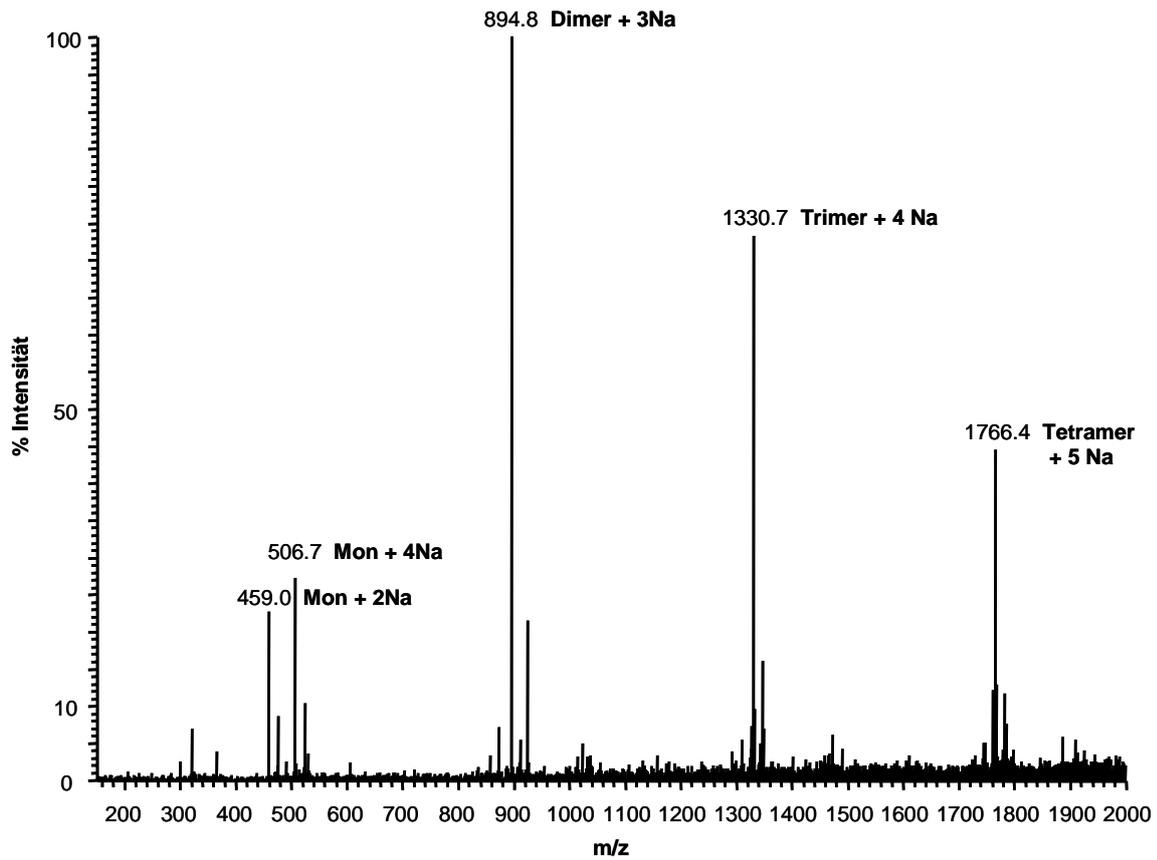
Abb. 9.3.8 MALDI-TOF-Spektrum von Angiotensin I/Zwittergent 3-14 (SB 3-14)



**Abb. 9.3.9 ESI-QIT-Spektrum von Cytochrom *c*/Decylmaltosid.** Konzentration Cytochrom *c*, 10 pmol/ $\mu$ l; Konzentration Decylmaltosid, CMC; Mon bzw. Dim, Monomer bzw. Dimer von Decylmaltosid; Na, Natriumanlagerung.



**Abb. 9.3.10** ESI-QIT-Spektrum von Cytochrom *c*/Zwittergent 3-12 (SB 3-12). Konzentration Cytochrom *c*, 10 pmol/μl; Konzentration Zwittergent 3-12 (SB 3-12), CMC; Mon, Dim, Tri, bzw. Tetra, Monomer, Dimer, Trimer bzw. Tetramer von Zwittergent 3-12 (SB 3-12); Na, Natriumanlagerung.



**Abb. 9.3.11 ESI-QIT-Spektrum von Cytochrom *c*/Pentafluoroktansäure.** Konzentration Cytochrom *c*, 10 pmol/μl; Konzentration Pentafluoroktansäure, 25 mM (Ishihama *et al.*, 2000); Mon, Dim, Tri, bzw. Tetra, Monomer, Dimer, Trimer bzw. Tetramer von Pentafluoroktansäure; Na, Natriumanlagerung.

## 9.4 Weniger spezifische Enzyme

### 9.4.1 Reproduzierbarkeit

**Legenden für Abbildung 9.4.1 bis 9.4.5 (siehe folgende Seiten)**

**Abb. 9.4.1 MS-Spektren der Verdau von BSA (A – C), Carboanhydrase (D – F) und Myoglobin (G – I) mit Trypsin (siehe auch Kapitel 5.4.2).** Die Abfolge der MS-Spektren ist folgendermaßen mit der Farbgebung der Balken in den Abbildungen 5.16, 5.17 und 5.18 abgestimmt: 1. Spektrum, schwarzer Balken; 2. Spektrum, grauer Balken; 3. Spektrum, hellgrauer Balken. Abkürzungen: BSA, Rinderserumalbumin; CAH, Carboanhydrase; MYO, Myoglobin; REF, Referenz d. h. kein Protein, um den Hintergrund des Verdau zu erhalten (*J – L*); L, Verdau in Lösung; Gel, Verdau im Gel; T, Trypsin; C, Chymotrypsin (Roche); mC, modifiziertes Chymotrypsin (Princeton Separations); P, Pepsin; E, Elastase; RA, das Protein wurde reduziert und alkyliert.

**Abb. 9.4.2 MS-Spektren der Verdau von BSA (A – C), Carboanhydrase (D – F) und Myoglobin (G – I) mit Chymotrypsin (siehe auch Kapitel 5.4.2).** Weitere Informationen, siehe Abb. 9.4.1; neue Abkürzung: C, Chymotrypsin (Roche).

**Abb. 9.4.3 MS-Spektren der Verdau von BSA (A – C), Carboanhydrase (D – F) und Myoglobin (G – I) mit modifiziertem Chymotrypsin (siehe auch Kapitel 5.4.2).** Weitere Informationen, siehe Abb. 9.4.1; neue Abkürzung: mC, modifiziertes Chymotrypsin (Princeton Separations).

**Abb. 9.4.4 MS-Spektren der Verdau von BSA (A – C), Carboanhydrase (D – F) und Myoglobin (G – I) mit Elastase (siehe auch Kapitel 5.4.2).** Weitere Informationen, siehe Abb. 9.4.1; neue Abkürzung: E, Elastase.

**Abb. 9.4.5 MS-Spektren der Verdau von BSA (A – C), Carboanhydrase (D – F) und Myoglobin (G – I) mit Pepsin (siehe auch Kapitel 5.4.2).** Weitere Informationen, siehe Abb. 9.4.1; neue Abkürzung: P, Pepsin.

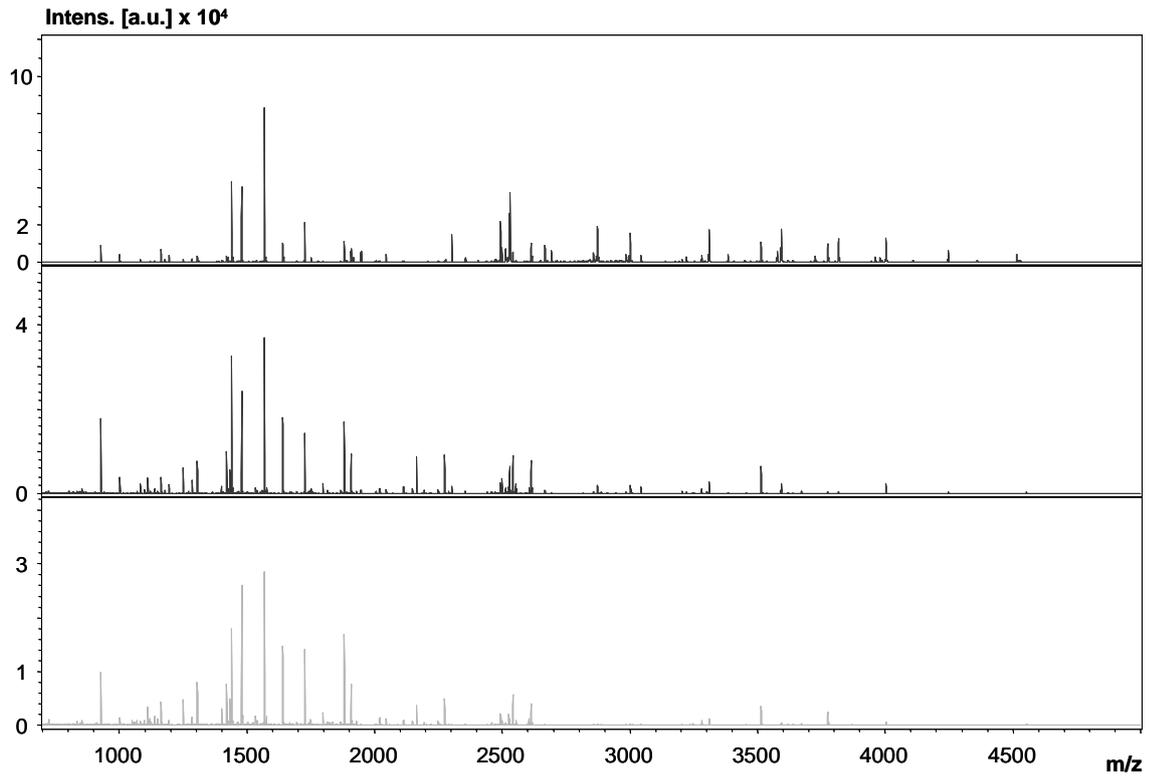


Abb. 9.4.1A T, L, BSA, RA

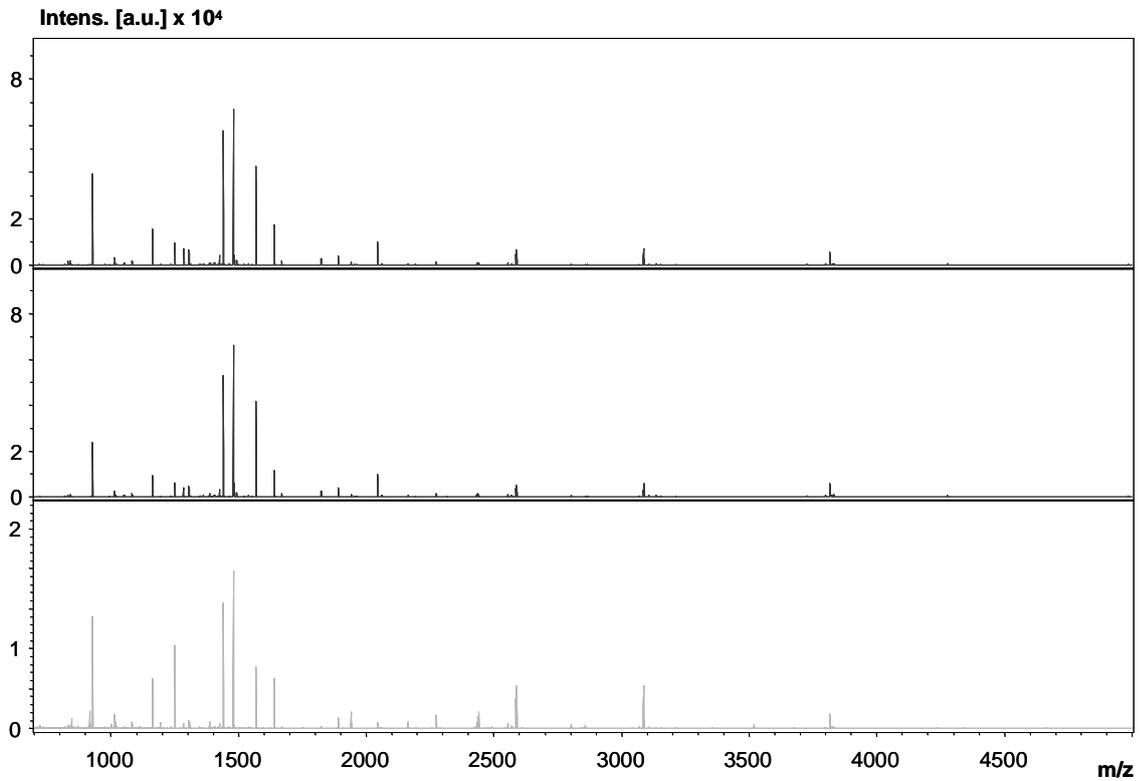


Abb. 9.4.1B T, L, BSA

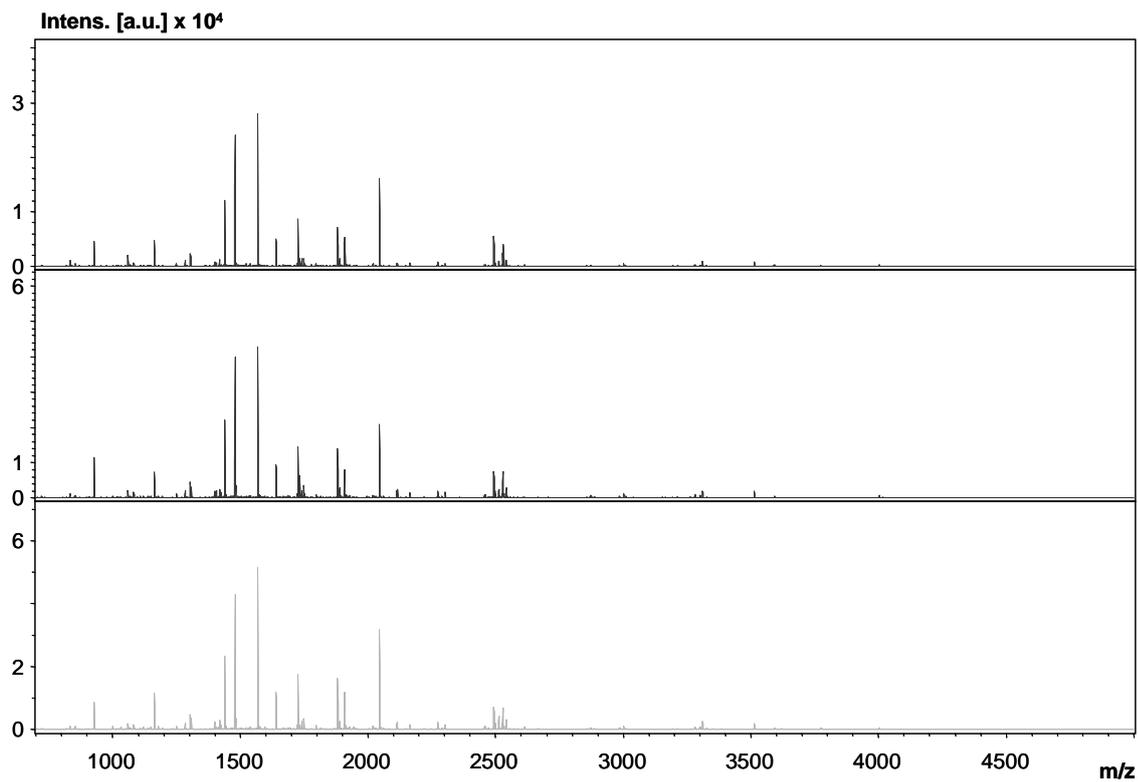


Abb. 9.4.1C T, Gel, BSA, RA

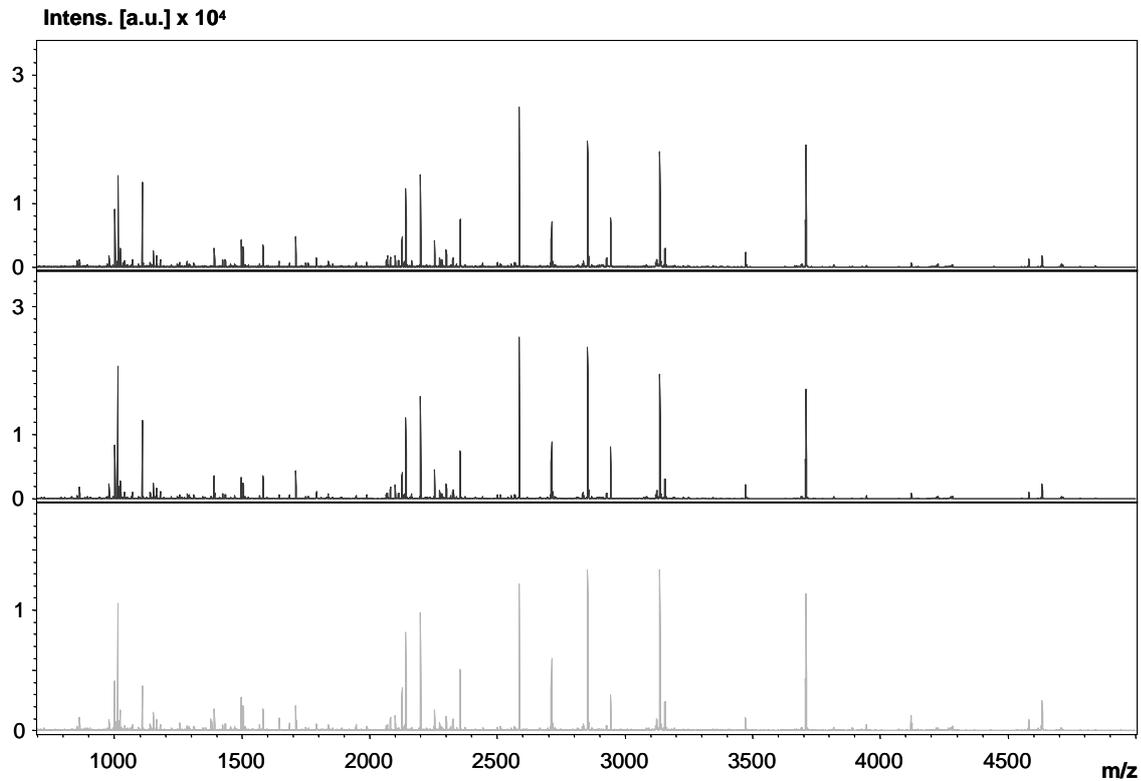


Abb. 9.4.1D T, L, CAH, RA

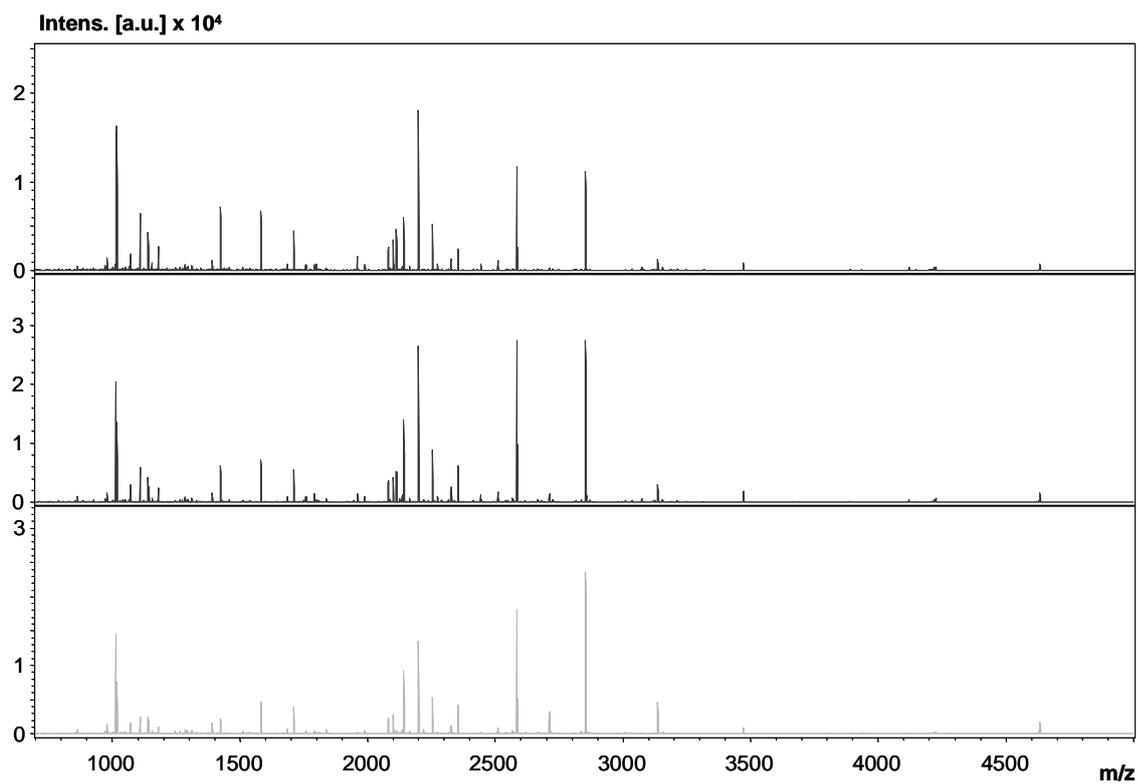


Abb. 9.4.1E T, L, CAH

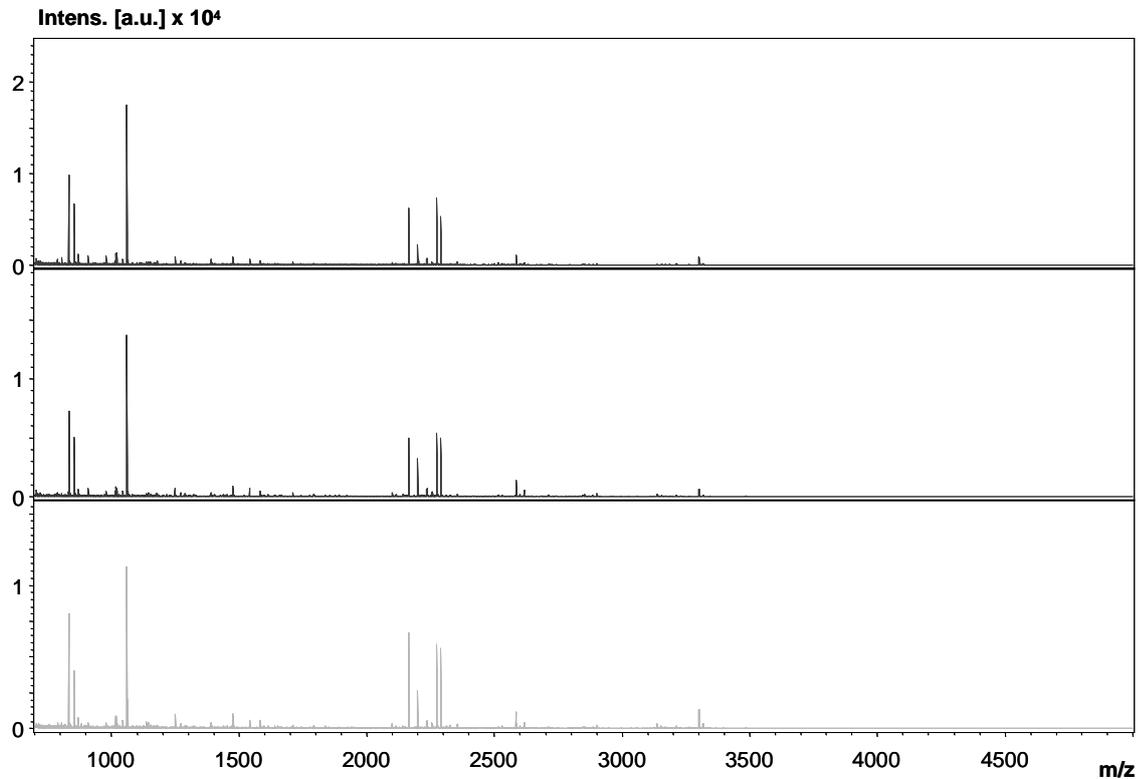


Abb. 9.4.1F T, Gel, CAH, RA

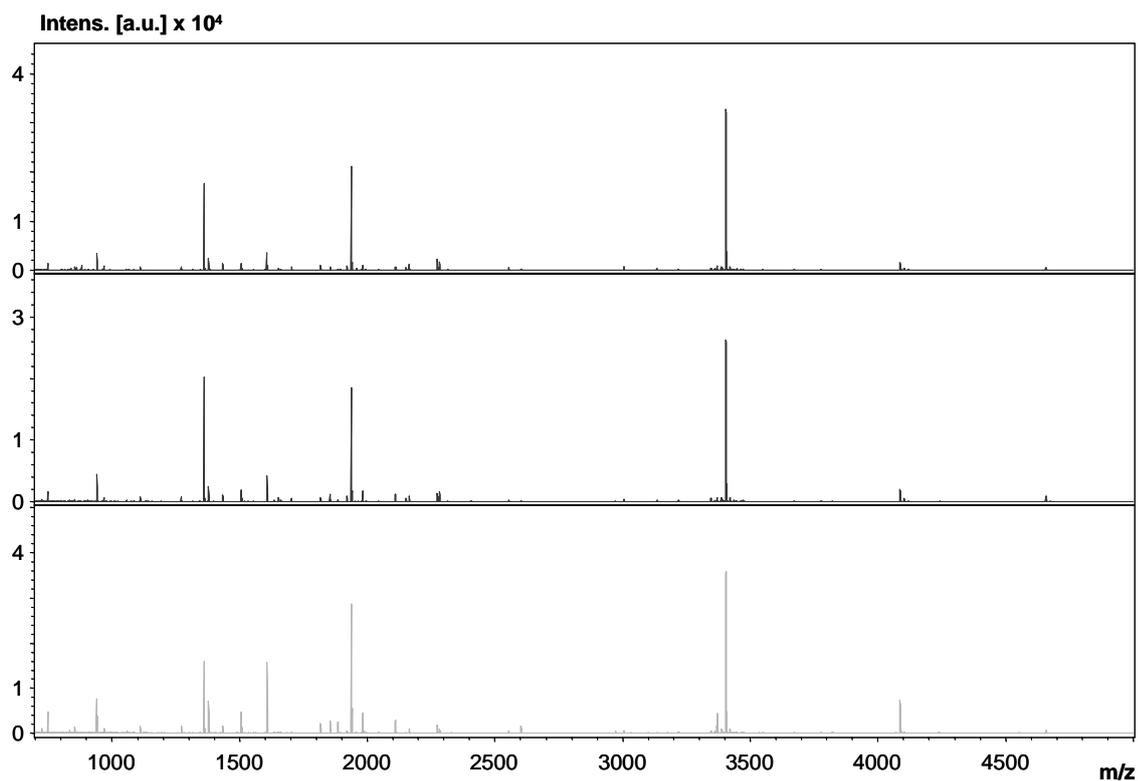


Abb. 9.4.1G T, L, MYO, RA

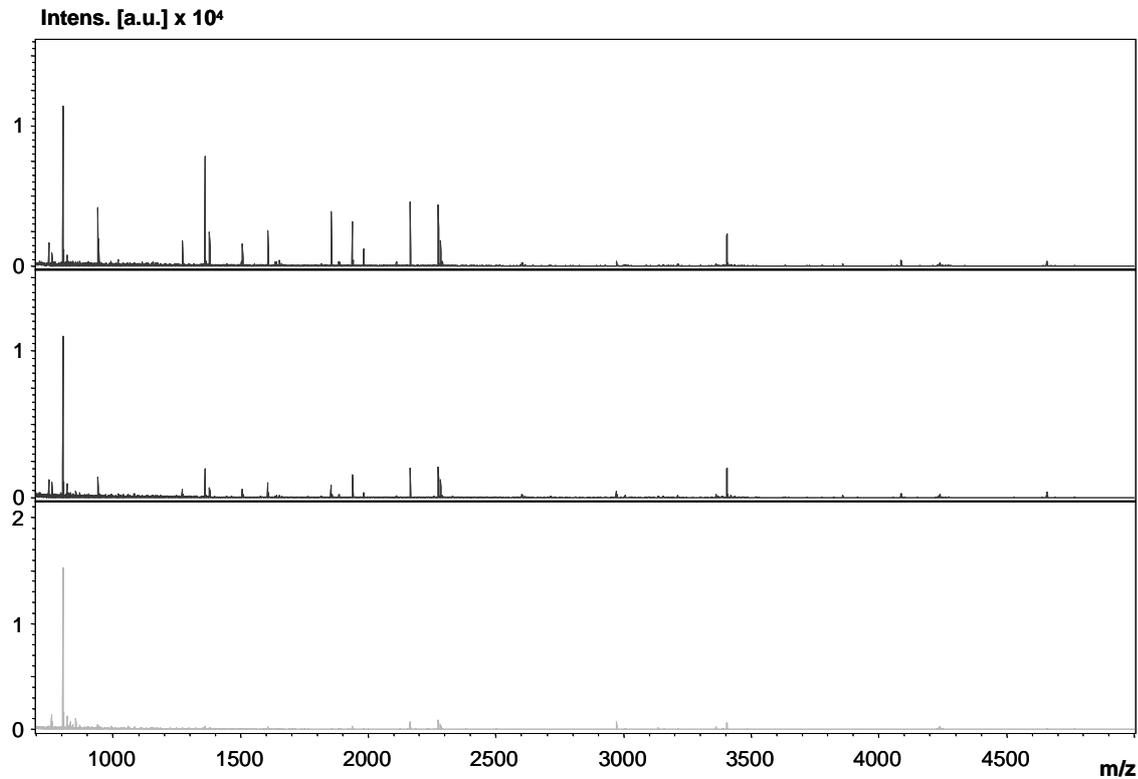


Abb. 9.4.1H T, L, MYO

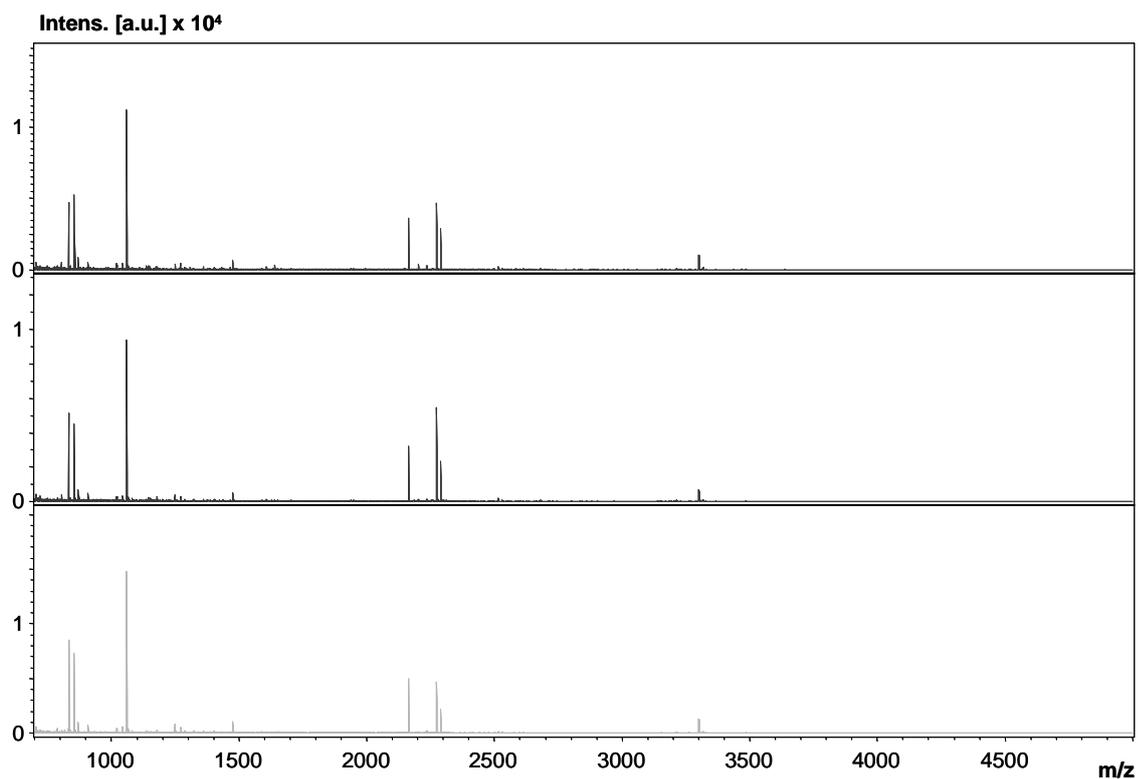


Abb. 9.4.1I T, Gel, MYO, RA

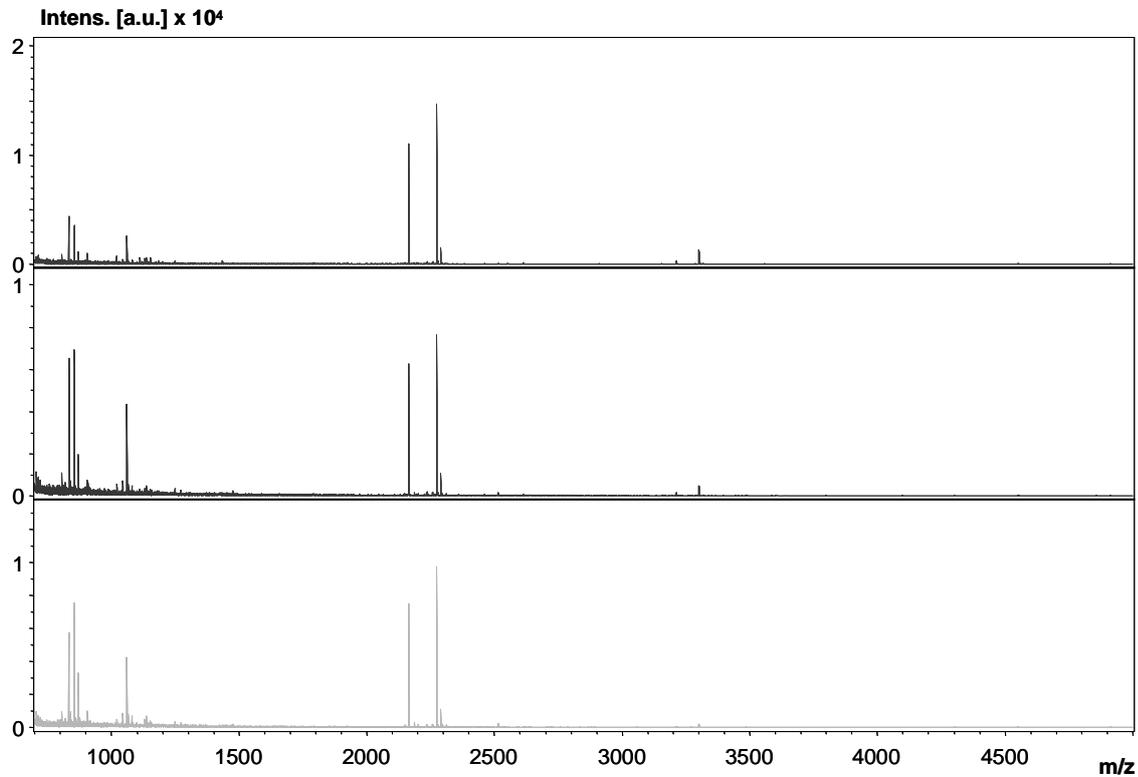


Abb. 9.4.1J T, L, REF, RA

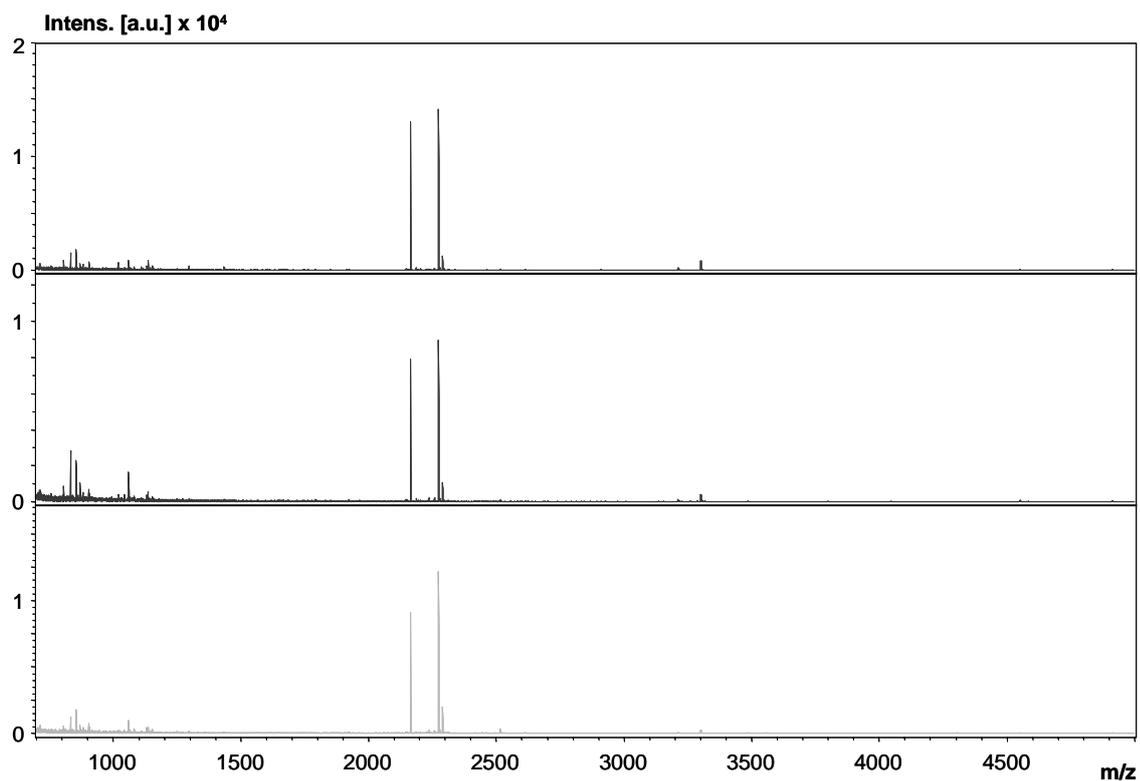


Abb. 9.4.1K T, L, REF

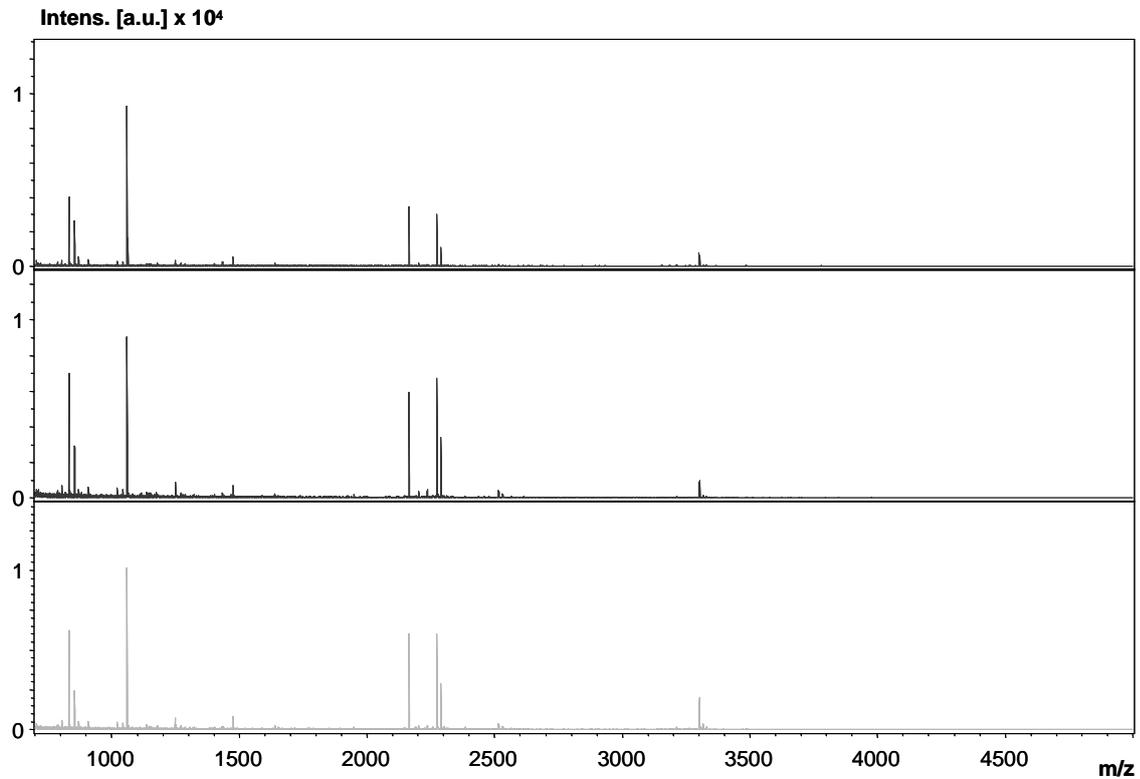


Abb. 9.4.1L T, L, REF, Gel

9. Anhang

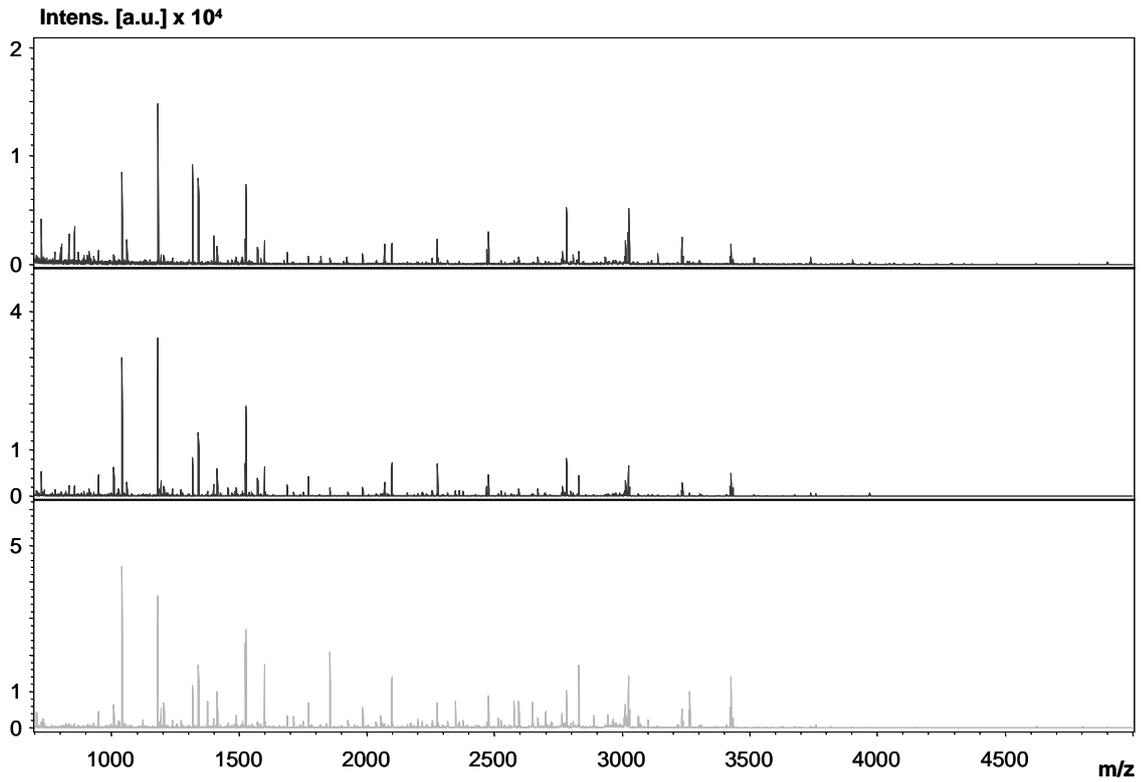


Abb. 9.4.2A C, L, BSA, RA

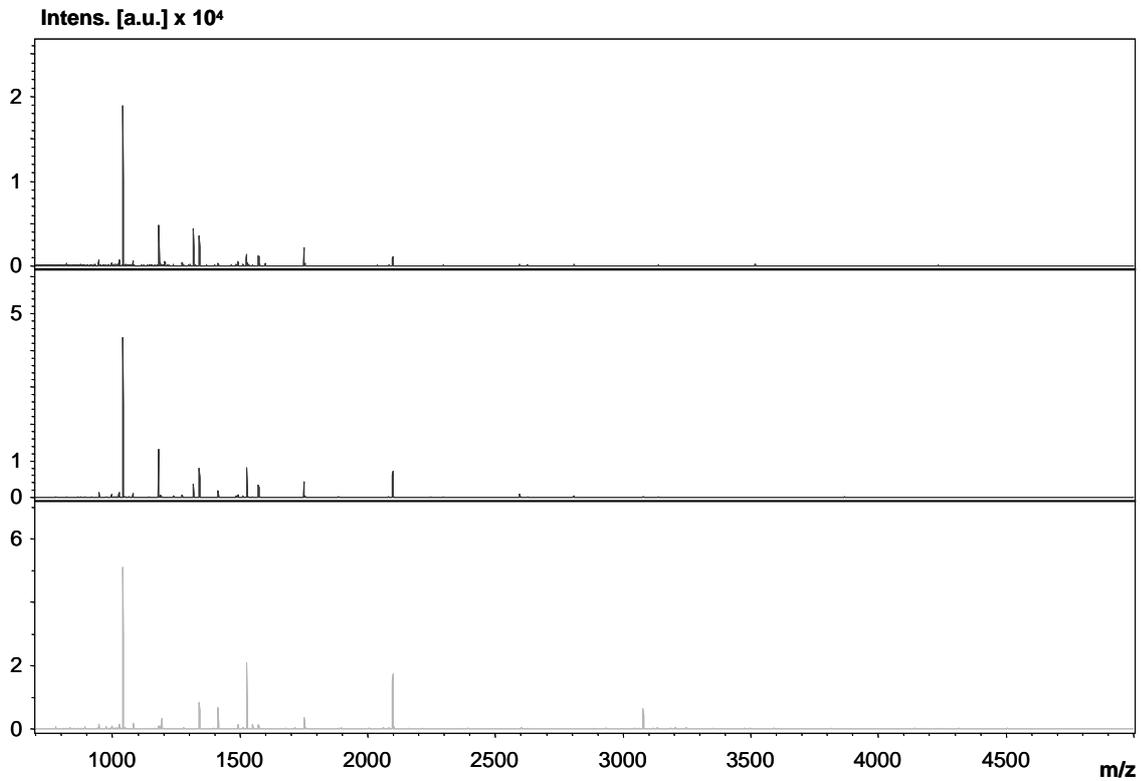


Abb. 9.4.2B C, L, BSA

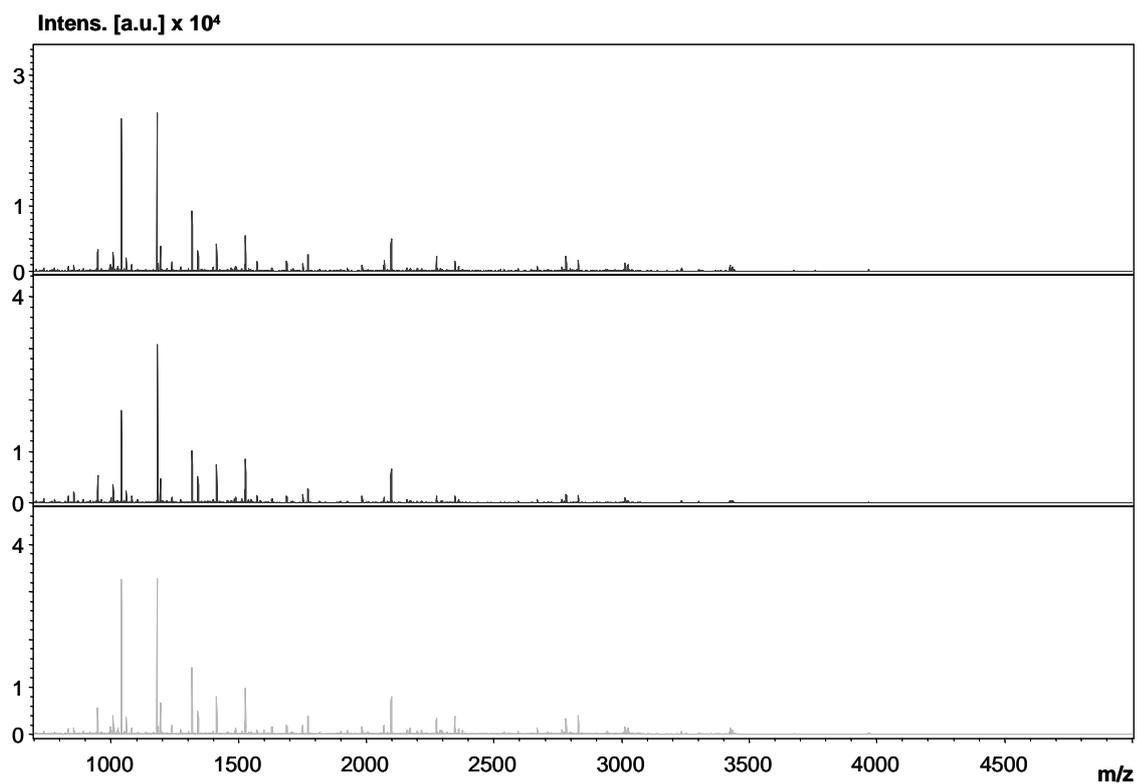


Abb. 9.4.2C C, Gel, BSA, RA

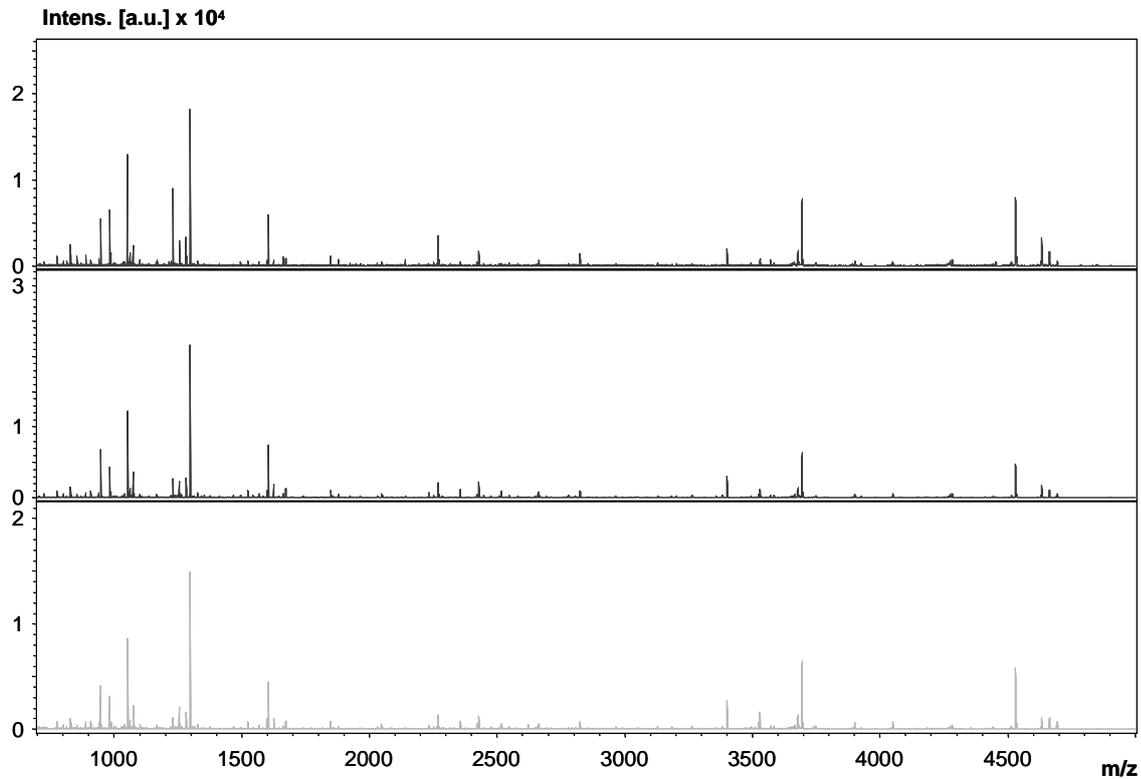


Abb. 9.4.2D C, L, CAH, RA

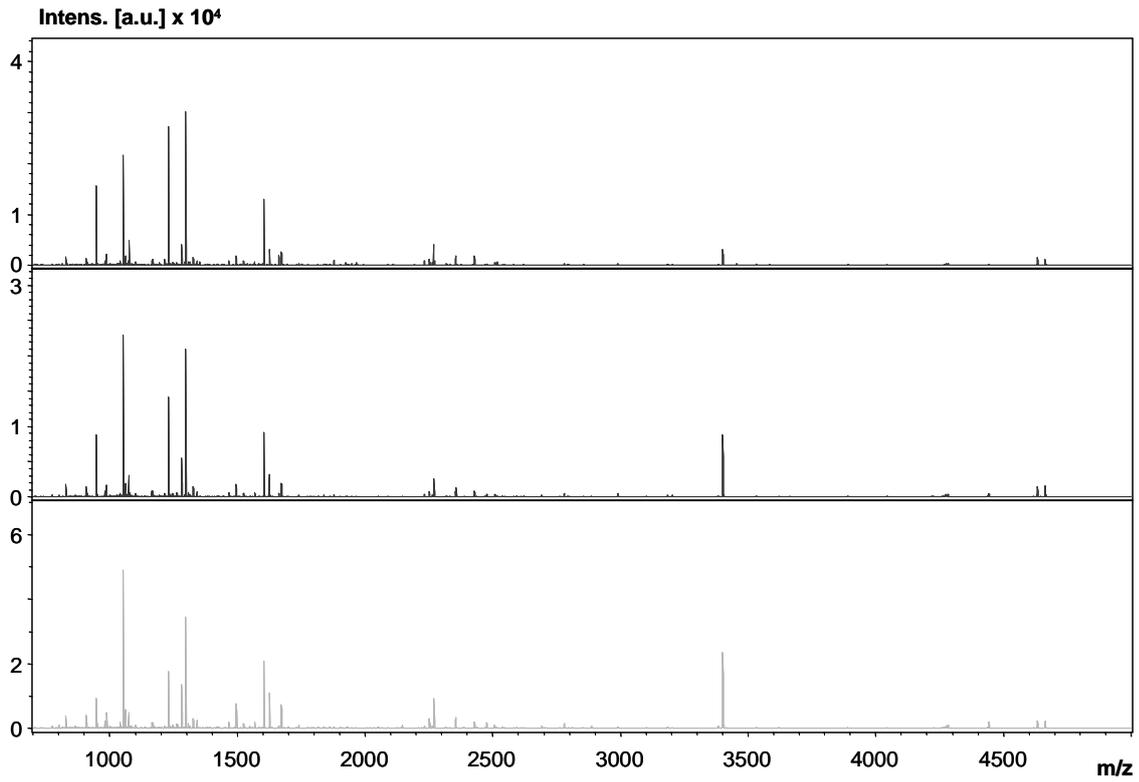


Abb. 9.4.2E C, L, CAH

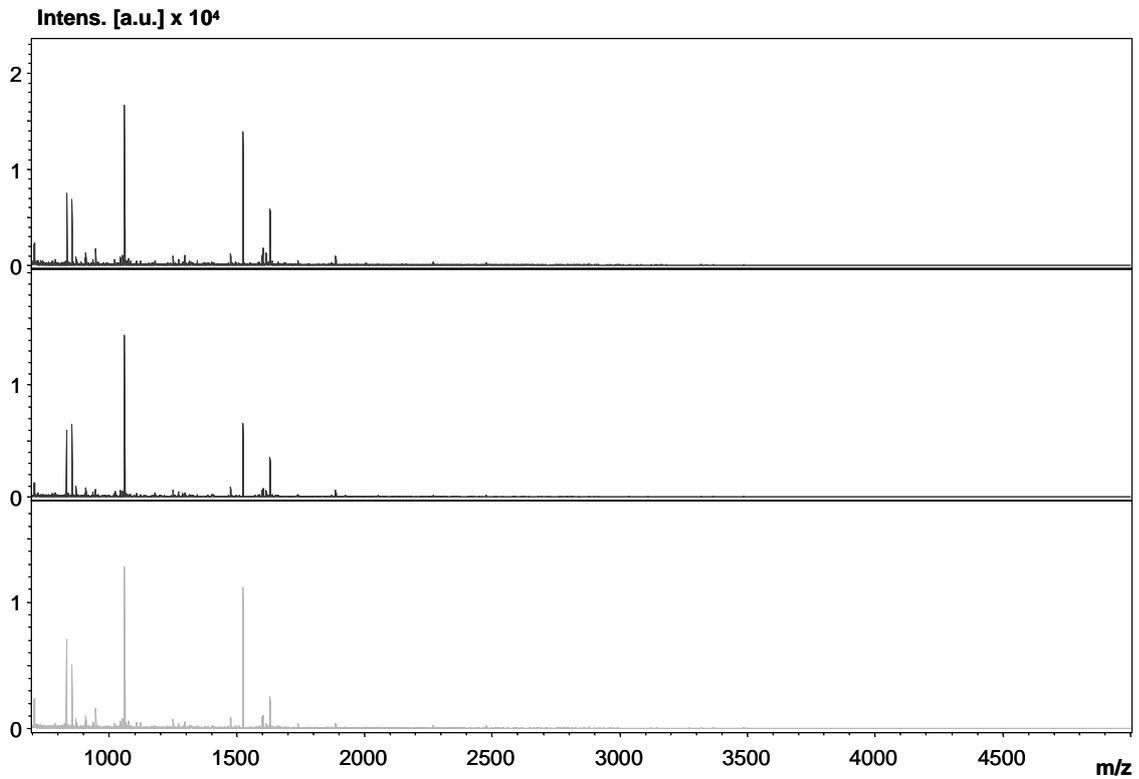


Abb. 9.4.2F C, Gel, CAH, RA

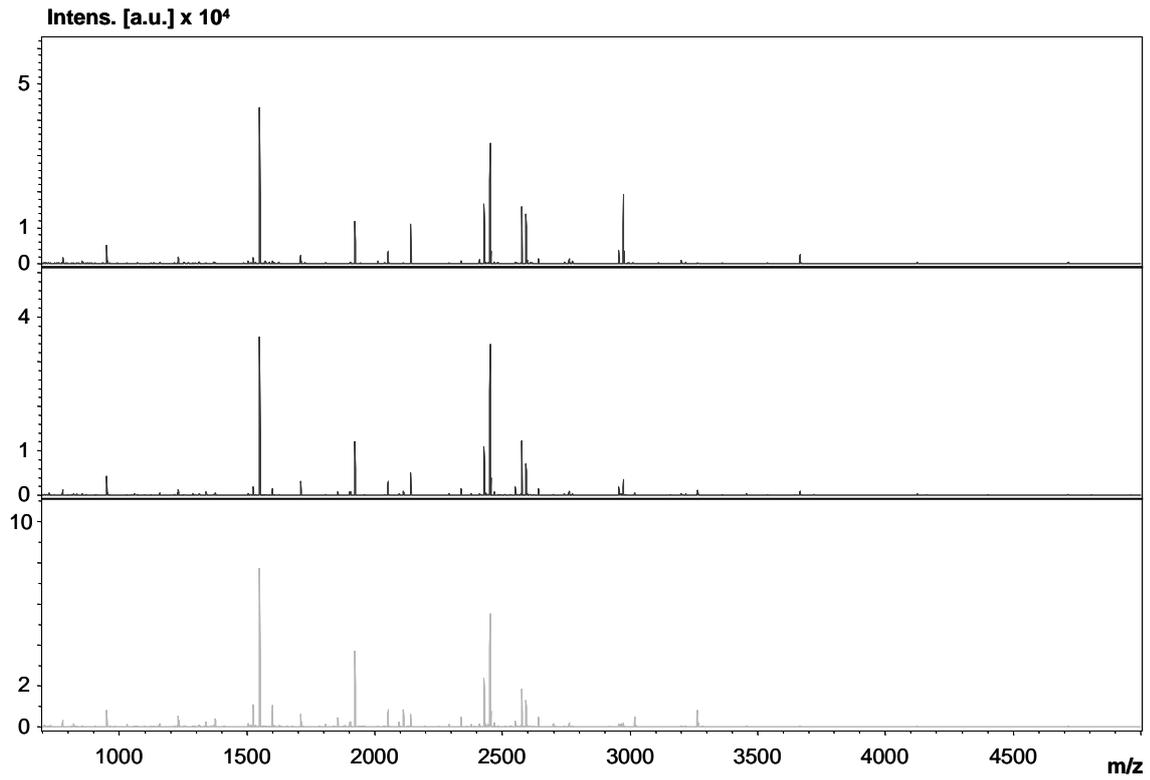


Abb. 9.4.2G C, L, MYO, RA

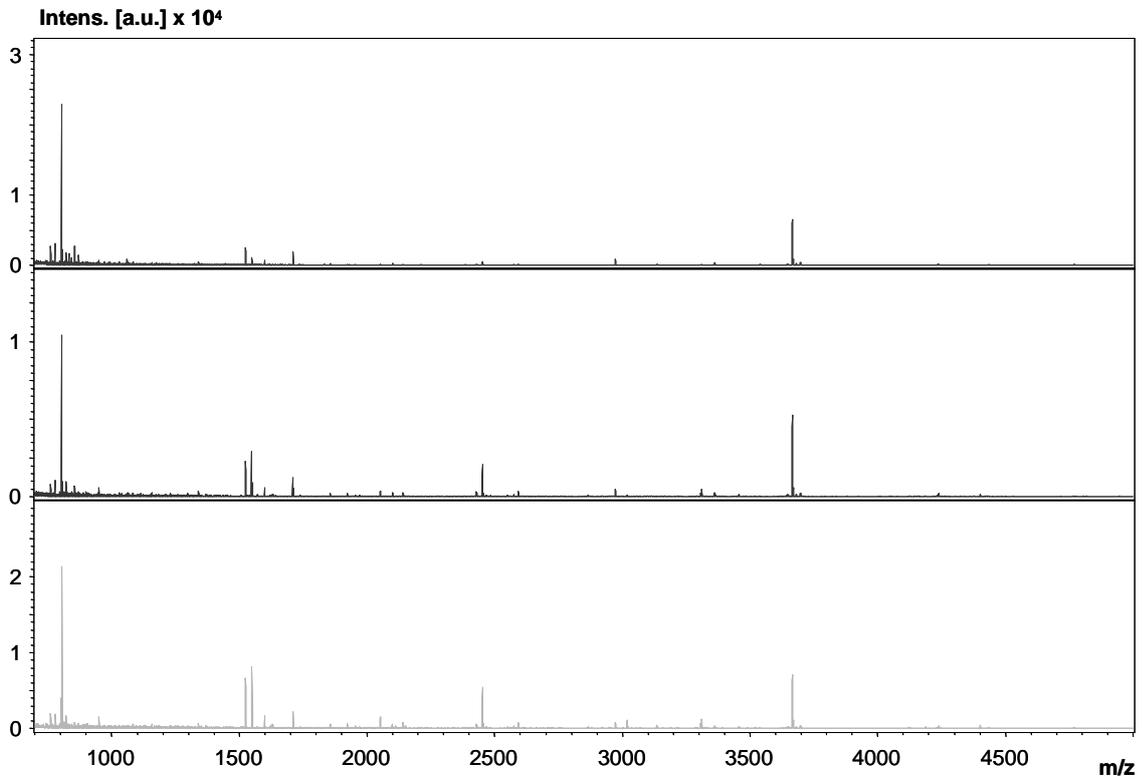


Abb. 9.4.2H C, L, MYO

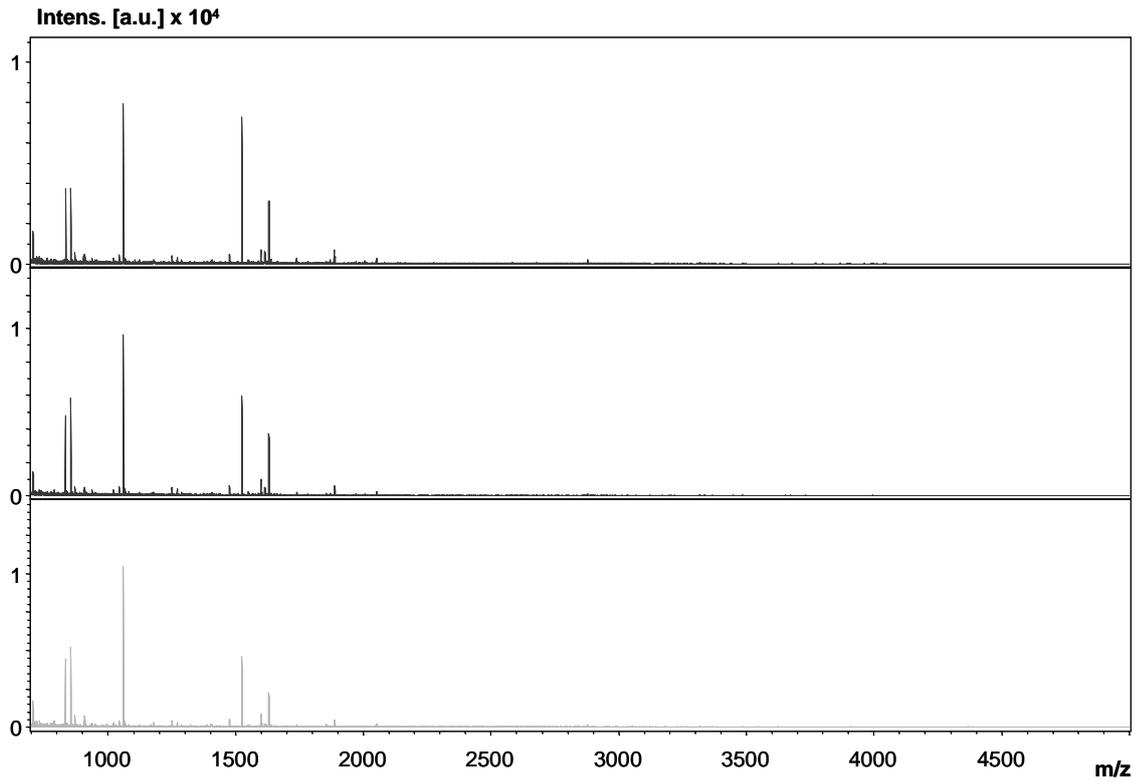


Abb. 9.4.2I C, Gel, MYO, RA

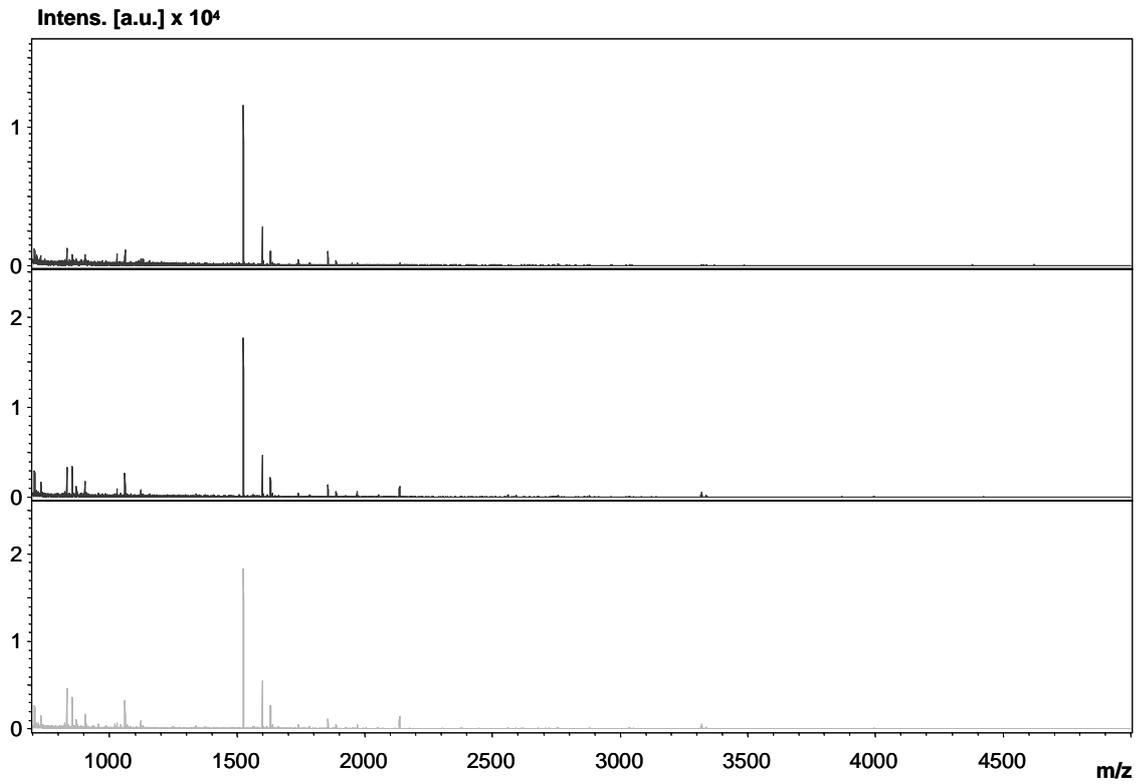


Abb. 9.4.2J C, L, REF, RA

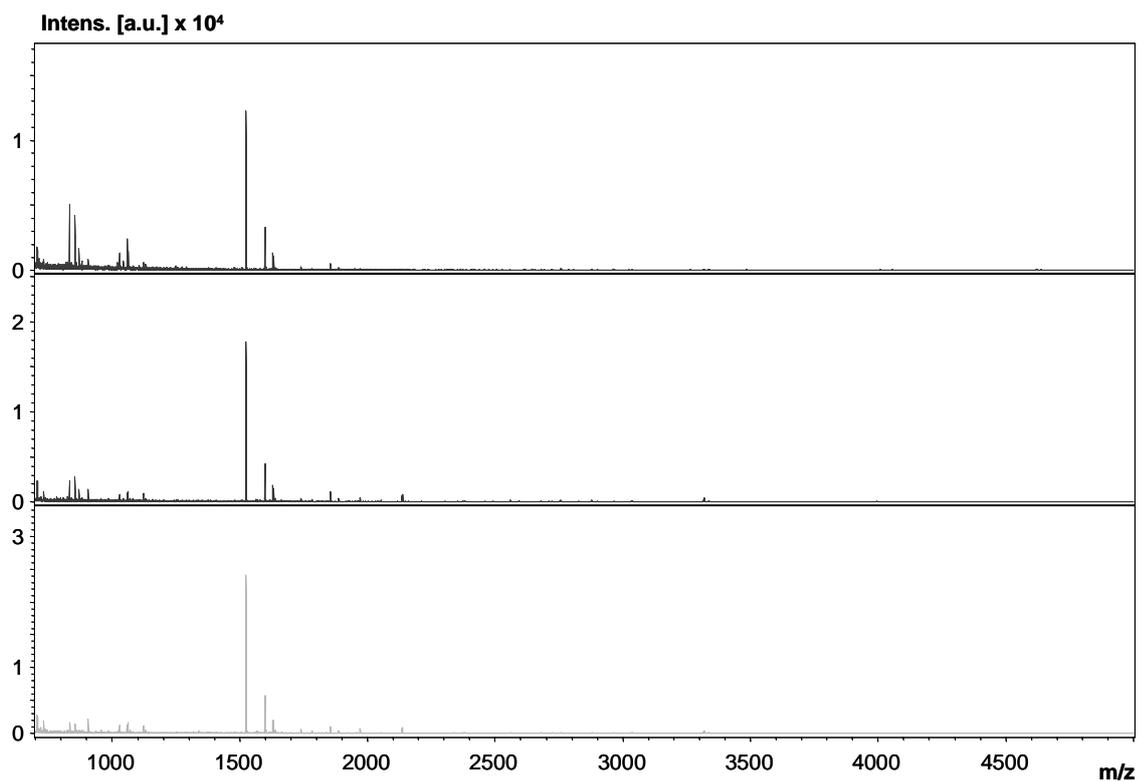


Abb. 9.4.2K C, L, REF

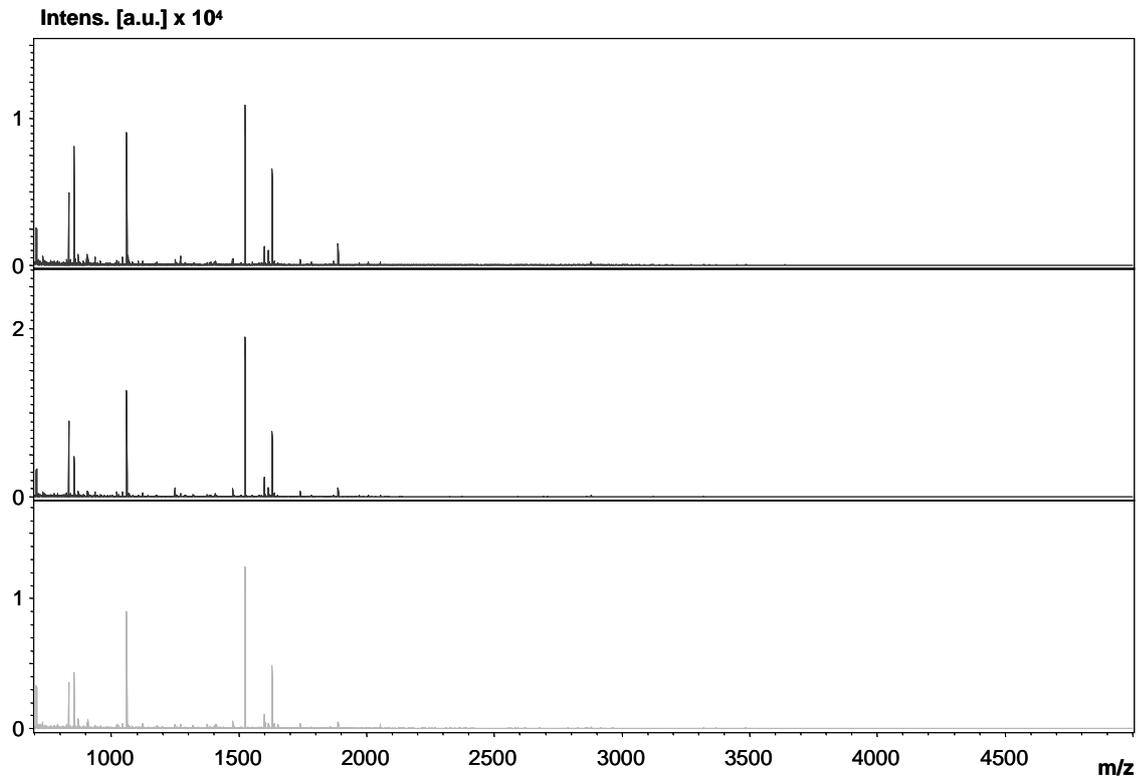


Abb. 9.4.2L C, Gel, REF, RA

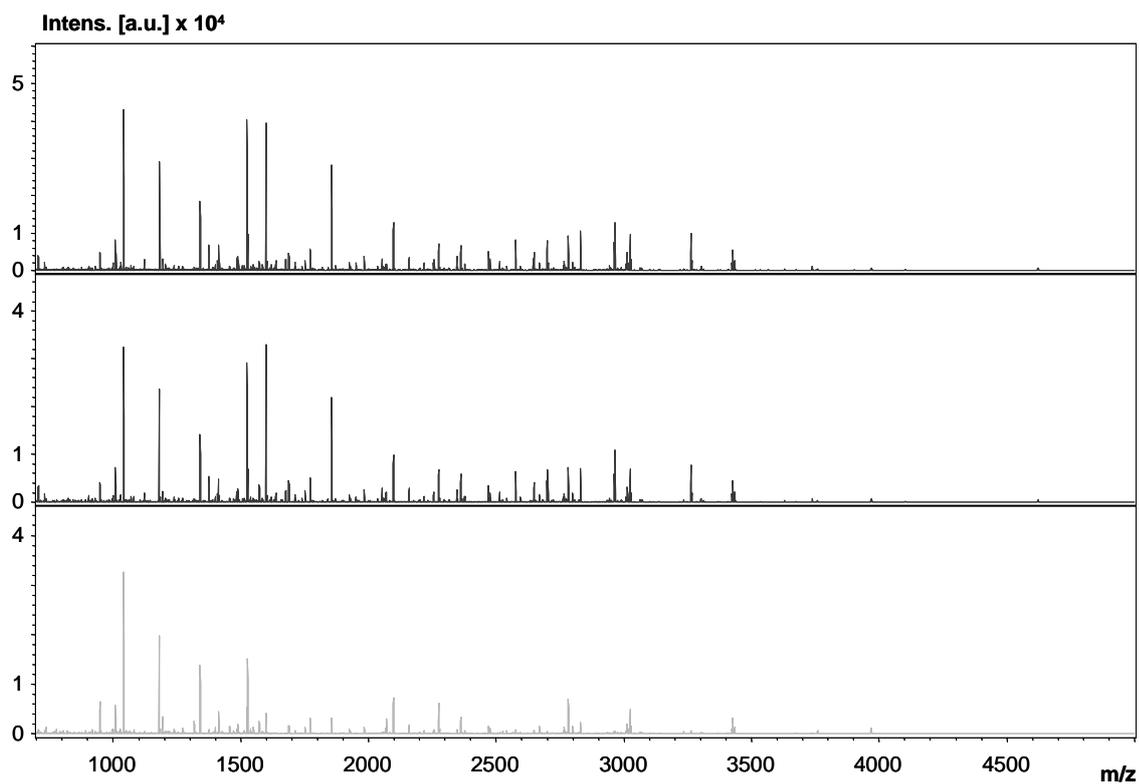


Abb. 9.4.3A mC, L, BSA, RA

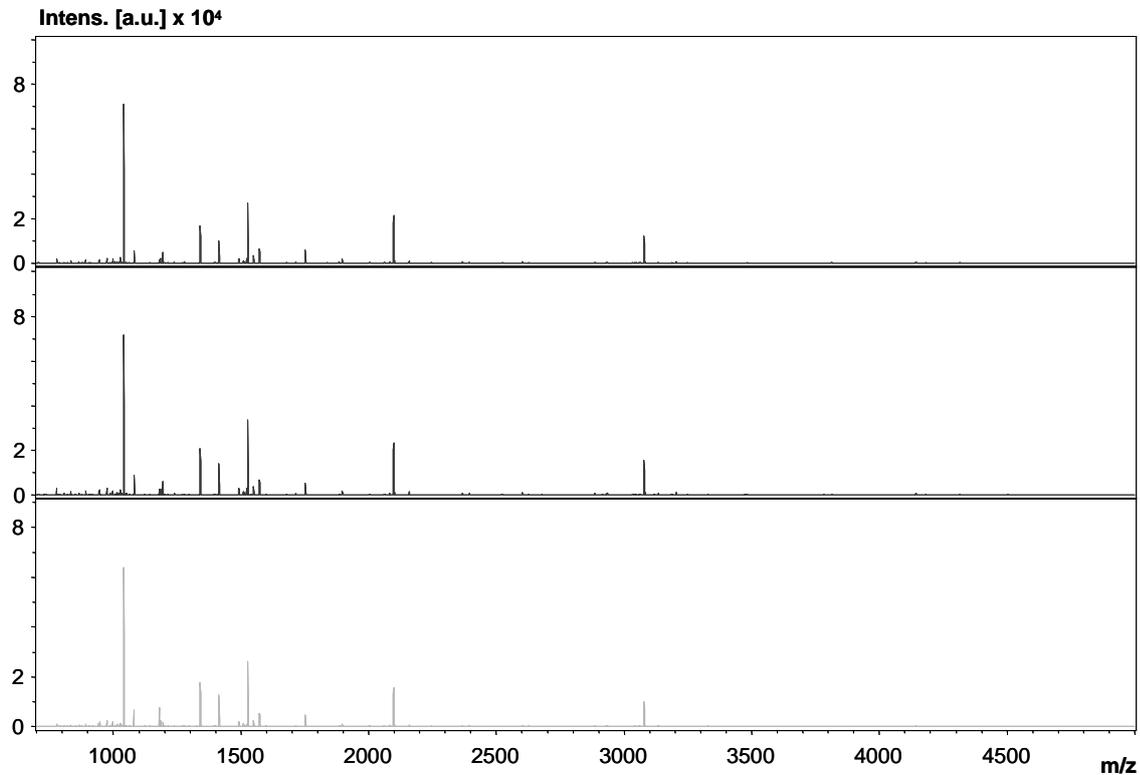


Abb. 9.4.3B mC, L, BSA

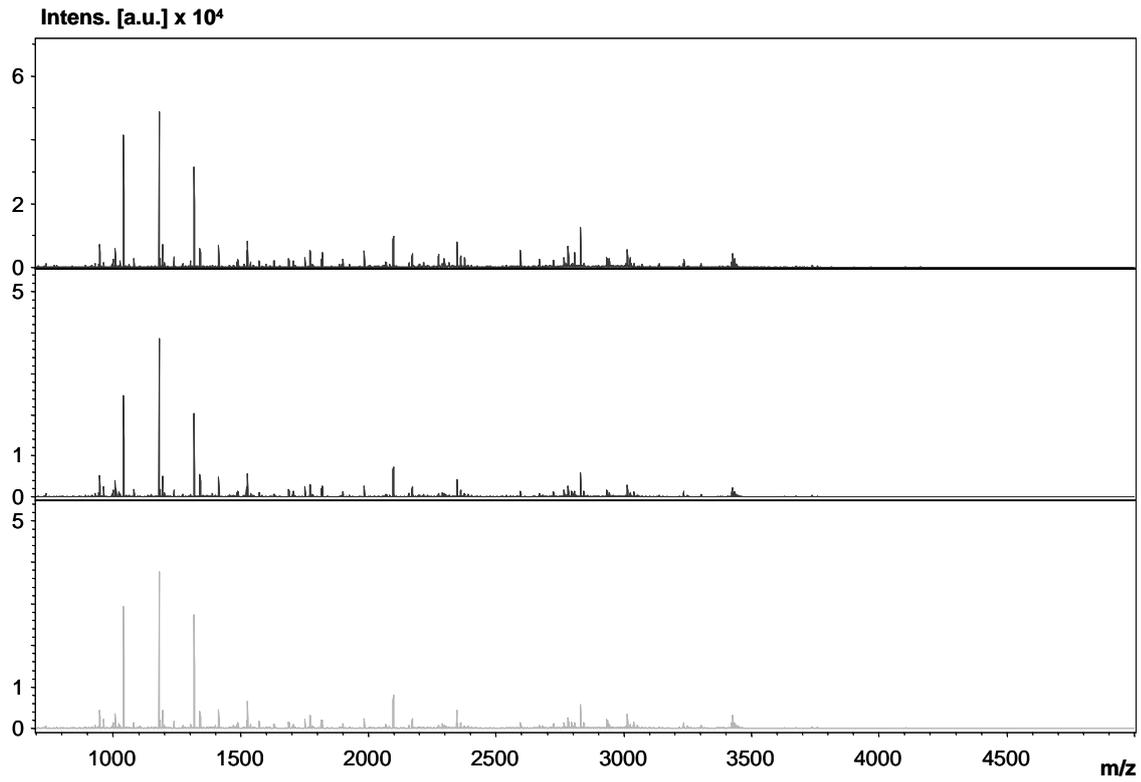


Abb. 9.4.3C mC, Gel, BSA, RA

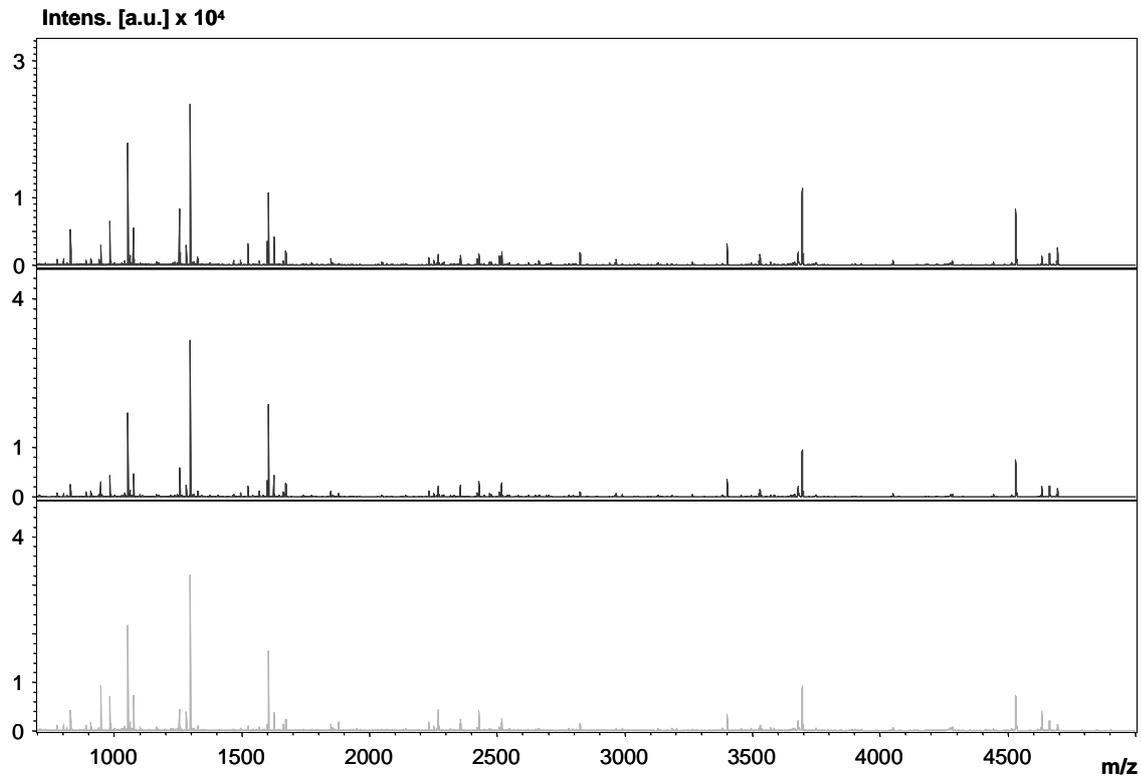


Abb. 9.4.3D mC, L, CAH, RA

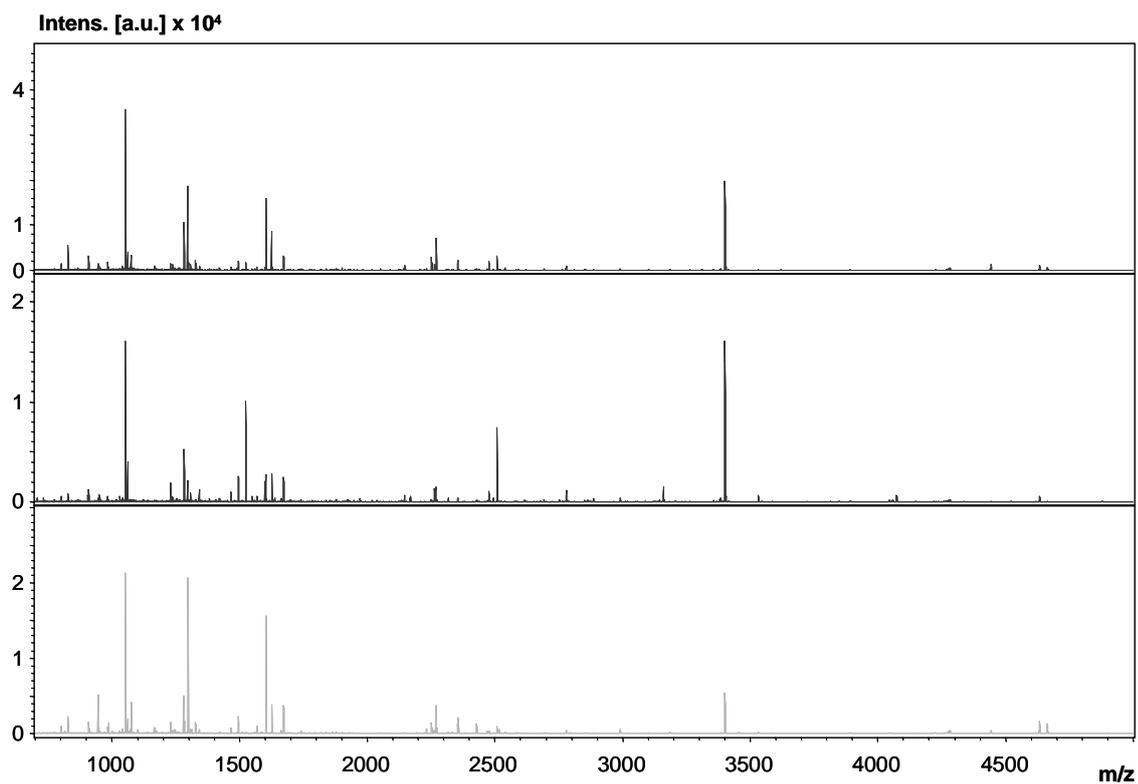


Abb. 9.4.3E mC, L, CAH

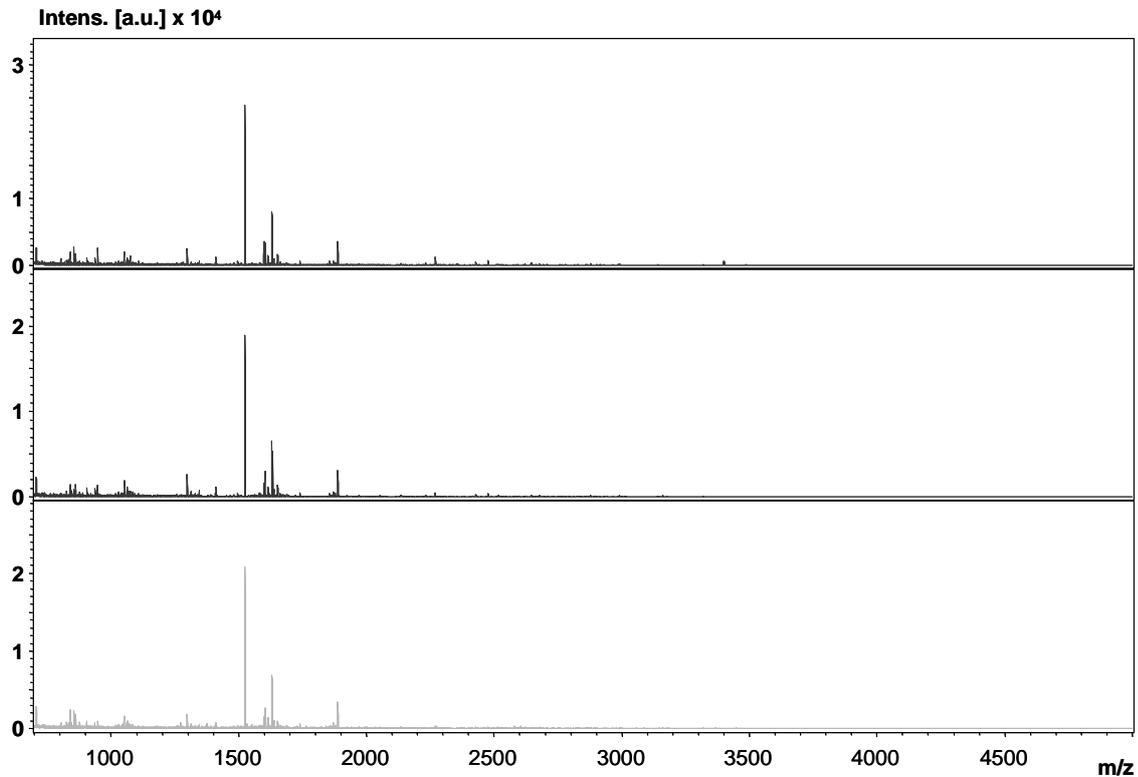


Abb. 9.4.3F mC, Gel, CAH, RA

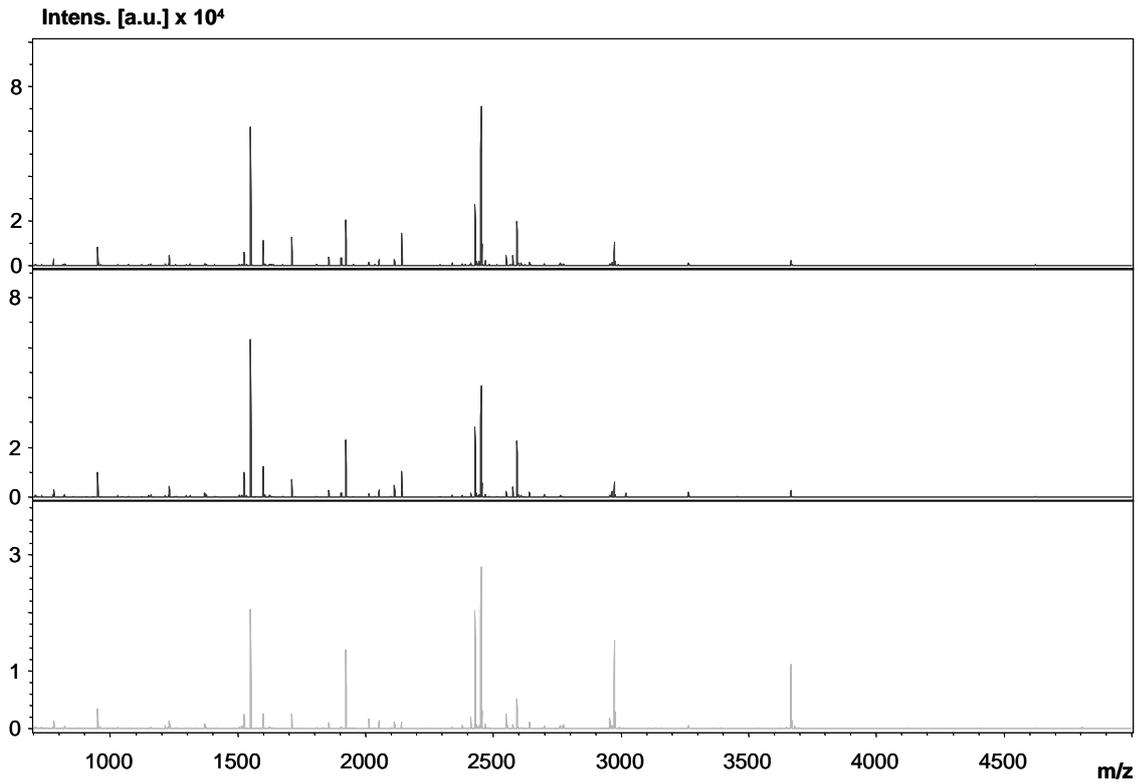


Abb. 9.4.3G mC, L, MYO, RA

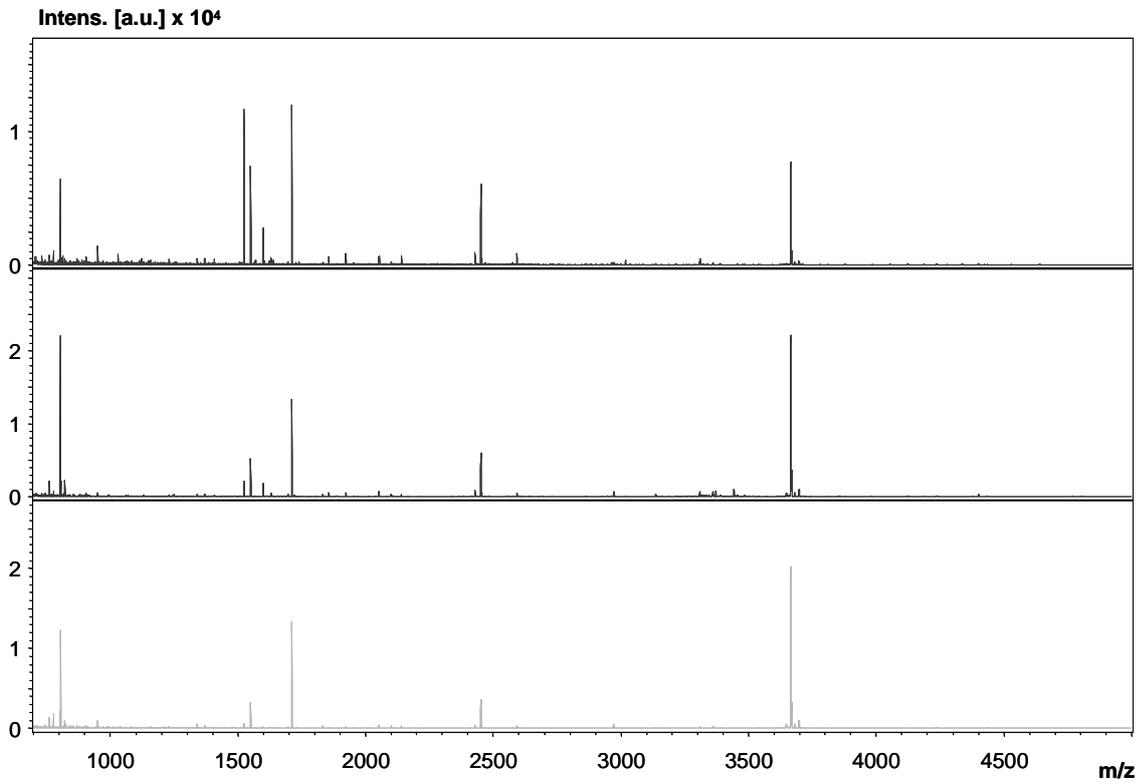


Abb. 9.4.3H mC, L, MYO

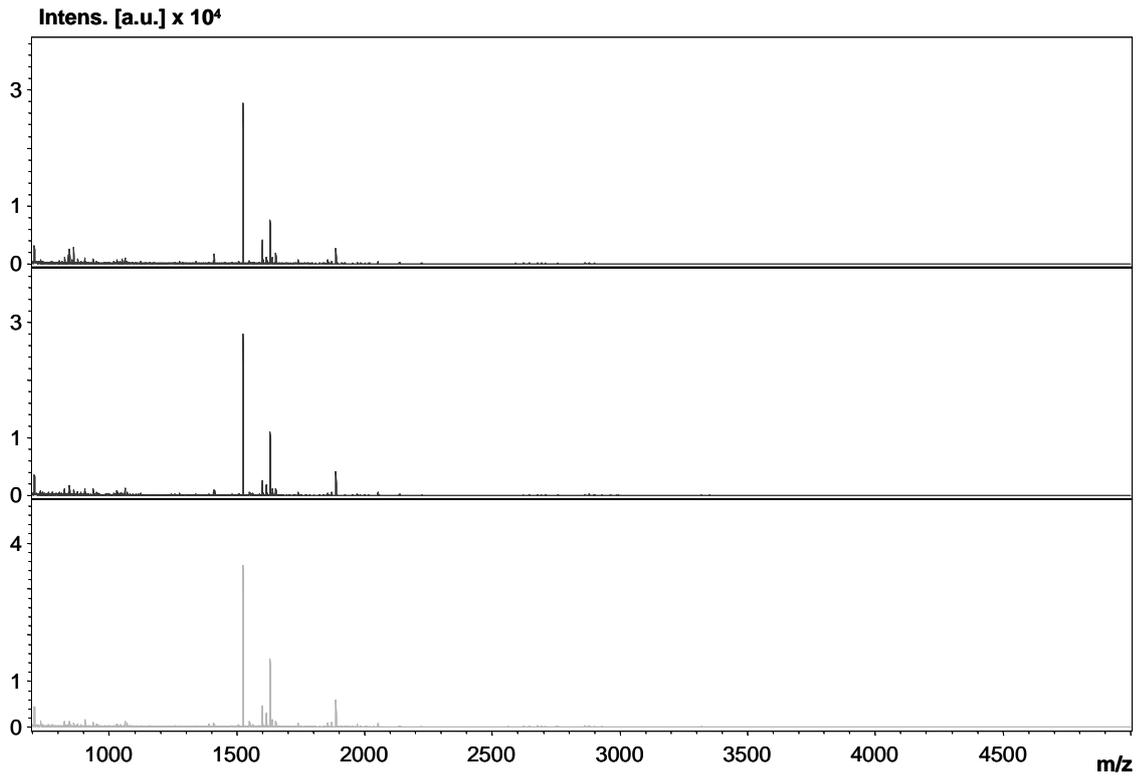


Abb. 9.4.3I mC, Gel, MYO, RA

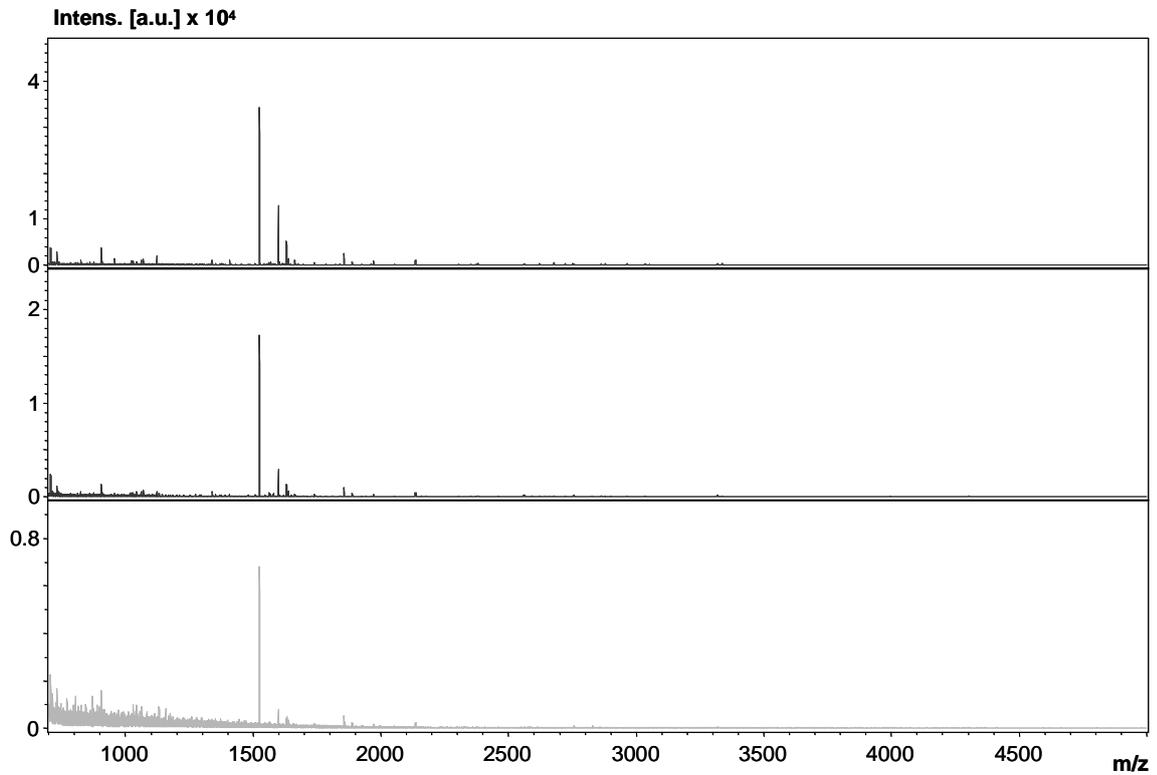


Abb. 9.4.3J mC, L, REF, RA

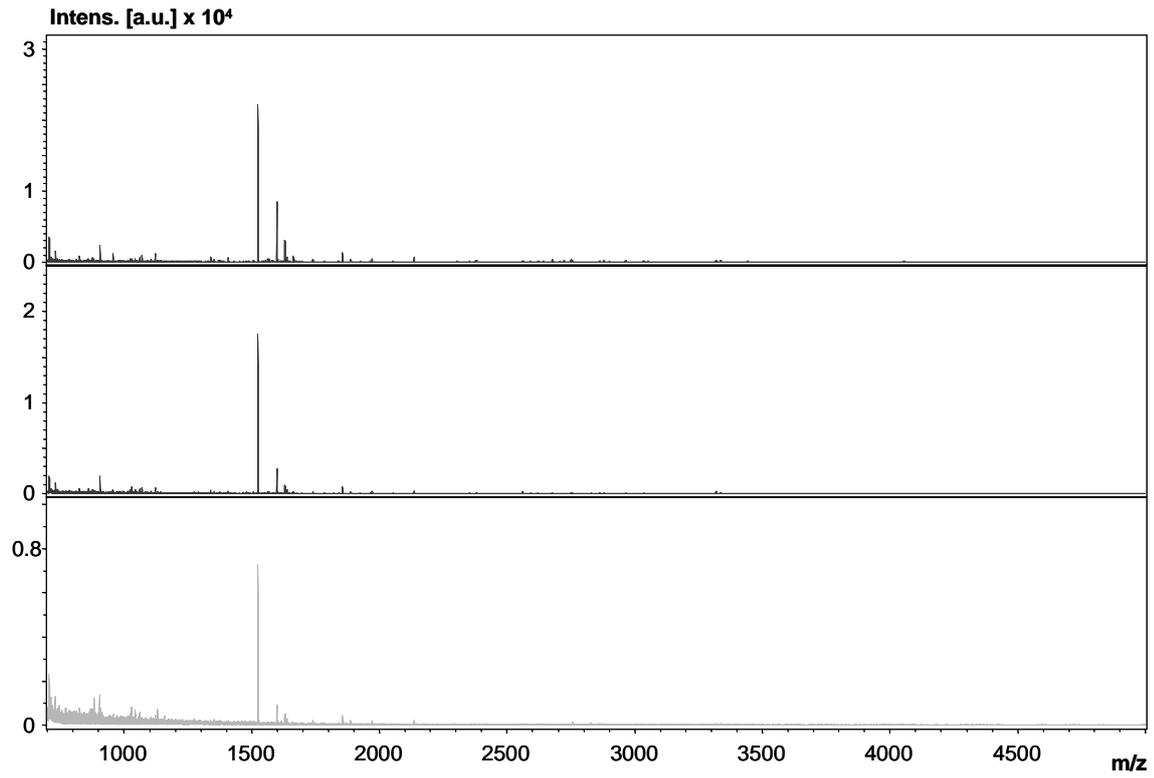


Abb. 9.4.3K mC, L, REF

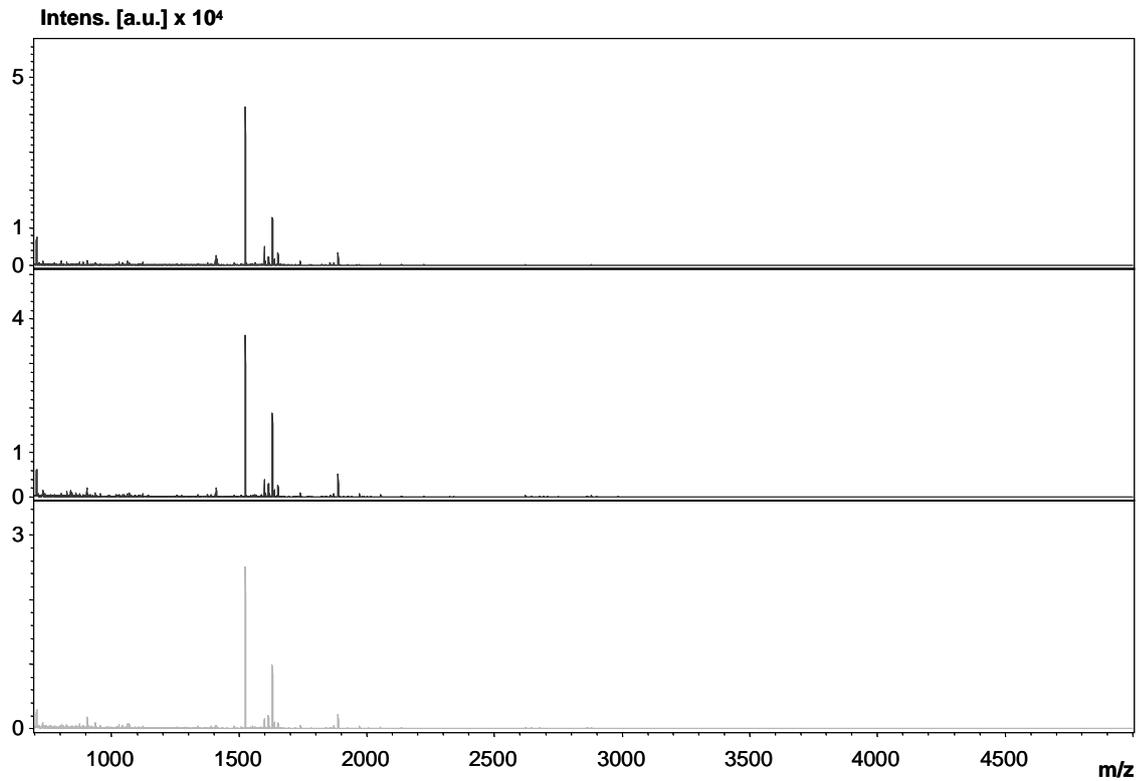


Abb. 9.4.3L mC, Gel, REF, RA

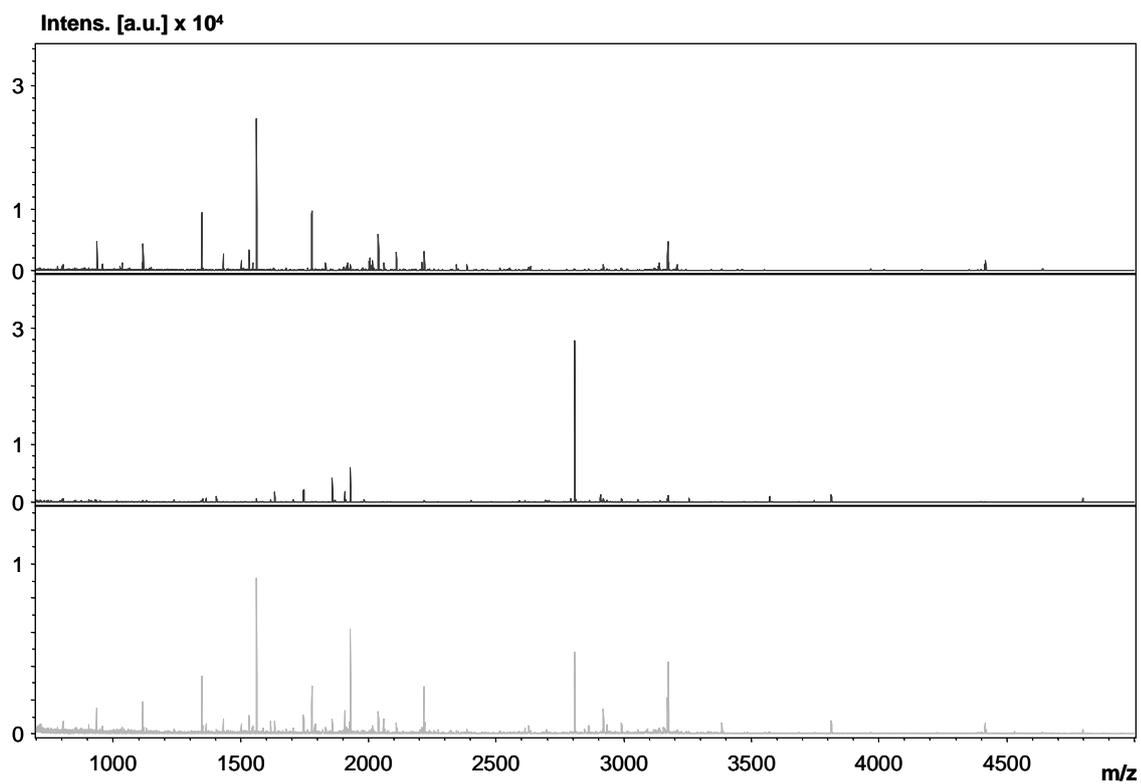


Abb. 9.4.4A E, L, BSA, RA

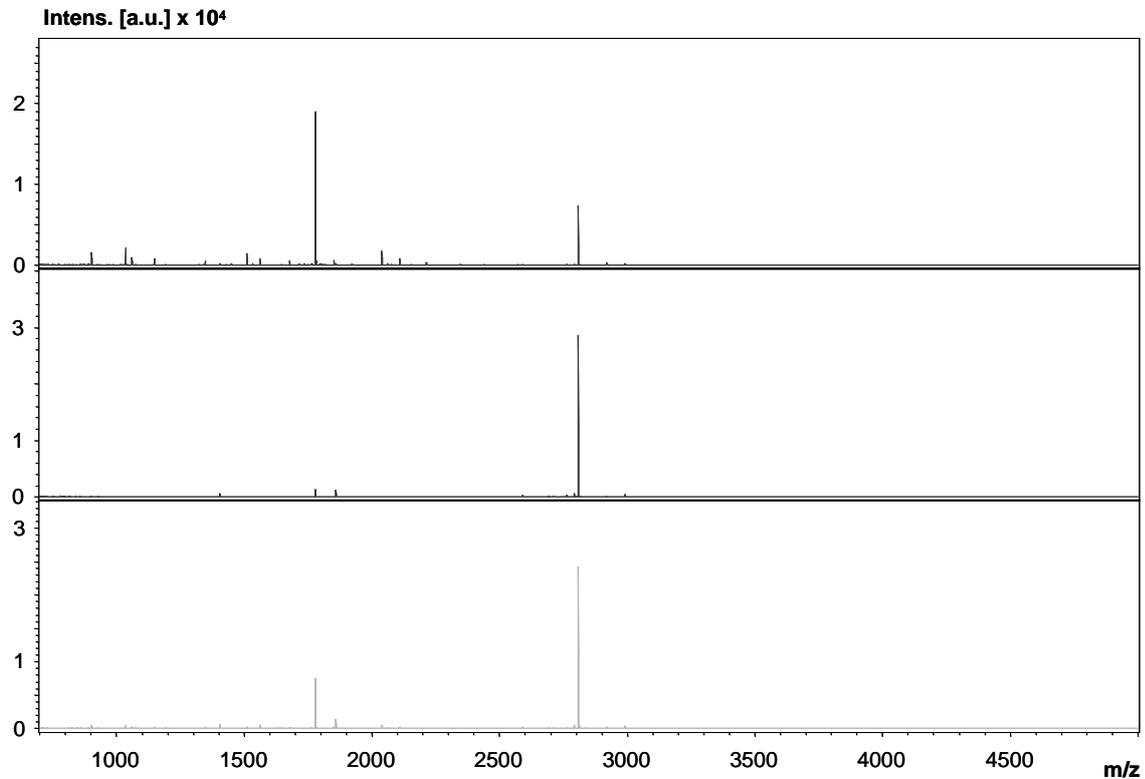


Abb. 9.4.4B E, L, BSA

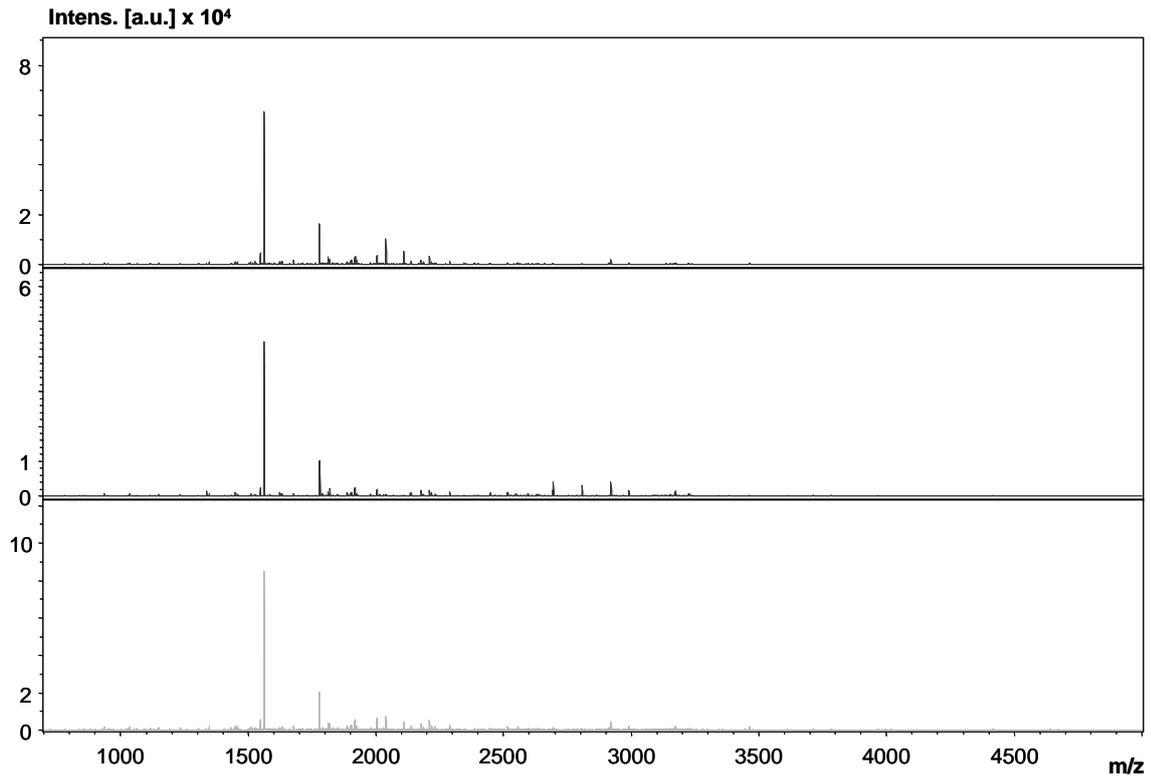


Abb. 9.4.4C E, Gel, BSA, RA

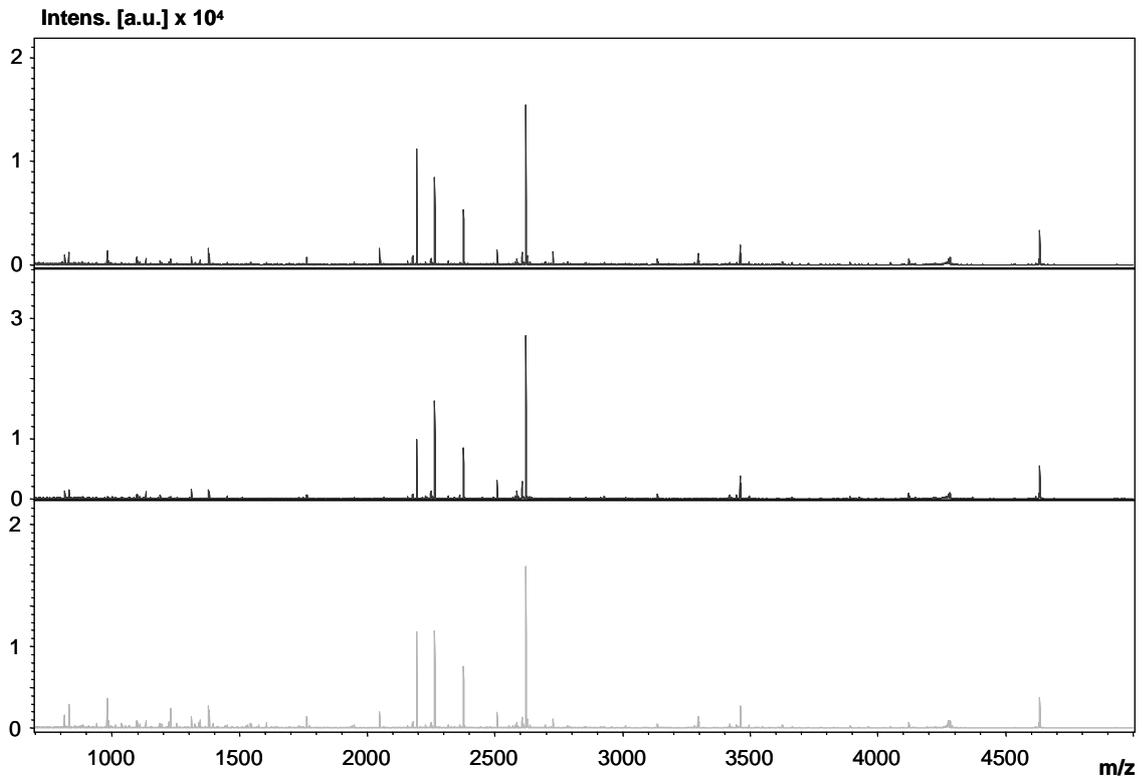


Abb. 9.4.4D E, L, CAH, RA

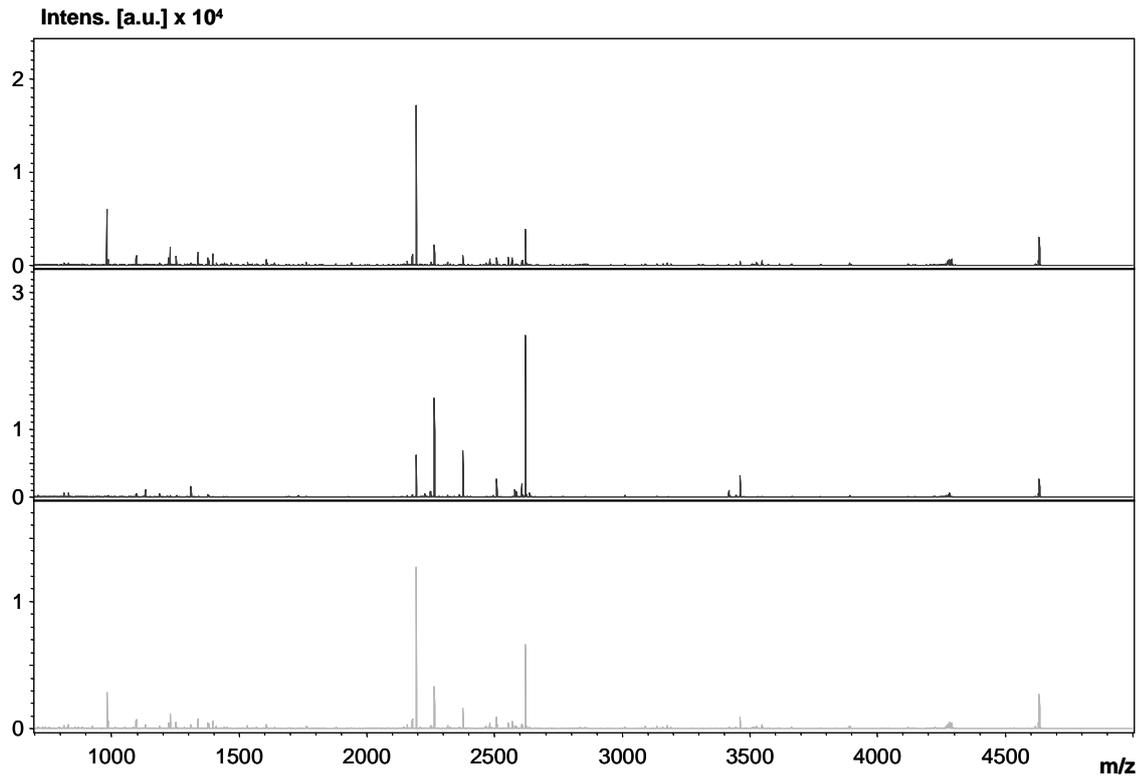


Abb. 9.4.4E E, L, CAH

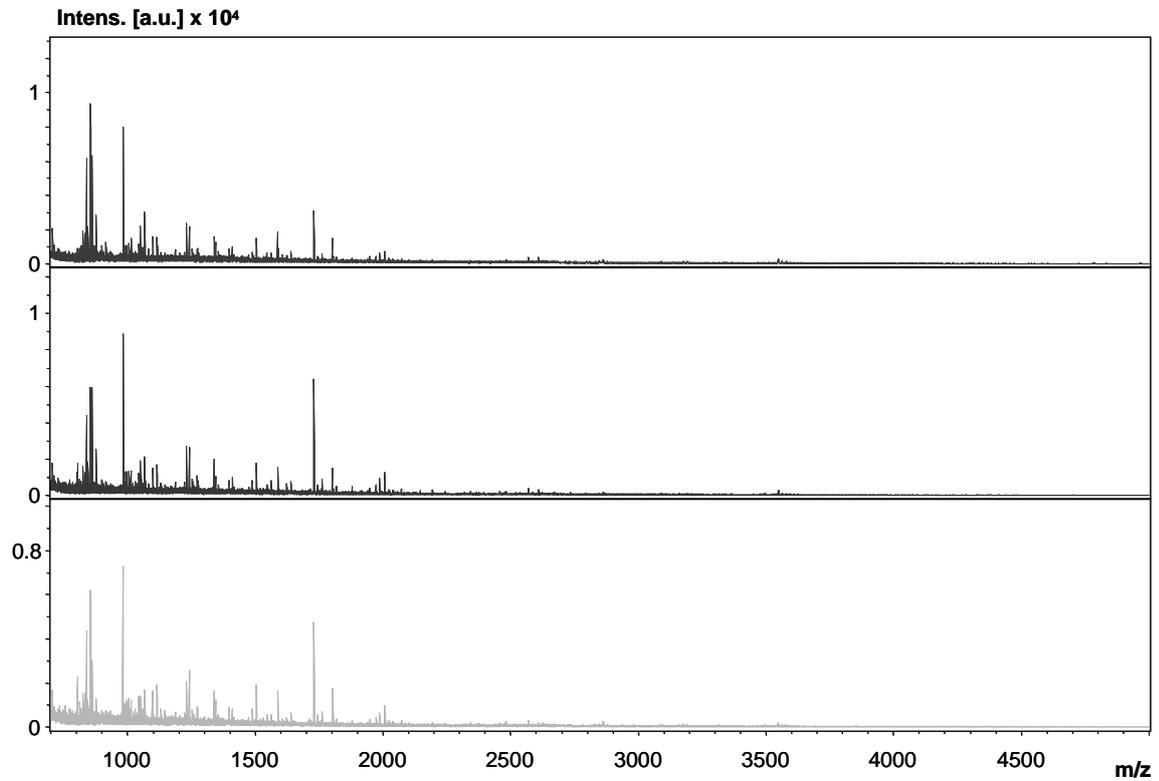


Abb. 9.4.4F E, Gel, CAH, RA

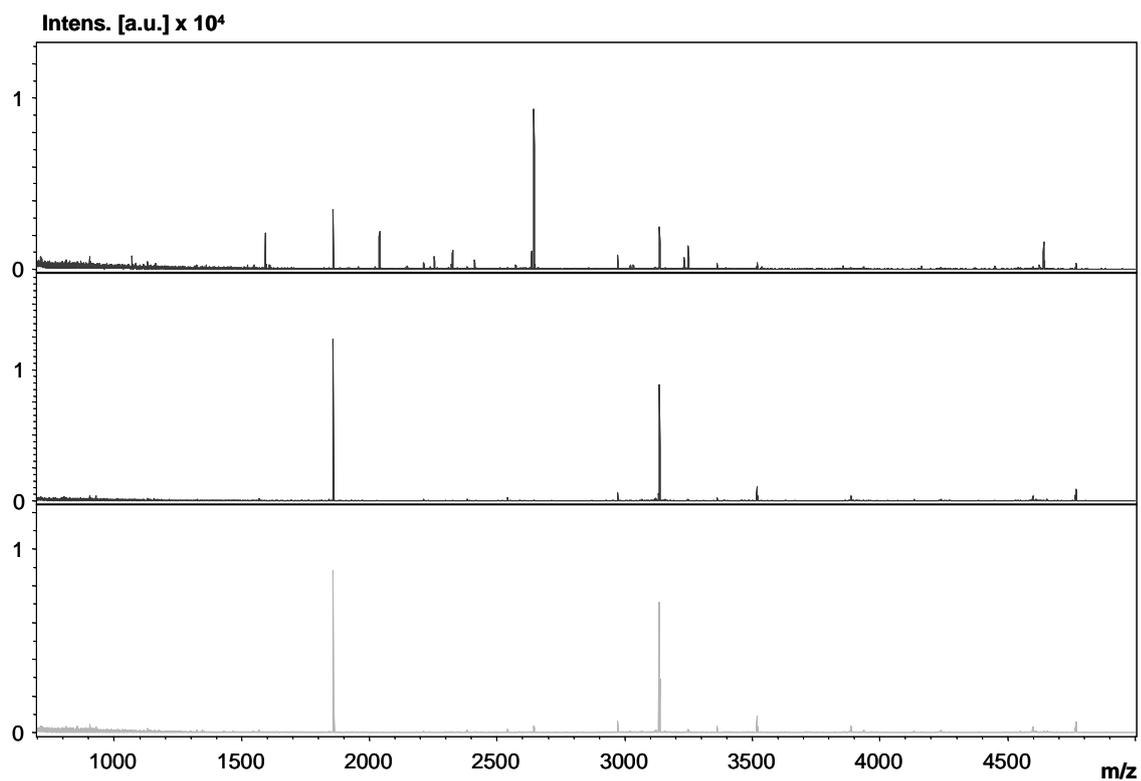


Abb. 9.4.4G E, L, MYO, RA

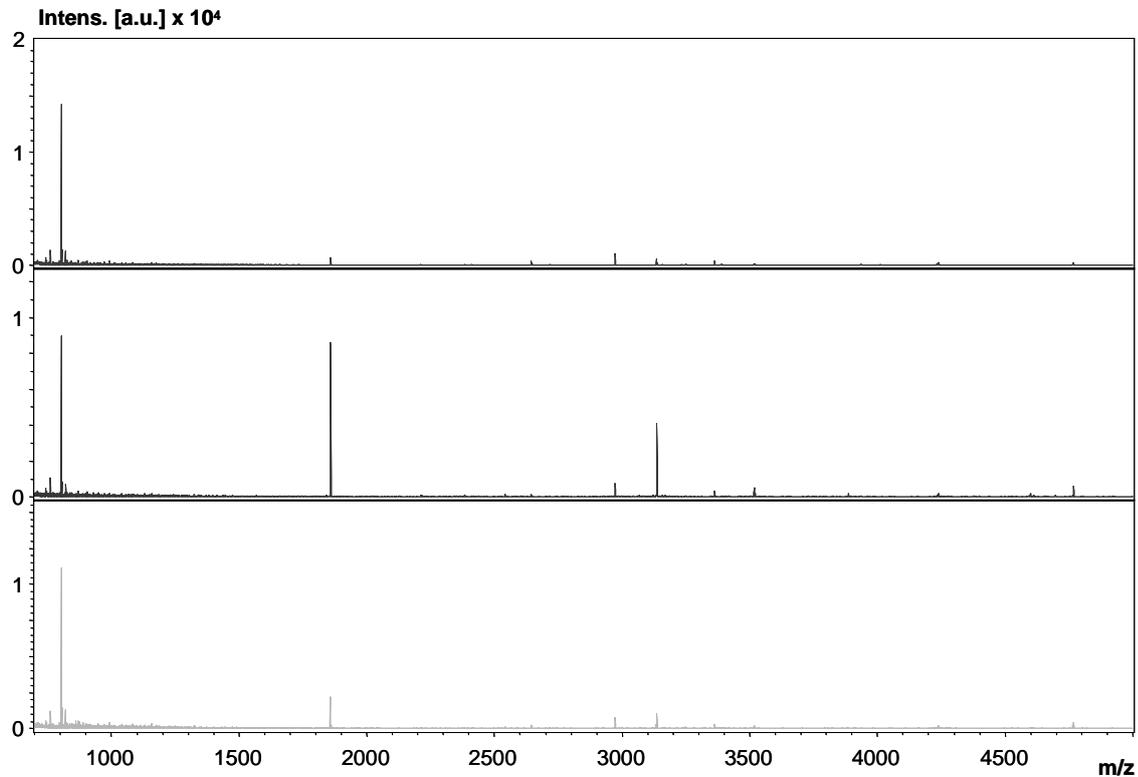


Abb. 9.4.4H E, L, MYO

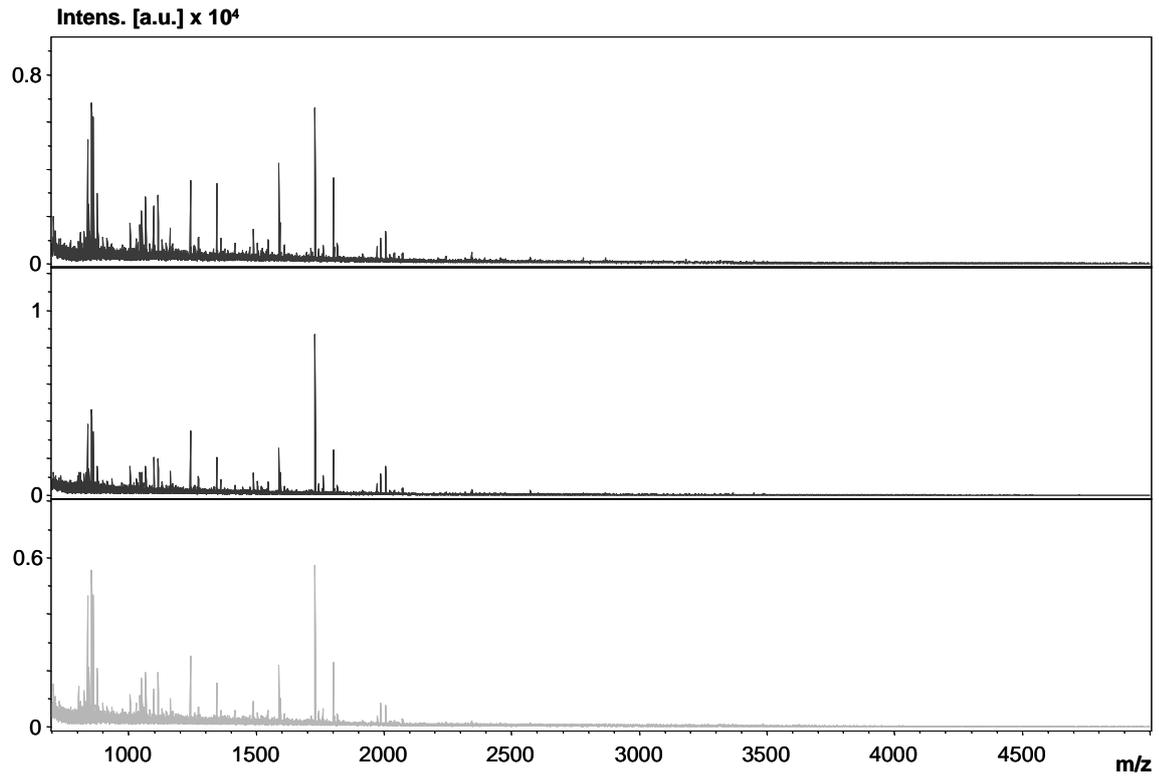


Abb. 9.4.4I E, Gel, MYO, RA

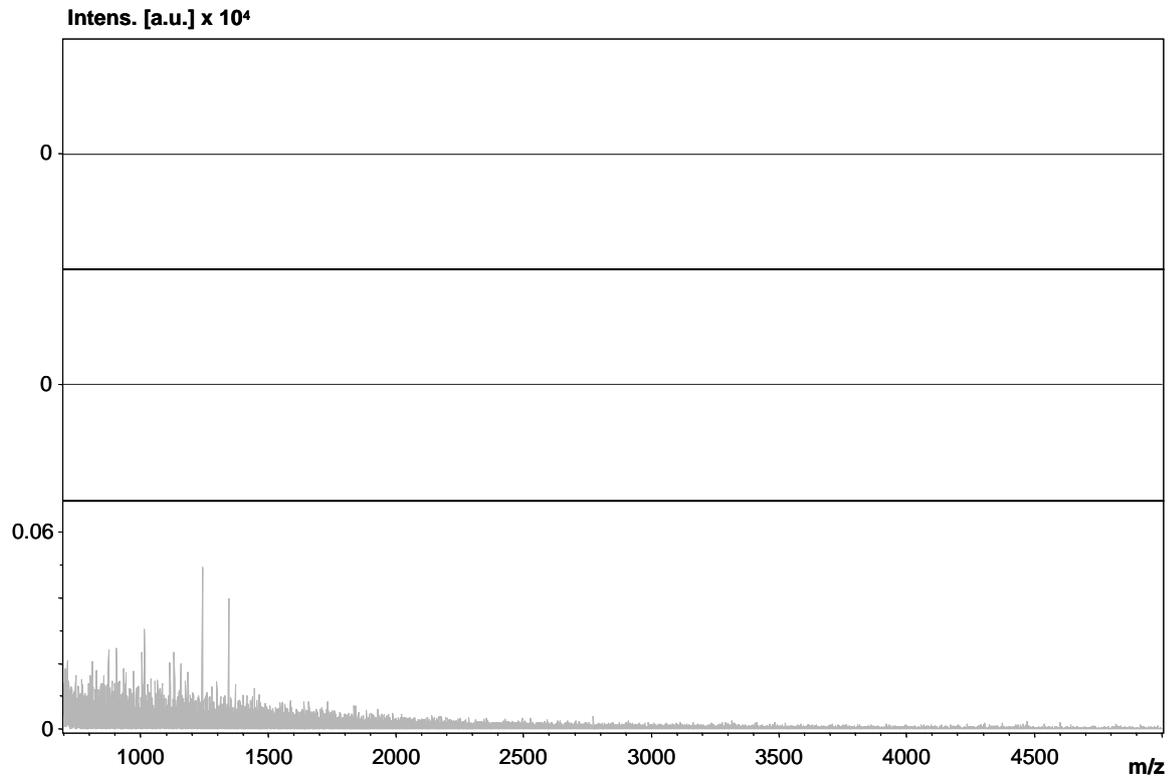


Abb. 9.4.4J E, L, REF, RA

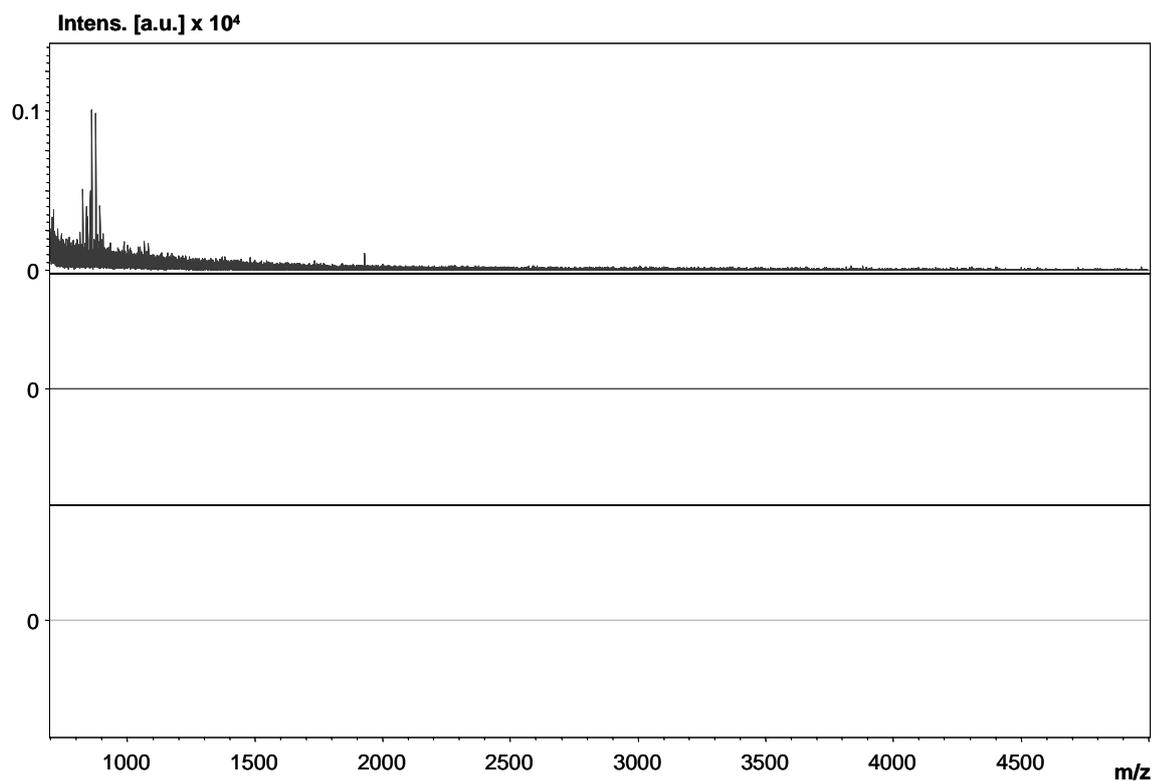


Abb. 9.4.4K E, L, REF

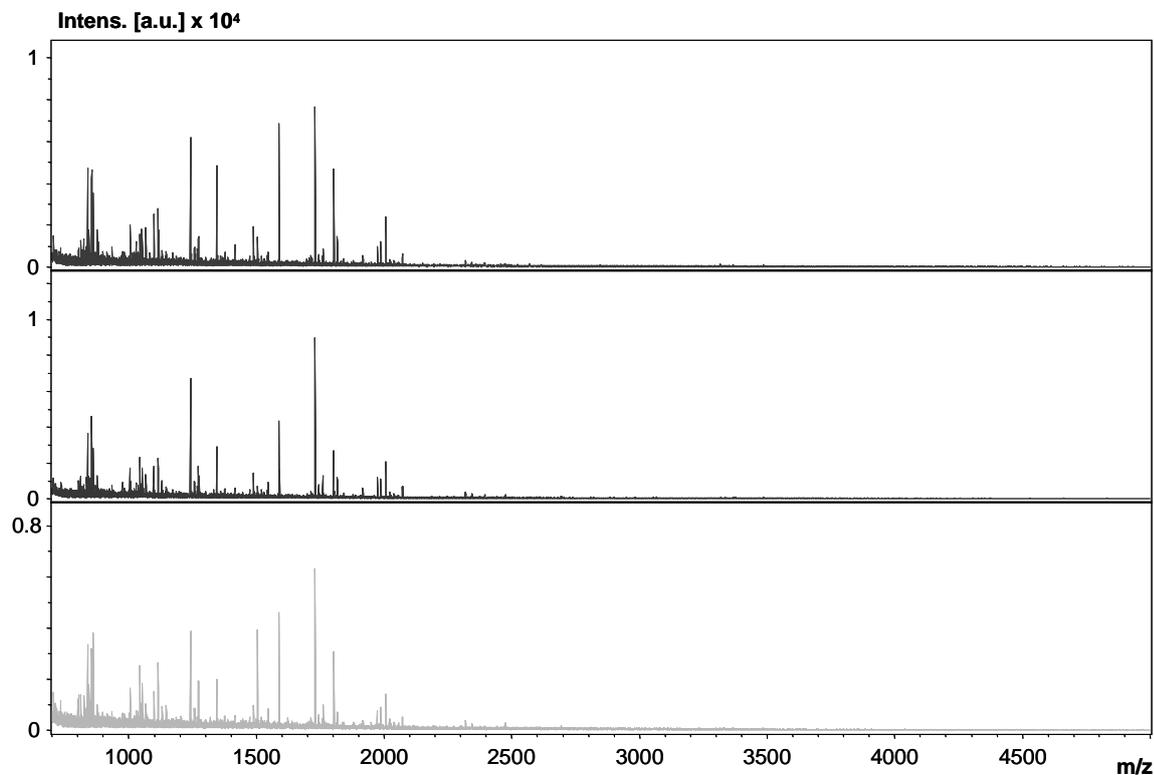


Abb. 9.4.4L E, Gel, REF, RA

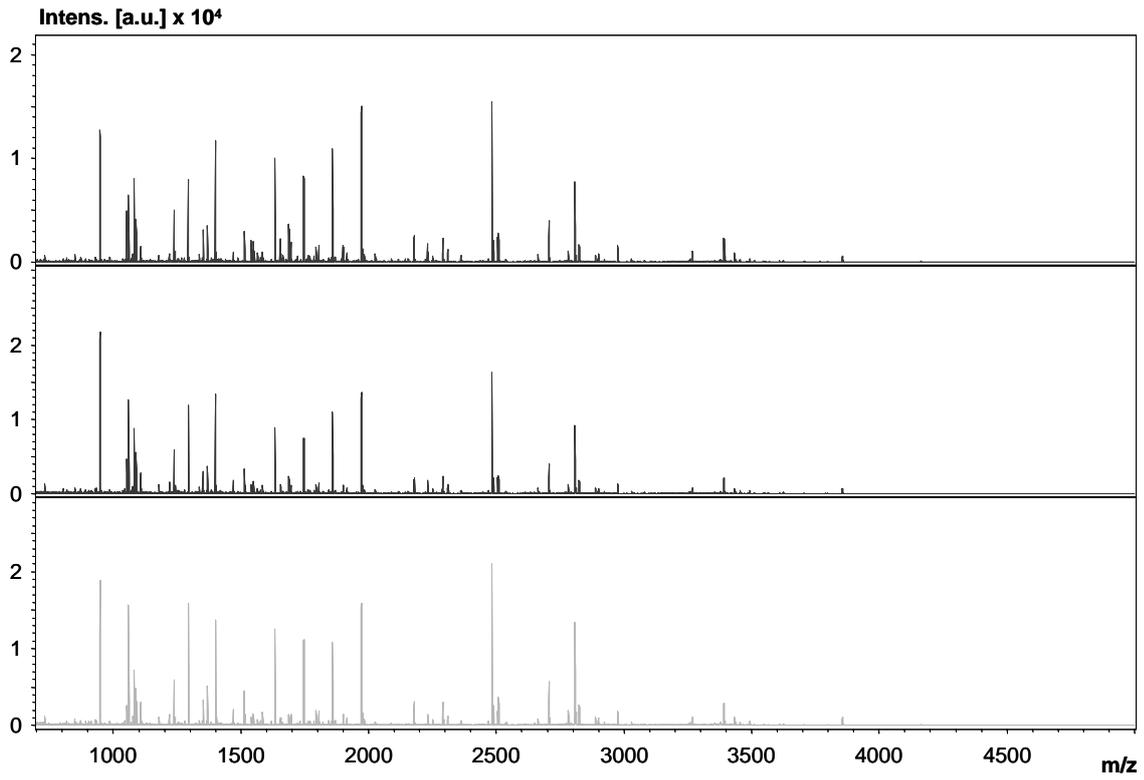


Abb. 9.4.5A P, L, BSA, RA

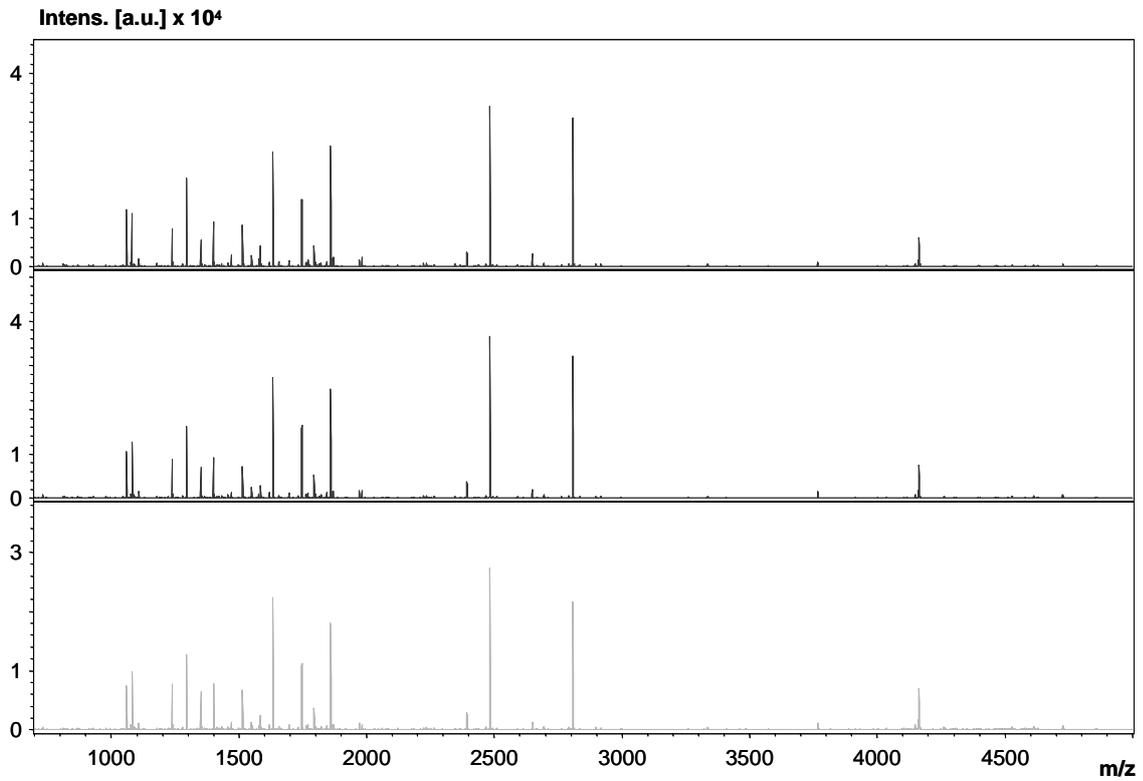


Abb. 9.4.5B P, L, BSA

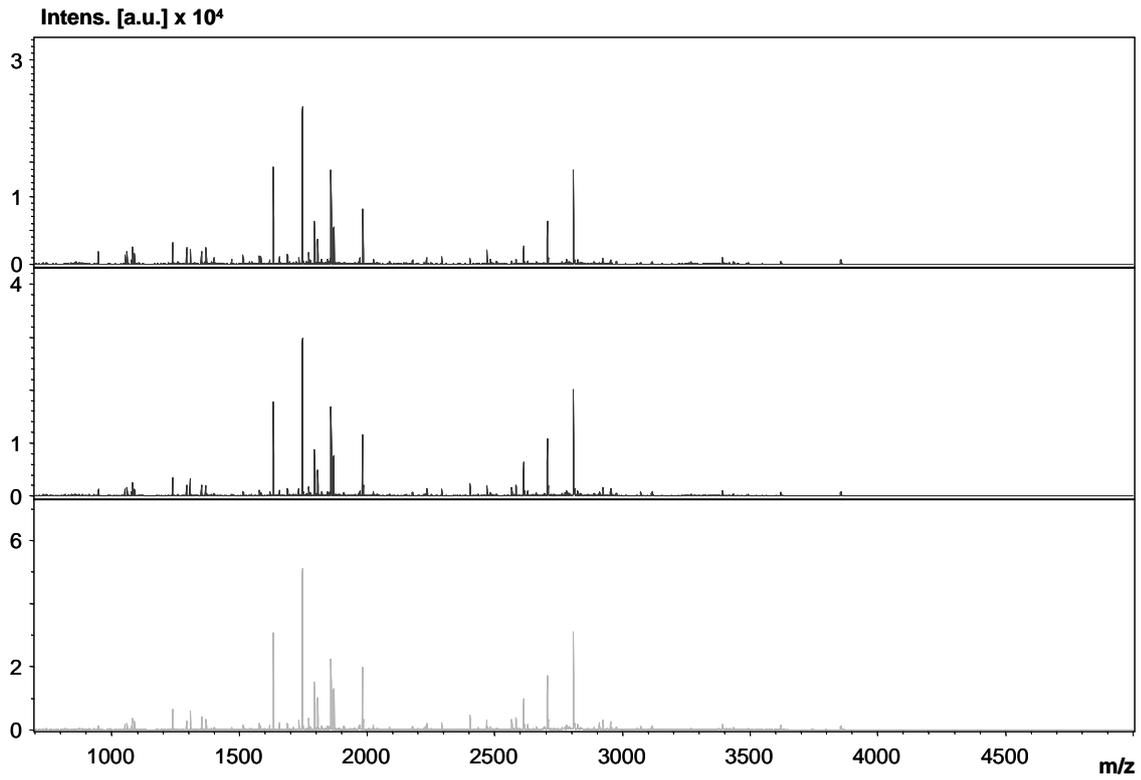


Abb. 9.4.5C P, Gel, BSA, RA

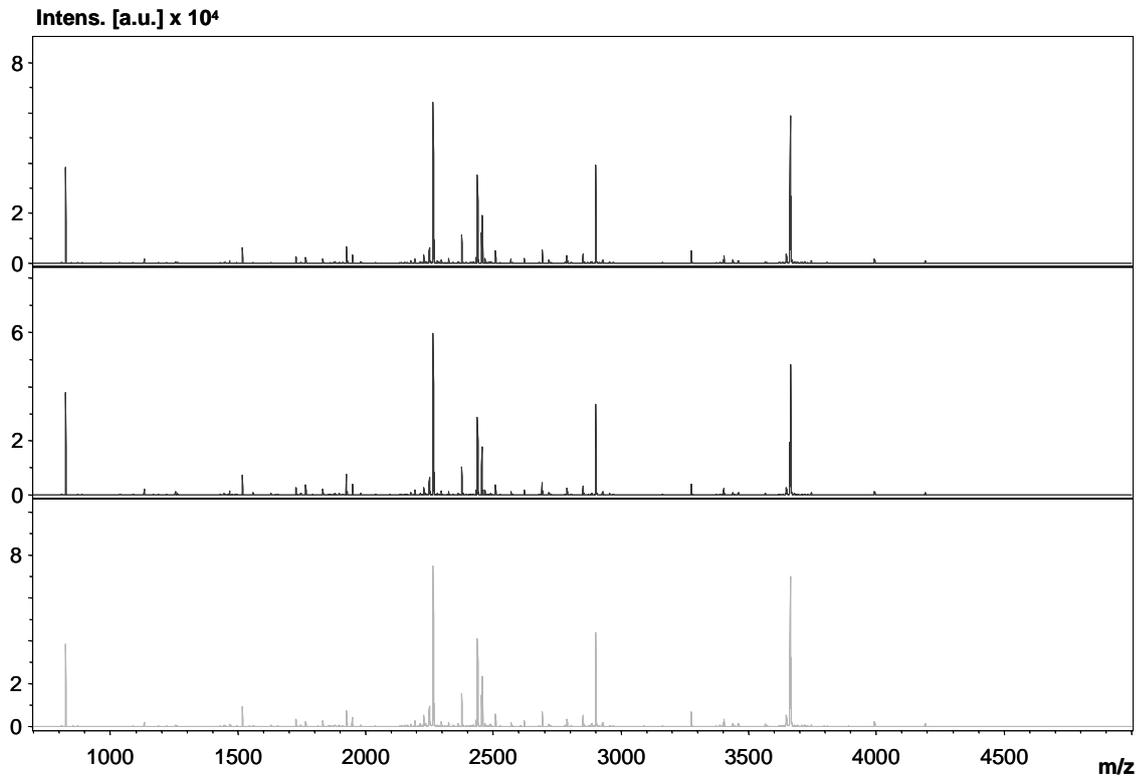


Abb. 9.4.5D P, L, CAH, RA

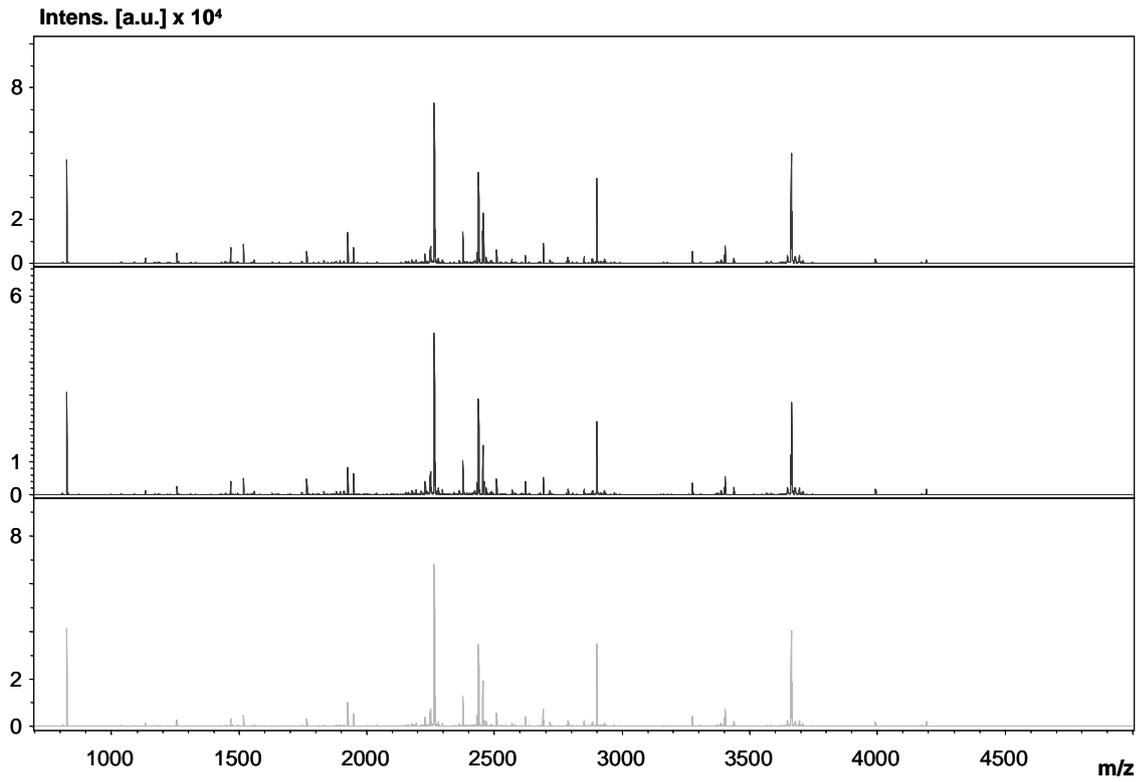


Abb. 9.4.5E P, L, CAH

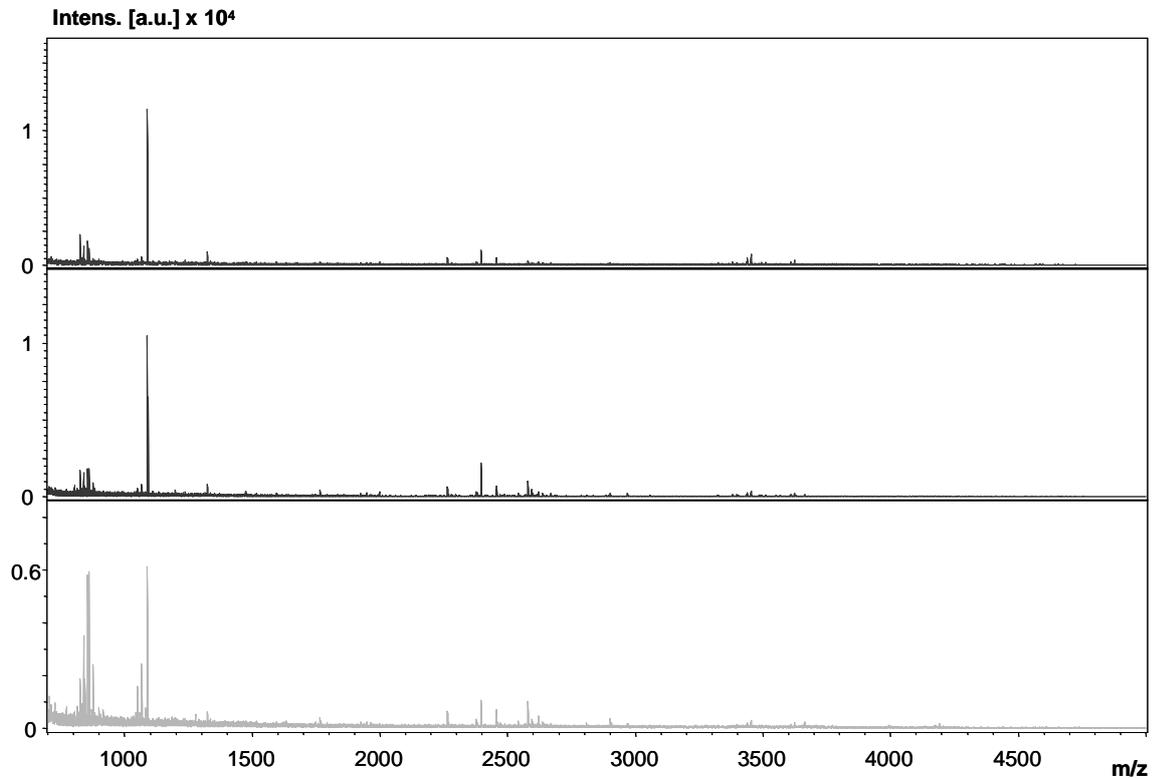
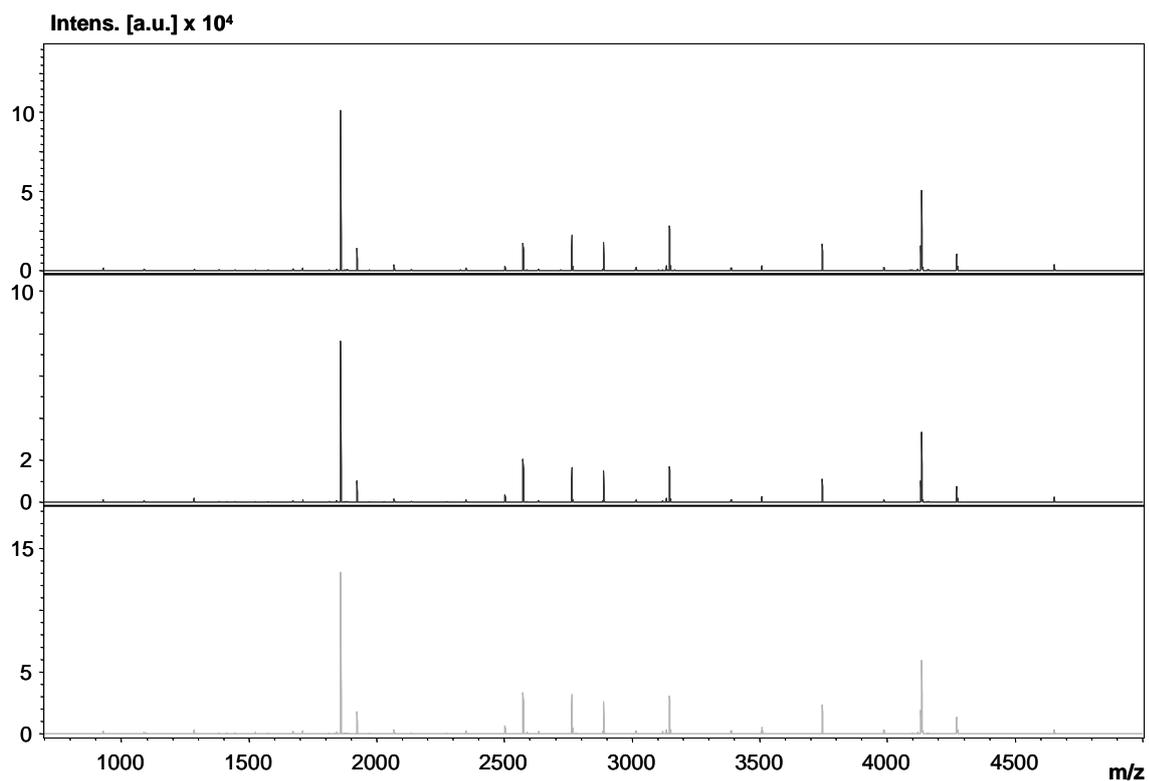
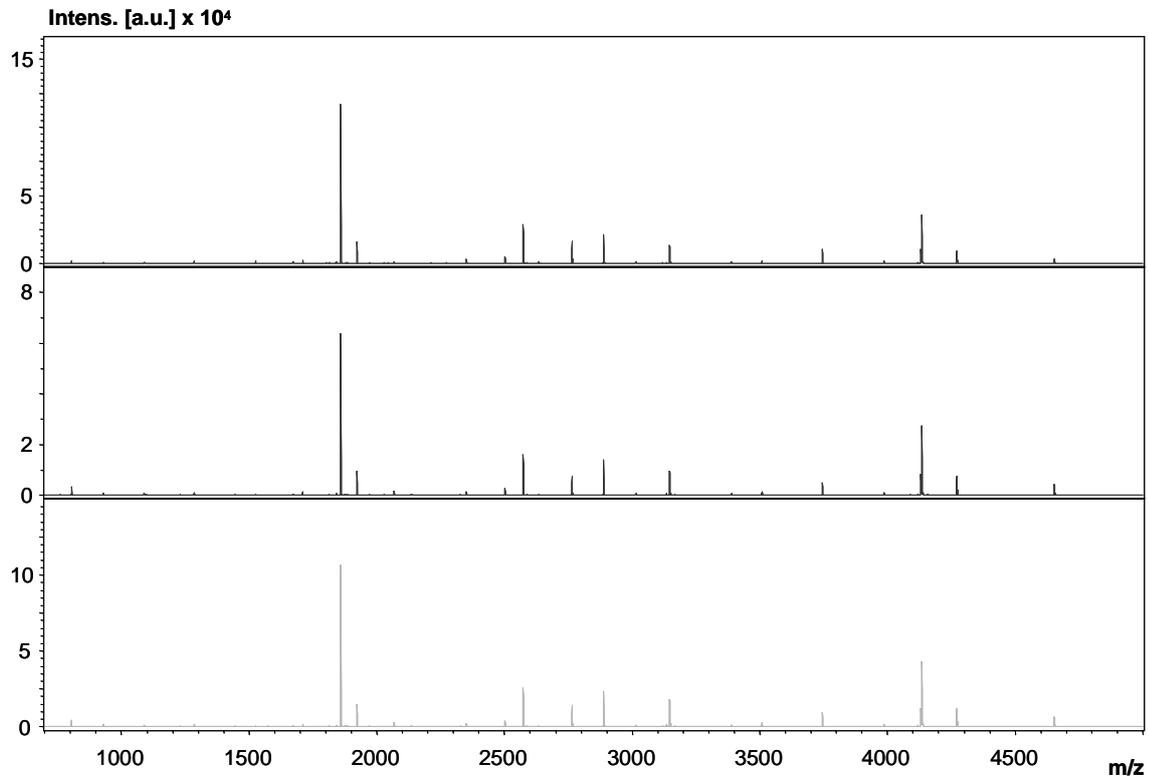


Abb. 9.4.5F P, Gel, CAH, RA



**Abb. 9.4.5G P, L, MYO, RA**



**Abb. 9.4.5H P, L, MYO**

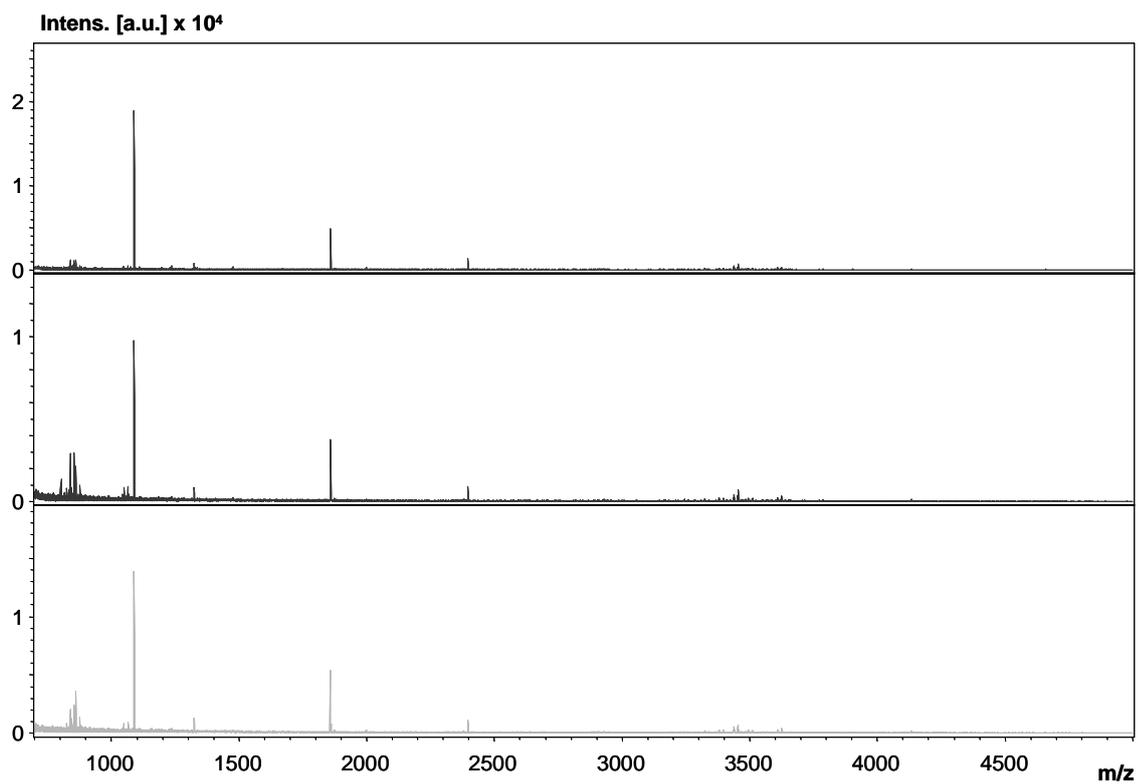


Abb. 9.4.5I P, Gel, MYO, RA

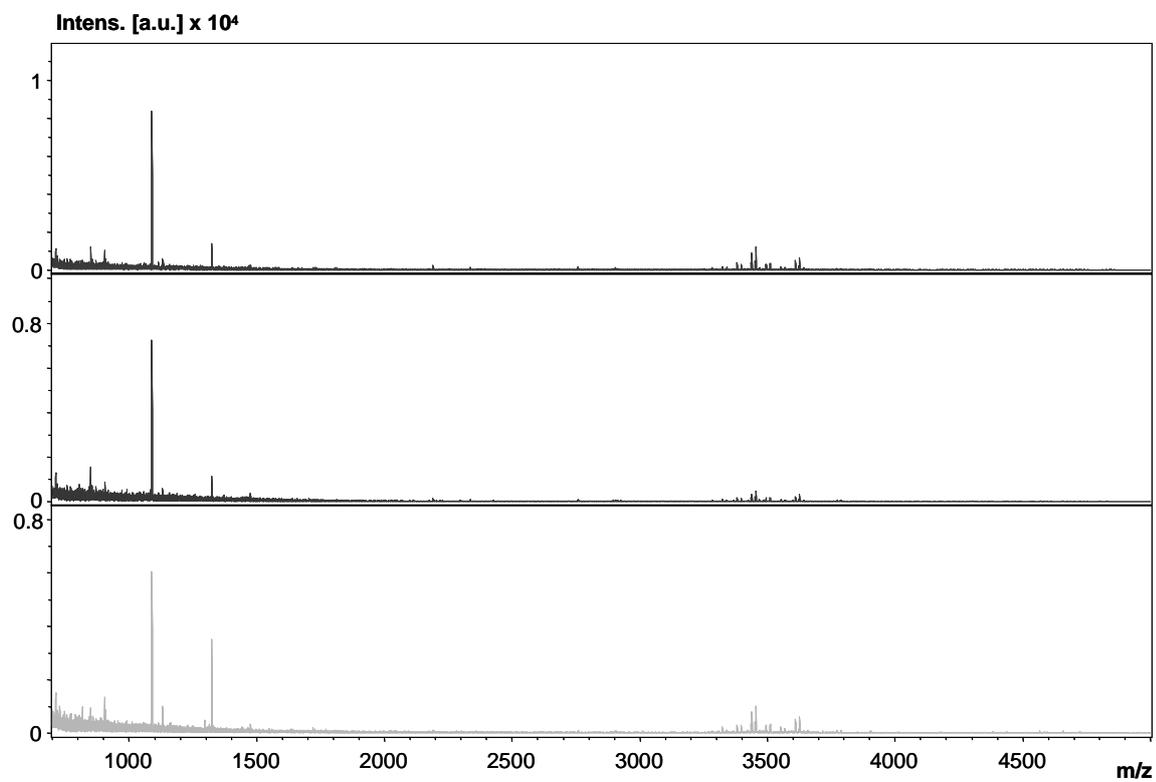


Abb. 9.4.5J P, Gel, REF, RA

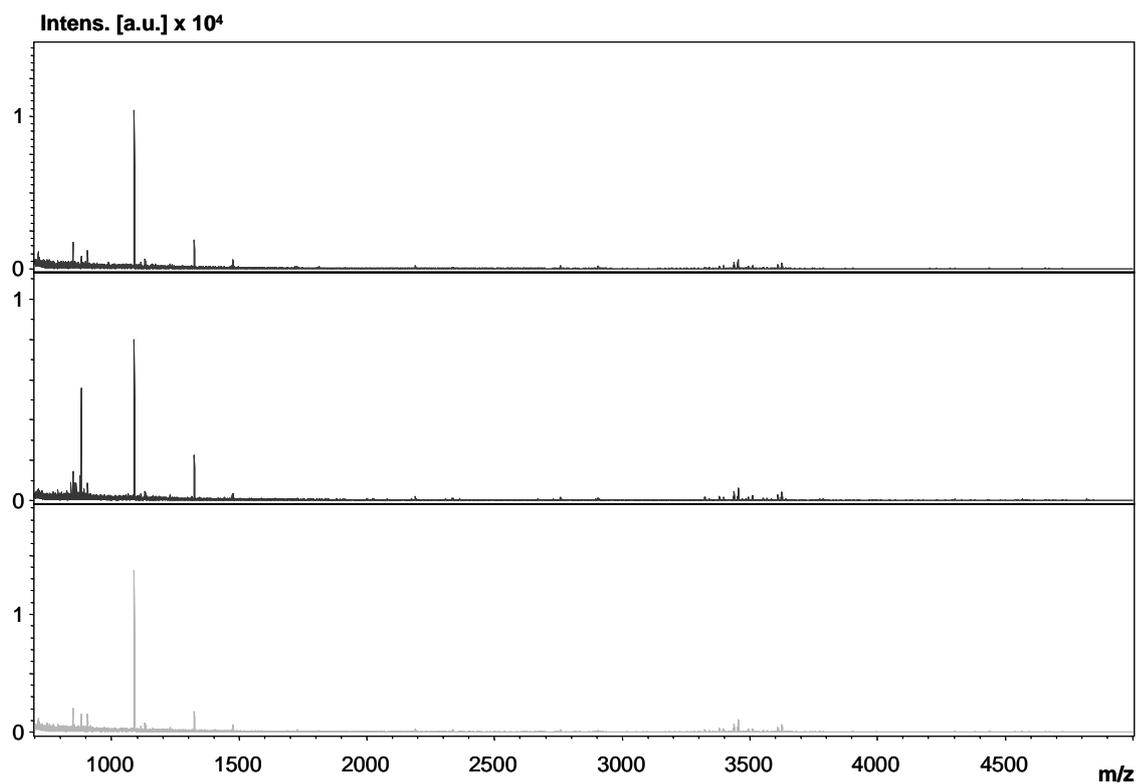


Abb. 9.4.5K P, L, REF

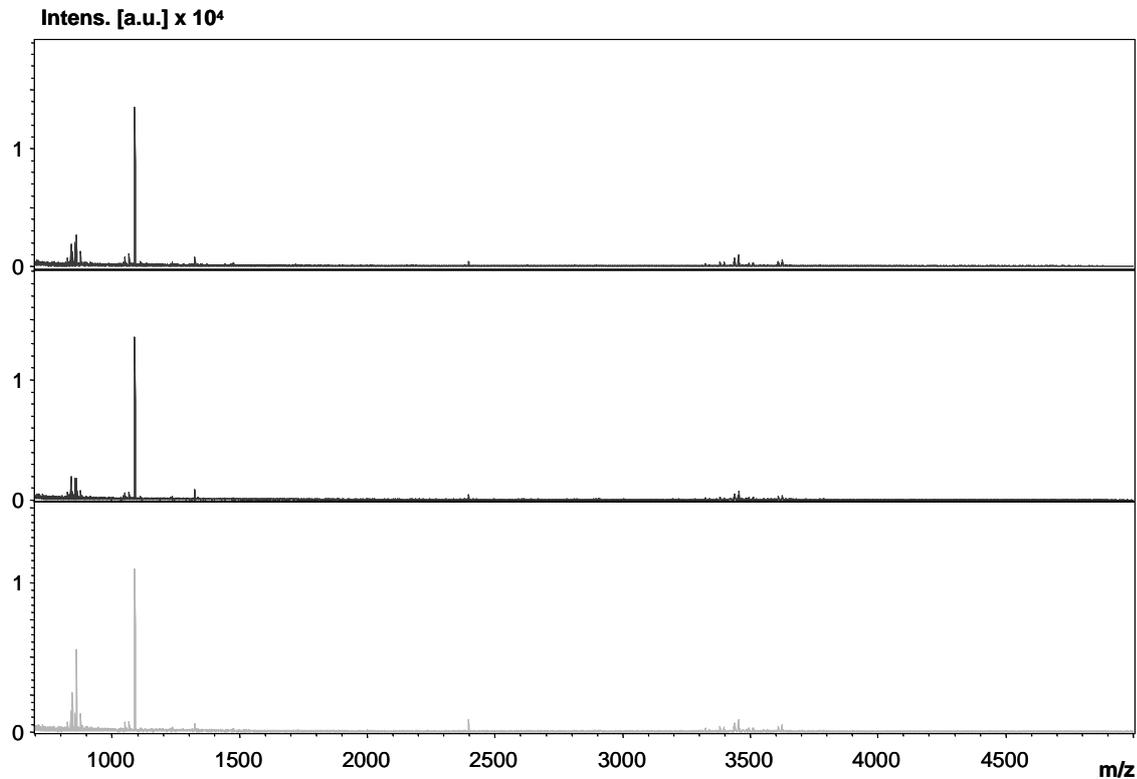


Abb. 9.4.5L P, Gel, REF, RA

### 9.4.2 Auswertung von Verdaus weniger spezifischer Enzyme mittels PMF

BSA	1	MKWVTFISLILLFSSAYSRGVFRRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFISOYLQOCPF
Feto	1	MKWVESIFLIFLLNFTESTRTLHRNEYGIASILLDSYQCTAEISLADLATIFFAQFVQEATY
BSA	61	DEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASIREITYGDMADCCCKQEP
Feto	61	KEVSKMVKDALTAIEKPTGDEQSSGCLNQLPAFLLEELCHEKEILEKYG-HSDCCSQSEE
BSA	121	ERNECFLSHKDDSPD-LPKLK-PDPNTLCEDEFKADEKKFWGKYLIEIARRHPYFYAPEILL
Feto	120	GRHNCFLAHKKPTPASIPFLFQVPEPVISCEAYEEDRETFMKNFYIYEIARRHPELYAPTILL
BSA	179	YYANKYNGVVFQEECCQAEDKGAACLLPKIETMREKVLASSARQLRCASTQKFGFRALKAWS
Feto	180	LWAARYDKIIPSCCKAENAVECFQTKAATVTKELRESSLLNQHACAVMKNEFTRTFQAIT
BSA	239	VARLSQKFPKAEFVEVTKLVIDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDITSSKIL
Feto	240	VTKLSQKFTKVNFTETIQKLVLDVAHVHEHCCRGDVLDCLQDGEKIMSYICSQODTILSNKI
BSA	299	KECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPILTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYS
Feto	300	TECKLTTTLERGQCIIHAENDEKPEGLSPNLNRFELGDRDFNQFSSGKNIIFLASFVHEYS
BSA	359	RRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFDKLLKHLVDEPQNLIKQNCDDQF
Feto	360	RRHPQLAVSVILRVAKGYQELLEKCFQTEPNLECQDKGEEELQKYIQESQALAKRSCGLF
BSA	419	EKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESESRMPCTEDYLSL
Feto	420	QKLGYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSELMATRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAAADI
BSA	479	IILNRLCVLHEKTPVSEKVTCCTEESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICT
Feto	480	IIGHLCIRHEMTPVNPVGQCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAFSDDKFIHFHDKLQ
BSA	539	LPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQKTKVMENFVAFVDKCCAADDKBAFCFAVEGPKL
Feto	540	AQGVALQTMKQEFLLINLVKQKPOITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGOEVEVCFABEGOKL
BSA	599	VVSTQTALA-
Feto	600	ISKTRAAALGV

**Abb 9.4.6 Sequenzabgleich der Proteine BSA und Feto.** Die verwendete Software war ClustalW v1.83 ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Schwarz, grau bzw. weiß hinterlegte Aminosäuren kennzeichnen Übereinstimmung, Ähnlichkeit bzw. keine Übereinstimmung. Abkürzungen: BSA, Rinderserumalbumin (Swiss-Prot-Datenbanknummer, P02769); Feto oder Fetoprotein, humanes Alpha-Fetoprotein (Swiss-Prot-Datenbanknummer, P02771)

**Tab. 9.4.1 – Tab. 9.4.36 Auswertung von Verdau weniger spezifischer Enzyme mittels PMF (siehe Kapitel 5.4.3).** BSA wurde in Lösung (Proteinkonzentration, 1 pmol/μl) und im Gel (14% Polyacrylamidgel; Proteinkonzentration 10 pmol pro Bande) mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin (Princeton Separations) oder Elastase verdaut. Das Protein wurde immer reduziert und alkyliert (Abkürzung, RA). Bei den Verdau in Lösung wurde 1 h, 3 h, 6 h und 12 h verdaut. Bei den Verdau im Gel wurde nur 12 h verdaut, aber eine Silber- und Coomassiefärbung durchgeführt. Zusätzlich wurde ohne Proteinzugabe in Lösung bzw. ein leeres Gelstück 12 h verdaut, um den Hintergrund der Verdau als Referenz zu erhalten. Die Auswertung aller MS-Spektren mit Biotoools erfolgte, wie in Kapitel 8.4.1 beschrieben. Die Spektren wurden vorher intern kalibriert, indem ein Standard zugesetzt wurde (siehe Kapitel 8.2.4). Für die Berechnungen wurden verschiedene Massengenauigkeiten (6 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 30 ppm und 50 ppm) und Enzymdefinitionen (Angaben bei der jeweiligen Tabelle; immer C-terminal) verwendet. Für jedes MS-Spektrum wurde die Berechnung einmal mit der richtigen Proteinsequenz (BSA; *A* oder *C*) und einmal mit einer falschen (Fetoprotein; *B* oder *D*) durchgeführt (Aminosäuresequenzen der beiden Proteine, siehe Abb. 9.4.6). Die resultierende Sequenzabdeckung, Intensitätsabdeckung und Signalverwertung (Abkürzungen: Sequenz, Intensität bzw. Signal) ist für die einzelnen Berechnungen in den nachfolgenden Tabellen\* in % gelistet, die eine repräsentative Auswertung wiedergeben.

**\*Übersicht der durchgeführten Berechnungen:**

Allgemeine Reihenfolge der Berechnungen für alle Tabellen: Verdau in Lösung (1 h, 3 h, 6 h, 12 h), Verdau im Gel (Silberfärbung, Coomassiefärbung), Hintergrund (Verdau in Lösung, Verdau im Gel)

***Trypsin***

Tab. 9.4.1 – Tab. 9.4.8: *A,B*, ohne Enzymdefinition; *C,D*, Enzymdefinition K, R

***Chymotrypsin***

Tab. 9.4.9 – Tab. 9.4.16: *A,B*, ohne Enzymdefinition; *C,D*, Enzymdefinition F, W, Y, L

Tab. 9.4.17 – Tab. 9.4.20: *A,B* bzw. *C,D*, Enzymdefinition F, W, Y, L, M, A, D, E

***Elastase***

Tab. 9.4.21 – 9.4.28: *A,B*, ohne Enzymdefinition; *C,D*, Enzymdefinition A, V, L, I

Tab. 9.4.29 – 9.4.36: *A,B*, Enzymdefinition G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C;

*C,D*, Enzymdefinition G,A,V,L,I,S,T

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	94.6	90.8	121.9
10.0	95.1	95.6	153.5
15.0	95.1	96.4	187.7
30.0	99.3	97.3	284.2
50.0	99.8	98.4	379.8

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	78.8	21.5	48.2
10.0	89.3	28.5	88.6
15.0	93.3	67.5	136.0
30.0	97.5	83.1	243.9
50.0	99.5	88.5	326.0

**Tab. 9.4.1** BSA-Verdau in Lösung, RA, Trypsin, 1h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	91.6	94.6	109.1
10.0	96.9	95.8	157.6
15.0	97.7	96.3	188.9
30.0	98.7	97.6	280.8
50.0	99.7	97.9	382.8

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	79.5	29.3	50.5
10.0	87.8	69.7	92.9
15.0	92.0	71.9	132.3
30.0	97.4	86.9	217.2
50.0	99.5	90.3	367.7

**Tab. 9.4.2** BSA-Verdau in Lösung, RA, Trypsin, 3h.**C** Berechnung mit Definition K, R (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	82.0	42.3	41.2
10.0	82.0	67.4	49.2
15.0	82.0	91.8	52.6
30.0	82.0	93.0	56.1
50.0	82.0	93.0	56.1

**D** Berechnung mit Definition K, R (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	0.0	0.0	0.0
10.0	0.0	0.0	0.0
15.0	5.6	4.9	1.8
30.0	12.2	5.9	3.5
50.0	14.9	5.9	4.4

**C** Berechnung mit Definition K, R (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	67.5	57.8	38.4
10.0	70.8	92.4	46.5
15.0	70.8	92.5	48.5
30.0	70.8	93.4	52.5
50.0	70.8	93.4	52.5

**D** Berechnung mit Definition K, R (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	0.0	0.0	0.0
10.0	5.6	3.8	2.0
15.0	5.6	3.8	2.0
30.0	8.0	4.9	3.0
50.0	10.0	4.9	4.0

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	83.7	82.0	98.2
10.0	93.7	92.2	133.9
15.0	93.9	94.1	174.1
30.0	95.6	95.6	275.9
50.0	99.8	96.4	383.0

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	83.7	25.2	58.0
10.0	94.3	47.7	93.8
15.0	94.6	72.0	129.5
30.0	97.9	87.7	225.9
50.0	99.5	91.6	375.9

**Tab. 9.4.3** BSA-Verdau in Lösung, RA, Trypsin, 6h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	86.3	63.4	103.8
10.0	91.4	94.7	150.0
15.0	91.9	95.6	192.3
30.0	95.4	96.7	288.5
50.0	98.2	97.4	389.4

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	72.4	23.8	55.8
10.0	86.2	65.3	87.5
15.0	91.8	70.5	127.9
30.0	97.4	85.8	217.3
50.0	99.0	89.5	349.0

**Tab. 9.4.4** BSA-Verdau in Lösung, RA, Trypsin, 12h.**C** Berechnung mit Definition K, R (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	66.2	26.6	30.4
10.0	70.0	47.3	35.7
15.0	73.3	88.4	41.1
30.0	75.0	89.0	46.4
50.0	75.8	89.0	47.3

**D** Berechnung mit Definition K, R (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	2.0	0.6	0.9
10.0	2.0	0.6	0.9
15.0	5.6	3.4	1.8
30.0	8.0	4.2	2.6
50.0	10.0	4.3	3.8

**C** Berechnung mit Definition K, R (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	66.9	52.5	35.6
10.0	74.5	90.8	45.2
15.0	74.5	91.0	48.1
30.0	74.5	91.4	51.0
50.0	74.5	91.5	51.9

**D** Berechnung mit Definition K, R (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	2.0	0.2	1.0
10.0	2.0	0.2	1.0
15.0	5.6	2.5	1.9
30.0	8.0	3.6	2.9
50.0	12.8	3.7	4.8

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	78.1	79.9	68.1
10.0	89.8	84.3	118.1
15.0	96.2	86.7	171.3
30.0	97.2	88.7	269.1
50.0	98.8	90.7	350.0

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	77.0	16.9	56.4
10.0	87.7	40.7	87.2
15.0	93.1	66.2	122.3
30.0	99.2	73.3	236.2
50.0	99.7	77.8	350.0

**Tab. 9.4.5 BSA-Verdau im Gel (Silberfärbung), RA, Trypsin, 12h.****A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	86.5	76.0	82.5
10.0	90.4	78.3	105.6
15.0	94.1	81.6	142.1
30.0	98.4	88.7	238.9
50.0	99.5	90.5	330.2

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	82.6	36.0	53.2
10.0	92.0	52.3	91.3
15.0	94.6	61.7	132.5
30.0	99.0	74.6	237.3
50.0	99.5	78.6	343.7

**Tab. 9.4.6 BSA-Verdau im Gel (Coomassiefärbung), RA, Trypsin, 12h.****C** Berechnung mit Definition K, R (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	31.3	25.9	16.0
10.0	46.5	34.7	28.7
15.0	46.5	75.6	30.9
30.0	50.4	76.0	33.0
50.0	50.4	76.3	34.0

**D** Berechnung mit Definition K, R (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	2.8	0.1	1.1
10.0	2.8	0.1	1.1
15.0	9.5	2.1	3.2
30.0	16.3	4.3	6.4
50.0	21.8	4.4	7.4

**C** Berechnung mit Definition K, R (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	43.0	63.6	22.2
10.0	45.6	64.5	23.0
15.0	45.6	64.5	23.8
30.0	48.4	64.6	24.6
50.0	50.7	65.1	26.2

**D** Berechnung mit Definition K, R (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	3.1	0.1	0.8
10.0	6.7	0.2	1.6
15.0	9.9	0.9	2.4
30.0	14.9	1.3	4.0
50.0	20.5	1.4	4.8

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	32.0	15.3	29.3
10.0	46.5	21.2	56.9
15.0	62.4	31.3	81.0
30.0	94.4	46.2	169.0
50.0	98.4	52.1	256.9

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	48.8	29.0	46.6
10.0	69.3	38.6	84.5
15.0	80.8	44.5	119.0
30.0	96.9	48.3	229.3
50.0	98.0	54.5	306.9

**Tab. 9.4.7** Hintergrund für BSA-Verdau in Lösung, RA, Trypsin, 12h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	12.0	6.6	16.1
10.0	19.9	6.8	22.6
15.0	28.0	7.4	29.0
30.0	45.8	11.6	64.5
50.0	68.2	13.8	122.6

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	21.3	4.9	22.6
10.0	32.3	7.0	45.2
15.0	42.5	7.9	58.1
30.0	60.1	9.7	103.2
50.0	74.2	11.2	148.4

**Tab. 9.4.8** Hintergrund für BSA-Verdau im Gel, RA, Trypsin, 12h.**C** Berechnung mit Definition K, R (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	0.0	0.0	0.0
10.0	0.0	0.0	0.0
15.0	0.0	0.0	0.0
30.0	6.3	1.6	3.4
50.0	8.2	2.2	5.2

**D** Berechnung mit Definition K, R (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	5.9	7.2	3.4
10.0	5.9	7.2	3.4
15.0	5.9	7.2	3.4
30.0	5.9	7.2	3.4
50.0	5.9	7.2	3.4

**C** Berechnung mit Definition K, R (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	0.0	0.0	0.0
10.0	0.0	0.0	0.0
15.0	0.0	0.0	0.0
30.0	0.0	0.0	0.0
50.0	0.0	0.0	0.0

**D** Berechnung mit Definition K, R (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	0.0	0.0	0.0
10.0	3.1	0.8	3.2
15.0	3.1	0.8	3.2
30.0	6.2	6.2	6.5
50.0	6.2	6.2	6.5

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	88.50	91.80	107.10
10	97.00	93.60	145.50
15	97.70	95.20	173.70
30	99.00	95.70	249.50
50	99.80	96.40	386.90

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	69.80	23.90	48.50
10	81.80	30.30	74.70
15	90.8	41.90	107.10
30	96.90	78.60	219.20
50	98.20	82.40	332.30

**Tab. 9.4.9** BSA-Verdau in Lösung, RA, Chymotrypsin, 1 h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	93.4	84.5	88.9
10	98.4	91.5	136.1
15	98.4	92.8	173.1
30	99.0	95.0	269.4
50	99.0	97.3	397.2

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	79.6	28.7	50.0
10	87.4	37.7	83.3
15	92.3	49.0	124.1
30	95.9	80.9	239.8
50	97.9	90.5	383.3

**Tab. 9.4.10** BSA-Verdau in Lösung, RA, Chymotrypsin, 3 h.**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	70.30	75.90	44.40
10	78.60	77.10	50.50
15	78.60	77.30	51.50
30	81.40	78.00	54.50
50	83.00	78.90	56.50

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	5.40	0.60	2.00
10	14.30	0.70	4.00
15	18.70	1.50	5.00
30	36.30	4.10	10.10
50	36.30	4.30	11.10

**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	61.1	59.9	30.6
10	75.6	69.5	42.6
15	77.6	69.6	44.4
30	77.6	70.2	48.1
50	82.4	71.2	52.8

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	8.9	0.4	1.9
10	22.0	1.9	4.6
15	23.6	2.5	5.6
30	43.3	6.2	11.1
50	47.5	6.5	13.9

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	95.4	69.4	83.7
10	97.0	90.6	133.3
15	97.7	93.9	171.9
30	99.0	95.2	252.6
50	99.0	95.9	355.6

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	87.4	21.8	47.4
10	91.5	40.8	77.0
15	94.1	41.9	110.4
30	99.5	76.8	214.8
50	99.5	82.3	341.5

**Tab. 9.4.11** BSA-Verdau in Lösung, RA, Chymotrypsin, 6 h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	90.3	63.2	69.6
10	98.2	77.1	121.1
15	98.4	82.7	164.0
30	99.0	95.3	257.8
50	100.0	96.2	346.6

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	80.5	26.7	44.1
10	93.1	37.9	75.2
15	96.9	45.9	116.1
30	98.5	75.0	234.2
50	99.5	84.4	344.7

**Tab. 9.4.12** BSA-Verdau in Lösung, RA, Chymotrypsin, 12 h.**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	70.8	43.9	28.1
10	84.0	77.4	45.2
15	86.8	78.7	50.4
30	88.0	79.1	52.6
50	89.0	80.5	54.8

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	12.0	0.5	2.2
10	17.6	1.9	3.7
15	17.8	1.9	3.7
30	37.8	3.0	8.1
50	44.7	3.5	11.1

**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	58.5	36.1	24.2
10	71.3	60.1	33.5
15	86.0	65.3	41.0
30	89.0	77.8	48.4
50	90.4	78.3	50.9

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	3.4	1.2	1.2
10	17.6	1.8	3.1
15	25.3	1.9	4.3
30	40.7	2.8	8.1
50	53.0	4.0	10.6

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	93.6	67.5	82.7
10	96.0	73.1	118.2
15	98.0	87.0	141.8
30	99.0	91.3	226.4
50	99.8	92.2	347.2

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	78.8	30.7	43.6
10	81.6	36.4	68.2
15	85.9	40.3	99.1
30	94.4	65.2	212.7
50	99.8	86.4	345.5

**Tab. 9.4.13** BSA-Verdau im Gel (Silberfärbung), RA, Chymotrypsin, 12 h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	84.50	73.50	76.70
10	87.80	77.00	102.90
15	97.50	80.40	135.90
30	98.70	86.30	209.70
50	98.80	87.20	326.20

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	58.60	27.10	37.90
10	77.30	33.00	60.20
15	87.40	39.90	101.00
30	98.20	66.40	213.60
50	99.80	68.70	347.60

**Tab. 9.4.14** BSA-Verdau im Gel (Coomassiefärbung), RA, Chymotrypsin, 12 h.**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	42.2	57.3	26.4
10	49.8	59.7	33.6
15	55.4	72.7	36.4
30	55.4	72.7	37.3
50	64.6	74.1	42.7

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	1.6	1.6	0.9
10	1.6	1.6	0.9
15	7.6	1.9	2.7
30	12.8	2.2	4.5
50	21.8	3.5	7.3

**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	46.10	53.70	26.20
10	46.50	65.50	29.10
15	52.60	67.10	35.00
30	56.00	67.90	38.80
50	62.10	69.60	42.70

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	4.40	0.60	1.90
10	6.10	2.20	2.90
15	9.70	2.50	3.90
30	15.30	3.00	5.80
50	23.60	4.80	10.70

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	35.6	20.2	25.8
10	55.8	28.1	48.5
15	70.3	39.5	69.7
30	88.3	46.8	136.4
50	98.7	51.1	219.7

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	48.1	19.0	34.8
10	68.0	24.4	62.1
15	78.7	28.3	109.1
30	98.0	43.8	215.2
50	99.7	45.6	330.3

**Tab. 9.4.15** Hintergrund für BSA-Verdau in Lösung, RA, Chymotrypsin, 12 h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	32.9	6.6	24.6
10	50.4	11.4	43.9
15	62.4	15.9	63.2
30	90.0	25.4	128.1
50	98.0	30.5	205.3

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	36.6	8.2	26.3
10	54.0	12.9	45.6
15	75.7	17.4	91.2
30	92.8	21.0	150.9
50	96.9	25.2	235.1

**Tab. 9.4.16** Hintergrund für BSA-Verdau im Gel, RA, Chymotrypsin, 12 h.**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	3.1	0.5	1.5
10	3.1	0.5	1.5
15	3.1	0.5	1.5
30	9.4	1.9	4.5
50	14.8	3.0	7.6

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	2.1	1.2	1.5
10	6.9	1.5	3.0
15	10.5	3.2	7.6
30	21.3	4.2	12.1
50	31.9	16.0	18.2

**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0
15	0.0	0.0	0.0
30	7.4	0.9	3.5
50	10.9	1.2	5.3

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	3.6	1.3	1.8
10	3.6	1.3	1.8
15	8.7	1.6	3.5
30	15.1	2.6	7.0
50	17.4	3.3	8.8

**A** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	83.90	84.30	60.60
10	90.60	85.60	69.70
15	93.10	85.70	74.70
30	93.60	86.20	91.90
50	99.00	90.10	119.20

**B** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	27.30	4.00	11.10
10	35.80	5.10	16.20
15	45.20	7.40	23.20
30	72.90	33.00	46.50
50	81.10	37.90	62.70

**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	68.2	72.5	41.7
10	80.9	82.5	59.3
15	81.7	83.1	66.7
30	84.2	84.7	88.0
50	96.2	89.0	118.5

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	31.0	5.4	12.0
10	47.6	7.5	20.4
15	66.5	9.2	27.8
30	86.0	29.0	54.6
50	89.7	37.3	82.4

**Tab. 9.4.17 BSA-Verdau in Lösung, RA, Chymotrypsin; A/B, 1 h und C/D, 3 h.****A** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	75.1	45.3	37.8
10	88.0	82.0	59.3
15	90.3	84.2	70.4
30	91.3	85.6	87.4
50	96.4	91.3	112.9

**B** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	30.4	2.5	8.1
10	51.1	4.9	13.3
15	53.0	5.7	16.3
30	79.6	37.5	38.5
50	90.3	40.2	62.2

**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	68.7	44.9	30.4
10	81.9	64.6	48.4
15	93.4	70.7	63.4
30	94.6	84.6	84.5
50	98.5	89.7	102.5

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	31.2	12.5	7.5
10	49.3	14.9	12.4
15	61.4	16.9	20.5
30	86.9	32.9	42.9
50	92.3	41.2	65.2

**Tab. 9.4.18 BSA-Verdau in Lösung, RA, Chymotrypsin; A/B, 6 h und C/D, 12 h.**

**A** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	52.9	57.6	31.8
10	59.6	61.8	44.5
15	70.3	75.5	52.7
30	79.9	78.1	68.2
50	93.9	83.4	97.3

**B** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	5.7	14.1	2.7
10	14.6	14.9	6.4
15	26.6	16.1	10.9
30	50.7	38.8	30.9
50	76.4	45.6	50.9

**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	57.30	54.20	32.00
10	59.60	68.80	39.80
15	67.10	71.50	50.50
30	76.80	74.30	67.00
50	90.10	79.40	92.20

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	8.50	0.90	3.90
10	13.60	3.00	6.80
15	27.60	6.10	14.60
30	53.40	39.20	33.00
50	78.00	44.80	56.30

**Tab. 9.4.19** BSA-Verdau im Gel, RA, Chymotrypsin, 12h; A/B, Silberfärbung und C/D, Coomassiefärbung.**A** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	6.6	1.5	3.0
10	8.6	2.6	4.5
15	11.7	3.8	7.6
30	27.8	11.1	21.2
50	41.0	29.5	43.9

**B** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	3.9	2.3	3.0
10	16.3	4.6	9.1
15	21.3	7.8	16.7
30	38.8	10.4	28.8
50	63.7	29.9	57.6

**C** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	4.8	0.2	1.8
10	9.9	0.2	3.5
15	13.3	1.5	5.3
30	26.7	5.7	14.0
50	47.4	11.1	33.3

**D** Berechnung mit Def. F,W,Y,L,M,A,D,E (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6	3.6	1.3	1.8
10	3.6	1.3	1.8
15	18.4	2.8	10.5
30	33.7	6.3	19.3
50	41.2	11.1	33.3

**Tab. 9.4.20** Hintergrund für BSA-Verdau, RA, Chymotrypsin; A/B, in Lösung, 12h und C/D, im Gel, 12 h.

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	86.3	87.8	87.9
10.0	93.2	90.5	126.4
15.0	99.2	92.6	172.5
30.0	99.5	96.6	254.9
50.0	99.7	96.8	357.1

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	77.5	19.6	69.2
10.0	89.8	28.2	100.0
15.0	93.1	74.5	153.8
30.0	98.5	91.1	270.3
50.0	99.5	92.6	398.9

**Tab. 9.4.21** BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 1 h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	83.2	88.7	85.3
10.0	90.1	92.7	123.5
15.0	98.4	95.3	170.6
30.0	99.7	96.4	258.8
50.0	99.7	96.8	375.0

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	72.6	12.6	55.9
10.0	83.6	81.8	82.4
15.0	90.0	87.6	126.5
30.0	98.0	92.1	229.4
50.0	99.7	96.0	357.4

**Tab. 9.4.22** BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 3 h.**C** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	51.5	60.5	27.5
10.0	58.8	60.9	31.9
15.0	65.6	63.2	38.5
30.0	72.0	66.3	47.3
50.0	78.4	82.9	57.1

**D** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	26.8	0.9	8.9
10.0	32.2	2.0	12.1
15.0	32.2	2.0	14.3
30.0	54.7	6.8	29.7
50.0	66.7	7.5	36.3

**C** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	30.3	19.7	26.5
10.0	36.2	20.2	30.9
15.0	45.6	73.1	39.7
30.0	55.8	75.2	50.0
50.0	66.9	84.3	61.8

**D** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	19.4	0.9	7.4
10.0	24.0	1.2	10.3
15.0	37.9	1.9	16.2
30.0	49.3	4.7	27.9
50.0	49.3	6.9	33.8

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	95.2	42.5	90.8
10.0	98.5	90.5	131.2
15.0	99.7	92.7	178.9
30.0	99.7	95.2	270.6
50.0	99.7	95.6	389.9

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	76.5	17.2	51.4
10.0	92.4	22.6	91.7
15.0	97.5	77.3	149.5
30.0	100.0	91.8	262.4
50.0	100.0	94.0	387.2

**Tab. 9.4.23** BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 6 h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	90.4	89.6	108.8
10.0	97.0	93.0	145.6
15.0	98.5	94.8	174.4
30.0	99.7	96.9	260.0
50.0	99.7	97.4	376.7

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	81.8	18.8	57.8
10.0	96.1	25.6	101.1
15.0	98.2	83.5	158.9
30.0	100.0	92.2	265.6
50.0	100.0	95.6	382.2

**Tab. 9.4.24** BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 12 h.**C** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	55.7	22.5	29.4
10.0	60.3	69.2	33.9
15.0	64.4	71.6	40.4
30.0	77.6	73.5	50.5
50.0	85.2	84.3	61.5

**D** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	11.3	0.2	1.8
10.0	21.0	1.0	5.5
15.0	37.6	1.8	14.8
30.0	60.1	4.7	27.5
50.0	64.4	5.5	34.9

**C** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	48.9	68.1	35.6
10.0	53.4	69.2	40.0
15.0	54.0	69.5	41.1
30.0	62.9	71.1	47.8
50.0	69.7	82.0	57.8

**D** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	7.9	0.3	2.2
10.0	12.8	0.8	5.6
15.0	32.2	2.9	15.6
30.0	54.2	7.2	30.0
50.0	55.0	10.2	33.3

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	72.3	42.6	67.4
10.0	79.2	85.5	94.6
15.0	85.5	86.6	126.1
30.0	97.2	90.7	218.5
50.0	99.7	92.0	309.8

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	73.9	25.9	45.7
10.0	84.2	30.2	81.5
15.0	92.9	76.9	118.5
30.0	99.3	87.8	230.4
50.0	99.5	89.8	353.2

**Tab. 9.4.25 BSA-Verdau im Gel (Silberfärbung), RA, Elastase, 12 h.****A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	66.6	79.0	54.4
10.0	94.4	84.0	90.4
15.0	95.7	86.4	121.1
30.0	99.3	89.7	211.4
50.0	99.8	90.5	318.4

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	79.3	22.1	51.8
10.0	91.8	33.3	81.6
15.0	97.7	75.0	122.8
30.0	99.0	85.0	201.8
50.0	99.3	88.2	329.8

**Tab. 9.4.26 BSA-Verdau im Gel (Coomassiefärbung), RA, Elastase, 12 h.****C** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	23.6	16.2	14.1
10.0	29.7	56.4	18.5
15.0	40.7	60.0	27.1
30.0	57.3	65.5	39.1
50.0	64.9	76.8	45.7

**D** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	5.7	0.6	2.2
10.0	19.7	1.5	5.4
15.0	23.6	16.2	7.6
30.0	38.8	5.8	15.2
50.0	44.8	6.6	18.5

**C** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	29.3	56.9	15.8
10.0	40.2	58.6	21.9
15.0	46.8	61.8	26.3
30.0	56.7	63.5	38.6
50.0	67.4	76.3	49.1

**D** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	9.7	1.4	3.5
10.0	11.2	1.6	4.4
15.0	18.1	2.0	6.1
30.0	29.7	5.0	10.5
50.0	51.1	6.8	19.3

**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	36.2	21.2	36.0
10.0	48.4	37.1	58.0
15.0	61.0	42.8	82.0
30.0	90.6	54.1	160.0
50.0	97.5	61.5	220.0

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	39.4	28.4	36.0
10.0	51.6	35.9	68.0
15.0	61.6	39.7	110.0
30.0	92.6	49.2	194.0
50.0	95.4	50.2	304.0

**Tab. 9.4.27** Hintergrund für BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 12 h.**A** Berechnung ohne Definition (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	29.5	18.1	32.1
10.0	53.5	24.1	60.4
15.0	68.4	35.9	83.0
30.0	92.4	49.9	169.8
50.0	96.7	54.0	245.3

**B** Berechnung ohne Definition (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	33.8	17.4	39.6
10.0	51.6	30.1	67.9
15.0	56.8	34.8	90.6
30.0	88.0	41.8	183.0
50.0	96.6	46.8	281.1

**Tab. 9.4.28** Hintergrund für BSA-Verdau im Gel, RA, Elastase, 12 h.**C** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	0.0	0.0	0.0
10.0	0.0	0.0	0.0
15.0	3.8	6.9	4.0
30.0	3.8	6.9	4.0
50.0	15.5	15.0	16.0

**D** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	4.1	0.3	2.0
10.0	7.1	4.6	6.0
15.0	12.3	12.8	12.0
30.0	19.0	15.3	20.0
50.0	26.4	17.7	28.0

**C** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	3.8	4.9	3.8
10.0	5.4	6.1	5.7
15.0	7.2	6.9	7.5
30.0	12.7	8.6	11.3
50.0	21.1	13.8	20.8

**D** Berechnung mit Def. A,V,L,I (Protein: Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	2.0	2.9	1.9
10.0	3.6	4.6	3.8
15.0	5.3	6.8	5.7
30.0	18.2	15.0	18.9
50.0	23.0	16.4	22.6

**A** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	76.8	85.5	59.3
10.0	84.3	86.3	71.4
15.0	93.6	88.5	93.4
30.0	98.5	92.6	124.2
50.0	99.0	92.8	149.5

**B** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	48.3	3.0	25.3
10.0	70.1	12.2	38.5
15.0	81.1	16.5	57.1
30.0	86.4	20.7	101.1
50.0	92.6	36.7	148.4

**Tab. 9.4.29** BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 1 h.**A** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	56.0	85.1	54.4
10.0	65.9	87.3	69.1
15.0	78.9	90.5	91.2
30.0	86.8	91.9	127.9
50.0	91.6	92.3	150.0

**B** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	46.5	3.6	19.1
10.0	60.8	5.3	27.9
15.0	75.2	15.9	45.6
30.0	88.5	22.3	92.6
50.0	90.6	25.9	126.5

**Tab. 9.4.30** BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 3 h.**C** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	76.4	85.5	57.1
10.0	84.3	86.3	67.0
15.0	91.6	88.4	86.8
30.0	96.5	91.9	107.7
50.0	97.5	92.3	127.5

**D** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	34.8	1.3	14.3
10.0	52.1	3.3	20.9
15.0	54.8	11.2	27.5
30.0	80.1	16.4	56.0
50.0	88.2	32.4	83.5

**C** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	56.0	85.1	52.9
10.0	65.9	87.3	67.6
15.0	78.9	90.3	88.2
30.0	84.8	91.5	114.7
50.0	90.6	91.6	130.9

**D** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	40.2	2.9	16.2
10.0	44.8	2.9	19.1
15.0	62.2	4.3	29.4
30.0	82.9	17.4	54.4
50.0	89.0	21.7	75.0

**A** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	79.1	39.7	54.1
10.0	84.2	87.2	66.1
15.0	87.3	89.4	81.7
30.0	98.5	91.6	112.8
50.0	99.5	92.6	136.7

**B** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	48.1	3.0	16.5
10.0	69.0	14.0	33.0
15.0	74.5	17.2	50.5
30.0	91.3	21.5	88.1
50.0	96.2	36.8	133.0

**Tab. 9.4.31** BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 6 h.**A** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	77.3	88.3	66.7
10.0	86.5	90.8	82.2
15.0	92.6	91.4	91.1
30.0	93.1	93.4	114.4
50.0	95.9	95.6	138.9

**B** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	46.6	4.6	18.9
10.0	64.9	7.7	34.4
15.0	78.7	15.5	57.8
30.0	87.2	21.9	91.1
50.0	92.8	38.7	131.1

**Tab. 9.4.32** BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 12 h.**C** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	77.9	39.1	48.6
10.0	84.2	86.7	60.6
15.0	87.3	88.8	72.5
30.0	98.5	90.4	95.4
50.0	99.5	90.9	114.7

**D** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	29.2	1.2	10.1
10.0	47.1	4.3	18.3
15.0	59.3	12.4	33.0
30.0	79.5	15.9	56.9
50.0	89.0	31.8	85.3

**C** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	74.5	88.0	62.2
10.0	83.7	90.5	76.7
15.0	87.8	91.0	83.3
30.0	89.8	92.3	98.9
50.0	92.6	93.6	116.7

**D** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	23.8	3.1	10.0
10.0	40.6	5.0	20.0
15.0	58.0	11.7	36.7
30.0	76.8	17.1	61.1
50.0	85.9	32.5	83.3

**A** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	37.6	35.1	33.7
10.0	48.1	76.0	44.6
15.0	59.5	80.1	59.8
30.0	80.6	83.9	94.6
50.0	86.0	84.7	115.2

**B** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	26.8	2.3	8.7
10.0	56.7	11.9	25.0
15.0	64.7	16.2	34.8
30.0	84.4	22.2	67.4
50.0	92.4	34.3	107.6

**Tab. 9.4.33 BSA-Verdau im Gel (Silberfärbung), RA, Elastase, 12 h.****A** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	41.8	75.3	28.9
10.0	61.6	79.2	44.7
15.0	64.6	80.3	52.6
30.0	82.0	83.4	86.0
50.0	91.9	84.0	110.5

**B** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	28.9	2.7	14.9
10.0	49.6	15.5	24.6
15.0	77.5	18.7	38.6
30.0	87.0	21.4	64.0
50.0	92.0	36.7	112.3

**Tab. 9.4.34 BSA-Verdau im Gel (Coomassiefärbung), RA, Elastase, 12 h.****C** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	35.3	35.1	32.6
10.0	48.1	76.0	43.5
15.0	57.2	80.1	55.4
30.0	73.8	82.6	79.3
50.0	79.7	83.4	94.6

**D** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	14.8	0.9	4.3
10.0	34.5	9.3	12.0
15.0	42.5	12.5	18.5
30.0	69.8	16.6	33.7
50.0	86.2	28.7	59.8

**C** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	40.0	74.7	27.2
10.0	57.5	78.5	41.2
15.0	61.0	79.3	48.2
30.0	81.4	81.6	75.4
50.0	86.3	81.9	90.3

**D** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	19.4	1.4	9.6
10.0	24.6	4.4	13.2
15.0	40.9	15.7	21.1
30.0	60.4	16.8	32.5
50.0	86.2	31.1	64.9

**A** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	10.2	2.7	6.0
10.0	10.2	2.7	6.0
15.0	17.3	11.6	14.0
30.0	21.7	14.1	18.0
50.0	35.6	23.6	36.0

**B** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	15.1	3.4	8.0
10.0	19.0	7.3	22.0
15.0	29.9	18.7	40.0
30.0	56.5	32.7	76.0
50.0	75.7	39.3	110.0

**Tab. 9.4.35** Hintergrund für BSA-Verdau in Lösung, RA, Elastase, 12 h.**A** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	5.6	6.1	7.5
10.0	13.5	8.7	15.1
15.0	18.6	10.4	18.9
30.0	37.1	17.4	34.0
50.0	48.1	22.5	47.2

**B** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,M,S,T,N,Q,C (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	15.6	7.7	17.0
10.0	19.0	9.4	22.6
15.0	25.5	10.6	32.1
30.0	57.3	24.8	64.2
50.0	75.7	33.2	96.2

**Tab. 9.4.36** Hintergrund für BSA-Verdau im Gel, RA, Elastase, 12 h.**C** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	0.0	0.0	0.0
10.0	0.0	0.0	0.0
15.0	7.1	8.9	8.0
30.0	8.2	10.2	10.0
50.0	26.5	21.6	28.0

**D** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Fetoprotein)

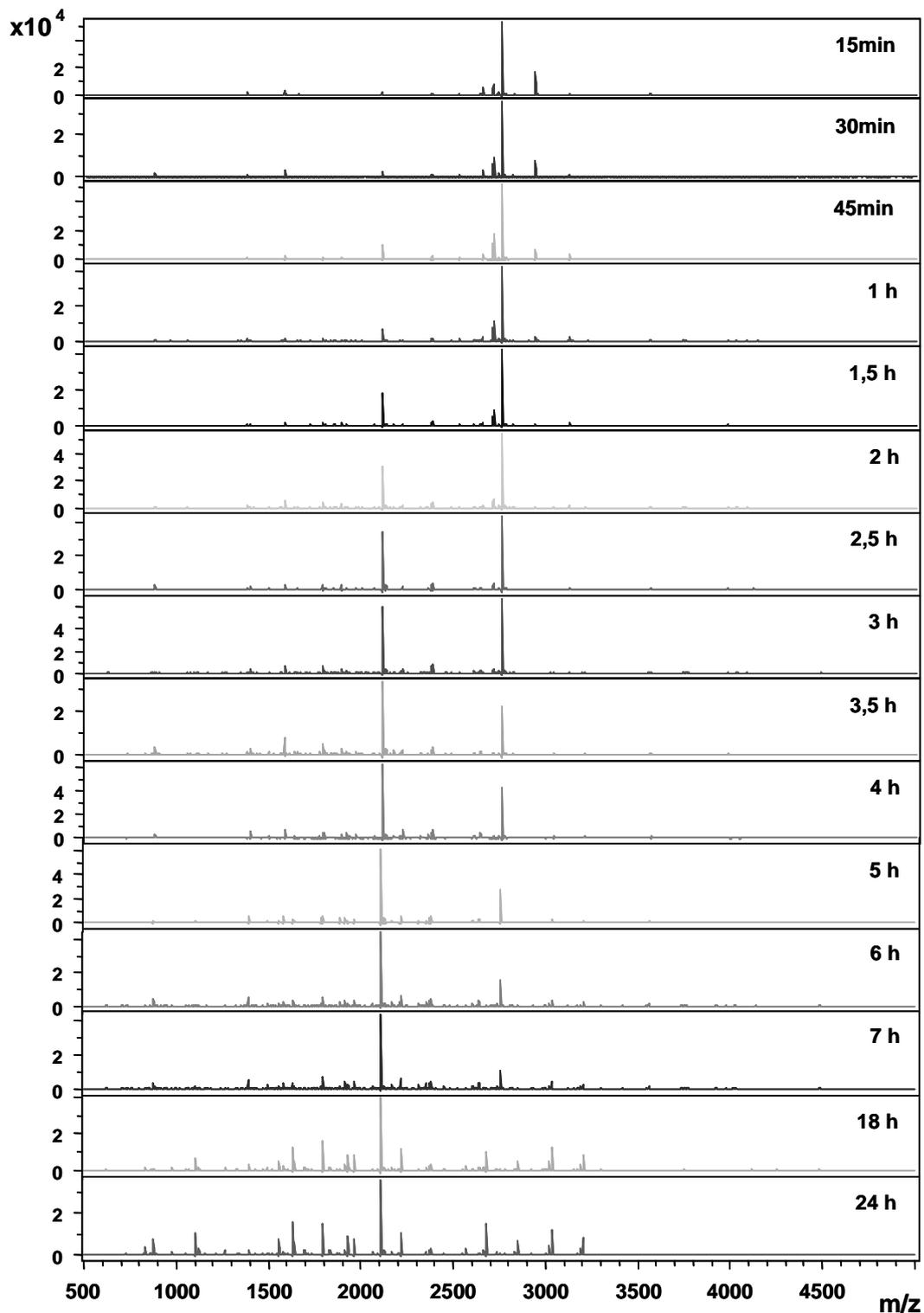
Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	4.1	0.3	2.0
10.0	10.0	6.1	16.0
15.0	18.9	18.3	30.0
30.0	37.8	24.0	46.0
50.0	55.2	30.5	68.0

**C** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Protein: BSA)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	5.6	6.1	7.5
10.0	13.5	8.7	15.1
15.0	13.5	9.6	17.0
30.0	28.7	16.0	28.3
50.0	36.7	21.1	39.6

**D** Berechnung mit Def. G,A,V,L,I,S,T (Fetoprotein)

Fehler [ppm]	Sequenz	Intensität	Signal
6.0	2.5	5.1	7.5
10.0	3.6	6.8	9.4
15.0	11.2	8.8	17.0
30.0	37.9	20.6	37.7
50.0	55.8	30.2	58.5

9.4.3 Elastaseverdau des Membranproteins Cytochrom  $c_1$ 

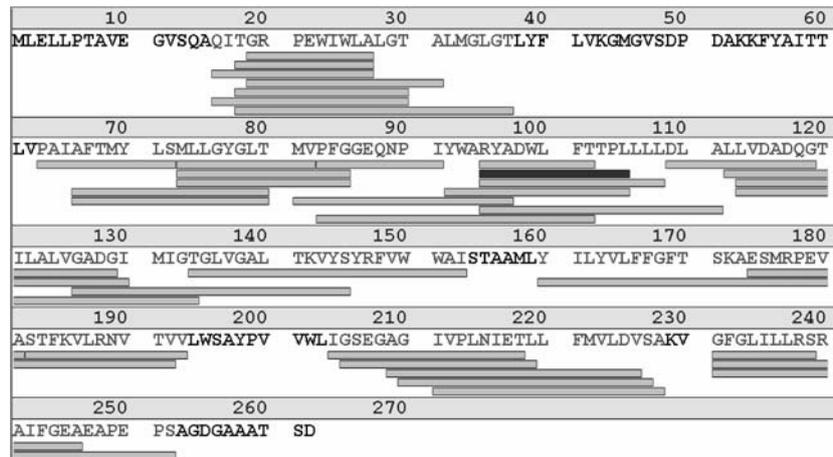
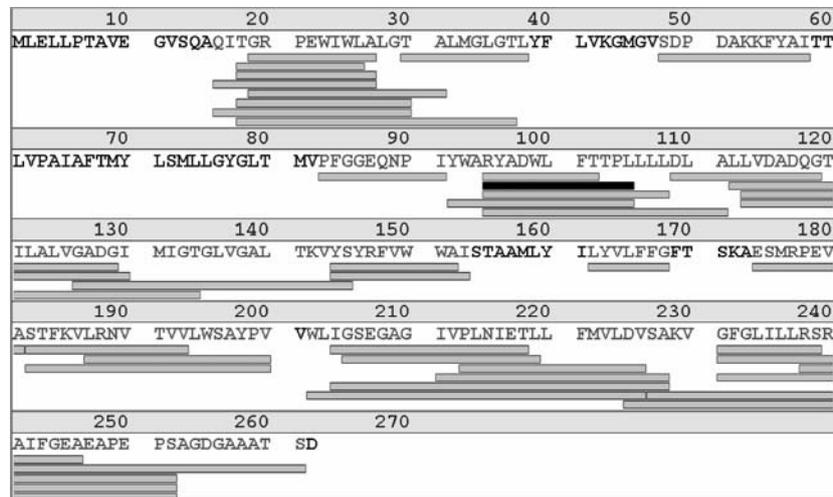
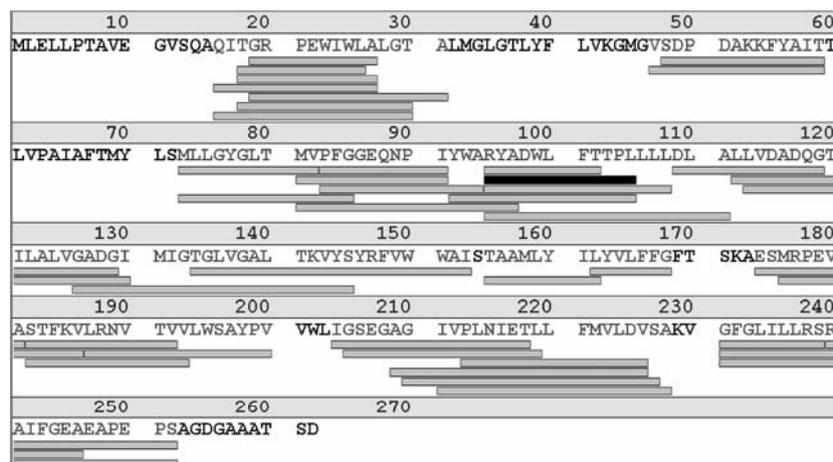
**Abb. 9.4.7** Repräsentativer Zeitverlauf eines Elastaseverdaus des Membranproteins Cytochrom  $c_1$  (siehe Kapitel 5.4.4). Das MS-Spektrum zum Zeitpunkt 24 h entspricht der Abb. 5.22A. Der Verdau erfolgte in Lösung. Die Proteinkonzentration betrug ca. 1 pmol/ $\mu$ l. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde 1  $\mu$ l entnommen und direkt auf einer MALDI-Platte präpariert.

## 9.4.4 Bacteriorhodopsin in Purpurchmembranen

m/z	M	Fehler (ppm)	Position	Sequenz
829.4728	828.4593	7.5	109-116	DLALLVDA
858.4681	857.4687	-9.2	162-168	LYVLFFG
918.434	917.4277	-1.1	174-181	ESMRPEVA
958.4849	957.4767	0.9	6-15	PTAVEGVSA
1056.557	1055.5552	-5.2	19-26	GRPEWIWL
1071.5203	1070.5185	-5.1	95-102	RYADWLFT
1157.6044	1156.6029	-5.0	18-26	TGRPEWIWL
<b>1228.6386</b>	<b>1227.64</b>	<b>-7.1</b>	<b>18-27</b>	<b>TGRPEWIWLA</b>
<b>1228.6386</b>	<b>1227.6209</b>	<b>8.5</b>	<b>62-72</b>	<b>VPAIAFTMYLS</b>
1362.806	1361.8031	-3.2	182-193	STFKVLRNVTVV
1373.6666	1372.6623	-2.2	240-252	RAIFGEAEPEPS
1382.7064	1381.703	-2.8	95-105	RYADWLFTTPL
1390.6996	1389.687	3.8	144-153	YSYRFVWWAI
<b>1398.7415</b>	<b>1397.7456</b>	<b>-8.2</b>	<b>16-26</b>	<b>QITGRPEWIWL</b>
<b>1398.7415</b>	<b>1397.7456</b>	<b>-8.2</b>	<b>18-29</b>	<b>TGRPEWIWLALG</b>
<b>1398.7415</b>	<b>1397.7456</b>	<b>-8.2</b>	<b>19-30</b>	<b>GRPEWIWLALGT</b>
<b>1469.7836</b>	<b>1468.7827</b>	<b>-4.4</b>	<b>16-27</b>	<b>QITGRPEWIWLA</b>
<b>1469.7836</b>	<b>1468.7827</b>	<b>-4.4</b>	<b>19-31</b>	<b>GRPEWIWLALGTA</b>
<b>1469.7836</b>	<b>1468.7642</b>	<b>8.2</b>	<b>160-171</b>	<b>YILYVLFFGFTS</b>
<b>1469.7836</b>	<b>1468.7773</b>	<b>-0.7</b>	<b>204-218</b>	<b>IGSEGAGIVPLNIET</b>
<b>1469.7836</b>	<b>1468.7773</b>	<b>-0.7</b>	<b>205-219</b>	<b>GSEGAGIVPLNIETL</b>
1499.7986	1498.7932	-1.0	18-30	TGRPEWIWLALGT
1616.8814	1615.8895	-9.5	213-226	PLNIETLLFMVLDV
1719.9897	1718.9832	-0.5	231-246	GFGILLRSRAIFGEA
1721.9654	1720.9552	1.7	95-108	RYADWLFTTPLLLL
<b>1740.9492</b>	<b>1739.9359</b>	<b>3.4</b>	<b>16-30</b>	<b>QITGRPEWIWLALGT</b>
<b>1740.9492</b>	<b>1739.9305</b>	<b>6.5</b>	<b>112-129</b>	<b>LLVDADQGTILALVGADG</b>
<b>1740.9492</b>	<b>1739.9305</b>	<b>6.5</b>	<b>113-130</b>	<b>LVDADQGTILALVGADGI</b>
1749.0101	1747.9985	2.5	182-196	STFKVLRNVTVLLWS
1772.0073	1770.9914	4.9	125-143	VGADGIMIGTGLVGALTKV
1773.9914	1772.9825	0.9	134-149	TGLVGALTKVYSYRFV
1923.0216	1922.0183	-2.1	126-145	GADGIMIGTGLVGALTKVYS
2003.1131	2002.1061	-0.1	211-228	IVPLNIETLLFMVLDVSA
2021.1225	2020.1033	5.9	95-111	RYADWLFTTPLLLDLA
2179.2304	2178.2201	1.4	182-200	STFKVLRNVTVLLWSAYPV
<b>2330.258</b>	<b>2329.2623</b>	<b>-5.0</b>	<b>134-153</b>	<b>TGLVGALTKVYSYRFVWWAI</b>
<b>2330.258</b>	<b>2329.243</b>	<b>3.3</b>	<b>231-252</b>	<b>GFGILLRSRAIFGEAEPEPS</b>
<b>2441.3008</b>	<b>2440.2937</b>	<b>-0.1</b>	<b>14-35</b>	<b>QAQITGRPEWIWLALGTALMGL</b>
<b>2441.3008</b>	<b>2440.2831</b>	<b>4.3</b>	<b>92-111</b>	<b>YWARYADWLFTTPLLLDLA</b>
<b>2441.3008</b>	<b>2440.2883</b>	<b>2.1</b>	<b>115-140</b>	<b>DADQGTILALVGADGIMIGTGLVGAL</b>
2557.409	2556.4064	-1.8	229-252	KVGFGLILLRSRAIFGEAEPEPS
2715.5005	2714.4756	6.5	227-252	SAKVGFGILLRSRAIFGEAEPEPS
3257.7513	3256.7399	1.3	139-165	ALTKVYSYRFVWWAISTAAMLYLYVL

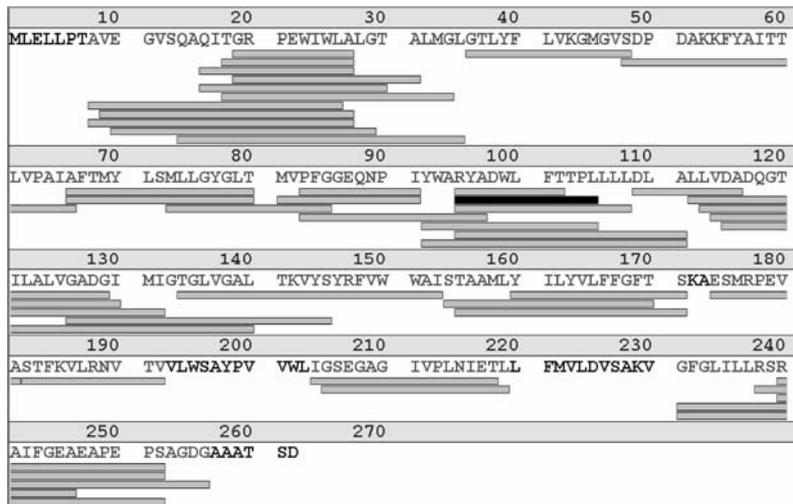
**Nicht zugeordnet:** 763.9249; 800.6874; 843.4543; 850.469; 870.5677; 874.4511; 875.4913; 888.5724; 893.4866; 910.521; 940.4145; 956.3923; 975.5759; 1094.5843; 1127.5871; 1184.6343; 1198.6095; 1200.6232; 1215.6017; 1216.6157; 1224.6377; 1238.6296; 1250.6278; 1256.6428; 1277.6277; 1285.6449; 1338.6786; 1368.6698; 1396.6997; 1404.6814; 1414.6964; 1446.7488; 1450.7145; 1452.7551; 1462.7149; 1491.722; 1609.8676; 1651.8611; 1804.8992; 2027.9191; 2043.1053; 2116.1855; 2315.9601; 2321.1237; 2375.1642; 2469.4218; 2474.2154; 2554.3217; 2987.6774; 3129.7636; 3470.567; 3546.6629

**Tab. 9.4.37 Bacteriorhodopsinverdau in Acetonitril (siehe Kapitel 5.4.6, Abb. 5.34).** Die mehrdeutigen Zuordnungen der *Biotoools*-Berechnung sind schwarz hervorgehoben. Abkürzungen: m/z, gemessene Masse [M+H]; M, theoretische monoisotopische Masse; Fehler, Abweichung von der theoretischen Masse in ppm; Position, Position in der Proteinsequenz; Sequenz, Sequenz des zugeordneten Fragments.

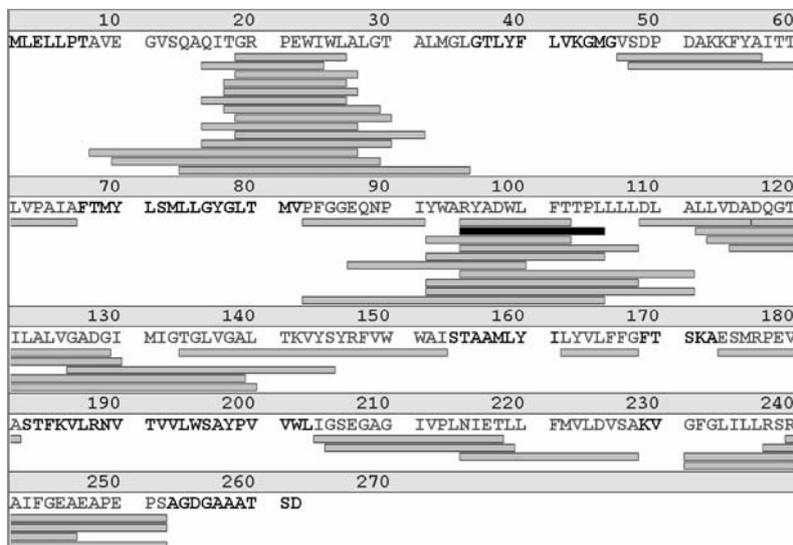
**A****B****C**

**Abb. 9.4.8** *Biotools*-Berechnungen des Bacteriorhodopsinverdaus in Isopropanol (siehe Kapitel 5.4.6, Abb. 5.33). (A) schwarzen Balken in Abb. 5.33. (B) grauen Balken in Abb. 5.33. (C) weißen Balken in Abb. 5.33. Legende, siehe Abb. 5.34B.

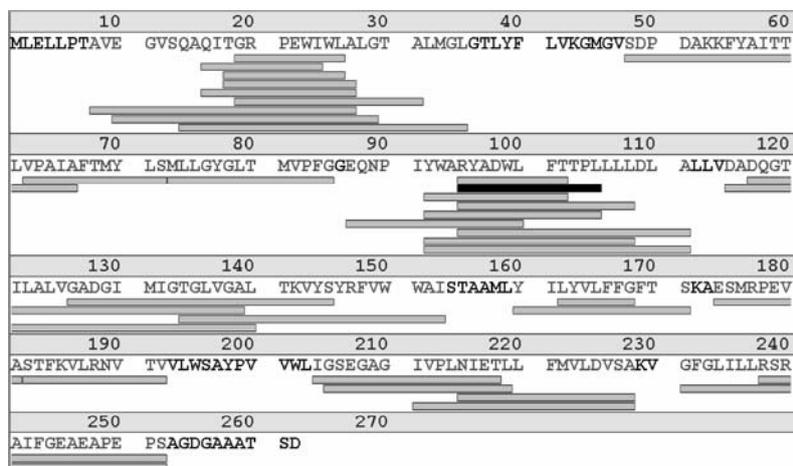
A



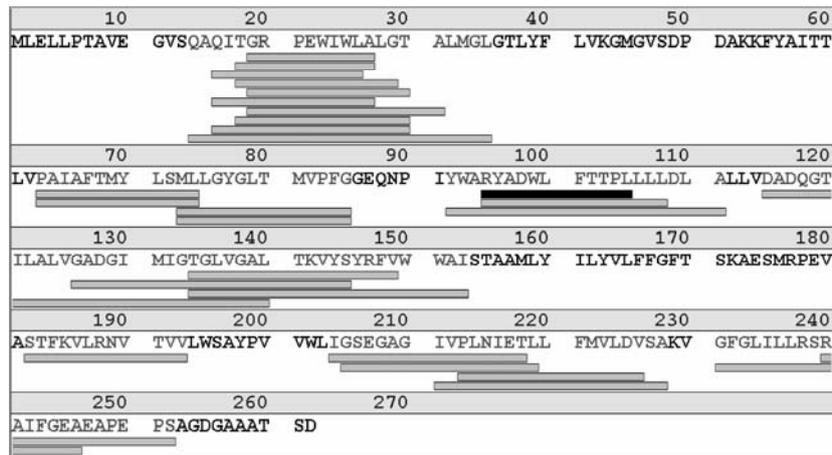
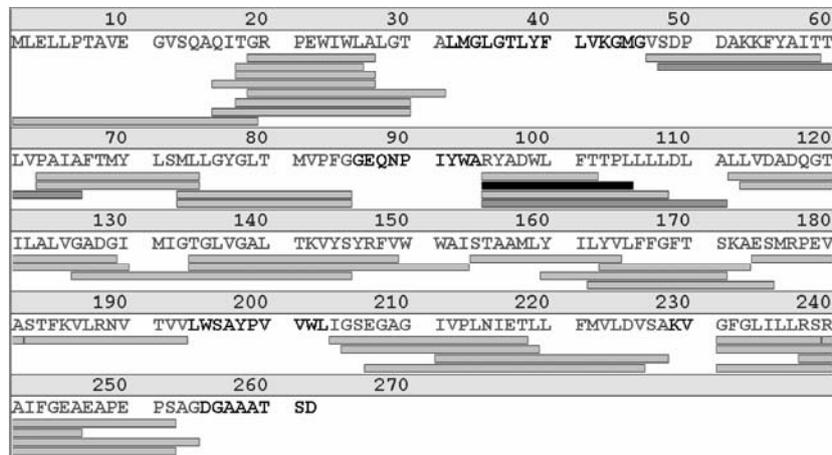
B



C



**Abb. 9.4.9** *Biotoools*-Berechnungen des Bacteriorhodopsinverdaus in Methanol (siehe Kapitel 5.4.6, Abb. 5.33). (A) schwarzen Balken in Abb. 5.33. (B) grauen Balken in Abb. 5.33. (C) weißen Balken in Abb. 5.33. Legende, siehe Abb. 5.34B.

**A****B**

**Abb. 9.4.10** *Biotoools*-Berechnungen des Bacteriorhodopsinverdaus in Acetonitril (siehe Kapitel 5.4.6, Abb. 5.33). (A) schwarzen Balken in Abb. 5.33. (B) weißen Balken in Abb. 5.33. Grauen Balken in Abb. 5.33, siehe Abb. 5.34B; Legende, siehe Abb. 5.34B.

### 9.4.5 Identifikation von ND3 aus einem 16%igen Polyacrylamidgel

m/z	M	Err.	C.	N.	Sequenz	Mod.
1742.7791	1741.7076	36.8604	34	48	(K)TSPYECGFDPMG SAR(L)	NEM
1758.766	1757.7025	31.9736	34	48	(K)TSPYECGFDPMG SAR(L)	NEM; M

**Nicht zugeordnet:** 1045.6616; 1051.7504; 1143.8588; 1320.687; 1638.9633; 1705.2019; 1707.8535; 1839.0089; 2151.2277; 2241.3341; 2399.0768; 2501.4513

**Tab. 9.4.38 ND3-Fragmente des Trypsinverdaus von Spot 2 (siehe auch Abb. 5.36A).** Eine Massenliste mit Hintergrundsignalen war nicht vorhanden. Zwei tryptische Fragmente passten zu der ND3-Untereinheit von Komplex I, was auf eine Modifikation von ND3 mit NEM hinwies. Abkürzungen: m/z, gemessene Masse (M+H); M, theoretische Masse; Err., Abweichung in ppm; C. und N., Position in der Sequenz von ND3; Sequenz, Sequenz des Fragments; Modifikationen, NEM = N-Ethyl-Maleimid, NEMhyd = N-Ethyl-Maleimid + H<sub>2</sub>O, NFM = N-Fluoresceinyl-Maleimid, NFMhyd = N-Fluoresceinyl-Maleimid + H<sub>2</sub>O, M = Oxidation von Methionin.

m/z	M	Err.	C.	N.	Sequenz	Mod.
2748.4501	2747.1018	124	34	54	(K)TSPYECGFDPMG SARLPFSMK(F)	NFM

**Nicht zugeordnet:** 1009.651; 1027.7653; 1044.1582; 1045.6443; 1047.1915; 1051.7556; 1061.9705; 1077.2697; 1077.6677; 1085.8128; 1097.6859; 1129.7062; 1143.8265; 1185.7615; 1201.8485; 1229.7765; 1273.7969; 1287.7975; 1294.7479; 1317.8293; 1320.7671; 1331.8157; 1333.8413; 1361.8423; 1375.8398; 1405.868; 1419.8901; 1449.9165; 1609.9052; 1639.9889; 1670.0482; 1707.9589; 1839.0266; 2399.1535; 2691.4106; 2807.4559

**Tab. 9.4.39 Trypsinverdau von dem fluoreszierenden Spot 1 (siehe auch Abb. 5.36B).** Eine Massenliste mit Hintergrundsignalen war nicht vorhanden. Ein tryptisches Fragment passte zu der ND3-Untereinheit von Komplex I, was den ersten Hinweis für die spezifische Modifikation von ND3 mit NFM in der neuen Konformation von Komplex I lieferte. Legende, siehe Tab. 9.4.38.

m/z	M	Err.	C.	N.	Sequenz	Mod.
1027.7022	1026.6689	25	12	21	(F)TLATLLVIA(F)	
1542.7046	1541.6643	21	38	51	(Y)ECGFDPMG SARLPF(S)	M
1597.8147	1596.8255	-11	1	14	(-)MNLMLALLTNFTLA(T)	M
1651.7596	1650.717	21	38	51	(Y)ECGFDPMG SARLPF(S)	NEM
1667.7568	1666.712	23	38	51	(Y)ECGFDPMG SARLPF(S)	NEM; M
1685.7646	1684.7225	21	38	51	(Y)ECGFDPMG SARLPF(S)	NEMhyd; M
1796.0232	1794.9624	30	1	16	(-)MNLMLALLTNFTLATL(L)	M
2335.2008	2334.0297	70	31	51	(Y)SEKTSPYECGFDPMG SARLPF(S)	M
2444.1606	2443.0824	29	31	51	(Y)SEKTSPYECGFDPMG SARLPF(S)	NEM
2460.1416	2459.0773	23	31	51	(Y)SEKTSPYECGFDPMG SARLPF(S)	NEM; M
2478.1457	2477.0879	20	31	51	(Y)SEKTSPYECGFDPMG SARLPF(S)	NEMhyd; M

**Nicht zugeordnet:** 1022.5757; 1044.1007; 1047.0783; 1062.029; 1064.0815; 1077.2229; 1085.7685; 1120.6273; 1143.7771; 1194.6167; 1322.7055; 1343.7761; 1527.7754; 1603.8022; 1619.8261; 1884.0461; 2054.1206; 2222.1893; 2406.2667

**Tab. 9.4.40 ND3-Fragmente des Chymotrypsinverdaus von Spot 2 (siehe auch Abb. 5.37A).** Die Massenliste wurde von Hintergrundsignalen bereinigt (siehe Tabelle 9.4.42). Legende, siehe Tab. 9.4.38.

m/z	M	Err.	C.	N.	Sequenz	Mod.
1243.3584	1242.3522	-1	38	44	(Y)ECGFDPM(G)	NFMhyd
1259.3648	1258.3471	8	38	44	(Y)ECGFDPM(G)	NFMhyd ; M
1542.6733	1541.6643	1	38	51	(Y)ECGFDPMG SARLPF(S)	M
1795.9909	1794.9624	12	1	16	(-)MNLMLALLTNFTLATL(L)	M
1971.7735	1970.7491	9	38	51	(Y)ECGFDPMG SARLPF(S)	NFMhyd
1987.7813	1986.7441	15	38	51	(Y)ECGFDPMG SARLPF(S)	NFMhyd ; M
2035.7455	2034.7176	10	31	44	(Y)SEKTSPYECGFDPM(G)	NFMhyd
2051.7458	2050.7125	13	31	44	(Y)SEKTSPYECGFDPM(G)	NFMhyd ; M
2074.8334	2073.7285	47	31	45	(Y)SEKTSPYECGFDPMG(S)	NFMhyd
2090.8423	2089.7234	53	31	45	(Y)SEKTSPYECGFDPMG(S)	NFMhyd ; M
2335.1403	2334.0297	44	31	51	(Y)SEKTSPYECGFDPMG SARLPF(S)	M
2764.1407	2763.1145	7	31	51	(Y)SEKTSPYECGFDPMG SARLPF(S)	NFMhyd
2780.1419	2779.1094	9	31	51	(Y)SEKTSPYECGFDPMG SARLPF(S)	NFMhyd ; M

**Nicht zugeordnet:** 1143.731; 1166.6378; 1194.6027; 1345.6839; 1725.8839; 1729.9891; 1782.9599; 1928.0495; 1934.0537; 2038.0964; 2153.1961; 2271.1305; 2351.0956; 2726.1728; 2830.3149; 2868.2212; 2883.2035

**Tab. 9.4.41 ND3-Fragmente des Chymotrypsinverdaus von Spot 1 (siehe auch Abb. 5.37B).** Die Massenliste wurde von Hintergrundsignalen bereinigt (siehe Tabelle 9.4.42). Legende, siehe Tab. 9.4.38.

**m/z**

1059.5872; 1060.0773; 1061.5947; 1129.639; 1143.731; 1166.6378; 1177.639; 1194.6027; 1209.6682; 1243.3584; 1259.3648; 1259.8154; 1345.6839; 1523.8301; 1539.8396; 1542.6733; 1598.9045; 1610.8536; 1626.8992; 1637.8849; 1670.9239; 1720.9239; 1725.8839; 1729.9891; 1733.0093; 1738.9344; 1779.0036; 1782.9599; 1792.9911; 1795.9909; 1855.0351; 1883.0226; 1928.0495; 1934.0537; 1971.7735; 1987.7813; 1991.7713; 2035.1099; 2035.7455; 2038.0964; 2051.7458; 2074.8334; 2090.8423; 2093.8497; 2136.1807; 2153.1961; 2227.011; 2271.1305; 2335.1403; 2351.0956; 2726.1728; 2764.1407; 2780.1419; 2830.3149; 2868.2212; 2883.2035; 2993.4247

**Tab. 9.4.42 Hintergrundsignale des Chymotrypsinverdaus von ND3 (m/z = 1000 – 3000).** Siehe auch Tab 9.4.40 und Tab 9.4.41 sowie Kapitel 8.6.5.

m/z	M	Err.	C.	N.	Sequenz	Mod.
1734.5677	1733.5538	4	35	46	(T)SPYECGFDPMG(S)(A)	NFMhyd
1750.5804	1749.5487	14	35	46	(T)SPYECGFDPMG(S)(A)	NFMhyd; M

**Nicht zugeordnet:** 1080.6191; 1094.6219; 1129.6544; 1171.6548; 1438.7811; 1508.76; 1528.8344; 1622.8436; 1763.9252; 1877.0582; 1910.0329; 2005.0401; 2130.1235; 2193.2439; 2252.1688; 2331.2375; 2361.2715; 2808.2668

**Tab. 9.4.43 ND3-Fragmente des Elastaseverdaus von Spot 1 (siehe Abb. 5.38A).** Die Massenliste wurde von Hintergrundsignalen bereinigt (siehe Tabelle 9.4.44). Die signifikante Zuordnung der Signale war nur mittels MS/MS-Experiment möglich (siehe Abb. 5.38B). Legende, siehe Tab. 9.4.38.

**m/z**

1027.697; 1061.5974; 1064.599; 1085.7658; 1111.6287; 1113.6275; 1135.6301; 1143.7608; 1169.6769; 1176.6304; 1201.8137; 1286.7188; 1292.748; 1392.7745; 1415.7141; 1418.7596; 1483.8189; 1503.8062; 1539.8404; 1587.8939; 1639.9245; 1650.8855; 1802.0314; 1841.9235; 1879.9718; 1948.0481; 1986.1529; 2020.9986; 2166.0938; 2326.1894

**Tab. 9.4.44 Hintergrundsignale des Elastaseverdaus von ND3 (m/z = 1000 – 3000).** Siehe Tab. 9.4.43 sowie Kapitel 8.6.5.

**Literaturverzeichnis**

- Ablonczy, Z., Crouch, R.K., and Knapp, D.R. (2005) Mass spectrometric analysis of integral membrane proteins at subpicomolar levels: application to rhodopsin. *J. Chromatogr. B* **825**, 169-175
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628
- Aivaliotis, M., Haase, W., Karas, M., and Tsiotis, G. (2006a) Proteomic analysis of chlorosome-depleted membranes of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Proteomics* **6**, 217-232
- Aivaliotis M, Karas M, and Tsiotis G. (2006b) High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of cytoplasmatic protein complexes from *Chlorobium tepidum*. *Photosynth Res.* **88**, 143-157
- Aivaliotis, M., Karas, M., Tsiotis, G. (2007) An alternative strategy for the membrane proteome analysis of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* using blue native PAGE and 2-D PAGE on purified membranes. *J. Proteome Res.* **6**, 1048-1058
- Allen, R. D., Schroeder, C. C., and Fok, A. K. (1989) An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques *J. Cell Biol.* **108**, 2233-2240
- Allen, R. D. (1995) Membrane tubulation and proton pumps. *Protoplasma* **189**, 1-8
- Allen, J.W.A., Daltrop, O., Stevens, J.M., Ferguson, S.J. (2003) C-type cytochromes: diverse structures and biogenesis systems pose evolutionary problems. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **358**, 255-266
- Allen, J.W.A., Ginger, M.L., Ferguson, S.J. (2004) Maturation of the unusual single-cysteine (XXXCH) mitochondrial c-type cytochromes found in trypanosomatids must occur through a novel biogenesis pathway. *Biochem. J.* **383**, 537-542
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., and Schägger, H. (1998) Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *Embo J.* **17**, 7170-7178
- Bae, S.H., Harris, A.G., Hains, P.G., Chen, H., Garfin, D.E., Hazell, S.L., Paik, Y.K., Walsh, B., Cordwell, S.J. (2003) Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics* **3**, 569-579
- Bahr, U., Stahl-Zeng, J., Gleitsmann, E., and Karas, M. (1997) Delayed extraction time-of-flight MALDI mass spectrometry of proteins above 25000 Da. *J. Mass Spectrom.* **32**, 1111-1116

- Barnidge, D.R., Dratz, E.A., Jesaitis, A.J., and Sunner, J. (1999) Extraction Method for Analysis of Detergent-Solubilized Bacteriorhodopsin and Hydrophobic Peptides by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **269**, 1-9
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, F.D. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, San Diego, 1998
- Bauer, P.J., Dencher, N.A., and Heyn, M. (1976) Evidence for chromophore interactions in the purple membrane from reconstitution experiments of chromophore-free membrane. *Biophys. Struct. Mechanism.* **2**, 79–92
- Beardsley, R.L., Karty, J.A., and Reilly, J.P. (2000) Enhancing the intensities of lysine-terminated tryptic peptide ions in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **14**, 2147-2153
- Beavis, R.C., and Chait R.T. (1989) Cinnamic acid derivatives as matrices for UV-Laser Desorption Mass Spectrometry of Proteins. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **2**, 432-435
- Beavis, R.C., Chaudhary, T., and Chait R.T. (1992)  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for Matrix-assisted Laser Desorption mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **27**, 156-158
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**, 783-795
- Bhairi, S.M. (2001) *A guide to the properties and uses of detergents in biological systems*. Calbiochem-Novabiochem Corporation
- Bigelow, H.R., Petrey, D.S., Liu, J., Przybylski, D., and Rost, B. (2004) Predicting transmembrane beta-barrels in proteomes. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2566-2577
- Bisle, B., Schmidt, A., Scheibe, B., Klein, C., Tebbe, A., Kellermann, J., Siedler, F., Pfeiffer, F., Lottspeich, F., and Oesterhelt, D. (2006) Quantitative profiling of the membrane proteome in a halophilic archaeon. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1543-1558
- Bodnar, W.M., Blackburn, R.K., Krise, J.M., and Moseles, M.A. (2003) Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 971-979
- Boekema, E.J., Braun, H.P. (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem.*, **5**;282(1):1-4

- Boersema, P.J., Divecha, N., Heck, A.J., Mohammed, S. (2007) Evaluation and optimization of ZIC-HILIC-RP as an alternative MudPIT strategy. *J. Proteome Res.* **6**, 937-46
- Bogdanov, B., and Smith, R.D. (2005) Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. *Mass Spectrom. Rev.* **24**,168-200
- Boyer, P. D. (1999) The ATP synthase - a splendid molecular machine. *Ann. Rev. Biochem.* **66**, 717-749
- Blonder, J., Goshe, M.B., Moore, R.J., Pasa-Tolic, L., Masselon, C.D., Lipton, M.S., and Smith, R.D. (2002) Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res* **1**, 351-360
- Blonder, J., Conrads, T.P., Yu, L.R., Terunuma, A., Janini, G.M., Issaq, H.J., Vogel, J.C., and Veenstra, T.D. (2004) 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., Yu, L.-R., Radeva, G., Chan, K.C., Lucas, D.A., Waybright, T.J., Issaq, H.J., Sharom, F.J., and Veenstra, T.D. (2006) Combined chemical and enzymatic stable isotope labeling using Triton X-100 and Brij-96. *J. Proteome Res.* **5**, 349-360
- Blow, D. M. (1971) in *The Enzymes*, Vol. 3 (Boyer, P. D., eds) pp. 185-212, Academic Press.
- Breci, L.A., Tabb, D.L., Yates III, J.R., Wysocki, V.H. (2003) Cleavage N-terminal to Proline: Analysis of a Database of Peptide Tandem Mass Spectra. *Anal. Chem.* **75**, 1963-1971
- Brookes, P.S., Pinner, A., Ramachandran, A., Coward, L., Barnes, S., Kim, H., and Darley-Usmar (2002) High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of mitochondria and signaling complexes. *Proteomics* **2**, 969-977
- Brown, R.S., and Lennon, J.J. (1998) Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* **67**, 1998-2003.
- Burrows, P.A., Sazanov, L.A., Svab, Z., Maliga, P., and Nixon, P.J. (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplast through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *Embo J.* **17**, 868-876
- Burré, J., Beckhaus, T., Schägger, H., Corvey, C., Hofmann, S., Karas, M., Zimmermann, H., and Volkandt, W. (2006a) Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. *Proteomics* **6**, 6250-6262

- Burré J, Beckhaus T, Corvey C, Karas M, Zimmermann H, and Volkandt W. (2006b) Synaptic vesicle proteins under conditions of rest and activation: analysis by 2-D difference gel electrophoresis. *Electrophoresis* **27**, 3488-3496
- Bustos, D.M., and Velours, J. (2005) The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit g destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **280**, 29004-29010
- Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., and Walker, J. E. (2000a) Dimerization of bovine F<sub>1</sub>-ATPase by binding the inhibitor protein, IF<sub>1</sub>. *J. Biol. Chem.* **275**, 28353-28355
- Cabezón, E., Butler, P. J., Runswick, M. J., and Walker, J. E. (2000b) Modulation of the oligomerization state of the bovine F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein, IF<sub>1</sub>, by pH. *J. Biol. Chem.* **275**, 25460-25464
- Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2003) The structure of bovine F<sub>1</sub>-ATPase in complex with its regulatory protein IF<sub>1</sub>. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 744-750
- Cadene, M., and Chait, B.T. (2000) A Robust, Detergent-Friendly Method for Mass Spectrometric Analysis of Integral Membrane Proteins. *Anal. Chem.* **72**, 5655-5658.
- Cameron, A.E., Eggers, D.F. Jr. (1948) An Ion "Velocitron". *The Rev. of Sci. Instrum.* **19**, 605-607
- Campanini, N., Areces, L.B., Rappsilber, J., Pietrogrande, M.C., Dondi, F., Pastorino, F., Ponzoni, M., Righetti, P.G. (2005) Spot overlapping in two-dimensional maps: A serious problem ignored for much too long. *Proteomics* **5**, 2385 - 2395
- Cargile, B.J., Sevinsky, J.R., Essader, A.S., Stephenson, J.L., and Bundy, J.L. (2005) Immobilized pH Gradient Isoelectric Focusing as a First-Dimension Separation in Shotgun Proteomics. *J. Biomol. Tech.* **16**, 181-189
- Carraway, A.D., Burkhalter, R.S., Timkovich, R., Peterson, J. (1993) Characterization of heme c peptides by mass spectrometry. *J. Inorg. Chem.* **52**: 201-207
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Hirst, J., and Walker, J.E. (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* **2**, 117-126
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Walker, J.E. (2006) Definition of the mitochondrial proteome by measurement of molecular masses of membrane proteins. *PNAS* **103**, 16170-16175
- Chen, E.I., Cociorva, D., Norris, J.L., and Yates, J.R. (2007) Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics. *J. Proteome Res.* **6**, 2529-2538

- Chernushevich, I.V., Loboda, A.V., and Thomson B.A. (2001) An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **36**, 849-65
- Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquie, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J., Rabilloud, T. (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 1901-1909.
- Chevet, E., and Palcy, S. (2006) Integrating forward and reverse proteomics to unravel protein function. *Proteomics* **6**, 5467 -5480
- Clark, A.G., and Whittam, T.S. (1992) Sequencing Errors and Molecular Evolutionary Analysis. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 744-752
- Collinson, I. R., Runswick, M. J., Buchanan, S. K., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., van Raaij, M. J., Griffiths, D. E., and Walker, J. E. (1994) Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochemistry* **33**, 7971-7978
- Comisarow, M.B., and Marshall A.G. (1974) Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **25**, 282-283
- Cooper, J.B., Khan, G., Taylor, G., Tickle, I.J., Blundell, T.L. (1990) X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *J.Mol.Biol.* **214**, 199-222
- Corthals, G.L., Wasinger, C.V., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C. (2000) The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* **21**, 1104-1115.
- Coughenour, H.D., Spaulding, R.S., and Thompson, C.M. (2004) The synaptic vesicle proteome: a comparative study in membrane protein identification. *Proteomics* **4**, 3141-3155
- da Cunha JP, Nakayasu ES, de Almeida IC, and Schenkman S. (2006) Post-translational modifications of Trypanosoma cruzi histone H4. *Mol. Biochem. Parasitol.* **150**, 268-277
- Dai, J., Jin, W-H., Sheng, Q-H., Shieh, C-H., Wu, J-R., and Zeng, R. (2007) Protein Phosphorylation and Expression Profiling by Yin-Yang Multidimensional Liquid Chromatography (Yin-Yang MDLC) Mass Spectrometry. *J. Proteom. Res.* **7**, 250-262
- Darley-USmar, V.M., Capaldi, R.A., Takamiya, S., Millet, F., Wilson, M.T., Malatesta, F., and Sarti, P. (1987) In: Darley-USmar V.M., Rickwood D and Wilson M.T., editors. Mitochondria – A Practical Approach. *IRL Press, Oxford*, 143-152

Dawson, J.H.J., Guilhaus, M., Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**, 155-159

DeDuc, R.D., Taylor, G.K., Kim, Y.B., Januszyk, T.E., Bynum, L.H., Sola, J.V., Garavelli, J.S., and Kelleher, N.L. (2004) ProSight PTM: an integrated environment for protein identification and characterization by top-down mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*, 340-345

de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* **60**, 604–617.

de Duve, C. (1965) The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey Lectures* **59**, 49-87.

Delahunty, C., and Yates III, J.R. (2005) Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods* **35**, 248-255

Deshusses, J.M., Burgess, J.A., Scherl, A., Wenger, Y., Walter, N., Converset, V., Paesano, S., Corthals, G.L., Hochstrasser, D.F., and Sanchez, J.C. (2003) Exploitation of specific properties of trifluoroethanol for extraction and separation of membrane proteins. *Proteomics* **3**, 1418-1424.

Devreese, B., Vanrobaeys, F., Smet, J., Van Beeumen, J., and Van Coster, R. (2002) Mass spectrometric identification of mitochondrial oxidative phosphorylation subunits separated by two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 2525-2533.

Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schägger, H., and Stuart, R. A. (2002) Formation of the yeast F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein Inh1. *J. Biol. Chem.* **277**, 39289-39295

Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., and Alice, M.B. (1968) Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240-2249

Downard, K.M. (2006) Ions of the interactome: The role of MS in the study of protein interactions in proteomics and structural biology. *Proteomics* **6**, 5374-5384

Dreger, M., Bengtsson, L., Schoneberg, T., Otto, H., and Hucho, F. (2001) Nuclear envelop proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *PNAS* **98**, 11943-11948

Dreisewerd, K. (2003) The Desorption Process in MALDI. *Chem. Rev.* **103**, 395-425

Dunkley, T.P., Watson, R., Griffin, J.L., Dupree, P., Lilley, K.S (2004) Localization of organelle proteins by isotope tagging (LOPIT). *Mol Cell Proteomics* **3**, 1128-1134.

- Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E. J., and Braun, H.-P. (2005) Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett.* **579**, 5769-5772
- Dudkina, N. V., Sunderhaus, S., Braun, H. P., and Boekema, E. J. (2006) Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* **580**, 3427-3432
- Dzialisznysky, L., and Hofmann, T. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **302**, 406
- Eichacker, L.A., Granvogl, B., Mirus, O., Müller, B.C., Miess, C., and Schleiff, E. (2004) Hiding behind hydrophobicity - Transmembrane segments in mass spectrometry. *J. Biol. Chem* **279**, 50915-50922.
- Elias, J.E., Haas, W., Faherty, B.K., and Gygi, S.P. (2005) Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nature Methods* **2**, 667-675
- Elortza, F., Nühse, T.S., Foster, L.J., Stensballe, A., Peck, S.C., and Jensen, O.N. (2003) Proteomics analysis of glycosphosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* **5**, 444-453.
- Ens, W., Mao, Y., Mayer, F., Standing, K.G. (1991) Properties of matrix-assisted laser desorption. Measurements with a time-to-digital converter. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**, 117-123
- Eubel, H., Jansch, L., Braun, H.P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant. Physiol.* **133**, 274-286.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., and Braun, H.P. (2004) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol.* **134**, 1450-1459
- Everard-Gigot, V., Dunn, C. D., Dolan, B. M., Brunner, S., Jensen, R. E. and Stuart, R. A. (2005) Functional analysis of subunit e of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region. *Eucaryotic Cell* **4**, 346-355
- Fandiño, A.S., Rais, I., Vollmer, M., Elgass, H., Schägger, H., Karas, M. (2005) LC-nanospray-MS/MS analysis of hydrophobic proteins from membrane protein complexes isolated by blue-native electrophoresis. *J Mass Spectrom.* **40**, 1223-1231
- Fenn, J.B. (1988) *Proc 36<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Francisco
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989) Elektrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71

Fenn, J.B. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **4**, 524-535

Fenn, J.B., Rosell, J., and Meng, C.K. (1997) In electrospray ionization, how much pull does an ion need to escape its droplet prison? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, 1147-1157

Fischer, F., Wolters, D., Rögner, M., and Poetsch, A. (2006a) Towards the complete membrane proteome: High coverage of integral membrane proteins through transmembrane peptide detection. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 444-453

Fischer, F., and Poetsch, A. (2006b) Protein cleavage strategies for an improved analysis of membrane proteome. *Proteome Sc.* **4**, 1-12

Fountoulakis, M., Takacs, M.F., Berndt, P., Langen, H., Takacs B. (2000) Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography. *Electrophoresis* **20**, 2181-2195

Fowler, L.R., and Richardson, S.H. (1963) Studies on electron transfer system. L. On the mechanism of reconstitution of the mitochondrial electron transfer system. *J. Biol. Chem.* **238**, 456-463

Friess, S.D., and Zenobi R. (2001) Protein structure information from mass spectrometry? Selective titration of arginine residues by sulfonates. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 810-818

Fronzes, R., Weimann, T., Vaillier, J., Velours, J., and Brethes, D. (2006) The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. *Biochemistry* **45**, 6715-6723

Furka, A., Sebestyén, F., Asgedom, M., and Dibo, G (1991) General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int. J. Pept. Protein Res.* **37**, 487-493

Galeva, N., and Altermann, M. (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**, 713-722.

Gajer, P., Schatz, M., and Salzberg, S.L. (2004) Automated correction of genome sequence errors. *Nucleic Acids Res.* **32**, 562-569

Gamero-Castano, M., and Fernandez de la Mora, J. (2000) Mechanisms of electrospray ionization of singly and multiply charged salt clusters. *Anal. Chim. Acta* **406**, 67-91

Garbis, S.D., Xixi, E.P., Vougas, K., Dimitraki, P., Zerefos, P.G., Fountoulakis, M (2005) Proteome Profiling of the Mouse Brain Using Multidimensional Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Proceedings of the 53rd Annual ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio, Texas, USA, June 5-9*

Gavin, P.D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2005) Yeast  $F_1F_0$ -ATP synthase complex interactions in vivo can occur in the absence of the dimer specific subunit e. *J. Bioenergetics Biomembranes* **37**, 55-66

Gavrikova, E.V., and Vinogradov, A.D. (1999) Active/de-active state transition of the mitochondrial complex I as revealed by specific sulfhydryl group labeling. *FEBS Lett.* **455**, 36-40

Gay, S., Binz, P.A., Hochstrasser, D.F., and Appel, R.D. (2002) Peptide mass fingerprinting peak intensity prediction: extracting knowledge from spectra. *Proteomics* **2**, 1374-1391.

Gheorghe, M. T., Jornvall, H., and Bergman, T. (1997) Optimized alcoholic deacetylation of N-acetyl blocked polypeptides for subsequent Edman degradation. *Anal. Biochem.* **254**, 119-125

Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2000) The structure of the central stalk in bovine  $F_1$ -ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **11**, 1055-1061

Gillardon, F., Rist, W., Kussmaul, L., Vogel, J., Berg, M., Danzer, K., Kraut, N., and Hengerer, B. (2007) Proteomic and functional alterations in brain mitochondria from Tg2576 mice occur before amyloid plaque deposition. *Proteomics* **7**, 605-616

Godovac-Zimmermann, J., Kleiner, O., Brown, L.R., Drukier, A.K. (2005) Perspectives in splicing up proteomics with splicing. *Proteomics* **5**, 699-709

Görg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-3685

Goshe, M.B., Blonder, J., and Smith, R.D. (2003) Affinity labeling of highly hydrophobic integral membrane proteins for proteome-wide analysis. *J. Proteome Res.* **2**, 153-161

Guerrier, L, Lomas, L, Boschetti, E. (2005) A simplified monobuffer multidimensional chromatography for high-throughput proteome fractionation. *J. Chromatogr. A* **1073**, 25-33

Guilhaus, M. (1995) Principles and Instrumentation in Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **30**, 1519-1532

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., and Aebersold, R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotop-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**, 994-999.

Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y., Aebersold, R. (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *PNAS* **97**, 9390-9395

- Hale, J.E., Butler, J.P., Knierman, M.D., and Becker, G.W. (2000) Increased sensitivity of tryptic peptide detection by MALDI-TOF mass spectrometry is achieved by conversion of lysine to homoarginine. *Anal. Biochem.* **287**, 110-117
- Hames, B.D., and Rickwood, D. (1998) *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*, 3rd Ed., Oxford University Press, New York.
- Han, D.K., Eng, J., Zhou, H., and Aebersold, R. (2001) Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **19**, 946-951
- Han, J., and Schey, K.L. (2004) Proteolysis and mass spectrometric analysis of an integral membrane: Aquaporin 0. *J. Proteom. Res.* **3**, 807-812
- Han, L., Cui, J., Lin, H., Ji, Z., Cao, Z., Li, Y., Chen, Y. (2006a) Recent progresses in the application of machine learning approach for predicting protein functional class independent of sequence similarity. *Proteomics* **6**, 4023-4037)
- Han X, Jin M, Breuker K, McLafferty FW (2006b) Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science* **314**, 109-112
- Hartinger, J., Stenius, K., Hogemann, D., and Jahn, R. (1996) 16-BAC/SDS-PAGE: A two dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal. Biochem.* **240**, 126-133
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1069
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., Shevchenko, A. (2003) Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem.* **75**, 1300-1306.
- Hemström, P., Irgum, K. (2006) Hydrophilic interaction chromatography. *J. Separation Science* **29**, 1784 - 1821
- Hendler, R.W., Pardhasaradhi, K., Reynafarje, B., and Ludwig, B. (1991) Comparison of energy-transducing capabilities of the two- and three-subunit cytochromes aa<sub>3</sub> from *Paracoccus denitrificans* and the 13-subunit beef heart enzyme. *Biophys. J.* **60**, 415-423
- Henry, K.D., Williams, E.R., Wang, B.H., McLafferty, F.W., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. (1989) Fourier-Transform Mass Spectrometry of Large Molecules by Electrospray Ionization *PNAS* **86**, 9075-9078
- Henzel, W.J., Stults, J.T., and Watanabe, C. (1989) *Proceedings of the Third Symposium of the Protein Society*. Seattle, Washington

- Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., and Watanabe, C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *PNAS* **90**, 5011-5015.
- Henzel, W.J., Watanabe, C., and Stults, J.T. (2003) Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 931-942.
- Herbert, B., Righetti, P.G., McCarthy, J., Grinyer, J., Castagna, A., Laver, M., Durack, M., Rummery, G., Harcourt, R., Williams, K.L. (2004) in: Simpson R.J. (Ed.), Purifying proteins for proteomics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*, 431-442
- Hixson, K.K., Rodriguez, N., Camp, D.G., Strittmatter, E.F., Lipton, M.S., and Smith, R.D. (2002) Evaluation of enzymatic digestion and liquid chromatography-mass spectrometry peptide mapping of the integral membrane protein bacteriorhodopsin. *Electrophoresis* **23**, 3224-3232
- Hoffmanlow, M.D., Sniatynskia, M.J., Rogalskia, J.C., Le Blancb, J.C.Y., and Kast, J. (2006) Multiple Neutral Loss Monitoring (MNM): A Multiplexed Method for Post-Translational Modification Screening. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 307-317
- Hofmann, S., Glückmann, M., Kausche, S., Schmidt, A., Corvey, C., Lichtenfels, R., Huber, C., Albrecht, C., Karas, M., and Herr, W. (2005) Rapid and sensitive identification of major histocompatibility complex class I-associated tumor peptides by nanoLC MALDI MS/MS mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1888-1897.
- Hoppel, C. L., Tandler, B., Loffredo, F., Conti, G., Vazquez, E., and Riva, A. (2006) Metabolic state-related structure of isolated cardiac mitochondria as seen by high resolution scanning electron microscopy (HRSEM). *Biochem. Biophys. Acta* **1757**, 519-519
- Horneffer, V., Reichelt, R., and Strupat, K. (2003) Protein incorporation into MALDI-matrix crystals investigated by high resolution field emission scanning electron microscopy. *Int. J. Mass Spectrom.* **226**, 117-131
- Hoving, S., Voshol, H., van Oostrum, J. (2000) Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels. *Electrophoresis* **21**, 2617-2621
- Howell, K.E., and Palade, G.E. (1982) Hepatic Golgi fractions resolved into membrane and content subfractions. *J. Cell Biol.* **92**, 822-832
- Huang, Y., Triscari, J.M., Wysocki, V.H., Pasa-Tolic, L., Anderson, G.A., Lipton, M.S., Smith, R.D. (2004) Dissociation Behaviors of Doubly-Charged Tryptic Peptides: Correlation of Gas-Phase Cleavage Abundance with Ramachandran Plots. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3034-3035.

- Huber, C.G., Walcher, W., Timperio, A.M., Troiani, S., Porceddu, A., and Zolla, L. (2004) Multidimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography-mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 3909-3920
- Hunte, C., von Jagow, G., and Schägger, H. (2003) *Membrane protein purification and crystallization*, 2nd Ed., Academic Press, San Diego, CA
- Hunzinger, C., Schratzenholz, A., Poznanović, S., Schwall, G.P., and Stegmann, W. (2006) Comparison of different separation technologies for proteome analyses: isoform resolution as a prerequisite for the definition of protein biomarkers on the level of posttranslational modifications. *J. Chromatogr. A*. **1123**, 170-181
- Iribarne, J.V., and Thomson, B.A. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets *J. Chem. Phys.* **64**, 2287-2294
- Ishihama, Y., Katayama, H., and Asakawa, N. (2000) Surfactants Usable for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **287**, 45-54
- Issaq, H.J., Chan, K.C., Janini, G.M., Conrads, T.P., and Veenstra, T.D. (2005) Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **817**, 35-47.
- Jacobus, W. E., and Saks, V. A. (1982) Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **219**, 167-178
- Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P. (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J.* **9**, 357-368
- Jenö, P., Scherer, P.E., Manning-Krieg, U., Horst, M. (1993) Desalting electroeluted proteins with hydrophilic interaction chromatography. *Anal Biochem.* **215**, 292-298
- Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., and Mann, M. (1997) Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Anal Chem.* **69**, 4741-4750
- Johnson, R.S., Martin, S.A., Biemann, K., Stults, J.T., and Watson, J.T. (1987) Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal. Chem.* **59**, 2621 - 2625
- Johnson, R.S., Davis, M.T., Taylor, J.A., and Scott D. Patterson (2005) Informatics for protein identification by mass spectrometry. *Methods* **35**, 223-236
- Juan, H.F., Chang, S.C., Huang, H.C., Chen, S.T. (2005) A new application of microwave technology to proteomics. *Proteomics* **5**, 840-842

- Juraschek, R., Dülcks, T., Karas, M. (1999) Nanoelectrospray – More Than Just a Minimized-Flow Electrospray Ionization Source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 300-308
- Kallweit, U., Börnsen, K.O., Kresbach, G.M., Widmer, H.M. (1996) Matrix Compatible Buffers for Analysis of Proteins with Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **10**, 845-849
- Kamp, R. M. (1986) in *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis* (Wittmann-Liebold, K. et al., eds.) pp. 8 – 20, Springer-Verlag.
- Karas, M., Bachmann, and Hillenkamp, F. (1985) Influence of the wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* **57**, 2935-2939
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F. (1987) Matrix-assisted Ultraviolet Laser Desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **78**, 53-68
- Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-301
- Karas, M., Bahr, U., and Hillenkamp, F. (1989) UV Laser Matrix Desorption/Ionisation mass spectrometry of proteins in the 100000 Dalton range. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **92**, 231-242
- Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, E., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., and Hillenkamp, F. (1990). Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **241**, 175-185
- Karas, M., Ehring, H., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., Hillenkamp, F., Grehl, M., and Krebs, B (1993) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Org. Mass. Spectrom.* **28**, 1476-1481
- Karas, M., Glückmann, M., and J. Schäfer (2000) Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1-12
- Karas, M., and Krüger, R. (2003) Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chem. Rev.* **103**, 427 - 440
- Karlsson, K., Cairns, N., Lubec, G., Fountoulakis, M. (1999) Enrichment of human brain proteins by heparin chromatography. *Electrophoresis* **20**, 2970-2976
- Karrasch, S., and Walker, J. E. (1999) Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **290**, 379-384

- Katayama, H., Tabata, T., Ishihama, Y., Sato, T., Oda, Y., and Nagasu, T. (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
- Katayama, H., Nagasu, T., Oda, Y. (2001) Improvement of in-gel digestion protocol for peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **15**, 1416-1421
- Kaufmann, R., Spengler, B., and Lutzenkirchen, F. (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**, 902-910
- Kaufmann, T.C., Engel, A., and Rémy, H.-W. (2006) A Novel Method for Detergent Concentration Determination. *Biophys J.* **90**, 310–317.
- Kebarle, P., and Peschke, M. (2000) On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal Chim Acta* **406**, 11-35
- Keough, T., Lacey, M.P., and Youngquist, R.S. (2000) Derivatization procedures to facilitate de novo sequencing of lysine-terminated tryptic peptides using postsorce decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **14**, 2348-2356
- Kirkpatrick, D.S., Gerber, S.A., and Gygi, S.P. (2005) The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods* **35**, 265-273.
- Kotlyar, A.B., and Vinogradov, A.D. (1990) Slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1019**, 151
- Klein, C., Garcia-Rizo, C., Bisle, B., Scheffer, B., Zischka, H., Pfeiffer, F., Siedler, F., and Oesterhelt, D. (2004) The membrane proteome of Halobacterium salinarum. *Proteomics* **5**, 180-197.
- Kraft, P., Mills, J., and Dratz, E. (2001) Mass spectrometric analysis of cyanogen bromide fragments of integral membrane proteins at the picomole level: application to rhodopsin. 1: *Anal Biochem.* **292**, 76-86
- Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G., Merchant, S. (1998) Molecular mechanisms of cytochrome c biogenesis: three distinct systems. *Mol. Microbiol.* **29**, 383-396
- Krause, E., Wendschuh, H., and Jungblut, P.R. (1999) The Dominance of Arginine-Containing Peptides in MALDI-Derived Tryptic Mass Fingerprints of Proteins. *Anal. Chem.* **71**, 4160-4165
- Krause, F., Reifschneider, N. H., Goto, S., and Dencher, N. A. (2005) Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 583-590

- Krijgsveld, J., Ketting, R.F., Mahmoudi, T., Johanson, J., Artal-Sanz, M., Verrijzer, C.P., Plasterk, R.H., and Heck, A.J. (2003) Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* **21**, 927-931
- Krogh, A., Larsson, B., von Heinje, G., and Sonnhammer E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567-580
- Krüger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Glückmann, M., and Karas, M. (2001) Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes. *Anal. Chem.* **73**, 5812-5821
- Krüger, R., and Karas, M. (2002) Formation and fate of ion pairs during MALDI analysis: anion adduct generation as an indicative tool to determine ionization processes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 1218-1226
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laiko, V.V., Dodonov, A.F., Cotter, R.J. (1994) Resolution and spectral-line shapes in the reflecting time-of-flight mass spectrometer with orthogonally injected ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 720-726
- Lam, K.S., Salmon, S.F., Hersh, E.M., Hruby V.J., Kazmierski, W.M., Knapp, R.J. (1991) A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* **354**, 82-84
- Langen, H., Takacs, S., Evers, S., Berndt, P., Lahm, H.W., Wipf, B., Gray, C., and Fountoulakis, M. (2000) Two-dimensional map of the proteome of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis* **21**, 411-429.
- Leatherbarrow, R.J., and Dean, P.D. (1980) Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3G A. *Biochem. J.* **189**, 27-34
- Lehner, I., Niehof, M., and Borlak, J. (2003) An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. *Electrophoresis* **24**, 1795-1808
- Lescuyer, P., Strub, J.M., Luche, S., Diemer, H., Martinez, P., van Dorsselaer, A., Lunardi, J., and Rabbilloud, T. (2003) Progress in the definition of a reference human mitochondrial proteome. *Proteomics* **3**, 157-167
- Li, X., Gong, Y., Wang, Y., Wu, S., Cai, Y., He, P., Lu, Z., Ying, W., Zhang, Y., Jiao, L., He, H., Zhang, Z., He, F., Zhao, X., and Qian, X. (2005) Comparison of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in HUPO Plasma Proteome Project. *Proteomics* **5**, 3423-41.

- Lim, H., Eng, J., Yates, J.R., Tollaksen, S.L., Giometti, C.S., Holden, J.F., Adams, M.W., Reich, C.I., Olsen, G.J., and Hays, L.G. (2003) Identification of 2D-gel proteins: a comparison of MALDI/TOF peptide mass mapping to mu LC-ESI tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* **14**, 957-970.
- Lindmark, R, Thoren-Tolling, K., and Sjöquist, J. (1983) Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J. Immunol. Methods* **62**, 1-13
- Lisacek, F., Cohen-Boulakia, S., and Appel, R.D. (2006) Proteome informatics II: Bioinformatics for comparative proteomics. *Proteomics* **6**, 5445-5466
- Loo, R.R.O., Dales, N., and P.C. Andrews (1994) Surfactant effects on protein structure examined by electrospray ionization mass spectrometry. *Protein Science* **3**, 1975-1983
- Lu, X., and Zhu, H. (2005) Tube-gel digestion: a novel proteomic approach for high throughput analysis of membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1948-1958
- Luche, S., Santoni, V., and Rabilloud, T. (2003) Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3**, 249-253.
- Ludwig, B., Prochaska, L., and Capali, R.A. (1980) Arrangement of oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase in the mitochondrial inner membrane. *Biochemistry* **19**, 1516-1523
- Macek, B., Waanders, L.F., Olsen, J.V., Mann, M. (2006) Top-down protein sequencing and MS<sup>3</sup> on a hybrid linear quadrupole ion trap-orbitrap mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 949-958
- Mack, L.L., Kralik, P., Rheude, A., and Dole, M. (1970) Molecular Beams of Macroions II. *J. Chem. Phys.* **52**, 4977-4986
- Macko, V., and Stegemann, H. (1970) Free electrofocusing in a coil of polyethylene tubing. *Anal. Biochem.* **37**, 186-190
- Makarov A. (2000) Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156-1162
- Mamyrin, B.A., Karataev, V.I., Shmikk, D.V., and Zagulin, V.A. (1973) The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov. Phys. JETP* **37**, 45
- Mann, M., Højrup, P., and Roepstorff, P. (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 338-345
- Mann, M., and M. Wilm (1994) Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem.* **66**, 4390-4399

- March, R.E. and Todd, J.F.J. (2005) *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry* (2nd ed.), John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, NJ
- Matsumoto, Y., Murai, M., Fujita, D., Sakamoto, K., Miyoshi, H., Yoshida, M., and Mogi, T. (2006) Mass spectrometric analysis of the ubiquinol-binding site in cytochrome bd from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**, 1905-1912.
- Mazanek, M., Mituloviae, G., Herzog, F., Stingl, C., Hutchins, J.R., Peters, J.M., Mechtler, K. (2007) Titanium dioxide as a chemo-affinity solid phase in offline phosphopeptide chromatography prior to HPLC-MS/MS analysis. *Nat Protoc.* **2**, 1059-1069
- McCoss, M.J., McDonald, W.H., Saraf, A., Sadygov, R., Clark, J.M., Tasto, J.J., Gould, K.L., Wolters, D., Washburn, M., Weiss, A., Clark, J.I., and Yates III, J.R. (2002) Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *PNAS* **99**, 7900-7905
- McGrath, M.E., Sprengeler, P.A., Hirschbein, B., Somoza, J.R., Lehoux, I., Janc, J.W., Gjerstad, E., Graupe, M., Estiarte, A., Venkataramani, C., Liu, Y., Yee, R., Ho, J.D., Green, M.J., Lee, C.-S., Liu, L., Tai, V., Spencer, J., Sperandio, D., Katz, B.A. (2006) Structure-guided design of Peptide-based tryptase inhibitors. *Biochemistry* **45**, 5964-5973.
- Medzihradszky, K.F., Campbell, J.M., Baldwin, M.A., Falick, A.M., Juhasz, P., Vestal, M.L., and Burlingame, A.L. (2000) The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **72**, 552-558
- Mehta, A.I., Ross, S., Lowenthal, M.S., Fusaro, V., Fishman, D.A., Petricoin, E.F., Liotta, L.A. (2002) Biomarker amplification by serum carrier protein binding. *Disease Markers* **19**, 1-10
- Meisinger, C., Sommer, T., and Pfanner, N. (2000) Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal. Biochem.* **287**, 339-342
- Mereschkowsky, C. (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralb.* **25**, 593-604
- Merrifield R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis: I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154
- Miller, I., Crawford, J., and Gianazza, E. (2006) Protein stains for proteomic applications: Which, when, why? *Proteomics* **6**, 5385-5406

- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. and Garcia, J. J. (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F<sub>0</sub> bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 12356-12358
- Mirgorodskaya, O.A., Shevchenko, A.A., Chernushevich, I.V., Dodonov, A.F., and Miroshnikov, A.I. (1994) Electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry in protein chemistry. *Anal. Chem.* **66**, 99 - 107
- Mirgorodskaya, O.A., Kozmin, Y.P., Titov, M.I., Korner, R., Sonksen, C.P., and Roepstorff, P. (2000) Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1226-1232.
- Moller, S., Croning, M.D., and Apweiler, R. (2001) Evaluation of methods for prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **17**, 646-653.
- Molloy, M.P., (2000) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal. Biochem.* **280**, 1-10
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Slade, M.B., Rabbiloud, T. Nouwens, A.S., Williams, K.L., and Gooley, A.A. (2001a) Proteomics analysis of the Escherichia coli outer membrane. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2871-2881
- Molloy, M.P., Phadke, N.D., Maddock, J.R., and Andrews, P.C. (2001b) Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis* **22**, 1686-1696.
- Monigatti, F., and Berndt, P. (2005) Algorithm for accurate similarity measurements of peptide mass fingerprints and its application. *J Am Soc Mass Spectrom.* **16**, 13-21.
- Moore, G.R., Pettigrew, G.W. (1990) *Cytochromes c: evolutionary, structural, and physicochemical aspects*. Springer, New York, USA
- Mooser, D., Maneg, O., Corvey, C., Steiner, T., Malatesta, F., Karas, M., Soulimane, T., and Ludwig B. (2005) A four-subunit cytochrome bc<sub>1</sub> complex complements the respiratory chain of Thermus thermophilus. *Biochim. Biophys. Acta* **1708**, 262-274.
- Morandell, S., Stasyk, T., Grosstessner-Hain, K., Roitinger, E., Mechtler, K., Bonn, G.K., and Huber, L.K. (2006) Phosphoproteomics strategies for functional analysis of signal transduction *Proteomics* **6**, 4047-4056
- Morelle, W., Canis, K., Chirat, F., Faïd, V., and Michalski, J.C. (2006) The use of mass spectrometry for the proteomics analysis of glycosylation. *Proteomics* **6**, 3993-4015
- Morris, H.R., and Batley, K.E. (1974) Dihydrofolate reductase: Low-resolution mass-spectrometric analysis of an Elastase Digest as a Sequencing Tool. *Biochem. J.* **137**, 409-411

- Mowry, C.D., and Johnston, M.V. (1993) Simultaneous detection of ions and neutrals produced by matrix-assisted laser desorption. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7**, 569-575
- Muller, A., Hinrichs, W., Wolf, W.M., Saenger, W. (1994) Crystal structure of calcium-free proteinase K at 1.5-Å resolution. *J.Biol.Chem.* **269**, 23108-23111
- Navarre, C., Degand, H., Bennett, K.L., Crawford, J.S., Mortz, E., and Boutry, M (2002) Subproteomics: identification of plasma membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics* **2**, 1706-1714
- Nelson, R.W., Dogruel, D., Williams, P., and Beavis, R. (1994) Mass determination of human immunoglobulin IgM using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 627-631
- Nelson, R.W., Dogruel, D., and Williams, P. (1995) Detection of human IgM at  $m/z$  1 MDa *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 625
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-62.
- Nielsen, P.A., Olsen, J.V., Podtelejnikov, A.V., Anderson, J.R., Mann, M., and Wisniewski, J.R. (2005) Proteomic mapping of brain plasma membrane proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 402-408
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinosita, K. (1997) Direct observation of the rotation of  $F_1$ -ATPase. *Nature* **386**, 299-302
- Nomura, E., Katsuta, K., Ueda, T., Toriyama, M., Mori, T., Inagaki, N. (2004) Acid-labile surfactant improves in-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel protein digestion for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping. *J. Mass Spectrom.* **39**, 202-207
- Nunomura, K., Nagano, K., Itagaki, C., Taoka, M., Okamura, N., Yamauchi, Y., Sugano, S., Takahashi, N., Izumi, T., and Isobe, T. (2005) Cell surface labeling and mass spectrometry reveal diversity of cell surface markers and signaling molecules expressed in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1968-1976.
- O'Connell, P.B.H., and Brady, C.J. (1976) Polyacrylamide Gels with modified Cross-Linkages. *Anal. Biochem.* **76**, 63-73
- Oda, Y., Huang, F.R., Cross, D., Cowburn, D., and Chait, B.T. (1999) Accurate quantification of protein expression and site-specific phosphorylations. *PNAS* **96**, 6591-6596

- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021
- Olsen, J.V., Ong, S.E., and Mann, M. (2004a) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 608-614
- Olsen, J.V., Andersen, J.R., Nielsen, P.A., Nielsen, M.L., Figeys, D., Mann, M., and Wisniewski, J.R. (2004b) HysTag – A novel proteomic quantification tool applied to differential display analysis of membrane proteins from distinct areas of mouse brain. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 82-92
- Olsen, J.V., de Godoy, L.M.F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., and Mann, M. (2005) Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock-mass injection into a C-trap. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 2010-2021
- Olsen, J.V., Nielsen, P.A., Andersen, J.R., Mann, M., and Wisniewski, J.R. (2007) Quantitative proteomic profiling of membrane proteins from the mouse brain cortex, hippocampus, and cerebellum using the HysTag reagent: mapping of neurotransmitter receptors and ion channels. *Brain Res.* **1134**, 95-106.
- Oong, S.E., Foster, L.J., and Mann, M. (2003) Mass spectrometric –based approaches in quantitative proteomics. *Methods* **29**, 124-130
- Paivarinne, H., and Kainulainen, H. (2001) DAPIT, a novel protein down-regulated in insulin-sensitive tissues in streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetol.* **38**, 83-86
- Palagi, P.M., Hernandez, P., Walther, D., Appel, R.D. (2006) Proteome informatics I: Bioinformatics tools for processing experimental data. *Proteomics* **6**, 5435-5444
- Pappin, D.J., Hojrup, P., and Bleasby (1993). Rapid identification of proteins by peptide mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**, 327-332
- Parker, K.C. (2002) Scoring methods in MALDI peptide mass fingerprinting: ChemScore, and the ChemApplex program. *J Am Soc Mass Spectrom.* **13**, 22-39
- Patterson, S.D., and Aebersold, R.H. (2003) Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 311-323
- Paul, W., and Steinwedel, H. (1953) A New Mass Spectrometer without a Magnetic Field. *Z. Naturforsch.* **8a**, 448

- Paumard, P., Vaillier, J., Couly, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P., and Velours, J. (2002a) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **21**, 221-230
- Paumard, P., Arselin, G., Vaillier, J., Chaignepain, S., Bathany, K., Schmitter, J. M., Brethes, D., and Velours, J. (2002b) Two ATP synthases can be linked through subunits i in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **41**, 10390-10396
- Paus, P.N. (1971) Solubilization of Polyacrylamide Gels for Liquid Scintillation Counting. *Anal. Biochem.* **42**, 372-376
- Pedersen, S.K., Harry, J.L., Sebastian, L., Baker, J., Traini, M.D., McCarthy J.T., Manoharan, A., Wilkins, M.R., Gooley, A.A., Righetti, P.G., Packer, N.H., Williams, K.L., and Herbert, B.R. (2003) Unseen proteome: mining below the tip of the iceberg to find low abundance and membrane proteins. *J Proteome Res.* **2**, 303-11
- Perkins, D.N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M., Cottrell, J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567
- Peters E.C., Horn, D.M., Tully, D.C., and Brock, A. (2001) A novel multifunctional labeling reagent for enhanced protein characterization with mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **15**, 2387-2392
- Pieles, U., Zürcher, W., Schär, M., and Moser, H.E. (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
- Pietrogrande, M.C., Marchetti, N., Dondi, F., Righetti, P.G. (2002) Spot overlapping in 2D-PAGE separations: a statistical study of complex protein maps. *Electrophoresis* **23**, 283-291
- Pietrogrande, M.C., Marchetti, N., Dondi, F., Righetti, P.G. (2003) Spot overlapping in two-dimensional polyacrylamide electrophoresis maps: relevance to proteomics. *Electrophoresis* **24**, 217-224
- Pramanik, B.N., Mirza, U.A., Ing, Y.H., Liu, Y.H., Bartner, P.L., Weber, P.C., and Bose, A.K. (2002) Microwave-enhanced enzyme reaction for protein mapping by mass spectrometry: a new approach to protein digestion in minutes. *Protein Sci.* **11**, 2676-2687.
- Pullman, M. E., and Monroy, G. C. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **238**, 3762-3769
- Quist, A.P., Huth-Fehre, T., Sundqvist, B.U.R., and Vertes, A. (1994) Total yield measurements in matrix-assisted laser desorption using a quartz crystal microbalance. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 149-154

- Ragan, C.I., and Heron, C. (1978) The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Evidence for stoichiometric association. *Biochem. J.* **174**, 783-790
- Rais, I., Karas, M., Schägger, H. (2004) Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics* **3**, 2567-2571
- Rais, I. (2005) Neue Strategien zur massenspektrometrischen und gelelektrophoretischen Identifizierung von Membranproteinkomplexen. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, Deutschland*
- Ramus C, Gonzalez de Peredo A, Dahout C, Gallagher M, and Garin J. (2006) An optimized strategy for ICAT quantification of membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* **5**, 68-78.
- Reid, G.E., and McLuckey, S.A., Top down protein characterization via tandem mass spectrometry (2002) *J. Mass Spectrom.* **37**, 663-675
- Reifschneider NH, Goto S, Nakamoto H, Takahashi R, Sugawa M, Dencher NA, Krause F. (2006) Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. *J Proteome Res.* **5**, 1117-1132
- Rexroth, S., Meyer zu Tittingdorf, J.M., Krause, F., Dencher, N.A., and Seelert, H. (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis* **24**, 2814-2823
- Righetti, P.G. (1990) Immobilized pH Gradients: Theory and Methodology. *Elsevier, Amsterdam*
- Righetti, P.G., Castagna, A., Antonucci, F., Piubelli, C., Cecconi, D., Campostrini, N., Rustichelli, C., Antonioli, P., Zanusso, G., Monaco, S., Lomas, L., Boschetti, E. (2005a) *Clin. Chim. Acta* **357**, 123-139
- Righetti, P.G., Castagna, A., Antonioli, P., Boschetti, E. (2005b) Prefractionation techniques in proteome analysis. *Electrophoresis* **26**, 297-319
- Righetti, P.R., Boschetti, E., Lomas, L., and Citterio, A. (2006) Protein Equalizer™ Technology: The quest for a “democratic proteome”. *Proteomics* **6**, 3980-3992
- Roberts, L. (1991) Finding DNA sequencing errors. *Science* **252**, 1255-1256.
- Röllgen, F.W., Bremmer-Weger, E., and Bütfering, L. (1987) *J. De Physique C6* **11**, 253-256
- Roepstroff, P., and Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601

- Rosinke, B., Strupat, K., Hillenkamp, F., Rosenbusch, J., Dencher, N., Krüger, U., and Galla, H.-J. (1995) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) of Membrane Proteins and Non-covalent Complexes. *J. Mass Spectrom.* **30**, 1462-1468
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., and Pappin, D.J. (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 1154-1169
- Rubinstein, J. L., Walker, J. E., and Henderson, R. (2003) Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron microscopy. *EMBO J.* **22**, 6182-6192
- Rubinstein, J. L., Dickson, V. K., Runswick, M. J., and Walker, J. E. (2005) ATP synthase from *Saccharomyces cerevisiae*: location of subunit h in the peripheral stalk region. *J. Mol. Biol.* **345**, 513-520
- Running, W.E., Ravipaty, S., Karty, J.A., and Reilly, J.P. (2007) A top-down/bottom-up study of the ribosomal proteins of *Caulobacter crescentus*. *J. Proteome Res.* **6**, 337-347
- Sabbert, D., Engelbrecht, S., and Junge, W. (1996) Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature* **381**, 623-625
- Sadowski, P.G., Dunkley, T.P., Shadforth, I.P., Dupree, P., Bessant, C., Griffin, J.L., Lilley, K.S. (2006) Quantitative proteomic approach to study subcellular localization of membrane proteins. *Nat. Protoc.* **1**, 1778-1789
- Sadygov, R.G., Liu, H., and Yates III, J.R. (2004) Statistical Models for Protein Validation Using Tandem Mass Spectral Data and Protein Amino Acid Sequence Databases  
*Anal. Chem.* **76**, 1664 – 1671
- Sagan, L. (1967) On the origin of mitosing cells. *J. Theoretical Biology* **14**, 255-274.
- Santoni, V., Molloy, M., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21**, 1054-70
- Santoni, V., Rabilloud, T., Dumas, P., Rouquie, D., Mansion, M., Kieffer, S., Garin, J., and Rossignol, M. (1999) Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* **20**, 705-711
- Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**, 1488-1493

Savitski M.M., Nielsen M.L., and Zubarev, R.A. (2006) ModifiComb, a new proteomic tool for mapping substoichiometric post-translational modifications, finding novel types of modifications, and fingerprinting complex protein mixtures. *Mol Cell Proteomics* **5**, 935-48

Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379

Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231

Schägger, H., Cramer, W.A., and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230

Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J.* **19**, 1777-1783

Schägger, H. (2001) Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* **52**, 119-128

Schägger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**, 154-159.

Schägger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16-22.

Scheurer, S.B., Roesli, C., Neri, D., and Elia, G. (2005a) A comparison of different biotinylation reagents, tryptic digestion procedures, and mass spectrometric techniques for 2-D peptide mapping of membrane proteins. *Proteomics* **5**, 3035-3039

Scheurer SB, Rybak JN, Roesli C, Brunisholz RA, Potthast F, Schlapbach R, Neri D, and Elia G. (2005b) Identification and relative quantification of membrane proteins by surface biotinylation and two-dimensional peptide mapping. *Proteomics* **5**, 2718-2728

Schimper, A.F.W. (1883) Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Z.* **41**, 102-113

Schindler, J., and Nothwang, H.G. (2006) Aqueous polymer two-phase systems: Effective tools for plasma membrane proteomics. *Proteomics* **6**, 5409-5417

Schirle, M., Heurtier, and Kuster, B. (2003) Profiling Core Proteomes of Human Cell Lines by One-dimensional PAGE and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 1297-1305

Schmidt, A. (2000) Untersuchungen des Elektrospray-Ionisierungsprozesses zum massenspektrometrischen Nachweis nicht-kovalenter Komplexe. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, Deutschland*

Schmidt, A., Karas, M., and Dülcks, T. (2003) Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 492-500

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

Schmidt, F., Krah, A., Schmid, M., Jungblut, P., and Bernd Thiede (2006) Distinctive mass losses of tryptic peptides generated by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 933-936

Schlosser, A., Bodem, J., Bossemeyer, D., Grummt, I., and Lehmann, W.D. (2002) Identification of protein phosphorylation sites by combination of elastase digestion, immobilized metal affinity chromatography, and quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. *Proteomics* **2**, 911-918

Schlosser, G., Pocsfalvi, G., Huszár, E., Malorni, A., and Hudecz, F. (2005a) MALDI-TOF mass spectrometry of a combinatorial peptide library: effect of matrix composition on signal suppression. *J. Mass Spectrom.* **40**, 1590-1594

Schlosser, A., Vanselow, J.T., Kramer, A. (2005b) Mapping of phosphorylation sites by a multi-protease approach with specific phosphopeptide enrichment and NanoLC-MS/MS analysis. *Anal Chem.* **77**, 5243-5250

Schluesner, D., Fischer, F., Kruij, J., Rögner, M., and Poetsch, A. (2005) Mapping the membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics* **5**, 1317-1330

Schnolzer, M., Jedrzejewski, P., and Lehmann, W.D. (1996) Protease-catalyzed incorporation of <sup>18</sup>O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* **17**, 945-953

Schwerzmann, K., and Pedersen, P. L. (1986) Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 1-18

Scigelova, M., Makarov, A. (2006) Orbitrap mass analyzer - overview and applications in proteomics. *Proteomics* **6**, 16-21.

Scott, R.A., Mauk, A.G. (1995) *Cytochrome c: a multidisciplinary approach*. University Science Books, Mill Valley, USA

- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H., and Muller, D. J. (2000) Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405**, 418-419
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins on silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858
- Shirasu, Y. et al. (1986) *J. Biochem.* **99**, 1707-1712
- Shotton, D.M. (1970) *Methods Enzymol* **19**, 113-140
- Simpson, D.C., Ahn, S., Pasa-Tolic, L., Bogdanov, B., Mottaz, H.M., Vilkov, A.N., Anderson, G.A., Lipton, M.S., and Smith, R.D. (2006) Using SEC-RPLC and RPLC-CIEF as two-dimensional separation strategies for protein profiling. *Electrophoresis* **27**, 2722–2733.
- Smirnov, I.P., Zhu, X., Taylor, T., Huang, Y., Ross, P., Papayanopoulos, I.A., Martin, S.A., and Pappin, D.J. (2004) Suppression of -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Matrix Clusters and Reduction of Chemical Noise in MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 2958 -2965
- Smith, A. L. (1967) Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material, small-scale. *Methods Enzymol.* **10**, 81-86
- Smith, S.A., Blake, T.A., Ifa, D.R., Cooks, R.G., and Ouyang, Z. (2007) Dual-source mass spectrometer with MALDI-LIT-ESI configuration. *J Proteome Res.* **6**, 837-845
- Song, Z., Chen, L., Ganapathy, A., Wan, X.F., Brechenmacher, L., Tao, N., Emerich, D., Stacey, G., and Xu, D. (2007) Development and assessment of scoring functions for protein identification using PMF data. *Electrophoresis* **5**, 864-870.
- Speers, A. E., Blackler, A. R., Wu, C. C. (2007) Shotgun Analysis of Integral Membrane Proteins Facilitated by Elevated Temperature. *Anal. Chem.* **79**, 4613-4620.
- Speicher, K.D., Kolbas, O., Harper, S., and Speicher D.W. (2000) Systematic Analysis of Peptide Recoveries from In-Gel Digestions for protein identifications in proteome studies. *J. Biomol. Tech.* **11**, 74-86
- Spengler, B., Kirsch, D., and Kaufmann, R. (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/Ionisation Mass Spectrometry of Biomolecules. *J. Mass Spectrom.* **32**, 1019-1036

- Stafford, G.C., Kelley, P.E., Syka, J.E.P., Reynolds, W.E., and Todd, J.F.J. (1984) Recent Improvements in and Analytical Applications of Advanced Ion Trap Technology. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **60**, 85–98.
- Stephens, W.E. (1946) A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Physical Review* **69**, 674
- Stevens, J.M., Daltrop, O., Allen, J.W.A., Ferguson, S.J. (2004) C-type cytochrome formation: chemical and biological enigmas. *Acc. Chem. Res.* **37**, 999-1007
- Stock, D., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., and Schägger, H. (2004) Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **279**, 5000-5007
- Stroop, S.D. (2007) A modified peptide mapping strategy for quantifying site-specific deamidation by electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **21**, 830-836
- Strupat, K., Karas, M., and Hillenkamp, F (1991) 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **111**, 89-102
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., and Holle A. (2003) A novel LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 952-965
- Suder, P., Bierczynska, A., König, S., and Silberring, J. (2004) Acid-labile surfactant assists in-solution digestion of proteins resistant to enzymatic attack. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **18**, 822-824
- Sun, G., Kinter, M.T., and Anderson, V.E. (2003) Mass spectrometric characterization of mitochondrial electron transport complexes: subunits of the rat heart ubiquinol-cytochrome c reductase. *J. Mass Spectrom.* **38**, 531-539
- Sun, W., Gao, S., Wang, L., Chen, Y., Wu, S., Wang, X., Zheng, D., and Gao, Y. (2006) Microwave-assisted protein preparation and enzymatic digestion in proteomics. *Mol Cell Proteomics* **5**, 769-776
- Sutphen, R., Escherich, S., Karolat, J., Gauthier, T., Yip, R., Koomen, J. (2006) Optimizing Chemical Cleavage for LC-MS Profiling. *53<sup>rd</sup> ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topic, Seattle, USA, May 28.-June 1.*
- Swatkoski, S., Russell, S., Edwards, N., and Fenselau, C. (2007) Analysis of a Model Virus Using Residue-Specific Chemical Cleavage and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 654 - 658
- Syka, J.E.P., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. (2004a) Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *PNAS* **101**, 9528-9533

Syka, J.E., Marto, J.A., Bai, D.L., Horning, S., Senko, M.W., Schwartz, J.C., Ueberheide, B., Garcia, B., Busby, S., Muratore, T., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. (2004b) Novel linear quadrupole ion trap/FT mass spectrometer: performance characterization and use in the comparative analysis of histone H3 post-translational modifications. *J. Proteom. Res* **3**, 621-626

Tabb, D.L., Smith, L.L., Brezi, L.A., Wysocki, V.H., Lin, D., Yates III, J.R. (2003) Statistical Characterization of Ion Trap Tandem Mass Spectra from Doubly Charged Tryptic Peptides. *Anal. Chem.* **75**, 1155-1163.

Tabb, D.L., Huang, Y., Wysocki, V.H., Yates, J.R. (2004) Influence of basic residue content on fragment ion peak intensities in low-energy collision-induced dissociation spectra of peptides. *Anal. Chem.* **76**, 1243-1248.

Tanner, S., Pevzner, P.A., and Bafna, V. (2006) Unrestrictive identification of post-translational modifications through peptide mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **1**, 67-72.

Taranenko, N.I., Tang, K., Allman, S.L., Chang, L.Y., and Chen, C.H. (1994) 3-Aminopicolonic acid as a matrix for laser desorption mass spectrometry of biopolymers. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **8**, 1001-1006

Tas, J., De Vries, A.C.J., and Berndsen, R.G. (1979) A Method for Quantitative Determination of Protein Incorporated in Solubilizable Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* **100**, 264-270

Taylor, G. (1964) Disintegration of Water Droplets in an Electric Field. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. A* **280**, 383-397

Taylor, R.S., Wu, C.C., Hays, L.G., Eng, J.K., Yates III, J.R., and Howell, K.E. (2000) Proteomics of rat liver Golgi complex: minor proteins are identified through sequential fractionation. *Electrophoresis* **21**, 3441-3459

Taylor, S.W., Warnock, D.E., Glenn, G.M., Zhang, B., Fahy, E., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson, B.W., Ghosh, S.S (2002) An alternative strategy to determine the mitochondrial proteome using sucrose gradient fractionation and 1D PAGE on highly purified human heart mitochondria. *J. Proteom. Res.* **5**, 451-458

Terzi, E., Boyot, P., Van Dorsselaer, A., Luu, B., and Trifilieff, E. (1990) Isolation and amino acid sequence of a novel 6.8-kDa mitochondrial proteolipid from beef heart. Use of FAB-MS for molecular mass determination. *FEBS Lett.* **260**, 122-126

Thiede, B., Höhenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, M., Jungblut, P.R. (2005) Peptide mass fingerprinting. *Methods* **35**, 237-247

Thingholm, T.E., Jørgensen, T.J., Jensen, O.N., Larsen, M.R. (2006) Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat Protoc.* **1**, 1929-1935

- Thöny-Meyer, L. (1997) Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 337-376
- Tirumalai, R.S., Chan, K.C., Prieto, D.A., Issaq, J., Conrads, T., and Veenstra, T.D. (2003) Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 1096-1103
- Trester-Zedlitz, M., Burlingame, A., Kobilka, B., and von Zastrow, M. (2005) Mass spectrometric analysis of agonist effects on posttranslational modifications of the beta-2 adrenoceptor in mammalian cells. *Biochemistry* **44**, 6133-6143
- Tuloup, M., Hernandez, C., Coro, I., Hoogland, C., Binz, P-A., and Appel, R.D. (2003) *Aldente and BioGraph: An improved peptide mass fingerprinting protein identification environment*, Swiss Proteomics Society 2003 Congress: Understanding Biological Systems through Proteomics, Basel, Switzerland, 2-4 Dec. 2003, Ed. FontisMedia (ISBN 2-88476-004-0), 174-176
- Turro J.N., and Xue-Gong Lei (1995) Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant Interactions: The BSA/SDS System. *Langmuir* **11**, 2525-2533
- Unlü, M., Morgan, M.E., and Minden, J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-2077
- Van Lis, R., Atteia, A., Mendoza-Hernandez, G., and Gonzalez-Halphen, D. (2003) Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol.* **132**, 318-330
- Van Montfort, B.A., Canas, B., Duurkens, R., Godovac-Zimmermann, J., Robillard, G.T. (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**, 322-330.
- Van Pelt, C., Zhang, S., and Henion, J. (2002) Characterization of a fully automated nanoelectrospray system with mass spectrometric detection for proteomic analyses. *J. Biomol. Tech.* **13**, 72-84
- Vesper, H.W., Mi, L., Enada, A., and Myers, G.L. (2005) Assessment of microwave-assisted enzymatic digestion by measuring glycosylated hemoglobin A1c by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **19**, 2865-2870.
- Viswanathan, S., Unlü, M., Minden, J.S. (2006) Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc.* **1**, 1351-1358
- Vorm, O., Chait, B.T., Roepstorff (1993) Mass spectrometry of proteinsamples containing detergents. *Proceedings of the 41<sup>st</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topic, San Francisco*, 621 – 622.

- Wa, C., Cerny, R., and Hage, D.S. (2006) Obtaining high sequence coverage in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry for studies of protein modification: analysis of human serum albumin as a model. *Anal. Biochem.* **349**, 229-241
- Wallin, E., and von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **7**, 1029-1038
- Washburn, M.P., Yates III, J.R. (2000) In: Blackstock W., Mann, M., editors. Proteomics: A trend guide. *London: Elsevier*, 27-30.
- Washburn, M.P., Wolters, D., Yates III, J.R. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242-247
- Washburn, M.P., Ulaszek, R.R., and Yates, J.R. (2003) Reproducibility of quantitative proteomic analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology. *Anal. Chem.* **75**, 5054-5061
- Wenger, P., de Zuanni, M., Javet, P., Gelfi, C., Righetti, P.G. (1987) Amphoteric, isoelectric immobiline membranes for preparative isoelectric focusing. *J. Biochem. Biophys. Methods* **14**, 29-43
- Westbrook, J.A., Yan, J.X., Wait, R., Welson, S.Y., Dunn, M.J. (2001) Zooming-in on the proteome: very narrow-range immobilized pH gradients reveal more protein species and isoforms. *Electrophoresis* **22**, 2865-2871
- Whitelegge, J.P., Gunderson, C.B., Faull, K.F. (1998) Electrospray-ionization mass spectrometry of intact intrinsic membrane proteins. *Protein Sci* **7**, 1423-1430
- Whitelegge, J.P., Laganowsky, A., Nishio, J., Souda, P., Zhang, H., Cramer, W.A. (2006a) Sequencing covalent modifications of membrane proteins. *J Exp Bot.* **57**, 1515-1522
- Whitelegge, J.P., Halgand, F., Souda, P., Zabrouskov, V. (2006b) Top-down mass spectrometry of integral membrane proteins. *Expert Rev Proteomics* **3**, 585-596.
- Wielsch, N., Thomas, H., Surendranath, V., Waridel, P., Frank, A., Pevzner, P., Shevchenko, A. (2006) Rapid validation of protein identifications with the borderline statistical confidence via de novo sequencing and MS BLAST searches. *J. Proteom. Res.* **5**, 2448-2456
- Wildgruber, R., Harder, A., Obermeier, C., Boguth, G., Weiss, W., Fey, S.J., Larsen, P.M., Görg, A. (2000) Towards higher resolution: Two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 2610-2616

Wiley, W.C., and MacLaren, I.H. (1955) Time-of-Flight Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instr.* **26**, 1150-1157.

Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., and Hochstrasser, D.F. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* **14**, 61-65

Williams, T.I., Combs, J.C., Thakur, A.P., Strobel, H.J., Lynn, B.C (2006) A novel Bicine running buffer system for doubled sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* **27**, 2984-2995

Wilm, M., and Mann, M. (1994) Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom Ion Proc.* **136**, 167-180

Wilm, M., and Mann, M. (1996) Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Anal. Chem.* **68**, 1 -8

Wiltfang, J., Arold, N., Neuhoff, V. (1991) A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis* **12**, 352-366

Wittig, I., and Schägger, H. (2005) Advantages and limitations of clear native polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* **5**, 4338-4346.

Wittig, I., Braun H.-P., and Schägger, H. (2006a) Blue-Native-PAGE. *Nature Protocols* **1**, 418-428

Wittig, I, and Schägger, H. (2006b) Electrophoretic methods to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol.* **80**, 723-741

Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M., Schägger, H. (2006c) Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1066-1072.

Wittig, I., Karas, M., and Schägger, H. (2007) High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1215-1225

Wright, P.A., Wilmouth, R.C., Clifton, I.J., Schofield, C.J. (2001) Kinetic and Crystallographic Analysis of Complexes Formed between Elastase and Peptides from Beta-Casein. *Eur.J.Biochem.* **268**, 2969

Wu, C.C., Yates III, J.R. (2003a) The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.* **21**, 262-267

- Wu, C.C., MacCoss, M.J., Howell, K.E., and Yates III, J.R. (2003b) A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat. Biotechnol.* **21**, 532-538
- Wysocki, V.H., Resing, K.A., Zhang, Q., Cheng, Guilong (2005) Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* **35**, 211-222
- Yamashita, M., and Fenn, J.B. (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451 - 4459
- Yang, F., Bogdanov, B., Strittmatter, E.F., Vilkov, A.N., Gritsenko, M., Shi, L., Elias, D.A., Ni, S., Romine, M., Paša-Tolić, L., Lipton, M.S., Smith, R.D. (2005) Characterization of purified c-type heme-containing peptides and identification of c-type heme-attachment sites in *Shewanella oneidensis* cytochromes using mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **4**, 846-854
- Yao, J., Scott, J.R., Young, M.K., and Wilkins, C.L. (1998) Importance of Matrix:Analyte Ratio for Buffer Tolerance Using 2,5-Dihydroxybenzoic Acid as a Matrix in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Fourier Transform Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight. *J. Am Soc. Mass Spectrom.* **9**, 805-813
- Yennawar, N.H., Yennawar, H.P., Farber, G.K. (1994) X-ray crystal structure of gamma-chymotrypsin in hexane. *Biochemistry* **33**, 7326-7336
- Yost R.A., and Enke C.G. (1978) Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer. *J. American Chem Soc.* **100**, 2274 -2275
- Yu, Y.Q., Gilar, M., Lee, P.J., Bouvier, E.S., and Gebler, J.C. (2003) Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal. Chem.* **75**, 6023-6028
- Zabrouskov, V., and Whitelegge, J.P. (2007) Increased coverage in the transmembrane domain with activated-ion electron capture dissociation for top-down Fourier-transform mass spectrometry of integral membrane proteins. *J. Proteome Res.* **6**, 2205-2210
- Zahedi, R.-P., Meisinger, C., and Sickmann, A. (2005) Two-dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride/SDS-PAGE for membrane proteomics. *Proteomics* **5**, 3581-3588
- Zamdborg, L., LeDuc, R.D., Glowacz, K.J., Kim, Y-B., Viswanathan, V., Spaulding, I.T., Early, B.P., Bluhm, E.J., Babai, S., and Kelleher, N.L. (2007) ProSight PTM 2.0: improved protein identification and characterization for top down mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*, 1-6

- Zerbetto, E., Vergani, L., and Dabbeni-Sala, F. (1997) Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **18**, 2059-2064
- Zhang, N., Li, N., and Li, L. (2004) Liquid chromatography MALDI MS/MS for membrane proteins. *Anal. Chem.* **76**, 1817-1823
- Zhang, S., and Williamson, B.L. (2005) Characterization of Protein Glycosylation Using Chip-Based Nanoelectrospray with Precursor Ion Scanning Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Biomol. Tech.* **16**, 209-219
- Zhang, H., Lin, Q., Ponnusamy, S., Kothandaraman, N., Lim, T.K., Zhao, C., Kit, H.S., Arijit, B., Rauff, M., Hew, C.L., Chung, M.C., Joshi, S.B., and Choolani, M. (2007) Differential recovery of membrane proteins after extraction by aqueous methanol and trifluoroethanol. *Proteomics* **7**, 1654-1663
- Zhu, H., Pan, S., Gu, S., Bradbury, E.M., and Chen, X. (2002) Amino Acid residue specific stable isotop labeling for quantitative proteomics. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **16**, 2115-2123
- Zhu, X., and Papayannopoulos, I.A. (2003) Improvement in the Detection of Low Concentration Protein Digests on a MALDI TOF/TOF Workstation by Reducing  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Adduct Ions. *J. Biomol. Tech.* **14**, 298-307

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
Abs. Int.	Absolute Intensität
ACN	Acetonitril
AGP, AGP-Protein	<i>dapit protein</i> (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Benzyl-dimethyl- <i>n</i> -hexadecylammoniumchlorid
Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BN-PAGE bzw. BNE	Blau-Native Gelelektrophorese
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin (Swiss-Prot-Datenbanknr., P02769)
<i>bottom up</i>	Erklärung, siehe Kapitel 3.1.3
CCHL	<i>cytochrome c haem lyase</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CMC	<i>Critical micelle concentration</i> ; kritische Mizellenkonzentration
CN-PAGE bzw. CNE	Native Gelelektrophorese (CN, <i>Clear Native</i> )
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
D	Feldfreie Driftstrecke
Da	Dalton
ddist	doppeldestilliert
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
DE	<i>Delayed Extraction</i>
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DHBs	superDHB [2,5-Dihydroxybenzoesäure/2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure = 9 : 1]
DHEBA	N,N'-(1,2-dihydroxyethylen)-bisacrylamid
DIGE	<i>Difference gel electrophoresis</i>

Abkürzungsverzeichnis

DNA bzw. DNS	Desoxyribonukleinsäure
DM	Decyl- $\beta$ -D-maltosid
DTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
DTT	Dithiothreitol
e	Elementarladung [ $1,6 \cdot 10^{-19}$ C (Coulomb)]
$E_{\text{kin}}$	Kinetische Energie [Einheit: 1 Joule; $1 \text{ J} = \text{kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$ ]
EDA	Ethylendiacrylat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray Ionisation
ETD	<i>Electron transfer dissociation</i>
Fetoprotein	Alpha-Fetoprotein (Swiss-Prot-Datenbanknr., P02771)
FT-ICR	Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz
GRAVY	<i>grand average hydropathy</i>
Häm	Fe-Protoporphyrin IX bzw. Häm b
HCCA	alpha-Cyano-4-Hydroxymzimtsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Intens [a.u.] od. Intensität	Absolute Intensität in <i>counts</i>
% Intensität	Relative Intensität in %
ISD	<i>In source decay</i>
IT	Ionenfalle
Komplex I; KI	NADH:Ubichinon Oxidoreduktase
Komplex II; KII	Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase
Komplex III; KIII	Ubichinol:Cytochrom <i>c</i> Oxidoreduktase
Komplex IV; KIV	Cytochrom <i>c</i> Oxidase
Komplex V	$F_1F_0$ -ATP-Synthase; ATP-Synthase
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>Liquid chromatography</i> )
LID	<i>Laser induced dissociation</i>
LIT	Lineare Ionenfalle
m	Masse [Einheit: 1 kg]
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>

Abkürzungsverzeichnis

MBA	N,N'-Methylenbisacrylamid
MccA	<i>multi haem cytochrome c</i>
MEGA-11	N-Undecanoyl-N-methylglucamin
MLQ, MLQ-Protein	<i>6.8 kDa mitochondrial proteolipid</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem- bzw. Hybridmassenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND3	NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 3 ( <i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3</i> )
NEM	N-Ethyl-Maleimid
NEMhyd	N-Ethyl-Maleimid + H <sub>2</sub> O
NFM	N-Fluoresceinyl-Maleimid
NFMhyd	N-Fluoresceinyl-Maleimid + H <sub>2</sub> O
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint(ing)</i>
ppm	parts per million
PSD	<i>Post source decay</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QIT	Quadrupol-Ionenfalle
Qq-oTOF	Quadrupol-o-TOF
R	Auflösung
RA	Protein wurde reduziert und alkyliert.
RNA bzw. RNS	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reversed phase</i>
S	Beschleunigungsstrecke
SAX	Anionenaustauscher ( <i>Strong anion exchange</i> )
SCX	Kationenaustauscher ( <i>Strong cation exchange</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE bzw. 1-D-SDS-PAGE	1D-Polyacrylamidgelelektrophorese

2D-SDS-PAGE	2D-Gelelektrophorese (IEF/SDS-PAGE)
dSDS-PAGE	<i>doubled</i> SDS-PAGE; doppel Polyacrylamid-gelelektrophorese
SNAP	<i>Sophisticated Numerical Annotation Procedure</i>
t	Zeit
t <sub>s</sub>	Beschleunigungszeit
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMH	Transmembranhelix
TOF	Flugzeitmassenanalysator ( <i>Time of Flight</i> )
TOF/TOF	Tandemmassenspektrometrie
<i>top down</i>	Erklärung, siehe Kapitel 3.1.3
Tricin	N-Tris[hydroxymethyl]methylglycerin
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
Triton X-100	(p-tert-Octylphenoxy) polyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
U <sub>0</sub>	Beschleunigungsspannung
U <sub>1</sub>	Gitterspannung für Zweistufenextraktion
v	Geschwindigkeit
z	Ladung
Zwittergent 3-08 od. SB 3-08	Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat
Zwittergent 3-12 od. SB 3-12	Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat
Zwittergent 3-14 od. SB 3-14	Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat
Zwittergent 3-16 od. SB 3-16	Hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat

## Publikationen

### **Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase.**

Meyer B., Wittig I., Trifilieff E., Karas M., Schägger H.

Mol. Cell. Proteomics (2007) 6, 1690-1699

### **A dedicated haem lyase is required for the maturation of a novel bacterial cytochrome c with unconventional covalent haem binding.**

Hartshorne R.S., Kern M., Meyer B., Clarke T.A., Karas M., Richardson D.J., Simon J.

Mol. Microbiol. (2007) 64, 1049-1060

### **Mass spectrometric analysis of glycine receptor-associated gephyrin splice variants.**

Paarmann I., Schmitt B., Meyer B., Karas M., Betz H.

J. Biol. Chem. (2006) 281, 34918-34925

### **Identification of the mitochondrial ND3 subunit as a structural component involved in the active/deactive enzyme transition of respiratory complex I.**

Galkin A., Meyer B., Wittig I., Karas M., Schägger H., Vinogradov A., Brandt U.

(in Vorbereitung)

### **The key residue for substrate transport (E14) in the EmrE dimer is asymmetric.**

Lehner I., Basting D., Haase W., Kaiser C., Meyer B., Karas M., Glaubitz C.

(in Vorbereitung)

## Posterpräsentationen

### **Vergleich verschiedener Enzyme auf Eignung für die massenspektrometrische Analyse von Membranproteinen**

Björn Meyer, Sandra Hofmann, Carsten Corvey, Khalid Siddiqui, Bernd Ludwig, Michael Karas

38. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Rostock, Deutschland, 6. bis 9. März 2005

**Mass spectrometric analyses of integral membrane proteins, solubilized with Detergents or reconstituted into artificial phospholipids vesicles**

Björn Meyer, Khalid Siddiqui, Michalis Aivaliotis, Bernd Ludwig, Michael Karas

53<sup>rd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio, Texas, 5. bis 9. Juni 2005

**Mass Spectrometric Analysis of Membrane Proteins after Digestion with unspecific enzymes.**

Björn Meyer, Khalid Siddiqui, Bernd Ludwig, Michael Karas

HUPO 4<sup>th</sup> Annual World Congress, München, Deutschland, 29. August bis 1. September 2005

**Neue Strategien für eine “Peptide Mass fingerprint” Datenbanksuche bei Einsatz von Enzymen mit geringerer Spezifität als Trypsin**

Björn Meyer, Michael Karas

39. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Mainz, Deutschland, 5. bis 8. März 2006

**New strategies for a „Peptide Mass Fingerprint Database Search using less specific proteolytic enzymes**

Björn Meyer, Bernd Ludwig, Michael Karas

54<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topic, Seattle, Washington, 28. Mai bis 1. Juni 2006

**Peptide mass fingerprints using less specific enzymes: a challenge in proteomics, but a chance for the mass spectrometric analysis of membrane proteins**

Björn Meyer, Bernd Ludwig, Michael Karas

Symposium „Membrane Proteins 2006“ der Sonderforschungsbereiche „Membrane Proteins – Functional Dynamics and Coupling to Cellular Networks“ (SFB 431, Osnabrück), „Molecular Bioenergetics“ (SFB 472, Frankfurt a. M.) und „Functional Membrane Proteomics“ (SFB 628, Frankfurt a. M.), Wiesbaden-Naurod, 11. – 13 Oktober 2006

## Lebenslauf

### *Persönliche Angaben*

- Name: Björn Meyer
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdaten: 05.10.1976 in Hannover
- Eltern: Christian Heinrich Meyer  
Ingrid Meyer, geb. Ahrens

### *Schulbildung*

- 1983 – 1984 Grundschule, Wielenbach/Oberbayern
- 1984 – 1987 Angelina-Egger-Volksschule, Dillingen an der Donau
- 1987 – 1992 Goethe-Schule, Flensburg  
(mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium)
- 1992 – 1996 Gymnasium Weilheim in Oberbayern
- 06/1996 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### *Hochschulbildung*

- 09/1997 – 11/2001 Studium der Pharmazie an der Universität Würzburg
- 12/2002 Approbation zum Apotheker

### *Wissenschaftlicher Werdegang*

- Seit 01/2003 Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt a. M. unter Leitung von Herrn Prof. M. Karas  
Dissertationsthema: Charakterisierung und Identifizierung von Membranproteinen auf der Ebene von Peptiden

***Wehrdienst und Praktika***

- 09/1996 – 06/1997 3./ Gebirgssanitätsregiment 8 in Kempten und 1./ Gebirgsstabs- und Fernmeldelehrbataillon 8 in Murnau
- 11/2001 – 04/2002 Metropolitan Pharmacy, Flughafen München
- 05/2002 – 10/2002 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

***Sprachkenntnisse***

- Englisch

***Hobbies***

- Klavier, Gitarre, Skifahren, Bergwandern

## **Schlussgedanke – 21 Punkte zum wissenschaftlichen Arbeiten**

Die nachfolgenden 21 Aussagen zum wissenschaftlichen Arbeiten sind eine teilweise freie Interpretation von Friedrich Dürrenmatt's 21 Punkten aus seiner Komödie „Die Physiker“. Einzelne Thesen wurden aber auch unverändert übernommen. Ursprünglich wurden diese Thesen von Friedrich Dürrenmatt für den Sammelband „Komödie II“ (Verlag der Arche, Zürich 1962) verfasst.

1

Ich gehe nicht von dem Ziel einer These, sondern von einer Dissertation aus.

2

Geht man von einer Dissertation aus, muss sie zu Ende gedacht werden.

3

Eine Dissertation ist dann zu Ende gedacht, wenn sie eine Wendung genommen hat.

4

Die Wendung ist nicht vorhersehbar. Sie tritt durch Zufall ein.

5

Die Kunst der Wissenschaft besteht darin, den Zufall möglichst wirksam einzusetzen.

6

Träger der Wissenschaft sind Menschen.

7

Der Zufall in der Wissenschaft besteht darin, wann und wo was zufällig erkannt wird.

8

Je planmäßiger Menschen vorgehen, desto wirksamer vermag sie der Zufall zu treffen.

9

Planmäßig vorgehende Menschen wollen ein bestimmtes Ziel erreichen. Der Zufall trifft sie dann am schlimmsten, wenn sie durch ihn das Gegenteil ihres Ziels erreichen: Das, was sie befürchten, was sie zu vermeiden suchten (z.B. Oedipus)

10

Wissenschaft ist zwar grotesk, aber nicht absurd (sinnwidrig).

11

Sie ist paradox.

12

Ebensowenig wie Philosophen können Menschen das Paradoxe vermeiden.

13

Ebensowenig wie Philosophen können Wissenschaftler das Paradoxe vermeiden.

14

Eine Dissertation muss paradox sein.

15

Sie kann nicht Thesen zum Ziel haben, sondern nur ihre Auswirkungen.

16

Die Auswirkungen gehen alle etwas an.

17

Was alle angeht, können nur alle lösen.

18

Jeder Versuch eines Einzelnen, für sich zu lösen, was alle angeht, muss scheitern.

19

Im Paradoxen erscheint die Wirklichkeit.

20

Wer dem Paradoxen gegenübersteht, setzt sich der Wirklichkeit aus.

21

Eine Dissertation kann den Menschen überlisten, sich der Wirklichkeit auszusetzen, aber nicht zwingen, ihr standzuhalten oder sie gar zu bewältigen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Charakterisierung und Identifizierung von Membranproteinen auf der Ebene von Peptiden“ 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 .....

.....

Björn Meyer