

**Analyse des Proteinimports durch die äußere  
mitochondriale Membran von *Saccharomyces  
cerevisiae***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Dr. rer. nat**

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen  
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

**Dipl.-Ing. Sonja Radau**

aus

Lubliniec

**Dortmund 2015**

## Zusammenfassung

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der ATP-Produktion der Zelle. Sie sind essentielle Organellen und gelten als Kraftwerke einer Zelle. Obwohl sie eine eigene DNA besitzen, können nur ca. 1 % aller mitochondrialer Proteine im Mitochondrium selbst synthetisiert werden, alle anderen müssen aus dem Cytosol importiert werden. Ein fehlerhafter Proteinimport kann demnach die Funktionalität von Mitochondrien beeinträchtigen und Auswirkungen auf den Energiehaushalt der Zelle haben. Inzwischen ist vieles über den mitochondrialen Proteinimport bekannt, jedoch ist dessen Dynamik bis heute nicht vollständig entschlüsselt. Erst vor wenigen Jahren beispielsweise konnte gezeigt werden, dass der Proteinimport durch reversible Phosphorylierung der mitochondrialen Importkomplexe reguliert werden kann.

Um den Proteinimport und seine Dynamik besser charakterisieren zu können, wurden in dieser Arbeit LC-MS basierte Methoden etabliert, die es 1.) ermöglichen die Stöchiometrie von Membranproteinkomplexen zu bestimmen und es 2.) erlauben einzelne Proteine auf ihrem Weg vom Cytosol ins Mitochondrium zu verfolgen. Membranproteine sind stark hydrophob und können nur schlecht in Lösung gebracht und verdaut werden. Aus diesem Grund wurde zunächst die Probenvorbereitung bezüglich der Membranproteine optimiert.

Da die reversible Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Regulation des Proteinimports spielt, war die Analyse des mitochondrialen Phosphoproteoms das 3. Ziel dieser Arbeit. Dafür wurden die bereits in der Arbeitsgruppe bestehenden Protokolle zur Anreicherung von Phosphopeptiden mit Titandioxid optimiert. Die Spezifität der Anreicherung konnte von 55 % auf 98 % und die Effizienz von 14 Phosphopeptide/ $\mu\text{g}$  eingesetztes Material auf 28 Phosphopeptide/ $\mu\text{g}$  verbessert werden. Durch die Optimierung war es möglich 487 neue Phosphorylierungsstellen in mitochondrialen Proteinen zu identifizieren, von denen sich über 40 % in der Innen- bzw. Außenmembran befinden. Außerdem wurde die Veränderung des Phosphoproteoms von Mitochondrien in verschiedenen Stadien des Zellzyklus untersucht und 11 Proteine detektiert, die auf Phosphopeptid-Ebene reguliert werden. Diese Proteine sind am Energiehaushalt der Zelle, an der Membranorganisation bzw. dem Proteinimport beteiligt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit die methodische Grundlage dafür geschaffen wurde tiefere Einblicke in den mitochondrialen Proteinimport und die Regulation von Mitochondrien zu erlangen.

### Summary

Mitochondria play a key role in the energy production of a cell. Therefore they are essential organelles and are classified as the power plants of a cell. Although they have their own DNA only 1 % of all mitochondrial proteins are synthesized in mitochondria, 99 % have to be imported from cytosol. An incorrect protein import can affect the functionality of mitochondria and could interfere with the energy balance in the cell. Meanwhile a lot is known about the mitochondrial protein import, however its dynamics is not fully understood until now. Only since some years it is known that protein import is regulated by reversible phosphorylation of mitochondrial import complexes.

To characterize the protein import and its dynamics more in detail LC-MS based methods were established to 1.) determine the stoichiometry of membrane protein complexes and to 2.) follow the imported proteins on their way from the cytosol to mitochondria. Membrane proteins are highly hydrophobic and difficult to solubilize. Consequently the digestion of these proteins is challenging. For this reason first the sample preparation for membrane proteins was optimized.

Since reversible phosphorylation plays an important role in the regulation of the protein import, the 3.) aim of this work was the analysis of the mitochondrial phosphoproteome. Therefore the enrichment protocols (titaniumdioxid) for phosphopeptides were improved. The specificity of the enrichment could be improved from 55 % to 98 % and the performance from 14 phosphopeptides/ $\mu\text{g}$  used material up to 28 phosphopeptides/ $\mu\text{g}$ . With the optimized protocol 487 new mitochondrial phosphosites could be identified. 40 % of these sites are located in the outer and inner mitochondrial membrane. Furthermore the variation of the phosphoproteome in different stages of the cell cycle was analyzed. In this measurements 11 different proteins could be detected which were regulated at phosphopeptide level. These proteins take part in the energy production of the cell, the membrane organization and the protein import respectively.

Summing up, this thesis shows basic methodic concepts to gain deeper insight the mitochondrial protein import and the regulation of mitochondria.

# Inhaltsverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Zusammenfassung .....  | i   |
| Summary .....  | ii  |
| Inhaltsverzeichnis .....   | iii |
| I Abkürzungsverzeichnis .....  | vi  |
| II Aminosäuren .....   | vii |
| III Veröffentlichungen .....   | ix  |
| IV Vorträge und Poster .....   | x   |
| 1 Einleitung .....   | 1   |
| 1.1 Das Proteom .....  | 1   |
| 1.2 Phosphorylierung von Proteinen .....                               | 1   |
| 1.3 Mitochondrien .....  | 3   |
| 1.3.1 Aufbau und Funktion .....  | 3   |
| 1.3.2 Protein-Import .....   | 5   |
| 1.3.3 Phosphorylierung von Proteinen in Mitochondrien .....            | 10  |
| 1.4 Der Zellzyklus der Hefe .....                                      | 12  |
| 2 Zielsetzung .....  | 14  |
| 3 Technische Grundlagen .....  | 15  |
| 3.1 Probenvorbereitung .....   | 15  |
| 3.2 Flüssigchromatographie .....                                       | 17  |
| 3.3 Massenspektrometrie .....  | 20  |
| 3.3.1 Fragmentierung von Peptiden .....                                | 20  |
| 3.4 Anreicherung und Fraktionierung phosphorylierter Peptide .....     | 24  |
| 3.4.1 Kationenaustauscher .....  | 24  |
| 3.4.2 HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) .....      | 25  |
| 3.4.3 IMAC (Immobilisierte Metalionen Affinitätschromatographie) ..... | 25  |
| 3.4.4 Anreicherung mit Titandioxid .....                               | 26  |
| 3.5 Quantitative Proteomforschung .....                                | 27  |
| 3.5.1 Chemische Markierung zur Quantifizierung mittels LC-MS .....     | 27  |
| 3.5.2 Metabolische Markierung zur Quantifizierung mittels LC-MS .....  | 29  |
| 3.5.3 Labelfreie Quantifizierung mittels LC-MS .....                   | 30  |
| 3.6 Datenauswertung .....  | 31  |
| 4 Material und Methoden .....  | 33  |

# Inhaltsverzeichnis

---

|  |     |
|--|-----|
| 4.1 Materialien.....   | 33  |
| 4.2 Methoden.....  | 36  |
| 4.2.1 Aufreinigung von Mitochondrien aus <i>S.cerevisiae</i> .....                 | 36  |
| 4.2.2 Probenvorbereitung .....   | 36  |
| 4.2.3 Anreicherungsverfahren.....  | 40  |
| 4.2.4 Entsalzen mittels Festphasenextraktion.....                                  | 45  |
| 4.2.5 Quantitative Ansätze .....   | 46  |
| 4.2.6 Herstellung eines realistischen Phosphopeptidstandards .....                 | 47  |
| 4.2.7 LC-MS Methoden.....  | 49  |
| 4.2.8 Datenbanksuchen.....   | 49  |
| 5. Ergebnisse .....  | 51  |
| 5.1 Optimierung des Verdaus .....  | 51  |
| 5.2 Optimierung der Titandioxid-Anreicherung.....                                  | 55  |
| 5.2.1 Aufbau und Optimierung des HILIC-Systems .....                               | 60  |
| 5.2.2 Weitere Experimente zur Validierung der Phosphopeptid-Anreicherung.....      | 63  |
| 5.3 Anreicherung mitochondrialer Phosphopeptide .....                              | 66  |
| 5.4 Phosphopeptidstandard.....   | 67  |
| 5.5 Tom40 Import.....  | 72  |
| 5.6 Quantifizierung des Tim22-Komplexes .....                                      | 77  |
| 5.7 Das mitochondriale Phosphoproteom in verschiedenen Stadien des Zellzyklus..... | 82  |
| 5.8 Phosphoproteom-Analyse von aktivierten Tabakpollen.....                        | 88  |
| 6 Diskussion .....   | 90  |
| 6.1 Optimierung der Probenvorbereitung.....  | 90  |
| 6.2 Optimierung der Anreicherung phosphorylierter Peptiden .....                   | 92  |
| 6.3 Phosphopeptid-Anreicherung von Mitochondrien .....                             | 94  |
| 6.4 Ein realistischer Phosphopeptidstandard .....                                  | 96  |
| 6.5 Analyse des Imports von Tom40 in Hefe Mitochondrien .....                      | 100 |
| 6.6 Analyse der Stöchiometrie des Tim22 Komplexes .....                            | 103 |
| 6.7 Zellzyklus .....   | 105 |
| 6.8 Phosphoproteom-Analyse von aktivierten Tabakpollen.....                        | 110 |
| 7 Fazit und Ausblick.....  | 112 |
| Referenzen.....  | 113 |
| Danksagung .....   | I   |
| Lebenslauf .....   | II  |

# Inhaltsverzeichnis

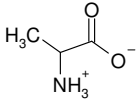
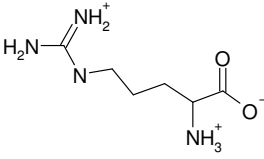
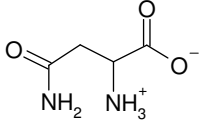
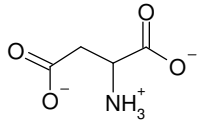
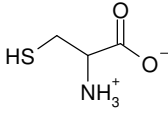
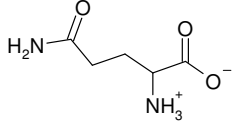
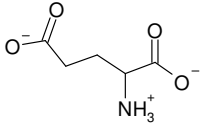
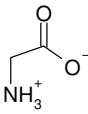
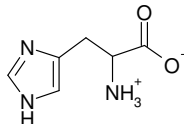
---

|  |      |
|--|------|
| Erklärung.....   | III  |
| Anhang .....   | IV   |
| A1: Protokoll PolyMac Enrichment Kit .....                     | IV   |
| A2: QC-Mix Zusammensetzung.....                                | V    |
| A3: Zusammensetzung des Phosphopeptid Standards .....          | VI   |
| A4:Identifizierte mitochondriale Phosphorylierungstellen ..... | XXII |

## I Abkürzungsverzeichnis

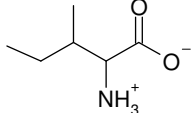
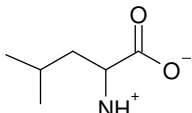
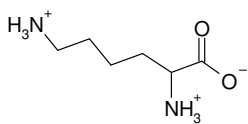
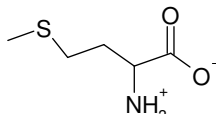
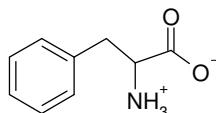
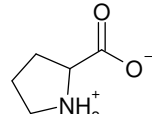
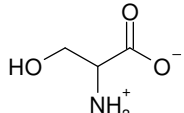
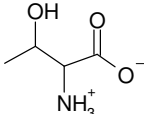
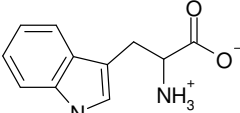
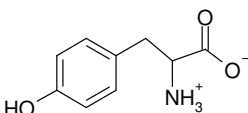
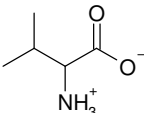
| Abkürzung |  |
|-----------|--|
| ABC       | Ammoniumbicarbonat                                     |
| ATP       | Adenosintriphosphat                                    |
| BCA       | Bicinchoninsäure                                       |
| BSA       | Rinderserumalbumin                                     |
| CID       | Collision-induced dissociation                         |
| CK2       | Casein Kinase 2  |
| Da        | Dalton   |
| DNA       | Desoxyribonukleinsäure                                 |
| DTT       | Dithiothreitol   |
| ER        | Endoplasmatisches Retikulum                            |
| ESI       | Elektrospray-Ionisation                                |
| FA        | Ameisensäure   |
| FASP      | Filter Aided Sample Preparation                        |
| Gu-HCl    | Guanidiniumhydrochlorid                                |
| HCD       | High Collision Dissociation                            |
| HPLC      | High Performance Liquid Chromatography                 |
| IAA       | Iodacedamid  |
| IM        | Innere Membran   |
| IMR       | Intermembranraum                                       |
| iTRAQ     | Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation   |
| LC        | Liquid Chromatography                                  |
| Mdm       | Mitochondrial distribution and morphology              |
| MeCN      | Acetonitril  |
| MeOH      | Methanol   |
| MS        | Massenspektrometrie                                    |
| OM        | Äußere Membran   |
| Pam       | Presequence-associated motor                           |
| PKA       | Protein Kinase A                                       |
| PTM       | Posttranslationale Modifikationen                      |
| Sam       | Sorting and assembly machinery                         |
| SCX       | Strong Cation Exchange                                 |
| SDS       | Natriumdodecylsulfat                                   |
| SILAC     | Stable isotope labeling by amino acids in cell culture |
| TFA       | Trifluoressigsäure                                     |
| TFE       | Trifluorethanol  |
| Tim       | Translocase of inner mitochondrial membrane            |
| Tom       | Translocase of outer mitochondrial membrane            |

## II Aminosäuren

| Name           | Buchstabencodes | Strukturformel   | Monoisotopische Masse (-H <sub>2</sub> O) / Da |
|----------------|-----------------|--|--|
| Alanin         | Ala, A          |    | 71,03711                                       |
| Arginin        | Arg, R          |    | 156,10111                                      |
| Asparagin      | Asn, N          |    | 114,04293                                      |
| Asparaginsäure | Asp, D          |   | 115,02694                                      |
| Cystein        | Cys, C          |  | 103,00919                                      |
| Glutamin       | Gln, Q          |  | 128,05858                                      |
| Glutaminsäure  | Gln, E          |  | 129,04259                                      |
| Glycin         | Gly, G          |  | 57,02146                                       |
| Histidin       | His, H          |  | 137,05891                                      |



## II Aminosäuren

|              |        |  |           |
|--------------|--------|--|-----------|
| Isoleucin    | Ile, I |    | 113,08406 |
| Leucin       | Leu, L |    | 113,08406 |
| Lysin        | Lys, K |    | 128,09496 |
| Methionin    | Met, M |    | 131,04049 |
| Phenylalanin | Phe, F |    | 147,06841 |
| Prolin       | Pro, P |  | 97,05276  |
| Serin        | Ser, S |  | 87,03203  |
| Threonin     | Thr, T |  | 101,04768 |
| Tryptophan   | Trp, W |  | 186,07931 |
| Tyrosin      | Tyr, Y |  | 163,06333 |
| Valin        | Val, V |  | 99,06841  |

## III Veröffentlichungen

**Radau S**, Dickhut C, Zahedi RP: *Fast, efficient and quality controlled phosphopeptide enrichment from minute sample amounts using titanium dioxide*, *Methods in Molecular Biology*, 2014

Radestock B, Morales I, **Radau S**, Zahedi RP, Müller B, Kräusslich HG.: *Comprehensive mutational analysis reveals p6Gag phosphorylation to be dispensable for HIV-1 morphogenesis and replication*. *J Virol*. 2013 Jan;87(2):724-34

Fíla J, Matros A, **Radau S**, Zahedi RP, Capková V, Mock HP, Honys D.: *Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated in vitro*. *Proteomics* 2012 Nov;12(21):3229-50

Vaudel M, Burkhardt JM, **Radau S**, Zahedi RP, Martens L, Sickmann A.: *Integral quantification accuracy estimation for reporter ion-based quantitative proteomics (iQuARI)*. *J Proteome Res*. 2012 Oct 5;11(10):5072-80

Burkhardt JM, Vaudel M, Gambaryan S, **Radau S**, Sickmann A, Zahedi RP: *The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways*. *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):e73-82

## IV Vorträge und Poster

Vorträge: **Proteomic Forum 2013, Berlin**

„A novel phosphopeptide standard to evaluate data interpretation in a realistic phosphoproteomic environment“

**Summer School 2012, Dortmund**

“Import of Tom 40 into the outer mitochondrial membrane”

**GBM 2011, Frankfurt**

“Developing novel methods for systems biology of membrane protein complexes”

Poster: **bio.Dortmund 2013, Dortmund**

“Strategies for analyzing the protein import of mitochondria”

**DGMS 2011, Dortmund**

“Developing novel methods for systems biology of membrane protein complexes”

**Proteomic Forum 2011, Berlin**

“Developing novel methods for systems biology of membrane protein complexes”

**GBM 2011, Frankfurt**

Developing novel methods for systems biology of membrane protein complexes”

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Proteom

In Anlehnung an den Begriff „Genom“ (Gesamtheit der Erbinformation einer Zelle) führte der Australier Marc Wilkinis im Jahr 1995 den Begriff „Proteom“ ein [1]. Während das Genom quasi statisch ist und zu jeder Zeit isoliert und analysiert werden kann, ist das Proteom, also die Gesamtheit aller exprimierten Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus unter definierten Bedingungen, dynamisch. Die Expression eines Proteins kann von vielen internen und externen Faktoren, wie z.B. dem Stoffwechsel, dem Zellzyklus, Umweltbedingungen oder auch verabreichten Medikamenten, verändert werden. Das Proteom zeigt somit eine Momentaufnahme der Proteine zu einer bestimmten Zeit und unter bestimmten Bedingungen. Eine Herausforderung bei der Analyse des Proteoms ist der dynamische Bereich von Proteinen in einer Zelle oder einem Gewebe. Während beispielsweise Strukturproteine hochabundant sind und in mehreren Millionen Kopien in einer Zelle vorkommen, können Rezeptorproteine in nur einigen wenigen Kopien vorhanden sein. Der dynamische Bereich humaner Zellen liegt beispielsweise bei sechs bis sieben Größenordnungen [2]. Die Methode der Wahl zur qualitativen und quantitativen Untersuchung des Proteoms ist heutzutage die Massenspektrometrie auf die in Kapitel 3.3 näher eingegangen wird.

## 1.2 Phosphorylierung von Proteinen

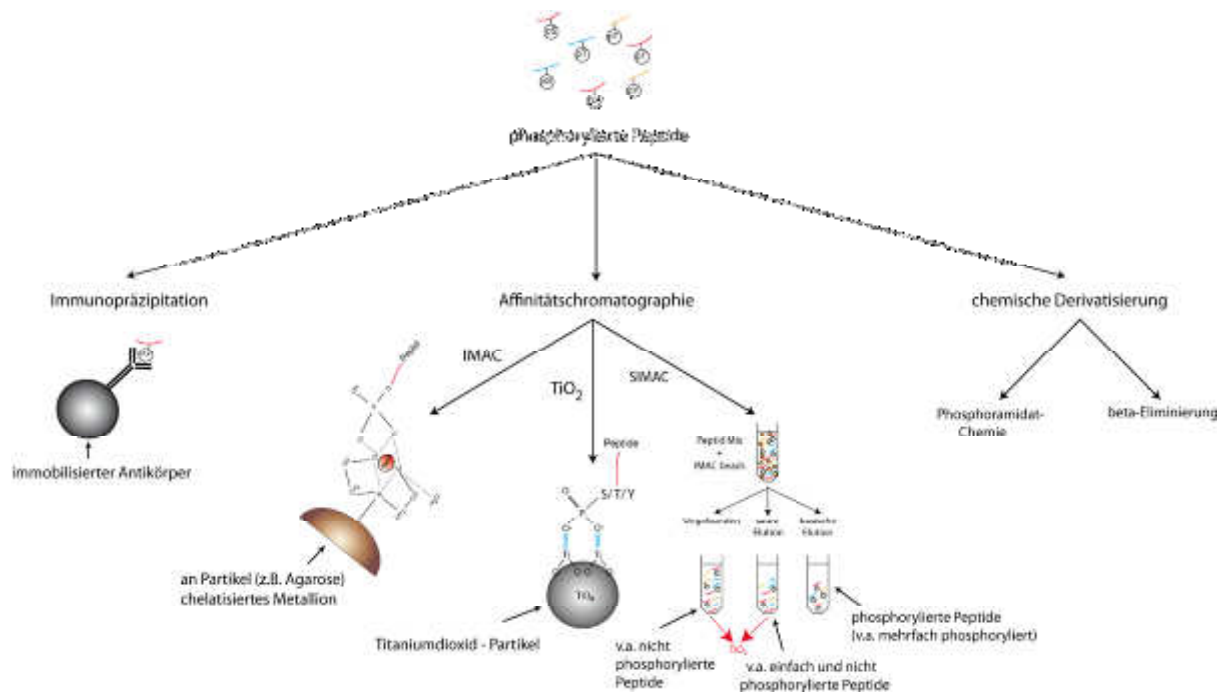
Nach der Translation können Proteine auf unterschiedliche Weise in der Zelle modifiziert werden (z.B.: Glycosylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung). Eine wichtige posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die reversible Phosphorylierung, die für die Regulierung zahlreicher zellulärer Prozesse von großer Bedeutung ist. Durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Aminosäuren können die Bindungseigenschaften, die katalytische Aktivität und die Konformation eines Proteins verändert werden, was wiederum Auswirkungen auf Prozesse, wie den Zellzyklus, die Signalübertragung oder den Metabolismus haben kann [3]. Kinasen katalysieren in der Zelle die Bindung einer Phosphatgruppe an das Protein, Phosphatasen hingegen katalysieren die Dephosphorylierung. Oft können ganze Kaskaden von Kinasen und Phosphatasen an der Regulierung von zellulären Prozessen beteiligt sein. Dies macht die reversible Phosphorylierung zu einem schnellen und präzisen Regulationsmechanismus.

Heutzutage werden vier verschiedene Arten der Phosphorylierung von Proteinen unterschieden. Die am besten untersuchte Art ist die O-Phosphorylierung, bei der Phosphatgruppen über eine Phosphoesterbindung an die Hydroxylreste von Serin, Threonin und Tyrosin gebunden werden. Das Verhältnis dieser phosphorylierten Aminosäuren liegt in einer eukaryotischen Zelle bei ca. 1800:200:1 (pSer:pThr:pTyr) [4], [5]. Neben der O-Phosphorylierung sind noch die N- (an Amidgruppe von Arginin, Lysin und Histidin), die S- (an Thiolgruppen von Cystein) und die Acylphosphorylierung (Phosphoanhydride mit Aspartat und Glutamat) bekannt [6]. Auf Grund der zahlreichen zellulären Prozesse, die mit Hilfe der reversiblen Phosphorylierung reguliert werden, und den daraus resultierenden Krankheiten bei fehlerhafter Phosphorylierung, ist die Analyse phosphorylierter Proteine in der Bioanalytik und der Medizin von enormer Wichtigkeit.

### **Phosphoproteom-Analyse**

Zu Beginn der Analyse phosphorylierter Proteine wurde der Edman-Abbau verwendet [7], [8]. Der Edman-Abbau wurde 1949 von Pehr Edman entwickelt und dient dazu die Aminosäuresequenz von Proteinen zu bestimmen. Dabei werden nacheinander die N-terminalen Aminosäuren eines Proteins abgespalten, mit Phenylisothiocyanat (Edman-Reagenz) umgesetzt und anschließend chromatographisch identifiziert. Diese Methode hat jedoch zwei entscheidende Nachteile: Die Analyse eines einzelnen Proteins kann, je nach Sequenz, mehrere Tage dauern, was diesen Ansatz sehr langwierig macht. Außerdem hat die Methode eine geringe Sensitivität, sodass pro Analyse 10-100 pmol Startmaterial benötigt werden. Im Laufe der Zeit hat sich die Massenspektrometrie als eine sensitive Methode zur Phosphoprotein-Analytik herauskristallisiert. Mit Hilfe der Massenspektrometrie ist es möglich, in kurzer Zeit aus einer komplexen Probe mehrere hundert bis tausend phosphorylierte Peptide zu identifizieren und quantifizieren. Als weiterer Vorteil kommt die hohe Sensitivität dazu, die im Gegensatz zum Edman-Abbau, im amol Bereich liegt [9]. Ein großes Problem bei der Phosphoproteom-Analyse ist jedoch, dass phosphorylierte Proteine/Peptide substöchiometrisch vorhanden sind. Das bedeutet, dass in einer komplexen Probe nach dem proteolytischen Verdau ein starker Hintergrund 100.000er nicht phosphorylierter Peptide und nur ein geringer Anteil phosphorylierter Peptide zu finden ist. Durch diesen starken Hintergrund werden die Signale der phosphorylierten Peptide unterdrückt und ihre Analyse entscheidend erschwert. Aus diesem Grund ist eine Anreicherung phosphorylierter Peptide, also die Isolierung dieser Peptide von dem störenden Hintergrund, vor der massenspektrometrischen Messung wichtig. Es gibt diverse Anreicherungsverfahren, die in der Literatur zu finden sind [10]. Eine Zusammenfassung einiger

Techniken ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine Methode, die sich zur Anreicherung phosphorylierter Peptide aus komplexen Proben am meisten etabliert hat, ist die Affinitätschromatographie mit Titandioxid. Auf diese Technik wird in Kapitel 3.4.4 näher eingegangen.



**Abbildung 1: Überblick verschiedener Techniken, die zur Anreicherung von phosphorylierten Proteinen und Peptiden genutzt werden können. Dazu gehören u.a. die Immunopräzipitation, die Affinitätschromatographie und die chemische Derivatisierung; (modifiziert nach Eyrich *et al.* [10])**

## 1.3 Mitochondrien

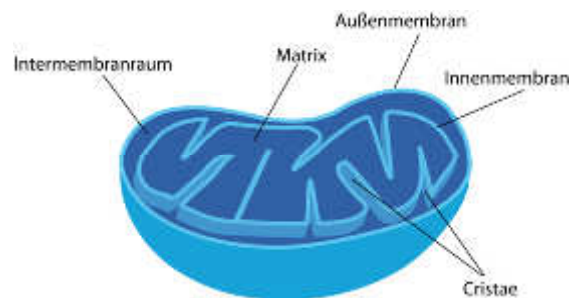
### 1.3.1 Aufbau und Funktion

Mitochondrien sind kleine Organellen mit einem Durchmesser von 0,5-1  $\mu\text{m}$ , die in eukaryontischen Zellen zu finden sind. Sie gelten als Kraftwerke der Zellen, da sie eine zentrale Rolle in der ATP-Produktion spielen. In ihnen laufen wichtige Stoffwechselprozesse, wie der Citratzyklus und die Fettsäure-Oxidation ( $\beta$ -Oxidation) ab. Zusätzlich sind sie auch an der Synthese von zahlreichen Metaboliten, wie Aminosäuren und Steroiden, beteiligt. Mitochondrien setzen sich aus vier verschiedenen Kompartimenten zusammen: der Außenmembran, dem Intermembranraum, der Innenmembran und der Matrix (s. Abbildung 2). Sowohl die äußere, als auch die innere Membran bestehen aus einer Phospholipid- Doppelschicht, haben jedoch unterschiedliche Eigenschaften. Die Außenmembran beinhaltet Kanalproteine (Porine) und ist

## Einleitung

---

für Substanzen bis etwa 1000 Da permeabel [11]. Außerdem dient sie dem Schutz der Mitochondrien. Die Innenmembran hingegen ist nicht permeabel. Sie enthält die Enzyme der Atmungskette. Durch Einstülpungen, den sogenannten Cristae, wird die reaktive Oberfläche der Membran stark vergrößert. In der mitochondrialen Matrix sind die Enzyme des Citratzyklus und der  $\beta$ -Oxidation zu finden [12].



**Abbildung 2: Aufbau von Mitochondrien: Mitochondrien bestehen aus vier verschiedenen Kompartimenten: der Außenmembran, dem Intermembranraum, der Matrix und der Innenmembran, welche zur Oberflächenvergrößerung eingestülpt ist und sogenannte Cristae bildet.**

Der Ursprung von Mitochondrien liegt ca. 1,5-2 Milliarden Jahre zurück und geht auf die Endosymbionten-Theorie zurück [13], [14]. Danach entwickelten sich Mitochondrien und Chloroplasten in frühen Eukaryoten durch die Endocytose von prokaryotischen Zellen. Gestützt wird die Hypothese unter anderem dadurch, dass Mitochondrien eine eigene zirkuläre DNA (mtDNA), ähnlich der von Bakterien, und eine eigene Proteinbiosynthesemaschinerie besitzen. Hefe-Mitochondrien bestehen aus etwa 1000 verschiedenen Proteinen [15]. Obwohl Mitochondrien eine eigene DNA besitzen, werden nur 8 der Proteine (ca. 1 %) in Mitochondrien synthetisiert (Untereinheiten der Atmungskette und der  $F_1F_0$ -ATPase) [16], [17]. 99% der Proteine werden dagegen im Cytosol synthetisiert und müssen anschließend in die Mitochondrien importiert werden. Die verschiedenen Proteinimport-Wege werden im nachfolgenden Kapitel näher erläutert.

Da Mitochondrien an diversen zellulären Prozessen, wie der ATP-Gewinnung, der Apoptose und der Synthese verschiedener Aminosäuren, Steroiden und Metaboliten, beteiligt sind, sind sie enorm wichtig für die korrekte Funktionalität einer Zelle. Sowohl Fehler beim Import und anschließendem Prozessieren cytosolischer Proteine in Mitochondrien, als auch Mutationen der mitochondrialen DNA stehen somit in Zusammenhang mit diversen Krankheiten, wie z.B. Alzheimer, Huntington oder Parkinson [18], [19].

### **1.3.2 Protein-Import**

Proteine, welche nicht im Mitochondrium synthetisiert werden können, werden im Cytosol als Vorstufenproteine hergestellt, mit Hilfe verschiedener mitochondrialer Komplexe in die entsprechenden Kompartimente der Mitochondrien transportiert und anschließend dort prozessiert. Zu den mitochondrialen Importkomplexen zählen der Tom- (Translocase of the outer membrane) und der Sam- (sorting and assembly machinery) Komplex in der äußeren mitochondrialen Membran und der Tim- (Translocase of the inner membrane) Komplex in der inneren Membran. Die Vorstufenproteine können in zwei Klassen gegliedert werden [20]: Zur ersten Klasse gehören Proteine, welche N-terminale Import-Signale nutzen (Matrix-Proteine, einige Proteine der inneren Membran und des Intermembranraumes). Diese sogenannten Präsequenzen sind positiv geladen und bestehen in der Regel aus 15-55 Aminosäuren [21], [22]. Mit Hilfe von Import-Signalen können die Vorstufenproteine von den mitochondrialen Komplexen erkannt und zum jeweiligen Bestimmungsort transportiert werden. Nach dem Import wird die Präsequenz proteolytisch abgespalten. Etwa 70 % aller mitochondrialen Vorstufenproteine besitzen solche Präsequenzen [21]. Zur zweiten Klasse werden Proteine gezählt, die interne Import-Signale besitzen. Dazu gehören alle Außenmembran-Proteine und einige Proteine des Intermembranraumes.

#### **Der Tom - Komplex**

Der Tom-Komplex setzt sich aus sieben verschiedenen Untereinheiten zusammen (siehe Abb. 3) und dient dem Import von Vorstufen-Proteinen aus dem Cytosol durch die äußere mitochondriale Membran. Tom40 bildet die Pore, durch die Proteine durch die Außenmembran geschleust werden [23]. Tom20 dient als Rezeptor für Präsequenzen. Er bindet Proteine, die Präsequenzen besitzen, an der cytosolischen Seite der Mitochondrien und leitet diese zu Tom40 weiter [24]. Tom70 und Tom71 sind Rezeptoren für Proteine mit unterschiedlichen internen Import-Signalen [25]. Tom6 und Tom7 stabilisieren den Komplex und spielen zudem eine Rolle beim dynamischen Auf- und Abbau des Komplexes [26].





### 1. Mia-Importweg

Proteine des Intermembranraumes, wie z.B. Tim9 und Tim10, besitzen cystein-haltige Bereiche und werden über den Mia-Transportweg importiert. Nach dem Import aus dem Cytosol über den Tom-Komplex binden die Proteine an das Protein Mia40, welches sich im Intermembranraum befindet. Anschließend katalysiert Mia40 die Bildung von Disulfidbrücken im Inneren des importierten Proteins, setzt dieses in den Intermembranraum frei und wird selbst reduziert. Die Oxidase Erv1 ist anschließend in der Lage Mia40 zu oxidieren und für den Import weiterer Proteine vorzubereiten. Die Oxidation der Proteine und Mia40 ist mit der Atmungskette gekoppelt. Elektronen werden beim Import der Proteine über Mia40 und Erv1 an Cytochrom C und somit die Atmungskette weitergegeben [27], [28].

### 2. Import von Vorstufenproteinen mit Präsequenzen - Tim23-Komplex

Vorstufenproteine, die Präsequenzen besitzen, werden nach dem Import durch die äußere mitochondriale Membran an Tom22 gebunden. Anschließend werden sie weiter zum Tim23-Komplex geleitet, der sie sowohl in die innere Membran (Tim23<sup>SORT</sup>) einbauen, als auch zur Matrix durchschleusen kann (Tim23<sup>MOTOR</sup>). Dieser Komplex setzt sich aus mehreren Proteinen zusammen (Tim23, 17, 50, 21). Tim23 bildet den Kanal, durch den Proteine durch die Membran geleitet werden können. Während der ATP-Gewinnung in der Atmungskette werden Protonen aus der Matrix in den IMR gepumpt. Dadurch wird ein Protonen- und Spannungsgradient gebildet, der als Membranpotential  $\Delta\psi$  bezeichnet wird. Durch dieses Membranpotential wird Tim23 aktiviert. Tim17 stabilisiert den Komplex und ist mit für die Regulation des Komplexes verantwortlich [29]. Tim50 erkennt die Präsequenzen der Vorläuferproteine und transportiert diese zum Importkanal. Außerdem verschließt es den Kanal solange bis Präsequenzen erkannt werden und ein bestimmtes Membranpotential erreicht worden ist [30], [31], [32], [33].

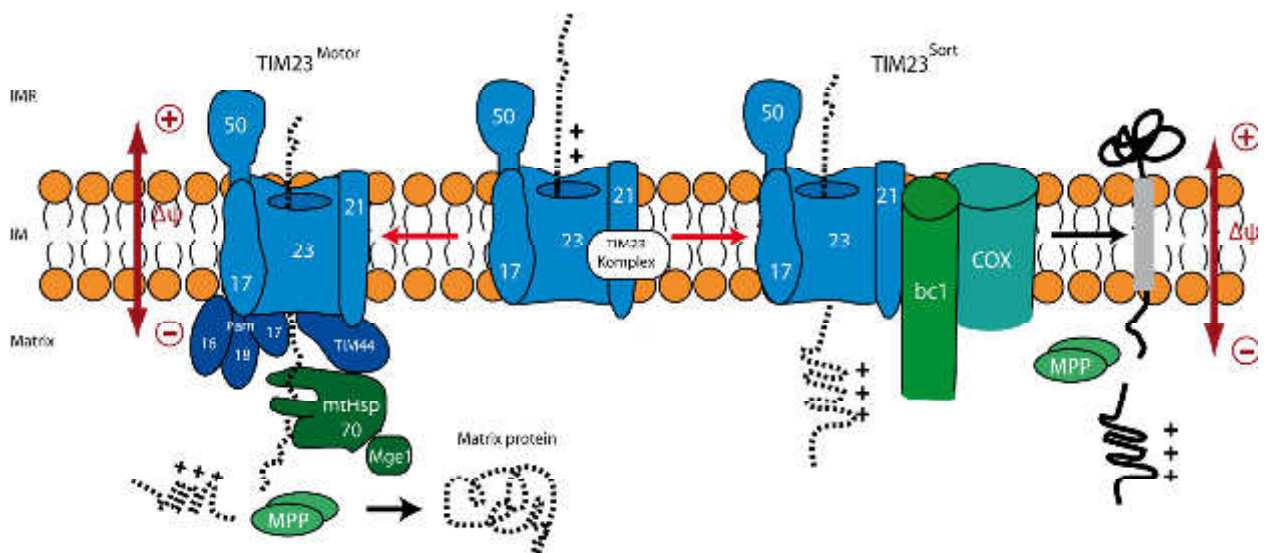
Proteine der inneren Membran enthalten hydrophobe Stop-Signale in der Präsequenz und werden dadurch in die innere Membran geleitet. Unterstützt werden sie dabei durch die Bindung der Cytochrom-C-Oxidase und des bc1-Komplexes der Atmungskette an den Tim23 Komplex (Tim23<sup>SORT</sup>). Nach dem Import werden die Präsequenzen von der MPP (mitochondrial processing peptidase) entfernt [34], [35], [36].

Anders als beim Import von Proteinen der inneren Membran, wird für den Import von Matrix-Proteinen, neben dem Membranpotential, der ATP gesteuerte presequence-associated motor

## Einleitung

(Pam) benötigt, der an den Tim23 Komplex bindet ( $\text{Tim23}^{\text{MOTOR}}$ ). Hauptbestandteil dieses Motors ist mtHsp70. Die ATP gebundene Form von mtHsp70 kann schwache Bindungen mit Präsequenzen der Vorläuferproteine eingehen. Die Hydrolyse von ATP zu ADP bewirkt, dass die Bindung der Präsequenz verstärkt und das Vorläuferprotein durch den Importkanal geschleust wird. Das Matrix-Protein Mge1 bewirkt die Abspaltung des ADP, so dass im nächsten Schritt neues ATP an mtHsp70 gebunden werden kann. Auch hier schneidet MPP, nach dem vollständigen Import der Proteine, die Präsequenz. Anschließend werden die Proteine durch die Chaperone Hsp60 und Hsp10 gefaltet [37], [38], [39], [40].

Der Tim23 Komplex ist somit nicht statisch, sondern besitzt zwei verschiedenen Varianten, welche je nach Bedarf aktiviert werden können.



**Abbildung 4:** Die zwei Konformationen des Tim23 Komplexes: Tim23 importiert Vorläuferproteine, die Präsequenzen besitzen. Proteine der inneren Membran benötigen ein bestimmtes Membranpotential, um durch den Tim23 Komplex transportiert werden zu können. Unterstützt wird der Import durch die Bindung des Tim23 Komplexes ( $\text{Tim23}^{\text{SORT}}$ ) an bc1 und COX der Atmungskette. Für den Import von Matrix-Proteinen benötigt Tim23 ( $\text{Tim23}^{\text{Motor}}$ ) neben dem Membranpotential, den ATP gesteuerten, sogenannten Pam-Motor. Je nach Bedarf kann zwischen  $\text{Tim23}^{\text{SORT}}$  und  $\text{Tim23}^{\text{Motor}}$  geschaltet werden.

### 3. Tim22-Komplex

Eine weiterer Komponente der inneren Membran (IM) ist der Tim22-Komplex. Er setzt sich aus vier verschiedenen Bestandteilen zusammen: Tim22, Tim18, Tim54 und den Tim9/10/12 Chaperon. Die meisten Vorläuferproteine der IM ohne Präsequenz werden durch diesen Tim-

Komplex importiert. Dazu gehören Carrier-Proteine, wie der ADP/ATP - carrier (AAC) und der Phosphat-carrier (PiC). Nach dem Einschleusen der Proteine durch Tom40 in den IMR, binden sie an einen Komplex aus Tim9 und Tim10, der sie weiter zum Tim22-Komplex transportiert und gleichzeitig eine Aggregation im IMR verhindert. Anschließend werden die importierten Proteine in die IM freigesetzt. Zum Import von Proteinen benötigt Tim22 nur das Membranpotential  $\Delta\psi$  [41], [42].

#### **4. Import von $\beta$ -Faltblatt-Proteinen – Sam-Komplex**

$\beta$ -Faltblatt-Proteine sind Proteine der äußeren mitochondrialen Membran (OM), deren Vorläufer keine Präsequenz besitzen. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Porin, Sam50 und Mdm10 (mitochondrial distribution and morphology). Nach dem Import durch den Tom-Komplex in den IMR, binden die importierten Proteine an einen Komplex aus Tim9 und Tim10 und werden anschließend zum Sam-Komplex transportiert. Dieser setzt sich aus den Untereinheiten Sam35, Sam37 und Sam50 zusammen. Sam35 bindet die ankommenden Vorläuferproteine. Sam50 unterstützt sowohl die Faltung der importierten Proteine, als auch, zusammen mit Sam37, ihre Freisetzung in die Lipiddoppelschicht der OM [43], [44]. Ein weiterer Vertreter der Gruppe der  $\beta$ -Faltblatt-Proteine ist Tom40, die zentrale Importpore der Mitochondrien. Der Import dieses Proteins weist eine Besonderheit auf. Es zeigte sich, dass Sam-Komplexe, die zum Import von Tom40 Vorläufer-Proteinen verwendet werden, mit Mdm10 eine vierte Untereinheit aufweisen. Mdm10 unterstützt die Verknüpfung von Tom40 mit  $\alpha$ -helicalen Tom-Proteinen, wie Tom22, und somit den Einbau in einen neuen intakten Tom-Komplex [45], [46]. Durch eine Verknüpfung des Sam-Komplexes mit dem Protein Mim1 wird Tom40 außerdem mit Tom20 und Tom70 verankert [47]. Neben dem Sam-Komplex konnte Mdm10 zusätzlich in einem weiteren Komplex der äußeren mitochondrialen Membran, dem Mdm-Komplex, identifiziert werden. Weitere Komponenten des Mdm-Komplexes sind Mdm34, Mdm12 und Mmm1 (maintenance of mitochondrial morphology). Mmm1 ist außerdem mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulum (ER) in der Zelle verbunden. Diese Verknüpfung von Mitochondrien und ER wird ER-mitochondrion encounter structure (ERMES) genannt [48]. Die Funktion dieser Verbindung ist weitgehend unbekannt. Er wird vermutet, dass ERMES wichtig für den Transfer von Lipiden und  $\text{Ca}^{2+}$  zwischen diesen beiden Organellen ist.

## 5. Import von $\alpha$ -helicalen Proteinen

Neben den  $\beta$ -Faltblatt-Proteinen, sind in der OM  $\alpha$ -helicale Protein zu finden, die je nach Lokalisation ihrer Transmembranabschnitte in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden können (siehe Abbildung 5): Proteine mit N-terminalen, mit internen und mit C-terminalen Transmembranabschnitten. Zu den N-terminalen Proteinen gehören Proteine, wie Tom20 und Tom70. Sie werden durch Mim1 importiert und in die äußere mitochondriale Membran geschleust [49], [50]. Im Gegensatz dazu nutzen Proteine mit internen Transmembranabschnitten, wie Tom22, Tom-Rezeptoren, um an Mitochondrien zu binden und werden anschließend über den Sam-Komplex in die Außenmembran integriert [51]. Der Import-Mechanismus von Proteinen mit C-terminalen Transmembranabschnitten ist bis heute unbekannt [52].

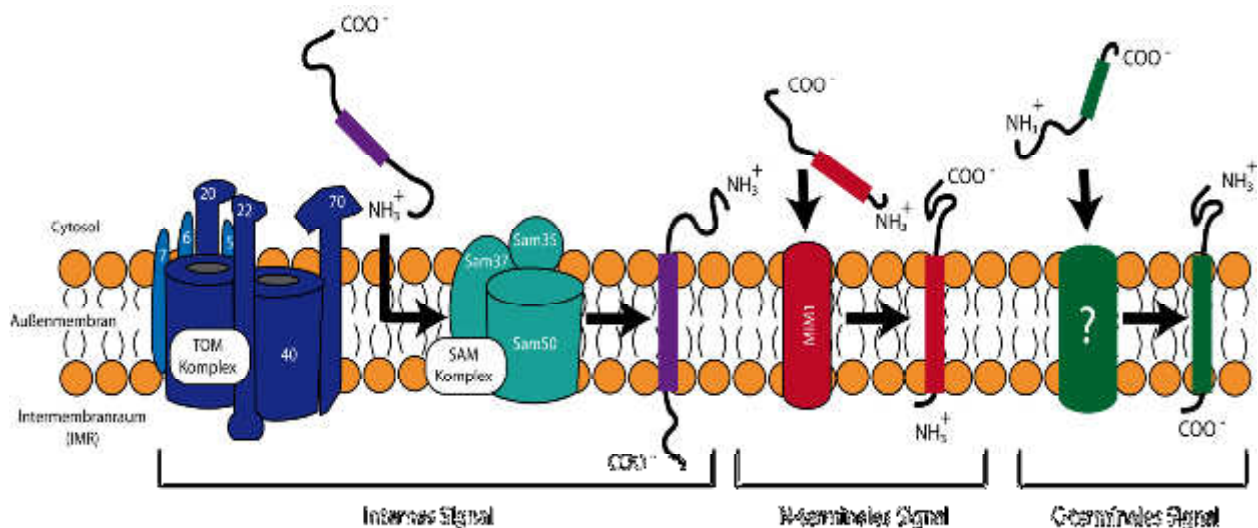


Abbildung 5: Import  $\alpha$ -helicaler Proteine in Mitochondrien; Proteine mit internem Signal werden von Tom-Rezeptoren erkannt und über den Sam-Komplex importiert; Proteine mit N-terminalen Signalen werden über Mim1 importiert; Der Importmechanismus von C-terminalen Proteinen ist weitgehend unbekannt.

### 1.3.3 Phosphorylierung von Proteinen in Mitochondrien

Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass die Phosphorylierung von Proteinen keine Rolle in Mitochondrien einnimmt. Im Jahr 2007 konnten jedoch Reinders *et al.* [53] 80 verschiedene Phosphorylierungsstellen in 48 mitochondrialen Proteinen identifizieren. 2011 konnten Schmidt *et al.* [54] erstmals bestätigen, dass die reversible Phosphorylierung sogar beim Import von

Proteinen in Mitochondrien eine regulatorische Rolle spielt. Es zeigte sich, dass die Kinasen CK2 (Casein Kinase 2) und PKA (Protein Kinase A) in der Lage dazu sind, Tom Proteine sequenzspezifisch zu phosphorylieren und somit den Proteinimport zu regulieren [55], [56].

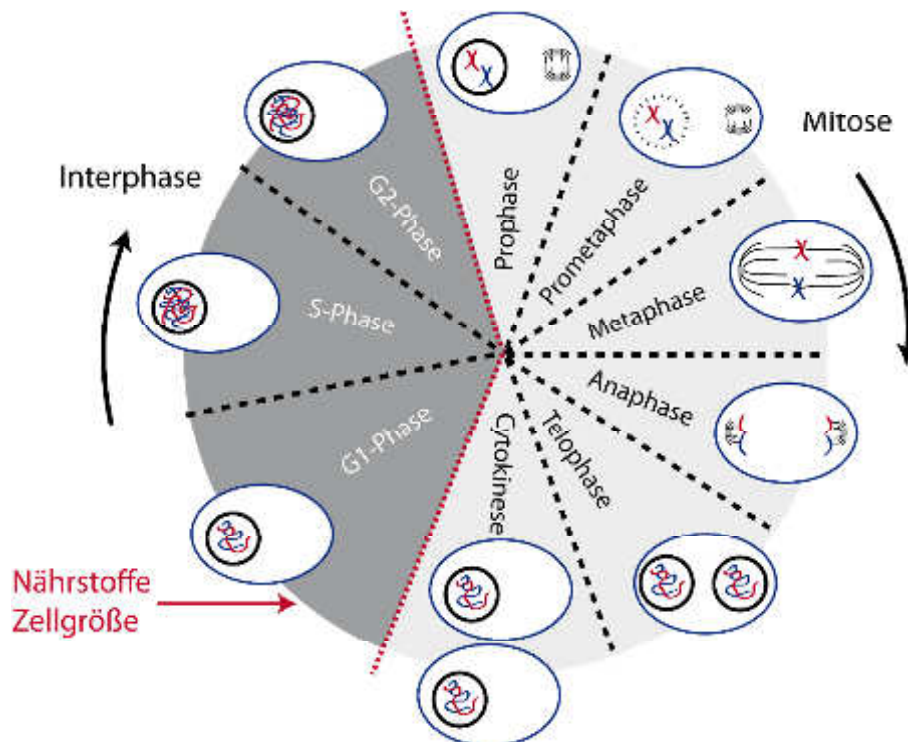
CK2 beeinflusst den Import von Proteinen auf drei verschiedene Arten. Durch die Phosphorylierung des Vorläuferproteins von Tom22 an Ser44 und Ser46 im Cytosol, kann dieses von Tom20 erkannt und anschließend über den Sam-Komplex importiert werden. Im intakten Tom-Komplex verbindet Tom22 den Rezeptor Tom20 mit den restlichen Komplex-Bausteinen [57]. Diese Verbindung ist wichtig, um Vorläuferproteine, die auf der cytosolischen Seite am Rezeptor gebunden haben weiter zur Importpore (Tom40) zu transportieren. Ser44 und Ser46 scheinen eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung von Tom22 und Tom20 zu spielen, da es durch Dephosphorylierung möglich ist, Tom20 vom restlichen Tom-Komplex abzuspalten [54], [58]. Zusätzlich dient CK2 der Phosphorylierung und somit Stabilisierung von Mim1. Dadurch wird der Import von Tom20 und Tom70 Vorläuferproteinen beeinflusst [56].

PKA ist in der Lage Tom40 an Ser54 zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierung hat zur Folge, dass es nicht mehr ins Mitochondrium importiert werden kann [54], [55]. Dieser Effekt spielt in Hefen eine Rolle, wenn die Wachstumsbedingungen von respiratorisch (Atmung: Zelle braucht ATP und somit hohe mitochondriale Aktivität), in fermentativ (ATP-Produktion und somit mitochondriale Aktivität werden heruntergefahren, z.B. in Gegenwart von Glucose als Energiequelle) gewechselt werden. Bei der Kultivierung der Zellen unter fermentativen Bedingungen erhöht sich die Konzentration an cAMP in der Zelle [59], [60]. Dadurch wird PKA aktiviert und phosphoryliert Tom40, sodass es nicht mehr importiert werden kann. Somit können weniger intakte Tom-Komplexe gebildet werden und der Protein-Import und somit auch die mitochondriale Aktivität werden heruntergefahren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CK2 und PKA einen großen Einfluss auf die Bildung eines intakten Tom-Komplexes und somit auf den Import von Proteinen in Mitochondrien und den Energiehaushalt einer Zelle haben.

## 1.4 Der Zellzyklus der Hefe

Der Zellzyklus ist ein essentieller Mechanismus in Eukaryonten, der zur Teilung von Zellen dient. Er lässt sich in zwei große Abschnitte teilen: der Mitosephase, welche sich aus der eigentlichen Mitose und der Cytokinese zusammensetzt, und der Interphase. Die Mitose setzt sich aus fünf verschiedenen Bereichen zusammen. Die verschiedenen Stadien des Zellzyklus sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 6: Der Zellzyklus: Die Interphase und die Mitose bilden die zwei großen Abschnitte des Zellzyklus; Die Zellgröße und externe Signale, wie Nährstoffe, regulieren den Zellzyklus der Hefe.**

Im ersten Bereich, der Prophase, wird DNA so stark verdichtet, dass sich Chromosomen ausbilden. Jedes Chromosom besteht aus zwei identischen Schwesterchromatiden, welche am Zentromer zusammengehalten werden. Außerdem wird der Spindelapparat gebildet. In der Prometaphase wird die Zellkernhülle aufgelöst. Die Mikrotubuli des Spindelapparates binden an die Zentromere der Chromosomen und ordnen sie anschließend in der Metaphase in der Äquatorialebene an. Während der Anaphase werden die beiden Chromatiden der Chromosomen geteilt und jeweils zu den entgegengesetzten Polen der Zelle gezogen. In der letzten Phase der



Mitose, der Telophase, entschauben sich die Chromatide wieder und die Kernmembran wird aufgebaut. Als letzter Abschnitt folgt die Cytokinese. Dabei wird die Zelle in zwei Tochterzellen getrennt.

Die neu gebildeten Zellen treten anschließend in die Interphase ein, welche sich aus der G1-, der S- und der G2-Phase zusammensetzt. In der G1- Phase wächst die Zelle und alle noch fehlenden Zellbestandteile (Zytoplasma, Zellorganellen) werden ausgebildet. In der nachfolgenden S- oder Synthese-Phase wird die in der Zelle enthaltene DNA verdoppelt und somit die Zelle auf eine weitere Zellteilung vorbereitet. In der anschließenden G2-Phase wird die Zelle durch Aufnahme von Zellflüssigkeit vergrößert und essentielle Proteine zur Zellteilung synthetisiert, sodass sie erneut in die Mitose eintreten kann. Der Zellzyklus wird durch die Größe der Zelle und extrazelluläre Signale, wie Nährstoffe gesteuert.

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle im Zellzyklus. Beim Übergang der Zelle von der G1- zur S-Phase verschmelzen sie zu einem Netzwerk und bilden ein hyperpolarisierendes Membranpotential aus. Dadurch ist die Zelle in der Lage dazu mehr Energie zu produzieren, welche zur Synthese von Proteinen während des Zellzyklus benötigt wird.



## 2 Zielsetzung

Mitochondrien sind die Kraftwerke eukaryotischer Zellen und somit von enormer Wichtigkeit. Nur ca. 1 % aller mitochondrialen Proteine können in Mitochondrien selbst synthetisiert werden. Alle anderen werden im Cytosol hergestellt und müssen über die mitochondrialen Proteinkomplexe importiert werden. Fehler beim Import können gravierende Ausmaße haben und zu diversen Krankheiten, wie Alzheimer oder Parkinson führen, sodass dessen Analyse sehr wichtig ist. Erst in den letzten Jahren zeigte sich in ersten Studien, dass der Proteinimport durch die reversible Phosphorylierung des Tom-Komplexes reguliert werden kann. Bisher konnten jedoch nur wenige Phosphorylierungsstellen in Hefe Mitochondrien identifiziert werden. So konnten beispielsweise Reinders *et al.* 80 verschiedene Phosphorylierungsstellen in 48 Proteinen identifizieren [53], Schmidt *et al.* 30 verschiedene im Tom-Komplex [54]. Eine optimierte und vor allem quantitative Analyse des Phosphoproteoms stellt somit ein neues und interessantes Forschungsprojekt dar.

Ziel dieser Arbeit war es nun, den dynamischen Proteinimport und die Regulation durch reversible Phosphorylierung qualitativ und quantitativ zu untersuchen, um neue Einblicke in die Dynamik von Mitochondrien zu erlangen. Dafür sollte a) das Phosphoproteom von Mitochondrien untersucht und „proof-of-principle“-Methoden entwickelt werden, mit denen es b) möglich ist die Stöchiometrie von Membrankomplexen zu ermitteln und c) importierte Proteine auf ihrem Weg vom Cytosol ins Mitochondrium zu verfolgen. Da die Aufreinigung von Mitochondrien aufwendig ist, standen nur geringe Probemengen (wenige µg) zur Analyse bereit. Hinzu kommt, dass die meisten Proteine, die für den Proteinimport zuständig sind, wie der Tom- und der Tim-Komplex, Membranproteine sind. Diese sind schwer löslich und somit schwer für die LC-MS Analyse zugänglich zu machen. Aus diesen Gründen wurde die gesamte Probenvorbereitung für die Verwendung geringer Probemengen und Membranproteine optimiert. Dazu gehörte die Optimierung a) der Lyse, b) des proteolytischen Proteinverdaus, c) der Anreicherung der phosphorylierten Peptide mittels Titaniumdioxid, d) der Fraktionierung der angereicherten Peptide (HILIC) und e) der Messung und Auswertung der angereicherten Proben.

## 3 Technische Grundlagen

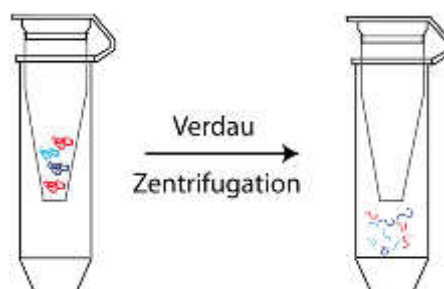
Im nachfolgenden Kapitel werden technische Grundlagen zum besseren Verständnis der Arbeit dargestellt.

### 3.1 Probenvorbereitung

Der erste Schritt im Arbeitsablauf einer Proteom-Analyse ist die Probenvorbereitung. Dazu zählen die Lyse der Zellen, die Bestimmung der Proteinkonzentration und der Verdau der Proteine. Alle diese Schritte sind essentiell für die Analyse und müssen vor allem bei quantitativen Ansätzen reproduzierbar ablaufen.

Bei der Lyse werden Zellen oder Organellen aufgeschlossen, sodass Proteine freigesetzt werden können. Die Lyse kann, je nach Zell - bzw. Organellenart, mechanisch, beispielweise mit dem Mörser, einer Kugelmühle oder mit Ultraschall, oder chemisch (SDS, Harnstoff, RapiGest) erfolgen [61].

Eine schnelle und einfache Lyse ist durch Zugabe von 1 % SDS zum Zellpellet möglich. Der Nachteil liegt jedoch darin, dass SDS sowohl den anschließenden Verdau der Proteine, als auch die spätere chromatographische Auftrennung der Probe negativ beeinflusst und somit vor der Weiterverwendung entfernt werden sollte. Eine Option stellt dabei das FASP (Filter aided sample preparation)-Protokoll dar [62], [63] (siehe Abbildung 7).

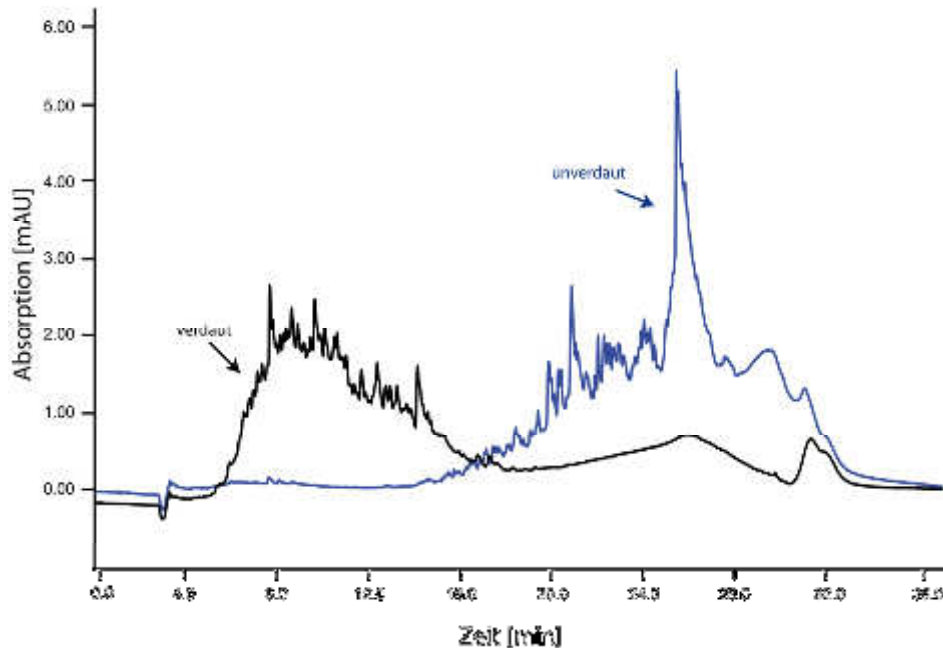


**Abbildung 7: Prinzip des FASP Verdauens. Proteine werden auf dem Filter umgepuffert und verdaut. Anschließend können die Peptide in einem Gefäß gesammelt werden.**

Dafür werden Filter mit einem Molekulargewichts- cut-off von 30 kDa verwendet. Alle Moleküle, die größer als 30 kDa sind, also auch die Proteine, verbleiben bei verschiedenen Waschschritten auf dem Filter, während das SDS rausgewaschen werden kann. Anschließend werden die Proteine auf dem Filter verdaut. Die entstandenen Peptide können nun durch den Filter hindurch zentrifugiert und in einem Gefäß aufgefangen werden.

Zur Bestimmung des Proteingehalts unbekannter Proben wurde in dieser Arbeit der BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay verwendet. Dieser Assay stellt eine Alternative zum Lowry- und Biuret-Assay dar und wurde 1985 von P.K. Smith entwickelt. Sowohl die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Cystein, als auch die Peptidbindungen sind in der Lage dazu die im Assay enthaltenen  $\text{Cu}^{2+}$ - Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen zu reduzieren. Diese können dann ein Chelatkomplex mit der Bicinchoninsäure bilden, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm liegt.

Für den proteolytischen Verdau, also die enzymatische Spaltung von Proteinen in Peptide, wurde in dieser Arbeit die Protease Trypsin verwendet. Trypsin spaltet Peptidbindungen carboxyterminal an den Aminosäuren Arginin und Lysin. Das pH-Optimum liegt bei pH 7-8, das Temperatur-Optimum bei 37°C [64]. Für alle nachfolgenden Schritte ist ein optimaler Verdau von großer Bedeutung. Eine schnelle und sensitive Möglichkeit die Qualität und auch die Reproduzierbarkeit eines Verdaus zu überprüfen, ist die Verwendung einer monolithischen Säule. Diese Säulen bestehen nicht aus einzelnen Partikeln, sondern aus polymerisiertem Silicagel und sind in der Lage sowohl Proteine, als auch Peptide aufzutrennen. Proteine eluieren dabei, auf Grund ihrer Größe und der höheren Hydrophobizität später von der Säule als Peptide. Durch den Vergleich der Auftrennung einer nicht verdauten mit einer verdauten Probe, ist es möglich die Qualität eines Verdaus einzuschätzen [65]. In Abbildung 8 ist die Auftrennung einer verdauten und einer unverdauten Probe dargestellt.



**Abbildung 8: Monolithische Auftrennung einer verdauten (schwarz) und unverdauten (blau) HeLa Probe. Peptide eluieren im vorderen Bereich, die deutlich größeren Proteine im hinteren Teil des Gradienten.**

## 3.2 Flüssigchromatographie

Die Flüssigchromatographie dient dazu Substanzgemische in einem Zweiphasensystem (mobile – und stationäre Phase) aufzutrennen. Das Gemisch wird in der mobilen Phase gelöst und anschließend über eine stationäre Phase (Säule) geleitet. Dabei binden die verschiedenen Komponenten des Gemisches durch Wechselwirkungen unterschiedlich stark an die stationäre Phase und werden dadurch voneinander getrennt. Substanzen, welche stärker an die stationäre Phase binden, eluieren später, als solche, die nur eine schwache Wechselwirkung mit der Säule aufweisen.

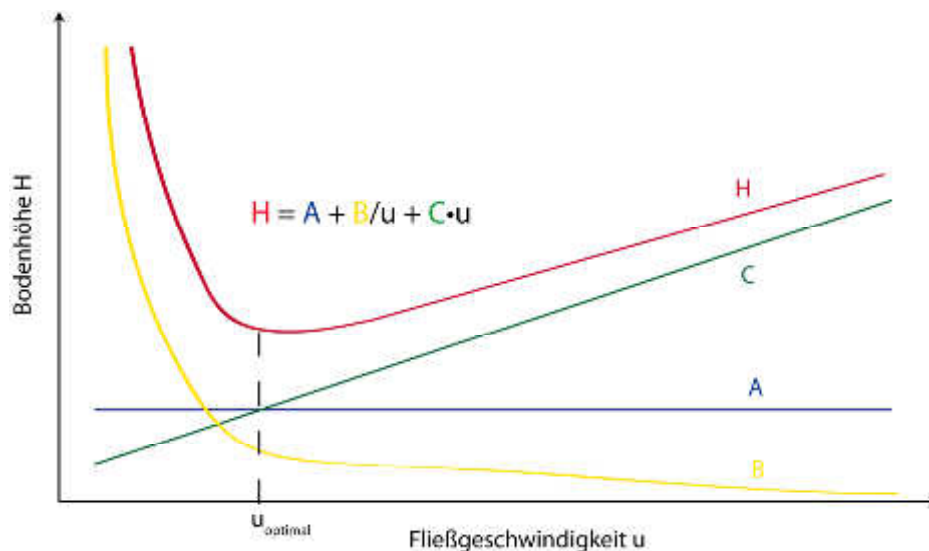
Die Trennleistung einer chromatographischen Säule wird in erster Näherung durch die van-Deemter-Gleichung zur Berechnung der Bodenhöhe  $H$  beschrieben. Nach der Theorie der Trennböden wird ein Trennprozess in mehrere Schritte, sogenannte Trennstufen oder Böden  $N$ , unterteilt. Zwischen jedem Boden stellt sich beim Trennprozess ein Gleichgewicht ein, bevor der zu trennende Analyt zum nächsten Boden transportiert werden kann. Durch die Länge einer Trennsäule und die Anzahl der Böden  $N$  lässt sich die Bodenhöhe einer Säule berechnen (siehe Gleichung 1).

Je geringer die Bodenhöhe, desto höher die Anzahl der Trennböden und desto besser die Trennleistung einer Säule [66], [67].

$$(1) \quad H = \frac{L}{N}$$

mit  $H$  = Bodenhöhe,  $L$  = Säulenlänge,  $N$  = Anzahl der Boden

Mit der van-Deemter-Gleichung ist es nun möglich die geringste Bodenhöhe und somit die Fließgeschwindigkeit für die optimale Trennleistung einer Säule zu bestimmen. Die Zusammenhänge der Gleichung sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Die Eddy-Diffusion (A) beschreibt die Tatsache, dass Analytmoleküle unterschiedlich lange Wege in der Säule zurücklegen können, was eine Bandenverbreiterung bei der Auftrennung zur Folge hat. Sie ist unabhängig von der Fließgeschwindigkeit. Die longitudinale Diffusion (B) berücksichtigt die laminare Strömungsverteilung in der Säule. Der letzte Parameter, der Stoffaustausch (C), spiegelt die Geschwindigkeit des Stoffaustausches zwischen der stationären und der mobilen Phase wider.



**Abbildung 9:** Diagramm zur van-Deemter-Gleichung; A: Eddy-Diffusion, B: longitudinale Diffusion; C: Stoffaustausch, H: Bodenhöhe; Mit Hilfe der van-Deemter-Gleichung lässt sich die optimale Fließgeschwindigkeit bestimmen, bei welcher eine minimale Bodenhöhe und somit eine verbesserte Trennleistung erreicht werden kann.

Durch Verwendung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), wie sie heutzutage in der Proteinanalytik zu finden ist, kann durch Säulen mit kleinem Durchmesser und dichter Säulenpackung die Flussrate herabgesetzt (wenige nL/min) und die Trennleistung deutlich verbessert werden (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Zusammenhang der Sensitivität einer Trennsäule mit dem inneren Durchmesser und der Flussrate.**

|                          | <b>Innerer Durchmesser [mm]</b> | <b>Fluss [<math>\mu</math>L/min]</b> | <b>Relative Sensitivität</b> |
|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <b>Konventionelle LC</b> | 4,6                             | > 1000                               | $\equiv$ 1                   |
| <b>Analytische LC</b>    | 2,0                             | 200                                  | 5                            |
| <b>Mikro LC</b>          | 0,1-1,0                         | 10-50                                | 35                           |
| <b>Kapillar LC</b>       | 0,1-0,5                         | 1-10                                 | 200                          |
| <b>Nano LC</b>           | 0,05-0,1                        | 0,05-0,2                             | 3500                         |

Zur Auftrennung von Peptidgemischen wird heutzutage vorwiegend die Umkehrphasenchromatographie (reversed-phase (RP-) chromatography) verwendet. Dabei wird das zu trennende Substanzgemisch in einer hydrophilen mobilen Phase gelöst und über eine unpolare stationäre Phase geleitet. Durch hydrophobe Wechselwirkungen binden die Komponenten des Gemisches an der stationären Phase. Durch Erhöhung des organischen Anteils der mobilen Phase erfolgt die Elution. Als stationäre Phasen können Kieselgele mit langen Kohlenwasserstoffketten verwendet werden. Durch die Länge der Kohlenwasserstoffketten wird die Hydrophobizität erhöht. Zur Auftrennung von Peptidgemischen werden meist C18-Säulen eingesetzt. Als organisches Lösungsmittel zur Elution der Peptide wird Acetonitril (MeCN) verwendet. Zusätzlich kann in der mobilen Phase mit Trifluoressigsäure (TFA) gearbeitet werden. Diese dient als Ionenpaarreagenz, maskiert die Eigenladung der Peptide, erhöht ihre Hydrophobizität und verbessert somit die Auftrennung eines Peptidgemisches. Bei der Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer mittels ESI (Elektrospray-Ionisation) muss dabei beachtet werden, dass TFA die Effektivität der Ionisierung beeinträchtigen kann.

ESI ist ein schonendes Ionisierungsverfahren bei dem Analytmoleküle, welche in einem polaren, leicht flüchtigen Lösungsmittel gelöst sind, durch eine Kapillare (Anode bei positiver ESI, Kathode bei negativer ESI) in ein elektrisches Feld geleitet werden. Dabei werden positiv bzw. negativ geladene Ionen an der Flüssigkeitsoberfläche angereichert und wandern in Richtung Massenspektrometer (Kathode bei positiver ESI, Anode bei negativer ESI). Durch Zusammenwirken der Oberflächenspannung der Flüssigkeit und des elektrischen Feldes entsteht

ein stabiler Flüssigkeitsstrom (Taylor-Konus). Je weiter sich der Flüssigkeitsstrom von der Anode entfernt, desto instabiler wird dieser. Die Ladungsdichte der entstehenden Flüssigkeitstropfen steigt und nähert sich dem sogenannten Rayleigh-Limit an, einer Stabilitätsgrenze bei der die elektrostatische Abstoßung der Analytmoleküle größer als die Oberflächenspannung der Tropfen wird [68]. Wird dieses Limit überschritten, zerfallen die Tropfen explosionsartig (Coulomb-Explosion). Anschließend werden aus den entstandenen Mikrotröpfchen durch Desolvatisierung Analyt-Ionen gebildet, die in das Massenspektrometer gelangen können [69].

### 3.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie dient dazu das Masse- zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) freier Ionen im Hochvakuum zu bestimmen. Die drei Hauptbestandteile eines Massenspektrometers sind üblicherweise die Ionenquelle zur Erzeugung der Ionen, der Massenanalysator zum Trennen der Ionen nach  $m/z$  und der Detektor. Die wichtigsten Eigenschaften eines Massenspektrometers sind die Massengenauigkeit, der dynamische Bereich, die Auflösung und die Sensitivität (Nachweisgrenze). Die Massengenauigkeit zeigt inwieweit eine gemessene Masse von der tatsächlichen Masse abweicht. Der dynamische Bereich beschreibt den maximalen Mengenunterschied zwischen zwei gleichzeitig vorhandenen Analyten, der noch abbildbar ist. Die Auflösung eines Massenspektrometers gibt an inwieweit Ionen, welche nur geringe Unterschiede in ihrem  $m/z$ -Verhältnis besitzen, getrennt werden können.

#### 3.3.1 Fragmentierung von Peptiden

Bei der Analyse von Peptiden mit Hilfe eines Massenspektrometers können neben einem Übersichtsscan ( $MS^1$ ), bei dem die  $m/z$ -Verhältnisse alle Peptide zu einem bestimmten Zeitpunkt aufgezeichnet werden, auch Fragmentationenspektren ( $MS^2$  oder  $MS/MS$ -Spektren) aufgenommen werden. Durch den Abgleich dieser Spektren mit Proteindatenbanken mit Hilfe von Suchalgorithmen, wie z.B. Mascot, ist es möglich, weitere Informationen über die zu analysierenden Peptide, wie z.B. die Aminosäuresequenz oder die Position von Modifikationen, zu gewinnen (detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 3.6). Die Fragmentierung kann durch unterschiedliche Methoden, wie beispielsweise die electron capture dissociation (ECD) [70],

electron transfer dissociation (ETD) [70], collision-induced dissociation (CID) oder die higher energy collisional dissociation (HCD), erfolgen. Je nach Methode werden dabei nach der Nomenklatur von Biemann [71] unterschiedliche Fragmentationen gebildet (siehe Abbildung 10).

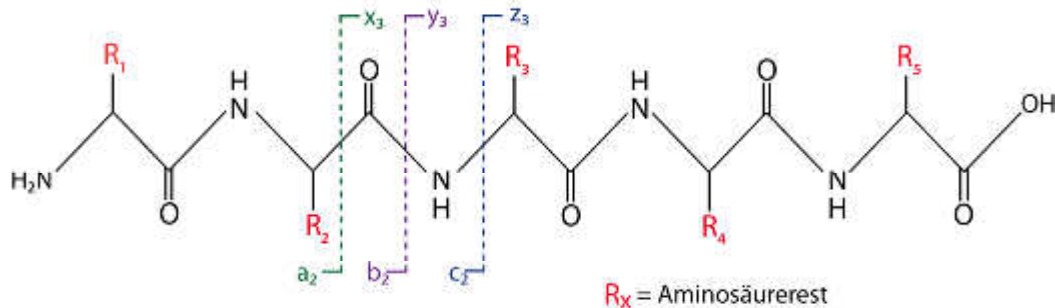


Abbildung 10: Fragmentionen nach der Nomenklatur von Biemann

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit CID und HCD gearbeitet. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle nur auf diese beiden Fragmentierungsmethoden näher eingegangen. Bei CID erfolgt die Fragmentierung der Ionen in der Ionenfalle. Die Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode, die mit Endkappen abgeschlossen ist an die eine Spannung angelegt werden kann. Beim Eintritt der Ionen in die Falle werden diese durch ein Bremsgas abgebremst und durch das Zusammenwirken von Gleich- und Wechselspannung, welche angelegt werden, eingefangen. Anschließend werden die Analytationen durch Veränderung der Spannungen zu Schwingungen angeregt, stoßen schwach tausende Male mit den Gasmolekülen zusammen und werden auf diese Weise fragmentiert. Bei der Fragmentierung von phosphorylierten Peptiden kann dies dazu beitragen, dass die labile Phosphoesterbindung von phosphorylierten Serinen und Threoninen als erstes bricht und ein sogenanntes Neutralverlust-Ion entsteht (Ion ohne Phosphatgruppe, Massenshift von 98 Da), das nicht mehr angeregt und somit auch nicht mehr fragmentiert werden kann [72]. Das daraus resultierende Spektrum wird von dem Neutralverlust-Ion dominiert, sodass eine Identifizierung schwierig ist. Durch Verwendung der multi-stage activation (MSA) kann dieses Problem behoben werden. Dabei werden neben dem Analy-Ion, auch das potentiell entstandene Neutralverlust-Ion zum Fragmentieren angeregt [73], [74]. Durch Veränderung der Spannung werden dann die Fragmentionen mit steigendem  $m/z$ -Verhältnis aus der Falle entlassen.

Im Gegensatz zu CID erfolgt die Fragmentierung mit HCD in einem Quadrupol. Die Ionen werden beschleunigt, stoßen mit hoher Energie mit Gasmolekülen zusammen und werden

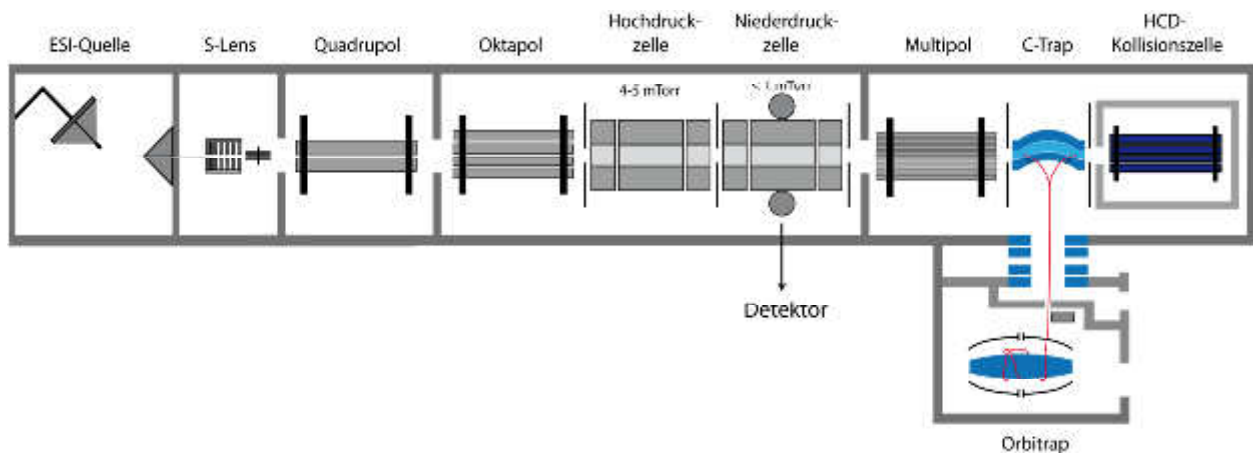


dadurch fragmentiert. Der Quadrupol besteht aus vier stabförmigen Metallelektroden an die Wechsel- und Gleichspannung angelegt werden kann. Je nach Kombination der Spannungen können Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Verhältnissen den Quadrupol passieren.

In dieser Arbeit wurden 2 Arten von Massenspektrometern verwendet: das LTQ Orbitrap Velos/Orbitrap Elite und das Q Exactive. Beide werden in den nachfolgenden Kapiteln kurz vorgestellt.

### LTQ Orbitrap Velos/Orbitrap Elite

Eine schematische Darstellung des LTQ Orbitrap Velos ist in der nachfolgenden Abbildung zu finden.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific).**

Nach der Auftrennung mittels LC werden die Peptide mit der ESI-Ionenquelle ionisiert und in das Massenspektrometer befördert. Durch eine spezielle Ionenoptik gelangen die Ionen in eine Ionenfalle, die in zwei Zellen getrennt ist. In der ersten Zelle, der Hochdruckzelle, werden die Ionen bei dafür optimalem Druck (4-5 mTorr) abgebremst, isoliert und fragmentiert (CID). In der zweiten Zelle, der Niederdruckzelle, erfolgt die Detektion der Ionen bei dafür optimiertem Druck (< 1 mTorr) [75]. Von der Ionenfalle können die Ionen weiter zur C-trap transportiert werden. In der C-trap, welche mit Bremsgas gefüllt ist, werden sie abgebremst, gespeichert und als Ionenpakete zur Orbitrap weitergeschickt. Die Orbitrap ist ein weiterer Massenanalysator des LTQ Orbitrap Velos. Im Inneren der Orbitrap ist eine Elektrode zu finden. Die Ionen oszillieren axial, abhängig von ihrem  $m/z$ -Verhältnis als Pakete, mit einer bestimmten Frequenz um diese Elektrode. Der dabei entstehende Strom kann im mittleren Bereich der Spindel detektiert

werden. Anhand der Frequenz kann mit Hilfe der Fourier-Transformation das  $m/z$ -Verhältnis der Ionen bestimmt werden. Im Gegensatz zur Ionenfalle arbeitet die Orbitrap zwar langsamer, hat jedoch eine deutlich höhere Auflösung, welche von der Dauer der Akquisition abhängt. Alternativ zur Fragmentierung in der Ionenfalle, können die Ionen auch in der HCD-Zelle fragmentiert werden. Dafür werden sie von der C-trap zur HCD-Zelle transportiert. Bei den MS-Analysen, die während dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden die Analyt-Ionen zunächst in einem kurzen Prescan (Scan von wenigen ms) in der Orbitrap analysiert. Basierend darauf wurden anschließend, je nach Methode, die Ionen mit den 10 oder 15 höchsten Signalen in der Ionenfalle fragmentiert und detektiert. Gleichzeitig wurde mit den Ionen in der Orbitrap zur Bestimmung der exakten Masse ein hochauflösender Übersichtsscan durchgeführt.

Die Orbitrap Elite arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie die LTQ Orbitrap Velos. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Systemen ist, dass in der Orbitrap Elite eine verbesserte Orbitrap (kleiner, höhere Spannung) eingesetzt wird, die bei gleicher Scandauer eine höhere Auflösung erreichen kann. Außerdem wurde die Ionenoptik verbessert, sodass neutrale Moleküle im vorderen Bereich des Gerätes abgeblockt werden und somit das Gerät nicht verschmutzen.

### Q Exactive

Ein weiteres Gerät, welches während dieser Arbeit verwendet wurde, ist das Q Exactive, das in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt ist.

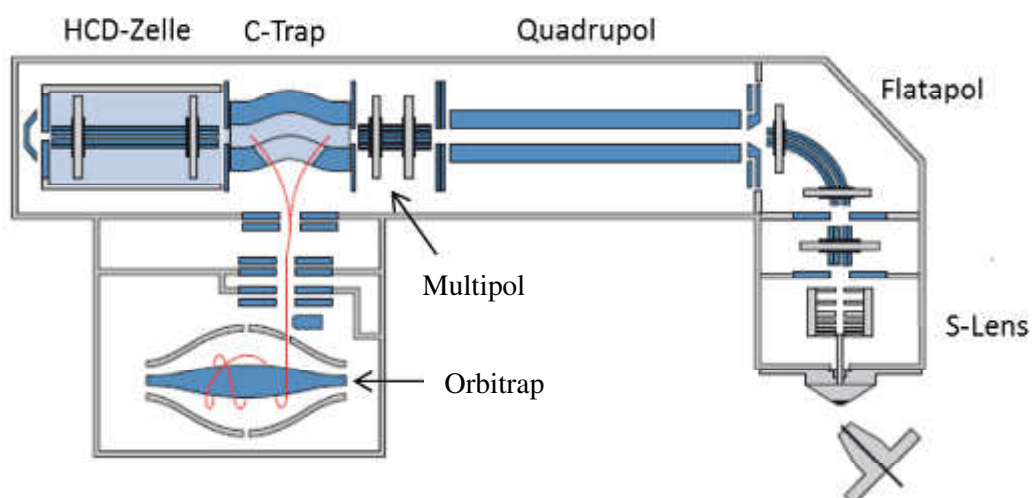


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Q Exactive [76].

Im Unterschied zum Orbitrap Velos verfügt das Q Exactive als Massensfilter einen Quadrupol. Nach der Isolierung bestimmter Ionen, können diese ausschließlich in der HCD-Zelle fragmentiert und anschließend in der Orbitrap analysiert werden.

### **3.4 Anreicherung und Fraktionierung phosphorylierter Peptide**

Da phosphorylierte Peptide in einer komplexen Probe meist substöchiometrisch vorhanden sind, ist eine Fraktionierung und Anreicherung dieser Peptide vor der Analyse mittels LC-MS wichtig. Durch Abtrennung nicht phosphorylierter Peptide und Verringerung der Komplexität der Probe ist eine Erhöhung der Anzahl identifizierter phosphorylierter Peptide bei der anschließenden LC-MS-Analyse möglich [77]. Verschiedene Methoden zur Anreicherung und Fraktionierung werden in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert.

#### **3.4.1 Kationenaustauscher**

Kationenaustauscher (strong cation exchange, SCX) besitzen auf ihrer stationären Phase negativ geladene funktionelle Gruppen, die an ein Trägermaterial gebunden sind. An diese negativ geladenen Gruppen binden positiv geladene Gegen-Ionen. Analyt-Ionen, die eine positive Ladung tragen, können nun die Gegen-Ionen verdrängen und selbst an die funktionellen Gruppen binden. Die Elution der Analyt-Ionen erfolgt anschließend durch Zufügen von Kationen im Überschuss zur mobilen Phase, welche eine sehr starke Affinität zu den negativ geladenen funktionellen Gruppen besitzen und die ihrerseits die Analytionen verdrängen. Auch eine Elution durch Änderung des pH-Wertes ist möglich. Ein Anionenaustauscher arbeitet nach dem gleichen Prinzip, besitzt jedoch positiv geladene funktionelle Gruppen und negativ geladene Gegen-Ionen. Für die Trennung phosphorylierter von nicht phosphorylierten Peptiden wird bei einem sauren pH-Wert (pH 2,7) gearbeitet. Bei diesem pH-Wert tragen die meisten tryptischen Peptide, durch die N-Termini und die Lysin- bzw. Argininreste, eine Ladung von +2. Jeder Histidin-Rest und jede überlesene Schnittstelle erhöht die Ladung der Peptide um +1. Die Nettoladung phosphorylierter Peptide wird durch die negative Ladung der Phosphatgruppe um eins gesenkt. Tryptische, phosphorylierte Peptide (ohne überlesenen Schnittstelle und Histidin) sind somit nicht mehr 2fach, sondern 1fach positiv geladen und eluieren demzufolge früher. In den vorderen Fraktionen einer SCX-Auftrennung sind somit einfach phosphorylierte Peptide zu finden, während nicht phosphorylierte Peptide und phosphorylierte Peptide mit überlesenen

Schnittstellen in späteren Teil des Gradienten eluieren. Mehrfach phosphorylierte Peptide, deren Ladung durch zusätzliche Phosphatgruppen weiter gesenkt wird, sind im Durchfluss zu finden. Durch die Auftrennung einer Probe mit SCX ist es somit möglich phosphorylierte und nicht phosphorylierte Peptide voneinander zu trennen [78], [79].

### **3.4.2 HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography)**

Bei einer HILIC-Auftrennung werden Analyten, die sich in einer organischen mobilen Phase befinden, durch Wasserstoffbrückenbindungen an eine neutrale, hydrophile Phase gebunden. Als stationäre Phase werden vorwiegend Silica-Gele mit polaren funktionellen Gruppen verwendet [80]. In dieser Arbeit wurde als stationäre Phase TSKgel Amid-80 (TOSOH Bioscience) genutzt. Dabei handelt es sich um Silica-Partikel, die kovalent an nicht-ionische Carbamoylgruppen gebunden sind. Die Elution der Analyten erfolgt durch Erhöhung der Polarität der mobilen Phase. Hydrophile Peptide binden somit stärker an die stationäre Phase als hydrophobe und eluieren im späteren Bereich des Gradienten. Dadurch ist die HILIC-Auftrennung orthogonal zur Auftrennung von Peptiden mit C18-Material. Phosphorylierte Peptide sind hydrophil, binden somit stärker an die stationäre Phase als nicht phosphorylierte Peptide. Durch eine HILIC-Auftrennung ist es somit möglich die nicht phosphorylierten Peptide von den phosphorylierten zu trennen und diese gleichzeitig zu fraktionieren [81].

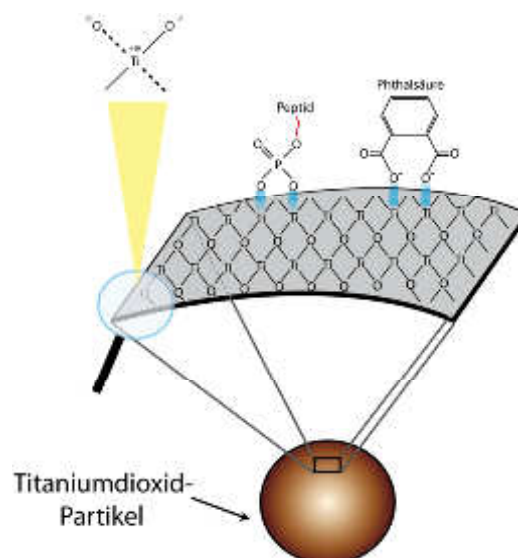
### **3.4.3 IMAC (Immobilisierte Metalionen Affinitätschromatographie)**

Bereits im Jahr 1986 wurde IMAC von Andersson *et al.* [82] zur Anreicherung phosphorylierter Proteine etabliert. Auch heutzutage ist dies eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Anreicherung phosphorylierter Peptide. Die Anreicherung von Proteinen wird nur noch selten verwendet. Bei IMAC werden positiv geladene Metall-Ionen (z.B.:  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) über Chelatbindungen mit Iminodiessigsäure (IDA)-, Nitrilotriessigsäure (NTA)- oder Triscarboxymethylethylendiamin (TED)- Linker an Partikel aus Agarose oder Silica gebunden. Bei sauren Bedingungen (pH 2,3-2,9) sind die Carboxylgruppen ( $\text{pK}_a = 3,5$ ) saurer Aminosäurereste von Glutamat und Aspartat ungeladen, während die Phosphatgruppen ( $\text{pK}_a$  Phosphorsäure = 1,8) phosphorylierter Peptide noch eine negative Ladung tragen. Damit wird gewährleistet, dass die negativ geladenen Phosphatgruppen an den positiv geladenen IMAC-Partikeln binden, während nicht phosphorylierte Peptide (auch die mit sauren Aminosäureresten) nicht binden und

durch verschiedenen Waschschr tten herausgespült werden können. Durch Salz- oder pH-Plugs können die phosphorylierten Peptide anschließend wieder von den IMAC Partikeln eluiert werden [83], [84].

### 3.4.4 Anreicherung mit Titandioxid

Sano *et al.* [85] publizierten 2004 die Anreicherung phosphorylierter Peptide mittels Titandioxid als Alternative zu IMAC. Ähnlich wie bei der Verwendung von IMAC werden im optimalen Fall nur die phosphorylierten Peptide bei geringem pH-Wert an Titandioxid-Partikel gebunden, während nicht phosphorylierte Peptide herausgewaschen werden können [86], [87]. Um die unspezifische Bindung von nicht phosphorylierten Peptiden an die Partikel zu minimieren, werden Additive, wie Phthalsäure oder Glykolsäure, bei der Anreicherung zugefügt [88]. Die Säuren konkurrieren mit den unspezifischen, nicht phosphorylierten Peptiden um freie Bindungsplätze an den Titandioxid-Partikeln und verbessern somit die Selektivität der Anreicherung. Durch Verwendung von stark alkalischen Puffern (pH 11) können die phosphorylierten Peptide wieder von den Partikeln eluiert werden [89]. Eine schematische Darstellung der Bindung phosphorylierter Peptide an ein Titandioxid-Partikel ist in der nachfolgenden Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Bindung phosphorylierter Peptide an Titandioxid-Partikel. Die Phthalsäure (alternativ Glykolsäure) konkurriert mit unspezifischen Peptiden um Bindungsplätze am Partikel und erhöht somit die Selektivität (nach [90]).

### **3.5 Quantitative Proteomforschung**

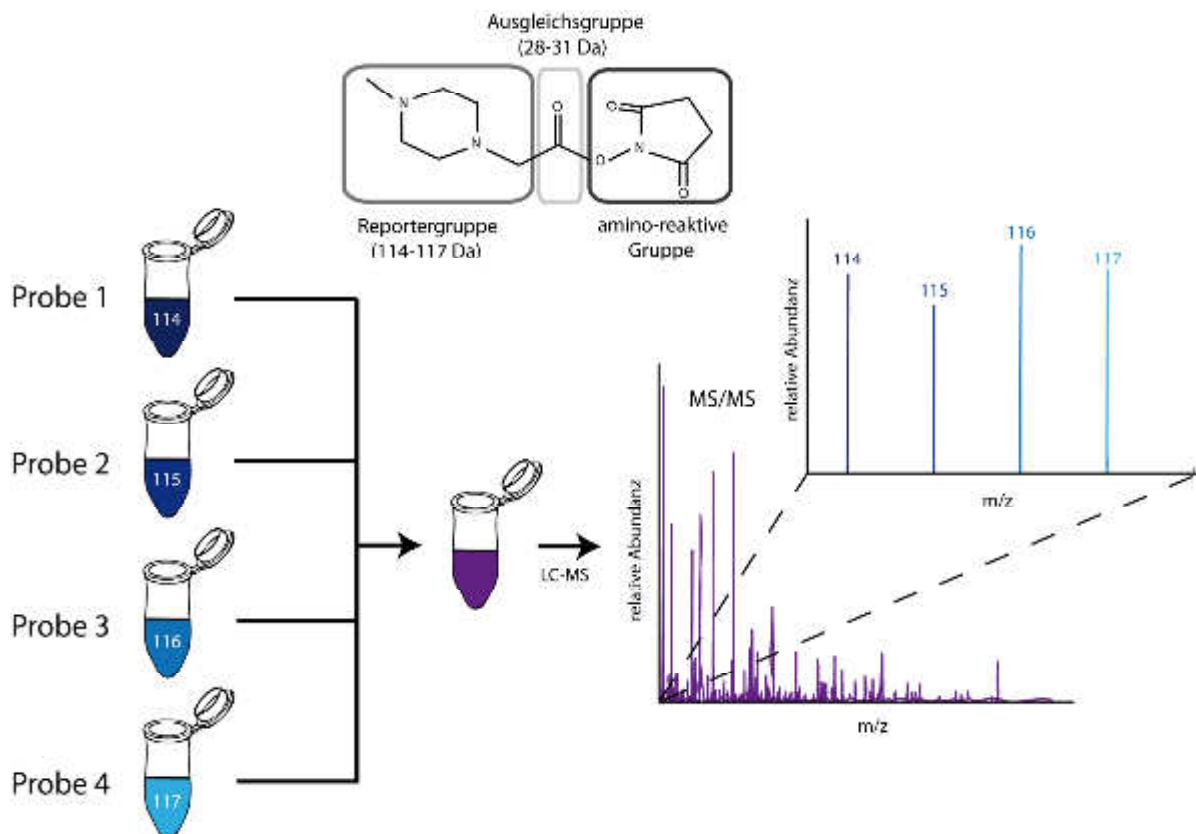
Die differentielle Proteomanalyse ist ein wichtiger Teilbereich der Proteomforschung. Dabei wird das Proteom von Organismen, die beispielsweise auf unterschiedliche Art stimuliert wurden, relativ zueinander quantifiziert. Am Anfang wurden zur Quantifizierung der Proteine nur visuelle Methoden, wie beispielsweise die 2D-PAGE, verwendet. Dabei werden die Proteine in zwei Dimensionen (nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht) aufgetrennt und anschließend im Gel durch Färbung visualisiert. Anhand der Intensität der Färbung kann anschließend relativ quantifiziert werden. Mit dieser Methode ist es möglich mehr als 5000 verschiedene Proteinspots mit hoher Sensitivität (< 1 ng) aufzutrennen [91], [92]. Ein Nachteil liegt aber darin, dass die Proteinspots im Gel zwar quantifiziert, jedoch die einzelnen Proteine nicht identifiziert werden können. Erst durch das Ausschneiden und die anschließende massenspektrometrische Messung der Spots ist eine Identifizierung möglich. Dies wird aber hauptsächlich durch zwei Aspekte limitiert: 1) die große Anzahl der zu analysierenden Gel-Spots und somit hoher Meßaufwand und hohe Kosten; 2) Proteine mit ähnlichem isoelektrischem Punkt und ähnlicher Größe können co-migrieren und im gleichen Gel-Spot identifiziert werden. Dadurch ist die exakte Quantifizierung nur bedingt möglich.

Heutzutage werden üblicherweise LC-MS Messungen zur differentiellen Proteomanalyse verwendet. Dabei wird auf die Verwendung von stabil-Isotopen markierten (chemisch oder metabolisch) und markierungsfreien (label-free) Ansätzen zurückgegriffen. Beide Arten haben Vor- und Nachteile und werden im Folgenden näher erläutert.

#### **3.5.1 Chemische Markierung zur Quantifizierung mittels LC-MS**

Bei der Verwendung einer chemischen Markierung zur relativen Quantifizierung von Proteinen und Peptiden werden stabil-Isotopen markierte Reagenzien verwendet, die kovalent an die zu quantifizierenden Proteine oder Peptide gebunden werden. Ein Reagenz, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, ist iTRAQ (isobaric Tag for relative and absolute quantitation) [93]. Mit iTRAQ ist es möglich 4 (4-plex Kit) bzw. 8 (8-plex Kit) verschiedene Proben miteinander zu vergleichen. Die zu quantifizierenden Proben werden unabhängig voneinander proteolytisch verdaut und markiert. Nach der Markierung der Proben, werden diese zu einer vereinigt und mittels LC-MS/MS analysiert. Die isobaren iTRAQ Reagenzien bestehen aus einer amino-reaktiven Gruppe, durch welche sie an Peptide binden können (an primäre Amine), einer

geladenen Reportergruppe unterschiedlicher Masse (im Fall des 4-plex Kits 114, 115, 116, 117 Da) mit der die Peptide quantifiziert werden können und einer neutralen Ausgleichsgruppe. Diese besitzt je nach Reportergruppe verschiedene Massen und führt dazu, dass alle iTRAQ Reagenzien die gleiche Gesamtmasse aufweisen. Dadurch werden unterschiedlich markierte Peptide zur gleichen Zeit von der HPLC eluiert und im MS analysiert. Die Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung der Intensitäten der jeweiligen Reporter-Ionen bei der Fragmentierung [93]. Das Prinzip der iTRAQ-Markierung ist der nachfolgenden Abbildung 14 zu entnehmen.



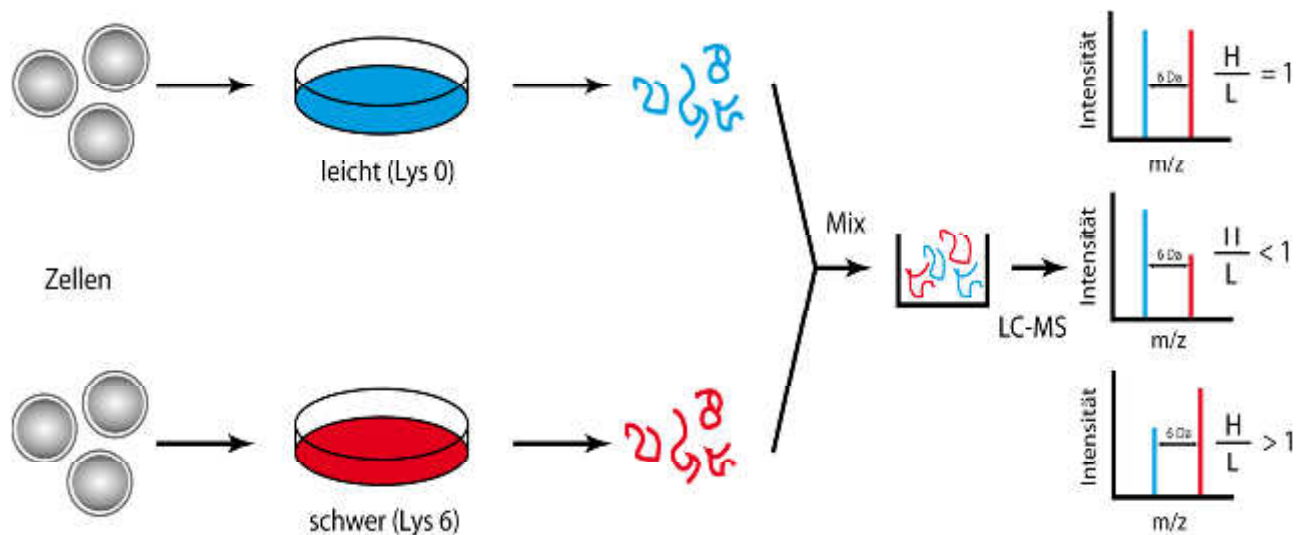
**Abbildung 14: iTRAQ Prinzip:** Vier verdaute Proben werden mit dem iTraQ Reagenz (114-117 Da) markiert, vereint und mittels LC-MS/MS analysiert. Anhand der Intensitäten der Reportergruppen des iTRAQ Reagenzes im MS/MS-Spektrum ist eine relative Quantifizierung der Peptide möglich.

Die Quantifizierung mittels iTraQ hat den entscheidenden Vorteil, dass bis zu 8 Proben in einer einzigen LC-MS Messung analysiert werden können, ohne die Komplexität der Messung wesentlich zu erhöhen. Alle 4 bzw. 8 verschiedenen Varianten eines Peptides können aufgrund der gleichen Masse co-isoliert und co-fragmentiert werden. Ein Problem stellt jedoch dar, dass die Vereinigung der Proben erst sehr spät in der Probenvorbereitung durchgeführt wird, sodass

entscheidende Schritte, wie z.B. der proteolytische Verdau, für jede Probe individuell durchgeführt werden müssen. Dadurch können technische Varianzen zwischen den Proben eingebaut werden, welche die exakte Quantifizierung beeinträchtigen können.

### 3.5.2 Metabolische Markierung zur Quantifizierung mittels LC-MS

Eine Möglichkeit der metabolischen Markierung ist SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) [94]. In der nachfolgenden Abbildung 15 ist das SILAC Prinzip dargestellt.



**Abbildung 15: SILAC-Prinzip: Zellen werden auf leichtem und schwerem (enthält stabil-Isotopen markierte Aminosäuren) Medium kultiviert. Nach der Ernte werden sie gemeinsam prozessiert und mittels LC-MS analysiert. Die eingebauten schweren Aminosäuren verursachen dabei einen Massenshift mit dem es möglich ist die Peptide anhand der Intensitäten der MS<sup>1</sup>- Signale zu quantifizieren.**

Zellen werden auf nicht markiertem „light“ Medium und auf „heavy“ Medium mit stabil-Isotopen markierten Aminosäuren, wie Lysin und Arginin (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N), kultiviert. Diese stabil-Isotopen markierten Aminosäuren werden während der Proteinbiosynthese vollständig in die Zelle eingebaut. Nach durchschnittlich 5-8 Zellteilungszyklen liegt die Markierungseffizienz bei 95-99 %. Lysin und Arginin bieten sich vor allem bei tryptischen Verdauen (Trypsin schneiden nach Lysin und Arginin) an, da somit gewährleistet wird, dass jedes tryptische Peptid gelabelt vorliegt und zur Quantifizierung verwendet werden kann. Nach der Ernte beider Zellarten (light

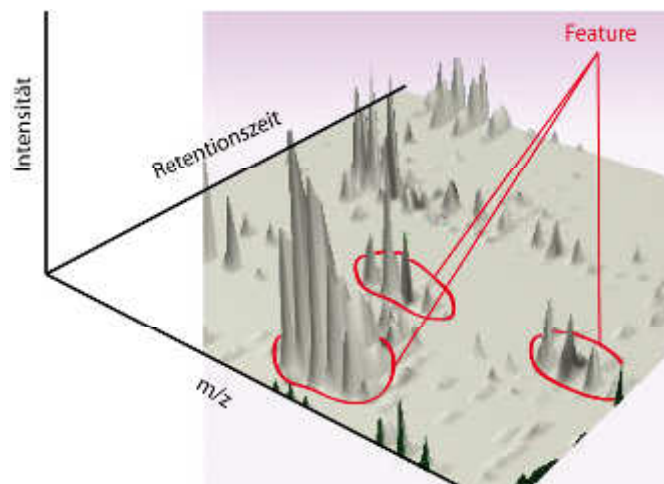


und heavy) werden diese vereinigt, gemeinsam prozessiert (Lyse, proteolytischer Verdau etc.) und mittels LC-MS gemessen. Gleiche Peptide der unterschiedlichen Proben haben dabei gleiche Eigenschaften und werden somit zur gleichen Zeit von der LC eluiert und im MS analysiert. Unterschieden werden die Peptide durch ihren Massenshift, der durch die stabil-Isotopen Markierung der Aminosäuren verursacht wird. Die Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich der Peakflächen der MS<sup>1</sup> Signale (siehe Kapitel 3.3.1) der leichten und der schwer markierten Peptide. Der Vorteil dieser Art der Quantifizierung liegt darin, dass die Proben schon in einem sehr frühen Stadium der Probenvorbereitung miteinander vereinigt werden und es somit keine Unterschiede in der Lyse und dem Verdau der Proben gibt, die die Quantifizierung beeinflussen könnten. Ein Nachteil liegt jedoch darin, dass diese Art der Quantifizierung die Komplexität der massenspektrometrischen Analyse stark erhöht, da die Peptide durch den Massenshift als zwei unabhängige Signale auftreten, die einzeln isoliert und fragmentiert werden können.

### 3.5.3 Labelfreie Quantifizierung mittels LC-MS

Bei der labelfreien Quantifizierung wird ohne chemische und metabolische Markierung gearbeitet. Die zu vergleichenden Proben werden unabhängig voneinander aufbereitet, verdaut und mittels LC-MS analysiert. Die Quantifizierung erfolgt dabei durch den Vergleich der Signalintensitäten von sogenannten Features, also MS<sup>1</sup> Signalen, die anhand der Retentionszeit, des m/z-Verhältnisses und des Isotopenmusters charakterisiert werden (siehe Abbildung 16). Alternativ kann die Quantifizierung auch durch „spectral counting“ erfolgen [95]. Dabei werden die während der MS-Messung identifizierten Spektren pro Protein gezählt und als Maß für die Abundanz eines Proteins verwendet. Eine bekannte Methode dabei ist die Bestimmung des NSAF (normalized spectral abundance factor) [96]. Dabei werden die identifizierten Spektren pro Protein auf die jeweilige Proteinlänge normalisiert. Je höher der NSAF ist, desto höher ist die Konzentration des jeweiligen Proteins in der gemessenen Probe. Ein Vorteil der labelfreien Quantifizierung ist, dass die Anzahl der zu quantifizierenden Proben nicht durch die Verwendung einer Markierung, wie bei iTRAQ (4 oder 8 Proben), limitiert ist. Hinzu kommt, dass diese Methode nicht auf die Verwendung von Zellkultur beschränkt ist wie SILAC. Außerdem kann diese Art der Quantifizierung, im Vergleich zu der Verwendung einer chemischen oder metabolischen Markierung, kostengünstiger sein. Entscheidend bei der labelfreien Quantifizierung ist jedoch, dass sowohl die Probenvorbereitung aller Proben, als auch die LC-MS Messungen reproduzierbar sind, was die Methode für Fehler anfällig machen kann.

Abweichungen in den Retentionszeiten oder Sprayinstabilitäten können dazu führen, dass eine aussagekräftige Quantifizierung nicht mehr möglich ist. Interne Standards, welche vor der Messungen zur jeder Probe zugefügt werden, können jedoch dafür genutzt werden die Retentionszeiten verschiedener Läufe anzugleichen.



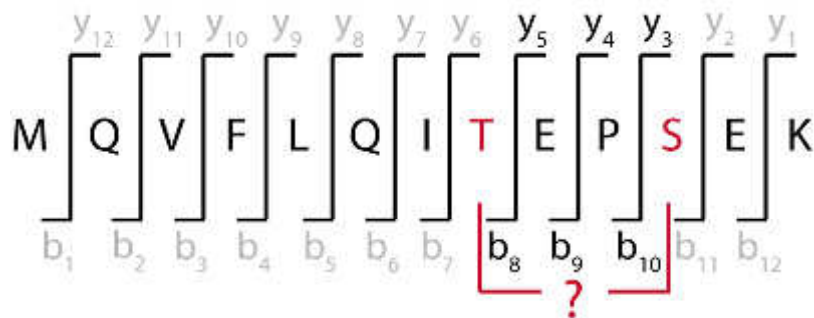
**Abbildung 16:** Beispielhafte Darstellung von Features.  $MS^1$  Signale werden anhand ihrer Retentionszeit, des  $m/z$ -Verhältnisses und des Isotopenmusters charakterisiert und bilden ein Feature.

### 3.6 Datenauswertung

Bei der Messung von Proben mittels LC-MS werden vom Massenspektrometer die  $m/z$ -Verhältnisse und Intensitäten von Vorläufer-Ionen und den dazugehörigen Fragment-Ionen aufgezeichnet. Durch Vergleich dieser Ergebnisse mit Proteindatenbanken, können anschließend Peptide identifiziert werden. Ein Suchalgorithmus, welcher vorwiegend dafür in dieser Arbeit verwendet wurde, ist Mascot [97]. Bei der Datenauswertung verdaut Mascot zunächst alle Proteine, die in der gewählten Datenbank enthalten sind, theoretisch, also *in silico*. Die Masse der analysierten Peptide ( $MS^1$ ) wird aus dem aufgenommenen  $m/z$ -Verhältnis und der Ladung berechnet und mit der Masse aller theoretischen Peptide der Datenbank verglichen. Im nächsten Schritt werden, basierend auf dieser Masse, Peptide der Datenbank *in silico* fragmentiert und die theoretischen Fragment-Ionen mit den tatsächlich gemessenen ( $MS/MS$ ) verglichen. Die Zuordnung der Peptide zu den aufgenommenen Spektren erfolgt im Rahmen vorher bestimmter Massentoleranzen und Massengenauigkeiten.

Bei der Datenanalyse von Phosphopeptiden ist, neben der Identifizierung der Peptide, die Frage an welcher Aminosäure das gefundene Peptid phosphoryliert ist ein weiterer wichtiger Punkt. Neben der manuellen Bestimmung der richtigen Phosphorylierungsstelle durch Analyse der einzelnen Fragmentspektren, können dafür Algorithmen verwendet werden, die in der Lage sind die Phosphorylierungsstelle mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit anzugeben. Die gängigsten Algorithmen dafür sind phosphoRS und Ascore. PhosphoRS generiert theoretische Spektren für alle möglichen Isoformen eines phosphorylierten Peptids. Diese werden mit dem tatsächlich aufgenommenen Spektrum des Peptids verglichen. Anschließend wird geschätzt mit welcher Wahrscheinlichkeit das aufgenommene und die theoretischen Spektren zusammenpassen [98].

Ascore hingegen schaut sich sogenannte „site-determining-ions“ im Spektrum hinsichtlich ihres Auftretens und ihrer Intensität an und berechnet basierend darauf die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Phosphorylierungsstelle. „Site-determining-ions“ sind die Ionen im Spektrum, mit denen eindeutig die richtige Phosphorylierungsstelle bestimmt werden kann. In Abbildung 17 sind dies die Ionen  $y_3$ - $y_5$  und  $b_8$ - $b_{10}$ . Können beispielsweise die Ionen  $y_3$ - $y_5$  nur mit Phosphorylierung (+80 Da,  $\text{HPO}_3$ ) und/oder mit Neutralverlust (-98 Da,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , siehe Kapitel 3.3.1), die  $b_8$ - $b_{10}$  Ionen nur ohne Neutralverlust oder zusätzlicher Phosphatgruppe identifiziert werden, kann davon ausgegangen werden, dass S11 phosphoryliert ist. Im umgekehrten Fall hingegen, wäre T8 phosphoryliert [99]. Nicht immer ist es jedoch möglich alle b- und y- Ionen zu sehen, was die Bestimmung der richtigen Phosphorylierungsstelle erschwert.



**Abbildung 17: Beschreibung „site-determining-ions“.** Als „site-determining-ions“ werden Ionen bezeichnet mit denen es möglich ist, die Phosphorylierungsstelle im Peptid zu bestimmen. In diesem Beispiel sind das die Ionen  $y_3$ - $y_5$  und  $b_8$ - $b_{10}$ . Können die y-Ionen mit zusätzlicher Phosphatgruppe und/oder Neutralverlust identifiziert werden, die b-Ionen jedoch nur ohne, liegt die Phosphorylierung bei S11. Im umgekehrten Fall liegt die Phosphorylierung bei T8.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

**Tabelle 2: Chemikalien**

| Chemikalie                    | Hersteller                   |
|-------------------------------|------------------------------|
| Acetonitril UPLC-Grade        | Biosolve BV, Volkenwaard, NL |
| $\alpha$ -Casein              | Sigma-Aldrich, München, D    |
| Ameisensäure (FA)             | Biosolve BV, Volkenwaard, NL |
| Ammoniumbicarbonat (ABC)      | Sigma-Aldrich, Steinheim, D  |
| Ammoniumhydroxid              | Sigma-Aldrich, Steinheim, D  |
| Benzonase                     | Merck KGaA, Darmstadt, D     |
| Rinder Serum Albumin (BSA)    | Sigma-Aldrich, München, D    |
| Calciumchlorid                | Merck KGaA, Darmstadt, D     |
| Dithiothreitol (DTT)          | Roche, Mannheim, D           |
| Ethanol                       | Merck KGaA, Darmstadt, D     |
| Glykolsäure                   | Sigma-Aldrich, Steinheim, D  |
| Guanidinium-Hydrochlorid      | Merck KGaA, Darmstadt, D     |
| Harnstoff                     | Sigma-Aldrich, München, D    |
| Iodacetamid                   | Sigma-Aldrich, München, D    |
| Magnesiumchlorid              | Sigma-Aldrich, München, D    |
| Methanol                      | Biosolve BV, Volkenwaard, NL |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)    | Sigma-Aldrich, Steinheim, D  |
| Phosphorsäure (89%)           | Merck KGaA, Darmstadt, D     |
| PhosStop                      | Roche, Mannheim, D           |
| Phthalsäure                   | Sigma-Aldrich, Steinheim, D  |
| RapiGest                      | Waters GmbH, Eschborn, D     |
| Triethylaminbicarbonat (TEAB) | Sigma-Aldrich, Steinheim, D  |

## Material und Methoden

|                                 |                              |
|---------------------------------|------------------------------|
| Triflouressigsäure (TFA)        | Biosolve BV, Volkenwaard, NL |
| Triflourethanol                 | Sigma-Aldrich, Steinheim, D  |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan | Merck KGaA, Darmstadt, D     |
| Trypsin Gold                    | Promega, MA, USA             |
| Trypsin T1426                   | Sigma-Aldrich, Steinheim, D  |
| Wasserstoffperoxid              | Merck KGaA, Darmstadt, D     |

**Tabelle 3: Chromatographie- und Verbrauchsmaterialien**

| Materialien  | Hersteller                                   |
|--|--|
| BCA Kit  | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D        |
| iTRAQ 4-plex Kit   | Applied Biosystems, Darmstadt, D             |
| PolyMAC-Ti Kit   | Tymora Analytical Operations, Lafayette, USA |
| Poros Oligo R3   | PerSeptive Biosystems, Framingham, USA       |
| Sachtopore Titandioxid   | ZirChrom Separations, Anoka, USA             |
| SPEC C18 AR Tips   | Agilent Technologies, Böblingen, D           |
| Titandioxid Partikel   | GL Science, Tokyo, Japan                     |
| Titansphere <sup>®</sup> Phos-TiO Kit  | GL Science, Tokyo, Japan                     |
| 3M Empore C18 Filter   | 3M Bioanalytical Tech., St. Paul, USA        |
| 3M Empore C8 Filter  | 3M Bioanalytical Tech., St. Paul, USA        |
| Acclaim PepMap C18<br>Vorsäule: 100 µm ID, 2 cm<br>Hauptsäule: 75 µm ID, 50 cm | Thermo Fisher Scientific, Germering, D       |
| Kinetex C18<br>Vorsäule: 100 µm ID, 2 cm<br>Hauptsäule: 75 µm ID, 50 cm        | Phenomenex, Aschaffenburg, D                 |
| Pepswift Monolith<br>Vorsäule: 200 µm ID, 5 mm<br>Hauptsäule: 200 µm ID, 5 cm  | Thermo Fisher Scientific, Germering, D       |
| TSKgel Amide-80<br>250 µm ID, 15cm   | Tosoh Bioscience, Stuttgart, D               |

**Tabelle 4: Geräte**

| <b>Geräte</b>  | <b>Hersteller</b>                     |
|--|---------------------------------------|
| 5424 Tischzentrifuge   | Eppendorf, Hamburg, D                 |
| Feinwaage RC 210 D   | Sartorius AG, Göttingen, D            |
| Inkubationsofen  | Memmert, Schwabach, D                 |
| LTQ-Orbitrap   | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D |
| LTQ-Orbitrap-Velos Pro   | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D |
| Orbitrap Elite   | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D |
| pH Elektrode blue line pH 16                                     | Schott Instruments, Mainz, D          |
| pH Meter Lab 850   | Schott Instruments, Mainz, D          |
| Pipetten 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 50-1000 µl | Eppendorf, Hamburg, D                 |
| Plate-Reader Multiscan FC  | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D |
| Q Exactive   | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D |
| Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL                           | Eppendorf, Hamburg, D                 |
| Thermomixer comfort + Adapter                                    | Eppendorf, Hamburg, D                 |
| UltiMate® 3000 RSLCnano  | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D |
| Vakuumstation  | Agilent Technologies, Böblingen, D    |

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Aufreinigung von Mitochondrien aus *S.cerevisiae*

Mitochondrien, die für verschiedene Projekte in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden in der Fakultät für Biochemie der Universität Freiburg aufgereinigt. Dafür wurden *S.cerevisiae* Zellen in respiratorischen YPG-Medium (1 % Hefeextrakt, 2 % Bactopecton, 3 % Glycerin, pH 5.0) bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600} = 1$  kultiviert und geerntet. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einem Teflon-Potter aufgebrochen. Durch Zentrifugation wurden die Zelltrümmer und Nuclei entfernt. Mit Hilfe einer Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden weitere Verunreinigungen, wie Vakuolen und Endoplasmatisches Retikulum, entfernt und die Mitochondrien somit aufgereinigt [100].

### 4.2.2 Probenvorbereitung

#### Lyse

Zur Lyse wurden die Pellets in Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden sie abwechselnd für wenige Sekunden im Ultraschallbad behandelt, gekühlt und mit einem Vortexer vermischt, bis die Flüssigkeit klar wurde. Zur Optimierung der Solubilisierung von Membranproteinen wurden drei verschiedene Puffer getestet, die in der folgenden Tabelle dargestellt sind.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Puffer, die zur Optimierung der Solubilisierung von Membranproteinen verwendet wurden.**

| Puffer 1                             | Puffer 2      | Puffer 3       |
|--------------------------------------|---------------|----------------|
| 1 % SDS<br>150 mM NaCl<br>50 mM Tris | 8 M Harnstoff | 0,1 % RapiGest |

Bei Proben, die für anschließende Phosphopeptid-Analysen genutzt wurden, wurde zusätzlich PhosStop (Roche) zum Puffer zugefügt. PhosStop ist ein Gemisch verschiedener Phosphatase Inhibitoren, welche die Dephosphorylierung der Proteine nach der Lyse durch noch intakte Phosphatasen der Zelle verhindern sollen.

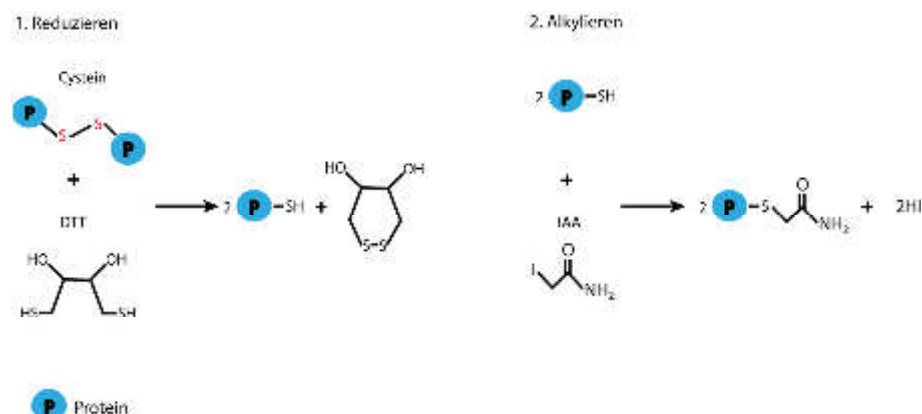
Hela-Zellen (menschliche Zelllinie, gewonnen aus einem Zervixkarzinom von **Henrietta Lacks**), die zur Optimierung der Phosphoproteom-Analyse genutzt wurden, enthalten DNA, die vor der Proteinmengenbestimmung und dem Verdau entfernt werden muss. Zum Verdau der DNA wurden die Proben nach der Lyse mit dem Enzym Benzonase behandelt (35 U Benzonase pro 100 µg Probe, 30 min bei 37°C, 2 mM MgCl<sub>2</sub>).

### Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Der BCA-Assay wurde nach Herstellerangaben in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Standardprotein zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde BSA verwendet. Der lineare Bereich des Assays liegt bei 5 - 250 µg/mL. Jede Probe wurde in Triplikaten analysiert. Aus den BCA Reagenzien A und B wurde eine „working solution“ hergestellt (Verhältnis 50:1). Jeweils 200 µL dieser Lösung wurden zu jeder Probe (25 µL) zugefügt und die Platte für 30 min bei 60°C inkubiert. Um ein Verdampfen der Lösung bei der Temperatur zu vermeiden, wurde die Platte während der Inkubation mit einer Folie bedeckt. Die Messung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm.

### In-solution Verdau

Um die Verdaueffizienz zu verbessern, wurden die Proben vor Verdau mit DTT (Dithiothreitol) und IAA (Iodacdamid) behandelt (Carbamidomethylierung). DTT (10 mM, 30 min, 56°C) spaltet die Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten, sodass die Proteine sich entfalten können. Durch Zugabe von IAA (30 mM, 30 min, RT, im Dunkeln, da IAA instabil bei Lichteinfluss ist) werden die gespaltenen Disulfidbrücken alkyliert, was ihre erneute Bildung verhindert (siehe Abb. 18).



**Abbildung 18: Carbamidomethylierung von Proteinen. DTT spaltet und reduziert Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Cysteinen. IAA alkyliert diese anschließend und verhindert somit deren erneute Bildung.**



## Material und Methoden

---

Zum Entfernen des SDS-Puffers aus der Probe wurde sowohl die Protein-Fällung mit Ethanol, als auch das FASP Protokoll verwendet. Bei der Fällung wurde die lysierte Probe mit eiskaltem Ethanol (bei -20 °C) versetzt, bei -20°C inkubiert und abzentrifugiert (30 min, 16000 g, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 2 M Guanidiniumhydrochlorid (Gu-HCl) resuspendiert. Vor dem Verdau wurde die Lösung mit 50 mM Ammoniumbicarbonat Puffer (ABC-Puffer) auf 0,2 M Gu-HCl verdünnt, da zu hohe Gu-HCl Konzentrationen die Aktivität von Trypsin beeinträchtigen. Der Verdau erfolgte mit der Protease Trypsin über Nacht bei 37°C mit einem Verhältnis von Protein- zu Trypsin von 20:1 (w:w). Zur Prüfung der optimalen Verdaubedingungen für den Verdau von Membranproteinen wurden verschiedene Zusätze im Verdauopuffer untersucht (siehe Tabelle 6). Diese Zusätze sollen die Löslichkeit der Proteine im Verdauopuffer verbessern. Der Verdau wurde durch Zugabe von 10 % iger TFA auf eine TFA-Endkonzentration von 1 % abgestoppt.

**Tabelle 6: Zusätze zum Verdauopuffer nach Ethanol - Fällung. Der Verdauopuffer (0,2 M Gu-HCl mit 50 mM ABC) wurde zur Optimierung der Verdaubedingungen von Membranproteinen mit verschiedenen Zusätzen ergänzt. (Mit MeOH = Methanol, TFE = Trifluorethanol, MeCN = Acetonitril)**

|               | <b>Puffer A</b> | <b>Puffer B</b> | <b>Puffer C</b> | <b>Puffer D</b> | <b>Puffer E</b> | <b>Puffer F</b> |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Zusatz</b> | -               | 10 %<br>MeCN    | 10 %<br>MeOH    | 30 %<br>MeOH    | 60 %<br>MeOH    | 5 %<br>TFE      |

Des Weiteren wurde das FASP Protokoll modifiziert nach Wisniewski *et al.* [63] verwendet. Dafür wurden die Proben 1:4 mit FASP-Puffer 1 (Pufferzusammensetzung siehe Tabelle 7) verdünnt, auf den Filter gegeben und für 20 min bei 13000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe 3x mit 100 µL FASP-Puffer 1 (10 min, 13000 g, RT) und 3 x mit FASP-Puffer 2 (10 min, 13000 g, RT) gewaschen. Der Verdau erfolgte mit Trypsin (37°C, über Nacht) in 100 µL Verdauopuffer auf dem Filter. Zur Optimierung der Verdaubedingungen für Membranproteine wurden auch hier Verdauopuffer mit verschiedenen Zusätzen geprüft (FASP-Puffer 3 a-d). Das Verhältnis von Protein zu Protease (w/w) lag bei 20:1. Nach dem Verdau wurden die verdauten Peptide abzentrifugiert (20 min, 13000 g, RT) und der Filter jeweils 1x mit 50 µL Puffer 3a und 1x 50 µL H<sub>2</sub>O gewaschen.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der FASP-Puffer**

|                         | <b>Puffer 1 (pH 8.5)</b> | <b>Puffer 2</b> | <b>Puffer 3a</b> | <b>Puffer 3b</b> | <b>Puffer 3c</b> | <b>Puffer 3d</b> |
|-------------------------|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Harnstoff</b>        | 8 M                      | -               | 0,1 M            | 0,1 M            | 0,1 M            | 0,1 M            |
| <b>Tris</b>             | 100 mM                   | -               | -                | -                | -                | -                |
| <b>ABC</b>              | -                        | 50 mM           | 50 mM            | 50 mM            | 50 mM            | 50 mM            |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> | -                        | -               | 1 mM             | 1 mM             | 1 mM             | 1 mM             |
| <b>Zusatz</b>           | -                        | -               | -                | 10 %<br>MeCN     | 30 %<br>MeOH     | 5 % TFE          |

### **In-Gel Verdau**

Zur Bestimmung der Stöchiometrie des Tim23 Komplexes (siehe Kapitel 1.3.2 und 5.6) wurde der Komplex aus Mitochondrien isoliert und auf ein Blau-natives Gel aufgetragen. Diese Schritte wurden von Kooperationspartnern (Gruppe von Dr. Nils Wiedemann, Universität Freiburg) durchgeführt. Für den darauffolgenden in-Gel Verdau der Probe wurden die ausgeschnittenen Gelstücke abwechselnd zweimal in Lösung A (50 mM ABC) und Lösung B (1:1 Lösung A: MeCN) gewaschen (37°C, unter Schütteln). Anschließend erfolgte die Carbamidomethylierung mit DTT und IAA, wie beim in-Lösung Verdau beschrieben. Im nächsten Schritt wurden die Gelstücke erneut abwechselnd zweimal in Lösung A und Lösung B gewaschen und in der Vakuumszentrifuge komplett eingetrocknet. Für den Verdau wurden die Gelstücke mit einer Trypsinlösung (12,5 ng/μL Trypsin im 50 mM ABC) rehydratisiert (je nach Größe des Gelstücks bis zu 20 μL) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion der Peptide wurden die Gelstücke für je 15 min zweimal in 15 μL 0,1% TFA und einmal in einem Gemisch aus 0,1% TFA und MeCN (1:1) bei 37 °C inkubiert. Die Überstände wurden jeweils abgenommen und vereinigt. Anschließend wurde das gesamte Extrakt in der Vakuumszentrifuge eingetrocknet und in 0.1 % TFA aufgenommen.

### Oxidieren von Methionen

Verdaute Proteine wurden in der Vakuumszentrifuge komplett eingetrocknet und in angesäuertem ABC (50 mM, pH 5,5)-Puffer aufgenommen. Nach Zufügen von 3  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) wurden die Peptide zur vollständigen Oxidation aller Methionine für 30 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Probe wieder eingetrocknet und konnte, je nach Bedarf, weiterverwendet werden.

### 4.2.3 Anreicherungsverfahren

Zur Anreicherung phosphorylierter Peptide wurde in dieser Arbeit Titandioxid unter Verwendung verschiedener Methoden genutzt: a) im Batch-Verfahren I mit selbst hergestellten Tips b) im Batch-Verfahren II im Reaktionsgefäß/mit selbst hergestellten Tips, c) mit dem Titansphere<sup>®</sup> Phos-TiO Kit und d) dem PolyMAC-Ti Kit. Diese Ansätze werden im Folgenden näher beschrieben. Ziel war es ein robustes, effizientes und reproduzierbares Protokoll für die Analyse geringer Probemengen zu etablieren und zu optimieren.

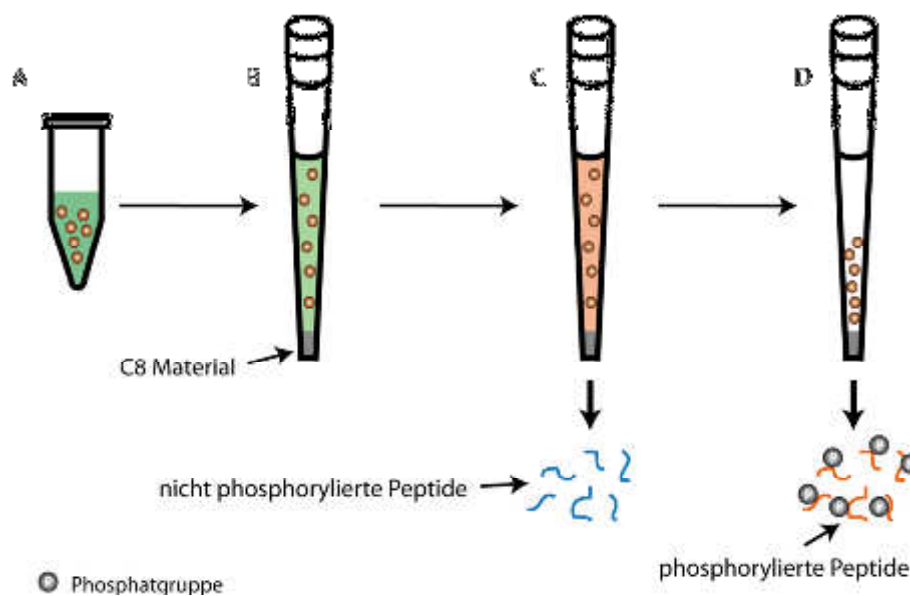
#### Batch-Verfahren I mit selbst hergestellten Tips

Im ersten Schritt wurde die anzureichende Probe mit Titandioxid Partikeln (GL Science) im Ladepuffer für 30 min (RT, unter Schütteln) in einem Reaktionsgefäß inkubiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist Tabelle 8 zu entnehmen. Zur Optimierung der Anreicherung phosphorylierter Peptide aus Membranproteinen wurden verschiedene Verhältnisse von Partikel- zu Proteinmenge (1:1, 1:5, 1:10, 1:20) untersucht.

**Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer für die Titandioxid-Anreicherung Batch-Verfahren I**

| Ladepuffer   | Waschpuffer            | Eluent 1 (5mL)   | Eluent 2 (5mL)  | Eluent 3 (5mL)                                      |
|--|------------------------|--|---|---|
| 80 % MeCN<br>2,5 % TFA<br>Phthalsäure<br>(gesättigt) | 80 % MeCN<br>0,1 % TFA | 250 mM ABC<br>130 $\mu\text{l}$ $\text{NH}_4\text{OH}$<br>(pH 9) | 125 mM ABC<br>900 $\mu\text{l}$ $\text{NH}_4\text{OH}$<br>14 $\mu\text{l}$ $\text{H}_3\text{PO}_4$<br>(pH 10,5) | 330 $\mu\text{l}$ $\text{NH}_4\text{OH}$<br>(pH 11) |

Im nächsten Schritt wurde die Lösung in einen selbst hergestellten Tip überführt. Dieser bestand aus einer Pipettenspitze (200  $\mu$ L), die am unteren Ende mit C8 Material verschlossen wurde. Dadurch wurden die Partikel in der Spitze zurückgehalten, die Puffer hingegen konnten durch Zentrifugation des Tips (2 min, 1000 g) abgetrennt werden. Die Partikel wurden mit Ladepuffer (2x) und Waschlösung (4x) gewaschen, mit Elutionspuffer in ein sauberes Reaktionsgefäß eluiert und anschließend mit Ameisensäure (FA) angesäuert (pH 2-3). In Abbildung 19 ist das Prinzip der Anreicherung mit selbst hergestellten Tips nochmal dargestellt [101].



**Abbildung 19: Prinzip der Titandioxid Anreicherung mit selbst gebauten Tips; A: Die anzureichende Probe wird in einem Reaktionsgefäß mit  $\text{TiO}_2$  - Partikeln inkubiert; B: Die Probe wird in einen selbst hergestellten Tip überführt. C: Durch verschiedene Waschschrte werden die nicht phosphorylierten Peptide entfernt. D: Im letzten Schritt werden die phosphorylierten, angereicherten Peptide von den Titandioxid Partikeln eluiert und in einem sauberen Gefäß gesammelt.**

### Batch-Verfahren II in Reaktionsgefäßen/mit selbst hergestellten Tips

Die hier beschriebene Methode ist eine Anreicherung von phosphorylierten Peptiden mit Hilfe von Titandioxid in zwei Durchgängen. Im ersten Durchgang wurde die anzureichende Probe für 10 min (RT, unter Schütteln) mit Titandioxid-Partikeln (Verhältnis Proteine: Partikel 1:6 (w:w)) im Ladepuffer (1 mL) in einem Reaktionsgefäß inkubiert (Pufferzusammensetzungen siehe Tabelle 9). Der Überstand wurde abgenommen und für weitere 10 min (RT, unter Schütteln) mit neuen Titandioxid-Partikeln (Verhältnis Proteine: Partikel 1:3 (w:w)) inkubiert. Bei komplexen Proben folgte eine dritte Anreicherung (10 min, RT, unter Schütteln) mit einem Verhältnis von Protein- zu Partikelmenge von 1:1,5 (w:w). Die Titandioxidpartikel von allen

Anreicherungsschritten wurden in 100 µL Ladepuffer vereinigt und anschließend mit jeweils 100 µL Waschpuffer 1 und 2 gewaschen. Nach den Waschsritten wurden die Partikel in der Vakuumzentrifuge getrocknet, um alle TFA- und MeCN-Reste zu entfernen. Zur Elution der phosphorylierten Peptide wurden die Partikel für 10 min in 100 µL Elutionspuffer inkubiert, der Elutionspuffer in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und mit FA angesäuert (pH 2-3).

**Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer für die Titandioxid-Anreicherung Batch-Verfahren II**

|                       | <b>Durchgang 1</b>                      | <b>Durchgang 2</b>                |
|-----------------------|---|-----------------------------------|
| <b>Ladepuffer</b>     | 80 % MeCN<br>5 % TFA<br>1 M Glykolsäure | 70 % MeCN<br>2 % TFA              |
| <b>Waschpuffer 1</b>  | 80 % MeCN<br>1 % TFA                    | 50 % MeCN<br>0.1 % TFA            |
| <b>Waschpuffer 2</b>  | 10 % MeCN<br>0,1 % TFA                  | -                                 |
| <b>Elutionspuffer</b> | 1 % NH <sub>4</sub> OH (pH: 11.3)       | 1 % NH <sub>4</sub> OH (pH. 11.3) |

Zur Verbesserung der Spezifität der Anreicherung wurde die angereicherte Probe für den 2. Durchgang in der Vakuumzentrifuge komplett eingetrocknet, in 1 mL Ladepuffer des Durchgangs 2 aufgenommen und ein weiteres Mal, wie oben beschrieben, jedoch mit leicht veränderten Puffern (siehe Tabelle 9), angereichert.

Bei der Verwendung von Reaktionsgefäßen wurden die Titandioxid Partikel in den jeweiligen Puffern inkubiert, anschließend durch Abzentrifugieren (2 min, 1000g) pelletiert und der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Nach dem letzten Elutionsschritt wurde die angereicherte Probe durch eine 200 µL Pipettenspitze, die mit C8 Material verschlossen war, gedrückt, um alle Titandioxid Partikel von der Probe abzutrennen.

## Material und Methoden

Bei der Verwendung von selbst hergestellten Tips wurde wie in Abbildung 19 beschrieben vorgegangen. Um die beiden Verfahren Batch I und Batch II besser vergleichen zu können, ist in der nachfolgenden Abbildung ein schematischer Vergleich beider Methoden dargestellt.

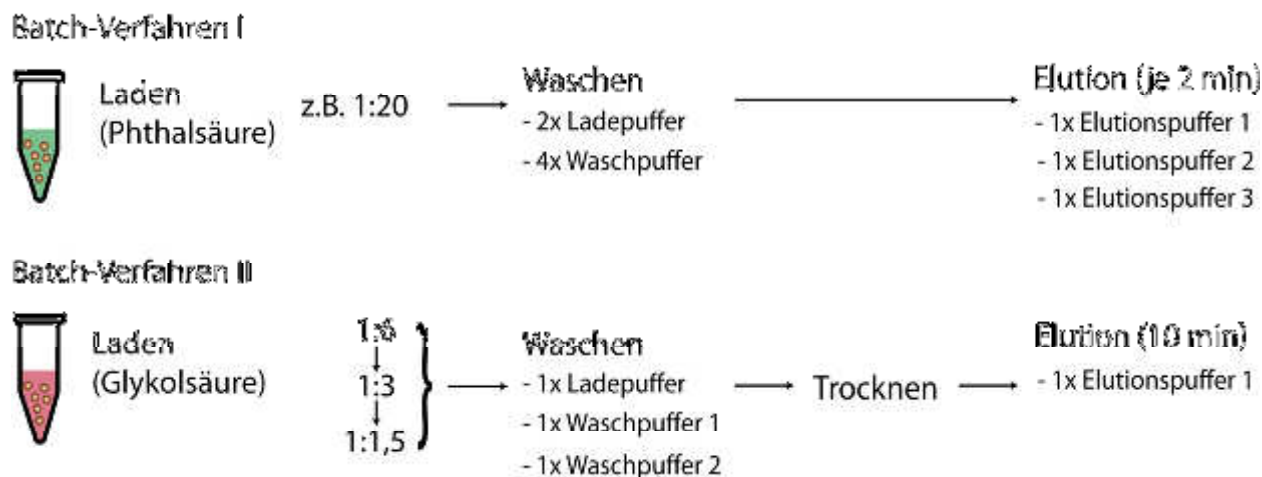


Abbildung 20: Schematischer Vergleich zwischen Batch-Verfahren I und II.

### Titansphere® Phos-TiO Kit

Das Titansphere® Phos-TiO Kit wurde nach der Anleitung des Herstellers verwendet. Die einzelnen Puffer wurden in die mit Titandioxid-Partikeln befüllten Säulen pipettiert und anschließend abzentrifugiert. Die Pufferzusammensetzung ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Puffer des Titansphere® Phos-TiO Kits

| Puffer A               | Puffer B                         | Eluent A               | Eluent B       |
|------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------|
| 80 % MeCN<br>0,5 % TFA | 25 % Puffer A<br>75 % Milchsäure | 5 % NH <sub>4</sub> OH | 5 % Pyrrolidin |

Die einzelnen Schritte der Anreicherung sind kurz in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 11: Workflow bei der Verwendung des Titansphere® Phos-TiO Kits

| Aktivierung                      | Beladen                                    | Waschen                          | Eluieren                         |
|----------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|
| 20 µL Puffer A<br>(3000g, 2 min) | Probe in 50 µL Puffer B<br>(1000g, 10 min) | 20 µL Puffer B<br>(3000g, 2 min) | 50 µL Eluent A<br>(1000g, 5 min) |
| 20 µL Puffer B<br>(3000g, 2 min) | <b>5 x beladen</b>                         | 20 µl Puffer A<br>(3000g, 2 min) | 50 µL Eluent B<br>(1000g, 5 min) |
|                                  |  | <b>Je 3 x</b>                    |                                  |

### PolyMAC-Ti Kit

Das PolyMAC-Ti (Polymer-based Metal ion affinity capture) Kit wurde nach den Herstellerangaben verwendet. Bei der Anreicherung binden phosphorylierte Peptide an ein lösliches Nanopolymer, welches mit Titan-Ionen beladen ist. Anschließend bindet das Polymer an sogenannte „capture beads“. Von diesen Partikeln können alle nicht spezifisch gebundenen Peptide herausgewaschen und im letzten Schritt die phosphorylierten Peptide eluiert werden. Schematisch ist dies in Abbildung 21 dargestellt. Das detaillierte Protokoll ist im Anhang dieser Arbeit zu finden. Durch das, im Gegensatz zu herkömmlichen Titandioxid-Partikeln, lösliche Polymer entsteht eine homogene Lösung bei der Anreicherung der phosphorylierten Peptide. Dadurch soll die Anreicherung laut Hersteller effizienter und reproduzierbarer werden.

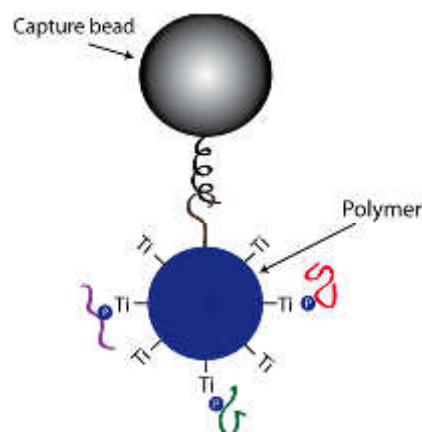


Abbildung 21: Prinzip der Anreicherung mit dem PolyMAC Kit; Phosphorylierte Peptide werden an ein lösliches Polymer gebunden, dessen Oberfläche mit Titanium beladen ist. Das Polymer bindet anschließend an capture beads. Die phosphorylierten Peptide können dann gewaschen und eluiert werden.

## 4.2.4 Entsalzen mittels Festphasenextraktion

Das Entsalzen von Proben diente dazu Salze und andere Komponenten, die für die nachfolgende HPLC Auftrennung störend sind, aus der Probe zu entfernen und erfolgte mit C18-Material. Je nach Probenmenge wurden dafür verschiedene SPEC C18 AR Tips genutzt, die mit unterschiedlichen Mengen an C18 Material beladen waren (15 mg bzw. 4 mg). Die Bindekapazität des Materials beträgt 5 - 10 %. Das bedeutet beispielsweise für 4 mg Tips, dass damit 200 - 400 µg Peptide entsalzt werden können. Die einzelnen Schritte des Entsalzens sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Das C18-Material wird im ersten Schritt mit MeCN aktiviert (mögliche gebundene Stoffe werden vom C18 Material abgelöst). Anschließend wird es mit 0,1 % TFA äquilibriert und mit der angesäuerten Probe (pH 2-3) beladen. Die Salze werden durch mehrmaliges Waschen mit 0,1 % TFA herausgespült. Im letzten Schritt wird die Probe vom C18 Material mit Hilfe von MeCN eluiert.

Das Entsalzen phosphorylierter Peptide nach der Anreicherung mit Titandioxid erfolgte mit OLIGO™ R3-Material. OLIGO™ R3 ist ein Polymer (quervernetzte Polystyrol-divinylbenzol Partikel), welches ähnlich wie C18-Material zur Umkehrphasen Chromatographie genutzt wird, jedoch die Aufreinigung phosphorylierter Peptide verbessern soll [102]. Zum Entsalzen mit R3-Material wurde eine 200 µL Pipettenspitze mit C18-Material an der Unterseite verschlossen. Anschließend wurde das in 70 % MeCN (in 0,1 % TFA) aufgenommene R3-Material auf das C18 Material pipettiert und das MeCN mit Hilfe einer Spritze aus der Pipettenspitze gedrückt. Das dabei entstandene Bett aus R3 Material war ca. 1 cm hoch. Das R3-Material wurde, wie oben für C18 beschrieben, mit 0,1 % TFA äquilibriert, anschließend wurde die Probe aufgeladen, mehrfach mit 0,1 % TFA gewaschen und zum Schluss eluiert.

**Tabelle 12: Protokoll zur Entsalzung von Proben mit C18 und R3 Material.**

|                      | <b>SPEC C18 AR Tips</b> | <b>R3 Material</b>    |
|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| <b>Aktivieren</b>    | 2 x 100 µL MeCN         | -                     |
| <b>Äquilibrieren</b> | 2 x 100 µL TFA (0.1 %)  | 2 x 50 µL TFA (0.1 %) |
| <b>Beladen</b>       | Probe 2 x laden         | Probe 2x laden        |
| <b>Waschen</b>       | 2 x 100 µL TFA (0.1 %)  | 2x 100 µL TFA (0.1 %) |
| <b>Eluieren</b>      | 1 x 50 µL 60 % MeCN     | 1 x 50 µL 70% MeCN    |



### 4.2.5 Quantitative Ansätze

#### Stabil-Isotopen Markierung mit iTRAQ

Die Stabil-Isotopen Markierung mittels iTRAQ (4-plex) wurde nach dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Sie wurde zur Quantifizierung von Hefe-Mitochondrien auf globaler und Phosphopeptid-Ebene in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus (siehe Kapitel 5.7) verwendet.

Die zu quantifizierenden Proben wurden mit dem FASP Protokoll verdaut. Anschließend wurden pro Probe jeweils 100 µg Peptide mit iTRAQ markiert. Die Anpassung der Proteinmenge in den jeweiligen Proben erfolgte durch Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) Messungen und Vergleich der UV-Spuren der HPLC Auftrennungen der verdauten Proben. Der Nanodrop ist ein UV-Vis Spektrophotometer mit dem, bei einer Wellenlänge von 205 nm (Absorption der Peptidbindung), die Peptidkonzentration einer verdauten Probe bestimmt werden kann. Die Proben wurden vor dem Markieren komplett eingetrocknet und in 25 µL Dissolution-Puffer (aus iTRAQ Kit, 500 mM TEAB) aufgenommen. Die Label wurden mit 70 µL Ethanol gelöst und zu den einzelnen Proben zugefügt. Anschließend wurde alles für 1 h bei 25°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die mit den unterschiedlichen iTRAQ Reagenzien markierten Proben in einem neuen Reaktionsgefäß vereinigt und auf ca. 100 µL eingetrocknet. Zur Überprüfung der Labeleffizienz und zur globalen Messung der Probe wurden 5 µg abgenommen, angesäuert, mit C18-Material, wie oben beschrieben entsalzt, und anschließend mittels LC-MS analysiert [103]. Die restliche Probe wurde mit 50 µL 100 % TFA, 800 µL MeCN und 76 mg Glycolsäure aufgefüllt und mit Titandioxid (Siehe Batch-Verfahren II, Kapitel 4.2.3) angereichert.

#### Labelfreie Quantifizierung

Der labelfreie Ansatz wurde bei der Analyse des Phosphoproteoms von unterschiedlich behandelten Tabakpflanzen (siehe Kapitel 5.8) verwendet. Dafür wurden die Proben (jeweils 100 µg) mit dem FASP Protokoll verdaut und die Proteinmengen der einzelnen Proben mit Hilfe des Nanodrops angeglichen. Zur globalen Analyse wurden je 1 µg der Proben mittels LC-MS aufgetrennt und gemessen. Vor den Messungen wurden zu jeder Probe eine Mischung verschiedener stabil-Isotopen markierter Peptide als interner Standard zugefügt, um die Reproduzierbarkeit der HPLC-Auftrennung zu kontrollieren [104]. Die Zusammensetzung des Peptid Gemisches ist im Anhang zusammengefasst. Die restliche Probe wurde mit dem in

Kapitel 4.2.3 beschriebenen Titandioxid-Protokoll (Batch-Verfahren II) angereichert. Vor der Anreicherung wurden den Proben als weiterer interner Standard 10 synthetische Phosphopeptide zugefügt, die keine Homologie zu Tabak-Peptiden aufweisen (siehe Tabelle 13). Diese synthetischen Peptide wurden anschließend dazu verwendet, die Reproduzierbarkeit der Anreicherung zu überprüfen.

**Tabelle 13: Synthetische Peptide zum Monitoren der Phosphopeptid-Anreicherung. Kleine Buchstaben zeigen phosphorylierte Aminosäuren an**

| Synthetische Peptide      | M [Da]  | Ladung | m/z Verhältnis |
|---------------------------|---------|--------|----------------|
| <b>AFsFSLPRPGR</b>        | 1316,35 | 3      | 439,14         |
| <b>sLSVLSSPR</b>          | 1026,08 | 2      | 513,54         |
| <b>QPLLLsEDEEDTKR</b>     | 1752,81 | 3      | 584,93         |
| <b>SRsLTPQLNNNVPMQK</b>   | 1906,92 | 3      | 636,31         |
| <b>MAPtPIPTR</b>          | 1063,50 | 2      | 532,25         |
| <b>RGsLCATCGLPVTGR</b>    | 1570,72 | 3      | 524,24         |
| <b>LSLsDPLVAERAGTDESR</b> | 2009,95 | 3      | 670,65         |
| <b>AFsFSLPRPGR</b>        | 1314,64 | 2      | 657,82         |
| <b>LEsYRPDTDLSR</b>       | 1531,68 | 3      | 511,23         |
| <b>GIITDsFGR</b>          | 1045,47 | 2      | 523,24         |

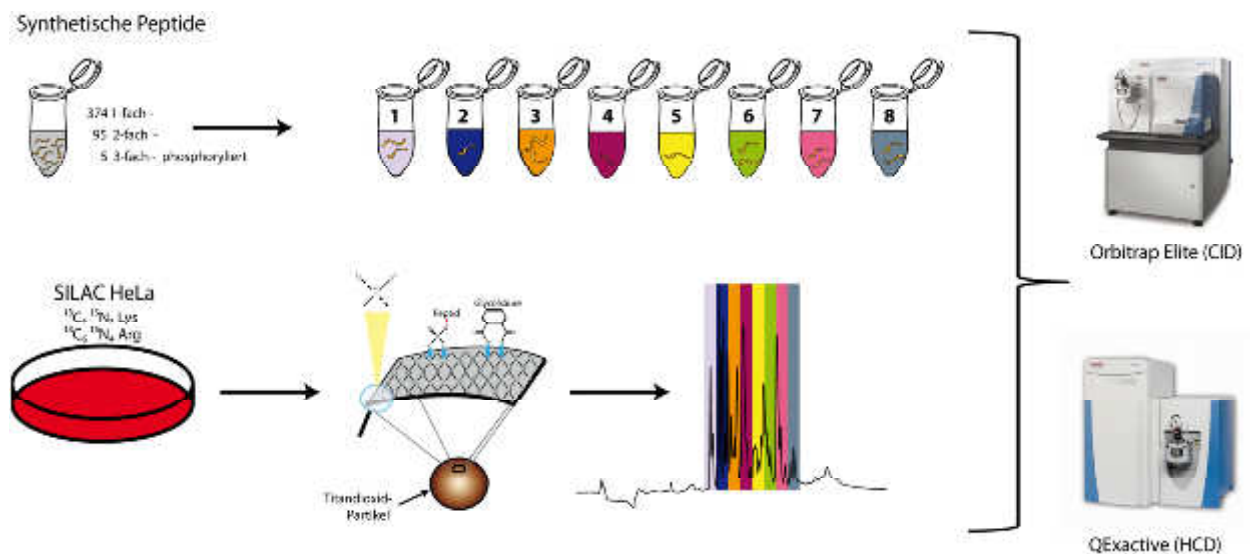
### 4.2.6 Herstellung eines realistischen Phosphopeptidstandards

SILAC markierte HeLa Zellen (Arg10 & Lys8) wurden, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, lysiert, mit Ethanol gefällt und mit Trypsin (20:1 (w/w) Protein: Protease) verdaut. Die verdauten Peptide wurden anschließend mit Titandioxid angereichert und durch eine HILIC-Auftrennung in acht verschiedene Fraktionen aufgetrennt.

Zudem wurden 474 (374 1-fach, 95 2-fach, 5 3-fach phosphoryliert) verschiedene synthetische Phosphopeptide (nicht markiert) in acht Mischungen geteilt (40 - 45 Peptide pro Mix). Dabei wurde darauf geachtet, dass unterschiedliche Isoformen des gleichen Peptides unterschiedlichen

## Material und Methoden

Mischungen zugeteilt wurden. Eine Liste der synthetischen Peptide ist im Anhang zu finden. Die acht Peptid- Mischungen wurden anschließend mit den acht verschiedenen Fraktionen der HILIC-Auftrennung gemischt und sowohl mit einem Orbitrap Elite (CID-Fragmentierung), als auch mit einem Q Exactive Massenspektrometer (HCD-Fragmentierung) gemessen. Die Arbeitsschritte zur Erstellung des Standards sind in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt.



**Abbildung 22: Arbeitsschritte zur Erstellung des Phosphopeptidstandards:** synthetische phosphorylierte Peptide wurden in acht verschiedene Mixe unterteilt, sodass unterschiedliche Isoformen in unterschiedlichen Mixen zu finden waren. Gleichzeitig wurden SILAC markierte HeLa Zellen verdaut, mit Titandioxid angereichert und mit einer HILIC Auftrennung in acht verschiedene Fraktionen geteilt. Jeweils ein Mix synthetischer Peptide wurde zu einer HILIC Fraktion zugefügt und mit LC-MS (CID und HCD) gemessen.

## 4.2.7 LC-MS Methoden

Folgende Methoden wurden bei den jeweiligen MS-Systemen verwendet:

Tabelle 14: MS-Methoden

|                             | Velos          | Orbitrap Elite | Q Exactive     |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Fragmentierung</b>       | CID            | CID            | HCD            |
| <b>MS/MS / Zyklus</b>       | 10             | 15             | 15             |
| <b>Kollisionsenergie</b>    | 35             | 35             | 35             |
| <b>Auflösung MS</b>         | 60.000         | 60.000         | 70.000         |
| <b>max. Füllmenge MS</b>    | $1 \cdot 10^5$ | $1 \cdot 10^6$ | $3 \cdot 10^5$ |
| <b>max. Füllzeit MS</b>     | 100            | 100            | 120            |
| <b>Auflösung MS/MS</b>      | 2.000          | 2.000          | 17.500         |
| <b>max. Füllmenge MS/MS</b> | $1 \cdot 10^4$ | $1 \cdot 10^4$ | $1 \cdot 10^3$ |
| <b>max. Füllzeit MS/MS</b>  | 100            | 100            | 120            |

Folgende LC-Systeme wurden verwendet:

Tabelle 15: LC-Methoden

| LC                      | Ultimate 3000                            | Ultimate 3000 RSLC                       | HILIC                                      | Monolith                                    |
|-------------------------|--|--|--|---|
| <b>Vorsäule</b>         | Kinetex C18<br>100 µm ID<br>2 cm         | Acclaim PepMap<br>100 µm ID<br>2 cm      | -  | PepSwift<br>200 µm ID<br>5 mm               |
| <b>Hauptssäule (HS)</b> | Kinetex C18<br>75 µm ID<br>30 cm         | Acclaim PepMap<br>75 µm ID<br>50 cm      | TSKgel Amid 80<br>250 µm ID<br>15 cm       | PepSwift<br>200 µm ID<br>5 cm               |
| <b>Lösungsmittel</b>    | A: 0,1 % FA<br>B: 0,1 % FA,<br>84 % MeCN | A: 0,1 % FA<br>B: 0,1 % FA,<br>84 % MeCN | A: 0,1 % TFA,<br>98 % MeCN<br>B: 0,1 % TFA | A: 0,1 % TFA<br>B: 0,08 % TFA,<br>84 % MeCN |
| <b>Gradient</b>         | 3 - 45 % B                               | 3 - 45 % B                               | 1 - 40 % B                                 | 10 - 65 % B                                 |
| <b>MS-Kopplung</b>      | Velos                                    | Orbitrap, Q Exactive,<br>Orbitrap Elite  | -  | -   |

## 4.2.8 Datenbanksuchen

Zur Auswertung der Daten in dieser Arbeit wurde der Proteome Discoverer 1.3 von Thermo Fisher Scientific genutzt. Die verwendeten Datenbanken und Einstellungen für die einzelnen Projekte sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

## Material und Methoden

**Tabelle 16: DB-Suchen; P1: Verdautests; P2: Anreicherungstests HeLa und Mitochondrien; P3: Phosphopeptid Standard; P4: TOM40 Import Experimente; P5: Bestimmung der Stöchiometrie von TIM22; P6: Zellzyklus Experimente; P7: Experimente mit Tabak-Pollen; High confidence entspricht einer false discovery rate (Wahrscheinlichkeit mit der ein Peptid falsch identifiziert wurde) (FDR) von 1 %**

|                                      | P1                                   | P2   | P3   | P4   | P5   | P6   | P7  |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--|--|--|--|---|
| <b>DB</b>                            | UniProt Human/<br>SGD                | UniProt Human/<br>SGD                        | UniProt Human +<br>Synthetische Peptide      | SGD  | SGD  | SGD  | UniProt<br>Viridiplantae                  |
| <b>Algorithmus</b>                   | Mascot                               | Mascot                                       | Mascot                                       | Mascot   | Mascot   | Mascot<br>MS Amanda                            | Mascot                                    |
| <b>Protease</b>                      | Trypsin                              | Trypsin                                      | Trypsin                                      | Trypsin  | Trypsin  | Trypsin  | Trypsin                                   |
| <b>Überlesene<br/>Schnittstellen</b> | 2                                    | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2   |
| <b>MS-Toleranz</b>                   | 10 ppm                               | 10 ppm                                       | 10 ppm                                       | 10 ppm   | 10 ppm   | 10 ppm   | 10 ppm                                    |
| <b>MS/MS-<br/>Toleranz</b>           | 0,4 Da                               | 0,4 Da                                       | 0,4 Da (CID)<br>0,02 Da (HCD)                | 0,4 Da   | 0,4 Da   | 0,02 Da  | 0,4 Da                                    |
| <b>Fixe<br/>Modifikationen</b>       | CMC                                  | CMC  | CMC  | CMC  | CMC  | CMC<br>iTRAQ 4plex (H-term)<br>iTRAQ 4plex (K) | CMC                                       |
| <b>Variable<br/>Modifikationen</b>   | Oxidation (M)                        | Oxidation (M)<br>Phosphorylierung<br>(S,T,Y) | Oxidation (M)<br>Phosphorylierung<br>(S,T,Y) | Oxidation (M)<br>Phosphorylierung<br>(S,T,Y)<br>SILAC Lys8 & Arg10 | Oxidation (M)<br>Phosphorylierung<br>(S,T,Y)<br>SILAC Lys8 & Arg10 | Oxidation (M)<br>Phosphorylierung (S,T,Y)      | Oxidation (M)<br>Phosphorylierung (S,T,Y) |
| <b>Filterkriterien</b>               | High confidence<br>2 Peptide/Protein | High confidence<br><br>PhosphoRS > 75        | High confidence<br><br>PhosphoRS > 75        | High confidence<br>2 Peptide/Protein<br>PhosphoRS > 75             | High confidence<br><br>PhosphoRS > 75                              | High confidence<br><br>PhosphoRS > 75          | High confidence<br><br>PhosphoRS > 75     |

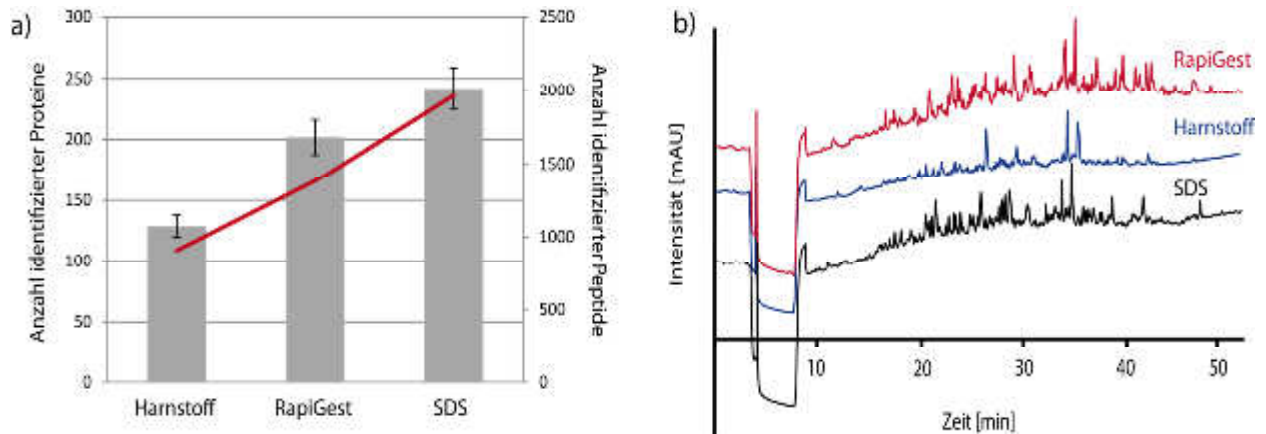
# 5. Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt. In den ersten Kapiteln wird auf die Optimierung der Lyse, des Verdau von Membranproteinen, der Anreicherung phosphorylierter Peptide und der Auswertung von Phospho-Daten eingegangen. Eine optimale und reproduzierbare Probenvorbereitung ist entscheidend für die Aussagekraft der nachfolgenden Analysen mit realen Proben. Basierend auf diesen Ergebnissen werden verschiedene Ansätze vorgestellt, mit deren Hilfe der mitochondriale Proteinimport (global und auf Phosphopeptid-Ebene) charakterisiert werden sollte.

## 5.1 Optimierung des Verdau

Die Aufreinigung mitochondrialer Außenmembranvesikel ist aufwendig, sodass nur wenig Material zur Methodenoptimierung bereitstand. Aus diesem Grund wurde zur Optimierung der Verdaubedingungen für Membranproteine auf aufgereinigte Thrombozyten-Membranen zurückgegriffen. Diese wurden von Claudia Schütz (Universität Würzburg) mit Hilfe eines 2-Phasensystems und anschließender Carbonatextraktion aufgereinigt [105]. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden drei verschiedene Lysepuffer miteinander verglichen: ein Harnstoff-Puffer, RapiGest<sup>TM</sup> und ein SDS-Puffer. Der erste Unterschied, der bei der Verwendung der verschiedenen Lysepuffer auffiel war, dass unterschiedliche Volumina der Puffer zur kompletten Lyse eines Pellets von etwa 200 µg Gesamtprotein benötigt wurden. Während bei der Verwendung von SDS nur 100 µL Puffer zur Herstellung einer klaren Lösung nötig waren, waren es bei der Verwendung von RapiGest<sup>TM</sup> bereits 300 µL und bei Harnstoff sogar 500 µL. Die SDS-haltige Probe musste vor dem proteolytischen Verdau mit Ethanol gefällt, die RapiGest<sup>TM</sup>-haltige konnte nach Ansäuern und Erhitzen direkt zum Verdau verwendet werden. Die Probe, welche mit Harnstoff lysiert wurde, musste vor dem Verdau auf eine Harnstoffkonzentration von maximal 1 M verdünnt werden, um die Trypsin Aktivität nicht zu beeinträchtigen. Nach dem Verdau wurden 0,5 µg der jeweiligen Proben (je drei Replikate pro Lysepuffer) mittels LC-MS analysiert. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 23 zusammengefasst.



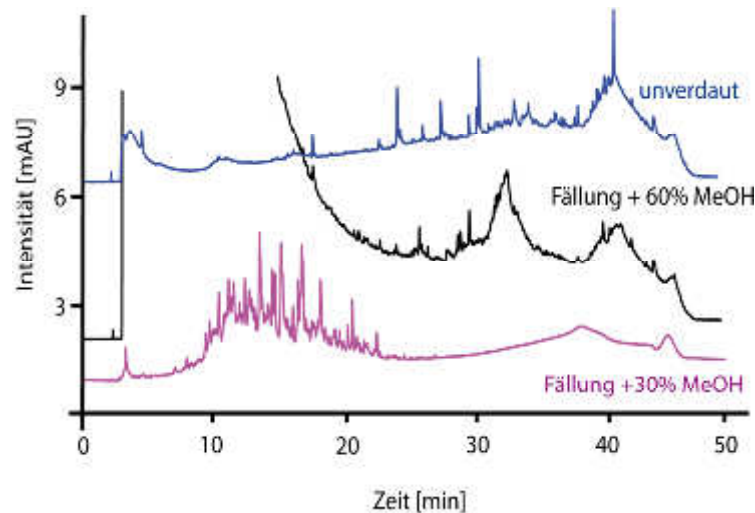
**Abbildung 23: Vergleich verschiedener Lysepuffer; a) Die Anzahl identifizierter Proteine aus der Lyse mit unterschiedlichen Puffern ist auf der Primär-, die Anzahl identifizierter Peptide auf der Sekundärachse dargestellt. b) Beispielhafte UV-Spuren von 0,5  $\mu\text{g}$  verdauten Membranproteinen nach der Lyse mit RapiGest<sup>TM</sup>, Harnstoff oder SDS**

Nach der Lyse der Probe mit SDS-haltigem Puffer konnten durch Analyse gleicher Probenmenge 20 % mehr Proteine und 25 % mehr Peptide identifiziert werden als nach der Lyse mit RapiGest<sup>TM</sup> und sogar etwa 50 % mehr Proteine und Peptide als nach der Lyse mit Harnstoff. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Lyse des Pellets mit RapiGest<sup>TM</sup> und Harnstoff nicht vollständig war, obwohl keine sichtbare Trübung der Lösung mehr festzustellen war.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob der Verdau der Proteine nach der Lyse mit SDS und anschließender Fällung, durch Zugabe von Additiven, wie MeCN (10 %), MeOH (10 %, 30 %, 60%) oder Trifluoroethanol (TFE, 5 %), optimiert werden konnte [106], [107], [108], [109]. Die Prozentangaben zeigen die Endkonzentration der Substanzen in der Probe. Die Additive sollen bewirken, dass Proteine besser in Lösung gebracht und entfaltet werden. Durch das Entfalten der Proteine kann die verwendete Protease besser andocken, sodass der proteolytische Verdau gefördert wird. Zusätzlich wurde als Alternative zur Ethanol-Fällung, zum Entfernen des SDS aus der Probe, das FASP Protokoll zum Verdau angewendet. Vor der Messung mittels LC-MS wurde je 1  $\mu\text{g}$  der Proben auf einer monolithischen Säule aufgetrennt, um die Effizienz des Verdau zu prüfen. In Abbildung 24 sind die monolithischen Läufe einer nicht verdauten Probe (blau), einer verdauten Probe mit Zusatz von 60 % MeOH (schwarz) und einer Probe mit Zusatz von 30 % MeOH dargestellt. Beim Vergleich dieser drei Läufe wird deutlich, dass die Proteine bei einer Methanol-Konzentration von 60 % nicht mehr vollständig verdaut werden. Bei diesen

## Ergebnisse

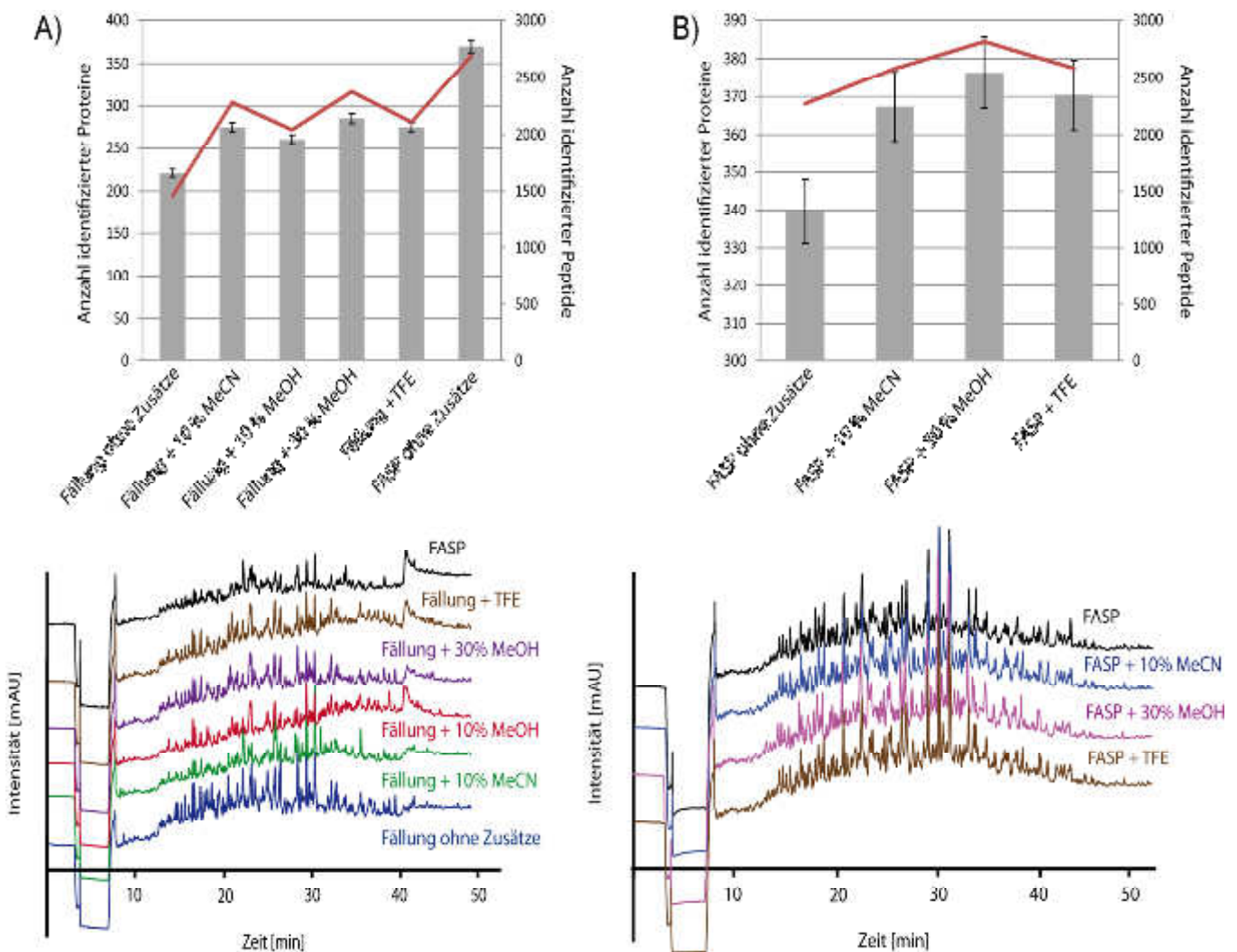
Methanol-Konzentrationen wird das verwendete Trypsin scheinbar teilweise inhibiert. Aus diesem Grund wurden die Proben mit 60 % MeOH Zusatz für die nachfolgenden LC-MS Analysen nicht mehr verwendet.



**Abbildung 24: Monolithische Auftrennung einer unverdauten (blau), einer verdauten Probe mit 60 % MeOH und einer verdauten Probe mit 30 % MeOH im Verdaupuffer.**

Die Ergebnisse der LC-MS Messungen sind in Abbildung 25 A zusammengefasst. Durch die Zugabe der verschiedenen Additive war es möglich, die Anzahl an identifizierten Proteinen und Peptiden zu erhöhen. Die besten Ergebnisse wurden jedoch durch den Verdau der Probe mit Hilfe des FASP Protokolls erreicht. Die Anzahl an identifizierten Proteinen und Peptiden ließ sich dadurch um 40 % im Vergleich zum besten in-Lösung-Verdau (Lyse mit SDS, Ethanol-Fällung, Verdau mit Zugabe von 30 % MeOH) erhöhen. Da durch den Zusatz von Additiven der in-Lösung-Verdau der Membranproteine sichtbar verbessert werden konnte, wurde im nachfolgenden Experiment geprüft, ob sich auch der Verdau mit dem FASP Protokoll durch die Zugabe von MeOH, MeCN oder TFE verbessern lässt. Ein kritischer Schritt dabei ist die Kompatibilität der verwendeten FASP-Filter mit den genutzten Additiven. Es wurde jedoch bei keinem der verwendeten Zusätze eine sichtbare Veränderung der Filter oder eine Zunahme von Verunreinigungen beispielsweise in Form von Polymeren in den LC-MS Messungen beobachtet. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die genutzten Filter sowohl mit MeOH, als auch mit MeCN und TFE in den verwendeten Konzentrationen kompatibel sind. Die LC-MS Analysen zeigten, wie auch beim in-Lösung-Verdau nach Fällung, eine deutliche Erhöhung der Anzahl an identifizierten Proteinen und Peptiden bei der Verwendung von 30 % MeOH im Verdaupuffer (siehe Abb. 25 B).





**Abbildung 25:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Optimierung der Verdaubedingungen für Membranproteine; A) Vergleich des Verdau nach dem FASP Protokoll mit dem Verdau in Lösung nach einer Ethanol Fällung mit und ohne Zugabe von Additiven; B) Zugabe von Additiven bei dem Verdau nach dem FASP Protokoll; Die Anzahl identifizierter Proteine (Balken) ist dabei auf der Primär-, die Anzahl identifizierter Peptide (rote Linie) auf der Sekundärachse dargestellt.

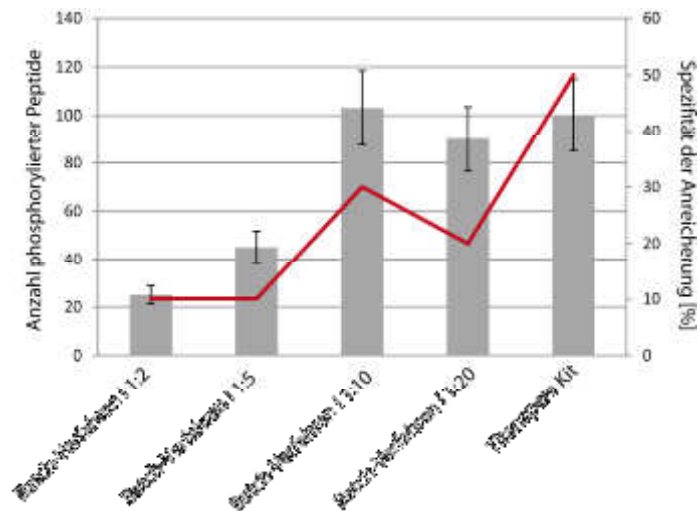
Durch die Optimierung der Lyse und der Verdaubedingungen, konnte somit der Verdau von Membranproteinen deutlich verbessert werden. Die Anzahl an identifizierten Proteinen und Peptiden konnte um etwa 60 % erhöht werden. Die besten Verdaubedingungen sind basierend auf den hier vorgestellten Experimenten bei einer Gesamtproteinmenge von 200 µg: Lyse der Probe in 1 % iger SDS Lösung, Verdau der Proteine nach dem FASP-Protokoll und ein Zusatz von 30 % MeOH im Verdaupuffer.

### 5.2 Optimierung der Titandioxid-Anreicherung

Zur Durchführung der Phosphoproteom Analyse von Mitochondrien aus *S.cerevisiae* Zellen musste zunächst die Strategie zur Anreicherung phosphorylierter Peptide optimiert werden. Alle angereicherten Proben wurden mit einer 140 min LC-Methode aufgetrennt und im CID-Modus gemessen. Die Auswertung wurde mit dem Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific) durchgeführt (verwendete Parameter siehe Kapitel 4.2.8). Zur Auswertung wurden alle phosphorylierten Peptide mit phosphoRS  $\geq 75$  % (Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit einer Phosphorylierungsstelle) und einer FDR  $\leq 1$  % (Wahrscheinlichkeit, dass ein Peptid falsch identifiziert wurde liegt bei  $\leq 1$ %) mit einbezogen.

Im ersten Schritt wurde ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Titandioxid Anreicherungsverfahren (Batch-Verfahren I) genutzt (siehe Kapitel 4.2.3) [101] und modifiziert. Zur Anreicherung wurden 50  $\mu$ g verdaute und entsalzte Mitochondrien verwendet. Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses von Protein- zu TiO<sub>2</sub>-Partikel wurden die Verhältnisse 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20, mit je drei Replikaten pro Ansatz, getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.

Das Wählen des richtigen Verhältnisses von Proteinmenge zu TiO<sub>2</sub>-Partikel ist ein entscheidender Schritt bei der Anreicherung. Werden zu wenige Partikel verwendet, ist es möglich, dass nicht alle phosphorylierten Peptide, die in der Probe enthalten sind, einen Bindungsplatz an den Partikeln finden. Wird die Anreicherung mit zu vielen Partikeln durchgeführt, hat es zur Folge, dass viele unspezifische Peptide an die freien Bindungsplätze binden und die Signale von niedrig abundanten phosphorylierten Peptiden bei der Analyse unterdrückt werden, so dass diese nicht mehr identifiziert werden können. Es zeigte sich, dass für die verwendete Methode ein Verhältnis von 1:10 (Protein:Partikel (w:w)) die besten Ergebnisse lieferte. Jedoch konnten aus 50  $\mu$ g Gesamtprotein in einem LC-MS-Lauf lediglich 103 phosphorylierte Peptide identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde versucht die Anreicherung durch die Verwendung eines kommerziell erwerblichen Titandioxid Kits (Titansphere<sup>®</sup> Phos-TiO Kit) zu verbessern. Die Kapazität dieses Kits liegt laut Herstellerangaben bei 25-50  $\mu$ g Protein. Zwar war es durch die Verwendung des Kits möglich die Spezifität (% phosphorylierter Peptide im Vergleich zur Gesamtanzahl identifizierter Peptide) der Anreicherung von 30 % auf 50 % zu erhöhen, allerdings konnten auch mit diesem Kit nicht mehr als 100 verschiedene phosphorylierte Peptide identifiziert werden.



**Abbildung 26:** Ergebnisse der Versuche zur Optimierung der  $\text{TiO}_2$  Anreicherung von Mitochondrien. Verglichen wurde das oben beschriebene Batch-Verfahren I mit unterschiedlichen Peptid zu Partikel-Verhältnissen und das Titansphere® Phos-TiO Kit. Die besten Ergebnisse konnten mit dem genutzten Kit erreicht werden. Die Verwendung des Batch-Verfahrens I mit einem Verhältnis von 1:10 zeigt ähnlich gute Ergebnisse, jedoch eine schlechtere Spezifität. Die Anzahl identifizierter phosphorylierter Peptide ist dabei auf der Primär- (Balken), die Spezifität der Anreicherung auf der Sekundärachse (rote Linie) dargestellt.

Da das Aufreinigen von Mitochondrien aus Hefe-Zellen aufwendig ist und somit nicht genug Mitochondrien für eine umfassende Optimierung bereitstanden, wurden für die weiteren Experimente HeLa-Zellen verwendet. Je 50  $\mu\text{g}$  verdaute und entsalzte HeLa-Peptide wurden mit dem Batch-Protokoll I mit einem Peptid zu Partikel Verhältnis von 1:10 (Batch-Verfahren Ia), dem Titansphere® Phos-TiO Kit und dem PolyMac-Ti Kit angereichert (siehe Abbildung 27 A). Das PolyMac-Ti Kit war zwar einfach in der Anwendung und im Vergleich zu den anderen beiden Methoden deutlich zeitsparender, jedoch konnten damit nur 30 verschiedene phosphorylierte Peptide mit einer Spezifität von nur 1 % (d.h. 99 % aller identifizierten Peptide waren nicht phosphoryliert) angereichert werden. Mit 210 identifizierten phosphorylierten Peptiden und einer Spezifität von 40 %, konnten mit dem Titansphere® Phos-TiO Kit deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Noch bessere Resultate lieferte mit 600 Phosphopeptiden und einer Spezifität von 50 %, die Anreicherung der Peptide mit dem Batch-Verfahren Ia. Um die Spezifität zu verbessern und somit die Anzahl der identifizierten Phosphopeptide zu erhöhen, wurde anschließend die gesättigte Phthalsäure im Ladepuffer durch Glycolsäure (1 M) ersetzt (Batch-Verfahren Ib). Durch die Verwendung der Glycolsäure konnte die Spezifität zwar auf 70 % erhöht werden, die Anzahl an identifizierten phosphorylierten Peptiden wurde jedoch nur auf 680 erhöht.

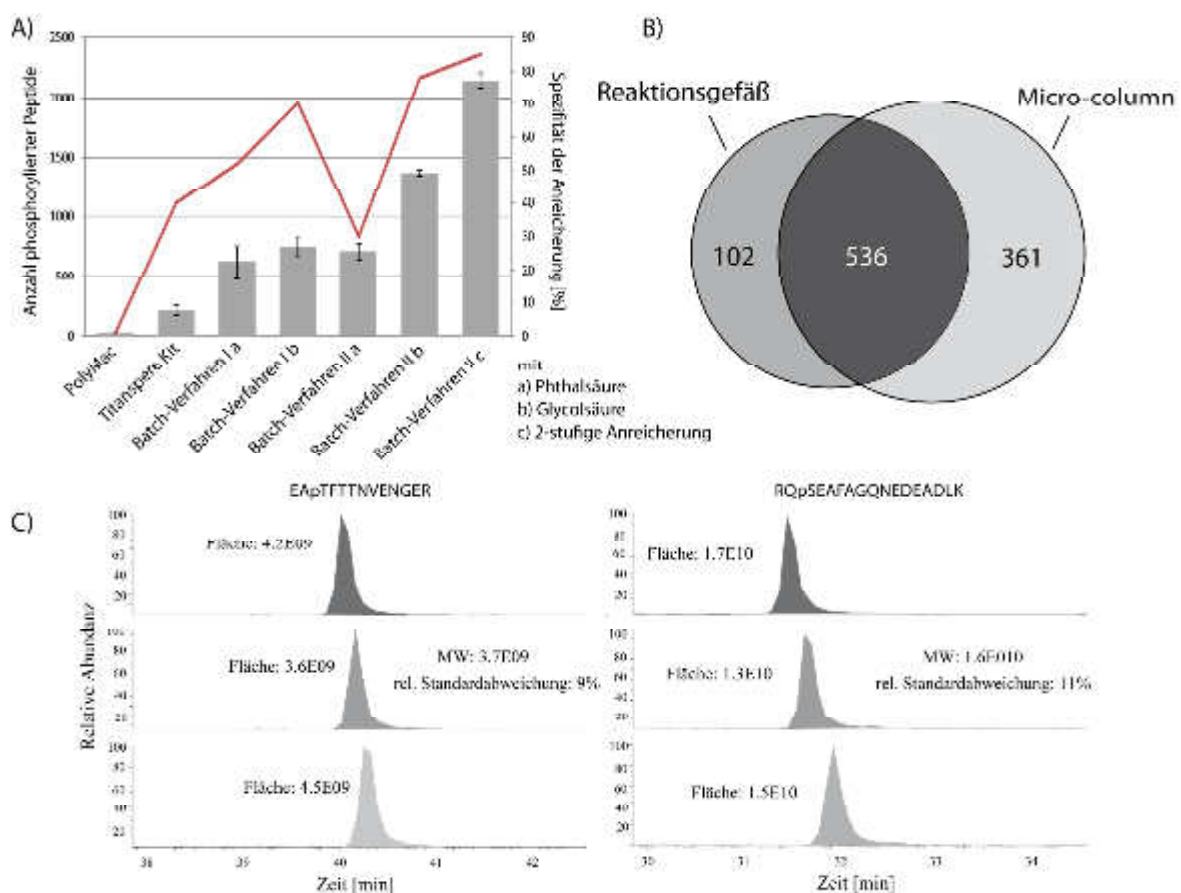
Basierend auf dem Protokoll von Engholm-Keller *et al* [110] wurden im nächsten Schritt die bei der Anreicherung verwendeten Puffer geändert (Batch-Verfahren II). Außerdem wurden die Titandioxid-Partikel vor der Elution in einer Vakuumszentrifuge komplett eingetrocknet. Das dient dazu den Lade- und Waschpuffer zu entfernen, um bei der anschließenden Elution einen stark basischen pH-Wert gewährleisten zu können. Der Ladepuffer wurde sowohl mit Phthalsäure (Batchverfahren IIa), als auch mit Glycolsäure getestet (Batchverfahren IIb). Bei der Verwendung der Phthalsäure konnten keine Verbesserung zum ursprünglichen Protokoll beobachtet werden. Bei der Verwendung der Glycolsäure konnten aber bei einer Spezifität von 80 %, 1380 verschiedene phosphorylierte Peptide identifiziert werden. Zu weiteren Erhöhung der Spezifität und somit zur Verbesserung der Anreicherung wurde, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, eine 2-stufige Anreicherung mit dem optimierten Protokoll durchgeführt (Batch-Verfahren IIc). Durch diese Art der Anreicherung war es möglich, aus 50 µg Startmaterial 2145 verschiedene phosphorylierte Peptide zu identifizieren (Spezifität: 86 %), was eine Verbesserung der Ergebnisse um das ca. 3.5-fache im Vergleich zum ursprünglichen Protokoll bedeutet (Ergebnisse siehe Abbildung 27 A).

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Anreicherungsstrategie wurde eine HeLa Probe (100 µg) mit drei technischen Replikaten angereichert. Zu jeder Probe wurden vor der Anreicherung 10 synthetisch hergestellte, phosphorylierte Peptide zugefügt. Durch Vergleich der Peakflächen der MS<sup>1</sup>-Peaks dieser Peptide in den Replikaten ist es möglich eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Anreicherung zu treffen (labelfreie Quantifizierung). Die Peakflächen der Peptide zwischen den Replikaten hatten, je nach Peptid, eine relative Standardabweichung von nur 9-15 %. Dies bedeutet, dass die Anreicherung mit dem genutzten Protokoll sehr stabil und reproduzierbar ist. In Abbildung 27 C ist der Vergleich der Peakflächen zwischen den Replikaten beispielhaft an zwei der 10 verwendeten synthetischen Peptiden dargestellt.

Die Anreicherung von Proben mit einem Proteingehalt von 50 µg und mehr stellt mit dem optimierten Protokoll kaum Schwierigkeiten in Bezug auf den Partikelverlust dar. Die dazu benötigte Menge an Titandioxid Partikel ist groß genug, um sie im Reaktionsgefäß, in dem die Anreicherung durchgeführt wird, zu erkennen. Somit ist es möglich die Puffer nach jedem Waschschrift, nach dem Pelletieren der Partikel durch Zentrifugation, als Überstand abzunehmen ohne Partikel zu verlieren. Ab einem Proteingehalt von 20 µg und weniger ist dies schwierig. Die Partikel sind nach dem Zentrifugieren nicht mehr als Pellet im Reaktionsgefäß zu erkennen. Somit können theoretisch bei jedem Waschschrift unbemerkt Titandioxid-Partikel verloren gehen. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob es bei der Anreicherung von 10 µg verdauten

## Ergebnisse

Proteinen im Reaktionsgefäß oder in einem selbsthergestelltem Tip (micro-column/siehe Abbildung 19), bei dem keine Partikel in den Waschschrinen verloren gehen können, Unterschiede gibt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 B dargestellt. Es zeigte sich deutlich, dass es bei kleinen Probemengen zu einem Verlust von Titandioxid-Partikel bei der Verwendung von Reaktionsgefäßen kommt. Bei der Anreicherung von 10 µg verdauten HeLa Proteinen, war es bei der Verwendung von selbsthergestellten Tips möglich 25 % mehr phosphorylierte Peptide (897 Peptide) zu identifizieren, als bei der Verwendung von Reaktionsgefäßen (638 Peptide). Bei Proben mit einem Proteingehalt von über 20 µg konnten keine nennenswerten Unterschiede beobachtet werden.

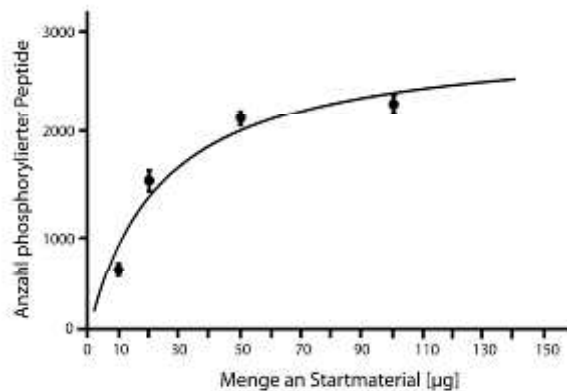


**Abbildung 27: Zusammenfassung der Ergebnisse der Optimierung der Titandioxid Anreicherung mittels HeLa Zellen.** A) Vergleich von verschiedenen Strategien zur Anreicherung von phosphorylierten Peptiden basierend an der Anzahl identifizierter Phosphopeptide und der Spezifität der Anreicherung; Die Anzahl identifizierter phosphorylierter Peptide ist dabei auf der Primär- (Balken), die Spezifität der Anreicherung auf der Sekundärachse (rote Linie) dargestellt. B) Vergleich der Anreicherung von 10 µg HeLa Proteinen mit selbst gemachten Tips (micro-column) und im Reaktionsgefäß (Batch-Verfahren); C) Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Titandioxid Anreicherung beispielhaft an 2 verschiedenen synthetisch hergestellten Phosphopeptiden; Verglichen wird die Fläche des MS<sup>1</sup> Peaks der Peptide in allen Replikaten; Die Abweichung liegt, je nach Peptide, bei 9-15%;

## Ergebnisse

---

Anschließend wurde geprüft, ob die Anzahl identifizierbarer Phosphopeptide in Abhängigkeit mit der Startmenge in einem 2 h LC-MS erhöht werden kann. Dafür wurden verdauete HeLa Proben mit einem Anfangsproteingehalt von 1  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$  und 100  $\mu\text{g}$  in jeweils drei technischen Replikaten angereichert und jeweils mit einem 2 h Gradienten analysiert (CID, Orbitrap Elite). Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 28 dargestellt [80].



**Abbildung 28:** Zusammenhang zwischen der Menge an Startmaterial für die Titandioxid Anreicherung und der Anzahl identifizierter phosphorylierter Peptide; Aus 1  $\mu\text{g}$  Startmaterial konnten 70 verschiedene phosphorylierte Peptide identifiziert werden, aus 50  $\mu\text{g}$  Startmaterial schon 2100. Durch weitere Erhöhung des Startmaterials war eine weitere Erhöhung der Anzahl an Phosphopeptiden in einem einzigen LC-MS Lauf (2 h) jedoch nicht möglich.

Aus nur 1  $\mu\text{g}$  Startmaterial konnten mit dem optimierten Protokoll bereits 70 verschiedene phosphorylierte Peptide angereichert werden. Durch Erhöhung des verwendeten Startmaterials auf 10  $\mu\text{g}$  war es möglich die Anzahl der identifizierten Phosphopeptide auf etwa 700 zu steigern, bei der Verwendung von 50  $\mu\text{g}$  Startmaterial konnte über 2000 phosphorylierte Peptide identifiziert werden. Ab 50  $\mu\text{g}$  konnten jedoch keine besseren Ergebnisse mehr erzielt werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass bei der Erhöhung des Startmaterials neben den stark in der Probe vertretenen Peptiden auch diejenigen angereichert werden, die weniger abundant sind und somit grundsätzlich die Menge an angereicherten Peptiden in der Probe erhöht wird. Bei der Messung der Probe unterdrücken dann jedoch die höher konzentrierten Peptide die Signale der weniger abundanten Peptide, sodass diese in einem einzelnen kurzen LC-MS Lauf nicht identifiziert werden können (undersampling). Aus diesem Grund wurde beschlossen, die Proben nach der Anreicherung mittels HILIC-Chromatographie in mehrere Fraktionen aufzutrennen, sodass die Probenkomplexität pro Fraktion reduziert wird und auch niedrig abundante Peptide

identifiziert werden können. Die Optimierung des HILIC-Systems ist im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben.

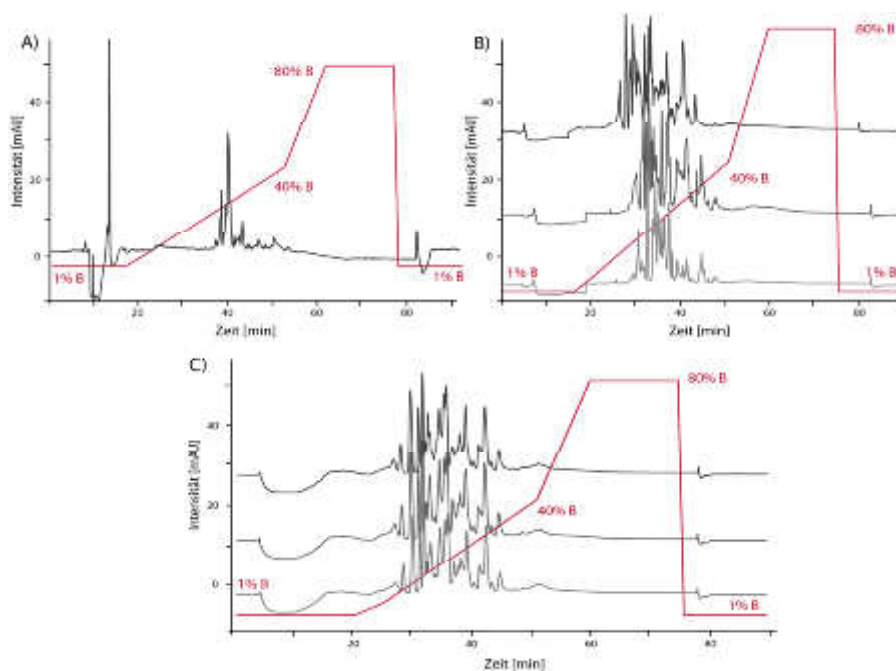
### 5.2.1 Aufbau und Optimierung des HILIC-Systems

Zur Auftrennung der angereicherten Peptide wurde ein Ultimate 3000 nano-RSLC-System (Thermo Fisher Scientific) mit einer selbst gepackten Säule verwendet. Als HILIC Material wurde TSKgel Amid-80 (Tosoh Bioscience) genutzt. Im ersten Schritt wurde zur Auftrennung eine 15 cm Säule mit einem Innendurchmesser von 150  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Auftrennung erfolgte über 30 min mit einem binären Gradienten von 1-40 % Lösungsmittel B (0,1 % FA) bei einem Fluss von 2,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Lösungsmittel A setzte sich aus 98 % MeCN in 0.1 % FA zusammen. Zur Optimierung der Auftrennung wurde 150 pmol verdautes Casein aufgetrennt. Casein ist ein Protein mit mehreren bekannten Phosphorylierungsstellen (2x Phospho-Serin, 2x Phospho-Threonin) und eignet sich somit gut dafür, die Auftrennung phosphorylierter und nicht phosphorylierter Peptide zu optimieren. Wie in Abbildung 29 A dargestellt, konnte das Casein unter den oben genannten Bedingungen nur schlecht aufgetrennt werden. Es eluiert fast vollständig in einem einzigen breiten Peak von der Säule. Auch das Ändern des Gradienten brachte keine Verbesserung.

Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Zusammensetzung der Lösungsmittel geändert und FA durch TFA ersetzt. Alle anderen Parameter wurden beibehalten. Bei der Herstellung von Silica-basierenden Materialien, wie dem HILIC TSKgel-Amid 80 Material, können Silanole (Siliciumverbindungen mit Hydroxylgruppe) zurückbleiben, die mit geladenen Aminosäureresten interagieren können. Das führt dazu, dass diese Peptide an der Säule haften bleiben und/oder ein „Tailing“ aufweisen. Dieses Phänomen zeigte sich auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Casein-Auftrennungen, da Peptide teilweise unkontrolliert erst im Waschgradienten oder in nachfolgenden Auftrennungen eluierten. Durch die Verwendung einer starken Säure wie TFA, die die Hydroxylgruppe der Silanole protoniert, können solche Effekte vermieden werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 B zu sehen. Es zeigte sich, dass durch die Verwendung der TFA eine deutliche Verbesserung der Auftrennung erzielt werden konnte. Ein weiteres Problem war jedoch, dass das Casein nicht reproduzierbar aufgetrennt werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür ist Folgende: Die HILIC-Säule ist sehr empfindlich gegenüber Salzen, sodass alle Proben vor der Auftrennung mit C18 Material entsalzt werden müssen. Nach dem vollständigen Eintrocknen der entsalzten Probe muss diese anschließend

## Ergebnisse

wieder in Lösungsmittel A (98 % MeCN, 0,1 % TFA) aufgenommen werden. Dafür muss die Probe erst in 0,1 % TFA gelöst und dann mit MeCN aufgefüllt werden. Bei einer verwendeten Injektionsmenge von 15  $\mu\text{L}$  bedeutet dies, dass die Probe in einem sehr geringen Volumen von 0,3  $\mu\text{L}$  TFA aufgenommen werden muss. Es besteht also die Gefahr, dass die entsalzte Probe nicht vollständig in Lösung gebracht werden konnte, womit u.a. die schlechte Reproduzierbarkeit der Auftrennung zu erklären wäre. Aus diesem Grund wurde das Injektionsvolumen von 15  $\mu\text{L}$  auf 45  $\mu\text{L}$  erhöht, sodass die entsalzte Probe in 1  $\mu\text{L}$  0,1 % TFA aufgenommen werden konnte. Um die Auftrennungsdauer nicht zu verlängern, wurde außerdem der Fluss auf 4  $\mu\text{L}/\text{min}$  erhöht. Da der Gegendruck der Säule bei dem erhöhten Fluss zu hoch war, wurde eine Säule mit größerem Innendurchmesser (250  $\mu\text{m}$ ) genutzt. Wie in Abbildung 29 C dargestellt, konnten dadurch sowohl eine gute Auftrennung, als auch eine gute Reproduzierbarkeit erzielt werden.



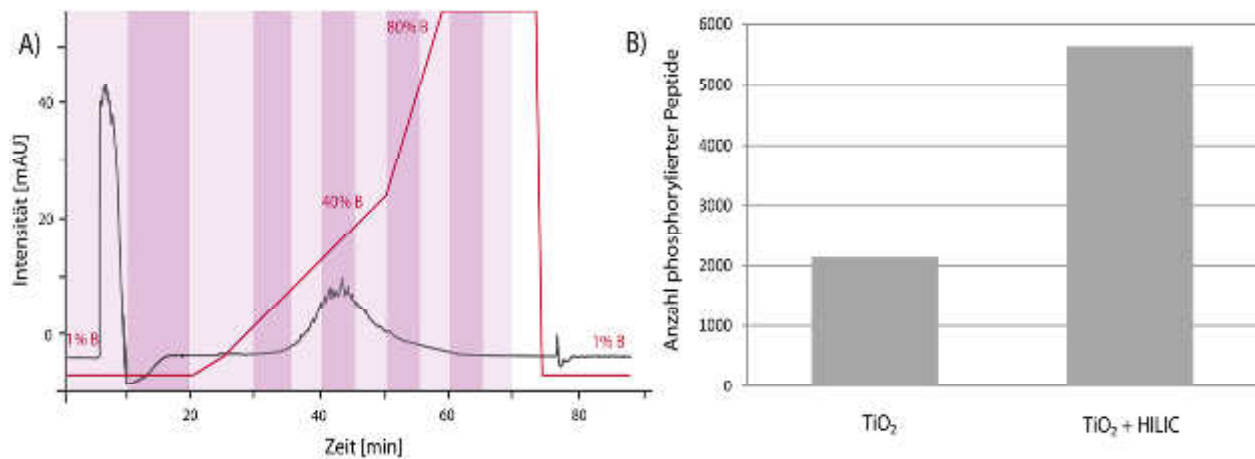
**Abbildung 29:** HILIC Auftrennung von 150 pmol Casein unter verschiedenen Bedingungen; A) 150  $\mu\text{m}$  Säule, Puffer A: 98 % MeCN, 0,1% FA, Puffer B: 0,1 % FA, Injektionsvolumen von 15  $\mu\text{L}$ ; B) 150  $\mu\text{m}$  Säule, Puffer A: 98 % MeCN, 0,1 % TFA, Puffer B: 0,1 % TFA, Injektionsvolumen von 15  $\mu\text{L}$ ; C) 250  $\mu\text{m}$  Säule, Puffer A: 98 % MeCN, 0,1 % TFA, Puffer B: 0,1 % TFA, Injektionsvolumen von 45  $\mu\text{L}$

Dieser optimierte Aufbau des HILIC-Systems wurde zur Auftrennung Titandioxid angereicherter HeLa Proben verwendet. 400  $\mu\text{g}$  verdaute HeLa Proteine wurden, wie in Kapitel 4.2.3



## Ergebnisse

beschrieben, mittels Titandioxid angereichert. Die Hälfte des Eluats wurde mit R3 Material entsalzt (siehe Kapitel 4.2.4) und auf der HILIC-Anlage aufgetrennt. Bei der Auftrennung wurden 11 verschiedene Fraktionen (siehe Abbildung 30 A) gesammelt. Die Fraktionen wurden vollständig eingetrocknet und in 15  $\mu$ L 0.1 % TFA aufgenommen. Anschließend wurde jede Fraktion mit einem 2 h Gradienten im CID-Modus mittels LC-MS gemessen. Die zweite Hälfte des Eluats wurde ebenfalls entsalzt, dann jedoch ohne HILIC-Auftrennung direkt mit LC-MS analysiert. Durch die zusätzliche Auftrennung der angereicherten Probe war es möglich etwa 3000 phosphorylierte Peptide mehr aus 200  $\mu$ g Startmaterial zu identifizieren. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass durch die Optimierung der Titandioxid Anreicherung und der HILIC Auftrennung der angereicherten Probe eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse erreicht werden konnte.

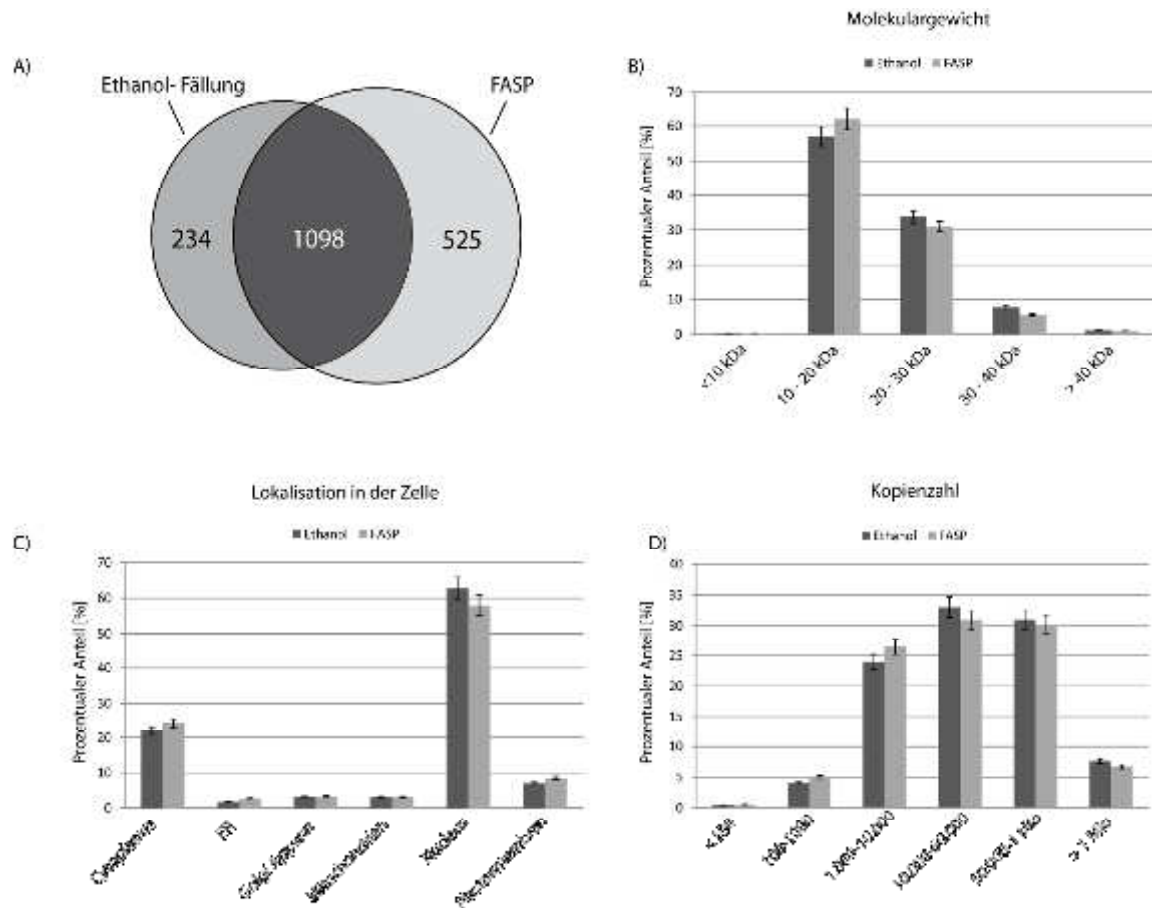


**Abbildung 30: Vergleich der Analyse angereicherter HeLa Zellen mit und ohne HILIC Auftrennung; A) 200  $\mu$ g HeLa Zellen wurden angereichert und auf einer HILIC Säule aufgetrennt, 11 verschiedene Fraktionen wurden gesammelt und mit LC-MS gemessen; B) Mit der HILIC Auftrennung konnten 2,5 x mehr phosphorylierte Peptide identifiziert werden, als ohne Auftrennung.**

### 5.2.2 Weitere Experimente zur Validierung der Phosphopeptid-Anreicherung

Bei der Optimierung der Verdaubedingungen für Membranproteine zeigte sich, dass der Verdau mit Hilfe des FASP-Protokolls die besten Ergebnisse liefert (siehe Kapitel 5.1). Bei dieser Art des Verdau werden MolekulargewichtsfILTER mit einem cut off von 30 kDa (d.h. Moleküle mit einem Molekulargewicht  $\geq 30$  kDa werden vom Filter zurückgehalten) verwendet. Dadurch besteht die Möglichkeit vor allem kleine Proteine und somit auch die phosphorylierten Peptide kleiner Proteine zu verlieren. Aus diesem Grund wurde geprüft, inwieweit sich die Ergebnisse der Titandioxid-Anreicherung bei vorheriger Anwendung des FASP-Protokolls oder der Fällung ändern. Verglichen wurden dabei das Molekulargewicht, die Kopienzahl und die Lokalisation von Proteinen in der Zelle von denen phosphorylierte Peptide identifiziert werden konnten. Verwendet wurden für diese Experimente in SDS (1 %) lysierte HeLa Zellen. Nach dem Verdau (100  $\mu$ g, jeweils in 3 Replikaten) wurden die Proben mit dem optimierten Titandioxid-Protokoll angereichert.

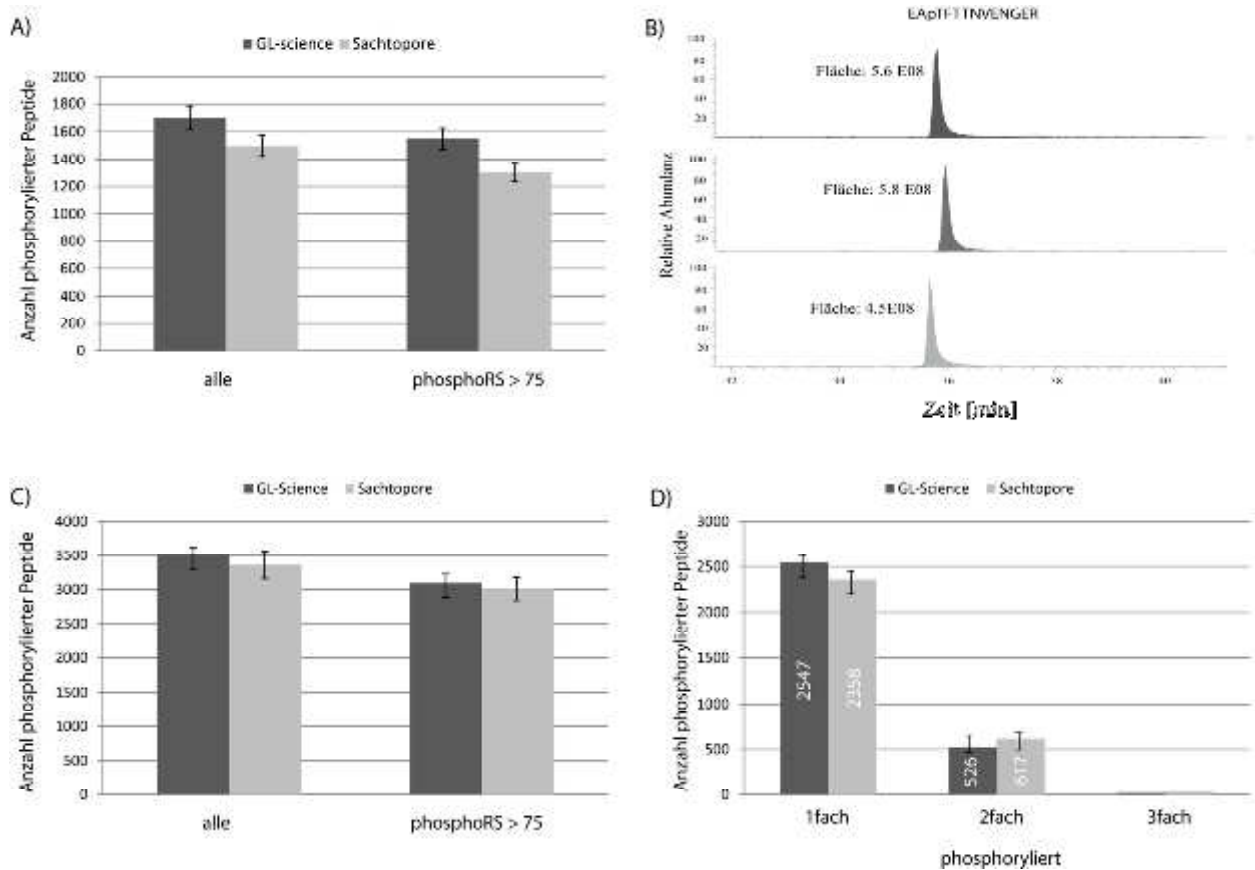
Beim Verdau der Proteine mit dem FASP-Protokoll und der anschließenden Anreicherung konnten 1623 verschiedene phosphorylierte Peptide identifiziert werden, bei der Verwendung der Ethanol-Fällung hingegen 1332. 1098 wurden mit beiden Methoden gefunden (Überschneidung 60 %). Miteinbezogen wurden bei dieser Auswertung wieder alle phosphorylierten Peptide mit einem phosphoRS Wert  $\geq 75$ . Bezogen auf das Molekulargewicht, die Kopienzahl und die zelluläre Lokalisation der identifizierten Proteine, von denen phosphorylierte Peptide identifiziert werden konnten, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen FASP und Ethanol-Fällung ermittelt werden. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass weder FASP noch die Ethanol-Fällung bestimmte Tendenzen bezüglich Molekulargewicht, Kopienzahl und Lokalisation der Proteine haben. Die geringere Anzahl an identifizierten phosphorylierten Peptiden nach der Ethanol-Fällung im Vergleich zu FASP ist auf den größeren Verlust der Probe bei diesen Probemengen (100  $\mu$ g) während der Fällung zurückzuführen (siehe Kapitel 5.1) und unabhängig von Lokalisation, Kopienzahl und Molekulargewicht der Proteine. Die Ergebnisse der Experimente sind in der nachfolgenden Abbildung 31 dargestellt



**Abbildung 31: Vergleich der Anreicherung von HeLa Peptiden nach Ethanol-Fällung oder FASP Verdau; A) Venn Diagramm der identifizierten phosphorylierten Peptide nach Ethanol-Fällung und FASP Verdau; Vergleich der mittels Phosphopeptiden identifizierten Proteinen anhand ihres B) Molekulargewichts, C) der Lokalisation in der Zelle und D) ihrer Kopienzahl in der Zelle (Zuordnung der Lokalisation, des Molekulargewichts und der Kopienzahl nach [2])**

Zur Titandioxid-Anreicherung wurden im Institut bisher Partikel von GL-Science verwendet. In den nachfolgenden Experimenten wurde geprüft, ob mit Partikeln eines anderen Herstellers bessere Anreicherungsresultate erzielt werden können. Verwendet wurden dafür Titandioxid Partikel von Sachtopore. Diese sind mit 1 Euro pro g deutlich günstiger als die Partikel von GL-Science (600 Euro pro g) und könnten somit eine gute Alternative zu diesen darstellen. 300 µg HeLa Zellen wurden verdaut, in sechs identische Proben von je 50 µg aufgeteilt (3 Replikate pro Partikelsorte) und mit den verschiedenen Partikelsorten nach dem optimierten Protokoll angereichert. Um die Reproduzierbarkeit der Anreicherungen zwischen den Replikaten überprüfen zu können, wurden auch bei diesen Experimenten synthetisch hergestellte Phosphopeptide vor der Anreicherung zu den Proben zugefügt (siehe Abbildung 32 B).

## Ergebnisse



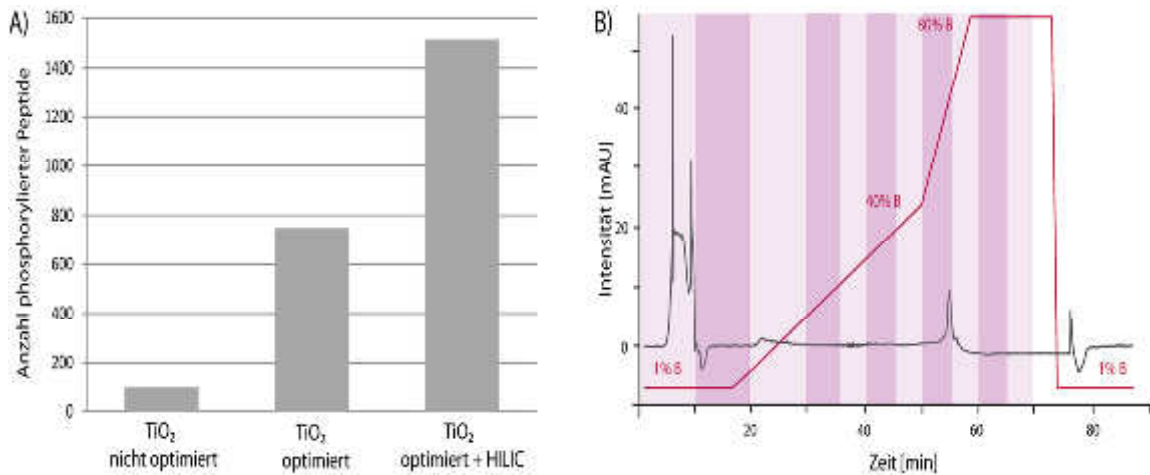
**Abbildung 32: Ergebnisse der Anreicherung mit verschiedenen Titandioxid Partikelsorten (GL-Science, Sachtopore); A) Bei der Anreicherung von 50 µg verdauten HeLa Zellen konnten bei der Verwendung der GL-Science Partikel 200 phosphorylierte Peptide mehr identifiziert werden als bei der Verwendung von Sachtopore Partikeln; B) Die Anreicherung mit den Sachtopore Partikeln zeigt eine gute Reproduzierbarkeit. Diese wurde anhand zugespikter synthetischer Phosphopeptide überprüft. Die Abweichung zwischen den Replikaten lag bei ca. 10%. Beispielhaft ist das hier an einem der zugefügten Peptide dargestellt. C) Nach dem Angleichen der effektiven Oberflächen der beiden Partikelsorten durch Erhöhung der Menge an Sachtopore Partikel bei der Anreicherung um einen Faktor von 1,4, konnte die Anzahl der angereicherten Phosphopeptide angeglichen werden; D) Bei der Verwendung der Sachtopore Partikel konnten weniger 1-fach phosphorylierte Peptide identifiziert werden, als bei der Verwendung der GL-Science Partikel, jedoch mehr 2-fach phosphorylierte.**

Es zeigte sich, dass auch die Anreicherung mit den günstigeren Sachtopore Partikeln reproduzierbar ist (Standard Abweichungen von 10 %), jedoch im Vergleich zur Verwendung der GL-Science Partikel 200 phosphorylierte Peptide weniger identifiziert werden konnten. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Grenzflächenprozesse (ISAS Dortmund, Messungen durchgeführt von Hannes Raschke) ergaben, dass die effektive Oberfläche der GL-Science Partikel (94,46 m<sup>2</sup>/g) 1,4 x höher als die der Sachtopore Partikel (68,319 m<sup>2</sup>/g) ist, was die geringere Anzahl an identifizierten Phosphopeptiden mit den Sachtopore Partikeln erklären könnte. Bei einem weiteren Experiment wurden daher 1,4 x mehr Sachtopore Partikel eingesetzt, um so die effektive Oberfläche beider Partikelsorten anzupassen. Durch diese Anpassung konnte

die Anzahl an identifizierten phosphorylierten Peptiden angenähert werden (siehe Abbildung 32 C). Auffällig war jedoch, dass mit den Sachtopore Partikeln weniger 1-fach- und dafür mehr 2-fach phosphorylierte Peptide identifiziert werden konnten als mit den GL-Science Partikeln. Eine Kombination beider Partikelsorten könnte von daher in Zukunft in Betracht gezogen werden.

### **5.3 Anreicherung mitochondrialer Phosphopeptide**

Nach der Optimierung der Anreicherung phosphorylierter Peptide mit HeLa-Zellen wurde geprüft, ob mit dem optimierten Protokoll auch die Anreicherung mitochondrialer Peptide verbessert werden kann. Dafür wurden verdaute Mitochondrien sowohl mit dem alten, als auch mit dem optimierten Protokoll mit und ohne zusätzliche HILIC-Auftrennung angereichert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Für die Experimente wurden jeweils 100 µg Startmaterial verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt. Allein durch die Optimierung des Titandioxid-Protokolls konnten aus 100 µg verdauten Mitochondrien 749 verschiedene phosphorylierte Peptide identifiziert werden. Durch die anschließende Auftrennung der Probe konnte die Anzahl an identifizierten phosphorylierten Peptiden auf 1415 erhöht werden, von denen 519 Peptide mitochondrial waren. Die große Anzahl an nicht mitochondrialen Peptiden in der Anreicherung lässt sich dadurch erklären, dass die Aufreinigung der Mitochondrien nicht optimal war und noch weitere Zellreste in der Probe vorhanden waren. Neuste Ergebnisse der Arbeitsgruppe deuten jedoch auch darauf hin, dass mehr Proteine in Mitochondrien vorhanden sind, als bisher angenommen (ca. 1200 insgesamt). Es ist somit möglich, dass sich die Anzahl mitochondrialer Phosphopeptide weiter erhöht. Diese Ergebnisse müssen jedoch erst weiter validiert werden.



**Abbildung 33: Zusammenfassung der Titandioxid Experimente mit Mitochondrien aus Bäckerhefe; A) Je 100 µg Mitochondrien wurden mit dem ursprünglichen Protokoll und dem optimierten Protokoll mit und ohne HILIC-Auftrennung angereichert. Durch die Optimierung des Protokolls konnten, im Vergleich zum ursprünglichen Protokoll 7x mehr phosphorylierte Peptide identifiziert werden (749). Durch eine zusätzliche HILIC-Auftrennung erhöhte sich die Zahl sogar auf 1415; B) UV- Chromatogram der HILIC-Auftrennung**

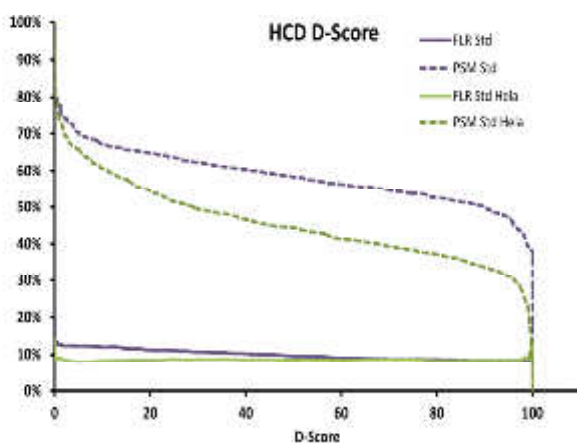
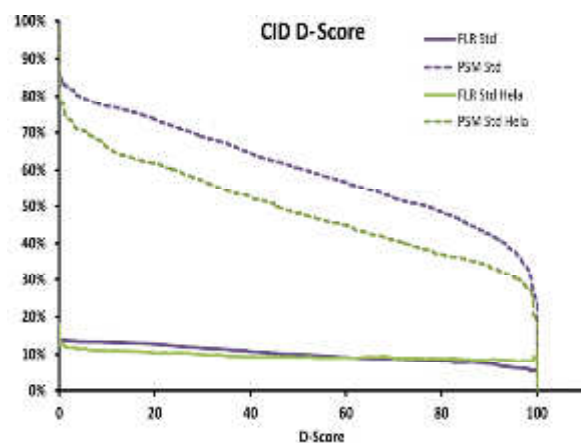
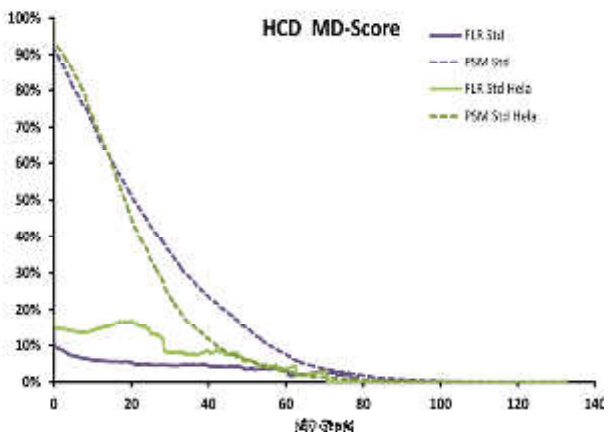
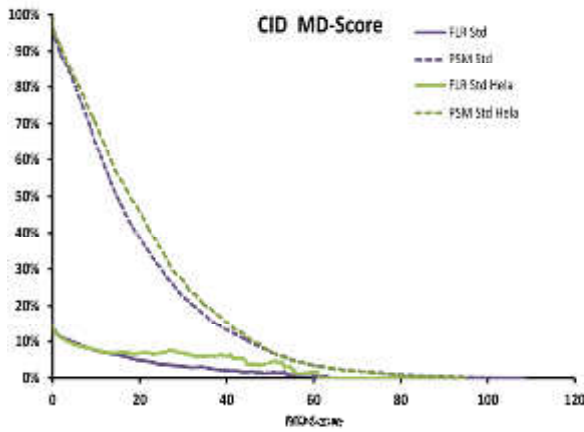
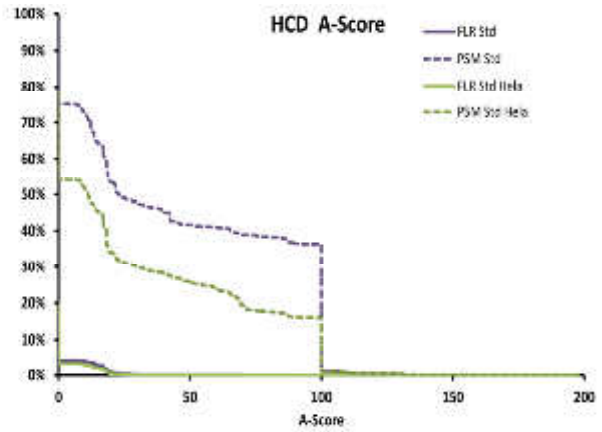
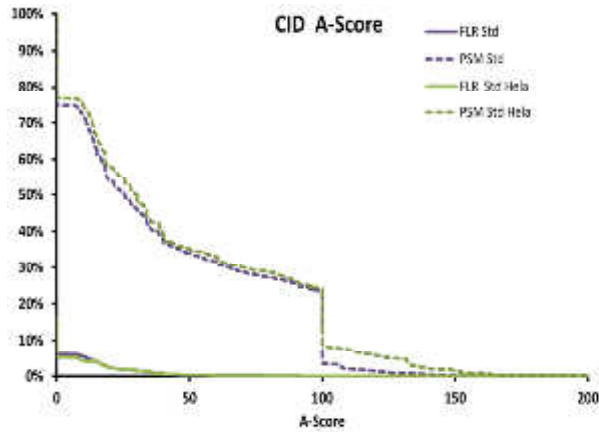
## 5.4 Phosphopeptidstandard

Die Auswertung von Daten aus Phosphoproteomanalysen ist eine große Herausforderung. Verwendete Suchalgorithmen, wie z.B. Mascot, müssen dabei nicht nur erkennen, ob ein identifiziertes Peptid phosphoryliert ist oder nicht, sondern sollten auch bestimmen können, an welcher Stelle sich die Phosphorylierung im Peptid befindet. Dies ist vor allem für nachfolgende funktionelle Studien von großer Wichtigkeit. Die Ergebnisse, welche die Algorithmen, vor allem in Bezug auf die Lokalisation der Phosphorylierungsstelle, liefern sind auf Grund schlechter Spektrenqualität oftmals nicht korrekt und müssen somit kritisch hinterfragt werden. Eine Möglichkeit die Ergebnisse zu überprüfen ist, jedes Spektrum eines phosphorylierten Peptides manuell zu begutachten und zu entscheiden, ob das Ergebnis richtig oder falsch ist. Dies ist jedoch sehr zeitaufwändig und bei einer umfangreichen Analyse, bei der mehrere tausend phosphorylierte Peptide identifiziert werden können, nicht durchführbar. Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von Algorithmen, wie phosphoRS oder Ascore (siehe Kapitel 3.6). Diese Algorithmen bewerten die angezeigte Phosphorylierungsstelle im Peptid. Ein Ansatz, um die Richtigkeit solcher Algorithmen zu überprüfen, ist folgender: synthetische Peptide mit bekannter Phosphorylierungsstelle werden mittels LC-MS gemessen und anschließend ausgewertet. Da die

richtigen Phosphorylierungsstellen dabei bekannt sind, kann direkt geprüft werden, ob der verwendete Algorithmus richtige oder falsche Ergebnisse liefert. Bis jetzt wurden, wie beispielsweise bei Savitski *et al* [111], niedrig komplexe Gemische von wenigen hundert synthetischen Phosphopeptiden für solche Ansätze verwendet. Die Schwierigkeit der Algorithmen die richtige Phosphorylierungsstelle zu identifizieren liegt jedoch in der Komplexität der Probe. Bei Proben mit mehreren tausend verschiedenen phosphorylierten Peptiden treten Probleme, wie Co-Isolation der Peptide, ein hoher dynamischer Bereich und damit verbunden Phosphopeptid-Spektren mit schlechter Qualität auf, mit denen die verwendeten Algorithmen zurecht kommen müssen. All dies ist nicht gegeben, wenn nur wenige hundert Peptide gemessen und ausgewertet werden. Aus diesem Grund ist bei der Verwendung einer niedrig komplexen Testprobe damit zu rechnen, dass die Ergebnisse besser ausfallen, als es bei einer realen Probe wirklich der Fall wäre. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein vollkommen neuartiger Phosphopeptidstandard entwickelt (siehe Kapitel 4.2.6), der auf Grund seiner Komplexität besser mit einer realen Probe zu vergleichen ist. Er besteht aus 474 (374 1-fach, 95 2-fach, 5 3-fach phosphoryliert) synthetisch hergestellten Phosphopeptiden mit bekannter Phosphorylierungsstelle, die zu einer komplexen Matrix angereicherter HeLa Phosphopeptide zugefügt wurden und simuliert somit eine reale komplexe Probe (Co-Isolation von Peptiden, hoher dynamischer Bereich, schlechte Spektren der Phosphopeptide sind gegeben). Der neu entwickelte Standard (Std-HeLa) wurde sowohl auf einem Orbitrap Elite (CID), als auch auf einem Q Exactive Massenspektrometer (HCD) analysiert, die phosphorylierten Peptide wurden mittels Mascot identifiziert und anschließend wurden verschiedene Algorithmen (phosphoRS, Ascore, MD-Score, D-Score, MaxQuant (MQ) Score) angewendet, um die Lokalisation der Phosphorylierung zu bestimmen. Auf exakt die gleiche Weise wurden die synthetischen Peptide (Std), die beim Std-HeLa verwendet wurden, jedoch ohne komplexen Hintergrund, gemessen und ausgewertet. Anschließend wurde überprüft wie viele Peptide mit der richtigen Phosphorylierungsstelle identifiziert werden konnten und wie groß der Unterschied bei der Verwendung beider Arten des Standards ist. Die Auswertung wurde auf PSM (peptide to spectrum matches)-Ebene durchgeführt. Für jedes Peptid werden während der MS-Messung verschiedene Spektren aufgenommen. Für jedes Spektrum, das einem phosphorylierten Peptid zugeordnet werden konnte, wurde überprüft, ob die angegebene Phosphorylierungsstelle korrekt war oder nicht. Die Zusammenfassung der Ergebnisse für D-Score [112], MD-Score [113], MQ-Score [114], [115] und Ascore ist in Abbildung 34 dargestellt. Diese Abbildung zeigt, wie sich die False Localisation Rate (FLR), also das Verhältnis von PSMs, bei denen die Phosphorylierungsstelle falsch annotiert wurde, zu der

# Ergebnisse

Gesamtanzahl der phospho-PSMs, abhängig vom jeweiligen Score verhält. Je höher also die FLR, desto schlechter ist die Arbeitsleistung des jeweiligen Scores.





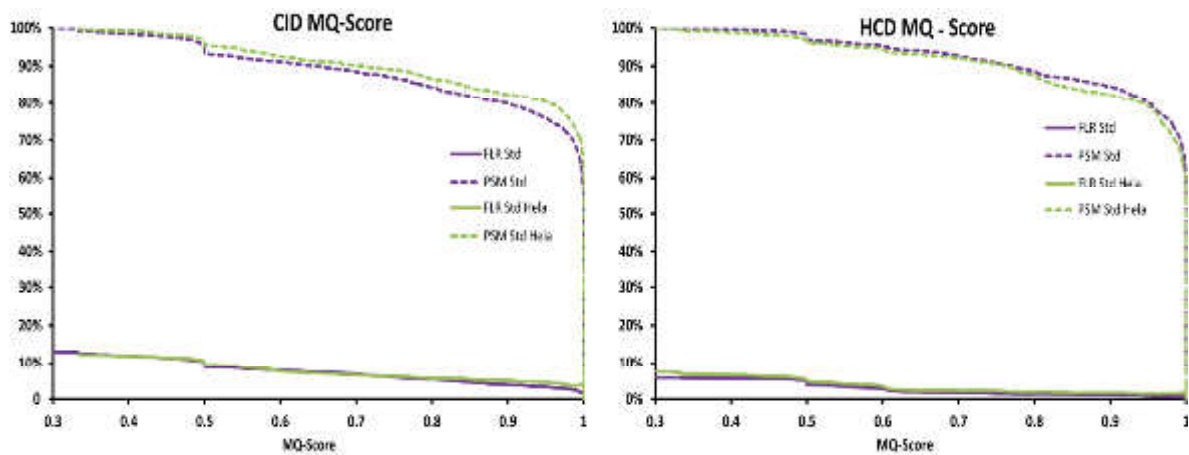


Abbildung 34: Vergleich der einzelnen Scores zur Lokalisation von Phosphorylierungsstellen; Verglichen wurden die Verwendung eines Gemisches aus synthetischen Phosphopeptiden (Std) mit dem neu entwickelten Phosphopeptid Standard (Std Hela).

Der Algorithmus phosphoRS konnte nicht in dieser Art ausgewertet werden, da er im Gegensatz zu den anderen Algorithmen keinen absoluten Score anzeigt, sondern für jede Phosphorylierungsstelle eine Wahrscheinlichkeit dafür angibt, ob diese richtig ist. Das bedeutet, dass beispielsweise bei einem Peptid mit zwei möglichen Phosphorylierungsstellen, bei dem der Algorithmus unsicher ist, ein phosphoRS Score von 50 % angezeigt wird. Bei einem Peptid mit drei möglichen, aber unsicheren Phosphorylierungsstellen wird eine phosphoRS Score von 33,33 % angezeigt. Die Auswertung des phosphoRS Scores ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

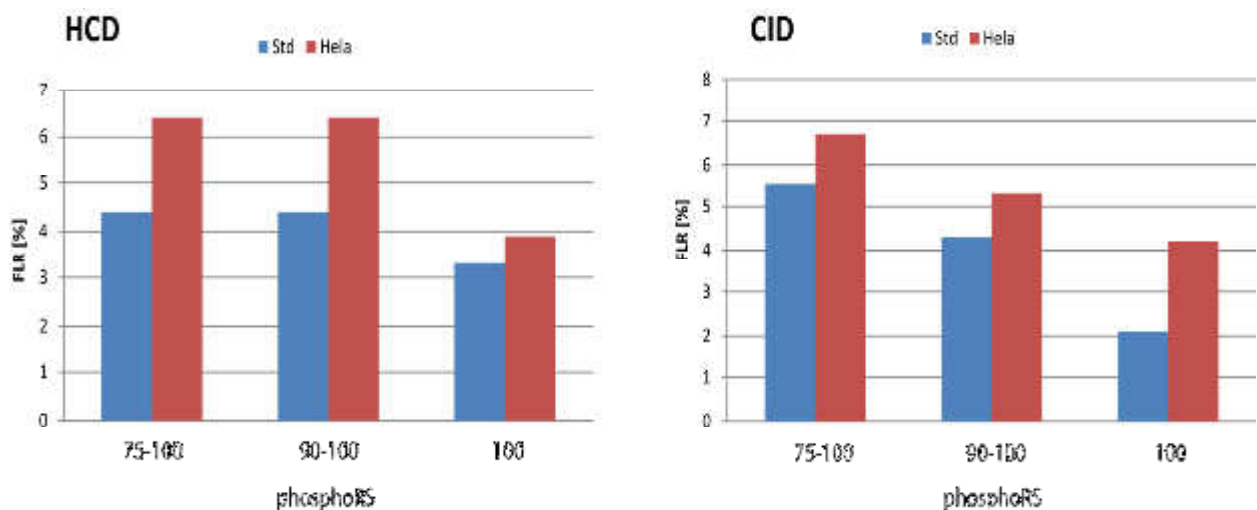
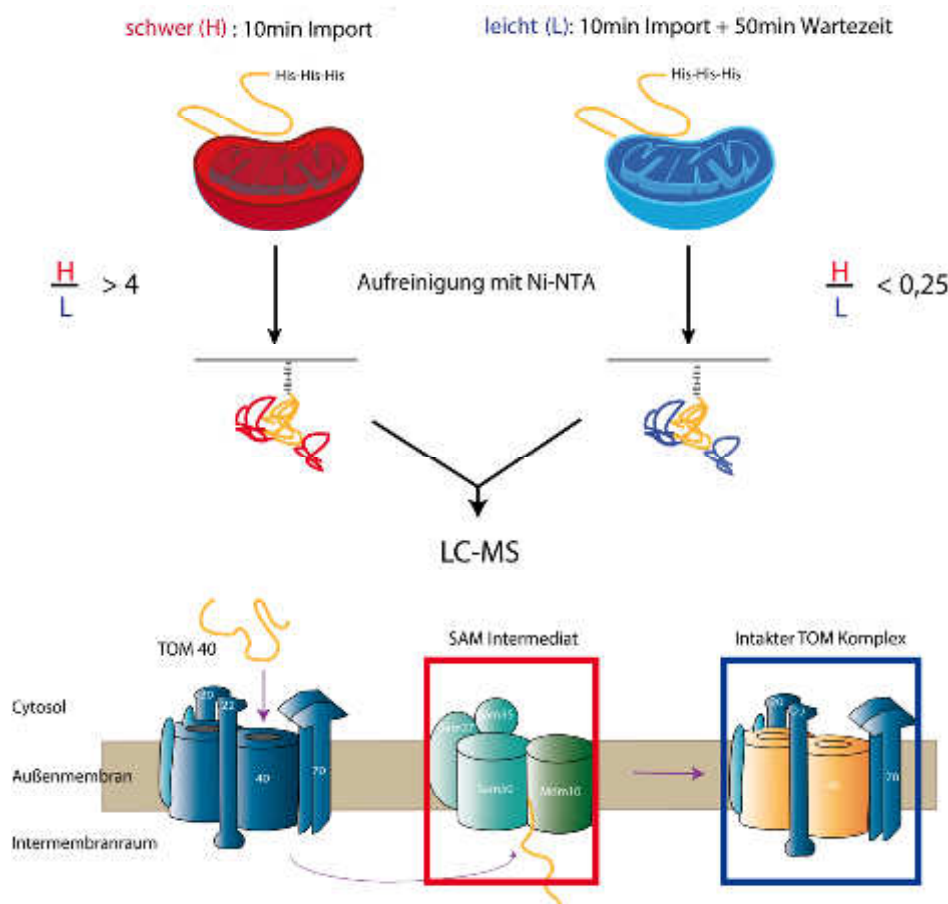


Abbildung 35: Zusammenfassung der Ergebnisse des phosphoRS Algorithmus

Es zeigte sich, dass fast alle Scores besser bei der Verwendung der gering komplexen Probe (Std), als bei der Verwendung des neuen komplexen Standards (Std-Hela) abschneiden. Bei PhosphoRS beispielsweise kann bei Std eine FLR von unter 5 % (HCD) bei einem Score von 90 erreicht werden, bei der Verwendung des neuen Std-HeLa jedoch erst bei einem Score von 100. Bei CID ist die gleiche Tendenz erkennbar. Auch beim MD- und D-Score ist sowohl bei CID, als auch bei HCD erkennbar, dass bei einer komplexen Probe eine FLR von 5 % erst bei höheren Scores erreicht werden kann, als bei einem Gemisch aus einigen hundert Phosphopeptiden. Der A-Score (CID und HCD) und der MQ-Score für Messungen im HCD Modus scheinen hingegen sehr robust zu sein und zeigen keine deutlich schlechteren Ergebnisse bei der Verwendung einer komplexen Probe. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die Verwendung eines komplexen Standards nützlich ist, um die Effizienz eines Algorithmus in einer realen Probe besser beurteilen zu können.

## 5.5 TOM40 Import

Durch biochemische Untersuchungen ist bekannt, dass  $\beta$ -Faltblatt-Proteine, wie beispielsweise Tom40, Mdm10 oder Sam50, mit Hilfe des Tom-Komplexes durch die äußere mitochondriale Membran geschleust werden. Anschließend werden sie zum Sam-Komplex geleitet, bilden einen Komplex mit den Sam-Proteinen und werden letztendlich in die Außenmembran integriert. Dieser Vorgang sollte nun mit Hilfe LC-MS basierter Methoden untersucht und somit erstmalig der Import von Proteinen in Mitochondrien dynamisch per MS verfolgt werden. Die Arbeitsschritte dafür sahen folgendermaßen aus:



**Abbildung 36:** Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Analyse des Imports von Tom40 in Mitochondrien; Mit Polyhistidin markierte Tom40 Proteine werden in schwer- und leicht- markierte Mitochondrien (SILAC) importiert. Nach 10 min Import-Phase wird das in schwere Mitochondrien (H) importierte Protein mit Ni-NTA aufgereinigt. Die zu dieser Zeit an das Tom40 gebundenen Proteine werden mit aufgereinigt; Zu dieser Zeit sollte Tom40 einen Komplex mit den Sam-Proteinen der Außenmembran bilden; Das in leichte Mitochondrien (L) importierte Tom40 wird nach einer Importzeit von 10 min und einer Wartezeit von 50 min aufgereinigt. Währenddessen hat es genug Zeit in einen intakten Tom-Komplex integriert zu werden; Beide Proben werden zu gleichen Teilen gemischt, verdaut und mittels LC-MS gemessen. Mit diesem SILAC-Ansatz ist es möglich die spezifischen Proteine der jeweiligen Zeitpunkte in einer Messung zu identifizieren. Proteine mit hohem H/L Verhältnis sind spezifisch für den Import nach 10 min, Proteine mit geringem H/L Verhältnis für den Import nach 10 min mit Wartezeit von 50 min.

## Ergebnisse

---

Hefe Zellen wurden sowohl auf leichtem, als auch auf Medium mit schwer Isotopen-markierten Aminosäuren ( $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -Lysin/  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -Arginin) kultiviert. Sowohl die leichten, als auch die schwer-markierten Mitochondrien wurden aus den Zellen aufgereinigt. Isolierte Tom40 Proteine wurden mit einem Polyhistidin-Tag versehen und 10 min lang in schwer-markierte Mitochondrien importiert. Anschließend wurde Tom40 mittels Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriaceticacid) aufgereinigt. In einem zweiten Experiment wurden Polyhistidin-haltige Tom40 Proteine 10 min in leichte Mitochondrien importiert, der Import gestoppt und nach weiteren 50 min die Tom40 Proteine mit Ni-NTA aufgereinigt. Diejenigen Proteine, die zu den jeweiligen Zeiten am Import beteiligt waren, binden an Tom40 und werden mit aufgereinigt. Nach einer Importzeit von 10 min sollte Tom40 bereits in die Mitochondrien importiert worden und eine Verbindung mit dem Sam-Komplex eingegangen sein. Nach einer Wartezeit von 50 min sollte gewährleistet sein, dass das importierte Tom40 Protein in den intakten Tom-Komplex eingebaut wurde. Die gemeinsam geplanten Experimente wurden bis zu diesem Schritt von Kooperationspartnern (Gruppe von Dr. Nils Wiedemann, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg) durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden gleiche Mengen aufgereinigtes Tom40 aus beiden Experimenten miteinander vermischt. Proteine, welche spezifisch für den Import nach 10 min sind (z.B. Sam-Proteine), lagen nun leicht, Proteine, welche spezifisch für den Import nach 10 min mit anschließender Wartezeit von 50 min (Tom-Proteine) sind, lagen schwer vor und konnten auf Grund in einer einzigen LC-MS Messung voneinander unterschieden werden.

Neben den für den jeweiligen Importschritt spezifischen Proteinen können bei der Ni-NTA Aufreinigung Proteine unspezifisch mit aufgereinigt werden und das Ergebnis verfälschen. Aus diesem Grund wurden spezifische Kontrollexperimente durchgeführt. Auch hier wurden Tom40 Proteine in schwere und leichte Mitochondrien importiert und nach 10 min bzw. 10 min mit 50 min Wartezeit mit Ni-NTA aufgereinigt. Jedoch waren die importierten Tom40 Proteine nicht mit Polyhistidin versehen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass alle gebundenen Proteine unspezifisch aufgereinigt wurden und somit nicht für den Import relevant sind. Auch die Kontrollexperimente wurden am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Freiburg durchgeführt.

Ein Schema des Versuchsaufbaus der einzelnen Experimente ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 17: Zusammenfassung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Imports von Tom40 in Mitochondrien**

|                                     | Experiment 1                                   | Experiment 2                                   | Experiment 3  |
|-------------------------------------|--|--|---|
| <b>schwer</b>                       | Import 10 min                                  | Kontrolle 10min + 50min                        | Import 10min  |
| <b>leicht</b>                       | Kontrolle 10 min                               | Import 10min + 50min                           | Import 10min + 50min                                  |
| <b>Kriterien für Auswertung H/L</b> | >4 spezifisch für Import<br><0,25 unspezifisch | >4 unspezifisch<br><0,25 spezifisch für Import | >4 spezifisch 10min<br><0,25 spezifisch 10min + 50min |

Die Durchführung der oben beschriebenen Experimente ist sehr arbeitsaufwändig und zeitintensiv. Um Probenmaterial der aufwendigen Experimente zu sparen, wurde von den Kooperationspartnern der Universität Freiburg, zur Optimierung der Probenvorbereitung vor der LC-MS Messung, ein vereinfachtes Probenet hergestellt. Wie in Experiment 2 (siehe Tabelle 17) wurden dabei gleiche Anteile schwer-markierter Kontrollproben mit leichten Importproben gemischt. Die Importzeit betrug 10 min. Die für diese Importdauer spezifischen Sam-Proteine sollten bei diesem Versuchsaufbau ein geringes H/L-Verhältnis aufweisen.

Die Proben waren, nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA, in einer Lösung aus 2 M Gu-HCl, 500 mM Imidazol und 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gelöst. Um das Imidazol, welches den Verdau und vor allem die nachfolgende LC-MS Messung beeinträchtigen kann, zu entfernen wurde die Probe, nach der Proteinkonzentration-Bestimmung mittels BCA-Assay, zunächst mit Ethanol gefällt und anschließend verdaut. 0,5 µg der verdauten Proteine wurden per LC-MS analysiert. Die Daten wurden mit dem Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) ausgewertet. Der Median der H/L-Verhältnisse aller identifizierter Proteine lag bei 2. Wird von einer technischen Varianz von 20 % bei den Experimenten ausgegangen, wurden als reguliert alle Proteine mit einem H/L-Verhältnis < 0,25 und > 4 angenommen. Nach Ethanol-Fällung und Verdau konnten zwar die Proteine Sam35 und Sam37 identifiziert werden, jedoch jeweils mit nur einem Peptid/Protein, was eine aussagekräftige Quantifizierung unmöglich machte (siehe Tabelle 18). Das Protein Sam50 konnte überhaupt nicht identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass die gefällten Proteine nicht wieder vollständig in Lösung gebracht werden konnten, obwohl optisch kein Präzipitat mehr sichtbar war.

Aus diesem Grund wurde alternativ zum Entfernen des Imidazols ein FASP-Verdau durchgeführt. Auch hier wurden 0,5 µg mittels LC-MS gemessen und mit dem Proteome Discoverer 1.3 ausgewertet. Mit diesem Ansatz war es möglich alle drei Sam-Proteine mit den erwarteten H/L-Verhältnissen ( $H/L = 0,001$ ) zu identifizieren. Auch konnten 3-4x mehr Peptide pro Protein identifiziert werden, als bei der Ethanol-Fällung. Trotzdem konnte aber auch hier, je nach Sam-Protein, eine Sequenzabdeckung von nur 8-17 % erreicht werden. Dieses Ergebnis ist, wenn bedacht wird, dass eine spezifische Anreicherung durchgeführt wurde, nicht optimal. Da nur eine beschränkte Menge an Probe vorhanden war, wurden 10 µg der Probe mittels FASP verdaut. Bei der Aufarbeitung der Proben mit FASP besteht immer die Möglichkeit, dass Proteine am Filter haften bleiben und verloren gehen. Bei den geringen Probenmengen, die verwendet wurden, fällt so ein Verlust stark ins Gewicht und würde die schlechten Ausbeuten erklären. Mehr Probenmenge konnte jedoch nicht eingesetzt werden, da auch bei den realen Proben nicht mehr zur Verfügung stand.

Als weiterer Ansatz den Verdau und somit auch die Sequenzabdeckung der Sam-Proteine zu verbessern, wurden die Proben in zwei Stufen verdaut. Nach der Fällung der Probe mit Ethanol wurden die Proteine für 4 h bei 37°C mit Trypsin behandelt (Trypsin: Protein 1:50 (w:w)). Durch den Vorverdau und anschließendes Mixen der Probe, sollten alle zuvor noch nicht vollständig gelösten Proteine besser in Lösung gebracht werden. Im zweiten Schritt wurde die Probe über Nacht bei 37°C mit einem Trypsin-zu-Protein-Verhältnis von 1:40 (w:w) verdaut. Auch hier wurden wieder 0,5 µg Probe per LC-MS gemessen. Dieser 2-stufige Verdau zeigte deutlich bessere Ergebnisse als die Ansätze zuvor. Alle drei Sam-Proteine konnten mit den erwarteten H/L-Verhältnissen identifiziert werden. Außerdem konnten je nach Sam-Protein 9-16 verschiedene Peptide pro Protein identifiziert werden, was einer Sequenzabdeckung von etwa 40 % entspricht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden auch die realen Proben aufgearbeitet und verdaut.

**Tabelle 18: Ergebnisse der Optimierung der Probenaufarbeitung und des Verdau.**

|  | <b>Protein</b> | <b>Anzahl Peptide</b> | <b>Sequenzabdeckung</b> | <b>H/L- Verhältnis</b> |
|--|----------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| <b>Fällung</b>                         | SAM 35         | 1                     | 4,2 %                   | 0,009                  |
|  | SAM 37         | 1                     | 2,5 %                   | 0,685                  |
| <b>FASP</b>                            | SAM 35         | 4                     | 17,9 %                  | 0,001                  |
|  | SAM 37         | 3                     | 10,7 %                  | 0,001                  |
|  | SAM 50         | 4                     | 8,9 %                   | 0,001                  |
| <b>Fällung +<br/>2-stufiger Verdau</b> | SAM 35         | 9                     | 36,1 %                  | 0,001                  |
|  | SAM 37         | 11                    | 43,3 %                  | 0,001                  |
|  | SAM 50         | 16                    | 46,9 %                  | 0,001                  |

Zur Untersuchung des Imports des Tom40 Proteins in Mitochondrien wurden alle Importexperimente in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Durch Messung und Auswertung der Kontroll-Experimente 1 & 2 (siehe Tabelle 17) konnten diejenigen Proteine bestimmt werden, welche unspezifisch für den Import sind. Bei der Datenauswertung der eigentlichen Importexperimente (Experiment 3, Tabelle 17) wurden alle Proteine als spezifisch angesehen, welche ein H/L-Verhältnis von  $> 4$  (spezifisch für 10 min Import) oder  $< 0,25$  (spezifisch für 10 min Import mit 50 min Wartezeit) hatten, mit mindestens zwei Peptiden pro Protein identifiziert wurden und bei den Kontroll-Experimenten nicht als unspezifisch bestimmt werden konnten. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Analyse des Imports von Tom40 in Mitochondrien.

|  | Protein | Anzahl Peptide | Sequenzabdeckung | H/L-Verhältnis |
|--|---------|----------------|------------------|----------------|
| <b>Spezifisch für<br/>10min Import</b>                       | SAM 35  | 6              | 23,4             | 5,8            |
|  | SAM 37  | 11             | 40,9             | 35,7           |
|  | SAM 50  | 12             | 33,5             | 4,3            |
| <b>Spezifisch für<br/>10 min Import<br/>50 min Wartezeit</b> | TOM 20  | 4              | 27,3             | 0,03           |
|  | TOM 22  | 2              | 24,3             | 0,19           |
|  | TOM 40  | 27             | 84,5             | 0,01           |
|  | TOM 5   | 3              | 70,0             | 0,16           |

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass das Tom40 Protein nach einem 10-minütigen Import einen Komplex mit den Sam-Proteinen eingeht. Nach einer Wartezeit von 50 min ist das Protein bereits in einen intakten Tom-Komplex eingebaut. Es handelt sich hierbei um die erstmalige Analyse eines dynamischen Proteinimport-Vorgangs mittels Massenspektrometrie.

## 5.6 Quantifizierung des Tim22-Komplexes

Wie in Kapitel 1.3.2 erläutert, ist Tim22 ein Komplex der inneren mitochondrialen Membran, welcher dazu dient Proteine ohne Präsequenzen zu importieren. Die Stöchiometrie dieses Komplexes ist jedoch weitgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Ansatz entwickelt, mit dem es möglich ist, die Stöchiometrie von Proteinkomplexen mit Hilfe der Massenspektrometrie zu bestimmen. Der Ansatz wurde zunächst mit zwei (Tim9, Tim10) der sechs Proteine des Tim22-Komplexes erarbeitet und soll im Folgenden näher erläutert werden.

Im ersten Schritt wurden die Proteine Tim9 und Tim10 in BL21-Codon Plus-RIPL Zellen exprimiert. BL21 Zellen sind *Escherichia coli* Zellen mit zusätzlicher T7 RNA Polymerase. In diesen Zellen ist es möglich, durch Einbau eines speziellen Plasmids (pET Plasmid), große Mengen eines gewünschten Proteins zu produzieren. Die exprimierte Sequenz setzte sich aus einem GST- und einem His-Tag (zur späteren Aufreinigung der Proteine), dem eigentlichen Protein und einem Kalibrier-Peptid zusammen (siehe Abbildung 37). Das Kalibrier-Peptid stellt dabei einen einfachen Ansatz dar, alle exprimierten Proteine absolut zu quantifizieren. Es wurde so gewählt, dass es nicht endogen modifiziert werden kann. Posttranslationale Modifikationen von Peptiden sind einer der Hauptgründe dafür, dass diese nur schlecht zur Quantifizierung



## Ergebnisse

verwendet werden können. Die Expression und die Aufreinigung der Proteine wurde von Kooperationspartnern (Gruppe von Dr. Nils Wiedemann, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg) durchgeführt. Nach der Aufreinigung der Proteine wurden diese mittels Trypsin verdaut und ca. 0,5 µg (laut BCA-Proteinbestimmung) mittels LC-MS gemessen. Nach der Messung wurden die Daten gegen die gesamte Uniprot Datenbank gesucht. Dadurch war es möglich zu überprüfen, ob neben den aufgereinigten Tim-Proteinen noch unspezifisch gebundene *E.coli* Proteine in der Probe vorhanden sind. Es war somit möglich die Reinheit der Proben zu untersuchen. Die Ergebnisse der Messungen sind in der nachfolgenden Abbildung 37 dargestellt.

### TIM9

```

MSPLIGYWAAGGIAFOPTLLLEYLEEKYSEHLYERDSGDKWIKK
ELGLEFPNLPYYIDGDKLQSMALIRYIADKHNMGGCPKERAEL
SMLREGAVLDIRYCVSRVAYSMDPFTLKVDFLSKLPENLKMFEEDRLC
HKTYLNGDHWVTHPDMLYDALDVLVLYMDPMCLDAPPKLVCFKK
RIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOQWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSR
EFLVAGGEDFKMDALNSKEQQEFQKVVEQKQMKDFMRLYSNLVE
RCFTDCVNDFTTSLKLNKEQTCIMKCEKFLKHSERVGGQRFQEQN
AALGQGLGRHHHHHHHHHH
  
```

| Protein  | Peptide | PSMs | NSAF  |
|--|---------|------|-------|
| TIM9 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )                   | 7       | 63   | 0.755 |
| Glutathione S-transferase ( <i>Schistosoma japonicum</i> ) | 8       | 41   | 0.196 |
| Trypsin ( <i>Bos taurus</i> )                              | 5       | 8    | 0.034 |
| Beta-lactamase ( <i>Escherichia coli</i> )                 | 4       | 4    | 0.015 |

### TIM10

```

MSPLIGYWAAGGIAFOPTLLLEYLEEKYSEHLYERDSGDKWIKK
ELGLEFPNLPYYIDGDKLQSMALIRYIADKHNMGGCPKERAEL
SMLREGAVLDIRYCVSRVAYSMDPFTLKVDFLSKLPENLKMFEEDRLC
HKTYLNGDHWVTHPDMLYDALDVLVLYMDPMCLDAPPKLVCFKK
RIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOQWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSR
EFLVAGGEDFKMSFLGFGGGQQLSSQKIQAAEAELDLVTDME
NKLVNNCYKCCINTSYSEGELNKNNESSCLDRVAKYFETNVQVGE
NMQKMGQSFNAAGKHHHHHHHHHH
  
```

| Protein  | Peptide | PSMs | NSAF  |
|--|---------|------|-------|
| TIM10 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )                          | 10      | 106  | 0.539 |
| Glutathione S-transferase ( <i>Schistosoma japonicum</i> )         | 20      | 178  | 0.386 |
| Trypsin ( <i>Bos taurus</i> )                                      | 6       | 15   | 0.029 |
| Beta-lactamase ( <i>Escherichia coli</i> )                         | 9       | 11   | 0.018 |
| Elongation factor ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )                 | 3       | 3    | 0.004 |
| Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase ( <i>Escherichia coli</i> ) | 2       | 2    | 0.003 |
| D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase ( <i>Escherichia coli</i> )   | 2       | 2    | 0.002 |

**Abbildung 37: Sequenzen und Ergebnisse der ersten LC-MS Messungen der exprimierten Tim-Proteine; Die Sequenzen der exprimierten Tim-Proteine setzten sich aus einem GST-tag (schwarz), einem Kalibrier-Peptid (rot), der eigentlichen Sequenz von Tim9 bzw. Tim10 (grün) und einem His-Tag (blau) zusammen. Mit Hilfe der Tags ist es möglich, die exprimierten Proteine aufzureinigen. Das Kalibrier-Peptid dient zur absoluten Quantifizierung der Proteine; Die LC-MS Messungen der aufgereinigten und verdauten Proben zeigen, dass neben den gewünschten Proteinen nur wenige unspezifische Spektren identifiziert werden konnten und somit die Aufreinigung erfolgreich war (>95 % der PSMs waren aus den Tim Konstrukten).**

Es zeigte sich, dass die Aufreinigung der Tim-Proteine erfolgreich war. Neben den gewünschten Tim-Proteinen konnten nur einige wenige unspezifische Proteine in geringer Konzentration (siehe NSAF) in der Probe identifiziert werden. Mit diesen aufgereinigten Proteinen konnte somit im Anschluss weiter gearbeitet werden.

Im nächsten Schritt wurde eine absolute Quantifizierung der beiden aufgereinigten Tim-Proteine durchgeführt. Dafür wurde eine stabil-Isotopen markierte und absolut quantifizierte Variante des Kalibrierpeptids (Thermo Fisher Scientific) verwendet, welches in den Tim-Proteinen integriert war. Die absolute Menge dieses schwer markierten Kalibrier-Peptides war durch den Hersteller bekannt. Durch Zuspiken einer bekannten Menge dieses Peptides zu den Tim-Proteinen und einer anschließenden LC-MS Messung war es nun möglich die Tim-Proteine anhand der Flächen ( $MS^1$ ) des Kalibrier-Peptides, absolut zu quantifizieren. Die Konzentration vom Tim9 Protein betrug 8,8 pmol/ $\mu$ L, die von Tim10 betrug 13,3 pmol/ $\mu$ L.

Im letzten Schritt erfolgte die Quantifizierung von Tim9 und Tim10 im isolierten Tim22-Komplex. Dafür wurden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen, welche Tim18<sub>ProteinA</sub> (Bestandteil des Tim22-Komplexes) exprimieren, auf schwer markiertem Medium ( $^{13}C_6$   $^{15}N_2$ -Lys,  $^{13}C_6$   $^{15}N_4$ -Arg) kultiviert. Das an den Tim22-Komplex gekoppelte ProteinA ist ein 40 - 60 kDa schweres Protein aus dem *Staphylococcus aureus*, welches Immunoglobuline, wie IgG (Immunoglobulin G), bindet und daher zur Immunopräzipitation verwendet werden kann [116]. Nach der Zellernte wurden die schwer markierten Mitochondrien aufgereinigt und lysiert. Anschließend wurde zur Isolierung des Tim22-Komplexes eine Immunopräzipitation durchgeführt. ProteinA wurde mit Hilfe der TEV-Protease (Cystein Protease aus dem Tabak Etch Virus) abgetrennt und der isolierte Tim22-Komplex zur weiteren Aufreinigung auf einem Blau-nativen Gel aufgetrennt. Auch diese Arbeitsschritte wurden von den Kooperationspartnern in Freiburg durchgeführt. Nach der Auftrennung erfolgte ein in-Gel Verdau des Komplexes mit Trypsin (siehe Kapitel 4.2.2). Nach dem gleichen Prinzip wie bei der Quantifizierung der unbekannt isolierten Tim9 und Tim10 Proteine sollten auch in diesem Ansatz die Konzentrationen der Tim-Proteine des Komplexes bestimmt werden. Definierte Mengen (jeweils 200 fmol pro Protein) der leichten isolierten und verdauten Tim-Proteine, deren Konzentrationen aus dem vorhergegangenen Arbeitsschritt nun bekannt waren, wurden zu dem verdauten, schwer markierten Tim22-Komplex (1/4 der Gelbande) zugefügt und mittels LC-MS nach dem SILAC-Prinzip mit Hilfe des Proteome Discoverers 1.3 quantifiziert. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

**Tabelle 20: Quantifizierung der Tim9 und Tim10 Proteine des Tim22-Komplexes; Rote Peptide enthalten Methionine, welche in der oxidierten und nicht oxidierten Form im Peptid vorkommen können, lila Peptide haben eine überlesene Schnittstelle, grüne Peptide lassen sich gut quantifizieren**

| TIM10                   |      |                |               | TIM9               |      |                |               |
|-------------------------|------|----------------|---------------|--------------------|------|----------------|---------------|
| Sequenz                 | PSMs | Modifikationen | schwer/leicht | Sequenz            | PSMs | Modifikationen | schwer/leicht |
| CINTSYSEGELNK           | 4    |                | 0.502         | CFTDCVNDFTTSK      | 8    |                | 0.183         |
| IQAAEAELDLVTDMPNK       | 75   |                | 0.037         | FQEQNAALGQGLGR     | 23   |                | 0.065         |
| MGQSFNAAGK              | 20   |                | 0.065         | LYSNLVER           | 5    |                | 0.152         |
| MGQSFNAAGK              | 61   | Oxidation      | 0.010         | EQTCIMK            | 4    |                | 0.197         |
| MGQSFNAAGKF             | 4    |                | 1.064         | EQTCIMK            | 11   | Oxidation      | 0.196         |
| MGQSFNAAGKF             | 4    | Oxidation      | 2.801         | LTNKEQTCIMK        | 9    |                | 0.017         |
| MSFLGFGGGQPQLSSQK       | 46   | Oxidation      | 0.010         | LTNKEQTCIMK        | 17   | Oxidation      | 0.012         |
| MSFLGFGGGQPQLSSQK       | 13   |                | 0.010         | MDALNSKEQQEFQK     | 5    | Oxidation      | 0.115         |
| YFETNVQVGENMQK          | 38   | Oxidation      | 0.135         | MDALNSKEQQEFQK     | 6    |                | 0.010         |
| YFETNVQVGENMQK          | 9    |                | 100.000       | DALNSKEQQEFQK      | 1    |                | 0.010         |
| KCINTSYSEGELNKNNESSCLDR | 2    |                | 0.017         | EQQEFQKWEQK        | 3    |                | 0.010         |
|                         |      |                |               | FLKHSER            | 1    |                | 0.010         |
|                         |      |                |               | MDALNSKEQQEFQKWEQK | 1    |                | 0.010         |

Peptide, die Methionine enthalten, können sowohl in der nicht oxidierten Form, als auch in der oxidierten Form bei einer Messung vorkommen. Das Peptid „YFETNVQVGENMQK“ des Tim10-Proteins beispielsweise kommt im Komplex sowohl oxidiert, als auch nicht oxidiert vor. Beim isolierten, leichten Tim10-Protein hingegen ist nur die oxidierte Form des Peptides zu finden. Das hat zur Folge, dass das oxidierte Peptid mit einem schwer/leicht (H/L)-Verhältnis von 0,135 quantifiziert wird, die nicht oxidierte Form jedoch mit einem Verhältnis von 100. Eine sinnvolle Quantifizierung ist somit nicht mehr möglich. Bei Peptiden mit überlesenen Schnittstellen können ähnliche Probleme auftreten. Werden alle diese Peptide von der Quantifizierung ausgeschlossen, bleiben bei Tim9 noch drei identifizierte Peptide übrig, mit denen eine verlässliche Quantifizierung durchgeführt werden kann. Eine Quantifizierung ist bei Tim9 also möglich. Bei Tim10 tritt jedoch ein Problem auf. Werden, wie bei Tim9 alle Methionin-haltigen Peptide und Peptide mit überlesenen Schnittstellen von der Quantifizierung ausgeschlossen, bleibt nur noch ein identifiziertes Peptid übrig. Anhand eines einzigen Peptides ist eine glaubhafte Quantifizierung eines Proteins jedoch nicht möglich.

Um dieses Problem zu beheben, wurden die Proben nach der Mischung des verdauten Komplexes mit je 200 fmol leichten verdauten Tim9- und Tim10-Proteinen mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt. Das hatte zur Folge, dass alle Methionine in der Probe oxidiert wurden und somit Methionin-haltige Peptide zur Quantifizierung verwendet werden konnten. Bei diesem Experiment wurde die Menge an eingesetztem verdautem Tim22-Komplex erhöht, um die Signale während der Messung anzuheben. Die Ergebnisse sind in der

## Ergebnisse

nachfolgenden Tabelle dargestellt. In Vorexperimenten wurde überprüft, dass durch die Behandlung der Probe mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keine unerwünschten Nebenprodukte (z.B. Oxidation von Tryptophan) entstehen.

**Tabelle 21: Quantifizierung der Tim9- und Tim10-Proteine des Tim22-Komplexes nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidation; Rot markierte Peptide besitzen überlesene Schnittstellen, grün markierte Peptide können zur Quantifizierung verwendet werden; Die untere Tabelle zeigt die absoluten Mengen an TIM9 und TIM10 im Komplex basierend auf den Werten der oberen Tabellen**

| TIM10                           |      |              |               | TIM9               |      |              |               |
|---------------------------------|------|--------------|---------------|--------------------|------|--------------|---------------|
| Sequenz                         | PSMs | Modifikation | schwer/leicht | Sequenz            | PSMs | Modifikation | schwer/leicht |
| IQA4EAELDVLVTD <sup>M</sup> FNK | 16   | Oxidation    | 0,502         | FQEQNAALGQGLGR     | 17   |              | 0,674         |
| YFET <sup>W</sup> QVGENMQK      | 8    | Oxidation    | 0,676         | CFTDCVNDFTTSK      | 2    |              | 1,088         |
| CINTSYSEGELNK                   | 4    |              | 0,344         | LYSNLVER           | 3    |              | 1,078         |
| MQQSFNAAGKF                     | 4    | Oxidation    | 100           | VGQRFQEQNAALGQGLGR | 1    |              | 100           |

| Protein | Protein zugefügt (leicht) | ϕ schwer/leicht | Protein in Komplex (schwer) |
|---------|---------------------------|-----------------|-----------------------------|
| TIM9    | 250 fmol                  | 0.947           | 237 fmol                    |
| TIM10   | 290fmol                   | 0.507           | 147 fmol                    |

Das Oxidieren der verdauten Peptide mit Wasserstoffperoxid war folglich erfolgreich. Die LC-MS Messung zeigte, dass alle Methionin-haltigen Peptide nur noch in ihrer oxidierten Form vorlagen. Mit Hilfe der Oxidation der Probe war es somit möglich, sowohl Tim9 als auch Tim10 mit drei verschiedenen Peptiden zu quantifizieren. Das Verhältnis von Tim9 zu Tim10 im Tim22-Komplex liegt, basierend auf den hier vorgestellten Messungen, bei ca. 1,6:1.

Im nachfolgenden Schritt wurden auch die restlichen Proteine des Tim22-Komplexes (Tim12, Tim18, Tim22 und Tim54) in *E.coli* synthetisiert und mit der hier beschriebenen Methode quantifiziert. In der nachfolgenden Tabelle ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse dargestellt.

**Tabelle 22: Zusammenfassung der Quantifizierung aller Tim-Proteine des Tim22-Komplex (in-Gel Verdau)**

| Protein | Protein zugefügt (leicht) | schwer/leicht | Protein in Komplex (schwer) | Verhältnis |
|---------|---------------------------|---------------|-----------------------------|------------|
| Tim9    | 304 fmol                  | 0,85 ± 3,5 %  | 258 fmol                    | 2,8        |
| Tim10   | 283 fmol                  | 0,53 ± 8,7 %  | 149 fmol                    | 1,6        |
| Tim12   | 205 fmol                  | 0,45 ± 3,6 %  | 92 fmol                     | 1          |
| Tim18   | 282 fmol                  | 0,01 ± 9,8 %  | 2 fmol                      | 0,03       |
| Tim22   | 198 fmol                  | 0,79 ± 10,1 % | 156 fmol                    | 1,7        |
| Tim54   | 98 fmol                   | 0,97 ± 9,5 %  | 95 fmol                     | 1          |

Bei der Quantifizierung der Tim-Proteine zeigte sich, dass Tim18 stark unterrepräsentiert in der Probe zu sein scheint. Der zur Quantifizierung verwendete Tim22-Komplex wurde, wie oben beschrieben, mit einem blau-nativen Gel aufgereinigt und in-Gel verdaut. Tim18 ist ein Protein, welches sich quasi komplett in der inneren Membran befindet und stark hydrophob ist. Aus diesem Grund ist es möglich, dass das Protein im Gel nicht optimal verdaut und aus dem Gel heraus eluiert werden kann. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass Tim18 in nur geringen Mengen in der Probe identifiziert werden konnte. Im nächsten Schritt wurde aus diesem Grund ein Tim22-Komplex direkt nach der Immunopräzipitation und ohne zusätzliche Aufreinigung mittels blau-nativen Gels quantifiziert. Der Verdau des Komplexes erfolgte, nach der Fällung der Probe mit Ethanol, in-Lösung mit Trypsin als Protease (37°C, 12 h, Protein:Trypsin-Verhältnis: 30:1). Auch mit diesem Ansatz war es nicht möglich Tim18 im Komplex zu identifizieren.

## **5.7 Das mitochondriale Phosphoproteom in verschiedenen Stadien des Zellzyklus**

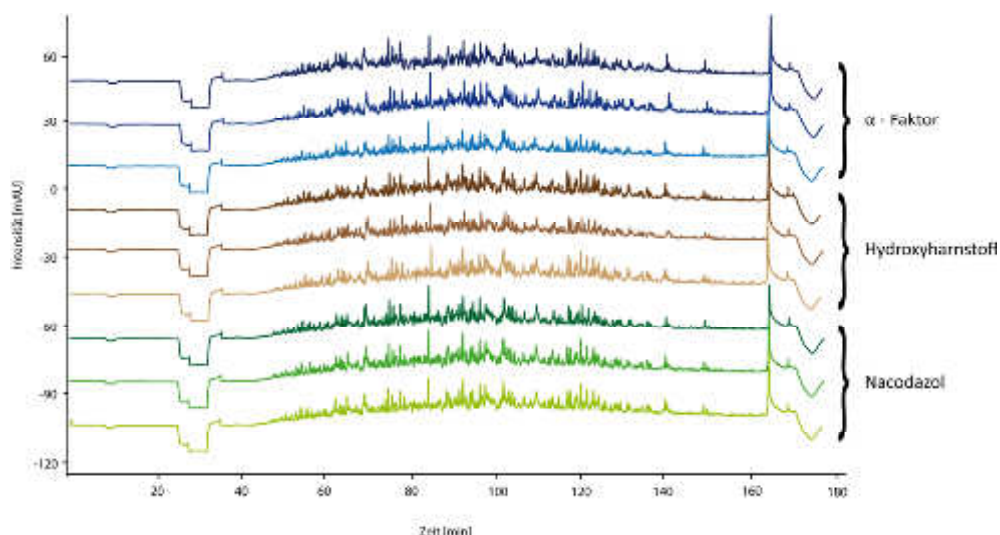
Zur Untersuchung des Zellzyklus können Zellen durch Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen in bestimmten Bereichen des Zyklus gestoppt werden. Im Laufe dieser Arbeit sollte die Veränderung des Phosphoproteoms von Mitochondrien in verschiedenen Bereichen des Zellzyklus untersucht werden. Dafür wurden Hefe-Zellen mit drei verschiedenen Substanzen behandelt:  $\alpha$ -Faktor, Hydroxyharnstoff und Nacodazol. Der Übergang der Zelle in die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus wird durch Kinasen reguliert. Diese wiederum werden durch verschiedene Cycline stimuliert. Durch die Behandlung von Zellen mit dem  $\alpha$ -Faktor wird das Protein FAR1 aktiviert. Das hat zur Folge, dass das Cyclin CLN2 inhibiert wird. CLN2 ist für den Übergang der Zelle von der G1- zur S-Phase der Interphase verantwortlich. Die Behandlung von Zellen mit dem  $\alpha$ -Faktor hat also zur Folge, dass die Zellen in der G1-Phase verbleiben



[117], [118], [119]. Hydroxyharnstoff ist ein Zytostatikum, welches zur Behandlung von malignen Bluterkrankungen, wie Leukämie, eingesetzt wird. Es inhibiert das Enzym Ribonucleotid-Reduktase, was zur Folge hat, dass keine Desoxyribonucleotide gebildet werden können. Desoxyribonucleotide sind Grundbausteine der DNA, ohne die ein DNA-Strang nicht verdoppelt werden kann. Durch die Behandlung von Zellen mit Hydroxyharnstoff wird somit die Verdopplung der DNA während des Zellzyklus blockiert. Die Zellen werden somit zwischen der G1- und S-Phase abgestoppt [120], [121]. Nacodazol ist ein anti-neoplastisches Mittel, welches die Polymerisation von Mikrotubuli verhindert. Dadurch kann während des Zellzyklus kein Spindelapparat gebildet werden. Das wiederum hat zur Folge, dass mit Nacodazol behandelte Zellen im frühen Bereich der Prophase in der Mitose verbleiben [122].

Zur quantitativen Analyse des (Phospho-) Proteoms von Mitochondrien während des Zellzyklus, wurden Hefe-Zellen nun mit dem  $\alpha$ -Faktor ( $\alpha$ ), mit Hydroxyharnstoff (H) und mit Nacodazol (N) behandelt. Das Experiment wurde mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Zur Quantifizierung auf globaler und Phosphopeptid-Ebene wurde iTRAQ (4-plex) verwendet.

Im ersten Schritt wurden alle Proben mit 1 % SDS lysiert und je 200  $\mu\text{g}$  (basierend auf der BCA-Analyse) von jeder Probe mit FASP verdaut. Nach dem Verdau wurde die Konzentration der Proben mit dem Nanodrop2000 angeglichen. Je 1  $\mu\text{g}$  jeder Probe wurde anschließend mittels LC-MS analysiert, um die angeglichenen Konzentrationen zu überprüfen (siehe Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Auftrennung der Zellzyklus Proben mittels LC nach Verdau und Angleichung mit dem Nanodrop 2000; Blau: Replikate, der mit  $\alpha$ -Faktor behandelten Proben; Braun: Replikate, der mit Hydroxyharnstoff behandelten Proben; Grün: Replikate, der mit Nacodazol behandelten Proben.

## Ergebnisse

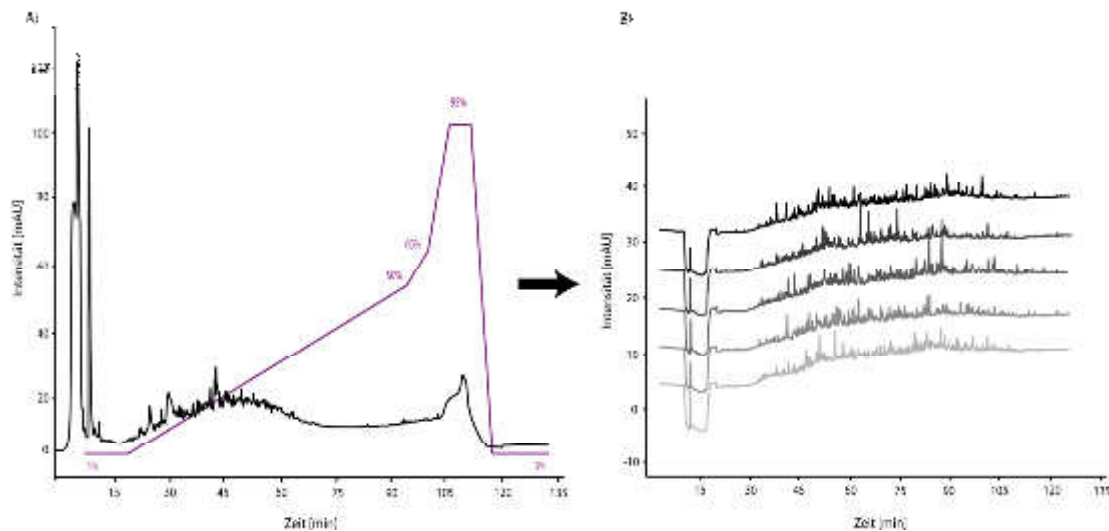
---

Nachdem die Proben sowohl mit dem Nanodrop, als auch mit LC-MS Messungen angeglichen wurden, erfolgte das Markieren der Proben (je 150 µg) mit iTRAQ. Da pro iTRAQ 4-plex Kit jeweils vier verschiedene Proben markiert werden können, pro Replikate jedoch nur drei verschiedene Bedingungen ( $\alpha$ -Faktor, Hydroxyharnstoff, Nacodazol) vorhanden waren, wurde die vierte Markierung als interner Standard genutzt. Dafür wurden 50 µg jeder Probe gemischt (insgesamt 450 µg) und je 150 µg dieses Gemisches als vierte Probe in jedem Replikate verwendet. Dies vereinfacht den späteren Abgleich der quantitativen Daten zwischen den biologischen Replikaten. Die Markierungsstrategie ist nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 23: Markierungsstrategie der Zellzyklus Experimente**

| <b>Replikate 1</b> |     | <b>Replikate 2</b> |     | <b>Replikate 3</b> |     |
|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
| $\alpha$ -Faktor   | 114 | $\alpha$ -Faktor   | 117 | $\alpha$ -Faktor   | 116 |
| Hydroxyharnstoff   | 116 | Hydroxyharnstoff   | 115 | Hydroxyharnstoff   | 117 |
| Nacodazol          | 115 | Nacodazol          | 114 | Nacodazol          | 114 |
| Standard           | 117 | Standard           | 116 | Standard           | 115 |

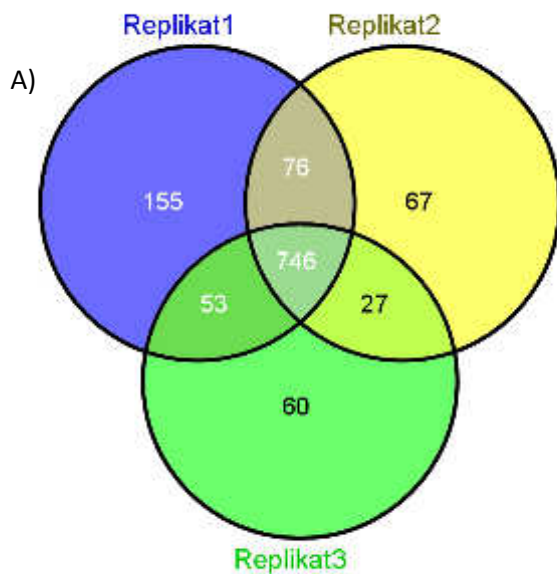
Nach der Markierung mit iTRAQ wurden zur globalen Quantifizierung des Proteoms je 5 µg pro Replikate abgenommen, mit R3 entsalzt und anschließend aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte durch Umkehrphasen-Chromatographie bei einem pH-Wert von 6. Pro Replikate wurden alternierend 5 Fraktionen genommen und mittels LC-MS (saure RP Auftrennung) analysiert. Eine Fraktion wurde jeweils 30 Sekunden gesammelt. Nach der 5. Fraktion, also nach 2,5 min, wurde wieder mit der ersten Fraktion begonnen. Die Auftrennung ist beispielhaft an Replikate 1 in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 39: Auftrennung der globalen Probe beispielhaft an Replik 1; A) Auftrennung pH6; 5 Fraktionen wurden gesammelt, jede Fraktion wurde 30 Sekunden gesammelt, nach 2,5 min wurde wieder mit Fraktion 1 begonnen; B) Auftrennung der 5 Fraktionen auf einer C18 Säule (saurer pH).**

Die restlichen Proben wurden ebenfalls entsalzt und anschließend mit dem optimierten Titandioxid-Protokoll angereichert. Nach der Anreicherung der phosphorylierten Peptide wurden die Proben auf einer HILIC-Säule aufgetrennt. Pro Replik wurden 10 Fraktionen genommen und diese anschließend mittels LC-MS analysiert. Die Auswertung der Daten auf globaler und auf Phosphopeptid-Ebene erfolgte mit dem Proteome Discoverer 1.3. Bei der globalen Analyse konnten 902 verschiedene Proteine identifiziert werden, die in mindestens zwei Replikaten gefunden werden konnten (mind. 2 Peptide pro Protein,  $FDR \leq 1\%$ ). 63 % der Proteine konnten in allen drei Replikaten identifiziert werden, 76 % in mindestens zwei Replikaten (siehe Abbildung 40 A). Der Median der iTRAQ -Verhältnisse aller identifizierter Proteine lag bei 1. Wird von einer technischen Varianz von 20 % bei den Experimenten ausgegangen, wurden bei der Quantifizierung alle Proteine, die ein Verhältnis  $> 2$  zwischen den einzelnen iTRAQ Markierungen aufwiesen, als signifikant hochreguliert angenommen. Alle mit einem Verhältnis von  $< 0,5$  wurden als runterreguliert eingestuft. In Abbildung 40 B sind die sieben Proteine dargestellt, welche eine Regulierung aufgezeigt haben.





B)

| Accession | Gename  | $\alpha/N$ | $\alpha/H$ | N/H  |
|-----------|---------|------------|------------|------|
| YBR056W   | YBR056W | 1.18       | 0.54       | 0.46 |
| YER166W   | DNF1    | 1.41       | 0.66       | 0.47 |
| YPL148C   | PPT2    | 0.75       | 0.46       | 0.69 |
| YEL034W   | HYP2    | 0.42       | 0.47       | 1.12 |
| YGL195W   | GCN1    | 0.39       | 0.48       | 1.25 |
| YJR060W   | CBF1    | 0.21       | 0.40       | 1.93 |
| YBR078W   | ECM33   | 0.47       | 0.82       | 2.02 |

Abbildung 40: Zusammenfassung der globalen Analyse; A) Zusammenfassung der globalen Messung der drei biologischen Replikate. 746 Proteine konnten in allen drei Replikaten identifiziert werden; B) Sieben mitochondriale Proteine, die auf globaler Ebene eine Regulierung zwischen den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus aufweisen.

Bei der Analyse auf Phosphopeptid-Ebene konnten 252 (davon 162 mitochondrial) verschiedene phosphorylierte Peptide identifiziert werden, die in mindestens zwei Replikaten gefunden wurden und eine phosphoRS Wahrscheinlichkeit von über 75 % hatten. Von den mitochondrialen Phosphopeptiden waren 14 signifikant reguliert (siehe Tabelle 24). Die entsprechenden Proteine zeigten auf globaler Ebene keine Regulierung, sodass es sich folglich um eine reale Veränderung auf Phosphopeptid-Ebene handelt. Auch hier wurden alle Peptide, die ein Verhältnis  $> 2$  zwischen den einzelnen iTRAQ Markierungen aufwiesen, als hochreguliert angenommen. Alle mit einem Verhältnis von  $< 0,5$  wurden als runterreguliert eingestuft.

## Ergebnisse

**Tabelle 24: Zusammenfassung der regulierten phosphorylierten mitochondrialen Peptide der Zellzyklus-Experimente; Kleine rote Buchstaben markieren die Phosphorylierungsstelle; Angegeben sind Durchschnittswerte der drei Replikate**

| Nr. | Accession | Genname | Peptid                                    | $\alpha/N$ | $\alpha/H$ | N/H  |
|-----|-----------|---------|---|------------|------------|------|
| 1   | YGR086C   | PIL1    | ALLELLDDSPVtPGETRPA <sup>t</sup> YDGYEASK | 3.34       | 3.87       | 1.26 |
| 2   | YGR193C   | PDX1    | YFDPIFEDLVTLsPR                           | 2.71       | 3.20       | 1.19 |
| 3   | YGR244C   | LSC2    | SGVHMIEsPQQAEDVAK                         | 2.32       | 3.86       | 1.70 |
| 4   | YLR163C   | MAS1    | SESPVPLG <sup>s</sup> PR                  | 2.62       | 2.73       | 1.05 |
| 5   | YLR203C   | MSS51   | NALGLDPPP <sup>s</sup> PEDPTPENR          | 10.15      | 6.11       | 0.88 |
| 6   | YLR304C   | ACO1    | STVEVKV <sup>s</sup> PTSDR                | 8.54       | 5.19       | 0.75 |
| 7   | YNL121C   | TOM70   | FGDIDtATATPTELSTQPAKER                    | 3.35       | 4.21       | 1.25 |
| 8   | YNL121C   | TOM70   | FGDIDtATATPTELSTQPAK                      | 2.12       | 2.55       | 1.30 |
| 9   | YNL121C   | TOM70   | FGDIDTATA <sup>t</sup> PTELSTQPAKER       | 3.44       | 4.87       | 1.50 |
| 10  | YNL121C   | TOM70   | FGDIDTATA <sup>t</sup> PTELSTQPAK         | 2.34       | 4.28       | 1.78 |
| 11  | YPL004C   | LSP1    | ALLELLDDSPVtPGEARPA <sup>t</sup> YDGYEASR | 2.73       | 3.52       | 1.43 |
| 12  | YBR054W   | YRO2    | KAQEEEEEDVA <sup>t</sup> DSE              | 1.09       | 0.54       | 0.49 |
| 13  | YDR197W   | CBS2    | SAsLSLR                                   | 1.10       | 0.34       | 0.44 |
| 14  | YMR031C   | EIS1    | NN <sup>s</sup> ITSATSK                   | 0.46       | 0.89       | 3.39 |

Die Peptide 1-11 zeigen eine Hochregulation der Phosphorylierung nach Behandlung der Zellen mit  $\alpha$ -Faktor, also in der G1-Phase des Zellzyklus. Die Peptide 12 und 13 werden verstärkt bei den Zellen phosphoryliert, die mit Hydroxyharnstoff behandelt wurden und somit zwischen der G1- und der S-Phase eingefroren wurden. Peptid 14 zeigt eine Hochregulation nach der Behandlung der Zellen mit Nacodazol, also bei den Zellen, die nach dem Übergang von der Interphase zur Mitose abgestoppt wurden.

### 5.8 Phosphoproteom-Analyse von aktivierten Tabakpollen

Zusätzlich zur Analyse des mitochondrialen Proteinimports wurden die dafür optimierten Methoden zur Lyse, zum Verdau und zur Phosphopeptid-Anreicherung auf ein weiteres System, nämlich Tabakpollen, übertragen.

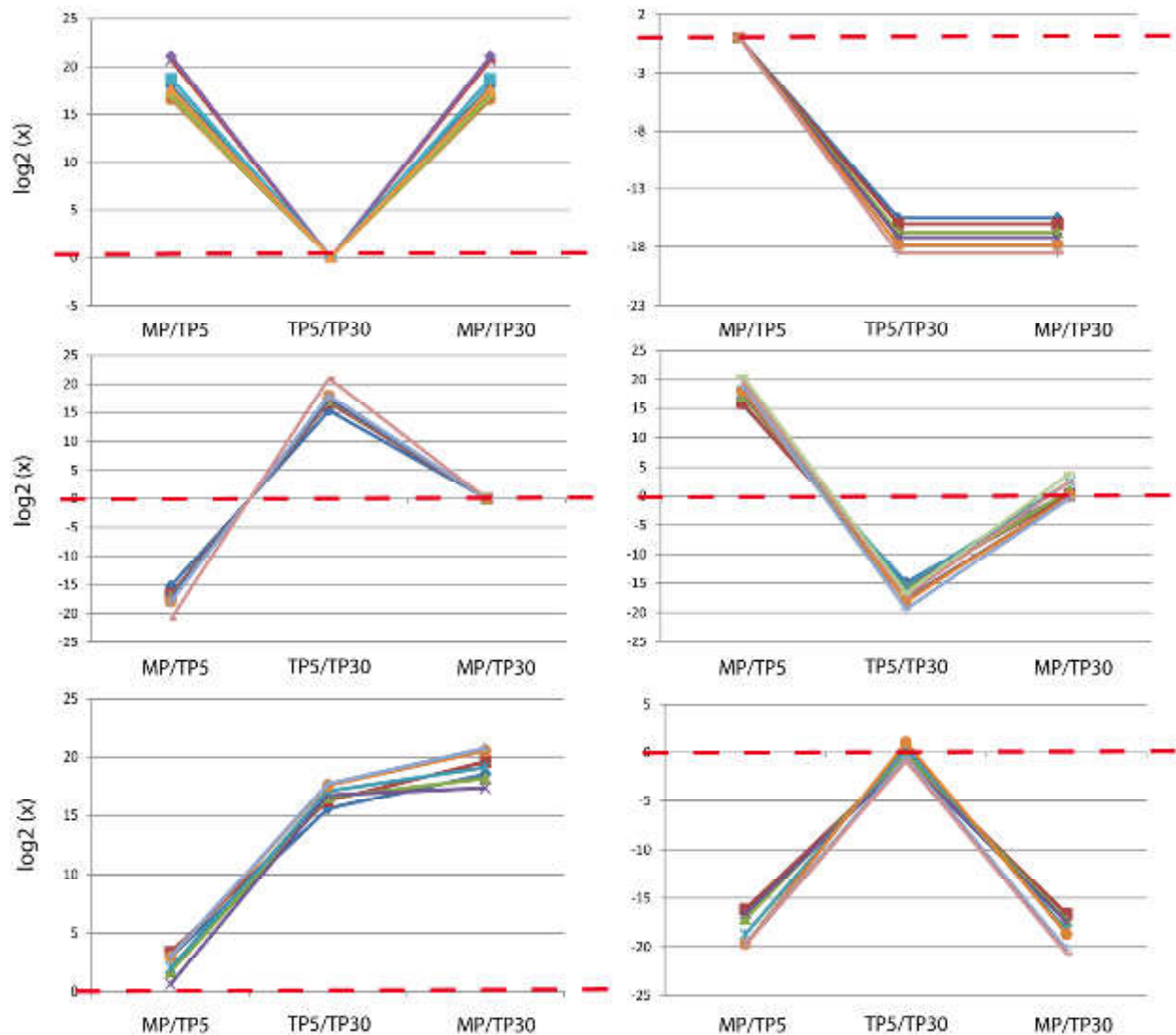
Reife Pollen von Angiospermen, wie Tabakpflanzen, können zum Überleben bei Umweltstress in eine inaktive, eingetrocknete Form übergehen. Ändern sich die Umweltbedingungen zum Positiven, sind die Pollen dazu in der Lage in eine aktive Form zu wechseln, zu Rehydrieren und einen Pollenschlauch auszubilden. Röhrig *et al* [123] zeigten, dass der Übergang von ruhenden zu aktivierten Pollen bei der Pflanze *Craterostigma plantagineum* durch die Phosphorylierung von Proteinen reguliert wird und konnten 16 verschiedene phosphorylierte Proteine identifizieren.

In diesem Projekt wurde nun eine quantitative Analyse des Phosphoproteoms von Tabakpollen durchgeführt, um Veränderungen in der Protein-Phosphorylierung bei der Aktivierung der Pollen zu untersuchen. Verglichen wurden reife, nicht aktivierte Pollen mit Pollen nach einer Aktivierungszeit von 5 und 30 Minuten. Dafür wurden reife, eingefrorene Pollen der Tabak-Pflanze (*Nicotiana tabacum*) aufgetaut und durch Überführen in SMM-MES-Medium (Zusammensetzung siehe Anhang) aktiviert. Nach 5 (TP5) bzw. 30 (TP30) Minuten wurden die aktivierten Pollen vom Medium abgetrennt und eine Proteinextraktion und -fällung durchgeführt. Auch reife, nicht aktivierte Pollen (MP) wurden extrahiert und gefällt. Das Experiment wurde mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Aktivierung der Pollen sowie die Proteinextraktion (TCA/Aceton) erfolgten bei Kooperationspartnern in Prag (durchgeführt von Jan Fila, Institute of Experimental Botany).

Die quantitative Analyse wurde mit einem labelfreien Ansatz durchgeführt. Dafür wurden die Proben im ersten Schritt mit Trypsin verdaut und die Proteinkonzentration mittels Nanodrop und LC-Analyse angeglichen. Zur globalen Analyse wurden je 6 µg (jeweils 2 µg der biologischen Replikate vermischt) von TP5, TP30 und MP fraktioniert (pH 6) und die 8 gesammelten Fraktionen mittels LC-MS analysiert. Zur Phosphopeptid-Analyse wurden allen Proben synthetisch hergestellte phosphorylierte Peptide (siehe Tabelle 10) hinzugefügt, um die Reproduzierbarkeit und Qualität der Anreicherung zu kontrollieren. Die Anreicherung wurde nach dem in Kapitel 5.2 optimierten Protokoll durchgeführt. Insgesamt konnten 630 phosphorylierte Peptide identifiziert werden, die in mindestens zwei verschiedenen Replikaten analysiert werden konnten und einen phosphoRS Wert  $\geq 75$  hatten. Von diesen 630 Peptiden

## Ergebnisse

waren 109 aus 94 Proteinen reguliert (max. fold change  $\geq 2$ ). Laut der globalen Analyse waren die entsprechenden Proteine zwischen den unterschiedlich behandelten Pollen nicht reguliert. Die regulierten Peptide lassen in sechs verschiedene Cluster teilen (siehe Abbildung 41).



**Abbildung 41:** Ergebnisse der Phosphopeptid-Analyse von Tabak-Pollen in verschiedenen Aktivierungsstadien; Die Phosphopeptide wurden anhand ihrer unterschiedlichen Regulierung bei den Zeitpunkten MP, TP5 und TP30 in 6 verschiedenen Gruppen gegliedert; Die rote Linie kennzeichnet den Nullpunkt der y-Achse. Peptide mit einem y-Wert = 0 weisen keine Regulierung zwischen zwei Zeitpunkten auf.

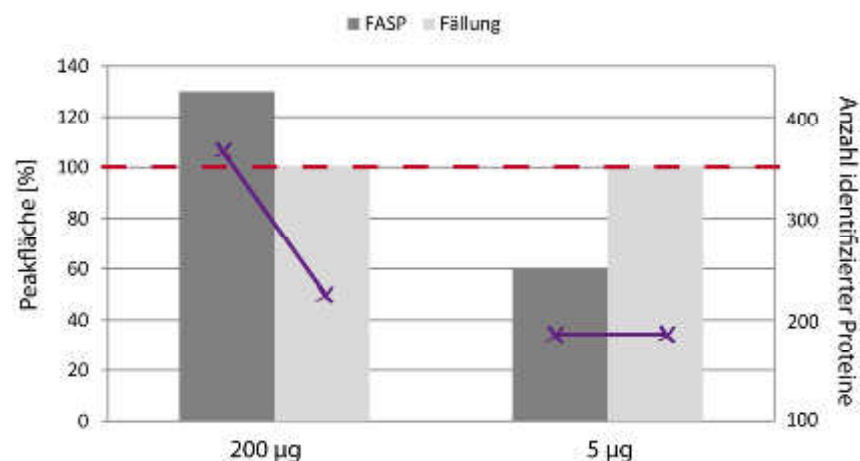
## **6 Diskussion**

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Probenvorbereitung für die globale und Phosphoproteom-Analyse von Membranproteinen optimiert. Dadurch war es möglich, die Lyse, den Verdau und die Anreicherung von phosphorylierten mitochondrialen Peptiden deutlich zu verbessern und somit eine Grundlage für sensitivere Analysen des mitochondrialen Proteinimports zu schaffen. Im Folgenden wurden neue Phosphorylierungsstellen an mitochondrialen Import-Komplexen identifiziert, welche eine Rolle in der Regulierung des Proteinimports spielen könnten und deren genaue Funktion noch näher biochemisch untersucht werden muss. Außerdem wurden in Kooperation mit der Universität Freiburg neue Methoden entwickelt, mit denen es möglich ist den Proteinimport und seine Dynamik zu charakterisieren. So konnte der Import einzelner Proteine in Mitochondrien zeitaufgelöst verfolgt werden. Zudem wurde eine Strategie etabliert, um die Stöchiometrie von Membranproteinkomplexen in Mitochondrien zu bestimmen. Schließlich wurden die optimierten Methoden (Lyse, Verdau, Anreicherung) dazu verwendet die Veränderung der Mitochondrien auf globaler und Phosphopeptid-Ebene während des Zellzyklus zu untersuchen. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass die hier optimierten und etablierten Strategien zur Probenvorbereitung und Phosphopeptid-Anreicherung auch auf andere Organismen und Fragestellungen transferierbar sind. So wurde untersucht, wie sich das Phosphoproteom von Tabakpollen bei der Aktivierung der reifen Pollen verändert.

### **6.1 Optimierung der Probenvorbereitung**

Für die qualitative und vor allem quantitative Analyse des Proteoms von Zellen oder Organellen ist eine effektive und vor allem reproduzierbare Probenvorbereitung äußerst wichtig. Die Varianz im Proteom von unterschiedlich behandelten Zellen kann gering sein, sodass schon kleine Abweichungen in der Reproduzierbarkeit die Aussagekraft der Analyse beeinflussen können. Aus diesem Grund wurde im ersten Teil dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Optimierung der Lyse und des Verdau von Membranproteinen gelegt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Probenvorbereitung bei allen weiteren hier durchgeführten Projekten entsprechend ausgeführt, um somit die bestmöglichen Ergebnisse zu erzielen.

Während der Experimente zeigte sich, dass drei Aspekte für eine optimale Probenvorbereitung wichtig sind. Der erste wichtige Schritt ist die Lyse. Ist diese nicht vollständig, kann dies zu Proteinverlusten führen. Außerdem kann eine gute Reproduzierbarkeit nicht gewährleistet werden. Die besten Ergebnisse konnten mit der Lyse in 1 % SDS erreicht werden. Im Gegensatz zur Lyse mit Harnstoff und RapiGest konnte die Anzahl an identifizierten Proteinen und Peptiden um 50 % erhöht werden, was die Bedeutung der Lyse in der Probenvorbereitung bestätigt. Der nächste wichtige Schritt ist der Verdau, bei dem das SDS für weitere Analysen aus der Probe entfernt werden muss. Welche Verdaustrategie angewendet werden sollte, hängt stark von der Proteinmenge in der Probe ab, dem dritten wichtigen Aspekt der Probenvorbereitung. Beim Verdau von Proben mit einem Proteingehalt von 50 - 200 µg konnten die besten Ergebnisse mit dem FASP-Protokoll erzielt werden (siehe Abbildung 42). Etwa 40 % mehr Proteine und Peptide konnten dabei im Vergleich zur Ethanol-Fällung identifiziert werden. Zusätzlich dazu wurde bei Proteinen, welche mit beiden Methoden identifiziert werden konnten, anhand der Peak-Intensitäten in der MS-Analyse quantitativ geprüft, wieviel Protein bei der Aufarbeitung verloren geht. Bei der Fällung konnte im Vergleich zu FASP ein Verlust von 30 % (Wert bestimmt über alle Proteine) bestimmt werden. Ein Problem, welches die Ergebnisse bei der Fällung beeinflussen könnte ist, dass die Proteine möglicherweise nach der Fällung nicht mehr vollständig in Lösung gebracht werden können.



**Abbildung 42:** Vergleich zwischen FASP und Ethanol-fällung bei unterschiedlichen Probenmengen; Die Fläche der MS<sup>1</sup>- Peaks aller Proteine, welcher mit beiden Methoden identifiziert werden konnten, wurde bestimmt. Die Fläche der Proteine nach Fällung wurde gleich 100 % gesetzt. Beim Verdau von 200 µg Protein konnten mit dem FASP Protokoll mehr Proteine identifiziert werden (lila Linie). Auch die Fläche der MS<sup>1</sup>-Peaks der Proteine nach FASP war höher als bei der Fällung (Balken); Bei dem Verdau geringer Proteinmengen (5 µg) konnten mit beiden Methoden gleich viele Proteine identifiziert werden (lila Linie). Die Fläche der MS<sup>1</sup>-Peaks der Proteine nach der Fällung war jedoch höher, als bei Verwendung des FASP-Protokolls (Balken).

Beim Verdau kleiner Proteinmengen (2 µg) sehen die Ergebnisse hingegen anders aus. Sowohl mit FASP, als auch mit der Fällung konnte nahezu die gleiche Anzahl an Proteinen identifiziert werden. Beim quantitativen Vergleich von Proteinen, die mit beiden Methoden analysiert werden konnten, zeigte sich beim FASP-Verdau jedoch ein Verlust von ca. 40 %. Das lässt sich dadurch erklären, dass Proteine im Filter haften bleiben, nicht optimal verdaut und somit auch nicht vollständig eluiert werden können. Bei geringen Probenmengen fällt dieser Verlust an der Filtermembran mehr ins Gewicht, als bei großen Probenmengen.

Das Zufügen von MeOH zum Verdaupuffer, zur Verbesserung der Löslichkeit der Proteine trägt im Vergleich zu den vorher genannten Punkten weniger zur Optimierung des Verdau von Membranproteinen bei. So konnte mit MeOH im Verdaupuffer die Anzahl an identifizierten Proteinen und Peptiden um nur 10 % erhöht werden. Auch die Reproduzierbarkeit des Verdau, die bei FASP ohne Zusätze bei sehr guten 5 % lag, wurde nicht weiter verbessert.

Zusammenfassend zeigte sich, dass durch Optimierung der Methoden die Probenvorbereitung deutlich verbessert werden konnte.

## 6.2 Optimierung der Anreicherung phosphorylierter Peptiden

Als beste Methode zur Anreicherung mitochondrialer Phosphopeptiden erwies sich die in den Kapiteln 4.2.3 und 5.2 vorgestellte Methode Batchverfahren II c. Dabei werden die Peptide mit Titandioxid-Partikeln angereichert, die unspezifischen, nicht gebundenen Peptide durch mehrere Waschschrte entfernt und im letzten Schritt die phosphorylierten Peptide von den Partikeln eluiert. Die Anreicherung wird in zwei aufeinander folgenden Schritten durchgeführt, um die nicht phosphorylierten Peptide, die im ersten Anreicherungsschritt unspezifisch gebunden haben, zu entfernen und somit die Spezifität der Analyse zu verbessern.

Ein wichtiger Punkt für eine erfolgreiche Anreicherung ist das Verhältnis von verwendeten Titandioxid-Partikeln und anzureicherender Proteinmenge. Werden zu wenige Partikel verwendet, sind nicht genügend Bindungsplätze für alle phosphorylierten Peptide vorhanden. Werden zu viele Partikel verwendet, können trotz Verwendung von Phthal- oder Glykolsäure, verstärkt unspezifische Bindungen von nicht phosphorylierten Peptiden auftreten. Das hat zur Folge, dass bei der anschließenden LC-MS Messung die Signale niedrig abundanter phosphorylierter Peptide unterdrückt werden und diese somit nicht identifiziert werden können. Durch diesen Punkt ergibt sich ein grundlegendes Problem bei der Verwendung von gekauften Kits zur Anreicherung. Die

gekauften Tips sind mit einer definierten Menge an Titandioxid-Material gepackt und besitzen somit eine bestimmte Kapazität (z.B: Titansphere<sup>®</sup> Phos-TiO Kit geeignet für 25 - 50 µg). Die Anreicherung mit solchen Tips ist somit nicht flexibel in Bezug auf die Proteinmenge und somit selten optimal. Proben mit geringerer Proteinmenge, wie es bei Experimenten mit Mitochondrien oft der Fall ist, oder auch größerer Proteinmenge können somit nicht optimal angereichert werden. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, trotz des höheren Zeitaufwands, auf das Verwenden von kommerziell erwerblichen Kits zu verzichten.

Neben dem optimalen Partikel- zu Proteinverhältnis ist ein weiterer entscheidender Punkt bei der Anreicherung die Elution der gebundenen phosphorylierten Peptide von den Titandioxid-Partikeln. Dies wird beim Vergleich der Anreicherung mit den in Kapitel 5.2 vorgestellten Methoden Batchverfahren I b und Batchverfahren II b deutlich. Bei beiden Verfahren wird mit optimierten Verhältnissen von Titandioxid Partikeln und Proteinmenge und mit Glykolsäure gearbeitet, verschieden hingegen sind die verwendeten Wasch- und Elutionspuffer und die Durchführung der Elution. Die verwendeten Waschpuffer haben in erster Linie einen Einfluss darauf, wie gut nicht gebundene, nicht phosphorylierte Peptide herausgewaschen werden und somit auf die Spezifität der Anreicherung. Da sich die Spezifität bei der Verwendung vom Batchverfahren II b um nur 10 Prozentpunkte, von 70 % auf 80 %, verbessert, sind die verwendeten Waschpuffer nicht der ausschlaggebende Punkt bei der Verbesserung des Protokolls. Beim Batchverfahren II b werden die Partikel nach dem Waschen komplett eingetrocknet, sodass alle verbliebenen Pufferreste entfernt werden. Anschließend werden die phosphorylierten Peptide durch einen extremen pH-Wert Wechsel auf pH 11,5 von den Partikeln gelöst. Beim Batchverfahren I b hingegen werden die Partikel vor der Elution nicht eingetrocknet. Reste der Waschpuffer scheinen den verwendeten Elutionspuffer auf der Partikeloberfläche zu verdünnen, den pH-Wert zu senken und führen folglich zu einer ineffizienteren Elution, sodass mit dem Batchverfahren I b 43 % weniger phosphorylierte Peptide identifiziert werden konnten, als mit dem Batchverfahren II b.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine systematische Optimierung der Anreicherung für zunächst schwierige Proben eine Verbesserung der Spezifität, der Ausbeute und der Reproduzierbarkeit herbeiführt. Ficarro *et al.* [124] beschrieben die Effizienz einer Phosphopeptid Anreicherung mit der Anzahl an identifizierten Phosphopeptiden pro µg eingesetztes Startmaterial. Je höher dieser Wert ist, desto effizienter ist die Anreicherung. Mit dem ursprünglichen Anreicherungsprotokoll konnten bei 100 µg Startmaterial 14 phosphorylierte Peptide/µg identifiziert werden. Durch Optimierung des Protokolls ist es nun

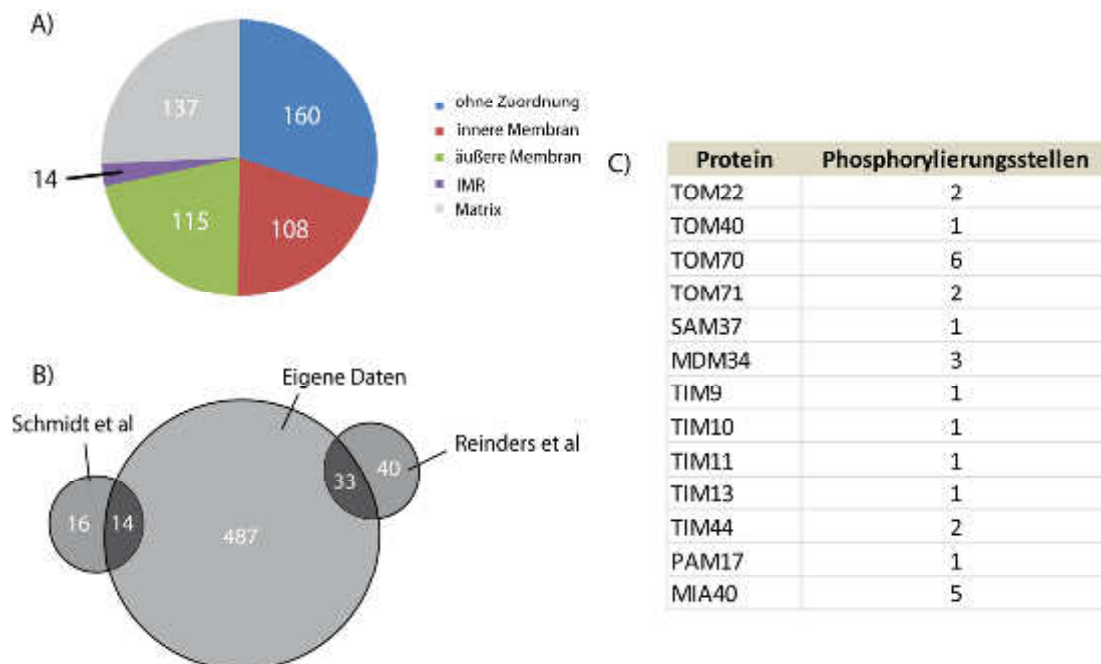


möglich 28 phosphorylierte Peptide/ $\mu\text{g}$  Startmaterial zu detektieren, was im Vergleich zu Literaturwerten in einem guten Bereich liegt. Palmisano *et al.* [89] und Hennrich *et al.* [125] beispielsweise erreichten einen Wert von 22 Peptide/ $\mu\text{g}$ , Masuda *et al.* [126] einen Wert von 60 Peptiden/ $\mu\text{g}$ . Jedoch verwendeten letztere 60 verschiedene Fraktionen für ihre Analyse. Durch eine Verbesserung des Gradienten bei der HILIC-Auftrennung und durch das Sammeln von mehr Fraktionen (z.B. 24 statt der hier gesammelten 11 Fraktionen) sollte eine weitere Optimierung des hier vorgestellten Protokolls möglich sein. Titandioxid ist in der Lage sowohl einfach-, als auch mehrfach phosphorylierte Peptide zu binden. Mehrfach phosphorylierte Peptide scheinen jedoch eine so starke Bindung mit dem Material einzugehen, dass eine Elution nur noch bedingt möglich ist. Hinzu kommt, dass diese Peptide im Vergleich zu einfach phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptiden schlechter ionisieren und somit schlechter im MS detektiert werden. Das führt dazu, dass bei einer Titandioxid-Anreicherung überwiegend einfach phosphorylierte Peptide identifiziert werden können. Eine weitere Option die Anreicherung zu verbessern und auch die mehrfach phosphorylierten Peptide zu analysieren liegt in der Verwendung einer Kombination von Titandioxid und SIMAC [127]. Dabei wird die Probe, wie bei Engholm-Keller *et al.* [110] vorgestellt, zuerst mittels IMAC (siehe Kapitel 3.4.3) angereichert. Bei einer 2-stufigen Elution werden erst die einfach phosphorylierten Peptide abgetrennt und im zweiten Schritt die mehrfach phosphorylierten. Der Durchfluss und der erste Elutionsschritt werden anschließend mit Hilfe von Titandioxid angereichert und mittels HILIC aufgetrennt. Diese Methode macht es möglich, einfach- von mehrfach phosphorylierten Peptiden zu trennen und somit auch die mehrfach phosphorylierten Peptide zu identifizieren.

### 6.3 Phosphopeptid-Anreicherung von Mitochondrien

Durch Verwendung der optimierten Methode zur Anreicherung von phosphorylierten Peptiden in Mitochondrien konnten 519 phosphorylierte mitochondriale Peptide identifiziert werden (vollständige Listen siehe Anhang). Das entspricht 534 verschiedenen Phosphorylierungsstellen in 238 Proteinen. Verglichen mit publizierten Daten zur Phosphorylierung von Mitochondrien aus *S.cerevisiae* konnten in dieser Arbeit 487 neue Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Von den 30 von Schmidt *et al.* [54] veröffentlichten Phosphorylierungsstellen in Tom-Proteinen, konnten 14 in dieser Studie detektiert werden, von den 73 mitochondrialen Phosphorylierungsstellen bei Reinders *et al.* [53], konnten 33 analysiert werden (siehe Abbildung 43). Bei 15 weiteren Phosphorylierungsstellen konnte das identische Peptid jedoch

mit anderer Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass bei Reinders *et al.* nur Mascot zur Lokalisation der Phosphorylierungsstelle verwendet wurde. In dieser Studie hingegen wurde phosphoRS als zusätzlicher Algorithmus genutzt, was eine zuverlässigere Lokalisation der Phosphorylierungsstelle ermöglichte.



**Abbildung 43: Zusammenfassung der Anreicherung von Mitochondrien aus *S.cerevisiae*; A) Im Diagramm wird dargestellt, zu welchen mitochondrialen Kompartimenten die Phosphorylierungsstellen, die in dieser Arbeit identifiziert werden konnten, zugeordnet werden; B) Vergleich der identifizierten Phosphorylierungsstellen mit schon publizierten Daten von Reinders *et al.* und Schmidt *et al.* C) Übersicht neuer Phosphorylierungsstellen in den für den Proteinimport wichtigen Komplexen;**

Es wird davon ausgegangen, dass ca. 30 % der Proteoms einer Zelle zu gleichen Zeit phosphoryliert vorliegt [128], was bei Mitochondrien, wird dort ein ähnlicher Wert angenommen, ca. 300 Proteine beträgt. Phosphorylierung ist jedoch ein dynamischer Vorgang. Phosphopeptidanalysen, wie sie auch hier durchgeführt wurden, spiegeln nur eine Momentaufnahme des Phosphoproteoms dar. Durch beispielsweise wechselnde Wachstumsbedingungen (YPG - respiratorisch, YPD - fermentativ) der Zelle, in verschiedenen Stadien des Zellwachstums oder aber auch beim Import bestimmter Proteine in Mitochondrien, können andere Proteine phosphoryliert werden. Das führt dazu, dass die genaue Anzahl an Phosphorylierungsstellen nur schwer abgeschätzt werden kann. Es ist somit anzunehmen, dass

noch deutlich mehr als die hier identifizierten Phosphorylierungsstellen in Mitochondrien vorhanden sind.

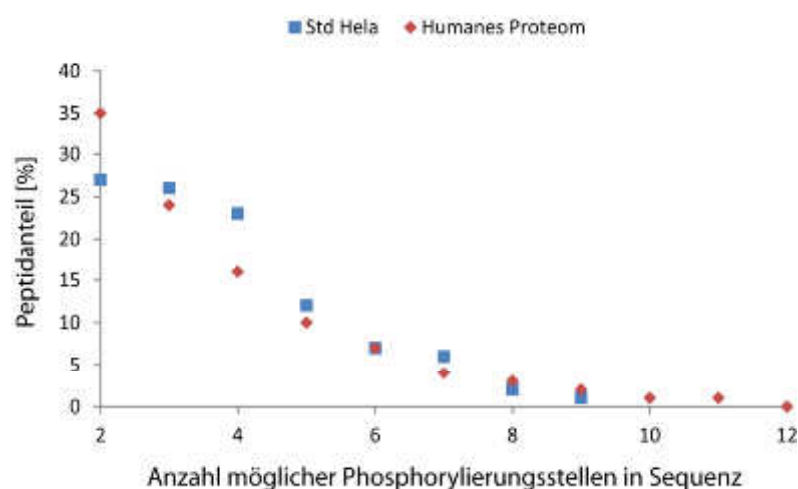
Auffällig ist, dass sich über 40 % aller in dieser Arbeit identifizierten Phosphorylierungsstellen, in der äußeren und inneren Membran der Mitochondrien befinden. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, wenn bedacht wird an welchen Prozessen die mitochondrialen Membranen beteiligt sind. In der inneren Membran befinden sich die Proteine der Atmungskette und zum Transport von Metaboliten. Die Außenmembran geht Verbindungen zu anderen Organellen der Zelle ein, wie dem ER. Beiden Membranen sind außerdem am Proteinimport und der Fusion und Spaltung von Mitochondrien beteiligt. All diese Prozesse bedürfen einer Regulation, die über die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen erfolgen kann.

Neben den schon bekannten Phosphorylierungsstellen der Tom-Proteine, konnten weitere Stellen an Proteinen (Sam, Tim, Mdm, Pam) identifiziert werden, die in den unterschiedlichsten Bereichen des Imports von Proteinen eine wichtige Rolle spielen. Dies zeigt einmal mehr, dass der Proteinimport scheinbar stark durch reversible Phosphorylierung reguliert wird und es offensichtlich mehr Regulationsvorgänge gibt, die von Phosphorylierung beeinflusst werden, als die bisher bekannten und in Kapitel 1.3.3 beschriebenen. Die in dieser Arbeit identifizierten Phosphorylierungsstellen der am Import beteiligten Proteine, müssen nun in biologischen Experimenten untersucht werden, um die Funktion der Phosphorylierung zu entschlüsseln und in Zukunft somit die Regulation des Proteinimports in Mitochondrien besser verstehen zu können.

## 6.4 Ein realistischer Phosphopeptidstandard

Bei der Analyse von Phosphoproteom-Daten ist ein wichtiger Punkt die richtige Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle im Peptid bzw. Protein. Basierend auf den Ergebnissen der Analyse können funktionelle Studien durchgeführt werden, welche die Bedeutung einer bestimmten Phosphorylierungsstelle im Protein beschreiben können. Ein Beispiel dafür ist der Import von Proteinen in Mitochondrien. In LC-MS basierenden Phosphoproteom-Analysen konnten verschiedene Phosphorylierungsstellen an Proteinen des Tom-Komplexes identifiziert werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden Untersuchungen durchgeführt, die deren Bedeutung beschreiben und somit den Proteinimport in Mitochondrien besser charakterisieren konnten. Werden bei solchen Analysen jedoch falsche Phosphorylierungsstellen identifiziert, ist eine darauf aufbauende funktionelle Studie nicht mehr realisierbar. Vandermarliere *et al.* konnten

beispielsweise zeigen, dass sogar bei Uniprot fehlerhafte Daten in Bezug auf die Lokalisation von Phosphorylierungsstellen im Protein zu finden sind [129]. Aus diesem Grund ist die genaue Kenntnis der Effizienz eines Algorithmus zur Bestimmung der richtigen Phosphorylierungsstelle von enormer Wichtigkeit. Meistens werden die verwendeten Algorithmen mit einer niedrig komplexen Mischung aus wenigen 100 synthetischen phosphorylierten Peptiden mit bekannter Phosphorylierungsstelle getestet [113]. Ein großes Problem dabei ist jedoch, dass solche Mischungen eine nur geringe Komplexität haben und somit die Tests nicht aussagekräftig sind, da sie nicht auf ein reales System transferiert werden können. Reale Proben haben nämlich einen hohen dynamischen Bereich und somit viele Spektren von teils schlechter Qualität, die für eine eindeutige Identifizierung und Lokalisation problematisch werden können (Intensitäten der Fragment-Ionen niedrig, y- und b- Ionen lassen sich schwer zuordnen). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein neuer Standard zur Überprüfung der Effizienz von Algorithmen konzipiert (474 synthetisch hergestellte Phosphopeptide mit bekannter Phosphorylierungsstelle in einer komplexen HeLa Matrix). Dieser entwickelte Standard zeigt im Vergleich zum humanen Proteom eine ähnliche Verteilung an möglichen Phosphorylierungsstellen im Peptid (siehe Abbildung 44) und entspricht somit einer realen Probe.



**Abbildung 44: Vergleich des in dieser Arbeit entwickelten Standards mit dem humanen Proteom basierend auf der Anzahl möglicher Phosphorylierungsstellen in einer Peptidsequenz.**

Getestet wurden die Algorithmen Ascore, D-Score, MD-Score, der PTM Score von MaxQuant (MQ) und phosphoRS. Es ist jedoch zu beachten, dass der hier verwendete Ascore ein basierend auf dem Original nachprogrammierter und in den Peptide Shaker implementierter Score ist (durchgeführt von Dr. Marc Vaudel, ehemals ISAS). Es zeigte sich, wie vermutet, dass die

Scores bei der Verwendung des komplexen Standards schlechtere Ergebnisse aufweisen, als bei der Verwendung der gleichen phosphorylierten Peptide ohne komplexen Hintergrund. Die einzigen Ausnahmen bilden der Ascore und der MQ-Score in Kombination mit HCD. Bei diesen Scores ist eine nur geringe Veränderung der Ergebnisse zu beobachten. Nichtsdestotrotz konnte in der Analyse gezeigt werden, dass sich eine reelle Beurteilung der einzelnen Algorithmen bei der Verwendung einer Peptidmischung geringer Komplexität als schwierig erweist. Die Nutzung des hier entwickelten komplexen Standards ist somit wichtig, um Algorithmen unter realen Bedingungen zu testen und eine Aussage über ihre Effizienz treffen zu können. In der nachfolgenden Abbildung werden die Scores nochmals genauer miteinander verglichen. Für jeden Algorithmus wurde geprüft bei welchem Score eine „False Localization Rate (FLR), also das Verhältnis von PSMs falsch annotierter Phosphopeptide zur Gesamtanzahl, von 5 % erreicht werden kann. Zusätzlich wurde die Anzahl an richtig annotierten PSMs bei entsprechendem Score und der Prozentsatz der richtig annotierten PSMs zur Gesamtanzahl der PSMs verglichen.

### CID

| Probe | Algorithmus | FLR | PSMs | % PSMs | Score  |
|-------|-------------|-----|------|--------|--------|
| HeLa  | MD-Score    | 5%  | 266  | 14%    | 41.55  |
| Std   | MD-Score    | 5%  | 3135 | 43%    | 17.77  |
| HeLa  | D-Score     | *   | *    | *      | *      |
| Std   | D-Score     | 5%  | 1724 | 25%    | 99.74  |
| HeLa  | A-Score     | 5%  | 1243 | 77%    | 7.29   |
| Std   | A-Score     | 5%  | 4827 | 72%    | 9.90   |
| HeLa  | MQ-Score    | 5%  | 965  | 85%    | 0.84   |
| Std   | MQ-Score    | 5%  | 2751 | 85%    | 0.77   |
| HeLa  | phosphoRS   | 4%  | 1622 | 75%    | 100.00 |
| Std   | phosphoRS   | 4%  | 4445 | 86%    | 90.00  |

### HCD

| Probe | Algorithmus | FLR | PSMs | % PSMs | Score  |
|-------|-------------|-----|------|--------|--------|
| HeLa  | MD-Score    | 5%  | 156  | 5%     | 51.89  |
| Std   | MD-Score    | 5%  | 1956 | 52%    | 19.38  |
| HeLa  | D-Score     | *   | *    | *      | *      |
| Std   | D-Score     | *   | *    | *      | *      |
| HeLa  | A-Score     | 3%  | 1673 | 68%    | 1.00   |
| Std   | A-Score     | 4%  | 2328 | 75%    | 6.83   |
| HeLa  | MQ-Score    | 5%  | 1828 | 97%    | 0.49   |
| Std   | MQ-Score    | 5%  | 2364 | 99%    | 0.43   |
| HeLa  | phosphoRS   | 4%  | 3379 | 78%    | 100.00 |
| Std   | phosphoRS   | 4%  | 3799 | 83%    | 90.00  |

**Abbildung 45:** Vergleich der verschiedenen Algorithmen zur korrekten Bestimmung der Phosphorylierungsstelle im Peptid; FLR = Summe falsch annotierter PSMs/Summe aller annotierter phospho-PSMs; PSMs: Anzahl korrekt annotierter PSMs bei angegebener FLR; %PSM: Prozentsatz der annotierter phospho-PSMs bei angegebener FLR in Bezug auf alle PSMs; Score bei Erreichen der angegebenen FLR; \* eine FLR von 5% konnte selbst bei hohen Scores nicht erreicht werden.

## Diskussion

Anschließend wurde für jeden Algorithmus die Anzahl an HeLa phospho-PSMs bestimmt, die basierend auf den Scores der Std und Std-HeLa Messungen (Scores mit  $FLR \leq 5\%$ , siehe Abbildung 45), potentiell richtig annotierte Phosphorylierungsstellen besitzen. Zusammenfassend sind diese Werte in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

| Algorithmus | MS/MS | Std-HeLa | Std   | $\Delta$ in % |
|-------------|-------|----------|-------|---------------|
| MD-Score    | CID   | 4961     | 16326 | 229%          |
| MD-Score    | HCD   | 3024     | 12575 | 316%          |
| D-Score     | CID   |          | 5146  | 100%          |
| D-Score     | HCD   |          |       |               |
| A-Score     | CID   | 24859    | 24859 | 0%            |
| A-Score     | HCD   | 16756    | 16756 | 0%            |
| MQ-Score    | CID   | 16124    | 21481 | 33%           |
| MQ-Score    | HCD   | 22936    | 24665 | 8%            |
| phosphoRS   | CID   | 19996    | 27581 | 38%           |
| phosphoRS   | HCD   | 22733    | 23027 | 1%            |

**Abbildung 46: Vergleich der Anzahl an PSMs von Phosphopeptiden des Hela Hintergrunds bei Verwendung der Scores (FLR = 5 %) des Std und des Std-HeLa.  $\Delta$  entspricht der prozentuellen Abweichung der Anzahl an phosphorylierten PSMs mit Std-Score im Vergleich zum Std-HeLa-Score ((phospho-PSMs Std Scores/ phospho-PSMs Std-HeLa Scores)\*100)**

Diese Auswertung zeigt deutlich den Unterschied zwischen der Verwendung einer Mischung synthetischer Phosphopeptide und eines Standards mit komplexem HeLa-Hintergrund. Zudem ist es möglich die einzelnen Scores miteinander zu vergleichen.

Beim Ascore wurde sowohl für HCD, als auch für CID unter Berücksichtigung aller phospho-PSMs mit angegebenen Score ( $> 0$ ) eine FLR von unter 5 % erreicht. Hinzu kommt, dass bei der Verwendung beider Standards keine Unterschiede in der Anzahl der HeLa PSMs auftraten. Auch der MQ-Score und phosphoRS zeigen insbesondere bei HCD Messungen ähnlich gute Ergebnisse. Die schlechtesten Ergebnisse wurden mit dem D-Score und dem MD-Score erreicht. Mit dem komplexen Standard konnte beim D-Score keine FLR von 5 % erreicht werden. Bei MD-Score ist besonders gut zu erkennen, wie wichtig die Verwendung eines realistischen Standards zur Beurteilung von Algorithmen ist. Während der MD-Score bei der Verwendung des niedrig komplexen Standards noch mit den anderen Algorithmen zu vergleichen ist (z.B. HCD: 52% aller PSMs und über 12000 Hela PSMs bei einer  $FLR = 5\%$ ), zeigt er bei der Verwendung des realistischen Standards einen massiven Leistungseinbruch (HCD: 5% aller PSMs und nur ca. 3000 Hela PSMs bei einer  $FLR = 5\%$ ).

Marx *et al* [130] publizierten 2013 einen Standard zur Beurteilung von Algorithmen, welcher aus > 100000 synthetischen Phosphopeptiden besteht. Die Synthese dieser Phosphopeptide beruht auf 96 verschiedenen Peptidsequenzen bei denen jeweils die phosphorylierte und die daran angrenzenden Aminosäuren ausgetauscht wurden (siehe Abbildung 47). Resultierend daraus ist der hergestellte Standard zwar hoch komplex, besteht jedoch zu > 99 % aus artifiziellen Peptidsequenzen und besitzt nur 96 verschiedenen Kombinationen von Peptid-Länge und Position der Phosphorylierungsstelle. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Peptide nach der Synthese nicht aufgereinigt wurden, sodass Nebenprodukte mit unbekannter Sequenz und Phosphorylierungsstelle auftreten können. Hinzu kommt, dass die Peptide nicht unter realen Bedingungen mit konkurrierenden Spezies mit hohem dynamischem Bereich gemessen wurden.



**Abbildung 47: Prinzip der Synthese der Phosphopeptide publiziert von Marx *et al* [130] beispielhaft an einem Peptid;  $x_0$ : S, T, Y in phosphorylierter oder nicht phosphorylierter Form;  $x_{-1}$  und  $x_1$ : Verschiedene Kombinationen der 20 proteinogenen Aminosäuren.**

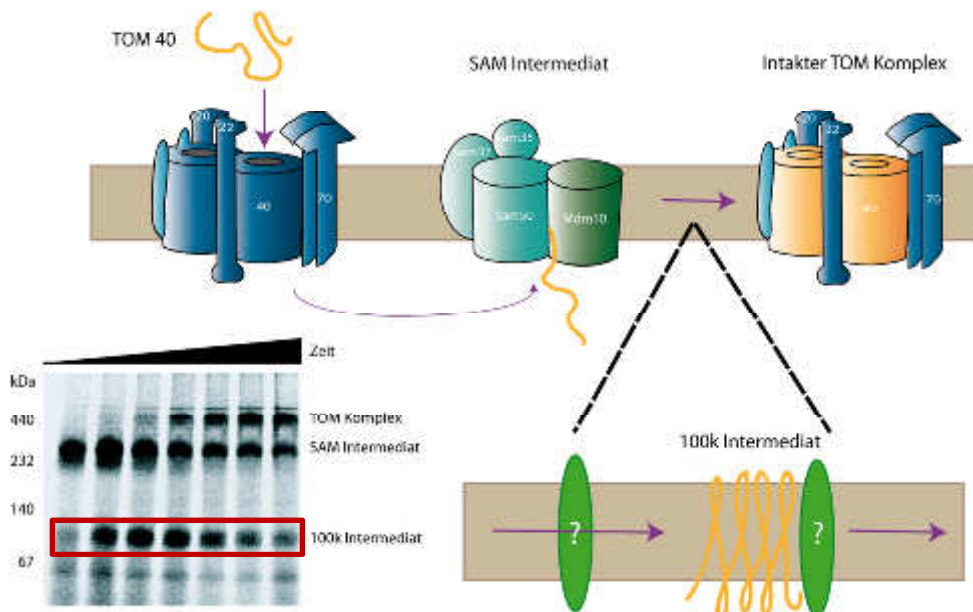
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der hier vorgestellte Phosphopeptid-Standard ein völlig neues Konzept zur Beurteilung von Algorithmen zur PTM-Bestimmung darstellt. Durch die Verwendung einer komplexen Hela-Matrix wird die Komplexität der Probe erhöht und somit eine reale Situation simuliert. Mit dem SILAC-Ansatz lassen sich synthetische Peptide von Hela Peptiden unterscheiden.

## 6.5 Analyse des Imports von Tom40 in Hefe Mitochondrien

Über den Import von Tom40 in Mitochondrien ist bereits bekannt, dass das Protein über den Tom-Komplex in den Intermembranraum eingeschleust wird und anschließend eine Verbindung mit dem Sam-Komplex in der äußeren mitochondrialen Membran eingeht. Im letzten Schritt



wird Tom40 in einen neuen intakten Tom-Komplex integriert. In diesem Projekt sollte nun eine Methode entwickelt werden, um die Verbindung von Tom40 mit dem Sam-Komplex während des Imports durch bioanalytische Methoden verifizieren zu können. Durch einen SILAC basierten Ansatz, der in Kapitel 5.5 näher beschrieben worden ist, war es tatsächlich möglich zu zeigen, dass nach einer Importzeit von 10 min Tom40 an alle drei Sam-Proteine des Komplexes bindet. Bei zeitlich abhängigen Importexperimenten der Kooperationspartnern der Universität Freiburg zeigte sich, dass beim Import von Tom40 neben dem Sam-Intermediat und dem fertigen Tom-Komplex ein weiteres Intermediat auftritt, von dem bis jetzt nur bekannt ist, dass es zusammen mit Tom40 eine Größe von ca. 100 kDa besitzt. Dieses unbekannte Intermediat tritt zeitlich verzögert zur Bildung des Sam-Intermediates auf und nimmt im Laufe der Zeit genauso wie das Sam-Intermediat ab, wenn der fertige Tom-Komplex gebildet wird. Daraus lässt sich schließen, dass Tom40, nach Komplexbindung mit den Sam-Proteinen, einen weiteren Komplex mit bisher unbekannten Proteinen eingeht. Nach diesem Zwischenschritt wird es anschließend in den Tom-Komplex integriert (siehe Abbildung 48).



**Abbildung 48: 100kDa Intermediat beim Import von Tom40 in Mitochondrien; Bei biochemischen Importexperimenten zeigte sich, dass Tom40, nach der Bindung mit dem Sam-Komplex, ein weiteres Intermediat mit bisher unbekannten Proteinen bildet, bevor es in einen neuen intakten Tom-Komplex integriert wird; Das blau-natives Gel wurde von der Gruppe von Dr. Nils Wiedemann (Universität Freiburg) angefertigt.**



Nachdem nun mit der weitgehend bekannten Verbindung vom Tom40 zum Sam-Komplex die Strategie zur Analyse des Importvorgangs erfolgreich getestet wurde, kann dieser Ansatz verwendet werden, um das unbekannte Intermediat zu analysieren. Dafür müssten neben den beiden Zeitpunkten 10 min (Tom40 komplett im Sam-Intermediat) und 10 min + 50 min Wartezeit (Tom40 vollständig importiert und in Tom-Komplex integriert) weitere Zeitpunkte genommen und analog analysiert werden.

Bei einer Anreicherung der Import Probe (S.73, Tabelle 17, Experiment 3) konnten außerdem zwei bisher unbekannte Phosphorylierungsstellen von Tom40 nach 10 min Import, also während der Komplexbildung mit den Sam-Proteinen identifiziert werden (GNFFSSNPIS<sup>p</sup>SFVVDTYK (S39 im Protein) und YAFSALFANDNLFAQGNIDNLSV<sup>p</sup>SGR (S138 im Protein)). Diese beiden Stellen konnten jedoch nur in einem Vorexperiment analysiert werden, bei denen mehr Startmaterial zur Verfügung stand. Bei den eigentlichen drei Replikaten, bei denen nur ein Gesamtproteingehalt von 10 µg vorhanden war, um den Aufwand der Importexperimente zu reduzieren, konnte die Stellen trotz Verwendung des optimierten Anreicherungsprotokolls nicht identifiziert werden. Um diese beiden Stellen zu verifizieren, wäre es von daher ratsam ein weiteres Experiment mit mehr Startmaterial durchzuführen. Anschließend sollte durch weitere Experimente die Funktion der neuen Phosphorylierungsstellen untersucht werden. Möglich ist, dass die Phosphorylierung nur temporär auftritt und bei der Komplexbildung mit dem Sam-Komplex eine Rolle spielt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hier am Beispiel des Tom40, ein SILAC-Ansatz entwickelt und durchgeführt wurde, mit dem es möglich ist die Dynamik des Proteinimports näher zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Methode ist es in Zukunft somit möglich, neben Tom40, den Import weitere interessanter Proteine zu analysieren. Eine mögliche Anwendung wäre beispielsweise die Untersuchung des Imports  $\alpha$ -helicaler Proteine der mitochondrialen Außenmembran, welche eine C-terminale Transmembran-Region besitzen (z.B. Fis1, beteiligt an Teilung von Mitochondrien). Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, ist der Importweg dieser Proteine bis jetzt völlig unbekannt. Durch solche Untersuchungen könnten neue Importkomplexe identifiziert und ein besseres Verständnis des Proteinimports in Mitochondrien erlangt werden. Dieser Ansatz ist somit ein gutes Beispiel dafür, dass analytische Strategien vollkommen neue Einblicke in fundamentale biochemische Vorgänge liefern können.

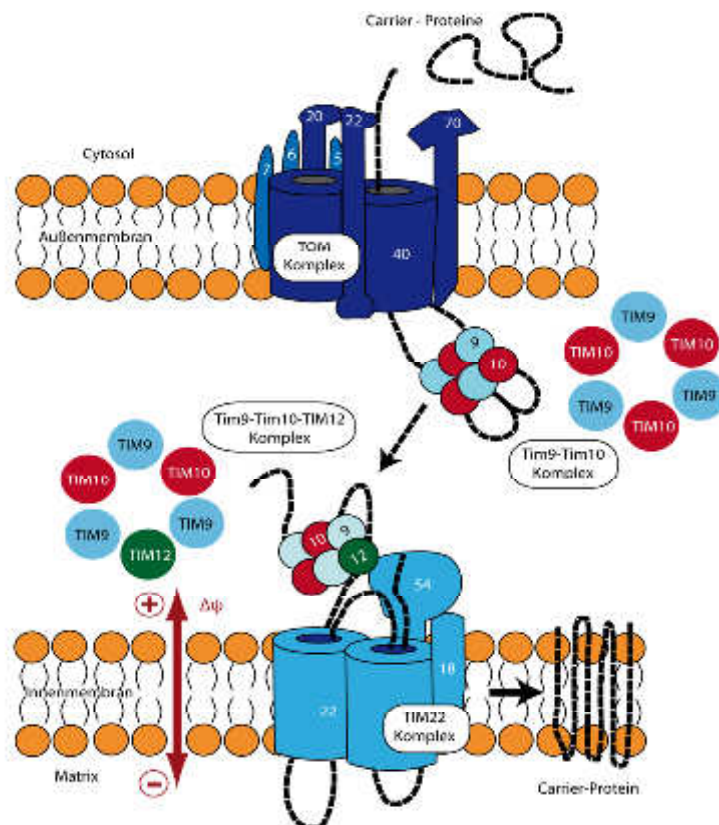
## 6.6 Analyse der Stöchiometrie des Tim22 Komplexes

Die einzelnen Komponenten der Membrankomplexe von Mitochondrien sind heutzutage weitgehend bekannt. Der Tim22-Komplex der inneren mitochondrialen Membran beispielsweise besteht aus den Proteinen Tim22, Tim18, Tim54, Tim9, Tim10 und Tim12. Sirrenberg *et al.* [131] konnten zusätzlich mit Hilfe von Immunopräzipitation und Phosphorimaging zeigen, dass die Proteine Tom40, Tim23 und Tim22 in einem Verhältnis von 5:1:0,22 im Mitochondrium vorliegen. Weitere Angaben zur Stöchiometrie der Membrankomplexe in Mitochondrien konnten bisher jedoch nicht gemacht werden. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden (siehe Kapitel 5.6), mit der es möglich ist, Proteinkomplexe absolut zu quantifizieren. Die Bestimmung der Stöchiometrie ist ein weiterer essentieller Schritt, um die Dynamik des Proteinimports besser verstehen zu können. Evaluiert wurde der Ansatz mit der Quantifizierung der Komponenten des aufgereinigten Tim22-Komplexes. Ein wichtiger Schritt im Arbeitsablauf, auf den hier nun näher eingegangen wird, ist die Quantifizierung der isolierten Tim-Proteine, da basierend auf diesen Ergebnissen die weitere Bestimmung der Stöchiometrie vorgenommen wird. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des in den Proteinen integrierten Kalibrierpeptides. Die Verwendung eines Kalibrierpeptides hat den entscheidenden Vorteil, dass es für jedes zu quantifizierende Protein verwendet werden kann. Zur Überprüfung der Quantifizierung der Proteine mit dem Kalibrierpeptid wurde beispielhaft für Tim9 und Tim10 eine zusätzliche Quantifizierung mit der Aminosäureanalyse (ASA) durchgeführt. Dabei werden Proteine in einzelne Aminosäuren hydrolysiert. Anschließend werden diese derivatisiert, auf einer HPLC aufgetrennt und mit Hilfe der Peak-Flächen quantifiziert. Auf eine Quantifizierung allein durch ASA wurde verzichtet, da Verunreinigungen der Probe durch andere Proteine die Ergebnisse verfälschen können. Zeigen ASA und die Quantifizierung mit dem Kalibrierpeptide jedoch die gleichen Ergebnisse, können sie als verlässlich angesehen werden. In den hier durchgeführten Experimenten zeigten die Ergebnisse von ASA und Kalibrierpeptiden eine Abweichung von lediglich 6 % bei Tim9 und 8 % bei Tim10. Aus diesem Grund wurde die Quantifizierung aller anderen Tim-Proteine des Tim22-Komplexes ausschließlich mit Hilfe des Kalibrierpeptides durchgeführt.

Nach dem Import von Proteinen der inneren Membran (ohne Präsequenz), wie Carrier-Proteinen, durch den Tom-Komplex in den Intermembranraum, werden diese an einen Chaperon-Komplex aus Tim9 und Tim10 gebunden. Dieser transportiert die importierten Proteine zum Tim22-Komplex in der inneren Membran und verhindert gleichzeitig deren Aggregation im Intermembranraum. Durch Analyse der Kristallstruktur dieses Komplexes [132] zeigte sich, dass

## Diskussion

Tim9 und Tim10 ein Hexamer aus drei Molekülen Tim9 und drei Molekülen Tim10 bilden. Im nächsten Schritt wird das importierte Protein an einen weiteren Chaperon-Komplex aus Tim9, Tim10 und Tim12 Proteinen geleitet, welcher über Tim12 an Tim54 des Tim22-Komplexes bindet. Auch der Tim9-Tim10-Tim12-Komplex ist ein Hexamer. Da sich Tim10 und Tim12 in ihrer Struktur ähneln, wird davon ausgegangen, dass im Vergleich beider Chaperon-Komplexe beim Tim9-Tim10-Tim12-Komplex ein Tim10-Molekül gegen ein Tim12-Molekül ausgetauscht wird, was es dem Komplex ermöglicht am Tim54 zu binden (siehe Abbildung 49) [133], [134]. Das bedeutet, dass sich dieser Komplex aus 3 Molekülen Tim9, 2 Molekülen Tim10 und einem Tim12 zusammensetzt. Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit (siehe Tabelle 22) konnte diese Theorie erstmals bestätigt werden.



**Abbildung 49:** Schematische Darstellung des Proteinimports von Carrier-Proteinen. Proteine gelangen über den Tom-Komplex in den Intermembranraum. Dort binden sie an den Tim9-Tim10-Komplex. Dieser transportiert die Proteine zum Tim9-Tim10-Tim12-Komplex und verhindert deren Aggregation im Intermembranraum. Der Tim9-Tim10-Tim12-Komplex bindet an den Tim22-Komplex. Von dort werden die importierten Proteine in die Innenmembran der Mitochondrien geschleust.

Einzig Tim18 konnte mit diesem Ansatz nicht quantifiziert werden. Tim18 ist ein Protein welches sich fast vollständig in der inneren Membran befindet, was dazu führt, dass es schwer zu denaturieren und zu verdauen ist. Auch bei diversen Analysen in der Arbeitsgruppe ließ sich Tim18, sei es aus Gesamtmitochondrien oder isolierten Membranen, nicht detektieren. In weiteren Experimenten kann in Zukunft geprüft werden, ob durch Verwendung anderer Denaturierungspuffer, wie Natriumlaurat [135], oder RapiGest in Kombination mit Guanidin und Acetonitril [136], der Verdau verbessert werden kann.

Nichtsdestotrotz konnte hier ein Ansatz entwickelt werden mit dem es möglich ist, die Stöchiometrie von Membranproteinkomplexen zu bestimmen.

## 6.7 Zellzyklus

Mitochondrien sind keine starren Organellen in der Zelle. Vielmehr sind sie hoch-dynamisch und können miteinander verschmelzen und sich wieder voneinander trennen. Die Rolle von Mitochondrien während des Zellzyklus der Zelle ist bis heute nicht geklärt. Mitra *et al.* [137] konnten zeigen, dass Mitochondrien vor dem Übergang in die S-Phase miteinander verschmelzen und ein großes Netzwerk bilden. Dadurch wird ein hyperpolarisierendes Membranpotential ausgebildet, welches zur Folge hat, dass mehr ATP in der Zelle produziert wird. Die vermehrte Energie wird in der Zelle zum Wachstum, zur Proteinsynthese und DNA-Replikation während des Zellzyklus benötigt. Außerdem hat das Verschmelzen der Mitochondrien einen Einfluss auf die Cyclin-E-Bildung in der Zelle und auf den Übergang von der G1- in die S-Phase [138].

In diesem Projekt sollte die Änderung des Phosphoproteoms von Mitochondrien in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus untersucht werden. Dabei wurden 11 verschiedene Proteine identifiziert, welche in der globalen Analyse keine Änderung in den Zellzyklus Phasen aufweisen, jedoch Phosphorylierungsstellen besitzen, die unterschiedlich reguliert werden. Diese 11 Proteine können in drei verschiedene Gruppen gegliedert werden (siehe Tabelle 25).

**Tabelle 25: Funktion von Proteinen mit potentiell regulierter Phosphorylierungsstelle.**

| <b>Funktion</b>            | <b>Proteine</b>               |
|----------------------------|-------------------------------|
| <b>Energiehaushalt</b>     | CBS2, ACO1, LSC2, MSS51, PDX1 |
| <b>Membranorganisation</b> | EIS1, LSP1, PIL1              |
| <b>Proteinimport</b>       | TOM70, MAS1                   |
| <b>Unbekannt</b>           | YRO2                          |

Die Proteine EIS1, LSP1 und PIL1 bilden einen Komplex und sind Bestandteile des Eisosoms. Eisosomen sind Strukturen, welche Endocytose-Bereiche an der Plasmamembran markieren. Die drei Proteine dienen dabei dazu, die Membran während des Vorgangs der Endocytose neu zu organisieren. Reguliert wird dieser Vorgang durch reversible Phosphorylierung [139], [140], [141]. Bei Phosphoproteom-Analysen konnten alle drei Proteine im phosphorylierten Stadium auch in Mitochondrien identifiziert werden [53]. Während des Zellzyklus verschmelzen Mitochondrien miteinander, bilden große Netzwerke und trennen sich wieder voneinander. Die Membran der Mitochondrien muss durch den Vorgang des Verschmelzen und voneinander Lösens ständig neu organisiert werden. Basierend auf den Analysen des Eisosoms, ist davon auszugehen, dass EIS1, LSP1 und PIL1 auch in Mitochondrien die Reorganisation der Membran beeinflussen und durch reversible Phosphorylierung, je nach Zeitpunkt, unterschiedlich reguliert werden. Die zweite Gruppe von Proteinen, die reguliert detektiert werden konnte, sind Proteine, die bei der Energieversorgung der Zelle mitwirken. Die Proteine PDX1 (Strukturprotein der Pyruvatdehydrogenase), LSC2 (Untereinheit der Succinyl-CoA-Ligase) und ACO1 (Aconitase) sind Bestandteile des Zitratzyklus. MSS51 und CBS2 spielen eine wichtige Rolle in der Atmungskette [142], [143]. Vorrangig zu Beginn eines neuen Zyklus werden vermehrt Proteine synthetisiert, die Zelle wächst und bereitet sich dadurch auf die Teilung vor. Dafür wird mehr Energie benötigt, die durch das Verschmelzen der Mitochondrien und das Ausbilden eines hyperpolarisierenden Membranpotentials produziert wird. Die gesamte Energieproduktion der Zelle muss hochgefahren werden. Die Regulation der oben beschriebenen Proteine durch Phosphorylierung könnte eine Rolle dabei spielen. Die letzte Gruppe der regulierten Proteine, sind Proteine, welche eine Rolle beim Import von Proteinen in Mitochondrien spielen. Tom70 ist ein Rezeptorprotein des Tom-Komplexes der äußeren mitochondrialen Membran, der für das Einschleusen von Proteinen aus dem Cytosol in Mitochondrien verantwortlich ist. MAS1 ist eine Untereinheit der mitochondrial processing peptidase (MPP), welche importierte Proteine nach dem Import prozessiert, indem sie die

## Diskussion

Präsequenzen des Proteins abtrennt. Da zu Beginn des Zellzyklus mehr Proteine synthetisiert, mehr Energie und somit auch mehr Mitochondrien benötigt werden, ist eine Regulierung des Proteinimports insbesondere im Anfangsstadium als wahrscheinlich anzunehmen. YRO2 hat Ähnlichkeiten zu Bacteriorhodopsin, einem Membranprotein welches Archeabakterien zur Energiegewinnung benötigen. Die Funktion des Proteins im Mitochondrium und die Verknüpfung des Proteins mit dem Zellzyklus ist bis heute nicht bekannt. Welche Rolle die Phosphorylierung der einzelnen Proteine im Detail spielt, muss durch weitere funktionelle Studien in Zukunft noch geklärt werden.

Mit Hilfe der Software GPS 2.1 (<http://gps.biocuckoo.org/>) wurden den regulierten Phosphopeptide mögliche Kinasen zugeordnet (siehe Tabelle 26).

**Tabelle 26: Zuordnung möglicher Kinasen zu den regulierten Peptide (durchgeführt mit der Software GPS 2.1). Kleine Buchstaben entsprechen phosphorylierten Aminosäuren**

| Nr. | Accession | Protein | Peptid                      | Kinase |
|-----|-----------|---------|-----------------------------|--------|
| 1   | YGR086C   | PIL1    | ALLELLDDSPVtPGETRPAYDGYEASK | CMGC   |
| 2   | YGR193C   | PDX1    | YFDPIFEDLVTLsPR             | CMGC   |
| 3   | YGR244C   | LSC2    | SGVHMIEsPQQAEDVAK           | CMGC   |
| 4   | YLR163C   | MAS1    | SESPVPLGsPR                 | CMGC   |
| 5   | YLR203C   | MSS51   | NALGLDPPPSPEDPTPENR         | CMGC   |
| 6   | YLR304C   | ACO1    | STVEVKVsPTSDR               | CMGC   |
| 7   | YNL121C   | TOM70   | FGDIDtATATPTELSTQPAKER      | CAMK   |
| 8   | YNL121C   | TOM70   | FGDIDtATATPTELSTQPAK        | CAMK   |
| 9   | YNL121C   | TOM70   | FGDIDTATAtPTELSTQPAKER      | CMGC   |
| 10  | YNL121C   | TOM70   | FGDIDTATAtPTELSTQPAK        | CMGC   |
| 11  | YPL004C   | LSP1    | ALLELLDDSPVtPGEARPAYDGYEASR | CMGC   |
| 12  | YBR054W   | YRO2    | KAQEEEEEDVAtdSE             | CK1    |
| 13  | YDR197W   | CBS2    | SA <sub>s</sub> LSLR        | CMGC   |
| 14  | YMR031C   | EIS1    | NN <sub>s</sub> ITSATSK     | CK1    |

Es ist bisher bekannt, dass von den ca. 130 Kinasen in *Saccharomyces cerevisiae* neun Kinasen mitochondrial und sechs weitere potentiell mitochondrial sind. Keine der Kinase wird jedoch durch mitochondriale DNA kodiert [144]. Da die Proteine der hier regulierten Phosphopeptide auf globaler Ebene stabil bleiben, ist davon auszugehen, dass die Peptide im Laufe des Zellzyklus durch mitochondriale Kinasen und Phosphatasen phosphoryliert bzw. dephosphoryliert werden und nicht etwa außerhalb der Mitochondrien und anschließend importiert werden. Zehn der hier als reguliert gefundenen Phosphopeptide werden laut GPS 2.1 durch CMGC Kinasen phosphoryliert. Dies ist eine Kinasen-Gruppe zu der CDK-Kinasen (Cyclin-dependent kinases), MAP (Mitogen activated protein)-Kinasen, Glycogen-Synthase Kinasen und CDK ähnliche Kinasen gehören. Ohlmeier *et al.* [144] zeigten, dass die mitochondriale MAP-Kinase Sat4 die Proteine Pil1 und Lsp1 und die mitochondriale MAP-Kinase Mec1 das Protein Aco1 phosphorylieren kann. Die Phosphorylierung der anderen Peptide kann entweder durch weitere, bereits bekannte mitochondriale CMGC Kinasen, wie Fus3, Bck1 oder Yck1 erfolgen oder aber durch CMGC Kinasen, die bis jetzt noch nicht als mitochondrial identifiziert werden konnten. Tom70 und EIS1 werden durch cytosolische Kinasen phosphoryliert, sind aber auch beides Proteine, welche sich in der äußeren mitochondrialen Membran befinden. Yro2 ist ein Protein bei dem die Lokalisation im Mitochondrium und die Funktion nicht bekannt sind. Als potentielle Kinase wurde CK1 (cytosolisch) vorausgesagt, was vermuten lässt, dass sich auch Yro2 in der Außenmembran befindet. Alternativ ist jedoch auch möglich, dass es eine bisher unbekannte mitochondriale Kinase gibt, die eine ähnliche Konsensussequenz wie CK1 besitzt und Yro2 somit nicht zwingend in der Außenmembran liegt.

Ein wichtiger Punkt, der bei der Analyse der Regulation von Phosphorylierungsstellen beachtet werden muss, ist, dass dabei von relativer Quantifizierung gesprochen wird. Sind beispielsweise von 100 möglichen Peptiden in Zeitpunkt 1 (ZP1) ein Peptid und in Zeitpunkt 2 (ZP2) vier Peptide phosphoryliert, liegt eine 4-fache Regulierung vor. Sind von 100 möglichen Peptiden in ZP1 20 und in ZP2 80 Peptide phosphoryliert liegt auch eine 4-fache Regulierung vor, jedoch kann hier eine völlig andere und stärkere Regulation der Zelle vorliegen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll nicht nur die Regulierung einer Phosphorylierungsstelle zwischen zwei Zeitpunkten zu bestimmen, sondern auch deren Stöchiometrie (Vergleich der Menge an phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Peptid in einer Probe). Ein Ansatz dafür wurde 2011 von Wu *et al.* [145] vorgestellt. Seine Methode basiert auf dem Vergleich einer Probe vor und nach einer Phosphatase-Behandlung (Phosphatgruppe wird abgespalten). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass in einer LC-MS Messung die Stöchiometrie einer großen Anzahl an Phosphopeptiden ermittelt werden kann und keine schwer-Isotopen markierten Peptide [146] zur absoluten

Quantifizierung der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptide benötigt werden. Ein Nachteil ist jedoch, dass die Stöchiometrie einzelner Phosphorylierungsstellen in mehrfach phosphorylierten Peptiden nicht ermittelt werden kann. In dieser Arbeit stand nicht genug Probenmaterial zur Verfügung, um Experimente zur Stöchiometrie durchzuführen.

Zusätzlich zu den potentiell regulierten Phosphopeptiden wurden 7 Proteine identifiziert, die auf globaler Ebene (Protein-Ebene) reguliert sind. In der nachfolgenden Tabelle sind diese Proteine anhand ihrer Funktion in der Zelle zusammengefasst.

**Tabelle 27: Funktion potentiell regulierter Proteine.**

| <b>Funktion</b>             | <b>Proteine</b> |
|-----------------------------|-----------------|
| <b>Energiehaushalt</b>      | PPT2            |
| <b>Membranorganisation</b>  | DNF1            |
| <b>Proteinbiosynthese</b>   | HYP2,GCN1       |
| <b>Chromosomen-Trennung</b> | CBF1            |
| <b>Unbekannt</b>            | ECM33, YBR056W  |

Die Proteine PPT2, DNF1, HYP2 und GCN1 liegen zu Beginn des Zellzyklus hochreguliert vor. Diese Proteine sind am Energiehaushalt, an der Membranorganisation bzw. an der Proteinbiosynthese in Mitochondrien beteiligt. Wie bereits beschrieben, werden vorrangig im Anfangsstadium des Zellzyklus vermehrt Proteine synthetisiert. Dafür wird zunehmend Energie benötigt, die durch das Verschmelzen von Mitochondrien und das Ausbilden eines hyperpolarisierenden Membranpotentials produziert wird. Somit ist die Regulierung von Proteinen, die an diesen Funktionen beteiligt sind, in einer frühen Phase des Zellzyklus nachvollziehbar. CBF1 ist ein Protein, welches mit Proteinen des Zentromers interagiert und zur Trennung der Chromosomen in der Mitose benötigt wird. Aus diesem Grund ist es plausibel, dass CBF1 während der Mitose reguliert wird.



## 6.8 Phosphoproteom-Analyse von aktivierten Tabakpollen

In Kapitel 5.2 wurde das Protokoll zur Anreicherung phosphorylierter Peptide mittels Titandioxid optimiert und anschließend auf die Analyse des Phosphoproteoms von Mitochondrien angewendet. Anhand der Untersuchung des Phosphoproteoms von Tabakpollen konnte gezeigt werden, dass dieses optimierte Protokoll effizient und reproduzierbar auch auf andere Organismen und Fragestellungen übertragen werden kann. In diesem Experiment wurden reife inaktive Pollen (MP) von Tabakpflanzen aktiviert (Aktivierungszeit 5 (TP5) und 30 (TP30) Minuten) und die Veränderung des Phosphoproteoms zu den Zeitpunkten MP, TP5 und TP30 quantitativ bestimmt. Insgesamt konnten 630 phosphorylierte Peptide identifiziert werden, die in mindestens zwei der drei Replikate vorhanden waren und einen phosphoRS-Wert von  $\geq 75$  hatten. 109 dieser Peptide aus 94 verschiedenen Proteinen (Proteine in der globalen Analyse stabil) konnten reguliert gefunden werden.

Von vielen der hier identifizierten Proteine ist zwar bekannt, dass sie in Pflanzen zu finden sind, jedoch ist ihre genaue Funktion weitgehend unbekannt. Ischebeck *et al.* publizierten erst Anfang 2014 [147] eine Liste mit 3817 Proteinen aus Pflanzenpollen, die sie in verschiedene funktionelle Gruppen einsortieren konnten.

Es zeichnete sich ab, dass viele der hier als reguliert identifizierten Proteine an der Proteinbiosynthese in der Zelle beteiligt sind, was nicht überraschend ist. Pollen in ihrer inaktiven Form sind eingetrocknet und haben ihren Energiehaushalt auf ein Minimum zurückgefahren. Werden sie aktiviert müssen alle zellulären Prozesse wieder angefahren werden und ein Pollenschlauch wird ausgebildet. Dafür werden Proteine benötigt, deren Synthese über Phosphorylierung reguliert werden kann. Basierend auf der globalen Analyse der Pollen in den unterschiedlichen Stadien zeigte sich, dass 67 Proteine in den aktivierten Pollen im Gegensatz zu den MP hochreguliert werden. Über 200 verschiedene Proteine wurden nach der Aktivierung neu synthetisiert und konnten nur in TP5 und TP30 identifiziert werden.

Zwei interessante Proteine, welche auf Phosphopeptid-Ebene reguliert sind, sind EB678400 und TC113598. EB678400 gehört zu den sogenannten LEA (Late Embryogenesis Abundant)-Proteinen, die in Zusammenhang mit der Toleranz von Pflanzen gegenüber Umweltstress stehen [148]. TC113598 ist ein Protein mit bisher unbekannter Funktion. Beide Proteine haben eine Phosphorylierungsstelle, die stark in TP5 hochreguliert ist, und eine andere Phosphorylierungsstelle, welche nur in MP und TP30 identifiziert werden kann. Ähnliches lässt sich bei 6 weiteren Proteinen beobachten. Diese weisen die Hochregulierung einer

Phosphorylierungsstelle in MP und die Regulierung einer weiteren in TP5 und/oder TP30 auf. Drei dieser Proteine sind an der Synthese bzw. Degradation von Proteinen beteiligt, ein Protein steht in Zusammenhang mit der Reaktion von Pollen auf Umweltstress und zwei haben unbekannte Funktionen. Basierend auf diesen Ergebnissen sind in Zukunft weitere biologische Studien zunächst dieser 8 Proteine interessant, um die Bedeutung der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen während der Aktivierung von Pflanzenpollen besser zu verstehen.

## 7 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es neue LC-MS basierte Methoden zu entwickeln, mit denen es möglich ist die Dynamik von Mitochondrien bezogen auf den Proteinimport und das Phosphoproteom der Organellen zu untersuchen.

Dafür wurde zunächst die Probenaufarbeitung in Bezug auf Membranproteine optimiert. Aufbauend darauf wurde ein Ansatz etabliert, um die Stöchiometrie von Membrankomplexen zu analysieren und den dynamischen Import von Proteinen in Mitochondrien zu verfolgen. Zusätzlich wurde die Anreicherung phosphophorylierter Peptide mittels Titandioxid verbessert und 487 neue Phosphorylierungsstellen in 238 mitochondrialen Proteinen identifiziert.

Es wurde somit eine Grundlage dafür geschaffen, den mitochondrialen Proteinimport besser charakterisieren zu können. Aufbauend auf den hier generierten Ergebnissen können in Zukunft neue Regulationswege aufgeklärt und damit völlig neue Einblicke in die Dynamik von Mitochondrien erlangt werden.

In zukünftigen Projekten kann im ersten Schritt die Stöchiometrie aller bis jetzt bekannter mitochondrialer Membrankomplexe bestimmt werden. Außerdem kann der Import aller Klassen von Proteinen (z.B. IMR-Proteine, Proteine der Außenmembran, Proteine der Innenmembran usw.) untersucht werden. Dafür kann für jede Gruppe ein Repräsentant gesucht (wie Tom40 für  $\beta$ -Faltblatt Proteine der Außenmembran oder ATP-Translocase für Proteine der Innenmembran) und dessen Weg von Cytosol ins Mitochondrium nachverfolgt werden, um somit mögliche neue Komplexe, die am Import beteiligt sind, zu identifizieren. Auch die Analyse der Funktion der hier identifizierten mitochondrialen Phosphorylierungsstellen ist von großem Interesse.

Basierend auf den daraus gewonnen Erkenntnissen kann in weiterer Zukunft der Modellorganismus *S.cerevisiae* verlassen werden. Wie anhand der Analyse von Tabakpollen gezeigt wurde, ist es möglich alle hier optimierten Methoden auf andere biologische Systeme anzuwenden. Ein interessanter Ansatz ist in diesem Zusammenhang die Analyse von Mitochondrien aus humanen Blutplättchen. So kann beispielsweise das mitochondriale Proteom von Patienten mit Alzheimer oder Parkinson untersucht werden, um diese Krankheiten besser verstehen zu können oder Biomarker zu finden, die es ermöglichen diese bereits im frühen Stadium durch Blutuntersuchungen zu erkennen.

---

## Referenzen

1. Lottspeich, F., *Bioanalytik*. Vol. 2. 2006: Spektrum Verlag.
2. Nagaraj, N., et al., *Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line*. *Mol Syst Biol*, 2011. 7: p. 548.
3. Delom, F. and E. Chevet, *Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes*. *Proteome Sci*, 2006. 4: p. 15.
4. Hunter, T., *The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998. 353(1368): p. 583-605.
5. Mann, M., et al., *Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome*. *Trends Biotechnol*, 2002. 20(6): p. 261-8.
6. Paradela, A. and J.P. Albar, *Advances in the analysis of protein phosphorylation*. *J Proteome Res*, 2008. 7(5): p. 1809-18.
7. Rogers, L.D. and L.J. Foster, *Phosphoproteomics--finally fulfilling the promise?* *Mol Biosyst*, 2009. 5(10): p. 1122-9.
8. Fischer, W.H., et al., *Determination of phosphorylation sites in peptides and proteins employing a volatile Edman reagent*. *J Protein Chem*, 1997. 16(5): p. 329-34.
9. Olsen, J.V., et al., *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. *Cell*, 2006. 127(3): p. 635-48.
10. Eyrich, B., A. Sickmann, and R.P. Zahedi, *Catch me if you can: Mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies*. *Proteomics*, 2011. 11(4): p. 554-570.
11. Geoffrey M. Cooper, R.E.H., *The cell: a molecular approach*. 4 ed. 2007: ASM Press.
12. Otera, H. and K. Mihara, *Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics*. *J Biochem*, 2011. 149(3): p. 241-51.
13. Dolezal, P., et al., *Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria*. *Science*, 2006. 313(5785): p. 314-8.
14. Lang, B.F., M.W. Gray, and G. Burger, *Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes*. *Annu Rev Genet*, 1999. 33: p. 351-97.
15. Sickmann, A., et al., *The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(23): p. 13207-12.
16. Dudek, J., P. Rehling, and M. van der Laan, *Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1833(2): p. 274-85.
17. Mossmann, D., C. Meisinger, and F.N. Vogtle, *Processing of mitochondrial presequences*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1819(9-10): p. 1098-106.
18. MacKenzie, J.A. and R.M. Payne, *Mitochondrial protein import and human health and disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1772(5): p. 509-23.
19. de Moura, M.B., L.S. dos Santos, and B. Van Houten, *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer*. *Environ Mol Mutagen*, 2010. 51(5): p. 391-405.
20. Wiedemann, N., A.E. Frazier, and N. Pfanner, *The protein import machinery of mitochondria*. *J Biol Chem*, 2004. 279(15): p. 14473-6.
21. Vogtle, F.N., et al., *Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability*. *Cell*, 2009. 139(2): p. 428-39.
22. Rehling, P., et al., *The mitochondrial import machinery for preproteins*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2001. 36(3): p. 291-336.
23. Hill, K., et al., *Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]*. *Nature*, 1998. 395(6701): p. 516-21.
24. Abe, Y., et al., *Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20*. *Cell*, 2000. 100(5): p. 551-60.
25. Brix, J., K. Dietmeier, and N. Pfanner, *Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70*. *J Biol Chem*, 1997. 272(33): p. 20730-5.

26. Becker, T., et al., *Biogenesis of mitochondria: dual role of Tom7 in modulating assembly of the preprotein translocase of the outer membrane*. J Mol Biol, 2011. 405(1): p. 113-24.
27. Chacinska, A., et al., *Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins*. EMBO J, 2004. 23(19): p. 3735-46.
28. Mesecke, N., et al., *A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import*. Cell, 2005. 121(7): p. 1059-69.
29. Meier, S., W. Neupert, and J.M. Herrmann, *Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria*. J Biol Chem, 2005. 280(9): p. 7777-85.
30. Jensen, R.E. and A.E. Johnson, *Opening the door to mitochondrial protein import*. Nat Struct Biol, 2001. 8(12): p. 1008-10.
31. Meinecke, M., et al., *Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane*. Science, 2006. 312(5779): p. 1523-6.
32. Truscott, K.N., et al., *A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23*. Nat Struct Biol, 2001. 8(12): p. 1074-82.
33. Geissler, A., et al., *Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence*. Mol Biol Cell, 2000. 11(11): p. 3977-91.
34. Bohnert, M., et al., *Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport*. Curr Biol, 2010. 20(13): p. 1227-32.
35. Saddar, S., M.K. Dienhart, and R.A. Stuart, *The F1F0-ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome bc1-cytochrome oxidase supercomplex and its association with the TIM23 machinery*. J Biol Chem, 2008. 283(11): p. 6677-86.
36. Wiedemann, N., et al., *Sorting switch of mitochondrial presequence translocase involves coupling of motor module to respiratory chain*. J Cell Biol, 2007. 179(6): p. 1115-22.
37. Kang, P.J., et al., *Requirement for Hsp70 in the Mitochondrial Matrix for Translocation and Folding of Precursor Proteins*. Nature, 1990. 348(6297): p. 137-143.
38. Voisine, C., et al., *The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins ave distinct and separable functions of matrix Hsp70*. Cell, 1999. 97(5): p. 565-574.
39. Taylor, A.B., et al., *Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences*. Structure, 2001. 9(7): p. 615-625.
40. Bukau, B. and A.L. Horwich, *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines*. Cell, 1998. 92(3): p. 351-366.
41. Sirrenberg, C., et al., *Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5*. Nature, 1998. 391(6670): p. 912-5.
42. Kovermann, P., et al., *Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel*. Mol Cell, 2002. 9(2): p. 363-73.
43. Wiedemann, N., et al., *Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane*. Nature, 2003. 424(6948): p. 565-71.
44. Wiedemann, N., et al., *Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway*. J Biol Chem, 2004. 279(18): p. 18188-94.
45. Yamano, K., S. Tanaka-Yamano, and T. Endo, *Mdm10 as a dynamic constituent of the TOB/SAM complex directs coordinated assembly of Tom40*. EMBO Rep, 2010. 11(3): p. 187-93.
46. Meisinger, C., et al., *The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane*. Dev Cell, 2004. 7(1): p. 61-71.
47. Becker, T., et al., *Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors*. J Biol Chem, 2008. 283(1): p. 120-7.
48. Kornmann, B., et al., *An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen*. Science, 2009. 325(5939): p. 477-81.
49. Hulett, J.M., et al., *The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex*. J Mol Biol, 2008. 376(3): p. 694-704.

50. Popov-Celeketic, J., T. Waizenegger, and D. Rapaport, *Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane*. J Mol Biol, 2008. 376(3): p. 671-80.
51. Stojanovski, D., et al., *Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins*. J Cell Biol, 2007. 179(5): p. 881-93.
52. Kemper, C., et al., *Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components*. J Cell Sci, 2008. 121(Pt 12): p. 1990-8.
53. Reinders, J., et al., *Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase*. Mol Cell Proteomics, 2007. 6(11): p. 1896-906.
54. Schmidt, O., et al., *Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases*. Cell, 2011. 144(2): p. 227-39.
55. Rao, S., et al., *Biogenesis of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: protein kinase A phosphorylates the precursor of Tom40 and impairs its import*. Mol Biol Cell, 2012. 23(9): p. 1618-27.
56. Rao, S., et al., *Signaling at the gate: phosphorylation of the mitochondrial protein import machinery*. Cell Cycle, 2011. 10(13): p. 2083-90.
57. van Wilpe, S., et al., *Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase*. Nature, 1999. 401(6752): p. 485-9.
58. Shiota, T., et al., *In vivo protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(37): p. 15179-83.
59. Taylor, W.E. and E.T. Young, *cAMP-dependent phosphorylation and inactivation of yeast transcription factor ADR1 does not affect DNA binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(11): p. 4098-102.
60. Tamaki, H., *Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng, 2007. 104(4): p. 245-50.
61. Wu, F., et al., *Comparison of surfactant-assisted shotgun methods using acid-labile surfactants and sodium dodecyl sulfate for membrane proteome analysis*. Anal Chim Acta, 2011. 698(1-2): p. 36-43.
62. Manza, L.L., et al., *Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters*. Proteomics, 2005. 5(7): p. 1742-5.
63. Wisniewski, J.R., et al., *Universal sample preparation method for proteome analysis*. Nat Methods, 2009. 6(5): p. 359-62.
64. Vandermarliere, E., M. Mueller, and L. Martens, *Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics*. Mass Spectrom Rev, 2013. 32(6): p. 453-65.
65. Burkhart, J.M., et al., *Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics*. J Proteomics, 2012. 75(4): p. 1454-62.
66. Gey, M.H., ed. *Instrumentelle Bioanalytik*. 1 ed. 1998, Vieweg Verlag.
67. Meyer, V.R., ed. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 10 ed. 2009, Wiley Verlag.
68. Consta, S., *Manifestation of Rayleigh instability in droplets containing multiply charged macroions*. J Phys Chem B, 2010. 114(16): p. 5263-8.
69. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme*. Journal of Physical Chemistry, 1984. 88(20): p. 4451-4459.
70. Zubarev, R.A., *Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry*. Curr Opin Biotechnol, 2004. 15(1): p. 12-6.
71. Biemann, K., *Mass spectrometry of peptides and proteins*. Annu Rev Biochem, 1992. 61: p. 977-1010.
72. Thingholm, T.E., O.N. Jensen, and M.R. Larsen, *Analytical strategies for phosphoproteomics*. Proteomics, 2009. 9(6): p. 1451-68.

73. Schroeder, M.J., et al., *A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2004. 76(13): p. 3590-3598.
74. Villen, J., S.A. Beausoleil, and S.P. Gygi, *Evaluation of the utility of neutral-loss-dependent MS3 strategies in large-scale phosphorylation analysis*. Proteomics, 2008. 8(21): p. 4444-52.
75. Olsen, J.V., et al., *A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed*. Mol Cell Proteomics, 2009. 8(12): p. 2759-69.
76. [http://media.biocompare.com/m/37/Product/3722049\\_2-400x300.jpg](http://media.biocompare.com/m/37/Product/3722049_2-400x300.jpg). 2013.
77. Ly, L. and V.C. Wasinger, *Mass and charge selective protein fractionation for the differential analysis of T-cell and CD34+ stem cell proteins from cord blood*. J Proteomics, 2010. 73(3): p. 571-8.
78. Ballif, B.A., et al., *Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain*. Mol Cell Proteomics, 2004. 3(11): p. 1093-101.
79. Edelman, M.J., *Strong Cation Exchange Chromatography in Analysis of Posttranslational Modifications: Innovations and Perspectives*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011.
80. Buszewski, B. and S. Noga, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique*. Anal Bioanal Chem, 2012. 402(1): p. 231-47.
81. McNulty, D.E. and R.S. Annan, *Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection*. Mol Cell Proteomics, 2008. 7(5): p. 971-80.
82. Andersson, L. and J. Porath, *Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe<sup>3+</sup>) affinity chromatography*. Anal Biochem, 1986. 154(1): p. 250-4.
83. Zahedi, R.P., et al., *Phosphoproteomics of human platelets: A quest for novel activation pathways*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1764(12): p. 1963-76.
84. Ficarro, S.B., et al., *Automated immobilized metal affinity chromatography/nano-liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry platform for profiling protein phosphorylation sites*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. 19(1): p. 57-71.
85. Sano, A. and H. Nakamura, *Titanium as a chemo-affinity support for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides: application to the characterization of phosphorylation sites in proteins by combination with protease digestion and electrospray ionization mass spectrometry*. Anal Sci, 2004. 20(5): p. 861-4.
86. Larsen, M.R., et al., *Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns*. Mol Cell Proteomics, 2005. 4(7): p. 873-86.
87. Pinkse, M.W., et al., *Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns*. Anal Chem, 2004. 76(14): p. 3935-43.
88. Aryal, U.K. and A.R. Ross, *Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010. 24(2): p. 219-31.
89. Palmisano, G., et al., *A novel method for the simultaneous enrichment, identification, and quantification of phosphopeptides and sialylated glycopeptides applied to a temporal profile of mouse brain development*. Mol Cell Proteomics, 2012. 11(11): p. 1191-202.
90. Engholm-Keller, K. and M.R. Larsen, *Titanium dioxide as chemo-affinity chromatographic sorbent of biomolecular compounds--applications in acidic modification-specific proteomics*. J Proteomics, 2011. 75(2): p. 317-28.
91. Klose, J. and U. Kobalz, *Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome*. Electrophoresis, 1995. 16(6): p. 1034-59.
92. Gorg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. Proteomics, 2004. 4(12): p. 3665-85.
93. Ross, P.L., et al., *Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents*. Mol Cell Proteomics, 2004. 3(12): p. 1154-69.

94. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. 1(5): p. 376-86.
95. Liu, H., R.G. Sadygov, and J.R. Yates, 3rd, *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics*. Anal Chem, 2004. 76(14): p. 4193-201.
96. Florens, L., et al., *Analyzing chromatin remodeling complexes using shotgun proteomics and normalized spectral abundance factors*. Methods, 2006. 40(4): p. 303-11.
97. Perkins, D.N., et al., *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis, 1999. 20(18): p. 3551-67.
98. Taus, T., et al., *Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS*. J Proteome Res, 2011. 10(12): p. 5354-62.
99. Beausoleil, S.A., et al., *A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization*. Nat Biotechnol, 2006. 24(10): p. 1285-92.
100. Meisinger, C., T. Sommer, and N. Pfanner, *Purification of Saccharomyces cerevisiae mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations*. Anal Biochem, 2000. 287(2): p. 339-42.
101. Beck, F., et al., *The good, the bad, the ugly: validating the mass spectrometric analysis of modified peptides*. Proteomics, 2011. 11(6): p. 1099-109.
102. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/1133903?CID=search-product>. 2014.
103. Beck, F., et al., *Robust workflow for iTRAQ-based peptide and protein quantification*. Methods Mol Biol, 2012. 893: p. 101-13.
104. Burkhardt, J.M., T. Premisler, and A. Sickmann, *Quality control of nano-LC-MS systems using stable isotope-coded peptides*. Proteomics, 2011. 11(6): p. 1049-57.
105. Lewandrowski, U., et al., *Platelet membrane proteomics: a novel repository for functional research*. Blood, 2009. 114(1): p. e10-9.
106. Rietschel, B., et al., *Membrane protein analysis using an improved peptic in-solution digestion protocol*. Proteomics, 2009. 9(24): p. 5553-7.
107. Gilmore, J.M. and M.P. Washburn, *Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes*. J Proteomics, 2010. 73(11): p. 2078-91.
108. Wu, C.C., et al., *A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins*. Nat Biotechnol, 2003. 21(5): p. 532-8.
109. Han, J. and K.L. Schey, *Proteolysis and mass spectrometric analysis of an integral membrane: aquaporin 0*. J Proteome Res, 2004. 3(4): p. 807-12.
110. Engholm-Keller, K., et al., *TiSH--a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO2, SIMAC, and HILIC*. J Proteomics, 2012. 75(18): p. 5749-61.
111. Savitski, M.M. and M. Falth, *Peptide fragmentation and phospho-site detection*. Expert Rev Proteomics, 2007. 4(4): p. 445-6.
112. Vaudel, M., et al., *D-score: A search engine independent MD-score*. Proteomics, 2013. 13(6): p. 1036-1041.
113. Savitski, M.M., et al., *Confident phosphorylation site localization using the Mascot Delta Score*. Mol Cell Proteomics, 2011. 10(2): p. M110 003830.
114. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol, 2008. 26(12): p. 1367-72.
115. Olsen, J.V., et al., *Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis*. Sci Signal, 2010. 3(104): p. ra3.
116. Graille, M., et al., *Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(10): p. 5399-404.
117. Chang, F. and I. Herskowitz, *Phosphorylation of FAR1 in response to alpha-factor: a possible requirement for cell-cycle arrest*. Mol Biol Cell, 1992. 3(4): p. 445-50.



118. Chang, F. and I. Herskowitz, *Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2*. Cell, 1990. 63(5): p. 999-1011.
119. Udden, M.M. and D.B. Finkelstein, *Reaction order of Saccharomyces cerevisiae alpha-factor-mediated cell cycle arrest and mating inhibition*. J Bacteriol, 1978. 133(3): p. 1501-7.
120. Koc, A., et al., *Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools*. J Biol Chem, 2004. 279(1): p. 223-30.
121. Nordlund, P. and P. Reichard, *Ribonucleotide reductases*. Annu Rev Biochem, 2006. 75: p. 681-706.
122. Coldwell, M.J., et al., *Phosphorylation of eIF4GII and 4E-BP1 in response to nocodazole treatment: A reappraisal of translation initiation during mitosis*. Cell Cycle, 2013. 12(23).
123. Rohrig, H., et al., *Analysis of desiccation-induced candidate phosphoproteins from Craterostigma plantagineum isolated with a modified metal oxide affinity chromatography procedure*. Proteomics, 2008. 8(17): p. 3548-60.
124. Ficarro, S.B., et al., *Online nanoflow multidimensional fractionation for high efficiency phosphopeptide analysis*. Mol Cell Proteomics, 2011. 10(11): p. O111 011064.
125. Hennrich, M.L., et al., *Improving depth in phosphoproteomics by using a strong cation exchange-weak anion exchange-reversed phase multidimensional separation approach*. Anal Chem, 2011. 83(18): p. 7137-43.
126. Masuda, T., et al., *Microscale phosphoproteome analysis of 10,000 cells from human cancer cell lines*. Anal Chem, 2011. 83(20): p. 7698-703.
127. Thingholm, T.E., et al., *SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides*. Mol Cell Proteomics, 2008. 7(4): p. 661-71.
128. Manning, G., *Genomic overview of protein kinases*. WormBook, 2005: p. 1-19.
129. Vandermarliere, E. and L. Martens, *Protein structure as a means to triage proposed PTM sites*. Proteomics, 2013. 13(6): p. 1028-35.
130. Marx, H., et al., *A large synthetic peptide and phosphopeptide reference library for mass spectrometry-based proteomics*. Nat Biotechnol, 2013. 31(6): p. 557-64.
131. Sirrenberg, C., et al., *Functional cooperation and stoichiometry of protein translocases of the outer and inner membranes of mitochondria*. J Biol Chem, 1997. 272(47): p. 29963-6.
132. Webb, C.T., et al., *Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller*. Mol Cell, 2006. 21(1): p. 123-33.
133. Kulawiak, B., et al., *The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1827(5): p. 612-26.
134. Wagner, K., et al., *The assembly pathway of the mitochondrial carrier translocase involves four preprotein translocases*. Mol Cell Biol, 2008. 28(13): p. 4251-60.
135. Lin, Y., et al., *Sodium laurate, a novel protease- and mass spectrometry-compatible detergent for mass spectrometry-based membrane proteomics*. PLoS One, 2013. 8(3): p. e59779.
136. Waas, M., et al., *Combine and conquer: surfactants, solvents, and chaotropes for robust mass spectrometry based analyses of membrane proteins*. Anal Chem, 2014. 86(3): p. 1551-9.
137. Mitra, K., et al., *A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(29): p. 11960-5.
138. Detmer, S.A. and D.C. Chan, *Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(11): p. 870-9.
139. Deng, C., X. Xiong, and A.N. Krutchinsky, *Unifying fluorescence microscopy and mass spectrometry for studying protein complexes in cells*. Mol Cell Proteomics, 2009. 8(6): p. 1413-23.
140. Karotki, L., et al., *Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold*. J Cell Biol, 2011. 195(5): p. 889-902.
141. Walther, T.C., et al., *Eisosomes mark static sites of endocytosis*. Nature, 2006. 439(7079): p. 998-1003.

142. Perez-Martinez, X., et al., *Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome c oxidase in Saccharomyces cerevisiae mitochondria*. Mol Biol Cell, 2009. 20(20): p. 4371-80.
143. Krause-Buchholz, U., et al., *Saccharomyces cerevisiae translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes*. Curr Genet, 2004. 46(1): p. 20-8.
144. Ohlmeier, S., J.K. Hiltunen, and U. Bergmann, *Protein phosphorylation in mitochondria --a study on fermentative and respiratory growth of Saccharomyces cerevisiae*. Electrophoresis, 2010. 31(17): p. 2869-81.
145. Wu, R., et al., *A large-scale method to measure absolute protein phosphorylation stoichiometries*. Nat Methods, 2011. 8(8): p. 677-83.
146. Gerber, S.A., et al., *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. 100(12): p. 6940-6945.
147. Ischebeck, T., et al., *Comprehensive cell-specific protein analysis in early and late pollen development from diploid microsporocytes to pollen tube growth*. Mol Cell Proteomics, 2014. 13(1): p. 295-310.
148. Hundertmark, M. and D.K. Hinch, *LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics, 2008. 9: p. 118.

## Danksagung

Während meiner Promotion haben mir viele Menschen zur Seite gestanden, bei denen ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte. Mein größter Dank gilt...

.... Prof. Dr. Albert Sickmann, der mich als mein Doktorvater mit seinem Fachwissen unterstützt hat und wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

.... Prof. Dr. Kayser und Prof. Dr. Wichmann, die sich dazu bereit erklärt haben meine Arbeit als Prüfer zu betreuen.

.... Dr. Rene Zahedi für viele fachliche Diskussionen rund um meine Projekte und die kritische Korrektur meiner Arbeit.

.... Prof. Dr. Chris Meisinger und Dr. Nils Wiedemann für die gute Zusammenarbeit in vielen interessanten Projekten

.... Meinen Kollegen aus dem Labor, insbesondere Clarissa für viele nette Gespräche und das Korrekturlesen meiner Arbeit und Lucky für angenehme Pausen mit Kaffee und indischem Essen

.... Ganz besonders meiner Familie, vorallem meinen Eltern und Sebastian, die mich die ganze Zeit während des Studiums und der Promotion unterstützt haben und es jedes Mal aufs Neue geschafft haben mich vom Laborstress erfolgreich abzulenken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Sonja Radau (geb. Zabor)  
Adresse: Hauptstr. 31, 63150 Heusenstamm  
Geburtsdatum: 13.08.1985  
Geburtsort: Loben (PL)  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

08/1992 – 07/1996 St. Peter Grundschule, Rheinberg  
08/1996 – 06/2005 Amplonius Gymnasium, Rheinberg  
Abschluss: Abitur

### Studium:

10/2005 – 10/2010 TU Dortmund  
Fachbereich Bioingenieurwesen  
Schwerpunkt: Biotechnologie  
Abschluss: Dipl.-Ing

10/2010 – 05/2014 Promotion an der TU Dortmund (Fachbereich Bio- und  
Chemieingenieurwesen)/ Leibniz Institut für Analytische Wissenschaften -  
ISAS – e.V. Dortmund

Ab 06/2015 Applikationsspezialist bei Thermo Fisher Scientific, Dreieich

## **Erklärung**

§ 8 (2) 4.

Ich erkläre, dass beim Verfassen der eingereichten Dissertation keine anderen als die angegebenen Personen mitgewirkt haben, nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und übernommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

§ 8 (2) 6.

Ich erkläre, dass ich bisher keinen Promotionsversuch unternommen habe.

§ 8 (3) 4.

Ich widerspreche der Zulassung der Öffentlichkeit bei der mündlichen Prüfung.

Dortmund, den

(Unterschrift Doktorandin/Doktorand)

## **Anhang**

### **A1: Protokoll PolyMac Enrichment Kit**

#### **1) Probenvorbereitung**

- Probe verdauen und entsalzen und eintrocknen

#### **2) Waschen des capture gel**

- 50  $\mu$ L des capture gel in Zentrifugen-Säule überführen (30s bei 5000g zentrifugieren)
- 2x mit 200  $\mu$ L Wasser waschen (je 30s bei 5000g zentrifugieren)

#### **3) Phosphopeptid-Bindung**

- Peptide mit 100  $\mu$ L Ladepuffer resuspendieren
- 10  $\mu$ L PolyMac Reagenz zufügen, 5 min unter Schütteln inkubieren
- 200  $\mu$ L Capture Puffer zufügen (pH sollte über 6.3 liegen)
- Lösung ins gewaschene capture gel überführen und 10 min unter Schütteln inkubieren, anschließend abzentrifugieren (30s, 5000g)
- Gel waschen (1x Ladepuffer, 2x Waschpuffer, 1x Wasser)

#### **4) Elution**

- Gel mit 2x 100  $\mu$ L Elutionspuffer für 5 min inkubieren (30s bei 5000g zentrifugieren)
- Elution eintrocknen

**A2: QC-Mix Zusammensetzung**

| <b>m/z</b>      | <b>M [Da]</b> | <b>Sequenz</b>      | <b>RT [min]</b> |
|-----------------|---------------|---------------------|-----------------|
| <b>416.7181</b> | 831.4217      | R.LYGDSAAK*.I       | 11.5            |
| <b>373.1791</b> | 744.3437      | R.GPDGFSR*.G        | 13.0            |
| <b>437.7826</b> | 873.5507      | R.LGPGKPLK*.F       | 14.1            |
| <b>523.2731</b> | 1044.5317     | K.AATAAADFTAK*.V    | 16.5            |
| <b>458.7411</b> | 915.4677      | R.TPQEYLR*.R        | 17.1            |
| <b>527.2471</b> | 1052.4797     | R.QYFAETER*.H       | 17.2            |
| <b>556.2966</b> | 1110.5787     | R.LPRGPDGFSR*.G     | 18.1            |
| <b>757.8426</b> | 1513.6707     | R.ELNEDVSADVEER*.F  | 20.5            |
| <b>509.9092</b> | 1526.7057     | R.ETCVVVYTGYNR*.E   | 22.2            |
| <b>472.7391</b> | 943.4637      | R.DFTPELGR*.W       | 22.3            |
| <b>705.8646</b> | 1410.7147     | R.VQDLIEGHL*.TASQ.- | 22.5            |
| <b>416.2516</b> | 830.4887      | R.TSVFLVR*.V        | 23.1            |
| <b>557.8206</b> | 1113.6267     | R.VLISTDLTSR*.G     | 23.3            |
| <b>606.3376</b> | 1210.6607     | K.TNPSVSSLLQR*.A    | 24.1            |
| <b>610.3076</b> | 1218.6007     | K.EFLVAGGEDFK*.L    | 26.2            |
| <b>446.8882</b> | 1337.6427     | R.CSDIISYTFK*.P     | 27.5            |
| <b>536.2931</b> | 1070.5717     | R.LFILDEADK*.L      | 27.5            |
| <b>649.3471</b> | 1296.6797     | R.LDVEEVDSLRL*.I    | 28.5            |

mit K\* = 13C (6) 15N (2)

R\* = 13C (6) 15N (4)

**A3: Zusammensetzung des SMM-MES Mediums**

| Substanz                          | Konzentration |
|-----------------------------------|---------------|
| Sucrose                           | 175 mM        |
| Borsäure                          | 1,6 mM        |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3 mM          |
| MgSO <sub>4</sub>                 | 0,8 mM        |
| KNO <sub>3</sub>                  | 1 mM          |
| MES Hydrat                        | 25 mM         |

**A4: Zusammensetzung des Phosphopeptid Standards**

| Mix | Sequenz             | Stelle im Peptid |
|-----|---------------------|------------------|
| 1   | AATPLPSLR           | 3                |
| 1   | APSVANVGSHCDLSLK    | 3                |
| 1   | ASVANVGSHCDLSLK     | 2                |
| 1   | ATSLPSLDTPGELR      | 3                |
| 1   | DIGSESTDQAMEDIK     | 4                |
| 1   | DIGSESTEDQAEDIK     | 4                |
| 1   | DIGSESTEDQAMEDIK    | 4                |
| 1   | DIGSESTEQAMEDIK     | 4                |
| 1   | ELSNSPLRENSFGSPLEFR | 3, 5             |
| 1   | GSRPPEIR            | 2                |
| 1   | IAASSFR             | 6                |
| 1   | IGSESTEDQAMEDIK     | 3                |
| 1   | ISASISASK           | 4                |
| 1   | ISASISASK           | 2, 6             |
| 1   | ISASISASR           | 2                |
| 1   | ISASISASR           | 2, 4             |



## Anhang

|   |                      |       |
|---|----------------------|-------|
| 1 | ISLSDPLAER           | 2     |
| 1 | ISLTDPLAER           | 2     |
| 1 | ISLTDPLVAER          | 2     |
| 1 | ISTDPLVAER           | 2     |
| 1 | KLSLPEIPSYGFLVPR     | 3     |
| 1 | LAETLGR              | 4     |
| 1 | LDSPTMSR             | 3     |
| 1 | LNQPGTPTR            | 6     |
| 1 | LSPSPTSQR            | 6     |
| 1 | LSPTMSR              | 2     |
| 1 | LTDTTFSPNTGK         | 7     |
| 1 | LTFDTTFSPNTGK        | 8     |
| 1 | LTFDTTSPNTGK         | 7     |
| 1 | LYGSVCDLR            | 4     |
| 1 | QPSPSHDGLSPLQDR      | 3, 11 |
| 1 | QSLELVNPGTVENLNK     | 2     |
| 1 | RGSPPEIR             | 3     |
| 1 | RGSPPEIRR            | 3     |
| 1 | RGSRPPEIR            | 3     |
| 1 | RSLVISPPVR           | 2     |
| 1 | SISSPNVNR            | 3     |
| 1 | SKPVMIVTEYMENGLDSFLR | 10    |
| 1 | SLTDPLVAER           | 1     |
| 1 | SLVISPPVR            | 1     |
| 1 | SQTLPIIR             | 3     |
| 1 | SQTLPIR              | 3     |
| 1 | SSSSSSK              | 2     |
| 1 | SSSSSSSR             | 1     |
| 1 | SSSSSSSR             | 6, 7  |
| 1 | TASLPGYGR            | 3     |
| 1 | TVDPHTYEDPTQAVHEFAK  | 7     |

## Anhang

|   |                      |      |
|---|----------------------|------|
| 1 | TYVDPHTEDPTQAVHEFAK  | 2    |
| 1 | TYVDPHTYEDPTAVHEFAK  | 2, 8 |
| 1 | TYVDPHTYEDPTQAVHEFAK | 2, 8 |
| 1 | TYVDPHTYEDPTQVHEFAK  | 2, 8 |
| 1 | TYVPHTYEDPTQAVHEFAK  | 2, 7 |
| 1 | VLSIGDGIAR           | 3    |
| 1 | VPQLEIVPNSAEER       | 10   |
| 1 | YGMGTSVER            | 6    |
| 2 | AAYFGIYDTAK          | 7    |
| 2 | ADEPSSEESDLEIDK      | 5    |
| 2 | ADPSSEESDLEIDK       | 4    |
| 2 | ALELKPDISK           | 9    |
| 2 | APSPVVEHPR           | 3    |
| 2 | ASGSSVTSLEGTR        | 2    |
| 2 | ASLGTGTASPR          | 5    |
| 2 | ASSPVTLR             | 4    |
| 2 | ATSLPSLDTPGELR       | 6    |
| 2 | DIGESTEDQAMEDIK      | 5    |
| 2 | DIGSESTEDQAMEDIK     | 4, 6 |
| 2 | EDVVHESGSLGDR        | 9    |
| 2 | ELITSLTPGVAK         | 7    |
| 2 | ELSPFSQEQTENK        | 3    |
| 2 | ELSPNFSEQTENK        | 3    |
| 2 | ELSPNFSQEQTENK       | 3    |
| 2 | EQAEASIDNLK          | 6    |
| 2 | FQESLSDDEK           | 6    |
| 2 | GFESLSDDEK           | 6    |
| 2 | GFQESLSDDEK          | 7    |
| 2 | GFQSLSDDEK           | 6    |
| 2 | GRSIDQDYER           | 3    |
| 2 | IGSESTEDQAMEDIK      | 3, 5 |

## Anhang

|   |                          |      |
|---|--------------------------|------|
| 2 | INFDSNSAYR               | 5    |
| 2 | ISASISASK                | 6    |
| 2 | ISASISASK                | 2, 8 |
| 2 | ISASISASR                | 4    |
| 2 | ISASISASR                | 2, 6 |
| 2 | KLSLPTDLKPDLDVK          | 3    |
| 2 | KRPSLPSSPSPGLPK          | 10   |
| 2 | LEEKESLQNK               | 6    |
| 2 | LEETESLQNK               | 6    |
| 2 | LEETKESLQNK              | 7    |
| 2 | LNQPGTPTR                | 8    |
| 2 | LSPNFSQEQTENK            | 2    |
| 2 | LSSGVSEIR                | 2    |
| 2 | LSSPVLHR                 | 2    |
| 2 | LTFDSSFSPNTGK            | 8    |
| 2 | NELITSLTPGVAK            | 8    |
| 2 | NLITSLTPGVAK             | 7    |
| 2 | NSASATTPLSGNSSR          | 14   |
| 2 | QLSSGVSEIR               | 3    |
| 2 | RDSVLAASR                | 3    |
| 2 | RLSLTLR                  | 3    |
| 2 | RPSALSQGR                | 3, 6 |
| 2 | RPSLPSSPSPGLPK           | 9    |
| 2 | RSIDQDYER                | 2    |
| 2 | RVSLSEIGFGK              | 3    |
| 2 | SAPTPLAEASQIPTIPALSPLTAK | 1    |
| 2 | SASEPSLHR                | 3    |
| 2 | SASLVTR                  | 3    |
| 2 | SLEGGGCPAR               | 1    |
| 2 | SMPTTPVLTR               | 1    |
| 2 | SNVDIPR                  | 1    |

## Anhang

|   |                         |       |
|---|-------------------------|-------|
| 2 | SPPVYSDISR              | 6     |
| 2 | STAPSNPPIYPVSSNGEPDFSNK | 2     |
| 2 | STLNPQWNESFTFK          | 10    |
| 2 | SVDEVNYWDK              | 1     |
| 2 | SVIDLPEDVVHESGLGDR      | 1, 15 |
| 2 | SVIDLRPEDVVHESGLGDR     | 1     |
| 2 | SVIDLRPEDVVHESGLGDR     | 1, 16 |
| 2 | SVIDLRPEDVVHESGLGR      | 1, 16 |
| 2 | TAPSNPPIYPVSSNGEPDFSNK  | 1     |
| 2 | TASGSSVTSLEGTR          | 3     |
| 2 | TASGSSVTSLGTR           | 3     |
| 2 | TASGSVTSLEGTR           | 3     |
| 2 | TGTAEMSSILEER           | 8     |
| 2 | TSGSSVTSLEGTR           | 2     |
| 2 | TTPPTQKPPSPMSGK         | 10    |
| 2 | TTSISPALAR              | 5     |
| 2 | TTVQTLR                 | 5     |
| 2 | VLSLQGR                 | 3     |
| 3 | ADEPSSEESDLEIDK         | 6, 9  |
| 3 | AGSGEGSDSAGGATLK        | 7, 9  |
| 3 | ANSKSEGSPVLPHEPAK       | 3, 5  |
| 3 | ASLALDSNPSTNEK          | 7     |
| 3 | ASLASLDSNPSTNEK         | 5, 8  |
| 3 | ASLGTGTASPR             | 7     |
| 3 | DGSLNQSSGYR             | 3     |
| 3 | DSSVPGSPSSIVAK          | 3, 9  |
| 3 | EAVAVAPPPSPSLPAK        | 12    |
| 3 | EGEPTVYSDEEHPKDESAR     | 9     |
| 3 | ETSSPGTDDVFTPAPSDSPSSQR | 18    |
| 3 | EYVNVSQELHPGAAK         | 2, 6  |
| 3 | FGDIDTATATPTELSTQPAK    | 12    |

## Anhang

|   |                          |      |
|---|--------------------------|------|
| 3 | FGDIDTTATPTELSTQPAK      | 11   |
| 3 | GDIDTATATPTELSTQPAK      | 11   |
| 3 | GGSTSYGTGSETESPR         | 3    |
| 3 | GSDPASGEVEASQLR          | 2    |
| 3 | GSGDTSSLIDPDTLSSELR      | 7    |
| 3 | GSYGSDAEEEEYR            | 5    |
| 3 | HPPVLTTPDQEVIR           | 6    |
| 3 | ISASISASK                | 8    |
| 3 | ISASISASK                | 4, 6 |
| 3 | ISASISASR                | 8    |
| 3 | ISASISASR                | 2, 8 |
| 3 | ISLTDPLVAER              | 4    |
| 3 | LEGNPQGSNQGK             | 5, 9 |
| 3 | NFSFMNPGMER              | 3    |
| 3 | QPLTSPGVSPPSR            | 4    |
| 3 | QPSPSHDGLSPLQDR          | 3, 9 |
| 3 | QSASTLQGEPR              | 2    |
| 3 | QSSPSGSEQLVR             | 3    |
| 3 | QTPPVSPAPQTEER           | 2    |
| 3 | QVAEQGGDLSPAANR          | 10   |
| 3 | RSGGDTSSLIDPDTLSSELR     | 8    |
| 3 | RPSALSQGR                | 3, 6 |
| 3 | RSWEDSPER                | 2    |
| 3 | RTESVPSDINNPVDR          | 4    |
| 3 | SAPTPLAEASQIPTIPALSPLTAK | 4    |
| 3 | SASADNLTLP               | 3    |
| 3 | SASTLQGEPR               | 1    |
| 3 | SGTSSPQSPVFR             | 8    |
| 3 | SLDSDESEDEDDYQK          | 4, 7 |
| 3 | SLSLQPQLTQR              | 1    |
| 3 | SQSLPTLLSPVR             | 3    |

## Anhang

|   |  |        |
|---|--|--------|
| 3 | SRSWEDSPER                             | 3      |
| 3 | SSSSSSSR                               | 3      |
| 3 | STAPSNPPIYPVSSNGEPDFSNK                | 14     |
| 3 | STSPPPPEVWADSR                         | 3      |
| 3 | STSPPPSPEVWADSR                        | 3      |
| 3 | SYGSDAEIEEEYR                          | 4      |
| 3 | TALPAQSAATLPAR                         | 10     |
| 3 | TAPAQSAATLPAR                          | 9      |
| 3 | TLSDPPSPLPHGPPNK                       | 3, 7   |
| 3 | TQTPPVSPAPQPTTEER                      | 1, 3   |
| 3 | VATTPGSPSLGR                           | 7      |
| 3 | VPGSSGHLHK                             | 4, 5   |
| 4 | ADEPSSEESDLEIDK                        | 9      |
| 4 | AGNSDSEEDDANGR                         | 4, 6   |
| 4 | ALSPGSVFSPGR                           | 3, 9   |
| 4 | ANSKSEGSPVLPHEPAK                      | 3, 8   |
| 4 | APSDSSGTPSDGRPELR                      | 3, 6   |
| 4 | APSDSSLGTPSDGRPELR                     | 3, 6   |
| 4 | ASSGDISPYDNNSPVLSEER                   | 3, 13  |
| 4 | DVFLSQYFFTGLRDVFLSQYFFTGLR             | 5, 18  |
| 4 | EAAVAPPPSPSLPAK                        | 9      |
| 4 | EATFTTNVENER                           | 3      |
| 4 | EATFTTNVENEREATFTTNVENER               | 3, 16  |
| 4 | EAVAVAPPPSPSLPAK                       | 10     |
| 4 | EAVAVAPPPSPSLPAK                       | 9      |
| 4 | ESSPIPSPTSDR                           | 2, 7   |
| 4 | FDLGSPKPGDETTQGDSEDEK                  | 18     |
| 4 | FGDIDTATATPELSTQPAK                    | 6      |
| 4 | FGDIDTATATPELSTQPAK                    | 6      |
| 4 | FGDIDTATATPELSTQPAKFGDIDTATATPELSTQPAK | 6, 26  |
| 4 | GCPPLGDEGDTDLYDYYPEEDTEGDK             | 14, 16 |

# Anhang

|   |                                    |       |
|---|------------------------------------|-------|
| 4 | GGTSYGTGSETESPR                    | 4     |
| 4 | GGTSYGTGSETESPR                    | 3     |
| 4 | GNAEGSDEEGKLVIDEPAK                | 6     |
| 4 | GNAEGSSDEEGKLVIDEPAK               | 6, 7  |
| 4 | GSTSYGTGSETESPR                    | 3     |
| 4 | HGSGADSDENTQSGDPLLGLEGK            | 3     |
| 4 | HGSGADSDYENTQSGDPLLGLEGK           | 3, 9  |
| 4 | HHNSTAELQK                         | 4     |
| 4 | IQQESGEEDSDLSPEER                  | 6     |
| 4 | IQQESSGEEDSDLSPEER                 | 6, 7  |
| 4 | ISASASR                            | 5     |
| 4 | ISASISASR                          | 4, 6  |
| 4 | MAGNEALSPTSPFR                     | 8, 11 |
| 4 | MANEALSPTSPFR                      | 7, 10 |
| 4 | MLAEDESGDEESVSQTDK                 | 7     |
| 4 | MLAESDESGDEESVSQTDK                | 5, 8  |
| 4 | NPTVENFIEATNLLEKNPTVENFIEATNLLEK   | 3, 19 |
| 4 | NSASATTPLSGNSSR                    | 10    |
| 4 | PVSVAGSPLSPGPVR                    | 7, 10 |
| 4 | QSEAFAGQNEDEADLK                   | 2     |
| 4 | QSLELVNPGTVENLNKQSLELVNPGTVENLNK   | 2, 18 |
| 4 | QTISNFFGFTSSFVRQTISNFFGFTSSFVR     | 2, 17 |
| 4 | RDSHGANSVASYENEGASGIR              | 3, 11 |
| 4 | RDSHGANSVSYENEGASGIR               | 3, 10 |
| 4 | RQSAFAGQNEDEADLK                   | 3     |
| 4 | RQSEAFAGQNEDEADLKRQSEAFAGQNEDEADLK | 3, 20 |
| 4 | RQSEAFAGQNEDEALK                   | 3     |
| 4 | RQSEAFAGQNEEADLK                   | 3     |
| 4 | RQSEAFAGQNEDEADLK                  | 3     |
| 4 | RSPTSSPTPQR                        | 2, 6  |
| 4 | RSSGELSSPLR                        | 3, 8  |

# Anhang

|   |  |        |
|---|--|--------|
| 4 | RSWEDSPER  | 6      |
| 4 | SAPTPLAEASQIPTIPALSPLTAKSAPTPLAEASQIPTIPALSPLTAK | 10, 34 |
| 4 | SEAFAGQNEDEADLK                                  | 1      |
| 4 | SEANLQSKSEDMTLNILPEFK                            | 7, 9   |
| 4 | SFDLGSPKPGDETPQGDSEK                             | 1, 19  |
| 4 | SGIVELIAGGGSSCSPVLSR                             | 15     |
| 4 | SGSIVELAGGGSSCSPVLSR                             | 3, 15  |
| 4 | SGSIVELIAGGGSSCSPVLSR                            | 3, 16  |
| 4 | SGSIVLIAGGGSSCSPVLSR                             | 3, 15  |
| 4 | SLPSSPER   | 1, 5   |
| 4 | SLSLQPQLTQR                                      | 3      |
| 4 | SLSPTSSPGAGTR                                    | 3, 7   |
| 4 | SPTSSPTPQR                                       | 5      |
| 4 | SRSWEDSPER                                       | 1, 7   |
| 4 | SSPIPSPTSDR                                      | 1, 6   |
| 4 | SSSSSSK  | 6      |
| 4 | SSSSSSR  | 4      |
| 4 | SSSVPHSPR  | 3, 7   |
| 4 | SSTGSPTSPLNAEK                                   | 7, 8   |
| 4 | STAPSNPPIYPVSSNGEPDFSNK                          | 1      |
| 4 | TDDVSEKSLADQEEVR                                 | 5, 9   |
| 4 | TDDVSKTSLADQEEVR                                 | 5, 8   |
| 4 | TFDLQSDANNILAQGEK                                | 1      |
| 4 | THILLFLPKSVSDYEGK                                | 10     |
| 4 | TISNFFGFTSSFVR                                   | 1      |
| 4 | TLFLGIPDENFEDHSAPPSPEEK                          | 15, 19 |
| 4 | TPLSFTNLHSDSDSDER                                | 10, 13 |
| 4 | TPLSFTNPLHSDSDSDER                               | 11, 14 |
| 4 | VELTEIKDDVVQLDEPQFSRVELTEIKDDVVQLDEPQFSR         | 4, 24  |
| 4 | VEMYSGDDDDDFNKLPK                                | 5, 7   |
| 4 | VLLRRASANEGLKVLLRRASANEGLGK                      | 7, 21  |



# Anhang

|   |   |            |
|---|---|------------|
| 4 | VTEFLSMELAKDPIPSDPSERVTEFLSMELAKDPIPSDPSERVTEFLSMELAKDPIPSDPSER | 16, 37, 58 |
| 4 | YHHSMSDPGVSYR   | 1, 11      |
| 5 | ALYDYK  | 3          |
| 5 | ASGDYIDSSWELR   | 5          |
| 5 | ATSTFTNITYR   | 10         |
| 5 | AVDGYVK   | 5          |
| 5 | AVDGYVKPQIK   | 5          |
| 5 | DIANYNK   | 5          |
| 5 | DINSLYDVSR  | 6          |
| 5 | EATSFTNITYR   | 10         |
| 5 | EATSTFTNITYR  | 11         |
| 5 | EDIYVNYPTFSR  | 4          |
| 5 | EDIYVNYPTFSR  | 4, 7       |
| 5 | EEPVNTVYSEVQFADK  | 8          |
| 5 | EFSVNEQLQLYQEK  | 12         |
| 5 | FLDILLTDYPK   | 10         |
| 5 | FLDILTLDYPK   | 9          |
| 5 | FLTCDEYK  | 7          |
| 5 | GDYGTR  | 3          |
| 5 | GEPNVSYICSR   | 7          |
| 5 | HDDEMTGYVATR  | 8          |
| 5 | HTDDEMTGYVATR   | 9          |
| 5 | HTDDETGYVATR  | 8          |
| 5 | HTDEMTGYVATR  | 8          |
| 5 | HYCAIADAK   | 2          |
| 5 | INVNEIFYDLVR  | 8          |
| 5 | IYDEILQSK   | 2          |
| 5 | IYDLNIPAFVK   | 2          |
| 5 | IYDLNPAFVK  | 2          |
| 5 | IYHLDAESDEDEDFK   | 2          |
| 5 | IYHLPAESDEDEDFK   | 2          |

## Anhang

|   |                      |   |
|---|----------------------|---|
| 5 | IYHLPDAESDEDEDFKEQTR | 2 |
| 5 | IYHLPDESEDEDEDFK     | 2 |
| 5 | KDTETVYSEVR          | 7 |
| 5 | LDILLTLDYPK          | 9 |
| 5 | LIEDNEYTAR           | 7 |
| 5 | LIYDFIEDQGGLEAVR     | 3 |
| 5 | LPSPVYEDAASFK        | 6 |
| 5 | LPSSPVYEDAASFK       | 7 |
| 5 | LPSSPYEDAASFK        | 6 |
| 5 | LPSSVYEDAASFK        | 6 |
| 5 | NQETYETLK            | 5 |
| 5 | SAEEAPLYSK           | 8 |
| 5 | SDGVYTGLSTR          | 5 |
| 5 | SFTSSYAISAANHVK      | 6 |
| 5 | SYIQEVVQYIK          | 9 |
| 5 | TAGDYIDSSWELR        | 5 |
| 5 | TASDYIDSSWELR        | 5 |
| 5 | TASGDYDSSWELR        | 6 |
| 5 | TASGDYIDSSWELR       | 6 |
| 5 | TASGYIDSSWELR        | 5 |
| 5 | TDDEMTGYVATR         | 8 |
| 5 | TSGDYIDSSWELR        | 5 |
| 5 | TTAVEIDYDSLK         | 8 |
| 5 | VIEDEYTAR            | 6 |
| 5 | VIEDNEYTAR           | 7 |
| 5 | VIEDNYTAR            | 6 |
| 5 | VPYVTR               | 3 |
| 5 | VVQEYIDAFSDYANFK     | 5 |
| 5 | YDLNIPAFVK           | 1 |
| 5 | YHGHSMDPGVSYR        | 1 |
| 5 | YHGHSMDPGVSYR        | 1 |

## Anhang

|   |                     |       |
|---|---------------------|-------|
| 5 | YHLPDAESDEDEDFK     | 1     |
| 5 | YHLPDAESDEDEDFKEQTR | 1     |
| 5 | YPQVRSMISQGK        | 1     |
| 5 | YPVTPELLER          | 1     |
| 5 | YVLDDQYTSSSGAK      | 1, 7  |
| 6 | AAARLSLTDPLVAER     | 8     |
| 6 | AFQYHSK             | 6     |
| 6 | AFSFLPRPGR          | 5     |
| 6 | AKPSVSFAEGTK        | 4     |
| 6 | AKRPSVSFAEGTK       | 5     |
| 6 | ARPSVSFAEGTK        | 4     |
| 6 | ASLTLEEK            | 2     |
| 6 | ASSPGYIDSPTYSR      | 3     |
| 6 | DNSPPPAFKPEPPK      | 3     |
| 6 | HFGSFQK             | 4     |
| 6 | HHNSTAELQK          | 5     |
| 6 | KCSQLLVSEDPK        | 3     |
| 6 | KCSTQLLVSEDPK       | 3     |
| 6 | KEEITGTLRK          | 5     |
| 6 | KGSFGLPGQGDFLR      | 3     |
| 6 | KPSLVASK            | 3     |
| 6 | KRPSVSFAEGTK        | 4     |
| 6 | KSSLVTSK            | 3     |
| 6 | LRSELDQLK           | 3     |
| 6 | LSLTDPLVAERAGTDESR  | 2     |
| 6 | LSLTDPLVERAGTDESR   | 2     |
| 6 | LSLTPLVAERAGTDESR   | 2     |
| 6 | RAPSVANVGSHCDLSLK   | 4, 10 |
| 6 | RASLSEIGFGK         | 3     |
| 6 | RASLTLEEK           | 3     |
| 6 | RASSPGYIDSPTYSR     | 4     |

## Anhang

|   |                  |      |
|---|------------------|------|
| 6 | RDSLDKSGLFPEWK   | 3    |
| 6 | RGSLSNAGDPEIVK   | 3    |
| 6 | RPSVSFAEGTK      | 3    |
| 6 | RPTATGDYDK       | 3    |
| 6 | RRVSVAVVVK       | 4    |
| 6 | RSDIDVNAAASAK    | 2    |
| 6 | RTSFSFQK         | 3    |
| 6 | RVSVAVVVK        | 3    |
| 6 | SEGSVLPHEPAK     | 4    |
| 6 | SESPVLPHEPAK     | 3    |
| 6 | SIPLSIK          | 1    |
| 6 | SLSVLSPR         | 3    |
| 6 | SMSLTLGK         | 3    |
| 6 | SRSDIDVNAAASAK   | 3    |
| 6 | SRSLTPQLNNNVPMQK | 1    |
| 6 | SSLPAYGR         | 1    |
| 6 | SSSLPAYGR        | 1    |
| 6 | SSTGSPTSLNAEK    | 5, 8 |
| 6 | SSTSPTSLNAEK     | 4, 7 |
| 6 | STGSPTSLNAEK     | 4, 7 |
| 6 | STQLLVSEDPK      | 1    |
| 7 | AEDEILNRSRPR     | 10   |
| 7 | AEDEILNSRPR      | 9    |
| 7 | AFSFLPRPGR       | 3    |
| 7 | AHGSFSHVR        | 4    |
| 7 | ANSIQLR          | 3    |
| 7 | ANSMEGLMPR       | 3    |
| 7 | ARSPSPCFR        | 3    |
| 7 | ASPSPCFR         | 2    |
| 7 | AVKASTEATELLQNIR | 9    |
| 7 | EGVHTPR          | 5    |

## Anhang

|   |                    |    |
|---|--------------------|----|
| 7 | ETPICMLPIETER      | 11 |
| 7 | GIITDSFGR          | 6  |
| 7 | GSGENNNPGSPTVSNFR  | 10 |
| 7 | GSSGENNNPGSPTVSNFR | 11 |
| 7 | GSSGENNNPSPTVSNFR  | 10 |
| 7 | GSSGENNPGSPTVSNFR  | 10 |
| 7 | IYQYIQR            | 4  |
| 7 | KDSSSVVEWTQAPK     | 4  |
| 7 | KGSVSHDTVQPR       | 3  |
| 7 | KGSVVNVNPTNTR      | 3  |
| 7 | KVSKQEEASGGPTAPK   | 3  |
| 7 | LESYRPDTDLR        | 3  |
| 7 | LGSVSLIPLR         | 3  |
| 7 | LSLQGHPTDLQTSNVK   | 2  |
| 7 | LSLTDPLVAERAGTDESR | 4  |
| 7 | MAPTPIPTR          | 4  |
| 7 | QASLEQANSFPR       | 3  |
| 7 | QPLLLSEDEEDTKR     | 6  |
| 7 | RGSLCATCGLPVTGR    | 3  |
| 7 | RHTDPVQLQAAGR      | 3  |
| 7 | SLSVLSPR           | 1  |
| 7 | SPSPCPFR           | 1  |
| 7 | SRSLTPQLNNNVPMQK   | 3  |
| 7 | SSSDPPAVHPPLPLR    | 3  |
| 7 | SSSLPAYGR          | 2  |
| 7 | SSYTHGLNR          | 2  |
| 7 | SVDIHDSIQPR        | 1  |
| 7 | SWSPPEVSR          | 3  |
| 7 | TDPVQLQAAGR        | 1  |
| 7 | TNPPTQKPPSPMSGR    | 10 |
| 7 | TSLEVSPNPEPPEKVR   | 2  |

## Anhang

|   |                      |         |
|---|----------------------|---------|
| 7 | VEGVHTPR             | 6       |
| 7 | VEPSSQSPGRSPR        | 11      |
| 7 | VSVTPPEESQNSDTPRPDR  | 4       |
| 7 | VSVTPPEESQNSDTPRPDR  | 4       |
| 7 | YNTEGRVSPSPSQESLSSK  | 8       |
| 8 | AAARLSLSDPLVAER      | 8       |
| 8 | AAARLSLYDPLVAER      | 8       |
| 8 | AAARLTLTDPLVAER      | 6       |
| 8 | AARLSLYDPLVAER       | 7       |
| 8 | ANSKSEGSPLPHEPAK     | 3, 8    |
| 8 | APPDNLSPGGSR         | 12      |
| 8 | ASSPGYIDSPTYSR       | 2       |
| 8 | DWEDDSDEDMSNFDR      | 6       |
| 8 | DWEDDSDEMSNFDR       | 6       |
| 8 | DYVPML               | 2       |
| 8 | EEPSIYESVR           | 6       |
| 8 | ENIMRSENSESQLTSK     | 6       |
| 8 | GSLASPAFSPR          | 5, 9    |
| 8 | ISLDPLVAER           | 2       |
| 8 | ISLTDPLVAER          | 2       |
| 8 | ISLTDPLVAR           | 2       |
| 8 | ISLTPLVAER           | 2       |
| 8 | IYHLPDAESDEDEDFKEQTR | 2, 9    |
| 8 | KDSSSVVEWTQAPK       | 5       |
| 8 | KFLSLASNPELLNLPSSVIK | 4, 17   |
| 8 | KSSTGSPSPLNAEK       | 2, 8    |
| 8 | KSSTGSPTSPLNAEK      | 2, 8, 9 |
| 8 | LIEDNEYTAR           | 7       |
| 8 | LSLSDPLVAERAGTDESR   | 4       |
| 8 | LSLTDPLVAERAGTDESR   | 14      |
| 8 | LSLYDPLVAERAGTDESR   | 4       |

## Anhang

|   |                     |         |
|---|---------------------|---------|
| 8 | LSVLSPR             | 2       |
| 8 | LTLTDPLVAERAGTDESR  | 2       |
| 8 | LYLTDPLVAERAGTDESR  | 2       |
| 8 | NSVEQGRRL           | 2       |
| 8 | PQEFSSVERGR         | 6       |
| 8 | QLGEPEKSQDSSPVLSELK | 8       |
| 8 | QQRGYPPEISNLR       | 6       |
| 8 | RASSPGYIDSPTYSR     | 3       |
| 8 | RGSLSNAGDPEIVK      | 5       |
| 8 | RISQVSSGETEYNPTTEAR | 3       |
| 8 | SAGSRLTSLGR         | 4, 7, 9 |
| 8 | SLDTITLSGDER        | 1, 6, 8 |
| 8 | SLSVLPR             | 1, 3    |
| 8 | SLSVLSPR            | 1, 3    |
| 8 | SSSLPAYGR           | 3       |
| 8 | SVENLPEAGITHEQR     | 11      |
| 8 | SVSDYEGK            | 3       |
| 8 | TQTPPVSPAPQPTTEER   | 1, 3, 7 |
| 8 | TTSISPALAR          | 2, 5    |
| 8 | TYEWSEEEEPVKK       | 5       |
| 8 | VEEPIYESVR          | 6       |
| 8 | VEEPSIYESVR         | 7       |
| 8 | VEPSIYESVR          | 6       |
| 8 | YSHSYLSDSDTEAK      | 7, 9    |

## A5:Identifizierte mitochondriale Phosphorylierungstellen

Mit P1 und P2: Phosphorylierungsstellen im Protein; P1/P2 schwarz: sichere Phosphorylierungsstellen (phosphoRS  $\geq$  75), P1/P2 rot: unsichere Phosphorylierungsstellen (phosphoRS < 75)

| Protein Accession | Name  | P1    | P2 |
|-------------------|-------|-------|----|
| YMR072W           | ABF2  | S132  |    |
| YNR016C           | ACC1  | S1157 |    |
| YBL015W           | ACH1  | S76   |    |
| YBL015W           | ACH1  | T241  |    |
| YDR511W           | ACN9  | S90   |    |
| YLR304C           | ACO1  | S20   |    |
| YLR304C           | ACO1  | S37   |    |
| YLR304C           | ACO1  | S549  |    |
| YLR304C           | ACO1  | S556  |    |
| YKL192C           | ACP1  | S120  |    |
| YKL192C           | ACP1  | S60   |    |
| YCR010C           | ADY2  | T47   |    |
| YFL030W           | AGX1  | S4    |    |
| YFR011C           | AIM13 | S138  |    |
| YJR080C           | AIM24 | T394  |    |
| YPR004C           | AIM45 | S223  |    |
| YPR004C           | AIM45 | S78   |    |
| YOR374W           | ALD4  | S154  |    |
| YOR374W           | ALD4  | S219  |    |
| YOR374W           | ALD4  | S269  |    |
| YOR374W           | ALD4  | S279  |    |
| YOR374W           | ALD4  | S368  |    |
| YOR374W           | ALD4  | S445  |    |
| YOR374W           | ALD4  | S500  |    |



|                  |        |      |     |
|------------------|--------|------|-----|
| <b>YOR374W</b>   | ALD4   | S68  |     |
| <b>YOR374W</b>   | ALD4   | T388 |     |
| <b>YML086C</b>   | ALO1   | S339 |     |
| <b>YKL157W</b>   | APE2   | S596 |     |
| <b>YER069W</b>   | ARG5,6 | S359 |     |
| <b>YNR002C</b>   | ATO2   | S2   |     |
| <b>YNR002C</b>   | ATO2   | S21  |     |
| <b>YNR002C</b>   | ATO2   | S22  |     |
| <b>YNR002C</b>   | ATO2   | T11  |     |
| <b>YDR384C</b>   | ATO3   | S29  |     |
| <b>YDR384C</b>   | ATO3   | S7   |     |
| <b>YDR384C</b>   | ATO3   | T2   |     |
| <b>YBL099W</b>   | ATP1   | S115 |     |
| <b>YBL099W</b>   | ATP1   | S178 |     |
| <b>YBL099W</b>   | ATP1   | S178 | S22 |
| <b>YBL099W</b>   | ATP1   | S445 |     |
| <b>YBL099W</b>   | ATP1   | S57  |     |
| <b>YBL099W</b>   | ATP1   | T128 |     |
| <b>YBL099W</b>   | ATP1   | T65  |     |
| <b>YNL315C</b>   | ATP11  | S109 |     |
| <b>YLR295C</b>   | ATP14  | T92  |     |
| <b>YPL271W</b>   | ATP15  | S34  |     |
| <b>YPL271W</b>   | ATP15  | T52  |     |
| <b>YDL004W</b>   | ATP16  | S157 |     |
| <b>YDL004W</b>   | ATP16  | S47  |     |
| <b>YML081C-A</b> | ATP18  | T37  |     |
| <b>YJR121W</b>   | ATP2   | S117 |     |
| <b>YJR121W</b>   | ATP2   | S161 |     |
| <b>YJR121W</b>   | ATP2   | S246 |     |
| <b>YJR121W</b>   | ATP2   | S299 |     |

|                |       |      |  |
|----------------|-------|------|--|
| <b>YPR020W</b> | ATP20 | S14  |  |
| <b>YBR039W</b> | ATP3  | S119 |  |
| <b>YBR039W</b> | ATP3  | S224 |  |
| <b>YBR039W</b> | ATP3  | S226 |  |
| <b>YBR039W</b> | ATP3  | S308 |  |
| <b>YBR039W</b> | ATP3  | S65  |  |
| <b>YBR039W</b> | ATP3  | T100 |  |
| <b>YPL078C</b> | ATP4  | S124 |  |
| <b>YPL078C</b> | ATP4  | S144 |  |
| <b>YPL078C</b> | ATP4  | S217 |  |
| <b>YPL078C</b> | ATP4  | S234 |  |
| <b>YPL078C</b> | ATP4  | S52  |  |
| <b>YDR298C</b> | ATP5  | S49  |  |
| <b>YDR298C</b> | ATP5  | S62  |  |
| <b>YKL016C</b> | ATP7  | S120 |  |
| <b>YKL016C</b> | ATP7  | S25  |  |
| <b>YKL016C</b> | ATP7  | S32  |  |
| <b>YKL016C</b> | ATP7  | S67  |  |
| <b>YKR036C</b> | CAF4  | S136 |  |
| <b>YPL215W</b> | CBP3  | S44  |  |
| <b>YKR066C</b> | CCP1  | S82  |  |
| <b>YNR001C</b> | CIT1  | S157 |  |
| <b>YNR001C</b> | CIT1  | S240 |  |
| <b>YNR001C</b> | CIT1  | T239 |  |
| <b>YBL045C</b> | COR1  | S123 |  |
| <b>YBL045C</b> | COR1  | S134 |  |
| <b>YBL045C</b> | COR1  | S135 |  |
| <b>YBL045C</b> | COR1  | S225 |  |
| <b>YBL045C</b> | COR1  | S247 |  |
| <b>YBL045C</b> | COR1  | S83  |  |

|                |              |              |  |
|----------------|--------------|--------------|--|
| <b>YBL045C</b> | <b>COR1</b>  | <b>S94</b>   |  |
| <b>YBL045C</b> | <b>COR1</b>  | <b>T234</b>  |  |
| <b>YLR038C</b> | <b>COX12</b> | <b>S7</b>    |  |
| <b>YLR038C</b> | <b>COX12</b> | <b>S82</b>   |  |
| <b>YML129C</b> | <b>COX14</b> | <b>T69</b>   |  |
| <b>YER141W</b> | <b>COX15</b> | <b>S466</b>  |  |
| <b>YLL009C</b> | <b>COX17</b> | <b>S44</b>   |  |
| <b>YDR231C</b> | <b>COX20</b> | <b>S142</b>  |  |
| <b>YDR231C</b> | <b>COX20</b> | <b>S193</b>  |  |
| <b>YDR231C</b> | <b>COX20</b> | <b>S52</b>   |  |
| <b>YGL187C</b> | <b>COX4</b>  | <b>S89</b>   |  |
| <b>YGL187C</b> | <b>COX4</b>  | <b>T58</b>   |  |
| <b>YHR051W</b> | <b>COX6</b>  | <b>S41</b>   |  |
| <b>YDR155C</b> | <b>CPR1</b>  | <b>S145</b>  |  |
| <b>YLR087C</b> | <b>CSF1</b>  | <b>S1183</b> |  |
| <b>YMR264W</b> | <b>CUE1</b>  | <b>S194</b>  |  |
| <b>YML054C</b> | <b>CYB2</b>  | <b>S365</b>  |  |
| <b>YJR048W</b> | <b>CYC1</b>  | <b>S53</b>   |  |
| <b>YAL039C</b> | <b>CYC3</b>  | <b>S260</b>  |  |
| <b>YDR430C</b> | <b>CYM1</b>  | <b>S920</b>  |  |
| <b>YDR470C</b> | <b>CYM1</b>  | <b>S56</b>   |  |
| <b>YKL087C</b> | <b>CYT2</b>  | <b>S111</b>  |  |
| <b>YDL178W</b> | <b>DLD2</b>  | <b>S504</b>  |  |
| <b>YER166W</b> | <b>DNF1</b>  | <b>S53</b>   |  |
| <b>YER166W</b> | <b>DNF1</b>  | <b>S92</b>   |  |
| <b>YBR078W</b> | <b>ECM33</b> | <b>S261</b>  |  |
| <b>YMR212C</b> | <b>EFR3</b>  | <b>S564</b>  |  |
| <b>YMR212C</b> | <b>EFR3</b>  | <b>S611</b>  |  |
| <b>YMR212C</b> | <b>EFR3</b>  | <b>S625</b>  |  |
| <b>YMR212C</b> | <b>EFR3</b>  | <b>S632</b>  |  |

|                |              |             |             |
|----------------|--------------|-------------|-------------|
| <b>YMR212C</b> | <b>EFR3</b>  | <b>S771</b> |             |
| <b>YMR212C</b> | <b>EFR3</b>  | <b>T687</b> |             |
| <b>YDR036C</b> | <b>EHD3</b>  | <b>S330</b> |             |
| <b>YBR177C</b> | <b>EHT1</b>  | <b>S332</b> |             |
| <b>YML008C</b> | <b>ERG6</b>  | <b>T373</b> |             |
| <b>YML008C</b> | <b>ERG6</b>  | <b>T377</b> |             |
| <b>YBR026C</b> | <b>ETR1</b>  | <b>S233</b> |             |
| <b>YBR026C</b> | <b>ETR1</b>  | <b>S266</b> |             |
| <b>YOR317W</b> | <b>FAA1</b>  | <b>S698</b> |             |
| <b>YKR016W</b> | <b>FCJ1</b>  | <b>S108</b> |             |
| <b>YKR016W</b> | <b>FCJ1</b>  | <b>S481</b> |             |
| <b>YGL139W</b> | <b>FLC3</b>  | <b>S687</b> |             |
| <b>YGL139W</b> | <b>FLC3</b>  | <b>S779</b> |             |
| <b>YBR269C</b> | <b>FMP21</b> | <b>S95</b>  |             |
| <b>YPL262W</b> | <b>FUM1</b>  | <b>S108</b> |             |
| <b>YPL262W</b> | <b>FUM1</b>  | <b>S53</b>  |             |
| <b>YPL262W</b> | <b>FUM1</b>  | <b>S87</b>  |             |
| <b>YPL262W</b> | <b>FUM1</b>  | <b>T122</b> |             |
| <b>YAL008W</b> | <b>FUN14</b> | <b>S89</b>  |             |
| <b>YAL044C</b> | <b>GCV3</b>  | <b>S39</b>  |             |
| <b>YDL215C</b> | <b>GDH2</b>  | <b>S482</b> |             |
| <b>YDL207W</b> | <b>GLE1</b>  | <b>S108</b> |             |
| <b>YDR508C</b> | <b>GNP1</b>  | <b>S113</b> |             |
| <b>YDR508C</b> | <b>GNP1</b>  | <b>S124</b> |             |
| <b>YER020W</b> | <b>GPA2</b>  | <b>S117</b> |             |
| <b>YER020W</b> | <b>GPA2</b>  | <b>T16</b>  |             |
| <b>YOL059W</b> | <b>GPD2</b>  | <b>S72</b>  | <b>T690</b> |
| <b>YDR513W</b> | <b>GRX2</b>  | <b>S69</b>  |             |
| <b>YIL155C</b> | <b>GUT2</b>  | <b>S220</b> |             |
| <b>YIL155C</b> | <b>GUT2</b>  | <b>S304</b> |             |

|                |              |              |             |
|----------------|--------------|--------------|-------------|
| <b>YIL155C</b> | <b>GUT2</b>  | <b>S304</b>  | <b>S378</b> |
| <b>YIL155C</b> | <b>GUT2</b>  | <b>S310</b>  |             |
| <b>YIL155C</b> | <b>GUT2</b>  | <b>S314</b>  |             |
| <b>YMR192W</b> | <b>GYL1</b>  | <b>S37</b>   |             |
| <b>YOR227W</b> | <b>HER1</b>  | <b>S157</b>  |             |
| <b>YOR227W</b> | <b>HER1</b>  | <b>S277</b>  |             |
| <b>YOR227W</b> | <b>HER1</b>  | <b>T1130</b> |             |
| <b>YMR110C</b> | <b>HFD1</b>  | <b>S111</b>  |             |
| <b>YMR110C</b> | <b>HFD1</b>  | <b>S406</b>  |             |
| <b>YOR020C</b> | <b>HSP10</b> | <b>T82</b>   |             |
| <b>YLR259C</b> | <b>HSP60</b> | <b>S100</b>  |             |
| <b>YLR259C</b> | <b>HSP60</b> | <b>S250</b>  |             |
| <b>YLR259C</b> | <b>HSP60</b> | <b>S407</b>  |             |
| <b>YLR259C</b> | <b>HSP60</b> | <b>S485</b>  |             |
| <b>YLR259C</b> | <b>HSP60</b> | <b>T111</b>  |             |
| <b>YLR259C</b> | <b>HSP60</b> | <b>T379</b>  |             |
| <b>YFL011W</b> | <b>HXT10</b> | <b>S545</b>  |             |
| <b>YPR006C</b> | <b>ICL2</b>  | <b>S88</b>   |             |
| <b>YER078C</b> | <b>ICP55</b> | <b>S219</b>  |             |
| <b>YNL037C</b> | <b>IDH1</b>  | <b>S345</b>  |             |
| <b>YOR136W</b> | <b>IDH2</b>  | <b>S113</b>  |             |
| <b>YOR136W</b> | <b>IDH2</b>  | <b>S298</b>  |             |
| <b>YOR136W</b> | <b>IDH2</b>  | <b>T105</b>  |             |
| <b>YOR136W</b> | <b>IDH2</b>  | <b>T153</b>  |             |
| <b>YDL066W</b> | <b>IDP1</b>  | <b>S69</b>   |             |
| <b>YDL066W</b> | <b>IDP1</b>  | <b>T93</b>   |             |
| <b>YER086W</b> | <b>ILV1</b>  | <b>S333</b>  |             |
| <b>YMR108W</b> | <b>ILV2</b>  | <b>S270</b>  |             |
| <b>YMR108W</b> | <b>ILV2</b>  | <b>S288</b>  |             |
| <b>YMR108W</b> | <b>ILV2</b>  | <b>S386</b>  |             |

|                |       |      |  |
|----------------|-------|------|--|
| <b>YJR016C</b> | ILV3  | S336 |  |
| <b>YLR355C</b> | ILV5  | S355 |  |
| <b>YLR355C</b> | ILV5  | T79  |  |
| <b>YCL009C</b> | ILV6  | T281 |  |
| <b>YJL082W</b> | IML2  | S268 |  |
| <b>YPL135W</b> | ISU1  | S82  |  |
| <b>YKL217W</b> | JEN1  | S584 |  |
| <b>YKL217W</b> | JEN1  | S603 |  |
| <b>YKL217W</b> | JEN1  | S66  |  |
| <b>YIL125W</b> | KGD1  | S151 |  |
| <b>YIL125W</b> | KGD1  | S322 |  |
| <b>YIL125W</b> | KGD1  | S331 |  |
| <b>YIL125W</b> | KGD1  | S369 |  |
| <b>YIL125W</b> | KGD1  | S530 |  |
| <b>YIL125W</b> | KGD1  | S988 |  |
| <b>YIL125W</b> | KGD1  | S997 |  |
| <b>YIL125W</b> | KGD1  | T453 |  |
| <b>YIL125W</b> | KGD1  | T677 |  |
| <b>YDR148C</b> | KGD2  | S225 |  |
| <b>YDR148C</b> | KGD2  | S348 |  |
| <b>YNL071W</b> | LAT1  | S129 |  |
| <b>YNL071W</b> | LAT1  | S368 |  |
| <b>YCL005W</b> | LDB16 | S241 |  |
| <b>YNL104C</b> | LEU4  | S107 |  |
| <b>YFL018C</b> | LPD1  | T422 |  |
| <b>YOR142W</b> | LSC1  | S285 |  |
| <b>YOR142W</b> | LSC1  | S313 |  |
| <b>YGR244C</b> | LSC2  | S102 |  |
| <b>YGR244C</b> | LSC2  | S185 |  |
| <b>YGR244C</b> | LSC2  | S203 |  |

|                  |       |      |      |
|------------------|-------|------|------|
| <b>YGR244C</b>   | LSC2  | S263 |      |
| <b>YGR244C</b>   | LSC2  | S276 |      |
| <b>YGR244C</b>   | LSC2  | S404 |      |
| <b>YGR244C</b>   | LSC2  | T425 |      |
| <b>YPL004C</b>   | LSP1  | S138 |      |
| <b>YPL004C</b>   | LSP1  | S188 |      |
| <b>YPL004C</b>   | LSP1  | S59  |      |
| <b>YPL004C</b>   | LSP1  | T14  |      |
| <b>YPL004C</b>   | LSP1  | T233 |      |
| <b>YIL094C</b>   | LYS12 | S211 |      |
| <b>YIL094C</b>   | LYS12 | S23  |      |
| <b>YIL094C</b>   | LYS12 | S23  | S606 |
| <b>YIL094C</b>   | LYS12 | S369 |      |
| <b>YIL094C</b>   | LYS12 | S51  |      |
| <b>YIL094C</b>   | LYS12 | S98  |      |
| <b>YIL094C</b>   | LYS12 | T351 |      |
| <b>YKL029C</b>   | MAE1  | S663 | T593 |
| <b>YIL070C</b>   | MAM33 | S76  |      |
| <b>YLR163C</b>   | MAS1  | S237 |      |
| <b>YHR024C</b>   | MAS2  | S471 |      |
| <b>YOR298C-A</b> | MBF1  | S143 |      |
| <b>YKL150W</b>   | MCR1  | S37  |      |
| <b>YKL085W</b>   | MDH1  | S114 |      |
| <b>YKL085W</b>   | MDH1  | S196 |      |
| <b>YKL085W</b>   | MDH1  | S240 |      |
| <b>YKL085W</b>   | MDH1  | S258 |      |
| <b>YKL085W</b>   | MDH1  | S333 |      |
| <b>YKL085W</b>   | MDH1  | T185 |      |
| <b>YKL085W</b>   | MDH1  | T66  |      |
| <b>YPL270W</b>   | MDL2  | S694 |      |

|                |        |      |  |
|----------------|--------|------|--|
| <b>YPL270W</b> | MDL2   | S84  |  |
| <b>YGL219C</b> | MDM34  | S29  |  |
| <b>YJL112W</b> | MDV1   | S340 |  |
| <b>YJL112W</b> | MDV1   | S376 |  |
| <b>YJL112W</b> | MDV1   | S72  |  |
| <b>YOR232W</b> | MGE1   | S53  |  |
| <b>YOR232W</b> | MGE1   | S72  |  |
| <b>YJR144W</b> | MGM101 | S91  |  |
| <b>YCL044C</b> | MGR1   | S398 |  |
| <b>YDR296W</b> | MHR1   | S225 |  |
| <b>YKL195W</b> | MIA40  | S133 |  |
| <b>YKL195W</b> | MIA40  | S256 |  |
| <b>YKL195W</b> | MIA40  | S372 |  |
| <b>YKL195W</b> | MIA40  | S378 |  |
| <b>YJR077C</b> | MIR1   | S34  |  |
| <b>YJR077C</b> | MIR1   | T303 |  |
| <b>YBR084W</b> | MIS1   | S124 |  |
| <b>YIL051C</b> | MMF1   | S108 |  |
| <b>YIL051C</b> | MMF1   | S86  |  |
| <b>YIL051C</b> | MMF1   | T55  |  |
| <b>YLR190W</b> | MMR1   | S154 |  |
| <b>YLR190W</b> | MMR1   | S170 |  |
| <b>YLR190W</b> | MMR1   | S37  |  |
| <b>YDR033W</b> | MRH1   | S289 |  |
| <b>YDR033W</b> | MRH1   | T295 |  |
| <b>YDR347W</b> | MRP1   | S127 |  |
| <b>YDR347W</b> | MRP1   | T119 |  |
| <b>YDR376W</b> | MRP1   | S84  |  |
| <b>YDR377W</b> | MRP1   | S39  |  |
| <b>YHL004W</b> | MRP4   | S83  |  |



|                |               |              |  |
|----------------|---------------|--------------|--|
| <b>YPL118W</b> | <b>MRP51</b>  | <b>S327</b>  |  |
| <b>YNL005C</b> | <b>MRP7</b>   | <b>S334</b>  |  |
| <b>YDR116C</b> | <b>MRPL1</b>  | <b>S94</b>   |  |
| <b>YNL177C</b> | <b>MRPL22</b> | <b>S74</b>   |  |
| <b>YMR024W</b> | <b>MRPL3</b>  | <b>S90</b>   |  |
| <b>YMR286W</b> | <b>MRPL33</b> | <b>S66</b>   |  |
| <b>YPL173W</b> | <b>MRPL40</b> | <b>S155</b>  |  |
| <b>YJL096W</b> | <b>MRPL49</b> | <b>S146</b>  |  |
| <b>YPR100W</b> | <b>MRPL51</b> | <b>S124</b>  |  |
| <b>YJL063C</b> | <b>MRPL8</b>  | <b>S220</b>  |  |
| <b>YJL063C</b> | <b>MRPL8</b>  | <b>S63</b>   |  |
| <b>YGR165W</b> | <b>MRPS35</b> | <b>S97</b>   |  |
| <b>YBR251W</b> | <b>MRPS5</b>  | <b>S122</b>  |  |
| <b>YGR028W</b> | <b>MSP1</b>   | <b>S333</b>  |  |
| <b>YDR194C</b> | <b>MSS116</b> | <b>S616</b>  |  |
| <b>YLR203C</b> | <b>MSS51</b>  | <b>S51</b>   |  |
| <b>YKL194C</b> | <b>MST1</b>   | <b>S166</b>  |  |
| <b>YNL137C</b> | <b>NAM9</b>   | <b>S230</b>  |  |
| <b>YPR155C</b> | <b>NCA2</b>   | <b>S29</b>   |  |
| <b>YPR149W</b> | <b>NCE102</b> | <b>S171</b>  |  |
| <b>YPR149W</b> | <b>NCE102</b> | <b>T162</b>  |  |
| <b>YMR145C</b> | <b>NDE1</b>   | <b>S265</b>  |  |
| <b>YMR145C</b> | <b>NDE1</b>   | <b>S484</b>  |  |
| <b>YML120C</b> | <b>NDI1</b>   | <b>S287</b>  |  |
| <b>YML120C</b> | <b>NDI1</b>   | <b>S33</b>   |  |
| <b>YML120C</b> | <b>NDI1</b>   | <b>S86</b>   |  |
| <b>YPL226W</b> | <b>NEW1</b>   | <b>T1191</b> |  |
| <b>YJL208C</b> | <b>NUC1</b>   | <b>S316</b>  |  |
| <b>YDR150W</b> | <b>NUM1</b>   | <b>S2162</b> |  |
| <b>YDR150W</b> | <b>NUM1</b>   | <b>S2743</b> |  |

|                |        |      |      |
|----------------|--------|------|------|
| <b>YIL136W</b> | OM45   | S186 |      |
| <b>YIL136W</b> | OM45   | S78  |      |
| <b>YIL136W</b> | OM45   | S94  |      |
| <b>YIL136W</b> | OM45   | T207 |      |
| <b>YKR065C</b> | PAM17  | S160 |      |
| <b>YGR178C</b> | PBP1   | S106 |      |
| <b>YGR178C</b> | PBP1   | S284 |      |
| <b>YGR178C</b> | PBP1   | S442 |      |
| <b>YGR178C</b> | PBP1   | S479 |      |
| <b>YGR178C</b> | PBP1   | T267 |      |
| <b>YER178W</b> | PDA1   | S313 |      |
| <b>YER178W</b> | PDA1   | S332 |      |
| <b>YER178W</b> | PDA1   | Y309 |      |
| <b>YER178W</b> | PDA1   | Y321 |      |
| <b>YPR002W</b> | PDH1   | S277 |      |
| <b>YPR002W</b> | PDH1   | S297 |      |
| <b>YPR002W</b> | PDH1   | S412 |      |
| <b>YOR158W</b> | PET123 | S169 | T295 |
| <b>YOR158W</b> | PET123 | S185 |      |
| <b>YGL023C</b> | PIB2   | S381 |      |
| <b>YGR086C</b> | PIL1   | S138 |      |
| <b>YGR086C</b> | PIL1   | S45  |      |
| <b>YGR086C</b> | PIL1   | T14  |      |
| <b>YGR086C</b> | PIL1   | T233 |      |
| <b>YBL022C</b> | PIM1   | S902 |      |
| <b>YGL059W</b> | PKP2   | S21  |      |
| <b>YGL008C</b> | PMA1   | S464 |      |
| <b>YGL008C</b> | PMA1   | S899 |      |
| <b>YOR266W</b> | PNT1   | S62  |      |
| <b>YMR129W</b> | POM152 | S45  |      |

|                  |              |             |  |
|------------------|--------------|-------------|--|
| <b>YNL055C</b>   | <b>POR1</b>  | <b>S101</b> |  |
| <b>YNL055C</b>   | <b>POR1</b>  | <b>S215</b> |  |
| <b>YNL055C</b>   | <b>POR1</b>  | <b>S55</b>  |  |
| <b>YNL055C</b>   | <b>POR1</b>  | <b>S7</b>   |  |
| <b>YNL055C</b>   | <b>POR1</b>  | <b>S76</b>  |  |
| <b>YNL055C</b>   | <b>POR1</b>  | <b>T103</b> |  |
| <b>YNL055C</b>   | <b>POR1</b>  | <b>T117</b> |  |
| <b>YNL055C</b>   | <b>POR1</b>  | <b>T72</b>  |  |
| <b>YNL055C</b>   | <b>POR1</b>  | <b>T91</b>  |  |
| <b>YBL064C</b>   | <b>PRX1</b>  | <b>S53</b>  |  |
| <b>YNL169C</b>   | <b>PSD1</b>  | <b>S251</b> |  |
| <b>YDR032C</b>   | <b>PST2</b>  | <b>S175</b> |  |
| <b>YBL057C</b>   | <b>PTH2</b>  | <b>S184</b> |  |
| <b>YPR191W</b>   | <b>QCR2</b>  | <b>S168</b> |  |
| <b>YPR191W</b>   | <b>QCR2</b>  | <b>S217</b> |  |
| <b>YPR191W</b>   | <b>QCR2</b>  | <b>S299</b> |  |
| <b>YPR191W</b>   | <b>QCR2</b>  | <b>S315</b> |  |
| <b>YPR191W</b>   | <b>QCR2</b>  | <b>S331</b> |  |
| <b>YPR191W</b>   | <b>QCR2</b>  | <b>T26</b>  |  |
| <b>YPR191W</b>   | <b>QCR2</b>  | <b>T61</b>  |  |
| <b>YDR529C</b>   | <b>QCR7</b>  | <b>S126</b> |  |
| <b>YDR529C</b>   | <b>QCR7</b>  | <b>S4</b>   |  |
| <b>YCR028C-A</b> | <b>RIM1</b>  | <b>T104</b> |  |
| <b>YCR028C-A</b> | <b>RIM1</b>  | <b>T36</b>  |  |
| <b>YHR038W</b>   | <b>RRF1</b>  | <b>S34</b>  |  |
| <b>YJR101W</b>   | <b>RSM26</b> | <b>S182</b> |  |
| <b>YJR113C</b>   | <b>RSM7</b>  | <b>S86</b>  |  |
| <b>YDR233C</b>   | <b>RTN1</b>  | <b>S232</b> |  |
| <b>YMR060C</b>   | <b>SAM37</b> | <b>S192</b> |  |
| <b>YGR049W</b>   | <b>SCM4</b>  | <b>S140</b> |  |

|                |      |       |      |
|----------------|------|-------|------|
| <b>YBR037C</b> | SCO1 | S68   |      |
| <b>YKL148C</b> | SDH1 | S312  |      |
| <b>YKL148C</b> | SDH1 | S523  |      |
| <b>YKL148C</b> | SDH1 | T521  |      |
| <b>YLL041C</b> | SDH2 | S166  |      |
| <b>YFL005W</b> | SEC4 | S204  |      |
| <b>YBR263W</b> | SHM1 | S164  | S313 |
| <b>YBR263W</b> | SHM1 | S60   |      |
| <b>YIL105C</b> | SLM1 | S145  |      |
| <b>YIL105C</b> | SLM1 | S150  |      |
| <b>YDR011W</b> | SNQ2 | S836  |      |
| <b>YDR011W</b> | SNQ2 | S837  |      |
| <b>YDR011W</b> | SNQ2 | S99   |      |
| <b>YJR104C</b> | SOD1 | S39   |      |
| <b>YHR008C</b> | SOD2 | S139  |      |
| <b>YJR045C</b> | SSC1 | S139  |      |
| <b>YJR045C</b> | SSC1 | S177  |      |
| <b>YJR045C</b> | SSC1 | S31   |      |
| <b>YJR045C</b> | SSC1 | S353  |      |
| <b>YJR045C</b> | SSC1 | S355  |      |
| <b>YJR045C</b> | SSC1 | S378  |      |
| <b>YJR045C</b> | SSC1 | S446  |      |
| <b>YLR369W</b> | SSQ1 | S53   |      |
| <b>YML052W</b> | SUR7 | S221  |      |
| <b>YML052W</b> | SUR7 | S301  |      |
| <b>YML072C</b> | TCB3 | S112  |      |
| <b>YML072C</b> | TCB3 | S1340 |      |
| <b>YML072C</b> | TCB3 | S1342 |      |
| <b>YML072C</b> | TCB3 | T1350 |      |
| <b>YGR192C</b> | TDH3 | S149  |      |

|                  |                  |              |  |
|------------------|------------------|--------------|--|
| <b>YGR192C</b>   | <b>TDH3</b>      | <b>T209</b>  |  |
| <b>YHR005C-A</b> | <b>TIM10</b>     | <b>S86</b>   |  |
| <b>YDR322C-A</b> | <b>TIM11</b>     | <b>T96</b>   |  |
| <b>YGR181W</b>   | <b>TIM13</b>     | <b>S13</b>   |  |
| <b>YIL022W</b>   | <b>TIM44</b>     | <b>S168</b>  |  |
| <b>YIL022W</b>   | <b>TIM44</b>     | <b>S199</b>  |  |
| <b>YEL020W-A</b> | <b>TIM9</b>      | <b>S46</b>   |  |
| <b>YGR082W</b>   | <b>TOM20</b>     | <b>S172</b>  |  |
| <b>YGR082W</b>   | <b>TOM20</b>     | <b>S87</b>   |  |
| <b>YGR082W</b>   | <b>TOM20</b>     | <b>T92</b>   |  |
| <b>YNL131W</b>   | <b>TOM22</b>     | <b>S20</b>   |  |
| <b>YNL131W</b>   | <b>TOM22</b>     | <b>S44</b>   |  |
| <b>YMR203W</b>   | <b>TOM40</b>     | <b>S223</b>  |  |
| <b>YNL121C</b>   | <b>TOM70</b>     | <b>S166</b>  |  |
| <b>YNL121C</b>   | <b>TOM70</b>     | <b>S78</b>   |  |
| <b>YNL121C</b>   | <b>TOM70</b>     | <b>T228</b>  |  |
| <b>YNL121C</b>   | <b>TOM70</b>     | <b>T232</b>  |  |
| <b>YNL121C</b>   | <b>TOM70</b>     | <b>T234</b>  |  |
| <b>YNL121C</b>   | <b>TOM70</b>     | <b>T520</b>  |  |
| <b>YHR117W</b>   | <b>TOM71</b>     | <b>S55</b>   |  |
| <b>YHR117W</b>   | <b>TOM71</b>     | <b>S76</b>   |  |
| <b>YOR187W</b>   | <b>TUF1</b>      | <b>S258</b>  |  |
| <b>YLL040C</b>   | <b>VPS13</b>     | <b>S1364</b> |  |
| <b>YLL040C</b>   | <b>VPS13</b>     | <b>S1731</b> |  |
| <b>YHR135C</b>   | <b>YCK1</b>      | <b>S493</b>  |  |
| <b>YHR135C</b>   | <b>YCK1</b>      | <b>S507</b>  |  |
| <b>YCL057C-A</b> | <b>YCL057C-A</b> | <b>S25</b>   |  |
| <b>YDR061W</b>   | <b>YDR061W</b>   | <b>S23</b>   |  |
| <b>YDR381C-A</b> | <b>YDR381C-A</b> | <b>S78</b>   |  |
| <b>YGR021W</b>   | <b>YGR021W</b>   | <b>S282</b>  |  |

|                  |           |      |       |
|------------------|-----------|------|-------|
| <b>YGR207C</b>   | YGR207C   | S73  |       |
| <b>YGR234W</b>   | YHB1      | S215 |       |
| <b>YGR234W</b>   | YHB1      | T22  |       |
| <b>YMR241W</b>   | YHM2      | T7   |       |
| <b>YHR003C</b>   | YHR003C   | S259 |       |
| <b>YKL027W</b>   | YKL027W   | S124 |       |
| <b>YKL187C</b>   | YKL187C   | S675 |       |
| <b>YKL187C</b>   | YKL187C   | S678 |       |
| <b>YKL187C</b>   | YKL187C   | S712 |       |
| <b>YKL187C</b>   | YKL187C   | S729 |       |
| <b>YKL187C</b>   | YKL187C   | S738 |       |
| <b>YKL187C</b>   | YKL187C   | T734 |       |
| <b>YLR419W</b>   | YLR419W   | T13  |       |
| <b>YMR302C</b>   | YME2      | S167 |       |
| <b>YMR031C</b>   | YMR031C   | S775 |       |
| <b>YMR031C</b>   | YMR031C   | T720 |       |
| <b>YMR221C</b>   | YMR221C   | S238 |       |
| <b>YOR020W-A</b> | YOR020W-A | S59  |       |
| <b>YOR020W-A</b> | YOR020W-A | S71  |       |
| <b>YOR356W</b>   | YOR356W   | S511 |       |
| <b>YPR098C</b>   | YPR098C   | S113 |       |
| <b>YFL038C</b>   | YPT1      | S174 |       |
| <b>YBR054W</b>   | YRO2      | S290 |       |
| <b>YBR054W</b>   | YRO2      | S293 |       |
| <b>YBR054W</b>   | YRO2      | T341 |       |
| <b>YBR054W</b>   | YRO2      | T341 | T1350 |
| <b>YOL109W</b>   | ZEO1      | S25  |       |
| <b>YOL109W</b>   | ZEO1      | S40  |       |
| <b>YOL109W</b>   | ZEO1      | T10  |       |
| <b>YOL109W</b>   | ZEO1      | T22  |       |

|         |        |                |       |
|---------|--------|----------------|-------|
| YOL109W | ZEO1   | T49            |       |
| YBL015W | ACH1   | T241/S243      |       |
| YLR304C | ACO1   | S467/S468/T469 |       |
| YLR304C | ACO1   | S83/Y84        |       |
| YFL030W | AGX1   | T2/S4/T7       |       |
| YHL021C | AIM17  | S194           |       |
| YJR080C | AIM24  | S165/S166      |       |
| YJR080C | AIM24  | S185/187       |       |
| YPR004C | AIM45  | S40/41         |       |
| YOR374W | ALD4   | S269/270       |       |
| YOR374W | ALD4   | S348/350       | T232  |
| YPL061W | ALD6   | S261/262       |       |
| YER069W | ARG5,6 | S358/359       |       |
| YDR384C | ATO3   | S6/S7          | T232  |
| YBL099W | ATP1   | S46/S47        |       |
| YBL099W | ATP1   | S533/S536      |       |
| YBL099W | ATP1   | S93/94         |       |
| YBR039W | ATP3   | Y199           |       |
| YDR298C | ATP5   | S62/T63        |       |
| YML042W | CAT2   | S514/515       |       |
| YBL045C | COR1   | S112/T113      |       |
| YHR051W | COX6   | S146/147/148   |       |
| YML078W | CPR3   | T165/S167      |       |
| YML078W | CPR3   | Y97/S99        | S1371 |
| YDR470C | CYM1   | S55/S56/T59    |       |
| YDL174C | DLD1   | S297/S298      |       |
| YER166W | DNF1   | S358/361/365   |       |
| YER166W | DNF1   | T1551/S1552    |       |
| YER166W | DNF1   | Y77/S81        |       |
| YBR177C | EHT1   | S121/T122      |       |

|         |        |                |      |
|---------|--------|----------------|------|
| YGL139W | FLC3   | S635/Y637      |      |
| YPL262W | FUM1   | T122/S124      |      |
| YBR179C | FZO1   | S437/S438      |      |
| YAL048C | GEM1   | S49/S50/T52    |      |
| YDR508C | GNP1   | S29/Y31        |      |
| YER020W | GPA2   | S12/T13        |      |
| YDR513W | GRX2   | S91            |      |
| YLR259C | HSP60  | S249/S250      |      |
| YPR006C | ICL2   | Y66/S67        |      |
| YOR136W | IDH2   | T358/S359/S360 | S678 |
| YLR355C | ILV5   | S317/T318      |      |
| YJL082W | IML2   | S383/S384      | S678 |
| YDL181W | INH1   | S33/Y34        |      |
| YKL217W | JEN1   | Y80/S81        |      |
| YJL094C | KHA1   | T554/557       | T734 |
| YOR142W | LSC1   | S184/T186      |      |
| YLR188W | MDL1   | S132/S134      |      |
| YGL219C | MDM34  | S198/S200      |      |
| YGL219C | MDM34  | S321/Y323      |      |
| YOL027C | MDM38  | S419/420       |      |
| YJL112W | MDV1   | S27/29         |      |
| YKL195W | MIA40  | S332/333       |      |
| YBR084W | MIS1   | S203/204       |      |
| YIL051C | MMF1   | S36/Y37        |      |
| YLR190W | MMR1   | S224/T225      |      |
| YLR190W | MMR1   | T122           |      |
| YLR190W | MMR1   | T122/T123/S124 |      |
| YJL066C | MPM1   | S156/T157      |      |
| YBR122C | MRPL36 | S94/S97        |      |
| YKL040C | NFU1   | S200/201/202   |      |



---

|                |         |                     |     |
|----------------|---------|---------------------|-----|
| <b>YKL120W</b> | OAC1    | <b>T201/S205</b>    |     |
| <b>YBR230C</b> | OM14    | <b>S40/S42</b>      |     |
| <b>YPR002W</b> | PDH1    | <b>S496/497</b>     |     |
| <b>YOR153W</b> | PDR5    | <b>T49/T51</b>      |     |
| <b>YOR158W</b> | PET123  | <b>S148/149</b>     |     |
| <b>YBL022C</b> | PIM1    | <b>S318/T319</b>    |     |
| <b>YGL008C</b> | PMA1    | <b>S14/15</b>       | T49 |
| <b>YPL188W</b> | POS5    | <b>S44/45/46/47</b> |     |
| <b>YBR263W</b> | SHM1    | <b>T210/211</b>     |     |
| <b>YJR045C</b> | SSC1    | <b>T63/T64</b>      |     |
| <b>YHR135C</b> | YCK1    | <b>S62/T63</b>      | S25 |
| <b>YKL187C</b> | YKL187C | <b>S675/S678</b>    |     |
| <b>YMR031C</b> | YMR031C | <b>S584/S586</b>    |     |
| <b>YOR356W</b> | YOR356W | <b>S88/T90</b>      |     |
| <b>YBR111C</b> | YSA1    | <b>S73/74</b>       |     |