
**CHARAKTERISIERUNG DER WECHSELWIRKUNG
POST-TRANSLATIONALER MODIFIKATIONEN
MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE-BASIERTER
PROTEOMFORSCHUNG**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Anna Saskia Venne

aus

Bergen (auf Rügen)

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2017

1. Gutachter/-in: Prof. Dr. Albert Sickmann

2. Gutachter/-in: Prof. Dr. Oliver Kayser

Dortmund 2018



INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Aminosäuren.....	VII
Veröffentlichungen.....	IX

INHALT

1 EINLEITUNG.....	1
1.1. Proteomstudien und ihre Bedeutung für die Wissenschaft.....	1
1.2. Post-translationale Modifikationen.....	2
1.3. Methoden der Proteomik.....	8
1.3.1. Massenspektrometrie.....	8
1.3.1.1. Datenanalyse und Statistik	11
1.3.2. Flüssigchromatographie	14
1.3.2.1. Starke Kationenaustausch-Chromatographie.....	16
1.3.3. Quantifizierung und Labeling.....	17
1.3.4. Anreicherungsmethoden in der Proteomik.....	21
1.3.4.1. Anreicherung von PTM-Subspezies und zwei-dimensionale Chromatographie.....	22
2 ZIELSETZUNG	29
3 MATERIAL UND METHODEN.....	30
3.1. Material.....	30
3.1.1. Synthese des D3-NHS-Esters	33
3.2. Methoden.....	34
3.2.1. Optimierung SCX-Auftrennung	34
3.2.1.1. Zellyse	34
3.2.1.2. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	35
3.2.1.3. Vorbereitung der Proteine für den proteolytischen Verdau	36
3.2.1.4. Proteolytischer Verdau	37
3.2.1.5. Entsalzung mittels C18-Festphasen-Extraktion.....	37
3.2.1.6. Kationenaustausch-Chromatographie	39
3.2.1.7. LC-MS-Messung und Analyse der fraktionierten Peptide	41
3.2.1.8. Datenauswertung	42
3.2.2. N-terminale Anreicherungen	44
3.2.2.1. Probenvorbereitung.....	44
3.2.2.2. Stabile Isotopenmarkierung auf Proteinebene	45
3.2.2.2.1. Dimethylierung auf Proteinebene.....	45
3.2.2.2.2. iTRAQ-Labeling auf Proteinebene	46
3.2.2.3. Proteolytischer Verdau.....	47
3.2.2.4. Anreicherungen N-terminaler Peptide mittels ChaFRADIC	49

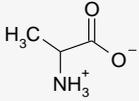
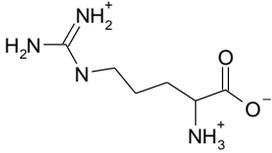
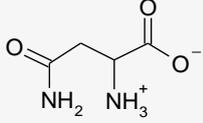
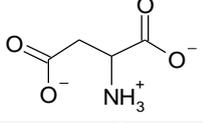
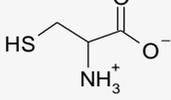
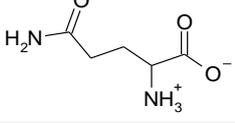
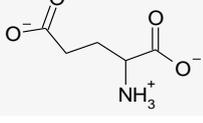
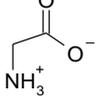
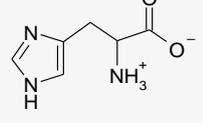
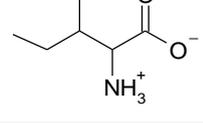
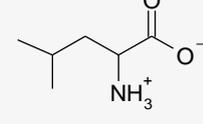
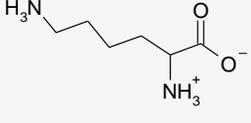
3.2.2.5 LC-MS-Messung und Analyse der angereicherten Peptide	51
3.2.2.6. Datenauswertung	55
3.2.2.7. Dateninterpretation	56
3.2.3. Anreicherung Disulfidverbrückter Peptide.....	58
3.2.3.1. Probenvorbereitung.....	59
3.2.3.1.1. FASP (Filter-Aided Sample Preparation method) Protokoll	60
3.2.3.2. iTRAQ-Markierung	61
3.2.3.3. Anreicherung mittels ChaFRADIC	62
3.2.3.4. nano-LC-MS Analyse	64
3.2.3.5. Datenauswertung	65
3.2.4. Anreicherung ubiquitinylierter Peptide	65
3.2.4.1. Immunoaffinitäts-basierte Anreicherung	65
3.2.4.2. Anreicherung mittels ChaFRADIC - Vorexperiment	67
3.2.4.3. Anreicherung mittels ChaFRADIC - Vergleichsexperiment.....	71
3.2.4.4. Immunoaffinitäts-basierte Anreicherung mit 1 mg Material.....	72
4 ERGEBNISSE.....	74
4.1. Optimierung SCX-Auftrennung.....	74
4.2. Anreicherung N-terminaler Peptide	80
4.2.1. Anwendung des Initialen ChaFRADICs zur Anreicherung N-terminaler Peptide aus Saccharomyces cerevisiae.....	80
4.2.2. Anwendung des Initialen ChaFRADICs zur Anreicherung N-terminaler Peptide aus Arabidopsis thaliana	88
4.2.3. Anwendung des erweiterten ChaFRADICs zur Anreicherung N-terminaler Peptide aus Arabidopsis thaliana	90
4.3. Anreicherung ehemals Disulfid-verbrückter Peptide.....	96
4.4. Anreicherung Ubiquitinylierter Peptide.....	105
4.5. Anwendung der etablierten Methoden zur Charakterisierung der Wechselwirkung post- translationaler Modifikationen.....	112
5 DISKUSSION.....	118
5.1. Optimierung SCX-Auftrennung.....	118
5.2. N-terminale Anreicherungen.....	119
5.2.1. Anwendung des Initialen ChaFRADICs zur Anreicherung N-terminaler Peptide aus Saccharomyces cerevisiae.....	119
5.2.2. Anwendung des Initialen ChaFRADICs zur Anreicherung N-terminaler Peptide aus Arabidopsis thaliana	122
5.2.3. Anwendung des erweiterten ChaFRADICs zur Anreicherung N-terminaler Peptide aus Arabidopsis thaliana	124
5.3. Anreicherung von Disulfid-verbrückten Peptiden	127
5.4. Anreicherung von Ubiquitinylierten Peptiden	131

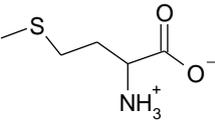
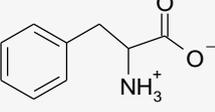
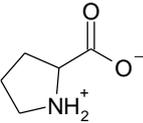
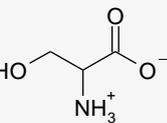
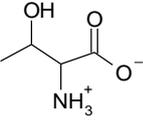
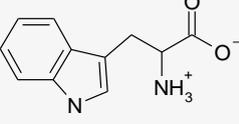
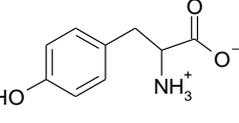
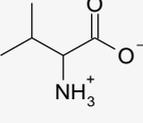
5.5. Anwendung der etablierten Methoden zur Charakterisierung der Wechselwirkung post-translationaler Modifikationen.....	134
6 ZUSAMMENFASSUNG	138
7 SUMMARY	139
8 DANKSAGUNGEN	140
9 LEBENSLAUF.....	141
10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	142
11 LITERATURVERZEICHNIS	143
12 ANHANG	154

ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
BSA	Bovines Serum Albumin
CE	Engl.: <i>collision energy</i>
CID	Engl.: <i>collision-induced dissociation</i>
ChaFRADIC	Engl.: <i>charge-based fractional diagonal chromatography</i>
COFRADIC	Engl.: <i>combined fractional diagonal chromatography</i>
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
D ₃ -NHS-Ester	trideutero-N-Hydroxysuccinimid-Ester
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrosprayionisation
FCS/FBS	Engl.: <i>fetal calf/bovine serum</i>
FDR	engl.: <i>false discovery rate</i>
g	Erdbeschleunigung
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
HCD	engl.: <i>higher-energy collisional dissociation</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie, engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>
IAA	Iodacetamid
IMAC	Engl.: <i>immobilized metal affinity chromatography</i>
iTRAQ	Engl.: <i>isobaric tag for relative and absolute quantification</i>
LC	Flüssigchromatographie, engl.: <i>liquid chromatography</i>

m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
mAU	Milliabsorptionseinheiten, engl.: <i>milli absorption units</i>
MMTS	S-Methyl-Methanthiosulfonat
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MudPIT	Engl.: <i>multidimensional protein identification technology</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
PBS	Engl.: phosphate buffered saline
PD	Proteome Discoverer
PSM	Engl.: <i>peptide to spectrum match</i>
PTM(s)	Posttranslationale Modifikation(en)
RNA	Ribonukleinsäure, engl.: <i>ribonucleic acid</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (auch oft als oxidativer Stress bezeichnet)
RP	Umkehrphasenchromatographie, engl.: <i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
SCX	Starke Kationenaustausch-Chromatographie, engl.: <i>strong cation exchange chromatography</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SGD	Saccharomyces genome database
SIL	stabil-Isotopen markiert, engl.: <i>stable isotope labeled</i>
SPE	Festphasenextraktion, engl.: <i>solid phase extraction</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TFA	Trifluoressigsäure, engl.: <i>trifluoroacetic acid</i>
TiO ₂	Titandioxid
TMT	Engl.: tandem mass tag
UV	Ultraviolettstrahlung
v/v	Volumenprozent bezogen auf das Gesamtvolumen

w/v	Gewichtsprozent bezogen auf das Gesamtvolumen
w/w	Gewichtsprozent bezogen auf das Gesamtgewicht

Name	Buchstabencodes	Strukturformel	Monoisotopische Masse (-H ₂ O)/Da [1]
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	Glu, E		129,04259
Glycin	Gly, G		57,02146
Histidin	His, H		137,05891
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

Publikationen

- April 2017 Saita, S., Nolte, H., Fiedler, K.U., Kashkar, H., Venne, A.S., Zahedi, R.P., Krüger, M., Langer, T.
PARL mediates Smac proteolytic maturation in mitochondria to promote apoptosis
Nature Cell Biology, 19(4):318-328
Impact Factor: 18.699
- Dez 2016 Tinnefeld, V., Venne, A.S., Sickmann, A., Zahedi, R.P.
Enrichment of Cross-Linked Peptides Using Charge-Based Fractional Diagonal Chromatography (ChaFRADIC)
Journal of proteome research, 16(2):459-469
Impact Factor: 3.83
- Mai 2015 Carrie, C., Venne, A.S., Zahedi R.P., Soll, J.
Identification of cleavage sites and substrate proteins for two mitochondrial intermediate peptidases in Arabidopsis thaliana
Journal of Experimental Botany, 66(9):2691-708
Impact Factor: 5.794
- Mai 2015 Venne, A.S.*, Solari, F.A.*, Faden, F., Pareti, T., Dissmeyer, N., Zahedi, R.P.
An improved workflow for quantitative N-terminal ChaFRADIC to study proteolytic events in Arabidopsis thaliana seedlings
PROTEOMICS (Special Issue), 15(14):2458-69
Impact Factor: 3.973
- Sep 2014 Venne, A.S., Zahedi, R.P.
The potential of fractional diagonal chromatography strategies for the enrichment of post-translational modifications
EuPA Open proteomics, 4(0):165-170
Impact Factor: 1.34
- März 2014 Vaudel, M., Venne, A.S., Berven, F.S., Zahedi, R.P., Martens, L., Barsnes
Shedding light on black boxes in protein identification
PROTEOMICS, 14, 1001–1005
Impact Factor: 4.132
- Jan 2014 Venne, A. S.*, Kollipara, L.*, & Zahedi, R. P.
The next level of complexity: Crosstalk of posttranslational modifications
PROTEOMICS, 14, 513–524
Impact Factor: 4.132
- Aug 2013 Venne, A. S., Vögtle, F. N., Meisinger, C., Sickmann, A., & Zahedi, R. P.
A novel highly sensitive, specific and straightforward strategy for comprehensive N-terminal proteomics reveals unknown substrates of the mitochondrial peptidase icp55
Journal of proteome research, 12, 3823-3830
Impact Factor: 5.056

* geteilte Erstautorenschaft

Vorträge

- Okt 2015 Vortrag in der **ISAS Summer School 2015**, Dortmund
Titel: ChaFRADIC – A novel multifunctional tool for PTM-specific proteomics
- Dez 2014 Vortrag in der **ISAS Summer School 2014**, Dortmund
Titel: Uncovering of N-terminal processing in *Arabidopsis thaliana* using ChaFRADIC
- Juli 2014 Ausgewählter Vortrag auf der **21. Arbeitstagung für Mikromethoden in der Proteinchemie 2014**, Dortmund
Titel: ChaFRADIC – Ein multifunktionelles Werkzeug zeigt neue Wege für die PTM-fokussierte Proteomanalyse
- Okt 2013 Ausgewählter Vortrag in der PTM-Session der **Annual Conference of the European Proteomic Association (EuPA) 2013**, Saint Malo (Frankreich)
Titel: ChaFRADIC – A novel highly sensitive strategy for comprehensive N-terminal proteomics reveals unknown substrates of the mitochondrial peptidase icp55
- Okt 2013 Vortrag in der **ISAS Summer School 2013**, Dortmund
Titel: ChaFRADIC – A novel highly sensitive strategy for comprehensive N-terminal proteomics reveals unknown substrates of the mitochondrial peptidase Icp55

Posterpräsentationen

- Okt 2014 Posterpräsentation auf dem **4. Marktplatz bio.dortmund**
Titel: ChaFRADIC for studying signaling beyond phosphorylation
- Juni 2014 Posterpräsentation auf der **62nd Annual Conference of the American Society of Mass Spectrometry (ASMS) 2014**, Baltimore (MD, USA)
Titel: ChaFRADIC – A novel multifunctional tool for PTM-specific proteomics
- Juni 2013 Posterpräsentation auf dem **Doktorandenforum der Sektion D**, Berlin
Titel: A novel and sensitive strategy for analyzing proteolytic cleavage
- Okt 2012 Posterpräsentation auf der **ISAS Summer School**, Dortmund
Titel: Enrichment of disulfide-bond peptides via a new SCX-based method
- Okt 2012 Posterpräsentation auf dem **2. Marktplatz bio.dortmund**
Titel: Quantitative and qualitative analysis of PTMs in proteomics

Auszeichnungen und Preise

- Okt 2014 **Posterpreis 1.Platz** vergeben innerhalb des **4.Marktplatz bio.dortmund 2014**
- Juli 2014 **Nachwuchswissenschaftspreis der 21. Arbeitstagung für Mikromethoden in der Proteinchemie, Dortmund**
- Juni 2014 **Reiskostenstipendium** des Deutschen Akademischen Austausch Dienst (DAAD) über 630 Euro zur Förderung einer Kongressreise zur **ASMS 2014, Baltimore (MD, USA)**

Außeruniversitäres Engagement

- Seit 2013 Mitglied in der **Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM)**
- Seit 2013 Mitglied in der **Deutschen Gesellschaft für Proteomforschung e.V. (DGPF)**
- Seit 2014 Mitglied der **American Society of Mass Spectrometry (ASMS)**
- Okt 2014 Organisation und aktive Teilnahme an der **“Wissensnacht Ruhr 2014” im Zentrum für Kunst und Kreativität - Dortmunder U**
- Seit 2015 **Gründung einer Junior-GBM-Gruppe** am Standort Dortmund und amtierende **Vorsitzende** dieser Gruppe

1 EINLEITUNG

1.1. PROTEOMSTUDIEN UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE WISSENSCHAFT

Der grundlegende Bauplan eines jeden Lebewesens ist in seinem Erbgut verankert. In den vergangenen 25 Jahren wurde deshalb ein enormer wissenschaftlicher Aufwand betrieben, um zunächst die Genome einfacher Prokaryoten wie *Escherichia coli* zu sequenzieren [2] und schließlich auch das gesamte humane Genom zu entschlüsseln [3, 4]. Letzteres fand als *Human Genome Project* 2003 nach 13 Jahren seinen Abschluss und gilt damit als erstes gemeinschaftliches Großforschungsprojekt weltweit [5]. Zudem lieferte es erstaunliche Erkenntnisse über das humane Genom, das zum heutigen Zeitpunkt auf etwa 20,000 Gene geschätzt wird [4, 6] und damit einen 5-mal geringeren Umfang hat als zunächst angenommen [7]. Überraschenderweise besitzen manche - deutlich weniger entwickelte - Lebensformen, wie z.B. der Wasserfloh, eine höhere Genanzahl als der Mensch [8], so dass sich nicht allein durch die Betrachtung des Genoms die Organisation eines komplexen Organismus erklären lässt. Neben der Genomik wurden deshalb auch andere Forschungsrichtungen wie die Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik ausgeweitet, um zelluläre Abläufe und deren Regulationsmechanismen im Detail verstehen zu können. Besonders Transkriptomik und Proteomik greifen dabei auf die umfassenden Ergebnisse aus Genomstudien zurück, da die zu untersuchenden Genprodukte theoretisch aus dem genetischen Code prognostizierbar sind. Das tatsächliche Proteom einer betrachteten Zelle ist dabei jedoch hochdynamisch, so dass Proteomstudien immer nur eine Momentaufnahme eines betrachteten biologischen Gefüges liefern können, die stark abhängig ist von verschiedensten in-/ und extrinsischen Faktoren, wie z.B. Zellzyklus, Temperatur, Nährstofflevel, Hormonen oder Stress [9]. Die Existenz eines Proteins ist dabei nur bedingt abhängig von der Konzentration des korrespondierenden Transkripts [10, 11], so dass spezifische Stimuli die Translationsrate, Lokalisation, Degradation und Modifikation eines Proteins verändern und damit dessen finale Konzentration ort-/ und zeitabhängig beeinflussen können [12]. Dies erlaubt lebenden Zellen eine Vielzahl an Modulatoren zu generieren, die eine schnelle, spezifische und dennoch variable zelluläre Antwort auf einen gegebenen Reiz initiieren und macht diesen Prozess gleichzeitig weniger abhängig von der limitierten Anzahl an Genen oder deren gezielter Expression [13, 14]. Die Proteomik hat sich dabei das hochgesteckte Ziel gesetzt, alle Komponenten eines Proteoms zu identifizieren und zu quantifizieren, was zudem Aussagen über deren Expressionslevel, subzelluläre Lokalisation, Interaktionen, mögliche post-

translationale Modifikationen (PTMs) und Turnover (Balance zwischen Proteinsynthese und /-abbau) abhängig von Zeit, Bedingung und Zelltyp beinhaltet [15]. Zum aktuellen Zeitpunkt ist dies trotz diverser technischer Neuerungen dennoch nur teilweise realisierbar. Im Genom einer humanen Zelle sind geschätzte 100,000 Protein-Isoformen codiert [16], von denen unter definierten Bedingungen ca. 10,000 Proteine existent sind [17]. Deren dynamischer Bereich variiert jedoch zwischen sechs und sieben Größenordnungen [18], da durch differentielle Genexpression einige Proteine in nur wenigen Kopien pro Zelle vorliegen, andere werden millionenfach mit Maximalraten von 1300 Kopien pro mRNA und Stunde synthetisiert [19]. Somit erschweren extrem häufig vorkommende Proteine den Nachweis von sehr niedrig abundanten. Zusätzlich können PTMs und deren differentielles Auftreten die Komplexität eines Proteoms um ein Vielfaches erhöhen, was eine Erfassung aller Isoformen nahezu unmöglich macht. Durch den stetigen Ausbau des methodischen Repertoires und der Verbesserung bestehender Techniken wird die Sensitivität von Proteomanalysen fortlaufend erhöht, so dass molekulare Netzwerke immer besser charakterisiert werden können. Der umfassende Einblick in zelluläre Zusammenhänge liefert wichtige Ansatzpunkte in der Evolutionsbiologie [20, 21], Biomarker-Entdeckung [22, 23] und nicht zuletzt für Medizin und Wirkstoffforschung [9, 24-26]. So können neue pharmazeutische Wirkstoffe an Zellkulturen getestet werden und die Auswirkungen auf Proteinebene direkt überwacht werden [27, 28]. Auch die Detektion von Biomarker-Proteinen im Blut oder Urin könnte eine schnellere und nicht-invasive Diagnose von Erkrankungen ermöglichen [29, 30], so dass in Zukunft schwere Krankheitsverläufe durch frühzeitige Therapie abgemildert werden könnten. Besonders in der Krebsforschung lieferte die Proteomforschung in den letzten Jahren viele neue Therapieansätze [25, 31] und auch eine auf den individuellen Patienten zugeschnittene „personalisierte Medizin“ wird mehr und mehr diskutiert [32, 33].

1.2. POST-TRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN

Die ständige Bereitschaft der Zelle auf äußere Einflüsse dynamisch und präzise zu reagieren erfordert neben gezielter Genexpression und transkriptioneller Kontrolle eine weitere Regulationsebene. Post-translationale Modifikationen (PTMs), die sich allgemein als enzymatisch katalysierte Veränderung von Proteinen nach der Translation beschreiben lassen [34], erlauben eine gesteuerte Modulation von bereits synthetisierten Proteinen. Durch Anheftung von funktionellen Gruppen oder deren Abspaltung können so 15 der 20 proteinogenen Aminosäuren modifiziert werden, wobei für Alanin, Phenylalanin, Leucin,

Isoleucin und Valin keine *in vivo*-Modifikationen bekannt sind [35, 36]. Deren unpolare Seitenketten bestehen aus stabilen Kohlenwasserstoffverbindungen, die nur schwer eine Bindung mit anderen Molekülen eingehen. Aktuell sind über 450 PTMs in der Uniprot (engl.: *universal protein resource*) Datenbank [37] gelistet, darunter als prominenteste Vertreter z.B. Phosphorylierung und Acetylierung, aber auch Disulfidbrückenbildung oder Ubiquitinylierung (siehe auch Abb.1.1.1.). Meist werden die jeweiligen chemischen Gruppen gezielt durch hoch-spezialisierte Enzyme kovalent an die Seitenkettenreste bestimmter Aminosäuren gebunden, in manchen Fällen können sie aber auch artifiziell entstehen, wie z.B. im Falle der Oxidierung oder Deamidierung [9]. Eine sehr häufig auftretende und daher gut untersuchte PTM ist die Phosphorylierung. Durch sogenannte Kinasen wird eine Phosphatgruppe auf das Zielprotein übertragen - vorrangig auf Serin, Threonin oder Tyrosin-Seitenketten (siehe Abb.1.2.1 A). Diese Reaktion ist reversibel und Phosphatasen können modifizierte Proteine wieder dephosphorylieren. Neben Übertragung von kleinen funktionellen Gruppen können auch sehr viel größere Moleküle angeheftet werden, wie z.B. bei der Ubiquitinylierung. Dabei wird ein 8,5 kDa großes Protein, das Ubiquitin, in einem mehrstufigen Prozess auf ein Lysin des Zielproteins übertragen (Abb.1.2.1. B). Es können auch mehrere solcher Ubiquitin-Moleküle an ein einzelnes Protein geheftet werden (Polyubiquitinylierung), so dass große verzweigte Kettenstrukturen entstehen. Je nach Bindungsart und Anzahl der übertragenen Ubiquitin-Moleküle entscheidet dies über Funktion, Lebensdauer und Lokalisation des modifizierten Proteins [38, 39]. Im Gegensatz dazu können durch PTMs auch funktionelle Gruppen oder einzelne Atome abgespalten werden, so z.B. bei der Disulfidbrückenbildung (Abb.1.2.1. C). Dabei werden die freien Thiolgruppen zweier Cysteine oxidiert und bilden eine sogenannte Disulfidbrücke unter Abspaltung von Wasserstoff aus. Einen Sonderfall stellt die proteolytische Prozessierung dar: Hier wird die Peptidbindung an einer spezifischen Schnittstelle enzymatisch durch Proteasen aufgebrochen und so ein Teil des Zielproteins abgespalten. Proteolytische Prozessierung kann sowohl am N- als auch am C-Terminus stattfinden, wobei sogenannte neo-Termini entstehen und somit das Protein irreversibel verändert wird (Abb.1.2.1. D) [40, 41]. Die biologische Funktion der einzelnen Modifikationen ist dabei so vielfältig wie das Repertoire an PTMs selbst: Durch addierte oder abgespaltene funktionelle Gruppen können physikochemische Eigenschaften eines Proteins z.B. Ladung, isoelektrischer Punkt, dreidimensionale Struktur oder Hydrophobizität verändert werden [42]. Änderung von Struktur und Konformation z.B. durch Disulfidbrücken oder Umorientierung der Oberflächenladung haben Auswirkungen auf

Stabilität sowie Aktivität von Proteinen und ermöglichen die Interaktion mit Bindungspartnern oder verhindern diese.

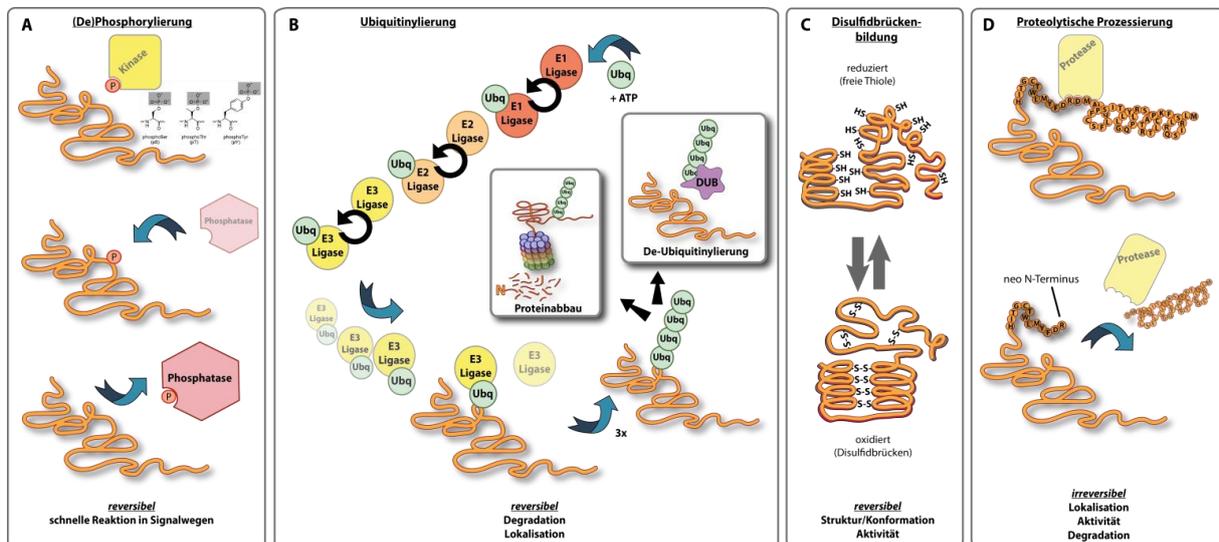


Abb.1.2.1.: Übersicht ausgewählter post-translationaler Modifikationen und ihrer Übertragungsmechanismen. (A) Bei der Phosphorylierung wird eine Phosphatgruppe durch eine Kinase auf das Zielprotein übertragen, diese Reaktion ist sehr schnell und zudem reversibel, so dass die Modifikation durch Phosphatasen wieder abgespalten werden kann. (B) Ubiquitinmoleküle werden über mehrere Ligasen transferiert, bevor sie auf das Zielprotein übertragen werden. Durch mehrfache Wiederholung dieses Prozesses können lange Ubiquitinketten oder verzweigte Strukturen entstehen. Je nach Verknüpfungsart und Molekülanzahl entscheidet dies über Funktion und Lebensdauer des Proteins. Durch Deubiquitinasen (DUBs) können die Ubiquitinmoleküle wieder abgespalten und das Protein vor dem proteasomalen Abbau geschützt werden. (C) In einer reduzierenden (Mikro-)Umgebung liegen die SH-Gruppen von Cysteinen als freie Thiole vor, werden sie oxidiert kann es zur Bildung einer Disulfidbrücke kommen. Diese sind maßgeblich verantwortlich für Struktur und Konformation einiger Proteine. (D) Bei der proteolytischen Prozessierung wird die Proteinsequenz durch eine Protease geschnitten und ein Teil des Proteins irreversibel entfernt. Dies führt zur Bildung sogenannter Neo-N-/ oder C-Termini, was die Proteineigenschaften grundlegend verändern kann.

Es sind sowohl sehr schnelle und reversible Veränderungen an Proteinen möglich, z.B. durch Phosphorylierung, als auch langsamere und nicht umkehrbare PTMs bekannt, wie bestimmte Formen der Glykolisierung [14] oder Lipidierung [43]. Durch diese Vielfalt stellen PTMs einen wichtigen Schlüssel zur Variabilität des Proteoms dar: sie erhöhen die Anzahl potentieller Modulatoren in der Zelle um ein Vielfaches und ermöglichen eine sekunden- bis minutengenaue Reaktion, da bereits vorhandene Proteinmoleküle dynamisch moduliert werden. PTMs ergänzen somit die teils limitierten Möglichkeiten der relativ langsamen Genexpression und transkriptionellen Kontrolle, die vorrangig Einfluss auf die generelle Proteinabundanz haben. Anders als man demzufolge erwarten könnte, treten PTMs trotz ihrer fundamentalen Beteiligung an nahezu allen zellulären Prozessen nur in substöchiometrischem Verhältnis auf, so dass oft nur ein geringer Prozentsatz an Molekülen eines gegebenen

Proteins modifiziert wird und ein Großteil unverändert bleibt [44]. Wie dennoch Effektivität und eine hohe Spezifität in einem solchen System hergestellt wird, wurde von Übersax et al. am Beispiel der Phosphorylierung zusammengefasst, die Mechanismen lassen sich aber auch auf andere PTMs übertragen. Demzufolge wird die Spezifität vor allem über (i) Lokalisation, (ii) Substrataffinität, (iii) Co-Faktoren und (iv) systemische Effekte bestimmt [45]. So hat die Verknüpfung einer bestimmten PTM mit einer sub-zellulären Lokalisation (i) den Vorteil, dass erst am Zielort die erforderliche Funktion ermöglicht wird. Ungewollte Reaktionen können so unterbunden werden. Dieser Mechanismus wird bei der ortsgebundenen Aktivierung von Kinasen genutzt [45], er spielt aber auch bei der proteolytischen Prozessierung eine Rolle. So enthalten beispielsweise mitochondriale Proteine, die aus dem Cytosol importiert werden, eine N-terminale Signalsequenz, die nach erfolgreichem Transport abgespalten wird. Die aktive Konformation kann erst nach dieser Proteolyse eingenommen werden und ermöglicht somit erst am Zielort die Erfüllung der eigentlichen Aufgabe, wie die Interaktion mit weiteren Proteinen, DNA oder Lipiden [46]. Die erfolgreiche Übertragung einer PTM hängt außerdem maßgeblich von der Wechselwirkung zwischen Zielprotein und katalysierendem Enzym, also von der Substrataffinität (ii), ab. Die aktiven Zentren von PTM-übertragenden Enzymen sind oft spezifisch für eine bestimmte Substratgruppe und binden dann an festgelegte Konsensus-Sequenzen des Zielproteins. Interaktionen können so nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip nur an bestimmten Substraten stattfinden. Beispielsweise teilen sich die rund 500 bekannten humanen Kinasen [47] zwar denselben Reaktionsmechanismus, um ihre Substrate zu phosphorylieren, jedoch erkennen sie unterschiedliche Konsensus-Sequenzen und divergieren in Oberflächenladung und Hydrophobizität, was nur Interaktionen mit ganz bestimmten, passenden Substraten zulässt [45]. Zudem sind häufig weitere Co-Faktoren (iii) notwendig, die die Bindung stabilisieren, oder beide Interaktionspartner werden erst durch Adapterproteine zum ausführenden Proteinkomplex rekrutiert. Dies wurde in vielen komplexen Signalwegen nachgewiesen, wie dem MAP-Kinase Signalweg [48, 49], der Chaperon-Maschinerie [50], oder auch im Ubiquitin-Proteasom System (UPS), welches Proteindegradation und Turnover reguliert (vgl. Abb.1.2.1.) [51]. Zu guter Letzt können auch systemische Effekte (iv) die Spezifität beeinflussen: Darunter werden alle Auswirkungen zusammengefasst, die auf Grund der komplexen Zusammensetzung des betrachteten Proteoms entstehen. *In vivo* ist die Entscheidung, welches Protein von welchem Enzym modifiziert wird, abhängig von vielen anderen zu diesem Zeitpunkt existierenden Proteinen oder auch anderen PTMs. So konkurrieren beispielsweise mehrere Substrate häufig kompetitiv um die Bindungsstelle ihrer

phosphorylierenden Kinasen und können sogar die Affinität für jeweils andere Proteine herabsetzen [45]. Noch komplexer funktioniert die gegenseitige Abhängigkeit einzelner PTMs voneinander, die auch als PTM-Crosstalk (engl. für gegenseitige Beeinflussung) bezeichnet wird. Dabei unterscheidet man (i) positiven und (ii) negativen Crosstalk voneinander [13, 14] (siehe Abb.1.2.2).

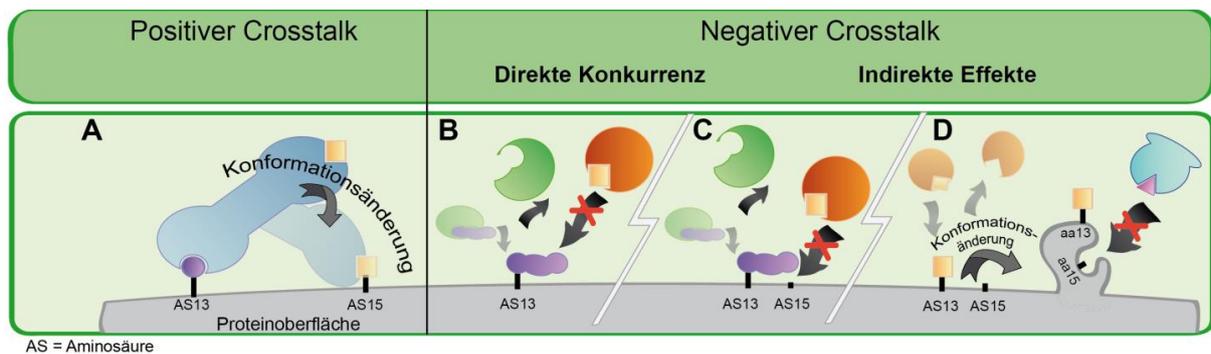


Abb.1.2.2.: Schematischer Vergleich von positivem und negativem Crosstalk. Bei positivem Crosstalk (A) triggert das Vorhandensein einer ersten PTM die Bindung einer weiteren (z.B. durch Rekrutierung eines PTM-übertragenden Enzyms). Beim negativen Crosstalk unterscheidet man verschiedene Szenarien, denen gemeinsam ist, dass die Bindung einer ersten PTM die Bindung einer zweiten PTM verhindert. Dies kann durch direkte Konkurrenz der zwei PTMs um dieselbe Aminosäure der Fall sein (B) oder, weil die erste PTM die Bindestelle der zweiten maskiert - beispielsweise durch sterische Hinderung (C) oder durch eine ausgelöste Konformationsänderung (D). Abbildung modifiziert nach Venne et al. [14]

Beim positiven Crosstalk ermöglicht die Bindung einer ersten PTM, z.B. durch Rekrutierung eines PTM-übertragenden Enzymes, die Bindung einer zweiten PTM (siehe Abb.1.2.2. A). Im Gegensatz dazu wird die Bindung einer zweiten PTM beim negativen Crosstalk verhindert, entweder dadurch, dass beide PTMs kompetitiv um dieselbe Aminosäure konkurrieren (Abb.1.2.2. B), oder durch Bindung der ersten PTM die Bindestelle der zweiten maskiert wird (Abb.1.2.2. C+D). Durch die gegenseitige Einflussnahme kann die Spezifität enorm erhöht werden und auch eine Art „Fehlerkorrektur“ stattfinden. Etwa 1000-2000 Gene, was einem Anteil von über 5% des humanen Genoms entspricht, codieren für Enzyme, die für die Ausbildung von PTMs verantwortlich sind [52], wiederum unterliegen die meisten davon selbst der Regulation durch solche Modifikationen [14, 53, 54], so dass eine strikte Kontrolle dieser Prozesse von immenser Bedeutung ist. Erfolgt die finale Aktivierung eines Proteins jedoch erst nach mehrfacher Modifikation, so kann der Effekt von fälschlicherweise übertragenen PTMs abgeschwächt oder sogar verhindert werden. Ein Beispiel für solch eine systematische Modulierung anhand bestimmter PTM-Muster liefert beispielsweise das Tumorsuppressorprotein p53. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Modifikationen in diesem Protein nachgewiesen, darunter Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung,

SUMOylierung, O-Glykolisierung und Ubiquitinylierung [55, 56]. Häufig treten bestimmte PTMs zusammen auf, so dass eine gegenseitige Modulation vermutet wurde. 2012 demonstrierten Gu et al. dann sogar, dass einzelne PTM-Muster verschiedenen molekularen Funktionen zugeordnet werden können [57]. Abb.1.2.3 zeigt exemplarisch vier der berichteten PTM-Profile und die dadurch modulierte Funktion.

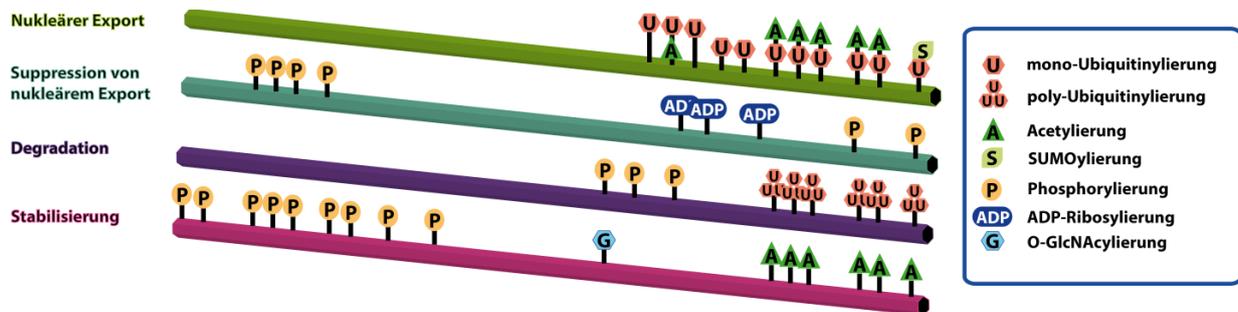


Abb.1.2.3.: Exemplarische Übersicht über ausgewählte PTM-Muster des Tumorsuppressorproteins p53 und der jeweilig zugeordneten molekularen Funktion. Abbildung modifiziert nach Gu et al. [57]

Ähnliche Zusammenhänge wurden auch in Histonen nachgewiesen [58, 59] und trotz der unterschiedlichen Aufgabe beider Proteinklassen, wurden Beispiele gefunden, in denen identische PTM-Muster ähnliche Funktionen initiierten [60]. Dies erklärt sich vermutlich durch die jeweiligen physikochemischen Eigenschaften der einzelnen PTMs. Beispielsweise können Lysin-Acetylierung oder auch Phosphorylierungen die Ladung eines Proteins verringern und wirken auf diesem Weg modulierend auf die Interaktion mit stark negativ geladenen Molekülen wie z.B. der DNA. Zudem können bestimmte PTM-Muster die Andockstelle für weitere Interaktionspartner bilden, so dass Proteine mit spezifischen Erkennungsdomänen nur an diese zuvor modifizierten Stellen rekrutiert werden. Am besten untersucht sind diese Vorgänge aktuell für nukleäre Proteine und in Zusammenhang mit Transkriptionsprozessen [61, 62], was die Auslegung als generellen PTM-Code schwierig macht. Selbst ein deutlich eingeschränkter Begriff wie „Histon-Code“ oder „Tubulin-Code“ [63] lässt nur in Einzelfällen eine generalisierte Aussage zu, bei der ein bestimmtes PTM-Muster mit einer daraus resultierenden Proteinfunktion verknüpft werden kann [60]. Dies lässt erahnen, dass man sich mit der Erforschung noch im Anfangsstadium befindet und die Existenz eines solchen Codes sich nur beweisen ließe, wenn man ihn als weitaus komplexeres Netzwerk interpretiert, als zunächst angenommen [58]. Jedoch weisen die bereits gewonnen Erkenntnisse daraufhin hin, dass ein bestimmtes Protein durch das jeweilige Gesamtmuster an PTMs gesteuert wird und dies auch immer vom zellulären Kontext abhängig ist. Dies ermöglicht erst die sinnvolle und vielseitige Regulation. Zudem bedeutet der kombinatorische

Einsatz von PTMs unbestreitbar eine Zunahme an Spezifität und ermöglicht ein präzises „Fein-Tuning“ zellulärer Abläufe, was das Verständnis dieser Vorgänge unverzichtbar macht.

1.3. METHODEN DER PROTEOMIK

1.3.1. MASSENSPEKTROMETRIE

Für die Analyse von Proteinen und besonders im Hinblick auf PTMs hat sich die Massenspektrometrie (MS) in den letzten Jahren als die Methode der Wahl etabliert, da diese Technik es erlaubt Proteine und Peptide auch in hoch komplexen Gemischen zu identifizieren und neben einer quantitativen auch eine qualitative Darstellung von dynamischen Prozessen im zellulären Netzwerk erlaubt. Ein Massenspektrometer ist üblicherweise aus drei Hauptkomponenten aufgebaut: der Ionenquelle, einem Massenanalysator, dem Detektor (vgl. Abb1.3.1.1.).

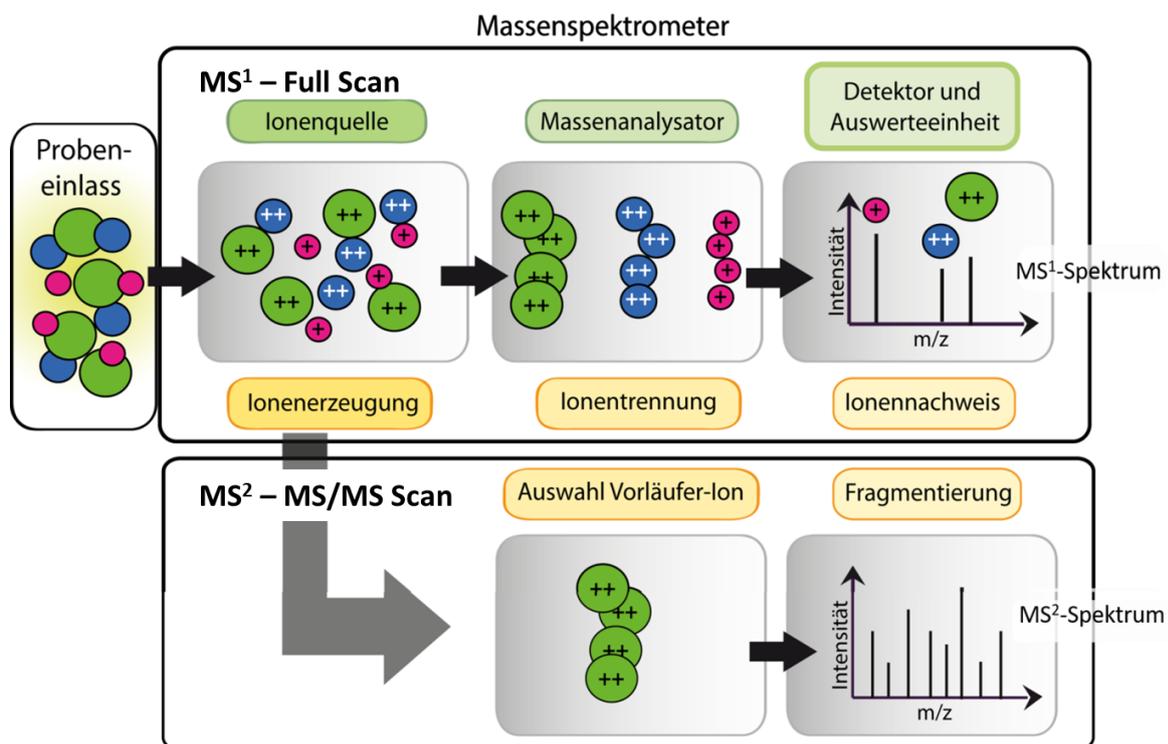


Abb.1.3.1.1.: Klassischer schematischer Aufbau eines Massenspektrometers und typischer Ablauf einer Analyse. Nach dem Probeneinlass, werden die Analyten in der Ionenquelle in die Gasphase überführt und ionisiert, im Massenanalysator können sie dann anhand ihrer verschiedenen m/z Werte aufgetrennt und schließlich vom Detektor aufgezeichnet werden (MS¹ Scan oder Full Scan). Die Auswerteeinheit kombiniert dann die gesammelten Informationen zu einzelnen Spektren. Zusätzlich können aus den detektierten Vorläufer-Ionen (engl.: precursor) Ionen ausgewählt und erneut isoliert werden. Durch anschließende Fragmentierung werden sie in Produktionen gebrochen, anhand derer Rückschlüsse auf die Identität des ursprünglichen Vorläuferions gezogen werden können (MS² oder MS/MS Scan).

In der Ionenquelle werden die Analyten aus dem festen oder flüssigen Zustand in die Gasphase überführt. Häufig wird sich dazu der Elektrosprayionisation (ESI) bedient, bei der ein flüssiger Analyt durch Anlegen eines elektrischen Feldes in feine Tröpfchen zerstäubt wird [64]. Proteine und Peptide werden bei diesem Vorgang protoniert und können anschließend im Massenanalysator unter Hochvakuum nach ihrem spezifischen Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt und detektiert werden. Aus den hier aufgezeichneten m/z Werten und dem Isotopenmuster kann dann das genaue Molekulargewicht eines Analyten errechnet werden. Zusätzlich können in einem separaten Vorgang Ionen von Interesse in kleinere Produktionen zerlegt werden. Da dazu im Allgemeinen ein vorangegangener MS Scan nötig ist, wird dieser Vorgang als MS^2 oder auch MS/MS Scan bezeichnet. Die entstandenen Fragmente korrelieren unter Berücksichtigung der Kollisionsart mit der Primärstruktur des jeweiligen Vorläuferions, so dass diese Information zur Identifizierung des Analyten genutzt werden kann. Die Anwendung auf intakte Proteine (Top-Down Experiment) ist jedoch auf Grund ihrer hohen Molekülmasse technisch anspruchsvoll, so dass sich vielfach sogenannte Bottom-Up Ansätze (engl.: von unten nach oben) durchgesetzt haben. Dabei werden Proteine durch einen proteolytischen Verdau in definierte Peptide geschnitten, die auf Grund ihrer geringeren Länge leichter aufzutrennen, zu ionisieren und zu fragmentieren sind. In der Proteomik haben sich vor allem kollisionsinduzierte Dissoziation (engl.: *collision induced dissociation*, CID) und die *higher energy collisional dissociation* (HCD) durchgesetzt. Beim CID werden die durch ESI protonierten Vorläuferionen im elektrischen Feld beschleunigt und kollidieren im Anschluss daran mit inerten Gasmolekülen, wobei meist Stickstoff verwendet wird. Die eingesetzte Kollisionsenergie (engl.: *collision energy*, CE) wird beim Zusammenstoß mit den Peptidmolekülen in Vibrationsenergie umgewandelt, welche sich gleichmäßig über das Molekül verteilt. Dieser energetisch angeregte Zustand wird durch Fragmentierung wieder ausgeglichen, so dass es beim Übersteigen der Bindungsenergie zum Bruch der Bindung kommt. In einem Peptid sind die Amidbindungen meist die schwächsten Bindungen, welche dann als erstes brechen, wodurch beim CID meist y- und b-Ionen entstehen (siehe auch Abb.1.3.1.2. A). Bei der HCD-Fragmentierung wird eine höhere Wechselspannung an die Kollisionszelle angelegt, so dass die Peptidionen auf höhere Energien beschleunigt werden können. Dadurch entstehen nicht zwangsläufig mehr Fragmentionen, sie können aber über einen breiten Massenbereich hinweg effizienter in der Kollisionszelle stabilisiert werden [65], so dass häufig ein besseres Fragmentierungsmuster als bei CID entsteht [66]. Bei ausreichend guter Qualität des Spektrums korrelieren die

entstandenen Fragmentationen mit der jeweiligen Aminosäuresequenz des Peptids (siehe Abb.1.3.1.2. A).

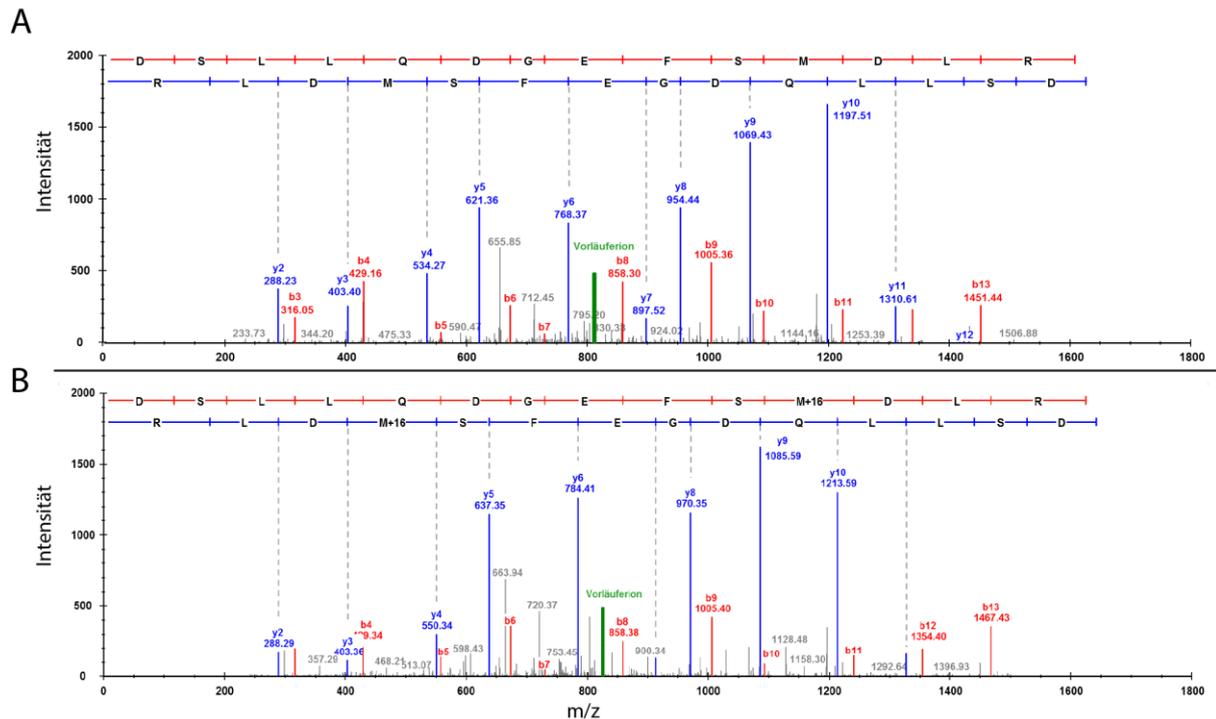


Abb.1.3.1.2.: Fragmentationenspektren des unmodifizierten Peptids DSSLQDGEFSMDLR und des oxidierten Pendant DSSLQDGEFSM_{ox}DLR . (A) Durch die gezielte Kollision mit inerten Stoßgasen (z.B. N₂ oder He) können Peptide im Massenspektrometer fragmentiert werden. Welche Fragmentationen dabei entstehen (in der Abb. hauptsächlich b- und y-Ionen) hängt maßgeblich von der verwendeten Kollisionsart ab. Zudem korrelieren die jeweiligen Fragmentationen-Massen mit bestimmten N- und C-terminalen Teilsequenzen des Peptids: so spiegelt beispielsweise die Masse des y₄-Ions die Sequenz RLDM⁺ + H₂O (~ 534 Da) wider und das b₁₃-Ion entspricht der Masse der nahezu kompletten Aminosäuresequenz DSSLQDGEFSMDL⁺. Je mehr Fragmentationen entstanden sind, desto genauer kann die Berechnung der ursprünglichen Aminosäuresequenz durchgeführt werden, da im Idealfall die Differenz zweier Fragmentationen derselben Serie (z.B. b₈ und b₉) die Masse der jeweiligen Aminosäure ergeben sollte (1005.36 – 858.30 Da = 147.06 Da, Phenylalanin an Position 9). (B) Darüber hinaus können auch PTMs lokalisiert werden, da sie die Masse der modifizierten Aminosäure verändern und damit auch die Gesamtmasse des Vorläuferions. Auch die Fragmentationen b₁₁ bis b₁₃ sowie y₄ bis y₁₀ zeigen diesen Massenshift, so dass die Aminosäure an Position 11 (bzw. an Position 4 vom C-terminalen Ende gesehen) oxidiert vorliegen muss.

Massenspektrometrische Analysen wurden in den letzten Jahren intensiv in der Proteinanalytik und der Proteomforschung besonders im Hinblick auf die Detektion von post-translationalen Modifikationen genutzt. Die meisten PTMs verändern das Molekulargewicht des jeweiligen Peptids um eine charakteristische Masse: eine Oxidierung führt z.B. durch die Addition eines Sauerstoffatoms zu einer Zunahme der molekularen Masse um 15,99 Dalton (Da) und die artifizielle Umformung von Glutaminsäure zu Pyroglutamat bedingt die Abnahme um 17,02 Da. Mit der in den letzten Jahren erreichten hohen Präzision von

Massenspektrometern - im Hinblick auf Auflösung und Messgenauigkeit - gelingt die Detektion auf wenige ppm genau, was eine eindeutige Identifikation der jeweiligen PTM erleichtert. Zusätzlich kann aus einem qualitativ hochwertigen Fragmentspektrum die genaue Aminosäure bestimmt werden, die durch eine PTM modifiziert wurde (siehe Abb.1.3.1.2. B). Eine maßgebliche Limitierung der massenspektrometrischen Analyse wird durch das jeweils betrachtete Proteom selbst begründet: in einer komplexen biologischen Probe, wie beispielsweise in dem Lysat humaner Zellen, können bis zu 10,000 Proteine existent sein [17]. Durch den proteolytischen Verdau können daraus mehrere hunderttausend Peptide generiert werden [67]. Eine Identifikation aller Komponenten ist bei einer direkten Probenaufgabe in das Massenspektrometer jedoch nicht möglich, so dass meist eine chromatographische Auftrennung vorgeschaltet wird [68].

1.3.1.1. DATENANALYSE UND STATISTIK

Nach der massenspektrometrischen Analyse werden alle akquirierten Spektren in einer Datei gespeichert, welche dann als sogenannte Rohdaten gegen die jeweilige Datenbank abgeglichen werden müssen. Ziel ist es, diejenigen Spektren zu identifizieren, deren Vorläufermasse und Fragmentenmuster zu Peptiden aus der Datenbank passt. Da eine händische Auswertung auf Grund der enormen Anzahl an aufgenommenen Spektren kaum möglich ist, werden dazu häufig Auswertesoftware eingesetzt, wie z.B. der Proteome Discoverer (Thermo Scientific). Zunächst wird dabei ein Suchrahmen festgelegt, der spezifische Informationen über die Probe enthält, z.B. die Taxonomie der verwendeten Spezies, besondere Probenvorbereitungsschritte, wie z.B. die Verdauspezifität, und zu erwartende Modifikationen. Das Kernelement der Software bildet ein Suchalgorithmus, wie beispielsweise der in dieser Arbeit verwendete MASCOT™ (Version 2.4.1.) Server [69], der diese Information nutzt, um die Spektren auf mögliche Peptidübereinstimmungen (engl.: *match*) zu überprüfen. Durch die angegebenen Parameter kann der Suchalgorithmus auch Peptide identifizieren, die durch eine PTM in ihrem Molekulargewicht verändert wurden. So zeigt ein phosphoryliertes Peptid beispielsweise eine Erhöhung der Molekülmasse um 79,9663 Da und auch die korrespondierenden Fragmenten unterscheiden sich im Vergleich zum unphosphorylierten Analogon.

In einer typischen Top10 Analyse wird ein von der LC eluierender Peak zunächst in einem Full Scan aufgezeichnet, gefolgt von mehreren MS/MS Scans zur Fragmentierung der zehn intensivsten Ionen des MS¹ Scans. Bei einer maximalen Füllzeit von 50 ms für den Full Scan sowie 250 ms pro MS² Scan ergibt sich ein Messzyklus (engl.: *cycle time*) von 2,55 s, so dass

für einen Peptidpeak, der üblicherweise über einen Zeitraum von etwa 20 Sekunden eluiert, theoretisch mindestens 7 Datenpunkte detektiert werden können. Ein Fragmentionenspektrum wird jedoch nur dann aufgezeichnet, wenn die Intensität des Ions im Vergleich zu anderen zeitgleich eluierenden Ionen zu den zehn höchsten zählt. Die Fragmentierung erfolgt so zu einem Zeitpunkt, zudem ausreichend Ionen vorhanden sind und somit auch intensive Produktionen entstehen können, was in Folge des qualitativ hochwertigen erzeugten Spektrums zu einer guten Identifizierungsrate in der Datenanalyse führt. Auf Grund der enormen Datenmengen ist eine manuelle Auswertung aller Spektren nicht realisierbar, so dass spezialisierte Algorithmen eingesetzt werden, die experimentell erzeugte Spektren mit theoretischen Fragmentionenspektren einer Datenbank abgleichen. Anhand einer Qualitätsnote (bei vielen Algorithmen als *Score* bezeichnet) kann dann abgeschätzt werden, welche theoretischen Peptidsequenzen am besten zu den eingepflegten Spektren passen. Eine solche Wahrscheinlichkeits-gestützte Datenbanksuche birgt trotz der hohen Messgenauigkeit das Risiko einer falsch-positiven Zuordnung von Spektrum zu Peptidsequenz (engl.: *PSM, peptide to spectrum match*). Auf Grund der enormen Datenmengen, die eine manuelle Validierung unmöglich machen, wurden auch hier bioinformatische Lösungen etabliert, die eine statistische Beurteilung für das Auftreten von falsch-positiven Peptididentifikationen in einem Datensatz erlauben. Elias et al. entwickelten dafür die sehr häufig genutzte Berechnung der Falsch-Positiv-Rate (engl.: *false discovery rate, FDR*) [70-72]. Dabei wird der experimentelle Spektrensatz gegen eine sogenannte target/decoy Datenbank abgeglichen, die nicht nur die möglichen richtig-positiven (target-Sequenzen), sondern zusätzlich randomisierte und rückwärts gelesene Sequenzen enthält (decoy-Sequenzen) [72, 73]. Der Anteil der ermittelten Decoy-Hits an der Gesamtheit aller Identifikationen kann als Maß für das Auftreten von falsch-positiven Hits verwendet werden. Ziel ist es, einen Score-Schwellenwert zu definieren, bei dem die verbleibende Anzahl an Decoy-Hits nur noch einen festgesetzten Anteil (meist <1%) an der Zahl der Gesamthits ausmacht (vgl. Abb.1.3.1.1.1. A). Die Berechnung beruht dabei auf der Annahme, dass, wenn Decoy-/ und Target-Datenbank die gleiche Größe aufweisen, auch die Anzahl an Falsch-Positiven innerhalb von target-/ und decoy-Sequenzen gleich verteilt sind (vgl. Abb.1.3.1.1.1. B) [72, 74]. Da alle Einträge der decoy-Datenbank grundsätzlich falsch sind, ist die Anzahl der Decoy-Falsch-Positiven innerhalb aller identifizierten Sequenzen bekannt und entspricht dem Anteil der Target-Falsch-Positiven. Die FDR wird dabei vom jeweiligen Nutzer des Suchalgorithmus festgelegt und liegt üblicherweise bei <1%, in manchen Fällen bei bis zu 5%.

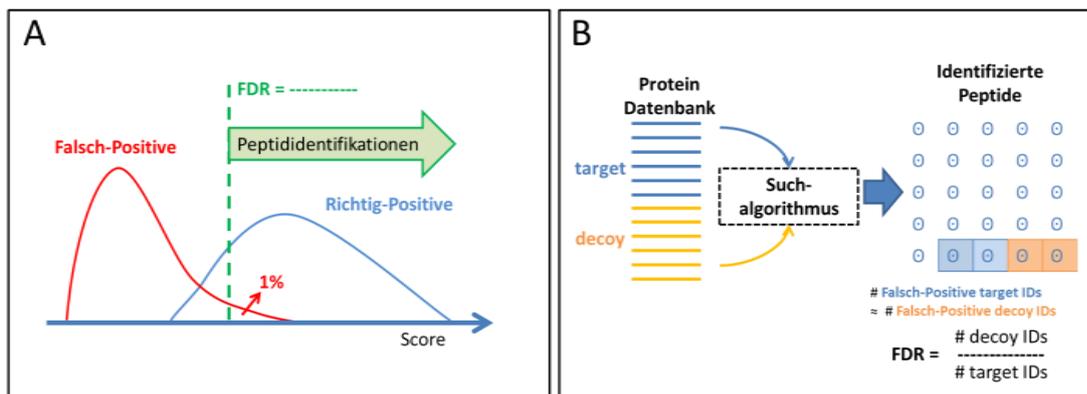


Abb.1.3.1.1.1.: Statistische Beurteilung von Peptididentifikationen anhand der False-Discovery-Rate (FDR). A) Für jeden spektralen Datensatz wird ein Decoy-Datensatz erstellt, der randomisierte und rückwärtsgelesene Sequenzen aus der verwendeten Datenbank enthält. Anschließend wird der zu verwendende Score so festgelegt, dass die finalen Peptididentifikationen nur noch Einträge enthalten, bei denen der Anteil an Falsch-Positiven unter 1% liegt. Dies ist eine häufig verwendete statistische Methode in der Proteomik, um valide Datensätze zu erhalten und die Wahrscheinlichkeit für richtig-positive Identifikationen zu erhöhen. B) Durch Generierung einer target-decoy-Datenbank, kann der Anteil an Falsch-Positiven-target-IDs anhand dem bekannten Anteil an Falsch-Positiven-decoy-IDs bei festgelegter FDR bestimmt werden.

Auch wenn diese Methode in der Proteomik als probates Mittel zur Steigerung der Validität erhaltener Datensätze genutzt wird, muss die Tauglichkeit in den Bezug auf das individuelle Experiment beurteilt werden. So können beispielsweise die ausgewählten Toleranzbereiche für Vorläufer- und Fragmentenmassen, Analysen von niedrig komplexen Peptidgemischen bei hohem Suchraumen oder die fehlende Klassifizierung nach Subspezies (wie z.B. PTM-tragende Peptide) die Ergebnisse verfälschen [73, 75]. Um von der erhaltenen Peptidliste Rückschlüsse auf ein korrespondierendes Protein ziehen zu können, werden meist nur in dem betrachteten Organismus einmalig vorkommende Peptide (engl.: *unique peptides*) berücksichtigt, je nach Ziel der Analyse zum Teil auch nur, wenn mindestens zwei solcher Peptide pro Protein identifiziert wurden. In der finalen Dateninterpretation erfolgt dann mittels spezieller Software und diverser Datenbanken eine umfassende Eingliederung der identifizierten Proteine in bereits bekannte biologische Zusammenhänge und möglicherweise die Ergänzung dieses Wissenstandes. Dies ist eine zeitaufwändige und sehr komplexe Aufgabe, bei der zusammengestellte Informationen aus verschiedensten wissenschaftlichen Disziplinen genutzt werden. So können Erkenntnisse aus dem gesamten „omik“-Sektor herangezogen gezogen, darunter beispielsweise Genomik, Transkriptomik, Interaktomik, Systemik sowie bioinformatische Modellierungen, um letztendlich eine zuvor gestellte biologische Fragestellung zu beantworten. Trotz der immensen technischen Fortschritte und der mittlerweile etablierten weltweiten Konnektivität, stellt dies dennoch den

anspruchsvollsten Schritt dar und nicht selten müssen gewonnene Erkenntnisse durch komplementäre wissenschaftliche Ansätze validiert werden. Trotz allem ist es auf diesem Weg gelungen beispielsweise bereits bekannte Signalwege um neue Komponenten zu ergänzen oder neue zelluläre Abhängigkeiten aufzudecken.

Alle gefundenen Peptididentifikationen, also die Übereinstimmung eines experimentell erzeugten Spektrums mit einem theoretisch zu erwarteten Spektrum eines Peptids, werden in einer Ausgabe-Datei präsentiert. Diese enthält umfangreiche Information u.a. über die identifizierte Peptidsequenz, das zugehörige Protein und die jeweils detektierten Modifikationen (siehe Abb.1.3.1.1.2.).

Peptides	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	IonScore	Exp Value	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]	# Missed Cleavages
1	AAAAPNGRASAPR	1	1	1	Q9HC07		0.0000	26	3.6E-002	3	1266.67865	9.80	13.29	1
2	AADAFAEVALNRR	1	1	1	P06753		0.0000	26	4.5E-002	3	1472.74436	-0.63	19.88	1
3	AEEEEDEADPKR	1	1	1	P20962		0.0000	28	2.3E-002	2	1359.60283	0.35	8.10	1
4	AAGHPGDPESQQR	1	1	1	Q9Y490		0.0000	35	6.6E-003	2	1349.61919	-0.11	7.34	0
5	AHHFFDTLPELPSSELGR	2	1	1	Q15833	C10(Carbamidomethyl)	0.0000	48	4.2E-004	2	2308.11064	1.67	39.31	0
6	AALSEELEKK	2	1	1	Q04637		0.0000	43	8.1E-004	2	1246.65227	-0.26	18.43	1
7	AANGVPLATEKK	2	1	1	P25787		0.0000	72	5.9E-007	2	1200.69402	-0.59	15.47	1
8	AANVLLSEHVEK	2	1	1	Q9Y6E0		0.0000	53	6.3E-005	2	1366.73296	0.28	20.68	0
9	AATALKDVK	1	1	1	Q15084		0.0000	59	9.4E-006	2	1015.61406	-0.61	17.82	1
10	AATSDLEHYDK	1	1	1	P80303		0.0000	38	2.4E-003	2	1249.56938	-0.14	17.51	0
11	AcEFAGFQcQIQFGPHNEQK	1	1	1	Q9Y490	C2(Carbamidomethyl); C9(...)	0.0000	45	1.2E-003	3	2396.05350	-0.53	31.31	0
12	ADAESESLNSRKK	2	1	1	Q9Y490		0.0000	64	7.1E-006	2	1520.68254	0.09	14.26	1
13	ADDGRPPQVIK	2	1	1	P04075		0.0000	34	6.6E-003	3	1342.71027	-0.88	24.54	0
14	ADDKETFAEEGK	2	1	1	P02768	C7(Carbamidomethyl)	0.0000	69	2.2E-006	2	1499.63103	-0.61	16.49	1
15	ADDLGKGNVESTK	1	1	1	P00441		0.0000	25	6.4E-002	2	1420.65495	-0.12	7.84	1
16	ADFLIHHYAGK	1	2	1	P35579	C4(Carbamidomethyl)	0.0000	39	2.8E-003	2	1294.62517	0.20	27.98	0
17	adPFDORVSDDEKVR	2	1	1	P52907	N-Term(Acetyl)	0.0000	58	3.6E-005	3	1722.79135	-0.97	24.55	2
18	ADINTOADPYTTTKR	1	1	1	O9UI88		0.0000	34	1.0E-002	3	1694.83390	-0.33	19.08	1

Abb. 1.3.1.1.2.: Exemplarisches Beispiel einer Ausgabedatei des Proteome Discoverers 1.3. Die aus den spektralen Roh-Daten identifizierten Peptide werden in tabellarischer Form aufgelistet, zusätzlich sind Informationen über Molekülmasse, zugehöriges Protein oder gefundene Modifikationen enthalten. Die Einträge können beliebig sortiert und gefiltert werden und schließlich in eine Microsoft Excel Datei exportiert werden.

Der vergebene Score ermöglicht es dabei, die Peptidliste im Vorfeld zu filtern und so die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Treffer zu verringern. Grundsätzlich wurden in dieser Arbeit nur Peptide berücksichtigt, die eine FDR von unter 1% haben und damit als statistisch valide gelten. Um die dennoch teils enormen Datenmengen in anschaulichen Ergebnissen zusammenzufassen, werden die Ausgabedateien anschließend als Microsoft Excel Dateien exportiert und können dann nochmals je nach Fragestellung bearbeitet werden.

1.3.2. FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE

Mit Hilfe der Flüssigchromatographie können komplexe Substanzgemische aufgetrennt und zudem über Standards auch identifiziert und quantifiziert werden. Dabei interagieren die in der mobilen Phase gelösten Analyten mit der stationären Phase und werden auf Grund ihrer jeweiligen physikochemischen Eigenschaften unterschiedlich lange retardiert, so dass die

Substanzen zu definierten Retentionszeiten eluieren. Gegenwärtig werden solche Auftrennung oft mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: *high performance liquid chromatography*, HPLC) bewerkstelligt, wobei sich in der Proteomik in den letzten 20 Jahren auch deren miniaturisierte Form, die nano-HPLC (engl.: *nano high performance liquid chromatography*), durchgesetzt hat [76]. Beide Techniken folgen den Prinzipien der klassischen Flüssigchromatographie, wobei Probenaufgabe und Trennung automatisiert in eigens konstruierten, programmierbaren HPLC-Systemen geschieht und der Flüssigkeitsstrom auch bei extremen Gegendrücken durch Hochleistungspumpen exakt gesteuert werden kann. Nano-LCs zeichnen sich dabei durch geringere Trennsäulendurchmesser von 50-100 μm und eine damit verbundene, verminderte Flussrate von wenigen hundert Nanolitern pro Minute aus. Dies erlaubt die Verwendung geringer Peptidmengen, was auf Grund begrenzter Probenmengen in der Bioanalytik generell von Vorteil ist, und gewährleistet dennoch eine erhöhte Sensitivität, da kleinere Partikel die Trennschärfe erhöhen. In Bottom-Up Ansätzen besteht die stationäre Phase üblicherweise aus einem hydrophoben C18-Material, welches als wenige μm große Partikel (üblicherweise $<2 \mu\text{m}$) in eine chromatographische Säule eingebracht wurden. Im Verlauf der chromatographischen Auftrennung werden die Analyten zunächst auf das Säulenbett aufgeladen und anschließend mittels eines binären Gradienten, durch den kontinuierlich zunehmenden Anteil an organischem Lösungsmittel (meist Acetonitril), nach aufsteigender Hydrophobizität eluiert. Durch Zusatz eines Ionenpaarreagenzes (meist Trifluoressig-/ oder Ameisensäure), wird die Eigenladung der Peptide maskiert und deren Hydrophobizität erhöht. Dadurch werden unspezifische Wechselwirkungen der ionischen Peptidseitengruppen mit den freien Silanolgruppen der stationären Phase vermindert, was zur Vermeidung einer Peakverbreiterung beiträgt und somit die Trennschärfe erhöht. Da die mobile Phase polarer als die stationäre Phase ist, wird diese Art der Auftrennung als Umkehrphasen-Chromatographie (engl.: *reverse phase*, RP) bezeichnet. Die Zusammensetzung der Lösungsmittel erlaubt dabei eine direkte Kopplung mit der von Fenn et al. etablierten ESI [77], durch die Peptide schonend in die Gasphase überführt und somit für eine massenspektrometrische Analyse zugänglich gemacht werden können. Durch die chromatographische Aufkonzentrierung und die „online“ Kopplung mit einem Massenspektrometer lassen sich so sehr geringe Probenmengen im femto-/ bis attomol-Bereich nachweisen [78]. Neben solchen eindimensionalen Systemen, können auch mehrere chromatographische Systeme miteinander kombiniert werden. Dabei sind diagonale Systeme, bei denen zwei gleiche chromatographische Phasen eingesetzt werden, ebenso wie orthogonale Strategien beschrieben worden. Letztere kombiniert chromatographische

Trenntechniken, die Peptide nach möglichst unterschiedlichen Eigenschaften separieren, wie beispielsweise die *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT) [79, 80]. Je nach Auswahl der verwendeten Techniken können diese direkt mit MS gekoppelt werden, aber auch als „offline“-Präfraktionierung eingesetzt werden, um die Probenkomplexität zu reduzieren und damit den dynamischen Bereich in der massenspektrometrischen Analyse zu erhöhen.

1.3.2.1. STARKE KATIONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE

Bei der starken Kationenaustauschchromatographie (engl.: *strong cation exchange chromatography*, SCX) wird eine salzhaltige, saure mobile Phase mit einem pH Wert unter 3 eingesetzt. Die stationäre Phase besteht aus polymeren Harzen, die mit negativ geladenen funktionellen Gruppen gekoppelt werden. Die Verwendung von Sulfoethylaspartamidgruppen hat dabei den Vorteil, dass es auch zu hydrophilen Wechselwirkungen mit den Analyten kommt und somit hydrophobe Interaktionen minimiert werden. Dies führt zu weniger Probenverlust und Peakverbreiterung als mit Trägermaterialien, bei denen die Auftrennung beispielsweise mit Sulfopropylgruppen bewerkstelligt wird [81]. Generell wird eine SCX-Auftrennung üblicherweise dem proteolytischen Verdau nachgeschaltet, durch den der Großteil der generierten Peptide bei pH 2,7 einen Ladungszustand von +2 aufweist. Durch post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Acetylierung können aber auch einfach geladene Peptide auftreten oder bei Vorhandensein von überlesenen Schnittstellen oder Histidinen Ladungszustände von +3 oder höher erreicht werden. Eine Elution kann über Erhöhung der Salzkonzentration erreicht werden und/oder auch durch Änderung des pH-Wertes. Dabei konkurrieren die Peptide mit den Kationen der mobilen Phase um die Bindestellen auf der Matrix und werden bei ansteigender Salzkonzentration verdrängt. Die Bindung der Peptide ist dabei umso stärker je höher sie geladen sind. Auch durch Änderung des pH-Wertes kann eine Elution erreicht werden, da sich die Affinität zur Austauschermatrix durch Änderung des Ladungszustandes vermindert. Häufig wird eine SCX-Auftrennung in einem zwei-dimensionalen Ansatz zur Reduktion der Probenkomplexität eingesetzt (siehe Abb.1.3.2.1.1.), wobei über den Verlauf des Gradienten eine Fraktionierung erfolgt (1. Dimension). Die Fraktionen werden anschließend mittels RP-Trennung der massenspektrometrischen Analyse unterzogen (2. Dimension). Dieses Vorgehen hat sich bewährt, da die SCX-Auftrennung durch den Salzgehalt nicht direkt kompatibel mit MS ist und meist ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt notwendig ist.

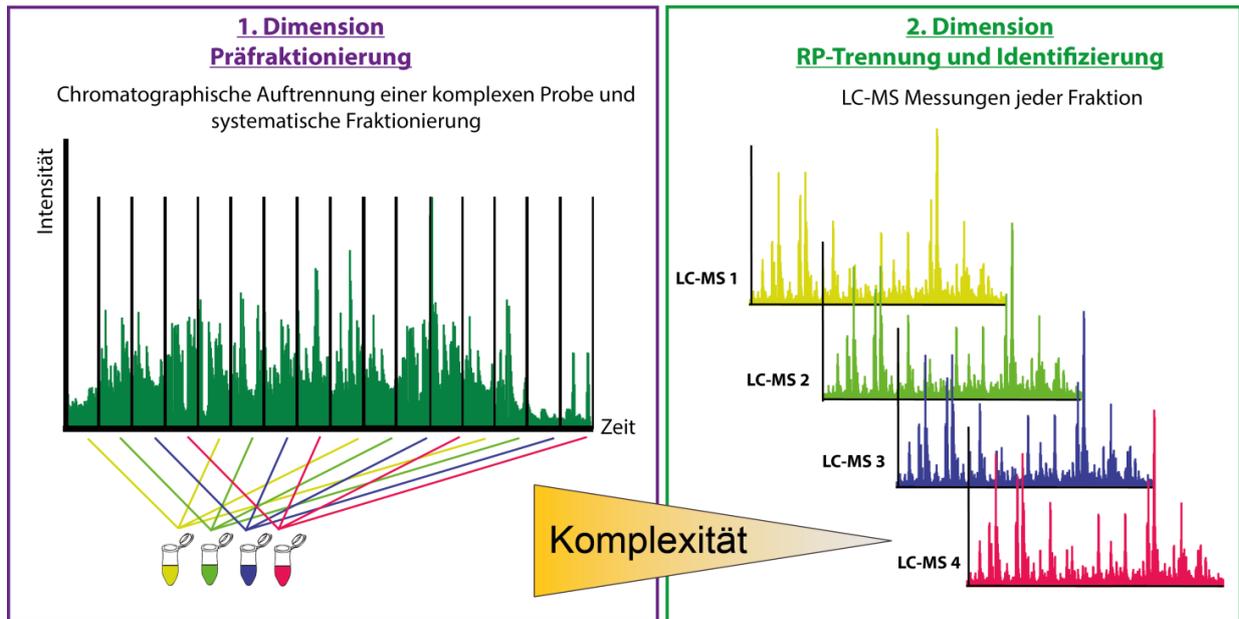


Abb.1.3.2.1.1.: Schematische Darstellung einer zwei-dimensionalen Auftrennung. Eine komplexe Probe wird auf eine Trennsäule (z.B. Kationen-, Anionenaustauscher oder high pH RP) geladen und die eluierenden Peptide in definierten Zeitintervallen gesammelt. Optional können die Fraktionen systematisch vereinigt werden, um die Anzahl der anschließenden LC-MS Messungen zu verringern. Generell empfiehlt sich, die Trennsäule der Präfraktionierung sowie der LC-MS-Messung möglichst orthogonal auszuwählen, so dass die Probenkomplexität von der ersten zur zweiten Dimension gleichmäßig reduziert wird.

Es bietet sich hierbei an, in der ersten Trennung eine größer dimensionierte Säule mit mehr Probenmaterial zu beladen (meist 20-50 μg), so dass diese Menge dann über eine geeignete Anzahl an Fraktionen verteilt und im nachfolgenden nano-LC-MS Setup nur noch wenige μg Probe pro Fraktion analysiert werden. Generell können für die erste Dimension auch andere chromatographische Systeme, wie Anionenaustauscher oder high pH RP verwendet werden, so dass diese Methode besonders geeignet ist, um ein Proteom global zu analysieren und gleichzeitig die Komplexität durch Aufteilung in einzelne Fraktionen zu reduzieren. Zudem liefern die verwendeten Trennungsmechanismen der ersten Dimension wichtige Zusatzinformationen bezüglich Ladung oder Hydrophobizität der Peptide. Auch bei PTM-fokussierten Proteomstudien werden solche zwei- oder mehr-dimensional aufgebauten Präfraktionierungen genutzt [82], um ausgewählte Peptidspezies (z.B. phosphorylierte Peptide) für die massenspektrometrischen Analyse zu isolieren. Diese Anreicherungstechniken werden im Abschnitt 1.3.4.1. eingehend beleuchtet.

1.3.3. QUANTIFIZIERUNG UND LABELING

In der Proteomik ist die differentielle Analyse zweier Zellzustände, z.B. in Hinblick auf pathophysiologische Zustände oder vor und nach spezifischer Stimulation, von essentieller

Bedeutung. Dabei sind in quantitativen Analysen nicht nur Aussagen über die Existenz bestimmter Proteine, sondern auch deren Abundanz von Belang. Allerdings zeigen proteolytisch generierte Peptide, auf Grund der stark variierenden physikochemischen Eigenschaften wie Größe, Ladung oder Hydrophobizität, zum Teil sehr unterschiedliche Resonanzen in der massenspektrometrischen Analyse, so dass nicht zwangsläufig eine quantitative Aussage über die korrespondierende Proteine gewonnen werden kann [83]. Der quantitative Vergleich identischer Peptide über mehrere Experimente kann wiederum nur gelingen, wenn sowohl in der Probenvorbereitung als auch in der finalen Analyse systematische, sowie nicht-systematische Fehler weitestgehend ausgeschlossen werden. Dies bedingt eine kleinstmögliche Anzahl an experimentellen Schritten und deren nachgeschaltete Kontrolle bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit [83]. Oftmals haben sich wegen der höheren Robustheit Quantifizierungsstrategien entwickelt, die auf stabiler Isotopenmarkierung (engl.: *stable isotope labeling*, SIL) basieren. Meist werden dafür Peptide mit einem sogenannten Tag (engl. für Markierung, Etikett) versehen, der sich für jeden zu betrachtenden Zustand in seiner Zusammensetzung an ^{13}C , ^{15}N und / oder ^{18}O -Atomen unterscheidet. Dies erlaubt eine Vereinigung (engl.: *multiplexing*) der Proben, da differentiell markierte Peptide durch die unterschiedliche Isotopenzusammensetzung in der massenspektrometrischen Analyse unterscheidbar bleiben. Chemisch gesehen sind sie jedoch identisch, so dass sie sich nur minimal in ihrer Retentionszeit, Peakbreite oder Ionisierungseffizienz unterscheiden. Dies bringt verschiedene Vorteile mit sich: (i) zum einen können die vereinigten Peptidgemische als eine Probe weiter behandelt werden, was den experimentellen Aufwand für alle nachgeschalteten Schritte (z.B. Anzahl der LC-MS Messungen) reduziert. (ii) Auch die Menge an eingesetztem Startmaterial kann häufig verringert werden, da sich das benötigte Quantum, beispielsweise für eine Präfraktionierung, anteilig aus allen verwendeten Proben zusammensetzt. Dies ist besonders für limitierte Probenmengen wie Primärgewebe oder Patientenproben von Vorteil. (iii) Zudem zeigen die differentiell markierten Peptide in der vereinigten Probe ein identisches chromatographisches Verhalten. So eluieren sie sowohl bei chromatographischer Präfraktionierung als auch bei der finalen LC-Auftrennung zum gleichen Zeitpunkt und die Quantifizierung kann über ein einzelnes Massenspektrum erfolgen (siehe Abb.1.3.3.1. A). Dies macht die Quantifizierung im Vergleich zur separaten Messung der jeweiligen Proben weniger störanfällig gegenüber Messschwankungen, was zu validen und leichter reproduzierbaren Ergebnissen führt.

In den letzten Jahren wurden verschiedene SIL-Tags etabliert, mit denen eine relative und, bei Verwendung eines internen Standards, auch eine absolute Quantifizierung möglich ist. Häufig verwendet wird beispielsweise die Dimethylierung [84], bei der an primäre Amine, also Peptid-N-Termini und Lysinseitenketten, zwei CH₃-Gruppen addiert werden. Diese Reaktion läuft bei einem leicht basischen pH durch Zugabe von Formaldehyd (CH₂O) und einem leichten Reduktionsmittel wie Natriumcyanoborhydrid (NaBH₃CN) ab. Durch Verwendung derselben Reagenzien, bei denen einige Elemente gegen ihre schwereren Isotope ersetzt wurden, ergibt sich die mittelschwere oder schwere Variante der Dimethylierung, wie im unteren Teil der Abb.1.3.3.1. B dargestellt wurde. Die differentiell markierten Peptide zeigen in der massenspektrometrischen Analyse einen definierten Massenshift von 4 Da, was die Peptide bereits im MS¹ Scan unterscheidbar macht und deren - für die Quantifizierung relevante - Relation zueinander zeigt (siehe Abb.1.3.3.1. B, oben). Die Fragmentierung und damit die Identifikation der Peptidsequenz kann anschließend für eine oder mehrere Varianten separat durchgeführt werden. Durch die eventuell repetitive Akquisition der eigentlich gleichen Aminosäuresequenz kann dies jedoch zu einer Erhöhung der massenspektrometrischen Komplexität und damit einhergehend zu einer reduzierten Identifikationsrate, beispielsweise im Vergleich zu einem markierungsfreien Ansatz, führen. Eine elegantere Lösung wurde 2004 von Ross et al. [85] publiziert, die ebenfalls einen Amin-spezifischen Tag synthetisierten. Dieser war in vier Varianten verfügbar und, im Gegensatz zu den meisten anderen bis dahin verfügbaren Tags, isobar aufgebaut. Dies bedeutet, dass jeder der vier Tag-Varianten dieselbe Molekülmasse hat und damit keinen Massenshift hervorruft. Das hat den enormen Vorteil, dass sich alle markierten Peptidvarianten bis zur Fragmentierung identisch verhalten und erst dann jeder Tag ein spezifisches „Reporter-Ion“ abspaltet, das zur Quantifizierung dient (siehe auch Abb.1.3.3.1. C, oben). Das Grunddesign eines jeden Tags besteht dabei aus 3 Elementen: (i) der Abgangsgruppe, auch als Reporter-Ion bezeichnet, (ii) der Amin-reaktiven Gruppe, die eine Kopplung mit dem Peptid erlaubt und (iii) dem dazwischen befindlichen Balancer, der die Molekülmasse des Gesamtkonstrukts für alle Tags ausgleicht (siehe auch Abb.1.3.3.1. C, unten). Dieses Reagenz wurde später unter dem Marken-Namen iTRAQ (engl.: *isobaric tag for relative and absolute quantification*) in einem kommerziellen Kit vermarktet und wurde seitdem für über 3000 Publikation verwendet (Quelle: National Center for Biotechnological Information, NCBI). In den letzten Jahren wurde die Entwicklung isobarer Tags stetig weiterentwickelt, so dass heute das Multiplexen von acht (iTRAQ 8-plex [86]) und sogar bis zu zehn Proben (TMT 10-plex [87]) möglich ist.

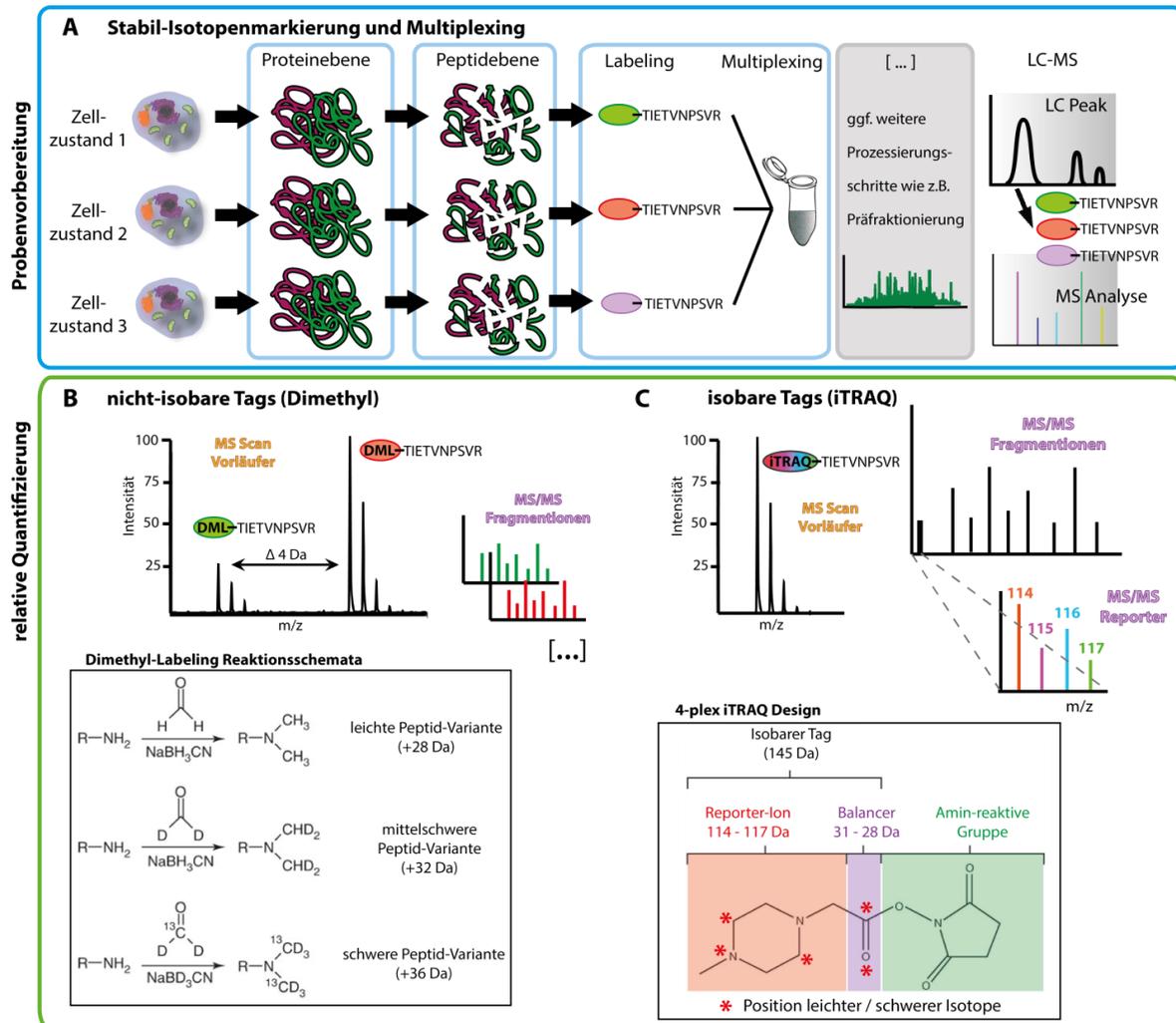


Abb.1.3.3.1.: Schematische Darstellung verschiedener Stabil-Isotopenmarkierungen. (A) Die zu charakterisierenden Zellzustände werden zunächst einzeln aufgearbeitet und erst auf Peptidebene markiert. Anschließend erfolgt die Vereinigung aller Proben (Multiplexing), was ggf. eine weitere gemeinsame Prozessierung erlaubt, da das gleiche Peptid aus verschiedenen Proben im LC-MS unterscheidbar bleibt. Bei der relativen Quantifizierung werden Peptide zwischen zwei oder mehr zu untersuchenden Proben in Relation zueinander verglichen. (B) Nicht-isobare Tags, wie die Dimethylierung, führen dabei zu einem Massenshift, was die Peptide bereits im MS¹ unterscheidbar macht. Durch Austausch einiger Elemente gegen deren schwerere Isotope können bis zu drei verschiedene Dimethyl-Tags erzeugt werden. (C) Isobare Tags haben den Vorteil, dass die Peptide bis zur Fragmentierung im MS/MS nicht unterscheidbar sind. Dabei können, auch bei niedriger Peptidkonzentration in der Ausgangsprobe, qualitativ hochwertige MS¹ und MS² Spektren erzielt werden, da die Intensitäten von der Gesamtanzahl an unterschiedlich markierten Peptidmolekülen bestimmt wird und nur die Reporterionen das individuelle Verhältnis widerspiegeln. Teile der Abbildung modifiziert nach Boersema et al. [84] und Sadowski et al. [88].

Neben den bereits beschriebenen Vorteilen, die auch für andere SIL-basierte Strategien gelten, zeichnet sich iTRAQ zudem dadurch aus, dass es die Komplexität der LC-MS Analyse nicht erhöht. Da die Intensität der Vorläufer- sowie Fragmentionen von der aufsummierten Gesamtanzahl aller differentiell markierten Peptidmoleküle abhängt, können zudem auch

Peptide, die in den Ausgangsproben niedrig abundant vorkommen, mit qualitativ hochwertigen Spektren detektiert werden.

Tab.1.3.3.1.: Zusammenfassung der wichtigsten Unterschiede zwischen verschiedenen Peptidquantifizierungsstrategien.

	Markierungsfreie Analyse	DML (nicht isobar)	iTRAQ / TMT (isobar)
Probenvorbereitung und Analyse	Separate Probenvorbereitung und LC-MS-Messung	Multiplexing nach Labeling und gemeinsame LC-MS-Analyse	Multiplexing nach Labeling und gemeinsame LC-MS-Analyse
Besonderheiten	Zusätzliche Software zur Quantifizierung nötig	Höhere Probenkomplexität in der LC-MS-Messung	Keine erhöhte Probenkomplexität
	Optimale und absolut reproduzierbare LC-MS-Messung nötig	Geringere Menge an Startmaterial notwendig	Geringere Menge an Startmaterial notwendig
	Zeitlich erhöhter Messaufwand		Erleichterte Quantifizierung durch gemeinsame Fragmentierung aller Vorläuferionen

1.3.4. ANREICHERUNGSMETHODEN IN DER PROTEOMIK

Wie im vorhergehenden Abschnitten beschrieben erfolgt der Nachweis von Proteinen in Bottom-Up Experimenten meist über die Identifikation von ein oder mehr Peptiden stammend aus der jeweiligen Proteinsequenz. Dies erlaubt zwar einen guten Überblick über die generelle Identität der existierenden Proteine in dem betrachteten System, lässt jedoch keine Rückschlüsse über PTM-Stöchiometrie, PTM-Crosstalk oder eine umfassende Analyse aller Proteoformen zu. Letzteres beschreibt alle vorkommenden Varianten eines exprimierten Proteins, die sich durch genetische Variation, transkriptionelle Modulation oder in ihrem differentiellen PTM-Auftreten unterscheiden können [89]. Da die meisten zellulären Proteine nur zu einem geringen Anteil durch PTMs modifiziert werden, ist die Wahrscheinlichkeit das korrespondierende Peptid nach einem proteolytischen Verdau neben dem Großteil an unmodifizierten Peptiden zu detektieren sehr gering. Weiterhin ist im Hinblick auf eine gezielte biologische Fragestellung oft die Untersuchung eines Sub-Proteoms sinnvoller. Beispielsweise steht das Ubiquitin-Proteasom-Systems, welches hauptsächlich für den Abbau fehlerhaft gefalteter Proteine zuständig ist, in direktem Zusammenhang mit der Entstehung schwerwiegender neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson [90, 91] oder Amyotrophe

Lateralsklerose (ALS) [92]. Um die regulatorischen Mechanismen dieses Systems eingehend zu studieren, ist daher die Identifikation möglichst aller Zielproteine, die dementsprechend Ubiquitinylierungen tragen, sinnvoll. Dies ist auf Grund der geringen Stöchiometrie in einer globalen Analyse nahezu unmöglich, so dass erst eine gezielte Anreicherung von ubiquitinylierten Peptiden aus einer komplexen Probe die Anzahl gefundener Substrate enorm erhöht und somit aussagekräftige Rückschlüsse über zelluläre Zusammenhänge zulässt [93]. In den letzten Jahren konnte so eine Reihe wichtiger Erkenntnisse aus der Charakterisierung einzelner PTM-Sub-Proteome gewonnen werden [93-96], nach wie vor ist deren Charakterisierung jedoch maßgeblich abhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Anreicherungsverfahren. Bereits seit den 1970er Jahren ist eine Vielzahl an proteinchemischen Methoden bekannt, um modifizierte Aminosäuren aus teils komplexen Proben zu isolieren [97, 98], darüber hinaus wurden auch erste Ansätze der zwei-dimensionalen Chromatographie entwickelt, mit denen es möglich war, modifizierte und unmodifizierte Peptidvarianten zu separieren [99, 100]. Dennoch konnten bis heute nur wenige der Techniken zur Anreicherung von bestimmten PTM-Peptidspezies weiterentwickelt werden. Daher besteht aktuell eine Diskrepanz zwischen der hohen Zahl an bekannten PTMs und der Anzahl an etablierten Anreicherungsverfahren, die sich im Vergleich dazu auf einige wenige beschränkt [101]. Um jedoch umfassende Einblicke in die Relevanz einzelner PTMs zu erhalten, ist der Ausbau dieses Repertoires zwingend erforderlich. Aktuell sind nur einige wenige PTMs wie z.B. die Phosphorylierung sehr gut erforscht, die Bedeutsamkeit anderer Modifikationen kann jedoch auf Grund fehlender Isolierungsmethoden nur unzureichend bewertet werden. Besonders auch im Hinblick auf PTM-Crosstalk spielt dies eine Rolle, da viele Anreicherungstechniken nur für einzelne PTMs spezifisch sind und somit globale Zusammenhänge nicht erkannt werden können. Im nachfolgenden Abschnitt soll ein Überblick über die bestehenden Methoden und ihre Limitierungen gegeben, aber auch diskutiert werden, welche Weiterentwicklungen nötig sind, um die Erforschung von PTMs voranzutreiben.

1.3.4.1. ANREICHERUNG VON PTM-SUBSPEZIES UND ZWEI-DIMENSIONALE CHROMATOGRAPHIE

Das Repertoire an etablierten Methoden zur Anreicherung einzelner PTM-Subspezies lässt sich in den meisten Fällen auf zwei Strategien reduzieren: so können Peptide durch (i) Immunaффinitäts-basierte Verfahren angereichert werden oder es kommen (ii) Chromatographie-gestützte Ansätze zur Anwendung, um modifizierte Peptide von

unmodifizierten abzutrennen. Trotz unterschiedlicher Varianten, zielen sie alle auf nur einige wenige PTM-Spezies ab und oft werden unterschiedliche Ansätze zur alternativen Anreicherung derselben PTM-Klasse genutzt. Die Immunaффinitätsaufreinigung kann theoretisch universell für alle Arten von PTMs eingesetzt werden, aktuell wird sie besonders für die Anreicherung von Lysin-acetylierten [102, 103], Tyrosin-phosphorylierten [104, 105] und ubiquitinylierten Peptiden [93, 106, 107] verwendet. Im letzteren Fall wird der Umstand genutzt, dass durch einen proteolytischen Verdau auch die gesamte, an das Zielprotein angehängte Ubiquitinkette mitverdaut wird und ein Glycin-Glycin-Rest an dem generierten Peptid zurückbleibt (siehe auch Abb.1.3.4.1.1.). Es wird dann ein spezifischer Antikörper verwendet, der durch Bindung an magnetische oder Agarose-Beads (engl.: Kügelchen) immobilisiert wurde [108]. Inkubiert man nun die komplexe, verdaute Probe mit dieser Suspension, werden Ubiquitin-Peptide an den spezifischen Antikörper gebunden. Durch sequentielles Waschen der Beads kann der Überschuss an unmodifizierten Peptiden anschließend abgetrennt werden und man erhält nach Elution der ubiquitinylierten Peptide vom Antikörper ein angereichertes Sub-Proteom.

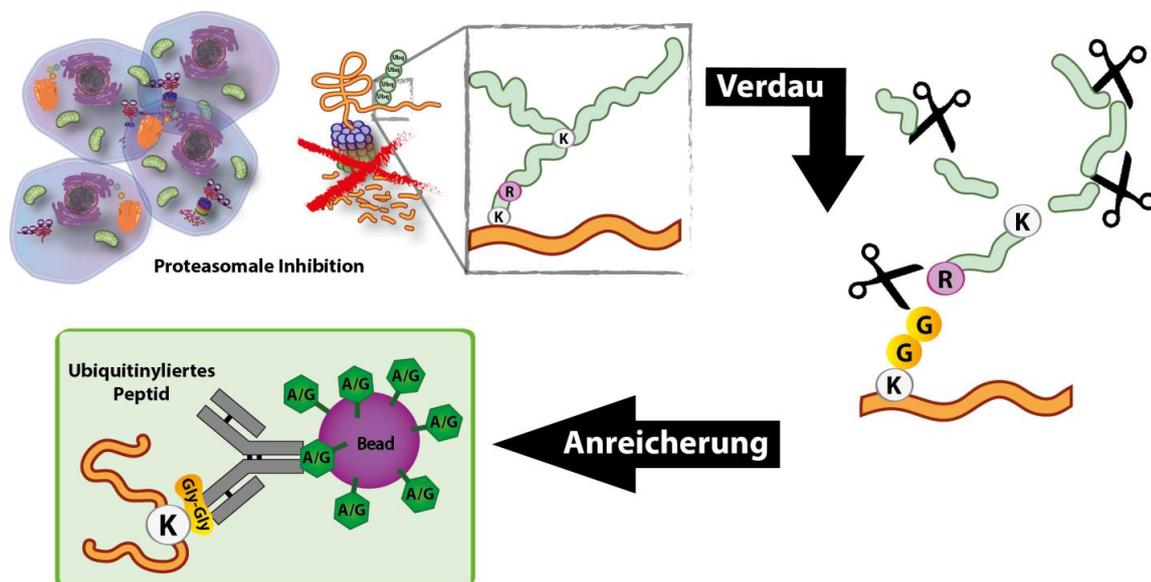


Abb.1.3.4.1.1.: Schematischer Aufbau eines typischen Experiments zur Anreicherung von ubiquitinylierten Peptiden. In den zu untersuchenden Zellen wird der proteasomale Abbau zunächst durch Inhibitoren stark reduziert. Nach der Zellyse können die enthaltenen Proteine verdaut werden, wobei auch die gebundene Ubiquitinkette der Zielproteine mitverdaut wird und ein typisches Glycin-Glycin-Motiv zurückbleibt. Anschließend wird ein eigens generierter Antikörper, der an kleinen magnetischen Kügelchen, den sog. Beads, immobilisiert wurde, eingesetzt, der spezifisch diesen Gly-Gly-Rest binden kann. Durch sequentielles Waschen können nicht-ubiquitinylierte Peptide aus der Immunaффinitätskomplex-Suspension abgetrennt werden, so dass nach Elution der modifizierten Peptide vom Antikörper ein aufgereinigtes Sub-Proteom erhalten wird.

Oft wird versucht die Anzahl an ubiquitinylierten Proteinen durch Inhibition des Proteasoms zu erhöhen, so dass die schnell ablaufende Degradation deutlich eingeschränkt wird und mehr Zielproteine identifiziert werden können. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass prinzipiell gegen jede Art von PTM ein solcher Antikörper generiert werden kann. Praktisch gesehen ist dies jedoch zeit- und kostenintensiv, da die Antikörper *in vivo* generiert werden müssen, anschließend aus dem Blut der Versuchstiere isoliert und schließlich im Hinblick auf ihre monoklonalen Bindungseigenschaften aufwendig validiert werden müssen. Die kommerziell erhältlichen Antikörper sind dennoch oftmals nicht ausreichend immunogen, so dass das Ergebnis durch unspezifisch co-angereicherte Peptide verfälscht werden kann. Wiederum ist durch die Spezifität ein generierter Antikörper nur für eine spezielle PTM-Klasse anwendbar und damit nicht flexibel einsetzbar. Zudem müssen vielfach hohe Mengen an Startmaterial (oft 10-20 mg) eingesetzt werden, was die Anwendung in der Bioanalytik und speziell für klinische Proben kaum möglich macht. Daher ist sowohl die Weiteroptimierung bestehender Methoden, bei immunaffinitätsbasierten Methoden beispielsweise eine Verringerung des einzusetzenden Probenmaterials, als auch die Entwicklung neuer Techniken insbesondere zur Anwendung auf bisher nicht zugängliche PTM-Spezies zwingend erforderlich. Auf Grund der zuvor erwähnten Limitierungen schließen sich Immunaffinitäts-basierte Verfahren jedoch weitestgehend selbst aus, so dass chromatographische Methoden interessante Alternativen bieten können. Bei einer Chromatographie-basierten Anreicherung werden grundsätzlich die speziellen physikochemischen Eigenschaften einer PTM-Subspezies ausgenutzt, um sie von anderen unerwünschten Peptiden zu isolieren. Eine einfach durchzuführende und dennoch hoch-effiziente Methode ist beispielsweise die Anreicherung von Phosphopeptiden mittels Titandioxid-Affinitätschromatographie. Dabei werden TiO₂-Beads verwendet, an deren Oberfläche hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen, Phosphopeptide gebunden werden können [109]. Unphosphorylierte Peptide interagieren deutlich weniger mit dem Material und können größtenteils in sequentiellen Waschschrritten abgetrennt werden, so dass nach der Elution ein angereichertes Phospho-Subproteom erhalten wird. Kuroda et al. ließen sich bereits 2003 diese Methode patentieren [110], seitdem wird sie intensiv in diversen Abwandlungen genutzt [111-115]. Im Gegensatz dazu deutlich aufwendiger ist die Verwendung von HPLC-gestützten Anreicherungsverfahren, wobei hier der Vorteil in der automatisierbaren Auftrennung und Fraktionierung liegt. Die Auswahl geeigneter Gradienten und die Überwachung der Elution, z.B. anhand von UV-Detektion, erlaubt dabei eine gezielte Auswahl der PTM-enthaltenden Fraktionen, so dass diese Methoden sehr präzise für die

gewünschte Anreicherung angepasst werden können. In den letzten Jahren wurden zudem auch zwei-dimensionale Strategien etabliert, deren Prinzip in Abb.1.3.4.1.2. zusammengefasst wurde.

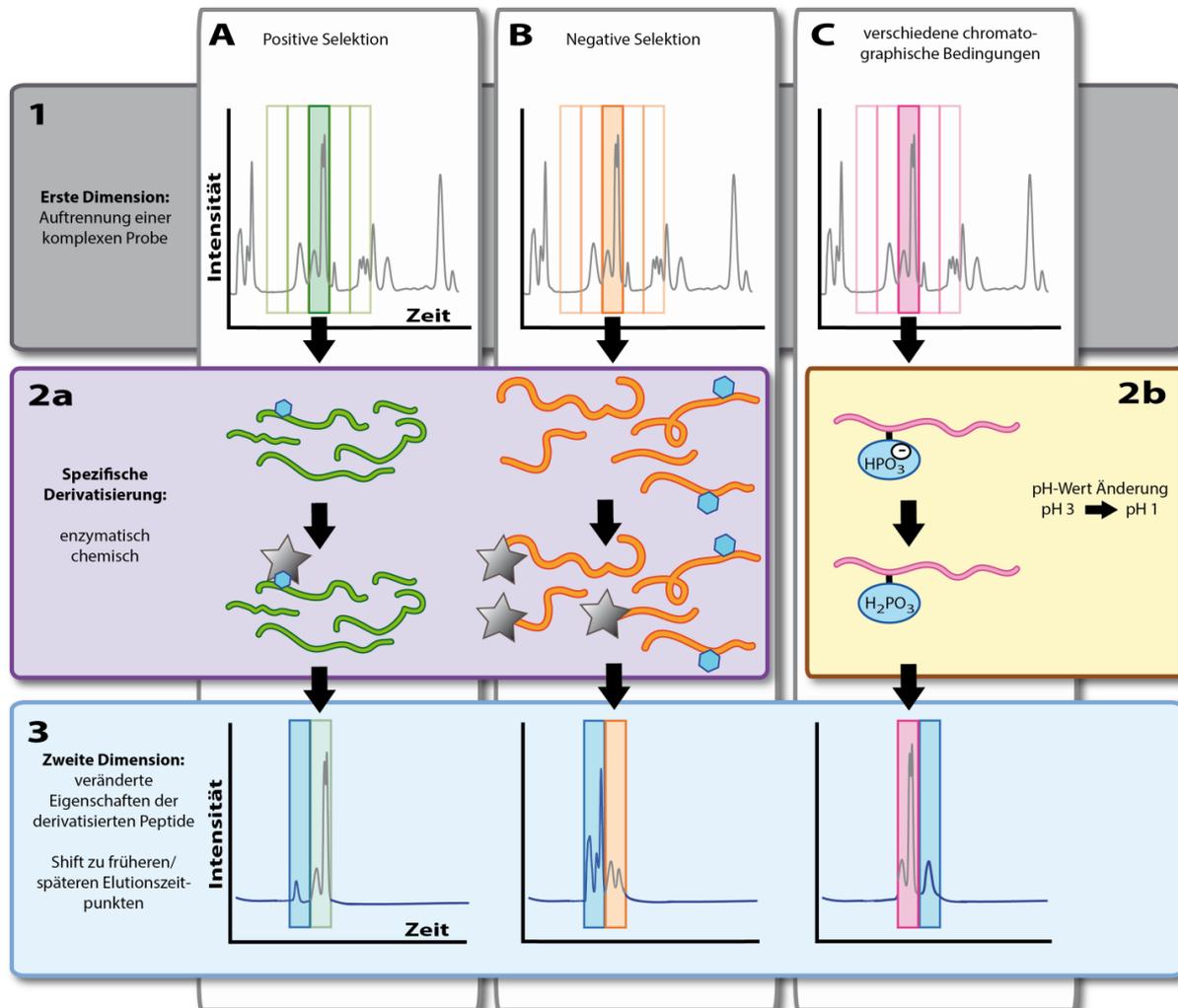


Abb.1.3.4.1.2.: Generelles Prinzip zweidimensionaler Chromatographiemethoden zur Anreicherung von PTM-Peptiden. Alle Strategien basieren dabei auf denselben drei Teilschritten: (1) Zunächst wird ein komplexes Peptidgemisch über ein gewähltes chromatographisches Material aufgetrennt und fraktioniert. (2) Anschließend erfolgt eine Derivatisierung, die gezielt die chromatographischen Eigenschaften einer Peptid-Subspezies verändert. (3) Im finalen Schritt werden die Fraktionen rechromatographiert, dabei ändert sich durch die vorangegangene Derivatisierung das Elutionsverhalten der modifizierten Peptide und sie können von anderen unmodifizierten Peptiden abgetrennt werden. Grundsätzlich werden positive (A) und negative Selektion (B) unterschieden. Im ersten Fall werden PTM-Peptide spezifisch derivatisiert, wodurch diese in der zweiten Dimension einen Retentionszeitshift zeigen. Die negative Selektion funktioniert *vice versa*, so dass alle nicht-PTM-Peptide modifiziert werden und diese im nachfolgenden Rechromatographie-Schritt abgetrennt werden können. Für beide Strategien sind dabei exakt identischen Bedingungen in erster und zweiter Dimension notwendig, so dass der Retentionszeitshift nur durch die Derivatisierung induziert wird. Einen Sonderfall bilden Strategien, bei denen unterschiedliche chromatographische Bedingungen genutzt werden (C). Dabei wird das Elutionsprofil einer PTM-Subspezies z.B. durch Änderung des pH-Wertes verschoben, wie Henrich et al. zeigten [116]. Abbildung modifiziert nach Venne et al. [101]

Alle Ansätze können dabei grundsätzlich in drei Teilschritte gegliedert werden: (i) zunächst wird ein komplexes Peptidgemisch mittels chromatographischer Auftrennung nach definierten Eigenschaften separiert und in Fraktionen gesammelt. (ii) Anschließend werden die Fraktionen einer Derivatisierung unterzogen, die spezifisch für eine der enthaltenen Peptid-Subspezies ist und deren chromatographische Eigenschaften verändert. (iii) Werden die Fraktionen anschließend rechromatographiert verändert sich das Elutionsverhalten der derivatisierten Peptide, so dass diese von den nicht-derivatisierten abgetrennt werden können. Je nach Strategie werden entweder die PTM-Peptide modifiziert und somit chromatographisch abgetrennt (positive Selektion) oder *vice versa* alle nicht-PTM-Peptide isoliert (negative Selektion). Für beide Ansätze sind exakt identische chromatographische Bedingungen in beiden Dimensionen notwendig, um einen spezifischen Shift zu gewährleisten. Einen Sonderfall bekleidet hier ein Ansatz, bei dem der Retentionszeitshift durch Verwendung zweier unterschiedlicher chromatographischer Dimensionen induziert wird (siehe auch Abb.1.3.4.1.2. C). In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze basierend auf zwei-dimensionaler Chromatographie etabliert, das bekannteste ist das sog. COFRADIC (engl.: *Combined fractional diagonal chromatography*). Erstmals wurde diese Methode 2002 von Gevaert et al. [117] als Anreicherungsverfahren für Methionin-haltige Peptide publiziert. Dabei wurde ein verdautes Zelllysate mittels RP-Chromatographie separiert und die Fraktionen mit Wasserstoffperoxid oxidiert. Bei Reinjektion unter identischen Bedingungen eluieren Methionin-haltige Peptide auf Grund der Oxidation zu früheren Retentionszeiten, so dass diese von den restlichen enthaltenen Peptiden abgetrennt werden konnten. Dieselbe Gruppe veröffentlichte in den folgenden Jahren mehrere Anwendungen des COFRADIC-Prinzips zur Anreicherung von N-terminalen [118, 119], Cystein-haltigen [120], glykosylierten [121], nitrosylierten [122], phosphorylierten [123] und ubiquitinylierten Peptiden [124]. Dies zeigt die enorme Wandlungsfähigkeit chromatographischer Ansätze, die auch dadurch ermöglicht wird, dass PTMs in aller Regel zu einer bestimmten physikochemischen Veränderung des jeweiligen modifizierten Peptids führen. In Kombination mit den zur Verfügung stehenden chromatographischen Trennmaterialien und einer großen Vielfalt an chemischen, enzymatischen oder physikalischen Derivatisierungsstrategien lassen sich theoretisch für eine große Anzahl an PTM-Peptiden solche spezifischen Anreicherungsverfahren entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das zum COFRADIC komplementäre ChaFRADIC (engl.: *charge based fractional chromatography*) entwickelt, welches statt zwei RP-Dimensionen die Auftrennung über einen Kationenaustauscher nutzt. Die Abtrennung von unerwünschten Peptidspezies erfolgt dabei

statt über Änderung der Hydrophobizität über einen induzierten Ladungsshift zwischen den beiden Dimensionen. Dieser ist spezifisch und vorhersagbar für ein individuelles Peptid, im Gegensatz zum COFRADIC, indem individuelle Anpassungen notwendig sind, um angereicherte Fraktionen zu isolieren. Darüber hinaus ist ChaFRADIC ebenso abwandlungsfähig und kann zur Anreicherung verschiedener PTM-Spezies eingesetzt werden. Generell offerieren viele PTMs geladene oder ionisierbare, funktionelle Gruppen, so dass diese theoretisch im ChaFRADIC Ansatz genutzt werden könnten, um gezielt Ladungen durch Derivatisierung zu addieren oder zu entfernen und somit den benötigten chromatographischen Shift zu induzieren.

Um zelluläre Zusammenhänge und Abläufe von Signalwegen im Detail zu erklären, ist ein umfassendes Verständnis von der Rolle der PTMs in einem solchen Netzwerk unerlässlich. So kann beispielsweise eine pathophysiologische proteolytische Prozessierung von Proteinen bei der Kanzerogenese [125] sowie bei der Aktivierung von Proteasen bei der Metastasierung eine Rolle spielen [126]. Weiterhin enthält die N-terminale Proteinsequenz häufig auch die Information, in welches Kompartiment ein Protein transportiert werden soll. Dieser als *protein sorting* bezeichneter Mechanismus, gewährleistet, dass im Cytosol synthetisierte Proteine anhand einer Zielerkennungssequenz in das vorherbestimmte Zellkompartiment transportiert und dort weiter prozessiert werden und eine festgelegte Funktion einnehmen können. So werden Proteine beispielsweise schon während der Proteinbiosynthese in das Endoplasmatische Retikulum transportiert, dort über Transportvesikel abgeschnürt und zur Zellmembran weitergeleitet, um schlussendlich als membranständige Proteine zu fungieren. Auch beim Import von mitochondrialen Matrixproteinen spielt eine N-terminale Signalsequenz eine Rolle und vermittelt den gezielten Transport. Die Anreicherung N-terminaler Peptide aus einem betrachteten Organismus könnte daher Aufschluss darüber geben, welche Identität die N-Termini aufweisen und welche Proteine zur Induktion eines pathologischen Zustandes beitragen. Dazu stehen mehrere, alternative Methoden zur Verfügung wie COFRADIC [119], ChaFRADIC [127], die PTAG-Strategie [128] oder N-TAILS [129] wohingegen für andere Modifikation, wie z.B. für Disulfid-verbrückte Peptide, keine Anreicherungsverfahren vorhanden sind. Das ungleiche Verhältnis von aktuell bekannten PTMs und den wenigen vorhandenen Anreicherungsstrategien, um diese in komplexen Proben zu analysieren, macht deutlich, wie dringend ein Ausbau dieser Methoden ist. Dazu könnte zwei-dimensionale Chromatographie auf Grund der Wandlungsfähigkeit einen wichtigen Beitrag leisten und hat zusätzlich diverse Vorteile gegenüber bislang häufig

verwendeter Antikörper-basierter Verfahren. Beispielsweise erfolgt bei der Immunaффinitäts-basierten Anreicherung die Bindung des Epitops an den Antikörper über nicht-kovalente Bindungen, wie elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbildung, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen [130, 131] und der gebildete Immunkomplex unterliegt – wie auch alle andere Ligandenbindungsreaktionen - dem Massenwirkungsgesetz. Daher ist die Bindung des Antikörpers an sein Substrat stark von der jeweiligen Bindungskonstante abhängig: je niedriger diese ist desto stärker ist die Bindung. Diese wird jedoch durch viele Faktoren beeinflusst, so spielen Konzentration von Antikörper und Substrat eine Rolle, aber auch Temperatur sowie die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes. All dies bestimmt wie schnell die Sättigung einer solchen Reaktion erreicht wird und in welcher Konzentration ein Substrat dafür vorliegen muss [61, 132]. Das führt zu diversen Limitierungen bei Immunaффinitäts-basierten Verfahren: beispielsweise werden besonders niedrig abundante Peptide häufig nicht in ausreichender Menge gebunden, so dass diese möglicherweise interessanten Analyten bereits vor der eigentlichen Detektion abgetrennt werden. Zudem ergeben sich durch das experimentelle Design weitere Einschränkungen: Durch die Inkubation mit einer komplexen Probe kommen die Antikörper mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Molekülen in Kontakt, diese beeinflussen unter Umständen die eigentlich gewünschte Komplexbildung, indem sie Bindestellen blockieren (Inhibitoren) oder eine ähnliche Affinität besitzen und um dieselbe Bindestelle konkurrieren (*replacement effect*). Auf Grund dieser Effekte ist eine quantitativ valide Anreicherung kaum zu bewerkstelligen, so dass die, von diesen Nachteilen nicht betroffenen, Chromatographie-basierten Methoden hier eine erfolgsversprechende Alternative darstellen. Gerade in Bezug auf quantitative Aussagen, die von immenser Bedeutung für die meisten proteomischen Studien sind, können hier interessante Strategien entwickelt werden, die sich auch zu Hochdurchsatzmethoden erweitern lassen.

2 ZIELSETZUNG

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Etablierung eines Hochdruckflüssigchromatographie-basierten SCX-Systems (engl.: *strong cation exchange*), um dieses für die Auftrennung von Peptiden aus einer komplexen, realen Probe zu nutzen. Dabei sollten die Peptide effizient und reproduzierbar nach aufsteigenden Ladungszuständen eluiert und zeitgleich in definierten Fraktionen automatisiert gesammelt werden. Nachfolgend sollte diese optimierte Auftrennung zur Etablierung eines zwei-dimensionalen, diagonalen Ansatzes genutzt werden, der es erlaubte aus komplexen Peptidgemischen bestimmte post-translational modifizierte Peptidspezies zu isolieren. Das Prinzip eines solchen ChaFRADIC (engl.: *charge-based fractional diagonal chromatography*) basiert dabei auf Induktion eines Ladungsshifts in der zweiten Dimension, der zur Veränderung des chromatographischen Elutionsprofils der anzureichernden Peptidklasse führt, so dass diese effizient von anderen Peptiden separiert werden kann. Eine solche Methodik sollte unter anderem neue Einblicke in die zellulären Abläufe der Proteinsortierung (engl.: *protein sorting*) bringen. Darunter werden Mechanismen zusammengefasst, die dazu führen, dass im Cytosol synthetisierte Proteine in andere Zellkompartimente transportiert werden, wo sie eine festgelegte Funktion erfüllen können. So werden bestimmte Proteine während oder nach der Proteinbiosynthese beispielsweise in den Nukleus, das Endoplasmatische Retikulum oder in die mitochondriale Matrix importiert. Zunächst sollte eine Anwendung zur Anreicherung N-terminaler Peptide aus einer komplexen Hefeprobe etabliert werden, die zudem die Möglichkeit einer relativen Quantifizierung zwischen verschiedenen Proben bietet, so dass proteolytische Prozesse an mitochondrialen Matrixproteinen und deren Mechanismen genauer charakterisiert werden können. Nachfolgend sollte auch die Anwendung des etablierten Prinzips zur Anreicherung weiterer PTM-Peptidklassen untersucht werden, wobei Disulfid-verbrückte Peptide und ubiquitinierte Peptide mögliche Anwendungsgebiete offerieren könnten. Dabei sollte die Effizienz und Vergleichbarkeit mit anderen möglicherweise existenten Methoden stets im Vordergrund stehen, um konkurrenzfähige Methoden zu gewährleisten. Schlussendlich sollten die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Techniken im Hinblick auf die Anwendung zur Anreicherung unterschiedlicher PTM-Subproteome diskutiert werden, wobei Möglichkeiten aber auch Limitierungen sowie noch zu überwindende Anforderungen dargestellt werden sollten.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1. MATERIAL

Tab. 3.1.1.: Übersicht über verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien / Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,4-Dithiothreitol, $\geq 97\%$ Reinheit	Roche, Mannheim, D
2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) - ethansulfonsäure (HEPES), $\geq 99,5\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
2-Propanol, UPLC-Grade, $\geq 99,9999\%$ Reinheit	Biosolve BV, Volkenwaard, NL
Acetonitril UPLC-Grade, $\geq 99,9999\%$ Reinheit	Biosolve BV, Volkenwaard, NL
Ameisensäure, UPLC-Grade, $\geq 99,9999\%$ Reinheit	Biosolve BV, Volkenwaard, NL
Ammoniumbicarbonat, $\geq 99,5\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
BCA TM Protein Assay Kit Pierce	Thermo Scientific, Bremen, D
Bovine Serum Albumin (Rind), $\geq 98\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Calciumchlorid, $\geq 98\%$ Reinheit	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Di-Natrium-Hydrogenphosphat, $\geq 98\%$ Reinheit	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Scientific, Bremen, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz, $\geq 99\%$ Reinheit	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Ethanol UPLC-Grade, $\geq 99,9999\%$ Reinheit	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Fetal Calf/Bovine Serum (FCS/FBS), hitzeinaktiviert, Ursprung: Südamerika (EU zugelassen)	Thermo Scientific, Bremen, D
Formaldehyd, 37% (w/v) in H ₂ O, 10-15% Methanol, $\geq 99\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Formaldehyd-d ₂ Lösung, 20% (w/v) in D ₂ O, 98 atom% D, $\geq 99\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
GluC, sequencing grade	Promega GmbH, Mannheim, D
Glycin, $\geq 99,5\%$ Reinheit	Applichem, Darmstadt, D
Guanidinhydrochlorid, $\geq 98\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Harnstoff, $\geq 98\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Hydroxylamin, 50% (w/v) in H ₂ O, $\geq 99,99\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Iodacetamid, $\geq 99\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
iTRAQ Reagent, 8-plex Multiplex Kit	AB Sciex, Darmstadt, D
Kaliumchlorid Suprapur®, $\geq 99,999\%$ Reinheit	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat Suprapur®, $\geq 99,999\%$ Reinheit	MERCK KGaA, Darmstadt, D
MG-132 Lösung, $\geq 90\%$ Reinheit, 10 mM in DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Nanosep 30K Omega Zentrifugen Filter	PALL Life Sciences, Dreieich, D

Natriumcyanoborhydrid, $\geq 95\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumcyanobordeuterid, 96% atom% D, $\geq 98\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumchlorid Suprapur®, $\geq 99,999\%$ Reinheit	MERCK KGaA, Darmstadt, D
N-Ethylmaleimid (NEM), $\geq 98\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ortho-Phosphorsäure, $\geq 99\%$ Reinheit	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), 100x Konzentrat	Thermo Scientific, Bremen, D
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	Thermo Scientific, Bremen, D
PTMScan® Ubiquitin Remnant Motif (K- ϵ -GG) Kit	Cell Signaling Technology, Leiden, NL
Salzsäure (reagent grade), 37%, Verunreinigung durch Kationen/Anionen $< 0,02$ ppm	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
S-Methyl methanethiosulfonate (MMTS), $\geq 98\%$ Reinheit	Thermo Scientific, Bremen, D
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), Pellets, $\geq 99\%$ Reinheit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Subtilisin, sequencing grade	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Thioharnstoff, $\geq 99\%$ Reinheit	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP), $\geq 98\%$ Reinheit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
trideutero-N-Hydroxylsuccinimidester (D ₃ -NHS)	im Institut synthetisiert, Synthesevorschrift nachfolgend in Kap. 3.1.1.
Triethylammoniumbicarbonat (TEAB), 1 M, pH $8,5 \pm 0,1$ $\geq 99\%$ Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trifluoressigsäure, UPLC-Grade, $\geq 99,9999\%$ Reinheit	Biosolve BV, Volkenwaard, NL
Tris, ultrapure, $\geq 99,999\%$ Reinheit	Applichem, Darmstadt, D
Trypsin, sequencing grade modified, Porcine	Promega GmbH, Mannheim, D
Trypsin, T1426, Porcine	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Tab. 3.1.2.: Übersicht über verwendete Chromatographiematerialien

Produkt	Hersteller
Acclaim, PepMap Säule (100 μ m ID, 2 cm Länge, 100 Å Porengröße, 5 μ m Partikeldurchmesser)	Thermo Scientific, Bremen, D
Acclaim, PepMap Säule (75 μ m ID, 15 cm / 25 cm / 50 cm Länge, 100 Å Porengröße, 2 μ m Partikeldurchmesser)	Thermo Scientific, Bremen, D
Oligo R3 Reversed-Phase Resin , Bulk Material	Thermo Scientific, Bremen, D
Polysulfoethyl A Säule (200 Å Porengröße, 5 μ m Partikeldurchmesser)	PolyLC Columbia, USA
SPEC C18 AR, Kartuschen , 4 mg, 15 mg und 30 mg	Agilent, Waldbronn, D
Supel-Tips C18 Pipetten Tips , 10 μ L Volumen	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Tab. 3.1.3.: Übersicht über verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Eppendorf Kühl-Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, D
LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific, Bremen, D
LTQ Orbitrap Velos	Thermo Scientific, Bremen, D
LoBind Reaktionsgefäße 0.5 mL, 1.5 mL, 2.0 mL	Eppendorf, Hamburg, D
Q-Exacte (Plus)	Thermo Scientific, Bremen, D
Magnetrührer Variomag Mono	Thermo Scientific, Bremen, D
pH-Meter	SCHOTT, Mainz, D
Pipetten 0.1-2.5 µL, 0.5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 50-1000 µL	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten, elektronisch, 0.5-10 µL, 10-100 µL, 20-300 µL, 50-1000 µL	Eppendorf, Hamburg, D
Plate-Reader Multiscan FC	Thermo Scientific, Bremen, D
Reaktionsgefäße 0.5 mL, 1.5 mL, 2.0 mL	Eppendorf, Hamburg, D
Reinstwasserspender, Purelab Ultra ELGA	ELGA Labwaters, Celle, D
SpeedVac	Thermo Scientific, Bremen, D
Thermo-Mixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Ultimate 3000 HPLC	Thermo Scientific, Bremen, D
Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) systems	Thermo Scientific, Bremen, D
Varian/Agilent Vakuumstation	Agilent Technologies, Böblingen, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge 5424, 5417R und 5415R	Eppendorf, Hamburg, D

Tab. 3.1.4.: Übersicht über verwendete Software

Software	Firma / Author /Version
Adobe Illustrator CS6	Version 16, Stand April 2012
Chromeleon 6.80	Dionex Corporation, Idstein, D
DiANNA 1.1 Disulfidvorhersage-Software	Boston College [133, 134], Massachusetts, USA http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/
DiPro 2.0 Disulfidvorhersage-Software	University of California Irvine [135], USA http://download.igb.uci.edu/bridge.html
IceLogo Sequenzanalyse Software	Ghent university [136, 137], Belgien http://iomics.ugent.be/icelogoserver/index.html

Inferno Heatmap Visualizer	Pacific Northwest National Laboratory, Richland, USA [138] https://omics.pnl.gov/software/infernordn
Mascot Version 2.4.1	Matrix Science Ltd., London, GB http://www.matrixscience.com [69]
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
Proteome Discoverer 1.3	Thermo Scientific, Bremen, D
Proteome Discoverer 1.4	Thermo Scientific, Bremen, D
Venn Diagramm Erstellungssoftware	Venny 2.0 und Venny 2.1 [139], Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, ES http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html
Xcalibur Version 2.1.01140	Thermo Scientific, Bremen, D
Proteindatenbank Uniprot <i>A. thaliana</i>	Stand Juli 2012, 11,340 Einträge
Proteindatenbank Uniprot <i>A. thaliana</i>	Stand Dezember 2014, 13,414 Einträge
Proteindatenbank TAIR <i>A. thaliana</i>	Stand Februar 2015, 35,386 Einträge
Proteindatenbank Uniprot Human	Stand Juli 2012, 20,232 Einträge
Proteindatenbank Uniprot Human	Stand September 2014, 20,194 Einträge
Proteindatenbank Uniprot <i>S. cerevisiae</i>	Stand September 2011, 6,717 Einträge
Proteindatenbank, selbst generiert, Hefeproteom mit zusätzlicher BSA-Sequenz	Stand August 2012, 6,852 Einträge

3.1.1. SYNTHESE DES D₃-NHS-ESTERS

Die Synthese des trideutero-N-Hydroxylsuccinimidesters (D₃-NHS) erfolgte wie bereits in Staes et al beschrieben [140]. Dabei werden in einem Rundkolben 1,0 g N-Hydroxysuccinimid (NHS) in 2,6 g sechsfach-deutერიertem Essigsäureanhydrid (d₆-Essigsäureanhydrid) aufgelöst und unter ständigem Rühren über Nacht bei RT inkubiert (vgl. Abb. 3.1.1.1.). Anschließend wird das Gemisch unter Vakuum und bei gleichzeitiger Erwärmung im Wasserbad auf 40°C bis zur Trocknung verdampft. Das erhaltene Produkt wird in einem minimalen Volumen Dichlormethan aufgenommen und auf eine Silicagel-Säule (3x 16,5 cm, 60 Å, 40 µm Partikeldurchmesser) mit 40 g Bedmaterial aufgeladen und mittels isokratischer Elution chromatographiert. Nicht umgesetztes NHS eluiert dabei im Durchfluss und kann so vom später eluierenden reaktiven NHS-Ester abgetrennt werden. Die Fraktion, die das benötigte Endprodukt enthält, wird abschließend, wie zuvor beschrieben, bis zur Trocknung eingengt und bei -40°C bis zur Verwendung gelagert. Zur Verwendung als

schweres Acetylierungsreagenz wird die jeweils benötigte Menge eingewogen und in DMSO mit einer finalen Konzentration von 500 $\mu\text{mol/L}$ aufgelöst.

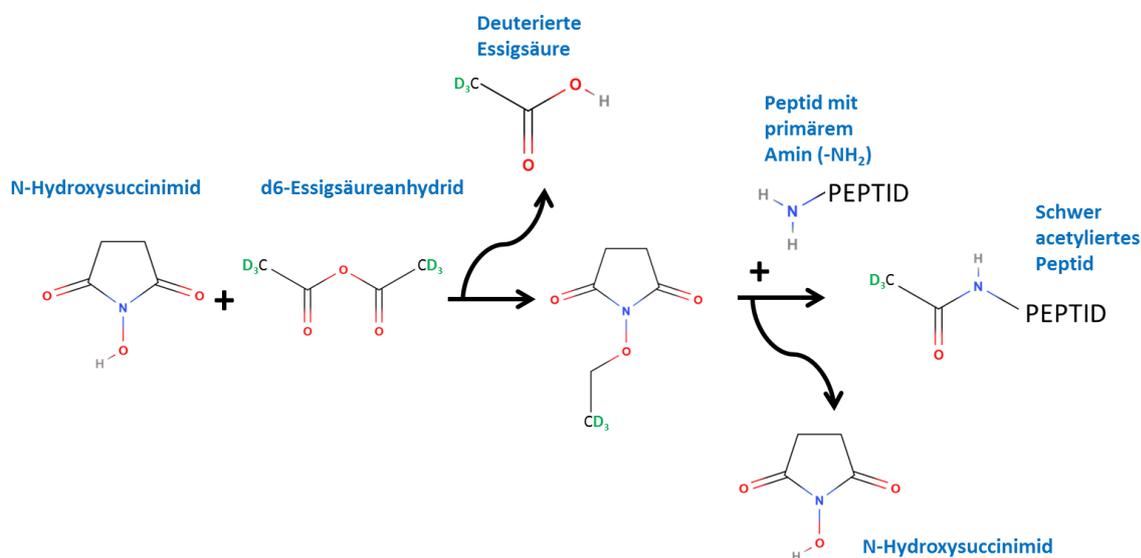


Abb.3.1.1.1.: Reaktionschemata der D₃-NHS-Estersynthese und Verwendung als schweres Acetylierungsreagenzes.

3.2. METHODEN

3.2.1. OPTIMIERUNG SCX-AUFTRENNUNG

Zur Etablierung des zwei-dimensionalen ChaFRADIC Ansatzes wurde zunächst eine reproduzierbare Auftrennung der Peptide nach ihrem jeweiligen Ladungszustand benötigt. Um diese Optimierung durchzuführen und in regelmäßigen Abständen zu validieren, wurde eine größere Menge eines komplexen Peptidgemisches benötigt. Hierzu erschienen humane Thrombozyten als geeignet, da sie mit rund 4,000 Proteinen ein durchaus komplexes Proteom besitzen [141], welches im Vergleich zu anderen humanen Zelltypen mit etwa 10,000 Proteinen jedoch deutlich überschaubarer ist [17]. Die verwendeten Thrombozyten wurden bereits durch differentielle Zentrifugation aus Apharesekonzentraten isoliert und in pelletiertem Zustand im Bestand der „Systemanalyse“-Gruppe des ISAS Dortmund bei -80°C gelagert.

3.2.1.1. ZELLYSE

Die Thrombozytenpellets wurden mit einem Lysepuffer aufgeschlossen, dieser enthielt 1% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH=7,8). Um eine vollständige

Lyse zu erzielen, wurde das Volumen schrittweise auf 200 μL erhöht und die Proben zusätzlich in 10-sekündigen Intervallen kurzzeitig ultraschallbehandelt, abwechselnd mit 30-sekündigen Kühleinheiten auf Eis. Dies wurde in insgesamt 4 Intervallen bis zur Transparenz des Lysats durchgeführt und schlussendlich unlösliche Bestandteile wie Zellfragmente durch eine Zentrifugation bei 8,000 rcf (engl.: *relative centrifugal force*) für 5 Min. abgetrennt. Die Überstände wurden in einem neuen Eppendorf Gefäß vereinigt.

3.2.1.2. PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Proteinkonzentration des hergestellten Thrombozytenlysats wurde mit Hilfe eines Pierce BCA-Protein-Assay-Kits (Thermo Scientific) bestimmt und laut den Herstellerangaben für die Mikroplatten-Anwendung durchgeführt. Dabei reduzieren die in der Proteinsequenz enthaltenen Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan sowie die Peptidbindung selbst Cu^{2+} -Ionen (Biuret-Reaktion). Diese können dann an die Bicinchoninsäure binden können, was zur Ausbildung eines violetten Farbkomplexes führt. Über den kolorimetrischen Nachweis bei 562 nm und dem Absorptionsvergleich mit einer Standard-Verdünnungsreihe bekannter Proteinkonzentrationen kann schließlich die quantitative Bestimmung erfolgen. Der Vorteil gegenüber anderen Messmethoden liegt in der kurzen Durchführungszeit, hoher Empfindlichkeit und Resistenz gegenüber den meisten Detergenzien [142]. Da es sich jedoch um eine indirekte Bestimmungsmethode handelt, kann das Ergebnis im Einzelfall vom tatsächlich im Lysat vorhandenen Proteingehalt abweichen. Auf Grund der leichten Durchführung und der hohen Reproduzierbarkeit wird im Idealfall ein Standardfehler von etwa 15% jedoch in den meisten Laboren in Kauf genommen [143, 144], da alternative direkte Messmethoden wie beispielsweise die Aminosäureanalyse weitaus schwieriger zu etablieren sind [145]. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden dazu Verdünnungen von 250, 125, 50, 25, 5 und 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aus einer BSA-Lösung hergestellt. Zusätzlich wurden drei Verdünnungen der Probe in Wasser (1:50, 1:100 und 1:200) vorbereitet. Die Wahl der Verdünnungen hängt dabei vom linearen Bereich der verwendeten Standardreihe ab, so dass die zu messende Proteinkonzentration hier idealerweise zwischen 5 und 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ liegen sollte. Um die statistische Validität der Ergebnisse zu erhöhen, wurden sowohl die Standard- als auch die Probenverdünnungen jeweils im Triplikat gemessen. Dazu wurden 25 μL der jeweiligen Proteinprobe in ein Mikrotiterplatten-Well vorgelegt und mit 200 μL des aus Lösung A und B (Verhältnis 1:50) frisch angesetzten BCA-Reagenzes aufgefüllt. Anschließend wurde die belegte Mikrotiterplatte mit einem Klebefilm gegen eventuelle Verdunstung geschützt und für 30 Min. bei 60°C inkubiert. Der kolorimetrische Farbnachweis

erfolgte durch Auslesung aller Verdünnungen bei 562 nm in einem MultiScan Plattenlesegerät und die finalen Proteinkonzentrationen konnten über semi-automatische Auswertung mittels zugehöriger Software ermittelt werden. Ein der benötigten Proteinmenge entsprechendes Aliquot kann anschließend von dem Lysatvolumen abgenommen und für den proteolytischen Verdau vorbereitet werden.

3.2.1.3. VORBEREITUNG DER PROTEINE FÜR DEN PROTEOLYTISCHEN VERDAU

Um einen effizienten proteolytischen Verdau zu gewährleisten, wurden Cysteinmodifikationen, wie z.B. Disulfidbrücken, durch Reduktion abgespalten und die freigewordenen Thiole irreversibel alkyliert. Diese Carbamidomethylierung ermöglicht eine bessere Auffaltung der Proteine und erleichtert durch die verringerte sterische Hinderung den Zugriff der Protease auf die jeweiligen Aminosäuren. Dafür wurde die Probe zunächst mit 1,4-Dithiothreitol (DTT) für 30 Min. bei 56°C in einer finalen Konzentration von 10 mM inkubiert, was vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Die freigewordenen Thiole wurden anschließend irreversibel alkyliert, was eine Neubildung oder Reorganisation von Disulfidbrücken verhindert. Dies erfolgte durch Inkubation mit Iodacetamid (IAA) in einer finalen Konzentration von 20 mM für 30 Min. bei Raumtemperatur (RT) in Dunkelheit, da das Reagenz licht-sensitiv und nur für begrenzte Zeit stabil ist.

Ethanol-fällung

Da SDS ein sehr starkes Detergenz ist und auch in niedrigen Konzentrationen die Aktivität von Proteasen herabsetzen kann, sollte es vor dem Verdau entfernt werden. Dies erfolgte über eine Ethanol-fällung [146], die den Umstand nutzt, dass organische Lösungsmittel die dielektrische Konstante erniedrigt und somit die Anziehungskraft zwischen den Proteinmolekülen erhöht. Zusätzlich werden die Proteine stark dehydriert, so dass sie zur Aggregation neigen und schließlich ausfallen. Dieser Vorgang sollte bei niedrigen Temperaturen (unter 0°C) durchgeführt werden, um die Löslichkeit herab zu setzen und eine dauerhafte Denaturierung des Proteins zu verhindern, so dass eine erfolgreiche Resolubilisierung nach der Fällung gewährleistet wird. Dementsprechend wurde das carbamidomethylierte Thrombozytenlysat mit dem 9-fachen Volumen an -40°C-kaltem, hochreinem Ethanol aufgefüllt und für 1 h bei -40°C inkubiert. Anschließend wurden die ausgefällten Proteine in einer Kühlzentrifuge bei 4°C für 30 Min. bei 16,000 *rcf* abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das resultierende Proteinpellet wurde anschließend zweimal mit 500 µL -40°C-kaltem Aceton gewaschen und schließlich durch

Zugabe von 400 μL eines hochkonzentrierten, chaotropen Puffers, der aus 2 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl) in 50 mM Na_2HPO_4 mit pH 7,8 bestand, resolubilisiert, um die Proteine möglichst vollständig wieder in Lösung zu bringen.

3.2.1.4. PROTEOLYTISCHER VERDAU

Aus der vorbehandelten Thrombozytenprobe wurde ein Aliquot von 270 μL korrespondierend zu 3 mg Protein entnommen und die Chaotropenkonzentration durch Zugabe eines 50 mM Na_2HPO_4 -Puffer mit pH 7,8 im Verhältnis von 1:10 auf 0.2 M verdünnt, um eine optimale Proteaseaktivität zu gewährleisten. Weiterhin wurden 3% Acetonitril (ACN) zur Erhöhung der Proteinlöslichkeit, 1 mM CaCl_2 zur Unterstützung der Protease-Stabilität [147, 148] und Trypsin in einem Verdau-Verhältnis von 1:20 (w/w) hinzugefügt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C in einem Thermomixer, wurde die Verdaueffizienz wie in Burkhart et al. [149] beschrieben überprüft. Die Probe wurde dabei über ein poröses monolithisches Säulenmaterial aufgetrennt, welches möglicherweise unverdaute Proteine auf Grund ihrer Größe und erhöhter Hydrophobizität länger retardiert würde und diese somit am Ende einer Auftrennung detektiert werden könnten. Je nach experimentellem Design können unterschiedliche Proteasen verwendet werden, in der Proteinanalytik hat sich jedoch die Verwendung von Trypsin etabliert. Dieses schneidet Proteinsequenzen bei pH 7,5-8,5 spezifisch an der carboxyterminalen Seite der Aminosäuren Lysin und Arginin, wobei ein nachfolgendes Prolin die Spaltung gänzlich verhindert und weitere nachfolgende Lysin-/ und Argininreste die Reaktion stark verlangsamen [150]. Zudem wird insbesondere bei höherem pH die Spaltung von Arginin bevorzugt. Bei einem tryptischen Verdau humaner Proteinsequenzen werden so Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von etwa 14 Aminosäuren generiert. In einer massenspektrometrischen Analyse ist dies besonders günstig, da der Großteil der Peptide theoretisch in einem Fenster von 350 - 1400 m/z detektiert werden kann. Zudem zeichnet sich das typische, tryptische Peptid durch eine zweifach positive Ladung aus – wobei der N-terminus und das am C-terminus befindliche Arginin oder Lysin protoniert vorliegt. Dies begünstigt eine optimale Ionisierung sowie Fragmentierung, da die entstehenden Fragmentionen mindestens eine verbleibende Ladung tragen müssen, um detektierbar zu sein.

3.2.1.5. ENTSALZUNG MITTELS C18-FESTPHASEN-EXTRAKTION

Da Verdauansätze generell Puffersalze zur Stabilisierung des pH-Wertes sowie meist auch chaotrope Substanzen enthalten, sollte vor einer chromatographischen Auftrennung stets

geprüft werden, in wie weit diese Substanzen mit dem verwendeten Trennmaterial kompatibel sind. So können beispielsweise Umkehrphase-Trennsäulen, die zur Auftrennung von Peptiden direkt vor der massenspektrometrischen Untersuchung genutzt werden, durch hohe Konzentrationen an Salz oder chaotropen Reagenzien geschädigt werden. Auch in der hier angestrebten Auftrennung mittels Ionenaustausch-Chromatographie können bereits niedrige Salzkonzentrationen das Elutionsverhalten der Peptide verändern und so das Ergebnis verfälschen. Daher ist eine vorherige Aufreinigung der Peptide zwingend notwendig. Praktisch erfolgt dies über Festphasenextraktion (engl.: *solid phase extraction*, SPE) mittels geeigneter C18-Kartuschen oder entsprechender Tips, wobei sich die jeweilige Wahl nach den vorhandenen Probenmengen sowie dem nachfolgenden Bearbeitungsschritt richtet. Direkt nach dem proteolytischen Verdau sind die Probenmengen meist größer, so dass SPE-Kartuschen verwendet werden, die mit einer größeren Menge C18-Material beladen sind. Für niedrigkonzentrierte Proben, wie beispielsweise nach einer Fraktionierung, empfiehlt sich die Verwendung von Entsalzungs-Tips mit geringerer Kapazität. Diese wurden selbst hergestellt, durch Einbringen einer Fritte aus C18-Material in einen handelsüblichen 200 µL-Pipetten-Tip sowie anschließende Einfüllung eines porösen Oligo-R3-Materials (Applied Biosystems). Das R3-Material verhält sich analog zu C18-Phasen, jedoch können, durch Verwendung angepasster Mengen, auch geringe Probenmengen entsalzt werden [151]. Das Protokoll verschiedener Festphasenextraktionen ist dabei sehr ähnlich und wird in der nachfolgenden Tabelle 3.2.1.5.1. zusammengefasst. Die unterschiedlichen Entsalzungsmethoden waren ein wiederkehrender Bestandteil dieser Arbeit und fanden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach proteolytischem Verdau, nach erster oder zweiter Dimension SCX, zur finalen Aufreinigung vor LC-MS etc.) ihre Anwendung, daher wurden in Tab.3.2.1.5.1., stellvertretend auch für nachfolgende Kapitel, alle in der Arbeit verwendeten Protokolle detailliert zusammengefasst. Die Entsalzungskartuschen sind generell so konzipiert, dass sie mit einer dafür konstruierten Vakuumstation verwendet werden können. Durch Anlegen eines Vakuums können sowohl Lösungen als auch die Probe selbst durch das Material gesogen werden. Die selbsthergestellten Tips sind für die Verwendung in einer Zentrifuge ausgelegt, wobei die jeweiligen Lösungen bei 900 rcf abzentrifugiert wurden. Alle Proben wurden vor dem Aufladen mit 10%-iger TFA angesäuert, um die Interaktion mit dem C18-Material zu unterstützen und die Peptide optimal zu binden. Ist eine anschließende SCX-Auftrennung geplant, empfiehlt sich die Verwendung von Ameisensäure (FA) in Wasch-/ und Elutionsschritten anstelle von TFA, da sich das Ionenpaarreagenz ungünstig auf die Interaktion der Peptide mit einem Kationenaustauscher auswirken könnte. Durch Elution mit

einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel (wie z.B. ACN) können die gebundenen Peptide eluiert und die Lösungsmittel anschließend unter Vakuum verdampft werden. Abhängig von nachfolgender Verwendung wurden die Peptide entweder in SCX-Puffer A (für eine nachgeschaltete SCX-Auftrennung, 10 mM KH₂PO₄, 20% ACN, pH=2,7) oder in 0.1% TFA in Wasser (für eine LC-MS-Messung) aufgenommen.

Tab. 3.2.1.5.1.: Auswahl der verschiedenen SPE-Materialien nach ihrer Anwendung und die jeweiligen Entsalzungsprotokolle.

	Entsalzung größerer Peptidmengen (< 3 mg) nach proteolytischem Verdau	Entsalzung größerer Peptidmengen (< 1,5 mg) nach proteolytischem Verdau	Entsalzung kleinerer Peptidmengen nach proteolytischem Verdau	Entsalzung nach Fraktionierung	Finale Entsalzung vor LC-MS (nur in initialen ChaFRADIC Experimenten, Abschnitt 3.2.2.5)
Verwendetes SPE-Material	SPEC C18AR Kartuschen (Varian)	SPEC C18AR Kartuschen (Varian)	SPEC C18AR Kartuschen (Varian)	Oligo R3 Material	Supel Tips 10µL
Materialmenge	30 mg	15 mg	4 mg	250 µg	150 µg
Kapazität	Max. 5-10% Ca. 1,5 – 3 mg Peptid	Max. 5-10% Ca. 0,75 – 1,5 mg Peptid	Max. 5-10% Ca. 50 – 400 µg Peptid	Max. 5-10% < 25 µg Peptid	Max. 5-10% < 20 µg Peptid
Aktivierung	2 mL ACN	2 mL ACN	500 µL ACN	50 µL ACN	2x10 µL ACN
Äquilibrierung	2 mL 0,1% TFA in H ₂ O	2 mL 0,1% TFA in H ₂ O	500 µL 0,1% TFA in H ₂ O	50 µL 0,1% TFA in H ₂ O	2x10 µL 0,1% TFA in H ₂ O
Laden der Probe	Probe (pH=2,5 eingestellt)	Probe (pH=2,5 eingestellt)	Probe (pH=2,5 eingestellt)	Probe (pH=2,5 eingestellt)	Probe (pH=2,5 eingestellt)
Aufladezyklen	3	3	3	3	10
Waschschritt	2 mL 0,1% FA	2 mL 0,1% FA	500 µL 0,1% FA	100 µL 0,1% TFA ¹	2x10 µL 0,1% TFA
Elution	2x500 µL Elutionslösung (60% ACN, 0,1% FA (v/v))	2x500 µL Elutionslösung (60% ACN, 0,1% FA (v/v))	2x100 µL Elutionslösung (60% ACN, 0,1% FA (v/v))	50 µL Elutionslösung (60% ACN, 0,1% TFA (v/v)) ¹	2x10 µL Elutionslösung (60% ACN, 0,1% TFA (v/v))

¹ Für eine nachfolgende SCX-Auftrennung wurde statt TFA die gleiche Menge an FA eingesetzt.

Zur Entsalzung des verdauten Thrombozytenlysats wurden 30 mg Kartuschen verwendet und nach oben beschriebenem Protokoll verwendet. Nach der Elution wurden die Peptide unter Vakuum bis zur Trockene eingengt und in 2 mL SCX-Puffer A aufgelöst.

3.2.1.6. KATIONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE

Die Optimierung der SCX-Auftrennung erfolgte mit unterschiedlichen Gradienten und Pufferzusammensetzungen, die im Ergebnisteil eingehender beschrieben werden. Das

verdaute Thrombozytenlysate diente dabei als SCX-Standard, der aliquotiert bei -80°C gelagert wurde. Für jeden Optimierungsschritt wurden $40\ \mu\text{g}$ Peptid aufgetrennt, die in einem Injektionsvolumen von $50\ \mu\text{L}$ gelöst waren.

Für die Auftrennung wurde eine $150\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$ PolySULFOETHYL Säule ($200\ \text{\AA}$ Porengröße, $5\ \mu\text{m}$ Partikelgröße, PolyLC, USA) in Kombination mit einem inerten Ultimate 3000 HPLC-System (Thermo Scientific, Bremen, D) verwendet. Die Thrombozyten-Peptide konnten bei einer Flussrate von $80\ \mu\text{L}/\text{min}$ mit Hilfe eines stufenweisen, binären Gradienten, bestehend aus einem Ladepuffer (SCX-Puffer A) und einem Elutionspuffers (SCX-Puffer B), bei ansteigender Salzkonzentration nach Ladung separiert werden.

Tab. 3.2.1.6.1.: Zusammensetzung der anfänglich verwendeten Puffer und Verlauf des Gradienten

SCX-Puffer A	10 mM KH_2PO_4 , 20% ACN, $\text{pH}=2,7$
SCX-Puffer B	10 mM KH_2PO_4 , 188 mM KCl, 20% ACN, $\text{pH}=2,7$
SCX-Puffer C	10 mM KH_2PO_4 , 800 mM NaCl, 20% ACN, $\text{pH}=2,7$
Gradient	

Zusätzlich wurde ein hochmolarer Salzpuffer (SCX-Puffer C) verwendet, der nach einer Auftrennung alle eventuell noch verbliebenen Peptide eluieren und so die Trennsäule für die nächste Probe reinigen sollte. Dies verhindert sogenannte Memory-Effekte, bei denen Peptide auch noch in nachgeschalteten Läufen eluieren, und hilft das Trennmateriale länger mit gewohnter Kapazität zu erhalten. Die anfängliche Zusammensetzung der Puffer, sowie der generelle Verlauf eines Gradienten werden in Tab.3.2.1.6.1. zusammengefasst. Die von der Säule eluierten Peptide wurden automatisiert in 2-minütigen Fraktionen gesammelt, um zu bestimmen in welchen Zeitabschnitten Mischfraktionen aus zwei Ladungszuständen eluieren und anhand dieser Ergebnisse den Gradienten entsprechend anzupassen. Finales Ziel sollte

sein, einen optimierten Gradienten zu etablieren, mit dessen Hilfe 5 bis 6 Fraktionen gesammelt werden können, die dann möglichst nur noch Peptide eines einzigen Ladungszustandes enthalten. Dazu wurden jeweils 2.5% (4 µL) einer Fraktion mit dem 10-fachen Volumen an 0.1% TFA verdünnt, um den prozentualen Anteil an ACN auf 2% zu senken. Anschließend konnte die Entsalzung wie im Abschnitt 3.2.1.5 beschrieben durchgeführt werden. Die aufgereinigten Peptide wurden unter Vakuum eingetrocknet und für die LC-MS-Messung in 15 µL 0.1% TFA aufgenommen.

3.2.1.7. LC-MS-MESSUNG UND ANALYSE DER FRAKTIONIERTEN PEPTIDE

Die LC-MS-Messungen der Fraktionen wurden je nach zeitlicher Auslastung auf verschiedenen Massenspektrometern gemessen, meist jedoch auf einem LTQ Orbitrap Velos oder einem LTQ Orbitrap XL, das jeweils mit einem Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC)-System gekoppelt wurde. Dazu wurde die gesamte, in 0.1% TFA vorliegende, Probe zunächst in das chromatographische System injiziert und durch einen Ladefluss von 20 µL/min bei isokratischer Zusammensetzung des Lösungsmittels (0.1% TFA) auf die Vorsäule (Acclaim PepMap, 75 µm x 2cm, C18, 100 Å, Thermo Scientific) geladen (vgl. Abb.3.2.1.7.1.).

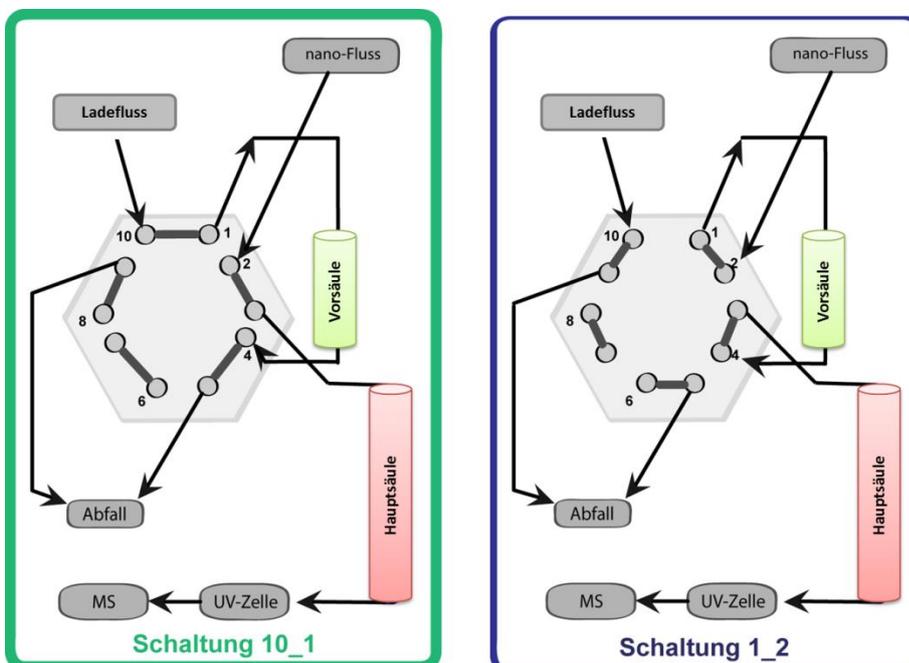


Abb. 3.2.1.7.1.: Schaltung des Injektionsventils. Schaltung 10_1: Die Probe wird zunächst durch Injektion über den Ladefluss in das System eingebracht und auf der Vorsäule aufkonzentriert, wobei Kontaminationen abgetrennt werden. Der nano-Fluss läuft bei dieser Schaltung direkt über die Hauptsäule hin zu UV und MS. **Schaltung 1_2:** Nach Schalten des Ventils sind Vor- und Hauptsäule in Reihe geschaltet und die gebundenen Peptide werden mittels eines binären Lösungsmittelgradienten aufgetrennt und in der UV-Zelle und im MS detektiert.

Hierdurch wird die Probe bei hohem Fluss effizient aufkonzentriert und eventuelle Kontaminationen (wie z.B. Salze) werden abgetrennt. Durch eine spezielle Schaltung innerhalb des HPLC-Systems kann die Probe anschließend mit einem sehr geringen Fluss von 250 nl/min auf die analytische Hauptsäule (Acclaim PepMap RSLC 75 μm x 25 cm, 2 μm , 100 Å, Thermo Scientific) gebracht werden, wo die eigentliche chromatographische Trennung bei 60°C stattfindet. Vor- und Hauptsäule unterscheiden sich hauptsächlich durch ihren Innendurchmesser, Länge und Partikelgrößen des Säulenmaterials. Dies wird gezielt genutzt, um einerseits größere Injektionsvolumina und damit höhere Probenmengen auf die Vorsäule aufladen zu können, gleichzeitig kann durch Verwendung einer analytischen Säule mit kleineren Partikeln eine höhere Trennschärfe und -kapazität erreicht und somit die Sensitivität erhöht werden [76]. Durch die geringe Flussrate und erhöhte Temperatur wird der Gegendruck in einem für die Kapillaren und das Säulenmaterial ausreichenden Rahmen gehalten, weiterhin wirkt sich dies positiv auf Elutionsverhalten und Peakform aus [152]. Das Umschalten des Ventils gibt dabei auch das Signal zum Start der Datenakquisition im Massenspektrometer, so dass eluierende Peptide direkt online detektiert werden können. Zusätzlich findet eine Kontrolle über einen UV-Detektor statt, so dass anhand einer Absorptionsmessung bei 214 nm bereits die Qualität der Auftrennung abgeschätzt werden kann. Die Auftrennung auf der Hauptsäule wird mittels eines binären Gradienten bewerkstelligt, der aus Lösungsmittel A (0.1% FA) und Lösungsmittel B (0.1% FA mit 84% ACN) bestand. Durch graduelle Erhöhung des Anteils an Lösungsmittel B von 5% auf 50% in 52 min eluieren die Peptide nach aufsteigender Hydrophobizität. Nach Überführung in die Gasphase mittels ESI, wurde ein „Full Scan“ von 300 - 2000 m/z in der Orbitrap bei einer Auflösung von 60,000 durchgeführt. Die jeweils 10 intensivsten Ionen (Top10 Methode) wurden ausgewählt und durch *collision induced dissociation* (CID) mit einer normalisierten Kollisionsenergie (CE) von 35% fragmentiert. Die entstandenen Fragmentationen wurden durch MS/MS-Scans in der Ionenfalle akquiriert.

3.2.1.8 DATENAUSWERTUNG

Die akquirierten Spektren, die in den sogenannten Rohdaten während der Messung gespeichert werden, wurden mittels der Proteome Discoverer Software (Version 1.3.0.339) mit dem integrierten Suchalgorithmus MASCOT™ (Version 2.4.1.) [69] gegen eine humane Datenbank (Uniprot DB, Stand Juli 2012, 20,232 Einträge) abgeglichen. Der generelle Ablauf einer solchen Analyse wurde in Kap.1.3.1.1. bereits detailliert beschrieben. Der

probenspezifische Suchrahmen wurde dafür, wie in Tab.3.2.1.8.1. zusammengefasst, festgelegt.

Tab.3.2.1.8.1.: Übersicht der verwendeten Parameter für den Abgleich der akquirierten Spektren mit einer Protein-Datenbank.

Datenbank	Human Uniprot
verwendetes Enzym	Trypsin
max. Anzahl überlesener Schnittstellen	2
Suchtoleranz für Vorläufer-Ionen	10 ppm
Suchtoleranz für Fragment-Ionen	0.5 Da (nur bei Ionenfallen-Detektion)
Dynamische Modifikationen (Aminosäure), Massenshift	Oxidation (M), +15,9949 Da Phosphorylierung (S,T,Y), +79,9663 Da Acetylierung (Protein N-terminus), +42,0105 Da
Statische Modifikation (Aminosäure), Massenshift	Carbamidomethylierung (C), +57,0214 Da

Es wurden nur PSMs (engl: *peptide spectrum match*) berücksichtigt, die eine FDR von <1% aufwiesen, die anschließend in Microsoft Excel exportiert wurden, um die Daten gemäß der Fragestellung zu analysieren. Bei der Optimierung der SCX-Auftrennung stand eine Prüfung der einzelnen Fraktionen im Hinblick auf ihre jeweilige Ladungsverteilung bei pH 2,7 im Vordergrund. Da die aus dem Spektrum ermittelte Ladung aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen bei der LC-MS nicht derjenigen entsprechen muss, die das Peptid während der SCX-Auftrennung hat, wurde für jedes Peptid der Ladungszustand bei pH 2,7 anhand der jeweiligen Aminosäuresequenz näherungsweise bestimmt. Dabei wird davon ausgegangen, dass der N-Terminus und basische Aminosäuren, wie Histidin, Arginin und Lysin bei pH 2,7 positiv geladen sind. Die Nettoladung des Peptids hängt neben dem Vorhandensein dieser Aminosäuren auch von möglichen posttranslationalen Modifikationen ab. So kann beispielsweise eine Phosphorylierung häufig eine negative Ladung am Serin, Tyrosin oder Threonin einbringen, eine Acetylierung hingegen kann eine positive Ladung am N-Terminus und der Seitenkette eines Lysins maskieren, was zu einer Reduktion der Nettoladung führt. So kann für jede individuelle Peptidsequenz mit zugehörigem Modifikationsmuster eine Nettoladung ermittelt werden. Letztendlich sollte so überprüft werden, in welcher Fraktion

Peptide welchen Ladungszustandes eluieren und in wie weit dies bei Änderung des Gradienten optimiert werden kann (vgl. Kap.4.1.).

3.2.2. N-TERMINALE ANREICHERUNGEN

Für den initialen ChaFRADIC Ansatz wurden zum einen Hefesphäroblasten aus dem Institutsbestand verwendet, um den Erfolg des grundlegenden Prinzips zu validieren. Diese wurden nach einem Standardprotokoll hergestellt [153]. Zur Anwendung des ChaFRADIC Ansatzes auf eine biologisch relevante Fragestellung wurden nach Meisinger et al. [153] aufgereinigte Hefemitochondrien eines Δ Icp55 und eines wildtypischen YPH499-Stammes aus dem kooperierenden Labor von Prof. Dr. Meisinger (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) verwendet. Im einem nachgeschalteten Experiment sollten dann geprüft werden, in wie weit die zuvor identifizierten icp55-Substratspezifikationen auch bei der mitochondrialen Homöostase in *Arabidopsis thaliana* von Bedeutung sind und, ob strukturell verwandte Protein in beiden Organismen dieselben Enzymfunktionen abdecken. Für die Identifizierung der gefundenen Hefe Analogons in höheren Pflanzen wurden aufgereinigte Mitochondrien aus Wildtyp (WT) *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen sowie Δ Icp55, Δ Oct-1-1 und Δ Oct-1-2 Mutanten verwendet, die aus dem Labor von Prof. Jürgen Soll (Ludwig-Maximilians-Universität München, Biologie I - Botanik) extrahiert wurden [154, 155]. Ein verbesserter ChaFRADIC Ansatz wurde mit einem Proteinextrakt aus *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen aus dem Labor von Dr. Dissmeyer (Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle an der Saale) etabliert [156].

3.2.2.1 PROBENVORBEREITUNG

Die oben aufgeführten Materialien wurden in unterschiedlichen Puffern lysiert: (1) Hefesphäroblasten und aufgereinigte Mitochondrien wurden mit 200 μ L 6 M GuHCl in 50 mM Na_2HPO_4 (pH=7,8) aufgeschlossen. (2) Die aufgereinigten Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* wurden in 500 μ L 1% SDS und 50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) -ethansulfonsäure (HEPES, pH=7,8) lysiert. (3) Der Proteinextrakt aus *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen wurde in 1 mL 1% SDS mit 50 mM Tris-HCL (pH=7,8) resolubilisiert. Die Proteinkonzentration aller Proben wurde mit Hilfe eines Pierce BCA-Protein-Assays, wie im Abschnitt 3.2.1.2. beschrieben, in Triplikaten gegen einen Kalibrierstandard bestimmt [157]. Anschließend wurden Cysteine durch Inkubation mit DTT für 30 min bei 56°C bei einer Endkonzentration von 10 mM reduziert und freie

Sulfhydrylgruppen irreversibel mit final 20 mM IAA für 30 min bei RT in Dunkelheit alkyliert.

3.2.2.2 STABILE ISOTOPENMARKIERUNG AUF PROTEINEBENE

Zur Anreicherung N-terminaler Peptide mittels ChaFRADIC ist eine stabile Isotopenmarkierung auf Proteinebene aus zwei Gründen essentiell: Zum einen wird der endogene N-terminus eines Proteins irreversibel markiert und kann im späteren Verlauf zweifelsfrei von den durch den proteolytischen Verdau generierten N-termini unterschieden werden. Zum anderen ist nur durch die Markierung auf Proteinebene ein spezifischer Shift aller internen Peptide möglich - bei gleichbleibenden Elutionsverhalten aller N-terminalen Peptide. Dabei kann grundsätzlich jedes Reagenz eingesetzt werden, welches (1) für primäre Amine spezifisch ist, (2) eine gute Markierungseffizienz besitzt, (3) die Ladung an primären Aminen erhält, (4) nicht zu teuer und (5) groß ist und (6) im besten Fall in mehreren stabilen Isotopenvarianten verfügbar ist. Letzteres erlaubt ein Pooling der Proben bereits auf Proteinebene und nach der Anreicherung die relative Quantifizierung der N-terminalen Peptide unter verschiedenen Bedingungen (z.B. WT gegen Mutante). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Markierungsstrategien gewählt: Für das initiale ChaFRADIC wurde eine Dimethylierung verwendet und für das erweiterte ChaFRADIC wurde das kommerziell erhältliche iTRAQ-Reagenz verwendet. Die Bearbeitung der Proben unterscheidet sich dabei minimal auf Grund der jeweils verwendeten Labeling-Strategie. Allerdings erlaubt das wesentlich kostenintensivere iTRAQ-Reagenz das Multiplexen von bis zu 8 Proben (Dimethylierung hingegen nur maximal drei) und so auch eine Verringerung der eingesetzten Probenmenge je Zustand.

3.2.2.2.1. DIMETHYLIERUNG AUF PROTEINEBENE

Für das initiale Experiment mit Hefesphäroblasten wurde die carbamidomethylierte Probe in zwei Aliquots entsprechend 50 µg aufgeteilt, die jeweils mit einer leichten ($-C_2H_4$) und einer schweren Dimethylierung ($-C_2D_4$) modifiziert werden sollten. Der Labeling-Puffer bestand dabei für die leichte Variante aus 80 mM CH_2O , 160 mM $NaBH_3CN$ und 800 mM HEPES mit einem justierten pH von 8,0 und für die schwere Variante entsprechend aus 80 mM CD_2O , 160 mM $NaBD_3CN$ und 800 mM HEPES bei pH 8,0 in einem Volumen von 500 µL. Anschließend wurde das Volumen aller Aliquots auf 150 µL mit 200 mM HEPES Puffer justiert und zuletzt zu allen Proben ein Aliquot von 50 µL des entsprechenden leichten oder schweren Labelingpuffers zugesetzt, so dass sich eine finale Konzentration von 20 mM

Formaldehyd, 40 mM Natriumcyanoborhydrid und 200 mM HEPES bei pH 8,0 ergab. Beide Proben wurden nach Jentoft et al. [158] 2 h bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit einer Endkonzentration von 60 mM Glycin für 10 Min. bei Raumtemperatur (RT) abgestoppt und eventuelle Nebenreaktion (O-Acylierung an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten) durch Inkubation mit 130 mM Hydroxylamin für 10 Min. bei RT revertiert [140]. Anschließend wurden beide Proben vereinigt und, zur Vorbereitung auf den Verdau, alle Labeling-Reagenzien durch eine Ethanol-fällung, wie im Abschnitt 3.2.1.3. beschrieben, entfernt.

Um eine differentielle Analyse N-terminaler Peptide in den Δ Icp55-, Δ oct1-1 und Δ oct1-2-Mutanten jeweils gegen einen Wildtyp durchzuführen, wurden 30 μ g Protein pro Zustand aus den jeweiligen Hefeproben entnommen und wie oben beschrieben bearbeitet. Die WT-Proben wurden dabei immer mit einer leichten, die Lysate der Mutanten immer mit einer schweren Dimethylierung markiert.

Zur Analyse der Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* wurden 80 μ g Protein pro Zustand entnommen und nach beschriebenen Ablauf mittels Dimethylierung markiert.

3.2.2.2.2. ITRAQ-LABELING AUF PROTEINEBENE

Für den erweiterten ChaFRADIC Ansatz wurde statt der Dimethylierung die Markierung der primären Amine mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen iTRAQ-Kits durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, dass deutlich mehr Proben gegeneinander verglichen werden konnten und in insgesamt 6 Proben zudem die technische Varianz des ganzen Ansatzes geprüft werden konnte. Der Volumenanteil der Probe am Gesamtvolumen im Labeling-Ansatz ist dabei sehr gering, so dass die carbamidomethylierte Probe zunächst einer Ethanol-fällung unterzogen wurde. Dazu wurde 1 mg Protein aus der Probe entnommen und mit dem 10-fachen Volumen an eiskaltem, hochreinem Ethanol aufgefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation bei -40°C, wurden die präzipitierten Proteine für 30 Min. bei 18,000 rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert und das resultierende Proteinpellet zweimal mit 500 μ L eiskaltem Aceton gewaschen. SDS kann durch die Ethanolpräzipitation ebenfalls ausfallen und würde in der Probe angereichert werden, durch die Waschschrte kann SDS jedoch bei gleichbleibender Proteinausbeute effektiv entfernt werden [159]. Nach abschließender Zentrifugation für 10 Min. bei 18,000 rpm bei 4°C wurde das Pellet in 100 μ L 10% (w/v) SDS-Lösung aufgenommen und 6 Aliquots entsprechend 100 μ g Protein entnommen. Jede Probe wurde mit dem 5-fachen Volumen an Reaktionspuffer aufgefüllt, dieser bestand aus 500 mM

Triethylammoniumbicarbonat (TEAB) in 20% Isopropanol/Wasser (v/v) mit pH 8,5. Jedes der 8 verschiedenen iTRAQ-Label enthielt 20 μL Reagenz, welches zunächst nach Herstellerangaben mit 80 μL Isopropanol aufgefüllt wurde. Das so verdünnte Reagenz wurde komplett zu dem jeweiligen Proteinaliquot hinzugefügt und laut Herstellerangaben für 2 h bei 25°C im Thermomixer inkubiert [85]. Anschließend wurden alle Proben vereinigt und die Reaktion analog zum Dimethyl-Labeling gestoppt. Abschließend wurde die gepoolte Probe in 3 Aliquots entsprechend 200 μg Protein aufgeteilt und jeweils einer Ethanol-fällung, wie zuvor beschrieben, unterzogen.

3.2.2.3 PROTEOLYTISCHER VERDAU

Die Effizienz eines proteolytischen Verdau hängt wesentlich von der Enzymaktivität ab. Daher sollten die Bedingungen besonders in Bezug auf (i) den tolerierten pH-Bereich des Enzyms, (ii) das jeweilige Temperaturoptimum, (iii) das Mengenverhältnis und (iv) die Detergenz- oder Chaotropenkonzentration in den jeweiligen Proben angepasst werden. Durch die vorherige Ethanol-fällung wurden alle Proben bereits aufgereinigt und sollten keine Detergenzien mehr enthalten, darüber hinaus wurden in diesem Schritt auch die Labelreagenzien entfernt, so dass unerwünschte Reaktionen unterbunden wurden. Die Proteinpellets mussten für den Verdau zunächst wieder in Lösung gebracht werden, dazu wurden sie durch Zugabe eines Chaotrops, hier GuHCl, resolubilisiert. Dabei empfiehlt sich die zu verwendende Konzentration an die jeweilige Proteinmenge anzupassen, um das Gesamtvolumen des Verdauansatzes nicht unnötig zu erhöhen. Das zu erreichende Volumen ergibt dabei sich aus der jeweiligen Verdünnung, die zu einer finalen Konzentration von 0.2 – 0.6 M GuHCl führen sollte, damit die verwendeten Enzyme effektiv schneiden. Durch Verwendung eines dem pH-Bereich entsprechenden Puffersalzes, wird das pH-Optimum des Enzyms auch über längere Inkubationszeiten gewährleistet. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die verwendeten Enzyme unterschiedliche Temperatur- und Inkubationsanforderungen haben [142, 160-162]. Die Verdaubedingungen der jeweiligen Proben wurden in Tab.3.2.2.3.1. zusammengefasst.

Tab.3.2.2.3.1.: Übersicht der Verdaubedingungen im jeweiligen ChaFRADIC Experiment.

	Initiales ChaFRADIC			Erweitertes ChaFRADIC		
	Hefe	Hefe Mito- chondrien	Arabidopsis Mito- chondrien	Arabidopsis Keimlinge		
Proben- menge	2 x 50 µg	2 x 30 µg	2 x 80 µg	200 µg	200 µg	200 µg
Labeling- Strategie	DML	DML	DML	iTRAQ	iTRAQ	iTRAQ
Ethanol- fällung	√	√	√	√	√	√
Resolubili- sierung	2 M GuHCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.8	2 M GuHCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.8	2 M GuHCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.8	6 M GuHCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.8	6 M GuHCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.8	6 M Harnstoff, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.8
Benötigte Verdünnung des Chaotrops	10-fach	10-fach	10-fach	10-fach	10-fach	15-fach
Finale Zusammen- setzung Verdau- puffer	0.2 M GuHCl, 50mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM CaCl ₂ , 5% ACN, pH 7.8	0.2 M GuHCl, 50mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM CaCl ₂ , 5% ACN, pH 7.8	0.2 M GuHCl, 50mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM CaCl ₂ , 5% ACN, pH 7.8	0.6 M GuHCl, 50mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 5% ACN, pH 7.8	0.6 M GuHCl, 50mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 5% ACN, pH 7.8	0.4 M Harnstoff, 50mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.8
Enzym	Trypsin T-1426 (Sigma- Aldrich)	Trypsin T-1426 (Sigma- Aldrich)	Trypsin T-1426 (Sigma- Aldrich)	Trypsin Sequencing grade Trypsin (Promega)	Subtilisin Sequencing grade Subtilisin (Sigma- Aldrich)	GluC Sequencing grade GluC (Promega)
Verdau-Ratio (w:w)	1:20	1:20	1:25	1:20	1:20	1:20
Temperatur- optimum	37°C	37°C	37°C	37°C	56°C	25°C
Inkubations- dauer	15 h	15 h	15 h	14 h	20 min	14 h

Letztendlich soll mit der Wahl der Enzyme im erweiterten ChaFRADIC Ansatz eine größere Sequenzabdeckung erzielt werden, so dass auch Peptide, die auf Grund des Arg-C-typischen

Verdaus im initialen Ansatz verloren gehen, durch den proteolytischen Verdau mit alternativen Enzymen ebenfalls angereichert werden können (vgl. Tab.3.2.2.3.2.).

Tab.3.2.2.3.2.: Beispielhafte Entstehung verschiedener Peptide bei Einsatz der drei verwendeten Proteasen. Bei Einsatz einer einzelnen Protease (bspw. ArgC) entstehen auch immer Peptide, die z.B. auf Grund ihrer geringen oder übermäßigen Länge nur schlecht anreicherbar und/oder im LC-MS detektierbar sind. Bei Verwendung einer anderen Protease (bspw. GluC oder Subtilisin) entstehen aus derselben Sequenz deutlich besser analysierbare Peptide, so dass auch Peptide abgedeckt werden können, die sonst auf Grund ihrer Sequenz schlecht oder gar nicht angereichert bzw. detektiert werden könnten.

	ArgC Verdau	GluC Verdau	Subtilisin Verdau
Peptid 1	XXXXXXXXKXXD/XXXXXXXXXR ⁺	XXXXXKXXD/E	XXXXXKXXX
Peptid 2	XXXR ⁺	XXXRXXXXD/E	XXXRXXXXX
LC-MS Detektion	erschwert	begünstigt	begünstigt

Die Verdaueffizienz wurde durch eine monolithische Auftrennung, wie in Burkhart et al. [149] sowie im Kapitel 3.21.4. beschrieben, geprüft. Anschließend wurden die Proben mit 10% TFA angesäuert und die Entsalzung mit Hilfe von 4 mg SPE-Kartuschen nach im Abschnitt 3.2.1.5. beschriebenem Protokoll durchgeführt. Die eluierten Peptide wurden unter Vakuum getrocknet und anschließend in jeweils 52 µL SCX-Puffer A aufgenommen. Ein Aliquot korrespondierend zu 0,5 – 1 µg Peptid wurde zur Überprüfung der Labeleffizienz sowie der globalen Analyse entnommen.

3.2.2.4 ANREICHERUNGEN N-TERMINALER PEPTIDE MITTELS CHAFRADIC

Die einzelnen Anreicherungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, daher unterscheiden sich die chromatographischen Bedingungen, je nachdem zu welchem Zeitpunkt der Optimierung sie durchgeführt wurden. Grundsätzlich war aber in jedem Experiment eine Auftrennung nach definierten Ladungszuständen möglich, so dass das grundlegende ChaFRADIC Prinzip in allen Ansätzen genutzt wurde. Aus Gründen der Übersicht wurden die einzelnen chromatographischen Parameter in Tab.3.2.2.4.1. dargestellt. Der Durchfluss (engl.: *flow through*, FT) aller initialen ChaFRADIC Ansätze wurde verworfen, erst im erweiterten ChaFRADIC wurde dieser ohne weitere Anreicherung direkt nach der ersten Dimension gemessen, um eventuell vorhandene N-terminale Peptide zu identifizieren. Dafür wurde der Durchfluss zunächst unter Vakuum getrocknet, in 0.1% TFA aufgenommen und anschließend mit R3-Tips entsalzt.

Tab.3.2.2.4.1.: Übersicht der verwendeten chromatographischen Bedingungen im jeweiligen ChaFRADIC Experiment.

	Initiales ChaFRADIC	Erweitertes ChaFRADIC
	<ul style="list-style-type: none"> • Hefe • Hefe Mitochondrien • Arabidopsis Mitochondrien 	Arabidopsis Keimlinge
Trennsäule	Polysulfoethyl A Säule (PolyLC, USA), 150 x 1 mm, 5 µm Partikeldurchmesser, 200 Å Porengröße	
HPLC System	U3000 HPLC System (Thermo Scientific, Bremen, D)	
SCX-Puffer A	10 mM KH ₂ PO ₄ , 20% ACN, pH=2,7	10 mM KH ₂ PO ₄ , 20% ACN, pH=2,7
SCX-Puffer B	10 mM KH ₂ PO ₄ , 188 mM KCl, 20% ACN, pH=2,7	10 mM KH ₂ PO ₄ , 250 mM KCl, 20% ACN, pH=2,7
SCX-Puffer C	10 mM KH ₂ PO ₄ , 800 mM NaCl, 20% ACN, pH=2,7	10 mM KH ₂ PO ₄ , 600 mM NaCl, 20% ACN, pH=2,7
Flussrate	80 µL/min	
Gradient	100% A für 10 Min.	100% A für 10 Min.
	0 bis 20% B in 18 Min.	0 bis 15% B in 9 Min.
	20% B für 10 Min.	15% B für 9 Min.
	20% bis 40% B in 2 Min.	15% bis 30% B in 8 Min.
	40% B für 5 Min.	30% B für 11 Min.
	40% bis 100% B in 5 Min.	30% bis 100% B in 5 Min.
	100% B für 5 Min.	100% B für 5 Min.
	100% C für 5 Min.	100% C für 5 Min.
Erhaltene Fraktionen	Durchfluss (FT), +1, +2, +3, +4, >4	

Die restlichen Fraktionen der ersten SCX-Dimension wurden zunächst unter Vakuum eingengt und anschließend in einem ausreichenden Volumen 200 mM Na₂HPO₄ Puffer mit pH 8,0 aufgenommen, bis der pH-Wert aller Proben auf 7,0 erhöht werden konnte. Um die internen Peptide erfolgreich in der zweiten Dimension abtrennen zu können, müssen diese zunächst spezifisch modifiziert werden. Dafür bietet sich aus mehreren Gründen eine trideutero (D₃)-Acetylierung an: (i) die Umsetzung mit einem D₃-NHS-Ester ist spezifisch für primäre Amine, kann aber auf Grund des vorherigen Labelings auf Proteinebene nur an freien N-Termini interner Peptide angreifen, (ii) die deuterierte Variante der Acetylierung ermöglicht eine Unterscheidung von endogenen und *in vitro* acetylierten Peptiden und (iii) genau wie eine native Acetylierung reduziert sie die Ladung des Peptids, so dass nur interne

Peptide in der zweiten Dimension einen „Ladungsshift“ zeigen werden, wobei N-terminale Peptide unverändert bleiben. Die Modifizierung erfolgte in allen Proben durch Inkubation mit 20 mM D₃-NHS für 1 h bei 37°C in einem Thermomixer, gefolgt von einer zweiten Inkubation mit 10 mM D₃-NHS unter identischen Bedingungen. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 60 mM Glycin für 10 Min. bei RT abgestoppt und mögliche Nebenreaktionen durch Inkubation mit 130 mM Hydroxylamin für 10 Min. bei RT revertiert. Nach Ansäuerung aller Proben mit 10% TFA auf pH 2-3, wurden die Proben im initialen ChaFRADIC-Ansatz mit 4 mg SPE-Kartuschen und im erweiterten ChaFRADIC mit R3-Tips, wie bereits in Abschnitt 3.2.1.5. beschrieben, entsalzt. Nach Eintrocknen unter Vakuum wurden die Proben erneut in 50 µL SCX-Puffer A resolubilisiert und unter exakt identischen Bedingungen wie zuvor aufgetrennt. Dies sollte dazu führen, dass die N-terminalen Peptide in derselben Fraktion wie zuvor eluieren, alle internen Peptide auf Grund der reduzierten Ladung jedoch zu einer früheren Fraktion „shiften“. Daher wurden in der zweiten Dimension für alle rechromatographierten Fraktionen jeweils identische Zeitfenster zur ersten Auftrennung gesammelt. Schließlich wurden die erhaltenen, angereicherten Fraktionen jeden Experimentes (+1, +2, +3, +4, >+4) unter Vakuum eingeengt und in 0.1% TFA resuspendiert. In den initialen ChaFRADIC-Experimenten wurde die finale Entsalzung mittels Supel 10 µL Entsalzungs-Tips (Sigma-Aldrich) durchgeführt, wie im Protokoll im Abschnitt 3.2.1.5. angegeben. Im erweiterten ChaFRADIC wurden stattdessen R3-Tips, wie bereits beschrieben, verwendet, da diese eine verbesserte Peptidausbeute zeigten. Anschließend wurden die Proben für die LC-MS-Messung in 0.1% TFA aufgenommen.

3.2.2.5 LC-MS-MESSUNG UND ANALYSE DER ANGEREICHERTEN PEPTIDE

Alle angereicherten Fraktionen wurden entweder auf einem Q-Exactive oder einem Q-Exactive Plus Massenspektrometer analysiert, welches online mit einem nano RSLC HPLC-System (alle Thermo Scientific) gekoppelt war. Abhängig von der UV-Intensität der jeweiligen Fraktion in der zweiten SCX-Auftrennung wurden unterschiedliche Mengen der angereicherten Proben gemessen, wodurch sich auch in der Gradienten-Auswahl einige Änderungen ergaben. Tab.3.2.2.5.1. gibt eine Übersicht über die verwendeten Parameter der LC-MS-Messungen, wobei bei allen Analysen die Probe zunächst bei 20 µL/min Ladefluss 0,1% TFA auf eine Vorsäule (C18 PepMap RSLC, 100 µm x 2 cm, Thermo Scientific) geladen wurde und anschließend über die Hauptsäule (C18 PepMap RSLC, 75 µm x 50 cm, Thermo Scientific) aufgetrennt wurde.

Tab.3.2.2.5.1.: Zusammenfassung der verwendeten LC-MS-Parameter zur Analyse der angereicherten N-terminalen Peptide.

		Initiales ChaFRADIC			Erweitertes ChaFRADIC
	Proben	Hefe	Hefe Mitochondrien	Arabidopsis Mitochondrien	Arabidopsis Keimlinge
LC	Gradient	3 - 42% B in 127 min	3 - 42% B in 90 min	3 - 42% B in 90 min	3 - 42% B in 90 min
	Gemessener Anteil der Fraktion	2/3 Fraktion für +1, +2, +4 1/3 Fraktion für +3, +5	1/3 jeder Fraktion	Komplette Fraktion	1/3 jeder Fraktion
MS	MS Instrument	Q-Exactive	Q-Exactive	Q-Exactive	Q-Exactive Plus
	Modus	Daten-abhängige Acquisition			
	Full Scan Auflösung	70,000			
	Precursor Auswahl	Top15			
	MS/MS Auflösung	17,500			
	Max. Ionenanzahl MS ¹	3 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶
	Max. Füllzeit MS ¹	120 ms			
	Max. Ionenanzahl MS ²	5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵
	Max. Füllzeit MS ²	250 ms	250 ms	250 ms	200 ms
	Normalisierte Kollisionsenergie	CE 30			
	10% NH ₄ OH Einspeisung ^a	Für Ladungszustände +2 - +5	Für Ladungszustände +2 - +5	Für Ladungszustände +3 - +5	Für Ladungszustände +3 - +5
	Erlaubnis für Fragmentierung von einfach geladenen Peptiden ^b	Für Ladungszustand +1			
	Besonderheiten				Unteres Limit für Messbereich wurde auf 100 m/z gesetzt ^c

^a Das Platzieren von Ammoniumhydroxid in der Ionenquelle führt nach Thingholm et al. zur Reduktion von Ladungszuständen bei den in die Gasphase überführten Ionen, dies findet häufige Anwendung bei der Analyse von hochgeladenen, gelabelten Peptiden, da diese höhere Ladungseffekte bei ESI zeigen und schlechter ionisieren [163].

^b In einer massenspektrometrischen Peptidanalyse werden einfach geladene Ionen meist von der Fragmentierung ausgeschlossen, da es sich meist nicht um Peptide handelt, sondern um Kontaminationen aus der Umgebung. Wird eine Fragmentierung einfach geladener Ionen erlaubt, ist es von Vorteil solche Kontaminationen mit ihren zuvor ermittelten m/z Werten von der Analyse auszuschließen.

^c In Analysen von iTRAQ-markierten Peptiden muss der aufzuzeichnende m/z-Bereich niedriger gewählt werden, um die Informationen über die Reporterionen (m/z 113 – 121) auslesen zu können.

Dazu wurde ein binärer Gradient bestehend aus Lösungsmittel A (0,1% FA) und B (0,1% FA, 84% ACN) bei einer Flussrate von 250 nL/min bei 60°C genutzt. Im erweiterten ChaFRADIC Ansatz wurden zudem die FT-Fraktionen direkt nach der ersten Dimension analysiert, um Peptide zu identifizieren, die nicht auf der Säule retardieren. Diese Fraktion ist erfahrungsgemäß wenig komplex, so dass hier ein kurzer Gradient von 3-42% B in 50 Min. gewählt wurde. Zudem wurde auch hier die Fragmentierung für einfach geladene Moleküle erlaubt in Kombination mit einer Ausschlussliste für Kontaminationen aus der Umgebung (siehe auch Erklärung in Tab.3.2.2.5.1. Fußnote ^b). Hintergrund ist, dass durch den tryptischen Verdau, das Labeling und die Ionisierungsmethode (ESI) höher geladene Peptidionen (+2 oder höher) erwartet werden und somit einfach geladene Ionen von der Fragmentierung ausgeschlossen werden sollen. Kleine chemische Moleküle, beispielsweise aus der Raumluft, sind häufig einfach geladen. Deren Massen können in einer Leerprobe (engl.: *blank*) aufgezeichnet werden und durch Erstellen einer Exklusionsliste (engl.: *exclusion list*) von der anschließenden Probenmessung ausgeschlossen werden. Dies macht vor allem bei der Analyse der beim ChaFRADIC erhaltenen FT- und +1-Fraktionen Sinn, da so hauptsächlich enthaltene einfach geladene Peptide und weniger Kontaminationen fragmentiert werden. Zusätzlich zu den angereicherten Proben wurden von der nicht-angereicherten Probe jeweils 0,5 µg - 1 µg Peptid in einem 2 - 4 h Gradienten gemessen. Dies diente (i) zur Bestimmung der Labeleffizienz und (ii) im erweiterten ChaFRADIC Ansatz zusätzlich zur Normalisierung der erhaltenen Reporter-Intensitäten (siehe Abschnitt 3.2.2.7.).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die massenspektrometrische Analyse eine Q Exactive (Thermo Scientific) verwendet, deren grundlegender Bauplan in Abb.3.2.2.5.1. dargestellt wurde. Im Unterschied zu vorangegangenen Massenspektrometer-Modellen verfügte sie erstmals über einen effektiven Quadrupol als Massenfiter bestehend aus vier parallelen hyperbolisch geformten Elektroden. Durch wechselseitiges Anlegen einer Gleichspannung an den jeweils gegenüberliegenden Elektroden, die mit einer hochfrequenten Wechselspannung überlagert wird, entsteht ein alternierendes elektrisches Feld, welches nur Ionen eines bestimmten Massenbereiches stabil durch den Quadrupol transportiert. Die in der Ionenquelle erzeugten Ionen werden hier selektiert und für einen Übersichtsscan (engl.: *Full Scan*, MS¹) in der Orbitrap analysiert. Diese dient als Massenanalysator, der im Inneren eine spindelförmige Elektrode aufweist, um die die Ionenpakete axial abhängig von ihrem m/z-Verhältnis mit einer bestimmten Frequenz oszillieren.

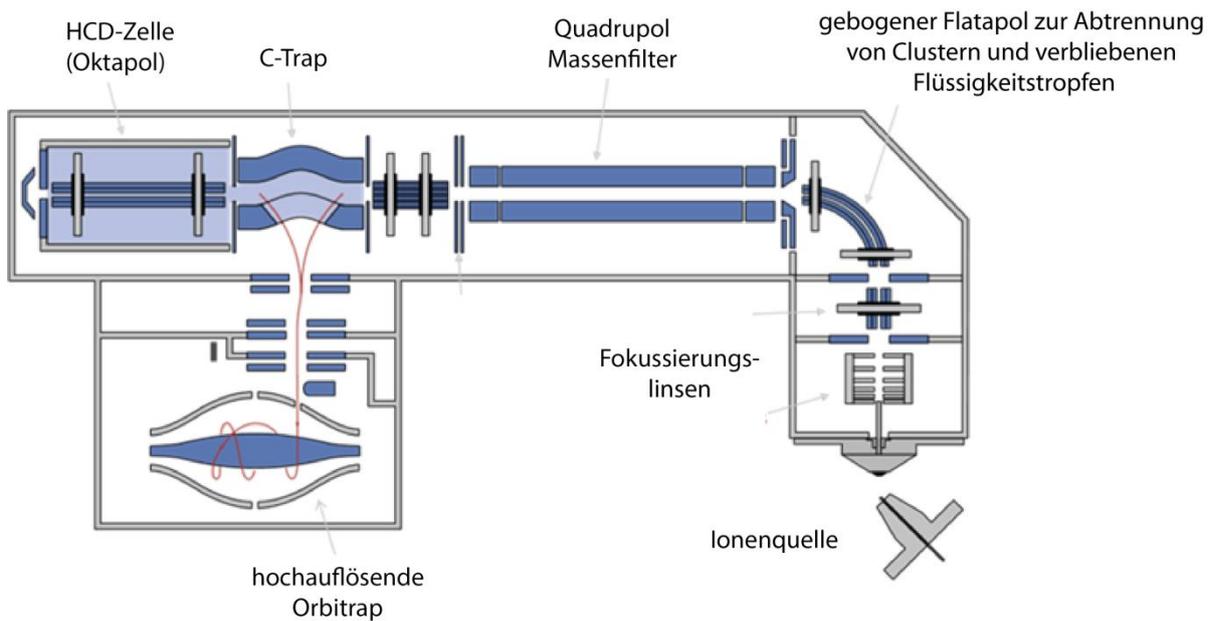


Abb.3.2.2.5.1.: Schematische Übersicht eines Q-Exactive Massenspektrometers. Die Ionen werden über die Ionenquelle in das Massenspektrometer eingebracht und über die Ionenoptik und den gebogenen Flatapol zum Quadrupol transferiert. Dieser operiert als Massenfilter und bestimmt den Bereich, innerhalb dessen Ionen ausgelesen werden können. Nachdem ein hochauflösender Full Scan in der Orbitrap durchgeführt wurde, können die intensivsten Precursor-Ionen ausgewählt und in der HCD-Zelle fragmentiert werden. Die Produktionen können anschließend ebenfalls hochauflösend detektiert werden. Abbildung modifiziert nach Thermo Scientific.

Durch Fourier-Transformation können dann die detektierten axialen Oszillationen bestimmten m/z -Werten zugeordnet werden. Basierend auf diesem hochauflösendem Full Scan werden dann die intensivsten 15 Ionen (Top15) zur Fragmentierung (MS/MS oder MS^2) ausgewählt, im Quadrupol selektiert und durch die C-Trap zur HCD-Zelle weiter transferiert. Durch den Einsatz eines sogenannten Oktapols kann der niedrige Massenausschluss (engl.: *low mass cut off*), dem lineare Ionenfallen unterliegen, überwunden werden, so dass Fragmentationen eines breiten Massenbereiches gespeichert werden können [65, 164]. Daher ist dieses Setup besonders geeignet für die Detektion von iTRAQ-derivatisierten Peptiden, da die quantitative Analyse über den Vergleich der entstehenden niedrig molekularen Reporterionen bewerkstelligt wird. Zudem werden die Fragmentationen hochauflösend in der Orbitrap ausgelesen, so dass sowohl Full Scan als auch MS/MS Scan mit Hochauflösung detektiert werden. Dies resultiert in qualitativ hochwertigen Spektren, die wiederum zu einer hohen Identifikationsrate beitragen. Abhängig ist dies auch von den verwendeten Füllzeiten, so dass eine maximale Ionenanzahl bei der Analyse festgelegt wird, nach deren Erreichen das Ionenpaket ausgelesen wird. Dies gewährleistet eine ausreichend hohe Zahl an zu

analysierenden Ionen, wobei dies bei sehr niedrig abundanten Analyten durch die maximale Füllzeit begrenzt wird, um dennoch eine zeiteffiziente Analyse zu garantieren.

3.2.2.6. DATENAUSWERTUNG

Die spektralen Rohdaten wurden mit Hilfe des Proteome Discoverers, wie in Abschnitt 1.3.1.1. beschrieben, mit geeigneten Datenbanken abgeglichen. Zusätzlich wurden die identifizierten Peptide bei ausreichender Spektrenqualität auch quantifiziert. Der Proteome Discoverer besitzt dazu eine Funktion, bei der nach Auswahl der Proben-spezifischen Parameter die Intensitäten der Vorläufer-Ionen (Dimethyl) oder der Reporter-Ionen (iTRAQ) relativ zu einander verglichen werden.

Tab.3.2.2.6.1.: Übersicht der verwendeten Such- und Quantifizierungsparameter in verschiedenen ChaFRADIC Experimenten.

		Initiales ChaFRADIC proof-of-principle mit Hefe	Initiales ChaFRADIC Hefe Mitochondrien	Initiales ChaFRADIC Arabidopsis Mitochondrien	Erweitertes ChaFRADIC Arabidopsis (Trypsin-Verdau)	Erweitertes ChaFRADIC Arabidopsis (Subtilisin-Verdau)	Erweitertes ChaFRADIC Arabidopsis (GluC-Verdau)	Erweitertes ChaFRADIC Arabidopsis (Trypsin-Verdau)	Erweitertes ChaFRADIC Arabidopsis (Subtilisin-Verdau)	Erweitertes ChaFRADIC Arabidopsis (GluC-Verdau)					
	Proteome Discoverer Version	1.3.0.339	1.3.0.339	1.3.0.339	1.4.1.14			1.4.1.14							
	Mascot Version	4.2.1	4.2.1	4.2.1	4.2.1			4.2.1							
	Datenbank	SGD Datenbank	SGD Datenbank	Uniprot Datenbank	Uniprot Datenbank			TAIR10 Datenbank							
	Taxonomie	Hefe	Hefe	Arabidopsis thaliana	Arabidopsis thaliana			Arabidopsis thaliana							
	Stand	Sep 11	Sep 11	Jul 12	Dez 14			Feb 15							
	Anzahl Einträge	6 717	6 717	11 340	13 414			35 386							
	verwendetes Enzym	Semi-ArgC	Semi-ArgC	Semi-ArgC	Semi-ArgC	'none'	Semi-GluC	Semi-ArgC	'none'	Semi-GluC					
	max. Anzahl an überlesenen Schnittstellen	2	2	2	2		2	2		2					
	Toleranz für Vorläufer-Ionen	10 ppm			5 ppm			5 ppm							
	Toleranz für Fragment-Ionen	0,02 Da			0,01 Da			0,01 Da							
1. Suche für Derivatisierte N-terminale Peptide	Dynamische Modifikationen (Aminosäure), Massenshift	Dimethylierung leicht (K), +28,0313 Da		Oxidation (M), +15,9949 Da	Oxidation (M), +15,9949 Da			Oxidation (M), +15,9949 Da							
		Dimethylierung leicht (Peptid N-terminus), +28,0313 Da													
		Dimethylierung medium (K), +34,0689 Da													
	Dimethylierung medium (Peptid N-Terminus), +34,0689 Da														
Statische Modifikation (Aminosäure), Massenshift	Carbamidomethylierung (C), +57,0214 Da		Carbamidomethylierung (C), +57,0214 Da			Carbamidomethylierung (C), +57,0214 Da									
			iTRAQ-8plex (K), +304,2053 Da			iTRAQ-8plex (K), +304,2053 Da									
			iTRAQ-8plex (Peptid N-Terminus), +304,2053 Da			iTRAQ-8plex (Peptid N-Terminus), +304,2053 Da									
2. Suche für endogen acetylierte N-terminale Peptide	Dynamische Modifikationen (Aminosäure), Massenshift	Dimethylierung leicht (K), +28,0313 Da		Oxidation (M), +15,9949 Da	Oxidation (M), +15,9949 Da			Oxidation (M), +15,9949 Da							
		Dimethylierung medium (K), +34,0689 Da													
	Acetylierung (Peptid N-Terminus), +42,0105 Da		Carbamidomethylierung (C), +57,0214 Da								Carbamidomethylierung (C), +57,0214 Da				
	Statische Modifikation (Aminosäure), Massenshift	Carbamidomethylierung (C), +57,0214 Da									Carbamidomethylierung (C), +57,0214 Da			Carbamidomethylierung (C), +57,0214 Da	
iTRAQ-8plex (K), +304,2053 Da				iTRAQ-8plex (K), +304,2053 Da											
Acetylierung (Peptid N-Terminus), +42,0105 Da				Acetylierung (Peptid N-Terminus), +42,0105 Da											
Statistik-Node* Quantifizierungsbesonderheiten	Percolator			Percolator			Percolator								
	Vorläufer-Ionen Quantifizierung			Reporter-Ionen Quantifizierung			Reporter-Ionen Quantifizierung								
		Um relativ gegeneinander quantifiziert zu werden, müssen Peptidpaare innerhalb eines Retentionszeitfenster von 1 min eluieren													

* Nodes sind Knotenpunkte, die im Proteome Discoverer einzeln ausgewählt werden können, sie enthalten beispielsweise Statistik oder Quantifizierungsoptionen

Bei der MS¹-basierten Quantifizierung ist es dem Programm nicht möglich endogen acetylierte und dimethylierte N-terminale Peptide in derselben Suche zu quantifizieren. Daher wurden zwei separate Suchen durchgeführt. Eine Übersicht der verwendeten Einstellungen ist in Tab.3.2.2.6.1. zusammengestellt. Die Ausgabedatei des Proteome Discoverers wurde nach Konfidenz der PSMs (FDR <1%) und zusätzlich nach ihrem Rang gefiltert, so dass nur jeweils die am besten passende Peptididentifikation pro Spektrum (Search Engine Rank 1) berücksichtigt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb des Proteome Discoverers über die sogenannte Percolator-Node, die von Käll et al. etabliert und seitdem stetig weiterentwickelt wurde [165, 166]. Percolator stellt eine Alternative zur FDR dar, da er auf einem Algorithmus basiert, der halb-automatisiertes maschinelles Lernen erlaubt. Wie in Abschnitt 1.3.1.1. bereits beschrieben, gelten auch hier die erzeugten decoy-Sequenzen weiterhin als die bekannten Falsch-Positiven-IDs. Zusätzlich werden aber nun auch hochbewertete Identifikationen aus den target-Sequenzen als Wahr-Positive-IDs bewertet und der Suchalgorithmus anhand ihrer Eigenschaften (Mascot Score, Vorläufermassenfehler, Fragmentmassenfehler, Anzahl möglicher Modifikationen etc.) darauf trainiert, basierend auf diesen positiv oder negativ gewichteten Merkmalen, alle identifizierten Peptide erneut zu bewerten, was oft zu einer verbesserten Sensitivität führt [165, 167].

3.2.2.7. DATENINTERPRETATION

Für den initialen ChaFRADIC Ansatz zur Analyse von Hefezellen sowie Hefe-Mitochondrien wurde die gefilterte Proteome Discoverer Datei in eine Excel Datei exportiert. Zur Erstellung der finalen Liste gefundener N-terminaler Peptide, wurden nur Peptidhits berücksichtigt, deren Startposition innerhalb der ersten 100 Aminosäuren der Proteinsequenz lag. Dies wurde als Ausschlusskriterium benutzt, da die proteolytische Abspaltung der Präsequenzen in mitochondrialen Matrixproteinen nahe des N-Terminus stattfindet und es sich bei gefundenen Peptiden aus dem Inneren der Proteinsequenz eher um Degradationsprodukte handeln könnte und weniger um den prozessierten N-Terminus eines Proteins. Weiterhin wurden nur einmalig vorkommende Peptide berücksichtigt und deren erste 6 Aminosäuren verglichen, um anhand dessen redundante Sequenzen (z.B. auf Grund von überlesenen Schnittstellen) zu eliminieren.

Zur Analyse der *Arabidopsis thaliana* Mitochondrien wurde die gefilterte Proteome Discoverer Ausgabedatei zunächst in Excel exportiert und anschließend alle Protein-Einträge unter Verwendung eines Excel-Skriptes in ihre korrespondierenden Arabidopsis-Proteinamen gemäß der TAIR-Datenbank (engl.: *The Arabidopsis Information Resource*) konvertiert. Anhand dieser Benennung konnten die gefundenen Hits in der SUBA (engl.:

subcellular location database for Arabidopsis proteins) Datenbank gefunden und die subzelluläre Lokalisation sowie Proteinbeschreibung ausgelesen werden [168]. Um eine finale Liste an N-terminalen Peptiden zu erstellen wurden nur Hits berücksichtigt, die mitochondrial waren und deren Startposition innerhalb der ersten 120 Aminosäuren der jeweiligen Proteinsequenz lag.

Im erweiterten ChaFRADIC Ansatz wurden zunächst alle identifizierten Peptide auf PSM-Ebene exportiert und für jedes PSM die vom Proteome Discoverer standardmäßig errechneten Ratios bezogen auf die erste Probe durch Normierung auf den PSM-Median herausgerechnet sowie anschließend auf den Median der globalen Ratios normalisiert. Dies hat den Hintergrund, dass eine solche Normierung die durch technische Varianz eingebrachten Fehler wieder kompensieren kann, deutlich präzisere Werte erzeugt und somit einen validen Datensatz liefert. In Tab.3.2.2.7.1. wurde beispielhaft dargestellt, welche Auswirkungen die Normierung auf die einzelnen Werte hat. Werden die gegebenen Ratios auf den Median aller Ratios eines PSMs normiert, ergeben sich deutlich homogenere Werte, die dann nicht mehr nur den Bezug zur ersten Probe spiegeln, sondern Aufschluss darüber geben, wie abundant ein PSM in einer Probe (iTRAQ-Kanal 113-118) ist, in Relation zu allen anderen Kanälen desselben PSMs (siehe Tab.3.2.2.7.1. PSM 3 nach Normierung auf den PSM-Median). Zudem können auch Schwankungen für einen ganzen iTRAQ-Kanal auftreten, dabei zeigen die iTRAQ-Ratios eines Kanals für alle gefundenen PSMs immer deutlich höhere Werte als in allen anderen Kanälen (siehe Tab.3.2.2.7.1. 117→globaler Median 3-fach höher als in anderen Kanälen, 118→ globaler Median 3-fach geringer als in anderen Kanälen). Dies kann auf Pipettierfehler, eine nicht präzise BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung oder ein unzureichendes Angleichen der Probenmengen vor dem Multiplexen hindeuten. Anhand eines auf Basis des globalen Medians errechneten Korrekturfaktors können solche durch die Probenvorbereitung eingebrachten Abweichungen kompensiert und deutlich präzisere Werte erhalten werden (siehe Tab.3.2.2.7.1 117 und 118 nach Normierung mit Hilfe des errechneten Korrekturfaktors). Gleichzeitig werden aber Werte, die eine Hoch-/ oder Runterregulation anzeigen, nicht verfälscht (siehe Tab.3.2.2.7.1. PSM 4 in 116 vor nach Normierung mit Hilfe des Korrekturfaktors). Zur finalen Auswertung des Experimentes wurden anschließend wurden alle PSMs gruppiert, die vom selben Protein stammten, dieselbe Sequenz besaßen und dasselbe Modifikationsmuster aufwiesen. So konnte für zusammengehörige PSMs durch abschließende Bildung des Medians jedem Peptid eine normalisierte Abundanz zugewiesen werden.

Tab.3.2.2.7.1.: Exemplarische Darstellung einer iTRAQ-Normalisierung zur Kompensation der technischen Varianz.

Ohne Normierung							PSM-Median
	113/113	114/113	115/113	116/113	117/113	118/113	
PSM 1	1.0	1.0	1.0	1.2	2.9	0.3	1.0
PSM 2	1.0	1.3	1.0	1.2	4.0	0.4	1.1
PSM 3	1.0	12.0	15.0	10.0	36.0	4.0	11.0
PSM 4	1.0	1.0	1.0	3.0	2.9	0.3	1.0
globaler Median	1.0	1.1	1.0	1.2	3.0	0.4	
Korrekturfaktor	1.1	1.0	1.1	0.9	0.4	2.6	
Nach Normierung auf den Peptidmedian							
PSM 1	1.0	1.0	1.0	1.2	2.9	0.3	
PSM 2	0.9	1.2	0.9	1.1	3.7	0.4	
PSM 3	0.1	1.1	1.4	0.9	3.3	0.4	
PSM 4	1.0	1.0	1.0	3.0	2.9	0.3	
Nach Normierung mit Hilfe des errechneten Korrekturfaktors							
PSM 1	1.0	0.9	1.1	1.0	1.0	0.9	
PSM 2	0.9	1.2	1.0	0.9	1.3	1.1	
PSM 3	0.1	1.0	1.4	0.8	1.2	1.0	
PSM 4	1.0	0.9	1.1	2.6	1.0	0.9	

Die Einträge aus allen drei Verdauansätzen wurden vereinigt und zusätzliche Information über Proteinfunktion, Lokalisierung etc. aus der Uniprot Datenbank hinzugefügt. Dieser Vorgang wurde für beide Suchen durchgeführt, so dass ein Datensatz stammend von der Uniprot Datenbank und ein weiterer für die TAIR10 Datenbank entstand.

3.2.3. ANREICHERUNG DISULFIDVERBRÜCKTER PEPTIDE

Die Entwicklung eines ChaFRADIC Ansatzes zur Anreicherung Disulfid-verbrückter Peptide wurde zunächst mit einem Modellprotein, dem bovinen Serum Albumin (BSA), durchgeführt, da es sich mit 17 Disulfidbrücken besonders gut zur Überprüfung des ChaFRADIC-Ansatzes eignet. Weiterhin wurde die Anwendung auf eine komplexe biologische Probe geprüft, dazu wurden Hefezelllysate verwendet, die in dem kooperierenden Labor von Prof. Jan Riemer (Universität zu Köln, Institut für Biochemie) präpariert wurden. Dafür wurden Hefezellen eines W303 WT-Stammes zunächst auf Galaktose-Medium angezogen und anschließend mit Antimycin A für verschieden lange Zeiträume (0, 5, 10, 30, 90, 120 Min.) stimuliert. Diese Substanz inhibiert die Atmungskette in Mitochondrien (Komplex III) und führt so zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [169]. Dies sollte zur vermehrten Bildung von Disulfidbrücken in Proteinen des Cytosols sowie des Intermembran-Raums (engl.: *intermembrane space*, IMS) in den Mitochondrien führen [170, 171]. Nach erfolgreicher Behandlung wurden die Zellen direkt in 1% SDS, 50 mM N-Ethylmaleimid (NEM), 50 mM Na₂HPO₄ pH 6,8 lysiert und auf Trockeneis verschickt. NEM sollt dabei freie

Sulphydrylgruppen alkylieren, um so eine Umlagerung bestehender Disulfidbrücken zu verhindern. Der niedrig gewählte pH-Wert sollte die Spezifität des zugefügten NEMs für primäre Amine reduzieren, so dass eine Reaktion mit freien Thiolen präferiert wird [172].

3.2.3.1. PROBENVORBREITUNG

Zur Herstellung einer geeigneten BSA-Standardprobe wurde 1 mg BSA Protein eingewogen und in 100 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) pH 6,8 gelöst. Anschließend wurden freie Thiole durch Inkubation mit 100 mM NEM für 10 Min. bei RT alkyliert und das Protein durch Ethanolfällung wie im Abschnitt 3.2.1.3. beschrieben präzipitiert. Das erhaltene Proteinpellet wurde in 6 M Harnstoff-Lösung resuspendiert. Für den proteolytischen Verdau wurde die gesamte Probe 1:1 (v/v) mit 50 mM ABC-Puffer verdünnt, sowie 5% ACN und 1 mM CaCl₂ zugefügt. Dadurch ergab sich in dem Verdauanatz eine hohe finale Konzentration an Harnstoff (3 M), die jedoch bei BSA mit intakten Disulfidbrücken nötig ist, um einen effizienten Verdau zu erreichen. Daher wurde auch das Verdauverhältnis von Trypsin: Protein auf 1:10 erhöht, um für die verminderte Aktivität auf Grund der denaturierenden Bedingungen zu kompensieren. Generell ist Trypsin in Harnstoff-Konzentrationen von bis zu 4 M aktiv, was besonders genutzt wird, wenn schwer zu lösende Proteine verdaut werden sollen [173]. Dies wurde vor dem Versuch anhand eines kurzen Experimentes zusätzlich überprüft, indem BSA mit verschiedenen finalen Konzentrationen an GuHCl und Harnstoff verdaut wurde. Dabei lieferte der Verdau mit 3 M Harnstoff die besten Ergebnisse, so dass keine unverdauten Protein-Peaks mehr detektiert werden konnten und zudem die Intensitäten der Peptidpeaks im Vergleich zur GuHCl-verdauten Probe deutlich anstiegen. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C, wurde die Verdaueffizienz, wie nach Burkhart et al. [149] beschrieben, überprüft und die Probe mittels 15 mg SPE-Kartuschen, wie in Abschnitt 3.2.1.5. aufgeführt, entsalzt. Anschließend wurde die Probe unter Vakuum eingedampft und in SCX-Puffer A resuspendiert.

Die Hefezellen der Antimycin A-Zeitreihe enthielten bereits 50 mM NEM zur Alkylierung der freien Thiole, daher wurde hier mit der Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay weiterverfahren (siehe auch Abschnitt 3.2.1.2.). Von allen Proben wurden Verdünnungen von 1:20, 1:50 und 1:100 in Wasser angefertigt und gegen eine BSA Standardreihe gemessen. Anschließend wurden 150 µg Protein aus jeder Probe mittels FASP (engl.: *filter aided sample preparation*) aufgearbeitet [174, 175], was zu möglichst reproduzierbaren Verdauen führen sollte.

3.2.3.1.1. FASP (FILTER-AIDED SAMPLE PREPARATION METHOD) PROTOKOLL

Das FASP-Protokoll basiert auf der Verwendung von 30 kDa Nanosep Spin-Filtern, deren engmaschige Filtermembran für Flüssigkeiten und kleine Moleküle (wie z.B. Salze und Peptide) permeabel ist. Proteine, die größer als 30 kDa sind, hingegen werden auf dem Filter zurückgehalten, was genutzt wird, um diese umzupuffern und anschließend auf dem Filter proteolytisch zu verdauen. Dazu müssen zunächst Detergenzien (wie z.B. SDS) durch hochmolaren Harnstoff verdrängt werden und dieser im Anschluss wieder herausgewaschen werden. Dadurch ergeben sich für das Protokoll sequentielle Lade- und Waschschrte, bis die Probe in einem für den Verdau geeigneten Puffer vorliegt. Ist eine nachfolgende Markierung mittels iTRAQ oder anderen Amin-spezifischen Tags geplant, empfiehlt sich die Verwendung eines Amin-freien Puffers für den Verdau, wie beispielsweise TEAB-Puffer. Ein genereller Vorteil des FASP-Protokolls ist, dass die Peptide nach dem Verdau abzentrifugiert werden können und unverdautes Material auf dem Filter zurückbleibt, dadurch erhält man besonders aufgereinigte und reproduzierbar verdaute Proben.

Tab. 3.2.3.1.1.1 Übersicht der verwendeten Lösungen

Reagenz	Zusammensetzung
Tris-HCl-Puffer	100 mM Tris in Wasser, pH=8,5 eingestellt mit HCl
Harnstoff-Puffer	8 M Harnstoff in Tris-HCl-Puffer, pH=8,5
TEAB-Puffer	50 mM Triethylamin in Wasser, pH=8,5
Trypsin-Puffer	0,1 M Harnstoff, 2 mM CaCl ₂ , 50 mM TEAB, pH=8,5

Alle Filter wurden zunächst mit 100 µL 100 mM Tris-HCl equilibriert und die Flüssigkeit bei 13,800 rcf für 10 Min. durchzentrifugiert. Anschließend wurde die Konzentration an SDS in allen Proben auf 0,3% (v/v) mit Harnstoff-Puffer verdünnt und die gesamte Probe auf den Filter geladen. Durch 30-minütige Zentrifugation bei 13,800 rcf wurde das gesamte Volumen abzentrifugiert und die vorherigen Probengefäße mit 100 µL 8 M Harnstoff-Puffer ausgewaschen, der anschließend auf die Filter überführt wurde. Nach der Zentrifugation bei 13,800 rcf für 15 Min. wurden insgesamt 5 Waschschrte durchgeführt: Dazu wurden die Filter mit jeweils 100 µL Puffer befüllt und die Flüssigkeit bei 13,800 rcf für 20 Min. abzentrifugiert. Die Waschschrte setzten sich zusammen aus zweimaligem Waschen mit Harnstoff-Lösung sowie dreimaligem Spülen mit TEAB-Puffer. Anschließend wurden die Proteine auf dem Filter mit Trypsin-Puffer resuspendiert, Trypsin (T1426, Sigma-Aldrich) in

einem Verhältnis von 1:20 zu jeder Probe hinzugegeben und alle Filter für 10 Min. bei 37°C mit 350 rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Der Verdau erfolgte anschließend über Nacht bei 37°C in einem Inkubator. Die generierten Peptide wurden am nächsten Tag durch Zentrifugation bei 13,800 rcf für 15 Min. in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und die Filter nacheinander mit je 50 µL TEAB sowie 50 µL Wasser gewaschen. Das gesamte Eluat wurde unter Vakuum eingetrocknet und in 150 µL 0.1% TFA aufgenommen. Anschließend wurde ein Aliquot korrespondierend zu 1 µg Peptid von jeder Probe abgenommen und die enthaltenen Mengen anhand der Intensitäten in einer LC-MS-Messung überprüft.

3.2.3.2. ITRAQ-MARKIERUNG

Um die Peptide nach einer Anreicherung mittels ChaFRADIC quantifizieren zu können, wurde eine iTRAQ-Markierung in den Ansatz integriert. Diese erlaubt ein Multiplexing der Proben aus den jeweiligen Experimenten und macht den Ansatz weitaus weniger störanfällig als mit separat prozessierten Proben.

Für das erste Überprüfungsexperiment wurden 4 Aliquots entsprechend 15 µg BSA sowie 2 Aliquots korrespondierend zu 30 µg BSA aus der verdauten Probe abgenommen und einzeln unter Vakuum eingetrocknet. Anschließend wurden die Aliquots nach Herstellerangaben auf Peptidebene markiert, jedoch auf Grund der reduzierten Peptidmengen mit entsprechend reduzierten Volumina. Tab.3.2.3.2.1. gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der einzelnen Labeling-Ansätze.

Anschließend wurden die Proben vereinigt und unter Vakuum getrocknet. Um die Probe für die SCX-Auftrennung vorzubereiten, wurde sie in 0.1% FA aufgenommen und mittels 4 mg SPE-Kartuschen entsalzt (siehe Abschnitt 3.2.1.5.).

Tab.3.2.3.2.1.: Übersicht der einzelnen Markierungsansätze mittels iTRAQ 8-plex Reagenz.

	15 µg BSA	15 µg BSA	30 µg BSA	30 µg BSA
Volumen TEAB-Puffer (500 mM) in µL	3	3	6	6
iTRAQ Label	113	117	119	121
Volumen iTRAQ Reagenz in µL	10	10	20	20
Inkubation	2 h 25°C Thermomixer			

Aus den verdauten Hefezellen der Antimycin A Zeitreihe wurden entsprechend der vorangegangenen Messungen mittels LC-MS, angepasste Mengen korrespondierend zu je 150

µg Peptid entnommen. Aus der restlichen, bereits verdauten BSA-STD-Probe wurden je 150 fmol unmarkierte Peptide entnommen und zu den einzelnen Proben als Qualitätsstandard zugefügt. Anschließend wurden alle Proben unter Vakuum getrocknet und nach Herstellerangaben mit dem iTRAQ 8-plex Reagenz derivatisiert. Dazu wurden sie in je 30 µL TEAB-Puffer resolubilisiert und anschließend mit je einer Variante (113, 114, 115, 116, 117, 118, 121) des verdünnten iTRAQ-Reagenzes (20 µL iTRAQ + 80 µL Isopropanol) vereinigt. Die Inkubation erfolgte bei 25°C für 2 h in einem Thermomixer. Anschließend wurden alle Proben (8 x 150 µg = 1200 µg) vereinigt und bis zur Trocknung unter Vakuum eingengt. Für die Entsalzung mittels C18 15 mg SPE-Kartuschen wurden sie zunächst in 0.1% TFA aufgenommen und dann nach beschriebenen Protokoll (Abschnitt 3.2.1.5.) aufgereinigt.

3.2.3.3. ANREICHERUNG MITTELS CHAFRADIC

Für das *Proof-of-principle*-Experiment wurde zunächst die Markierungseffizienz durch eine LC-MS-Messung von 1 pmol der BSA-Peptide geprüft, indem die Anzahl der vollständig markierten Peptide gegen die der unmarkierten verglichen wurde. Nachdem eine Markierungseffizienz von über 99% ermittelt werden konnte, wurden 400 pmol der Probe in einer SCX-Auftrennung nach aufsteigendem Ladungszustand der Peptide separiert. Die Parameter waren dabei identisch zu denen, die für die erste Dimension des erweiterten ChaFRADIC Experiments im Abschnitt 3.2.2.4. verwendet wurden. Es wurden jedoch nur zwei Fraktionen gesammelt, die die Peptide des Ladungszustandes +4 sowie >+4 enthielten, da verdaut Peptide, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind erwartungsgemäß einen höheren Ladungszustand besitzen (siehe Abb.3.2.3.3.1.).

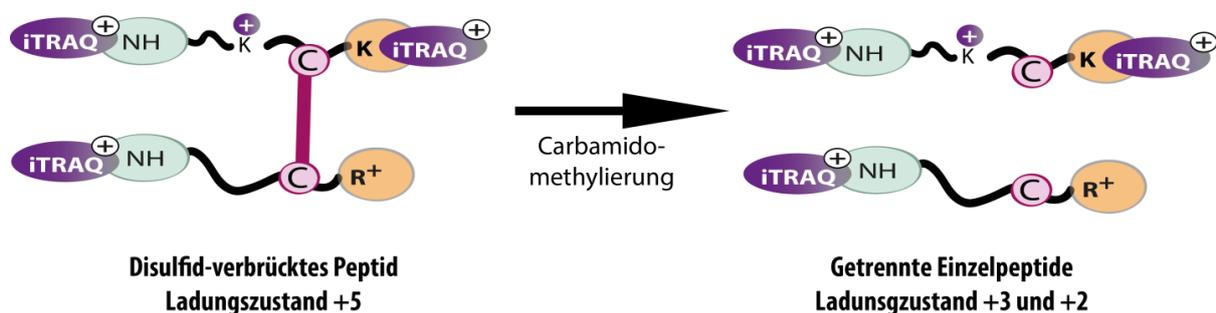


Abb.3.2.3.3.1.: Exemplarische Darstellung der Ladungsreduktion eines Disulfid-verbrückten Peptids. Ein Disulfid-Peptid eluiert in der SCX-Auftrennung auf Grund seiner Ladung in der +4 oder >+4-Fraktion. Durch die nachfolgend durchgeführte Carbamidomethylierung wird die Disulfidbrücke aufgebrochen und deren Rückbildung irreversibel verhindert. Dadurch entstehen zwei Einzelpeptide, die geringere Ladungszustände als das vorherige Disulfid-Konstrukt besitzen.

Die Lösungsmittel der SCX-Auftrennung wurden anschließend unter Vakuum verdampft und die Peptide in 100 mM Na₂HPO₄-Puffer aufgenommen, um den pH-Wert auf ~7 zu erhöhen.

Anschließend wurden die vorhandenen Disulfidbrücken mittels einer Carbamidomethylierung irreversibel entfernt. Dazu wurden die zwei Fraktionen mit 10 mM DTT für 30 Min bei 56°C und nachfolgend mit 20 mM IAA für 30 Min. bei RT in Dunkelheit inkubiert. Diese Reaktion bewirkt eine spezifische Ladungsreduktion der +4- oder +5-fach geladenen Peptid-Konstrukte, da sie in zwei Einzelpeptide gebrochen werden.

Für die finale SCX-Auftrennung wurden die behandelten Fraktionen mittels R3-Tips entsalzt und in SCX-Puffer A aufgenommen. Die +4-Fraktion sowie die >+4-Fraktion wurden einzeln unter exakt identischen Bedingungen zur ersten Dimension aufgetrennt. Jedoch wurden nun die +2- und +3-Fraktion gesammelt, da diese theoretisch die carbamidomethylierten, ehemals Disulfid-verbrückten Peptide enthalten sollten. Die angereicherten Fraktionen wurden erneut unter Vakuum getrocknet und in 0.1% TFA resuspendiert, um sie anschließend mit R3-Tips zu entsalzen und die Identifikation mittels LC-MS durchzuführen.

Um die Disulfidbrückenbildung in stimulierten Hefe- Proben zu charakterisieren, wurde 1 µg der iTRAQ-markierten, gepoolten Probe zunächst auf ihre Labeffizienz überprüft, indem der Anteil an markierten und unmarkierten Peptiden gegeneinander verglichen wurde. Nachdem eine Effizienz von über 98% nachgewiesen werden konnte, wurden 400 µg der Probe einer SCX-Auftrennung unterzogen. Die gesamte Anreicherungsprozedur erfolgte dabei identisch zum BSA-Experiment, so dass final jeweils die angereicherten +2- und +3-Fraktionen der ehemaligen +4-Fraktion bzw. +5-Fraktionen gesammelt wurden. Eine Besonderheit ergab sich dabei nur bei der aus der +4-Fraktion angereicherten +3-Fraktion: In dieser Fraktion können sich theoretisch auch glutathionylierte Peptide befinden. Diese Modifikation besteht aus einem kurzen Tripeptid, welches ebenfalls durch eine Disulfidbrücke an ein Cystein gebunden wird (vgl. Abb.3.2.3.3.2.). Daher verhält es sich identisch zu einem Disulfid-verbrückten Konstrukt, welches auf Grund eines proteolytischen Verdaus entstanden ist. Diese glutathionylierten Peptide können auf Grund des speziellen Designs des ChaFRADIC Experimentes jedoch nur die +4 →+3 Fraktion kontaminieren, so dass diese Fraktion nicht für die LC-MS Identifikation berücksichtigt wurde. Ähnlich wie Disulfidbrückenbildung tritt auch Glutathionylierung vermehrt auf, wenn die Proteine erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt sind. Durch diese Anpassung des ChaFRADIC-Designs kann die Co-Elution jedoch verhindert werden.



Abb.3.2.3.3.2.: Abtrennung von glutathionylierten Peptiden während der zwei-dimensionalen ChaFRADIC-Anreicherung. Das glutathionylierte Peptidkonstrukt hat eine Nettoladung von +4 in der ersten SCX-Dimension. Nach der Carbamidomethylierung eluieren die Einzelpeptide in den Fraktionen +1 und +3-Fraktion, die beide nicht zur Anreicherung verwendet werden.

3.2.3.4. NANO-LC-MS ANALYSE

Die entsalzten, getrockneten Proben wurden jeweils in 15 μL 0,1% TFA resolubilisiert und mittels eines nano-LC-MS/MS-Setups gemessen, welches aus einer nano-RSLC HPLC gekoppelt an ein Q-Exactive HF Massenspektrometer bestand. Die Aufladung der jeweiligen Probe fand bei einem Ladefluss von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 0,1% TFA auf eine C18-Vorsäule (100 μm x 2 cm PepMap RSLC, Thermo Scientific) statt. Anschließend erfolgte die chromatographische Auftrennung auf einer 50 cm Hauptsäule (C18, 75 μm x 50 cm PepMap RSCL, Thermo Scientific) mittels eines binären Gradienten bestehend aus Lösungsmittel A (0,1% FA) und Lösungsmittel B (0,1% FA, 89% ACN) bei einer Flussrate von 250 nl/min und 60°C.

Für die globalen Analysen wurde jeweils 1 pmol BSA und ein Aliquot korrespondierend zu 1 μg an Hefepetid aus den Proben entnommen und mit Hilfe eines linearen Gradienten beginnend von 3% B ansteigend auf 42% B separiert. Von den angereicherten, ehemals Disulfid-verbrückten Peptiden aus BSA wurde jeweils ein Aliquot korrespondierend zu 500 fmol Peptid via LC-MS gemessen, wobei der passend zur Materialmenge gewählte Gradient linear von 3% auf 50% Lösungsmittel B in 35 Min. anstieg. Von den deutlich komplexeren Fraktionen aus den Antimycin A behandelten Hefeproben wurden abhängig von der jeweiligen Intensität in der finalen SCX-Auftrennung entweder 33% (Fraktion +4 \rightarrow +2) oder 100% (+5 \rightarrow +2 und +5 \rightarrow +3) analysiert. Der Gradient stieg in einem linearen Verlauf von 3% B auf 42% B in 120 Min. an.

Für die massenspektrometrische Analysen wurde für alle Messungen eine datenabhängige Akquisition gewählt, die den Full Scan bei $R = 60,000$ und den MS/MS Scan der 15 abundantesten Ionen (Top15) bei $R = 15,000$ ausführte. Die maximale Ionenanzahl wurde auf 1×10^6 in 120 ms für den MS^1 Scan gesetzt und für MS^2 auf 2×10^5 in 200 ms. Da es sich um iTRAQ-markierte Proben handelte wurde eine normalisierte Kollisionsenergie von 33 gewählt

und die erste aufzuzeichnende Masse auf 105 m/z festgesetzt, um auch die Detektion des kleinsten entstehenden Reporterions (113 m/z) zu gewährleisten.

3.2.3.5. DATENAUSWERTUNG

Die spektrometrischen Roh-Daten wurden mittels des Proteome Discoverers (Version 1.4.1.14) auf Peptidübereinstimmungen überprüft und quantifiziert. Dazu wurde eine Datenbank generiert, die sowohl das Hefeproteom enthielt als auch die BSA-Sequenz (August 2012; 6852 Einträge). Für den Suchalgorithmus Mascot (Matrix Science; Version 2.4.1) wurden außerdem folgende Einstellungen gewählt: Verdauenzym Trypsin mit maximal 2 überlesenen Schnittstellen, Precursor-Massentoleranz 10 ppm, Fragmentmassentoleranz 0,02 Da. Als variable Modifikation wurde Oxidation am Methionin (15,9949 Da) und als statische Modifikation iTRAQ-8plex am N-Terminus sowie Lysin (304,2053 Da) und Carbamidomethylierung am Cystein (57,0214 Da) angegeben. Die gefundenen PSMs wurden nach hoher Konfidenz (FDR <1%) und der bestmöglichen Übereinstimmung (Search Engine Rank 1) gefiltert und durch Verwendung der „Reporter Ions Quantification“-Node anhand der jeweiligen iTRAQ-Reporter quantifiziert. Die durchgeführten Suchen für die angereicherten BSA- sowie die Hefe-Fraktionen wurden auf PSM-Ebene jeweils in eine Exceldatei exportiert und wie im erweiterten ChaFRADIC Ansatz ausführlich beschrieben normiert (siehe Abschnitt 3.2.2.7.) Es wurden nur Peptideinträge berücksichtigt, die mindestens eine Carbamidomethylierung trugen, da es sich hierbei um die angereicherten, ehemals Disulfid-verbrückten Peptide handelte. Wenn diese vom selben Protein stammten und dasselbe Modifikationsmuster aufwiesen, wurden die Einträge gruppiert und durch Bildung des Medians jedem Peptid eine normalisierte iTRAQ-Intensität zugewiesen, so dass sich eine finale Liste an nicht-redundanten Peptiden ergab.

3.2.4. ANREICHERUNG UBIQUITINYLIERTER PEPTIDE

3.2.4.1. IMMUNOAFFINITÄTS-BASIERTE ANREICHERUNG

Üblicherweise werden ubiquitinierte Peptide mittels Immunitäts-basierter Verfahren angereichert, wobei ein spezifischer Antikörper an das am Peptid befindliche Glycin-Glycin-Motif bindet und dieser gebildete Immunkomplex anschließend isoliert werden kann (vgl. Abschnitt 1.4.1.). Um den Erfolg dieser Methode zu überprüfen und die erzielten Ergebnisse später als Vergleichswerte zum ChaFRADIC-Ansatz zu benutzen, wurden zunächst HeLa S3 Zellen in DME-Medium (engl.: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, angereichert mit 1 g/l Glukose und Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt

14 Tage in 4 Passagen angezogen. Nachdem eine Konfluenz von etwa 60% (Zellzahl etwa $5-7 \times 10^6$ Zellen/175 cm² Flasche) erreicht worden war, wurden die Zellen mit 10µM eines Proteasominhibitors (MG-132) unter ansonsten identischen Bedingungen wie zuvor für 24 h behandelt. Wie durch Dammer et al. publiziert, führt die Blockierung des Proteasoms unter diesen Bedingungen zu einer 6-7-fachen Erhöhung der Ubiquitinabundanz im Vergleich zu unbehandelten Zellen, da der Abbau ubiquitiniertes Proteine gehemmt wird [176]. Anschließend wurden die Zellen mit einem Lysepuffer (1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NEM, 1x Complete Mini Protease-Inhibitor, pH 7,8) aufgeschlossen, wobei NEM zur Inaktivierung Cystein-abhängiger Deubiquitylasen dient [177]. Im Lysat co-isolierte DNA wurde mittels einer Ultraschallbehandlung in 10 Zyklen à 6 Sek. mit maximal 3 Watt Ausgangsleistung fragmentiert, wobei das Lysat auf Eis gekühlt wurde. Unlösliche Bestandteile wurden bei 16,000 x g für 20 Min. bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay abgenommen. Diese Probe wurde anschließend aliquotiert und diente als Ausgangsprobe für verschiedene nachfolgende Experimente.

Zur Anreicherung ubiquitiniertes Peptide mittels Immunaффinitätsaufreinigung wurde ein Aliquot korrespondierend zu 22 mg Protein durch Ethanol-fällung präzipitiert und das erhaltene Proteinpellet in 6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff und 10 mM HEPES bei pH 8,0 resolubilisiert. Bestehende Cysteinmodifikationen wurden durch Reduktion mit 10 mM TCEP für 1 h bei 60°C und anschließender Alkylierung mittels 20 mM MMTS für 10 Min. bei RT in Dunkelheit entfernt, so dass die Entstehung von Artefakten durch Verwendung herkömmlicher Alkylierungsreagenzien wie Iodacetamid umgangen werden konnte [178]. Nachfolgend wurden die Proteine durch Inkubation mit Trypsin (T1426, Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:30 über Nacht bei 37°C verdaut und anschließend mittels Festphasenextraktion (Bond Elut C18, 1 g Materialbett, 6 mL Volumen, Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers entsalzt. Nach Überprüfung der Gesamtprobenmenge mittels LC-MS wurde ein Aliquot entsprechend 20 mg Protein entnommen und für die Anreicherung von ubiquitinylierten Peptiden mit Hilfe des PTMScan Ubiquitin Remnant Motif (K-ε-GG) Kits (Cell Signaling Technology) verwendet [93, 179]. Es wurde exakt nach Herstellerangaben (Stand Januar 2012) vorgegangen, wobei das Protokoll, welches auf Verwendung von detergenzienhaltigen Puffern basiert, gewählt wurde. Die angereicherten ubiquitiniertes Peptide wurden ebenfalls wie im Protokoll empfohlen mittels Millipore ZipTips (C18 Material, Sigma Aldrich) aufgereinigt und anschließend die gesamte Probe via LC-MS

analysiert. Dazu wurde ein nano-LC-MS/MS-Setup verwendet bestehend aus einer nano-RSLC HPLC gekoppelt an ein Q-Exactive Massenspektrometer (beides Thermo Scientific). Die Aufladung der Probe auf eine C18-Vorsäule (100 μm x 2 cm PepMap RSLC, Thermo Scientific) erfolgte mit einem Ladefluss von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 0,1% TFA. Anschließend wurden die Peptide auf einer 50 cm langen Hauptsäule (C18, 75 μm x 50 cm PepMap RSCL, Thermo Scientific) mittels eines binären Gradienten bestehend aus Lösungsmittel A (0,1% FA) und Lösungsmittel B (0,1% FA, 89% ACN) bei einer Flussrate von 250 nl/min bei 60°C aufgetrennt. Sowohl für die globale Messung als auch für die Analyse der angereicherten Peptide wurde ein linearer Gradient, ansteigend von 3-42% B, gewählt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte durch datenabhängige Akquisition. Für den Full Scan bei $R = 70,000$ wurde die maximale Ionenzahl auf 3×10^6 in 120 ms gesetzt und der MS^2 Scan wurde für die 15 intensivsten Ionen (Top15) bei $R = 17,500$ bei einer maximalen Injektionszeit von 250 ms für 5×10^4 Ionen ausgeführt. Es wurde eine Kollisionsenergie von NCE 27 gewählt. Die erhaltenen Rohdaten wurden gegen eine humane Datenbank (Uniprot DB, Stand Juli 2012, 20,232 Einträge) mittels der Proteome Discoverer Software (Version 1.3.0.339) und dem integrierten Suchalgorithmus MASCOT™ (Version 2.4.1.) abgeglichen. Die Sucheinstellungen beinhalteten dabei folgende Parameter: Verdauenzym Trypsin mit maximal 2 überlesenen Schnittstellen, Precursor-Massentoleranz 10 ppm, Fragmentmassentoleranz 0,02 Da. Zusätzlich wurden als statische Modifikationen Methylierung am Cystein (+14,01565 Da) angegeben sowie als variable Modifikationen Diglycinierung am Lysin (+114,042927 Da) und Acetylierung am Protein-N-Terminus (+42,01056 Da). Aus der resultierenden Liste an Peptidübereinstimmungen wurden nur diejenigen berücksichtigt, die eine hohe Konfidenz (FDR <1%) und eine bestmögliche Übereinstimmung (Search Engine Rank 1) aufwiesen.

3.2.4.2. ANREICHERUNG MITTELS CHAFRADIC - VOREXPERIMENT

Anstatt die Anreicherung über die Bindung an einen spezifischen Antikörper zu erreichen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit zur chromatographischen Anreicherung ubiquitiniertes Peptide überprüft werden. Dazu sollte das bereits etablierte ChaFRADIC-Prinzip genutzt werden, so dass ubiquitinierte Peptide in einem zwei-dimensionalen Ansatz durch einen induzierten Ladungsshift von nicht-ubiquitinierten Peptiden abgetrennt werden können. Das experimentelle Design sollte dabei wie in Abb.3.2.4.2.1. dargestellt aufgebaut werden. Ausgangspunkt ist das wie im Abschnitt 3.2.4.1. vorbereitete Lysat, das intakte - darunter auch ubiquitinylierte - Proteine enthält. Primäre Amine, wie Lysinseitenketten und

N-Termini, werden zunächst durch Umsetzung mit D₃-NHS-Ester schwer acetyliert. Anschließend erfolgte ein Trypsinverdau, der durch die Modifikation der primären Amine jedoch eine ArgC-Spezifität erhielt, so dass Proteine sowie eventuell vorhandene Ubiquitinketten jeweils nur am Arginin gespalten wurden. Die anzureichernden Peptide tragen nun das spezifische GlyGly-Motif und sollten in der chromatographischen Auftrennung im SCX einen Ladungszustand von +3 (ein GlyGly-Rest) oder +4 (zwei GlyGly-Reste) aufweisen. Ähnlich wie in anderen ChaFRADIC-Applikationen wird zunächst die Auftrennung eines komplexen Peptidgemisches durchgeführt, wobei die Ubiquitin-Peptide bereits in den Fraktionen +3 und +4 „vorfraktioniert“ werden, jedoch hier auch andere Peptide desselben Ladungszustandes präsent sein können (vgl. Abb.3.2.4.2.1. „abzutrennende Peptide“).

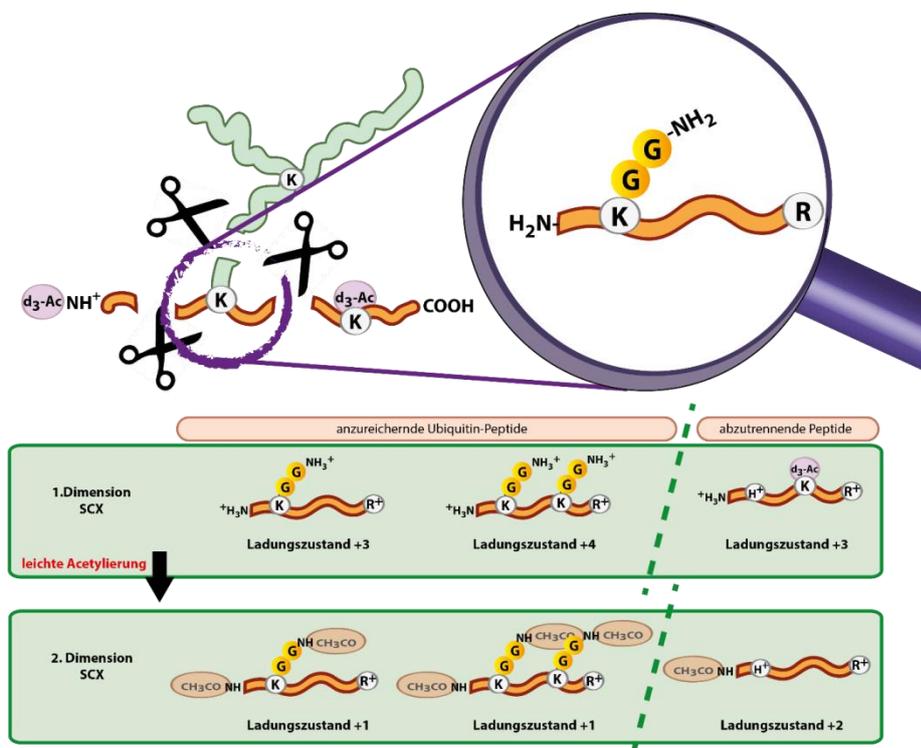


Abb.3.2.4.2.1.: ChaFRADIC-Ansatz zur Anreicherung von ubiquitinierten Peptiden. Zunächst werden die primären Amine aller intakten Proteine mit einer schweren Acetylierung modifiziert und anschließend verdaut. An ubiquitinierten Peptiden verbleibt dabei ein spezieller GlyGly-Rest, so dass diese Peptide in der SCX-Auftrennung eine Nettoladung von +3 oder +4 aufweisen. Um sie von anderen enthaltenen Peptiden mit gleicher Ladung zu separieren, erfolgt eine zweite Derivatisierung mit einem leichtem Acetylierungsreagenz. Diese führt bei GlyGly-Peptiden zu einer mehrfachen und bei allen anderen, abzutrennenden Peptiden nur zu einfacher Ladungsreduktion. Durch die dadurch bedingte veränderte Elutionszeit können die Peptidklassen voneinander getrennt werden.

Im nächsten Schritt werden alle in den gesammelten Fraktionen enthaltenen Peptide mit einem -im Vergleich zur vorangegangenen schweren Acetylierung- leichtem

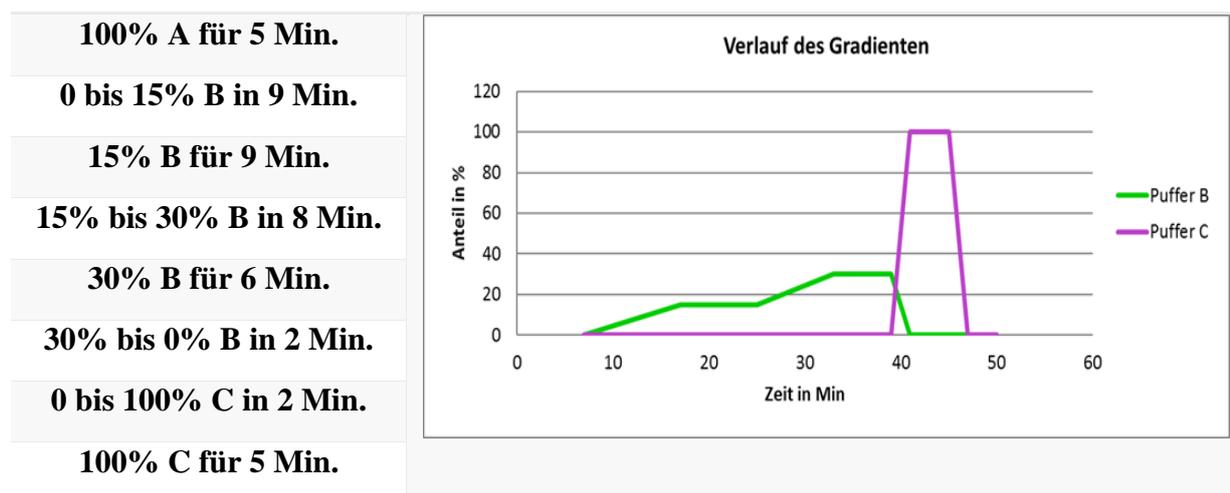
Derivatisierungsreagenz umgesetzt und dadurch in ihrer Nettoladung reduziert. Dies hat zur Folge, dass in einer zweiten SCX-Auftrennung Ubiquitin-Peptide einen mehrfachen Ladungsshift zeigen (von +3 bzw. +4 auf +1) und alle anderen, nicht ubiquitinierten Peptide nur eine Ladung verlieren (von +3 auf +2).

Entsprechend diesem experimentellen Ablauf wurde ein Aliquot korrespondierend zu 11 mg Protein aus dem im Abschnitt 3.2.4.1. beschriebenen Lysat entnommen und wie folgt carbamidomethyliert. Dazu wurden vorhandene Thiolmodifikationen zunächst durch Inkubation mit 10 mM DTT für 30 Min. bei 56°C reduziert und freigewordene Thiole anschließend durch Zugabe von 20 mM IAA für 30 Min. bei RT in Dunkelheit alkyliert. Durch den besonderen Aufbau der ChaFRADIC-Anreicherung bedurfte es hier nicht der üblicherweise benötigten Alkylierungsreagenzien TCEP und MMTS. Nach der Carbamidomethylierung wurden die Proteine mittels Ethanol-fällung präzipitiert und das Proteinpellet wurde in 6 M GuHCl, 100 mM Na₂HPO₄, pH 7,9 resolubilisiert, um die Acetylierung durchzuführen. Dafür wurde die Probe zunächst für 1 h mit 20 mM D₃-NHS bei 37°C auf einem Thermoschüttler inkubiert und die Reaktion nach Zugabe von weiteren 10 mM D₃-NHS eine weitere Stunde bei 37°C fortgesetzt. Abschließend wurde der Acetylierungsvorgang durch Zugabe von 60 mM Glycin für 10 Min. bei RT abgestoppt und eventuelle Nebenreaktionen durch Inkubation mit 130 mM Hydroxylamin für 10 Min. bei RT revertiert. Anschließend wurde die Probe erneut einer Ethanol-fällung unterzogen und das Proteinpellet in 6 M GuHCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,9 gelöst. Danach wurde die Probe 10-fach mit 50 mM Na₂HPO₄ verdünnt und nach Zugabe von 5% ACN und 1 mM CaCl₂ mit Trypsin (T1426, Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:20 (Trypsin: Protein) bei 37°C über Nacht verdaut. Anschließend wurde die Probe mit geeigneten Kartuschen (Bond Elut C18, 30 mg Materialbett, 3 mL Volumen, Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers entsalzt und wie im Abschnitt 3.2.4.1. beschrieben der Immunpräzipitation unterzogen. Das aufgereinigte Eluat wurde anschließend einer ChaFRADIC-Anreicherung nach dem oben beschriebenen Prinzip unterzogen, wobei es sich hier um ein Vorexperiment handelte, indem geprüft werden sollte, in welchen Fraktionen der ersten und zweiten Dimension die Ubiquitin-Peptide eluieren und, ob dies mit den theoretischen Überlegungen übereinstimmt. Dazu wurde das bereits etablierte SCX-HPLC-System verwendet, welches bereits in Abschnitt 3.2.2.4 beschrieben wurde, und aus einer Polysulfoethyl A Säule (150 x 1 mm, 5 µm Partikeldurchmesser, 200Å Porengröße, Hersteller PolyLC, USA) und einem U3000 HPLC System (Thermo Scientific, Bremen) bestand. Zur Auftrennung wurden SCX-Puffer A (10 mM KH₂PO₄, 20% ACN, pH 2,7), SCX-Puffer B (10 mM KH₂PO₄, 250 mM KCl, 20% ACN,

pH 2,7) und SCX-Puffer C (10 mM KH_2PO_4 , 600 mM NaCl, 20% ACN, pH 2,7) bei einem Fluss von 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ verwendet, wobei der genaue Gradientenverlauf in Tab.3.2.4.2.1. zusammengefasst wurde.

Tab.3.2.4.2.1.: Gradientenverlauf in der ChaFRADIC-Anreicherung für ubiquitinierte Peptide.

Gradientenverlauf



In der ersten Dimension wurden die Fraktionen FT, +1, +2, +2/+3-Übergang und die Hauptfraktion +3/+4/+5 gesammelt. Die Fraktionen FT bis +2 sollten dabei keine Ubiquitin-Peptide enthalten, was durch Messung von 1% aller Fraktionen mittels LC-MS überprüft wurde. Ubiquitinierte Peptide sollten im Gegensatz dazu einen Ladungszustand von +3 oder höher aufweisen und in einem Bereich zwischen Minute 30 und 46 im Gradienten eluieren, so dass dieser Bereich in einer Fraktion gesammelt wurde. Anschließend wurde diese Fraktion unter Vakuum getrocknet und die Peptide in 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7,9 aufgenommen. Die leichte Acetylierung erfolgte unter Inkubation mit 20 mM NHS für 1 h bei 37°C, gefolgt von einer zweiten Inkubation mit 10 mM NHS unter identischen Bedingungen. Danach wurde die Reaktion unter Zugabe von 60 mM Glycin für 10 Min. bei RT gestoppt und die Probe mit 130 mM Hydroxylamin für 10 Min. bei RT inkubiert. Für die zweite SCX-Dimension wurde die Probe zunächst mit R3-Tips, wie bereits in Abschnitt 3.2.1.5. beschrieben, entsalzt, anschließend unter Vakuum getrocknet und erneut in SCX-Puffer A aufgenommen. Die zweite Dimension erfolgte unter identischen Bedingungen zur ersten Auftrennung, wobei nun Fraktion +1 gesammelt wurde, in der die ladungsreduzierten Ubiquitin-Peptide eluieren sollten. Diese wurde ebenfalls bis zur Trocknung unter Vakuum eingengt und komplett für eine LC-MS/MS-Analyse verwendet. Analyse und Datenauswertung erfolgte wie bereits im Abschnitt 3.2.4.1. beschrieben, wobei hier lediglich ein anderes Massenspektrometer

verwendet wurde. Es handelte sich dabei um ein Nachfolgegerät der Q Exactive, nämlich ein Q Exactive HF Massenspektrometer (Thermo Scientific), so dass es hier nur einige geringe geräteabhängige Parameteränderungen gab. Die Q Exactive HF wurde im datenabhängigen Aufzeichnungsmodus betrieben, wobei der Full Scan bei $R = 60,000$ aufgezeichnet wurde, gefolgt von MS/MS Spektren der 15 intensivsten Ionen (Top15) bei $R = 15,000$. Die Werte für maximale Ionenanzahl und Füllzeiten wurden für den MS^1 Scan auf 1×10^6 in 120 ms gesetzt und für MS^2 auf 2×10^5 in 200 ms. Es wurde eine Kollisionsenergie von NCE 30 gewählt. Der Abgleich der spektralen Rohdaten erfolgte anhand der humanen Uniprot Datenbank (Stand September 2014, 20,194 Einträge) mittels der Proteome Discoverer Software (Version 1.4.1.14). Für den integrierten Suchalgorithmus MASCOT™ (Version 2.4.1.) wurden folgende Parameter festgelegt: Verdauenzym ArgC mit maximal zwei überlesenen Schnittstellen, Precursor-Massentoleranz 10 ppm, Fragmentmassentoleranz 0,02 Da. Es wurden als statische Modifikationen Carbamidomethylierung am Cystein (+57,0214 Da) und leichte Acetylierung an Peptid-N-Termini (+42,0106 Da) ausgewählt, sowie als variable Modifikationen der leicht acetylierte GlyGly-Rest am Lysin (+ 156,0535 Da) und schwere D₃-Acetylierung am Lysin (45,0343 Da). Die erhaltene Liste an Peptidübereinstimmungen wurde nach hoher Konfidenz (FDR<1%) und einer bestmöglichen Übereinstimmung (Search Engine Rank 1) gefiltert.

3.2.4.3. ANREICHERUNG MITTELS CHAFRADIC - VERGLEICHSEXPERIMENT

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene „Anreicherung“ einer bereits durch Immunpräzipitation angereicherten Probe diente als Vorexperiment, in dem der bis dahin theoretisch geplante Versuchsablauf auf seine Plausibilität und Funktionalität geprüft werden konnte. Der eigentliche Sinn der Methode bestand jedoch darin ubiquitinierte Peptide aus einem komplexen Peptidgemisch ohne Immunaффinitäts-basierte Verfahren jedoch unter Einsatz des ChaFRADIC-Prinzips chromatographisch anzureichern. Zu diesem Zweck wurde erneut die in Abschnitt 3.2.4.1. beschriebene Ausgangsprobe verwendet, wobei ein Aliquot korrespondierend zu 1500 µg Protein entnommen wurde. Diese Probe wurde identisch zur im Abschnitt 3.2.4.2. geschilderten Vorgehensweise aufgearbeitet, wobei lediglich die Immunpräzipitation ausgelassen wurde. Aus der verdauten und entsalzten Probe wurden anschließend drei verschiedene Probenmengen entnommen: 20, 200 und 1000 µg Peptid. Diese wurden dann jeweils einzeln für die Anreicherung mittels ChaFRADIC verwendet, wobei die Vorgehensweise exakt identisch zu der im Abschnitt 3.2.4.2. beschriebenen war.

Ebenso erfolgte die massenspektrometrische Analyse und anschließende Dateninterpretation wie im vorherigen Abschnitt geschildert.

3.2.4.4. IMMUNOAFFINITÄTS-BASIERTE ANREICHERUNG MIT 1 MG MATERIAL

Die Optimierung des Anreicherungsprotokolls, welches der Hersteller (Cell Signaling Technology) für die Verwendung des PTMScan Ubiquitin Remnant Motif (K-ε-GG) Kits empfiehlt, wurde die in Abschnitt 3.2.4.1. beschriebene Ausgangsprobe verwendet. Es wurde ein Aliquot entsprechend zu 1300 µg Protein abgenommen und im Hinblick auf Carbamidomethylierung und Verdau wie in Abschnitt 3.2.4.1. beschrieben für die Immunpräzipitation aufgearbeitet. Nach Überprüfung der Probenmenge mittels LC-MS wurde eine Probenmenge von 1 mg Peptid für die Anreicherung mittels Immunpräzipitation eingesetzt. Diese erfolgte in Anlehnung an das bestehende (für größere Mengen optimierte) Protokoll des Herstellers, wobei einige wichtige Änderungen vorgenommen wurde, die eine Anwendung auch für kleinere Probenmengen ermöglichen sollte. Diese werden im Ergebnis und Diskussionsteil eingehend beschrieben. Das für kleine Probenmenge (bis 1 mg Peptid) optimierte Protokoll basierte ebenfalls auf der Verwendung des IAP-Puffer mit Detergenzien, wobei die Herstellung des Puffers nicht verändert wurde. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurde die Probe in 140 µL des IAP-Puffers aufgenommen und die Resolubilisation durch 5 Zyklen á 3 Sek. im Ultraschallbad unterstützt. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung überprüft und sofern nötig mit 1-2 µL 1 M Tris (pH nicht mit HCl justiert) auf etwa 7 eingestellt. Aus der Antikörper-Suspension wurden 4 µL abgenommen, wobei ein zuvor präparierter 200µL-Pipettentip verwendet wurde, der eine vergrößerte Öffnung besaß. Der Antikörper-Bead-Komplex wurde in ein 200µL-Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 50 µL PBS-Puffer verdünnt und einige Male vorsichtig durch Invertieren gemischt. Durch anschließende Zentrifugation für 30 Sek. Bei 2,000 x g sammeln sich die Antikörper-Bead-Komplexe am Boden des Reaktionsgefäßes, so dass der Überstand abgenommen werden kann. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 4-mal durchgeführt. Danach wurden unlösliche Bestandteile aus der Probe für 5 Min. bei 10,000 x g abzentrifugiert und der Überstand mit der vorbereiteten Antikörper-Suspension vereinigt. Das Reaktionsgefäß wurde zusätzlich mit Parafilm verschlossen, um Undichtigkeit vorzubeugen und anschließend im Overhead-Shaker bei 4°C für 4 h inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 Sek. bei 2,000 x g zentrifugiert und die im Überstand befindlichen ungebundenen Peptide abgenommen. Danach folgten mehrere Wasch- und Elutionsschritte,

um die an den Antikörper gebundenen Peptide zu eluieren. Dabei wurde der Immunkomplex mit der entsprechenden Lösung jeweils vorsichtig durch Invertieren gemischt und anschließend für 30 Sek. bei 2,000 x g zentrifugiert, um den Überstand abzunehmen. Die einzelnen Schritte wurden in Tab.3.2.4.4.1. zusammengefasst. Das vereinigte Eluat wurde mittels Festphasenextraktion nach Herstellerangaben (Millipore ZipTips, C18 Material, Sigma Aldrich) aufgereinigt und die gesamte Probe im LC-MS/MS analysiert. Dabei folgten die massenspektrometrische Analyse sowie die Datenauswertung der im Abschnitt 3.2.4.1. beschriebenen Vorgehensweise.

Tab.3.2.4.4.1.: Übersicht der Wasch-/ und Elutionsschritte des optimierten Anreicherungsprotokolls ausgehend von 1 mg Peptid.

Schritt	Lösung	Volumen	Anzahl	Bemerkung	Ziel
Waschschritt 1	IAP-Puffer	100 µL	2x	2-3 Invertieren	Herauswaschen ungebundener Peptide
Waschschritt 2	Wasser	100 µL	3x	2-3 Invertieren	Entfernung des Detergenzienhaltigen Puffers
Elutionsschritte	0,1% TFA	20 µL	2x	10 Min. Inkubation bei RT, alle 2 Min. Invertieren, beide Eluate vereinigen	Elution der Ubiquitin-Peptide

Das Protokoll wurde anschließend auch auf zwei weitere Proben angewendet. Zum einen wurde dafür ein Lysat von Dr. Oliver Pötz (Naturwissenschaftliche und Medizinische Institut (NMI) an der Universität Tübingen) verwendet, welches aus MG-132 behandelten HeLa-Zellen aufgearbeitet wurde und als Vergleichsprobe aus einem Fremdlabor dienen sollte. Weiterhin wurde auch ein Lysat verwendet, bei dem keine Behandlung während der Anzucht der HeLa-Zellen stattgefunden hat, diese Probe wird im Nachfolgenden als unstimulierte Probe bezeichnet. In beiden Fällen erfolgte Anzucht, Probenvorbereitung und Immunpräzipitation nach der bereits beschriebenen Vorgehensweise durch Einsatz von 1mg Probenmaterial.

4 ERGEBNISSE

4.1. OPTIMIERUNG SCX-AUFTRENNUNG

Die Optimierung eines HPLC-basierten SCX-Chromatographie-Systems hinsichtlich einer klaren und reproduzierbaren Auftrennung eines komplexen Peptidgemisches nach aufsteigenden Ladungszuständen erfolgte mittels eines enzymatisch verdauten Blutplättchen-Lysats, welches jeweils in 40 µg-Aliquots genutzt wurde, um durch Austesten verschiedener Gradienten schlussendlich eine Auftrennung nach definierten Ladungszuständen zu erhalten. Im Nachfolgenden werden nur die wichtigsten Schritte einer solchen Optimierung exemplarisch dargestellt, da es sich insgesamt um einen zeitaufwendigen und mit vielen Einzelmessungen verbundenen Prozess handelt. Die Wahl der verwendeten Puffer orientierte sich dabei zunächst an den empfohlenen Werten des Herstellers und wird in Tab.4.1.1. zusammengefasst (siehe auch Abschnitt 3.2.1.6.).

Tab.4.1.1.: Zusammensetzung der verwendeten SCX-Puffer

SCX-Puffer A	10 mM KH ₂ PO ₄ , 20% ACN, pH=2,7
SCX-Puffer B	10 mM KH ₂ PO ₄ , 188 mM KCl, 20% ACN, pH=2,7
SCX-Puffer C	10 mM KH ₂ PO ₄ , 800 mM NaCl, 20% ACN, pH=2,7
Flussrate	80 µL /min

Mit Hilfe eines sehr flach ansteigenden, linearen Gradienten und LC-MS-Messung der Fraktionen inklusive Ladungsbestimmung sollte zunächst eine grobe Abschätzung getroffen werden, bei welchem Anteil an Lösungsmittel B Peptide bestimmter Ladung eluieren. Das in Abb.4.1.1. dargestellte Chromatogramm zeigt den Verlauf des Gradienten und die im UV-Detektor aufgezeichnete Absorption der jeweils eluierenden Peptide bei 214 nm in mAU. Nachfolgend sind einige Beispiele der im Rahmen der Optimierungen getesteten Gradienten aufgeführt.

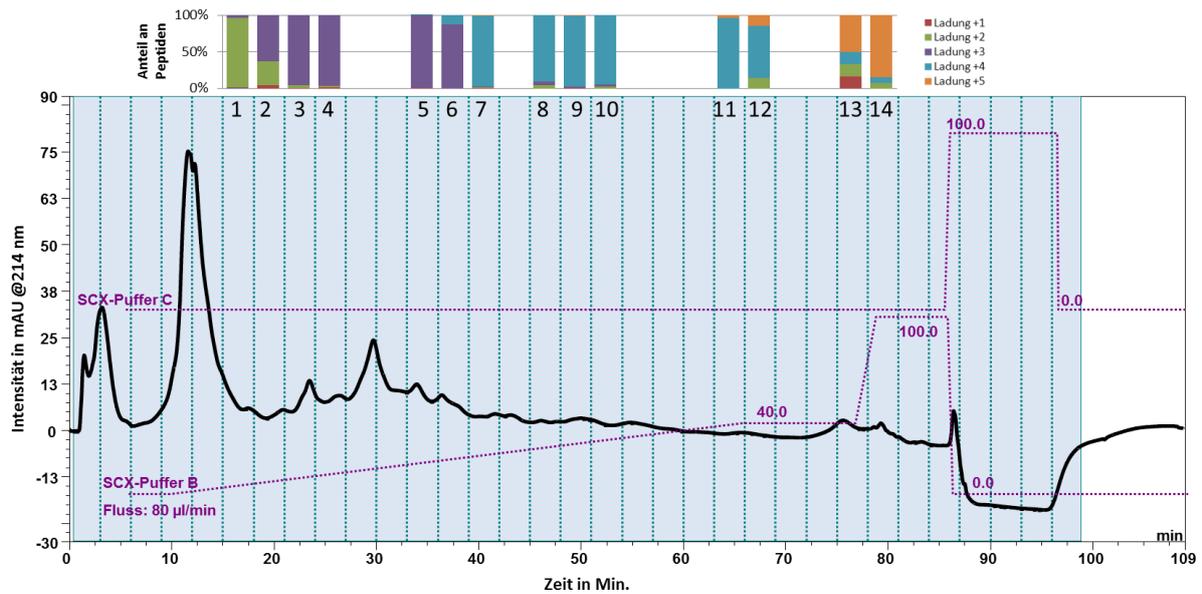


Abb.4.1.1.: Chromatogramm einer SCX-Auftrennung. Die Absorption der eluierenden Peptide wird in einem UV-Detektor bei 214 nm in mAU aufgezeichnet. Um die Identität der Peptide aufzuklären, wurden einzelne Fraktionen (1-14) einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Dabei zeigte sich, dass mit zunehmendem Gehalt an SCX-Puffer B die Peptide nach aufsteigender Ladung eluieren, wobei diese sich in bestimmten Bereichen überlagern können und es zur Bildung von Mischfraktionen kommt. Die prozentuale Zusammensetzung der Einzelfraktionen ist im Diagramm angegeben.

Es wurden drei-minütige Fraktionen gesammelt, von denen aus Effizienzgründen nur einzelne Fraktionen massenspektrometrisch analysiert wurden. Anhand der ermittelten Aminosäuresequenzen der jeweiligen PSMs wurde anschließend der theoretische Ladungszustand bei pH 2,7 bestimmt, wobei es sich hierbei um einen Näherungswert handelt. Die Ladungsverteilung innerhalb einer solchen Fraktion ist im oberen Bereich der Abb.4.1.1. angegeben, wobei als finales Ziel eine Trennung der einzelnen Ladungszustände (+1 bis >+4) möglichst bis zu 95% erreicht werden sollte. Dazu wurden automatisiert über den Verlauf einer SCX-Auftrennung definierte Fraktionen gesammelt und diese anschließend massenspektrometrisch analysiert. Es zeigte sich, dass die Peptide grundsätzlich bereits nach ansteigender Ladung aufgetrennt wurden, diese jedoch in sehr schmalen Zeitfenstern nacheinander sowie an den Übergangsbereichen in Mischfraktionen eluierten (siehe z.B. Abb.4.1.1. Frak. 1-3). Weiterhin war das Retentionszeitfenster für beispielsweise 2-fach positiv geladene Peptide sehr schmal (siehe Abb.4.1.1. Frak.1+2), wohingegen die 4-fach geladenen über fast 30 Min. eluierten (siehe Abb.4.1.1. Frak. 6-12). Anhand der Gradientenoptimierung sollte erreicht werden, dass (i) die einzelnen Ladungszustände möglichst gleichmäßig aufgetrennt werden, (ii) durch Integration von Gradientenstufen eine „Puffer-Zone“ geschaffen wird, die verhindert, dass sich das Elutionszeitfenster von Peptiden eines Ladungszustandes z.B. bei Aufladung von mehr Probenmaterial verschiebt und (iii) sich

insgesamt ein zeitlich effizienter Gradient ergibt. Dazu wurde zunächst der Anteil an SCX-Puffer B in Fraktion 6 (siehe Abb.4.1.1.) bestimmt, da hier noch viele dreifach geladene aber auch erste 4-fach geladene Peptide eluieren. Durch Einbau einer Stufe an dieser Position sollte eine Streckung des +3-Retentionszeitfensters erreicht werden, so dass die 4-fach positiven von dieser Fraktion klar abgegrenzt werden können. In Abb.4.1.2. sieht man den Verlauf des Gradienten mit einer Stufe bei 22% SCX-Puffer B, die dazu führte, dass dreifach geladene Peptide über einen längeren Zeitraum eluieren (Frak. 4-8). Der gewählte Anteil an Lösungsmittel B scheint jedoch zu hoch gewählt, da hier weiterhin auch vierfach positiv geladene Peptide detektiert wurden.

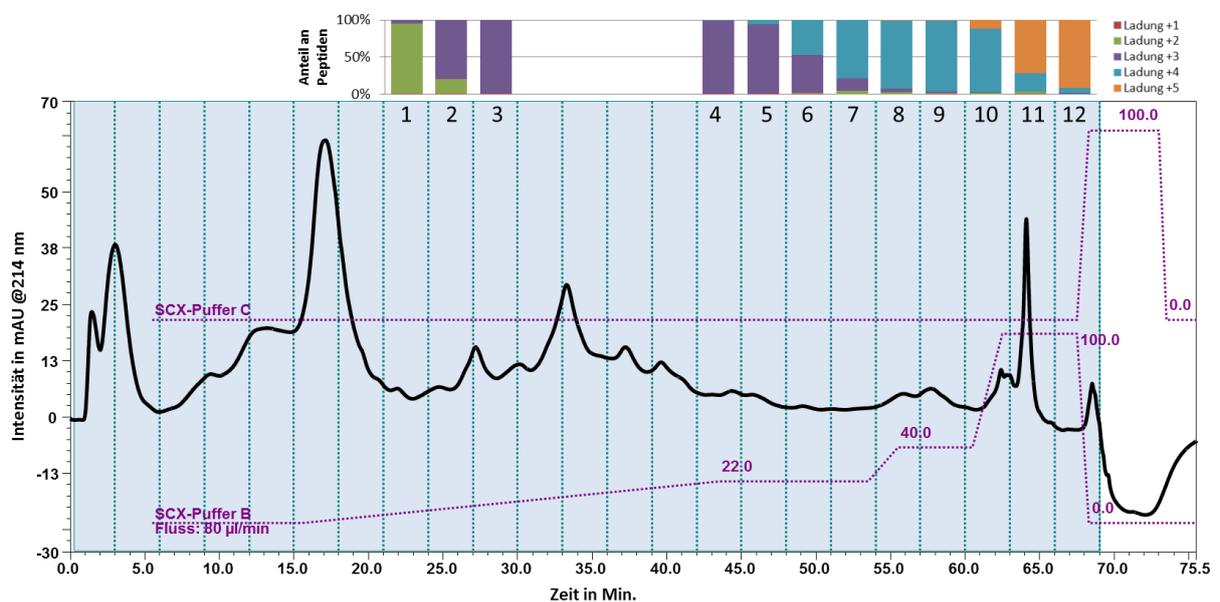


Abb.4.1.2.: SCX-Chromatogramm nach Einbau einer Gradientenstufe. Durch Einführung einer isokratischen Stufe bei 22% SCX-Puffer B sollte eine vollständige Elution von dreifach positiv geladenen Peptiden erreicht werden. Der prozentuale Anteil an Lösungsmittel B scheint aber zu hoch gewählt, da auch viele 4-fach geladene Peptide zeitgleich eluieren, was nicht gewünscht war.

Der Anteil an Lösungsmittel B wurde anschließend auf 20% gesenkt, um die Elution von +4-Peptiden zu reduzieren, so dass sich Fraktionen ergaben, die unter 10% vierfach geladene Peptide enthielten. (vgl. Abb.4.1.3., Frak. 8).

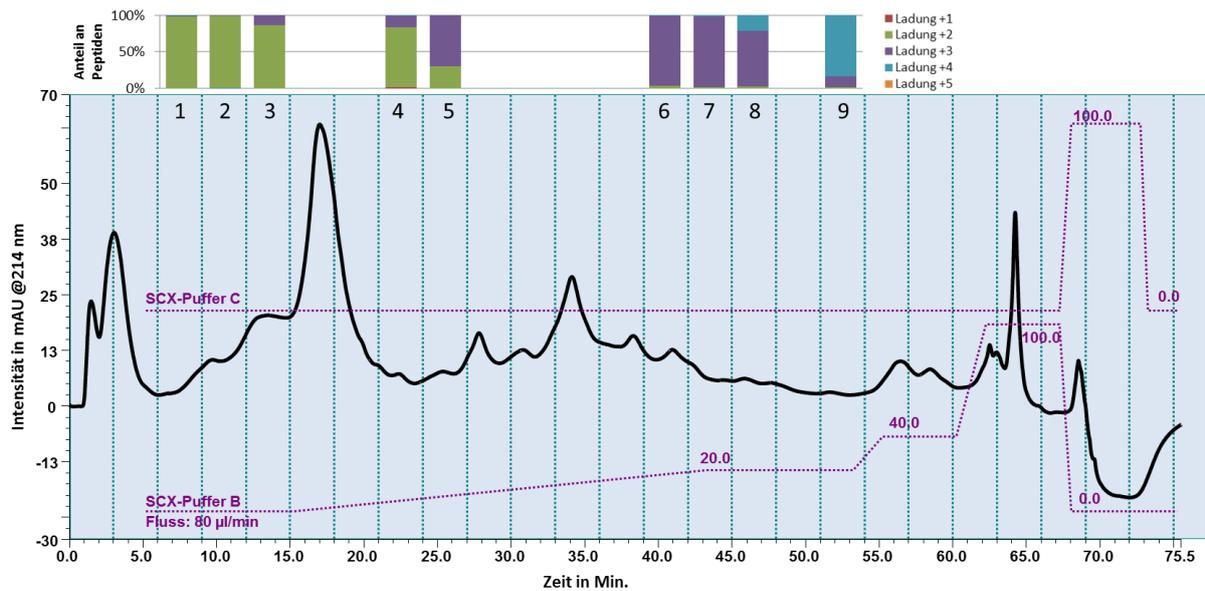


Abb.4.1.3.: SCX-Chromatogramm mit verringerter Gradientenstufe. Die Elution +3-fach geladener Peptide wurde positiv beeinflusst, so dass sie nahezu vollständig bei einem Anteil von 20% Lösungsmittel B eluieren (Frak.6-8). Vierfach geladene Peptide hingegen eluieren nur zu einem geringen Anteil von unter 10% bei dieser Stufe (siehe Frak. 8) und werden so erst im späteren Verlauf der Auftrennung (Frak. 9) detektiert.

Um die Auftrennung zeitlich effizient zu gestalten wurde ein verkürzter Gradient getestet. Wie in Abb.4.1.4. dargestellt, führt dies außerdem zu, dass die Mischfraktionen sich auf ein kleineres Retentionszeitfenster beschränken (vgl. Abb.4.1.4. Frak. 2) und nicht wie in Abb.4.1.3. über einen Zeitraum von etwa 12 Min. (vgl. Abb.4.1.3. Frak. 3-4) eluieren.

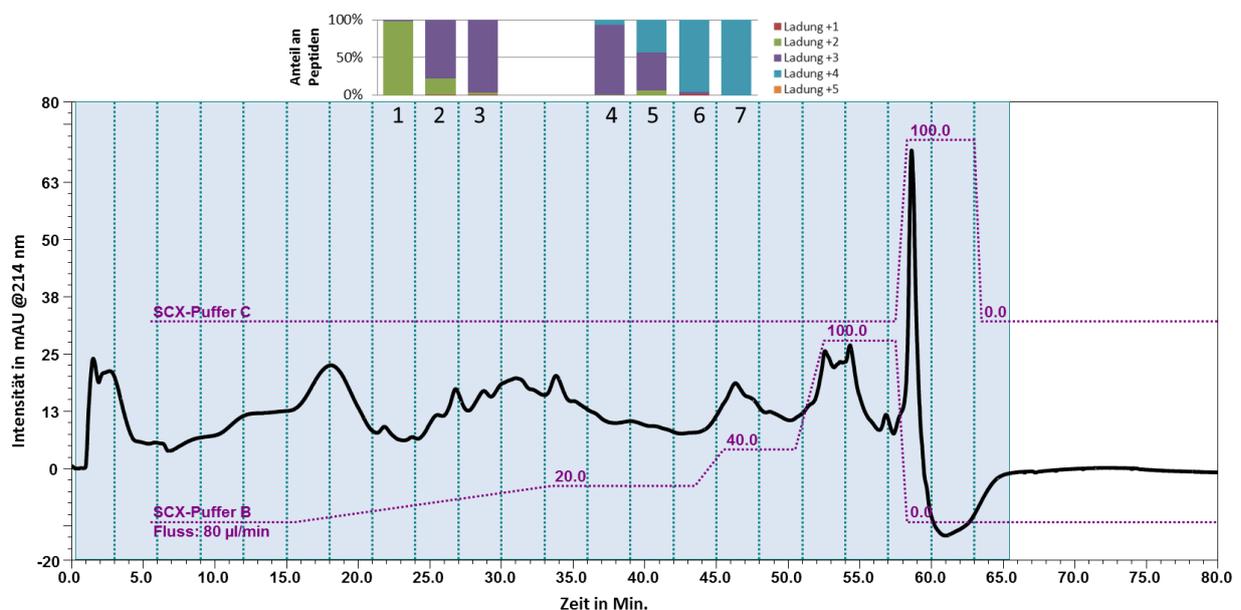


Abb.4.1.4.: SCX-Chromatogramm mit verkürztem Gradienten. Die Zeitspanne, um den Anteil an Lösungsmittel B von 0% auf 20% linear zu erhöhen, wurde von 30 auf 20 Min. reduziert. Dadurch kommt es zu einer zeitlich effizienten und gleichmäßigeren Auftrennung, zusätzlich eluieren auch Mischfraktionen in schmalere Zeitfenster (bspw. Frak. 2 und 5).

Schlussendlich konnte aus den erhaltenen Ergebnissen definierte Fraktionierungsfenster bestimmt werden, anhand derer sich 5 finale Ladungszustände sammeln ließen, die dann zu 90% Peptide eines einzigen Ladungszustandes enthielten (siehe Abb.4.1.5.). Generell ist eine Ladungsbestimmung für vier-/ und fünffach geladene Peptide problematisch, da diese mit CID und HCD schlechter fragmentieren. Zum Zeitpunkt der Optimierung stand zudem kein ETD-System zur Verfügung, so dass hier davon auszugehen ist, dass die identifizierten Peptide dieser zwei Ladungszustände im Vergleich zu anderen Fraktionen unterrepräsentiert zu finden sind. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden Gradient sowie die Pufferzusammensetzung nochmals verändert, da nach Einbau einer neuen chromatographischen Säule die bisher verwendeten Parameter nicht mehr zu einer exakten Ladungstrennung führten. Obwohl die verwendeten Säulen immer vom gleichen Hersteller erworben wurden, scheinen je nach Herstellungscharge Retentionszeitunterschiede aufzutreten. Zudem verändern sich die Retentionszeiten auch bei längerer Benutzung der Säulen, wahrscheinlich durch Abnutzung bzw. irreversible Blockierung der Materialporen, so dass die Auftrennleistung regelmäßig mit Standards überprüft werden sollte.

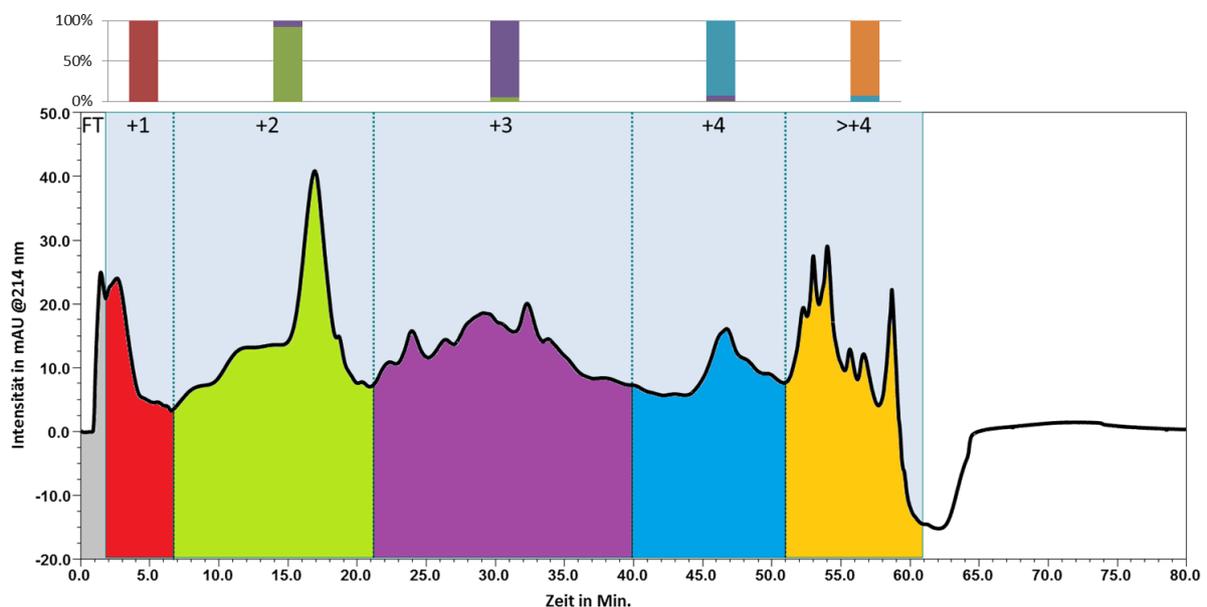


Abb.4.1.5.: Optimierte SCX-Auftrennung. Aus den vorherigen Messungen wurden 5 große Fraktionsfenster bestimmt, innerhalb derer zum größten Teil Peptide desselben Ladungszustandes eluierten. Die Kontamination durch anders geladene Peptide lag unter 10% pro Fraktion. Zudem wurde ein zeitlich sehr effizienter Gradient von insgesamt 60 Min. Laufzeit generiert. Der genaue Verlauf des Gradienten wurde hier aus Übersichtlichkeitsgründen weggelassen, dieser ist jedoch identisch zu dem in Abb.4.1.4.

Die Optimierung wurde mit den in Tab.4.1.2. angegebenen Puffern und analog zum oben beschriebenen Ablauf durchgeführt, bis eine Auftrennung wie in Abb.4.1.5. erreicht wurde.

Diese neuen Parameter (mit Gradientenstufen bei 15% und 30% SCX-Puffer B) wurden nachfolgend für die Durchführung des erweiterten ChaFRADIC-Ansatzes genutzt.

Tab.4.1.2.: Zusammensetzung der verwendeten SCX-Puffer nach erneuter Optimierung.

SCX-Puffer A	10 mM KH ₂ PO ₄ , 20% ACN, pH=2,7
SCX-Puffer B	10 mM KH ₂ PO ₄ , 250 mM KCl, 20% ACN, pH=2,7
SCX-Puffer C	10 mM KH ₂ PO ₄ , 600 mM NaCl, 20% ACN, pH=2,7
Flussrate	80 µL/min

Um das zwei-dimensionale ChaFRADIC Prinzip nutzen zu können, war neben der definierten Ladungstrennung weiterhin auch die Reproduzierbarkeit ein wichtiger Punkt. Besonders im Hinblick auf die geplante Rechromatographie wurde zunächst geprüft, ob eine gesammelte Fraktion nach Entsalzung und Reinjektion auch in der zweiten Dimension im selben Retentionszeitfenster eluiert. Abb.4.1.6. zeigt die Auftrennung eines komplexen Peptidgemisches (schwarz), welches nach Ladungszuständen fraktioniert wurde.

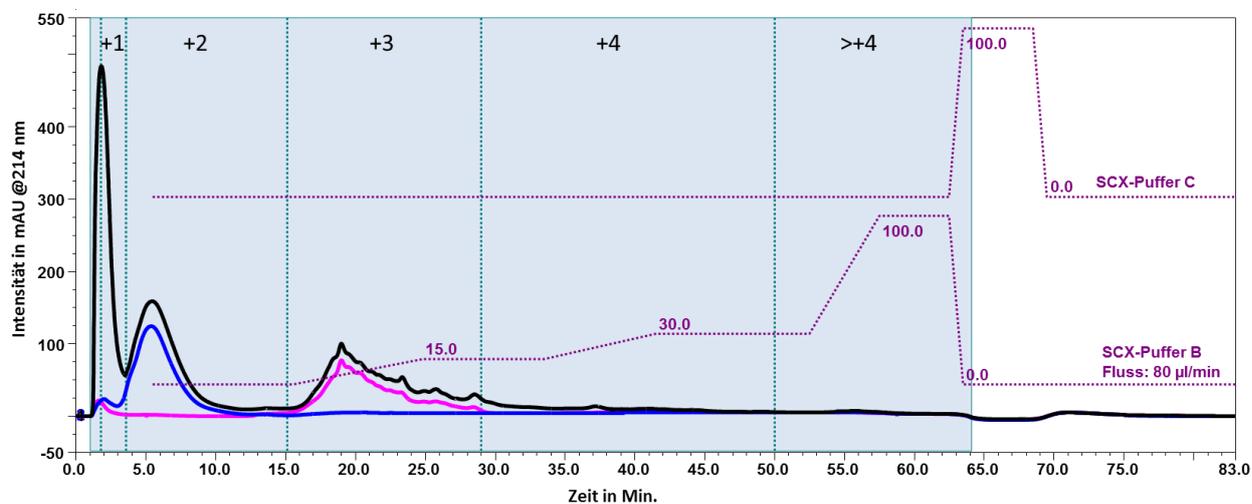


Abb.4.1.6.: Rechromatographie gesammelter Fraktionen. Ein komplexes Peptidgemisch (schwarz) wurde mit Hilfe des optimierten Gradienten nach Ladung aufgetrennt und gekennzeichnete Fraktionen gesammelt. Die +2- sowie +3-Fraktion wurden anschließend getrocknet, entsalzt und rechromatographiert, um das Elutionsverhalten in der zweiten Dimension zu überprüfen. Sowohl die +2-Fraktion (blau) als auch die +3-Fraktion (pink) eluierten zu exakt denselben Retentionszeiten wie in der ersten Dimension, weiterhin konnte in beiden Fraktionen nahezu das gesamte Probenmaterial in die zweite Dimension überführt werden, was für geringe Probenverluste während des Entsalzungsvorganges spricht.

Die Ladungszustände +2 und +3 wurden anschließend getrocknet, entsalzt und reinjiziert. Wobei die +2-Fraktion (blau) sowie die +3-Fraktion (pink) in exakt denselben Zeitfenstern

eluierten wie zuvor in der ersten Dimension und die nahezu identischen Intensitäten beider Fraktionen für geringe Peptidverluste durch das Entsalzen sprachen.

Grundsätzlich war durch die Optimierung des Gradienten sowie die Bestätigung der Reproduzierbarkeit des gesamten Systems die Durchführung eines zwei-dimensionalen ChaFRADIC-Ansatzes gewährleistet, so dass nachfolgend ein ChaFRADIC-Experiment mit biologischen relevanten Proben getestet werden konnte.

4.2. ANREICHERUNG N-TERMINALER PEPTIDE

4.2.1. ANWENDUNG DES INITIALEN CHAFRADICS ZUR ANREICHERUNG N-TERMINALER PEPTIDE AUS SACCHAROMYCES SEREVISIAE

Um die erfolgreiche Anwendung des ChaFRADICs auf eine biologisch relevante Probe hinsichtlich seiner Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde ein *proof-of-principle* Experiment zur Anreicherung N-terminaler Peptide aus Hefesphäroblasten durchgeführt. Eine graphische Darstellung des experimentellen Designs wird in Abb.4.2.1.1. dargestellt.

Für die grundlegende Validierung wurden zwei Aliquots entsprechend 50 µg Protein aus einem Hefelysat jeweils mit einer leichten und einem schweren Dimethyl markiert und anschließend in einem Verhältnis von 1:1 vereinigt. In der globalen LC-MS-Messung nach dem proteolytischen Verdau zeigte sich, dass eine hohe Markierungseffizienz erreicht werden konnte (96% aller Lysine waren dimethyliert). Zudem konnte das Labeling in beiden Proben sehr reproduzierbar durchgeführt werden, so dass sich ein Median Ratio der korrespondierenden Peptidpaare von 1,1 ergab, welches nahezu dem idealen Verhältnis von 1,0 entsprach. Anschließend wurde der Erfolg der Methode zur Anreicherung und Quantifizierung N-terminaler Peptide beurteilt. In der massenspektrometrischen Analyse der fünf erhaltenen, angereicherten Fraktionen konnten insgesamt 10918 PSMs identifiziert werden, von denen 8438 einem N-terminalen Peptid zugeordnet werden konnten, so dass sich eine effiziente Anreicherung von 77% ergab. Aus der Zahl der PSMs ergaben sich 1775 nicht-redundante N-terminale Peptide, von denen 1459 auch quantifiziert werden konnten. Diese zeigten ein Median Ratio von 1,1, wie in Abb.4.2.1.2. dargestellt wurde.

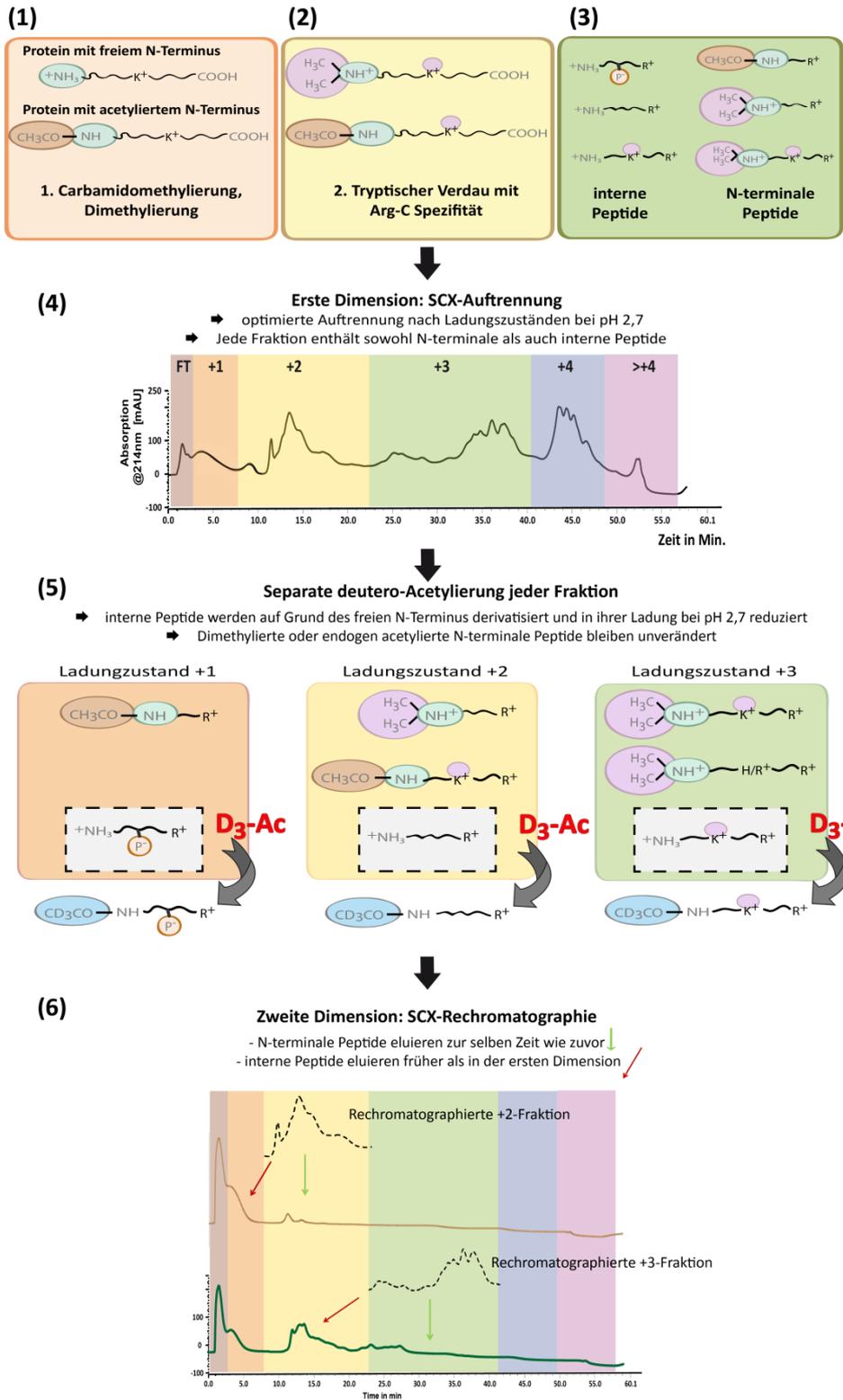


Abb.4.2.1.1.: Übersicht des ChaFRADIC Workflows. (1) Nach der Lyse werden die gelösten Proteine carbamido-methyliert und anschließend alle primären Amine durch Dimethylierung markiert. **(2)** Im nachfolgenden Verdau mit Trypsin ergibt sich dadurch eine ArgC Spezifität, da modifizierte Lysine nicht geschnitten werden. **(3)** Grundsätzlich entstehen durch den proteolytischen Verdau zwei Klassen von Peptiden, die N-terminalen und die internen Peptide. **(4)** Das komplexe Peptidgemisch kann anschließend mit Hilfe der optimierten Kationenaustauschchromatographie nach aufsteigenden Ladungszuständen separiert und in Fraktionen gesammelt

werden. **(5)** Um die N-terminalen Peptide aus dem Überschuss an generierten, internen Peptiden zu isolieren, werden interne Peptide spezifisch mittels einer schweren Acetylierung markiert, die die positive Ladung an deren N-Terminus maskiert. **(6)** Werden die Fraktionen einzeln unter exakt identischen Bedingungen erneut aufgetrennt, eluieren die modifizierten, internen Peptide durch den Ladungsshift in einer früheren Fraktion, wohingegen die nicht-derivatisierten N-terminalen Peptide in derselben Fraktion wie auch zuvor eluieren.

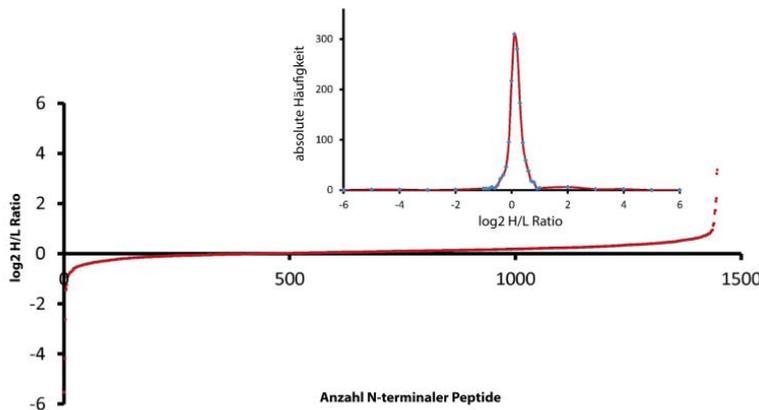


Abb.4.2.1.2.: Quantifizierung der mittels ChaFRADIC angereicherten N-terminalen Peptide. Da für das *proof-of-principle* Experiment zwei Hefeprotein-Aliquots in einem Verhältnis von 1:1 vereinigt wurden, läge das idealerweise zu erwartende Median Ratio bei 1,0 bzw. bei einem Log2-Wert von 0. Die graphische Darstellung zeigt, dass die ermittelten Ratios aller 1459 quantifizierten N-terminalen Peptide nahe bei dem optimalen Log2-Wert von 0 liegen und nur wenige Ausreißer im Datensatz vorhanden sind, so dass der Ansatz zur Quantifizierung genutzt werden kann.

Um eine finale Liste an identifizierten Protein N-termini zu erstellen, wurden nur Peptide berücksichtigt, deren Startposition (i) innerhalb der ersten 100 Aminosäuren der jeweiligen Proteinsequenz lag und, (ii) die den geringsten Abstand zum unprozessierten N-Terminus zeigten, also das „N-terminalste“ Peptid pro Protein darstellten. Dadurch ergab sich ein Datensatz von 806 einmalig vorkommenden Protein N-Termini, die über 20% des zu erwarteten Hefeproteoms (ca. 4000 Proteine [18]) repräsentierten, und von denen 661 zwischen beiden Proben relativ quantifiziert werden konnten (siehe Abb.4.2.1.3.).

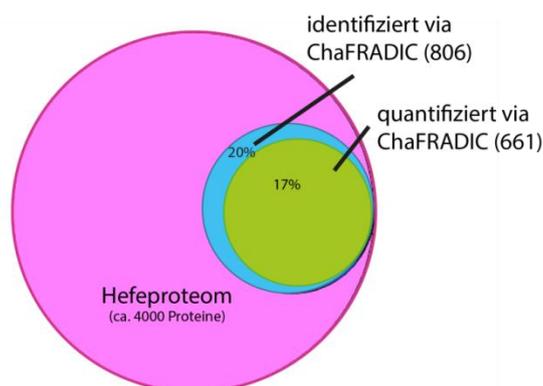


Abb.4.2.1.3.: Graphische Darstellung der durch ChaFRADIC erhaltenen Ergebnisse. Das aktuell bekannte Hefeproteom beläuft sich auf etwa 4000 Proteine, mit dem ChaFRADIC Ansatz konnten 806 Protein N-termini identifiziert und davon 661 quantifiziert werden. Dies entspricht jeweils 20 bzw. 17% des gesamten Proteoms. Abbildung erstellt mit dem *Venn Diagram Plotter* des Pacific Northwest National Laboratory [180].

Mit Hilfe der ChaFRADIC Methode war es möglich N-terminale Peptide aus einem komplexen Peptidgemisch anzureichern und zu quantifizieren. Neben der Darstellung eines

globalen N-terminalen Sub-Proteoms kann die Methode auch dazu genutzt werden Substrate von proteolytisch aktiven Enzymen (Proteasen) zu charakterisieren. Diese sind meist nur in bestimmten Zellkompartimenten aktiv und können dort durch die spezifische Abspaltung ein oder mehrerer Aminosäuren ein Protein z.B. in seine aktive Konformation überführen oder sich anderweitig auf Lokalisation, Lebensdauer und Funktion des Proteins auswirken. Sie spielen beispielsweise in Mitochondrien eine entscheidende Rolle: an den größtenteils aus dem Cytosol importierten, mitochondrialen Matrixproteinen erfolgt zunächst die Abspaltung der für den Import wichtigen Signalsequenz durch MPP (*mitochondrial processing peptidase*), was die sekundäre Prozessierung durch Icp55 (*intermediate cleaving peptidase 55*) initiiert (siehe Abb.4.2.1.4. A) [181]. Icp55 entfernt dabei eine einzelne Aminosäure (Tyrosin, Leucin und Phenylalanin) vom N-Terminus der in die mitochondriale Matrix importierten Proteine, was zur Stabilisierung dieser prozessierten Substrate führt.

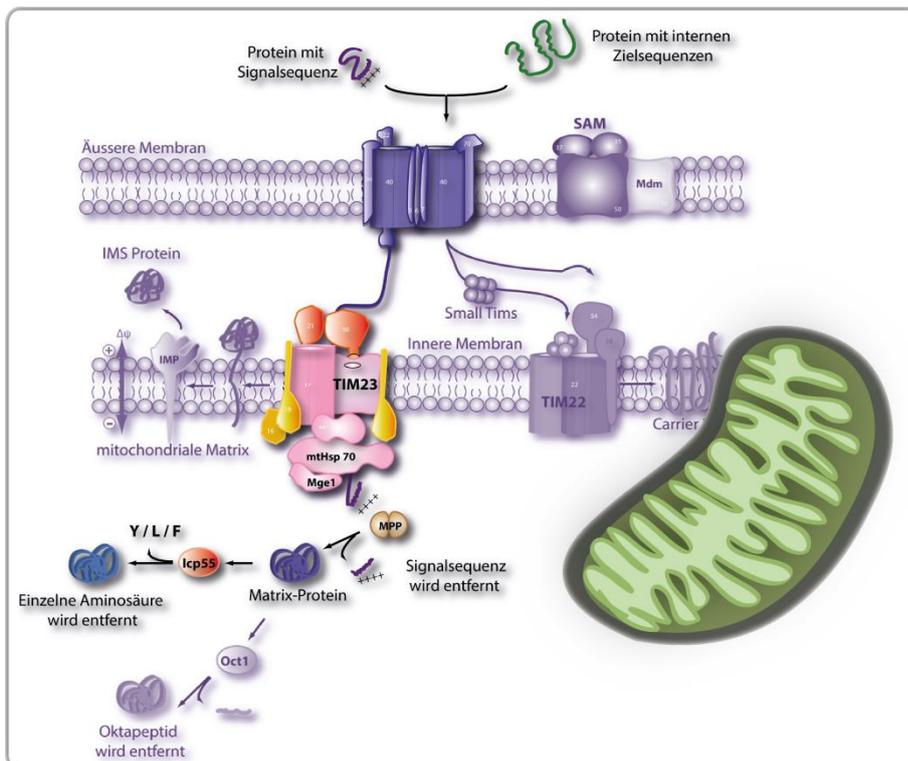


Abb.4.2.1.4.: Beispiel der proteolytischen Prozessierung in der mitochondrialen Matrix. Zunächst wird die Signalsequenz der importierten Proteine durch MPP entfernt, anschließend erfolgt die Abspaltung einer einzelnen Aminosäure (Y/F/L) durch sekundärprozessierende Peptidasen, wie Icp55. Dieser Mechanismus ist essentiell, um die Proteine in ihre reife Form zu überführen und das mitochondriale Proteom zu stabilisieren.

Dies ist ein bekannter Mechanismus des N-End-Rule Signalwegs, an dem noch weitere sekundärprozessierende Peptidasen (wie z.B. Oct1, *octapeptidyl aminopeptidase 1*) beteiligt sind und der dafür sorgt, dass bestimmte N-terminal ständige Aminosäuren die Abbaugeschwindigkeit eines Proteins regulatorisch beeinflussen können [182]. Wie in

Abb.4.2.1.5 schematisch dargestellt, ist dies ein komplexer Prozess, indem primär-, sekundär- und tertiär-destabilisierende Aminosäuren unterschieden werden, die direkt oder über weitere Prozessierungsschritte die Degradation des jeweiligen Proteins initiieren können. Sekundär-prozessierende Proteasen oder Peptidasen, wie beispielsweise Icp55, können diesen Prozess regulatorisch beeinflussen, indem sie destabilisierende Aminosäuren abspalten und damit die Degradation verzögern, was zur Stabilisierung des Proteoms führt.

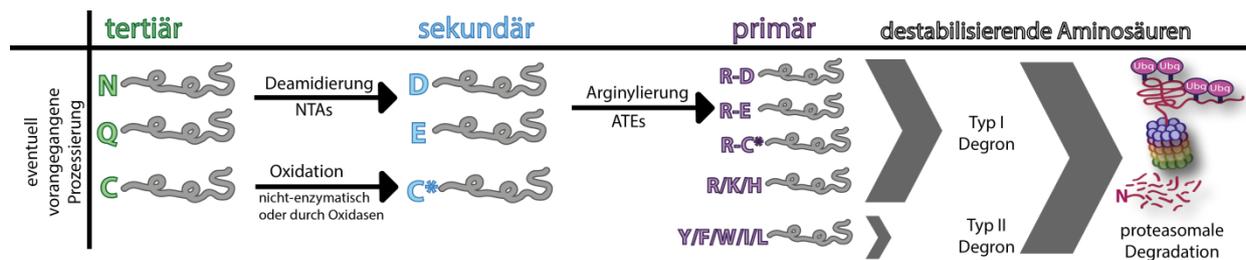


Abb.4.2.1.5.: Schematische Darstellung des N-End-Rule Signalwegs. Abhängig von der individuellen Proteinsequenz und eventuell vorangegangener Prozessierung kann sich die N-terminal offerierte Aminosäure unterscheiden und zu einem beschleunigten proteasomalen Abbau des Proteins führen. Dies folgt einer bestimmten Systematik, die als N-End-Rule bezeichnet wird und Proteine anhand ihrer N-ständigen Aminosäure in zwei Klassen unterteilt. Basische Aminosäuren (R, K, H) werden als Typ I Degron bezeichnet, aromatische oder aliphatische (Y, F, W, I, L) hingegen als Typ II Degron. Diese Aminosäuren werden auch primär destabilisierende Aminosäuren genannt, da sie den proteasomalen Abbau direkt initiieren. Daneben sind auch sekundär und tertiär destabilisierende Aminosäuren (N, Q, C, D, E) bekannt, die durch Prozessierung in ihre arginylierte Form überführt werden können und dann als primär destabilisierende Aminosäuren fungieren. In Eukaryoten prozessieren beispielsweise N-terminale Amidasen (NTAs) oder Arginyl-tRNA-Protein Transferasen (ATEs) ihre Substrate nach Erkennung spezifischer Aminosäuren, wobei sich die Mechanismen zwischen Pro- und Eukaryoten sowie verschiedenen Spezies unterscheiden können und teilweise noch nicht bekannt sind.

Um diese Vorgänge besser verstehen zu können und auch eventuelle Spezies-bedingte Unterschiede zu untersuchen, ist es essentiell die agierenden Proteasen und vor allem deren Substrate genauer zu charakterisieren, so dass sich ein experimentelles Design, wie in Abb.4.2.1.6. schematisch gezeigt, anbietet. Dabei werden in dem betrachteten Organismus die N-terminalen Peptide des Wildtyps gegen die einer gentechnisch veränderten Variante, in der die Funktion des Icp55 deaktiviert ist, verglichen. Abhängig von der stattfindenden oder fehlenden Prozessierung eines Substrats, unterscheiden sich die mittels ChaFRADIC angereicherten N-terminalen Peptide in ihrer Sequenz und sind auf Grund der stabilen Isotopenmarkierung quantifizierbar. So kann für ein identifiziertes Peptid dessen Abundanz in beiden Proben ermittelt und relativ zueinander verglichen werden. Das Verhältnis (Ratio) der Peptidabundanz gibt Aufschluss darüber, ob es sich bei dem korrespondierenden Protein um ein potentielles Substrat handeln könnte: Das nicht-prozessierte N-terminale Peptid (vgl. Abb.4.2.1.6. Sequenz startet mit Tyrosin, Y) sollte in der Mutante, auf Grund der fehlenden

Protease, deutlich abundanter vorkommen als im Wildtyp, so dass sich durch den Vergleich der relativen Abundanz des Peptids in beiden Proben (Mutante zu Wildtyp) ein hohes Verhältnis ergibt. Im Folgenden wird dies als Hochregulation bezeichnet. *Vice versa* wird das normal prozessierte (durch die Protease generierte) N-terminale Peptid häufiger in der wildtypischen Probe gefunden, was zu einem niedrigen Peptidverhältnis (Mut/WT) führt und im Nachfolgenden als Runterregulation benannt wird. Anhand des prozessierten Peptids kann zusätzlich die genaue Schnittstelle der Protease bestimmt werden (vgl. Abb.4.2.1.6. zwischen Y und N).

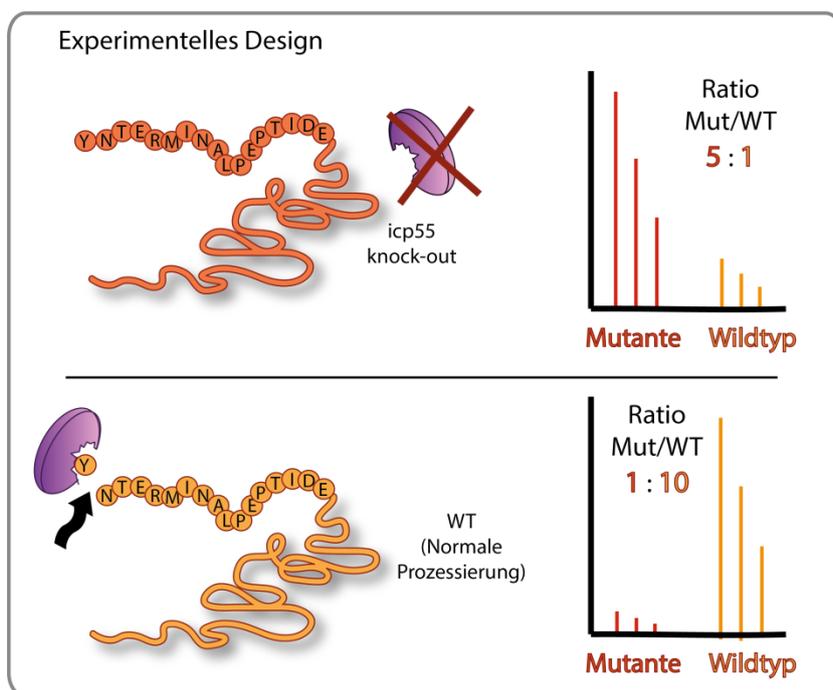


Abb.4.2.1.6.: Experimentelles Design zur Identifizierung von Protease-Substraten. Die Protease Icp55 wird im betrachteten Organismus deaktiviert (z.B. durch genetischen Knock-out), so dass sie keine proteolytische Aktivität mehr zeigt und der N-terminus ihrer Substrate nicht mehr prozessiert wird. Mit Hilfe von ChaFRADIC lassen sich Unterschiede der N-terminalen Peptidabundanzen quantifizieren. Dementsprechend wird ein unprozessiertes N-terminales Peptid deutlich abundanter in der Mutante sein als im Wildtyp, *vice versa* kommt ein prozessiertes Peptid häufiger im Wildtyp vor, da es in der Mutante nicht mehr prozessiert wird. Dies gibt Aufschluss darüber, ob es sich um ein Substrat der Protease handeln könnte.

Ein solches Experiment wurde für hochreine Mitochondrien aus Wildtyp-Hefe und einer Icp55-Knockout-Linie durchgeführt, um neue Substrate des Icp55 mittels ChaFRADIC zu identifizieren. Dazu wurden 30 µg Protein pro Zustand verwendet und wie zuvor beschrieben angereichert, was zur Quantifizierung von 627 nicht-redundanten, N-terminalen Peptiden führte (Median 1,0), darüber hinaus konnten 77 endogen acetylierte Peptide identifiziert werden. Um Substrate des Icp55 zu bestimmen, wurden nur Peptide ausgewählt, (i) die mindestens eine 5-fache Regulation zeigten und (ii) deren korrespondierende Proteine als

mitochondrial annotiert waren. (iii) Darüber hinaus wurde nur das jeweils N-terminalste Peptid eines Proteins berücksichtigt und (iv) die der Schnittstelle vorgelagerte Sequenz musste mit dem aus der Literatur bekannten Konsensus-Motiv R/K-X-Y, R/K-X-F oder R/K-X-L übereinstimmen [181]. Dabei handelt es sich um eine für die sequentielle Prozessierung wichtige Aminosäuresequenz, wobei R/K-X die Schnittstelle für MPP bildet und nachfolgend eine einzelne Aminosäure (Y, F, L) durch Icp55 entfernt wird. Dies führte zu einer finalen Liste von 36 Icp55-Substraten, von denen 14 noch nicht bekannt waren. Insgesamt gab es bereits 38 bekannte Substrate, von denen 9 auf Grund der speziellen Methodik des ChaFRADIC-Ansatzes (Arg-C Verdauspezifität) nicht zu detektieren waren. Von den restlichen 29 (zugänglichen) Substraten, konnten demnach 76% (22 von 29) abgedeckt werden, wobei 100-mal weniger an Ausgangsmaterial im Vergleich zur früheren Vergleichsstudie eingesetzt wurde [181]. Alle identifizierten Substrate wurden in Tab.4.2.1. zusammengefasst.

Tab.4.2.1.1.: Übersicht aller identifizierter Icp55 Substrate. Für die gefundenen N-terminalen Peptide wurde jeweils angegeben, ob sie hoch-/ (↑↑) oder runterreguliert (↓↓) waren. Herunterregulierte Peptide repräsentieren das normal prozessierte Protein, so dass anhand dieser die genaue Schnittstelle ermittelt werden konnte, die entfernte Aminosäure wurde jeweils angegeben. Bei Nr.1-22 handelt es sich um bereits bekannte Substrate, 23-36 sind neuentdeckte Substrate.

Nr .	Gen-name	Protein-name		Start-position	End-position	Entfernte Aminosäure	identifizierte Sequenz
1	ATP3	YBR039W	↑↑	33	42	Y	yATLkEVEMR
			↓↓	34	42		aTLkEVEMR
2	STF1	YDL130W-A	↑↑	23	43	Y	ySDGPLGGAGPGNPQDIFIkR
			↓↓	24	43		sDGPLGGAGPGNPQDIFIkR
3	DLD2	YDL178W	↑↑	36	43		ySTkIQTR
4	MRPL11	YDL202W	↑↑	31	40		yALASEQPSR
5	FMP16	YDR070C	↓↓	14	19	L	mRkSPR
6	MRP20	YDR405W	↓↓	35	52	L	aSVVESSSkILDkSGSDR
7	RSM28	YDR494W	↑↑	14	29	Y	ySTSVTEDFINSILAR
			↓↓	15	29		sTSVTEDFINSILAR
8	FMP10	YER182W	↓↓	14	28	Y	tNGVVfKtASkPkRR
9	TIM21	YGR033C	↑↑	42	58		ySNGTGATSGkkDDkTR
10	AIM17	YHL021C	↑↑	23	34	Y	yTSAATAAAAANR
			↓↓	24	44		tSAATAAAAANRGHIIkTYFNr
11	COX6	YHR051W	↑↑	40	55		ySDAHDEETFEETAR
12	ACP1	YKL192C	↑↑	36	48	Y	ySANLSkDQVSQR
			↓↓	37	48		sANLSkDQVSQR
13	HSP60	YLR259C	↑↑	21	34	Y	ySSHkELkFGVEGR
			↓↓	22	34		sSHkELkFGVEGR

Nr .	Gen-name	Protein-name		Start-position	End-position	Entfernte Aminosäure	identifizierte Sequenz
14	ACO1	YLR304C	↓↓	17	24	L	aTVSNLTR
15	MSK1	YNL073W	↓↓	30	45	Y	sLAHAVDTskMEATRR
16	ATP11	YNL315C	↑↑	35	44		ySSSPEQkYR
17	CIT1	YNR001C	↑↑	37	48		ySSASEQTLker
			↓↓	38	48	Y	sSASEQTLker
18	IDH2	YOR136W	↑↑	15	25		IATVqQPSIGR
			↓↓	16	25	L	aTVkQPSIGR
19	RDL2	YOR286W	↓↓	26	39	F	tTkAPkIYTFDQVR
20	MYS1	YPL097W	↑↑	37	52		ySQPSALEVQGTSDSR
			↓↓	38	52	Y	sQPSALEVQGTSDSR
21	COX11	YPL132W	↓↓	46	63	Y	sVNSEQPkHTFDISkLTR
22	MSF1	YPR047W	↓↓	18	51	Y	sTLkVPHVEINGIkYkTDPQTT NVTDSIIkLTDK
23	COQ8	YGL119W	↑↑	41	55		yTTkSAkeGEENVER
			↓↓	42	55	Y	tTkSAkeGEENVER
24	MTG2	YHR168W	↑↑	23	33		ySTkVPDNAPR
			↓↓	24	33	Y	sTkVPDNAPR
25	YHR056 W-A	YHR056W-A	↓↓	51	56	L	hNRILR
26	COQ2	YNR041C	↑↑	34	62		yTSSSSSSSSPSSkESAPVFTSk ELEVAR
27	MRS2	YOR334W	↑↑	32	47		yADTSTAANTNSTILR
28	FCJ1	YKR016W	↓↓	18	36	L	aSINTGTTVASKkASHkFR
29	POS5	YPL188W	↑↑	17	43		ySTLDShSLkLQSGSkFVvkIkP VNNLR
			↓↓	18	43	Y	sTLDSHSLkLQSGSkFVvkIkPV NNLR
30	YKL023C -A	YKL023C-A	↓↓	13	33	Y	sSkkPTFHNTAPSkTNVNVPR
31	AEP2	YMR282C	↓↓	68	77	Y	sTHTVcAIDR
32	MSD1	YPL104W	↑↑	16	32		IADFPEANAIkkkFLFR
			↓↓	17	32	L	aDFPEANAIkkkFLFR
33	TAM41	YGR046W	↑↑	27	35		ISTQIkEGR
34	ISA2	YPR067W	↑↑	35	49		ySDLVTkePLITPkR
			↓↓	36	49	Y	sDLVTkePLITPkR
35	ATP12	YJL180C	↑↑	23	46		ySLNAQPLGTDNTIENNTPTET TNR
			↓↓	24	46	Y	sLNAQPLGTDNTIENNTPTET NR
36	SDH4	YDR178W	↓↓	33	48	L	tIPFLPVLQkPGGVR

Die sequentiell erfolgende Prozessierung wird durch die identifizierten Peptide bestätigt, so dass beispielsweise für das Protein Atp3 das N-terminale Peptid ³³YATLKEVEMR⁴² hochreguliert sowie die Variante ³⁴ATLKEVEMR⁴² herunterreguliert in ΔIcp55 Hefe gefunden wurde. Dabei repräsentiert das Tyrosin-Peptid den nach Schneiden durch MPP

erhaltenen N-Terminus, der, auf Grund der fehlenden Icp55 Aktivität, nicht weiter prozessiert wird. Dementsprechend ist die Peptidvariante mit abgespaltenem Tyrosin nur im Wildtyp zu finden und runterreguliert in Δ Icp55 existent. Abhängig von der Sequenz kann die Prozessierung durch Icp55 auch mehrmals durchlaufen werden, so dass beim Substrat Isa2 zunächst F entfernt wird und anschließend das in der Sequenz nachfolgende Y. Dieses neu identifizierte Substrat und der beobachtete Mechanismus konnte erstmalig gezeigt werden und stellt damit das erste Beispiel für eine solche dreifach-Prozessierung durch die Kombination von MPP und Icp55 dar [127].

4.2.2. ANWENDUNG DES INITIALEN CHAFRADICS ZUR ANREICHERUNG N-TERMINALER PEPTIDE AUS ARABIDOPSIS THALIANA

Ein ähnliches Experiment, wie im Abschnitt 4.2.1. beschrieben, wurde zur Identifizierung der Substrate von Icp55 und Oct-1 in *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Wie aus Proteomstudien in *Saccharomyces cerevisiae* bereits bekannt, ist Oct-1, wie Icp55, eine sekundär-prozessierende Protease, die an -zuvor durch MPP prozessierten Proteinen - N-terminal ein Oktapeptid abspaltet (siehe vorheriger Abschnitt, Abb.4.2.1.4.) [181, 183]. Beide Proteasen generieren sogenannte Neo-N-Termini und sind damit für die Reifung von Proteinen sowie für die Stabilisierung des mitochondrialen Proteoms von Bedeutung. In höheren Pflanzen wurden bislang zwar Homologe zu den in Hefe vorkommenden Enzymen gefunden, deren Prozessierungsmechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt [184]. Um die Substrate von Icp55 und Oct-1 in *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren, wurde vorgegangen wie in Abschnitt 4.2.1. beschrieben, jedoch wurden mutierte Arabidopsis-Keimlinge verwendet, in denen die Genabschnitte, die für die beiden Peptidasen codieren, stillgelegt wurden. Für die Oct-1 Mutante wurden diese Gen-Knockouts an zwei verschiedenen Genloci durchgeführt, die im Nachfolgenden als Oct-1-1 und Oct-1-2 bezeichnet werden. Die erfolgreiche Stilllegung der Gene wurde mittels RT-PCR Analyse im Labor von Prof. Jürgen Soll (Ludwig-Maximilians-Universität München) überprüft [154]. Die Anreicherung N-terminaler Peptide erfolgte aus aufgereinigten Mitochondrien des Wildtyps sowie der Mutanten Δ icp55, Δ oct-1-1 und Δ oct-1-2, wobei jeweils 80 μ g pro Zustand eingesetzt wurden und die Peptide der Mutanten jeweils gegen die des Wildtyps verglichen wurden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach den, im Abschnitt 3.2.2.7. beschriebenen, Kriterien gefiltert, so dass insgesamt mittels ChaFRADIC 1052 N-terminale Peptide in der Δ icp55/WT-Probe und 724 Peptide in der Δ oct-1-1/WT-Probe identifiziert werden konnten. In der Δ oct-1-2/WT-Probe konnten 871 N-terminale Peptide gefunden werden. Um potentielle Substrate der Peptidasen zu ermitteln,

wurden nur Peptide berücksichtigt die mindestens eine 3-fach Hoch-/ oder Runterregulation (Vergleich Mut/WT, vgl. Abschnitt 4.2.1.) zeigten, was zu einem finalen Ergebnis von 74 Icp55-Substraten führte und im kombinierten Datensatz beider Oct-1 Experimente die Identifizierung von 7 potentiellen Substraten lieferte. Die gefundenen Substrate wurden im Anhang in Tab.1. (Δ icp55) und Tab.2. (Δ oct-1) aufgeführt. Um sie auf Analogien zu den aus Hefe bekannten Substraten zu überprüfen, wurde die Sequenzspezifität beider Organismen verglichen (siehe Abb.4.2.2.1.).

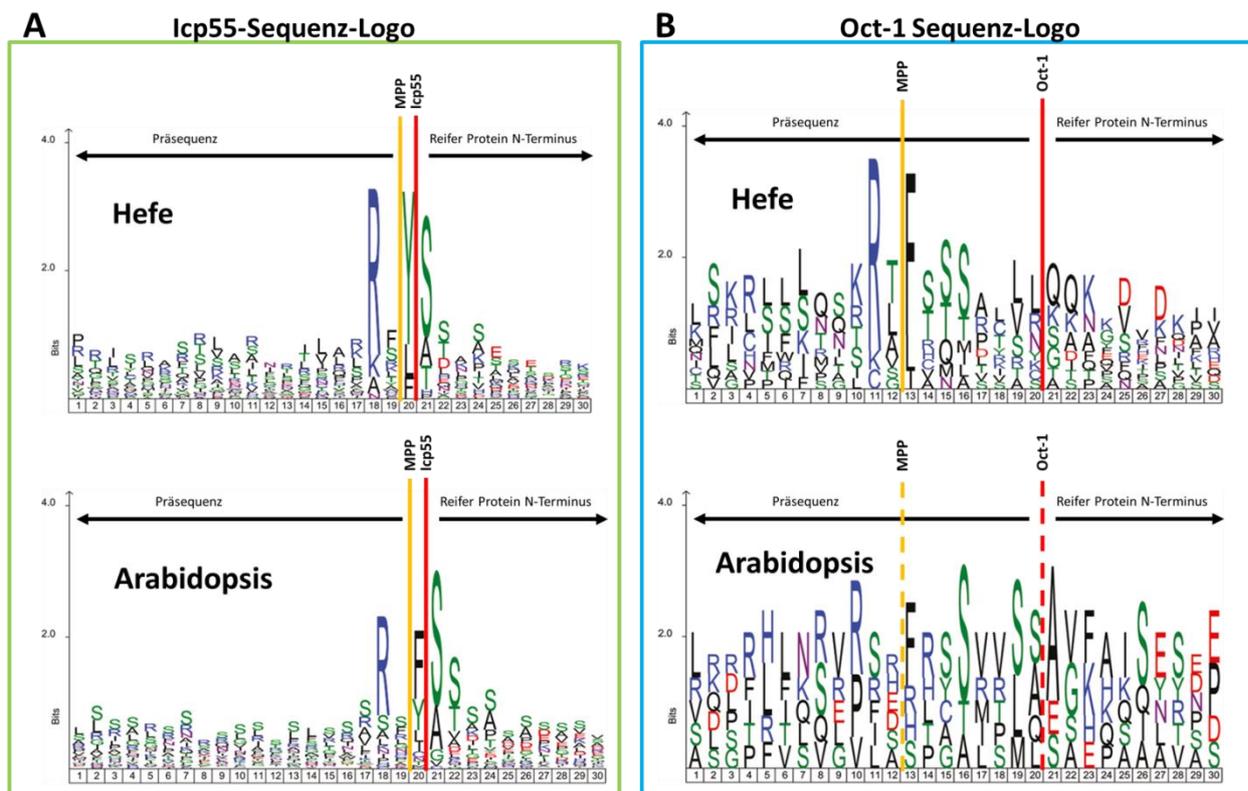


Abb.4.2.2.1.: Sequenzanalyse der identifizierten Schnittstellen in Hefe und Arabidopsis. Es wurden für die gefundenen Substrate aus Hefe und Arabidopsis jeweils die relativen Häufigkeiten der Aminosäuren in der Präsequenz (19 Aminosäuren vor der Schnittstelle) und die ersten 10 Aminosäuren der prozessierten, reifen Proteinsequenz verglichen. (A) Die Substrate von Icp55 zeigten dabei in beiden Organismen hohe Konformität. Für Arabidopsis ergibt sich daraus die Konsensussequenz R-X-F/Y/L/I, die dem bekannten Motiv aus Hefe ähnelt, wenn auch eine weniger strikte Spezifität aufweist. (B) Für Oct-1 Substrate ist aus Hefe das Sequenzmotiv R/K-X-F/L/I-S/T-S/T-S/T-XXXX bekannt [185-187], welches auch in der Sequenzanalyse erkennbar ist. Auf Grund der in Arabidopsis weniger deutlichen Präferenz für ausgewählte Aminosäuren, ist die Bestimmung einer Konsensussequenz nicht möglich. Abbildung modifiziert nach Carrie et al. [154] unter Verwendung der iceLogo Software [137].

Dabei wurden die Sequenzen der identifizierten N-terminalen Peptide, inklusive der davor befindlichen 20 Aminosäuren aus der jeweiligen Proteinsequenz, verglichen und deren relative Häufigkeit dargestellt. Liegen Schnitt-Präferenzen für bestimmte Aminosäuren vor, kommen diese häufiger am prozessierten N-Terminus vor und werden dementsprechend

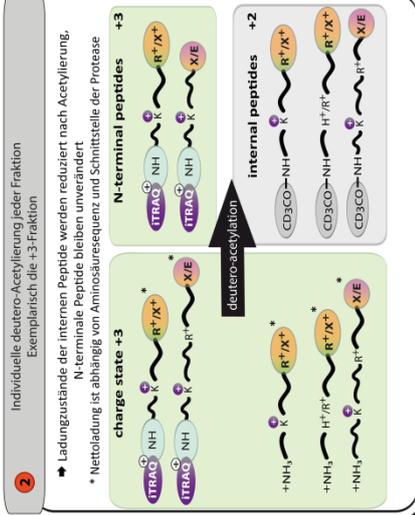
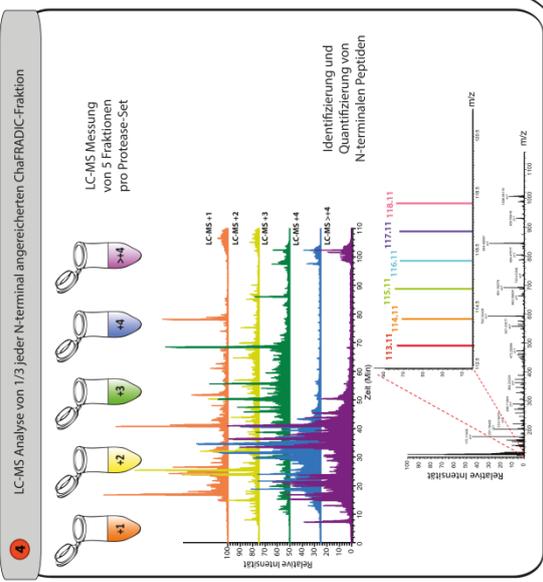
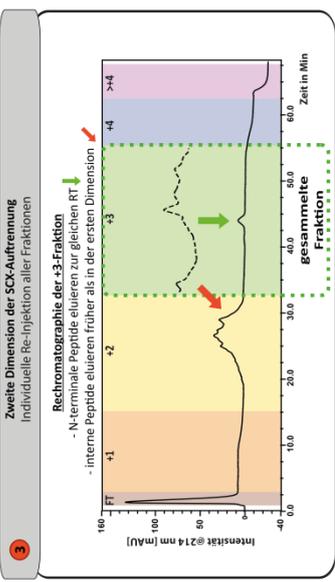
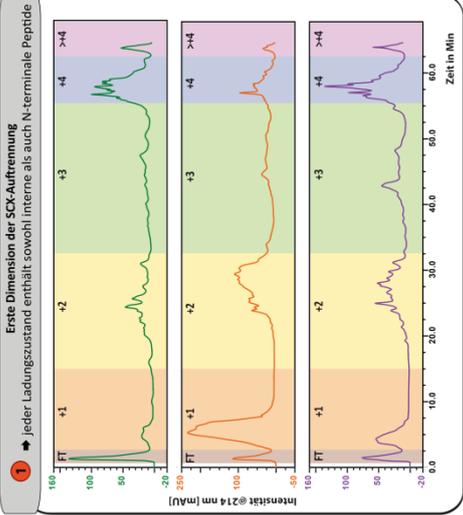
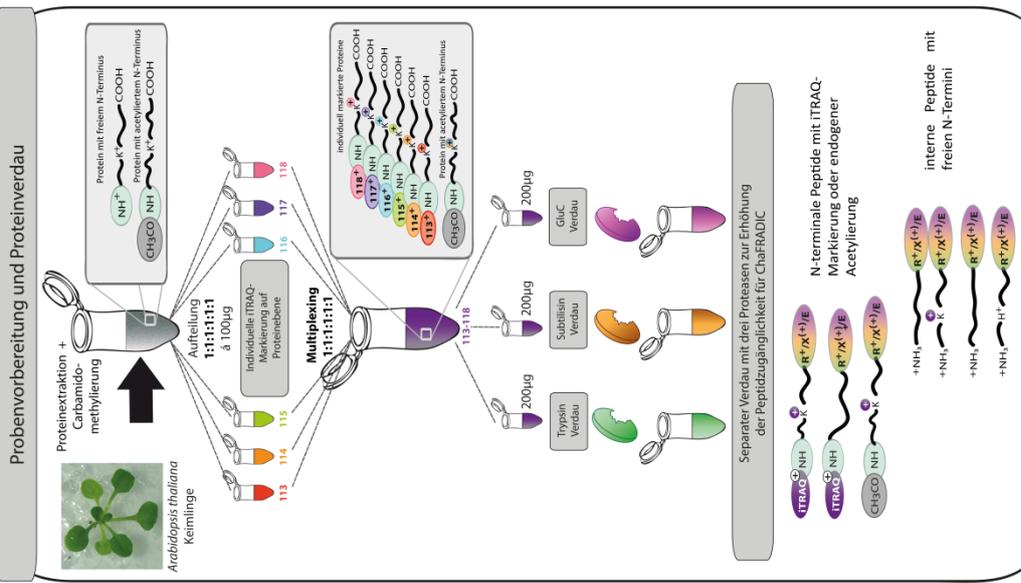
größer im Sequenz-Logo dargestellt. Wie in Abb.4.2.2.1. A dargestellt, ergab sich für die Sequenzanalyse der Icp55 Substrate aus Hefe die bekannte Konsensussequenz R/K-X-Y/L/F, wobei Y/L/F die durch Icp55 einzeln entfernte Aminosäure darstellt. Der davor befindliche Teil der Proteinsequenz fungiert als Prä-/ bzw. Signalsequenz und wird durch MPP abgespalten. Die in Arabidopsis identifizierten N-terminalen Sequenzen weisen dazu eine hohe Konformität auf, so dass sich hier eine Konsensussequenz von R-X-F/Y/L/I ergibt. Hauptsächlich werden, wie in Hefe, die Aminosäuren F, L und Y durch Icp55 entfernt, wobei jedoch eine weniger strikte Spezifität in Arabidopsis zu beobachten ist, die auch die Abspaltung anderer Aminosäuren wie beispielsweise I, N oder M zulässt. Ferner wurden auch Beispiele gefunden, in denen Icp55 mehrfach einzelne Aminosäuren entfernt, was für Hefe mit dem im Abschnitt 4.2.1. angeführten Beispiel des Proteins Isa2 ebenfalls beschrieben werden konnte. In Arabidopsis wurde beispielsweise das mitochondriale Acyl-Carrier Protein 3 (At5g47630) mit drei verschiedenen N-Termini identifiziert, die für eine Dreifachprozessierung sprechen: so konnte das zunächst durch MPP prozessierte Peptid ³⁸FTSEAAADGGQDQILSR⁵⁴ identifiziert werden sowie zusätzlich die Varianten ³⁹TSEAAADGGQDQILSR⁵⁴ und ⁴⁰SEAAADGGQDQILSR⁵⁴, die vermutlich zweifach durch Icp55 oder in Kombination mit einer noch unbekanntem Peptidase prozessiert werden. Im Gegensatz zu Icp55 wurden für Oct-1, für das ansonsten keine Zielproteine bekannt sind, nur sieben Substrate, korrespondierend zu 12 N-terminalen Peptiden, identifiziert. Die Sequenzanalyse (siehe Abb.4.2.2.1. B) ergab dabei kein eindeutiges Konsensusmotiv und zeigte nur partiell Übereinstimmungen mit der aus Hefe bekannten Sequenz R/K-X-F/L/I-S/T-S/T-S/T-XXXX [185-187].

4.2.3. ANWENDUNG DES ERWEITERTEN CHAFRADICS ZUR ANREICHERUNG N-TERMINALER PEPTIDE AUS ARABIDOPSIS THALIANA

Der initiale ChaFRADIC-Ansatz wird grundsätzlich durch die Tatsache limitiert, dass einige Peptide auf Grund der Protease-Spezifität im proteolytischen Verdau unzugänglich gemacht wurden. So schneidet Trypsin nach Dimethylierung auf Proteinebene nur noch C-terminal von Arginin, so dass im Vergleich zu einem normalen Trypsinverdau längere Peptide generiert werden. Hinzu kommt, dass sich bei einigen Proteinen eine solche Arginin-Schnittstelle entweder sehr nahe oder weiter entfernt vom jeweiligen N-terminus befinden kann und so nach dem Verdau entweder extrem kurze (<5 Aminosäuren) oder sehr lange Peptide entstehen, die dann prinzipiell mit dem ChaFRADIC-Ansatz angereichert werden könnten, jedoch in der massenspektrometrischen Analyse nur unzureichend detektierbar sind. Daher

liegt die Verwendung anderer Proteasen nahe, die - neben den durch Trypsin erzeugten basischen – dazu möglichst komplementäre Schnittstellen liefert und somit auch Peptide zugänglich macht, die auf Grund ihrer Aminosäuresequenz im initialen ChaFRADIC-Ansatz nicht abdeckbar sind. Daher wurde im erweiterten ChaFRADIC zusätzlich GluC, welches C-terminal nach Glutaminsäure schneidet, sowie unspezifisch schneidendes Subtilisin eingesetzt, um die Abdeckung des initialen ChaFRADICs und damit die Anzahl detektierbarer Peptide zu steigern. Weiterhin wurde statt der bis dahin verwendeten Dimethylmarkierung eine isobare Markierungsstrategie mittels iTRAQ gewählt. Dies hatte den Vorteil, dass bis zu 8 Proben relativ zueinander quantifiziert werden konnten und zudem auf Grund des isobaren Charakters des Labels die Probenkomplexität in der massenspektrometrischen Analyse nicht unnötig durch die unterschiedlich markierten Peptide erhöht wurde (vgl. Kapitel 1.3.3.). Zur Überprüfung des erweiterten ChaFRADIC wurden, wie in Abb.4.2.3.1. gezeigt, 6 x 100 µg Protein aus *Arabidopsis thaliana* Keimlingen eingesetzt und individuell mittels iTRAQ markiert. Nach dem Multiplexen aller Proben wurden diese in 3 gleiche Aliquots zum alternativen Verdau aufgeteilt und anschließend der etablierten ChaFRADIC-Anreicherung unterzogen. Die finale Identifikation der N-terminalen Peptide erfolgte durch Messung von nur 1/3 der jeweils angereicherten Fraktion, wodurch insgesamt 2791 nicht-redundante N-terminale Peptide (1% FDR) korrespondierend zu 2249 verschiedenen N-Termini aus 1270 Arabidopsis Proteinen quantifiziert werden konnten. Um den Nutzen eines Multienzym-Ansatzes zu untersuchen, wurden die quantifizierten Proteine in Kombination mit der jeweiligen Startposition ihrer N-terminalsten Aminosäure (z.B. F4KIL8;2) verglichen. Dies erlaubte auch bei unterschiedlicher Schnittstelle und Länge der Peptide einen Vergleich, welcher N-Terminus durch welche Protease abgedeckt wurde.

Anreicherung N-terminaler Peptide via ChaFRADIC separat für drei Protease-Verdaue



Unterschiedliche Ladung der Schnittstellen

Trypsin-Schnittstelle mit ArgC-Spezifität: R, positiv geladen in SCX bei pH 2.7

Subtilisin-Schnittstelle: unspezifisch (X), Ladung abhängig von offenerer Aminosäure

GluC-Schnittstelle: E, in SCX bei pH 2.7 ungeladen

R⁺X⁺

X/E

113⁺

114⁺

115⁺

R⁺X⁺/E

R⁺X⁽⁺⁾/E

R⁺X⁽⁺⁾/E

R⁺X⁽⁺⁾/E

R⁺X⁽⁺⁾/E

Es zeigte sich, dass 82% aller identifizierten N-Termini unter Verwendung von nur einem der drei Enzyme abdeckbar waren (Abb.4.2.3.2. A), was sich auch beim alleinigen Vergleich der Proteinnamen zwischen den Proteasen widerspiegelte, in dem 81% der Proteine ausschließlich mit einem Enzym identifiziert wurden (Abb.4.2.3.2. B). Dies unterstützte die initiale Vermutung, dass die Verwendung weiterer Proteasen die Peptidzugänglichkeit und Abdeckung erhöht, da die unterschiedlichen Schnittpräferenzen der Enzyme sich ergänzend auswirken und auch N-terminale Sequenzen detektiert werden können, die nur bei bestimmten Verdaubedingungen entstehen.

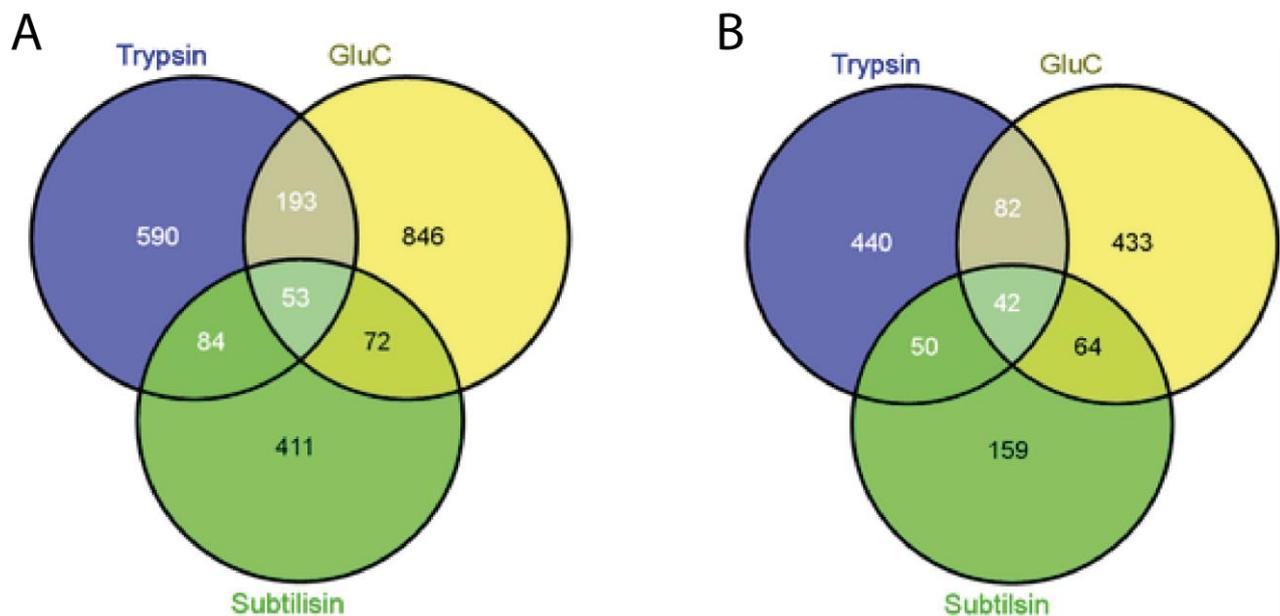


Abb.4.2.3.2.: Nutzen eines Multienzym-Ansatzes für ChaFRADIC. (A) Überlappung zwischen Trypsin, GluC und Subtilisin basierend auf dem Vergleich von Proteinname gekoppelt mit Startposition der ersten Aminosäure (z.B. F4KIL8;2) für alle identifizierten N-terminalen Peptide. (B) Vergleich nur basierend auf Proteinnamen (z.B. F4KIL8). Zur Visualisierung wurde die Venny Software (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) verwendet [139].

Insgesamt konnten im Trypsin-Satz 1132 N-terminale Peptide mittels erweitertem ChaFRADIC quantifiziert werden sowie 1496 im GluC-/ und 855 im Subtilisin-Ansatz. Für jedes identifizierte Peptid wurde eine normalisierte Abundanz bestimmt, die es erlaubt, die quantifizierten Werte aus jedem Markierungskanal miteinander in Relation zu setzen und zusätzlich eventuell auftretende Abweichungen in der Abundanz zu vergleichen. Der Median dieser normalisierten Abundanz sollte im Idealfall für jedes einzelne Peptid 1 ergeben, da es sich um technische Replikate handelt, die nach der iTRAQ-Markierung im Verhältnis 1:1:1:1:1:1 vereinigt wurden. Der Median aller normalisierten Abundanzen sollte demnach ebenfalls 1 betragen, wenn die Markierung in allen 6 Proben mit gleicher Effizienz durchgeführt werden konnte und somit ein markiertes Peptid mit derselben Quantität in allen

Proben existent ist. Wie in Abb.4.2.3.3. gezeigt, konnte der ideale Median von 1,0 nahezu erreicht werden (0,98 – 0,99) und unterscheidet sich kaum bei den verschiedenen Verdaustrategien. Die geringe Standardabweichung der normalisierten Abundanz von 0,082 – 0,094 in allen Ansätzen zeigt dabei die hohe Reproduzierbarkeit sowohl zwischen den verschiedenen Verdaustrategien als auch für die Quantifizierung der einzelnen Peptide innerhalb desselben Ansatzes. Dies spiegelte sich auch im Median der relativen Standardabweichung aller 6 Markierungskanäle wider, die bei allen Verdaustrategien unter 10% lag und somit zeigt, dass eine reproduzierbare und robuste Quantifizierung mit dem erweiterten ChaFRADIC erreicht werden konnte.

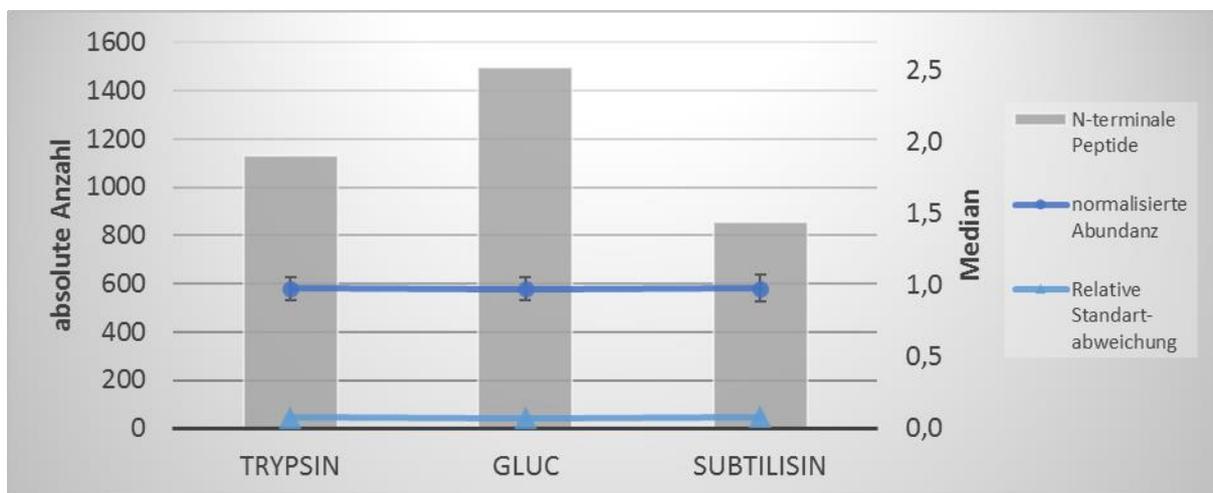


Abb.4.2.3.3.: Übersicht der Reproduzierbarkeit und technischen Variation des erweiterten ChaFRADIC Ansatzes. Die Anzahl der quantifizierten N-terminalen Peptide aus allen drei Verdauansätzen wurde im Balkendiagramm dargestellt. Zusätzlich wurde für jedes Peptid die Abundanz aller 6 Markierungskanäle in Relation gesetzt und der Median dieser normalisierten Abundanz für alle Peptide in einem Ansatz aufgetragen. Die Standardabweichung dieser Werte sowie die daraus resultierende relative Standardabweichung zeigt sowohl die hohe Reproduzierbarkeit innerhalb desselben Verdaustrategie als auch zwischen den unterschiedlichen Ansätzen, so dass eine niedrige technische Varianz von unter 10% für alle Verdaue erreicht werden konnte.

Dennoch zeigten sich innerhalb dieses großen Datensatzes auch einige wenige Extremwerte, die innerhalb der 6 Replikate für ein oder zwei Kanäle deutliche Abweichungen gegenüber den anderen quantifizierten Werten zeigten, so dass die Verwendung von mindestens 3 Replikaten bei Durchführung eines solchen Experimentes anzuraten ist. Zudem sollte bedacht werden, dass eine solche Evaluierung der technischen Varianz weder für vergleichbare Ansätze wie TAILS noch COFRADIC gezeigt wurden, so dass keine Vergleichswerte zur Beurteilung zur Verfügung stehen.

Ebenso wie das initiale ChaFRADIC ist auch der erweiterte Ansatz zur Untersuchung proteolytischer Aktivität geeignet, so dass anhand der identifizierten N-terminalen Peptide

individuelle Proteasespezifikationen charakterisiert werden können. In diesem Experiment konnte durch Verwendung dreier Replikate aus dem *Arabidopsis*-Wildtyp keine bestimmte Proteaseaktivität untersucht werden, dennoch konnten die identifizierten N-terminalen Peptide näher klassifiziert werden. Zunächst wurde für jedes Peptid die Position der ersten Aminosäure innerhalb der in der Uniprot angegebenen Proteinsequenz bestimmt (siehe Abb.4.2.3.4.).

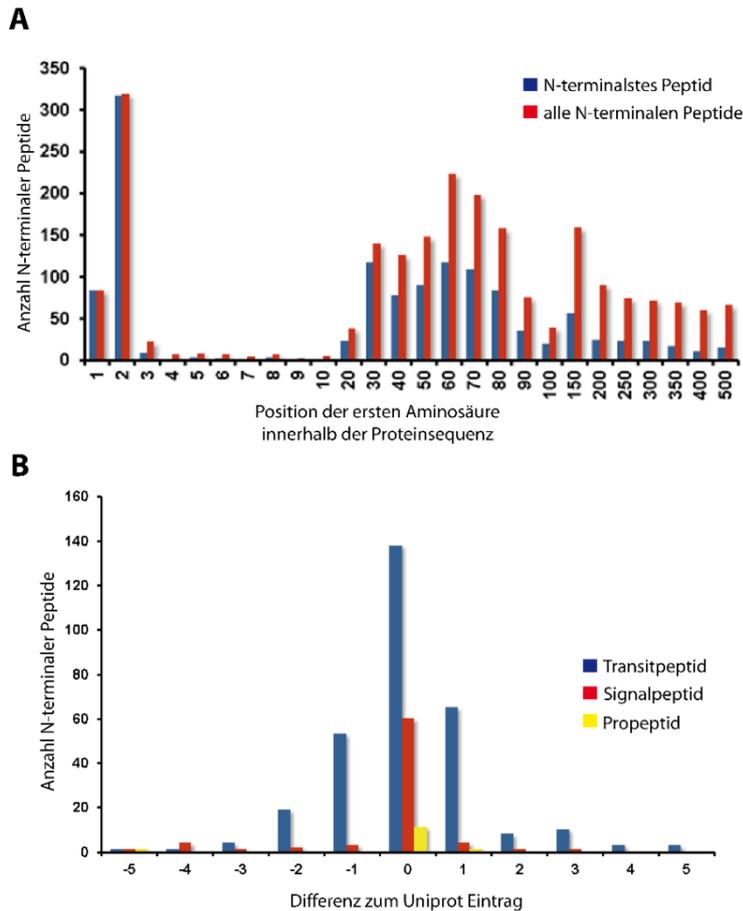


Abb.4.2.3.4.: Datenbankanalyse der identifizierten N-terminalen Peptide. A Startposition der identifizierten Peptide. B Übereinstimmung der Startposition der identifizierten Peptide mit dazu korrelierenden Uniprot-Einträgen.

Dies zeigte, dass 106 der 2791 einmalig vorkommenden N-terminalen Peptidsequenzen einen unprozessierten N-terminus aufwiesen, der dem entsprechend an Position 1 beginnt und damit die volle Länge der natürlichen Proteinsequenz aufweist. Bedingt durch die Translation beginnen Peptide generell mit einem Methionin, welches bei 430 der identifizierten Peptide durch Methionin-Aminopeptidasen (engl.: *methionine amino peptidases*, MAPs) abgespalten wurde und diese entsprechend erst an Position 2 beginnen. Der Großteil der gefundenen Peptide resultierte allerdings aus anderen proteolytischen Ereignissen, so dass insgesamt 2252 N-terminale Peptide eine Startposition von >2 aufwiesen. Wie in Abb.4.2.3.4. A graphisch

dargestellt, wurden die meisten endoproteolytischen Aktivitäten an Positionen hinter den ersten 20 Aminosäuren gefunden. Da die meisten importierten Matrixproteine vielfach prozessiert werden und häufig erst durch einen mehrstufigen Prozess in ihre reife Form überführt werden [188, 189], spricht das Ergebnis dafür, dass diese Proteinsequenzen durch Abspaltung von Transit-, Signal- oder Propeptiden entstanden sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurden die verfügbaren Informationen für die 1270 identifizierten Proteine bezüglich Transit-, Signal- oder Propeptidpositionen aus der Uniprot Datenbank extrahiert und mit den gefundenen N-terminalen Positionen verglichen. Wie in Abb.4.2.3.4. B gezeigt, stimmten diese in den meisten Fällen mit den in Uniprot angegebenen Positionen für Transit-, Signal- oder Propeptiden überein oder unterschieden sich nur um weniger als 3 Aminosäuren. Zu berücksichtigen ist hier, dass die Informationen über solche Prozessierungsmechanismen in der Uniprot Datenbank häufig auf Vorhersagen basieren und oft nicht immer experimentell belegt wurden. Des Weiteren können auf Grund von möglicherweise unbekanntem Peptidasen, die zusätzliche Aminosäuren entfernen, Sequenzen entstehen, die durch Prognosemodelle nur schwer vorherzusagen sind (z.B. Icp55). Dies kann dazu führen, dass leichte Differenzen zwischen den experimentellen und den in Datenbanken hinterlegten Informationen zu beobachten sind. Insgesamt konnten von den in Uniprot verfügbaren Daten für 681 Proteine etwa die Hälfte validiert werden.

4.3. ANREICHERUNG EHEMALS DISULFID-VERBRÜCKTER PEPTIDE

Neben der im vorherigen Kapitel beschriebene ChaFRADIC-Strategie zur Anreicherung N-terminaler Peptide, kann dasselbe Prinzip auch zur Isolation weiterer Peptidklassen genutzt werden. Disulfidbrücken stellen dabei eine für Struktur und Aktivität wichtige post-translationale Modifikation in Proteinen dar, die bislang häufig durch sehr aufwendige Röntgenstrukturanalysen untersucht wurde [190]. Zudem ist auch eine Identifikation mittels Massenspektrometrie möglich, dafür müssen jedoch spezielle Suchalgorithmen eingesetzt werden, die in der Lage sind überlagerte Spektren zweier disulfidverbrückter Peptide zu differenzieren. Beide Methoden haben den Nachteil, dass sie meist nur für einzelne Proteine nicht aber für Subproteom-Analysen angewendet werden können. Bei der hier beschriebenen Anwendung des ChaFRADIC-Prinzips wird der Umstand genutzt, dass Disulfid-verbrückte Peptide einen höheren Ladungszustand als die meisten anderen durch Trypsinverdau entstehenden Peptide besitzen und somit in einer ersten SCX-Auftrennung vom Großteil der nicht-Disulfid-verbrückten Peptide separiert werden können. Die spezifische Anreicherung

der verbrückten Peptide erfolgt dann innerhalb der zweiten Dimension anhand des durch Carbamidomethylierung induzierten Ladungsshifts, der spezifisch für Disulfid-verbrückte Peptide ist (siehe auch Abb.4.3.1. B). In Abb.4.3.1. A werden die wichtigsten Schritte einer solchen Anreicherung dargestellt: zunächst werden dazu die freien Thiole der nativen Proteine irreversibel alkyliert, was die Wahrscheinlichkeit für eine Umlagerung vorhandener Disulfidbrücken stark verringert. Dieser Schritt sollte sobald wie möglich nach Generierung der Probe durchgeführt werden, um verfälschte Ergebnisse auf Grund artifiziell entstandener Disulfidpositionen zu verhindern. Durch den tryptischen Verdau werden anschließend Disulfid-verbrückte Peptide generiert, die mittels iTRAQ markiert werden, so dass diese nach der zwei-dimensionalen ChaFRADIC-Anreicherung mittels LC-MS identifiziert und quantifiziert werden können. Die Anreicherung selbst basiert, wie in Abb.4.3.1. B mittleres Bild dargestellt, auf der für ChaFRADIC typischen Ladungsreduktion und dadurch verkürzter Retentionszeit. Die erste Dimension dient dabei zur Präfraktionierung der hochgeladenen Disulfid-verbrückten Peptide in die Fraktionen +4 und +5. Anschließend werden die Disulfidbrücken mittels Carbamidomethylierung irreversibel entfernt und es entstehen nicht mehr verbrückte Einzelpeptide. Diese weisen einen deutlich reduzierten Ladungszustand von +2 oder +3 auf, was sie in der zweiten Dimension früher eluieren lässt. Das Anreicherungsprinzip ist dabei so konzipiert, dass nur ehemals Disulfid-verbrückte Peptide einen solchen Retentionszeitshift aufweisen sollten und andere (nicht-verbrückte) hochgeladene Peptide in derselben Fraktion wie zuvor eluieren. Es handelt sich daher um eine indirekte Nachweismethode mit deren Hilfe sich Cysteinpositionen bestimmen lassen, die zuvor über eine Disulfidbrücke verbunden waren. Auf Grund des experimentellen Designs geht jedoch die Information verloren, welche einzelnen Cysteine miteinander verknüpft waren.

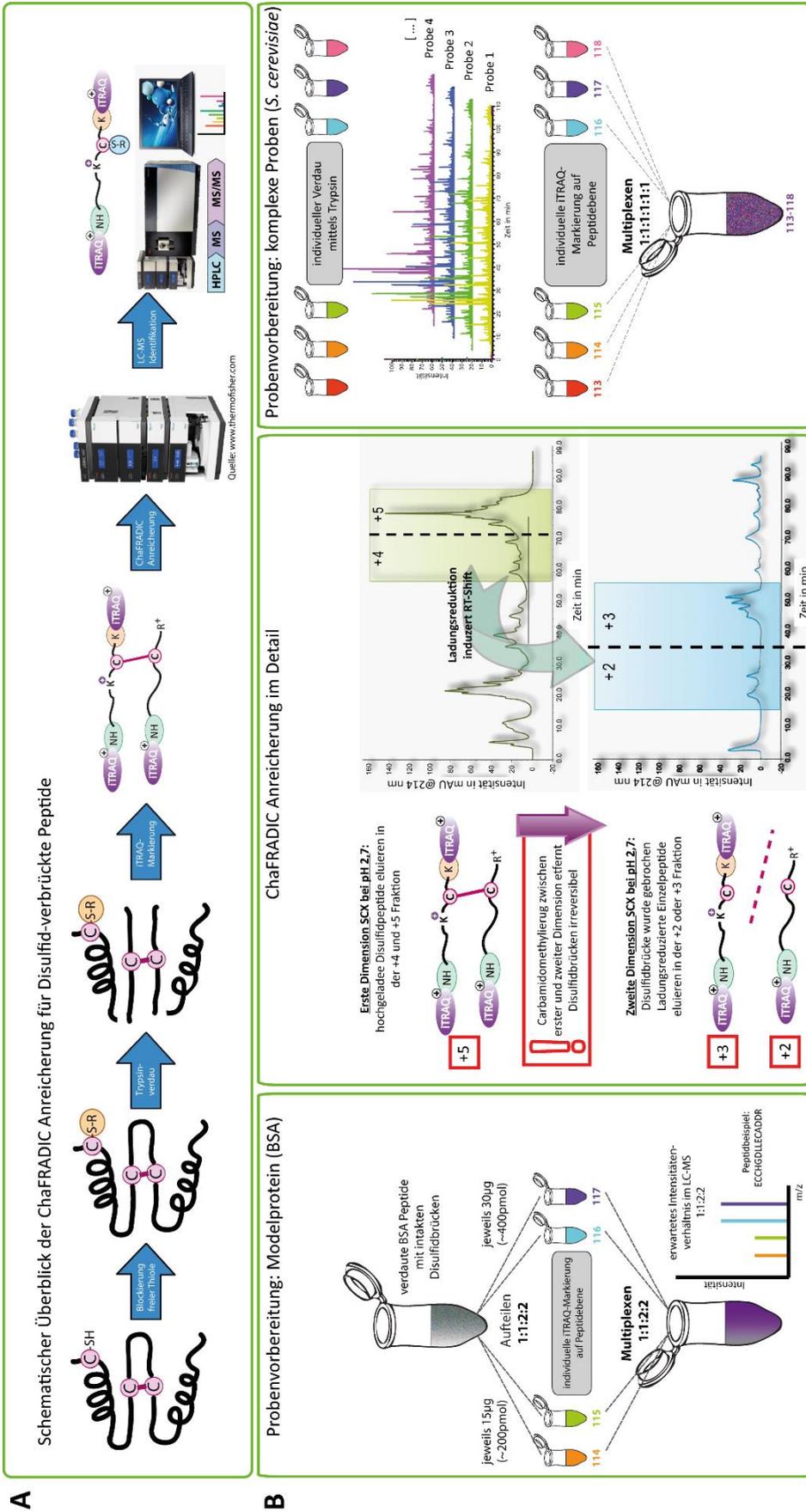


Abb.4.3.1.: Anwendung von ChaFRADIC zur Anreicherung ehemals Disulfid-verbrückter Peptide. A Die freien Thiole eines nativen Proteins werden zunächst irreversibel alkyliert, um die UmLagerung vorhandener Disulfidbrücken zu verhindern. Durch den tryptischen Verdau entstehen Disulfid-verbrückte Peptide, die mittels ChaFRADIC angereichert du anschließend in der LC-MS-Messung identifiziert und quantifiziert werden können. **B** Die Methode wurde zunächst mit einem Modelprotein (BSA) auf ihre Funktionalität überprüft (vorderes Bild) und anschließend auch für komplexe Proben aus Hefe angewendet (hinteres Bild). Die ChaFRADIC-Anreicherung basierte in beiden Ansätzen auf einer Vorfraktionierung der verbrückten Peptide in die Fraktionen +4 und +5 sowie der anschließenden Anreicherung über den durch Carbamidomethylierung induzierten Ladungsshift (mittleres Bild).

Die Funktionalität der Methode wurde zunächst mit dem Modelprotein BSA (engl.: *bovine serum albumin*) getestet, welches 34 bekannte Disulfidpositionen aufweist, und später auch auf komplexe Proben aus Hefe angewendet. Um die Reproduzierbarkeit hinsichtlich Anreicherung und Quantifizierung zu untersuchen, wurde BSA mit intakten Disulfidbrücken verdaut und in 4 Aliquots aufgeteilt (siehe Abb.4.3.1. B, erstes Bild). Dabei wurden je 15 und 30 µg BSA im Duplikat individuell iTRAQ-markiert und anschließend im Verhältnis 1:1:2:2 vereinigt. Die Anreicherung mittels ChaFRADIC erfolgte dann durch Injektion dieser Gesamtprobe, wobei für die abschließende LC-MS-Messung nur ein Aliquot von 500fmol pro angereicherter Fraktion verwendet wurde. Insgesamt konnten so 28 nicht-redundante ehemals Disulfid-verbrückte Peptide angereichert werden und mit den erhaltenen Informationen 33 Disulfidpositionen bestimmt werden. In der Uniprot Datenbank waren insgesamt 34 Disulfidpositionen gelistet, die daraufhin mit unseren experimentell ermittelten Daten verglichen wurden. Es ergaben sich für 32 der gefundenen Disulfidpositionen exakte Übereinstimmungen zu den in Uniprot hinterlegten Daten, so dass 97% des hier generierten Datensatzes validiert werden konnte. Zwei in Uniprot referierte Positionen konnten nicht mittels ChaFRADIC gefunden werden, was vermutlich an der durch den Trypsinverdau generierten sehr kurzen Peptidsequenz ³⁰⁰ECCDK³⁰⁴ und der damit verbundenen eingeschränkten Detektierbarkeit im LC-MS zusammenhängt.

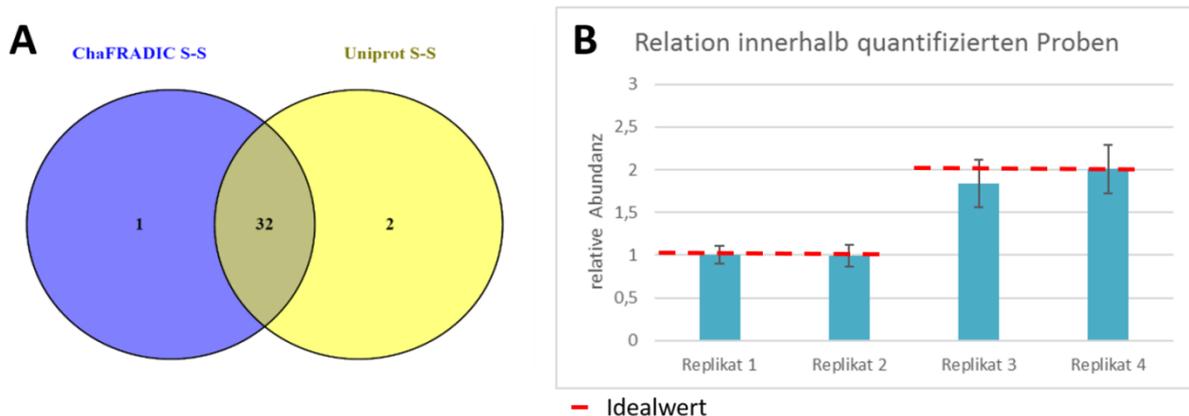


Abb.4.3.2.: Graphische Darstellung der Ergebnisse nach ChaFRADIC Anreicherung. **A** Insgesamt konnten 32 von 33 (97%) experimentell ermittelten Disulfidpositionen durch in Uniprot hinterlegten Daten validiert werden. **B** Die relative Abundanz wurde für alle Proben bestimmt, indem der Median aller Peptidintensitäten eines Markierungskanals mit den anderen Kanälen in Relation gesetzt wurde. Der auf Grund der Probenvereinigung (1:1:2:2) zu erwartende Idealwert würde für Replikat 1 und 2 bei 1,0 liegen und für Replikat 3 und 4 bei 2,0.

Zu bemerken ist an dieser Stelle, dass besonders bei BSA durch den Trypsinverdau auch Konstrukte bestehend aus drei Peptiden entstehen können. Auch diese hochgeladenen, ebenfalls über Disulfidbrücken verbundenen Peptide können mittels ChaFRADIC angereichert werden, da sie nach der zweiten Dimension ebenfalls in der +2 und +3 Fraktion eluieren.

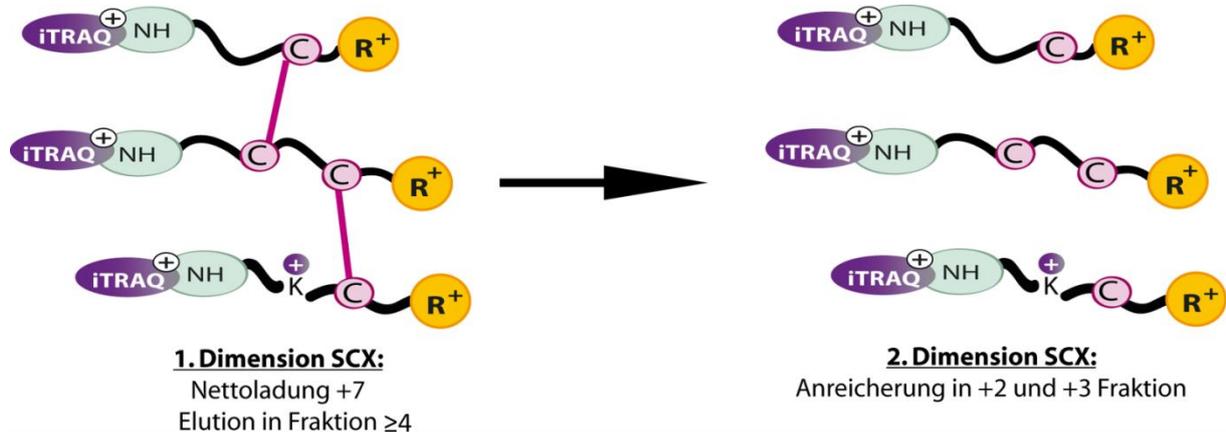


Abb.4.3.3.: Hochgeladenes Peptid aus einem tryptischen BSA-Verdau. Da BSA besonders viele Disulfidbrücken aufweist, entstehen nach dem Verdau häufig sehr hoch geladene Konstrukte (Nettoladung >6) bestehend aus drei Peptiden. Auch diese sind mittels ChaFRADIC anreicherbar, da sie nach Spaltung in der zweiten Dimension ebenfalls in der +2 und +3 Fraktionen eluieren.

Alle gefundenen Peptide konnten zudem mittels iTRAQ über 4 Markierungskanäle hinweg quantifiziert werden, wobei der Median aller Peptidintensitäten für jede Probe nahezu den idealen Wert erreichte (siehe Abb.4.3.2. B). Auf Grund des Vereinigungsschemas (1:1:2:2) war hier ein Median von 1,0 für die Replikate 1 und 2 sowie ein Median von 2,0 für die Replikate 3 und 4 zu erwarten. Dies konnte für die jeweiligen Markierungskanäle mit einer relativen Standardabweichung von etwa 10% für die ersten beiden Replikate erreicht werden. Die letzten beiden Replikate zeigten auf Grund einiger weniger Extremwerte eine höhere Standardabweichung von $<30\%$. Insgesamt zeigte die hohe Übereinstimmung mit den aus Uniprot extrahierten Daten, dass der ChaFRADIC-Ansatz dazu geeignet ist, Disulfidpositionen in aufgereinigten Proteinen präzise zu bestimmen. Weiterhin konnte durch die Quantifizierung gezeigt werden, dass die Methode über vier Replikate reproduzierbar durchführbar ist und valide Quantifizierungsergebnisse liefert.

Weitaus anspruchsvoller ist die Bestimmung von Disulfidpositionen in komplexen Proben, da wie bei anderen Methoden der Proteomik auch hier die enorme Anzahl der generierten Peptide den limitierenden Faktor darstellt. Durch den proteolytischen Verdau entsteht eine Vielzahl an unterschiedlichen Peptiden, von denen nur eine bestimmte Spezies zur

Beantwortung einer biologischen Fragestellung charakterisiert werden soll. Zur Bestimmung von Disulfidpositionen ist daher eine Anreicherung, wie auch bei der Untersuchung anderer PTMs, notwendig und wurde hier mittels ChaFRADIC durchgeführt. Dazu wurden 6 wildtypische Hefeprouben verwendet, die vor der Lyse mit Antimycin A behandelt wurden. Diese Substanz ist ein spezifischer Inhibitor des Komplex III der Atmungskette in Mitochondrien und führt bei den behandelten Zellen zur Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), was sich auch auf die Ausbildung von Disulfidbrücken auswirkt. In wie weit sich ein Effekt durch die Behandlung von Antimycin A nachweisen lässt, sollte durch die Anreicherung von ehemals Disulfid-verbrückten Peptiden untersucht werden. Durch die Quantifizierung ist es darüber hinaus möglich zu- / oder abnehmende Tendenzen in der Peptidintensität innerhalb der einzelnen Proben zu verfolgen. Anders als im Proof-of-principle-Experiment handelt es sich bei den Ausgangsproben um biologisch individuelle Proben, so dass sich nach der einzeln durchgeführten iTRAQ-Markierung eine Angleichung empfahl. Dazu wurden gleiche Volumina aller Proben mittels LC-MS analysiert und die für das Multiplexing benötigte Probenmenge auf Grund der individuellen Probenintensität festgelegt, um so einem tatsächlichen Verhältnis von 1:1:1:1:1:1 möglichst nahe zu kommen. Die ChaFRADIC Anreicherung führte zur Identifizierung von insgesamt 2401 nicht-redundanten ehemals Disulfid-verbrückten Peptiden aus 1421 Proteinen, die in allen 6 Proben zudem quantifiziert werden konnten. Für die identifizierten Proteine wurden anschließend die in Uniprot verfügbaren Informationen bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation extrahiert und deren Verteilung in Abb.4.3.4. A dargestellt.

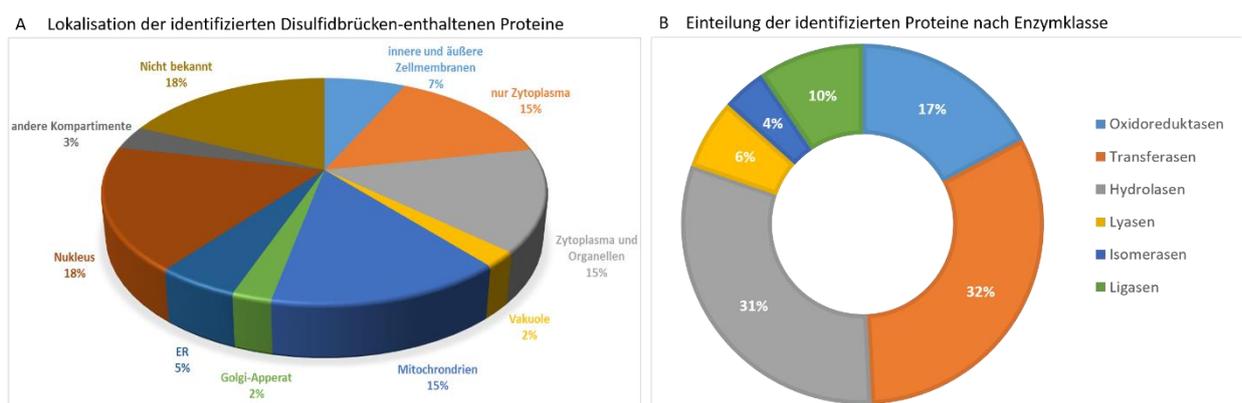


Abb.4.3.4.: Klassifizierung der identifizierten Proteine nach Lokalisation (A) und Enzymklasse (B).

Insgesamt waren für über 1100 der gefundenen Proteine Informationen zur Lokalisation verfügbar, wobei der Großteil der Proteine, insgesamt 67%, dabei in Membranen oder Organellen lokalisiert war und nur 15% als zytoplasmatische Proteine annotiert waren. Dieses

Ergebnis korrespondiert mit der Tatsache, dass im Zytoplasma generell reduzierende Bedingungen herrschen und Disulfidbrückenbildung daher vorrangig in Organellen, wie beispielsweise dem ER oder aber auch in Mitochondrien [171, 191], stattfindet, so dass die meisten disulfidverbrückten Proteine in Zellkompartimenten nachgewiesen werden sollten. Für weitere 15% der Proteine wird eine zweifache Lokalisierung sowohl im Zytoplasma als auch in Organellen angegeben, wobei fraglich ist, ob diese Proteine in beiden Kompartimenten dieselbe Funktion haben. Interessanterweise handelt es sich bei nahezu der Hälfte der identifizierten Proteine um Enzyme, die meisten davon sind Oxidoreduktasen, Transferasen oder Hydrolasen, wie in Abb.4.3.4. B gezeigt. Oxidoreduktasen katalysieren Redoxreaktionen und sind unter anderem am Abbau von oxidativem Stress beteiligt. Auch andere Enzyme wie die Glutathion-Transferase oder Disulfid-Isomerasen spielen eine wichtige Rolle bei der Disulfidbrückenbildung und Aufrechterhaltung der Homöostase der Zelle bei erhöhtem oxidativen Stress.

Um die generierten Ergebnisse des ChaFRADIC Ansatzes zur Bestimmung von Disulfidpositionen kritisch zu überprüfen, wurden die identifizierten Positionen mit bekannten Disulfidpositionen in Hefe mittels Uniprot Datenbank verglichen. Dabei waren lediglich für 84 Hefeproteine Informationen über Disulfidbrücken in Uniprot verfügbar von denen wiederum 43 auch in unserem Datensatz vorhanden waren. In diesen 43 Proteinen wurden insgesamt 92 Disulfidpositionen mittels ChaFRADIC identifiziert, davon stimmten 65% mit den in Uniprot angegebenen Positionen überein, wobei für etwa 19% der Proteine zwei oder mehr Disulfidpositionen pro Protein validiert werden konnten. Auf Grund der wenigen verfügbaren Daten in der Uniprot Datenbank, sollte eine zusätzliche Validierung über spezielle Software erfolgen, die anhand von Modelberechnungen die Wahrscheinlichkeit für die Bildung einer Disulfidbrücke vorhersagen kann. Dazu stehen verschiedene Softwares zur Verfügung, die jedoch nur einzelne Proteinsequenzen überprüfen können, so dass hier stichprobenartig die für vier Proteine identifizierten Disulfidpositionen mit den prognostizierten verglichen wurden. Um die Zuverlässigkeit der durch Vorhersagen erhaltenen Positionen zu erhöhen, wurden nur diejenigen berücksichtigt, die durch zwei unabhängige Softwares als sehr wahrscheinliche Disulfidpositionen bewertet wurden. Tab.4.3.1. zeigt die ausgewählten Proteine und die jeweilige Übereinstimmung. Für den Vergleich wurden Proteine mit unterschiedlicher Anzahl an Cysteinen und Länge ausgewählt, wobei sich zeigte, dass für längere Proteine etwa 40% aller zu erwartenden Disulfidpositionen abgedeckt werden konnten. Für kürzere Proteine, wie P39727, konnte sogar eine Übereinstimmung von 75% erreicht werden.

Tab.4.3.1.: Übereinstimmung mittels ChaFRADIC identifizierter Disulfidpositionen und prognostizierter Disulfidpositionen. Für ausgewählte Proteine wurde mit Hilfe der DiANNA [133] sowie der DiPro 2.0 [135] Software mögliche Disulfidpositionen bestimmt. Es wurden nur diejenigen Positionen berücksichtigt, die übereinstimmend in beiden Prognosen anhand einer Qualitätsnote als sehr wahrscheinliche Disulfidpositionen bewertet waren. Diese wurden anschließend mit den im ChaFRADIC Experiment ermittelten Positionen verglichen.

<i>Uniprot Protein-name</i>	Lokalisation	Funktion	Länge	# Cys	S-S Positionen identifiziert mit ChaFRADIC	S-S Positionen vorhergesagt	Übereinstimmung ChaFRADIC Daten mit der Vorhersage
P34111*	Nukleus, Mitochondrium	Vermittelt tRNA und 5S-RNA Genaktivierung durch Bindung an Promoterelemente	1161	7	2	5	40%
P39727*	Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat	Wichtig für effizienten Transport sekretorischer Proteine vom ER zum Golgi-Apparat	416	10	6	8	75%
P32319*	Golgi-Apparat	Wichtig für intrazelluläre Sortierung und Überbringung löslicher Vakuolen-Proteine	1580	37	12	29	41%
Q02933*	Vakuole, Zytoplasma	Moduliert Zellüberleben bei zell. Stress	434	12	0	6	0%

* P34111: *Transkriptionsfaktor Tau 138 kDa Untereinheit, TFC3*

P39727: *ER-spezifisches Vesikelprotein, ERV46*

P32319: *Vakuolares Transportprotein, PEP1*

Q02933: *Ribonuklease T2-like, RNY1*

Dabei wurden nur die Disulfidpositionen der DiANNA [133] sowie DiPro 2.0 [135] Software berücksichtigt, die mit einer hohen Qualitätsnote bewertet wurden und somit die Ausbildung einer Disulfidbrücke an dieser Position auf Grund mehrerer Kriterien (Proteinstruktur, Distanz der Cysteine, Proteinlöslichkeit, statistische Berechnung etc.) sehr wahrscheinlich ist. Generell konnten so für zufällig ausgewählte Proteine alle mittels ChaFRADIC experimentell ermittelten Positionen verifiziert werden, umgekehrt konnten 20 von insgesamt 48 vorhergesagten Disulfidpositionen experimentell belegt werden. Interessanterweise werden für Q02933, eine Ribonuklease T2-like, keine Disulfidpositionen mittels ChaFRADIC nachgewiesen, jedoch durch die Vorhersagesoftware insgesamt 6 Positionen angegeben werden. In Uniprot sind zu diesem Protein Informationen zu 10 Disulfidpositionen hinterlegt, die allein auf Grund von Sequenzhomologien zu anderen Proteinen ermittelt wurden. Dies

zeigt, dass die Softwares generell geeignet sind, um Disulfidpositionen vorherzusagen, jedoch oft auch Positionen als wahrscheinlich bewertet werden, die experimentell bisher nicht belegt werden konnten. Insgesamt sind die Programme in der Lage Disulfidpositionen mit einer Genauigkeit von bis zu 86% vorherzusagen [134], wobei davon auszugehen ist, dass auch immer Positionen angegeben werden, die experimentell nicht vorliegen (hier in allen 4 Fällen) und somit sowohl ChaFRADIC als auch Kristallisationsversuche nie 100% der vorhergesagten Positionen abdecken werden.

Die Darstellung der quantifizierten Peptide innerhalb aller 6 Proben erfolgte über die Inferno [138] Software, die die normalisierten Peptidabundanzen in allen 6 Markierungskanälen miteinander in Relation setzt und diese als sogenannte Heatmap für den gesamten Datensatz visualisiert (siehe Abb.4.3.5. A).

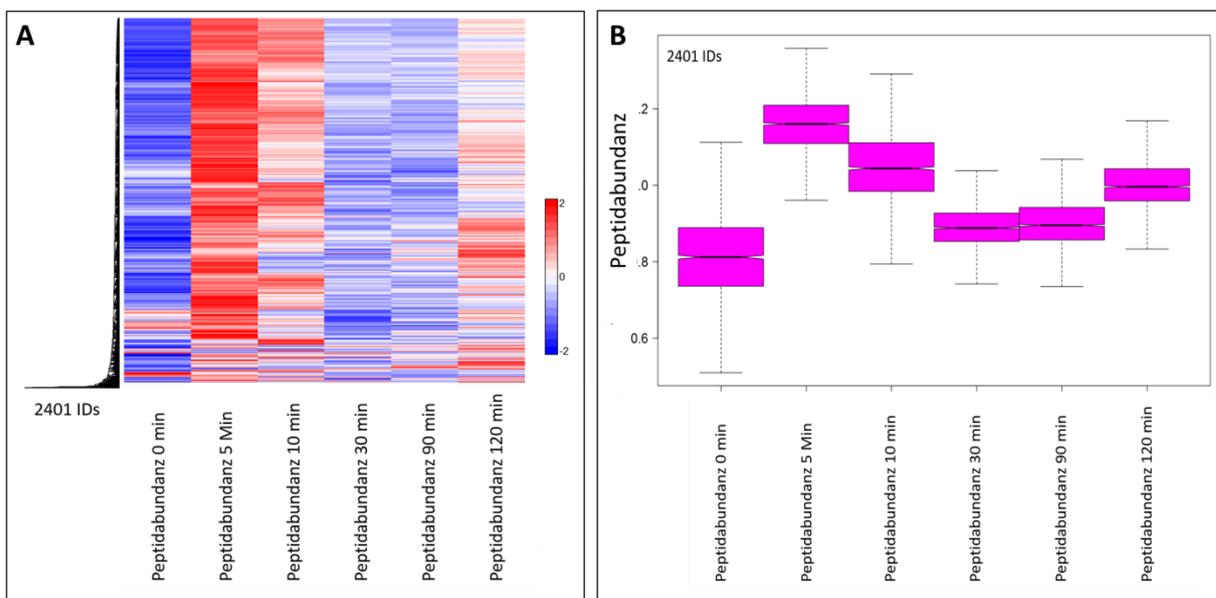


Abb.4.3.5.: Visualisierung der Quantifizierungsergebnisse. (A) Die quantifizierten Peptidabundanzen innerhalb aller 6 Proben nach Stimulation mit Antimycin A (0-120 Min.) wurde mittels Inferno Software als Heatmap dargestellt. Die Farbskala spiegelt dabei die in den Einzelproben auftretende Peptidabundanz wider, wobei blau herunterregulierte Peptide markiert, weiß dem Mittelwert entsprechende Werte darstellt und rot eine Hochregulierung symbolisiert. (B) Das mittels Inferno erstellte Boxplot Diagramm zeigt die Verteilung der quantifizierten Werte innerhalb der verschiedenen Proben.

Auffällig ist dabei, dass sich nach 5 und 10 Min. Stimulation die Peptidabundanz deutlich erhöht, was dafür spricht, dass hier Disulfidpeptide nachgewiesen wurden, die in anderen Proben weniger häufig auftraten. Diese sprunghafte Erhöhung relaxiert sich in den nachfolgenden Proben bei 30 und 90 Min. Stimulation, wobei nach 120 Min. wieder vereinzelt Peptidabundanzen erhöht vorliegen. Diese Tendenz wird auch im Boxplot Diagramm ersichtlich (Abb.4.3.5. B), welches die Verteilung der quantifizierten Peptidabundanzen innerhalb der jeweiligen Probe graphisch darstellt. Dabei treten die im

Mittel geringsten Werte in der unstimulierten Probe auf und steigen dann nach kurzer Stimulationsdauer (5 Min.) sprunghaft an, so dass hier davon ausgegangen werden kann, dass disulfidverbrückte Peptide mit einer höheren Abundanz nach einsetzender Stimulation mit Antimycin A auftreten. Durch die Inhibition des Komplex III der Atmungskette in Mitochondrien kommt es zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies, die freie Thiole an Proteinen oxidieren können. Generell sind in der Zelle verschiedene Systeme zur Bekämpfung von oxidativen Stress aktiv. Dabei können spezielle redox-sensitive Proteine wie beispielsweise Glutathion oder Thioredoxin an oxidierte Proteine binden und vorhandene Disulfidbrücken reduzieren (siehe auch Abschnitt 5.3.). Dennoch können beide Systeme durch eine zu hohe Konzentration an ROS blockiert werden, so dass ein sprunghafter Anstieg der Disulfidbrückenbildung zu beobachten ist. Bei längeren Stimulationszeiträumen (10-90 Min.) sinken die durchschnittlichen Peptidabundanzen wieder ab, so dass hier vermutlich kompensatorische Prozesse aktiviert werden, die das Auftreten von Disulfidbrücken langsam wieder dem Normalniveau annähern. Nach 120 Min. andauernder Stimulation zeigte sich erneut ein leichter Anstieg der Peptidabundanzen (siehe Abb.4.3.5. B), was dafür sprechen könnte, dass der andauernde oxidative Stress für die Zelle zu hoch ist, so dass auch gegensteuernde Maßnahmen der Zelle nicht ausreichen, um die weitere Thioloxidation zu verhindern. Besonders deutlich zeigte sich dies bei den redoxsensitiven Proteinen wie Thioredoxin, Thioredoxin-Reduktase, Glutaredoxin, Glutathion-Reduktase oder auch Peroxiredoxin, bei denen nach Beginn der Stimulation übereinstimmend eine zunehmende Disulfidbrückenbildung beobachtet werden konnte, die über die Zeit wieder abnahm und schließlich nach 120 Min. Behandlungsdauer wieder sprunghaft anstieg. Dies spiegelt vermutlich die Kapazitätsgrenze des zellulären Schutzsystems wider, in das all diese Proteine involviert sind (vgl. Abb.5.3.1.). Dabei werden durch ROS fälschlicherweise oxidierte Proteine zunächst durch Thio-/ oder Glutaredoxin in ihre physiologische Form revertiert. Dauert die Stimulation jedoch bis zu 120 Min., können diese reduzierenden Enzyme nicht mehr recycelt werden, da die eigentlich als Elektronenakzeptoren dienenden Proteine (Thioredoxin-/ und Glutathion-Reduktase) wiederum selbst vermehrt oxidiert vorliegen, so dass der Oxidationsschutz der Zelle zum Erliegen kommt.

4.4. ANREICHERUNG UBIQUITINYLIERTER PEPTIDE

Der Einsatz der in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Methoden hatte zum Ziel ubiquitinierte Peptide aus komplexen Peptidgemischen anzureichern. Dabei wurde eine etablierte

Immunaффinitäts-basierte Methode mit einer neu aufzusetzenden ChaFRADIC-Methode verglichen. Da alle beschriebenen Experimente und deren Resultate in Relation zu setzen sind, bietet sich hier die gemeinsame Darstellung der Ergebnisse in einem Kapitel an.

Durch Einsatz von 20 mg Peptid für die Anreicherung mit Hilfe des PTMScan Ubiquitin Remnant Motif Kits konnten insgesamt 8,431 ubiquitinierte Peptide bei 11,612 Gesamtidentifikationen, so dass sich für diese Methode eine Spezifität von 73% ergab. Dieses Ergebnis sollte im Nachfolgenden als Vergleichswert dienen, um die mittels ChaFRADIC erzielten Ergebnisse zu beurteilen. Dabei wurde zunächst überprüft, in wie fern sich der theoretisch erstellte Versuchsablauf bei der Bearbeitung einer reellen Probe als plausibel und funktionell herausstellt. Dazu wurden aus 10 mg derselben Ausgangsprobe ebenfalls anhand des PTMScan Kits ubiquitinierte Peptide isoliert und das Eluat anschließend chromatographisch mittels ChaFRADIC aufgearbeitet. Hierbei handelte es sich um ein Vorexperiment, das zeigen sollte, ob die Ubiquitin-Peptide in den zu erwartenden Fraktionen eluieren. In der ersten SCX-Dimension zeigte sich im Chromatogramm, dass nahezu die gesamte Probe ausschließlich im erwarteten Zeitfenster eluierte. Dabei handelte es sich, wie vermutet, um den chromatographischen Bereich, in dem hochgeladene Peptide mit einer Nettoladung größer oder gleich +3 eluieren sollten. Alle gesammelten Fraktionen der ersten Dimension wurden zusätzlich mittels LC-MS auf Vorhandensein von Ubiquitin-Peptiden überprüft. Die Ergebnisse wurden in Tab.4.4.1. zusammengefasst.

Tab.4.4.1.: Identifizierte PSMs der ersten SCX-Dimension der ChaFRADIC-Anreicherung für ubiquitinierte Peptide.

<i>Fraktion</i>	Ubq-Peptide (PSMs)	Nicht-Ubq-Peptide (PSMs)
<i>FT</i>	9	0
<i>+1</i>	0	4
<i>+2</i>	3	22
<i>Übergang +2/+3</i>	54	1
<i>Hauptfraktion +3/+4/+5</i>	117	1

Generell zeigte sich, dass die meisten Ubiquitin-Peptide in der höher geladenen Hauptfraktion +3/+4/+5 nachgewiesen werden konnten, einige weitere konnten zudem in der Übergangsfraction +2/+3 identifiziert werden. In den Fraktionen FT, +1 und +2 wurden hingegen deutlich weniger oder keine Ubq-Peptide nachgewiesen. Alle in der +2-Fraction gefundenen PSMs stammten vom selben Peptid ¹⁸⁸AQLGGPEAAk_(GlyGly)SDETAk_(D3Ac)²⁰⁵ des Heatshockproteins Beta-1 (P04792). Obwohl es sich um ein ubiquitiniertes Peptid

handelt, weicht es von den im ChaFRADIC üblicherweise generierten Peptidspezies ab, da es mit einem Lysin endet, wobei es sich jedoch nicht um eine Schnittstelle handelt, sondern um den acetylierten C-Terminus des Proteins. Daher besitzt dieses Peptid einen Ladungszustand von +2 und eluiert früher als die üblicherweise generierten Ubq-Peptide. Ferner wurde im FT das ubiquitinierte Peptid $^{43}\text{LIFAGk}_{(\text{GlyGly})}\text{QLEDGR}^{54}$ nachgewiesen, wobei es sich um PSMs der Ubiquitinkette selbst handelt. Dies ist in Anreicherungsexperimenten von ubiquitinierten Peptiden das am häufigsten nachweisbare Peptid, da es durch den Verdau der an Proteinen angehängten Mono-/ und Polyubiquitinketten freigesetzt wird und anschließend wie andere ubiquitinierte Peptide über die jeweilige Methode angereichert wird. Durch seine extreme Häufigkeit und möglicherweise auftretende Memory-Effekte kann dieses Peptid auch in anderen Fraktionen gefunden werden, in denen es regulär nicht eluieren würde. Es handelt sich vermutlich um Überladungseffekte oder kann gerade am Anfang einer chromatographischen Auftrennung auf Grund einer nicht optimalen Bindung der Probe an das Säulenmaterial auftreten. Zusammenfassend kann also davon ausgegangen werden, dass die erste SCX-Dimension für eine „Vorfraktionierung“ von ubiquitinierten Peptiden geeignet ist, da der Großteil der anzureichernden Ubiquitin-Peptide in der erwarteten Fraktion eluiert. Essentiell für den Erfolg der ChaFRADIC-Methode ist jedoch besonders der induzierte Ladungsshift, so dass die Ubq-Peptide aus der +3/+4/+5-Fraktion nach erfolgter Acetylierung in der zweiten Dimension in der +1-Fraktion eluieren sollten. Dies wurde durch Analyse dieser angereicherten Fraktion (+1 in der zweiten Dimension) überprüft und führte zur Identifikation von 803 ubiquitinierten Peptiden, wobei nur drei nicht-ubiquitinierte Peptide gefunden wurden. Generell lässt sich dieses Ergebnis nur bedingt mit dem erhaltenen Resultat der Immunpräzipitation (IP) des vorangegangenen Experimentes vergleichen. Zum einen wurden unterschiedliche Mengen verwendet (20 mg für IP und 10 mg für IP + ChaFRADIC), zum anderen unterscheiden sich die Peptidcharakteristika auf Grund des speziellen ChaFRADIC-Aufbaus in Bezug auf vorhandene Acetylierung und Verdauspezifität. Grundsätzlich können daher nur die Positionen der gefundenen ubiquitinierten Lysine verglichen werden (z.B. P42766 Ubq an Position 66), was zu einer Übereinstimmung von 3,2% führte (siehe Abb.4.4.1.). Auffällig war zudem, dass ein Anteil von etwa 7% nicht durch die IP abgedeckt werden konnte, was darauf schließen lässt, dass beide Methoden auf unterschiedliche Peptidpopulation abzielen. Obwohl die IP in diesem Experiment weitaus bessere Ergebnisse zu liefern scheint, ist zu berücksichtigen, dass der experimentelle Aufbau nicht dem beabsichtigten ChaFRADIC-Ablauf entsprach und es an dieser Stelle um die generelle Überprüfung des Elutionsverhaltens ging. Es empfahl sich daher, trotzdem die

Anwendung des ChaFRADIC auf eine reelle Probe durchzuführen und auch diese Ergebnisse in die endgültige Beurteilung mit einfließen zu lassen.

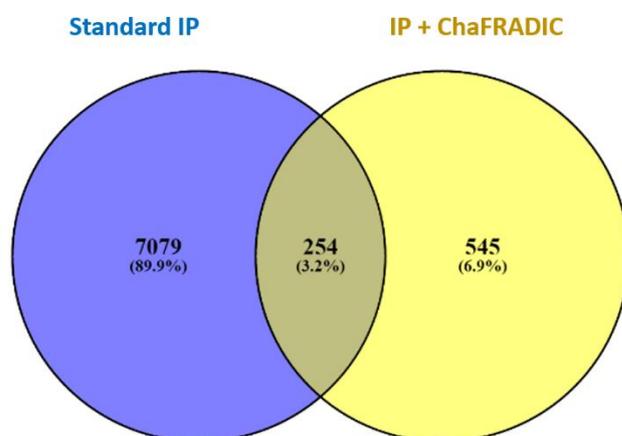


Abb.4.4.1.: Übereinstimmung der identifizierten Ubq-Peptide nach Immunpräzipitation (IP) und kombinierter IP mit ChaFRADIC.

Generell zeigte sich, dass die anzureichernden Ubiquitin-Peptide in beiden Dimensionen in den erwarteten Fraktionen eluierten und somit der ChaFRADIC-Ansatz grundsätzlich auch zur Anreicherung von ubiquitinierten Peptiden verwendet kann. Im nächsten Schritt sollte nun die Anwendung der Methode auf komplexe Probe überprüft werden. Dazu wurde ebenfalls dieselbe Ausgangsprobe verwendet, wobei mit Hilfe des zwei-dimensionalen ChaFRADIC-Ansatzes ubiquitinierte Peptide aus verschiedenen Probenmengen (20, 200 und 1000 µg Peptid) angereichert wurden. Die Ergebnisse wurden in Tab.4.4.2. zusammengefasst.

Tab.4.4.2.: Übersicht der identifizierten Ubq-Peptide mittels ChaFRADIC bei Einsatz unterschiedlicher Probenmengen.

	Ubq-Peptide	Nicht-Ubq-Peptide	Spezifität in %
20 µg	5	125	4%
200 µg	35	581	6%
1000 µg	53	988	5,4%

Es zeigte sich, dass mit mehr eingesetztem Material auch mehr ubiquitinierte Peptide angereichert werden können, jedoch nimmt damit auch die Kontamination durch nicht-Ubiquitin-Peptide drastisch zu. Insgesamt lässt sich durch Einsatz von mehr Ausgangsmaterial die Spezifität geringfügig steigern (von 4 auf etwa 6%), wobei diese für eine Anreicherungstechnik extrem gering ist und zudem die Detektion der Ubq-Peptide durch das Vorhandensein sehr vieler nicht gewünschter Peptide erschwert wird. Auffällig ist dabei, dass in allen drei Proben ein großer Anteil dieser co-eluierten Peptide einen Ladungszustand

von +1 aufweist, dieser macht beispielsweise in der angereicherten +1-Fraktion bei 200 µg eingesetztem Peptid einen Anteil von 75% aus (vgl. Abb.4.4.2.).

Zusammensetzung der co-eluierten, nicht-Ubq-Peptide

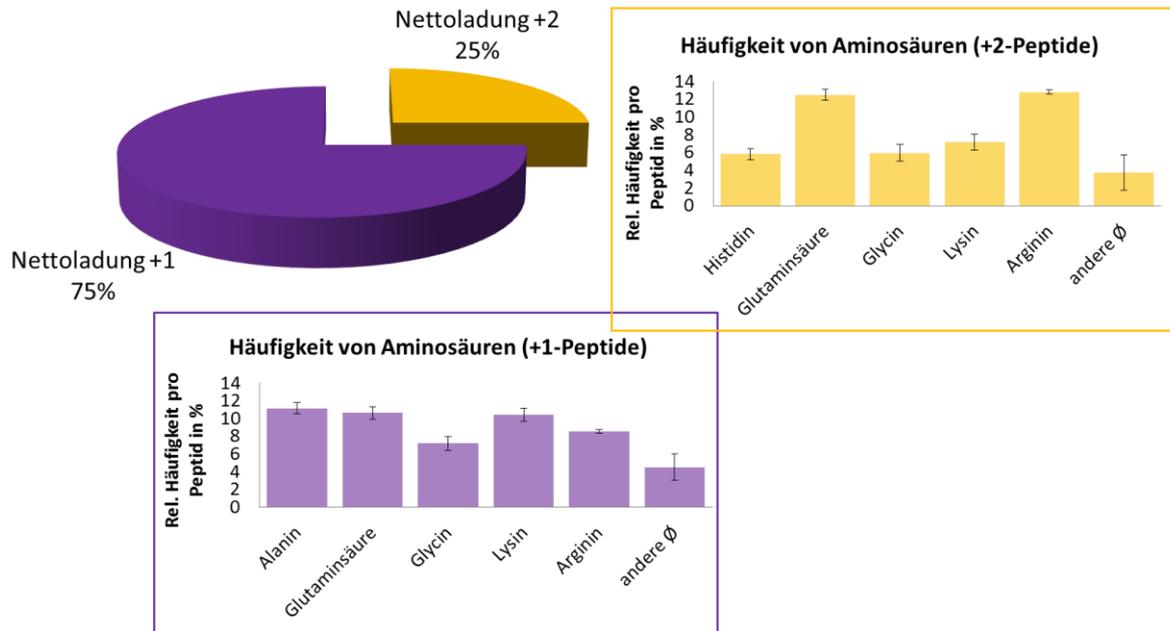
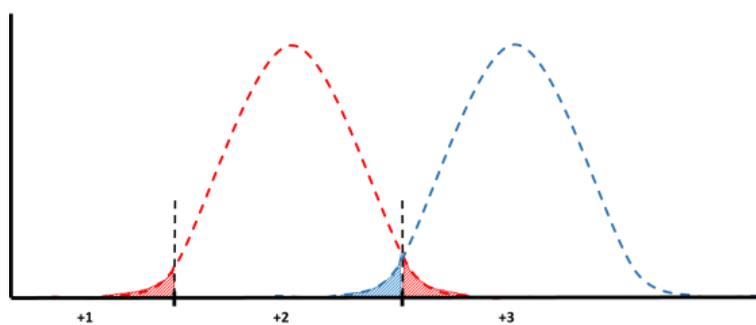


Abb.4.4.2.: Zusammensetzung der co-eluierten, nicht ubiquitinierten Peptide in der angereicherten +1-Fraktion aus 200 µg Peptid. Die unerwünschten Peptidkontaminationen teilen sich in ein- und zweifach positive geladene Peptidpopulationen auf, die jeweils ein vermehrtes Auftreten bestimmter Aminosäuren (wie z.B. Glutaminsäure und Leucin/Isoleucin) zeigen.

Anhand des Acetylierungsmusters lässt sich hierbei feststellen, dass die jeweiligen Peptide in der ersten Dimension einen Ladungszustand von +2 gehabt hätten und es somit bereits dort zu keiner exakten Ladungstrennung gekommen ist, was in der zweiten Dimension dann zu der beobachteten hohen Kontaminationsrate führt. Möglicherweise führt die initiale Acetylierung bei Peptiden mit einem hohen Anteil an hydrophoben (Ala, Ile, Leu) und sauren Aminosäuren (Glu) zu einem verspäteten Elutionsverhalten im SCX, da fast alle co-eluierten Peptide ein oder mehrere dieser Aminosäuren in ihrer Sequenz aufweisen. Ähnliche Zusammenhänge lassen sich auch bei den zweifach positiven Peptiden erkennen, die ein Anteil von 25% bei den co-eluierten Peptiden ausmachen (vgl. Abb.4.4.2.). Diese eluieren in der ersten Dimension wie erwartet als +3-Peptide, werden dann jedoch in der zweiten Dimension nach erneuter Acetylierung nicht ausreichend lange retardiert und eluieren bereits in der +1-Fraktion. Fraglich ist hier, ob ein hydrophober Effekt auf Grund der Acetylierung oder der vorhandenen Aminosäuren Leucin/Isoleucin eine Rolle spielt oder das Histidin, als schwach basische Aminosäure, in Kombination mit Glutaminsäure nicht als zweiter Ladungsträger im Peptid ausreicht, um in der SCX-Auftrennung ausreichend lange retardiert zu werden.

Zusätzlich ist zu bedenken, dass der Elutionsprozess generell einer Gaußschen Verteilung folgt, so dass eine Fraktion nie zu 100% aus Peptiden eines einzelnen Ladungszustandes besteht. Im Fall der Ubiquitin-Anreicherung könnte dieser normalerweise geringe Anteil an Kontaminationspeptiden allerdings dazu führen, dass er mengenmäßig die sehr niedrig abundanten Ubiquitinpeptide überlagert und somit zu einer erschwerten Identifikation der Ubiquitin-Peptide bzw. einer erhöhten Detektion der nicht-Ubq-Peptide führt.

Der Grund für die geringe Anzahl an identifizierten Ubiquitin-Peptiden besteht also in der hohen



Kontaminationsrate durch Peptide, die in der ersten oder zweiten Dimension ein unerwartetes Elutionsverhalten zeigen und möglicherweise auf Grund der speziellen Aminosäurezusammensetzung zu einer nicht exakten Ladungstrennung führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien verfolgt, um die Resultate der Methode zu verbessern, in Anbetracht der erzielten Ergebnisse werden diese allerdings hier nicht gezeigt. So wurde beispielsweise geprüft in wie weit eine reduzierte Probenkomplexität in der ersten Dimension die Ladungstrennung verbessert. Wie auch die oben beschriebenen Ergebnisse unterstreichen, führt der Einsatz von weniger Probematerial jedoch nicht zu einer Erhöhung der Spezifität, gleichzeitig werden auch weniger Peptide identifiziert, so dass dies keine Verbesserung der Methode darstellt. Weitere Ideen waren z.B. eine größere Probemenge (200 µg) in drei separaten Läufen aufzutrennen (jeweils 66 µg) und die gesammelten +3/+4/+5-Fractionen zu vereinigen, um somit die Probenkomplexität pro Lauf bei gleichbleibender Gesamtprobenmenge zu reduzieren. Auch geänderte Fraktionierungsschemata, die kleinere Elutionsfenster beinhalteten oder nur einen einzelnen Ladungszustand isolierten, wurden in Hinblick auf Verbesserung der Resultate geprüft. Insgesamt führte jedoch keine dieser Strategien zu einem Erfolg, so dass die Entwicklung einer ChaFRADIC-Anreicherung für ubiquitinierte Peptide zum Abschlusszeitpunkt dieser Arbeit als vorerst nicht erfolgversprechend bewertet wurde.

Der große Vorteil einer ChaFRADIC-basierten Anreicherung lag in den vergleichsweise minimalen Mengen, so dass statt 20 mg nur noch 200 – 1000 µg Peptide hätten eingesetzt werden müssen. Da auf Grund der oben beschriebenen Limitierungen die Etablierung eines

solchen Ansatzes in der vorgegebenen Zeit nicht durchgesetzt werden konnte, war jedoch zumindest eine Verbesserung des Immunaффinitäts-basierten Verfahrens erstrebenswert. Daher wurde das bestehende Protokoll des Herstellers zur Anreicherung von ubiquitinierten Peptiden mit Hilfe des PTMScan Kits (Stand Januar 2012) durch Optimierung einiger Arbeitsschritte verbessert und die Anwendung auch für deutlich geringere Probenmengen ermöglicht. Beispielsweise warnte der Hersteller ausdrücklich vor der Entnahme einer Teilmenge aus der Antikörper-Bead-Suspension sowie vor dem Aliquotieren, wodurch auch die Anwendung auf kleinere Peptidmengen ausgeschlossen wird bzw. für geringe Probenmengen die gesamte Suspension benutzt werden müsste. Um diese schwerwiegende Limitierung zu umgehen, wurde eine angepasste Pipettenspitze verwendet, die über eine größere Öffnung verfügt und es somit erlaubt, den Antikörper-Bead-Komplex bei Entnahme möglichst geringen Scherkräften auszusetzen. Weiterhin wurde diese Suspension vor Verwendung gewaschen, um den zur optimalen Lagerung benötigten Glycerol-Puffer möglichst effektiv auszuwaschen. Dies hat bei verkleinerten Probenmengen und den daraus resultierenden kleineren Volumina den Vorteil, dass Aufkonzentrierung von unerwünschten Substanzen verhindert wird. Zusätzlich wurden auch einige Arbeitsschritte des bestehenden Protokolls verändert, die nicht in direktem Zusammenhang mit der eingesetzten Probenmenge standen, jedoch die Bindung des Antikörper-Bead-Komplexes an das entsprechende Zielpeptid unterstützen sollte. Beispielsweise wurde die Inkubationsdauer auf 4 h verlängert, um eine optimale Bindung zu erreichen. Der eingesetzte Puffer enthielt Detergenzien und reduziert damit unspezifische Bindungen, wobei dieser nur auf Nachfrage beim Hersteller erhältlich ist und der standardmäßig mitgelieferte Inkubationspuffer des Kits keine Detergenzien enthält. Bei der Verwendung sollte darauf geachtet werden, unnötige Schaumbildung zu vermeiden, da diese zu Denaturierung und Probenverlusten beitragen kann. Durch Anwendung dieses Protokolls auf verschiedene HeLa-Proben bei Einsatz von jeweils 1 mg Peptid zur Immunpräzipitation wurden die in Abb.4.4.3. dargestellten Ergebnisse erzielt. Dabei werden die erzielten Ergebnisse aus einer IP mit 20 mg Material mit den optimierten IPs unter Verwendung von nur 1 mg Peptid verglichen. Auffällig ist, dass die Anzahl der identifizierten Peptide sich nicht proportional zum eingesetzten Material vermindert. Obwohl 20-mal weniger Material eingesetzt wurde, konnten dennoch in den mit MG-132 inhibierten Proben über 3000 ubiquitinierte Peptide identifiziert werden, was etwa 40% der zuvor erzielten Anzahl entspricht. Zudem ändert sich auch die Spezifität der Methode nur unwesentlich in den behandelten Proben und ist zudem auch zwischen den

beiden Proben nahezu identisch, obwohl eine in einem anderen Labor vorbereitet wurde und als Vergleichsprobe aus einem Fremdlabor diente.

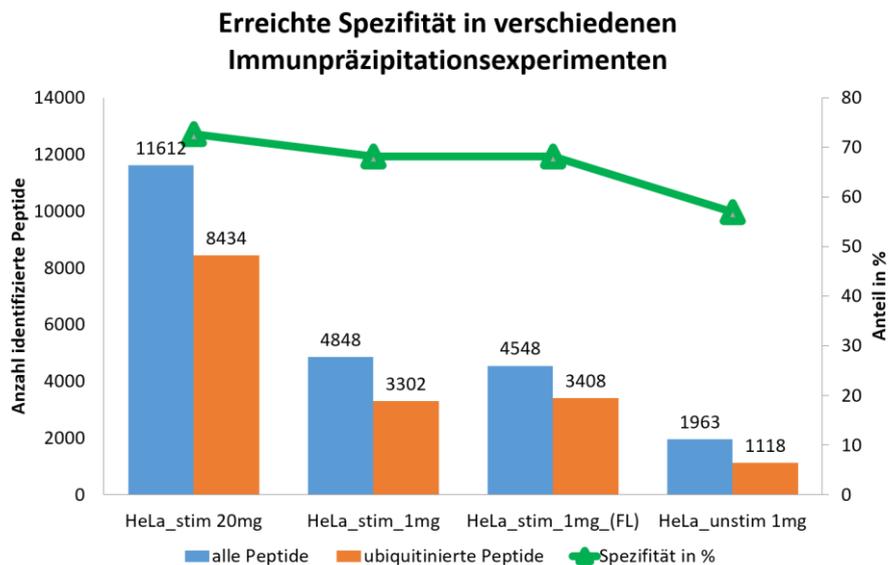


Abb.4.4.3.: Erreichte Spezifität in Immunpräzipitationsexperimenten. Es wurden die Ergebnisse, die unter Einsatz von 20 mg Probenmaterial erzielt wurden mit denjenigen verglichen, bei denen nur 1 mg Peptid eingesetzt wurde. Es wurden dazu HeLa-Proben verwendet, die selbst angezogen wurden (HeLa_stim_1mg; HeLa_unstim_1mg) sowie eine Probe, die in einem fremden Labor (HeLa_stim_1mg_(FL)) hergestellt wurde. stim: MG-132 stimuliert bzw. Proteasom-inhibiert; unstim: nicht mit MG-132 behandelt.

Auch die Anwendung auf eine unbehandelte Probe wurde in diesem Experiment geprüft, wobei die Anzahl an identifizierten, ubiquitinierten Peptiden deutlich geringer ist als in den Vergleichsproben. Die fehlende Inhibition des Proteasoms beschleunigt den Abbau von ubiquitinierten Proteinen, so dass vermutlich weniger Proteine für die Methode zugänglich sind. Insgesamt zeigte sich, dass auch unter Verwendung von deutlich weniger Material eine ausreichende Anzahl an ubiquitinierten Peptiden identifiziert werden können und die Methode zudem reproduzierbar auch bei unterschiedlichen Proben durchgeführt werden kann. Selbst in einer Probe, in der der proteasomale Abbau von ubiquitinierten Proteinen nicht inhibiert und somit eine geringere Anzahl an identifizierten Peptiden zu erwarten ist, kann dennoch ein vergleichsweise gutes Ergebnis erzielt werden.

4.5. ANWENDUNG DER ETABLIERTEN METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER WECHSELWIRKUNG POST-TRANSLATIONALER MODIFIKATIONEN

Die im Abschnitt 4.1. bis 4.4. etablierten Methoden sollten abschließend auf ihr Potential zur Charakterisierung der Wechselwirkung von post-translationalen Modifikationen überprüft werden. Im Allgemeinen werden Anreicherungsverfahren in der Proteomik dazu verwendet,

bestimmte Peptidspezies (z.B. ubiquitinierte Peptide) aus einem komplexen Peptidgemisch zu isolieren und so nach massenspektrometrischer Analyse Informationen über die korrespondierenden Proteine zu erhalten. Werden beispielsweise in Tumorgewebe bestimmte ubiquitinierte Proteine nachgewiesen, welche in gesundem Gewebe nicht detektierbar sind, könnte daraus der Rückschluss gezogen werden, dass jene ubiquitinierten Proteine an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. Dies stellt jedoch, genau wie die globale Proteomanalyse, nur eine Momentaufnahme dar und spiegelt zudem nur ein spezielles Subproteom (in diesem Fall die ubiquitinierten Proteine) wider. Unklar bleibt in diesem Fall, in wie weit andere Modifikationen die Krankheitsentstehung begünstigt oder ausgelöst haben, so dass die Ubiquitinierung bestimmter Proteine nur als Folge einer anderen Modifikation zu sehen wäre. Diese gegenseitige Beeinflussung von PTMs konnte bereits nachgewiesen werden und wird als PTM-Crosstalk bezeichnet (vgl. Abschnitt 1.2.). Darunter versteht man, dass das Vorhandensein einer ersten Modifikation das Auftreten einer zweiten Modifikation positiv oder negativ beeinflussen kann. Um demnach ein möglichst umfassendes Bild der zellulären Abläufe zu erhalten, wäre es sehr viel interessanter verschiedene Anreicherungstechniken miteinander zu verbinden, um somit Informationen über das globale Proteom mit dem Auftreten verschiedener Proteinmodifikationen miteinander in Relation zu setzen. Dies könnte Aufschluss darüber geben, in wie weit sich die generelle Proteinabundanz (globales Proteom) verändert und insbesondere, ob bestimmte PTMs häufig zusammen auftreten (positiver Crosstalk) oder um dieselbe Bindestelle konkurrieren und sich möglicherweise aktiv inhibieren (negativer Crosstalk).

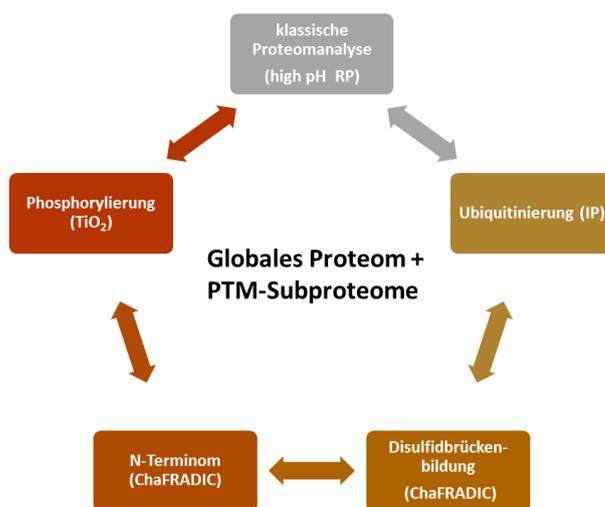
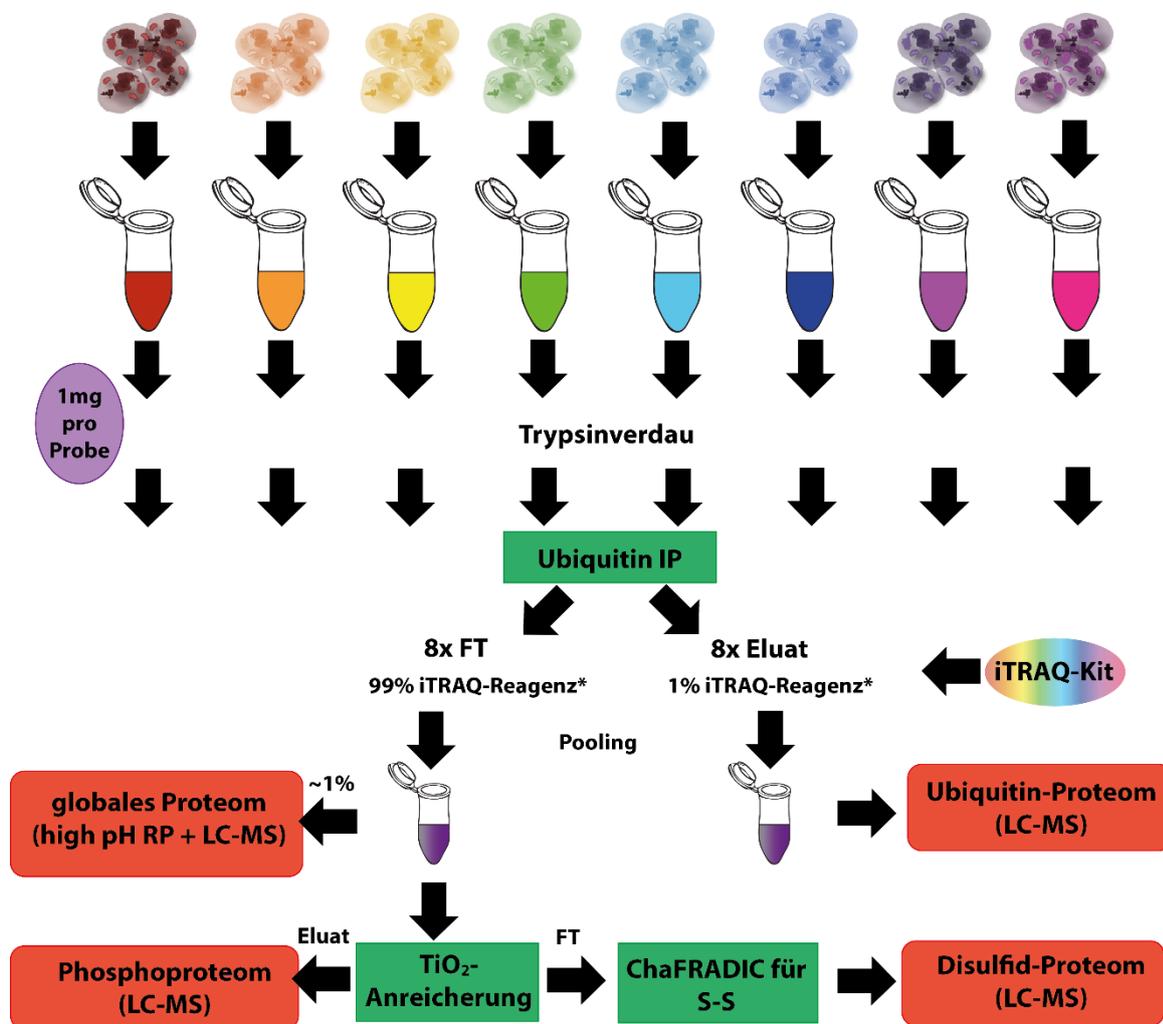


Abb.4.5.1.: Kombination verschiedener Anreicherungstechniken zur umfassenden Proteomanalyse.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden könnten in Kombination mit anderen bereits bestehenden Methoden dazu eingesetzt werden, um Proteome umfassend in Bezug auf diese Parameter zu charakterisieren und somit völlig neue Zusammenhänge aufzudecken. In Abb.4.5.1. wurde eine mögliche Kombination aus den ChaFRADIC-Techniken zur Anreicherung von N-terminalen und Disulfid-verbrückten Peptiden, dem optimierten IP-Protokoll für ubiquitinierte Peptide sowie weiteren bereits bestehenden Methoden zur Phospho-/ und globalen Proteomanalyse dargestellt. Je nach biologischer Fragestellung und experimentellen Gegebenheiten könnten solche Kombinationen variiert und durch andere Methoden ersetzt oder erweitert werden. Ein möglicher experimenteller Ablauf wird in Abb.4.5.2. schematisch dargestellt.



* Erfahrungswerte

Abb.4.5.2.: Experimentelles Design zur Kombination der globalen Proteomanalyse mit Methoden zur Anreicherung von ubiquitinierten, phosphorylierten und Disulfid-verbrückten Peptiden.

Dabei werden die Proteine zunächst aus verschiedenen Zellzuständen extrahiert und anschließend proteolytisch verdaut. Danach erfolgt die Anreicherung ubiquitiniertes Peptide separat aus jeder einzelnen Probe, wobei sich hier der Einsatz des optimierten IP-Protokolls unter Verwendung von nur 1 mg Startmaterial als besonders vorteilhaft erweist. Dies resultiert in acht Eluat, die die ubiquitinierten Peptide enthalten, und acht Durchflussfraktionen (FTs), die die restlichen aus dem Proteom generierten Peptide enthalten. Die korrespondierenden Fraktionen werden unter Einsatz eines iTRAQ-Kits einzeln markiert und können danach zu jeweils einer Probe vereinigt werden (Pooling). Anschließend können die in dem Eluat befindlichen ubiquitinierten Peptide mittels LC-MS analysiert und über die entstehenden iTRAQ-Reporterionen auch quantifiziert werden. Etwa 1% der vereinigten Durchflussfraktionen wird zunächst für die globale Proteomanalyse bei vorgeschalteter high-pH-RP (Umkehrphasenchromatographie bei pH 8) verwendet, der Hauptteil der Probe jedoch für weitere Anreicherungen. So werden beispielsweise vorhandene Phosphopeptide aus der verbleibenden Probe abgereichert und der Durchfluss wiederum zur finalen ChaFRADIC-Anreicherung von Disulfid-verbrückten Peptiden aufgewendet. Durch die vorangegangene Markierung mittels iTRAQ kann über jedes der erhaltenen Subproteome auch eine quantitative Aussage gemacht werden und die Abundanz einzelner Peptide über die verschiedenen Zellzustände hinweg verglichen werden. Die Kombination der einzelnen Methoden und die experimentelle Verschachtelung erlaubt hierbei die Analyse verschiedener Subproteome aus acht unterschiedlichen Proben innerhalb desselben Experimentes, die üblicherweise separat durchgeführt werden würden. Generell kann ein solches Experiment auch verschiedenfach erweitert werden, z.B. durch den Einsatz eines Antikörpers, der spezifisch Peptide mit einem acetylierten Lysin bindet, oder andere chromatographische Anreicherungstechniken. Durch den Einsatz der iTRAQ-Markierung auf Peptidebene ist eine gleichzeitige Kombination mit ChaFRADIC für N-terminale Peptide im oben dargestellten Experiment nicht sinnvoll, da dafür alle Proben auf Proteinebene ebenfalls mit iTRAQ markiert werden müssten und es somit zu Interferenzen und verfälschten Quantifizierungsergebnissen kommen würde. Steht jedoch nicht die Anzahl der zu quantifizierenden Proben im Vordergrund, so ist auch die Analyse des N-Terminoms integrierbar. Der Unterschied besteht hier in einer Variation der Quantifizierungsmethode, die auf SILAC (engl.: *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) basiert, so dass synthetisierte Proteine aus zwei Zellzuständen auf Grund der enthaltenen „leichten“ und „schweren“ Aminosäuren unterscheidbar sind (vgl. Abb.4.5.3.). Die anschließende Dimethylierung ist dabei nur zur Induktion des späteren Ladungsshifts im ChaFRADIC zur

Anreicherung N-terminaler Peptide notwendig und wird nicht als Quantifizierungsmethode eingesetzt. Nach dem proteolytischen Verdau wird ähnlich vorgegangen wie im vorherigen Experiment, jedoch kann nun, nach durchgeführter Anreicherung ubiquitiniertes und phosphorylierter Peptide, der Durchfluss auch zur Isolation N-terminaler Peptide verwendet werden. Hierbei werden zusätzlich die zwei ChaFRADIC-Experimente verschachtelt und in der ersten Dimension nur die Fraktionen +1/+2/+3 zur Anreicherung N-terminaler Peptide verwendet, die Fraktionen +4/+5 hingegen zur Analyse des Disulfidproteoms. Die Quantifizierung erfolgt bei allen Subproteomen über die Stabilisotopen-markierten Aminosäuren, zusätzlich ist auch hier eine globale Proteomanalyse möglich.

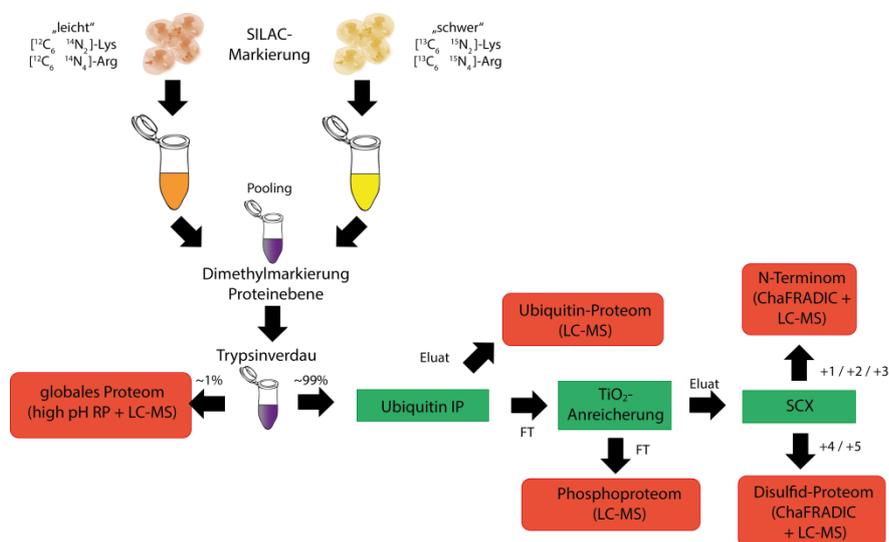


Abb.4.5.3.: Experimentelles Design zur Kombination der globalen Proteomanalyse mit Methoden zur Anreicherung von ubiquitinierten, phosphorylierten, N-terminalen und Disulfid-verbrückten Peptiden.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden zeigen auf Grund der verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten und der vielfältigen Variationen ein enormes Potential für die Massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse. Insbesondere im Hinblick auf die Charakterisierung verschiedener PTMs und deren möglichen Wechselwirkungen werden hier neuartige Methoden erstmals kombiniert. So gibt es zwar verschiedene Studien, die PTM-Subproteome beispielsweise durch serielle Antikörper-basierte Anreicherungen charakterisieren [192], jedoch sind keine Methoden bekannt, die gleichzeitig auch auf N-terminale Peptide abzielen oder Disulfidpositionen kartieren können. Das ChaFRADIC stellt dabei eine sensitive und für manche PTMs, wie z.B. für Disulfid-verbrückte Peptide, eine exklusive Methode dar. Ebenso werden die hier dargestellten Experimente durch das optimierte IP-Protokoll wesentlich kosteneffizienter und nur durch den geringen

Materialeinsatz überhaupt realisierbar. Unter Berücksichtigung des generellen Entwicklungspotentials des ChaFRADIC, das auch zur Anwendung auf andere PTM-Spezies genutzt werden könnte, ergeben sich hier durch die neu etablierten Methoden viele Möglichkeiten zur umfassenden (Sub-)Proteomanalyse, die viele neue Erkenntnisse über zelluläre Zusammenhänge und sich gegenseitig beeinflussende Modifikationen liefern könnte [193].

5 DISKUSSION

5.1. OPTIMIERUNG SCX-AUFTRENNUNG

Um einen zwei-dimensionalen ChaFRADIC-Ansatz unter Verwendung eines Kationenaustauschers zu etablieren, musste zunächst die präzise Auftrennung eines komplexen Peptidgemisches nach definierten Ladungszuständen gewährleistet werden. Dies konnte durch die gezielte Optimierung des Gradienten in Kombination mit den jeweils leicht veränderten Puffern sowohl für den initialen ChaFRADIC-Ansatz als auch für das erweiterte ChaFRADIC erreicht werden. Grundsätzlich ist eine reproduzierbare Auftrennung sowohl zwischen Einzelläufen als auch über die Zeit essentiell, so dass die Effizienz durch Einsatz von Standards regelmäßig überprüft werden sollte. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit durch Auftrennung dergleichen, komplexen Standard-Probe (verdautes Blutplättchen-Lysat) in regelmäßigen Abständen erfolgt. Weiterhin konnte auch eine reproduzierbare Auftrennung von reinjizierten Fraktionen sichergestellt werden, so dass die grundsätzlichen Voraussetzungen zur Etablierung eines ChaFRADIC-Ansatzes geschaffen wurden. Die Optimierung der Auftrennungseigenschaften anhand veränderter Gradienten oder Anpassung der Fraktionierungsfenster stellte einen wesentlichen Teil dieser Arbeit dar, da sich die Eigenschaften der verwendeten Chromatographiesäulen über die Zeit ändern können. Beispielsweise lassen Bindekapazitäten solcher Säulen mit zunehmender Verwendungsdauer nach, so dass Peptide über die Zeit früher eluieren. Dies hat zur Folge, dass die Fraktionierungszeiten stetig überprüft und bei Bedarf nachjustiert werden müssen. Zudem wurde die initiale Optimierung an einer seit längerer Zeit in Gebrauch befindlichen Säule durchgeführt, so dass nach Einbau einer neuen Säule die Parameter nicht ohne erneute Anpassung übernommen werden konnten. Daher bot es sich zu diesem Zeitpunkt an, die Optimierung mit leicht veränderter Pufferzusammensetzung erneut durchzuführen, um für nachfolgend verwendete (neue) Säulen stets auf diese Parameter zurückgreifen zu können, da insbesondere bei kommerziell erhältlichen Säulen die Auftrennungsleistung im Vorfeld geprüft wird und sich nur unwesentlich unterscheiden sollte.

5.2. N-TERMINALE ANREICHERUNGEN

5.2.1. ANWENDUNG DES INITIALEN CHAFRADICS ZUR ANREICHERUNG N-TERMINALER PEPTIDE AUS SACCHAROMYCES SEREVISIAE

Aus Hefesphäroblasten konnten mit Hilfe des ChaFRADIC-Ansatzes insgesamt 1775 nicht-redundante N-terminale Peptide identifiziert werden. Um eine finale Liste an Protein N-Termini daraus zu generieren, wurden nur diejenigen Peptide berücksichtigt, die eine Startposition innerhalb der ersten 100 Aminosäuren besaßen und nur die jeweils N-terminalste Identifikation wurde miteinbezogen, so dass sich eine Liste von 806 unigenen Protein N-Termini ergab. Dieses Ergebnis wurde mit einer, zum Zeitpunkt der Veröffentlichung, aktuellen Studie von Mommen et al. [128] verglichen, die eine sogenannte phospho-tagging (PTAG) Strategie zur Anreicherung N-terminaler Peptide entwickelt hatten. Dabei werden zunächst Protein N-Termini dimethyliert und später die, durch den proteolytischen Verdau mit drei verschiedenen Proteasen generierten, internen Peptide mit einer Phosphatgruppe derivatisiert. Zur Abtrennung der N-terminalen Peptide bedient man sich der bereits bekannten TiO₂-Chromatographie (siehe auch Abschnitt 1.4.1.), bei der die nun phosphorylierten, internen Peptide aus dem komplexen Gemisch abgereichert werden können, wobei N-terminale Peptide mit dem Durchfluss eluieren. Nach Ausschluss redundanter Peptidhits, die auf Grund von überlesenen Schnittstellen und der Verwendung drei verschiedener Proteasen auftraten, konnten in dieser Studie 547 Protein N-Termini identifiziert werden. Das mit ChaFRADIC erzielte Ergebnis entsprach somit einer Verbesserung von über 32%. Trotz der unterschiedlichen Ansätze belief sich die Überlappung beider Experimente auf insgesamt 229 Proteine (siehe Abb.5.2.1.1.), von denen sich nur 15% in ihrer Startposition unterschieden. Generell besaßen die meisten der gefundenen N-Termini aus dem ChaFRADIC-Datensatz eine Startposition, die einem unprozessierten N-Terminus (Position 1 oder 2) entsprach, was zu erwarten war, da es sich hier um einen Ausschnitt aus dem gesamten Hefeproteom handelt und nicht alle Proteine durch proteolytische Aktivitäten verändert werden. Meist wird nur das initiale Methionin, welches als Startcodon bei der Translation fungiert, abgetrennt, so dass der Großteil der Proteine an Position 2 beginnen sollte, was sich auch in den hier identifizierten N-Termini widerspiegelte (siehe Abb.5.2.1.1.). Dass beide Datensätze dennoch aus einer nicht unerheblichen Zahl an einzigartigen Hits bestehen, lässt sich hauptsächlich dadurch erklären, dass unterschiedliche Verdaubedingungen in beiden Ansätzen gewählt wurden. ChaFRADIC greift auf Trypsin zurück, wobei sich durch die verwendete Markierung eine Arg-C-Spezifität ergibt.

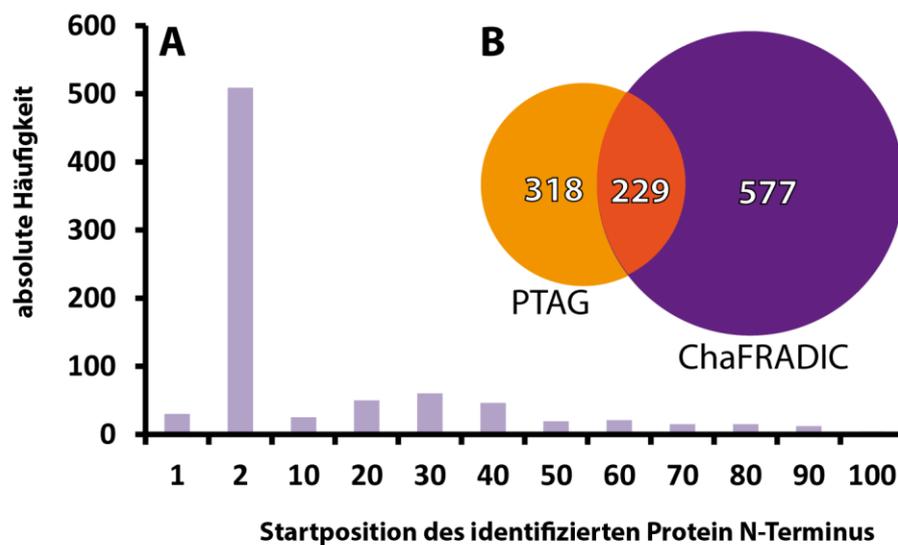


Abb.5.2.1.1.: Übersicht der mittels ChaFRADIC identifizierten Protein N-Termini. (A) Die identifizierten N-terminalen Peptide wurden auf Grund ihrer jeweiligen Startposition innerhalb der gesamten Proteinsequenz in Klassen eingeteilt. Da nach der Translation häufig das initiale Methionin entfernt wird, ist eine Startposition von 2 für den Großteil der Proteine zu erwarten. (B) Der Vergleich der identifizierten Protein N-Termini mit einer anderen Studie, die die PTAG-Strategie nutzte, zeigte eine großflächige Überlappung beider Studien, wobei sich nur 15% (35 von 229) der Proteine in ihrer Startposition unterschieden.

Mommen et al. hingegen benutzen eine Kombination aus Trypsin (ebenfalls Arg-C Spezifität), V8 und Chemotrypsin, die auf Grund der Schnittpräferenzen eher längere Peptide generiert (Median ChaFRADIC: 13 ± 6 Aminosäuren; Median PTAG: 17 ± 6 Aminosäuren), jedoch bei gleichbleibender Anzahl positiv geladener Reste (K, H, R mit einem Median von 2 pro Peptid). Da der Einsatz von mehr als einer Protease grundsätzlich dazu gedacht ist, die Sequenzabdeckung zu erhöhen und auch Peptide zugänglich zu machen, die auf Grund der Verdaubedingungen eigentlich depletiert würden, ist es an dieser Stelle positiv zu bewerten, dass das ChaFRADIC mit nur einer Protease deutlich mehr Peptide anreichern konnte. Zudem hat ChaFRADIC weitere Vorteile verglichen mit der PTAG-Strategie: der Workflow ist insgesamt deutlich weniger aufwendig, da (i) die zeitintensiven Reaktionen wegfallen, (ii) die Verdaubedingungen standardmäßig durchgeführt werden, (iii) generell weniger Startmaterial nötig ist und (iv) zur finalen Identifizierung weniger LC-MS-Messzeit benötigt wird. Dadurch ist der ChaFRADIC- Ansatz sehr zeiteffizient und dennoch deutlich sensitiver, besonders, wenn zusätzlich berücksichtigt wird, dass die Probenkomplexität durch die gewählte Markierungsstrategie verdoppelt wird und N-terminales Pyroglutamat nicht –wie im PTAG-Ansatz – entfernt wurde, was generell zu einem Verlust an einigen Hits führt.

Die finale Liste von 806 N-terminalen Peptidsequenzen wurde schlussendlich gegen eine spezielle Datenbank, die Global Proteome Machine [194], abgeglichen, um die Überschneidung mit Daten vorheriger Studien zu bestimmen. Tatsächlich wurden 60% der mit ChaFRADIC angereicherten N-Termini bereits in anderen globalen Studien identifiziert. Da die meisten Proteomics Ansätze auf der Verwendung von Trypsin basieren, in unserer Strategie der Verdau jedoch eine ArgC-Spezifität aufweist, führte die Umwandlung unserer identifizierten Hits in das jeweilige voll-tryptische Pendant zu einer Gesamtüberschneidung von 75%, was für die Zuverlässigkeit des ChaFRADIC Ansatzes spricht.

Durch die Anreicherung N-terminaler Peptide aus wildtypischen sowie Δ Icp55 Mitochondrien, konnten insgesamt 36 Substrate von Icp55 identifiziert werden. Eine ähnliche Studie wurde bereits 2009 von Vögtle et al. publiziert [181], in der ein COFRADIC-Ansatz genutzt wurde, der zur Identifizierung von 34 Substraten führte. Um dieses Ergebnis zu erzielen, wurden 3 mg Protein pro Zustand verwendet und drei verschiedene Proteasen eingesetzt sowie über 100 LC-MS-Messungen benötigt. Im Gegensatz dazu wurde im hier etablierten ChaFRADIC nur 30 μ g Protein pro Zustand verwendet, standardmäßig tryptisch verdaut und nur die 5 final angereicherten Fraktionen gemessen, so dass in diesem Ansatz 100-mal weniger Startmaterial und nur 1% der vorher benötigten Zeit gebraucht wurden. Weiterhin können mit dem ChaFRADIC-Ansatz auch N-terminale Peptide mit zusätzlichen Ladungen (auf Grund von überlesenen Schnittstellen oder Histidinresten) angereichert werden, wohingegen diese beim COFRADIC gänzlich verloren gehen [140]. Auch im Hinblick auf den Vergleich mit Mommen et al. erwies sich die Methode aktuell als die sensitivste und zeichnet sich durch Robustheit, Reproduzierbarkeit und eine einfache Durchführbarkeit aus. Die hohe Spezifität der Anreicherung von etwa 80% zeigt, dass das theoretische Prinzip erfolgreich zur Anwendung auf eine reale Probe angewendet werden konnte. In Bezug auf die Abdeckung des gesamten Hefeproteoms (die nur 20% betrug), ließe sich die Methode jedoch verbessern. Eine mögliche Strategie könnte hier der Einsatz verschiedener Proteasen sein, die den Ansatz etwas aufwendiger machen, jedoch N-terminale Peptide zugänglich machen würde, die auf Grund des speziellen Arg-C Verdau bislang ausgeschlossen werden. Besonders Proteasen, die gänzlich andere Spezifitäten besitzen, wären dafür interessant, wie beispielsweise GluC (saure AS) oder Subtilisin (unspezifische Schnittaktivität), da sie Peptide mit grundsätzlich anderen physikochemischen Eigenschaften generieren würden. Auch die Markierung der Protein-N-Termini ließe sich durch das aktuell häufig verwendete iTRAQ-/ oder TMT-Labeling ersetzen, wodurch die Anzahl der

miteinander vergleichbaren Proben von 3 auf bis zu 10 ansteigen würde. Da die Proben vor dem proteolytischen Verdau und der eigentlichen Anreicherung bereits vereinigt werden, ließe sich gleichzeitig die Menge an Startmaterial deutlich verringern, so dass der Einsatz von nur 5-20 µg Protein denkbar wäre. Dies würde eine Anwendung auch für klinische Proben oder Primärgewebe möglich machen, für die bislang auf Grund der äußerst limitierten Probenmengen nur wenige Methoden geeignet sind.

5.2.2. ANWENDUNG DES INITIALEN CHAFRADICS ZUR ANREICHERUNG N-TERMINALER PEPTIDE AUS ARABIDOPSIS THALIANA

Unter Verwendung des ChaFRADIC Ansatzes konnten N-terminale Peptide aus *Arabidopsis thaliana* Mitochondrien angereichert und die mutierten Varianten Δ icp55 und Δ oct-1-1/2 gegen den Wildtyp quantifiziert werden. Durch Berücksichtigung derjenigen Peptide, die eine ausreichend starke Regulation (mind. +/- 3-fach) zeigten, konnten final 74 Icp55 und 7 potentielle Oct-1 Substrate identifiziert werden. Dabei verifizierte die starke Korrelation des gefundenen Arabidopsis Icp55-Konsensusmotivs (R-X-F/L/I/Y) mit dem bekannten Motiv aus Hefe (R-X-Y/L/F) die Annahme, dass es sich um tatsächliche Substrate handelte. Dies ist zudem interessant, da sich Hefe und Arabidopsis separat vor über einer Milliarde Jahre entwickelten und die Prozessierungsmechanismen von Icp55 in beiden Spezies dennoch nahezu identisch geblieben sind (vgl. Abb.5.2.2.1.). Gemäß der Endosymbiontenhypothese geht man davon aus, dass Zellorganellen durch phagozytotisch aufgenommene chemo- und phototrophe Bakterien entstanden sind, so dass die Sequenzen von vielen organellspezifischen Proteinen in Eukaryoten hochkonserviert

vorliegen und sich auch die Funktionen häufig noch ähneln [195, 196]. Während der Transformation vom Endosymbionten zum Organell wurde ein Großteil der genetischen Information in die des Wirtsorganismus übertragen, gleichzeitig übernahmen vom Wirtsgenom codierte Proteine wichtige Funktionen im nun integrierten Organell [197]. Vermutlich hat sich Icp55 oder ein dem Icp55

ähnliches Protein bereits früh in der evolutionären Entwicklung des Mitochondriums durchgesetzt und hat durch die proteolytische Prozessierung importierter Proteine seine

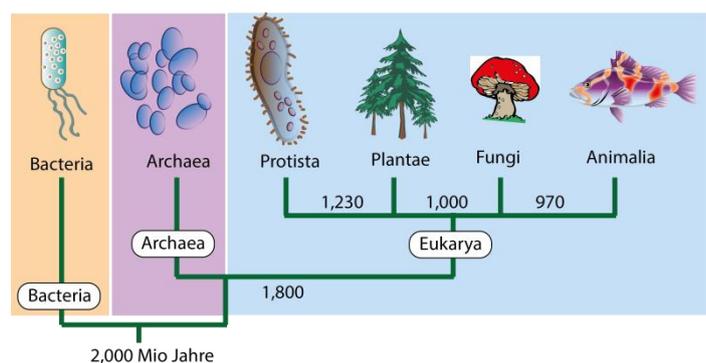


Abb.5.2.2.1.: Phylogenetischer Stammbaum des Lebens mit Einteilung in die drei Domänen (Bacteria, Archaea und Eukarya) und Dauer der Entwicklung in Millionen Jahren.

fundamentale Bedeutung bekommen. Es ist leicht nachzuvollziehen, dass mit steigender Anzahl an importierten, zu prozessierenden Proteinen die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass all jene nach Abspaltung der Signalsequenz einen stabilen N-Terminus aufweisen, so dass das Vorhandensein des Icp55 evolutionär stark von Vorteil für die mitochondrielle Homöostase ist. Dies wird zudem dadurch bestätigt, dass auch in anderen evolutionär weitentfernten Spezies zu Icp55 homologe Proteine mit sehr ähnlichen Schnittpräferenzen gefunden wurden, so z.B. im amöben Protisten *Acanthamoeba castellanii* [154]. All dies spricht für die frühe Entwicklung des Icp55 sowie dessen Konservierung über viele Evolutionsstufen hinweg mit nur geringen Abwandlungen bezüglich der Sequenz sowie Substratspezifität, wie für Arabidopsis gezeigt werden konnte. Auf Grund der erzielten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass Icp55 dieselbe Funktion in den verschiedenen Organismen hat und in Übereinstimmung mit den Prinzipien des N-End-Rule-Signalwegs die durch MPP-Prozessierung instabilen N-termini in ihre stabile Form überführt. Obwohl bereits seit einige Jahren bekannt ist, dass der N-End-Rule Signalweg sowohl in Pro-/ als auch Eukaryoten, inklusive Pflanzen, eine fundamentale Bedeutung besitzt, belegen die Ergebnisse dies zusätzlich, indem gezeigt werden konnte, dass sowohl das Hefe als auch das Arabidopsis icp55 dieselben Aminosäuren entfernt und somit der N-End-Rule Signalweg auch in pflanzlichen Mitochondrien einen wichtigen Prozess zur Stabilisierung des Proteoms darstellt [154].

Für Oct-1 konnten hingegen keine vergleichbaren Ergebnisse erzielt werden, so dass lediglich 7 potentielle Substrate gefunden werden konnten, die zudem nur rudimentär mit der erwarteten Konsensussequenz übereinstimmten. Dieses Ergebnis lässt keinen eindeutigen Rückschluss zu und kann sowohl bedeuten, dass Oct-1 in Arabidopsis eine sehr viel breitere Sequenzspezifität aufweist als in Hefe, es könnte aber auch dafür sprechen, dass eine weitaus komplexere Prozessierungsabfolge unter Beteiligung möglicherweise noch unbekannter Peptidasen zur Erzeugung des inhomogenen Konsensusmotivs führt. So scheint es für zwei gefundene potentielle Substrate aus der Familie der mitochondrialen RNA Helikasen (PMH1 und PMH2) beispielsweise nach Abspaltung der Signalsequenz durch MPP eine weitere Prozessierung zu geben, die zur Entfernung einer 17 Aminosäure-langen Sequenz führt. Dies stimmt nicht mit der erwarteten Abspaltung des 8 Aminosäure-langen Peptids überein und könnte durch eine zweifach stattfindende Prozessierung durch Oct-1 erklärt werden eventuell auch in Zusammenspiel einer weiteren Peptidase. Da keine eindeutige Aufklärung des Prozessierungsmechanismus mit Hilfe des ChaFRADIC-Ansatzes möglich war, könnten zur Verifizierung der gefundenen Substrate Import- und Peptidase-Aktivitätsexperimente

durchgeführt werden. Dabei wird ein potentielles Substrat mit wildtypischen sowie mutierten Mitochondrien inkubiert und die unterschiedlich prozessierten Proteinvarianten über Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Mittels der sehr sensitiven Autoradiographie können sowohl die prozessierten als auch die unprozessierten Proteinvarianten identifiziert werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob es sich tatsächlich um ein Substrat handelt, wenn auch nicht die genaue Schnittpräferenz durch einen solchen Ansatz ermittelt werden kann. Ein solches Experiment wurde von einem kooperierenden Labor (Prof. Dr. Soll, Biozentrum der LMU München, Department Biologie I – Botanik) im Rahmen der korrespondierenden Publikation durchgeführt [154], jedoch konnte auch durch dieses Vorgehen keines der ausgewählten potentiellen Substrate eindeutig als solches verifiziert werden. Beispielsweise zeigten die getesteten Substrate (AT2G32230, AT3G22330, AT5G52840) zwar eine gute Importrate, dennoch konnte kein Unterschied nach Inkubation mit wildtypischen oder Oct-1-defizienten Mitochondrien nachgewiesen werden, so dass eine Prozessierung durch Oct-1 nicht bestätigt werden konnte. Daher sind hier weitere Experimente nötig, um die physiologische Rolle der Peptidase zu charakterisieren und ihre Beteiligung an der Stabilisierung des mitochondrialen Proteoms genauer zu untersuchen.

5.2.3. ANWENDUNG DES ERWEITERTEN CHAFRADICS ZUR ANREICHERUNG N-TERMINALER PEPTIDE AUS ARABIDOPSIS THALIANA

Der initiale ChaFRADIC Ansatz wurde durch Verwendung zusätzlicher Proteasen sowie der isobaren iTRAQ-Markierung erweitert, um die Peptidzugänglichkeit des Ansatzes zu erhöhen und innerhalb desselben Experimentes deutlich mehr Proben relativ zueinander vergleichen zu können. Wie im Abschnitt 4.2.3. dargelegt, konnten durch die unterschiedlichen Schnittpräferenzen der eingesetzten Enzyme (Trypsin, GluC und Subtilisin) auch zuvor nicht zugängliche N-terminale Peptide identifiziert werden. Insgesamt konnten mit dem erweiterten ChaFRADIC Ansatz 2791 einmalig vorkommende N-terminale Peptide mit hoher Konfidenz identifiziert werden. Interessanterweise wurden dabei über 80% der gefundenen N-Termini nur mit Hilfe einer einzigen Protease identifiziert, so dass eine der maßgeblichen Limitierungen im initialen ChaFRADIC Ansatz, nämlich die alleinige Verwendung von Trypsin, nachgewiesen und dieser zudem entgegengewirkt werden konnte (vgl. Abschnitt 5.2.1.). Die zweite Verbesserung in Bezug auf den initialen Ansatz war die Verwendung der iTRAQ-Markierung, die neben den allgemeinen Vorteilen einer isobaren Markierung (vgl. Abschnitt 1.3.3.) auch die Anzahl der quantifizierbaren Proben innerhalb desselben Experimentes erhöht. Durch die Quantifizierung N-terminaler Peptide zwischen 6 technischen

Replikaten wurde die Reproduzierbarkeit und technische Varianz des Ansatzes geprüft. Dabei zeigte sich, dass alle 6 Markierungskanäle nahezu identische Quantifizierungswerte lieferten und diese auch bei einem solch großen Datensatz weniger als 10% Abweichung innerhalb der verwendeten Verdaustrategie zeigten. Generell war die relative Standardabweichung für alle drei Verdauungen ähnlich (8-9%), so dass dies als technische Varianz unter Berücksichtigung der vielen durchzuführenden Probenvorbereitungsschritte akzeptiert werden kann. Darüber hinaus lässt sich der erweiterte ChaFRADIC Ansatz ebenfalls zur Charakterisierung proteolytischer Aktivität verwenden. Auf Grund des experimentellen Designs konnte hier jedoch nur eine grobe Klassifizierung der identifizierten N-terminalen Peptide durchgeführt werden, die dennoch Präferenzen für bereits bekannte Schnittmechanismen beispielsweise zur Abspaltung von Transit-, Signal- oder Propeptiden widerspiegelte. Dies konnte anschließend auch durch Abgleich mit Einträgen der Uniprot Datenbank abgeglichen und für einen Großteil belegt werden.

Der Vergleich mit alternativen Methoden zur Anreicherung N-terminaler Peptide zeigte, dass seit den Anfängen im Jahr 2007 die Menge an Startmaterial über die Jahre konsequent reduziert wurde. Dennoch benötigen viele der in den letzten 5 Jahren veröffentlichten und aktuell verwendeten Strategien teilweise viel Probenmaterial, was besonders im Hinblick auf klinische Proben und Primärmaterial problematisch ist (siehe Tab.5.2.3.1.). Um Techniken für möglichst viele Anwendungsgebiete verfügbar zu machen, sind geringe Probenmengen, eine angesichts der Ausbeute gerechtfertigte Probenaufarbeitungszeit und eine Quantifizierungsoption, mit der man möglichst viele Proben innerhalb desselben Experimentes miteinander vergleichen kann, die zu bewertenden Parameter, die die Qualität einer Methode bestimmen. Dabei zeigte sich im direkten Vergleich des initialen als auch des erweiterten ChaFRADICs, dass beide Methoden auch bei geringen Probenausgangsmengen eine ausgezeichnete finale Identifizierungsrate besitzen. Andere Chromatographie-basierte Verfahren, wie z.B. das COFRADIC [118], benötigen beispielsweise deutlich größere Probenmengen und bedingt durch das spezielle experimentelle Design gehen höher geladene N-terminale Peptide verloren. Die PTAG-Strategie basiert auf einer sehr aufwendigen Probenvorbereitung und es wird eine zusätzliche Offline-Fraktionierung empfohlen [128]. Deutlich weniger aufwendig erscheint da beispielsweise die TAILS-Technik, wobei hier neben dem ohnehin teuren iTRAQ-Reagenz auch ein spezielles, kostenintensives Polymer unverzichtbar ist und etwa 10-mal mehr Material eingesetzt werden muss als beim ChaFRADIC.

Tab.5.2.3.1.1.: Chronologische Übersicht häufig verwendeter Strategien zur Anreicherung N-terminaler Peptide und deren wichtigste Merkmale. Verwendete Abkürzungen: TAILS – Terminal amine isotopic labeling of substrates, iTRAQ – isobaric tag for relative and absolute quantification, COFRADIC – combined fractional diagonal chromatography, ChaFRADIC – charge-based fractional diagonal chromatography

	Biotinylierungs-basierte Strategien		TAILS, kombiniert mit iTRAQ		COFRADIC		Phospho-tagging – PTAG Strategie		Immuno-affinitäts-basierte Strategie		ChaFRADIC initial		ChaFRADIC erweitert, kombiniert mit iTRAQ	
Erscheinungs- jahr	2007-2009		2014	2011	2012	2013	2013	2013	2013	2015				
Menge an Start- material	Bis zu 20 mg		300 µg pro Zustand	1. mg	100 µg pro Zustand	3 mg	3 mg	<50 µg pro Zustand		33 µg pro Zustand				
Anzahl identifizierter N-terminaler Peptide (nicht)	~600		~1998	~2300	~900	~270	~270	~900	~1700	~2800				
Organismus oder Zelltyp	<i>S. cerevisiae</i>		humane Thrombozyten	humane Thrombozyten	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Roseobacter denitrificans</i>	<i>Roseobacter denitrificans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>				
Grundlegendes Prinzip der Anreicherung	enzymatische oder chemische Biotinylierung der N-Termini und Bindung an Streptavidin		Abreicherung von internen Peptiden mittels Amin-spezifischem Polymer	Umkehrphasen-Chromatographie isoliert spezifisch N-terminale Peptide	Phosphorylierung von internen Peptiden und Abreicherung durch TIO-Chromatographie	TMPP-Markierung der N-Termini und spezifische Anreicherung mittels anti-TMPP-Antikörper	TMPP-Markierung der N-Termini und spezifische Anreicherung mittels anti-TMPP-Antikörper	Phosphorylierung von internen Peptiden und Abreicherung durch TIO-Chromatographie	zwei-dimensionale SCX-Chromatographie isoliert spezifisch N-terminale Peptide	zwei-dimensionale SCX-Chromatographie isoliert spezifisch N-terminale Peptide				
Kommentare und mögliche Probleme	enorme Menge an Startmaterial benötigt, keine Quantifizierungs-option		relativ teures Polymer notwendig welches aufwendig vorbehandelt werden muss, relativ teures iTRAQ-Reagenz notwendig, optionale SCX-Fraktionierung	höher geladene N-terminale Peptide gehen durch SCX-Präfraktionierung verloren, hohe Anzahl an finalen LC-MS Messungen nötig, Quantifizierung möglich, hoch-reproduzierbares HPLC-System notwendig	günstige Dimethylmarkierung, lange Derivatisierungszeit für Dimethylierung der N-Termini und Phosphorylierung der internen Peptide, Verwendung von 3 Proteasen, proteolytische pycro-Abspaltung notwendig, offline AEX Präfraktionierung empfohlen	Verwendung von 3 Proteasen, Quantifizierung generell möglich, aufwendige Antikörper-Produktion und Validierung notwendig, zusätzliche Präfraktionierung für Probenaufreinigung nach TMPP-Markierung	Verwendung von 3 Proteasen, Quantifizierung generell möglich, aufwendige Antikörper-Produktion und Validierung notwendig, zusätzliche Präfraktionierung für Probenaufreinigung nach TMPP-Markierung	Verwendung von 3 Proteasen, Quantifizierung generell möglich, aufwendige Antikörper-Produktion und Validierung notwendig, zusätzliche Präfraktionierung für Probenaufreinigung nach TMPP-Markierung	zwei-dimensionale SCX-Chromatographie isoliert spezifisch N-terminale Peptide	zwei-dimensionale SCX-Chromatographie isoliert spezifisch N-terminale Peptide				Verwendung von 3 Proteasen, relativ teures iTRAQ-Reagenz notwendig, hoch-reproduzierbares HPLC-System notwendig
Referenzen	Timmer et al., 2007		Prodova et al., 2010	Gewaert et al., 2003	Mommen et al., 2012	Bland et al., 2013	Bland et al., 2013	Mommen et al., 2012		Venne et al., 2013				Venne et al., 2015
	Mahrus et al., 2008		Kleefeld et al., 2011	Staes et al., 2008										
	Xu et al., 2009		Prodova et al., 2014	Van Damme et al., 2008										

Auch wenn auf Grund der unterschiedlichen Techniken und verwendeten Organismen kein präziser Vergleich vorgenommen werden kann, so konnte dennoch mit dem erweiterten ChaFRADIC ein robuster Ansatz etabliert werden, der die Anreicherung N-terminaler Peptide mit niedriger technischer Varianz erlaubt und eine der sensitivsten Methoden zum aktuellen Zeitpunkt darstellt. Dies zeigt sich auch in im Anschluss an diese Arbeit am ISAS erfolgten Studien [198, 199]. Beispielsweise konnte mit Hilfe des etablierten ChaFRADIC-Ansatzes in der jüngsten Studie die pro-apoptische Funktion der PARL Protease charakterisiert werden und zusätzlich auch deren Substrate identifiziert werden. Die Rolle von PARL wird unter anderem in Zusammenhang mit der Parkinson Krankheit gebracht und führt bei genetischem Knockout zu sehr progressiven Formen der Atrophie und Kachexie in Mausmodellen [200].

5.3. ANREICHERUNG VON DISULFID-VERBRÜCKTEN PEPTIDEN

Im initialen Proof-of-principle-Experiment mit dem Modelprotein BSA stimmten nahezu alle mittels ChaFRADIC identifizierten Disulfidpositionen mit aus der Literatur bekannten Positionen überein. Dies zeigte, dass das experimentelle Design zur Anreicherung von ehemals Disulfid-verbrückten Peptiden geeignet ist, wobei die Methode hauptsächlich den Limitierungen der abschließenden LC-MS-Messung unterworfen ist, so dass sehr kurze oder extrem lange Peptide oft nur unzureichend mittels Massenspektrometrie detektierbar sind und daher auch bei erfolgreicher Anreicherung nicht identifiziert werden. Daher können nicht nachgewiesene Peptide, wie in diesem Datensatz das Peptid ³⁰⁰ECCDK³⁰⁴, nicht zwangsläufig als Indiz für unzureichende Anreicherung gewertet werden. Umgekehrt kann es auch für nicht validierbare Positionen verschiedene Erklärungen geben. Die Disulfidposition am Cys58 wurde beispielsweise nur mittels ChaFRADIC nachgewiesen (siehe Abb.4.3.2. A). Diese Position liegt zwischen zwei alpha-Helices innerhalb einer beta-Faltblattstruktur [201], weiterhin konnte die Identität dieser Aminosäure bislang nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden, so dass an dieser sowie einiger weiterer Positionen sog. Sequenzkonflikte innerhalb der Proteinsequenz berichtet wurden (siehe <http://www.uniprot.org/uniprot/P02769>). Es bleibt daher Spekulation, ob die gefundene Position aus einer falsch-positiven Identifikation des ChaFRADICs entstammt oder ob es möglicherweise eine kleine Subpopulation innerhalb von BSA-Proteinen gibt, die eine bislang nicht charakterisierte Disulfidbrücke ausbildet. Nichtsdestotrotz zeigt die Quantifizierung der ehemals Disulfid-verbrückten Peptide, dass diese mittels ChaFRADIC reproduzierbar angereichert werden können. Die relative Standardabweichung variierte dabei von 10 bis <30%, wobei ersteres ein durchaus

vertretbares Ergebnis für technische Replikate darstellt, wie schon im Abschnitt 5.2.3. diskutiert wurde. Höhere Standardabweichungen ergeben sich meist durch einige wenige Einzelwerte, die Abweichungen von etwa 25% zum erwarteten Idealwert zeigen und so die Standardabweichung maßgeblich erhöhen. Es empfiehlt sich daher die manuelle Überprüfung dieser ausreißenden Werte hinsichtlich ihrer Validität und Qualität, so dass die massenspektrometrischen Rohdaten Indizien für die Zuverlässigkeit des Quantifizierungsergebnisses liefern können. Auch hier kann die Verwendung von mindestens drei Replikaten pro Zustand helfen, ausreißende Werte zu erkennen und ggf. durch deren Eliminierung homogenere Ergebnisse zu erhalten.

Die Analyse von Disulfidpositionen innerhalb komplexer Proben, wie den hier verwendeten stimulierten Hefezellen, ist zum einen auf Grund der großen Datenmengen zum anderen bezüglich der biologischen Interpretation der Daten anspruchsvoll. Generell konnten hier, wie auch im *proof-of-principle*-Experiment erfolgreich ehemals disulfidverbrückte Peptide angereichert werden. Die erreichte Anzahl von 2401 identifizierten nicht-redundanten Peptiden, die 2433 Positionen in 1421 Proteinen aufweisen, ist dabei nicht nur ein sehr sensibles Ergebnis, sondern auch das einzige, welches durch Einsatz einer Anreicherungs-methode erzielt wurde. Gegenwärtig gibt es kaum alternative Methoden, die eine Anreicherung von intakten oder ehemals verbrückten Disulfid-Peptiden ermöglichen. Lu et al. veröffentlichten 2015 eine Methode, bei der intakte Disulfid-verbrückte Peptide mittels HCD fragmentiert werden und so aus fragmentierten Einzelpeptiden überlagerte Spektren entstehen. Diese können anschließend mittels des speziell trainierten Algorithmus pLINK identifiziert werden [202]. Um dies erfolgreich auf eine komplexe Probe anwenden zu können, muss diese jedoch zunächst extensiv vorfraktioniert werden, so dass erst die deutlich reduzierte Probenkomplexität eine Aufnahme qualitativ verwendbarer Spektren ermöglicht. Methodisch gesehen handelt es sich daher nicht um eine Anreicherungs-methode, die mit 199 identifizierten Disulfidbrücken aus *E. Coli* auch deutlich weniger sensitiv ist als das ChaFRADIC. Weiterhin handelt es sich bei den erzielten Ergebnissen zum Teil um prognostizierte Peptide: da oft nur ein Peptid des verbrückten Konstruktes identifiziert werden kann, wird anhand der Molekülmasse des Gesamtkonstruktes die Masse des zugehörigen fehlenden Peptids berechnet und mit potentiell in der Probe verfügbaren Peptiden abgeglichen. Die abschließende Auswahl basiert dabei auf Wahrscheinlichkeitsberechnungen. Die einzige weitere Methode Disulfidpositionen zu charakterisieren wurde von Pan et al. 2014 veröffentlicht [203], wobei auch hier freie Thiole zunächst mit NEM blockiert werden und

anschließend Disulfidverbrückte Peptide durch Bindung an einen spezifischen Antikörper angereichert werden. Neben den in Kap.1.4 beschriebenen Limitierungen Antikörper-basierter Methoden kommt bei dieser Methode hinzu, dass glutathionylierte Peptide ebenfalls angereichert werden. Bei Glutathion handelt es sich um ein Tripeptid, so dass sich glutathionylierte Peptide grundsätzlich genauso verhalten wie ein Disulfid-verbrücktes Peptid, bei dem beide Peptide aus einer Proteinsequenz stammen. Der Unterschied liegt in der biologischen Funktion, so dass Glutathionylierung hauptsächlich als Schutzmaßnahme gegen oxidativen Stress stattfindet, intramolekulare Disulfidbrückenbildung in Proteinen jedoch eher strukturelle und funktionale Gründe hat. Generell war die Intention der Methode unterschiedliche Cysteinmodifikationen zu untersuchen, so dass im Ergebnis 260 verschiedenfach modifizierte Cysteinpositionen identifiziert werden konnten. Auf Grund der fehlenden Vergleichsmöglichkeiten mit weiteren Methoden, musste daher zur Interpretation der ChaFRADIC-Ergebnisse auf in Datenbanken hinterlegte Informationen zurückgegriffen werden. Dabei fiel auf, dass viele der Disulfid-verbrückten Peptide aus Proteinen stammten, die im Zytosol lokalisiert sind. Da zur Entstehung von Disulfidbrücken grundsätzlich eine oxidierende Umgebung vorhanden sein muss, ist jedoch zu erwarten, dass die meisten Disulfidbrücken in Proteinen auftreten, die in Zellorganellen oder Membranen lokalisiert sind. Auf Grund der Kompartimentierung können hier abgegrenzt zur reduzierenden Umgebung des Zytoplasmas, oxidierende Bedingungen entstehen. Ist die Zelle keinem erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt, findet Disulfidbrückenbildung vorrangig im ER statt [204], da der Großteil an Sulfhydrylgruppen einen $pK_a > 8,0$ besitzen und somit außerhalb der Organellen beim physiologischen pH des Zytoplasmas protoniert vorliegen. Daher ist die Ausbildung von Disulfidbrücken in zytoplasmatischen Proteinen bisher selten beschrieben, wenn auch einige redox-sensitive Proteine bekannt sind, deren Cysteinreste auf Grund von Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren einen geringeren pK_a -Wert aufweisen und so bei neutralem pH als Thiolanionen vorliegen, was eine Oxidierung begünstigt [170, 205]. Dieser Mechanismus ist beispielsweise von Disulfidbrücken-reduzierenden Enzymen wie Thioredoxin oder Glutathion bekannt (siehe Abb.5.3.1.), die damit zwei wichtige zelluläre Systeme zum Abbau von oxidativem Stress darstellen. Ist die Zelle jedoch auf Grund interner oder externe Einflüsse einer erhöhtem Menge an ROS ausgesetzt, können diese Systeme zumindest vorübergehend ausgeschaltet werden, so dass in der Folge auch zytoplasmatische Proteine oxidiert werden können [206, 207]. Dies stellt einen pathologischen Zustand dar, für dessen Umkehrung weitere zelluläre Mechanismen in Gang gesetzt werden müssen. Daher verwundert es nicht, dass viele der identifizierten oxidierten Proteine bestimmten

Enzymklassen angehörten. So wäre es biologisch durchaus sinnvoll, dass bei erhöhtem oxidativen Stresslevel redox-sensitive Proteine oxidiert werden können, die erst dann eine bestimmte Funktion ausüben. So könnten beispielsweise Oxidoreduktasen spezifisch aktiviert werden und somit den Abbau der ROS beschleunigen. Zusätzlich könnten auch andere Enzyme eine wichtige Rolle spielen und beispielsweise die Expression bestimmter Proteine induzieren oder umgekehrt den Abbau beschleunigen [208].

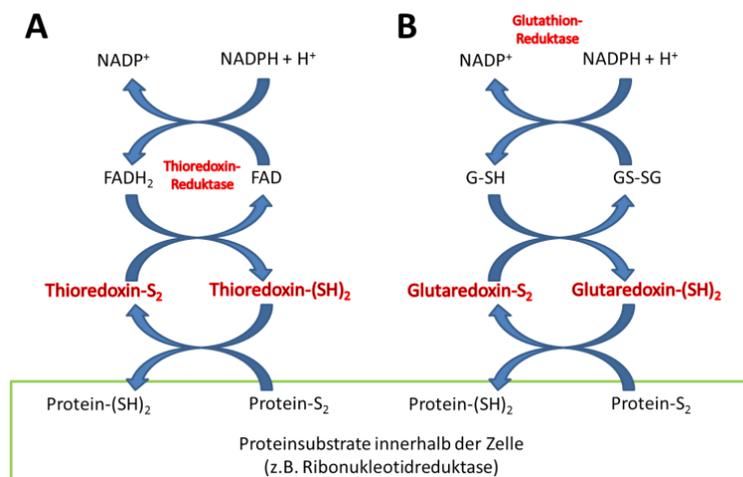


Abb.5.3.1.: Proteinreduktion und -oxidation durch Disulfidbrücken-reduzierende Enzyme. Sowohl Thioredoxin (A) als auch Glutaredoxin sind in der Lage die Disulfidbrücken von Proteinen zu reduzieren, anschließend werden die beiden -nun oxidierten- Proteine recycelt, indem in einer Abfolge an Redoxreaktionen Elektronen auf andere Moleküle übertragen werden. Beide Systeme spielen in der Zelle eine wichtige Rolle bei der Elimination von oxidativem Stress.

Obwohl gerade in Bezug auf die exakte Bestimmung von Disulfidpositionen noch sehr wenig experimentelle Daten insbesondere für Hefe verfügbar sind, konnte doch die Validität des ChaFRADICs Ansatzes bewertet werden. Bedenkt man, dass über 6000 Hefepoteine in der Uniprot Datenbank gelistet sind, sind im Vergleich dazu extrem wenige Daten zur Disulfidbrückenbildung vorhanden. Ein Teil der vorhandenen Daten ist zudem durch Strukturanalysen einzeln aufgereinigter Proteine entstanden, so dass es nicht zu erwarten war, mit dem ChaFRADIC Ansatz ebenfalls alle Disulfidpositionen eines einzelnen Proteins nachweisen zu können. Generell wird die ChaFRADIC-Anwendung immer durch die Beschaffenheit der erzeugten Peptidsequenzen limitiert, die je nach Aminosäuresequenz, Länge oder physikochemischen Eigenschaften nicht durch ladungsbasierte Anreicherung oder die abschließende massenspektrometrische Analyse zugänglich sind. Zudem wurden manche der gelisteten Disulfidpositionen nur auf Grund von Sequenzhomologien aufgenommen, so dass eine experimentelle Bestätigung noch aussteht. In Anbetracht der wenigen vorhandenen Daten ist daher eine Validierung von mehr als 60% der identifizierten Disulfidpositionen ein

gutes Ergebnis. Vor allem, da in alternativen Ansätzen es zwar prinzipiell möglich ist, potentielle Disulfidbrücken in strukturell bereits aufgeklärten Proteinen zu überprüfen, dies muss jedoch einzeln und manuell erfolgen. Zudem konnten durch Prognose-Software vorhergesagte Disulfidpositionen mittels ChaFRADIC experimentell belegt werden, was die Validität des Ansatzes unterstreicht. Generell sind auch hier die erzeugten Sequenzen ausschlaggebend für den erfolgreichen Einsatz der Methode, so dass z.B. im Falle des P34111 zwei der vorhergesagten 5 Positionen allein auf Grund der Sequenz nicht detektierbar waren.

Die biologische Einordnung der Ergebnisse ist auf Grund der enormen Datenmengen weitaus anspruchsvoller und kann immer nur den Ansatzpunkt für weitere Validierungsexperimente darstellen. Generell konnte gezeigt werden, dass nach Beginn der Stimulation und der damit verbundenen Akkumulation von oxidativem Stress eine vermehrte Disulfidbrückenbildung stattfindet. Offensichtlich verschiebt sich hier sprunghaft das Gleichgewicht in der Zelle und es werden vermehrt Proteine oxidiert. Bei längerer Behandlungsdauer kann dieser Prozess teilweise umgekehrt werden, so dass sich die Anzahl an Disulfidbrücken-tragenden Proteinen wieder dem Ursprungswert annähert. Es scheint also Mechanismen zu geben, die es der Zelle erlauben sich an den erhöhten Stresslevel zu adaptieren und sich wieder dem homöostatischen Zustand anzunähern. Dies wird auch belegt durch die Disulfidmuster, die in Thioredoxin, Glutaredoxin und ihren reduzierenden Enzymen gefunden wurden: Diese zeigen ebenfalls, dass die zunächst übermäßige Disulfidbrückenbildung relativiert werden kann und sogar dem Normalwert angenähert wird. Nach insgesamt 120 Min. Stimulationsdauer zeigte sich dann ein erneuter Anstieg, so dass ab diesem Zeitpunkt wahrscheinlich die Kapazitäten zur Rückwandlung von Disulfidbrücken erreicht wurden. Insbesondere wenn die Elektronenakzeptoren wie Glutathion- und Thioredoxin-Reduktase ebenfalls vermehrt oxidiert vorliegen, können die eigentlichen oxidativen Schutzenzyme nicht mehr recycelt werden und der Zyklus kommt zum Erliegen. Dies sind Tendenzen, die sich für gut charakterisierte Proteine wie Thioredoxin gut erklären lassen, jedoch für andere Proteine im Einzelfall weiter überprüft werden müssten, um zu klären, welche Funktion sie in der Zelle übernehmen und welche Folgen eine Disulfidbrückenbildung darauf hätte.

5.4. ANREICHERUNG VON UBIQUITINYLIERTEN PEPTIDEN

Das initiale Immunpräzipitationsexperiment unter Einsatz von 20 mg Material hatte zum Ziel einen Vergleichswert zu schaffen, mit dem im Nachfolgenden die durch ChaFRADIC erzielten Ergebnisse in Relation gesetzt werden konnten. Dieses Experiment wurde mit Hilfe

des PTMScan Ubiquitin Kits und gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt, was zur Identifikation von 8524 ubiquitinierten Peptiden in fast 3000 unterschiedlichen Proteinen führte. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit anderen Studien dieser Art, die selbiges Kit und einen ähnlichen Versuchsablauf verwendeten [93]. Das Ergebnis konnte daher zur Beurteilung der nachfolgenden Experimente verwendet werden, wenn auch grundsätzlich zu beachten war, dass sich die generierten Peptide in Bezug auf Modifikationen und Verdauungsspezifität unterschieden (Acetylierung und damit induzierte ArgC-Spezifität). Dies zeigte sich auch beim direkten Vergleich der Ergebnisse von IP und einer kombinierten IP+ChaFRADIC-Methode. Auffällig war hier die geringe Übereinstimmung der identifizierten Peptide, die sich dadurch erklären lässt, dass beide Methoden auf unterschiedliche Peptidpopulationen abzielen. So scheint ChaFRADIC generell eher für Peptide geeignet, deren ubiquitiniertes Lysin sich zwischen zwei nicht zu weit entfernten Argininen befindet. Diese Limitierung gilt nicht für die standardmäßige IP, bei der sowohl auf Arginin- als auch auf Lysin-endende Peptide generiert werden. Dennoch sind hier wiederum diejenigen Peptide nicht zugänglich, deren ubiquitiniertes Lysin sich unmittelbar zwischen zwei unmodifizierte Lysinen befindet (z.B. $^{92}\text{YKKK}_{(\text{GlyGly})}\text{KR}^{99}$ in Q9H5J8): eine solche Sequenz führt beim proteolytischen Verdau in der klassischen IP zur Erzeugung sehr kurzer Peptide, die dann möglicherweise in der massenspektrometrischen Analyse nicht optimal detektiert oder auf Grund der geringen Länge nicht einwandfrei identifiziert werden können. Folglich wird die geringe Übereinstimmung beider Experimente durch die unterschiedliche Methodik begründet. Nichtsdestotrotz wurde beim Vergleich auch deutlich, dass nahezu 10-mal weniger ubiquitinierte Peptide im kombinierten IP+ChaFRADIC-Ansatz identifiziert wurden. Ein Grund könnte zum einen die Kombination beider Methoden sein, da dann deutlich mehr Aufarbeitungsschritte nötig sind, die wiederum Probenverluste begünstigen. Zudem sind auch die Probenmengen nach IP-Anreicherung im Vergleich zu den sonst verwendeten Peptidmengen in der ersten Dimension sehr gering, so dass Probenverluste hier stärker ins Gewicht fallen. Zum zweiten basiert der ChaFRADIC-Ansatz auf mehrfacher Acetylierung der Peptide, so dass diese hydrophober und ladungsärmer werden, beides kann die Löslichkeit herabsetzen und sich zudem negativ auf Ionisierungs- und Fragmentierungsverhalten im MS auswirken. Es müsste daher eingehender geprüft werden, ob beim alleinigen Einsatz der ChaFRADIC-Methode diese Limitierungen einen ähnlich starken Effekt haben und ob ggf. weitere Optimierungen notwendig sind. Generell sollte dieses Experiment jedoch dazu dienen, das Elutionsverhalten der Ubq-Peptide genauer zu untersuchen. Dabei wurde deutlich, dass die meisten ubiquitinierten Peptiden tatsächlich in

der Hauptfraktion +3/+4/+5 eluierten, zudem befanden sich auch einige im Übergangsbereich der +2/+3 Fraktion. Dies korrelierte vollstens mit dem theoretisch erdachten Ablauf des Experimentes, so dass die Plausibilität des ChaFRADIC-Ansatzes damit überprüft wurde und diese für den Einsatz einer realen Probe verwendet werden konnte. Durch Einsatz unterschiedlich großer Mengen sollte bereits in diesem Experiment geprüft werden, in wie weit sich die Probenkomplexität auf die Spezifität der Methode auswirkt. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass mit allen drei gewählten Mengen (20, 200 und 1000 µg Peptid) keine zufriedenstellenden Resultate erzielt werden konnten. Die Spezifitäten sind für eine Anreicherungsmethode mit unter 10% deutlich zu gering, zudem ist auch die Gesamtanzahl an identifizierten Peptiden nicht ausreichend hoch. Obwohl eine alternative Methode nicht zwangsläufig gleichwertige oder bessere Ergebnisse liefern muss, wenn sie andere Vorteile besitzt (z.B. geringere Probenmenge oder deutlich günstiger), sollte dennoch ein gewisser Anreicherungseffekt sichtbar sein. Das ChaFRADIC liefert hier jedoch 20-25-mal mehr Kontaminationen als ubiquitinierte Peptide, so dass mit diesem Ergebnis eine Verwendung als Anreicherungsmethode nicht sinnvoll erscheint. Das Hauptproblem schien dabei, wie in Abschnitt 4.4. beschrieben, die generierten Peptidspezies zu sein, die auf Grund ihrer Aminosäurezusammensetzung sowohl in der ersten als auch der zweiten Dimension keine exakte Ladungstrennung zeigten. Um das Problem genauer zu charakterisieren wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere, bereits im Abschnitt 4.4. erläuterte, Strategien getestet, wobei auch diese keine nennenswerte Besserung der Resultate lieferten, so dass schlussendlich die Etablierung eines solchen Ansatzes zum damaligen Zeitpunkt eingestellt wurde. Um dennoch eine alternative Methode zur klassischen IP zu liefern, wurde versucht die bis dahin eingesetzten extrem hohen Probenmengen und damit auch den Verbrauch an kostspieliger Antikörper-Suspension zu reduzieren. Dies gelang erfolgreich unter Einsatz von nur 1 mg Peptid und lieferte zudem zufriedenstellende Ergebnisse. Obwohl 20-mal weniger Material eingesetzt wurde konnte die Spezifität weitgehend erhalten werden. Zudem war nicht zu erwarten, dass bei dieser deutlich reduzierten Probenmenge und unter Einsatz von 20-mal weniger Antikörper-Molekülen dieselbe Anzahl an ubiquitinierten Peptiden zu identifizieren sei, so dass eine Abdeckung von etwa 40% der mit klassischer IP erzielten Resultate durchaus als zufrieden stellend angesehen werden kann. Zudem zeigte sich auch eine hohe Reproduzierbarkeit zu andernorts produzierten Proben und das Protokoll ließ sich zusätzlich zur Anreicherung von Proben verwenden, die nicht proteasominhibiert wurden. Insgesamt wurde eine gute Alternative zur klassischen IP geschaffen, die es erlaubt statt der üblicherweise 5 möglichen IPs aus demselben Kit etwa 100 IPs mit jeweils 1 mg Startmaterial

durchzuführen. Damit handelt es sich um eine sehr kosteneffiziente Methode, die zudem auch für mengenlimitierte Proben anwendbar ist.

5.5. ANWENDUNG DER ETABLIERTEN METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER WECHSELWIRKUNG POST-TRANSLATIONALER MODIFIKATIONEN

Die in Abschnitt 4.2. bis 4.4. etablierten Methoden scheinen ein enormes Potential für die zukünftige Analyse von PTMs und deren Wechselwirkungen zu bieten. Bislang wurden in nahezu allen Großformatstudien nur einzelne PTM-Subproteome charakterisiert [14] und nur sporadisch versucht, bestimmte Anreicherungstechniken zu kombinieren, um die gegenseitige Beeinflussung zweier PTMs zu untersuchen [192, 209-211]. Die Hauptgründe dafür sind vermutlich, dass zum einen adäquate Anreicherungstechniken fehlen und zum zweiten die vorhandenen Methoden hochspezifisch für eine bestimmte PTM-Spezies und gleichzeitig wenig variabel sind. So sind beispielsweise Antikörper-basierte Verfahren auf Grund der spezifischen Bindung nicht für andere PTM-Peptide erweiterbar. Das ChaFRADIC bildet hier mit wenigen anderen chromatographischen Anreicherungstechniken, wie z.B. dem COFRADIC, eine Ausnahme. Durch die Variation des experimentellen Ablaufs zeichnen sich diese Methoden durch hohe Spezifität für die jeweils anzureichernde Peptidklasse aus, sind jedoch gleichzeitig auch zur Anreicherung anderer Peptide verwendbar. Die im Abschnitt 4.5. theoretisch beschriebenen Methoden, sind Beispiele für einen möglichen kombinatorischen Einsatz von ChaFRADIC-basierten Methoden und anderen bereits etablierten Methoden, wie TiO₂-Anreicherung oder Immunaффinitäts-basierter Anreicherung. Dies zeigt, dass die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden das bestehende Methodenrepertoire sinnvoll ergänzen, gleichzeitig wird deutlich, dass die Anzahl geeigneter Anreicherungsmethoden gegenüber der enormen Zahl an PTMs deutlich unterrepräsentiert ist. Chromatographie-basierte Verfahren wie ChaFRADIC oder auch COFRADIC bieten dabei ein enormes Potential, um auch bislang nicht anreicherbare PTM-Subproteome zugänglich zu machen. Gleichzeitig werden in den gezeigten Kombinationen auch aktuell verwendete Markierungsstrategien wie iTRAQ berücksichtigt, die eine quantitative Analyse ermöglichen würden. Eine solche quantitative Co-Anreicherung wurde bisher in keiner Studie durchgeführt und würde möglicherweise völlig neue Einblicke in die Stöchiometrie von einzelnen PTMs liefern, besonders wenn man diese Daten mit einer globalen Analyse, wie in Abb.4.5.2. und Abb.4.5.3. gezeigt, korrelieren könnte. Generell wird ein zukünftiges Ziel in der PTM-fokussierten Proteomforschung sein (i) bestehende Methoden in Bezug auf Sensitivität und

Selektivität zu verbessern, aber auch (ii) neue Methoden zur Anreicherung zu entwickeln [101]. Im besten Fall wären diese Methoden dann durch Anpassung des experimentellen Designs für verschiedene PTM-Peptide anwendbar. Obwohl die gegenseitige Beeinflussung von PTMs und auch der Bedarf an neuartigen Technologie zur Charakterisierung solcher Zusammenhänge erkannt wurde, wurden bisher nur in wenigen Studien verschiedene PTMs co-angereichert. Ein nicht zu unterschätzender Faktor ist dabei natürlich die Dateninterpretation: ist diese für eine einzelne PTM-Spezies durch spezifische Software und die Routine der letzten Jahre bereits gut durchführbar, so wird es nur durch Analyse einer weiteren ungleich komplexer. Viele PTMs treten an denselben Aminosäuren auf und lösen dann verschiedene nachgeschaltete Prozesse aus [212], solche Prozesse quantitativ für mehrere PTMs möglicherweise auch zeitaufgelöst über mehrere Proben hinweg zu monitoren, scheint manuell nahezu unmöglich zu sein und würde selbst bei bioinformatischer Unterstützung einen enormen Aufwand bedeuten. Ein weiteres Problem zeigt sich bei der Betrachtung einer Studie von Mertins et al., bei der durch serielle Anreicherung phosphorylierter, ubiquitiniertes und acetylierter Peptide unter Einsatz von einigen mg Startmaterial aus proteasom-inhibierten Jurkat-Zellen mehrere tausend verschiedene PTM-Peptide angereichert werden konnten. Die Datenanalyse ergab dabei, dass nur bei einem kleinen Anteil der Peptide (unter 0,5%) das gleichzeitige Auftreten mehrerer PTMs nachgewiesen werden konnte [192]. Gerade jedoch das Auftreten zweier PTMs in unmittelbarer Nachbarschaft, ist ein starker Hinweis auf PTM-Crosstalk, wie beispielsweise in der einer Studie von Swaney et al. gezeigt wurde [213]. Dabei wurden durch Einsatz alternativer Anreicherungsverfahren basierend auf SCX, IMAC und einem GlyGly-Antikörper 1,008 ubiquitinierte Phosphopeptide identifiziert, was den Hinweis lieferte, dass Phosphorylierung häufig einer Ubiquitinierung vorangehen kann. Dies zeigt deutlich, in wie weit die Charakterisierung von PTM-Crosstalk noch in den Kinderschuhen steckt. So ist nicht nur das Fehlen von geeigneten Anreicherungsverfahren sondern ebenso die Eignung zur Analyse solcher zeitgleich auftretender PTMs ein wichtiges Zukunftsziel. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre dabei die Etablierung sogenannter Middle-Down-Ansätze. Dabei werden zum proteolytischen Verdau alternative Enzyme eingesetzt, die zur Generierung längerer Peptide im Vergleich zum klassischen Trypsinverdau führen. Dies hat den Vorteil, dass in unmittelbarer Nachbarschaft auftretende PTMs bei diesem Ansatz eher an demselben Peptid nachgewiesen und somit eventuelle Abhängigkeiten gezielter erkannt werden könnten. Bisher wurden vor allem Asp-N, Lys-C und Glu-C-Verdaue durchgeführt, bei denen generell längere Peptide entstehen, die sich aber in ihrer durchschnittlichen Größe (2,2 bis 3 kDa) nicht

wesentlich von Trypsin-generierten Peptiden (~1,8 kDa) unterscheiden. Eine vielversprechende Alternative könnte der chemische Verdau, z.B. mit Cyanbromid (CNBr), liefern, da vorzugsweise Peptide an den Aminosäuren Met, Cys und Trp gespalten werden, die sehr viel seltener im humanen Proteom auftreten als Lys oder Arg und somit deutlich längere Peptide im middle-down-Bereich von 3-15 kDa entstehen [214]. Ebenfalls hochinteressant wären Proteasen wie OmpT, die spezifisch innerhalb bibasischer Arg und Lys-Kombinationen schneidet und damit Peptide von etwa 7,8 kDa Länge liefert [215]. Generell müsste die Verwendung solcher seltener spaltenden Enzyme jedoch für den Einsatz in einem Experiment zur Charakterisierung von PTM-Crosstalk zunächst eingehend geprüft werden. Auch der Einsatz für ChaFRADIC-basierte Verfahren müsste zunächst eingehender untersucht werden, da es sich um ladungsbasierte Anreicherungen handelt und veränderte Enzymspezifitäten sich negativ auf den Anreicherungsmechanismus auswirken könnten. Generell befinden sich solche Art von Studien noch im Anfangsstadium und es gilt einige Herausforderungen zu bewältigen: (i) so müssten zunächst weitere geeignete Methoden etabliert, (ii) aber auch bereits bestehende in sinnvoller Weise kombiniert werden. Im Idealfall sollte darüber hinaus ein solches Experiment (iii) zeitaufgelöst quantitative Veränderungen von PTM- und Proteinabundanzen darstellen können, (iv) absolute Quantifizierung zur Bestimmung von PTM-Stöchiometrien beinhalten und (v) eine gewisse Robustheit aufweisen, so dass sie nicht nur auf homogene Zellkultur-basierenden sondern beispielsweise auch auf klinische Proben angewendet werden können. (vi) Schlussendlich gilt es die entstehenden enormen Datenmengen zu integrieren, um eine sinnvolle Datenauswertung zu ermöglichen und einzelnen PTM-Mustern bestimmte Funktionen zuzuordnen [14]. Unter Berücksichtigung all dieser ausstehenden Entwicklungen, kann jedoch bereits jetzt zusammenfassend gesagt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden einen wichtigen Beitrag eben dazu leisten. Mit ChaFRADIC wurde eine sensitive, robuste und vor allem wandlungsfähige Methode geschaffen, mit der die Anreicherung unterschiedlicher PTM-Peptide unter Beibehaltung des grundlegenden Prinzips gelingt. Darüber hinaus könnte sie auch in Kombination mit anderen bestehenden Methoden verwendet werden und damit Subproteome abdecken, die bisher nur unzureichend erfasst wurden. So ist das ChaFRADIC zur Anreicherung N-terminaler Peptide beispielsweise die zurzeit sensitivste Methode und die abgewandelte Form zur Kartierung von Disulfidpositionen die einzige Chromatographie-basierte Technik überhaupt. Zudem vereinfacht die hier durchgeführte Optimierung des bestehenden IP-Protokolls zur Anreicherung ubiquitiniertes Peptide, solche Kombinationsexperimente enorm, da auf Grund der reduzierten Probenmengen sich auch der

Einsatz des Gesamtmaterials für solche Versuche deutlich verringert. Wie in Abschnitt 4.4. bereits gezeigt, lassen sich die etablierte Methoden auch relativ einfach mit anderen bestehenden Chromatographie-/ (TiO₂-Anreicherung) sowie Immunaффinitäts-basierten Verfahren (Anti-GlyGly-Antikörper) kombinieren. Damit zeigen sie ein enormes Potential für die Aufklärung der PTM-gesteuerten Kontrolle von zellulären Prozessen und ihrer Abhängigkeiten. Ein wichtiger Schritt für die Zukunft wäre zudem, die apparativ aufwendige Methode, die eine gut gewartete dedizierte HPLC benötigt, auf eine einfachere Plattform, z.B. ein SPE-basiertes Verfahren zu transferieren, was aktuell Gegenstand der Forschung ist und womit erste Ergebnisse erzielt werden konnten [216].

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Promotion konnte das neuartige *ChaFRADIC* zur Anreicherung post-translational modifizierter Peptide aus komplexen biologischen Proben etabliert werden. Das entwickelte Prinzip basiert dabei auf einer optimierten und reproduzierbaren Auftrennung von Peptiden nach ihrem Ladungszustand mittels zwei-dimensionaler Kationenaustauschchromatographie bei pH 2,7. Die während der ersten Auftrennung erhaltenen Fraktionen mit Peptiden unterschiedlicher Ladung (+1, +2, +3, +4, >+4) werden einzeln spezifisch derivatisiert und rechromatographiert. Diese Derivatisierung dient dazu, gezielt den Ladungszustand einer Subklasse von Peptiden zu verändern, und induziert somit eine Veränderung des Retentionszeitfensters bei der Rechromatographie. Dieses Prinzip konnte zur Anreicherung N-terminaler sowie Disulfid-verbrückter Peptide eingesetzt werden und kann durch geringe Abwandlungen zudem auf weitere PTM-Subklassen übertragen werden. Durch Einsatz für eine differentielle Analyse proteolytisch prozessierter N-Termini in *S. cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* konnten 88 bisher unbekannte Substrate der Peptidase *icp55* identifiziert werden, was neue Einblicke in die molekularen Prozesse zur Stabilisierung des mitochondrialen Proteoms lieferte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *ChaFRADIC* bereits etablierte Methoden in Bezug auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit übertrifft und eine differentielle Analyse von fast 3000 N-terminalen Peptiden aus bis zu 8 verschiedenen Proben in nur einem Experiment erlaubt. Damit stellt es eine wertvolle Alternative zur Charakterisierung des N-Terminoms dar. Durch Transfer der Methode auf Disulfid-verbrückte Peptide, konnten zudem erstmalig Disulfidpositionen für über 2400 Peptide in 6 verschiedenen Proben quantifiziert werden, da bisher keine alternative Methode zur Anreicherung aus komplexen Gemischen existierte. Weiterhin wurde ein bestehendes Protokoll der Immunaффinitäts-basierten Anreicherung ubiquitiniertes Peptide grundlegend optimiert, so dass 20-mal weniger Ausgangsmaterial eingesetzt werden musste und damit eine deutlich kosteneffizientere Technik geschaffen wurde. Alle hier entwickelten Methoden bieten ein enormes Potential für die PTM-fokussierten Proteomanalyse, da sie (i) das Methodenrepertoire erweitern, (ii) bestehende Methoden in Bezug auf Sensitivität und Wandelbarkeit übertreffen und (iii) in Kombination mit existierenden Methoden eine umfassende Analyse von PTM-Crosstalk und dessen Einfluss auf zelluläre Abläufe erlauben.

7 SUMMARY

In this work, a novel method *ChaFRADIC* could be established for the enrichment of post-translationally modified peptides out of complex biological samples. The principle developed here is based on an optimized separation of peptides according to their charge states using two-dimensional strong cation exchange chromatography at pH 2.7. Each charge state fraction (+1, +2, +3, +4, >+4) obtained from the 1st dimension HPLC separation was specifically derivatized which serves to selectively change the charge state of a subclass of peptides, thus inducing a shift in the retention time during rechromatography (2nd dimension). This principle was used for the enrichment of N-terminal and disulfide-bridged peptides and can be transferred to enrich other PTM subclasses with minor modifications. Applying ChaFRADIC for differential analysis of proteolytically processed N-termini in *S. cerevisiae* and *A. thaliana* 88 so far unknown substrates of the peptidase icp55 could be identified, which provides novel insights into the molecular processes involved in stabilization of the mitochondrial proteome. Furthermore, it has been shown that ChaFRADIC exceeds established methods in terms of sensitivity and reproducibility and permits a differential analysis of almost 3,000 N-terminal peptides from up to 8 different samples in one experiment providing a valuable tool for characterization of the N-terminome. Next, applying the method to disulfide-bond peptides led to quantification of over 2,400 disulfide positions in 6 different samples for the first time due to the absence of an alternative method. Lastly, optimization of an existing protocol for immunoaffinity-based enrichment of ubiquitinated peptides enabled to reduce the amount of starting material by 20-times. To summarize, these established methods have tremendous potential for PTM-focused proteome research since they (i) broaden the method repertoire, (ii) surpass existing methods regarding sensitivity and variable use, and (iii) in combination with existing methods, allow a comprehensive analysis of PTM-crosstalk and its involvement on cellular processes.

8 DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit sowie bei der schriftlichen Umsetzung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Albert Sickmann, dem Direktor des Instituts für analytische Wissenschaften (ISAS) in Dortmund, der es mir möglich machte eine Doktorarbeit über ein äußerst interessantes, ergiebiges und zukunftsweisendes Thema anzufertigen, bei der ich mir zudem ein wertvolles technisches Know-How aneignen durfte. Das erlangte Wissen und die vielen Erfahrungen, die ich während dieser Zeit sammeln durfte, werden vermutlich mein ganzes weiteres Berufsleben bestimmen und eröffnen mir einen Einstieg in ein sehr spezielles, aber auch ungemein spannendes Fachgebiet.

Weiterhin bedanke mich herzlich bei meinen weiteren Prüfern Herrn Prof. Dr. Oliver Kayser und Herrn Prof. Dr. Andrzej Gorak für ihre Zeit, die ausgesprochen gute Vorbereitung auf ein spezielles Thema und die vielen abwechslungsreichen Fragen, die die Prüfung durchweg spannend gestalteten.

Herrn Dr. René Zahedi möchte ich für die stets fachkundige Betreuung danken. Er zeigte immer ein bemerkenswertes Interesse an allen Fortschritten aber auch Rückschritten meiner Arbeit, stand mit Ratschlägen, Denkanstößen und auch mit der manchmal nötigen Kritik zur Seite und sorgte schlussendlich dafür, dass ich diese Arbeit mit einem guten Ergebnis abschließen konnte. Nicht zuletzt ist es ihm zu verdanken, dass ich viele interessante Fragestellungen bearbeiten, zahllose neue Kontakte knüpfen und an einer großen Zahl von inspirierenden Forschungsoperationen mitwirken durfte.

Für die tolle Arbeitsatmosphäre geht mein Dank an die gesamte Arbeitsgruppe, ganz besonders für das tägliche stets respektvolle Miteinander, die Hilfsbereitschaft aller Teammitglieder und viele schöne Momente auch mal abseits vom Arbeitsleben. Insbesondere bedanke ich mich bei Clarissa Dickhut, meiner langjährigen Bürokollegin, für die tolle Zusammenarbeit und lebhaften Diskussionen sowie Fiorella Solari, Stefan Loroch und Oliver Pagel für die vielen heiteren Momente und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei vielen Projekten und mitunter auftretenden Problemen.

9 LEBENS LAUF

Geburtsdatum / -ort 15.10.1985 in Bergen (auf Rügen)
 Staatsangehörigkeit deutsch
 Familienstand ledig, keine Kinder



Seit 01/2017

Post-Doktorandin*Bayer AG, Wuppertal*

- Division Pharmaceuticals, Abteilung Drug Discovery & Forschungskinetik

04/2012 – 09/2017

Promotion*Technische Universität, Dortmund*

- Fakultät für Bio-/ und Chemieingenieurwesen
- Externe Promotion am Leibniz Institut f. Analytische Wissenschaften, ISAS e.V.
- **Thema:** „Charakterisierung der Wechselwirkung post-translationaler Modifikationen mittels Massenspektrometrie-basierter Proteomforschung“

10/2005 – 01/2012

Studium der Biologie (Diplom)*Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*

- **Schwerpunkt:** Toxikologie, Molekulare Physiologie/ Pathologie
- Externe Diplomarbeit am Leibniz Institut f. Analytische Wissenschaften, ISAS e.V.
- **Thema:** „Etablierung und Validierung eines automatisierten Flüssigchromatographie-basierten Verfahrens für die quantitative Phosphoproteomanalyse“
- Abschlussnote: 1,6

08/1996 – 04/2005

Gymnasium, Abschluss mit Abitur*Archigymnasium, Soest*

10 EIDESSTATTLICHE 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 15.03.2018

11 LITERATURVERZEICHNIS

1. <http://prospector.ucsf.edu>.
 2. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF: **The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.** *Science* 1997, **277**(5331):1453-1462.
 3. Secretary TWH-OotP: **President Clinton announces the completion of the first survey of the entire humane genome.** 2000.
 4. Human Genome Sequencing C: **Finishing the euchromatic sequence of the human genome.** *Nature* 2004, **431**(7011):931-945.
 5. Collins FS, Morgan M, Patrinos A: **The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology.** *Science* 2003, **300**(5617):286-290.
 6. Tress ML, Martelli PL, Frankish A, Reeves GA, Wesselink JJ, Yeats C, Ísólfur Ólason P, Albrecht M, Hegyi H, Giorgetti A: **The implications of alternative splicing in the ENCODE protein complement.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(13):5495-5500.
 7. Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tomé P, Aggarwal A, Bajorek E *et al*: **A Gene Map of the Human Genome.** *Science* 1996, **274**(5287):540-546.
 8. Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, Thomas WK, Tucker A, Oakley TH, Tokishita S, Aerts A, Arnold GJ, Basu MK *et al*: **The Ecoresponsive Genome of Daphnia pulex.** *Science* 2011, **331**(6017):555-561.
 9. Lovric J: **Introducing Proteomics: From concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis:** Wiley; 2011.
 10. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R: **Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.** *Molecular and Cellular Biology* 1999, **19**(3):1720-1730.
 11. Vogel C, Marcotte EM: **Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses.** *Nature Reviews Genetics* 2012, **13**(4):227-232.
 12. Angeletti RH: **Proteins: Analysis and Design:** Elsevier Science; 1998.
 13. Hunter T: **The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond.** *Molecular cell* 2007, **28**(5):730-738.
 14. Venne AS, Kollipara L, Zahedi RP: **The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications.** *Proteomics* 2014, **14**(4-5):513-524.
 15. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek M-C, Yates III JR: **Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics.** *Chemical reviews* 2013, **113**(4):2343-2394.
 16. Gstaiger M, Aebersold R: **Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**(9):617-627.
 17. Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, Claassen M, Ori A, Szymiorska A, Herzog F, Rinner O, Ellenberg J, Aebersold R: **The quantitative proteome of a human cell line.** *Molecular systems biology* 2011, **7**(1):549.
 18. Nagaraj N, Kulak NA, Cox J, Neuhauser N, Mayr K, Hoerning O, Vorm O, Mann M: **System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top Orbitrap.** *Mol Cell Proteomics* 2012, **11**(3):20.
 19. Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M: **Global quantification of mammalian gene expression control.** *Nature* 2011, **473**(7347):337-342.
 20. Arnesen T, Van Damme P, Polevoda B, Helsens K, Evjenth R, Colaert N, Varhaug JE, Vandekerckhove J, Lillehaug JR, Sherman F: **Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106**(20):8157-8162.
 21. Roth S, Fromm B, Gäde G, Predel R: **A proteomic approach for studying insect phylogeny: CAPA peptides of ancient insect taxa (Dictyoptera, Blattoptera) as a test case.** *BMC evolutionary biology* 2009, **9**(1):50.
-

22. De la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Maroto AS, Donado A, Zubiri I, Posada M, Padial LR, Pinto AG, Barderas MG, Vivanco F: **A proteomic focus on the alterations occurring at the human atherosclerotic coronary intima.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2011, **10**(4):M110. 003517.
23. Sodek KL, Evangelou AI, Ignatchenko A, Agochiya M, Brown TJ, Ringuette MJ, Jurisica I, Kislinger T: **Identification of pathways associated with invasive behavior by ovarian cancer cells using multidimensional protein identification technology (MudPIT).** *Molecular BioSystems* 2008, **4**(7):762-773.
24. Weigl BH, Bardell RL, Cabrera CR: **Lab-on-a-chip for drug development.** *Advanced drug delivery reviews* 2003, **55**(3):349-377.
25. Rix U, Superti-Furga G: **Target profiling of small molecules by chemical proteomics.** *Nat Chem Biol* 2009, **5**(9):616-624.
26. Hanash S: **Disease proteomics.** *Nature* 2003, **422**(6928):226-232.
27. Sung FL, Pang RT, Ma BB, Lee MM, Chow SM, Poon TC, Chan AT: **Pharmacoproteomics study of cetuximab in nasopharyngeal carcinoma.** *Journal of proteome research* 2006, **5**(12):3260-3267.
28. Gao Y, Holland RD, Yu L-R: **Quantitative proteomics for drug toxicity.** *Briefings in Functional Genomics* 2009:elp006.
29. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW: **Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer.** *Clinical chemistry* 2002, **48**(8):1296-1304.
30. Craig-Schapiro R, Fagan AM, Holtzman DM: **Biomarkers of Alzheimer's disease.** *Neurobiology of Disease* 2009, **35**(2):128-140.
31. Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, Testa JE, Schnitzer JE: **Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy.** *Nature* 2004, **429**(6992):629-635.
32. Marko-Varga G, Ogiwara A, Nishimura T, Kawamura T, Fujii K, Kawakami T, Kyono Y, Tu H-k, Anyoji H, Kanazawa M: **Personalized medicine and proteomics: lessons from non-small cell lung cancer.** *Journal of proteome research* 2007, **6**(8):2925-2935.
33. Ginsburg GS, McCarthy JJ: **Personalized medicine: revolutionizing drug discovery and patient care.** *Trends in Biotechnology* 2001, **19**(12):491-496.
34. Rassow J, Deutzmann R, Netzker R, Hauser K: **Duale Reihe Biochemie:** Thieme; 2012.
35. Ryadnov M, Brunsveld L, Suga H: **Synthetic Biology:** Royal Society of Chemistry; 2014.
36. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ: **Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications.** *Angewandte Chemie International Edition* 2005, **44**(45):7342-7372.
37. Consortium U: **The universal protein resource (UniProt).** *Nucleic acids research* 2008, **36**(suppl 1):D190-D195.
38. Brown JS, Jackson SP: **Ubiquitylation, neddylation and the DNA damage response,** vol. 5; 2015.
39. Mukhopadhyay D, Riezman H: **Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling.** *Science* 2007, **315**(5809):201-205.
40. Huesgen PF, Overall CM: **N- and C-terminal degradomics: new approaches to reveal biological roles for plant proteases from substrate identification.** *Physiologia Plantarum* 2012, **145**(1):5-17.
41. Van Damme P, Staes A, Bronsoms S, Helsens K, Colaert N, Timmerman E, Aviles FX, Vandekerckhove J, Gevaert K: **Complementary positional proteomics for screening substrates of endo-and exoproteases.** *Nature methods* 2010, **7**(7):512-515.
42. Petrov D, Margreitter C, Grandits M, Oostenbrink C, Zagrovic B: **A Systematic Framework for Molecular Dynamics Simulations of Protein Post-Translational Modifications.** *PLoS Computational Biology* 2013, **9**(7):e1003154.
43. Hang HC, Linder ME: **Exploring protein lipidation with chemical biology.** *Chemical reviews* 2011, **111**(10):6341-6358.

44. Jensen ON: **Interpreting the protein language using proteomics.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**(6):391-403.
 45. Ubersax JA, Ferrell JE, Jr.: **Mechanisms of specificity in protein phosphorylation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(7):530-541.
 46. Neupert W: **PROTEIN IMPORT INTO MITOCHONDRIA.** *Annual Review of Biochemistry* 1997, **66**(1):863-917.
 47. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S: **The Protein Kinase Complement of the Human Genome.** *Science* 2002, **298**(5600):1912-1934.
 48. Bhattacharyya RP, Reményi A, Yeh BJ, Lim WA: **Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits.** *Annu Rev Biochem* 2006, **75**:655-680.
 49. Pawson T, Scott JD: **Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins.** *Science* 1997, **278**(5346):2075-2080.
 50. Wandinger SK, Richter K, Buchner J: **The Hsp90 Chaperone Machinery.** *Journal of Biological Chemistry* 2008, **283**(27):18473-18477.
 51. Wang X, Pattison JS, Su H: **Posttranslational Modification and Quality Control.** *Circulation Research* 2013, **112**(2):367-381.
 52. Walsh C: **Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory:** Roberts and Co. Publishers; 2006.
 53. Khater S, Mohanty D: **novPTMenzy: a database for enzymes involved in novel post-translational modifications.** *Database* 2015, **29**(10).
 54. Kessler BM, Edelman MJ: **PTMs in conversation: activity and function of deubiquitinating enzymes regulated via post-translational modifications.** *Cell Biochem Biophys* 2011, **60**(1-2):21-38.
 55. DeHart CJ, Chahal JS, Flint S, Perlman DH: **Extensive post-translational modification of active and inactivated forms of endogenous p53.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2014, **13**(1):1-17.
 56. Latham JA, Dent SY: **Cross-regulation of histone modifications.** *Nature structural & molecular biology* 2007, **14**(11):1017-1024.
 57. Gu B, Zhu W-G: **Surf the post-translational modification network of p53 regulation.** *International journal of biological sciences* 2012, **8**(5):672.
 58. Benayoun BA, Veitia RA: **A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals.** *Trends in cell biology* 2009, **19**(5):189-197.
 59. Young NL, Plazas-Mayorca MD, Garcia BA: **Systems-wide proteomic characterization of combinatorial post-translational modification patterns.** 2010.
 60. Sims RJ, Reinberg D: **Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications?** *Nature reviews Molecular cell biology* 2008, **9**(10):815-820.
 61. Berg JM, Held A, Stryer L, Lange C, Mahlke K, Maxam G, Seidler L, Zellerhoff N, Häcker B, Jarosch B: **Stryer Biochemie:** Springer Berlin Heidelberg; 2015.
 62. Knippers R: **Molekulare Genetik:** Thieme; 2006.
 63. Janke C: **The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions.** *J Cell Biol* 2014, **206**(4):461-472.
 64. Yamashita M, Fenn JB: **Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme.** *The Journal of Physical Chemistry* 1984, **88**(20):4451-4459.
 65. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M: **Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis.** *Nat Methods* 2007, **4**(9):709-712.
 66. Frese CK, Altelaar AM, Hennrich ML, Nolting D, Zeller M, Griep-Raming J, Heck AJ, Mohammed S: **Improved peptide identification by targeted fragmentation using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos.** *Journal of proteome research* 2011, **10**(5):2377-2388.
 67. Patterson SD, Aebersold RH: **Proteomics: the first decade and beyond.** *Nature genetics* 2003, **33**:311-323.
-

68. Yates JR: **Mass spectrometry and the age of the proteome.** *Journal of Mass Spectrometry* 1998, **33**(1):1-19.
 69. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS: **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.** *ELECTROPHORESIS* 1999, **20**(18):3551-3567.
 70. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1995, **57**(1):289-300.
 71. Kall L, Storey JD, MacCoss MJ, Noble WS: **Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases.** *J Proteome Res* 2008, **7**(1):29-34.
 72. Elias JE, Gygi SP: **Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry.** *Nature Methods* 2007, **4**:207.
 73. Vaudel M, Burkhardt JM, Sickmann A, Martens L, Zahedi RP: **Peptide identification quality control.** *PROTEOMICS* 2011, **11**(10):2105-2114.
 74. Zhang J, Xin L, Shan B, Chen W, Xie M, Yuen D, Zhang W, Zhang Z, Lajoie GA, Ma B: **PEAKS DB: De Novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2011.
 75. Fu Y, Qian X: **Transferred Subgroup False Discovery Rate for Rare Post-translational Modifications Detected by Mass Spectrometry.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2014, **13**(5):1359-1368.
 76. Chervet JP, Ursem M, Salzmann JP: **Instrumental Requirements for Nanoscale Liquid Chromatography.** *Analytical Chemistry* 1996, **68**(9):1507-1512.
 77. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM: **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.** *Science* 1989, **246**(4926):64-71.
 78. Wilm M, Shevchenko A, Houthaevae T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M: **Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry.** 1996.
 79. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR: **Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry.** *Nature biotechnology* 1999, **17**(7):676-682.
 80. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR: **An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics.** *Analytical chemistry* 2001, **73**(23):5683-5690.
 81. Alpert AJ, Andrews PC: **Cation-exchange chromatography of peptides on poly(2-sulfoethyl aspartamide)-silica.** *Journal of Chromatography A* 1988, **443**:85-96.
 82. Motoyama A, Yates JR: **Multidimensional LC Separations in Shotgun Proteomics.** *Analytical Chemistry* 2008, **80**(19):7187-7193.
 83. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B: **Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review.** *Analytical and bioanalytical chemistry* 2007, **389**(4):1017-1031.
 84. Boersema PJ, Raijmakers R, Lemeer S, Mohammed S, Heck AJR: **Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics.** *Nat Protocols* 2009, **4**(4):484-494.
 85. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S: **Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2004, **3**(12):1154-1169.
 86. Choe L, D'Ascenzo M, Relkin NR, Pappin D, Ross P, Williamson B, Guertin S, Pribil P, Lee KH: **8-Plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease.** *Proteomics* 2007, **7**(20):3651-3660.
 87. Viner R, Bomgarden R, Blank M, Rogers J: **Increasing the Multiplexing of Protein Quantitation from 6-to 10-Plex with Reporter Ion Isotopologues.** In: *61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics Minneapolis Convention Center, MN, USA: 2013; 2013.*
-

88. Sadowski PG, Dunkley TPJ, Shadforth IP, Dupree P, Bessant C, Griffin JL, Lilley KS: **Quantitative proteomic approach to study subcellular localization of membrane proteins.** *Nat Protocols* 2006, **1**(4):1778-1789.
89. Smith LM, Kelleher NL: **Proteoform: a single term describing protein complexity.** *Nat Meth* 2013, **10**(3):186-187.
90. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T: **The ubiquitin pathway in Parkinson's disease.** *Nature* 1998, **395**(6701):451-452.
91. Shimura H, Hattori N, Kubo S-i, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K: **Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase.** *Nature genetics* 2000, **25**(3):302-305.
92. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM: **Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.** *Science* 2006, **314**(5796):130-133.
93. Kim W, Bennett Eric J, Huttlin Edward L, Guo A, Li J, Possemato A, Sowa Mathew E, Rad R, Rush J, Comb Michael J *et al*: **Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome.** *Molecular cell* 2011, **44**(2):325-340.
94. Prudova A, Serrano K, Eckhard U, Fortelny N, Devine DV, Overall CM: **TAILS N-terminomics of human platelets reveals pervasive metalloproteinase-dependent proteolytic processing in storage.** *Blood* 2014, **124**(26):e49-60.
95. Thingholm TE, Larsen MR, Ingrell CR, Kassem M, Jensen ON: **TiO₂-based phosphoproteomic analysis of the plasma membrane and the effects of phosphatase inhibitor treatment.** *Journal of proteome research* 2008, **7**(8):3304-3313.
96. Nørregaard Jensen O: **Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry.** *Current Opinion in Chemical Biology* 2004, **8**(1):33-41.
97. Lundblad RL, Macdonald F: **Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition:** CRC Press; 2010.
98. Fasman GD: **Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology:** Taylor & Francis; 1989.
99. Katz AM, Dreyer WJ, Anfinsen CB: **Peptide separation by two-dimensional chromatography and electrophoresis.** *Journal of Biological Chemistry* 1959, **234**(11):2897-2900.
100. Gracy RW: **[22] Two-dimensional thin-layer methods.** In: *Methods in Enzymology. Volume Volume 47*, edn.: Academic Press; 1977: 195-204.
101. Venne AS, Zahedi RP: **The potential of fractional diagonal chromatography strategies for the enrichment of post-translational modifications.** *EuPA Open Proteomics* 2014, **4**:165-170.
102. Svinkina T, Gu H, Silva JC, Mertins P, Qiao J, Fereshetian S, Jaffe JD, Kuhn E, Udeshi ND, Carr SA: **Deep, quantitative coverage of the lysine acetylome using novel anti-acetyl-lysine antibodies and an optimized proteomic workflow.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2015:mcp. O114. 047555.
103. Choudhary C, Weinert BT, Nishida Y, Verdin E, Mann M: **The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**(8):536-550.
104. Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha X-M, Polakiewicz RD, Comb MJ: **Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells.** *Nat Biotech* 2005, **23**(1):94-101.
105. Boersema PJ, Foong LY, Ding VM, Lemeer S, van Breukelen B, Philp R, Boekhorst J, Snel B, den Hertog J, Choo AB: **In-depth qualitative and quantitative profiling of tyrosine phosphorylation using a combination of phosphopeptide immunoaffinity purification and stable isotope dimethyl labeling.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2010, **9**(1):84-99.
106. Udeshi ND, Svinkina T, Mertins P, Kuhn E, Mani D, Qiao JW, Carr SA: **Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K-ε-GG) antibody enables routine quantification of 10,000 s**

- of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Molecular & Cellular Proteomics* 2013, **12**(3):825-831.**
107. Xu G, Paige JS, Jaffrey SR: **Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling.** *Nature biotechnology* 2010, **28**(8):868-873.
108. Udeshi ND, Mertins P, Svinkina T, Carr SA: **Large-scale identification of ubiquitination sites by mass spectrometry.** *Nat Protocols* 2013, **8**(10):1950-1960.
109. Eriksson AIK, Edwards K, Hagfeldt A, Hernández VcA: **Physicochemical Characterization of Phosphopeptide/Titanium Dioxide Interactions Employing the Quartz Crystal Microbalance Technique.** *The Journal of Physical Chemistry B* 2013, **117**(7):2019-2025.
110. Kuroda I, Takahashi K, Nakamura H: **Using variation in phosphorylation as analytical tool in biopolymer analysis; proteomics; genomics; separation analysis.** In.: Google Patents; 2003.
111. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR: **Enrichment and separation of mono-and multiply phosphorylated peptides using sequential elution from IMAC prior to mass spectrometric analysis.** In: *Phospho-Proteomics*. edn.: Springer; 2009: 67-78.
112. Cantin GT, Shock TR, Park SK, Madhani HD, Yates JR: **Optimizing TiO₂-based phosphopeptide enrichment for automated multidimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.** *Analytical Chemistry* 2007, **79**(12):4666-4673.
113. Han D, Jin J, Yu J, Kim K, Kim Y: **Integrated approach using multistep enzyme digestion, TiO₂ enrichment, and database search for in-depth phosphoproteomic profiling.** *Proteomics* 2015, **15**(2-3):618-623.
114. Pinkse MW, Uitto PM, Hilhorst MJ, Ooms B, Heck AJ: **Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns.** *Analytical Chemistry* 2004, **76**(14):3935-3943.
115. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJ: **Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2005, **4**(7):873-886.
116. Hennrich ML, van den Toorn HW, Groenewold V, Heck AJ, Mohammed S: **Ultra acidic strong cation exchange enabling the efficient enrichment of basic phosphopeptides.** *Analytical Chemistry* 2012, **84**(4):1804-1808.
117. Gevaert K, Van Damme J, Goethals M, Thomas GR, Hoorelbeke B, Demol H, Martens L, Puype M, Staes A, Vandekerckhove J: **Chromatographic isolation of methionine-containing peptides for gel-free proteome analysis Identification of more than 800 Escherichia coli proteins.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2002, **1**(11):896-903.
118. Staes A, Van Damme P, Helsens K, Demol H, Vandekerckhove J, Gevaert K: **Improved recovery of proteome-informative, protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography (COFRADIC).** *Proteomics* 2008, **8**(7):1362-1370.
119. Gevaert K, Goethals M, Martens L, Van Damme J, Staes A, Thomas GR, Vandekerckhove J: **Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides.** *Nature biotechnology* 2003, **21**(5):566-569.
120. Gevaert K, Ghesquière B, Staes A, Martens L, Van Damme J, Thomas GR, Vandekerckhove J: **Reversible labeling of cysteine-containing peptides allows their specific chromatographic isolation for non-gel proteome studies.** *Proteomics* 2004, **4**(4):897-908.
121. Ghesquière B, Buyl L, Demol H, Van Damme J, Staes A, Timmerman E, Vandekerckhove J, Gevaert K: **A new approach for mapping sialylated N-glycosites in serum proteomes.** *Journal of proteome research* 2007, **6**(11):4304-4312.
122. Ghesquière B, Colaert N, Helsens K, Dejager L, Vanhaute C, Verleysen K, Kas K, Timmerman E, Goethals M, Libert C: **In vitro and in vivo protein-bound tyrosine nitration characterized by diagonal chromatography.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2009, **8**(12):2642-2652.
123. Gevaert K, Vandekerckhove J: **Reverse-phase diagonal chromatography for phosphoproteome research.** In: *Phospho-Proteomics*. edn.: Springer; 2009: 219-227.
-

124. Stes E, Laga M, Walton A, Samyn N, Timmerman E, De Smet I, Goormachtig S, Gevaert K: **A COFRADIC protocol to study protein ubiquitination.** *Journal of proteome research* 2014, **13**(6):3107-3113.
125. Porter DC, Zhang N, Danes C, McGahren MJ, Harwell RM, Faruki S, Keyomarsi K: **Tumor-Specific Proteolytic Processing of Cyclin E Generates Hyperactive Lower-Molecular-Weight Forms.** *Molecular and Cellular Biology* 2001, **21**(18):6254-6269.
126. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S: **Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.** *Nature* 1980, **284**(5751):67-68.
127. Venne AS, Vögtle F-N, Meisinger C, Sickmann A, Zahedi RP: **Novel highly sensitive, specific, and straightforward strategy for comprehensive N-terminal proteomics reveals unknown substrates of the mitochondrial peptidase Icp55.** *Journal of proteome research* 2013, **12**(9):3823-3830.
128. Mommen GP, van de Waterbeemd B, Meiring HD, Kersten G, Heck AJ, de Jong AP: **Unbiased selective isolation of protein N-terminal peptides from complex proteome samples using phospho tagging (PTAG) and TiO(2)-based depletion.** *Mol Cell Proteomics* 2012, **11**(9):832-842.
129. Kleifeld O, Doucet A, auf dem Keller U, Prudova A, Schilling O, Kainthan RK, Starr AE, Foster LJ, Kizhakkedathu JN, Overall CM: **Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products.** *Nature biotechnology* 2010, **28**(3):281-288.
130. van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK: **Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation.** *Journal of chromatography* 1986, **376**:111-119.
131. Absolom DR, van Oss CJ: **The nature of the antigen-antibody bond and the factors affecting its association and dissociation.** *CRC Critical reviews in immunology* 1986, **6**(1):1-46.
132. Alberts B: **Molekularbiologie der Zelle:** Wiley-VCH-Verlag; 2011.
133. Ferre F, Clote P: **DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(Web Server issue):W182-185.
134. Ferrè F, Clote P: **DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction.** *Nucleic Acids Research* 2005, **33**(Web Server issue):W230-W232.
135. Cheng J, Saigo H, Baldi P: **Large-scale prediction of disulphide bridges using kernel methods, two-dimensional recursive neural networks, and weighted graph matching.** *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2006, **62**(3):617-629.
136. Maddelein D, Colaert N, Buchanan I, Hulstaert N, Gevaert K, Martens L: **The iceLogo web server and SOAP service for determining protein consensus sequences.** *Nucleic Acids Research* 2015, **43**(Web Server issue):W543-W546.
137. Colaert N, Helsens K, Martens L, Vandekerckhove J, Gevaert K: **Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo:** *Nat Methods.* 2009 Nov;**6**(11):786-7. doi: 10.1038/nmeth1109-786.
138. Polpitiya AD, Qian WJ, Jaitly N, Petyuk VA, Adkins JN, Camp DG, 2nd, Anderson GA, Smith RD: **DANTE: a statistical tool for quantitative analysis of -omics data.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2008, **24**(13):1556-1558.
139. Oliveros J: **VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.** <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> 2007.
140. Staes A, Impens F, Van Damme P, Ruttens B, Goethals M, Demol H, Timmerman E, Vandekerckhove J, Gevaert K: **Selecting protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography.** *Nature protocols* 2011, **6**(8):1130-1141.
141. Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, Geiger J, 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, **120**(15):2012-2004.
-

142. Rehm H, Letzel T: **Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics**: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
143. Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, Sporns P: **Handbook of Food Analytical Chemistry, Volume 1: Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates**: Wiley; 2005.
144. Sorensen K, Brodbeck U: **A sensitive protein assay method using micro-titer plates**. *Experientia* 1986, **42**(2):161-162.
145. Henrikson RL, Meredith SC: **Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate**. *Analytical biochemistry* 1984, **136**(1):65-74.
146. Polson A, Potgieter G, Largier J, Mears G, Joubert F: **The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1964, **82**(3):463-475.
147. Sipos T, Merkel JR: **Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin**. *Biochemistry* 1970, **9**(14):2766-2775.
148. Hustoft HK, Malerod H, Wilson SR, Reubsaet L, Lundanes E, Greibrokk T: **A critical review of trypsin digestion for LC-MS based proteomics**. *Integrative Proteomics* 2012:73.
149. Burkhart JM, Schumbrutzki C, Wortelkamp S, Sickmann A, Zahedi RP: **Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics**. *Journal of proteomics* 2012, **75**(4):1454-1462.
150. Pingoud A, Urbanke C: **Arbeitsmethoden der Biochemie**: De Gruyter; 2013.
151. Larsen MR, Graham ME, Robinson PJ, Roepstorff P: **Improved Detection of Hydrophilic Phosphopeptides Using Graphite Powder Microcolumns and Mass Spectrometry: Evidence for in Vivo Doubly Phosphorylated Dynamin I and Dynamin III**. *Molecular & Cellular Proteomics* 2004, **3**(5):456-465.
152. Eeltink S, Dolman S, Detobel F, Swart R, Ursem M, Schoenmakers PJ: **High-efficiency liquid chromatography–mass spectrometry separations with 50mm, 250mm, and 1m long polymer-based monolithic capillary columns for the characterization of complex proteolytic digests**. *Journal of Chromatography A* 2010, **1217**(43):6610-6615.
153. Meisinger C, Sommer T, Pfanner N: **Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations**. *Anal Biochem* 2000, **287**(2):339-342.
154. Carrie C, Venne AS, Zahedi RP, Soll J: **Identification of cleavage sites and substrate proteins for two mitochondrial intermediate peptidases in *Arabidopsis thaliana***. *J Exp Bot* 2015, **66**(9):2691-2708.
155. Lister R, Carrie CJ, Duncan OR, Ho L, Howell K, Murcha M, Whelan J: **Functional Definition of Outer Membrane Proteins Involved in Preprotein Import into Mitochondria**. *The Plant Cell* 2007, **19**(Refereed article in scholarly journal (C1)):3739-3759.
156. Venne AS, Solari FA, Faden F, Paretti T, Dissmeyer N, Zahedi RP: **An improved workflow for quantitative N-terminal charge-based fractional diagonal chromatography (ChaFRADIC) to study proteolytic events in *Arabidopsis thaliana***. *Proteomics* 2015, **22**(10):201500014.
157. Walker J: **The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation**. In: *The Protein Protocols Handbook*. edn. Edited by Walker J: Humana Press; 2009: 11-15.
158. Jentoft N, Dearborn DG: **Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride**: American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 1979.
159. Botelho D, Wall MJ, Vieira DB, Fitzsimmons S, Liu F, Doucette A: **Top-Down and Bottom-Up Proteomics of SDS-Containing Solutions Following Mass-Based Separation**. *Journal of Proteome Research* 2010, **9**(6):2863-2870.
160. Gonczarowska-Jorge H, Dell'Aica M, Dickhut C, Zahedi RP: **Variable digestion strategies for phosphoproteomics analysis**. *Phospho-Proteomics: Methods and Protocols* 2016:225-239.
161. Rosenberg IM: **Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques**: Birkhäuser Boston; 2013.

162. Finehout EJ, Cantor JR, Lee KH: **Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin.** *Proteomics* 2005, **5**(9):2319-2321.
163. Thingholm TE, Palmisano G, Kjeldsen F, Larsen MR: **Undesirable charge-enhancement of isobaric tagged phosphopeptides leads to reduced identification efficiency.** *J Proteome Res* 2010, **9**(8):4045-4052.
164. Michalski A, Damoc E, Hauschild J-P, Lange O, Wieghaus A, Makarov A, Nagaraj N, Cox J, Mann M, Horning S: **Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer.** *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 2011, **10**(9):M111.011015.
165. Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ: **Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets.** *Nature Methods* 2007, **4**:923.
166. The M, MacCoss MJ, Noble WS, Käll L: **Fast and Accurate Protein False Discovery Rates on Large-Scale Proteomics Data Sets with Percolator 3.0.** *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 2016, **27**(11):1719-1727.
167. Brosch M, Yu L, Hubbard T, Choudhary J: **Accurate and Sensitive Peptide Identification with Mascot Percolator.** *Journal of Proteome Research* 2009, **8**(6):3176-3181.
168. Heazlewood JL, Verboom RE, Tonti-Filippini J, Small I, Millar AH: **SUBA: the Arabidopsis Subcellular Database.** *Nucleic Acids Research* 2007, **35**(Database issue):D213-D218.
169. Kojer K, Bien M, Gangel H, Morgan B, Dick TP, Riemer J: **Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state.** *The EMBO journal* 2012, **31**(14):3169-3182.
170. Cumming RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH, Schubert D: **Protein Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm during Oxidative Stress.** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(21):21749-21758.
171. Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM: **Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process.** *Science* 2009, **324**(5932):1284-1287.
172. Crankshaw MW, Grant GA: **Modification of cysteine.** *Curr Protoc Protein Sci* 2001, **15**(1).
173. Link AJ, LaBaer J: **Solution Protein Digest.** *Cold Spring Harbor Protocols* 2011, **2011**(2):pdb.prot5569.
174. Liebler DC, Ham A-JL: **Spin filter-based sample preparation for shotgun proteomics.** *Nature methods* 2009, **6**(11):785-785.
175. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M: **Universal sample preparation method for proteome analysis.** *Nature methods* 2009, **6**(5):359-362.
176. Dammer EB, Na CH, Xu P, Seyfried NT, Duong DM, Cheng D, Gearing M, Rees H, Lah JJ, Levey AI *et al*: **Polyubiquitin linkage profiles in three models of proteolytic stress suggest the etiology of Alzheimer disease.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(12):10457-10465.
177. Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M, Choudhary C: **A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles.** *Mol Cell Proteomics* 2011, **10**(10).
178. Nielsen ML, Vermeulen M, Bonaldi T, Cox J, Moroder L, Mann M: **Iodoacetamide-induced artifact mimics ubiquitination in mass spectrometry.** *Nature methods* 2008, **5**(6):459-460.
179. <https://www.cellsignal.com/products/proteomic-analysis-products/ubiquitin-remnant-motif-k-e-gg-kit/5562>.
180. Littlefield K, Monroe M: **Venn Diagram Plotter.** *Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA* 2008.
181. Vogtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W, Sickmann A, Pfanner N *et al*: **Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability.** *Cell* 2009, **139**(2):428-439.
182. Varshavsky A: **The N-end rule pathway of protein degradation.** *Genes to Cells* 1997, **2**(1):13-28.

183. Isaya G, Kalousek F, Fenton WA, Rosenberg LE: **Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide.** *The Journal of cell biology* 1991, **113**(1):65-76.
184. Kwasniak M, Pogorzelec L, Migdal I, Smakowska E, Janska H: **Proteolytic system of plant mitochondria.** *Physiologia Plantarum* 2012, **145**(1):187-195.
185. Teixeira PF, Glaser E: **Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2013, **1833**(2):360-370.
186. Vögtle F-N, Prinz C, Kellermann J, Lottspeich F, Pfanner N, Meisinger C: **Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization.** *Molecular Biology of the Cell* 2011, **22**(13):2135-2143.
187. Hendrick JP, Hodges PE, Rosenberg LE: **Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989, **86**(11):4056-4060.
188. Neupert W, Herrmann JM: **Translocation of proteins into mitochondria.** *Annu Rev Biochem* 2007, **76**:723-749.
189. Bohovych I, Chan SSL, Khalimonchuk O: **Mitochondrial Protein Quality Control: The Mechanisms Guarding Mitochondrial Health.** *Antioxidants & Redox Signaling* 2015, **22**(12):977-994.
190. Rupp B: **Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology:** Taylor & Francis Group; 2009.
191. Mesecke N, Bihlmaier K, Grumbt B, Longen S, Terziyska N, Hell K, Herrmann JM: **The zinc-binding protein Hot13 promotes oxidation of the mitochondrial import receptor Mia40.** *EMBO reports* 2008, **9**(11):1107-1113.
192. Mertins P, Qiao JW, Patel J, Udeshi ND, Clauser KR, Mani D, Burgess MW, Gillette MA, Jaffe JD, Carr SA: **Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment.** *Nature methods* 2013, **10**(7):634-637.
193. Zahedi RP: **Joining forces: studying multiple post-translational modifications to understand dynamic disease mechanisms.** *Expert Review of Proteomics* 2016, **13**(12):1055-1057.
194. Craig R, Cortens JP, Beavis RC: **Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data.** *J Proteome Res* 2004, **3**(6):1234-1242.
195. Sagan L: **On the origin of mitosing cells.** *Journal of theoretical biology* 1967, **14**(3):255-274.
196. Margulis L: **Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth.** 1970.
197. Bohnert M, Pfanner N, van der Laan M: **A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins.** *FEBS Letters* 2007, **581**(15):2802-2810.
198. Tinnefeld V, Venne AS, Sickmann A, Zahedi RP: **Enrichment of Cross-Linked Peptides Using Charge-Based Fractional Diagonal Chromatography (ChaFRADIC).** *Journal of Proteome Research* 2017, **16**(2):459-469.
199. Solari FA, Mattheij NJA, Burkhart JM, Swieringa F, Collins PW, Cosemans JMEM, Sickmann A, Heemskerk JWM, Zahedi RP: **Combined quantification of the global proteome, phosphoproteome and proteolytic cleavage to characterize altered platelet functions in the human Scott syndrome.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2016.
200. Saita S, Nolte H, Fiedler KU, Kashkar H, Venne AS, Zahedi RP, Kruger M, Langer T: **PARL mediates Smac proteolytic maturation in mitochondria to promote apoptosis.** 2017, **19**(4):318-328.
201. Bujacz A: **Structures of bovine, equine and leporine serum albumin.** *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2012, **68**(Pt 10):1278-1289.
202. Lu S, Fan S-B, Yang B, Li Y-X, Meng J-M, Wu L, Li P, Zhang K, Zhang M-J, Fu Y *et al*: **Mapping native disulfide bonds at a proteome scale.** *Nat Meth* 2015, **12**(4):329-331.
203. Pan K-T, Chen Y-Y, Pu T-H, Chao Y-S, Yang C-Y, Bomgarden RD, Rogers JC, Meng T-C, Khoo K-H: **Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics for Dissecting Multiplexed Redox**

- Cysteine Modifications in Nitric Oxide-Protected Cardiomyocyte Under Hypoxia.** *Antioxidants & Redox Signaling* 2014, **20**(9):1365-1381.
204. Sevier CS, Kaiser CA: **Formation and transfer of disulphide bonds in living cells.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2002, **3**(11):836-847.
205. Rietsch A, Beckwith J: **The genetics of disulfide bond metabolism.** *Annual review of genetics* 1998, **32**(1):163-184.
206. Cabisco E, Tamarit J, Ros J: **Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species.** *International Microbiology* 2010, **3**(1):3-8.
207. Åslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G: **Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol–disulfide status.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, **96**(11):6161-6165.
208. Schieber M, Chandel Navdeep S: **ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress.** *Current Biology* 2014, **24**(10):R453-R462.
209. van Noort V, Seebacher J, Bader S, Mohammed S, Vonkova I, Betts MJ, Kühner S, Kumar R, Maier T, O'Flaherty M: **Cross-talk between phosphorylation and lysine acetylation in a genome-reduced bacterium.** *Molecular systems biology* 2012, **8**(1):571.
210. Palmisano G, Parker BL, Engholm-Keller K, Lendal SE, Kulej K, Schulz M, Schwämmle V, Graham ME, Saxtorph H, Cordwell SJ: **A novel method for the simultaneous enrichment, identification, and quantification of phosphopeptides and sialylated glycopeptides applied to a temporal profile of mouse brain development.** *Molecular & cellular proteomics* 2012, **11**(11):1191-1202.
211. Ghesquière B, Jonckheere V, Colaert N, Van Durme J, Timmerman E, Goethals M, Schymkowitz J, Rousseau F, Vandekerckhove J, Gevaert K: **Redox proteomics of protein-bound methionine oxidation.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2011, **10**(5):M110. 006866.
212. Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM: **Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature biotechnology* 2002, **20**(3):301-305.
213. Swaney DL, Beltrao P, Starita L, Guo A, Rush J, Fields S, Krogan NJ, Villen J: **Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation.** *Nat Methods* 2013, **10**(7):676-682.
214. Tsiatsiani L, Heck AJ: **Proteomics beyond trypsin.** *FEBS journal* 2015, **282**(14):2612-2626.
215. Wu C, Tran JC, Zamdborg L, Durbin KR, Li M, Ahlf DR, Early BP, Thomas PM, Sweedler JV, Kelleher NL: **A protease for 'middle-down' proteomics.** *Nature methods* 2012, **9**(8):822-824.
216. Shema G, Nguyen MTN, Solari FA, Loroch S, Venne AS, Kollipara L, Sickmann A, Verhelst SH, Zahedi RP: **Simple, scalable and ultra-sensitive tip-based identification of protease substrates.** *Mol Cell Proteomics* 2018.
-
-

12 ANHANG

Tab.1.: Übersicht aller mittels ChaFRADIC identifizierter Icp55 Substrate aus *Arabidopsis thaliana*. Für die gefundenen N-terminalen Peptide wurde jeweils angegeben, ob sie hoch-/ (↑↑) oder runterreguliert (↓↓) waren. Herunterregulierte Peptide repräsentieren das normal prozessierte Protein, so dass anhand dieser die genaue Schnittstelle ermittelt werden konnte, die entfernte Aminosäure wurde jeweils angegeben.

Nr	TAIR Datenbank Name	Δ icp55	Entfernte Aminosäure	Identifizierte Sequenz
1	AT1G17290	↑↑	L	LSSSSSDMSASDSSSSLPVTLDTINPKVIKCEYAVR
		↓↓		SSSSSDMSASDSSSSLPVTLDTINPKVIKCEYAVR
2	AT1G23800	↑↑	Y	YSNLAAAVENTITPPVKVEHTQLLIGGR
		↓↓		SNLAAAVENTITPPVKVEHTQLLIGGR
3	AT1G32350	↑↑	L	LSSDTSSPVSGNQPENPIR
		↓↓		SSDTSSPVSGNQPENPIR
4	AT1G50940	↑↑	I	ISISITSLR
		↓↓		SISITSLR
5	AT2G14170	↑↑	L	LSTSPEQSTQPQMPPR
		↓↓		STSPEQSTQPQMPPR
6	AT2G20360	↑↑	Y	YSSLATKGVGHLAR
		↓↓		SSSLATKGVGHLAR
7	AT3G06050	↑↑	F	FSKLAEGTDITSAAPGVSLQKAR
		↓↓		SKLAEGTDITSAAPGVSLQKAR
8	AT3G13860	↑↑	Y	YAAKDISFGIGAR
		↓↓		AAKDISFGIGAR
9	AT3G13930	↑↑	F	FSSSDLPPHQEIGMPSLSPTMTEGNIAR
		↓↓		SSSDLPPHQEIGMPSLSPTMTEGNIAR
10	AT3G23990	↑↑	Y	YAAKEIKFGVEAR
		↓↓		AAKEIKFGVEAR
11	AT3G44370	↑↑	F	FSTPSDLDELTR
		↓↓		STPSDLDELTR
12	AT3G45770	↑↑	F	FSTIMSPPSKAIVYEEHGSPDSVTR
		↓↓		STIMSPPSKAIVYEEHGSPDSVTR
13	AT3G54980	↑↑	FC	FCSQSQFPKESENPSQEQR
		↓↓		SQSQFPKESENPSQEQR
14	AT4G08900	↑↑	FT	FTSVSASSIEKGQNR
		↓↓		SVSASSIEKGQNR
15	AT4G35460	↑↑	F	FSSAVMNGLETHNTR
		↓↓		SSSAVMNGLETHNTR
16	AT4G36400	↑↑	F	FGSSAASLIQR
		↓↓		GSSAASLIQR
17	AT4G37910	↑↑	FC	FCSRPGNDVIGIDLGTNNSCVSVMMEGKTAR
		↓↓		SRPGNDVIGIDLGTNNSCVSVMMEGKTAR
18	AT5G09450	↑↑	YN	YNADAAIGNSLVEESEKDDLKSR
		↓↓		ADAAIGNSLVEESEKDDLKSR
19	AT5G47630	↑↑	FT	FTSEAAADGGQDQILSR

		↓↓		SEAAADGGQDQLSR
20	AT5G50850	↑↑	Y	YAAGAKEMTVR
		↓↓		AAGAKEMTVR
21	AT5G55070	↑↑	F	FSSDSGDVVEAVVPHMGESITDGTAAFLKKPGDR
		↓↓		SSDSGDVVEAVVPHMGESITDGTAAFLKKPGDR
22	AT4G08390	↑↑	FN	FNSTTAATKSSSDPDQLKNAR
		↓↓		STTAATKSSSDPDQLKNAR
23	AT1G63940	↑↑	L	LVTASFANENR
		↓↓		VTASFANENREFVIVGGGNAAGYAAR
24	AT3G58140	↑↑	F	FSSAAYSPPKMR
		↓↓		SSAAYSPPKMR
25	AT5G04780	↑↑	I	ISVLASYDQEEVSPGR
		↓↓		SVLASYDQEEVSPGR
26	AT5G08670	↑↑	Y	YATSSPASSAAPSSAPAKDEGKKTIDYGGKGAIGR
				ATSSPASSAAPSSAPAKDEGKKTIDYGGKGAIGR
27	AT4G32915	↑↑	Y	YSSDSSSVLQPPDVAR
		↓↓		SSDSSSVLQPPDVAR
28	AT1G77170	↑↑	F	FVTTSSSVTPLSPQDR
		↓↓		VTTSSSVTPLSPQDR
29	AT1G09410	↓↓	Y	STTIPPTANVR
30	AT1G80230	↓↓	I	GSAAADTAVKKR
31	AT1G51965	↓↓	Y	ATKYVAKVTSSSPSGR
32	AT1G71210	↓↓	F	STFTKPSSSIAPGDFLVR
33	AT1G80550	↓↓	L	SVKPISNVDDAKFR
34	AT2G18520		F	FSTATGIDSQTTAYPGAITMSKAKSKLR
		↓↓		STATGIDSQTTAYPGAITMSKAKSKLR
35	AT2G26140		Q	QSSYVGSFAR
		↓↓		SSYVGSFAR
36	AT2G31955	↓↓	F	SSSYAAHQVDQIKDNPVSDMLIDKFGR
37	AT2G38400	↓↓	I	SSTSQAATASVKDSDEFQAR
38	AT2G39795	↓↓	Y	STAIRISSEQLIR
39	AT2G43360		Y	YSSLSAASAEAER
		↓↓		SSLAASAEAER
40	AT2G47510	↓↓	Y	STSFREERDTFGPIQVPSDKLWGAQTQR
41	AT3G02090	↓↓	Y	ASPHILASHNHILSAPETR
42	AT3G15590		L	LSSIADAKDKGDEVVR
		↓↓		SSIADAKDKGDEVVR
43	AT3G22470	↓↓	Y	SSITEAKLSYKER
44	AT3G60510	↓↓	C	SLKLTSEDLDYQVLVEGSGCSR
45	AT4G31810	↓↓	F	SALPNYSASDADFEDQVLVEGKAKSR
46	AT5G08680	↓↓	Y	STSSPANSAPSSAPAKDEGKKTIDYGGKGAIGR
47	AT5G15280	↓↓	F	STSSPASSSSSSSLGNDAIPR
48	AT5G23140	↓↓	Y	SLIPMVIHSSR
49	AT5G60960	↓↓	F	SSETNAESESLSNEIALSFSKELTGNPDAESQTISQR
50	AT3G02780		F	FSGTAMTDTKDAGMDAVQR
		↓↓		SGTAMTDTKDAGMDAVQR

51	AT3G59760	↓↓	F	ADGSERDPSVVCEAVKR
52	AT3G49240	↓↓	M	SFATQEEAAAERR
53	AT1G24880	↑↑	Y	YSSAASSPTVSLNPSGR
54	AT1G48030	↑↑	F	FASSGSDENDVVIIGGGPGGYVAAIKASQLGLKTTTCIEKR ASSGSDENDVVIIGGGPGGYVAAIKASQLGLKTTTCIEKR
55	AT1G49650	↑↑	I	ICSHSSEIIEHPPFVR
56	AT1G54220	↑↑	F	FSSGSDLPPHQEIGMPSLSPTMTEGNIAR
57	AT1G65290	↑↑	F	FSEEVRSFLDKSEVTDR SEEVRSFLDKSEVTDR
58	AT2G27730	↑↑	F	FSSGKVLSEER SSGKVLSEER
59	AT2G44620	↑↑	F	FSSHDDHLR
60	AT3G03070	↑↑	F	FSVATTQLGIPTDDLVDGNHTAKWMQDR SVATTQLGIPTDDLVDGNHTAKWMQDR
61	AT3G15020	↑↑	F	FASEVPDR
62	AT3G15640	↑↑	F	FSSDSVETPATKKVEDVMPIATGHEKEELEAELEGR SSDSVETPATKKVEDVMPIATGHEKEELEAELEGR
63	AT3G17240	↑↑	F	FASSGSDNDVVIIGGGPGGYVAAIKAAQLGLKTTTCIEKR ASSGSDNDVVIIGGGPGGYVAAIKAAQLGLKTTTCIEKR
64	AT3G30775	↑↑	F	FSSIPTDLLR
65	AT3G48000	↑↑	F	FGTSSAAAEIINPSVQVSHTQLLINGNFVDSASGKTFPTLD GTSSAAAEIINPSVQVSHTQLLINGNFVDSASGKTFPTLD
66	AT4G26910	↑↑	F	FSAETGDTVEAVPHMGESITDGTLATFLKPPGER SAETGDTVEAVPHMGESITDGTLATFLKPPGER
67	AT4G35850	↑↑	F	FASSPEEIAKR ASSPEEIAKR
68	AT5G08300	↑↑	F	FASDPHPPAAVFVDKNTR ASDPHPPAAVFVDKNTR
69	AT5G09590	↑↑	F	FSSKPAGNDVIGIDLGTTNSCVAVMEGKNPKVIENAEGAR SSKPAGNDVIGIDLGTTNSCVAVMEGKNPKVIENAEGAR
70	AT5G23250	↑↑	F	FGTTPPPAAVFVDKNTR GTPPPAAVFVDKNTR
71	AT5G67590	↑↑	F	FATDAVVESDYKR ATDAVVESDYKRGEIGKVSIGIPEEHLR
72	AT5G64050	↑↑	F	FAVVACSTPVNNGGSVR AVVACSTPVNNGGSVR
73	AT1G53240	↑↑	F	FSSGSVPER
74	AT1G47720	↑↑	F	FSDGESAVYHHAR

Tab.2.: Übersicht der mittels ChaFRADIC identifizierten Oct-1 Substrate in *Arabidopsis thaliana*. Für die gefundenen N-terminalen Peptide wurde jeweils angegeben, in welcher Mutante (Oct-1-1 oder Oct-1-2) sie hoch-/ (↑↑) oder runterreguliert (↓↓) waren.

Nr	TAIR Datenbank Name	Δoct	Identifizierte Sequenz
1	AT1G14610	1↓↓, 2↓↓	ESEKKILTEEELER
2	AT1G80550	1↓↓, 2↓↓	SVKPISNVDDAKFR
3	AT2G32230	1↓↓, 2↓↓	AAKQSAASPSENLSR
4	AT3G22310	2↑↑	FHVKSVPSEFR
5	AT3G22330	2↑↑	IHFQSGPLDFR
		1↑↑, 2↑↑	MVSQAGFAISESSER
		1↑↑, 2↑↑	VSQAGFAISESSERR
		1↑↑, 2↑↑	SQAGFAISESSERR
		1↓↓, 2↓↓	AGFAISESSERR
		1↓↓, 2↓↓	GFAISESSER
6	AT5G52840	1↓↓, 2↓↓	AKVKQTTGIVGLDVVPNAR
7	AT3G48110	2↓↓	AVHHQSYRNPDDDVTR