

# **Massenspektrometrische Charakterisierung von Phosphorylierungsstellen in mitochondrialen Membranen und Membran/Protein-Komplexen**

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. Beate Eyrich**

aus

Wertheim

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Albert Sickmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Kayser

**Dortmund 2015**

**„Curiosity is the essence of the scientific mind.“**

**(Bill Watterson)**

Meiner Familie

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>3</b>
<b>II</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....	<b>8</b>
<b>III</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>9</b>
<b>IV</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>13</b>
<b>V</b>	<b>PROTEINOGENE AMINOSÄUREN</b> .....	<b>16</b>
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>18</b>
<b>VII</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>19</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>20</b>
<b>1.1</b>	<b>Mitochondrien</b> .....	<b>20</b>
1.1.1	Struktur und Funktion der Mitochondrien .....	20
1.1.2	Evolution und Biogenese der Mitochondrien .....	22
1.1.3	Proteinimport ins Mitochondrium im Modellsystem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
<b>1.2</b>	<b>Die Phosphorylierung zellulärer Proteine</b> .....	<b>29</b>
	Das mitochondriale Phosphoproteom .....	30
<b>1.3</b>	<b>Analytik von Proteinen und deren Modifikationen</b> .....	<b>31</b>
<b>1.4</b>	<b>Chromatographische Trennung und Kopplung an Massenspektrometer</b> .....	<b>31</b>
1.4.1	Flüssigchromatographie .....	31
1.4.2	Ionisierungstechniken.....	34
	Elektrospray-Ionisation .....	35
1.4.3	Massenanalytoren .....	36
1.4.4	Detektoren .....	40
<b>1.5</b>	<b>Die massenspektrometrische Analytik der Phosphorylierung</b> .....	<b>40</b>
1.5.1	Sequenzierung von Peptiden mittels Tandemmassenspektrometrie (MS/MS).....	41

1.5.2	Neutralverlust-Scan.....	41
1.5.3	MS <sup>3</sup> und MSA.....	42
1.5.4	Selected Reaction Monitoring / Multiple Reaction Monitoring .....	43
<b>1.6</b>	<b>Spezifische Anreicherung negativ geladener Peptide/Proteine .....</b>	<b>44</b>
1.6.1	Isoelektrische Fokussierung von Proteinen und Peptiden .....	45
1.6.2	Kationenaustauscherchromatographie .....	46
1.6.3	Elektrostatische Repulsions-/hydrophile Interaktionschromatographie .....	47
1.6.4	Metalloxide .....	48
<b>1.7</b>	<b>Differentielle Phosphoproteomanalyse .....</b>	<b>48</b>
1.7.1	Quantifizierung mittels stabil-Isotopen Markierung .....	49
1.7.2	Labelfreie Quantifizierung .....	50
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>53</b>
3.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	53
3.2	Biologisches Material .....	55
3.3	Geräte und Software .....	57
3.4	Lyse von Mitochondrien .....	59
3.5	Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay .....	59
3.6	Gelelektrophoretische Trennungen .....	60
3.6.1	1D-SDS-PAGE .....	60
3.6.2	Proteinvisualisierung mittels kolloidal-Coomassiefärbung .....	60
3.6.3	Proteinvisualisierung mittels Silberfärbung .....	61
3.6.4	Tryptischer in-Gel Verdau.....	62
<b>3.7</b>	<b>Fällungen .....</b>	<b>63</b>
3.7.1	Acetonfällung.....	63
3.7.2	Ethanolfällung.....	64
<b>3.8</b>	<b>Carbamidomethylierung und proteolytischer Verdau in Lösung.....</b>	<b>64</b>
3.8.1	Mitochondrien .....	64
3.8.2	OMVs.....	65

3.8.3	TOM-Komplex .....	65
<b>3.9</b>	<b>Isoelektrische Fokussierungen von Peptiden/Proteinen .....</b>	<b>65</b>
<b>3.10</b>	<b>Entsalzung mittels C18-Festphasenextraktion .....</b>	<b>67</b>
<b>3.11</b>	<b>Anreicherung von Phosphopeptiden .....</b>	<b>69</b>
3.11.1	Kationenaustauscherchromatographie .....	69
3.11.2	Elektrostatische Repulsions-/hydrophile Interaktionschromatographie (ERLIC) .....	72
3.11.3	Titandioxid .....	73
<b>3.12</b>	<b>Differentielle Phosphoproteomanalyse .....</b>	<b>75</b>
3.12.1	Quantifizierung mittels stabil-Isotopen Markierung .....	75
3.12.2	Labelfreie Quantifizierung .....	77
<b>3.13</b>	<b>LC-ESI-MS/MS.....</b>	<b>80</b>
3.13.1	Nano-LC-ESI-MS/MS-Messung .....	80
3.13.2	Auswertung .....	81
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Qualität der durchgeführten Proteinverdauung .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2</b>	<b>Isoelektrische Fokussierung auf Peptid-/Proteinebene .....</b>	<b>84</b>
<b>4.3</b>	<b>Auftrennung von SILAC-Proben mittels 1D-SDS-PAGE .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4</b>	<b>Resultate der Anreicherung von Phosphopeptiden .....</b>	<b>92</b>
4.4.1	Anreicherung von Phosphopeptiden aus isoliertem TOM-Komplex .....	92
4.4.2	Anreicherung von Phosphopeptiden aus OMVs .....	92
4.4.2.1	Kationenaustauscherchromatographie .....	92
4.4.2.2	ERLIC .....	94
4.4.2.3	Titandioxid .....	95
4.4.3	Anreicherung von Phosphopeptiden aus Hefemitochondrien.....	97
4.4.3.1	Isoelektrische Fokussierung.....	97
4.4.3.2	Kationenaustauscherchromatographie .....	99
4.4.3.3	Titandioxid .....	101
4.4.4	Anreicherung von Phosphopeptiden aus Mausmitochondrien mittels TiO <sub>2</sub> .....	103
4.4.5	Anreicherung von Phosphopeptiden aus humanen Mitochondrien mittels TiO <sub>2</sub> .....	108
<b>4.5</b>	<b>Differentielle Phosphorylierungsanalytik.....</b>	<b>109</b>

4.5.1	Stable Isotope Labeling of Amino Acids in Cell Culture (SILAC) .....	109
4.5.1.1	Isoelektrische Fokussierung.....	112
4.5.1.2	Kationenaustauscherchromatographie .....	114
4.5.1.3	Titandioxid .....	115
4.5.2	Phosphatase-Assay .....	117
4.5.3	Synthetische Peptide & SRMs .....	120
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>127</b>
5.1	Anreicherung von Phosphopeptiden .....	127
5.2	Quantifizierung von Phosphopeptiden.....	134
5.2.1	SILAC .....	134
5.2.2	Phosphatase-Assay .....	138
5.2.3	SRM-Scans .....	139
5.3	Dateninterpretation .....	140
5.4	Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen.....	140
5.5	Relevanz der Phosphorylierungsanalytik .....	141
5.5.1	Proteinidentifikation durch peptid-orientierte Analysen .....	141
5.5.2	Biologische Relevanz von Phosphorylierungsstellen.....	144
5.6	Ausblick .....	148
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>149</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>169</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>170</b>
<b>9</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNGEN .....</b>	<b>171</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>172</b>
10.1	Filter- und Quantifizierungsparameter von Proteome Discoverer, Mascot Distiller und MaxQuant.....	172
10.1.1	Proteome Discoverer.....	172

10.1.2	Mascot Distiller .....	176
10.1.3	MaxQuant.....	181
<b>10.2</b>	<b>Ergebnisse der IEF auf Peptidebene .....</b>	<b>183</b>
<b>10.3</b>	<b>Ergebnisse der IEF auf Proteinebene der SILAC + Probe.....</b>	<b>208</b>
<b>10.4</b>	<b>Proteinliste der SILAC - Probe .....</b>	<b>217</b>
<b>10.5</b>	<b>Proteinliste der SILAC + Probe .....</b>	<b>231</b>
<b>10.6</b>	<b>Übersicht über die optimierten SRM-Parameter.....</b>	<b>247</b>
<b>10.7</b>	<b>Replikate, Mittelwerte und Standardabweichung der SRM-Messungen .....</b>	<b>251</b>

## II Veröffentlichungen

*Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases*

Schmidt O, Harbauer AB, Rao S, **Eyrich B**, Zahedi RP, Stojanovski D, Schönfisch B, Guiard B, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C.

*Cell* 2011, 144 (2), p. 227 - 239

*Catch me if you can: Mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies (Review)*

**Eyrich B**, Sickmann A, Zahedi RP.

*Proteomics* 2011, 11(4), p. 554 - 570

*Profiling Phosphoproteins of Yeast Mitochondria Reveals a Role of Phosphorylation in Assembly of the ATP Synthase*

Reinders J, Wagner K, Zahedi RP, Stojanovski D, **Eyrich B**, van der Laan M, Rehling P, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C.

*Mol. Cell. Prot.* 2007, 6 (11), p. 1896 - 1906



### III Abkürzungsverzeichnis

1D	Eindimensional
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CHAPS	(3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonsäure)
CID	Durch Kollision induzierte Fragmentierung, engl. <i>Collision Induced Dissociation</i>
CoA	Coenzym A
Da	Dalton, 1 Da = 1 amu (atomare Masseneinheit) = $1,66054 \times 10^{-27}$ kg
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DHB	2,5 Dihydroxybenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERLIC	Engl. <i>Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography</i>
ESI	Elektrospray Ionisation, engl. <i>Electrospray Ionization</i>
ETD	Elektronentransfer-Dissoziation, engl. <i>Electron Transfer Dissociation</i>
FA	Ameisensäure, engl. <i>Formic Acid</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinucleotid, reduzierte Form
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie, engl. <i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i>
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie, engl. <i>High Performance LC</i>
IAA	Jodacetamid
ICPL	Engl. <i>Isotope Coded Protein Label</i>
ID	Innendurchmesser
IEF	Isoelektrische Fokussierung

---

IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie, engl. <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IM	Innenmembran, engl. <i>Inner Membrane</i>
IMS	Intermembranraum, engl. <i>Inter Membrane Space</i>
IPG	Immobilisierter pH Gradient
iTRAQ	Engl. <i>Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation</i>
LC	Flüssigchromatographie, engl. <i>Liquid Chromatography</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LIT	Lineare Ionenfalle, engl. <i>Linear Ion Trap</i>
<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis, engl. <i>Mass-to-Charge-Ratio</i>
MALDI	Matrix unterstützte Laserdesorption/Ionisation, engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MD	Mascot Distiller
MeCN	Acetonitril
mgf	Engl. <i>Mascot Generic File</i>
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
MQ	MaxQuant
MRM	Engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
Mt	Mitochondrial
MW	Molekulargewicht, engl. <i>Molecular Weight</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NL	Neutralverlust, engl. <i>Neutral Loss</i>
OM	Außenmembran, engl. <i>Outer Membrane</i>
OMV(s)	Außenmembranvesikel, engl. <i>Outer Membrane Vesicle(s)</i>
OSA	Natriumsalz der 1-Octansulfonsäure

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PD	Proteome Discoverer
pI	Isoelektrischer Punkt
pSer, pS	Phosphoserin
pThr, pT	Phosphothreonin
PTM	Posttranslationale Modifikation, engl. <i>Post-translational Modification</i>
pTyr, pY	Phosphotyrosin
Q-TOF-MS	Quadrupol Flugzeitmassenanalysator
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase, engl. <i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	Sortierungs- und Assemblierungsmaschinerie der äußeren Membran, engl. <i>Sorting and Assembly Machinery of the Outer Membrane</i>
SCX	Starke Kationenaustausch-Chromatographie, engl. <i>Strong Cation Exchange Chromatography</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SILAC	Engl. <i>Stable Isotope Labeling of Amino Acids in Cell Culture</i>
SPE	Festphasenextraktion, engl. <i>Solid Phase Extraction</i>
SRM	Engl. <i>Selected Reaction Monitoring</i>
TFA	Trifluoressigsäure, engl. <i>Trifluoroacetic Acid</i>
TIM	Translokase der inneren Membran, engl. <i>Translocase of the Inner Membrane</i>
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TOF	Flugzeit, engl. <i>Time of Flight</i>
TOM	Translokase der äußeren Membran, engl. <i>Translocase of the Outer Membrane</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheiten, engl. <i>Units</i>

v/v	Volumenprozent bezogen auf das Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsprozent bezogen auf das Gesamtvolumen
w/w	Gewichtsprozent bezogen auf das Gesamtgewicht
$\Delta\phi, \Delta\Psi$	Membranpotenzial

## IV Abbildungsverzeichnis

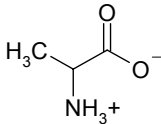
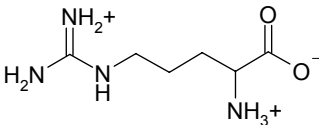
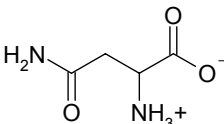
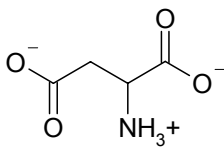
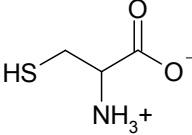
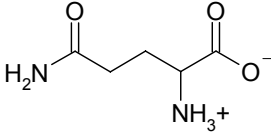
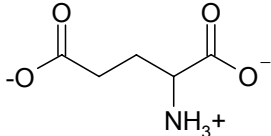
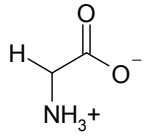
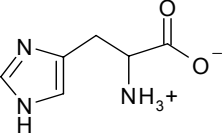
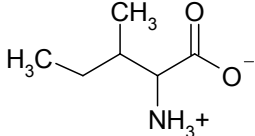
Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Mitochondriums.....	21
Abbildung 1.2: Import und Sortierung von mitochondrialen Proteinen.....	25
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des ESI-Prozesses.....	36
Abbildung 1.4: Vereinfachte schematische Darstellung der TSQ Vantage.....	37
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der LTQ-Orbitrap Velos.....	38
Abbildung 1.6: Schema der Fragmentierung von Peptiden nach Biemann.....	41
Abbildung 1.7: Schematischer Ablauf von MS <sup>3</sup> und MSA.....	43
Abbildung 1.8: Trennprinzip der flüssigen isoelektrischen Fokussierung.....	45
Abbildung 1.9: Phosphopeptidanreicherung mittels SCX.....	47
Abbildung 1.10: Quantifizierung mittels stabil-Isotopen Markierung durch SILAC.....	50
Abbildung 3.1: Reaktionen des Bicinchoinsäure-Assays.....	60
Abbildung 3.2: Strukturformel von Coomassie® Brilliant Blue G 250.....	61
Abbildung 3.3: Zeitlicher Verlauf des Gradienten der monolithischen Auftrennung von (un)verdauten SILAC-Mitochondrien und (un)verdauten Hefemitochondrien „pure“.....	65
Abbildung 4.1: Verdaukontrolle mittels 1D-SDS PAGE.....	83
Abbildung 4.2: Verdaukontrolle mittels chromatographischer Auftrennung auf einer monolithischen Säule.....	84
Abbildung 4.3: Überprüfung der mittels BCA-Assay bestimmten Proteinmengen anhand einer 1D-SDS PAGE.....	87
Abbildung 4.4: Vergleich der mittels PD, MD beziehungsweise MQ ermittelten H/L-Raten der einzelnen Proteine der - SILAC-Probe.....	90
Abbildung 4.5: Schwankung der H/L-Rate in Prozent [(a) PD und (b) MQ] beziehungsweise der geometrischen Standardabweichung [(c) MD] der - SILAC-Probe gegenüber der H/L-Rate.....	91
Abbildung 4.6: UV-Chromatogram von zwei sukzessiven OMV-SCX-Auftrennungen.....	93
Abbildung 4.7: Nano-LC-MS/MS Analyse einer SCX Fraktion.....	93
Abbildung 4.8: UV-Chromatogram der ERLIC-Auftrennung einer OMV Probe.....	94

Abbildung 4.9: UV-Chromatogram der Auftrennung der Hefemitochondrien-IEF-Fraktionen 1 bis 4.....	98
Abbildung 4.10: UV-Chromatogram der SCX-Auftrennung von <i>highly pure</i> Hefemitochondrien. ....	100
Abbildung 4.11: UV-Chromatogramme der nano-LC-MS/MS Analysen der SCX Fraktionen 1 - 5 .....	100
Abbildung 4.12: Anzahl an gemessenen MS/MS-Spektren der (Phospho-)Peptide bei einem Probe-zu-TiO <sub>2</sub> -Bead Verhältnis von 1:2 beziehungsweise 1:5 unter Verwendung von 20 µg (links) und 60 µg (rechts) <i>highly pure</i> Mitochondrienpräzipitat. ....	102
Abbildung 4.13: Anzahl an gemessenen MS/MS-Spektren der (Phospho-)Peptide bei einem Probe-zu-TiO <sub>2</sub> -Bead Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 unter Verwendung von 100 µg Mausmitochondrien aus der Niere. ....	103
Abbildung 4.14: Intensitäten einzelner nicht-phosphorylierter (oben) beziehungsweise phosphorylierter Peptide (unten) bei einem Probe-zu-TiO <sub>2</sub> -Bead Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 .....	104
Abbildung 4.15: Anzahl an gemessenen MS/MS-Spektren der (Phospho-)Peptide bei einem Probe-zu-TiO <sub>2</sub> -Bead Verhältnis von 1:2 und 1:5 unter Verwendung von 20 µg Mausmitochondrien aus der Niere und unterschiedlichen Elutionsmethoden .....	105
Abbildung 4.16: Proteome Discoverer Auswertung einer SILAC + Probe nach TiO <sub>2</sub> -Anreicherung am Beispiel des Proteins YOL109W Zeo1 (Phosphopeptid LEETKEpSLQNK)..	109
Abbildung 4.17: Mascot Distiller Auswertung einer SILAC + Probe nach TiO <sub>2</sub> -Anreicherung am Beispiel des Proteins YOL109W Zeo1 (Phosphopeptid LEETKEpSLQNK).....	110
Abbildung 4.18: MaxQuant Auswertung einer SILAC + Probe nach TiO <sub>2</sub> -Anreicherung am Beispiel des Proteins YOL109W Zeo1 (Phosphopeptid LEETKEpSLQNK).....	111
Abbildung 4.19: Screenshots der standardisierten Expressionsprofile der beiden Peptide 1353 und Albi2 in (nicht-)phosphorylierter Form ohne beziehungsweise nach Phosphatasebehandlung bei der Progenesis LC-MS-Auswertung .....	118
Abbildung 4.20: Screenshots der Mascot-Suchen der beiden Peptide 1353 und Albi2 (ohne Phosphatasebehandlung) nach LC-MS-Messungen mit <i>inclusion list</i> .....	119
Abbildung 4.21: Screenshots der Mascot-Suchen der beiden Peptide 1353 und Albi2 (nach Phosphatasebehandlung) nach LC-MS-Messungen mit <i>inclusion list</i> .....	119
Abbildung 4.22: Scheduled SRM-Scan des Peptides C6 (SPPVYSDISR, Ladung 2+) .....	121

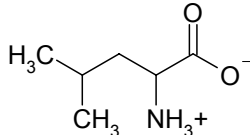
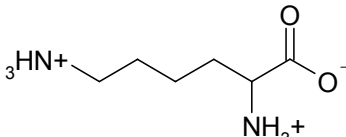
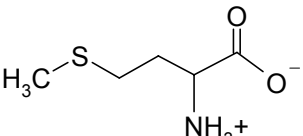
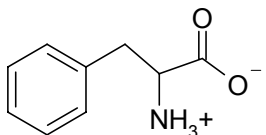
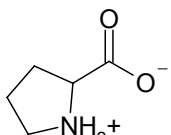
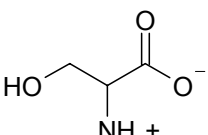
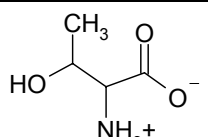
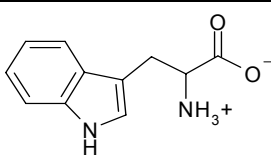
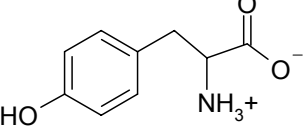
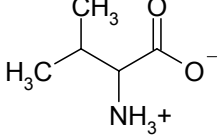
---

Abbildung 4.23: Labelfreie Quantifizierung der Peptide A1 - A6 im Bereich von 0,25 bis 100 fmol in einem Hintergrund von 1 µg Mitochondrien.....	122
Abbildung 4.24: SRM-Analyse des Peptides A5 (EQAEP SIDNLK, Ladung 2+) im Bereich von 0,25 bis 2 fmol.....	123
Abbildung 4.25: Kalibrierkurven der Peptide A1 - A6 im Bereich von 0,25 bis 100 fmol.....	124
Abbildung 5.1: Verteilung der identifizierten Phosphorylierungsstellen aus OMVs hinsichtlich der verwendeten Anreicherungsstrategie .....	128
Abbildung 5.2: Lokalisation der in dieser (a) und in der Studie von Reinders et al. [1] (b) in Hefemitochondrien detektierten Phosphorylierungsstellen.....	132
Abbildung 5.3: Verteilung der identifizierten Phosphorylierungsstellen aus Mausmitochondrien hinsichtlich des Ursprungsorgans.....	134
Abbildung 5.4: Funktionszugehörigkeit der 56 Proteine der Phosphorylierungsanalysen entsprechend Tabelle 5.4.....	143
Abbildung 5.5: Übersicht der TOM-Phosphorylierungsstellen.....	144
Abbildung 5.6: Sequenzalignment der humanen, murinen und Hefesequenz von Tom22.....	145
Abbildung 5.7: Sequenzalignment der humanen, murinen und Hefesequenz von Tom70.....	146
Abbildung 5.8: Strukturformel von Glutamat, Phosphoserin und Phosphothreonin.....	147

## V Proteinogene Aminosäuren

Name	Buchstabencodes	Strukturformel	Monoisotopische Masse (-H <sub>2</sub> O)[Da]
Alanin	Ala, A		71,03711
Arginin	Arg, R		156,10111
Asparagin	Asn, N		114,04293
Asparaginsäure	Asp, D		115,02694
Cystein	Cys, C		103,00919
Glutamin	Gln, Q		128,05858
Glutaminsäure	Gln, E		129,04259
Glycin	Gly, G		57,02146
Histidin	His, H		137,05891
Isoleucin	Ile, I		113,08406



Name	Buchstabencodes	Strukturformel	Monoisotopische Masse (-H <sub>2</sub> O)/Da
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

## VI Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit repräsentiert eine qualitative und quantitative Phosphorylierungsanalyse mitochondrialer Proteine der OM (engl. *Outer Membrane*) und von Membran/Protein-Komplexen. In Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnten nach Anreicherung mittels IEF, SCX, ERLIC und TiO<sub>2</sub> sowie Kombinationen dieser Methoden insgesamt 126 Phosphopeptide detektiert werden. Darunter befanden sich neben zahlreichen Peptiden von OM-Proteinen 25 Phosphorylierungsstellen des TOM-Komplexes, von denen 16 erstmalig im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurden. Durch Optimierung der Lade- und Elutionsbedingungen der Titandioxid-Anreicherung konnten auch in Mitochondrien aus verschiedenen Mausorganen und in humanen Mitochondrien Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Von den 66 aus Mausmitochondrien gewonnenen Phosphopeptiden konnten lediglich die drei Phosphopeptide K.IEDVGpSDEEDDSGKDK.K (Hsp90ab1), R.YGMGTpSVER.A (Pdha1) und M.\*AAAVAAAGAGEPLpSPEELLPK.A (Tom22, \* = N-terminal acetyliert) in allen Organen gefunden werden. Die Mehrheit der Phosphopeptide wurde in nur je einem der vier Organe detektiert - dabei lieferte die Niere 25 dieser P-Sites, gefolgt vom Herz mit 11 und Gehirn/Leber mit jeweils 7 phosphorylierten Peptiden. In humanen Mitochondrien konnten 21 Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, darunter auch Phosphopeptide von Tom22 und Tom70. Ein Vergleich der TOM-Proteine Tom22 und Tom70 in den drei Spezies Hefe, Maus und Mensch zeigte zum Teil homologe Phosphorylierungsmuster, was eventuell auf eine ähnliche Regulation durch (De-)Phosphorylierung schließen lässt.

Durch verschiedene Anreicherungsstrategien gekoppelt mit der Quantifizierung mittels SILAC konnten Unterschiede im Phosphoproteom von CK2-Wildtyp und temperatursensitiven CK2-Mutanten-Hefestämmen aufgezeigt werden. Als Alternativen für eine differentielle Phosphopeptidanalytik wurden zudem zwei labelfreie Ansätze vorgestellt und anhand von Hefemitochondrien auf ihre Anwendbarkeit geprüft. Vor allem der Einsatz von synthetischen (Phospho-) Peptiden und definierter SRMs erwies sich als sehr sensitive und reproduzierbare Quantifizierungsmethode.

## VII Summary

This thesis represents a qualitative and quantitative phosphorylation analysis on mitochondrial proteins of the OM (engl. *Outer Membrane*) and of membrane/protein-complexes. After enrichment by IEF, SCX, ERLIC and TiO<sub>2</sub> as well as combinations of these methods all together 126 phosphopeptides were detected in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Beside numerous peptides of OM-proteins 25 phosphosites of the TOM complex, 16 previously undetected, were found amongst.

By optimization of loading and elution conditions of titaniumdioxid enrichment phosphosites could also be identified in mitochondria of different mouse organs and in human mitochondria. Out of 66 phosphopeptides characterized in mouse mitochondria solely the three phosphopeptides K.IEDVGpSDEEDDSGKDK.K (Hsp90ab1), R.YGMGTpSVER.A (Pdha1) and M.\*AAAVAAAGAGEPLpSPEELLPK.A (Tom22, \* = N-terminal acetylation) were found in all organs. The majority of phosphopeptides was only detected in one of the four organs - thereby 25 phosphosites were provided by kidney, followed by heart with 11 and brain/liver with 7 phosphorylated peptides each. In human mitochondria 21 phosphosites were identified, among them phosphopeptides of Tom22 and Tom70. Comparison of the TOM proteins Tom22 and Tom70 through yeast, mouse and human partly showed homologous phosphorylation patterns, leading to potential similar regulation by (de-) phosphorylation.

By various enrichment strategies linked to quantification by SILAC differences in the phosphoproteome of yeast strains of CK2 wildtyp and temperature sensitive CK2 mutant could be demonstrated. Alternatively, two labelfree procedures for differential phosphopeptid analysis were presented and proven for their practicability by yeast mitochondria. Especially using synthetic (phospho) peptides and scheduled SRMs turned out to be a very sensitive and reproducible quantitaion method.

## 1 Einleitung

Eukaryotische Zellen besitzen zur Abgrenzung zum umgebenden Milieu und zur Aufrechterhaltung beziehungsweise Organisation ihrer Stoffwechselprozesse klar definierte, membranumschlossene Reaktionsräume. Diese Organellen sind hoch funktionsspezifische Kompartimente innerhalb der Zelle, die sich in ihrer Proteinausstattung und den vorherrschenden physikochemischen Bedingungen deutlich vom Zellinneren, aber auch voneinander, unterscheiden. Dabei erfolgt eine Unterteilung in Zellorganellen, die von einer einzelnen Membran umschlossen sind, wie zum Beispiel das endoplasmatische Retikulum, die Peroxisomen oder die Lysosomen, und die, die von einer Doppelmembran umgeben sind. Zu Letzteren gehören der Zellkern, die Mitochondrien und in Pflanzen die Chloroplasten und andere Plastide.

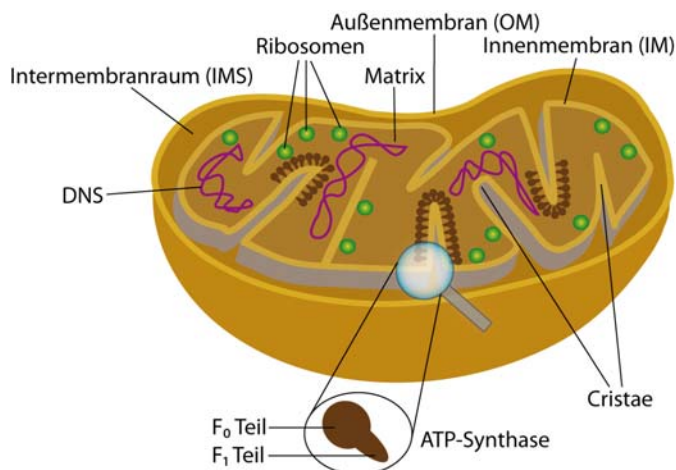
### 1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind durchschnittlich 2  $\mu\text{m}$  lang und besitzen einen Durchmesser von circa einem halben  $\mu\text{m}$ . Ihr Genom liegt in der mitochondrialen Matrix als zirkuläre, doppelsträngige DNS in mehreren identischen Kopien vor [2]. Die Replikation erfolgt analog zum Teilungsvorgang von Bakterien durch Wachstum/Verdopplung und Sprossung [3]. Anzahl und Gestalt der Mitochondrien können sich unterschiedlichen Wachstumsbedingungen anpassen und sind je nach Zelltyp und Organismus variabel [4]. In Zellen mit hohem Energiebedarf, wie beispielsweise Muskel- oder Nervenzellen, ist nicht nur der Volumenanteil an Mitochondrien deutlich erhöht – in Herzmuskelzellen beträgt er bis zu 36 % [5] – sondern die Mitochondrien bilden auch Netzwerke aus und orientieren sich dabei so, dass der Ort der ATP-Gewinnung und des Energieverbrauches möglichst dicht beisammen liegen [6-7].

#### 1.1.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien besitzen zur Kompartimentbildung eine lipidreiche Außenmembran (OM) und eine stark gefaltete innere Membran (IM, engl. *Inner Membrane*), die durch die sogenannten Cristae eine enorm vergrößerte Oberfläche aufweist und die mitochondriale Matrix umschließt. Zwischen den beiden mitochondrialen Membranen

befindet sich der Intermembranraum (IMS, engl. *Inter Membrane Space*; siehe Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung eines Mitochondriums [8]. Die mitochondriale Außenmembran grenzt die Mitochondrien vom Cytosol ab, während die Innenmembran, in die die ATP-Synthase als Transmembranprotein eingelagert ist, Matrix und Intermembranraum voneinander trennt. Die charakteristischen Ausstülpungen in den Matrixraum, die sogenannten Cristae, ergeben sich durch die starke Faltung der IM. Die Matrix beinhaltet neben der mitochondrialen DNS Enzyme des Citratzyklus und der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren sowie die membrangebundenen Ribosomen zur Translation von mitochondrialen Proteinen.

Die Struktur der Cristae ist zwischen verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedlich und korreliert mit deren Stoffwechselaktivität [9]. Dabei reicht deren Ausgestaltung von unregelmäßig verbreiterten Einstülpungen der Innenmembran bis hin zu exakt parallel angeordneten Stapeln von Cristae [10]. Aufgrund der charakteristischen Form der Cristae werden Mitochondrien in unterschiedliche Typen gegliedert: Der am häufigsten vorkommende Typ, bei dem das Mitochondrium in inaktiven Stadien schmale Leisten bildet [9] ist der Cristae-Typ. Daneben gibt es noch den Tubulus-Typ, den Prisma-Typ und den Sacculus-Typ. Da die IM von Transmembranproteinen durchspannt wird, die für die oxidative Phosphorylierung essentiell sind, einschließlich der ATP-Synthase (siehe Abb. 1.1) und einer Vielfalt von Cytochromen, enthalten Mitochondrien in Zellen mit hoher respiratorischer Aktivität besonders viele Cristae.

Mitochondrien sind geordnete Multienzymsysteme, deren Hauptfunktion die Herstellung von Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Energieträger der

Zelle, ist. Im Rahmen der sogenannten oxidativen Phosphorylierung [10] findet zunächst die Decarboxylierung von Pyruvat aus der cytosolischen Glykolyse statt, katalysiert durch die Pyruvat-Dehydrogenase. Das gewonnene Acetyl-CoA führt im Citratzyklus innerhalb der mitochondrialen Matrix zur Erzeugung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH und FADH<sub>2</sub>. Diese übertragen Elektronen über eine Reihe von Elektronen-Carriern im Rahmen der Elektronentransportkette (Atmungskette) an Sauerstoff, wobei Energie in Form von etwa 30 Molekülen ATP freigesetzt wird [11], mit deren Hilfe Protonen von Innen nach Außen gepumpt werden, um einen Protonengradienten und das Membranpotential  $\Delta\phi$  zwischen mitochondrialer Matrix und IM aufzubauen. Die Protonen fließen aufgrund des Gradienten wieder zurück und treiben dabei die ATP-Synthase, die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, zur Synthese von ATP an [12].

Weitere mitochondrial gesteuerte Stoffwechselprozesse sind zum Beispiel die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, die Biosynthese von Häm, die Synthese und der Abbau einiger Aminosäuren und die Stickstoffentgiftung durch Harnstoffsynthese [13]. Darüber hinaus produzieren Mitochondrien verschiedene Formen der Eisen-Schwefel-Cluster, die außer in Enzymen der mitochondrialen Atmungskette auch in cytoplasmatischen und nukleären Proteinen essentiell für deren Funktion sind [14-15]. Mitochondrien sind aber auch an der Regulation globaler zellulärer Prozesse, insbesondere der Apoptose [16], beteiligt. Dabei führt die Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Faktoren nach Permeabilisierung der Mitochondrienmembran zur Aktivierung der Apoptose-Kaskade [17-18]. Zudem dienen Mitochondrien als intrazellulärer Calciumspeicher zur Aufrechterhaltung der Homöostase der Zelle.

### 1.1.2 Evolution und Biogenese der Mitochondrien

Die weitgehend anerkannte Endosymbiontentheorie [19] besagt, dass sich Mitochondrien auf ursprünglich frei lebende, bakterienähnliche aerobe Prokaryoten zurückführen lassen, die als Symbionten von anaeroben Eukaryoten aufgenommen wurden und sich im Verlauf der Evolution unter Autonomieverlust allmählich zu hoch spezialisierten Zellorganellen entwickelt haben [20-21]. Gestützt wird diese These dadurch, dass Mitochondrien wie Prokaryonten eigenes genetisches Material in Form

eines zirkulären, histonfreien Genoms (mt DNS), sowie eine eigene Proteinbiosynthese mit Ribosomen und RNA besitzen. Des Weiteren sind sie von einer Doppelmembran umgeben, wobei die OM der Mitochondrien eucytisch zusammengesetzt ist, während sich die IM, die hauptsächlich der Synthese von ATP aus Adenosindiphosphat dient, in ihrer Zusammensetzung deutlich von den Membranen eukaryotischer Zellen unterscheidet. Außerdem vermehren sich Mitochondrien eigenständig und die Teilung ist ähnlich zur prokaryotischen Zellteilung.

Obwohl Mitochondrien eigene DNS enthalten, kodiert das mitochondriale Genom nur etwa 1% der mitochondrialen Proteine [22-24], da der Großteil der genetischen Information im Laufe der Evolution in die nukleäre DNS der Wirtszelle integriert beziehungsweise nicht-essentielle Gene deletiert wurden [20, 22-23]. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* hat das mitochondriale Genom eine Größe von circa 85 kb und kodiert lediglich 8 stabile mitochondriale Proteine, die 21 S und 15 S ribosomalen RNAs, 24 tRNAs und die 9 S RNA-Komponente der RNaseP [25]. Mitochondrien sind folglich aufgrund des Gentransfers mittlerweile so spezialisiert, dass sie nicht autark lebensfähig sind. Wie neuere Proteomstudien zeigen, sind in Mitochondrien von *S. cerevisiae* mehr als 850 verschiedene Proteine vorhanden [26-27], die zum weitaus größten Teil von der Kern-DNS transkribiert und im Zellplasma translatiert werden, um schließlich in die Mitochondrien transportiert zu werden.

### 1.1.3 Proteinimport ins Mitochondrium im Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae*

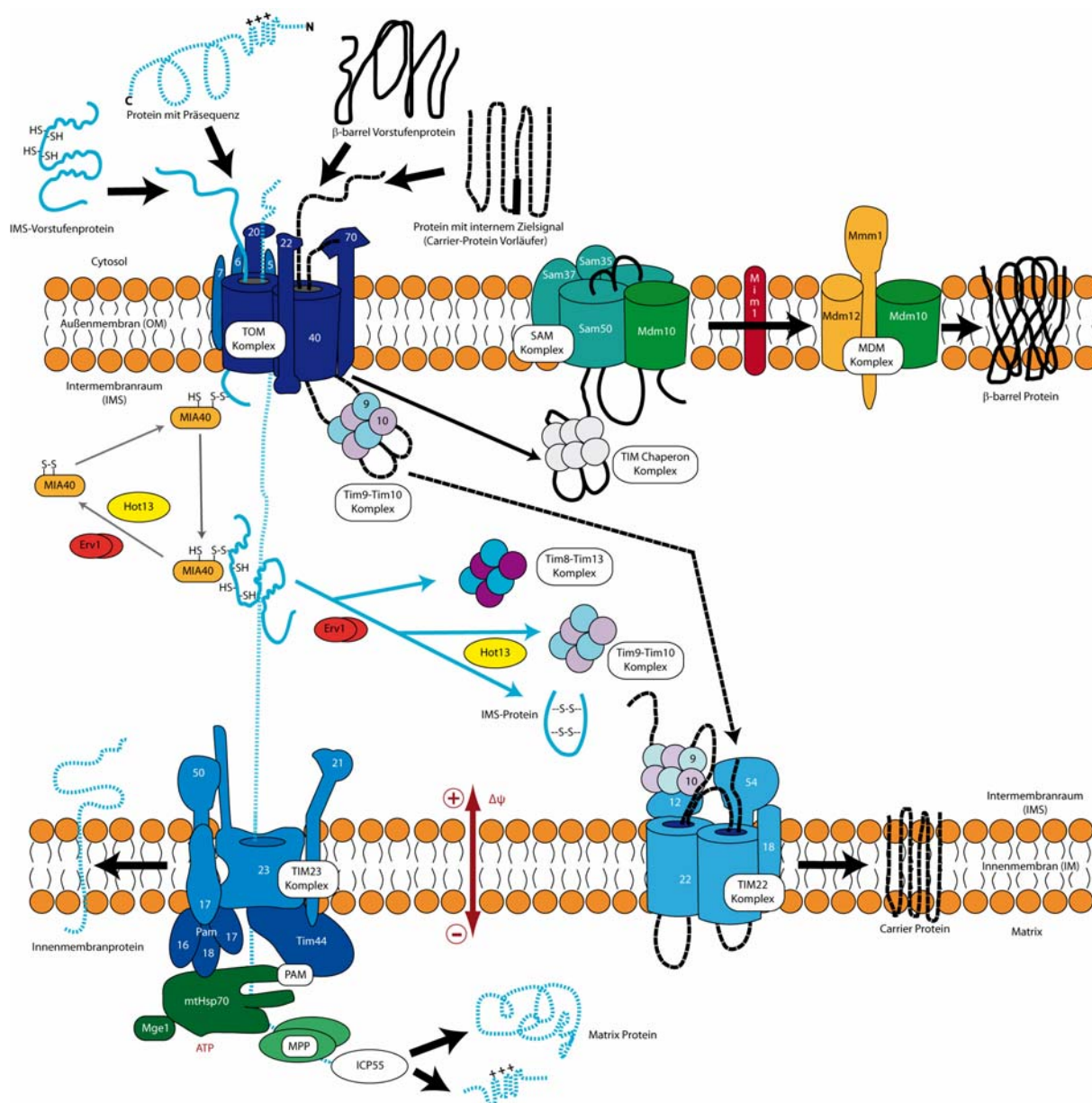
*Saccharomyces cerevisiae* gehört zu den einzelligen Pilzen und ist ein sehr einfach strukturierter eukaryotischer Organismus. Aufgrund der einfachen Kulturbedingungen, des relativ kleinen, zudem vollständig sequenzierten Genoms, der Möglichkeit zur Herstellung von Knockout-Mutanten und da viele Gene der Hefe Homologe im Genom des Menschen haben [26, 28], wird die Hefe als Modellorganismus für die molekular- und zellbiologische Forschung genutzt. Die mitochondriale Importmaschinerie der Hefe gehört daher zu den am besten untersuchten Proteintransportsystemen von Zellorganellen. Da die meisten mitochondrialen Proteine im Zellkern kodiert und im Cytosol synthetisiert werden, müssen sie, um ihre Funktion erfüllen zu können, anschließend in die verschiedenen Subkompartimente der Mitochondrien transportiert werden. Um ihren

Bestimmungsort zu kennzeichnen, enthalten die Proteine unterschiedliche, spezifische Signalsequenzen.

Der Großteil mitochondrialer Präproteine besitzt eine N-terminale Präsequenz, die etwa 15 bis 20 Aminosäuren lang und durch einen hohen Anteil an positiv geladenen Resten charakterisiert ist, die amphipathische  $\alpha$ -Helices ausbilden [29-31]. Diese Sequenz wird mit Erreichen der Matrix durch die dimere mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten [32] und der N-Terminus des Proteins wird gegebenenfalls durch ICP55 (engl. *I*ntermediate *C*leaving *P*eptidase of *55* kDa) zu einer stabilen Form prozessiert [31]. Zusätzlich gibt es weitere Signale innerhalb eines Proteins wie beispielsweise hydrophobe Sortierungssignale, die bei IMS-Proteinen durch die IMP (engl. *I*nnner *M*embrane *P*eptidase) ebenfalls abgespalten werden [32-34]. Dagegen bleibt bei Proteinen der Innenmembran das hydrophobe Sortierungssignal bei der Reifung des Proteins erhalten und sorgt für die Verankerung in der IM. IM-Proteine können außerdem auch eine Präsequenz-ähnliche interne Signalsequenz beinhalten. Andere Vorläufer von IMS-Proteinen besitzen eine spezifische Signalsequenz, das sogenannte MISS (engl. *M*itochondrial *I*ntermembrane *S*pace *S*ignal), das Cystein-Reste beinhaltet [35-37].

Für die Sortierung und den Import von Proteinen besitzen Mitochondrien spezifische Importmaschinerien, die diese Signalsequenzen erkennen und die Proteine zu ihrem entsprechenden Bestimmungsort leiten. In der äußeren Membran gibt es den TOM- (engl. *T*ranslocase of the *O*uter *M*embrane) und den SAM- (engl. *S*orting and *A*ssembly Machinery of the *O*uter *M*embrane) Komplex, in der inneren Membran den TIM23-, TIM22- (engl. *T*ranslocase of the *I*nnner *M*embrane, TIM) und OXA1- (engl. *O*xidase *A*ssembly; ist an der Insertion von Proteinen in die Innenmembran von der Matrixseite aus beteiligt [38]) Komplex sowie im Intermembranraum das Mia40/Erv1-System [39-40]. Dadurch sind hauptsächlich vier Transportwege möglich: 1) der Präsequenz Transportweg, 2) der Carrier-Protein Transportweg, 3) der Redox-regulierte Importweg und 4) der  $\beta$ -barrel Transportweg. Die verschiedenen Importwege sind in Abbildung 1.2 illustriert und werden im Folgenden genauer erläutert.





**Abbildung 1.2:** Import und Sortierung von mitochondrialen Proteinen (modifiziert nach [39, 41]). Der Transport von Proteinen über die Außenmembran mittels des TOM-Komplexes stellt den ersten Schritt des Proteinimports dar und ist daher für alle Transportwege gleich. Vorläufer von β-barrel Proteinen werden anschließend über den SAM- und den MDM-Komplex in die Außenmembran integriert (β-barrel Transportweg; schwarze Linien/Pfeile). IMS-Präproteine werden über MIA bestehend aus dem Mia40-Rezeptor und Erv1 importiert und im IMS freigesetzt (Redox-regulierter Importweg; hellblaue Linien/Pfeile). Nach dem Transport über die OM interagieren Carrier-Protein Vorläufer mit dem Tim9/Tim10 Komplex und werden mit Hilfe des Membranpotentials über den TOM22-Komplex transportiert und in die IM integriert (Carrier-Protein Transportweg; schwarze, gestrichelte Linien/Pfeile). Matrix-Proteine werden schließlich über den TIM23-Komplex und PAM importiert (Präsequenz Transportweg; hellblaue, gestrichelte Linien/Pfeile).

Allen Transportwegen gemeinsam ist der Transport über die Außenmembran durch den TOM-Komplex. Dieser besteht aus zwei bis drei Tom40-Proteinen, die als integrale Membranproteine Translokationsporen bilden, sowie den Rezeptorproteinen Tom20, Tom22 und Tom70, die auf der Oberfläche der Mitochondrien die Substratmoleküle erkennen [42], und den kleinen Tom-Proteinen Tom5, Tom6 und Tom7, die den Zusammenbau und die Stabilität des Komplexes beeinflussen [43]. Präproteine mit einer N-terminalen Präsequenz binden dabei erst an Tom20 [44] und Vorläufer von Innenmembran Carrier-Proteinen und IMS-Präproteine interagieren anfänglich mit Tom70, bevor sie jeweils an den Zentralrezeptor Tom22 [45-46] weitergeleitet und über Tom40 importiert werden.

### ***β-barrel Transportweg***

Vorläufer von β-barrel Proteinen der Außenmembran werden anschließend mit Hilfe der Chaperonkomplexe Tim9/10 und Tim8/13 [47] des IMS zum SAM-Komplex [48-49] transferiert. Der SAM-Komplex besteht aus der zentralen Poren-bildenden Untereinheit Sam50, dem Signalrezeptor Sam35, der ein Signal am C-Terminus von β-barrel Proteinen erkennt, und Sam37, das für die Stabilität des Komplexes und für die Freisetzung von Vorstufenproteinen vom SAM-Komplex verantwortlich ist. Die vierte Untereinheit des Komplexes, Mdm10, ist nicht nur am Zusammenbau des SAM-Komplexes sondern auch an der Aufrechterhaltung der Morphologie von Mitochondrien beteiligt [50]. Auf diesem β-barrel Transportweg werden die Präproteine innerhalb des SAM-Komplexes in eine hydrophile Umgebung integriert und anschließend in die Lipidschicht der OM entlassen. Der Zusammenbau der β-barrel Proteine wird durch Mim1 und den MDM-Komplex unterstützt [41].

### ***Redox-regulierter Importweg***

Viele IMS-Präproteine sind kleine Cystein-reiche Moleküle wie beispielsweise die Tim-Proteine Tim9 und Tim10. Sie werden im Cytosol mit internen Signalsequenzen (Cystein-Prolin-Cystein-Motiv) synthetisiert und nach dem Transport über die OM durch den TOM-Komplex über MIA (engl. *Mitochondrial Intermembrane Space Assembly Machinery*) importiert. Dabei bilden sie mit dem Mia40-Rezeptor des IMS anhand von intermolekularen Disulfidbrücken einen intermediären Komplex [35-37, 51-52]. Die Sulphydryloxidase Erv1 (engl. *Essential for Respiration and Viability*)

bewirkt zusammen mit Mia40 anschließend die Oxidation der Proteinvorläufer, was zu deren Reifung und Freisetzung als gefaltete Proteine beiträgt. Erv1 reoxidiert die Cysteine von Mia40 und transferiert die Elektronen über Cytochrom C an die Atmungskette und somit an O<sub>2</sub> [53-55]. Eine dritte Komponente, das Zink-bindende Protein Hot13 (engl. *Helper of Tim13* [56]), unterstützt die Oxidation von Mia40.

### **Carrier-Protein Transportweg**

Die hydrophoben Carrier-Protein Vorläufer werden in einer Loop-Formation mittels TOM-Komplex über die OM transportiert [57] und interagieren mit dem hexameren Tim9/Tim10 (oder Tim8/Tim13) Chaperonkomplex. Dieser verhindert eine Aggregation und leitet den Precursor durch den IMS [58-59] zur Carrier-Translokase der IM, dem TIM22-Komplex, an den der Tim9/Tim10/Tim12-Komplex membranständig gebunden ist [42, 60]. Das Membranpotential ( $\Delta\psi$ ) fördert die Integration des Proteinvorläufers in die IM mittels Translokationskanal Tim22, gefolgt vom Zusammenbau zur reifen Form des Carrier-Proteins. Tim54 sorgt dabei sowohl für den Zusammenbau als auch die Stabilität des TIM22-Komplexes. Zudem könnte Tim54 mit seiner Domäne, die in den IMS ragt, eine Bindestelle für den Tim9/Tim10/Tim12-Komplex zur Verfügung stellen [61-62]. Die Funktion von Tim18 ist bisher weitgehend unklar, es könnte jedoch ebenfalls beim Zusammenbau des Translokasekomplexes eine Rolle spielen [62].

### **Präsequenz Transportweg**

Matrix-Proteine werden über die Präsequenz-Translokase der IM (TIM23-Komplex) und mit Hilfe des PAM- (engl. *Presequence Translocase-associated Motor*) Komplexes importiert. Der TIM23-Komplex besteht aus dem Translokationskanal Tim23 [63-64], der in Abhängigkeit vom  $\Delta\psi$  die Präproteine bindet, dem Rezeptorprotein Tim50, das den Kanal geschlossen hält beziehungsweise öffnet, und Tim17, das an der Rekrutierung von PAM und der lateralen Verteilung von Membranproteinen beteiligt ist [65-66]. Die eigentliche Translokation wird durch den ATP-abhängigen PAM-Importmotor durchgeführt. Den zentralen Bestandteil des PAM-Komplexes bildet das mitochondriale (mt) Hsp70, das die Präproteine bindet. mtHsp70 wird durch die Ko-Chaperone Pam16-Pam18, Pam17 und durch den Nukleotid-Austauschfaktor Mge1 reguliert und durch das Adapterprotein Tim44

zusammen mit den Pam-Proteinen zur Translokase rekrutiert. Für die Freisetzung des Präproteins vom Tim44/mtHsp70-Komplex werden anschließend Mge1 und ATP benötigt. In der Matrix wird durch die MPP die Präsequenz entfernt und das Intermediat mittels ICP55 zur Stabilisierung des N-Terminus um eine Aminosäure gekürzt [31], falls dieser entsprechend der Aminoende-Regel [67-69] instabil sein sollte. Diese Regel besagt, dass der Abbau von Proteinen wesentlich von der N-terminalen Aminosäure beeinflusst wird, wobei zwischen stabilisierenden und destabilisierenden Aminosäuren unterschieden wird [67-69]. Zu den primär destabilisierenden Aminosäuren, die für eine Ubiquitinierung und somit den Abbau von Proteinen markieren, zählen dabei vor allem Tyrosin, Leucin, Phenylalanin und Tryptophan. Dagegen zählen Serin, Alanin, Threonin, Glycin oder Methionin zu den stabilisierenden N-terminalen Aminosäuren. ICP55, ein Mitglied der Aminopeptidase P (APP) Familie der Metalloproteasen [70-71], entfernt eine Aminosäure zwischen der letzten Aminosäure der Präsequenz (Tyr, Leu oder Phe) und der ersten Aminosäure des reifen Proteins (bevorzugt Ser, Ala oder Thr) [31], wandelt also durch MPP erzeugte destabilisierte N-Termini in stabile N-Termini um. Das prozessierte Protein wird schließlich durch mehrere Reaktionszyklen schrittweise in die Matrix gezogen.

Am Import von IM-Proteinen ist ebenfalls der TIM23-Komplex beteiligt, allerdings ohne Mitwirkung von PAM. Dabei spielt die Untereinheit Tim21 eine bedeutende Rolle, da sie für eine vorübergehende Interaktion zwischen dem TIM23- und dem TOM-Komplex sorgt und somit die Translokation von Präproteinen von der äußeren zur inneren Membran erleichtert [40, 65, 72]. Zudem fördert Tim21 durch die Kopplung des TIM23-Komplexes mit der Atmungskette den Membranpotential-abhängigen Importschritt [73-75]. Für den oben beschriebenen Import von Matrix-Proteinen wird Tim21 vom TIM23-Komplex freigesetzt und durch den PAM-Komplex ersetzt. Die MPP in der Matrix entfernt die Präsequenz von IM-Vorstufenproteinen, ICP55 kürzt das Protein notfalls um eine weitere Aminosäure und das dieser Sequenz folgende hydrophobe Sortiersignal sorgt schließlich für die laterale Freisetzung und die Integration in die IM.

## 1.2 Die Phosphorylierung zellulärer Proteine

Innerhalb einer Zelle werden eine Vielzahl von regulatorischen Prozessen wie Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) vermittelt. Dabei spielt neben der Acetylierung und der Glykosylierung vor allem die Phosphorylierung von Proteinen eine zentrale Rolle, da diese Art der Modifikation einen rasch ablaufenden, regulierbaren und reversiblen Vorgang darstellt. Zudem kommt es durch das Anhängen einer Phosphatgruppe zu einer Ladungsänderung des Proteins, was dessen dreidimensionale Struktur und somit seine Aktivität sowie die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen kann. Während bei der Phosphorylierung Kinasen eine Phosphatgruppe eines Phosphatgruppendedonors, beispielsweise eines gamma-Phosphates des ATPs oder eines anderen Nucleosidtriphosphats, auf einen spezifischen Aminosäurerest eines gezielten Proteins übertragen [76], sorgen Phosphatasen mittels Hydrolyse von Phosphorsäure-Esterbindungen für eine enzymatische Abspaltung des Phosphatrestes.

Obwohl Phosphoproteine im Vergleich zu ihren nicht-phosphorylierten Partnern meist weniger abundant sind, haben Phosphorylierungen eine enorme biologische Relevanz, da sie die Proteinfaltung und -aktivität, die Interaktion eines Proteins mit anderen Proteinen, die subzelluläre Lokalisation oder den Proteinabbau modulieren. Daher kann eine abnormale Proteinphosphorylierung beispielsweise zur Entstehung und Progression von Krebs [77-78], Diabetes oder neurodegenerativen Krankheiten [79] führen.

Derzeit wird zwischen vier Arten von Phosphoaminosäuren unterschieden [80-82]:

(a) O-Phosphate (an Hydroxylresten von Serin, Threonin und Tyrosin sowie Hydroxylysin [83] und Hydroxyprolin [84]), (b) N-Phosphate (an Aminogruppen von Arginin, Lysin und Histidin), (c) S-Phosphate (Phosphorylierung an Thiolgruppen von Cystein) sowie (d) Acylphosphate (Bildung von Phosphorsäureanhydriden mit Asparaginsäure und Glutaminsäure). Von diesen sind die O-Phosphate – Phosphoserin (pSer/pS), Phosphothreonin (pThr/pT) und Phosphotyrosin (pTyr/pY) – bisher am eingehendsten untersucht, da sie sowohl in saurem als auch neutralem Milieu chemisch stabil sind [76]. Es gibt jedoch auch vielversprechende Ansätze für die Analyse von zum Beispiel Phosphohistidin [85-87].

Da Proteine oft nur substöchiometrisch phosphoryliert sind, die zu einem bestimmten Zeitpunkt potentiell möglichen Phosphorylierungsstellen unterschiedlich reguliert sein können [88] und sich das bestehende Phosphorylierungsmuster aufgrund der transienten Natur der Modifikation rasch ändern kann, werden hoch sensitive Methoden für die Isolation, die Detektion und die Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen benötigt.

#### *Das mitochondriale Phosphoproteom*

Aufgrund der Homologie vieler mitochondrialer Proteine zwischen Hefe und Mensch [26, 28] ist es wichtig, das Proteom dieses Modellorganismus hinsichtlich (potentieller) Phosphorylierungsstellen möglichst vollständig zu charakterisieren. Da die Hefe für biochemische und genetische Analysen leicht zugänglich ist, können auf diese Weise Funktionen von Proteinen, die an mitochondrialen Fehlfunktionen beteiligt sind, identifiziert und genauer charakterisiert werden [27]. Ebenso ergibt sich die Möglichkeit zelluläre Signalwege zu erforschen, die oft über Phosphorylierungen reguliert werden. Obwohl Mitochondrien an vielen essentiellen zellulären Prozessen beteiligt sind, ist über die Regulation der meisten mitochondrialen Funktionen derzeit nur wenig bekannt [1]. Bisherige Studien haben eine Reihe von mitochondrialen Phosphatasen und Kinasen ermittelt [26-27, 89], deren Effekt auf die Struktur und Funktion von Mitochondrien aber bisher noch nicht bekannt ist. Zudem konnten in den letzten Jahren zahlreiche mitochondriale Phosphoproteine detektiert werden [1, 90-95], wobei die letztliche Funktion der Phosphorylierung nur in einigen Fällen geklärt werden konnte. Beispielsweise hat nach Reinders et al. [1] die reversible Phosphorylierung von Atp20 einen Einfluss auf die Dimerisierung der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob Phosphoproteine in phosphorylierter Form in Mitochondrien importiert oder erst in den Mitochondrien durch Phosphorylierung modifiziert werden. Zur Analyse der Funktionsweise der mitochondrialen Phosphatasen und Kinasen können daher Mutanten genutzt werden, bei denen die entsprechenden Gene deletiert werden. Derzeit sind in Mitochondrien von Säugerzellen beziehungsweise als mit Mitochondrien assoziiert etwa acht Phosphatasen sowie 25 Kinasen identifiziert (Überblick in [96]).

### **1.3 Analytik von Proteinen und deren Modifikationen**

In der Proteinanalytik stellt die Analyse von PTMs bestehend aus Detektion der Modifikation, Identifizierung des Peptides/Proteins und Lokalisation der modifizierten Aminosäure eine große Herausforderung dar. Aufgrund der Komplexität der Proteine erfolgt vor Analyse eine Trennung und Anreicherung über die unterschiedlichen Mobilitäts-, Affinitäts- oder Bindungseigenschaften des modifizierten Proteins. In der modernen Analytik kommen dafür Instrumente mit einem hohen Durchsatz zum Einsatz, die zum einen die Kosten reduzieren und zum anderen durch eine automatisierte Durchführung die Peptidverluste minimieren. Durch die Kopplung von nano-HPLC mit Elektrospray-Massenspektrometrie können dabei sehr niedrig konzentrierte Peptidgemische in ihre Komponenten getrennt werden, PTMs qualitativ nachgewiesen sowie die Anzahl an PTMs in einem Protein bestimmt werden.

### **1.4 Chromatographische Trennung und Kopplung an Massenspektrometer**

#### **1.4.1 Flüssigchromatographie**

Bevor die Peptide komplexer Proben massenspektrometrisch effektiv charakterisiert werden können, ist eine Auftrennung auf Protein- oder Peptidebene nötig, die entweder durch die Verwendung eines 1D-PAGE Gels, einer chromatographischen Auftrennung oder durch gezielte Anreicherung bestimmter Subspezies erreicht werden kann.

Bei der Flüssigchromatographie wird ein Substanzgemisch mittels eines Lösungsmittelstroms, der mobilen Phase, über eine stationäre Phase (Trennsäule) geleitet und dabei aufgetrennt. Adsorbiert eine Probenkomponente stark an die stationäre Phase, besitzt sie eine hohe Retention; interagiert sie hingegen nur schwach mit der stationären Phase, verlässt sie die Säule früher. Durch die unterschiedliche Stärke dieser Wechselwirkungen werden die Bestandteile des Substanzgemisches nacheinander eluiert, was bedeutet, dass sie zu spezifischen Zeiten, den sogenannten Retentionszeiten [76], das Ende der Trennsäule erreichen, wo sie dann mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden können.

Das klassische Konzept der „theoretischen Böden“ als der Anzahl an Destillationsböden der fraktionierten Destillation [76], das der van-Deemter-

Gleichung zu Grunde liegt, besagt, dass bei einer definierten Säulenlänge die Qualität der Trennung mit höherer Bodenzahl besser und die Signale schmalere werden. Die Anzahl der Trennböden ist dabei für eine Säule charakteristisch und hängt stark von der Qualität der Säulenpackung und der Teilchengröße des Trennmaterials ab [76]. Die van-Deemter-Gleichung (1) beschreibt die optimale Bodenhöhe  $H$  als Summe von Eddy-Diffusion ( $A$ ), longitudinaler Diffusion ( $B$ ) und der Massentransfereffekte ( $C$ ) in Abhängigkeit von der Flussrate  $u$ :

$$(1) \quad H(u) = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Faktor  $A$  gibt dabei den Einfluss der Säulenpackung auf die Peakbreite an [76]. Da die einzelnen Probenbestandteile unterschiedliche Wege zwischen den Teilchen der Säulenpackung zurücklegen [97] und somit unterschiedlichen Widerständen ausgesetzt sind, führt dies zur Verbreiterung der Probenzone. Die Eddy-Diffusion ist proportional zum Partikeldurchmesser [98], unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit und besonders klein, wenn kleine Teilchen einheitlicher Größe homogen in der Säule gepackt sind.

Faktor  $B$  steht für die während der Trennung auftretende Diffusion der Probenmoleküle auf die Länge der Säule [76] und ist abhängig von der Viskosität und der Temperatur der mobilen Phase sowie vom Kehrwert der Strömungsgeschwindigkeit. Der Beitrag der longitudinalen Diffusion wird umso signifikanter, je geringer die Flussgeschwindigkeit ist und je länger die Probe auf der Säule verweilt [98].

Faktor  $C$  beschreibt die Wechselwirkungen der Analyte mit der stationären Phase [76] und wird durch die Zusammensetzung der mobilen Phase und die Art und Dicke der stationären Phase beeinflusst. Die Massentransfereffekte sind direkt proportional zur Strömungsgeschwindigkeit und abhängig vom Teilchendurchmesser, der Porosität der Teilchen, der Säulenlänge, dem Säulenradius sowie dem Diffusionskoeffizienten der stationären Phase [97].

In der modernen Proteinanalytik kommt hauptsächlich die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*)



zum Einsatz, bei der im Vergleich zur konventionellen LC Säulen mit kleinerem Durchmesser und dichter Packung der stationären Phase verwendet werden. Dies ermöglicht eine Verringerung der Flussrate auf wenige  $\mu\text{L}/\text{min}$  bis  $\text{nL}/\text{min}$  bei gleichzeitig höherem Druck und führt zu verkürzten Retentionszeiten sowie schärferen und intensiveren Signalen und somit zu einer höheren Sensitivität (Tabelle 1.1). Aufgrund verringerter Diffusionseffekte wird der H-Wert kleiner (siehe van-Deemter-Gleichung).

**Tabelle 1.1:** Zusammenhang zwischen Durchmesser einer HPLC Säule, Flussgeschwindigkeit und der relativen Sensitivität [99]

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

Zur Trennung wurde in dieser Arbeit die Umkehrphasen-Chromatographie (RPC, engl. *Reversed Phase Chromatography*) und die Kationenaustauscherchromatographie (SCX, engl. *Strong Cation Exchange Chromatography*; siehe 1.6.2) verwendet.

Bei der RPC wird ein Substanzgemisch über eine hydrophobe stationäre und eine mobile Phase getrennt. Als stationäre Phase dienen hauptsächlich Kieselgele, die mit Alkylresten modifiziert wurden [76]. Dabei steigt der hydrophobe Charakter der stationären Phase mit der Länge der Kohlenwasserstoffketten und der Belegungsdichte, was bei einer Interaktion zur Zunahme der Retentionszeit der einzelnen Komponenten des Analyten führt. Für die Trennung von Peptidgemischen werden C18-Säulen bevorzugt. Die mobile Phase besteht aus Wasser, einem organischen Lösungsmittel und einem Ionenpaarreagenz [76]. Aufgrund seiner geringen Viskosität und geringen UV-Absorption wird Acetonitril bevorzugt als organisches Lösungsmittel verwendet. Das Ionenpaarreagenz, in der

Proteomanalyse zum Beispiel Trifluoressigsäure (TFA) oder Ameisensäure (FA), bindet als geladenes Reagenz über die Aminogruppe der Peptide an die Analyten, maskiert ihre Eigenladung und erhöht deren Hydrophobizität. Dadurch werden unspezifische Wechselwirkungen der ionischen Seitengruppen der Peptide mit polaren freien Silanolgruppen der Beadoberfläche der stationären Phase vermieden, eine Peakverbreiterung verhindert und somit die Trennleistung der Säule verbessert. Zur Elution wird eine Gradiententrennung angewandt, bei der durch einen steigenden Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase die Polarität verringert und dadurch die Elutionskraft erhöht wird. Bei einer ESI-Kopplung an ein Massenspektrometer sollte TFA nicht verwendet werden, da es durch Abschirmungseffekte die Effektivität der Ionisierung behindert [76, 100], daher wird stattdessen Ameisensäure eingesetzt.

#### 1.4.2 Ionisierungstechniken

Ein Massenspektrometer (MS) besteht hauptsächlich aus folgenden Bestandteilen [101]: Der Ionenquelle um die Probe zu ionisieren, einem oder mehreren Analysatoren, die die verschiedenen Ionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $= m/z$ ) auftrennen, und einem Detektor, der die Intensität des Ionenstroms nach Verlassen des Analysators und anschließender Signalverstärkung misst.

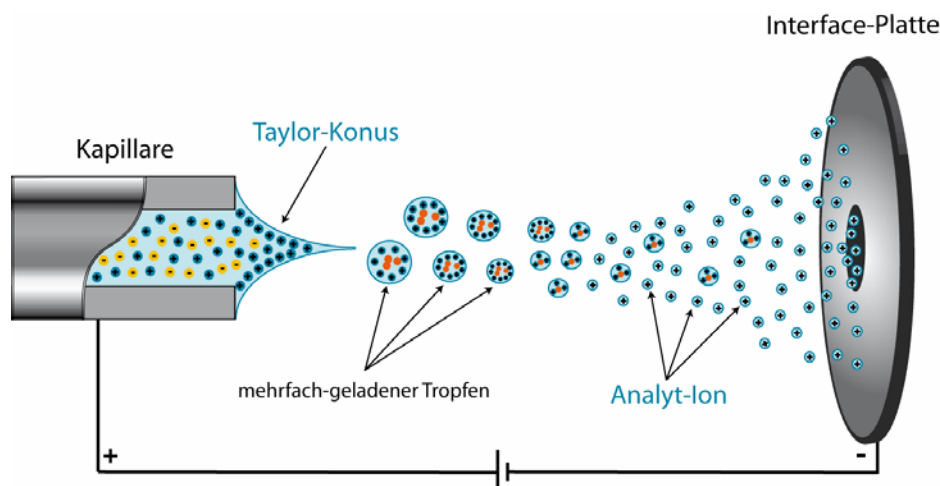
Die Ionisierung der Analytionen kann durch unterschiedliche Methoden erreicht werden. In der Bioanalytik werden am häufigsten die Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation (MALDI, engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) [102] und die Elektrospray-Ionisation (ESI, engl. *Electrospray Ionization*) [103] eingesetzt. Beides sind schonende Ionisierungstechniken, bei denen wenig innere Energie übertragen wird, wodurch eine Dissoziation der Analyten während der Ionisierung vermieden wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich ESI eingesetzt, da hierbei nano-HPLC mit ESI-Massenspektrometrie gekoppelt werden kann, so dass die eluierten Peptide sensitiv, schnell und automatisiert identifiziert werden können.

### *Elektrospray-Ionisation*

Bei der Elektrospray-Ionisation [103] wird die Probe in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel gelöst und durch eine dünne Kapillare in die Ionenquelle des Massenspektrometers geleitet. Aufgrund des angelegten elektrischen Feldes zwischen Kapillarspitze (Anode) und dem Einlass des Massenspektrometers (Kathode) werden positiv geladene Ionen an der Flüssigkeitsoberfläche angereichert und wandern Richtung Kathode, negative geladene Ionen wandern in entgegengesetzter Richtung zur Anode. Durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit entsteht ein stabiler Flüssigkeitskonus, der sogenannte Taylor-Konus [76]. In einiger Entfernung zur Anode wird dieser Flüssigkeitsstrom durch Evaporation des Lösungsmittels instabil und der Flüssigkeitsstrom wird in ein Aerosol hoch-geladener Tröpfchen zerstäubt. Die anschließende Desolvatisierung der geladenen Tröpfchen erfolgt durch Kollisionen mit den Stickstoffmolekülen des Gasstroms (*Curtain-Gas*) an der Schnittstelle zum Massenspektrometer. Wird durch die Lösungsmittelveaporation die elektrostatische Abstoßung an der Oberfläche größer als die Oberflächenspannung, wird die Stabilitätsgrenze dieser Tröpfchen, das sogenannte Rayleigh-Limit [104], überschritten und sie zerfallen durch Coulomb-Explosion [76, 105] (Abb. 1.3). Für die Entstehung von einzelnen gasförmigen Ionen gibt es zwei Theorien: Entweder sie bilden sich über Zerfälle der Tröpfchen bis ein einfach geladenes Ion übrig bleibt, welches anschließend komplett desolvatisiert wird (*Charged Residue Model*) [106-107] oder durch Emission einzelner gasförmiger Analyten aus einem Tröpfchen mit mehreren Ladungen (*Ion Evaporation Model*) [108-109]. Einige dieser Ionen gelangen über eine Öffnung in eine intermediäre Vakuumregion und von dort über spezifische Ionenoptiken in den Analysator des Massenspektrometers, der unter Hochvakuum steht.

Im Gegensatz zu MALDI resultiert der ESI-Prozess überwiegend in mehrfach geladenen Ionen.



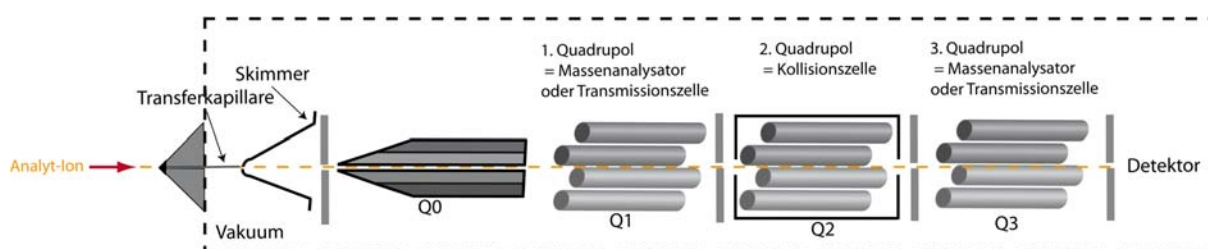
**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung des ESI-Prozesses. Der ESI-Prozess lässt sich formal in vier Schritte unterteilen [76]: 1. Die Bildung von kleinen geladenen Tröpfchen aus Elektrolyten mit positiver Ladung an der Oberfläche, 2. den kontinuierlichen Lösungsmittelverlust dieser Tröpfchen durch Evaporation, wobei die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt, 3. den wiederholten spontanen Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosionen) und schließlich 4. die vollständige Desolvatisierung der Analyt-Moleküle beim Transfer in das Massenspektrometer, wobei hauptsächlich mehrfach geladene Ionen entstehen.

### 1.4.3 Massenanalysatoren

#### *Triplequadrupol Analysatoren*

Triplequadrupol-Analysatoren sind aus vier Quadrupol-Stabsystemen aufgebaut, die jeweils aus einer Anordnung von vier parallelen, stabförmigen Metallelektroden bestehen (Abb 1.4). Der erste (Q1) und der dritte Quadrupol (Q3) können als Massenanalysator oder als Ionenübertragungseinheit/Filter für Ionen mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis verwendet werden. An jeweils gegenüber liegende Quadrupolstäbe ist eine Gleich- und eine hochfrequente Wechselspannung angelegt, wobei diese zwischen den Stabpaaren entgegengesetzt (Gleichspannung) beziehungsweise um  $180^\circ$  verschoben (Wechselspannung) sind. Abhängig von der Frequenz und den angelegten Spannungen können Ionen mit bestimmten  $m/z$  den Quadrupol auf einer stabilen oszillierenden Bahn durchlaufen, während alle anderen Ionen auf instabilen Bahnen fliegen und abgelenkt oder durch Kollisionen mit den Quadrupolstäben gestoppt werden [76]. Der 2. Quadrupol (Q2) ist von der Kollisionszelle umgeben und mit beispielsweise Argon als Kollisionsgas für CID

(engl. *Collision Induced Dissociation*) gefüllt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Triplequadrupol MS, der TSQ Vantage, sind die Stäbe des Q2 im 90 Grad Winkel gekrümmt, um eine Übertragung unerwünschter neutraler Teilchen zum Detektor zu verhindern, was die Intensität des Rauschens deutlich vermindert [110]. Quadrupol-Analysatoren besitzen vor allem im SRM-Modus (siehe Kapitel 1.5.4) eine hohe Sensitivität und Selektivität, aber nur eine geringe Scangeschwindigkeit und Auflösung. Zudem zeigen sie nur eine moderate Massengenauigkeit [76].



**Abbildung 1.4:** Vereinfachte schematische Darstellung der TSQ Vantage (modifiziert nach Thermo Fisher Scientific [110]; 90° Winkel von Q2 nicht abgebildet)

### *Ionenfallen Analysatoren*

In einer Ionenfalle (IT, engl. *Ion Trap*) können verschiedene Ionen gleichzeitig in einem geeigneten elektrischen Feld eingefangen, für variable Zeiten auf stabilen Bahnen gehalten/gespeichert und dann zur Massenanalyse gezielt aus der Ionenfalle entlassen werden. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Arten von Ionenfallen beschrieben:

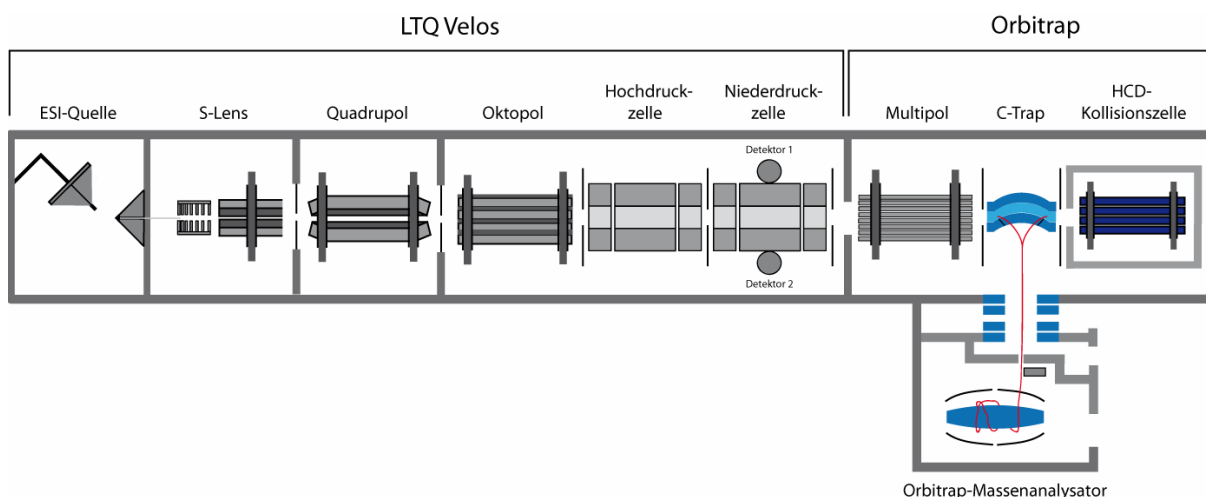
#### *a) Lineare Ionenfalle*

Die Funktionsweise einer Linearen Ionenfalle (LIT, engl. *Linear Ion Trap*) ähnelt der einer dreidimensionalen Ionenfalle (3D-IT), jedoch ist im Gegensatz zu einer 3D-IT nur ein zweidimensionales Hochfrequenzfeld angelegt. Zudem ist der Aufbau vergleichbar zu einem Quadrupol-Massenfilter: Vier kreisförmig um eine Achse angeordnete Stabelektroden erzeugen dabei ein elektrisches Hochfrequenzfeld, in dem sich die Ionen auf einer axialen Bahn bewegen. Zusätzliche Sperrpotentiale an den Enden halten die Ionen in der Falle. Die akkumulierten Ionen können massenselektiv entweder auf seitlich außerhalb angebrachte Detektoren gelenkt werden wie bei der LTQ Velos (Thermo Fisher Scientific, Abb. 1.5 vorderer Teil) oder, wie im Fall der LTQ-Orbitrap Velos (Abb. 1.5), über die C-Trap zur Massenanalyse in

die Orbitrap weitergeleitet werden, wodurch der gleichzeitige Einsatz von zwei Detektoren ermöglicht wird.

3D-ITs und LITs zeichnen sich durch eine hohe Scangeschwindigkeit und, aufgrund der hohen Speicherkapazität, durch eine hohe Sensitivität aus, wobei LITs im Vergleich zu 3D-ITs eine höhere Trap-Kapazität besitzen. Jedoch besitzen ITs nur eine relativ geringe Massengenauigkeit.

Ein Vorteil der LIT in der LTQ Velos gegenüber älteren Modellen ist die Einführung eines dualen Drucksystems aus einer Hoch- und einer Niederdruckzelle. Während ein optimaler Heliumgasdruck von 2 - 3 mTorr in der Hochdruckzelle zum Einfangen der Ionen, zur Isolierung der Vorläuferionen und zur Fragmentierung derselben verwendet wird und somit für eine effiziente CID sorgt, bewirkt der niedrigere Druck ( $< 1$  mTorr) in der Niederdruckzelle eine höhere Auflösung und eine größere Scangeschwindigkeit bei der Detektion.



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung der LTQ-Orbitrap Velos (nach Thermo Fisher Scientific [111])

### b) Orbitrap

Bei der LTQ-Orbitrap Velos (Abb. 1.5) werden die Analytione in der LIT gespeichert und dann entweder in der LTQ Velos detektiert oder axial ausgeworfen und in der mit Bremsgas gefüllten C-Trap (engl. *Curved Linear Trap*) erneut gespeichert. Anschließend werden die Ionen durch Änderung der angelegten Spannung in Form von Ionen-Päckchen in die Orbitrap transferiert. In der Orbitrap werden die Ionen durch elektrostatische Kräfte gespeichert, während sie mit einer für ihr  $m/z$ -Verhältnis charakteristischen Frequenz  $\omega$  axial um die zentrale Elektrode oszillieren. Der

dadurch im äußeren Bereich der Orbitrap induzierte Strom kann mit einem Verstärker detektiert werden. Aus den gemessenen komplexen Signalen kann durch die Fouriertransformation die jeweilige Frequenz und somit die Masse des Analyten bestimmt werden, da die Frequenz direkt proportional zu den  $m/z$ -Verhältnissen der Ionen ist [112-113] (siehe Gleichung (2)).

$$(2) \quad \omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

$\omega$  = Frequenz der Oszillation;  $k$  = instrumentenabhängige Konstante

In der LTQ-Orbitrap Velos kann entweder eine CID-Fragmentierung in der Hochdruckzelle der LIT stattfinden oder die Ionen werden über die C-Trap zur HCD (engl. *Higher Energy Collisional Dissociation*) - Kollisionszelle weitergeleitet, dort fragmentiert und dann in der Orbitrap detektiert. In einem Messzyklus kann also in der Orbitrap ein Übersichtsscan mit einer hohen Auflösung und Massengenauigkeit erstellt werden, während nach einem kurzen prä-MS-Scan in der schnelleren, aber ungenaueren LIT (geringere Auflösung, geringere Massengenauigkeit) bereits datenabhängig die intensivsten 3 - 10 Ionen mittels CID oder MSA (siehe 1.5.3) fragmentiert und ausgelesen werden können. Alternativ können die in der LIT erzeugten CID- oder MSA-Fragmente durch Transfer über die C-Trap auch in der Orbitrap ausgelesen werden. Für Phosphopeptide haben sich neben MSA-Scans auch HCD-Scans bewährt [114-116], deren Fragmente allerdings lediglich in der Orbitrap detektiert werden können.

Das Auflösungsvermögen  $R$  (siehe Gleichung (3)) der Orbitrap ist indirekt proportional zur Wurzel aus  $m/z$  [117], sinkt also bei konstanter Aufzeichnungsrate mit steigenden  $m/z$ -Werten.

$$(3) \quad R = \frac{m}{\Delta m_{50\%}} = \frac{1}{2\Delta\omega_{50\%}} \times \sqrt{\frac{k \times q}{m}}$$

$R$  = Auflösungsvermögen;  $m$  = Masse;  $\Delta m_{50\%}$  = Massen-Halbwertsbreite;  
 $\Delta\omega_{50\%}$  = Frequenz-Halbwertsbreite;  $q$  = Ladung;  $k$  = axiale Rückstellkraft

#### 1.4.4 Detektoren

Heutzutage enthalten Massenspektrometer als Detektor häufig eine Konversionsdynode und einen (Kanal-)Elektronenvervielfacher [110]. Die Ionen, die den Massenanalysator verlassen, treffen auf die Oberfläche der Konversionsdynode, wodurch eines oder mehrere Elektronen emittiert werden. Diese Sekundärteilchen werden von der folgenden Dynode beschleunigt und setzen beim Auftreffen auf die Kathodeninnenwand erneut Elektronen frei. Durch eine Vielzahl dieser Prozesse wird eine Elektrodenkaskade ausgelöst, die das Signal bis zum Kathodenende am Ende des Detektors verstärkt, wo es als elektrischer Strom gemessen werden kann. Der Elektrodenstrom ist dabei proportional zu den auf der Kathode auftreffenden Sekundärteilchen.

Bei der Orbitrap wird zur Detektion mit Hilfe eines Verstärkers der Strom gemessen, den die oszillierenden Ionen in den Detektorplatten erzeugen. Da die Ionen nicht vom Detektor absorbiert werden, können sie wiederholt analysiert werden, um eine sehr hohe Messgenauigkeit zu erzielen.

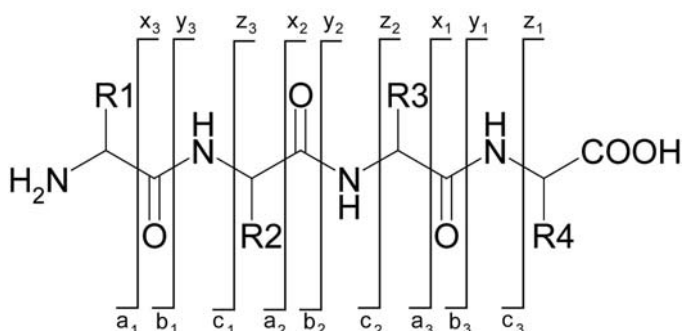
### 1.5 Die massenspektrometrische Analytik der Phosphorylierung

Die Analytik von Phosphorylierungen wird durch die Stöchiometrie der Phosphorylierungsstellen und deren transienten Charakter erschwert. Jedoch wurden mit zunehmender Bedeutung dieser Forschungsrichtung die Isolation, die Detektion und Lokalisierung sowie die Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen immer spezifischer und sensitiver. Während in der Vergangenheit ein Nachweis der modifizierten Aminosäure hauptsächlich durch radioaktiv-markiertes Phosphat [118-119] und Kapillarelektrophorese, mittels Aminosäurenanalyse oder durch Edman-Sequenzierung [120] erfolgte, ist heutzutage eine Kombination von verschiedenen Anreicherungsstrategien und anschließender massenspektrometrischer Detektion die Methode der Wahl. Dadurch wird es möglich in einer einzigen Probe im femtomol oder sogar attomol Bereich hunderte bis tausende Phosphorylierungsstellen zu identifizieren und relativ zu quantifizieren [88, 121-126].



### 1.5.1 Sequenzierung von Peptiden mittels Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)

Neben einem Übersichtsscan ( $MS^1$ ), der die  $m/z$ -Werte aller Peptide in einem definierten Bereich aufzeigt, kann beispielsweise durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) ein MS/MS-Fragmentationenspektrum erzeugt werden [127]. Mittels der Tandem-Massenspektrometrie können neben der Masse des Analyten strukturelle Informationen (Aminosäuresequenz, Position von Modifikationen) gewonnen werden. Im Fall von Peptiden erzeugen CID-Fragmentierungen durch den Zusammenstoß von Peptid-Ionen mit Gasmolekülen primär b- und y-Ionenserien (Nomenklatur nach Biemann [128], siehe Abb. 1.6), wobei b-Ionen den ursprünglichen N-Terminus und y-Ionen den C-Terminus enthalten. Durch andere Fragmentierungsarten wie die Electron Capture Dissociation (ECD) oder die Electron Transfer Dissociation (ETD) werden die Peptidionen N- beziehungsweise C-terminal der Peptidbindung gespalten und es entstehen a/x- oder c/z-Fragment-Ionenserien.



**Abbildung 1.6:** Schema der Fragmentierung von Peptiden nach Biemann [79]. Je nach Stelle der Fragmentierung können a/x-, b/y- oder c/z-Ionenserien entstehen.

### 1.5.2 Neutralverlust-Scan

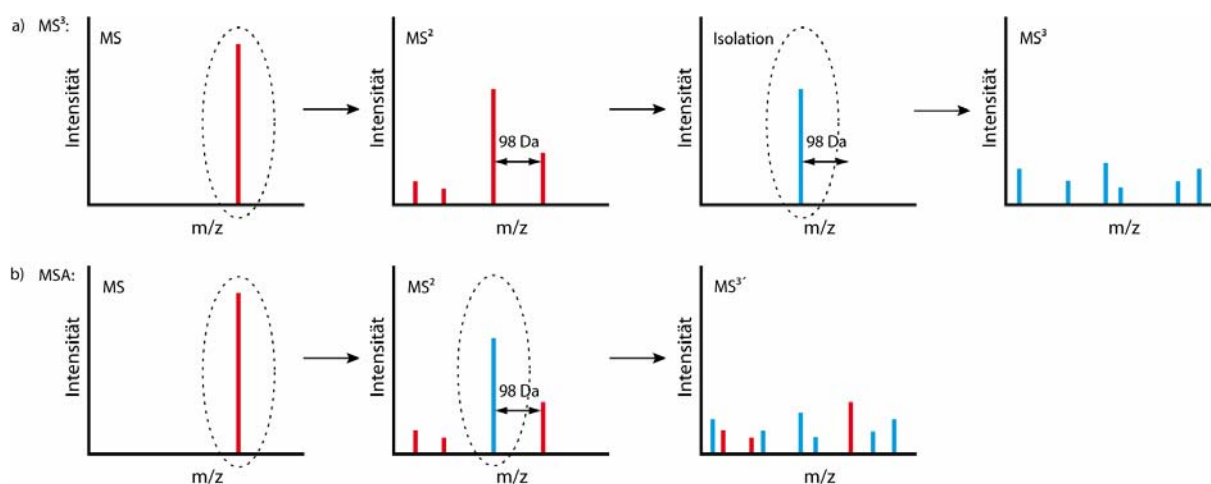
Bei der Fragmentierung von Phosphopeptidionen durch CID kann häufig ein sogenannter Neutralverlust (NL, engl. Neutral Loss) durch Abspaltung von Phosphorsäure ( $H_3PO_4$ , 98 Da) oder auch in geringem Maße von meta-Phosphorsäure ( $HPO_3$ , 80 Da) beobachtet werden, da die Phosphorsäureesterbindung sehr labil ist. Der Neutralverlust von  $H_3PO_4$  dominiert dabei oft in den Fragmentationenspektren [129] und tritt zusammen mit verminderter Fragmentierung des Peptidrückgrats auf. Da die Peptidfragmentationen ebenfalls wieder einen NL von  $H_3PO_4$  aufweisen können, ist die Sequenzinformation der MS/MS Spektren häufig für eine korrekte Annotation der Phosphorylierungsstelle innerhalb der Peptidsequenz nicht ausreichend.

Durch einen spezifischen NL-Scan nach 98 oder 80 Da, beispielsweise auf Triplequadrupol-Massenanalysatoren [130-132] kann das prominente Ionensignal jedoch dafür genutzt werden, gezielt Phosphopeptidsignale aus einer komplexen Probe zu isolieren und zu detektieren. Dabei filtert der erste Quadrupol (Q1) kontinuierlich Molekülionen eines definierten  $m/z$ -Bereiches und lässt diese passieren, der zweite Quadrupol (Q2) dient als Kollisionszelle für CID und der dritte Quadrupol (Q3) arbeitet als Massenfilter mit einer definierten  $m/z$  Differenz zum ersten Quadrupol, zum Beispiel dem Neutralverlust von  $H_3PO_4$  vom Mutterion ( $[M+H-98]^+$ ). Da lediglich ein Fragmentspektrum des Mutterions akquiriert wird wenn ein korrespondierendes Paar aus Mutterion und NL-Ion detektiert wurde, kann der messbare dynamische Bereich für die Analyse von Phosphopeptiden stark erhöht werden. Phosphotyrosine zeigen aufgrund ihrer hohen Stabilität unter CID Bedingungen üblicherweise keinen NL.

### 1.5.3 MS<sup>3</sup> und MSA

Für die erfolgreiche Identifikation von phosphorylierten Peptiden in Ionenfallen trotz NL kann nach Fragmentierung des Peptides das dominierende NL-Signal isoliert und erneut CID unterzogen werden, um ein MS<sup>3</sup>-Spektrum zu generieren (Abb. 1.7a) [133-134].

Schroeder et al. [135] führten für Ionenfallen die *Multistage Activation* (MSA; auch pseudo-MS<sup>3</sup>) ein, bei der durch zeitgleiche Anregung und Fragmentierung sowohl des Vorläuferions als auch des potentiell auftretenden NL-Signals ein einziges Ionenspektrum erzeugt wird, in dem gewissermaßen eine Kombination aus MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup> dargestellt wird (Abb. 1.7b). Vor allem bei benachbarten Serin-/Threoninresten können Phosphopeptide trotz MSA Spektren mit mäßiger bis schlechter Qualität generieren, die eine Zuordnung der Phosphorylierungsstelle weiterhin verhindern.



**Abbildung 1.7:** Schematischer Ablauf von MS<sup>3</sup> und MSA (nach [136]). (a) Bei MS<sup>3</sup> wird ein Phosphopeptid für CID ausgewählt und isoliert. Ist während der Fragmentierung ein dominanter Neutralverlust-Peak (- 98 Da) detektierbar, wird dieser erneut isoliert und mittels CID fragmentiert. Als Resultat entstehen Fragmentionen des Neutralverlust-Peakes. (b) Bei MSA wird ein Phosphopeptid für CID ausgewählt und isoliert. Ist während der Fragmentierung ein dominanter Neutralverlust-Peak von - 98 Da detektierbar, wird dieser mittels CID re-aktiviert. Das Resultat ist ein Produktionen-Spektrum, das Fragmentionen von beiden CID Ereignissen enthält. Rote und blaue Balken repräsentieren Vorläuferionen und Fragmentionen des ersten beziehungsweise zweiten Fragmentierungsereignisses.

#### 1.5.4 Selected Reaction Monitoring / Multiple Reaction Monitoring

Die Verwendung eines Triplequadrupol-Massenanalysators ermöglicht eine weitere hoch sensitive Methode um spezifisch nach vordefinierten Phosphopeptiden zu scannen, das sogenannte Selected Reaction Monitoring (SRM; auch Multiple Reaction Monitoring, MRM) [137-139]. Dabei werden Q1 und Q3 als  $m/z$  Filter für vordefinierte Mutterion/Fragmention-Paare, den sogenannten Übergang, verwendet während in Q2 die Fragmentierung mittels CID erfolgt. Sobald ein korrespondierendes SRM Übergangspaar detektiert wurde, wird im Detektor ein Signal erzeugt, das entsprechend an den Computer übermittelt wird. Die Auswahl geeigneter  $m/z$  Übergänge kann dabei entweder anhand von Spektren bereits detektierter Phosphopeptide oder durch theoretische Fragmentierung, zum Beispiel mittels der ProteinProspector Software, getroffen werden. Da im SRM Modus nur eine bestimmte Anzahl an Übergängen gemessen wird, wird die Messgeschwindigkeit, das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis, der dynamische Bereich, die Selektivität und somit auch die Sensitivität gegenüber einer normalen Messung

verbessert [140]. Allerdings können auf diese Weise nur Phosphopeptide identifiziert werden, die zuvor durch die Übergänge definiert wurden [141].

### **1.6 Spezifische Anreicherung negativ geladener Peptide/Proteine**

Trotz der erwähnten Messmethoden ergibt sich in der Massenspektrometrie das Problem, dass die Phosphoproteine im Proteom unterrepräsentiert sind und die Ionisierungseffizienz von Phosphopeptiden im Vergleich zu den entsprechenden unmodifizierten Peptiden reduziert ist [142]. Um die Probenkomplexität zu reduzieren und den zugänglichen dynamischen Bereich zu verbessern [81], sind daher eine gezielte Vorfraktionierung und/oder eine spezifische Anreicherung nötig [143]. Durch die Labilität dieser Modifikation im MS wird die Phosphopeptidanalyse zusätzlich erschwert, weshalb zumindest bei der Probenvorbereitung durch Zugabe von Phosphataseinhibitoren [144] und durch eine geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen [80] eine vorzeitige Abspaltung der Phosphatgruppen zu vermeiden ist.

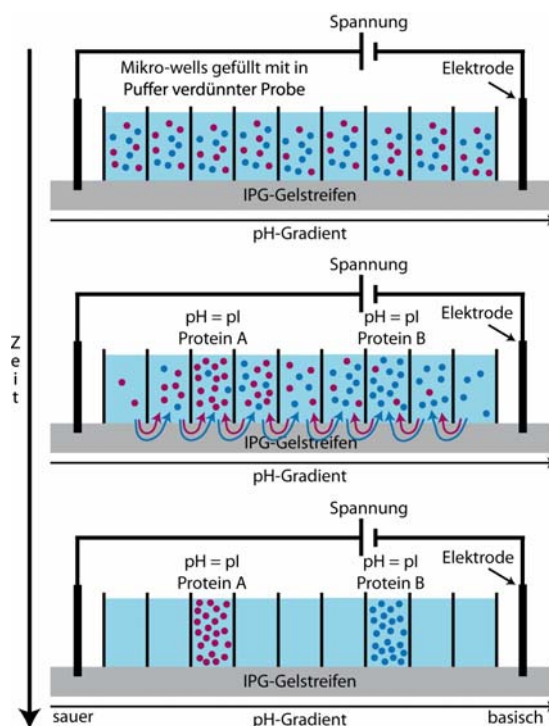
Die Anreicherung von Phosphopeptiden basiert hauptsächlich auf zwei Charakteristika, die phosphorylierte von nicht-phosphorylierten Peptiden unterscheiden: die Phosphatgruppe besitzt aufgrund ihres niedrigen  $pK_S$ -Wertes eine negative Ladung und hat zudem eine spezielle sterische Struktur. Jedoch können bei den verschiedenen Anreicherungsstrategien auch Peptide mit ähnlichen Eigenschaften, wie beispielsweise Sialinsäure-haltige Peptide [145-146] oder Peptide mit mehreren sauren und/oder Histidin-Resten [147-148], unbeabsichtigt mit angereichert werden. Um dies zu verhindern, können die Proben zum Beispiel durch Methylesterifizierung der Carboxylgruppe [124, 149], durch enzymatische Entfernung der Sialinsäure [150] oder durch Zugabe von kompetitiven Additiven zu den während der Anreicherung verwendeten Ladepuffern spezifisch modifiziert werden.

In den letzten Jahren konnten im Bereich der MS-gekoppelten Phosphopeptidanalytik vor allem die Kationenaustausch-Chromatographie (SCX, engl. *Strong Cation Exchange*) [121-122] und die Anreicherung mit Metalloxiden wie Titandioxid ( $TiO_2$ ) [151] etabliert werden, weshalb diese Methoden im Fokus der vorliegenden Arbeit liegen. Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit für die

Anreicherung von mitochondrialen Phosphopeptiden die isoelektrische Fokussierung (IEF, engl. *Isoelectric Focussing*) [152-153] sowohl auf Protein- als auch auf Peptidebene und die Elektrostatische Repulsions-/hydrophile Interaktionschromatographie (ERLIC, engl. *Electrostatic Repulsion- Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) [154] verwendet.

### 1.6.1 Isoelektrische Fokussierung von Proteinen und Peptiden

Da die Aminosäuren eines Proteins/Peptides je nach pH-Wert des umgebenden Mediums unterschiedliche, positive oder negative Ladungen tragen, wird bei der Isoelektrischen Fokussierung auf einem Gelstreifen ein pH-Gradient immobilisiert (IPG-Gelstreifen), in dem sich die Proteine/Peptide im elektrischen Feld entlang bewegen können. Sobald sie den pH-Wert erreicht haben, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, wandern sie nicht weiter, da an diesem Punkt die Nettoladung des Proteins/Peptides null ist (Abb. 1.8).



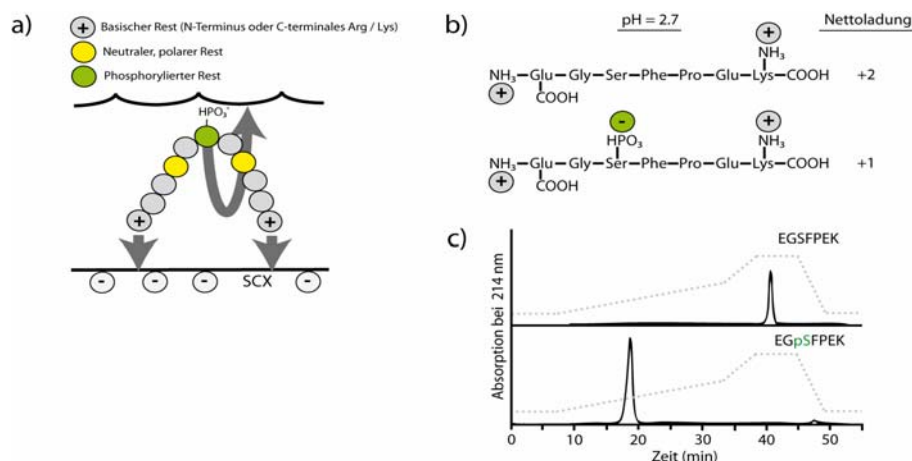
**Abbildung 1.8:** Trennprinzip der flüssigen isoelektrischen Fokussierung. Anfänglich, ohne Spannung, verteilt sich die Probe mittels IPG-Gelstreifen (= auf einem Gelstreifen immobilisierter pH-Gradient) noch über alle Wells. Sobald eine Spannung an die Enden des Gelstreifens angelegt wird, wandern die Proteine/Peptide, bis sie in ein Well gelangen, an dem der pH-Wert des Gelstreifens ihrem Isoelektrischen Punkt ( $pI$ ) entspricht.

Durch das Anhängen einer Phosphatgruppe wird der isoelektrische Punkt ( $pI$ ) eines Peptides in Richtung eines saureren  $pI$  verschoben, was Maccarone et al. [152] für die Anreicherung von Phosphopeptiden mittels isoelektrischer Fokussierung nutzen konnten. Während der IEF wird dabei die Mehrheit der Phosphopeptide in den vorderen Fraktionen der IEF ( $pH$ -Bereich von 3 bis 6) [152-153] fokussiert.

### 1.6.2 Kationenaustausch-Chromatographie

Bei der Kationenaustausch-Chromatographie sind negativ geladene funktionelle Gruppen an polymere Harze als Trägermaterial gebunden. Am gebräuchlichsten sind Sulfomethyl- und Sulfopropyl-Gruppen, da sie zwei starke Ionenaustauscher darstellen und über einen weiten  $pH$ -Bereich den Ladungszustand beibehalten. In Abhängigkeit von ihrer Aminosäurezusammensetzung wechselwirken Peptide unterschiedlich stark mit der stationären Phase, wobei positive Reste für eine stärkere Bindung sorgen (Abb. 1.9a). Eine Elution kann mittels Salz- oder  $pH$ -Stufen- bzw. Gradientenelution erreicht werden. Die Kationen der mobilen Phase verdrängen dabei aufgrund ihrer hohen Affinität zur negativen Matrix in einer Konkurrenzreaktion die Peptide. Durch die Änderung des  $pH$ -Wertes kann der Ladungszustand der Peptide geändert werden beziehungsweise dies kann auch zur Änderung des Ladungszustandes der stationären Phase führen, was sich auf die Affinität der Peptide zur Austauschermatrix auswirkt.

Bei einer SCX-Auftrennung bei einem  $pH$ -Wert von 2,7 tragen tryptische Peptide normalerweise eine Nettoladung von 2+ (Abb. 1.9b) oder 3+ (bei überlesenen Schnittstellen oder internen Histidin-Resten), da unter diesen Bedingungen nur der Aminoterminus, die carboxyterminalen Lysine und Arginine sowie Histidin-Reste positiv geladen sind. Bei Phosphopeptiden verringert jede negativ geladene Phosphatgruppe die Gesamtladung um eins. Folglich haben die meisten phosphorylierten Peptide eine Ladung von 1+ (Abb. 1.9b), binden somit schwächer an das SCX-Material als nicht-phosphorylierte und werden im Gradient früher eluiert (Abb. 1.9c). Somit lassen sich während einer SCX-Auftrennung bei  $pH$  2,7 die ladungsreduzierten Phosphopeptide von der Hauptmasse an nicht-phosphorylierten Peptiden trennen [121-122].



**Abbildung 1.9:** Phosphopeptidanreicherung mittels SCX (nach [154], [121]). (a) Die basischen Reste des Phosphopeptides interagieren mit der negativen stationären Phase während die Phosphatgruppe abgestoßen wird, (b) Ladungsverteilung des Peptids EGSFPEK bei pH 2,7 in nicht-phosphorylierter (oben) und phosphorylierter Form (unten), (c) Theoretische SCX-Auftrennung des Peptids EGSFPEK bei pH 2,7 in nicht-phosphorylierter (oben) und phosphorylierter Form (unten). Während das Phosphopeptid bereits im vorderen Bereich des Gradienten (gestrichelte graue Linie) eluiert, wird die nicht-phosphorylierte Variante erst bei höherem Salzgehalt eluiert.

### 1.6.3 Elektrostatische Repulsions-/hydrophile Interaktionschromatographie

Die Elektrostatische Repulsions-/hydrophile Interaktionschromatographie beruht auf einer Kombination aus schwachem Anionen-Austauscher (WAX, engl. Weak Anion Exchange) und hydrophiler Interaktion (HILIC [155-157]). Bei einem niedrigen pH-Wert sind die Carboxylgruppen der Aspartat- und Glutamat-Reste sowie der C-Terminus weitgehend protoniert und daher ungeladen, während der N-Terminus positiv geladen ist, was bei einer WAX Chromatographie generell eine Abstoßung der Peptide zur Folge hat. Bei Phosphopeptiden interagiert jedoch die negativ geladene Phosphatgruppe mit der stationären WAX-Phase und führt daher im Vergleich zu nicht-phosphorylierten Peptiden zu einer höheren Retentionszeit [154]. Durch die Verwendung einer hohen Konzentration an organischem Lösungsmittel wird die Retention zusätzlich verstärkt, da die hydrophile Interaktion der Phosphatgruppe mit der stationären Phase gefördert wird. Somit wird der Retentionszeitunterschied zwischen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Peptiden vergrößert, was eine gute Fraktionierung ermöglicht. Durch Elution mittels ansteigender Salzkonzentration können monophosphorylierte Peptide vor mehrfach phosphorylierten Peptiden eluiert werden.

#### 1.6.4 Metalloxide

Die Anreicherung von Phosphopeptiden mittels Metalloxiden, vor allem mit Titanoxid [126, 158], ist derzeit im Bereich der Proteomforschung eine der am meisten genutzten Methoden. Die nahe beieinander liegenden Sauerstoffatome der Phosphatgruppe besitzen bei saurem pH-Wert eine starke Affinität zur positiv geladenen Titaniumdioxid ( $\text{TiO}_2$ )-Oberfläche und bilden eine zweizählige Interaktion aus. Dabei beeinflussen mehrere Faktoren die Phosphopeptid-Affinität zu  $\text{TiO}_2$  wie beispielsweise die Primärstruktur der Peptide, die Position und Anzahl der Phosphoryl-Gruppen oder zusätzliche elektrostatische Ladungen der Peptide [159]. Da Phosphopeptide generell eine hohe Affinität zu Metalloxiden zeigen, können alternativ auch  $\text{ZrO}_2$  [160],  $\text{HfO}_2$  [161],  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  [162] oder  $\text{SnO}_2$  [163-164] verwendet werden. Um die Selektivität der Bindung von Phosphopeptiden an  $\text{TiO}_2$  zu verbessern, können Additive wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [151], das Natriumsalz der 1-Octansulfonsäure (OSA) [165], Glutaminsäure [166], Phthalsäure [167-168] oder HFBA [169] als Kompetitoren zum Ladepuffer zugegeben werden, um die Adsorption von nicht-phosphorylierten Peptiden zu verhindern. Eine Elution der gebundenen Phosphopeptide erfolgt entweder durch Verdrängung mittels Phosphathaltiger Puffer [165], mit Hilfe von alkalischen Puffern wie Ammoniumhydroxidlösungen [167-168, 170] oder durch pH-Stufen-Gradienten [171]. In  $\text{TiO}_2$  angereicherten Proben werden mittels MS hauptsächlich monophosphorylierte Peptide detektiert, da multiphosphorylierte Peptide stärker an die  $\text{TiO}_2$ -Oberfläche binden, daher wahrscheinlich nicht vollständig wieder eluiert und in der Analyse zudem durch die größere Anzahl an monophosphorylierten Peptiden unterdrückt werden [172].

### 1.7 Differentielle Phosphoproteomanalyse

Neben der qualitativen Phosphopeptidanalytik wird in den letzten Jahren auch zunehmend die Quantifizierung von phosphorylierten Peptiden/Proteinen von Bedeutung, um ein komplettes Bild zur Modellierung der komplexen zellulären Netzwerke zu erhalten. Derzeit sind die diversesten Quantifizierungstechniken verfügbar [143], wobei generell zwischen der Quantifizierung (1) mittels Stabilisotopen Markierung z.B. anhand von isobaren Labeln und (2) labelfreier

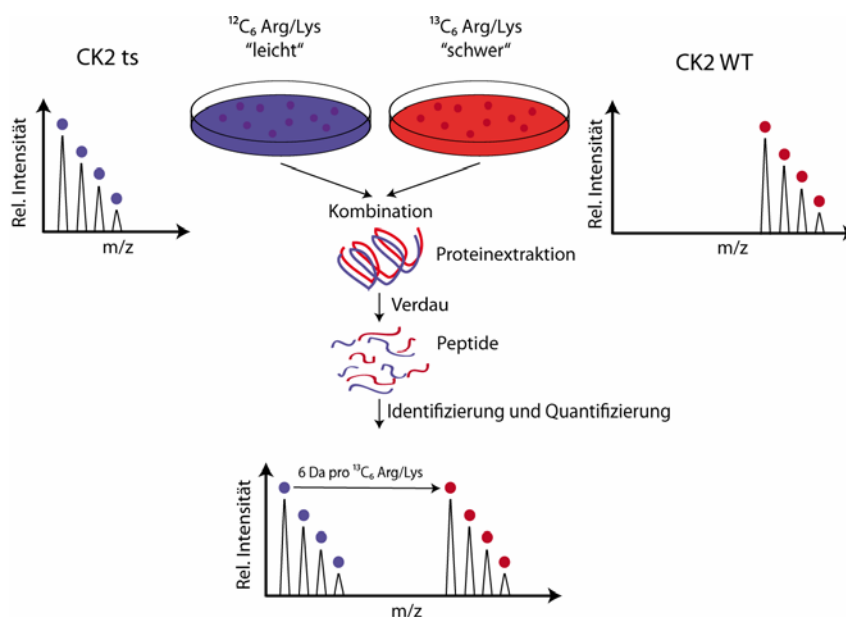


Quantifizierung unterschieden wird. Da in dieser Arbeit keine chemischen Label wie TMT (*Tandem Mass Tags*) oder iTRAQ (*Isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation*) verwendet wurden, wird im Folgenden lediglich auf die übrigen Quantifizierungsmethoden eingegangen.

### 1.7.1 Quantifizierung mittels Stabil-Isotopen Markierung

Bei der Quantifizierung mittels Stabil-Isotopen Markierung werden zwei Peptid-Isoformen generiert, die identische physiko-chemische Eigenschaften während der Probenvorbereitung/-trennung, der Ionisierung und der Detektion aufweisen, sich dabei jedoch in ihrer Masse unterscheiden. Generell können diese Stabil-Isotopen *in vivo* durch z.B. SILAC [173-174] (engl. *Stable Isotope Labeling of Amino Acids in Cell Culture*) oder *in vitro* durch z.B. ICPL [175] (engl. *Isotope-coded Protein Label*) eingebaut werden.

Beim metabolischen SILAC-Label können zwei Zellpopulationen individuell markiert werden. Eine Zelllinie wird auf Medium, das die normale (leichte) Aminosäure enthält, angezogen und die andere auf Medium, das essentielle Stabil-Isotopen markierte Aminosäuren enthält (siehe Abb. 1.10). Nach der Kultivierung können die Proben kombiniert werden, so dass bei allen weiteren Schritten die beiden Zelllinien zusammen bearbeitet und analysiert werden können, was die Fehler, die theoretisch während der Probenaufarbeitung eingeführt werden könnten, reduziert.



**Abbildung 1.10:** Quantifizierung mittels Stabil-Isotopen Markierung durch SILAC (modifiziert nach [176]). Als exemplarisches Beispiel ist das in dieser Arbeit analysierte SILAC Model abgebildet, bei dem die zwei verschiedenen Zelllinien CK2 ts und CK2 WT individuell markiert wurden. Während die Temperatur-sensitive Mutante CK2 ts auf Medium angezogen wurde, das die normalen (leichten) Aminosäuren enthielt, wurde der CK2 Wildtyp auf Medium, das essentielle Stabil-Isotopen markierte Aminosäuren enthält kultiviert. In diesem Fall wurden  $^{13}\text{C}_6$ -Arginin und  $^{13}\text{C}_6$ -Lysin als markierte Aminosäuren verwendet. Im Anschluss an die Kultivierung werden die Proben kombiniert und können gemeinsam verdaut, angereichert, aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert werden. SILAC führt hierbei im Vergleich zur unmarkierten Peptid-Variante zu einem Massenshift von 6 Da für jedes eingebaute Arginin/Lysin. Die Quantifizierung erfolgt durch einen Vergleich der MS<sup>1</sup> Peakflächen der markierten und unmarkierten Peptide, die ihr Abundanzverhältnis widerspiegeln.

Jedoch können nicht alle Zelltypen in dem für SILAC notwendigen depletierten Medium kultiviert werden und da für eine nahezu vollständige Inkorporation eine bestimmte Anzahl an Passagen notwendig ist, kann SILAC praktisch nicht für primäre Zelllinien verwendet werden. Daher wurden für quantitative Proteomanalysen *in vitro* Methoden wie ICPL eingeführt, die sowohl auf Protein- als auch auf Peptidebene durchgeführt werden können.

### 1.7.2 Labelfreie Quantifizierung

Im Gegensatz zu der obigen Quantifizierungsmethode sind bei der labelfreien Quantifizierung keine weiteren chemischen Arbeitsschritte und keine weitere Probenvorbereitung notwendig. Zudem ist es möglich das differentielle Peptidmuster über mehrere LC-MS/MS-Analysen hinweg zu bestimmen. Um Veränderungen in den Proteinabundanzen zu bestimmen, werden beispielsweise die MS-Signalintensitäten eines Peptid-Vorläuferions, das zu einem bestimmten Protein gehört, gemessen und verglichen. Die extrahierten Ionenchromatogramme (XICs, engl. *Extracted Ion Chromatograms*) können dabei genutzt werden, um die spezifischen Analyt-Peakflächen im Verlaufe der Zeit in den verschiedenen Proben zu integrieren. Eine weitere labelfreie Quantifizierungsmethode stellen die in 1.4.4 beschriebenen SRMs dar.

Für eine labelfreie Quantifizierung sind jedoch eine in hohem Maße reproduzierbare und hochauflösende LC sowie reproduzierbare und hochauflösende MS-Bedingungen obligatorisch, da eine Ko-Elution von Analyten mit ähnlichem  $m/z$  eine

akkurate Quantifizierung verhindert. Zudem ist mit dieser Quantifizierungsmethode nur eine sukzessive Analyse möglich, da die verwendeten Proben für eine Messung nicht kombiniert werden können.

## 2 Zielsetzung

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnten bereits einige Phosphorylierungsstellen in Hefe-Mitochondrien sowie zahlreiche Phosphatasen und Kinasen [26-27, 89] gefunden werden, die mögliche Indizien für eine Regulation mitochondrialer Vorgänge über reversible Phosphorylierung sind. Externe Proteomstudien wiesen außerdem Phosphorylierungsstellen am TOM-Komplex nach [90-94], deren funktionelle Relevanz bisher jedoch weitgehend ungeklärt ist. Vorläufige Ergebnisse legen nahe, dass der Proteinimport in Mitochondrien über posttranslationale Modifikationen reguliert werden kann, da das Phosphorylierungsmuster der mitochondrialen Transportkomplexe einen Einfluss auf die Stabilität der Einzelkomponenten und die Assemblierung des gesamten Transportapparates hat [95].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Phosphorylierungsstellen im mitochondrialen Proteom zu identifizieren sowie das mitochondriale Phosphoproteom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit dem von Mitochondrien aus verschiedenen Mausorganen und von humanen Mitochondrien zu vergleichen. Hierzu sollen die derzeit gängigen Methoden zur Anreicherung von Phosphopeptiden aus komplexen Gemischen für die Anwendung auf mitochondriale Außenmembranfraktionen und komplette Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* etabliert und optimiert werden. Ein Fokus liegt dabei auf der Analyse der Protein-Zusammensetzung der mitochondrialen Außenmembran und deren Phosphorylierungsmuster, insbesondere von Proteinen des TOM- (*Translocase of the Outer Membrane*) Komplexes, der den zentralen Eintrittspunkt für Proteine in Mitochondrien darstellt. Neben der rein qualitativen Analyse von Phosphorylierungen sollen in dieser Arbeit Strategien zur Quantifizierung einzelner Phosphorylierungsstellen entwickelt werden. Dabei wird zum einen der klassische SILAC-Ansatz [173] verwendet, um Unterschiede im Phosphoproteom von CK2-Wildtyp und temperatursensitiven CK2-Mutanten-Hefestämmen zu quantifizieren. Zum anderen werden modernere labelfreie Methoden wie beispielsweise SRM-Scans auf ihre Anwendbarkeit als allgemeine Quantifizierungsmethode für Phosphorylierungsstellen getestet und optimiert.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3.1:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien und deren Reinheitsgrad

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz	CAS-Nr.
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck	Darmstadt	3483-12-3
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem	Darmstadt	7365-45-9
2-Jodacetamid (IAA)	Merck	Darmstadt	144-48-9
Aceton (LiChrosolv)	Merck	Darmstadt	67-64-1
Acetonitril (LiChrosolv)	Merck	Darmstadt	75-05-8
Acetonitril (ULC/MS)	Biosolve	Valkenswaard, NL	75-05-8
Adenosine 5'-triphosphat-dinatriumsalz, Hydrat (99%)	Sigma Aldrich	Steinheim	987-65-5
Alkalische Phosphatase (P0114-10KU)	Sigma Aldrich	Steinheim	9001-78-9
AMBERLITE IRN-150 Ionenaustauscher	Merck	Darmstadt	79956-14-2
Ameisensäure	Biosolve	Valkenswaard, NL	64-18-6
Ameisensäure	Merck	Darmstadt	64-18-6
Ammoniumacetat (ultra 99%)	Fluka	Steinheim	631-61-8
Ammoniumformiat	VWR	Langenfeld	540-69-2
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt	1066-33-7
Ammoniumhydrogencarbonat (BioUltra)	Fluka	Steinheim	1066-33-7
Ammoniumhydroxid (25 %)	Sigma Aldrich	Steinheim	1336-21-6
Ammoniumsulfat (reinst)	Merck	Darmstadt	7783-20-2
Ampholyte, hochauflösend, pH 3-10 (~ 40% in Wasser)	Fluka	Steinheim	-----
BCA Proteinbestimmungs-kit	Thermo Fisher Scientific	Dreieich	-----
Calciumchlorid, entwässert	Merck	Darmstadt	10043-52-4
CHAPS	Merck	Darmstadt	75621-03-3
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma Aldrich	Steinheim	6104-58-1
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck	Darmstadt	50-01-1
Ethanol (96%, vergällt)	Roth	Karlsruhe	64-17-5
Ethanol (LiChrosolv)	VWR	Langenfeld	64-17-5
Ethanol (p.a.)	Merck	Darmstadt	64-17-5
Ethanolamin	Sigma Aldrich	Steinheim	141-43-5
Formaldehyd-Lösung (37%)	Sigma Aldrich	Steinheim	10034-99-8
Glaskugeln, 0,8 mm Durchmesser, Borsilikat	VWR	Nürnberg	-----
D(+)-Glukose Monohydrat	Merck	Darmstadt	14431-43-7
Glycerin, wasserfrei (reinst)	Merck	Darmstadt	56-81-5
Guanidiniumhydrochlorid	Fluka	Steinheim	50-01-1
Harnstoff	AppliChem	Darmstadt	57-13-6
Immobiline Dry Strip, pH 3-10 NL, 24 cm	GE Healthcare	München	-----
Isopropanol	Merck	Darmstadt	67-63-0
Kaliumchlorid (Suprapur)	Merck	Darmstadt	7447-40-7
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt	7778-77-0
Kaliumdihydrogenphosphat (Suprapur)	Merck	Darmstadt	7778-77-0

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz	CAS-Nr.
LDS-Probenpuffer (4x)	Invitrogen	Karlsruhe	-----
Magnesiumchlorid, wasserfrei (purum)	Fluka	Steinheim	7786-30-3
Mark12 Proteinstandard	Invitrogen	Karlsruhe	-----
Methanol (LiChrosolv)	Merck	Darmstadt	67-56-1
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck	Darmstadt	127-09-3
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Applichem	Darmstadt	34620-78-5
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt	7647-14-5
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	Darmstadt	16940-66-2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem	Darmstadt	151-21-3
Natriumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt	1936-15-8
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt	1310-73-2
Natriumthiosulfat-Pentahydrat (reinst)	Merck	Darmstadt	75-05-8
NuPAGE Bis-Tris Gele, 1mm (10%, 12%, 4-12%)	Invitrogen	Karlsruhe	-----
NuPAGE MOPS-Laufpuffer (20x)	Invitrogen	Karlsruhe	-----
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	Fluka	Steinheim	7664-38-2
Ortho-Phosphorsäure (89 %)	Merck	Darmstadt	7664-38-2
Phosphataseinhibitoren PhosStop	Roche Diagnostics	Mannheim	-----
Phthalsäure	Sigma Aldrich	Steinheim	88-99-3
Piperidin	Sigma Aldrich	Steinheim	110-89-4
Proteaseinhibitoren Complete Mini EDTA-frei	Roche Diagnostics	Mannheim	-----
Pyrrolidin	Sigma Aldrich	Steinheim	123-75-1
Salzsäure	Merck	Darmstadt	7647-01-0
Silbernitrat	Roth	Karlsruhe	64-18-6
Thioharnstoff	Merck	Darmstadt	62-56-6
Titriplex III (EDTA)	Merck	Darmstadt	6381-92-6
Trichloressigsäure	Merck	Darmstadt	64-17-5
Trichloressigsäure	Roth	Karlsruhe	64-17-5
Triethylamin (p.a. 99,5%)	Fluka	Steinheim	121-44-8
Trifluoressigsäure	Merck	Darmstadt	7791-18-6
Trifluoressigsäure (ULC/MS)	Biosolve	Valkenswaard, NL	7791-18-6
Tris-Base (ultrapure)	AppliChem	Darmstadt	77-86-1
Trypsin (Sequencing Grade)	Roche Diagnostics	Mannheim	9002-07-7
Trypsin 93614	Sigma Aldrich	Steinheim	9002-07-7
Trypsin Gold V5280	Promega	Mannheim	9002-07-7
Trypsin T-1426	Sigma Aldrich	Steinheim	9002-07-7
Zinkchlorid (p.a.)	Merck	Darmstadt	7646-85-7
Zitronensäure	Merck	Darmstadt	77-92-9

**Tabelle 3.2:** Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Firmensitz
OMIC Tip C18, 100 µl	Agilent Technologies	Böblingen
SPEC C18 AR (15 bzw. 30 mg)	Agilent Technologies	Böblingen
Material	Hersteller	Firmensitz
SPEC PT C18AP	Agilent Technologies	Böblingen
Stage Tips C18	Proxeon Biosystems	Odense, Dänemark
Stage Tips C18 GELoader	Proxeon Biosystems	Odense, Dänemark
Stage Tips SCX	Proxeon Biosystems	Odense, Dänemark
Titansphere®-Partikel (5µm, 100Å)	GL Science	Tokio, Japan
Titansphere® Phos-TiO <sub>2</sub> Kit	GL Science	Tokio, Japan
Säulenmaterial bzw. Säulen	Hersteller	Firmensitz
Synergi HydroPR 2 µm, 80 Å	Phenomenex	Aschaffenburg
Synergi HydroPR 4 µm, 80 Å	Phenomenex	Aschaffenburg
PolySULFOETHYL A 1.0mm ID x 15 cm, 5 µm, 200 Å	PolyLC	Columbia MD, USA
Pep Swift Monolithic PS-DVB 200 µm ID x 5 cm	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
Acclaim PepMap 100 nano trap 100 µm x 2 cm, C18, 5 µm, 100 Å	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
Acclaim PepMap 75 µm x 15 cm, C18, 2 µm, 100 Å	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
PolyWAX LP 150 mm x 1 mm, 5 µm, 300 Å	PolyLC	Columbia MD, USA

### 3.2 Biologisches Material

Die verwendeten, voraufgereinigten Hefemitochondrien - im Laufe der Arbeit als „*pure*“ bezeichnet - wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Chris Meisinger (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg) aus dem Wildtyp-Hefestamm YPH499 präpariert [177]. Anschließend wurden aus diesen unter Zugabe von PhosStop-Phosphataseinhibitoren durch eine Kombination von differentieller und (Sucrose-) Gradientenzentrifugation [178] die hochaufgereinigten Mitochondrien gewonnen, in dieser Arbeit auch „*highly pure*“ genannt. Die Mitochondrien beider Reinheitsgrade wurden in tiefgefrorenem Zustand in SEM-Puffer (250 mM Sucrose, 10 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7,2) als Ausgangsmaterial verwendet.

Die Aufreinigung der Außenmembranvesikel (engl. *Outer Membrane Vesicles*, OMVs) [89, 179] und des TOM-Komplexes erfolgte ebenfalls durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Meisinger. Die OMVs wurden dabei unter Verwendung von PhosStop-Phosphataseinhibitoren aus *highly pure* Mitochondrien des YPH499 Hefestammes gewonnen und in EM-Puffer (10 mM MOPS, 1 mM EDTA pH 7,2) ohne Phosphataseinhibitoren geliefert. Der TOM-Komplex wurde mittels eines His10-Tags an Tom22 isoliert [180] und stand gelöst in 20 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 10% Glycerol, 400 mM Imidazol, 1 % Digitonin und 1 mM PMSF inklusive PhosStop-Phosphataseinhibitor zur Verfügung.

Für die quantitativen Analysen mittels SILAC wurden nicht über Sucrosegradient aufgereinigte Mitochondrien (im Nachfolgenden als „*crude*“ bezeichnet) des mit  $^{13}\text{C}_6$ -Arginin/ $^{13}\text{C}_6$ -Lysin markierten CK2-Kinase Wildtypstammes (CK2 WT, „*heavy*“) sowie zwei Proben *highly pure* Mitochondrien, die jeweils sowohl aus dem Wildtyp als auch aus der  $^{12}\text{C}_6$ -Arginin/ $^{12}\text{C}_6$ -Lysin markierten temperatursensitiven CK2-Kinase Mutante (CK2 ts, „*light*“) gewonnen und bei zwei verschiedenen Temperaturen angezchtet wurden, zur Verfügung gestellt. Dabei wurden die CK2 WT- und CK2 ts-Mitochondrien im gleichen Verhältnis gemischt und gemeinsam über einen Sucrosegradient aufgereinigt. Mitochondrien, die aus Zellen stammen, die bei 24°C gewachsen sind, wurden als „Minus (-)“ gekennzeichnet und diejenigen, die aus Zellen stammen, die für 24 Stunden bei 37°C angezogen wurden, bei denen folglich die CK2-Kinase in CK2 ts inaktiv und in CK2 WT aktiv ist, als „Plus (+)“.

Die Mausmitochondrien aus Gehirn, Herz, Leber sowie Niere und die humanen Mitochondrien wurden von Prof. Dr. Michael T. Ryan (Department of Biochemistry, La Trobe University, Australien) zur Verfügung gestellt. Die jeweiligen Zellen wurden homogenisiert, bei 800 g abzentrifugiert und schließlich die Mitochondrien bei 10.000 g pelletiert und gewaschen. Dabei wurden alle Schritte unter Zugabe von Phosphataseinhibitoren (Cocktail 1 und 2, Sigma) und Proteinaseinhibitor (PMSF) durchgeführt. Die finale Mitochondrienpräparation lag in 20 mM HEPES, 220 mM Mannitol, 70 mM Sucrose und 1 mM EDTA inklusive Phosphataseinhibitoren vor.



### 3.3 Geräte und Software

**Tabelle 3.3:** Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
1D PAGE-Apparatur	XCell SureLock	Invitrogen, Karlsruhe
Brutschrank	INB300	Memmert, Schwabach
Feinwaage	RC210D	Sartorius, Göttingen
HPLC	Famos/Switchos/Ultimate	Dionex, Idstein
HPLC	Ultimate 3000 nanoHPLC	Dionex, Idstein
HPLC	U3000 RSLC	Dionex, Idstein
IEF-Apparatur	Agilent 3100 Offgel Fractionator	Agilent Technologies, Böblingen
Kühlfalle	Savant RVT4104	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Magnetrührer	IKA COMBIMAG RET	Janke & Kunkel, Staufen
Magnetrührer	Variomag Mono	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Massenspektrometer	LTQ-Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Massenspektrometer	LTQ-Orbitrap Velos	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Massenspektrometer	TSQ Vantage	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Mikrotiterplattenphotometer	Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Mikrotiterplattenschüttler	Grant-Bio PHMP	Grant Instruments, Cambridge, UK
Muffelofen	ELF 11/68	Carbolite, Ubstadt Weiher
Multifunktions-Rotator	Grant-Bio PTR-30	Grant Instruments, Cambridge, UK
Netzgerät	EPS-3501 XL	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Osmoseeinheit	Purelab Prima	Elga Labwaters, Siehrshahn
pH-Meter	Lab 850	Schott, Mainz
Pipette	Easypet 4421	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Safe-Lock und LoBind	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	Purelab Ultra	Elga Labwaters, Siehrshahn
Scanner	Umax Power Lock 2100XL	Umax Data Systems, Taiwan
Schüttler	IKA HS 260 basic	Janke & Kunkel, Staufen
Thermoschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK52	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vakuumpumpe	RC6	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vakuumentrifuge	Savant SPD121P	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Vortexer	Vortex Genie2(T)	Scientific Industries (VWR), Darmstadt
Vortexer	Vortex Genie2	Scientific Industries (VWR), Darmstadt
Waage	Kern 572	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Zentrifuge	5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	5417R	Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 3.4:** Übersicht über die verwendete Software

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Funktion</b>
Chromeleon 6.80	Dionex Softron, Idstein	HPLC Steuerungssoftware
ClustalW 2.1	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>	Multiple Sequence Alignment
Mascot Daemon 2.3.2	Matrix Sciences, London	Eingabeoberfläche für Sucheinstellungen des Mascot Servers
Mascot Distiller 2.3.2.0	Matrix Sciences, London	Sammlung von Tools z.B. für die Prozessierung von Rohdaten in Peak-Listen
Mascot Server 2.3	Matrix Sciences, London	Suchalgorithmus
MaxQuant 1.1.1.25	MPI für Biochemie, Martinsried ( <a href="http://www.maxquant.org">www.maxquant.org</a> )	Automatisierte Datenanalyse zur Auswertung von SILAC-Daten
MS Product	<a href="http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct">http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct</a>	<i>in-silico</i> Fragmentierung
Pinpoint 1.0	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	Auswertung der TSQ Vantage SRM-Daten
Progenesis LC-MS	NonLinear Dynamics Limited, Newcastle, UK	Datenanalyseprogramm für labelfreie Quantifizierung
ProteinProspector	<a href="http://prospector.ucsf.edu/">http://prospector.ucsf.edu/</a>	Proteomic Tools
Proteome Discoverer 1.2	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	Plattform für die Analyse von qualitativen und quantitativen Proteomdaten
Proteowizard 1.6.0	<a href="http://proteowizard.sourceforge.net">http://proteowizard.sourceforge.net</a>	Bibliotheken und Tools für Proteomdatenanalyse z.B. Datenumwandlung von RAW-files zu mgf-files
Silverfast Ai 6.0.2r36	Lasersoft Imaging AG, Kiel	Bedienung des UMAX Scanners
Skant 2.5.1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	Bedienung des Multiskan FC
Xcalibur 2.1.0	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	MS Steuerungssoftware

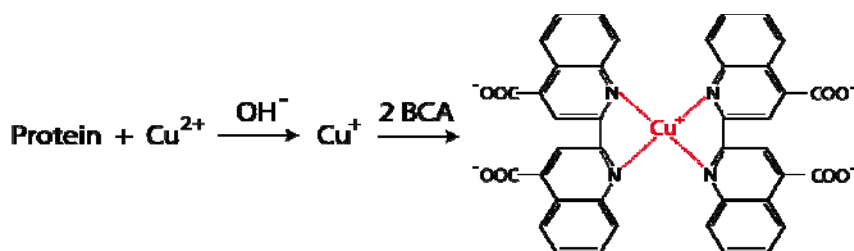
### 3.4 Lyse von Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden für 10 min bei 4°C und 15.000 rpm (Eppendorf 5417R) pelletiert, der Überstand verworfen, die Mitochondrien in 100 µL Lysepuffer (50 mM Tris, pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 % SDS) inklusive CompleteMini (EDTA-frei, 1 Tablette/10 mL) und PhosStop-Phosphataseinhibitoren (1 Tablette/10 mL) aufgenommen und mittels Glaskugeln durch Zyklen aus Ultraschallbad/Eisbad lysiert.

Alternativ dazu wurde das Mitochondrien-Pellet in 2 M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl), 50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, pH 7,8 inklusive PhosStop-Phosphataseinhibitoren (1 Tablette/10 mL) mittels Glaskugeln durch Zyklen aus Ultraschallbad/Eisbad lysiert.

### 3.5 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Zur Proteinmengenbestimmung wurde der BCA-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Assay [181] beruht darauf, dass Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen dieses Komplexes werden dabei teilweise zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden (siehe Abb. 3.1). Dieser ist wasserlöslich und zeigt eine lineare Absorption bei 562 nm mit (linear) zunehmenden Proteinkonzentrationen (20 - 2000 µg/mL). Die Bildung des BCA- $\text{Cu}^+$ -Komplexes wird durch die Seitenketten von Cystein, Tyrosin und Tryptophan sowie bei höheren Temperaturen (37°C - 60°C) durch die Peptidbindung unterstützt. Dabei hängt die Intensität der Farbstoffbildung neben der Proteinmenge unter anderem von der Temperatur ab, so dass durch deren Variation die Sensitivität des Tests modifiziert werden kann. Ebenso steigt die Farbintensität mit zunehmender Inkubationszeit, weshalb der BCA-Assay keine Endpunktmethode darstellt. Die Absorption des Komplexes korreliert jedoch nicht direkt mit der Proteinkonzentration, da nicht alle  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen reduziert werden, beziehungsweise nicht alle  $\text{Cu}^+$ -Ionen einen BCA-  $\text{Cu}^+$ -Komplex bilden. Um die Proteinkonzentration bestimmen zu können, wird daher zunächst eine Eichgerade anhand von bekannten Proteinkonzentrationen erstellt. Die gemessene Absorption und die anschließende Zuordnung zu einer bestimmten Konzentration ermöglicht dann eine Aussage über die Proteinkonzentration des Analysegemisches.



**Abbildung 3.1:** Reaktionen des Bicinchoninsäure-Assays [76]: Kombination der Biuret-Reaktion mit der selektiven Bicinchoninsäurekomplexierung von  $\text{Cu}^+$ .

Aus den beiden BCA-Reagenzien A und B wurde im Verhältnis 50:1 eine Arbeitslösung hergestellt. Von BSA wurde als Standardprotein eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 250, 125, 50, 25 beziehungsweise 5  $\mu\text{g/mL}$  angefertigt, um daraus eine Eichkurve zu erstellen. Die Verdünnungen der Probe wurden so gewählt, dass sie in etwa in einem Konzentrationsbereich von 5 - 250  $\mu\text{g/mL}$  und somit im linearen Bereich des Assays lagen. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte als Dreifachbestimmung auf einer 96-well Mikrotiter-Platte. Dabei wurden zu jeweils 25  $\mu\text{L}$  Probe, beziehungsweise Standard oder Wasser, 200  $\mu\text{L}$  der obigen Arbeitslösung gegeben und die Mikrotiter-Platte für 30 min bei  $60^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte daraufhin bei 570 nm am Multiskan FC.

### 3.6 Gelelektrophoretische Trennungen

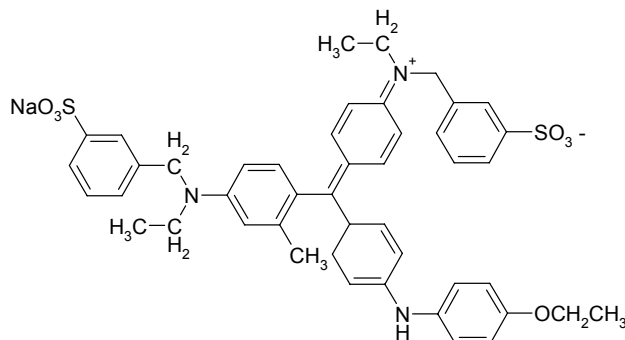
#### 3.6.1 1D-SDS-PAGE

Für die 1D-SDS-PAGE wurden je nach Anwendung 10%, 12% oder 4-12% Bis-Tris Fertiggele von Invitrogen und der zugehörige MOPS-Elektrophoresepuffer verwendet. Die Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichtes unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Dafür wurden die Proben mit 1x LDS-Probenpuffer für 10 min bei  $85^\circ\text{C}$  denaturiert und die Elektrophorese für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 50 V gestartet, bis die Proben in das Sammelgel eingelaufen waren. Die restliche Trennung erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$  und 200 V für circa  $1\frac{1}{2}$  - 2 Stunden. Als Marker wurden jeweils 3 - 5  $\mu\text{l}$  Mark12 aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine durch Färben des Gels mit kolloidal Coomassie [182] oder Silber [183] nachgewiesen.

#### 3.6.2 Proteinvisualisierung mittels kolloidal-Coomassiefärbung

Coomassie Brilliantblau (Abb. 3.2) bindet durch van der Waals-Kräfte und elektrostatische Kräfte unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren im Protein. Die Anlagerung des Farbstoffes ist hierbei annähernd proportional zur Menge an

Protein, wobei kolloidales Coomassie eine deutlich bessere Färbung liefert. Ein weiterer Vorteil des Coomassie Brilliantblau ist die Kompatibilität mit der anschließenden massenspektrometrischen Analyse der Proteine. Die Nachweisgrenze beträgt circa 50 - 100 ng [182].



**Abbildung 3.2:** Strukturformel von Coomassie® Brilliant Blue G 250 [76]. Der Farbstoff bindet an kationische und hydrophobe Domänen von Proteinen.

Für die kolloidal-Coomassiefärbung modifiziert nach Neuhoff [182] wurde das Gel über Nacht in Coomassielösung (Tab. 3.5) gefärbt. Anschließend wurde die Hintergrundfärbung durch Schütteln in Wasser unter mehrmaligem Wasserwechsel reduziert.

**Tabelle 3.5:** Coomassie-Färbelösung (modifiziert nach *Neuhoff* [182])

<b>Coomassielösung (100 mL)</b>
34 mL Methanol
2,2 mL Phosphorsäure (89%ig)
0,066 g Coomassie G-250
17 g Ammoniumsulfat
ad 100 mL H <sub>2</sub> O

### 3.6.3 Proteinvisualisierung mittels Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bilden Silber-Ionen ( $\text{Ag}^+$ ) Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten. Durch Reduktion mit beispielsweise Formaldehyd entsteht elementares Silber, welches die Stellen im Gel, an denen Proteine vorhanden sind, schwarz färbt. Um die Hintergrundfärbung zu reduzieren, können während des Färbeprozesses Thiosulfate verwendet werden, die lösliche Komplexe mit Silbersalzen an der Geloberfläche bilden und

somit die unspezifische Bindung von  $\text{Ag}^+$  reduzieren. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt bei circa 5 ng [184]. Die Silberfärbung der Bis-Tris-Gele (vorgefertigte Bis-Tris-HCl gepufferte Polyacrylamidgele) wurde modifiziert nach Blum [183] durchgeführt; ein Überblick über den Ablauf der Färbung ist in Tabelle 3.6 dargestellt.

**Tabelle 3.6:** Silberfärbung modifiziert nach *Blum* [183]

<b>1. Fixieren</b>	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure	1 h / über Nacht
<b>2. Waschen</b>	30% (v/v) Ethanol	2 x 20 min
<b>3. Waschen</b>	Wasser	20 min
<b>4. Sensibilisieren</b>	0,02% (w/v) Natriumthiosulfat	1 min
<b>5. Waschen</b>	Wasser	3 x 20 s
<b>6. Färben</b>	0,1% (w/v) Silbernitrat	20 min (4°C)
<b>7. Waschen</b>	Wasser	3 x 20 s
<b>8. Waschen</b>	Wasser	1 min
<b>9. Entwickeln</b>	3% (w/v) Natriumcarbonat 0,05% (w/v) Formaldehyd	5 - 10 min
<b>10. Waschen</b>	Wasser	20 s
<b>11. Stoppen</b>	0,05 M EDTA	mindestens 15 min

#### 3.6.4 Tryptischer in-Gel Verdau

**Tabelle 3.7:** Zusammensetzung der für die Waschprozedur von Gelbanden verwendeten Puffer

<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>	<b>DTT</b>	<b>IAA</b>
50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH ~ 7,5	1 : 1 Puffer A : MeCN	10 mM in Puffer A	5 mM in Puffer A

Aus 1D-PAGE Gelen ausgeschnittene Banden wurden je zweimal abwechselnd für 10 min bei 37°C mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (Puffer A) und 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  / 50 % (v/v) MeCN (Puffer B)

gewaschen. Danach erfolgte die Reduktion der Disulfidbrücken durch 10 mM DTT / 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  für 30 min bei 56°C. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Gelstücke mit 5 mM IAA / 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) für 30 min inkubiert und anschließend wiederum zweimal abwechselnd für jeweils 10 min bei 37°C mit Lösung A und Lösung B gewaschen. Schließlich wurden die Gelstücke unter Vakuum in der SpeedVac getrocknet.

100 µg Trypsin Gold wurden in 1 mL 1 mM HCl gelöst und als Aliquots von 25 µL ( $c = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) bei -80°C gelagert. Für den Verdau wurde ein Trypsin-Aliquot unmittelbar vor Verwendung mit 175 µL Puffer A (pH ~ 7,5) auf 12,5 ng/µL eingestellt. Anschließend wurden 10 µL dieser Verdaulösung auf die getrockneten Gelstücke gegeben und die Proben bei 4°C für 10 Minuten aufgequollen. Der Überstand wurde abgenommen und die Gelstücke über Nacht bei 37°C verdaut. Die Extraktion der Peptide erfolgte nachfolgend durch zweimalige Inkubation für 15 min bei 37°C mit 15 µL 0,1% TFA und anschließender Inkubation für 15 min bei 37°C mit 15 µL 0,1% TFA / 50% MeCN. Die drei Extrakte wurden vereinigt, in der SpeedVac auf 15 µL eingengt beziehungsweise im Anschluss vor der Messung mit 0,1% TFA auf 15 µL aufgefüllt.

### 3.7 Fällungen

Zum Entfernen störender Substanzen (z.B. SDS) aus den Proteinproben wurde in der vorliegenden Arbeit eine Fällung mit dem organischen Lösungsmitteln Aceton oder Ethanol durchgeführt. Weitere Möglichkeiten zur Fällung von Proteinen wären das Aussalzen durch beispielsweise Ammoniumsulfat oder die (irreversible) Präzipitation mit 5-10% iger Trichloressigsäure. Diese Methoden wurden jedoch aufgrund der Inkompatibilität mit nachfolgenden Analysen beziehungsweise der Notwendigkeit einer vorherigen Entsalzung sowie der denaturierenden Eigenschaften von Trichloressigsäure verworfen. Die von Polson et al. [185] 1964 eingeführte Polyethylenglycol (PEG)-Fällung wird in den meisten Fällen nur für Proteine mit einer Masse von 4 - 6 kDa verwendet. Die reversible PEG-Fällung ist sehr schonend für Proteine und findet beispielsweise eine Anwendung bei der Proteinkristallisation.

#### 3.7.1 Acetonfällung

Für die Acetonfällung wurde der unverdaute TOM-Komplex-Pulldown beziehungsweise die zugehörige Kontrolle mit dem 5-fachen (v/v) an Aceton (-20°C) verdünnt, gevortext und für 30 min auf Eis im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (16.400 rpm, Eppendorf 5417R) zentrifugiert, der Überstand

wurde in ein neues Eppendorf Tube gegeben und verwahrt, das Pellet wurde mit 100  $\mu$ L kaltem Aceton (-20°C) gewaschen. Die Probe wurde erneut für 10 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (16.400 rpm, Eppendorf 5417R) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet.

### 3.7.2 Ethanolfällung

Für die Ethanolfällung wurde die unverdaute Probe 10-fach (v/v) mit Ethanol (-20°C) verdünnt, gevortext und bei -20°C für 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (16.400 rpm, Eppendorf 5417R) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 100  $\mu$ L kaltem Aceton (-20°C) gewaschen. Die Probe wurde erneut für 10 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet.

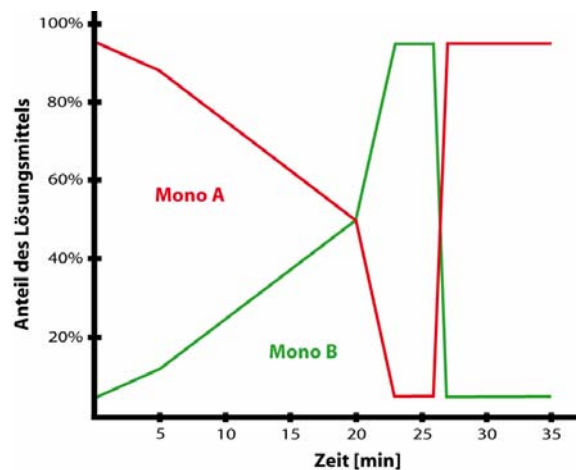
## 3.8 Carbamidomethylierung und proteolytischer Verdau in Lösung

### 3.8.1 Mitochondrien

Für die Reduktion der Disulfidbrücken wurden die lysierten Mitochondrien mit 10 mM DTT versetzt und für 30 min bei 56°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Alkylierung mit 30 mM IAA im Dunkeln bei RT für 30 min. Für die Verdaureaktion wurde die carbamidomethylierte Probe standardmäßig 1:10 mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat verdünnt (Zugabe von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) und 1:5 (Trypsin : Proteinmenge, (w/w)) mit Trypsin versetzt. Der Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht.

Als Verdaukontrolle wurden Aliquots der trypsinieren Proben zusammen mit einem Aliquot der unverdauten Probe am nächsten Tag entweder über 1D-SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend das Gel gefärbt oder der Verdau wurde mittels monolithischer Säule (Pep Swift Monolithic PS-DVB 200  $\mu$ m ID x 5 cm) kontrolliert. Dabei wurde die Auftrennung mit 0,1% TFA (Mono A) und 0,1% TFA / 0,08% Acetonitril (Mono B) als Lösungsmittel, mit einem Fluss von 1,7 beziehungsweise 2,5  $\mu$ L/min und dem folgenden Gradienten (Abb. 3.3) durchgeführt:





**Abbildung 3.3:** Zeitlicher Verlauf des Gradienten der monolithischen Auftrennung von (un)verdauten SILAC-Mitochondrien und (un)verdauten Hefemitochondrien „pure“

### 3.8.2 OMVs

Für den Verdau der OMVs wurde Trypsin (Sequencing Grade) in 40  $\mu$ L 50 mM Ammoniumbicarbonat gelöst und ungefähr im Verhältnis 1:5 (Trypsin : Proteinmenge, (w/w), Proteinmenge anhand von 1D-SDS-PAGE kalkuliert) zu den in EM-Puffer vorliegenden OMVs gegeben. Der Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht. Gegebenenfalls wurde nach einer Verdaukontrolle mittels 1D-SDS-PAGE ein Nachverdau (ebenfalls 1:5) über 4 Stunden durchgeführt.

### 3.8.3 TOM-Komplex

Das Pellet der Acetonfällung des TOM-Komplexes beziehungsweise der zugehörigen Kontrolle wurde in 2 M Guanidiniumhydrochlorid / 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat gelöst, wie oben bereits beschrieben mit DTT und IAA carbamidomethyliert, anschließend 1:10 mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat verdünnt (Zugabe von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) und mit 0,5  $\mu$ g Trypsin bei 37°C über Nacht verdaut.

## 3.9 Isoelektrische Fokussierungen von Peptiden/Proteinen

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem Agilent Offgel Fractionator 3100 durchgeführt und sowohl auf Peptid- als auch auf Proteinebene durchgeführt. Die verwendete Offgel Stock-Lösung hatte dabei folgende Zusammensetzung (Tab. 3.8):

**Tabelle 3.8:** Zusammensetzung der Offgel Stock-Lösung

Harnstoff	~ 8,4 M (25,2 g)
Thioharnstoff	~ 2,4 M (9,1 g)
DTT	~ 78 mM (600 mg)
Glycerin	12% (v/v)
Ampholyte (3 - 10)	1,2% (v/v)
Gesamtvolumen	50 mL

Für die IEF von reinen Hefemitochondrien auf Peptidebene wurden 1 mg verdaute Mitochondrien mit Wasser auf 0,72 mL aufgefüllt und mit 2,88 mL Offgel Stock-Lösung (siehe Tab. 3.8) versetzt. Die anfängliche SDS-Konzentration wurde dabei sowohl durch die 1:10 Verdünnung für den Verdau (siehe Kapitel 3.8) als auch durch den zugegebenen IEF Offgel-Puffer auf insgesamt 0,02% SDS verdünnt. Dieser SDS-Gehalt hat die Auftrennung nicht weiter negativ beeinflusst, da nach Miller et al. [186] bereits bei einer 0,1% SDS-haltigen Probe keine auffälligen Effekte in der IEF-Auftrennung - im Vergleich zur SDS-freien Probe - zu beobachten sind.

Bei der IEF von SILAC-gelabelten Hefemitochondrien auf Proteinebene wurden jeweils 400 µg in SDS-Puffer lysierte Mitochondrien (SILAC Plus und SILAC Minus) mittels Ethanol gefällt und die Pellets in 2,88 ml Offgel Stock-Lösung und 0,72 ml Wasser resuspendiert. Das Aliquot der Offgel Stock-Lösung wurde dabei vor der Verwendung mit einer Spatelspitze Mischbett-Ionenaustauscher (AMBERLITE IRN-150) versetzt und für 30 min bei RT auf dem Multifunktions-Rotator (Grant-Bio PTR-30) inkubiert. Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert (2 min 600g, Eppendorf 5810R) und es wurden 60 µL frische Ampholyte pro 5 mL Stock-Lösung zum Überstand gegeben. Durch eine Fällung vor der IEF sollten störende Salze und Detergenzien (SDS) aus der Probe entfernt werden, um eine bessere Auftrennung zu erreichen.

Die weitere Prozedur erfolgte für die Fraktionierung auf Peptid- als auch auf Proteinebene gleichermaßen. Die IPG-Streifen (24 cm, pH 3-10 NL) wurden mit dem durch ein Plus markierten Ende an der Anodenseite in der IEF-Schale platziert, der Well-Rahmen für die Fraktionen befestigt und jedes Mikro-well zum Aufquellen des Gels mit 40 µL Rehydrationslösung bestehend aus 0,96 mL Offgel-Stocksolution und 0,24 mL H<sub>2</sub>O gefüllt. An jedem Ende des Gelstreifens wurden zwei mit der Rehydrationslösung befeuchtete

Elektrodenpads platziert. Nach 15-minütiger Quellzeit wurden jeweils 150 µL der Probe in jedes Mikro-well pipettiert. Die Wells wurden mit der entsprechenden Abdeckung dicht verschlossen, die Elektrodenpads mit Mineralöl (Agilent) benetzt, die Elektroden auf den Elektrodenpads platziert und die IEF gestartet. Die elektrophoretische Trennung der Peptide/Proteine erfolgte unter folgendem Spannungsverlauf (siehe Tab. 3.9):

**Tabelle 3.9:** Spannungsverlauf auf dem Agilent 3100 Offgel Fractionator

Methode	Spannung	Zeit
Step	150 V	0 h
Step	300 V	2 h
Linear	500 V	4 h
Linear	1000 V	6 h
Linear	4000 V	9 h
Step	6000 V	12 h

Während der Fokussierung wurde der Strom auf 50 µA pro Streifen begrenzt. Nach der IEF wurden die einzelnen Fraktionen (je 150 µl pro Fraktion) sorgfältig aus den Mikro-wells entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Fraktionen der SILAC-Mitochondrien-IEF auf Proteinebene wurden jeweils mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat auf 2 mL verdünnt, mit 2 µL CaCl<sub>2</sub> (c = 1 M) versetzt und mit Trypsin (T1426, Sigma) im Verhältnis von circa 1:10 (Trypsin : Proteinmenge, (w/w)) bei 37°C über Nacht verdaut. Dabei wurde von einer Proteinmenge von etwa 16,7 µg pro Fraktion ausgegangen.

### 3.10 Entsalzung mittels C18-Festphasenextraktion

Die Entsalzung von Proben mittels C18-Festphasenextraktion erfolgte in dieser Arbeit abhängig von der Proteinmenge mit unterschiedlichen Tips/Säulen. Eine Übersicht über die verschiedenen verwendeten Tips/Säulen und ihre jeweiligen Bindungskapazitäten bietet Tabelle 3.10.

**Tabelle 3.10:** Übersicht über die verschiedenen Tips/Säulen und ihre Bindungskapazitäten

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Größe</b>	<b>Bindekapazität</b>
OMIX Tip C18, 100 µl	Agilent Technologies	100 µL Pipette	~ 79 µg [187]
SPEC PT C18AP	Agilent Technologies	100 µL Pipette, 4 mg Material	5 - 10%* [188] = 200 - 400 µg
SPEC C18 AR	Agilent Technologies	15 mg Material	5 - 10%* [188] = 0,75 - 1,5 mg
SPEC C18 AR	Agilent Technologies	30 mg Material	5 - 10%* [188] = 1,5 - 3 mg
Stage Tips C18	Proxeon Biosystems	20 µL Tip	10 µg [189]
Stage TipsC18 GELoader	Proxeon Biosystems	GELoader	5 µg [189]

\* % in Bezug auf die Sorbensmenge

Die einzelnen Entsalzungsschritte und die verwendeten Lösungs-Volumina sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.11) dargestellt. In den ersten Schritten wurde das C18 Material durch acetonitrilhaltige Lösungen aktiviert und mit FA oder TFA äquilibriert. Für eine optimale Bindung der Probe an das C18 Material wurde die Probe mit FA auf einen pH-Wert von 2 bis 3 angesäuert, bevor sie auf die Säule/den Tip gegeben wurde. Durch mehrmaliges Waschen wurden anschließend Salze aus der Probe herausgewaschen. Die Elution erfolgte wiederum durch MeCN-haltige Lösungen. Bei den Proxeon Tips wurden sämtliche Lösungen durch Zentrifugation durch den Tip befördert, bei der Verwendung aller übrigen Tips/Säulen wurden die Lösungen manuell mit Hilfe einer Spritze/mittels Pipette durchgedrückt.

Für die Elution von den SPEC PT C18AP Tips wurde eine schrittweise Elution mit 20, 40 und 60% MeCN gewählt, in Tabelle 3.11 in blau wieder gegeben. Die übrigen Schritte wurden mit denselben Lösungen und Volumen, die auch für die OMIX Tips verwendet wurden, durchgeführt.

**Tabelle 3.11:** Entsalzungsprotokoll für die verschiedenen Tips/Säulen. Die blauen Angaben wurden für die SPEC PT C18AP Tips verwendet.

	<b>Proxeon Stage Tips 20<math>\mu</math>L</b> <i>(Proxeon Stage GELoader)</i>	<b>SPEC C18 AR</b> <b>15 bzw. 30 mg</b>	<b>OMIX Tip C18 100 <math>\mu</math>L</b> <b>SPEC PT C18AP</b>
<b>Aktivieren</b>	3x 20 $\mu$ L (5 $\mu$ L)  80% MeCN / 5% FA  1000 g, 1min	3x 1 mL MeCN	3x 100 $\mu$ L MeCN
<b>Äquilibrieren</b>	3x 20 $\mu$ L (5 $\mu$ L) 5% FA  1000 g, 1min	3x 1 mL 0,1% TFA	3x 100 $\mu$ L 0,1% TFA
<b>Probe laden</b>	3x 20 $\mu$ L (10 $\mu$ L) Probe  500 g, 1½ min	Probe in 1 mL-Schritten	10 x Probe in 100 $\mu$ L-Schritten hoch-/runterpipettiert
<b>Waschen</b>	3x 20 $\mu$ L (5 $\mu$ L) 5% FA  1000 g, 1min	3x 1 mL 0,1% TFA	3x 100 $\mu$ L 0,1% TFA
<b>Eluieren</b>	3x 15-20 $\mu$ L (10 $\mu$ L)  80% MeCN / 5% FA  500 g, 1½ min	MeCN jeweils in 0,1% TFA  1x 250 $\mu$ L 20% MeCN  1x 250 $\mu$ L 40% MeCN  2x 250 $\mu$ L 60% MeCN	3 x 50 $\mu$ L 60% MeCN in 0,1% TFA  <i>1x 50 <math>\mu</math>L 20% MeCN</i>  <i>1x 50 <math>\mu</math>L 40% MeCN</i>  <i>2x 50 <math>\mu</math>L 60% MeCN</i>

### 3.11 Anreicherung von Phosphopeptiden

#### 3.11.1 Kationenaustausch-Chromatographie

Für die Phosphopeptidanreicherung mittels Kationenaustausch-Chromatographie wurde eine 1 mm ID x 15 cm SCX-Säule (PolySULFOETHYL Aspartamide, 200 Å Porengröße, 5  $\mu$ m Partikelgröße) in Kombination mit einer Famos<sup>TM</sup>/Ultimate<sup>TM</sup>-HPLC verwendet.

**Tabelle 3.12:** Zusammensetzung der SCX-Puffer für die Auftrennung von OMVs

<b>SCX A1</b>	<b>SCX B1</b>
10 mM Natriumdihydrogenphosphat	0,5 M NaCl
20 % Acetonitril	10 mM Natriumdihydrogenphosphat
pH 2,7 (Zugabe H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	20 % Acetonitril
	pH 2,7 (Zugabe H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaOH)

Zur Anreicherung von Phosphopeptiden aus den OMVs wurden jeweils ca. 20 µg des getrockneten C18 SPE entsalzten OMV-Verdaues in je 15 µL SCX-Puffer A1 (Tab. 3.12) aufgenommen und mittels eines binären Gradienten aus SCX A1 und SCX B1 (Tab. 3.13) aufgetrennt. Die Flussrate betrug 50 µL/min und es wurden 1 min Fraktionen vom Beginn des Gradienten bis zu Minute 36 gesammelt.

**Tabelle 3.13:** Zeitlicher Verlauf des binären Gradienten aus SCX A1 und SCX B1

<b>Retention [min]</b>	<b>Anteil SCX A1 [%]</b>	<b>Anteil SCX B1 [%]</b>
0	100	0
10	100	0
31	70	30
36	0	100
41	0	100
43	100	0
65	100	0

Zur Anreicherung von Phosphopeptiden aus 400 µg GuHCl-lysierten, verdauten, C18 SPE entsalzten und in der SpeedVac eingeeengten *pure* Mitochondrien oder je 400 µg SDS-lysierten, verdauten und nach Zugabe von FA (ca. 2%) in der SpeedVac eingeeengten SILAC Mitochondrien (+ und -) wurde das nahezu trockene Pellet in je 15 µL SCX-Puffer A2 (Tab. 3.14) aufgenommen und mittels eines binären Gradienten aus SCX A2 und SCX B2 (Tab. 3.15) aufgetrennt. Die Flussrate betrug bei allen Proben 50 µL/min und es wurden bei den *pure* Mitochondrien 1 min Fraktionen von Minute 1 bis 20 und anschließend 2 min Fraktionen bis Minute 50 gesammelt. Bei den SILAC Mitochondrien wurden 1 min Fraktionen von

Minute 1 bis 30 und danach 2 min Fraktionen bis Minute 50 gesammelt. SCX-Puffer C wurde lediglich im Waschgradienten zum Spülen der Säule verwendet.

**Tabelle 3.14:** Zusammensetzung der SCX-Puffer für die Auftrennung von *pure* beziehungsweise SILAC Mitochondrien

<b>SCX A2</b>	<b>SCX B2</b>	<b>SCX C</b>
7 mM Kaliumdihydrogenphosphat	7 mM Kaliumdihydrogenphosphat	7 mM Kaliumdihydrogenphosphat
pH 2,75 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaOH)	350 mM KCl	1 M KCl
	10 % Acetonitril	pH 2,75 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaOH)
	pH 2,75 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaOH)	

**Tabelle 3.15:** Zeitlicher Verlauf des binären Gradienten aus SCX A2 und SCX B2

<b>Retention [min]</b>	<b>Anteil SCX A2 [%]</b>	<b>Anteil SCX B2 [%]</b>
0	100	0
4	100	0
25	88	12
30	88	12
40	50	50
40,1	0	100
50	0	100
50,1	100	0
65	100	0

Vor der LC-MS/MS Analyse wurden alle SCX-aufgetrennten Proben mit C18 SPE entsalzt.

### 3.11.2 Elektrostatische Repulsions-/hydrophile Interaktionschromatographie (ERLIC)

Für die Aufreinigung von Phosphopeptiden über eine elektrostatische Repulsions-/hydrophile Interaktionschromatographie wurde eine PolyWAX LP Säule (150 mm x 1 mm, 300 Å Porengröße, 5 µm Partikelgröße) verwendet. Zur Generierung der benötigten Lösungsmittel wurden als erstes zwei Stocklösungen entsprechend Tabelle 3.16 hergestellt.

**Tabelle 3.16:** Zusammensetzung der ERLIC-Stocklösungen

<b>FA Stocklösung (1,2 M)</b>	<b>Stocklösung ERLIC D (0,5 M)</b>
27,6 g Ameisensäure (FA)	14,4 g Phosphorsäure (85%ig)
ad H <sub>2</sub> O 500 mL	+ 150 mL H <sub>2</sub> O
+ Ammoniumhydroxid -> pH 2.2	+ Triethylamin -> pH 2,0
	ad H <sub>2</sub> O 250 mL

Aus diesen Stocklösungen wurden anschließend die vier ERLIC-Puffer verdünnt (Tab. 3.17).

**Tabelle 3.17:** Zusammensetzung der vier verschiedenen ERLIC-Puffer

<b>ERLIC A</b>	<b>ERLIC B</b>	<b>ERLIC C</b>	<b>ERLIC D (0,3 M)</b>
10 mL FA Stock	10 mL FA Stock	10 mL FA Stock	300 mL Stock ERLIC D
420 mL Acetonitril	60 mL Acetonitril	50 mL Acetonitril	50 mL Acetonitril
ad H <sub>2</sub> O 600 mL	ad H <sub>2</sub> O 600 mL	ad H <sub>2</sub> O 500 mL	ad H <sub>2</sub> O 500 mL

Mit einem Fluss von 50 µL/min (1:4 Split bei einem Fluss von 200 µL) wurden die Proben anschließend unter Verwendung der folgenden Gradienten (Tab. 3.18) aufgetrennt:

**Tabelle 3.18:** Zeitlicher Verlauf der vier ERLIC-Lösungsmittelgradienten

<b>Retention [min]</b>	<b>ERLIC A [%]</b>	<b>ERLIC B [%]</b>	<b>ERLIC C [%]</b>	<b>ERLIC D [%]</b>
0	100	0	0	0
3,5	100	0	0	0
13	0	100	0	0
21	0	0	100	0
23	0	0	0	100
29	0	0	0	100
34	100	0	0	0
64	100	0	0	0



Vor der LC-MS/MS Analyse wurden die aufgetrennten Proben mit C18 SPE Tips von Proxeon entsalzt.

### 3.11.3 Titandioxid

Für die Anreicherung von phosphorylierten Peptiden mittels Titandioxid wurde (a) das Titansphere® Phos-TiO<sub>2</sub> Kit und (b) die Titansphere®-Partikel für das „Batch-Verfahren“ im Eppendorf Reaktionsgefäß verwendet. Durch die sukzessive Elution mit beispielsweise Ammoniumhydroxid- und Pyrrolidin-Lösung soll dabei nach Kyono et al. [190] eine selektive Freisetzung von einfach- und mehrfachphosphorylierten Peptiden erreicht werden. Derselbe Effekt wird durch die sukzessive Elution mit ansteigendem pH-Wert der Lösungen erwartet.

Das Titansphere® Phos-TiO<sub>2</sub> Kit wurde sowohl entsprechend den Angaben des Herstellers (Puffer siehe Tab. 3.19) als auch unter Verwendung von eigenen Puffern durchgeführt. Für die Elution beim Protokoll mit den eigenen Puffern wurden die Lösungen 1a - 1c (Tab. 3.20) verwendet, wobei nach dem ersten Elutionsschritt die Probe mit FA angesäuert und der pH-Wert am Ende der Anreicherung erneut überprüft wurde.

**Tabelle 3.19:** Zusammensetzung der Puffer des Titansphere® Phos-TiO<sub>2</sub> Kits

<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>	<b>Eluent A</b>	<b>Eluent B</b>
20% TFA (2 % ig)	25% Puffer A	5% Ammoniumhydroxid-	5% Pyrrolidin-
80% Acetonitril	75% Milchsäure	Lösung	Lösung

Für das „Batch-Verfahren“ wurde eine definierte Menge an Titansphere®-Partikeln abgewogen und mit Ladepuffer (Tab. 3.20) bei Raumtemperatur 5 min lang unter Schütteln gewaschen. Die Partikel wurden für 0,5 min bei 8000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, frischer Ladepuffer zugegeben und gevortext, so dass je nach TiO<sub>2</sub>-Bedarf eine Konzentration von 1 bis 2 mg/mL erreicht wurde. Anschließend wurde von dieser Suspension eine entsprechende Menge in ein neues Eppendorf Tube überführt, um ein bestimmtes Titandioxid zu Probe-Verhältnis (w/w) zu erreichen.

Zur Inkubation wurden die Beads mit maximal 50 µL Probe versetzt, mit Ladepuffer auf insgesamt 150 µL aufgefüllt und für 30 min unter Schütteln inkubiert. Das TiO<sub>2</sub> wurde für 0,5 min bei 8000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Beads mit frischem Ladepuffer versetzt und für 1 min unter Schütteln gewaschen. Nach zweimaligem Waschen mit Ladepuffer und viermaligem Waschen mit Waschpuffer (Tab. 3.20) wurden die

angereicherten Phosphopeptide mit verschiedenen Elutionslösungen (Tab. 3.20) eluiert. Um eine  $\beta$ -Eliminierung [76] der Phosphatgruppe zu verhindern, wurde die angereicherte Probe nach dem ersten Elutionsschritt mit FA angesäuert und der pH-Wert am Ende der Anreicherung erneut überprüft.

**Tabelle 3.20:** Zusammensetzung der Puffer für die Titandioxid-Anreicherung

<b>Ladepuffer</b>	<b>Waschpuffer</b>	<b>Elutionspuffer</b>
80% Acetonitril, 2,5% TFA, Phthalsäure (gesättigte Lösung bei RT durch Zugabe im Überschuss)	80% Acetonitril, 0,1% TFA	1a) 250 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 9,0 1b) 125 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 50 mM Ammoniumphosphat, pH 10,5 1c) 400 mM Ammoniumhydroxid, pH 11
		2a) 5% Ammoniumhydroxid-Lösung 2b) 5% Piperidin-Lösung 2c) 5% Pyrrolidin-Lösung
		3) 125 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 20 mM ATP, pH 10,2
		4a) 250 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 50% Acetonitril, pH 9,0 4b) 125 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 50 mM Ammoniumphosphat, pH 10,5 4c) 400 mM Ammoniumhydroxid, 50% Acetonitril, pH 11

Vor der LC-MS/MS Messung wurden die  $\text{TiO}_2$ -angereicherten Proben erneut mittels C18 SPE entsalzt.

## 3.12 Differentielle Phosphoproteomanalyse

### 3.12.1 Quantifizierung mittels Stabil-Isotopen Markierung

Ein Teil der SILAC-gelabelten Hefemitochondrien wurde über eine 1D SDS-PAGE aufgetrennt, die beiden ungefärbten Gelspuren (+ und -) mittels Gelcutter in jeweils circa 60 1 mm breite Banden geschnitten und diese nach dem unter Kapitel 3.6.4 aufgeführten Protokoll bearbeitet. Die Gelextrakte wurden massenspektrometrisch analysiert (LTQ-Orbitrap Velos) und mittels Proteome Discoverer, Mascot Distiller und MaxQuant ausgewertet, um die Regulation von CK2 WT und CK2 ts auf Proteinebene zu detektieren. Als Auswahlkriterium zur Erstellung der Proteinlisten wurde neben dem Mascot-Score ( $p\text{-Value} \leq 0,05$ ; für Proteome Discoverer und Mascot Distiller) und einer geringen Massenabweichung (MS-Toleranz: 10 [PD und Mascot Distiller] bzw. 20 ppm [MQ]; MS/MS-Toleranz: 0,4 [PD] bzw. 0,5 Da [Mascot Distiller und MQ]) u.a. auf das Vorhandensein von mindestens 3 eindeutigen Peptiden pro Protein geachtet. Die für das jeweilige Programm gewählten Filter- und Quantifizierungsparameter sind im Anhang im Einzelnen aufgeführt (Anhang 10.1).

Um das differentielle Phosphoproteom der SILAC Mitochondrien zu erhalten, wurden verschiedene Trennungs-/Phosphopeptidanreicherungsverfahren eingesetzt:

#### *IEF und $TiO_2$*

400  $\mu\text{g}$  SILAC + Mitochondrien (CK2 WT & ts bei 37°C) und 400  $\mu\text{g}$  SILAC - Mitochondrien (CK2 WT & ts bei 24°C) wurden getrennt nach der SDS-Lyse (siehe Abschnitt 3.4) mit Ethanol gefällt (siehe Abschnitt 3.7.2). Darauf wurde von den beiden Proben eine IEF auf Proteinebene mit anschließendem Verdau wie unter Abschnitt 3.8 beschrieben durchgeführt. Von beiden Proben wurden die Fraktionen 1 bis 8 durch Zugabe von FA auf einen pH-Wert von 2 - 3 eingestellt und die Proben mittels OMIX C18 Tip entsalzt, wobei als Elutionspuffer der  $TiO_2$ -Ladepuffer (Tab. 3.20) gewählt wurde. Die Phosphopeptide wurden mit dem Titansphere<sup>®</sup> Phos- $TiO_2$  Kit unter Verwendung der eigenen Puffer (Tab. 3.20, Elutionspuffer 1a- 1c) angereichert.

Um die Qualität der IEF zu überprüfen, wurden die Fraktionen 9 bis 24 der SILAC Plus IEF ebenfalls wie oben beschrieben entsalzt, diesmal jedoch wie in Tabelle 3.12 beschrieben eluiert und in der SpeedVac getrocknet. Die Proben wurden mit 0,1% TFA verdünnt und 0,1  $\mu\text{g}/15 \mu\text{L}$  mittels LTQ-Orbitrap Velos gemessen.

### SCX und TiO<sub>2</sub>

400 µg SILAC + (CK2 WT & ts bei 37°C) bzw. - (CK2 WT & ts bei 24°C) SDS-lysierte (siehe Abschnitt 3.4), carbamidomethylierte und verdaute Mitochondrien (siehe Abschnitt 3.8.1) wurden auf 2% FA eingestellt, gevortext und in der SpeedVac getrocknet. Die Pellets wurden jeweils in 17 µL SCX-Puffer A2 (Tab. 3.14) gelöst und mittels SCX unter Verwendung des Gradienten aus Tab. 3.15 aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.11.1). Zum Abschätzen der ungefähren Peptidmenge für die weitere Bearbeitung wurde jeweils von den Fraktionen 1-19 (entspricht Minuten 1-20) 1 µL abgenommen, mit 15 µL 0,1% TFA verdünnt und mittels LTQ-Orbitrap Velos gemessen. Die Fraktionen 1-19 wurden mit FA auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert und entsprechend ihrer UV-Absorption entweder mit OMIX C18 Tips oder mit C18 Stage Tips entsalzt (siehe Abschnitt 3.10). Die Proben wurden in der SpeedVac nahezu getrocknet, in TiO<sub>2</sub>-Ladepuffer (Tab. 3.19) gelöst, mit dem Titansphere® Phos-TiO<sub>2</sub> Kit unter Verwendung der eigenen Puffer (Tab. 3.20, Elutionspuffer 1a - 1c) angereichert und nach Einengen in der SpeedVac wurde das gesamte Eluat auf der LTQ-Orbitrap Velos gemessen. Dabei wurden vor der Anreicherung alle Fraktionen eines Zustandes (+ oder -) bis auf Fraktion 1 paarweise mit der nachfolgenden Fraktion vereint (Fraktionen 2 und 3, Fraktionen 4 und 5 usw.) und zusammen angereichert.

### TiO<sub>2</sub>

Für die TiO<sub>2</sub>-Anreicherung wurden 20 µg SDS-lysierte (siehe Abschnitt 3.4), carbamidomethylierte und verdaute (siehe Abschnitt 3.8.1) SILAC + bzw. - Mitochondrien mittels SPEC PT C18AP entsalzt und im „Batch-Verfahren“ mit einem Verhältnis von 1:5 (Probe : TiO<sub>2</sub>-beads, (w/w)) angereichert. Dabei wurde, abweichend vom ursprünglichen Protokoll (siehe Abschnitt 3.11.3), nur zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend zweimal mit 0,1% TFA/10% MeCN. Die Elution erfolgte mit den Puffern 1a-1c (Tab. 3.20).

Sämtliche Messdaten der verschiedenen Phosphopeptidanreicherungen wurden mit den Programmen Proteome Discoverer, Mascot Distiller und MaxQuant ausgewertet (Einstellungen wie oben, Ausnahme: nur ein Peptid pro Protein nötig) und mit den anhand der SDS-PAGE generierten Proteomdaten einschließlich der Regulationen der Proteine abgeglichen, um die Regulationen der einzelnen Phosphorylierungsstellen zu bestimmen.

### 3.12.2 Labelfreie Quantifizierung

#### *Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase*

1  $\mu\text{L}$  der alkalischen Phosphatase wurde mit 285  $\mu\text{L}$  Phosphatase-Puffer (siehe Tab. 3.21) auf eine Konzentration von 0,5 Units/ $\mu\text{L}$  verdünnt. 10  $\mu\text{L}$  GuHCl-lysierte Mitochondrien ( $c = 2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) wurden mit 110  $\mu\text{L}$  Phosphatase-Puffer und je 5 pmol der synthetischen Phosphopeptide 580, 1353, 1450 und Albi2 ( $c = 2 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ ; Gesamtvolumen = 10  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Die Hälfte dieser Mischung wurden entnommen und mit 15  $\mu\text{L}$  Phosphatase-Puffer verdünnt; zu den anderen 65  $\mu\text{L}$  wurden 15  $\mu\text{L}$  der verdünnten Phosphatase (entspricht 7,5 Units) zugegeben und die Probe für 30 min bei 25°C inkubiert.

Für die LC-MS-Messungen wurden jeweils 8  $\mu\text{L}$  der unbehandelten oder Phosphatase-behandelten Probe entnommen und mit 7  $\mu\text{L}$  0,1% TFA versetzt (entspricht pro Messung 1  $\mu\text{g}$  Mitochondrien und 250 fmol jedes Phosphopeptides). Im Anschluss an diese Messungen wurden die gewonnenen Daten dazu verwendet im Programm Progenesis LC-MS (NonLinear Dynamics Limited) eine Auswahlliste (*inclusion list*) mit potentiell phosphorylierten (Proben ohne Phosphatase) / nicht-phosphorylierten (Proben mit Phosphatase) Peptiden zu generieren (siehe Abschnitt 3.13.2).

**Tabelle 3.21:** Zusammensetzung des Phosphatase-Puffers

<b><i>Phosphatase-Puffer</i></b>
50 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8,2
2 mM $\text{MgCl}_2$
0,1 mM $\text{ZnCl}_2$

#### *Synthetische Phosphopeptide & SRMs*

Synthetische Phosphopeptide (Tab. 3.22) wurden von einem Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durch hausinterne Synthese mittels Syro I Syntheseeinheit (MultiSynTech, Witten, Germany) und Fmoc Aminosäure-Chemie hergestellt. Nach C18 Festphasenextraktion wurden die nicht-aufgereinigten Peptide bis zur weiteren Verwendung als getrocknetes Pulver gelagert.

**Tabelle 3.22:** Übersicht über die synthetischen Phosphopeptide und ihre nicht-phosphorylierte Variante

Peptid-ID	Sequenz	Protein	P-Site	(M+H) <sup>+</sup>	(M+2H) <sup>2+</sup>	(M+3H) <sup>3+</sup>	Einwaage [mg]	Menge [μmol]
A1	ALELKPDY <b>p</b> SK	Tom70	Ser 166	1242,5970	622,299	415,199	1,5	1,2
A2	ALELKPDYSK	Tom70	-----	1162,6307	582,315	388,544	2,2	1,9
A3	GFQESL <b>p</b> SDDEK	Mdm10	Ser 457	1333,5148	667,757	445,505	1,8	1,3
A4	GFQESLSDEK	Mdm10	-----	1253,5485	627,774	418,850	3,4	2,7
A5	EQAE <b>p</b> SIDNLK	Zeo1	Ser 40	1296,5672	649,284	433,189	1,7	1,3
A6	EQAEASIDNLK	Zeo1	-----	1216,6008	609,300	406,534	2,1	1,7
B1	LEETKE <b>p</b> SLQNK	Zeo1	Ser 25	1397,6512	699,826	466,884	1,7	1,2
B2	LEETKESLQNK	Zeo1	-----	1317,6849	659,842	440,228	3,2	2,4
B3	NELITSL <b>p</b> TPGVAK	Por1	Thr 103	1421,7240	711,862	474,908	1	0,7
B4	NELITSLTPGVAK	Por1	-----	1341,7577	671,879	448,253	1,6	1,2
B5	SFLP <b>p</b> SFILSDESK	Tom7	Ser 6	1548,7186	775,359	517,240	2,2	1,4
B6	SFLPSFILSDESK	Tom7	-----	1468,7522	735,376	490,584	1,3	0,89
C1	EL <b>p</b> SPNFSQEQTENK	Uip4	Ser 185	1729,7269	865,863	577,576	1,2	0,69
C2	ELSPNFSQEQTENK	Uip4	-----	1649,7606	825,880	550,920	1,7	1,0
C5	SPPVY <b>p</b> SDISR	Por1	Ser 7	1199,5296	600,765	400,843	1,4	1,2
C6	SPPVYSDISR	Por1	-----	1119,5633	560,782	374,188	1,1	0,98
D1	DPIPSDP <b>p</b> SER	Tom20	Ser 87	1191,4882	596,744	398,163	1,1	0,92
D2	DPIPSDPSEK	Tom20	-----	1111,5218	556,761	371,507	1,4	1,3

Von jedem nicht-aufgereinigten Peptid wurden einzeln jeweils wenige mg Peptid entnommen und durch Zugabe von 1 mL 0,1% TFA auf eine Konzentration von 1 bis maximal 3 nmol/μL (basierend auf der Einwaage) gebracht. Zur Optimierung von SRM-Übergängen wurden die Peptide anschließend in 50% Lösungsmittel A (0,1% FA) und 50% Lösungsmittel B (0,1% FA, 84% MeCN) auf 1 pmol/μL (basierend auf der Einwaage) verdünnt und per Direktinjektion auf der TSQ Vantage analysiert. Dabei wurden die SRM-Bedingungen (Übergänge, Kollisionsenergie und Einstellung der S-Linse) zum Teil automatisch und teilweise durch manuelle Selektion geeigneter, einzigartiger Fragmente, die durch MS-Product vorhergesagt wurden, bestimmt. Um die Selektivität und die Sensitivität der Methode zu Erhöhen, wurden je Peptid mehrere Übergänge (mindestens 4) gewählt.

Zur Überprüfung der Spezifität und der Anwendbarkeit dieser SRM Übergänge für komplexe Proben, wurden zu 1 μg Mitochondrien (GuHCl-lysiert, verdaut) je 200 fmol der entsprechenden Peptide gegeben. Da für eine einzige Messungen zu viele Übergänge und somit eine zu hohe Zykluszeit in einem Lauf benötigt gewesen wäre, wurden drei separate Messungen durchgeführt (Peptide A1 - A5, Peptide A6 - B5, Peptide B6 - C2 und C5 - D2). Für die SRM-Messungen wurde die TSQ Vantage online mit einer Ultimate 3000 RSLC gekoppelt. Die Peptide wurden in 0,1% TFA auf einer 100 μm ID RP Vorsäule

aufkonzentriert (Acclaim PepMap 100 nano trap 100  $\mu\text{m}$  x 2 cm, C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , Dionex) und anschließend durch einen binären Gradienten (Lösungsmittel A: 0,1% FA und Lösungsmittel B: 0,1% FA, 84% MeCN) von 5 - 45% Lösungsmittel B in 40 min und einer Flussrate von 300 nL/min auf einer 75  $\mu\text{m}$  ID RP Säule (Acclaim PepMap 75  $\mu\text{m}$  x 15 cm, C18, 2  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , Dionex) aufgetrennt. Es wurden folgende SRM Einstellungen gewählt: 0,2 FWHM für Q1, 0,7 FWHM für Q3, Druck des Kollisionsgases 1,2 mTorr, 10 ms für jede Transition, Chromfilter 10 s, Messung im Profile-Modus.

Anhand der gewonnenen Retentionszeiten der gemessenen Peptide wurden schließlich scheduled SRMs [191] mit einem Retentionszeitfenster von 10 min angefertigt, wobei Q1 variierend auf 0,2 oder auf 0,7 FWHM und Q3 auf 0,7 FWHM eingestellt wurden, die *Declustering Voltage* 10 V und der Druck des Kollisionsgases 1,5 mTorr betragen und 10 ms für jede Transition verwendet wurden. Als Probe wurde 1  $\mu\text{g}$  Mitochondrien (GuHCl-lysiert, verdaut) verwendet, die entweder nach den Peptiden A1 - B5 oder den Peptiden B6 - C2 und C5 -D2 gescannt wurden.

Zur Mengenbestimmung der aufgereinigten Peptide A1 - A6 wurden jeweils Aliquots gelöst in 5% FA / 5% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  zur Aminosäurenanalyse geschickt (Medizinisches Proteom Center, Ruhr Universität Bochum). Die Ergebnisse und die Berechnung einer 500 fmol/ $\mu\text{L}$  Verdünnung sind in Tabelle 3.23 zusammengefasst.

**Tabelle 3.23:** Resultate der Aminosäurenanalyse

Peptid-ID	Sequenz	Protein	P-Site	Konz. [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	Konz. [ $\text{pmol}/\mu\text{L}$ ]	Verdünnung für 500 fmol/ $\mu\text{L}$
101004 A1	ALELKPDY <b>p</b> SK	Tom70	Ser 166	0,49	395,56	1:791
101004 A2	ALELKPDYSK	Tom70	-----	1,47	1265,13	1:2530
101004 A3	GFQESL <b>p</b> SDDEK	Mdm10	Ser 457	1,08	808,90	1:1618
101004 A4	GFQESLSDDEK	Mdm10	-----	0,68	540,99	1:1082
101004 A5	EQAEAp <b>S</b> IDNLK	Zeo1	Ser 40	0,44	333,67	1:667
101004 A6	EQAEASIDNLK	Zeo1	-----	0,55	452,26	1:905

Zum Messen wurden aus der 500 fmol/ $\mu\text{L}$  Verdünnung Proben mit jeweils 0,25, 0,5, 1, 2, 10, 50 beziehungsweise 100 fmol jedes der sechs Peptide hergestellt. Die Hälfte der Messreplikate wurde dabei mit 0,1% TFA auf das entsprechende Injektionsvolumen (beziehungsweise für eine genauere Messung auf das doppelte Volumen = 30  $\mu\text{L}$ ) aufgefüllt,

während die anderen Replikate zusätzlich mit Mitochondrien (GuHCl-lysiert, verdaut) versetzt wurden, so dass neben der jeweiligen Peptidmenge pro Ansatz 1 µg Lysat gemessen wurde. Des Weiteren wurden auch Ansätze mit lediglich Mitochondrien (GuHCl-lysiert, verdaut) in 0,1% TFA hergestellt. Die Messung erfolgte auf der TSQ Vantage mittels scheduled SRMs wie oben beschrieben (Q1 = 0,7 und 10 ms für jede Transition).

### 3.13 LC-ESI-MS/MS

#### 3.13.1 Nano-LC-ESI-MS/MS-Messung

Die Analyse der Peptide erfolgte mittel nano-LC-ESI-MS/MS durch Kopplung einer LTQ-Orbitrap XL oder einer LTQ-Orbitrap Velos mit einem Ultimate HPLC-System (Famos/Switchos/Ultime), einer Ultimate 3000 nanoHPLC beziehungsweise einer Ultimate 3000 RSLC (Dionex). Die Peptide wurden in 0,1% TFA auf einer 100 µm ID RP Vorsäule aufkonzentriert (selbstgepackte Synergi HydroRP 100 µm x 2 cm, C18, 4 µm, 80 Å, Phenomenex oder Acclaim PepMap 100 nano trap 100 µm x 2 cm, C18, 5 µm, 100 Å, Dionex) und anschließend durch einen binären Gradienten (Lösungsmittel A: 0,1% FA und Lösungsmittel B: 0,1% FA, 84% MeCN) von 5 - 50% Lösungsmittel B in 40 min (1h-Gradient) beziehungsweise 90 min (2h-Gradient) und einer Flussrate von 230 nL/min auf einer 75 µm ID RP Säule (selbstgepackte Synergi HydroRP 75 µm x 2 cm, C18, 2 µm, 80 Å, Phenomenex oder Acclaim PepMap 75 µm x 15 cm, C18, 2 µm, 100 Å, Dionex) aufgetrennt.

Die Übersichtsscans wurden in einem Bereich von 300 - 2000  $m/z$  und mit einer Auflösung von 60.000 (bei 400  $m/z$ ) in der Orbitrap XL akquiriert, wobei das Polysiloxan-Signal bei 445.120030  $m/z$  als *lock mass* [192] verwendet wurde. Für datenabhängige MS/MS wurden die fünf (LTQ-Orbitrap XL) oder zehn (LTQ-Orbitrap Velos) intensivsten Mutterionen eines MS<sup>1</sup>-Scans für ein nachfolgendes CID- oder, im Fall von Phosphopeptiden, MSA-Experiment (NL von H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und H<sub>2</sub>O) isoliert, fragmentiert und in der Ionenfalle akquiriert. CID- und MSA-Spektren wurden mit einer normalisierte Kollisionsenergie von 35, einem (Standard-) Ladungszustand von 2+, einem *cutoff* von 20.000 und einer Aktivierungszeit von 30 ms aufgenommen.

Mittels dynamischem Ionenausschluss wurden  $m/z$ -Werte von gerade fragmentierten Ionen für 20 s von der Messung ausgeschlossen, um ein mehrmaliges Messen desselben Ions zu verhindern. Dadurch wurde gewährleistet, dass auch niedrig abundante Peptide anstelle der fünf / zehn intensivsten Ionen fragmentiert wurden und sich der dynamische Bereich der Analyse vergrößerte.



Für die Messung der Phosphatase-behandelten / unbehandelten Proben mittels Auswahlliste wurden nur die drei intensivsten Mutterionen eines MS<sup>1</sup>-Scans einem MSA-Experiment unterzogen. Dabei wurde eine HCD-Fragmentierung mit anschließender Detektion in der Orbitrap (Auflösung von 7.500) durchgeführt. Für die HCD-Spektren wurde eine normalisierte Kollisionsenergie von 40, ein (Standard-) Ladungszustand von 2+, ein *cutoff* von 20.000 und eine Aktivierungszeit von 100 µs verwendet.

### 3.13.2 Auswertung

Die gemessenen Fragmentionenspektren (mit Ausnahme sämtlicher SILAC-Daten) wurden mit dem Programm Proteowizard 1.6.0 in das mgf-Format umgewandelt und mit Hilfe des Suchalgorithmus MASCOT™ (Mascot Version 2.3.0.3, Mascot Daemon 2.3.2) analysiert. Als Datenbanken wurde die *Saccharomyces* Genom Datenbank (SGD, Mai 2009 [Release 62] / Januar 2010 [Release 63], 6717 Sequenzen), die murine IPI Datenbank (v.3.77, 57605 Sequenzen) oder die humanen SwissProt-Einträge (v.57.6, 20403 Sequenzen) verwendet. Die Suchen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: (1) Trypsin als Enzym mit maximal 2 überlesenen Schnittstellen, (2) Carbamidomethylierung von Cystein als fixe Modifikation (+ 57,02 Da), (3) Phosphorylierung von Ser/Thr/Tyr (+ 79,96 Da), Acetylierung von Protein N-Termini (+ 42,01 Da) und Oxidation von Methionin als variable Modifikationen (+ 15,99 Da). Als Massentoleranzen für die LTQ-Orbitrap XL und die LTQ-Orbitrap Velos wurden 10 ppm für MS und 0,5 Da für MS/MS gewählt.

Die erhaltenen Proteinergebnisse sowie die angezeigten Phosphopeptide wurden manuell anhand der Spektren validiert [150], wobei für jede Proteinidentifikation mindestens zwei signifikante Peptide und ein Mascot Score von mindestens 30 (p-Value ≤ 0,05) vorausgesetzt wurden. Des Weiteren wurde auf (1) ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis, (2) eine korrekte Annotation der prominenten Ionen und (3) eine gute Verteilung der Signale über den gesamten *m/z*-Bereich (Sequenzabdeckung) geachtet. Bei Phosphopeptiden wurde außerdem die Lokalisation der von Mascot angegebenen Phosphorylierungsstelle anhand von z.B. NL-Signalen überprüft.

#### *Quantifizierung mittels SILAC*

Die Datenauswertung und Quantifizierung aller SILAC-markierten Proben erfolgte durch die drei Programme Mascot Distiller 2.3.2.0, Proteome Discoverer 1.2 und MaxQuant 1.1.1.25. Die gewählten Filter-, Such- und Quantifizierungs-Einstellungen befinden sich im Anhang (Anhang 10.1).

### *Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase*

In Progenesis LC-MS (NonLinear Dynamics Ltd) wurden die Messungen der Phosphatase-behandelten / unbehandelten Proben aufeinander abgeglichen, gefiltert und im *Experiment Design Setup* nach „mit Phosphatase“ / „ohne Phosphatase“ gruppiert. Als Filterkriterien wurden dabei gewählt: Anova p-Wert < 0,05, *Maximum Fold Change* > 5, Ladung von 2+, 3+ und 4+, ein Retentionszeitfenster von Minute 1,6 (nach dem Injektionspeak) bis zu einem Zeitpunkt bei dem der Gradient ungefähr bei 95% B war und Anzahl der Isotope > 1.

Anschließend wurden Peptide, bei denen das standardisierte Expressionsprofil in der unbehandelten Probe höher war als in der Phosphatase-behandelten, mit einem Retentionszeitfenster von 8 min als *Inclusion*-Liste „ohne Phosphatase“ für eine weitere gezielte Analyse herangezogen. Umgekehrt wurden mittels *Inclusion*-Liste „mit Phosphatase“ mit einem Retentionszeitfenster von 8 min Peptide, bei denen das standardisierte Expressionsprofil in der Phosphatase-behandelten Probe höher war als in der unbehandelten, analysiert.

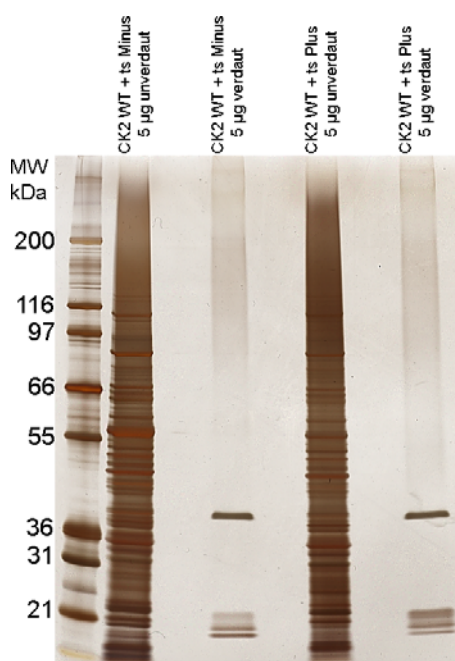
### *Synthetische Phosphopeptide & SRMs*

Die Dateninterpretation und Quantifizierung der SRMs wurden mit PinPoint 1.0 durchgeführt. Dabei wurden lediglich Signale berücksichtigt, die anhand der Retentionszeit und des gleichzeitigen Auftretens der beobachteten SRMs eindeutig identifiziert werden konnten. Die Quantifizierung erfolgte anhand der kombinierten Peakflächen aller ausgewählten Übergänge.

## 4 Ergebnisse

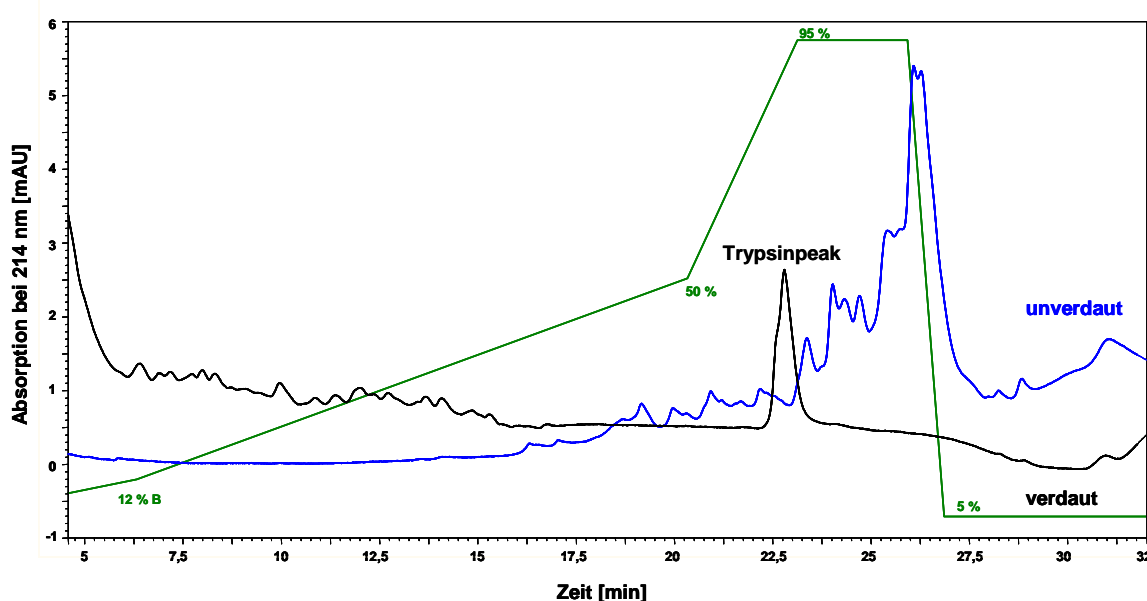
### 4.1 Qualität der durchgeführten Proteinverdau

Einen grundlegenden Schritt der Proteomanalyse bilden die Zellyse und der proteolytische Verdau. Daher ist es wichtig, dass durch eine geeignete Wahl der Puffer und Reaktionsbedingungen eine maximale Ausbeute an analysierbaren (Phospho-) Peptiden erzielt wird. Der in dieser Arbeit gewählte Lysepuffer mit 1% SDS, Protease- und Phosphataseinhibitoren verhindert zudem eine enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppen bzw. die Degradation der Proteine. Für den nachfolgenden proteolytischen Verdau wurden die Lysate jeweils 10:1 mit Verdauopuffer verdünnt, um eine kompatible Detergenzienkonzentration zu erreichen. Ein Verdau in 0,1% SDS stellte sich als effizient heraus, wie aus den Abbildungen 4.1 und 4.2 ersichtlich wird.



**Abbildung 4.1:** Verdaukontrolle mittels 1D-SDS PAGE.

5 µg SILAC-Mitochondrienlysate wurden direkt nach der Lyse (Spur 2 und 4) und nach erfolgtem proteolytischem Verdau mit Trypsin (Spur 3 und 5) in LDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem 4-12% NuPAGE BisTris Gradientengel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.6.1). Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch eine Silberfärbung nach Blum (siehe Abschnitt 3.6.3). Wie das Gel zeigt, gewährleistet das verwendete Protokoll einen effektiven proteolytischen Verdau der enthaltenen Proteine. Die Banden am unteren Ende der verdauten Proben sind auf Peptide in der Lauffront zurückzuführen. Banden zwischen 21 und 23 kDa könnten vom Trypsin stammen, während Banden zwischen 31 und 36 kDa von unverdauten Porinen, den abundantesten Proteinen der mitochondrialen OM stammen können.



**Abbildung 4.2:** Verdaukontrolle mittels chromatographischer Auftrennung auf einer monolithischen Säule. 1,5 µg Mitochondrienlysat wurden direkt nach der Lyse (blau) und nach erfolgtem proteolytischem Verdau mit Trypsin (schwarz) auf einer monolithischen Säule getrennt (siehe Abschnitt 3.8; Gradient in grün). Da die meisten Peptide zu Beginn und viele Proteine erst gegen Ende des Gradienten eluieren, bestätigt der Monolith, dass das verwendete Protokoll einen effektiven proteolytischen Verdau gewährleistet. Der hohe Peak gegen Minute 23 in der verdauten Probe ist, wie hier nicht abgebildete Messungen einer Trypsinlösung bestätigten, auf das enthaltene Trypsin zurückzuführen.

#### 4.2 Isoelektrische Fokussierung auf Peptid-/Proteinebene

Bei der IEF auf Peptidebene (siehe Abschnitt 3.9) wurde selbst nach 3 Tagen Laufzeit und wiederholtem Austauschen der Elektrodenpads nicht die gewünschte Gesamtspannung von circa 64 kV erreicht, weshalb die Auftrennung abgebrochen wurde. Anhand von Tabelle 4.1 beziehungsweise Anhang 10.2 lässt sich die Qualität der Auftrennung der IEF ablesen: Während einige Peptide lediglich in einer Fraktion detektiert werden, ist die Mehrheit der Peptide über mehrere Fraktionen verteilt. Zum Teil sind sie sogar in mehr als 50% der Fraktionen zu finden, was auf eine unzureichende Fokussierung schließen lässt.

**Tabelle 4.1:** Ausschnitt aus der Auswertung der IEF von Hefemitochondrien auf Peptidebene. Neben den Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank sind die jeweilige Peptidsequenz und die Fraktion, in der diese detektiert wurde, angegeben.

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
Q0050	WYEEPR				x																				
Q0055	LIHEEMK										x	x													
Q0140	IGPAGNINNK																					x	x		x
YAL038W	GVNLPGTDVLPALSEK		x																						
YAL039C	AEQPPPTFK												x												
YAL039C	FMGKPSVLSR																					x			
YAL039C	GWFWADGK										x	x	x	x	x	x						x			
YAL039C	KAEQPPPTFK																x	x	x	x	x	x	x	x	x
YAL039C	MDLPVDR		x																						
YAL039C	MISGPSSSSSAP						x	x	x	x															
YAL039C	TISSIPK																x		x	x	x		x	x	x
YAL048C	AEFIPTIQDVLPPISIPR			x																					
YBL003C	AGLTFPVGR																								x
YBL004W	IGGIIR																								x
YBL015W	AFANWENFK										x		x	x	x	x							x	x	x
YBL015W	AIAGHLVEFFR																x	x	x	x	x	x	x	x	x
YBL015W	APHQVQKPIAK																	x	x	x	x	x	x	x	x
YBL015W	AVPGLIDHVEK																		x	x	x	x	x	x	x
YBL015W	DQVPPNTPSDMSR		x	x	x	x	x	x																	
YBL015W	FHTNLAEK																								
YBL015W	FNLVFGASAGPEENR						x	x	x																
YBL015W	HGRLEPENLLPQSGIGNIANAVIEGLAQAQFK																								
YBL015W	IEFFDK																								
YBL015W	LPENLLPQSGIGNIANAVIEGLAQAQFK																								
YBL015W	LSIMHAPSARPTK																								
YBL015W	MLNGLGGSADFLR									x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
YBL015W	RAPHQVQKPIAK																								
YBL015W	SOVVSINPEMIR																								
YBL015W	VIEVNTATPSFEGHIDMPVNPFFR																								
YBL015W	VVAIVESTMR																								
YBL015W	WAEHDMIK																								
YBL022C	DNLNDWEELPDNVK		x																						
YBL022C	IKIDELFPPNEEK																								
YBL022C	LEDIVVER																								
YBL022C	LSIEDSPTSSADSKPK																								
YBL022C	NYLDWLTSPWVK																								
YBL022C	SPVINALTSEILK																								
YBL022C	TGQLGDVMK																								
YBL022C	TIIFK																								
YBL022C	TSDDIEALK																								
YBL030C	GNTANVIR																								
YBL030C	GVAGAGVISMYDQLQMLFGK																								
YBL030C	IVAAGVGSVLFK																								
YBL030C	TAASPIER																								
YBL030C	TPLPPAPAPK																								
YBL045C	AAFLGSSEVR																								
YBL045C	EGLALSSNISR																								
YBL045C	IRSDMSMMR																								
YBL045C	LRDDTLPK																								
YBL045C	LSLGEAFK																								
YBL045C	LTISVDTSEVER																								
YBL045C	NLSLQTGKPKVLK																								
YBL045C	QVQDFEENDHPNR																								
YBL045C	SDMSMMR																								
YBL057C	AVLDQITGDLK																								
YBL059C-A	IEEEYGEDALK																								

Als Vergleich zur Auftrennung auf Peptidebene wurde mit Proben der SILAC-Mitochondrien eine IEF auf Proteinebene durchgeführt (siehe Abschnitt 3.9).

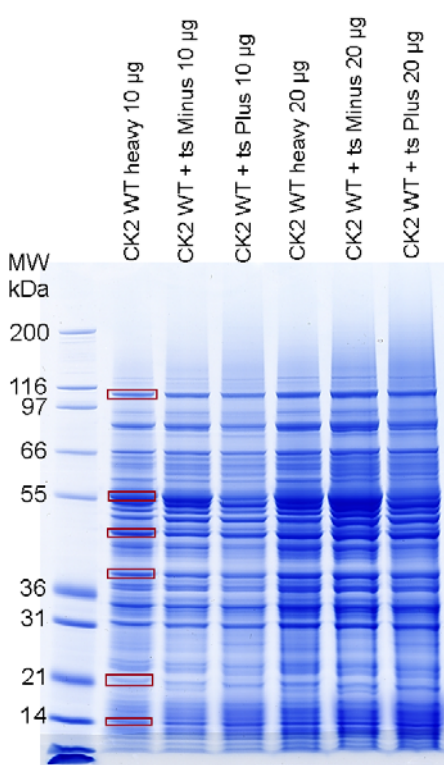
Um die Qualität der Auftrennung der IEF zu bestimmen, wurden Aliquots der Fraktionen 9 bis 24 von der + SILAC-Probe nach Verdau und Entsalzen auf der LTQ-Orbitrap Velos analysiert. Wie an Tabelle 4.2 beziehungsweise Anhang 10.3 zu erkennen ist, sind einzelne Proteine nur in einer Fraktion enthalten, während andere über mehrere Fraktionen (zum Teil über alle Fraktionen) verteilt gefunden wurden.

**Tabelle 4.2:** Ausschnitt aus der Auswertung der IEF auf Proteinebene (SILAC +). Neben den Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank sind der jeweilige Proteinname und die Fraktion, in der dieses detektiert wurde, angegeben.

ORF	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YMR056C	AAC1																X
YMR072W	ABF2															X	
YCR088W	ABP1	X	X														
YNR016C	ACC1	X		X	X	X		X	X			X					
YBL015W	ACH1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YLR304C	ACO1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YJL200C	ACO2							X	X	X	X	X					
YKL192C	ACP1	X	X	X										X			
YAL054C	ACS1			X	X										X	X	
YFL039C	ACT1	X	X	X	X	X		X									X
YOL086C	ADH1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YMR303C	ADH2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YMR083W	ADH3			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YMR318C	ADH6							X	X								
YMR009W	ADI1	X															
YDR226W	ADK1	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X				
YCR010C	ADY2			X	X			X	X	X	X	X	X			X	X
YEL052W	AFG1			X													
YER017C	AFG3																X
YFL030W	AGX1	X	X	X							X	X	X	X	X	X	
YFR011C	AIM13	X	X	X							X	X	X				
YHL021C	AIM17	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YHR198C	AIM18							X	X								
YJR080C	AIM24																X
YML030W	AIM31							X									X
YOR215C	AIM41														X	X	X
YPR004C	AIM45								X	X	X	X	X	X	X		
YER080W	AIM9			X							X	X					
YOR335C	ALA1	X	X	X													
YOR374W	ALD4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YER073W	ALD5			X				X	X	X	X	X	X	X			
YML086C	ALO1	X	X														
YLR089C	ALT1	X	X	X	X	X											
YER036C	ARB1	X															
YGL105W	ARC1		X	X						X	X	X	X				
YDL192W	ARF1																X
YER069W	ARG5,6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
YOL140W	ARG8								X	X	X	X	X	X	X		
YDR376W	ARH1														X		
YHR137W	ARO9			X													X

### 4.3 Auftrennung von SILAC-Proben mittels 1D-SDS-PAGE

Um die anhand des BCA-Assays (siehe Abschnitt 3.5) bestimmten Proteinmengen zu überprüfen, die verschiedenen SILAC-Proben gegeneinander abzugleichen und die von der AG Meisinger kalkulierten Einbauraten von circa 90% für Lys und nahezu 100% für Arg zu kontrollieren, wurde eine 1D-SDS-PAGE durchgeführt. Die massenspektrometrisch bestimmte Einbaurate entsprach dabei in etwa den angegebenen Werten.



**Abbildung 4.3:** Überprüfung der mittels BCA-Assay bestimmten Proteinmengen anhand einer 1D-SDS PAGE. Rechnerische 10 bzw. 20 µg des schwer-markierten CK2 WT sowie der beiden SILAC-Mitochondrien-Proben wurden direkt nach der Lyse in LDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem 4-12% NuPAGE BisTris Gradientengel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.6.1). Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch eine Coomassiefärbung (siehe Abschnitt 3.6.2). Es zeigt sich, dass die jeweils bestimmten Proteinmengen in etwa übereinstimmen. Jedoch weisen die Minus SILAC-Mitochondrien-Proben im Vergleich zu den restlichen Proben eine geringfügig höhere Proteinmenge auf. Die rot markierten Banden wurden im Anschluss zur Bestimmung der Einbaurate ausgeschnitten, gewaschen, verdaut, extrahiert (siehe Abschnitt 3.6.4) und auf der LTQ-Orbitrap XL gemessen.

Zur Bestimmung des SILAC-Mitochondrienproteoms und dessen Regulation auf Proteinebene wurde eine zweite 1D-SDS-PAGE der beiden SILAC-Proben - (CK2 WT & ts bei 24°C) und + (CK2 WT & ts bei 37°C) angefertigt und die beiden Spuren getrennt auf der LTQ-Orbitrap Velos analysiert und mittels Proteome Discoverer, Mascot Distiller und MaxQuant ausgewertet. Generell gilt dabei, dass Proteine, die eine H/L-Rate kleiner als 0,5 aufweisen, in der CK2 ts-Mutante („light“) abundanter sind als im CK2 WT („heavy“) und somit hoch reguliert. Dagegen sind Proteine, die eine H/L-Rate größer 2 besitzen, im CK2 WT („heavy“) abundanter als in der CK2 ts-Mutante („light“) und somit runter reguliert. Exemplarisch ist in Tabelle 4.3 ein Ausschnitt der Proteinliste der - SILAC-Probe sowie deren Regulation und die

Schwankung der H/L-Rate nach Auswertung mittels Proteome Discoverer (PD), Mascot Distiller (MD) beziehungsweise MaxQuant (MQ) aufgelistet. Die geometrische Standardabweichung  $SD_{geo}$  berechnet sich nach folgender Formel:

$$(1) SD_{geo} = \exp\left(\sqrt{\frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n \left[\ln\left(\frac{x_i}{x_g}\right)\right]^2}\right) \text{ mit } \bar{x}_g = \sqrt[n]{x_1 * x_2 * \dots * x_n}$$

**Tabelle 4.3:** Ausschnitt aus der Auswertung der - SILAC-Proben (24°C) auf Proteinebene. Neben den Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank und den Proteinnamen ist jeweils die H/L-Rate des entsprechenden Auswerteprogrammes sowie die Schwankung der H/L-Rate (*Variability*) in Prozent beziehungsweise die geometrische Standardabweichung ( $SD_{geo}$ ) angegeben. Hoch regulierte Proteine ( $H/L < 0,5$ ) sind rosa markiert und runter regulierte ( $H/L > 2$ ) hellblau. NN = Wert konnte nicht berechnet werden; n.d. = Protein wurde nicht detektiert.

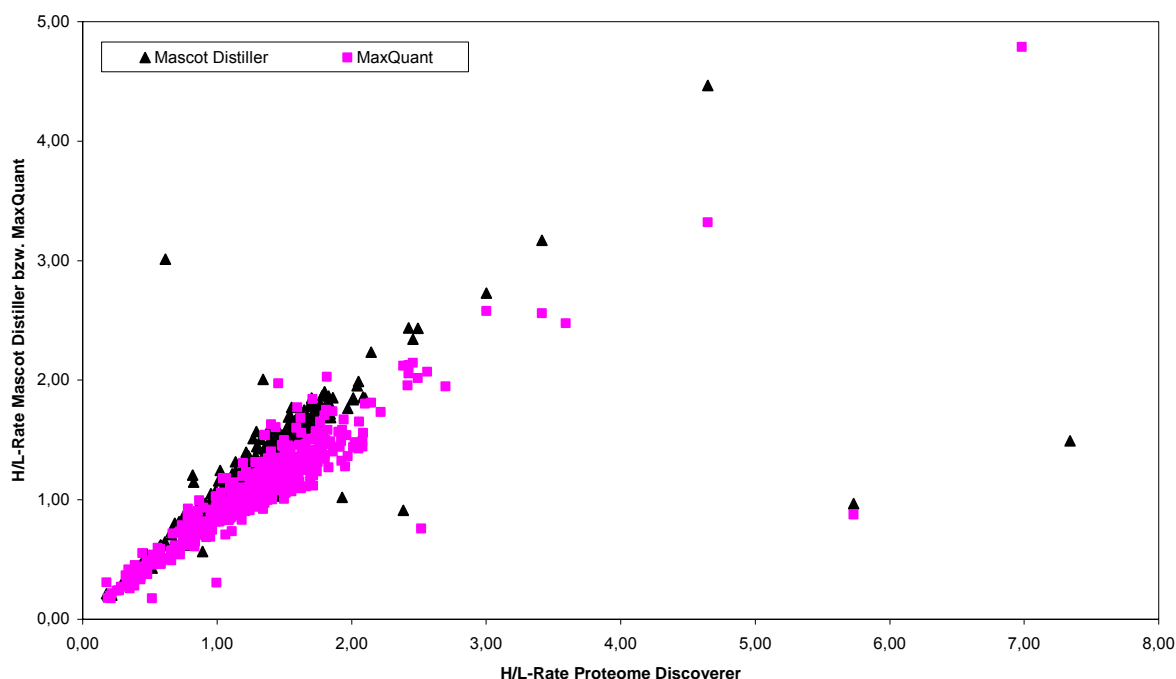
ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
Q0050	AI1	1,94	18,09	n.d.	n.d.	1,67	23,59
Q0055	AI2	2,56	7,16	n.d.	n.d.	2,07	12,76
Q0065	AI4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,52	15,49
Q0115	BI3	15,15	20,18	n.d.	n.d.	8,40	1,20
Q0120	BI4	1,47	4,66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Q0140	VAR1	1,64	8,16	1,71	1,08	1,26	26,03
Q0160	SCE1	12,73	4,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Q0250	COX2	1,20	7,34	n.d.	n.d.	0,91	13,48
Q0255	Q0255	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,97	117,57
YAL010C	MDM10	1,32	22,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YAL029C	MYO4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,09	13,83
YAL039C	CYC3	1,26	24,45	n.d.	n.d.	1,00	31,20
YAL054C	ACS1	0,62	8,95	n.d.	n.d.	0,50	18,82
YBL013W	FMT1	1,40	0,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBL015W	ACH1	3,00	16,20	2,73	1,12	2,58	22,91
YBL022C	PIM1	1,36	16,01	1,11	1,24	1,27	24,14
YBL030C	PET9	1,69	9,62	1,81	1,08	n.d.	n.d.
YBL038W	MRPL16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,97	26,98
YBL045C	COR1	1,29	9,40	1,28	1,18	1,11	16,75
YBL057C	PTH2	1,24	3,31	n.d.	n.d.	0,91	6,00
YBL059C-A	CMC2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,55	7,63
YBL059W	YBL059W	1,77	21,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBL064C	PRX1	1,84	17,78	1,72	1,07	1,49	20,71
YBL080C	PET112	1,25	4,86	n.d.	n.d.	1,19	13,17
YBL090W	MRP21	1,59	22,15	n.d.	n.d.	1,30	21,27
YBL098W	BNA4	0,72	4,67	n.d.	n.d.	0,57	9,88
YBL099W	ATP1	1,28	11,56	1,32	1,05	1,13	21,44
YBR003W	COQ1	1,55	21,27	n.d.	n.d.	1,38	15,29
YBR024W	SCO2	1,27	9,20	n.d.	n.d.	1,08	3,52



ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YBR026C	ETR1	1,29	4,15	1,25	1,07	1,08	21,89
YBR037C	SCO1	1,01	11,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBR039W	ATP3	1,24	11,93	1,29	1,17	1,02	16,56
YBR044C	TCM62	1,38	10,92	n.d.	n.d.	1,34	16,72
YBR078W	ECM33	0,36	16,24	0,39	1,08	0,39	26,41
YBR084W	MIS1	1,81	10,51	1,79	1,15	1,50	15,79
YBR085W	AAC3	n.d.	n.d.	1,68	1,02	n.d.	n.d.
YBR104W	YMC2	1,90	12,38	n.d.	n.d.	1,57	15,99
YBR106W	PHO88	0,86	11,04	0,86	1,12	n.d.	n.d.
YBR120C	CBP6	1,42	19,87	1,29	1,16	1,33	11,19
YBR121C	GRS1	0,95	11,60	1,05	1,11	0,80	27,03
YBR129C	OPY1	0,83	38,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBR146W	MRP59	1,61	7,56	1,52	1,12	n.d.	n.d.
YBR163W	EXO5	1,07	12,76	n.d.	n.d.	1,18	24,58
YBR176W	ECM31	1,21	6,20	n.d.	n.d.	0,90	18,47
YBR177C	EHT1	1,72	13,43	1,82	NN	1,38	22,09
YBR179C	FZO1	1,37	12,98	1,57	1,06	1,18	27,60
YBR192W	RIM2	1,35	7,67	1,43	1,03	1,13	32,72
YBR196C	PGI1	0,35	11,98	n.d.	n.d.	0,39	94,11

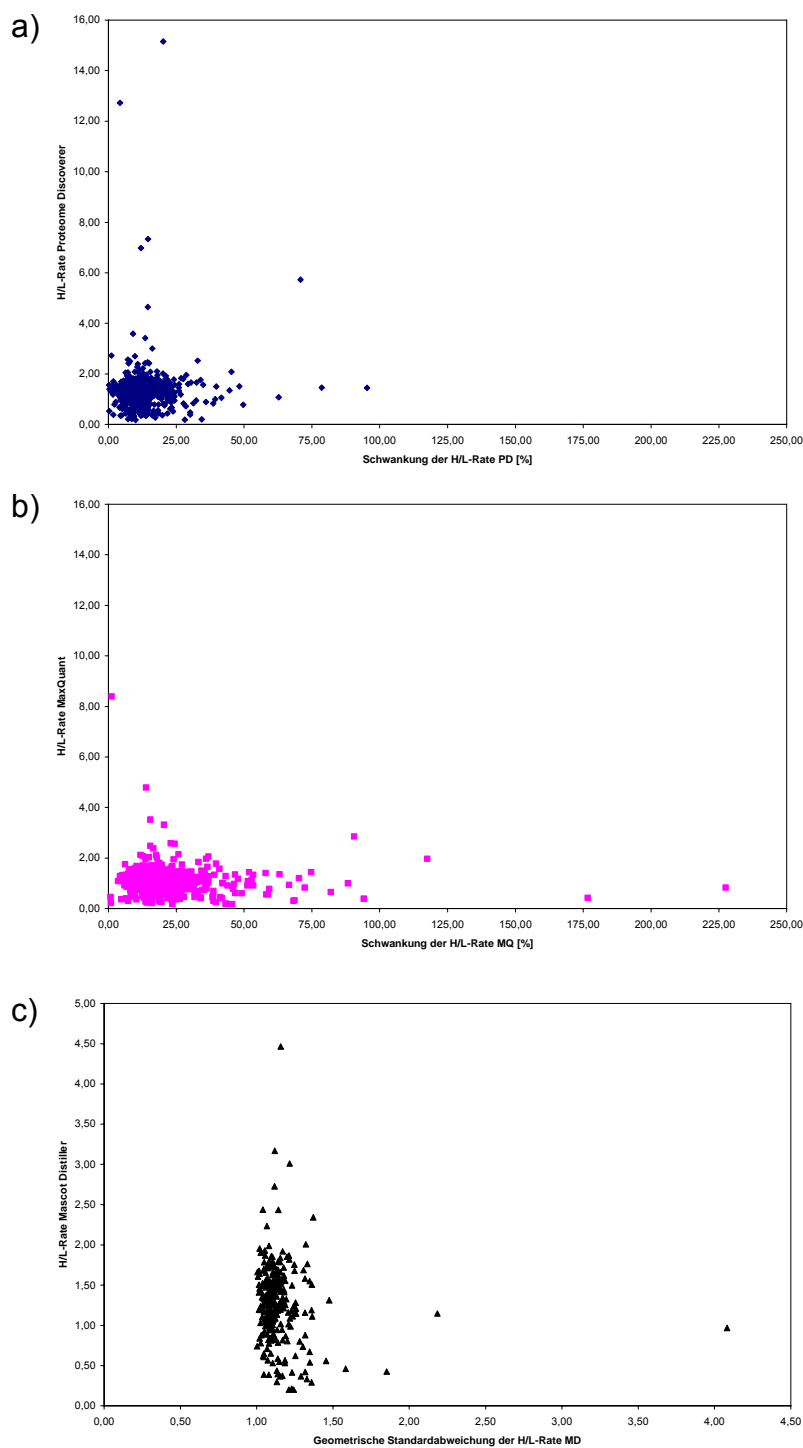
Insgesamt wurden in der - SILAC-Probe (24°C) 629 verschiedene mitochondriale Proteine detektiert. Bei Proteome Discoverer waren dabei von 575 Proteinen 35 hoch und 33 runter reguliert, bei Mascot Distiller waren von 311 Proteinen 17 hoch und 10 runter reguliert und bei MaxQuant waren von 553 Proteinen 45 hoch und 16 runter reguliert (siehe Anhang 10.4). Die Analyse der + SILAC-Probe (37°C) ergab mit einer Anzahl von 726 circa 100 mitochondriale Proteine mehr. Mittels Proteome Discoverer wurden 675 Proteine (davon 105 hoch und 96 runter reguliert) detektiert, mit Mascot Distiller wurden 524 Proteine (davon 63 hoch und 85 runter reguliert) gefunden und mit MaxQuant 626 Proteine - davon 106 hoch und 18 runter reguliert (siehe Anhang 10.5). Während PD und MQ in etwa eine vergleichbare Anzahl von Proteinen liefern, sind vor allem bei der - SILAC-Probe mit MD im Vergleich nur in etwa 50% der Proteine detektier- und quantifizierbar.

Trägt man die anhand der drei Programme ermittelten H/L-Raten der - SILAC-Proteine gegeneinander auf, lassen sich die meisten Punkte in etwa entlang einer Ursprungsgerade anordnen (Abb. 4.4). Dies bedeutet, dass die Proteine in PD, MD und MQ ungefähr dieselbe H/L-Rate aufweisen und daher für die meisten Proteine die Regulation eine ähnliche Tendenz zeigt.



**Abbildung 4.4:** Vergleich der mittels PD, MD beziehungsweise MQ ermittelten H/L-Raten der einzelnen Proteine der - SILAC-Probe. Zur Erstellung der Abbildung wurden die Werte der Proteine HXT7 und BI3 vernachlässigt, da sie im Vergleich zu den übrigen Werten deutlich höher liegen und somit die Darstellung verzerrt hätten.

Bei Betrachtung von Abbildung 4.5, in der die Schwankung der H/L-Rate in Prozent (PD und MQ) beziehungsweise die geometrischen Standardabweichung (MD) der - SILAC-Probe dargestellt sind, fällt auf, dass bei PD die meisten Proteine eine Schwankung von maximal 25% und bei MQ von 30% aufweisen. Die geometrische Standardabweichung in MD liegt für die Mehrheit der Proteine bei einem maximalen Wert von 1,25. Jedoch lassen sich in allen Auswerteprogrammen Ausreißer mit deutlich höherer Schwankung (bei MQ teilweise sogar über 100%) beziehungsweise höherer SDgeo beobachten.



**Abbildung 4.5:** Schwankung der H/L-Rate in Prozent [(a) PD und (b) MQ] beziehungsweise der geometrischen Standardabweichung [(c) MD] der - SILAC-Probe gegenüber der H/L-Rate. Zur Erstellung der Abbildung wurden bei PD und MQ erneut die Werte des Proteins HXT7 vernachlässigt, da sie im Vergleich zu den übrigen Werten deutlich höher liegen und somit die Darstellung verzerrt hätten.

## 4.4 Resultate der Anreicherung von Phosphopeptiden

### 4.4.1 Anreicherung von Phosphopeptiden aus isoliertem TOM-Komplex

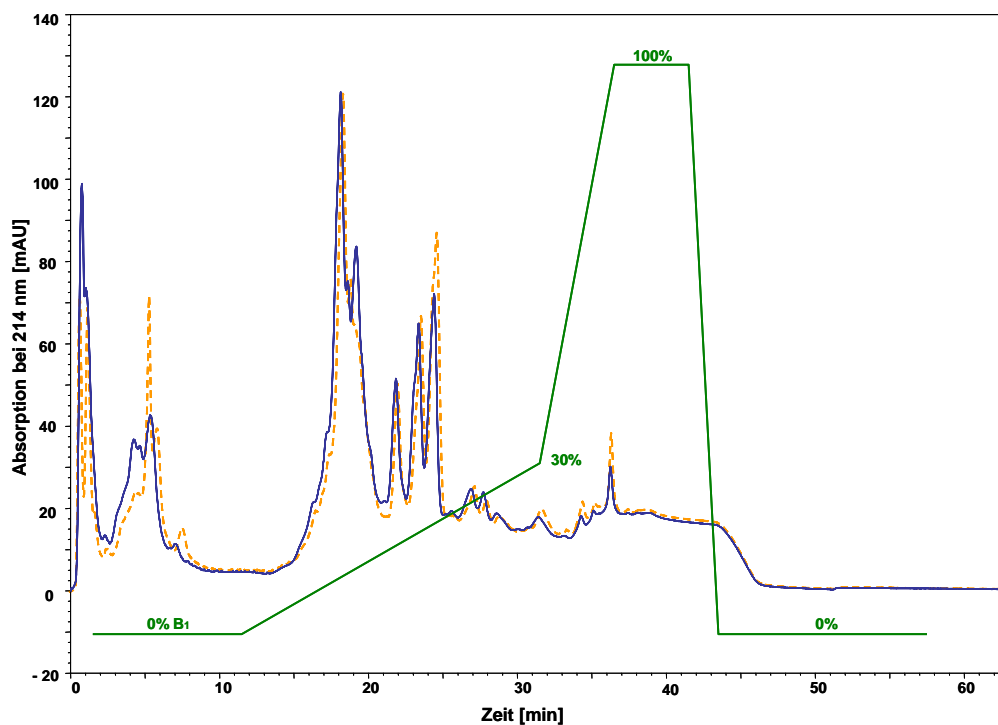
Der Vergleich mit der Pulldown-Kontrolle zeigt, dass die Hauptkomponenten des TOM-Komplexes, Tom40, Tom20, Tom22 und Tom5, ausschließlich im isolierten Komplex detektiert werden können. Jedoch konnte selbst nach  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung nur ein Phosphopeptid (Tom22 M.VELTEIKDDVVQLDEPQFpSR.N) in der TOM-Komplex-Probe identifiziert werden. Spezifische SRM-Scans nach potentiellen Phosphopeptiden der Translokationspore Tom40 lieferten keine Resultate, obwohl die Mehrheit der im isolierten Komplex detektierten Peptide aus Tom40 stammten.

### 4.4.2 Anreicherung von Phosphopeptiden aus OMVs

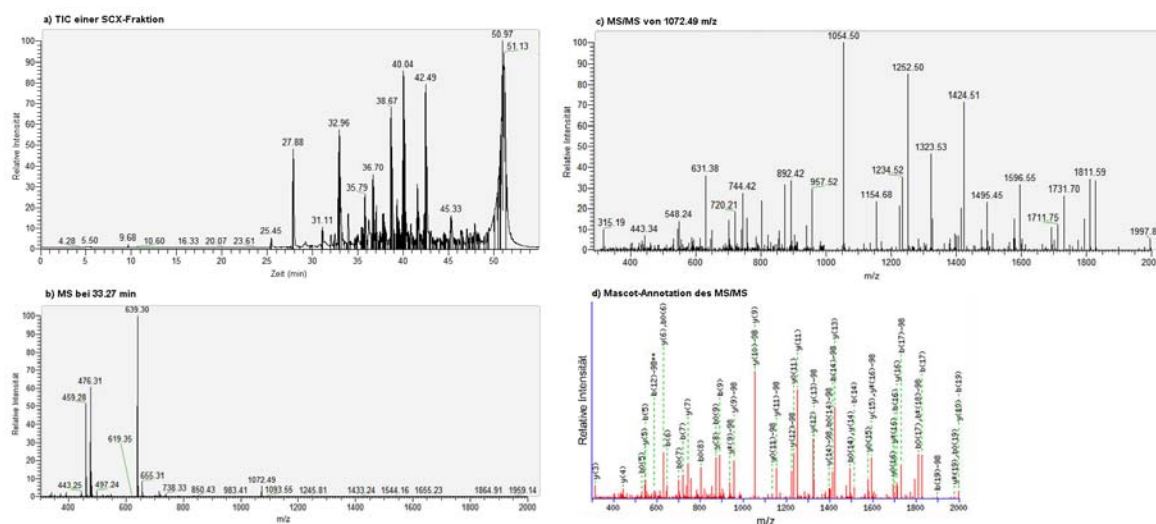
Für die Anreicherung von Phosphopeptiden aus isolierten OMVs wurden die drei Anreicherungsstrategien SCX, ERLIC und  $\text{TiO}_2$  („Batch-Verfahren“ oder  $\text{TiO}_2$ -Tips) beziehungsweise eine Kombination aus SCX und  $\text{TiO}_2$  verwendet.

#### 4.4.2.1 Kationenaustausch-Chromatographie

Wie in Abbildung 4.6 zu erkennen ist, verhielten sich die beiden SCX-Auftrennungen (siehe Abschnitt 3.11.1) der OMVs reproduzierbar. Die Fraktionen mit einer hohen UV-Absorption, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Phosphopeptide enthalten, wurden bis einschließlich Minute 36 gesammelt und für Messungen beziehungsweise eine weitere Behandlung aufgehoben. Abbildung 4.7 zeigt eine exemplarische nano-LC-MS/MS-Analyse einer SCX Fraktion. Die insgesamt mittels LTQ-Orbitrap XL detektierten Phosphopeptide der beiden Proben sind in Tabelle 4.4 am Ende dieses Abschnittes zusammengefasst.



**Abbildung 4.6:** UV-Chromatogram von zwei sukzessiven OMV-SCX-Auftrennungen (orange bzw. blau; Anteil des SCX-Puffers  $B_1$  des binären Gradienten in grün) bei 214 nm.

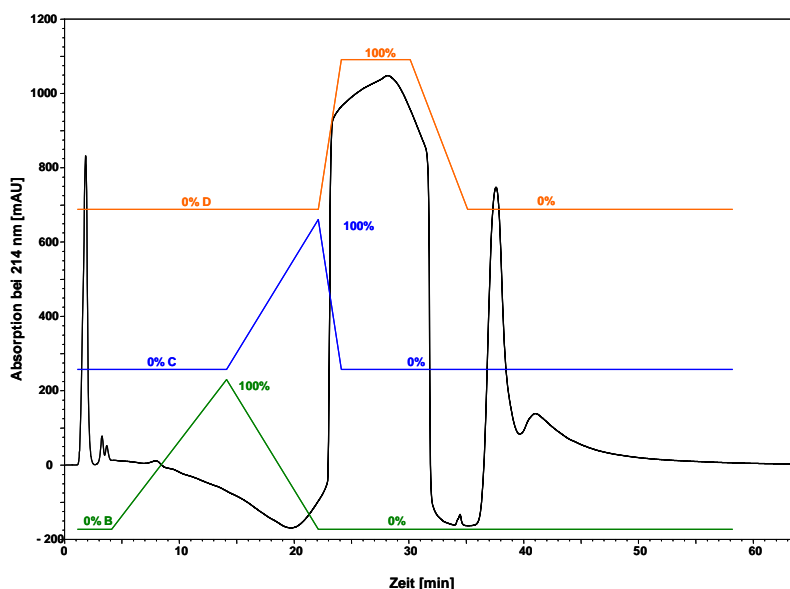


**Abbildung 4.7:** Nano-LC-MS/MS Analyse einer SCX Fraktion. a) Das Totalionen Chromatogramm (TIC) stellt die Signalintensität aller detektierten Ionen über den zeitlichen Verlauf des Gradienten dar. b) Ein exemplarisches MS Übersichtsspektrum bei 33,27 min. Für die nachfolgende MS/MS Analyse (c) wurde aufgrund der dynamischen Ausschlussliste das Ion bei 1072,49 m/z ausgewählt. d) Mascot-Annotation der prominenten MS/MS Fragmentationen.

Da die Analysen von potentiell Phosphopeptid-angereicherten SCX Fraktionen mittels nano-LC-MS/MS nur zu wenigen signifikant identifizierten Phosphopeptiden führten, wurden die Fraktionen 6 bis 36 der einen OMV-Auftrennung (orange in Abb. 4.6) nach Entsalzung mit Proxeon GELoader C18-Tips zusätzlich mittels  $\text{TiO}_2$ -Tips angereichert und anschließend erneut auf der LTQ-Orbitrap XL gemessen. Einen Überblick über die gefundenen Phosphopeptide bietet ebenfalls Tabelle 4.4 (Spalte „SCX+ $\text{TiO}_2$ “).

#### 4.4.2.2 ERLIC

Bei der Auftrennung der OMV-Proben über ERLIC (siehe Abschnitt 3.11.2) wurden ab dem Durchfluss (Abb. 4.8 hoher Peak zu Beginn des Laufes, circa bis Minute 3) 1-minütige Fraktionen bis zu Minute 35 (Abb. 4.8 nach dem hohen Signal in der Mitte des Laufes) gesammelt. Vor der Messung auf der LTQ-Orbitrap XL wurde das Volumen der Fraktionen in der SpeedVac reduziert und die Proben wie bereits bei der SCX-Auftrennung entsalzt. Eine Liste der in den Proben enthaltenen Phosphopeptide befindet sich in Tabelle 4.4.



**Abbildung 4.8:** UV-Chromatogramm der ERLIC-Auftrennung einer OMV Probe (schwarz). Die Anteile der verschiedenen Lösungsmittel am verwendeten Gradienten sind in grün (ERLIC B), blau (ERLIC C) und orange (ERLIC D) dargestellt.

#### 4.4.2.3 Titandioxid

Die Anreicherung mittels  $\text{TiO}_2$  (siehe Abschnitt 3.11.3) erfolgte sowohl im „Batch-Verfahren“ als auch mit  $\text{TiO}_2$ -Tips. Während nach Batch-Anreicherung keine Phosphopeptide detektiert werden konnten, sind die Phosphopeptide nach Tip-Anreicherung in der nachfolgenden Tabelle in der Spalte „ $\text{TiO}_2$ “ aufgelistet.

**Tabelle 4.4:** In OMVs detektierte Phosphopeptide aufgeschlüsselt nach der jeweiligen Methode. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. M(Ox) steht für oxidierte Methionine und \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem ist die Position der phosphorylierten Aminosäure sowohl in der Peptid- als auch in der Proteinsequenz angegeben. Grau unterlegte ORFs stehen für laut SGD in der OM lokalisierte Proteine.

ORF	Sequenz	* = N-terminal acetyliert	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein	SCX	SCX + $\text{TiO}_2$	ERLIC	$\text{TiO}_2$
YAL010C	K.NDNAIpSISATDTENGNIpVfPAK.F		S 6	S 467				x
YAL010C	R.GFQESLpSDDEK.N		S 7	S 457	x		x	x
YBR106W	K.ApSLFGGM(ox)GQTGPK.T		S 3	S 157				x
YBR177C	K.NpSFYMFPTPENLIK.A		S 3	S 332				x
YDR326C	R.Np(SS)SDFSTNQGGQMPR.T		S 2 / S 3	S 596 / S 597				x
YDR470C	K.LNVInp(SS)PTTK.R		S 6 / S 7	S 55 / S 56	x			
YDR508C	K.DpSSSQLDNELNR.K		S 2	S 111				x
YDR508C	R.KSpSYITVDGIK.Q		S 3	S 124				x
YER026C	*M.VEpSDEDFAPQEFPHDTDTDVIVNEHR.D		S 3	S 4				x
YER026C	-M(ox)VEpSDEDFAPQEFPHDTDTDVIVNEHR.D		S 4	S 4				x
YER026C	M.VEpSDEDFAPQEFPHDTDTDVIVNEHR.D		S 3	S 4			x	x
YER026C	R.DENDGYApSDEVGGLSR.R		S 8	S 34	x			x
YER026C	R.DENDGYASDEVGGLpSR.R		S 16	S 42			x	x
YER026C	R.RApSpSIFSINTTPLAPPNATIqK.F		S 3, S 4	S 46, S 47				x
YER140W	R.RNpSAPSAIHIISR.L		S 3	S 22		x		
YFL038C	R.FSDDTYTNDYIpSTIGVDFK.I		S 12	S 39				x
YGL219C	K.TVLDPSSQYDLATITK.I		S 5	S 320				x
YGL219C	K.TVLDPSSQYDLATITK.I		S 6	S 321				x
YGR082W	K.AEpSDAVAEANDIDD.-		S 3	S 172	x			
YGR082W	K.DPIPSDPpSER.E		S 8	S 87			x	
YGR082W	K.GVVGPpSKAESDAVAEANDIDD.-		S 5	S 168				x
YGR082W	K.VTEFLSM(ox)ELAKDPIPSDPpSER.E		S 16	S 84				x
YGR082W	K.VTEFLSM(ox)ELAKDPIPSDPpSER.E		S 19	S 87				x
YHR083W	R.pSTVAISEIM(ox)R.S		S 1	S 142				x
YHR117W	K.AKpSGEGFDYPSLPNGEPDIAQLK.G		S 3	S 96				x
YHR117W	K.pSGEGFDYPSLPNGEPDIAQLK.G		S 1	S 96				x
YHR117W	R.QSEAFAGQNEDEADLKDDGpSVVSGSNK.R		S 20	S 73		x	x	x
YHR117W	R.QSEAFAGQNEDEADLKDDGpSVVpSGSNK.R		S 23	S 76		x		
YHR117W	R.RQpSEAFAGQNEDEADLK.D		S 3	S 55				x
YIL136W	K.DSSSQpSIFNWGFSEAER.R		S 6	S 116				x
YIL136W	K.DSSSQSIFNWGFpSEAER.R		S 13	S 123				x
YIL136W	R.DFNElpSDKLDQqER.N		S 6	S 186				x
YIL136W	R.EGNVpSAYYNGQEYgSSAPPQLGK.L		S 5	S 37				x

ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein	SCX	SCX + TiO <sub>2</sub>	ERLIC	TiO <sub>2</sub>
YIL136W	R.EGNVSAYYNGQEYGp(SS)APPQLGK.L	S 15 / S 16	S 47 / S 48				x
YIL155C	R.NPSGLPDpSPLNDNSK.I	S 8	S 304	x			x
YJL112W	K.pSFPTFQQLYEPGK.I	S 1	S 376				x
YJR048W	R.HSQQAEGYp(SYT)DANIK.K	S 9 / T 11	S 53 / T 55				x
YKL027W	K.p(SDT)DKYHQYDEQFIR.Q	S 1 / T 3	S 52 / T 54				x
YKL027W	K.pSDTDKYHQYDEQFIR.Q	S 1	S 52		x		
YKL027W	R.GKVDELpSALK.D	S 7	S 285				x
YKL027W	R.VVDFDQVpSLSSLNR.H	S 8	S 122				x
YKL150W	K.GpSNVVRPYTPVSDLSQK.G	S 2	S 100				x
YKL150W	R.NQHpsFVFNESNK.V	S 4	S 37				x
YKL217W	K.YINQVEEYADGLpSISDIVEQK.T	S 14	S 584				x
YKL217W	R.VYpSQDQGVVEEEDKPNLSAASIK.S	S 3	S 81				x
YKR036C	R.LLLDNVDGATNpSDKEK.Y	S 12	S 136				x
YLR454W	K.IEFSEDISpSDFNEM(ox)LK.R	S 9	S 2510				x
YLR454W	K.QLTTYNpSYTEPEELR.-	S 7	S 2620				x
YLR454W	K.SApTDSEIPLTPAALNINGK.R	T 3	T 1144				x
YML072C	R.SPSNLNSTSVpTPR.A	T 11	T 1350	x			
YMR110C	K.FDLIFYTgSPR.V	S 9	S 215				x
YMR110C	K.IIEEHDTPLVQYIFSDSQpTEINR.I	T 19	T 408				x
YMR110C	R.RVpSDSSPPFMFGK.T	S 3	S 111				x
YMR110C	R.VpSDSSPPFMFGK.T	S 2	S 111				x
YMR110C	R.VSDSpSPPFM(ox)FGK.T	S 5	S 114				x
YMR129W	R.RFQYpSDDEPAEK.I	S 5	S 45				x
YMR203W	R.QpSLELVNPGTVENLNK.E	S 2	S 54				x
YMR212C	R.DNQISpTSDLLSDSQVR.T	T 6	T 565				x
YMR264W	K.FHVDLNEDM(ox)SNLpSFK.D	S 13	S 167				x
YMR264W	K.LQpSDKDLQSLLT.-	S 3	S 194				x
YNL055C	K.AKVpSDSGIVTLAYK.Q	S 4	S 238				x
YNL055C	K.DFYHApTPAAFDVQTTTANGIK.F	T 6	T 25				x
YNL055C	K.DFYHATPAAFDVQp(TT)TANGIK.F	T 14 / T 15	T 33 / T 34				x
YNL055C	K.DGFLpSTNVEAK.L	S 5	S 55	x		x	x
YNL055C	K.LEFANLpTPGLK.N	T 7	T 91	x			x
YNL055C	K.LPNpSNVNIEFATR.Y	S 4	S 215				x
YNL055C	K.NELITpSLTPGVAK.S	S 6	S 101				x
YNL055C	K.NELITSpTPGVAK.S	T 8	T 103	x	x		x
YNL055C	K.QTGLGLTQGWp(SNT)NNLQTK.L	T 13	T 78				x
YNL055C	K.VSDpSGIVTLAYK.Q	S 4	S 240				x
YNL055C	M.pSPPVYSDISR.N	S 1	S 2	x			x
YNL055C	M.SPPVYpSDISR.N	S 6	S 7	x			x
YNL055C	M.SPPVYSDIpSR.N	S 9	S 10				x
YNL070W	M.SFLPpSFILSDESK.E	S 5	S 6				x
YNL121C	K.ALELKPDYpSK.V	S 9	S 166				x
YNL121C	K.FGDIDpTATApTPELSTQPAK.E	T 6, T 10	T 228, T 232	x			
YNL121C	K.FGDIDpTATATPpTELSTQPAK.E	T 6, T 12	T 228, T 234				x
YNL121C	K.FGDIDpTATATPELSTQPAK.E	T 6	T 228				x
YNL121C	K.FGDIDTATApTPELSTQPAK.E	T 10	T 232	x	x	x	x
YNL121C	K.FGDIDTATATPpTELSTQPAK.E	T 12	T 234	x			
YNL121C	K.STAPpSNPIYPVSSNGEPDFSNK.A	S 5	S 69				x
YNL121C	K.STAPSNPIYPVp(SS)NGEPDFSNK.A	S 13 / S 14	S 77 / S 78	x	x	x	x
YNL121C	R.NPpTVENFIEATNLLEK.A	T 3	T 520				x
YNL131W	K.DDVVQLDEPQFpSR.N	S 12	S 20				x
YNL131W	M.VELTEIKDDVVQLDEPQFpSR.N	S 19	S 20		x		x
YNR002C	K.ALDp(SS)EGEFISENNDQSR.H	S 4 / S 5	S 21 / S 22				x
YOL109W	K.EQAEApSIDNLK.N	S 6	S 40	x	x	x	x



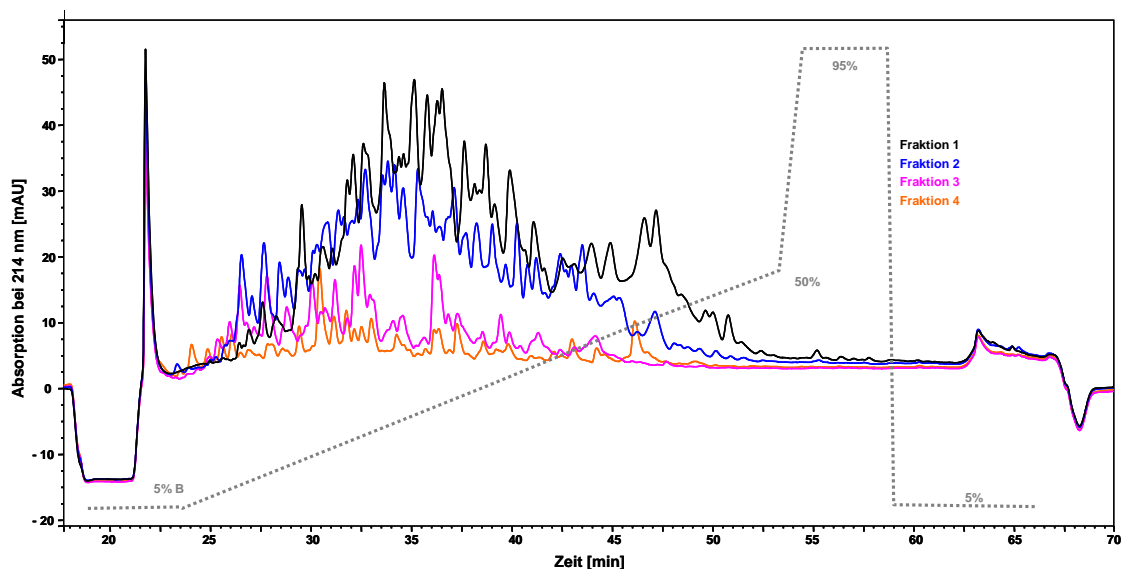
ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein	SCX	SCX + TiO <sub>2</sub>	ERLIC	TiO <sub>2</sub>
YOL109W	K.EQAEApSIDNLKNEApTPEAEQVK.K	S 6, T 15	S 40, T 49				x
YOL109W	K.EQAEApSIDNLKNEATPEAEQVK.K	S 6	S 40		x		
YOL109W	K.EQAEASIDNLKNEApTPEAEQVK.K	T 15	T 49		x		x
YOL109W	K.LEETKEpSLQNK.G	S 7	S 25				x
YOL129W	-.M(ox)EADDHVpSLFR.F	S 8	S 8				x
YOR020W-A	K.pSIEGFLNDLEK.D	S 1	S 71				x
YOR045W	-.*MDGMFAMPGAAAGAApSPQQPK.S	S 16	S 16	x		x	x
YOR086C	K.AGp(TT)VIGGGVGAIGK.I	T 3 / T 4	T 1146 / T 1147				x
YOR317W	K.DpSSINIENYLEDAK.L	S 2	S 621				x
YPL186C	K.EENKELpSPNFSQEQTENK.Q	S 7	S 185			x	x
YPL186C	K.ELpSPNFSQEQTENK.Q	S 3	S 185				x
YPL186C	K.GLDNLpSEGNDNDNTR.V	S 6	S 205			x	x
YPL186C	K.GNVTFpSPK.T	S 7	S 140	x			
YPL186C	K.TAlpSQDGSAFAK.E	S 4	S 146				x
YPR133W-A	-.M(ox)FGLPQQEVpSEEEKR.A	S 10	S 10				x
YPR155C	R.EVAFDpSQQLIQDVR.E	S 6	S 29		x		

#### 4.4.3 Anreicherung von Phosphopeptiden aus Hefemitochondrien

Für die Anreicherung von Phosphopeptiden aus Hefemitochondrien wurden die drei Anreicherungsstrategien IEF, SCX und TiO<sub>2</sub> („Batch-Verfahren“) beziehungsweise eine Kombination aus IEF und TiO<sub>2</sub>-Tips oder SCX und TiO<sub>2</sub>-Tips verwendet.

##### 4.4.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Die IEF der Hefemitochondrien erfolgte auf Peptidebene (siehe Abschnitte 3.8 und 4.1). Um für die nachfolgende TiO<sub>2</sub>-Anreicherung einen Anhaltspunkt bezüglich der Peptidmenge zu haben, wurden Aliquots der einzelnen Fraktionen auf der LTQ-Orbitrap Velos gemessen. Exemplarisch sind in Abb. 4.9 die UV-Chromatogramme der ersten vier Fraktionen der IEF dargestellt.



**Abbildung 4.9:** UV-Chromatogram der Auftrennung der Hefemitochondrien-IEF-Fraktionen 1 bis 4. Die unterschiedliche Peptidmenge der einzelnen Fraktionen schlägt sich in den unterschiedlichen UV-Absorptionen nieder.

Entsprechend ihrer UV-Absorption wurden Aliquots der Fraktionen oder die komplette IEF-Fraktion mittels Proxeon Stage Tips entsalzt (siehe Abschnitt 3.10) und die Proben anschließend für die  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung (siehe Abschnitt 3.11.3) mit einer entsprechenden Menge Ladepuffer sowie jeweils 40  $\mu\text{g}$  Beads versetzt. Die Resultate dieser Anreicherungen finden sich in der nachfolgenden Tabelle.

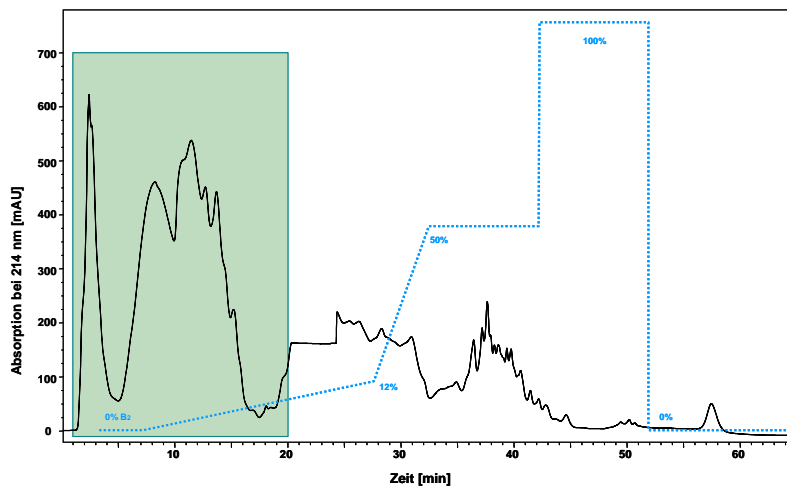
**Tabelle 4.5:** Mittels IEF und nachfolgender  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung in Hefemitochondrien detektierte Phosphopeptide. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem ist die Position der phosphorylierten Aminosäure sowohl in der Peptid- als auch in der Proteinsequenz angegeben. Grau unterlegte ORFs stehen für laut SGD in der OM lokalisierte Proteine.

ORF	Sequenz	* = N-terminal acetyliert	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein
YAL010C	R.GFQESLpSDDEK.N		S 7	S 457
YBR039W	K.TIEQSPpSFGKFEIDTDANVPR.D		S 7	S 226
YDR148C	K.AQEPPVASNpSFTPFPR.T		S 10	S 227
YGR082W	K.DPIPSPpSER.E		S 8	S 87
YGR086C	R.APTApSQLQNPPPPSTTK.G		S 5	S 16
YGR181W	M.GLpSSIFGGGAPSQQK.E		S 3	S 4
YGR244C	K.FGFDDNpSFR.Q		S 8	S 263
YIL094C	R.KpSLTIGLIPGDGIGK.E		S 2	S 23
YIL155C	R.NPSGLPDpSPLNDNSK.I		S 8	S 304
YJR121W	K.VLDTGGPIpSVPVGR.E		S 9	S 117
YKL217W	K.LYHNPSLPAQpSIQDTR.D		S 11	S 66
YLR203C	R.NALGLDPPPpSPEDPTPENR.F		S 10	S 51
YLR259C	K.QIIENAGEEGpSVIIGK.L		S 11	S 485
YMR110C	R.RVpSDSSPPFMFGK.T		S 3	S 111
YNL055C	K.NELITSLpTPGVAK.S		T 8	T 103
YNL070W	M.SFLPpSFILSDESK.E		S 5	S 6
YNL121C	K.STAPSNPIYPVp(SS)NGEPDFSNK.A		S 13 / S 14	S 77 / S 78
YNL131W	K.DDVVQLDEPQFpSR.N		S 12	S 20
YNR002C	M.*pSDREQSSGNTAFENPK.A		S 1	S 2
YOL109W	K.EQAEApSIDNLK.N		S 6	S 40
YOL109W	K.EQAEASIDNLKNEApTPEAEQVK.K		T 15	T 49
YOL109W	K.LEETKEpSLQNK.G		S 7	S 25
YOL129W	-.*MEADHDVpSLFR.F		S 8	S 8
YOR175C	K.DISASpSPNLGGILK.A		S 6	S 513
YOR374W	R.AFpSNGSWNGIDPIDR.G		S 3	S 96
YOR374W	R.VYVEEpSIYDK.F		S 6	S 335

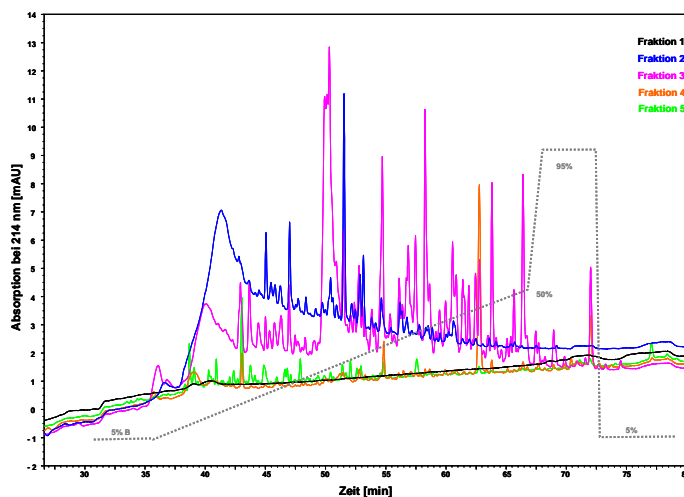
#### 4.4.3.2 Kationenaustausch-Chromatographie

Die Phosphopeptid-angereicherten Fraktionen mit einer hohen UV-Absorption zu Beginn des Gradienten wurden von Minute 1 bis Minute 20 (Abb. 4.10, grün markierter Bereich) gesammelt und für Messungen beziehungsweise eine weitere Behandlung aufgehoben. Abbildung 4.11 zeigt exemplarisch die UV-Chromatogramme der nano-LC-MS/MS-Analysen der SCX Fraktionen 1 bis 5, die

auch zur Abschätzung der enthaltenen Peptidmenge für die nachfolgende  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung herangezogen wurden.



**Abbildung 4.10:** UV-Chromatogramm der SCX-Auftrennung von *highly pure* Hefemitochondrien (Anteil des SCX-Puffers B2 des binären Gradienten in blau) bei 214 nm. Im grün markierten Bereich wurden mit dem Autosampler automatisch 1 min-Fractionen für die weitere Analyse gesammelt.



**Abbildung 4.11:** UV-Chromatogramme der nano-LC-MS/MS Analysen der SCX Fraktionen 1 - 5. Die variierende Peptidmenge schlägt sich in den unterschiedlichen UV-Absorptionen nieder.

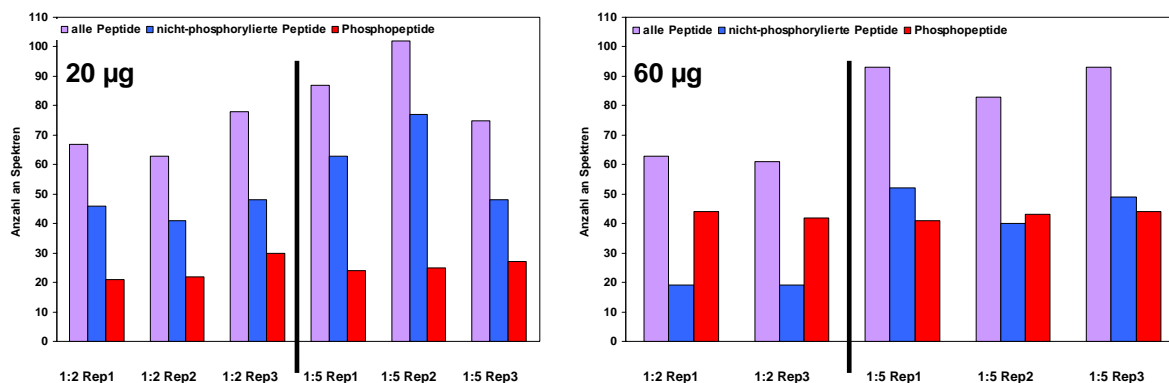
Da die Analysen von potentiell Phosphopeptid-angereicherten SCX Fraktionen mittels nano-LC-MS/MS nur zu wenigen signifikant identifizierten Phosphopeptiden führten, wurden die SCX Fraktionen nach Entsalzung zusätzlich mittels  $\text{TiO}_2$ -Tips angereichert und anschließend erneut auf der LTQ-Orbitrap Velos gemessen. Die

Ergebnisse der SCX- beziehungsweise der SCX- und TiO<sub>2</sub>-Anreicherung befinden sich in Tabelle 4.6.

#### 4.4.3.3 Titandioxid

Die Anreicherung von Phosphopeptiden aus *highly pure* Mitochondrienpräzipitat mittels TiO<sub>2</sub> (siehe Abschnitte 3.6.2 und 3.11.3) erfolgte im „Batch-Verfahren“, wobei entsprechend zu Li et al. [172] verschiedene Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnisse von 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 getestet wurden. Die Auswertung erfolgte durch sogenanntes *spectral counting* anhand der Anzahl der gemessenen MS/MS-Spektren der (Phospho-)Peptide, die in etwa mit der Menge an Protein in der Probe korreliert. Da erste Versuche ein Bead-Optimum bei 1:2 bis 1:5 ergaben (Daten der Vorversuche hier nicht gezeigt), wurden für die weiteren Experimente lediglich diese beiden Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnisse gewählt.

Ein weiterer Vergleich der beiden Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnisse 1:2 und 1:5 hinsichtlich der Anzahl an detektierten Phosphopeptid-Spektren unter Verwendung von 20 beziehungsweise 60 µg Mitochondrienpräzipitat zeigt keine eindeutige Präferenz (siehe Abb. 4.12). Bei der 60 µg Probe scheint jedoch das 1:2-Verhältnis eher die gewünschten Ergebnisse zu bringen, da nur noch 1/3 der gemessenen Peptide nicht phosphoryliert (blauer Balken) sind. Mit steigender Proteinmenge nimmt zudem die Anzahl an Phosphopeptiden (roter Balken) zu, während der Anteil an nicht-phosphorylierten Peptiden von 2/3 auf 1/3 (Verhältnis 1:2) beziehungsweise von 64 - 75% auf circa 50% (Verhältnis 1:5) sinkt. Die Varianz zwischen den Replikaten des 1:2 beziehungsweise 1:5 Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnisses lässt sich auf die manuelle Handhabung zurückführen, da im „Batch-Verfahren“ die TiO<sub>2</sub>-Beads sehr leicht aufgewirbelt und z.B. mit dem Überstand verworfen werden können.



**Abbildung 4.12:** Anzahl an gemessenen MS/MS-Spektren der (Phospho-)Peptide bei einem Probe- zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnis von 1:2 beziehungsweise 1:5 unter Verwendung von 20 µg (links) und 60 µg (rechts) *highly pure* Mitochondrienpräzipitat.

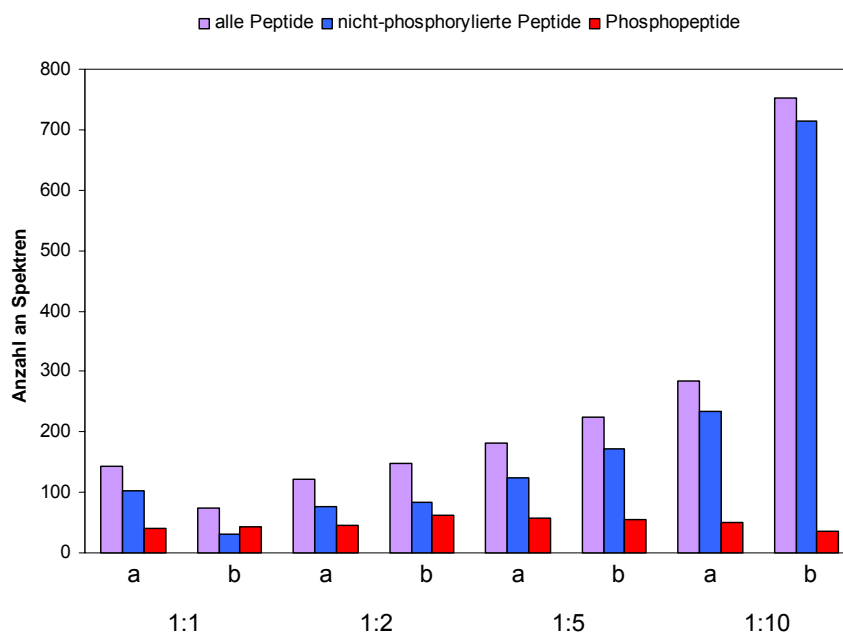
Da sowohl nach SCX-, nach kombinierter SCX- und TiO<sub>2</sub>-Anreicherung als auch nach TiO<sub>2</sub>-Anreicherung alleine nur wenige Phosphopeptide gefunden werden konnten, wurden die verschiedenen mgf-Files zu einem einzigen mgf-File zusammengeführt und gemeinsam einer Mascot-Suche unterzogen, deren Ergebnis in Tabelle 4.6 zusammengefasst ist.

**Tabelle 4.6:** Mittels SCX-, SCX- und nachfolgender TiO<sub>2</sub>-Anreicherung oder mittels TiO<sub>2</sub>-Anreicherung in Hefemitochondrien detektierte Phosphopeptide. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet. Zudem ist die Position der phosphorylierten Aminosäure sowohl in der Peptid- als auch in der Proteinsequenz angegeben. Grau unterlegte ORFs stehen für laut SGD in der OM lokalisierte Proteine.

ORF	Sequenz	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein
YAL010C	R.GFQESLpSDDEK.N	S 7	S 457
YBR054W	K.KAQEEEEEDVATDpSE.-	S 13	S 343
YER026C	R.DENDGYApSDEVGGTLpSR.R	S 8, S 16	S 34, S 42
YFL005W	K.EGNISINpSGSGNSSK.S	S 8	S 204
YGR086C	K.YKDPQpSPK.I	S 6	S 163
YIL155C	R.NPSGLPDpSPLNDNSK.I	S 8	S 304
YKL187C	R.TELpSHPDVTPK.D	S 4	S 729
YNR002C	R.HSQEpSICK.I	S 5	S 40
YNR002C	K.ALDSSERGEFipSENNDQSR.H	S 11	S 28
YOL109W	K.NEApTPEAEQVK.K	T 4	T 49
YOL109W	K.EQAEApSIDNLK.N	S 6	S 40
YOL109W	K.LEETKEpSLQNK.G	S 7	S 25
YOL109W	K.NEApTPEAEQVKK.E	T 4	T 49
YPL186C	K.GLDNLpSEGNDNDNTR.V	S 6	S 205

#### 4.4.4 Anreicherung von Phosphopeptiden aus Mausmitochondrien mittels $\text{TiO}_2$

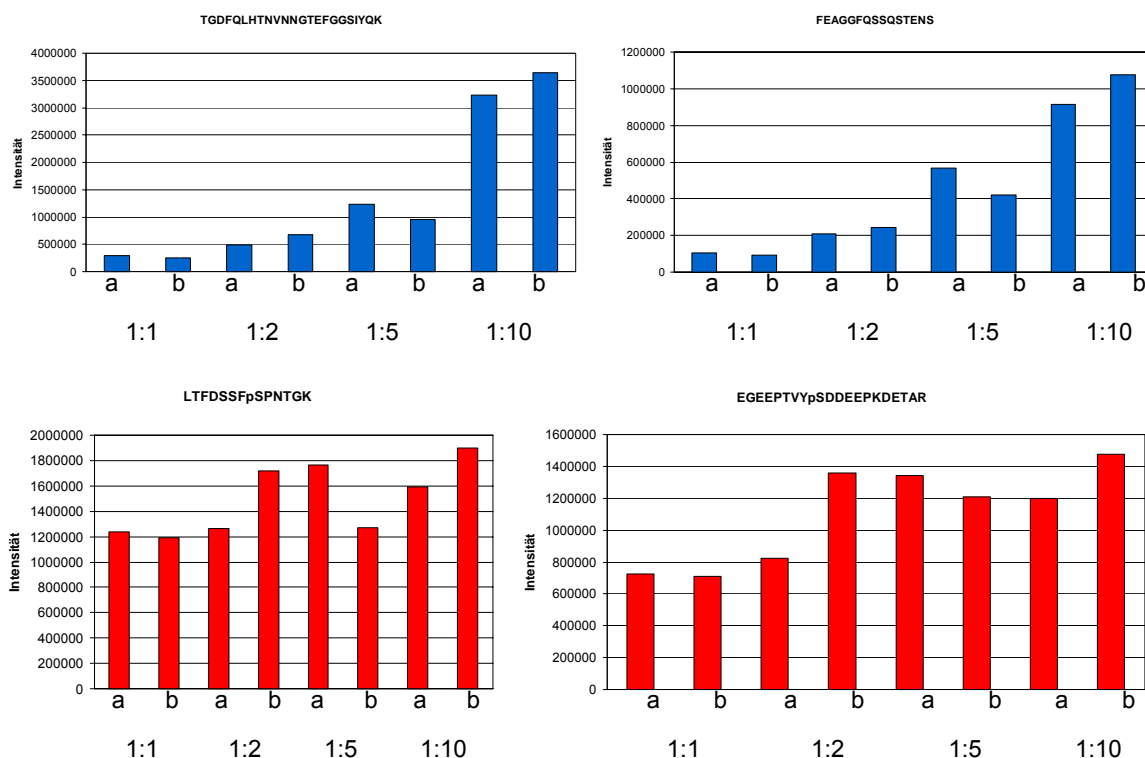
Bevor Phosphopeptide aus Mausmitochondrien der verschiedenen Organe (Gehirn, Herz, Leber und Niere) mittels  $\text{TiO}_2$ -„Batch-Verfahren“ (siehe Abschnitt 3.11.3) angereichert wurden, erfolgte anhand von Mausmitochondrien aus der Niere eine Optimierung der Methode. Wie bereits bei den Hefemitochondrien wurden als erstes verschiedene Probe-zu- $\text{TiO}_2$ -Bead Verhältnisse von 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 getestet und durch *spectral counting* (siehe Abschnitt 4.4.3.3) ausgewertet. In Abbildung 4.13 sind für jedes Probe-zu- $\text{TiO}_2$ -Bead Verhältnis zwei Replikate (a und b) dargestellt. Mit steigender Menge an  $\text{TiO}_2$ -Beads scheint auch die Anzahl der nicht-phosphorylierten Peptide (blaue Balken) zu zunehmen, während die Ausbeute an Phosphopeptiden (rote Balken) bei einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 ein Optimum erreicht. Unterschiede zwischen den Replikaten a und b (Abb. 4.13 und 4.14) sind wahrscheinlich auf eine leicht variierte Probenbearbeitung zurückzuführen. Da die  $\text{TiO}_2$ -Bead trotz Zentrifugation leicht aufzuwirbeln sind, kann es während der manuellen Handhabung zum Verlust von Beads und somit zum potentiellen Verlust von Phosphopeptiden kommen. Zum anderen ist die Varianz möglicherweise auf die Messreihenfolge (b nach a) zurückzuführen.



**Abbildung 4.13:** Anzahl an gemessenen MS/MS-Spektren der (Phospho-)Peptide bei einem Probe-zu- $\text{TiO}_2$ -Bead Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 unter Verwendung von 100  $\mu\text{g}$  Mausmitochondrien aus der Niere.

Eine Betrachtung der Intensitäten einzelner nicht-phosphorylierter (blau, Abb. 4.14 oben) beziehungsweise phosphorylierter Peptide (rot, Abb. 4.14 unten) der verschiedenen Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnisse zeigt, dass mit steigender Menge an TiO<sub>2</sub>-Beads die Intensität der nicht-phosphorylierten Peptide zunimmt, während die Intensität der Phosphopeptide bei einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 ein Maximum erreicht. Obwohl die Phosphopeptide bei einem Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnis von 1:10 ebenfalls einen maximalen Intensitätswert erreichen, ist dieses Verhältnis insgesamt ungünstiger, da die nicht-phosphorylierten Peptide in diesem Bereich auch ihre höchste Intensität aufweisen.

Für die weiteren Optimierungsschritte wurden also die beiden Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnisse von 1:2 und 1:5 gewählt, da hier sowohl eine große Ausbeute als auch eine hohe Intensität der Phosphopeptide gewährleistet zu sein scheint.

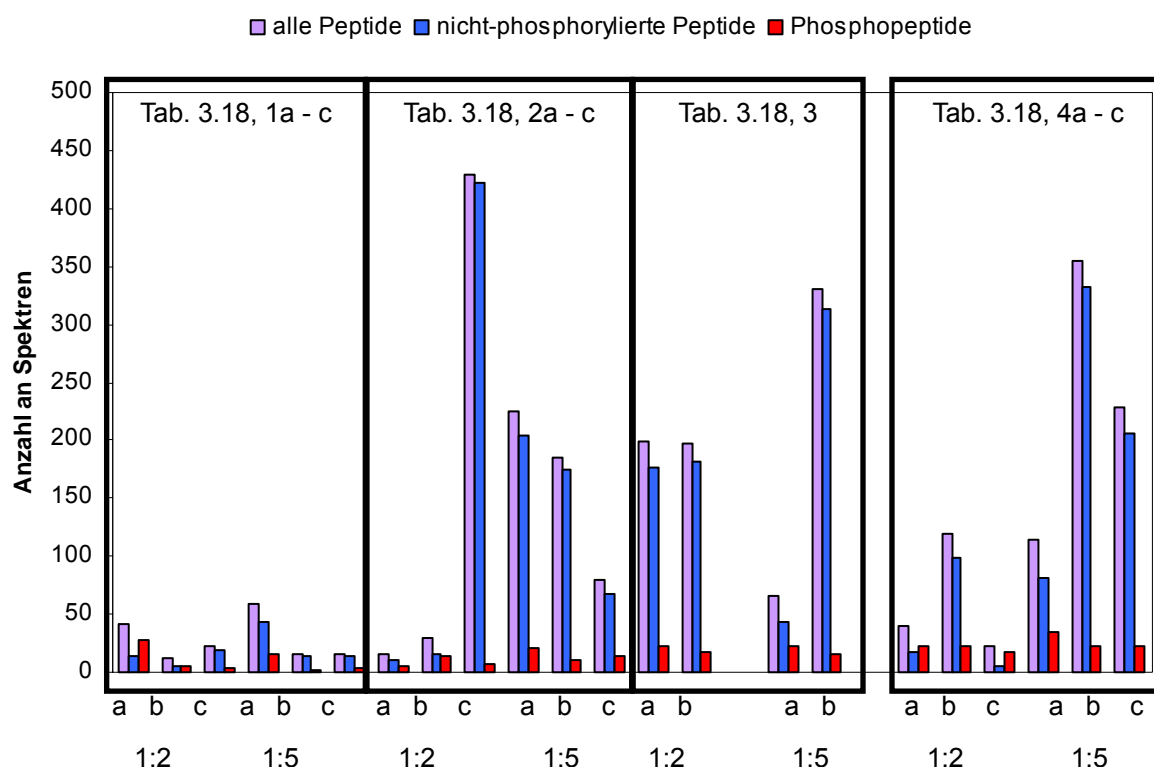


**Abbildung 4.14:** Intensitäten einzelner nicht-phosphorylierter (oben) beziehungsweise phosphorylierter Peptide (unten) bei einem Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10. Die phosphorylierte Aminosäure ist in der Sequenz durch ein vorangestelltes p markiert.

Neben den Bindefähigkeiten des TiO<sub>2</sub>-Materials spielt auch die Effizienz der Elution bei der Optimierung der TiO<sub>2</sub>-Anreicherung eine Rolle. Daher wurden mit den oben



definierten Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnissen unterschiedliche Elutionsmethoden (siehe Abschnitt 3.11.3, Tab. 3.18) auf ihre Qualitäten getestet. Wie sich aus Abbildung 4.15 entnehmen lässt, wird durch die Zugabe von Acetonitril zu den Puffern (Tab. 3.18, 4a - c) die Elutionsfähigkeit im Vergleich zum Standardprotokoll (Tab. 3.18, 1a - c) eventuell etwas erhöht, während bei den übrigen Puffern (Tab. 3.18, 2a - c und 3) keine verbesserte Elution zu verzeichnen ist. Allerdings lassen sich aufgrund der hohen Varianz der verschiedenen Replikate keine konkreten Aussagen treffen. Da bei den neuen Elutionsmethoden im Vergleich zur ursprünglichen Methode ein ungünstigeres Phosphopeptid (rote Balken) zu nicht-phosphoryliertem Peptid (blaue Balken) Verhältnis vorliegt und zudem bei einer Acetonitril-Elution dieses vor einer Messung erst mittels Einengen in der SpeedVac entfernt werden müsste, wurde für die weiteren Experimente das Ausgangsprotokoll verwendet.



**Abbildung 4.15:** Anzahl an gemessenen MS/MS-Spektren der (Phospho-)Peptide bei einem Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnis von 1:2 und 1:5 unter Verwendung von 20 µg Mausmitochondrien aus der Niere und unterschiedlichen Elutionsmethoden (siehe Kapitel 3.11.3, Tab. 3.20).

Für die Phosphopeptidanreicherung aus Mausmitochondrien zum Vergleich von Gehirn, Herz, Leber und Niere wurde unter Verwendung des Standardprotokolls ein

Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnis von 1:5 und je 40 µg Protein eingesetzt. Tabelle 4.7 fasst die während der Optimierung mit Mausmitochondrien aus der Niere sowie die aus Mitochondrien der anderen drei Organe detektierten Phosphopeptide zusammen. In der Niere wurden mit einer Anzahl von 40 die meisten Phosphopeptiden gefunden, gefolgt von Herz und Leber mit 20 beziehungsweise 19 Phosphopeptiden. Im Gehirn konnten 13 phosphorylierte Peptide detektiert werden. Lediglich die drei Phosphopeptide K.IEDVGpSDEEDDSGKDK.K (Hsp90ab1), R.YGMGTpSVVER.A (Pdha1) und M.\*AAVAAGAGEPLpSPEELLPK.A (Tom22) finden sich in allen Organen wieder.

**Tabelle 4.7:** In Mausmitochondrien von Gehirn, Herz, Leber und Niere detektierte Phosphopeptide aufgeschlüsselt nach dem jeweiligen Organ. Angegeben sind die Accessions der IPI-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. M(Ox) steht für oxidierte Methionine und \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem ist die Position der phosphorylierten Aminosäure sowohl in der Peptid- als auch in der Proteinsequenz angegeben. Orange unterlegte Accessions stehen für laut IPI mitochondrial aber auch anderweitig lokalisierte Proteine.

Accession	Sequenz	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein	Gehirn	Herz	Leber	Niere
IPI00112549	K.IIVIMDpSYGSDLVER.G	S 7	S 230		x		
IPI00112963	R.TPEELDDpSDFETEDFDVR.S	S 8	S 641				x
IPI00113141	R.EGSpSIGAIDSR.L	S4	S 226				x
IPI00114209	K.IIAEGANGTpTPEADK.I	T 11	T 410			x	
IPI00114209	K.NLNHVpSYGR.L	S 6	S 450				x
IPI00114710	R.SpSSAPVASPNVR.R	S 2	S 21				x
IPI00115040	K.NSTLpSEEDYIER.R	S 5	S 88		x	x	
IPI00115094	R.p(ST)SATDTHHVELAR.E	S 1 / T 2	S 31/ T31				x
IPI00115506	R.pSESSGNLPSVADTR.S	S 1	S 101		x		
IPI00115564	K.DFLAGGIAAAVpSK.T	S 12	S 22		x		
IPI00115564	M.*GDQALpSFLKDFLAGGIAAAVSK.T	S 6	S 7		x		
IPI00115564	M.*GDQALSFLKDFLAGGIAAAVpSK.T	S 21	S 22		x		
IPI00115564	R.AApYFGVYDTAK.G	Y 3	Y 191		x		
IPI00115598	R.LLGSPGpSEDGAPR.G	S 7	S 58			x	
IPI00117689	K.LPAKLpSVSK.S	S 6	S 169		x		
IPI00117689	R.ATEEPSGTGpSDELIK.S	S 10	S 42		x		
IPI00119114	R.IFpSSEHDIFR.E	S 3	S 54				x
IPI00119138	K.AVAQGNLp(SS)ADVQAAK.N	S 8 / S 9	S 367 / S 368				x
IPI00121322	R.NLpSIYDGPEQR.F	S 3	S 550			x	
IPI00122547	K.LTFDITpSPNTGK.K	S 8	S 116	x			x
IPI00122549	K.LTFDSSpSPNTGK.K	S 8	S 117		x	x	x
IPI00122549	K.LTFDSSpSPNTGKK.N	S 8	S 117		x		x
IPI00124212	R.GLpSLTETELEELR.A	S 3	S 100	x			

Accession	Sequenz	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein	Gehirn	Herz	Leber	Niere
IPI00125960	R.SRpTApSGSSVTSLEGTR.S	T 3, S 5	T 328, S 330				x
IPI00125960	R.TApSGSSVTSLEGTR.S	S 3	S 330				x
IPI00127276	K.GQGLTGPSLPPGpTPTR.K	T 13	T 543			x	
IPI00127276	R.KGQGLTGPSLPPGpTPTR.K	T 14	T 543				x
IPI00127841	K.DFLAGGVAAAlpSK.T	S 12	S 22	x		x	x
IPI00127841	K.LLLQVQHApSK.Q	S 9	S 42				x
IPI00128296	R.GTGGVDTAATGpSVFDISNLDR.L	S 12	S 366	x			
IPI00130280	K.TGTAEMSpSILEER.I	S 8	S 53			x	x
IPI00130280	R.ILGADTpSVDLEETGR.V	S 7	S 65		x		x
IPI00130280	R.VLpSIGDGIAR.V	S 3	S 76				x
IPI00132478	K.EADEEDpSDEETSYPER.S	S 7	S 106			x	x
IPI00153266	R.SVpSCLKPVIpVGTK.L	S 3	S 217				x
IPI00169862	R.YTDQpSGEEEEEDYESEEQLQHR.I	S 5	S 81		x	x	x
IPI00221564	R.ISLpSTLDLpSK.L	S 4	S 109				x
IPI00223818	R.AApSAAGASPAATPAAPESGTIPK.K	S 3	S 78			x	
IPI00228150	R.YpSTSSSSGLTAGK.I	S 2	S 34				x
IPI00229080	K.IEDVGpSDEEDDSGK.D	S 6	S 255	x		x	x
IPI00229080	K.IEDVGpSDEEDDSGKDK.K	S 6	S 255	x	x	x	x
IPI00229080	R.EKEIpSDDEAEEEEK.G	S 5	S 226			x	x
IPI00230540	K.LTFDSSpSPNTGKK.N	S 8	S 104	x			
IPI00261627	K.INFDpSNSAYR.Q	S 5	S 279				x
IPI00283611	K.FTTpSDVAAIETDKEGVQNAK.E	S 4	S 393	x			
IPI00313475	R.ThpSDQFLVpSFK.D	S 3	S 146				x
IPI00315135	M.*AAVAAAGAGEpLpSPEELLpK.A	S 14	S 15	x	x	x	x
IPI00330523	R.FSSQEAASpSFGDDR.L	S 9	S 248				x
IPI00331555	R.IGHpSTSDSSAYR.S	S 5	S 338			x	x
IPI00331555	R.pSVDEVNYWpDK.Q	S 1	S 348		x		x
IPI00337893	R.YMGpTpsVER.A	S 6	S 232	x	x	x	x
IPI00337893	R.YHGpSM(Ox)SDPGVpSYR.T	S 5, S 12	S 293, S 300				x
IPI00337893	R.YHGpSM(Ox)SDPGVSYR.T	S 5	S 293				x
IPI00337893	R.YHGpSMpSDPGVSYR.T	S 7	S 295				x
IPI00344626	R.SDEEDepSDFGEEQR.D	S 8	S 694			x	
IPI00415403	R.ESSRVpSFEDQAPTME.-	S 6	S 594	x			
IPI00420734	R.NDSIVp(TPS)PPQAR.V	T 6 / S 8	T 149 / S 151	x			
IPI00459487	K.SSGLpITpSAVDLEDAK.K	S 8	S 415				x
IPI00624653	M.AGAepSDGQFQFTGIK.K	S 5	S 6		x		
IPI00662028	M.*SpTENVEGKPNLGER.G	T 3	T 2				x
IPI00751137	R.ApSPALGSGHHDGSGDSLEM(Ox)SSLDR.A	S 2	S 94		x		
IPI00757909	R.pSAEDLTpDGSYDDILNAEQLK.K	S 1	S 43	x			
IPI00857439	R.ILGADTpSVDLEETGR.V	S 7	S 15				x
IPI00874456	K.IDVSVEAApSGGK.A	S 9	S 297				x
IPI00884460	R.STLNPQWNEpSFTFK.L	S 10	S 226		x		
IPI00884460	R.STLNPQWNEpSFTFK.L	S 10	S 226			x	

4.4.5 Anreicherung von Phosphopeptiden aus humanen Mitochondrien mittels TiO<sub>2</sub>

Für die Anreicherung von Phosphopeptiden aus humanen Mitochondrien wurde ebenfalls das Standardprotokoll des „Batch-Verfahrens“ (siehe Abschnitt 3.11.3, Tab. 3.18) verwendet. Neben einem Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnis von 1:5 wurde jedoch auch ein Verhältnis von 1:100 eingesetzt, da sich ein Verhältnis von 1:5 aufgrund der wesentlich komplexeren Probe im Vergleich zu den Hefe- und Mausmitochondrien als wahrscheinlich nicht ausreichend erwies. Die Ergebnisse dieser beiden Anreicherungen sind in Tabelle 4.8 verzeichnet. Die meisten Phosphopeptide lassen sich mit beiden Methoden detektieren, jedoch finden sich bei einem Verhältnis von 1:100 noch einige zusätzliche Phosphorylierungsstellen.

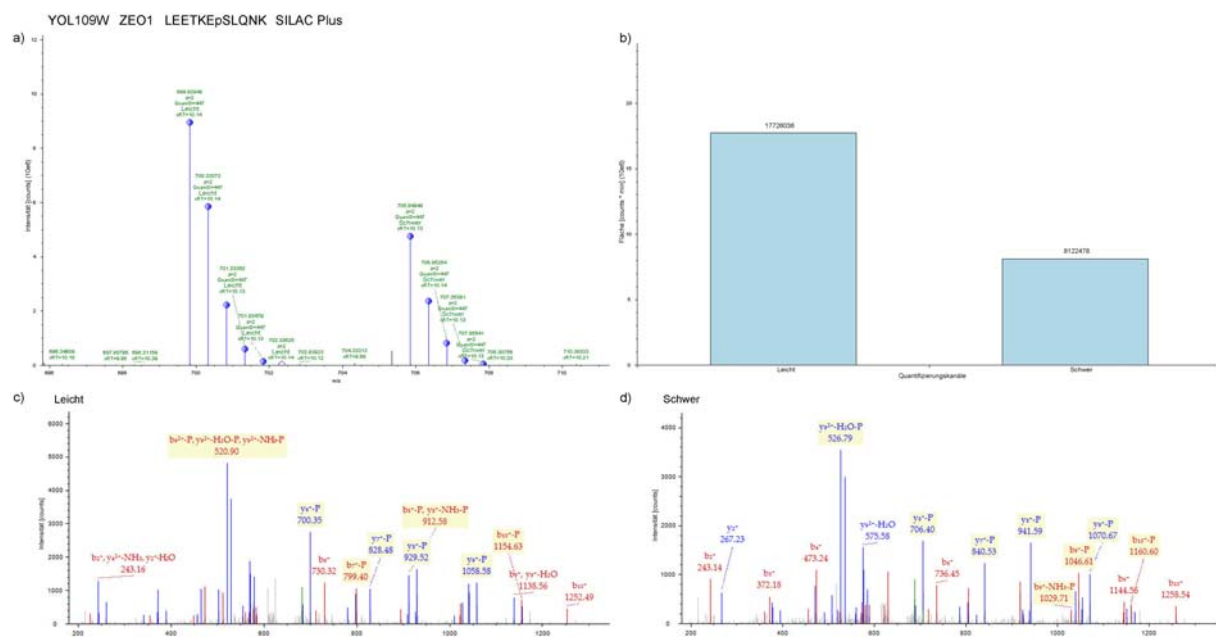
**Tabelle 4.8:** In humanen Mitochondrien mittels TiO<sub>2</sub> mit unterschiedlichen Probe-zu-TiO<sub>2</sub>-Bead Verhältnissen detektierte Phosphopeptide. Angegeben sind die Accessions der Swissprot-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. M(Ox) steht für oxidierte Methionine und \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem ist die Position der phosphorylierten Aminosäure sowohl in der Peptid- als auch in der Proteinsequenz angegeben.

Accession	Sequenz	* = N-terminal acetyliert	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein	TiO <sub>2</sub> 1:5	TiO <sub>2</sub> 1:100
O60238	R.DHSpSQSEEEVVEGEK.E		S 4	S 118	x	
O94826	R.ApSPAPGSGHPEGPGAHLDMNSLDR.A		S 2	S 91		x
P08559	R.YHGHpSMSDPGVSYR.T		S 5	S 293		x
P10809	R.TVIEQSWGpSPK.V		S 10	S 70		x
P21796	K.LTFDSSFpSPNTGK.K		S 8	S 104	x	x
P21796	K.LTFDSSFpSPNTGKK.N		S 8	S 104	x	x
P45880	K.LTFDFFFpSPNTGK.K		S 8	S 115	x	x
P45880	K.LTFDFFFpSPNTGKK.S		S 8	S 115	x	x
P82909	K.GSKpSPDLLM(Ox)YQGPPDTAEIHK.T		S 4	S 61		x
Q15390	R.QlpSLPDLSEQEEPQLK.T		S 3	S 119	x	
Q7Z434	R.GPVpSPSVSFQPLAR.S		S 4	S 222	x	x
Q8IYB8	K.ATEPPpSPDAGELSLASR.L		S 6	S 725		x
Q92667	K.VVSpTPPSVTEPEK.E		T 4	T 70		x
Q96DA6	R.EAALILGVp(SPT)ANK.G		S 9 / T 11	S 70 / T 72		x
Q96DA6	R.EAALILGVpSPTANK.G		S 9	S 70		x
Q96TC7	R.SQpSLPNSLDYTQTSDPGR.H		S 3	S 46	x	x
Q9NS69	M.*AAVAAGAGEPQpSPDELLPK.G		S 14	S 15	x	x
Q9NX63	R.YpSGAYGASVSDEELK.R		S 2	S 50	x	x
Q9NX63	R.YpSGAYGASVSDEELKR.R		S 2	S 50		x
Q9NX63	K.SQRYpSGAYGASVSDEELK.R		S 5	S 50		x
Q9Y2S7	R.IFSLSGpTLETVR.G		T 7	T 292		x

## 4.5 Differentielle Phosphorylierungsanalytik

### 4.5.1 Stable Isotope Labeling of Amino Acids in Cell Culture (SILAC)

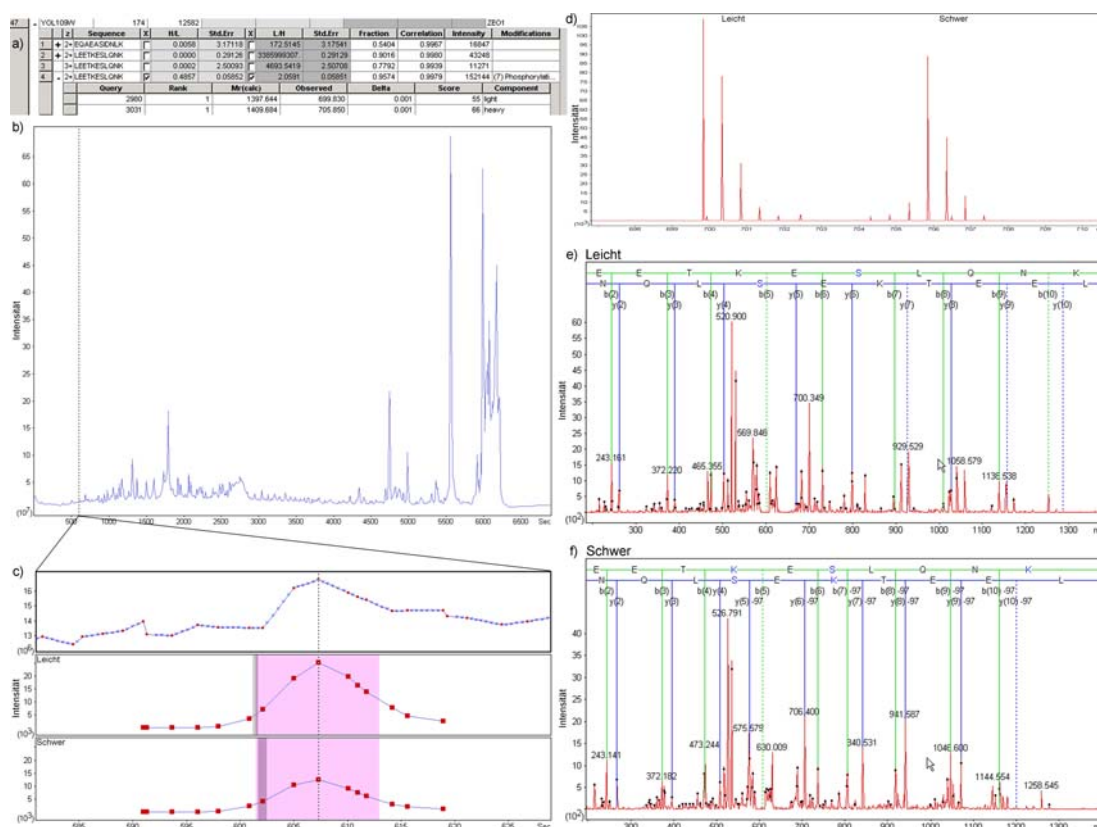
Für die differentielle Phosphorylierungsanalytik der SILAC-Proben wurden diese über IEF und  $\text{TiO}_2$ , SCX und  $\text{TiO}_2$  oder über  $\text{TiO}_2$  angereichert, auf der LTQ-Orbitrap Velos gemessen und anschließend mittels Proteome Discoverer (PD), Mascot Distiller (Distiller) und MaxQuant (MQ) [193-194] ausgewertet und mit den Ergebnissen der SILAC-Proben auf Proteinebene (siehe Abschnitt 4.3, Anhang 10.4 und 10.5) verglichen. Bei Proteome Discoverer wurden die Rohdaten-Files des Massenspektrometers in hochwertige Peaklisten umgewandelt, die anschließend direkt einer Mascot und einer Sequest Suche unterzogen sowie quantifiziert wurden (exemplarisches Beispiel siehe Abbildung 4.16). Die Falsch-Positiv-Rate (*False Discovery Rate, FDR*) betrug 1% beziehungsweise 5%. Weitere Programmeinstellungen befinden sich im Anhang 10.1.1.



**Abbildung 4.16:** Proteome Discoverer Auswertung einer SILAC + Probe nach  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung am Beispiel des Proteins YOL109W Zeo1 (Phosphopeptid LEETKEpSLQNK). a) Isotopenmuster des leichten und des schweren Phosphopeptides LEETKEpSLQNK, die kalkultierten Peakflächen der beiden Quantifizierungskanäle (b) sowie deren Fragmentspektren (c und d)

Mascot Distiller wandelt ebenfalls die Rohdaten in hochwertige Peaklisten um (siehe Prozessierungseinstellungen Anhang 10.1.2), die anschließend gespeichert oder direkt einer Mascot Suche unterzogen werden können. Die Suche der SILAC-Files

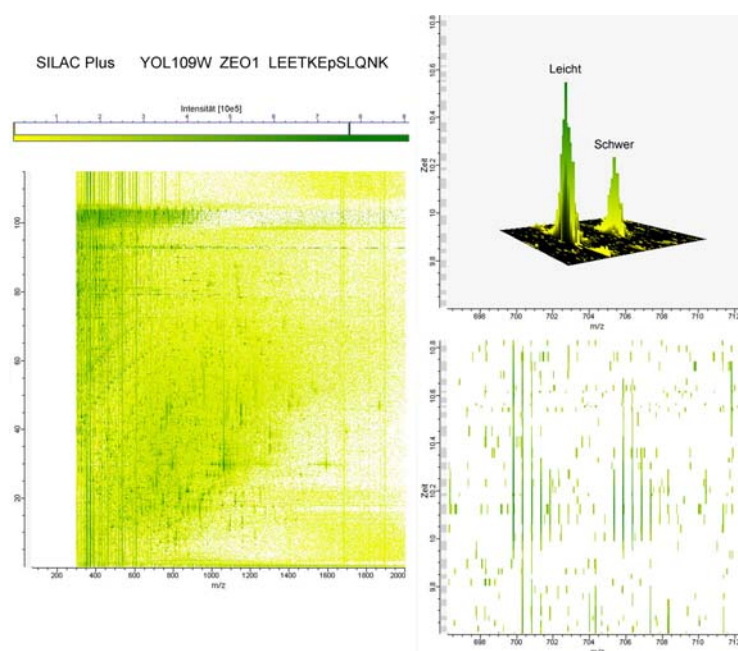
wurde gegen die SGD Datenbank (Januar 2010 [Release 63], 6717 Sequenzen) mit den Massentoleranzen von 10 ppm für MS und 0,5 Da für MS/MS durchgeführt. Die übrigen gewählten Such- beziehungsweise die Quantifizierungsparameter befinden sich ebenfalls im Anhang. Mit der zugehörigen *Quantitation Toolbox* wurden die Suchergebnisse anschließend in den Distiller re-importiert und quantifiziert. Ein exemplarisches Beispiel der Mascot Distiller Auswertung ist in der folgenden Abbildung 4.17 dargestellt.



**Abbildung 4.17:** Mascot Distiller Auswertung einer SILAC + Probe nach  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung am Beispiel des Proteins YOL109W Zeo1 (Phosphopeptid LEETKEpSLQNK). a) Ausschnitt des Proteins Zeo1 aus der Quantifizierungstabelle des LC-MS-Laufes. b) Das Totalionen Chromatogramm (TIC) stellt die Signalintensität aller detektierten Ionen über den zeitlichen Verlauf des Gradienten dar. c) Vergrößerter Ausschnitt des Chromatograms; dargestellt sind die einzelnen Messpunkte (rote Punkte) und der zum Quantifizieren gewählte Messbereich der leichten beziehungsweise schweren Peptidpeaks (rosa markierter Bereich). d) Isotopenmuster des leichten und des schweren Phosphopeptides LEETKEpSLQNK sowie deren Fragmentspektren (e und f).

Im Massenspektrometer werden als Messsignal zweidimensionale Kurven (Peaks) erzeugt, in denen die Masse gegen die Häufigkeit der Peptide aufgetragen werden.

Für das gleiche Peptid können dabei mehrere Peaks entstehen, da die Messdaten zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfasst werden. MaxQuant kann aus diesen zweidimensionalen Kurven einen dreidimensionalen Peak berechnen und detektiert somit die Peaks, Isotopencluster und SILAC-Peptidpaare als Objekte im dreidimensionalen Raum bestehend aus den Achsen  $m/z$ , Elutionszeit und Signalintensität [193] (siehe Abb. 4.18). Zur Rohdaten-Prozessierung erfolgte bei MaxQuant die Peakdetektion durch die Gauß-Verteilung zu den drei zentralen Rohdatenpunkten [193]. Die Massenspektren wurden mittels des in MaxQuant (Version 1.1.1.25) integrierten Suchalgorithmus Andromeda [195] analysiert, wobei eine Suche gegen die SGD Datenbank (Januar 2010 [Release 63], 6717 Sequenzen) mit einer *False Discovery Rate* von 1% auf Protein- und Peptidebene durchgeführt wurde (siehe Anhang 10.1.3).



**Abbildung 4.18:** MaxQuant Auswertung einer SILAC + Probe nach  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung am Beispiel des Proteins YOL109W Zeo1 (Phosphopeptid LEETKEpSLQNK). Links im Bild befindet sich der Überblick über die  $m/z$ -Retentionszeit-Mappe des gesamten LC-MS-Laufes. Die Intensität der Peptide ist dabei farbkodiert und nimmt von grün über gelb zu weiß ab. In der vergrößerten Ansicht des  $m/z$ -Bereiches von 696 bis 712 und der zugehörigen Retentionszeit von Minute 9,6 bis 10,8 sind die Isotopenmuster des leichten und des schweren Peaks des Peptides LEETKEpSLQNK (rechts unten) sowie deren dreidimensionale Peakdarstellung (rechts oben) zu erkennen.

#### 4.5.1.1 Isoelektrische Fokussierung

Die beiden Proben der isoelektrischen Fokussierung auf Proteinebene (siehe Abschnitt 3.9) wurden vor der anschließenden TiO<sub>2</sub>-Anreicherung getrennt verdaut und entsalzt. Die detektierten Phosphopeptide der - Probe (CK2 WT & ts bei 24°C) und der + Probe (CK2 WT & ts bei 37°C) sowie deren Regulation auf Peptid- und Proteinebene befinden sich in Tabelle 4.9. Phosphorylierungsstellen, die laut Auswertung dieselbe Regulation aufweisen wie das dazugehörige Protein (z.B. beide „hoch“), sind somit insgesamt weder hoch noch runter reguliert. Phosphorylierungsstellen, die laut Auswertung keine Regulation aufweisen, deren Protein jedoch hoch reguliert ist, sind folglich runter reguliert worden - ist das Protein runter reguliert, wurde die Phosphorylierungsstelle hoch reguliert. Eine Hochregulation ist in dieser sowie in folgenden Tabellen rosa markiert, eine Runterregulation blau.

Um eine schlüssige Aussage bezüglich einer Hoch- beziehungsweise Runterregulation treffen zu können, gilt es jedoch zu beachten, dass die Probentrennung mittels IEF oder SCX (siehe 4.5.1.2), die anschließende TiO<sub>2</sub>-Anreicherung von phosphorylierten Spezies sowie die nachfolgende MS-Analyse zu Ungunsten von phosphorylierten Spezies ablaufen. Zudem spielt das verwendete Auswerteprogramm eine entscheidende Rolle, da dieses anhand vordefinierter Kriterien die Protein- und Peptididentifikation ermöglicht beziehungsweise gegebenenfalls eine zugehörige Regulation anzeigt. Bezüglich Anzahl gefundener Proteine und Phosphopeptide als auch der potentiellen Regulation zeigen sich Unterschiede zwischen den drei Auswerteprogrammen Proteome Discoverer, Mascot Distiller und MaxQuant.



**Tabelle 4.9:** Nach IEF und TiO<sub>2</sub>-Anreicherung in den SILAC-Proben detektierte Phosphopeptide. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem sind die Position der phosphorylierten Aminosäure in der Peptidsequenz sowie die Regulation auf Protein- und Peptidebene, sortiert nach dem jeweiligen Auswerteprogramm, angegeben.

<b>SILAC - (24°C)</b>								
ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation Protein			Regulation P-Stelle		
			PD	Distiller	MQ	PD	Distiller	MQ
YNR002C	*pSDREQSSGNTAFENPK	S 1	hoch	hoch	hoch	-----	keine = runter	-----
YNR002C	*SDREQSpSGNTAFENPK	S 7	hoch	hoch	hoch	-----	keine = runter	-----
YNR002C	ALDp(SS)EGEFISENNDQSR	S 4/S 5	hoch	hoch	hoch	keine = runter	hoch = keine	-----
YDR384C	Tp(SS)ASSPQDLEK	S 2/S 3	keine	hoch	hoch	hoch	hoch = keine	hoch = keine
YMR212C	DNQlpSTSDLLSDSQVR	S 5	keine	----	keine	runter	keine	-----
YBR269C	NDIGSFpSPEFSK	S 7	keine	keine	----	-----	keine	hoch
YLR259C	QIIENAGEEGpSVIIGk	S 11	keine	keine	keine	runter	keine	keine
YKL217W	*SSpSITDEKISGEQQPAGR	S 3	keine	keine	keine	-----	hoch	-----
YNL055C	NELITSLpTPGVAK	T 8	keine	----	keine	-----	hoch	-----
YPL186C	GLDNLpSEGNDNDNTR	S 6	----	----	----	runter	runter	-----
YOL109W	EQAEApSIDNLK	S 6	keine	----	keine	hoch	hoch	keine
YOL109W	EQAEApSIDNLKNEApTPEAEQVK	S 6, T 15	keine	----	keine	hoch	keine	-----
YOL109W	EQAEASIDNLKNEApTPEAEQVK	T 15	keine	----	keine	hoch	keine	-----
YOL109W	LEETKEpSLQNK	S 7	keine	----	keine	hoch	hoch	hoch
YOL109W	NEApTPEAEQVK	T 4	keine	----	keine	hoch	keine	-----
YOL109W	NEApTPEAEQVKK	T 4	keine	----	keine	hoch	hoch	keine
<b>SILAC + (37°C)</b>								
ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation Protein			Regulation P-Stelle		
			PD	Distiller	MQ	PD	Distiller	MQ
YCR010C	IYpTGGDNNEYIYIGR	T 3	----	runter	----	keine	keine = hoch	----
YNR002C	ALDp(SS)EGEFISENNDQSR	S 4 / S 5	hoch	keine	hoch	keine = runter	keine	-----
YNR002C	*pSDREQSSGNTAFENPK	S 1	hoch	keine	hoch	----	runter	-----
YDR384C	TSpSASSPQDLEK	S 3	keine	runter	hoch	hoch	hoch	hoch = keine
YLR259C	QIIENAGEEGpSVIIGK	S 11	runter	runter	keine	----	runter = keine	runter
YAL010C	GFQESLpSDDEK	S 7	keine	----	----	hoch	----	-----
YDR150W	WNCVpSNEELQAEVK		keine	----	hoch	hoch	hoch	hoch = keine
YGR178C	VADSGVSDpSVDDLAK	S 9	keine	----	keine	hoch	hoch	hoch
YGR178C	ALEDDSApSWDQFVNEK	S 8	keine	----	keine	hoch	hoch	-----
YER178W	YGGHpSMSDPGTTYR	S 5	keine	keine	keine	runter	runter	-----
YGR253C	EKEAAEpSPEEADVEMS	S 7	----	----	----	hoch	hoch	hoch
YGR082W	GVVGSKAEpSDAVAEANDIDD	S 9	keine	keine	keine	runter	runter	runter
YPL186C	GLDNLpSEGNDNDNTR	S 6	----	----	----	runter	runter	runter

YOL109W	LEETKEpSLQNK	S 7	keine	-----	keine	hoch	hoch	hoch
YOL109W	EQAEApSIDNLK	S 6	keine	-----	keine	runter	keine	keine

#### 4.5.1.2 Kationenaustausch-Chromatographie

Aliquots der - Probe (CK2 WT & ts bei 24°C) und der + Probe (CK2 WT & ts bei 37°C) wurden über SCX (siehe Abschnitt 3.11.1) aufgetrennt und die enthaltenen Phosphopeptide über TiO<sub>2</sub> weiter angereichert. Einen Überblick über die detektierten Phosphopeptide und deren Regulation gibt die nachfolgende Tabelle. Es gelten bezüglich Regulation die unter Abschnitt 4.5.1.1. beschriebenen Regeln.

**Tabelle 4.10:** Nach SCX und TiO<sub>2</sub>-Anreicherung in den SILAC-Proben detektierte Phosphopeptide. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem sind die Position der phosphorylierten Aminosäure in der Peptidsequenz sowie die Regulation auf Protein- und Peptidebene, sortiert nach dem jeweiligen Auswertprogramm, angegeben.

SILAC - (24°C)								
ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation Protein			Regulation P-Stelle		
			PD	Distiller	MQ	PD	Distiller	MQ
YOR374W	VAFTGSpTATGR	T 7	keine	keine	keine	-----	hoch	-----
YNR002C	EQp(SSGNT)AFENPK	S 3/S 4/T 7	hoch	hoch	hoch	keine = runter	keine = runter	keine = runter
YNR002C	HSQEpSICK	S 5	hoch	hoch	hoch	keine = runter	keine = runter	keine = runter
YNR002C	ALDp(SSEGEFISENNDQS)R	S 4/S 5/S 11/S 17	hoch	hoch	hoch	keine = runter	hoch = keine	-----
YDR384C	TSSApSSPQDLEK	S 5	keine	hoch	hoch	-----	keine = runter	keine = runter
YKL217W	IpSGEQQPAGR	S 2	keine	keine	keine	-----	hoch	-----
YAL010C	GFQESLpSDDEK	S 7	keine	-----	-----	nicht eindeutig	hoch	runter
YML013W	ASHsETLPSQR	S 4	-----	-----	-----	runter	-----	-----
YPL186C	GLDNLpSEGNDNDNTR	S 6	-----	-----	-----	runter	runter	-----
SILAC + (37°C)								
ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation Protein			Regulation P-Stelle		
			PD	Distiller	MQ	PD	Distiller	MQ
YNR002C	ALDSSEGEFipSENNDQSR	S 11	hoch	keine	hoch	keine = runter	runter	-----
YPL217C	DEpSDIEEDVDDDFFR	S 3	-----	-----	-----	hoch	hoch	-----
YPR155C	EVAFDpSQQLIQDVR	S 6	keine	keine	keine	-----	runter	-----
YPL186C	GLDNLpSEGNDNDNTR	S 6	-----	-----	-----	-----	runter	-----

YLL040C	LAVLDPpSILGER	S 7	hoch	hoch	keine	----	keine = runter	----
YBR054W	KAQEEEEEDVApTDSE	T 11	runter	----	hoch	hoch	hoch	hoch = keine

#### 4.5.1.3 Titandioxid

Die detektierten Phosphopeptide der SILAC - Probe (CK2 WT & ts bei 24°C) und der SILAC + Probe (CK2 WT & ts bei 37°C) nach TiO<sub>2</sub>-Anreicherung sowie deren Regulation auf Peptid- und Proteinebene befinden sich in Tabelle 4.11. Es gelten bezüglich Regulation die unter Abschnitt 4.5.1.1. beschriebenen Regeln.

**Tabelle 4.11:** Nach TiO<sub>2</sub>-Anreicherung in den SILAC-Proben detektierte Phosphopeptide. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. M(Ox) steht für oxidierte Methionine und \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem sind die Position der phosphorylierten Aminosäure in der Peptidsequenz sowie die Regulation auf Protein- und Peptidebene, sortiert nach dem jeweiligen Auswerteprogramm, angegeben.

SILAC - (24°C)								
ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation Protein			Regulation P-Stelle		
			PD	Distiller	MQ	PD	Distiller	MQ
YCR010C	IYpTGGDNNEYIYIGR	T 3	----	keine	----	runter	keine	-----
YOR374W	AFpSNGSWNGIDPIDR	S 3	keine	keine	keine	-----	runter	-----
YOR374W	EM(Ox)pSVDALQNYLQVK	S 3	keine	keine	keine	hoch	keine	keine
YOR374W	VAFTGSpTATGR	T 7	keine	keine	keine	hoch	hoch	-----
YER069W	RSpSIGEFPSADALR	S 3	runter	runter	runter	keine = hoch	runter = keine	-----
YNR002C	*pSDREQSSGNTAFENPK	S 1	hoch	hoch	hoch	-----	keine = runter	-----
YNR002C	ALDp(SS)EGEFISENNDQSR	S 4 / S 5	hoch	hoch	hoch	keine = runter	hoch = keine	-----
YNR002C	EQpSSGNTAFENPK	S 3	hoch	hoch	hoch	keine = runter	keine = runter	keine = runter
YDR384C	TSpSASSPQDLEK	S 3	keine	hoch	hoch	hoch	hoch = keine	hoch = keine
YNL037C	DIGGSSpSTTDFTEIINK	S 7	keine	keine	keine	-----	runter	keine
YKL217W	*SSSIDEKIpSGEQQPAGR	S 10	keine	keine	keine	-----	hoch	-----
YKL217W	M(Ox)IDSNVpSKTYEEHIETV	S 7	keine	keine	keine	-----	hoch	hoch
YAL010C	GFQESLpSDDEK	S 7	keine	----	----	hoch	hoch	hoch
YJL096W	pSKGDLTILR	S 1	runter	----	keine	-----	runter	-----
YGR086C	APp(TAS)QLQNPPPPSTTK	T 3 / S 5	keine	keine	keine	hoch	hoch	hoch
YNL055C	NELITSLpTPGVAK	T 8	keine	----	keine	hoch	hoch	hoch
YDR233C	TKPYLDKVEpSK	S 10	hoch	----	hoch	-----	hoch	hoch = keine
YNL131W	DDVVQLDEPQFPpSR	S 12	keine	----	keine	-----	hoch	-----

YNL131W	VELTEIKDDVVQLDEPQFpSR	S 19	keine	----	keine	-----	hoch	-----
YNL070W	SFLPpSFILSDESK	S 5	----	----	----	-----	hoch	-----
YNL121C	ALELKPDYpSK	S 9	keine	keine	keine	-----	hoch	keine
YPL186C	GLDNLpSEGNDNDNTR	S 6	----	----	----	runter	runter	-----
YLL040C	LAVLDPpSILGER	S 7	keine	keine	keine	-----	hoch	-----
YKL187C	KGEIITYGDGSAIpSADR	S 14	keine	keine	keine	runter	runter	-----
YMR031C	*pSLISAVEDR	S 1	keine	keine	keine	-----	hoch	-----
YOL109W	EQAEApSIDNLK	S 6	keine	----	keine	hoch	hoch	hoch
YOL109W	EQAEASIDNLKNEApTPEAEQVK	T 15	keine	----	keine	hoch	hoch	-----
YOL109W	LEETKEpSLQNK	S 7	keine	----	keine	hoch	hoch	hoch
YOL109W	NEApTPEAEQVK(K)	T 4	keine	----	keine	-----	keine	hoch

**SILAC + (37°C)**

ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation Protein			Regulation P-Stelle		
			PD	Distiller	MQ	PD	Distiller	MQ
YCR010C	IYpTGGDNNEYIYIGR	T 3	----	runter	----	keine	keine = hoch	----
YNR002C	*pSDREQSSGNTAFENPK	S 1	hoch	keine	hoch	----	runter	----
YNR002C	*SDREQSpSGNTAFENPK	S 7	hoch	keine	hoch	----	hoch	----
YNR002C	ALDp(SS)EGEFISENNDQR	S 4 / S 5	hoch	keine	hoch	keine = runter	keine	----
YNR002C	EQSSGNpTAFENPK	T 7	hoch	keine	hoch	----	hoch	hoch = keine
YDR384C	TSpSASSPQDLEK	S 3	keine	runter	hoch	hoch	hoch	hoch = keine
YER026C	DENDGYASDEVGGTLsR	S 16	----	----	----	hoch	hoch	----
YOL059W	SDpSAVSIVHLK	S 3	runter	----	keine	----	hoch	----
YKL217W	YINQVEEYEADGLpSISDIVEQK	S 14	hoch	hoch	hoch	keine = runter	hoch = keine	hoch = keine
YJL094C	SVDDVDTNLpSVIDEK	S 10	----	----	----	runter	runter	----
YOR142W	M(Ox)GHpSGAIVEGSGTDAESK	S 4	keine	keine	keine	hoch	keine	hoch
YLR219W	RLpSTSSAAPPTSR	S 3	----	----	----	hoch	hoch	----
YAL010C	GFQEpSLSDDEK	S 5	keine	----	----	hoch	----	----
YAL010C	GFQESLpSDDEK	S 7	keine	----	----	----	hoch	hoch
YDR033W	APVApSPRPAAp(TPNLS)K	S5, T 11 / S 15	runter	keine	----	----	runter	----
YDR033W	APVApSPRPAATPNLSK	S 5	runter	keine	----	keine = hoch	runter	----
YDR033W	APVASPRPAApTPNLSK	T 11	runter	keine	----	----	runter	----
YJL096W	pSKGDLTILR	S 1	keine	keine	keine	runter	runter	----
YGR178C	p(SGS)NISQGGSSSTGHTR	S 1 / S 3	keine	----	keine	hoch	hoch	----
YNL055C	NELITSLpTPGVAK	T 8	keine	keine	keine	----	hoch	----
YFL005W	EGNISINpSGSGNSSK	S 8	keine	keine	keine	runter	keine	runter
YDR011W	EQFSSEp(SS)GANDEVFDDLEAK	S 7/S 8	keine	keine	keine	hoch	hoch	hoch
YMR107W	RSp(SIGSQDS)SDVEDVKEGR	S 3 / S 9	----	----	----	hoch	hoch	----
YNL131W	DDVVQLDEPQFpSR	S 12	keine	keine	keine	----	hoch	----
YNL121C	ALELKPDYpSK	S 9	keine	runter	keine	----	hoch	----
YPL186C	GLDNLpSEGNDNDNTR	S 6	----	----	----	runter	runter	keine
YLL040C	LAVLDPpSILGER	S 7	hoch	hoch	keine	keine = runter	keine = runter	----
YKL187C	KGEIITYGDGSAIpSADR	S 14	----	----	----	runter	runter	----
YFL038C	ESM(Ox)pSQQLNETTQK	S 4	keine	keine	hoch	hoch	----	hoch = keine

YBR054W	KAQEEEEEDVATDpSE	S 13	runter	-----	hoch	keine = hoch	-----	hoch = keine
YOL109W	LEETKEpSLQNK	S 7	keine	-----	keine	hoch	hoch	hoch

#### 4.5.2 Phosphatase-Assay

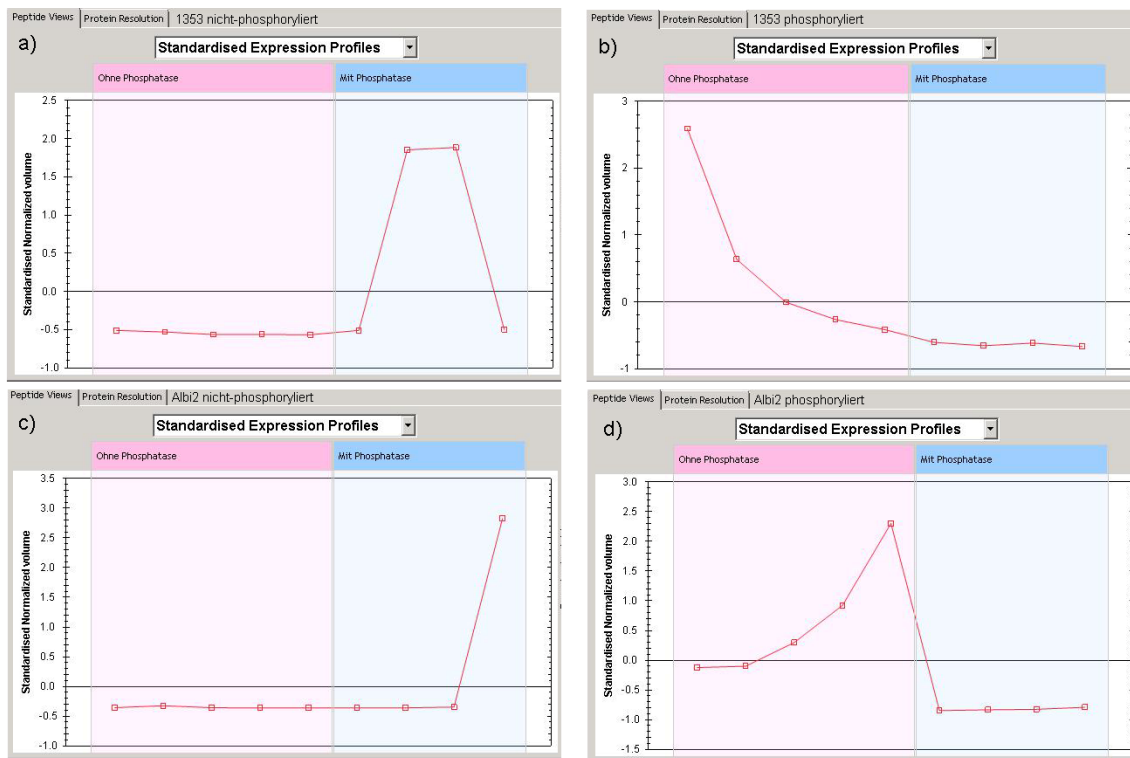
Für den Phosphatase-Assay wurde ein Peptidmix aus den vier Phosphopeptiden 580, 1353, 1450 und Albi2 (siehe Tabelle 4.12) hergestellt, zu 1 µg Mitochondrienlysat gegeben und entweder ohne oder nach Phosphatasebehandlung gemessen (siehe Abschnitt 3.12.2).

**Tabelle 4.12:** Übersicht über die synthetischen Phosphopeptide 580, 1353, 1450 und Albi2. Die phosphorylierte Aminosäure ist in der Peptidsequenz durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet.

Peptid	Sequenz	MW [Da]	Konzentration [pmol/µL]	(M+H) <sup>+</sup>	(M+2H) <sup>2+</sup>	(M+3H) <sup>3+</sup>
580	NpSVEQGRRL	1137,53	2,00	1138,54	569,77	380,18
1353	LIEDNEpYTAR	1302,55	2,00	1303,55	652,28	435,18
1450	QLGEPEKpSQDpSSPVLpSELK	2309,95	2,00	2310,95	1155,98	770,99
Albi2	SVENLPEAGIpTHEQR	1758,79	2,00	1759,79	880,40	587,26

Wie an Abbildung 4.19 zu erkennen ist, weisen Phosphatase-behandelte Proben für die nicht-phosphorylierten Peptidvariante (Abb. 4.19 a und c) in Progenesis LC-MS (NonLinear Dynamics Limited) einen höheren Wert auf, während bei unbehandelten Proben (Abb. 4.19 b und d) das Phosphopeptid stärker vertreten ist. Im Anschluss an die Auswertung konnten die gewonnenen Daten dazu verwendet werden je eine *inclusion list* mit potentiell phosphorylierten (Proben ohne Phosphatase) / nicht-phosphorylierten (Proben mit Phosphatase) Peptiden und einem Retentionszeitfenster von 8 min zu generieren, die dann für weitere Analysen genutzt wurden, um gezielt nach diesen *m/z*-Verhältnissen zu scannen. In Abbildung 4.20 sind exemplarisch Auszüge aus den Ergebnissen der Mascot-Suche für die beiden Peptide 1353 und Albi2 nach Verwendung dieser *inclusion list* zur Messung einer unbehandelten Probe dargestellt. Aufgrund der gezielten Scans wurden nur noch die phosphorylierten Varianten der ausgewählten Phosphopeptide detektiert. Im Vergleich dazu, finden sich in den Phosphatase-behandelten Proben nur noch die dephosphorylierten Peptide (Abb. 4.21). Jedoch wurden in der unbehandelten Probe trotz gezielter *inclusion list*-Scans nach Peptiden, die in der Phosphatase-behandelten Probe nicht oder nur in wesentlich geringerer Menge enthalten sind,

neben den zugegebenen Phosphopeptiden lediglich zwei bis drei Phosphopeptid-Spektren mit mäßiger bis schlechter Qualität gefunden.



**Abbildung 4.19:** Screenshots der standardisierten Expressionsprofile der beiden Peptide 1353 und Albi2 in (nicht-)phosphorylierter Form ohne beziehungsweise nach Phosphatasebehandlung bei der Progenesis LC-MS-Auswertung. Die Expressionsprofile der nicht-phosphorylierten Peptide (a und c) weisen in der Probe, die mit Phosphatase behandelt wurde, einen höheren Wert auf als in der ohne Phosphatase, während der Wert für die phosphorylierten Peptide (b und d) im Vergleich in der unbehandelten Probe höher ist.

gi 1353 Mass: 1223 Score: 124 Matches: 4(4) Sequences: 1(1) emPAI: 3.77										
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<a href="#">3064</a>	652.2813	1302.5479	1302.5493	-1.02	0	(44)	0.00021	1	U	--.LIEDNEYTAR.- + Phosphorylation (Y)
<a href="#">3065</a>	652.2813	1302.5479	1302.5493	-1.02	0	(35)	0.0017	1	U	--.LIEDNEYTAR.- + Phosphorylation (Y)
<a href="#">3066</a>	652.2823	1302.5500	1302.5493	0.58	0	62	2.7e-006	1	U	--.LIEDNEYTAR.- + Phosphorylation (Y)
<a href="#">3067</a>	652.2823	1302.5500	1302.5493	0.58	0	(41)	0.00035	1	U	--.LIEDNEYTAR.- + Phosphorylation (Y)

gi 2222 Mass: 1679 Score: 441 Matches: 14(14) Sequences: 1(1) emPAI: 11.76										
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<a href="#">3807</a>	880.4037	1758.7928	1758.7938	-0.53	0	(72)	4.8e-007	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3808</a>	880.4037	1758.7928	1758.7938	-0.53	0	(58)	1.4e-005	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3809</a>	880.4037	1758.7929	1758.7938	-0.47	0	81	6.1e-008	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3810</a>	880.4037	1758.7929	1758.7938	-0.47	0	(71)	6.8e-007	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3811</a>	587.2720	1758.7943	1758.7938	0.29	0	(35)	0.0024	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3813</a>	587.2724	1758.7954	1758.7938	0.92	0	(34)	0.0032	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3814</a>	587.2724	1758.7954	1758.7938	0.92	0	(29)	0.0096	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3815</a>	880.4050	1758.7954	1758.7938	0.92	0	(76)	2.3e-007	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3816</a>	880.4052	1758.7959	1758.7938	1.20	0	(68)	1.4e-006	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3817</a>	587.2726	1758.7961	1758.7938	1.33	0	(38)	0.0014	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3818</a>	587.2726	1758.7961	1758.7938	1.33	0	(28)	0.015	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3819</a>	587.2728	1758.7965	1758.7938	1.54	0	(39)	0.0011	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3823</a>	880.8990	1759.7834	1758.7938	563	0	(54)	3.7e-005	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)
<a href="#">3824</a>	880.8990	1759.7834	1758.7938	563	0	(44)	0.00039	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.- + Phosphorylation (ST)

Abbildung 4.20: Screenshots der Mascot-Suchen der beiden Peptide 1353 und Albi2 (ohne Phosphatasebehandlung) nach LC-MS-Messungen mit *inclusion list*.

gi 1353 Mass: 1223 Score: 427 Matches: 13(13) Sequences: 1(1) emPAI: 3.77										
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<a href="#">2582</a>	612.2985	1222.5825	1222.5829	-0.37	0	(60)	5.3e-006	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2583</a>	612.2985	1222.5825	1222.5829	-0.37	0	(59)	8e-006	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2584</a>	612.2988	1222.5830	1222.5829	0.03	0	(60)	5.3e-006	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2585</a>	612.2988	1222.5830	1222.5829	0.03	0	(52)	3.1e-005	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2586</a>	612.2990	1222.5835	1222.5829	0.43	0	(62)	3.7e-006	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2587</a>	612.2990	1222.5835	1222.5829	0.43	0	(53)	3e-005	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2588</a>	612.2993	1222.5840	1222.5829	0.83	0	(57)	1.2e-005	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2589</a>	612.2993	1222.5840	1222.5829	0.83	0	(41)	0.00047	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2590</a>	612.2993	1222.5841	1222.5829	0.93	0	65	1.8e-006	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2591</a>	612.2993	1222.5841	1222.5829	0.93	0	(47)	0.00013	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2592</a>	612.2997	1222.5849	1222.5829	1.63	0	(53)	3e-005	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2593</a>	612.2997	1222.5849	1222.5829	1.63	0	(33)	0.0029	1	U	--.LIEDNEYTAR.-
<a href="#">2595</a>	612.3009	1222.5873	1222.5829	3.52	0	(26)	0.018	1	U	--.LIEDNEYTAR.-

gi 2222 Mass: 1679 Score: 668 Matches: 21(21) Sequences: 1(1) emPAI: 11.76										
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<a href="#">3858</a>	560.6161	1678.8264	1678.8274	-0.60	0	(33)	0.0032	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3859</a>	840.4212	1678.8279	1678.8274	0.25	0	(75)	2.1e-007	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3860</a>	840.4212	1678.8279	1678.8274	0.25	0	(63)	3.3e-006	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3861</a>	560.6166	1678.8281	1678.8274	0.39	0	(38)	0.0011	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3862</a>	560.6172	1678.8299	1678.8274	1.48	0	(47)	0.00015	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3863</a>	560.6172	1678.8299	1678.8274	1.48	0	(33)	0.0036	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3864</a>	840.4224	1678.8303	1678.8274	1.70	0	(72)	4.1e-007	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3865</a>	840.4224	1678.8303	1678.8274	1.70	0	78	1.1e-007	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3866</a>	560.6175	1678.8307	1678.8274	1.91	0	(35)	0.0021	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3867</a>	560.6175	1678.8307	1678.8274	1.91	0	(50)	7.2e-005	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3868</a>	560.6175	1678.8307	1678.8274	1.91	0	(43)	0.00032	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3869</a>	560.6175	1678.8307	1678.8274	1.91	0	(40)	0.00064	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3870</a>	560.6175	1678.8307	1678.8274	1.91	0	(33)	0.0033	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3872</a>	840.4226	1678.8307	1678.8274	1.92	0	(76)	1.8e-007	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3873</a>	840.4226	1678.8307	1678.8274	1.92	0	(63)	3.2e-006	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3874</a>	560.6177	1678.8314	1678.8274	2.35	0	(49)	9.1e-005	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3875</a>	560.6177	1678.8314	1678.8274	2.35	0	(39)	0.00095	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3876</a>	560.6182	1678.8328	1678.8274	3.22	0	(45)	0.00024	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3877</a>	560.6182	1678.8328	1678.8274	3.22	0	(39)	0.00098	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3878</a>	840.4238	1678.8331	1678.8274	3.37	0	(76)	1.6e-007	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-
<a href="#">3879</a>	840.4238	1678.8331	1678.8274	3.37	0	(61)	5.4e-006	1	U	--.SVENLPEAGITHEQR.-

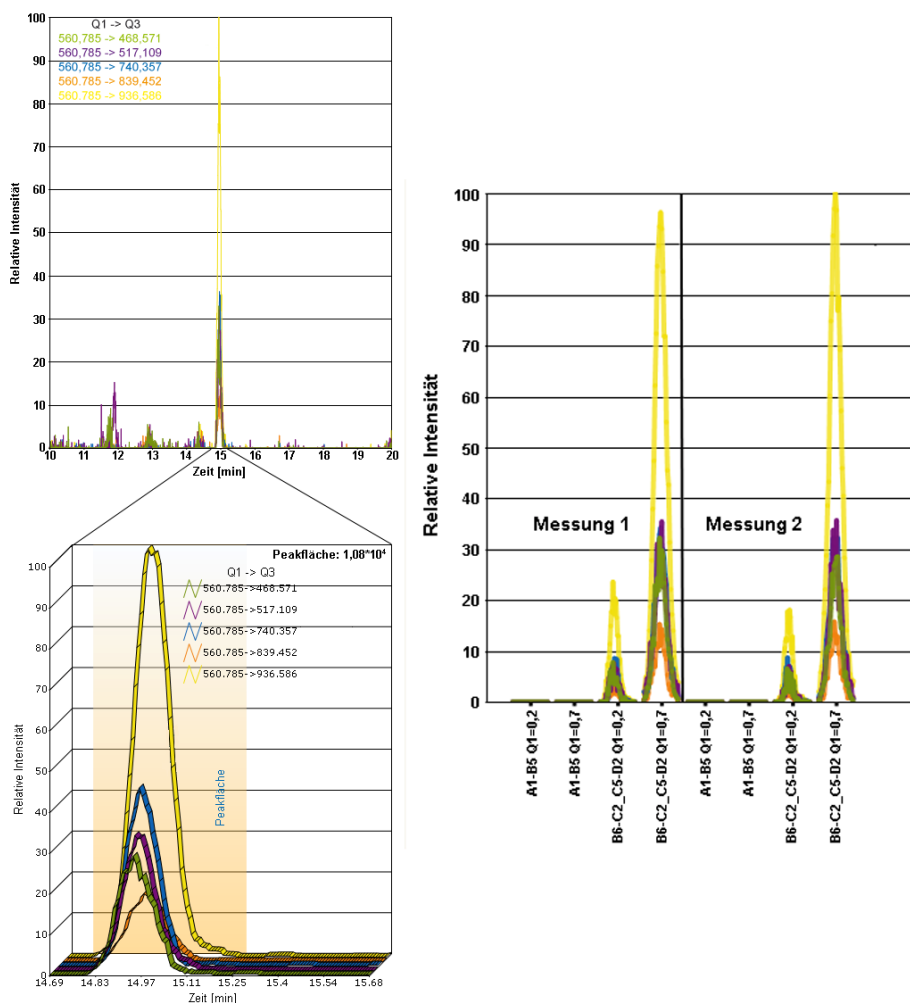
Abbildung 4.21: Screenshots der Mascot-Suchen der beiden Peptide 1353 und Albi2 (nach Phosphatasebehandlung) nach LC-MS-Messungen mit *inclusion list*.

### 4.5.3 Synthetische Peptide & SRMs

Als weitere Quantifizierungsmethode wurden anhand von synthetisch hergestellten mitochondrialen (Phospho-)Peptiden spezifische SRM-Scans erstellt und die SRM-Bedingungen wie die Wahl geeigneter Übergänge, die verwendete Kollisionsenergie und die Einstellung der S-Linse optimiert. Anschließend wurden diese Werte und die für jedes Peptid bestimmte Retentionszeit (siehe Anhang 10.6) für scheduled SRM-Messungen von Peptiden in Mitochondrien-Hintergrund genutzt (siehe Abschnitt 3.12.2).

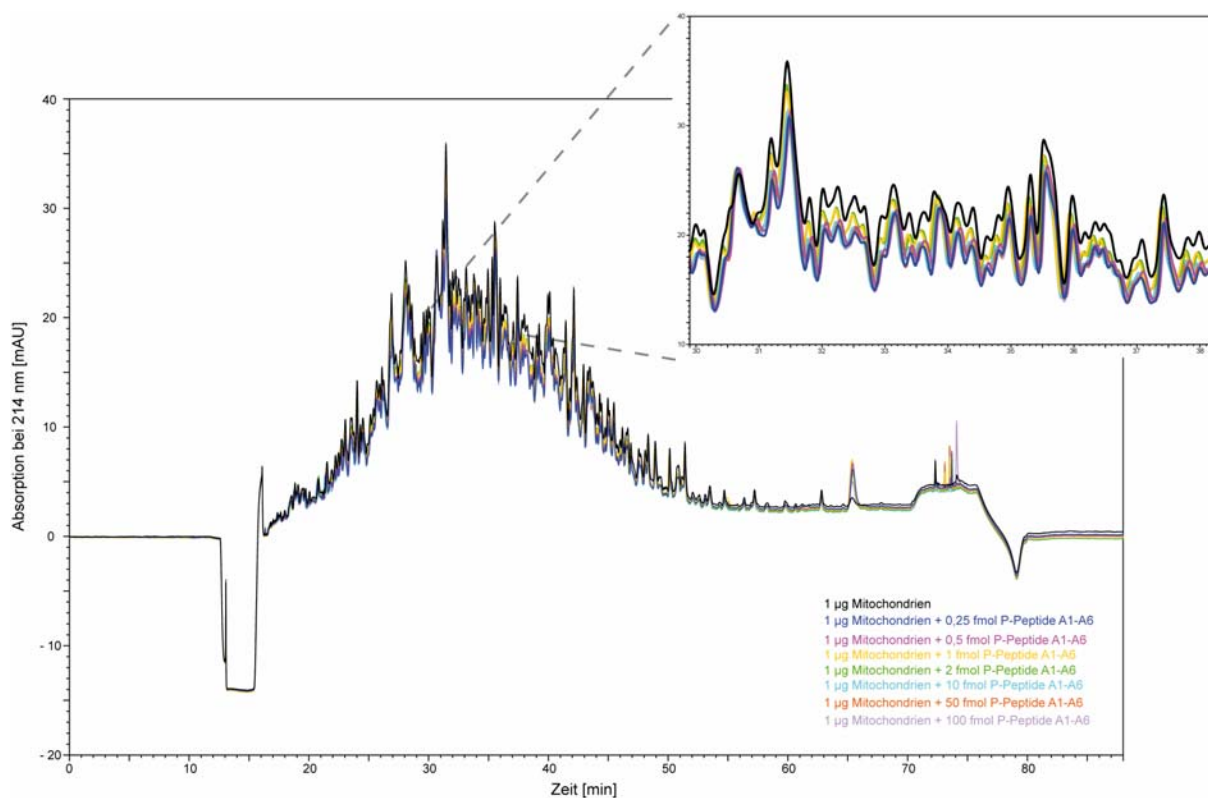
Mittels scheduled SRMs lässt sich anhand der Q1/Q3-Übergänge innerhalb eines gewählten Retentionszeitfensters das gewünschte Peptid eindeutig identifizieren und über die aufsummierten Peakflächen quantifizieren. Exemplarisch ist in Abb. 4.22 ein in Pinpoint 1.0 geöffneter scheduled SRM-Scan des Peptides C6 (SPPVYSDISR 2+) dargestellt. Innerhalb der Retentionszeit von 10,04 bis 20,04 min (Abb. 4.22 links oben) überlagern sich die Peaks der fünf Q1/Q3-Übergänge zwischen circa 14,80 und 15,10 min, wie eine Vergrößerung des entsprechenden Bereiches zeigt (Abb. 4.22 links unten), und sorgen damit für eine eindeutige Identifizierung des Peptides. Die aufsummierten Peakflächen ergeben dabei einen Wert von  $1,08 \cdot 10^4$ . Durch eine Variation der Q1-Peakbreite von 0,2 auf 0,7 FWHM (Abb. 4.22 rechts) wird die relative Intensität des gemessenen Peaks deutlich erhöht, weshalb diese Einstellung für die weiteren scheduled SRM-Messungen gewählt wurde.





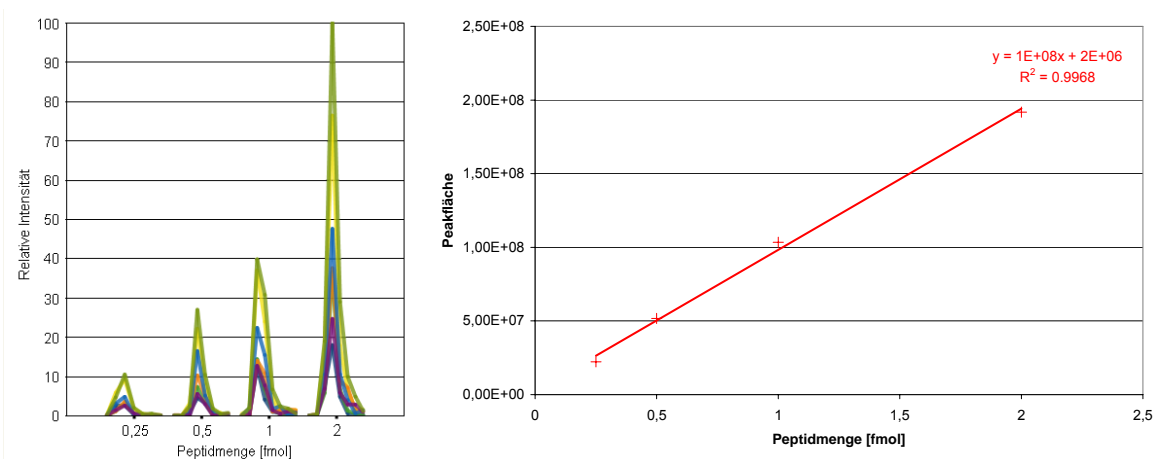
**Abbildung 4.22:** Scheduled SRM-Scan des Peptides C6 (SPPVYSDISR, Ladung 2+). Innerhalb des gewählten Retentionszeitfensters von 10,04 min bis 20,04 min (links oben) lässt sich das Peptid C6 anhand der fünf Q1/Q3-Übergänge eindeutig identifizieren und über die aufsummierten Peakflächen quantifizieren (links unten). Durch eine Variation der Q1-Peakbreite von 0,2 auf 0,7 FWHM (rechts) wird die relative Intensität des gemessenen Peaks deutlich erhöht.

Neben optimierten Parametern wird für eine labelfreie Quantifizierung mittels SRMs eine hochreproduzierbare HPLC benötigt, um die Linearität der Messung zu garantieren. Dabei soll trotz variierender Proteinmenge und der Komplexität der Probe sowohl die Peakform als auch die Retentionszeit für jedes Peptid über mehrere Läufe konstant bleiben. An Abb. 4.23 ist ersichtlich, dass während der sukzessiven HPLC-Messungen zur labelfreien Quantifizierung nur geringfügige Abweichungen der Retentionszeiten auftraten.



**Abbildung 4.23:** Labelfreie Quantifizierung der Peptide A1 - A6 im Bereich von 0,25 bis 100 fmol in einem Hintergrund von 1 µg Mitochondrien. Das UV-Chromatogram zeigt die hochreproduzierbare Auftrennung von acht sukzessiven einstündigen HPLC-Läufen mit nur geringen Retentionszeitabweichungen.

Zur Erstellung von Kalibrierkurven wurden als Erstes verschiedene Mengen der Peptide A1 - A6 im Bereich von 0,25 bis 100 fmol ohne mitochondrialen Hintergrund gemessen. Abb. 4.24 gibt exemplarisch die SRM-Messung des Peptides A5 (EQAEP SIDNLK, Ladung 2+) im Bereich von 0,25 bis 2 fmol (Abb. 4.24 links) sowie die zugehörige Regressionsgerade (Abb. 4.24 rechts) wieder. Es zeigt sich, dass während der Messungen die gewünschte Linearität erreicht wird.

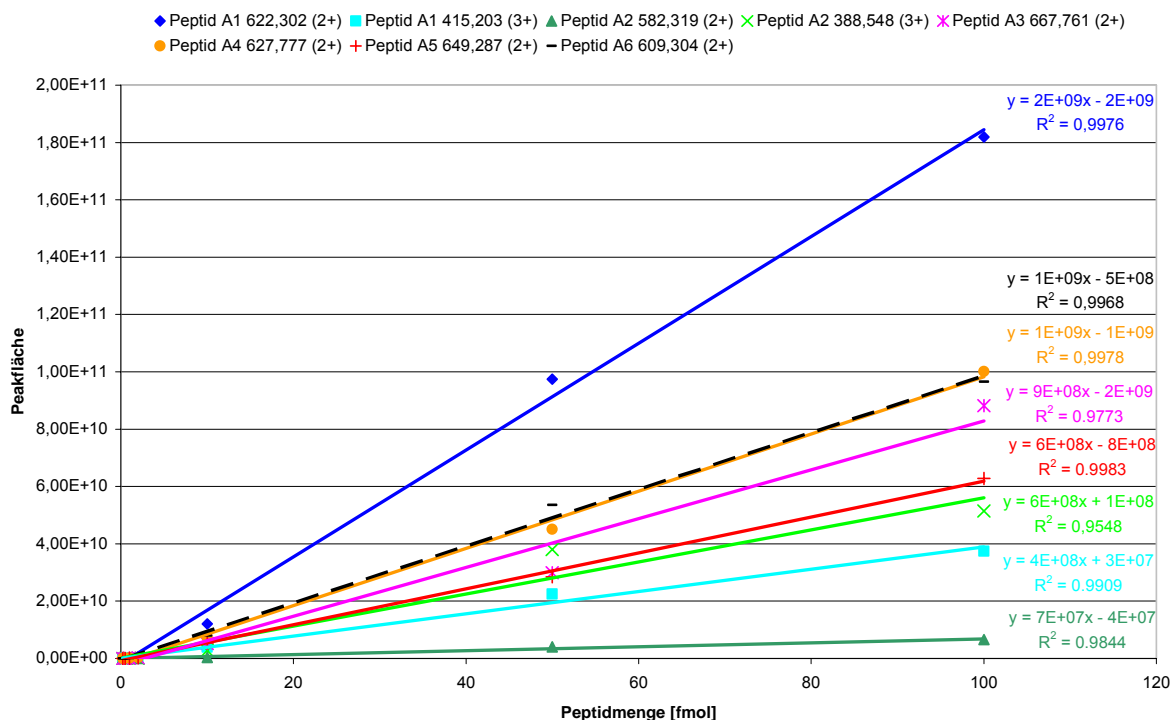


**Abbildung 4.24:** SRM-Analyse des Peptides A5 (EQAEP SIDNLK, Ladung 2+) im Bereich von 0,25 bis 2 fmol (basierend auf einer Einfachbestimmung).

Tab. 4.13 fasst die in Pinpoint 1.0 berechneten Peakflächen der Peptide A1 - A6 bei unterschiedlichen Peptidmengen im Bereich von jeweils 0,25 bis 100 fmol zusammen und in Abb. 4.25 sind die zugehörigen Regressionsgeraden dargestellt. Wie sich zeigt sind bei Peptid A1 die Werte des zweifach geladenen Fragmentes höher, während bei Peptid A2 das dreifach geladene Fragment größere Peakflächen aufweist.

**Tabelle 4.13:** Aufsummierte Peakflächen der Peptide A1 - A6 bei unterschiedlichen Peptidmengen im Bereich von 0,25 bis 100 fmol.

Peptidmenge [fmol]	0,25	0,5	1	2	10	50	100
A1 622,302 (2+)	5,30E+07	1,02E+08	2,30E+08	3,67E+08	1,21E+10	9,75E+10	1,82E+11
A1 415,203 (3+)	3,68E+06	1,11E+07	2,38E+07	4,40E+07	3,89E+09	2,25E+10	3,75E+10
A2 582,319 (2+)	3,35E+06	4,20E+06	1,51E+07	2,15E+07	3,16E+08	4,08E+09	6,56E+09
A2 388,548 (3+)	1,38E+07	3,06E+07	7,04E+07	1,27E+08	2,81E+09	3,80E+10	5,15E+10
A3 667,761 (2+)	1,67E+07	3,64E+07	9,45E+07	2,03E+08	5,26E+09	2,99E+10	8,81E+10
A4 627,777 (2+)	2,77E+07	6,47E+07	1,38E+08	3,11E+08	7,34E+09	4,50E+10	1,00E+11
A5 649,287 (2+)	2,21E+07	5,17E+07	1,04E+08	1,92E+08	5,45E+09	2,85E+10	6,28E+10
A6 609,304 (2+)	2,96E+07	7,52E+07	1,52E+08	3,34E+08	8,00E+09	5,35E+10	9,66E+10



**Abbildung 4.25:** Kalibrierkurven der Peptide A1 - A6 im Bereich von 0,25 bis 100 fmol (basierend auf einer Einfachbestimmung).

In weiteren Messungen wurden die mitochondrialen Peptide A1 - A6 mittels SRM-Scans aus 1  $\mu$ g Mitochondrien (Tab. 4.14 „1  $\mu$ g Mitos“) beziehungsweise aus Proben mit verschiedenen Peptidmengen im Bereich von 0,25 bis 100 fmol und 1  $\mu$ g mitochondrialem Hintergrund (Tab. 4.14 „1  $\mu$ g Mitos + x fmol“) analysiert. Anschließend wurden aus den beiden Replikaten für die unterschiedlichen Mengen jedes Peptides die Mittelwerte und die Standardabweichung (StAbw) bestimmt (Anhang 10.7). Diese wurden zusammen mit den Gleichungen der Regressionsgeraden (Abb. 4.25) und den Werten der reinen Peptide (Tab. 4.13) genutzt, um die in den Proben enthaltene Menge der Peptide A1 - A6 zu bestimmen. Dabei wurde aus den Mittelwerten jedes Peptides der als „1  $\mu$ g Mitos“ bezeichneten Proben direkt anhand der Geradengleichungen die Menge der Peptide A1 - A6 berechnet. Beispielsweise wurde der Mittelwert des Peptides A1 622,302 (2+) von  $4,16 \cdot 10^8$  (Anhang 10.7) als y-Wert der Gleichung  $y = 2 \cdot 10^9 x - 2 \cdot 10^9$  (Abb. 4.25) eingesetzt und daraus eine Peptidmenge von  $x = 1,2$  fmol berechnet (siehe Tab. 4.17, Spalte a).

**Tabelle 4.14:** Aufsummierte Peakflächen der Peptide A1 - A6 in 1 µg mitochondrialem Hintergrund bei unterschiedlichen Peptidmengen im Bereich von 0,25 bis 100 fmol.

Replikant 1	1 µg Mitos	1 µg Mitos + 0,25 fmol	1 µg Mitos + 0,5 fmol	1 µg Mitos + 1 fmol	1 µg Mitos + 2 fmol	1 µg Mitos + 10 fmol	1 µg Mitos + 50 fmol	1 µg Mitos + 100 fmol
A1 622,302 (2+)	1,83E+08	1,87E+08	2,42E+08	3,22E+08	5,56E+08	2,31E+09	9,77E+09	1,99E+10
A1 415,203 (3+)	2,65E+07	2,42E+07	2,52E+07	4,07E+07	5,52E+07	2,63E+08	1,09E+09	2,17E+09
A2 582,319 (2+)	1,41E+09	1,18E+09	1,25E+09	1,33E+09	1,20E+09	1,51E+09	2,83E+09	4,93E+09
A2 388,548 (3+)	4,48E+09	3,72E+09	4,17E+09	4,01E+09	3,59E+09	4,59E+09	8,79E+09	1,54E+10
A3 667,761 (2+)	2,33E+08	1,76E+08	1,86E+08	2,05E+08	2,68E+08	6,37E+08	2,16E+09	4,32E+09
A4 627,777 (2+)	5,35E+08	2,59E+08	2,56E+08	5,32E+08	4,79E+08	1,16E+09	4,22E+09	9,44E+09
A5 649,287 (2+)	2,18E+08	1,82E+08	1,80E+08	2,22E+08	2,75E+08	7,06E+08	2,25E+09	4,86E+09
A6 609,304 (2+)	2,31E+08	2,28E+08	2,81E+08	3,25E+08	4,46E+08	1,40E+09	5,80E+09	1,21E+10
Replikant 2	1 µg Mitos	1 µg Mitos + 0,25 fmol	1 µg Mitos + 0,5 fmol	1 µg Mitos + 1 fmol	1 µg Mitos + 2 fmol	1 µg Mitos + 10 fmol	1 µg Mitos + 50 fmol	1 µg Mitos + 100 fmol
A1 622,302 (2+)	6,50E+08	6,02E+08	8,73E+08	1,82E+09	2,14E+09	1,22E+10	5,45E+10	1,12E+11
A1 415,203 (3+)	7,35E+07	9,08E+07	1,36E+08	2,32E+08	2,19E+08	1,47E+09	4,67E+09	1,01E+10
A2 582,319 (2+)	3,64E+09	3,86E+09	4,22E+09	5,41E+09	4,23E+09	4,53E+09	8,38E+09	1,43E+10
A2 388,548 (3+)	1,12E+10	1,18E+10	1,31E+10	2,20E+10	1,19E+10	1,53E+10	3,21E+10	5,94E+10
A3 667,761 (2+)	7,01E+08	6,66E+08	6,77E+08	8,28E+08	1,01E+09	2,70E+09	1,08E+10	2,25E+10
A4 627,777 (2+)	7,32E+08	1,01E+09	1,03E+09	2,85E+09	1,80E+09	4,81E+09	1,92E+10	4,27E+10
A5 649,287 (2+)	6,42E+08	6,56E+08	7,31E+08	8,51E+08	9,19E+08	2,91E+09	1,13E+10	2,31E+10
A6 609,304 (2+)	5,86E+08	7,02E+08	7,60E+08	1,01E+09	1,43E+09	5,89E+09	2,48E+10	5,05E+10

Für die Kalkulation der „1 µg Mitos + x fmol“-Proben wurde für jedes Peptid einzeln zu jeder Peptidmenge der Mittelwert gebildet (Anhang 10.7), der zugehörige Wert der reinen Peptidmessung (Tab. 4.13) abgezogen und aus den resultierenden sieben Datenwerten der 0,25 bis 100 fmol-Messungen wiederum einzeln der Mittelwert für jedes Peptid bestimmt. Aus diesem wurde schließlich mit Hilfe der Regressionsgeraden die enthaltene Menge des jeweiligen Peptides A1 - A6 definiert. Exemplarisch sind in der nachfolgenden Tabelle 4.15 die Mittelwerte der sieben verschiedenen Peptidmengen „1 µg Mitos + x fmol“ des Peptides A1 622,302 (2+) (siehe Anhang 10.7) sowie in der Spalte „Mittelwerte - Peptidmessung“ die Datenwerte nach Abzug der reinen Peptidmessung (Tab. 4.13) erfasst. Als sozusagen „Gesamtmittelwert“ ergibt sich daraus unter Vernachlässigung der drei negativen Daten ein Wert von  $6,55 \cdot 10^8$ . Als y-Wert der Gleichung  $y = 2 \cdot 10^9 x - 2 \cdot 10^9$  (Abb. 4.25) eingesetzt, ergibt sich eine Peptidmenge von  $x = 1,3$  fmol (siehe Tab. 4.16, Spalte b). Die negativen Werte in Tab. 4.15 sind voraussichtlich auf Pipettier- und Messungenauigkeiten zurückzuführen.

**Tabelle 4.15:** Mittelwerte der verschiedenen zugegebenen Peptidmengen für Peptid A1 entsprechend Anhang 10.6 sowie die nach Abzug der reinen Peptidmessungen (Tab 4.13) erhaltenen Werte

Peptid A1 622,302 (2+)	Mittelwerte	Mittelwerte - Peptidmessung
+ 0,25 fmol	3,95E+08	3,42E+08
+ 0,5 fmol	5,57E+08	4,55E+08
+ 1 fmol	1,07E+09	8,39E+08
+ 2 fmol	1,35E+09	9,83E+08
+ 10 fmol	7,28E+09	- 4,81E+09
+ 50 fmol	3,21E+10	- 6,53E+10
+ 100 fmol	6,60E+10	- 1,16E+11

Ein Vergleich der berechneten Peptidmengen nach (a) Messung von 1 µg Mitochondrien und (b) nach Abzug der reinen Peptidwerte von den Mittelwerten der Messungen nach Zugabe unterschiedlicher Peptidmengen (siehe Tab. 4.16) zeigt, dass die meisten Werte im Rahmen der Messgenauigkeit nahezu identisch sind. Lediglich die Werte des Peptides A6 609,304 (2+) unterscheiden sich deutlich voneinander.

**Tabelle 4.16:** Vergleich der berechneten Peptidmengen der Peptide A1 - A6 in 1 µg Mitochondrien bei (a) Messung von lediglich 1 µg Mitochondrien (Tab 4.14, „1 µg Mitos“) und (b) nach Abzug der reinen Peptidwerte (Tab. 4.13) von den Mittelwerten der Messungen nach Zugabe unterschiedlicher Peptidmengen (Tab. 4.14, Anhang 10.7).

	a) 1 µg Mitochondrien	b) [1 µg Mitochondrien + Peptide] - Peptide
A1 622,302 (2+)	1,2 fmol	1,3 fmol
A1 415,203 (3+)	0,05 fmol	0,1 fmol
A2 582,319 (2+)	36,7 fmol	38,5 fmol
A2 388,548 (3+)	12,9 fmol	14,5 fmol
A3 667,761 (2+)	2,7 fmol	2,7 fmol
A4 627,777 (2+)	1,6 fmol	2 fmol
A5 649,287 (2+)	2,1 fmol	2 fmol
A6 609,304 (2+)	0,9 fmol	6,5 fmol

## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Entwicklung und Etablierung von verschiedenen Strategien zur Anreicherung von Phosphopeptiden die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Phosphorylierungsanalytik geschaffen. Basierend auf diesen Methoden konnte eine umfassende Studie von Phosphorylierungsstellen mitochondrialer Proteine durchgeführt werden. Dabei wurde der Fokus vor allem auf die mitochondriale Außenmembran und Membran/Protein-Komplexe gelegt.

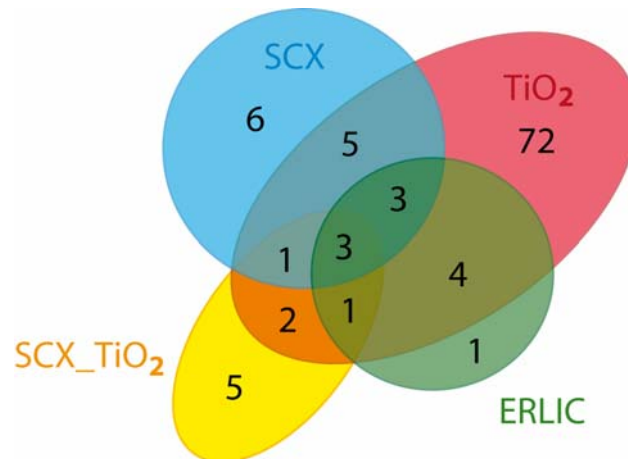
Zudem konnte gezeigt werden, dass die an Hefemitochondrien entwickelten Methoden zum Teil auch auf wesentlich komplexere Proben übertragen werden können, was in ersten Ansätzen eine vergleichende Studie zwischen Hefe-, Maus- und humanen Mitochondrien ermöglichte.

### 5.1 Anreicherung von Phosphopeptiden

Da Phosphopeptide im Vergleich zu nicht-phosphorylierten Peptiden in einem proteolytisch verdauten Mitochondrienlysate deutlich unterrepräsentiert sind, sind effiziente Anreicherungsstrategien notwendig, bevor die Phosphorylierungsstellen über massenspektrometrische Methoden detaillierter charakterisiert werden können. In dieser Arbeit wurden daher verschiedene Verfahren zur Analyse mitochondrialer Phosphorylierungsstellen etabliert: IEF, SCX, ERLIC und  $\text{TiO}_2$ .

Bei der Analyse von Phosphopeptiden aus OMVs fällt jedoch auf, dass nur drei Phosphorylierungsstellen mit allen hierfür verwendeten Anreicherungsverfahren (SCX, SCX und  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$  und ERLIC) gefunden wurden (siehe Abb. 5.1), während mit 72 Phosphorylierungsstellen der Hauptteil der Phosphopeptide nach alleiniger  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung identifiziert wurde. Dies spricht deutlich für die Verwendung von komplementären Analysenstrategien, um ein möglichst vollständiges Bild über die Phosphorylierungsstellen zu erhalten, da die verschiedenen Verfahren eine unterschiedliche Spezifität aufweisen. Zudem kann durch den Einsatz unterschiedlicher Methoden die Wahrscheinlichkeit zufälliger, falsch-positiver Identifikationen reduziert werden, wenn dieselbe Phosphorylierungsstelle mit mehreren Methoden bestimmt wird. Bei einer sukzessiven Kombination

unterschiedlicher Anreicherungsverfahren ist zu beachten, dass während der verschiedenen Schritte der Versuchsdurchführung ein Probenverlust auftreten kann, weshalb eine größere Menge an Ausgangsmaterial gewählt werden sollte als eventuell für die einzelne Methode im Idealfall benötigt wird.



**Abbildung 5.1:** Verteilung der identifizierten Phosphorylierungsstellen aus OMVs hinsichtlich der verwendeten Anreicherungsstrategie. Eine Reihe von Phosphorylierungsstellen wurde nur mit einer einzigen Technik identifiziert, während lediglich drei Phosphorylierungsstellen in allen vier Anreicherungen detektiert werden konnten. Von den hier dargestellten Methoden ist TiO<sub>2</sub> offensichtlich die effektivste bezüglich der Anzahl an Phosphopeptiden.

Um die hier gewonnenen Daten mit anderen Studien zu vergleichen, wurden die in OMVs und in Hefemitochondrien detektierten Phosphorylierungsstellen in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Diese 126 Phosphopeptide umfassende Liste besteht in etwa zu 1/4 aus den in Hefemitochondrien und zu 3/4 aus den in OMVs gefundenen Phosphopeptiden.



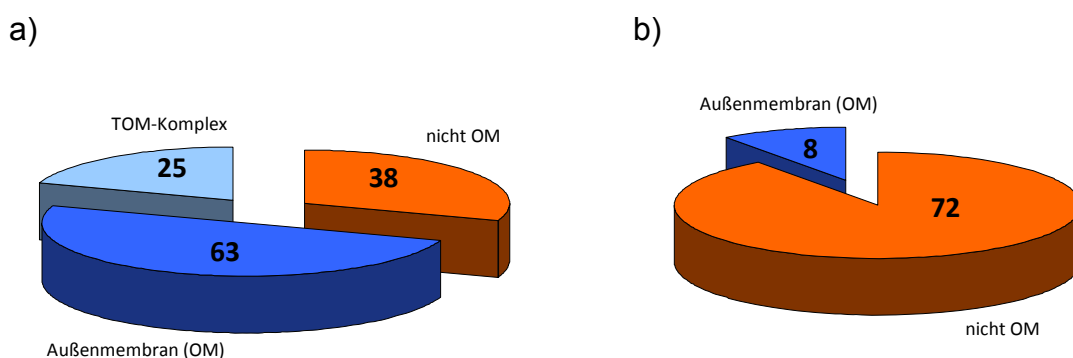
**Tabelle 5.1:** In OMVs oder/und Hefemitochondrien detektierte Phosphopeptide. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. M(Ox) steht für oxidierte Methionine und \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem ist die Position der phosphorylierten Aminosäure sowohl in der Peptid- als auch in der Proteinsequenz angegeben. Grau unterlegte ORFs stehen für laut SGD in der OM lokalisierte Proteine.

ORF	Gen	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein
YAL010C	MDM10	K.NDNAIpSISATDTENGNIpVFPK.F	S 6	S 467
YAL010C	MDM10	R.GFQESLpSDDEK.N	S 7	S 457
YBR039W	ATP3	K.TIEQSPpSFGKFEIDTDANVPR.D	S 7	S 226
YBR054W	YRO2	K.KAQEEEEVDATDpSE.-	S 13	S 343
YBR106W	PHO88	K.APpSLFGGM(ox)GQTGPK.T	S 3	S 157
YBR177C	EHT1	K.NPpSFYMFTEPENLIK.A	S 3	S 332
YDR148C	KGD2	K.AQEPPVASNpSFTPFPR.T	S 10	S 227
YDR326C	YSP2	R.Np(SS)SDFSTNQGQMPR.T	S 2 / S 3	S 596 / S 597
YDR470C	UGO1	K.LNVINp(SS)PTTK.R	S 6 / S 7	S 55 / S 56
YDR508C	GNP1	K.DpSSS QLDNELNR.K	S 2	S 111
YDR508C	GNP1	R.KSpSYITVDGIK.Q	S 3	S 124
YER026C	CHO1	*M.VEpSDEDFAPQEFPHDTDVI VNEHR.D	S 3	S 4
YER026C	CHO1	-M(ox)VEpSDEDFAPQEFPHDTDVI VNEHR.D	S 4	S 4
YER026C	CHO1	M.VEpSDEDFAPQEFPHDTDVI VNEHR.D	S 3	S 4
YER026C	CHO1	R.DENDGYApSDEVGGLpSR.R	S 8, S 16	S 34, S 42
YER026C	CHO1	R.DENDGYApSDEVGGLSR.R	S 8	S 34
YER026C	CHO1	R.DENDGYASDEVGGLpSR.R	S 16	S 42
YER026C	CHO1	R.RApSpSIFSINTTPLAPPNATI QK.F	S 3, S 4	S 46, S 47
YER140W	YER140W	R.RNpSAPSAIHISRL.L	S 3	S 22
YFL005W	SEC4	K.EGNISINpSGSGNSSK.S	S 8	S 204
YFL038C	YPT1	R.FSDDTYTNDYIpSTIGVDFK.I	S 12	S 39
YGL219C	MDM34	K.TVLDpSSQYDLATITK.I	S 5	S 320
YGL219C	MDM34	K.TVLDSpSQYDLATITK.I	S 6	S 321
YGR082W	TOM20	K.AEpSDAVAEANDIDD.-	S 3	S 172
YGR082W	TOM20	K.DPIPSDPpSER.E	S 8	S 87
YGR082W	TOM20	K.GVVGpSKAESDAVAEANDIDD.-	S 5	S 168
YGR082W	TOM20	K.VTEFLSM(ox)ELAKDPIpSDP SER.E	S 16	S 84
YGR082W	TOM20	K.VTEFLSM(ox)ELAKDPIPSDPpSER.E	S 19	S 87
YGR086C	PIL1	K.YKDPQpSPK.I	S 6	S 163
YGR086C	PIL1	R.APTApSQLQNPPPPSTTK.G	S 5	S 16
YGR181W	TIM13	M.GLpSSIFGGGAPSQQK.E	S 3	S 4
YGR244C	LSC2	K.FGFDDNApSFR.Q	S 8	S 263
YHR083W	SAM35	R.pSTVAISEIM(ox)R.S	S 1	S 142
YHR117W	TOM71	K.AKpSGEGFDYPSLPNGEPDIAQLK.G	S 3	S 96
YHR117W	TOM71	K.pSGEGFDYPSLPNGEPDIAQLK.G	S 1	S 96
YHR117W	TOM71	R.QSEAFAGQNEDEADLKDDGpSVVSGSNK.R	S 20	S 73
YHR117W	TOM71	R.QSEAFAGQNEDEADLKDDGSVpSGSNK.R	S 23	S 76
YHR117W	TOM71	R.RQpSEAFAGQNEDEADLK.D	S 3	S 55
YIL094C	LYS12	R.KpSLTIGLIPGDGIGK.E	S 2	S 23
YIL136W	OM45	K.DSSSQpSIFNWGFSEAER.R	S 6	S 116
YIL136W	OM45	K.DSSSQSIFNWGFpSEAER.R	S 13	S 123
YIL136W	OM45	R.DFNELpSDKLDQQR.N	S 6	S 186
YIL136W	OM45	R.EGNVpSAYYNGQEYGSAPPQLGK.L	S 5	S 37

ORF	Gen	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein
YIL136W	OM45	R.EGNVSAYYNGQEYGp(SS)APPQLGK.L	S 15 / S 16	S 47 / S 48
YIL155C	GUT2	R.NPSGLPDpSPLNDNSK.I	S 8	S 304
YJL112W	MDV1	K.pSFPTFQQLYEPGK.I	S 1	S 376
YJR048W	CYC1	R.HSGQAEGYp(SYT)DANIK.K	S 9 / T 11	S 53 / T 55
YJR121W	ATP2	K.VLDTGGPIpSVPVGR.E	S 9	S 117
YKL027W	YKL027W	K.p(SDT)DKYHQYDEQFIR.Q	S 1 / T 3	S 52 / T 54
YKL027W	YKL027W	K.pSDTDKYHQYDEQFIR.Q	S 1	S 52
YKL027W	YKL027W	R.GKVDELpSALK.D	S 7	S 285
YKL027W	YKL027W	R.VVDFDQVpSLSSLNR.H	S 8	S 122
YKL150W	MCR1	K.GpSNVVRPYTPVSDLSQK.G	S 2	S 100
YKL150W	MCR1	R.NQHpSFVFNESNK.V	S 4	S 37
YKL187C	YKL187C	R.TELpSHPDVTPK.D	S 4	S 729
YKL217W	JEN1	K.LYHNPSLPAQpSIQDTR.D	S 11	S 66
YKL217W	JEN1	K.YINQVEEYADGLpSISDIVEQK.T	S 14	S 584
YKL217W	JEN1	R.VYpSQDQGVVEEEDDKPNLSAASIK.S	S 3	S 81
YKR036C	CAF4	R.LLLDNVDGATNpSDKEK.Y	S 12	S 136
YLR203C	MSS51	R.NALGLDPPPpSPEDPTPENR.F	S 10	S 51
YLR259C	HSP60	K.QIENAGEEGpSVIIGK.L	S 11	S 485
YLR454W	FMP27	K.IEFSEDISpSDFNEM(ox)LK.R	S 9	S 2510
YLR454W	FMP27	K.QLTTYNpSYTEPEELR.-	S 7	S 2620
YLR454W	FMP27	K.SApTDEIPLTPAALNINGK.R	T 3	T 1144
YML072C	TCB3	R.SPSNLNSTSVpTPR.A	T 11	T 1350
YMR110C	HFD1	K.FDLIFYTGpSPR.V	S 9	S 215
YMR110C	HFD1	K.IIEEHDTPLVQYIFSDSQpTEINR.I	T 19	T 408
YMR110C	HFD1	R.RVpSDSSPPFMFGK.T	S 3	S 111
YMR110C	HFD1	R.VpSDSSPPFMFGK.T	S 2	S 111
YMR110C	HFD1	R.VSDSpSPPFM(ox)FGK.T	S 5	S 114
YMR129W	POM152	R.RFYQpSDDEPAEK.I	S 5	S 45
YMR203W	TOM40	R.QpSLELVNPGTVENLNK.E	S 2	S 54
YMR212C	EFR3	R.DNQISpTSDLLSDSQVR.T	T 6	T 565
YMR264W	CUE1	K.FHVDLNEDM(ox)SNLpSFK.D	S 13	S 167
YMR264W	CUE1	K.LQpSDKDLQSLLT.-	S 3	S 194
YNL055C	POR1	K.AKVpSDSGIVTLAYK.Q	S 4	S 238
YNL055C	POR1	K.DFYHApTPAAFDVQTTTANGIK.F	T 6	T 25
YNL055C	POR1	K.DFYHATPAAFDVQp(TT)TANGIK.F	T 14 / T 15	T 33 / T 34
YNL055C	POR1	K.DGPLpSTNVEAK.L	S 5	S 55
YNL055C	POR1	K.LEFANLpTPGLK.N	T 7	T 91
YNL055C	POR1	K.LPNpSNVNIEFATR.Y	S 4	S 215
YNL055C	POR1	K.NELITpSLTPGVAK.S	S 6	S 101
YNL055C	POR1	K.NELITSpLTPGVAK.S	T 8	T 103
YNL055C	POR1	K.QTGLGLTQGWp(SNT)NNLQTK.L	T 13	T 78
YNL055C	POR1	K.VSDpSGIVTLAYK.Q	S 4	S 240
YNL055C	POR1	M.pSPPVYSDISR.N	S 1	S 2
YNL055C	POR1	M.SPPVYpSDISR.N	S 6	S 7
YNL055C	POR1	M.SPPVYSDIpSR.N	S 9	S 10
YNL070W	TOM7	M.SFLPpSFILSDESK.E	S 5	S 6
YNL121C	TOM70	K.ALELKPDYpSK.V	S 9	S 166
YNL121C	TOM70	K.FGDIDpTATApTPTELSTQPAK.E	T 6, T 10	T 228, T 232
YNL121C	TOM70	K.FGDIDpTATATPpTELSTQPAK.E	T 6, T 12	T 228, T 234
YNL121C	TOM70	K.FGDIDpTATATPTELSTQPAK.E	T 6	T 228
YNL121C	TOM70	K.FGDIDTATApTPTELSTQPAK.E	T 10	T 232
YNL121C	TOM70	K.FGDIDTATATPpTELSTQPAK.E	T 12	T 234
YNL121C	TOM70	K.STAPpSNPPIYPVSSNGEPDFSNA.A	S 5	S 69
YNL121C	TOM70	K.STAPSNPPIYPp(SS)NGEPDFSNA.A	S 13 / S 14	S 77 / S 78

ORF	Gen	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein
YNL121C	TOM70	R.NPpTVENFIEATNLLEK.A	T 3	T 520
YNL131W	TOM22	K.DDVVQLDEPQFpSR.N	S 12	S 20
YNL131W	TOM22	M.VELTEIKDDVVQLDEPQFpSR.N	S 19	S 20
YNR002C	ATO2	K.ALDp(SS)EGEFISENNDQSR.H	S 4 / S 5	S 21 / S 22
YNR002C	ATO2	K.ALDSSEGEFpSENNDQSR.H	S 11	S 28
YNR002C	ATO2	M.*pSDREQSSGNTAFENPK.A	S 1	S 2
YNR002C	ATO2	R.HSQEpSICK.I	S 5	S 40
YOL109W	ZEO1	K.EQAEApSIDNLK.N	S 6	S 40
YOL109W	ZEO1	K.EQAEApSIDNLKNEApTPEAEQVK.K	S 6, T 15	S 40, T 49
YOL109W	ZEO1	K.EQAEApSIDNLKNEATPEAEQVK.K	S 6	S 40
YOL109W	ZEO1	K.EQAEASIDNLKNEApTPEAEQVK.K	T 15	T 49
YOL109W	ZEO1	K.LEETKEpSLQNK.G	S 7	S 25
YOL109W	ZEO1	K.NEApTPEAEQVK.K	T 4	T 49
YOL109W	ZEO1	K.NEApTPEAEQVKK.E	T 4	T 49
YOL129W	VPS68	-.*M(ox)EADDHvSLFR.F	S 8	S 8
YOR020W-A	YOR020W-A	K.pSIEGFLNDLEK.D	S 1	S 71
YOR045W	TOM6	-.*MDGMFAMPGAAAGAApSPQQPK.S	S 16	S 16
YOR086C	TCB1	K.AGp(TT)VIGGGVGAIGK.I	T 3 / T 4	T 1146 / T 1147
YOR175C	ALE1	K.DISASpSPNLGGILK.A	S 6	S 513
YOR317W	FAA1	K.DpSSINIENYLEDAK.L	S 2	S 621
YOR374W	ALD4	R.AFpSNGSWNGIDPIDR.G	S 3	S 96
YOR374W	ALD4	R.VYVEEpSIYDK.F	S 6	S 335
YPL186C	UIP4	K.EENKELpSPNFSEQTENK.Q	S 7	S 185
YPL186C	UIP4	K.ELpSPNFSEQTENK.Q	S 3	S 185
YPL186C	UIP4	K.GLDNLpSEGNDNDNTR.V	S 6	S 205
YPL186C	UIP4	K.GNVTFPpSPK.T	S 7	S 140
YPL186C	UIP4	K.TAipSQDGSAFAK.E	S 4	S 146
YPR133W-A	TOM5	-.M(ox)FGLPQQEVpSEEEKR.A	S 10	S 10
YPR155C	NCA2	R.EVAFDpSQQLIQDVR.E	S 6	S 29

Vergleicht man die Lokalisation der in Tab. 5.1 aufgelisteten Phosphopeptide mit einer Studie von Reinders et al. [1] (Abb. 5.2), konnte nicht nur die Gesamtzahl an Phosphopeptiden von 80 auf 126 erhöht sondern auch der Anteil der identifizierten OM-Peptide deutlich vergrößert werden. Circa 30% der 88 in der vorliegenden Arbeit detektierten OM-Phosphopeptide sind dabei von Komponenten des TOM-Komplexes.



**Abbildung 5.2:** Lokalisation der in dieser (a) und in der Studie von Reinders et al. [1] (b) in Hefemitochondrien detektierten Phosphorylierungsstellen. Die Gesamtzahl an Phosphopeptiden konnte von 80 auf 126 erhöht werden, wobei der Anteil der OM-Peptide sich deutlich vergrößerte. Innerhalb der neuen OM-Peptide konnten sogar 25 Phosphopeptide von Komponenten des TOM-Komplexes gefunden werden.

Wie Tabelle 5.2 zu entnehmen ist, sind lediglich 9 der 25 TOM-Phosphorylierungsstellen bereits durch vorherige Studien von Chi et al. [91], Li et al. [94], Albuquerque et al. [90], Gnad et al. [92] oder Holt et al. [93] bekannt, die übrigen 16 Phosphopeptide wurden erstmalig im Rahmen dieser Arbeit detektiert und zum Großteil bereits veröffentlicht [95].

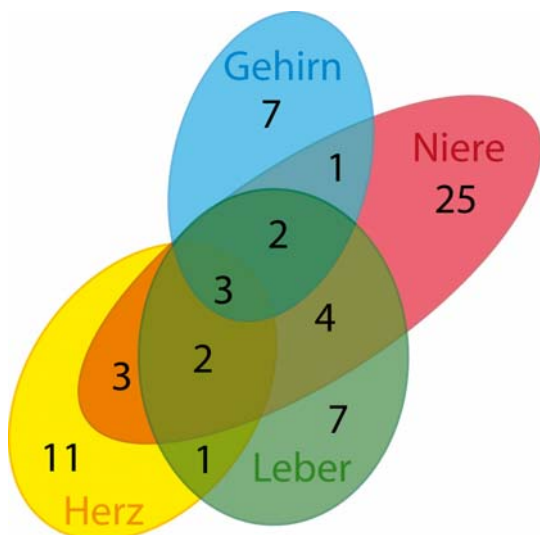
**Tabelle 5.2:** In dieser Arbeit identifizierte TOM-Phosphopeptide aus OMVs oder/und Hefemitochondrien im Vergleich zu vorherigen Studien von Chi et al. [91], Li et al. [94], Albuquerque et al. [90], Gnad et al. [92] und Holt et al. [93]. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. M(Ox) steht für oxidierte Methionine und \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem ist die Position der phosphorylierten Aminosäure sowohl in der Peptid- als auch in der Proteinsequenz angegeben.

RF	Gen	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle(n) Peptid	P-Stelle(n) Protein	Chi et al., 2007	Li et al., 2007	Albuquerque et al., 2008	Gnad et al., 2009	Holt et al., 2009
YGR082W	TOM20	K.AEpSDAVAEANDIDD.-	S 3	S 172			x	x	
YGR082W	TOM20	K.DPIPSDPpSER.E	S 8	S 87					
YGR082W	TOM20	K.GVVGpSKAESDAVAEANDIDD.-	S 5	S 168					
YGR082W	TOM20	K.VTEFLSM(ox)ELAKDPIpSDPpSER.E	S 16	S 84					
YGR082W	TOM20	K.VTEFLSM(ox)ELAKDPIPSDPpSER.E	S 19	S 87					
YNL131W	TOM22	K.DDVVQLDEPQFpSR.N	S 12	S 20					
YNL131W	TOM22	M.VELTEIKDDVVQLDEPQFpSR.N	S 19	S 20					
YMR203W	TOM40	R.QpSLELVNPGTVENLNK.E	S 2	S 54					
YPR133W-A	TOM5	-.M(ox)FGLPQQEVpSEEEKR.A	S 10	S 10					
YOR045W	TOM6	-.*MDGMFAMPGAAAGAApSPQQPK.S	S 16	S 16				x	
YNL070W	TOM7	M.SFLPpSFILSDESK.E	S 5	S 6					
YNL121C	TOM70	K.ALELKPDPpSK.V	S 9	S 166					
YNL121C	TOM70	K.FGDIDpTATApTPELSTQPAK.E	T 6, T 10	T 228, T 232					
YNL121C	TOM70	K.FGDIDpTATATPpTELSTQPAK.E	T 6, T 12	T 228, T 234					
YNL121C	TOM70	K.FGDIDpTATATPELSTQPAK.E	T 6	T 228					
YNL121C	TOM70	K.FGDIDTATApTPELSTQPAK.E	T 10	T 232		x	x	x	
YNL121C	TOM70	K.FGDIDTATATPpTELSTQPAK.E	T 12	T 234			x		
YNL121C	TOM70	K.STAPpSNPPIYPVSSNGEPDFSNK.A	S 5	S 69					
YNL121C	TOM70	K.STAPSNPPIYPp(SS)NGEPDFSNK.A	S 13 / S 14	S 77 / S 78			x		x
YNL121C	TOM70	R.NPpTVENFIEATNLLEK.A	T 3	T 520					x
YHR117W	TOM71	K.AKpSGEGFDYPSLPNGEPDIAQLK.G	S 3	S 96			x		
YHR117W	TOM71	K.pSGEGFDYPSLPNGEPDIAQLK.G	S 1	S 96			x		
YHR117W	TOM71	R.QSEAFAGQNEDEADLKDDGpSVVSGSNK.R	S 20	S 73					
YHR117W	TOM71	R.QSEAFAGQNEDEADLKDDGSVpSGSNK.R	S 23	S 76					
YHR117W	TOM71	R.RQpSEAFAGQNEDEADLK.D	S 3	S 55	x	x	x	x	x

Vergleicht man die aus Mausmitochondrien gewonnenen Phosphopeptide nach ihrem Ursprungsorgan Gehirn, Herz, Leber oder Niere (siehe Tab. 4.7), gibt es unter den insgesamt 66 Phosphopeptiden nur eine geringe Überlappung (siehe Abb. 5.3).

Lediglich die drei Phosphopeptide K.IEDVGpSDEEDDSGKDK.K (Hsp90ab1), R.YGMGTpSVER.A (Pdha1) und M.\*AAAVAAAGAGEPLpSPEELLPK.A (Tom22) konnten in allen Organen gefunden werden. Vier Phosphopeptide wurden in je drei der Organe und neun Phosphopeptide in je zwei Organen identifiziert. Die Mehrheit der Phosphopeptide (50 Peptide) wurde in nur je einem der vier Organe detektiert -

dabei lieferte die Niere 25 dieser P-Sites, gefolgt vom Herz mit 11 und Gehirn/Leber mit jeweils 7 phosphorylierten Peptiden.



**Abbildung 5.3:** Verteilung der identifizierten Phosphorylierungsstellen aus Mausmitochondrien hinsichtlich des Ursprungsorgans. In der Niere wurden 40 Phosphopeptide gefunden, gefolgt von Herz und Leber mit 20 beziehungsweise 19 Phosphopeptiden. Im Gehirn konnten 13 phosphorylierte Peptide detektiert werden. Lediglich die drei Phosphopeptide K.IEDVGpSDEEDDSGKDK.K (Hsp90ab1), R.YGMGTpSVER.A (Pdha1) und M.\*AAAVAAAGAGEPLpSPEELLPK.A (Tom22) finden sich in allen Organen wieder; die Mehrheit der Phosphopeptide (50 von 66 Peptiden) konnte jedoch nur in je einem der vier Organe detektiert werden.

## 5.2 Quantifizierung von Phosphopeptiden

Um ein besseres Verständnis für zelluläre Vorgänge zu gewinnen sowie deren Regulation zu verstehen, spielt neben der qualitativen Identifikation von Phosphorylierungen auch das relative Verhältnis einzelner Proteine beziehungsweise spezifischer Phosphorylierungsstellen eine entscheidende Rolle. Daher wurden für die Quantifizierung von Phosphopeptiden in dieser Arbeit die folgenden drei Ansätze gewählt: SILAC, Messung ohne / mit Phosphatasebehandlung (Phosphatase-Assay) und SRM-Scans mittels synthetischer (Phospho-)Peptide.

### 5.2.1 SILAC

Für die Auswertung der SILAC-Analysen wurden dabei die drei Programme Proteome Discoverer (PD), Mascot Distiller (MD) und MaxQuant (MQ) verwendet, die sich in einigen Punkten deutlich unterscheiden. Während bei PD sämtliche Datenbanksuchen sowohl mittels Sequest als auch mit Mascot durchgeführt wurden, konnte bei MD nur mit Mascot gearbeitet werden und bei MQ wurde sogar ein eigener Suchalgorithmus namens Andromeda, der in das Programm integriert ist, verwendet. Zudem lässt sich in PD und MQ eine *False Discovery Rate* (FDR) von 1%

definieren, die bei PD durch die Suche gegen Decoy Datenbanken erreicht wird, während in MD keine FDR bestimmt werden kann.

Vergleicht man die anhand der drei Programme generierten Proteinlisten fällt auf, dass mit PD sowohl in der + SILAC- als auch in der - SILAC-Probe die meisten Proteine detektiert werden, gefolgt von MQ und schließlich MD. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der Verwendung von zwei Suchalgorithmen bei PD (Mascot und Sequest), die zum Teil komplementäre Ergebnisse erzielen. Neben der unterschiedlichen Anzahl gibt es zudem vereinzelt Proteine, die nur mit einem der drei Programme gefunden werden. Wie zu erwarten war, weist die Mehrheit der aufgelisteten Proteine (Anhang 10.4 und 10.5) keine Regulation auf und für einige regulierte Proteine unterscheidet sich ihre Regulation je nach verwendetem Auswerteprogramm.

Die mittels der drei verschiedenen Anreicherungstechniken insgesamt in den SILAC-Proben detektierten Phosphopeptide sowie die Regulation der jeweiligen Phosphorylierungsstelle im Vergleich zur Regulation des Proteins sind in Tab. 5.3 zusammengefasst. Dabei konnte für einige Phosphopeptide keine eindeutige Regulation festgelegt werden, da die Regulation zum Teil je nach Anreicherungsmethode unterschiedlich war. Ein Vergleich der SILAC - Phosphopeptide mit den SILAC + Phosphopeptiden lieferte die zwei hoch regulierten Peptide ADY2 (YCR010C IYpTGGDNNEYIYIGR) und ATO2 (YNR002C, EQSSGNpTAFENPK) sowie die zwei runter regulierten Peptide VPS13 (YLL040C LAVLDPpSILGER) und ZEO1 (YOL109W EQAEApSIDNLK). Die übrigen in der SILAC + Probe detektierten Phosphopeptide wurden entweder in der - Probe nicht gefunden oder sie verhielten sich in ihrer Regulation identisch zu den SILAC - Phosphopeptiden.

**Tabelle 5.3:** Nach den verschiedenen Anreicherungen in den SILAC-Proben detektierte Phosphopeptide. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank. In der detektierten Peptidsequenz ist die phosphorylierte Aminosäure durch ein vorangestelltes p gekennzeichnet, bei uneindeutigen Phosphorylierungsstellen sind diese in Klammern. M(Ox) steht für oxidierte Methionine und \* weist auf acetylierte N-Termini hin. Zudem sind die Position der phosphorylierten Aminosäure in der Peptidsequenz sowie die Regulation auf Peptidebene im Vergleich zur Proteinebene, sortiert nach dem jeweiligen Auswerteprogramm, angegeben. Uneindeutig regulierte Phosphorylierungsstellen sind rot markiert.

SILAC - (24°C)					
ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation P-Stelle (Vergleich Protein)		
			PD	Distiller	MQ
YCR010C	IYpTGGDNNEYIYIGR	T 3	runter	keine	-----
YOR374W	AFpSNGSWGIDPIDR	S 3	-----	runter	-----
YOR374W	EM(Ox)pSVDALQNYLQVK	S 3	hoch	keine	keine
YOR374W	VAFTGSpTATGR	T 7	hoch	hoch	-----
YER069W	RSpSIGEFPSADALR	S 3	keine = hoch	runter = keine	-----
YNR002C	*pSDREQSSGNTAFENPK	S 1	-----	keine = runter	-----
YNR002C	ALDp(SS)EGEFISENNDQSR	S 4/S 5	keine = runter	keine = runter / hoch	-----
YNR002C	EQp(SSGNT)AFENPK	S 3/S 4/T 7	keine = runter	keine = runter	keine = runter
YNR002C	HSQEpSICK	S 5	keine = runter	keine = runter	keine = runter
YDR384C	Tp(SS)ASSPQDLEK	S 2/S 3	hoch	hoch = keine	hoch = keine
YDR384C	TSSApSSPQDLEK	S 5	-----	keine = runter	keine = runter
YMR212C	DNQIpSTSDLLSDSQVR	S 5	runter	keine	-----
YBR269C	NDIGSpSPEFSK	S 7	-----	keine	hoch
YLR259C	QIENAGEEGpSVIIGk	S 11	runter	keine	keine
YNL037C	DIGGSSpSTTDFTNEIINK	S 7	-----	runter	keine
YKL217W	*SSpSITDEKISGEQQQPAGR	S 3	-----	hoch	-----
YKL217W	*SSSITDEKIpSGEQQPAGR	S 10	-----	hoch	-----
YKL217W	IpSGEQQPAGR	S 2	-----	hoch	-----
YKL217W	M(Ox)IDSNVpSKTYEEHIETV	S 7	-----	hoch	hoch
YAL010C	GFQESLpSDDEK	S 7	hoch // runter	hoch	hoch // runter
YJL096W	pSKGDLTILR	S 1	-----	runter	-----
YGR086C	APp(TAS)QLQNPPPPSTTK	T 3/S 5	hoch	hoch	hoch
YNL055C	NELITSLpTPGVAK	T 8	hoch	hoch	hoch
YDR233C	TKPYLDKVEpSK	S 10	-----	hoch	hoch = keine
YNL131W	DDVVQLDEPQFpSR	S 12	-----	hoch	-----
YNL131W	VELTEIKDDVVQLDEPQFpSR	S 19	-----	hoch	-----
YNL070W	SFLPpSIFILSDESK	S 5	-----	hoch	-----
YNL121C	ALELKPDYpSK	S 9	-----	hoch	keine
YML013W	ASHsETLPSQR	S 4	runter	-----	-----
YPL186C	GLDNLpSEGNDNDNTR	S 6	runter	runter	-----
YLL040C	LAVLDPpSILGER	S 7	-----	hoch	-----
YKL187C	KGEIYTYGDGSAIpSADR	S 14	runter	runter	-----



ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation P-Stelle (Vergleich Protein)		
			PD	Distiller	MQ
YMR031C	*pSLISAVEDR	S 1	-----	hoch	-----
YOL109W	EQAEApSIDNLK	S 6	hoch	hoch	hoch // keine
YOL109W	EQAEApSIDNLKNEApTPEAEQVK	S 6, T15	hoch	keine	-----
YOL109W	EQAEASIDNLKNEApTPEAEQVK	T 15	hoch	hoch // keine	-----
YOL109W	LEETKEpSLQNK	S 7	hoch	hoch	hoch
YOL109W	NEApTPEAEQVK(K)	T 4	hoch	hoch // keine	hoch // keine
<b>SILAC + (37°C)</b>					
ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation P-Stelle (Vergleich Protein)		
			PD	Distiller	MQ
YCR010C	IYpTGGDNNEYIYIGR	T 3	keine	keine = hoch	-----
YNR002C	*pSDREQSSGNTAFENPK	S 1	-----	runter	-----
YNR002C	ALDSSEGEFipSENNDQSR	S 11	keine = runter	runter	-----
YNR002C	ALDp(SS)EGEFISENNDQR	S 4/S 5	keine = runter	keine	-----
YNR002C	*SDREQSpSGNTAFENPK	S 7	-----	hoch	-----
YNR002C	EQSSGNpTAFENPK	T 7	-----	hoch	hoch = keine
YDR384C	TSpSASSPQDLEK	S 3	hoch	hoch	hoch = keine
YPL217C	DEpSDIEEDVDDDFFR	S 3	hoch	hoch	-----
YER026C	DENDGYASDEVGGTLsR	S 16	hoch	hoch	-----
YOL059W	SDpSAVSIVHLK	S 3	-----	hoch	-----
YLR259C	QIENAGEEGpSVIIGK	S 11	-----	runter = keine	runter
YKL217W	YINQVEEYeadGLpSISDIVEQK	S 14	keine = runter	hoch = keine	hoch = keine
YKL217W	VYpSQDQGVVEEEDDKPNLSAASIK	S 3	-----	keine = runter	keine = runter
YJL094C	SVDDVDTNLpSVIDEK	S 10	runter	runter	-----
YOR142W	M(Ox)GHpSGAIVEGSGTDAESK	S 4	hoch	keine	hoch
YLR219W	RLpSTSSAAPPTSR	S 3	hoch	hoch	-----
YAL010C	GFQEpSLSDDEK	S 5	hoch	-----	-----
YAL010C	GFQESLpSDDEK	S 7	hoch	hoch	hoch
YDR033W	APVApSPRPAATPNLSK	S 5	keine = hoch	runter	-----
YDR033W	APVApSPRPAAp(TPNLS)K	S5, T 11/S 15	-----	runter	-----
YDR033W	APVASPRPAApTPNLSK	T 11	-----	runter	-----
YJL096W	pSKGDLTILR	S 1	runter	runter	-----
YPR155C	EVAFDpSQQLIQDVR	S 6	-----	runter	-----
YDR150W	WNCVpSNEELQAEVK	S 5	hoch	hoch	hoch = keine
YGR178C	p(SGS)NISQQQSSTGHTTR	S 1/S 3	hoch	hoch	-----
YGR178C	ALEDDSApSWDQFAVNEK	S 8	hoch	hoch	-----
YGR178C	VADSGVSDpSVDDLAK	S 9	hoch	hoch	hoch
YER178W	YGGHpSMSDPGTTYR	S 5	runter	runter	-----
YNL055C	NELITSLpTPGVAK	T 8	-----	hoch	-----
YGR253C	EKEAAEpSPEEADVEMS	S 7	hoch	hoch	hoch
YFL005W	EGNISINpSGSGNSSK	S 8	runter	keine	runter
YDR011W	EQFSSep(SS)GANDEVFDDLEAK	S 7/S 8	hoch	hoch	hoch
YMR107W	RSp(SIGSQDS)SDVEDVKEGR	S 3/S 9	hoch	hoch	-----
YGR082W	GVVGSKAepSDAVAEANDIDD	S 9	runter	runter	runter
YNL131W	DDVVQLDEPQFpSR	S 12	-----	hoch	-----

ORF	Sequenz * = N-terminal acetyliert	P-Stelle (Peptid)	Regulation P-Stelle (Vergleich Protein)		
			PD	Distiller	MQ
YNL121C	ALELKPDYpSK	S 9	-----	hoch	-----
YPL186C	GLDNLpSEGNDNDNTR	S 6	runter	runter	runter
YLL040C	LAVLDPpSILGER	S 7	keine = runter	keine = runter	-----
YKL187C	KGEIYTYGDGSAIpSADR	S 14	runter	runter	-----
YFL038C	ESM(Ox)pSQQLNETTQK	S 4	hoch	-----	hoch = keine
YBR054W	KAQEEEEEDVATDpSE	S 13	keine = hoch	-----	hoch = keine
YBR054W	KAQEEEEEDVApTDSE	T 11	hoch	hoch	hoch = keine
YOL109W	EQAeApSIDNLK	S 6	runter	keine	keine
YOL109W	LEETKEpSLQNK	S 7	hoch	hoch	hoch

### 5.2.2 Phosphatase-Assay

Im Verlauf dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass durch Zugabe einer Phosphatase Phosphopeptide vollständig dephosphoryliert werden können. Jedoch konnten trotz Einsatz von gezielten *inclusion list*-Scans aus einer komplexen mitochondrialen Probe außer den zugegebenen Peptiden keine weiteren Phosphopeptide detektiert werden. Durch die Verwendung von mehr Mitochondrienlysat könnte die Messung gegebenenfalls verbessert werden, falls die verwendete Probenmenge nicht ausreichend war, wobei dabei eine Überladung der Säule dringend zu vermeiden ist. Eventuell sollten auch noch wesentlich mehr sukzessive Messungen vorgenommen werden, um daraus umfassendere kombinierte *inclusion lists* zu erstellen.

Wu et al. [196] beschreiben zudem eine weiterführende Methode zur absoluten Bestimmung der Stöchiometrie von Phosphorylierungsstellen, die auf einer Kombination aus Phosphatasebehandlung und stabil-Isotopen Markierung beruht. Dabei werden die freien Amine einer Hälfte einer Peptidprobe nach Phosphatasebehandlung mit  $^2\text{H}$ -Formaldehyd reaktiv dimethyliert [197], während der unbehandelte Anteil mit Formaldehyd chemisch modifiziert wird. Werden die beiden Proben anschließend wieder vereint, weisen alle Peptide, die von der Phosphatasebehandlung nicht betroffen sind, eine 1:1 Rate auf. Nach chromatographischer Auftrennung mittels HILIC und LC-MS/MS-Analyse lassen sich aus der großen Anzahl detektierter Peptide ehemalige Phosphopeptide leicht identifizieren, da bei diesen die Intensität der schweren Peptidvariante höher ist als

---

die ko-eluierende leichte Variante. Durch Vergleich dieser Peptididentifikationen mit bereits veröffentlichten Phosphopeptiddatenbanken ist es schließlich möglich die Phosphorylierungsstellen auszusortieren, für die die Stöchiometrien bestimmt werden können. Eine Validierung dieser Daten kann beispielsweise mittels AQUA (absolute Quantifizierung) [198] erfolgen.

### 5.2.3 SRM-Scans

Die Ergebnisse des *proof-of-principle*-Experimentes mit synthetischen Peptiden und SRM-Scans zeigen, dass die Methodik prinzipiell zur Quantifizierung verwendet werden kann, jedoch ist für eine präzise Quantifizierung eine Mehrfachmessung empfehlenswert. Aufgrund der Synthese von Peptiden und anschließender ASA ist sie jedoch etwas aufwändiger als die übrigen Quantifizierungsmethoden. Durch die Zugabe der Peptide zu 1 µg mitochondrialem Hintergrund konnten die durch die SRM-Übergänge festgelegten Peaks eindeutiger aus dem Hintergrund den entsprechenden mitochondrialen Peptiden A1 - A6 zugeordnet werden, was gerade bei geringen Peptidmengen einen großen Vorteil gegenüber einer normalen SRM-Messung einer komplexen Probe hat. Die bereits hohe Sensitivität der SRM-Messung wurde durch die Verwendung der Retentionszeit in Form von scheduled SRMs zusätzlich verstärkt, da die Anzahl an simultan überwachten SRM-Übergängen reduziert wird, und führte zu einer höheren Reproduzierbarkeit und einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis [199].

Allerdings wiesen die hier durchgeführten Messungen zum Teil eine hohe Abweichung auf, da zum einen bei fast allen Peptiden die Messung aus 1 µg Mitochondrien (Tab. 4.14 „1 µg Mito“) einen höheren Wert ergab als die Proben mit 0,25 fmol in 1 µg mitochondrialem Hintergrund (Tab. 4.14 „1 µg Mito + x fmol“). Zum Teil waren diese Werte sogar höher als 0,5 fmol in 1 µg mitochondrialem Hintergrund. Zudem schienen sich während der Messungen die Peptide auf der Säule zu akkumulieren, da alle Werte des zweiten Replikates deutlich höher waren als die der ersten Messung. Diese Schwankungen sowie ungenaue Kalibrierkurven der Peptide könnten auch den Unterschied der berechneten Peptidmengen zwischen der Messung von lediglich 1 µg Mitochondrien und der Messung nach Zugabe von Peptiden zu 1 µg mitochondrialem Hintergrund (siehe Tab. 4.16) erklären.

---

Um die Genauigkeit der Messmethode zu verbessern, sollten zukünftig zur Erzeugung der Kalibriergeraden für jede Konzentration mehrere Messpunkte verwendet werden und der Einsatz mehrerer Replikate in mitochondrialem Hintergrund würde zudem eventuelle Messfehler bei der Berechnung nicht mehr so stark bemerkbar machen. Durch Verringerung der Abstände zwischen den einzelnen verwendeten Peptidmengen oder durch Variation hin zu einem niedrigeren atmol-Bereich könnte die Sensitivität zusätzlich erhöht werden.

### 5.3 Dateninterpretation

Für die Datenauswertung und Validierung der erhaltenen Proteinergebnisse sowie der angezeigten Phosphopeptide wurden sowohl Target/Decoy-Datenbanken [200] verwendet als auch die Spektren manuell validiert [150]. Als Kriterien für eine positive Phosphopeptid-Identifikation wurden dabei folgende Punkte vorausgesetzt: (1) mindestens zwei signifikante Peptide pro Proteinidentifikation, (2) ein Mascot Score von mindestens 30 ( $p\text{-Value} \leq 0,05$ ), (3) ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis, v.a. für Ionen, die für die Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle entscheidend sind, (4) eine korrekte Annotation der prominenten Ionen (*b*-/*y*-Ionen, NL-Signale), (5) eine gute Verteilung der Signale über den gesamten *m/z*-Bereich mit *b*-/*y*-Ionenserien (Sequenzabdeckung) und (6) die Überprüfung der Lokalisation der von Mascot angegebenen P-Site anhand von z.B. NL-Signalen. Spektren, die nicht mit diesen Kriterien übereinstimmten, wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt.

### 5.4 Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen

Bei einigen Peptiden erweist sich eine genaue Zuordnung des modifizierten Aminosäurerestes als schwierig beziehungsweise uneindeutig, v.a. in Peptiden mit benachbarten Ser-/Thr-Resten [114]. Daher ist es für eine korrekte P-Site-Annotierung unumgänglich entweder mehrere Suchalgorithmen zu verwenden und die Ergebnisse abzugleichen [114] oder die Spektren manuell zu validieren. Zudem kann der Einsatz von alternativen Fragmentierungsarten zu CID wie MSA, HCD, oder ETD für Phosphopeptide von Vorteil sein, da die unterschiedliche Fragmentierung zu einer besseren Sequenzabdeckung und somit zu einer genaueren Bestimmung der Phosphorylierungsstelle führen kann [114].

Eine weitere Möglichkeit zur Verifizierung von Phosphorylierungsstellen bietet das Ranking der MaxQuant 1.1.1.25 *Phospho Probabilities* [193], das jedoch nur für hochaufgelöste Daten verwendet werden kann und nicht immer alle MS/MS-Spektren identifiziert. Wie bei Schmidt et al. [95] beschrieben wurde, konnte für die meisten der in dieser Arbeit detektierten TOM-Phosphorylierungsstellen ein MaxQuant *Phospho Probabilities*-Wert von  $\geq 0,9$  bestimmt werden, was die eindeutige Identifizierung der entsprechenden P-Site bestätigt. Dabei ist „eindeutig“ lediglich als eine mit  $\geq 0,9$  sehr wahrscheinliche Einstufung im Rahmen der Berechnung durch den Lokalisationsalgorithmus zu betrachten.

## 5.5 Relevanz der Phosphorylierungsanalytik

### 5.5.1 Proteinidentifikation durch peptid-orientierte Analysen

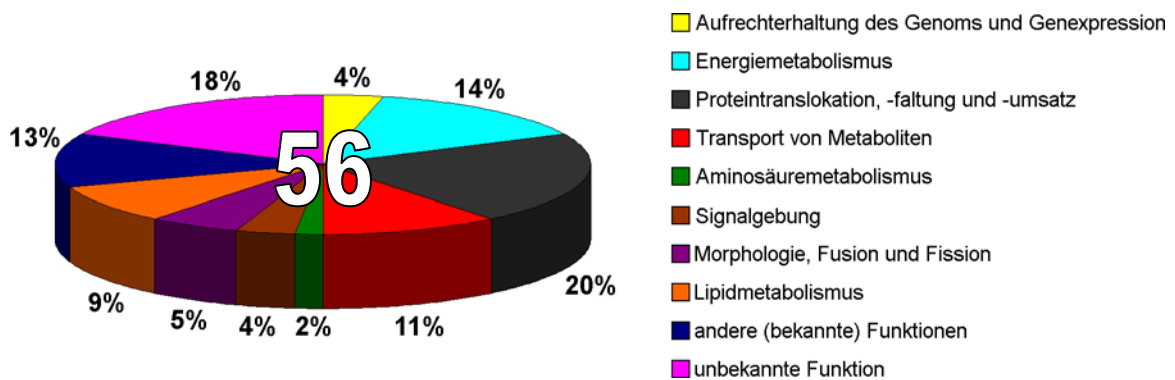
Die verschiedenen, in dieser Arbeit beschriebenen Anreicherungsstrategien für Phosphopeptide ermöglichen eine peptid-orientierte Identifikation der mitochondrialen Proteine. Dies verringert die Komplexität der Proben, da die Zahl der hoch abundanten Proteine reduziert wird, und erlaubt somit die Detektion von niedrig abundanten Proteinen mittels massenspektrometrischer Analysen. Unter den 126 in OMVs oder/und Hefemitochondrien detektierten Phosphopeptiden (Tab. 5.1) findet sich beispielsweise das niedrig abundante [201], in der mitochondrialen OM lokalisierte Protein YKL027W, dessen molekulare Funktion bisher allerdings unbekannt ist.

Betrachtet man die in Tab. 5.4 aufgelistete und in Abb. 5.4 dargestellte funktionelle Zugehörigkeit der identifizierten 56 Proteine, lassen diese sich mit 20% hauptsächlich in den Bereich Proteintranslokation, -faltung und -umsatz einordnen. Dabei sind, mit Ausnahme von HSP60, alle Proteine dieses Funktionsbereiches Bestandteile mitochondrialer Transportkomplexe - vorwiegend des TOM-Komplexes -, was sich auf die Fokussierung auf die mitochondriale OM während der Durchführung dieser Arbeit zurückführen lässt. Zudem liegen auch einige Proteine des Energiemetabolismus (14%) und des Transports von Metaboliten (11%) in phosphorylierter Form vor.

**Tabelle 5.4:** Funktionelle Klassifizierung der Proteine der Phosphorylierungsanalysen von OMVs oder/und Hefemitochondrien. Angegeben sind die Open reading frames (ORFs), Gennamen und die Proteinbeschreibungen entsprechend der SGD-Datenbank. Die funktionelle Klassifizierung erfolgte analog zu Sickmann et al. [27] beziehungsweise gemäß der Angaben bei SGD. Funktionelle Klassifizierung: a, Aufrechterhaltung des Genoms und Genexpression; b, Energiemetabolismus; c, Proteintranslokation, -faltung und -umsatz; d, Transport von Metaboliten; e, Aminosäuremetabolismus; f, Signalgebung; g, Morphologie, Fusion und Fission; h, Lipidmetabolismus; i, andere (bekannte) Funktionen; k, unbekannte Funktion.

ORF	Gen	Protein	Funktionelle Klassifizierung
YAL010C	MDM10	Bestandteil des ERMES- und des SAM-Komplexes	c
YBR039W	ATP3	Gamma Untereinheit der ATP-Synthase	b
YBR054W	YRO2	-----	k
YBR106W	PHO88	Protein ist an Transport von anorganischem Phosphat beteiligt	d
YBR177C	EHT1	Alkoholacyltransferase	h
YDR148C	KGD2	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase E2 Komponente (Vorläufer)	b
YDR326C	YSP2	Protein ist an programmiertem Zelltod beteiligt	i
YDR470C	UGO1	Protein ist an mitochondrialer Fusion beteiligt	g
YDR508C	GNP1	hoch-affine Glutaminpermease / Aminosäuretransporter	d
YER026C	CHO1	Phosphatidylserinsynthase	h
YER140W	YER140W	putatives Protein	k
YFL005W	SEC4	GTPase der Rab-Familie	f
YFL038C	YPT1	GTPase der Rab-Familie	f
YGL219C	MDM34	Bestandteil des ERMES-Komplexes	c
YGR082W	TOM20	Bestandteil der Translokase der OM	c
YGR086C	PIL1	Primärer Bestandteil der Eiosomen	i
YGR181W	TIM13	Bestandteil der Translokase der IM	c
YGR244C	LSC2	Beta Untereinheit der Succinyl-CoA Ligase	b
YHR083W	SAM35	Bestandteil des SAM-Komplexes	d
YHR117W	TOM71	Bestandteil der Translokase der OM	c
YIL094C	LYS12	Homoisocitrat-Dehydrogenase	e
YIL136W	OM45	mitochondriale OM 45 kDa	k
YIL155C	GUT2	Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase	b
YJL112W	MDV1	Protein wird für die Fission benötigt	g
YJR048W	CYC1	Cytochrom C	b
YJR121W	ATP2	Beta Untereinheit der ATP-Synthase	b
YKL027W	YKL027W	-----	k
YKL150W	MCR1	NADH-Cytochrom B5 Reduktase (Vorläufer)	i
YKL187C	YKL187C	putatives Protein	k
YKL217W	JEN1	Monocarboxylat/Protonen-Symporter	d
YKR036C	CAF4	Protein assoziiert mit CCR4	a
YLR203C	MSS51	Translationsaktivator für die mitochondriale COX1 mRNA	a
YLR259C	HSP60	Hitzeschock-Protein 60	c

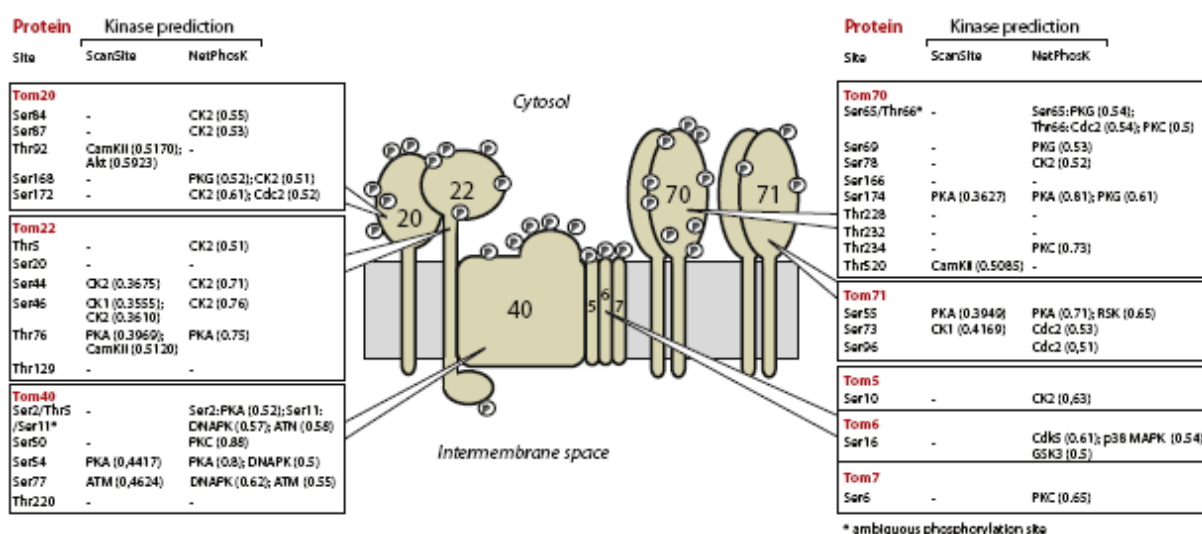
ORF	Gen	Protein	Funktionelle Klassifizierung
YLR454W	FMP27	putatives Protein	k
YML072C	TCB3	Lipid-bindendes Protein	i
YMR110C	HFD1	putative Aldehyddehydrogenase für langkettige Fettsäuren	h
YMR129W	POM152	Kernmembranporen-Glykoprotein	i
YMR203W	TOM40	Bestandteil der Translokase der OM	c
YMR212C	EFR3	Protein wird für die Sporulation benötigt	g
YMR264W	CUE1	Protein rekrutiert das lösliche Ubiquitinkonjugierende-Enzym UBC7 zur Membran	k
YNL055C	POR1	Porin 1, mitochondriales OM-Protein	d
YNL070W	TOM7	Bestandteil der Translokase der OM	c
YNL121C	TOM70	Bestandteil der Translokase der OM	c
YNL131W	TOM22	Bestandteil der Translokase der OM	c
YNR002C	ATO2	Export von Ammoniak	d
YOL109W	ZEO1	-----	i
YOL129W	VPS68	Vakuoläre Proteinsortierung	k
YOR020W-A	YOR020W-A	putatives Protein	k
YOR045W	TOM6	Bestandteil der Translokase der OM	c
YOR086C	TCB1	Lipid-bindendes Protein	i
YOR175C	ALE1	Acyltransferase für Lysophosphatidyl-Ethanolamin	h
YOR317W	FAA1	Acyl-CoA Synthetase für langkettige Fettsäuren	h
YOR374W	ALD4	mitochondriale Aldehyddehydrogenase	b
YPL186C	UIP4	Protein interagiert mit ULP1	k
YPR133W-A	TOM5	Bestandteil der Translokase der OM	c
YPR155C	NCA2	Nuclear Control of ATPase 2	b



**Abbildung 5.4:** Funktionszugehörigkeit der 56 Proteine der Phosphorylierungsanalysen entsprechend Tabelle 5.4. Die Phosphoproteine verteilen sich hauptsächlich auf die Funktionsbereiche Proteintranslokation, -faltung und -umsatz (20%), Energiemetabolismus (14%) und Transport von Metaboliten (11%). Für 18% der Proteine ist bisher keine funktionelle Klassifizierung möglich und 13% weisen eine andere als die hier explizit aufgelisteten Funktionen auf.

### 5.5.2 Biologische Relevanz von Phosphorylierungsstellen

In dieser Arbeit konnten in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* an 56 Proteinen 126 Phosphopeptide identifiziert werden. Darunter wurden 16 bisher unbekannte und nicht experimentell belegte P-Sites des TOM-Komplexes gefunden. Die genaue Kenntnis der Phosphorylierungsstelle(n) ermöglicht die funktionelle Studie dieser Proteine. Einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit sowie in früheren Mitochondrien-Studien gefundenen TOM-Phosphorylierungsstellen bietet die nachfolgende Abbildung aus Schmidt et al. [95].



**Abbildung 5.5:** Übersicht der TOM-Phosphorylierungsstellen nach Schmidt et al. [95].

Schmidt et al. [95] konnten nachweisen, dass Biogenese und Funktion des TOM-Komplexes über Phosphorylierung durch cytosolische Kinasen, insbesondere Casein Kinase 2 (CK2) und Proteinkinase A (PKA), reguliert werden. Während CK2 den Rezeptor Tom22 und das Importprotein Mim1 phosphoryliert und dadurch den mitochondrialen Proteinimport stimuliert, inhibiert PKA unter nicht-respiratorischen Konditionen durch Phosphorylierung die Rezeptoraktivität von Tom70 und verhindert den Import von mitochondrialen Metabolit-Carrier-Proteinen [95]. Wie diese Forschungsergebnisse zeigen, eignet sich die Studie von Hefemitochondrien, um den mitochondrialen Transportprozess sowie damit zusammenhängende fundamentale biochemische Prozesse in Eukaryoten zu entschlüsseln.

Um Rückschlüsse von Transportprozessen in Hefe auf höhere Eukaryoten ziehen zu können und eventuell konservierte mitochondriale Phosphorylierungsstellen



aufzuzeigen, wurde von den TOM-Proteinen Tom22 und Tom70, die sowohl in Hefe-, Maus- als auch in humanen Mitochondrien detektiert werden konnten, ein Sequenzalignment mit ClustalW 2.1 durchgeführt.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Q9NS69|TOM22_HUMAN      ----MAAAVAAGAGEP-QSPDELLPKGDAEKPEEELEEDDDE-----ELDEYLSE 46
Q9CPQ3|TOM22_MOUSE     ----MAAAVAAGAGEP-LSPEELLPKAEAEKAELEEEDDD-----ELDETLSE 46
YNL131W_YEAST_TOM22    MVELEEIKDDVVQLDEPQFSRNQAIVEEKASATNNDVVDDEDDSSDFEDEFDENETLLD 60
                        ..  .*  *  *  :  :  :  .  *  .  :  :  :  :  *  *  *  :  :  :  *  *  *  :
                        :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

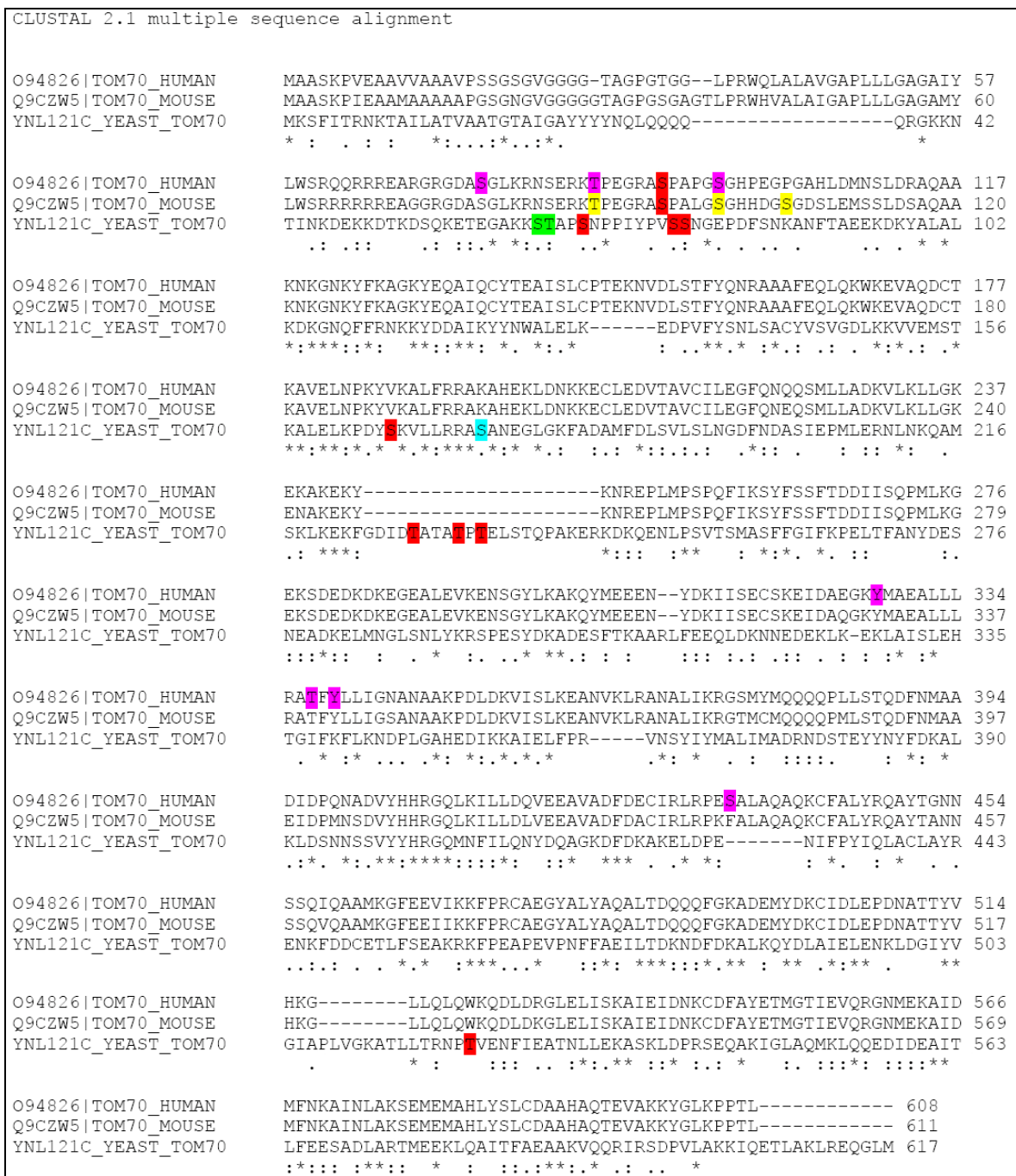
Q9NS69|TOM22_HUMAN      RLWGLTEMFPERVRSAAAGATFDLSLFVAQKMYRFSRAALWIGTTSFMILVLPVVFETEKL 106
Q9CPQ3|TOM22_MOUSE     RLWGLTEMFPERVRSAAAGATFDLSLFVAQKMYRFSRAALWIGTTSFMILVLPVVFETEKL 106
YNL131W_YEAST_TOM22    RIVALKDIVPPGKRQISNFFGFTSSFVRNAFTKSGNLAWTLTTTALLLVPLSLS---I 117
                        *  :  .  *  :  :  *  :  :  :  :  :  :  *  *  *  *  *  *  *  *  :  :  :  :
                        *  :  .  *  :  :  *  :  :  :  :  :  :  *  *  *  *  *  *  *  *  :  :  :  :

Q9NS69|TOM22_HUMAN      QMEQQQLQQRQILLGPNTG--LSGGMPGALPSLPGKI 142
Q9CPQ3|TOM22_MOUSE     QMEQQQLQQRQILLGPNTG--LSGGMPGALPPLPGKM 142
YNL131W_YEAST_TOM22    LAEQQLIEMEKFDLQSDANNILAQGEKDAATAN--- 152
                        ***  :  :  :  *  :  :  :  *  :  *  .  *  .  .

```

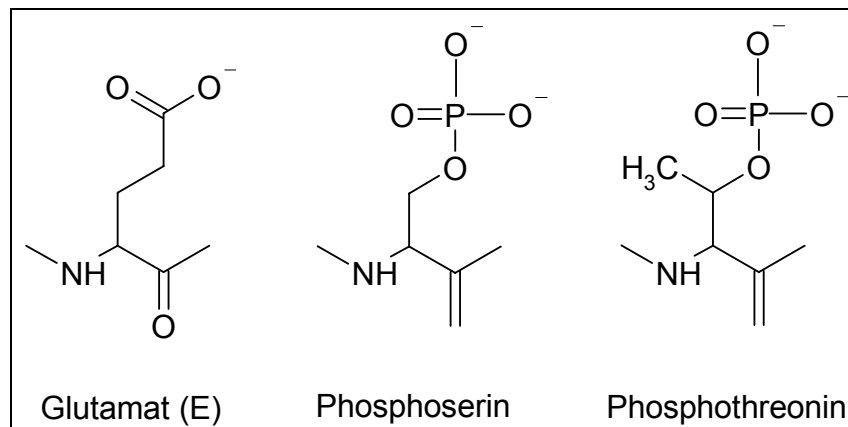
**Abbildung 5.6:** Sequenzalignment der humanen, murinen und Hefesequenz von Tom22. Der Stern (\*) steht für eine vollständig konservierte Aminosäure, ein Doppelpunkt (:) bezeichnet Aminosäuren die sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen und mit einem Punkt (.) gekennzeichnete Aminosäuren besitzen nur eine relativ geringe Ähnlichkeit. Phosphorylierungsstellen, die im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurden, sind rot markiert. Grün unterlegte zusätzliche P-Stellen stammen aus Schmidt et al. [95], die rosa markierte aus Dephoure et al. [202] und die gelbe aus Huttlin et al. [203].

Die sowohl in humanen als auch murinen Mitochondrien detektierte Tom22-Phosphorylierungsstelle S 15 ist identisch mit der Hefe-P-Stelle S 20 (Abb. 5.6 rot markierte Aminosäuren), was ein Hinweis auf eine eventuell evolutionär konservierte Funktion dieser P-Stelle ist. Die humane Phosphorylierungsstelle T 43 [202] ist potentiell sowohl im murinen Tom22 als auch in Hefe als T 57 vorhanden, wurde in diesen beiden Organismen jedoch bisher noch in keiner Studie in phosphorylierter Form gefunden. Ebenso ist die in Hefe identifizierte Tom22-Phosphorylierungsstelle T 76 [95] interessant, da in Mensch und Maus diese Aminosäure durch die mimetisch dauerhaft dephosphorylierte Tyrosin-Variante in Form von Alanin (A 62) ausgetauscht wurde. Dies könnte bedeuten, dass im Verlauf der Evolution eine Phosphorylierung dieser P-Stelle nur selten benötigt wurde und daher, um die Energie für Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungszyklen zu sparen, ein Austausch gegen das nicht-phosphorylierbare Alanin vorgenommen wurde.



**Abbildung 5.7:** Sequenzalignment der humanen, murinen und Hefesequenz von Tom70. Der Stern (\*) steht für eine vollständig konservierte Aminosäure, ein Doppelpunkt (:) bezeichnet Aminosäuren die sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen und mit einem Punkt (.) gekennzeichnete Aminosäuren besitzen nur eine relativ geringe Ähnlichkeit. Phosphorylierungsstellen, die im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurden, sind rot markiert. Grün unterlegte zusätzliche P-Stellen stammen aus Schmidt et al. [95], die hellblau markierte aus Chi et al. [91] und Albuquerque et al. [90], die rosa unterlegten aus verschiedenen Veröffentlichungen über humane Zellen [204-211] und die gelben aus Veröffentlichungen über Phosphorylierung in der Maus [203, 212-216].

Die humane Tom70-Phosphorylierungsstelle S 75 [209-210] findet sich in der Maus als potentielle P-Stelle S78 wieder, während in der Hefe an der entsprechenden Stelle ein phospho-mimetisches Glutamat ist (E 60), das strukturelle Ähnlichkeiten zu Phosposerin und Phosphothreonin aufweist (Abb. 5.8).



**Abbildung 5.8:** Strukturformel von Glutamat, Phosposerin und Phosphothreonin.

Analog zum Phosposerin S 69 in Hefe existieren im humanen Tom70 T 85 [205-206, 209-210] und in der Maus T 88 [213]. Ebenso befinden sich im Menschen mit S 91 und T 96 [204] / in der Maus mit S 94 und S 99 [203, 212] vergleichbare Phosphorylierungsstellen zu den in Hefe detektierten Stellen S 77 und S 78 (siehe Abb. 5.7).

Um die Funktion von Phosphorylierungen, die sich in den drei Sequenzen von Mensch, Maus und Hefe an ähnlicher oder identischer Stelle befinden, und deren evolutionsbedingte Homologie zu verstehen, können Studien mit phospho-mimetischen Proteinmutanten wie bei Schmidt et al. [95] aufschlussreich sein.

## **5.6 Ausblick**

Obwohl diese Arbeit eine umfangreiche Analyse des mitochondrialen Phosphoproteoms aus unterschiedlichen Organismen darstellt und auch einige zuvor unbekannte Phosphorylierungsstellen detektiert werden konnten, hat sich gezeigt, dass die einzelnen Anreicherungsstrategien jeweils spezifisch für Mitochondrien optimiert werden müssen, um die Ausbeute an Phosphopeptiden zu maximieren. Dabei sollten neben einer geeigneten Anreicherungsmatrix zu Probe Verhältnis sowohl die Binde- als auch die Elutionsbedingungen im Fokus stehen. Neben der qualitativen Analyse von Phosphorylierungsstellen wurden erste Ansätze zur quantitativen Bestimmung von Phosphopeptiden gezeigt, die jedoch für zukünftige Analysen auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft und bezüglich Sensitivität optimiert werden sollten. Ebenso gilt es die optimalen Einstellungen für die Messung und (quantitative) Auswertung von Phosphoproteinen/-peptiden zu evaluieren. Der Einsatz gezielter Kinase- oder Phosphatase Mutanten, wie der hier verwendeten temperatursensitiven CK2-Kinase Mutante, ermöglicht zudem eine gezielte differentielle Analyse des Hefe-Mitochondrienproteoms und kann beispielsweise einen Aufschluss über den Zusammenbau und die Funktionsweise des mitochondrialen Transportsystems bieten. Basierend auf diesem Verständnis wird es schließlich möglich sein den Zusammenhang zwischen mitochondrialen Dysfunktionen und bestimmten Erkrankungen erkennen und analysieren zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Reinders, J., K. Wagner, R.P. Zahedi, D. Stojanovski, B. Eyrich, M. van der Laan, P. Rehling, A. Sickmann, N. Pfanner, and C. Meisinger, *Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(11): p. 1896-906.
2. Wiesner, R.J., J.C. Ruegg and I. Morano, *Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **183**(2): p. 553-9.
3. Attardi, G. and G. Schatz, *Biogenesis of mitochondria*. Annu Rev Cell Biol, 1988. **4**: p. 289-333.
4. Bereiter-Hahn, J. and M. Voth, *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. Microsc Res Tech, 1994. **27**(3): p. 198-219.
5. Schrader, J., M. Kelm, *Das Herz*, in *Physiologie*, H.-C.P. Rainer Klinke, Stefan Silbernagel, Editor. 2005, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 147.
6. Jakobs, S., *Mitochondrien - Kraftwerke der Zelle*. MPIBPC News, Research Group of Mitochondrial Structure and Dynamics, MPI for biophysical chemistry, Max Planck Society, 2004(12): p. 1-4.
7. Jakobs, S., A.C. Schauss and S.W. Hell, *Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen*. FEBS Lett, 2003. **554**(1-2): p. 194-200.
8. *mitochondrion: internal structure*. [Art]. 1998 [cited 2011 2nd Feb]; Encyclopædia Britannica Online]. Available from: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/17869/Mitochondrion-cut-longitudinally>.
9. Vogel, G. and H. Angermann, *dtv-Atlas Biologie*. 4 ed. dtv-Atlas Biologie. Vol. 1. 1990, München: Deutscher Taschenbuch Verlag.
10. Saraste, M., *Oxidative phosphorylation at the fin de siecle*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1488-93.
11. Berg, J.M., J.L. Tymoczko and L. Stryer, *Biochemie*. 5 ed. 2003, Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
12. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. Nature, 1961. **191**: p. 144-8.

13. Reichert, A.S. and W. Neupert, *Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 41-9.
14. Lill, R. and G. Kispal, *Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(8): p. 352-6.
15. Muhlenhoff, U. and R. Lill, *Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1459**(2-3): p. 370-82.
16. Bernardi, P., L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli, and F. Di Lisa, *Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues*. Eur J Biochem, 1999. **264**(3): p. 687-701.
17. Frohlich, K.U., H. Fussi and C. Ruckenstuhl, *Yeast apoptosis--from genes to pathways*. Semin Cancer Biol, 2007. **17**(2): p. 112-21.
18. Mignotte, B. and J.L. Vayssiere, *Mitochondria and apoptosis*. Eur J Biochem, 1998. **252**(1): p. 1-15.
19. Sagan, L., *On the origin of mitosing cells*. J Theor Biol, 1967. **14**(3): p. 255-74.
20. Gray, M.W., G. Burger and B.F. Lang, *Mitochondrial evolution*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1476-81.
21. Gray, M.W., G. Burger and B.F. Lang, *The origin and early evolution of mitochondria*. Genome Biol, 2001. **2**(6): p. 1018.
22. Burger, G., M.W. Gray and B.F. Lang, *Mitochondrial genomes: anything goes*. Trends Genet, 2003. **19**(12): p. 709-16.
23. Wallace, D.C., *Mitochondrial diseases in man and mouse*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1482-8.
24. Borst, P. and L.A. Grivell, *The mitochondrial genome of yeast*. Cell, 1978. **15**(3): p. 705-23.
25. Foury, F., T. Roganti, N. Lecrenier, and B. Purnelle, *The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1998. **440**(3): p. 325-31.
26. Reinders, J., R.P. Zahedi, N. Pfanner, C. Meisinger, and A. Sickmann, *Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics*. J Proteome Res, 2006. **5**(7): p. 1543-54.

27. Sickmann, A., J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H.E. Meyer, B. Schonfisch, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, P. Rehling, N. Pfanner, and C. Meisinger, *The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13207-12.
28. Botstein, D., S.A. Chervitz and J.M. Cherry, *Yeast as a model organism*. Science, 1997. **277**(5330): p. 1259-60.
29. Roise, D., F. Theiler, S.J. Horvath, J.M. Tomich, J.H. Richards, D.S. Allison, and G. Schatz, *Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function*. EMBO J, 1988. **7**(3): p. 649-53.
30. von Heijne, G., *Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices*. EMBO J, 1986. **5**(6): p. 1335-42.
31. Vögtle, F.N., S. Wortelkamp, R.P. Zahedi, D. Becker, C. Leidhold, K. Gevaert, J. Kellermann, W. Voos, A. Sickmann, N. Pfanner, and C. Meisinger, *Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability*. Cell, 2009. **139**(2): p. 428-39.
32. Gakh, O., P. Cavadini and G. Isaya, *Mitochondrial processing peptidases*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 63-77.
33. Glick, B.S., A. Brandt, K. Cunningham, S. Muller, R.L. Hallberg, and G. Schatz, *Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism*. Cell, 1992. **69**(5): p. 809-22.
34. Jan, P.S., K. Esser, E. Pratje, and G. Michaelis, *Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2*. Mol Gen Genet, 2000. **263**(3): p. 483-91.
35. Milenkovic, D., K. Gabriel, B. Guiard, A. Schulze-Specking, N. Pfanner, and A. Chacinska, *Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22472-80.
36. Milenkovic, D., T. Ramming, J.M. Muller, L.S. Wenz, N. Gebert, A. Schulze-Specking, D. Stojanovski, S. Rospert, and A. Chacinska, *Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(10): p. 2530-9.
37. Sideris, D.P. and K. Tokatlidis, *Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space*. Mol Microbiol, 2007. **65**(5): p. 1360-73.

38. Hell, K., J.M. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert, and R.A. Stuart, *Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2250-5.
39. Chacinska, A., C.M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow, and N. Pfanner, *Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms*. Cell, 2009. **138**(4): p. 628-44.
40. Mokranjac, D. and W. Neupert, *Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(1): p. 33-41.
41. Bolender, N., A. Sickmann, R. Wagner, C. Meisinger, and N. Pfanner, *Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins*. EMBO Rep, 2008. **9**(1): p. 42-9.
42. Neupert, W. and J.M. Herrmann, *Translocation of Proteins into Mitochondria*. Annu Rev Biochem, 2007.
43. Pfanner, N., N. Wiedemann, C. Meisinger, and T. Lithgow, *Assembling the mitochondrial outer membrane*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1044-8.
44. Saitoh, T., M. Igura, T. Obita, T. Ose, R. Kojima, K. Maenaka, T. Endo, and D. Kohda, *Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states*. EMBO J, 2007. **26**(22): p. 4777-87.
45. Kiebler, M., P. Keil, H. Schneider, I.J. van der Klei, N. Pfanner, and W. Neupert, *The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore*. Cell, 1993. **74**(3): p. 483-92.
46. van Wilpe, S., M.T. Ryan, K. Hill, A.C. Maarse, C. Meisinger, J. Brix, P.J. Dekker, M. Moczko, R. Wagner, M. Meijer, B. Guiard, A. Honlinger, and N. Pfanner, *Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 485-9.
47. Hoppins, S.C. and F.E. Nargang, *The Tim8-Tim13 complex of Neurospora crassa functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12396-405.
48. Paschen, S.A., T. Waizenegger, T. Stan, M. Preuss, M. Cyrklaff, K. Hell, D. Rapaport, and W. Neupert, *Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 862-6.



- 
49. Wiedemann, N., V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schonfisch, S. Rospert, M.T. Ryan, N. Pfanner, and C. Meisinger, *Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 565-71.
50. Meisinger, C., M. Rissler, A. Chacinska, L.K. Szklarz, D. Milenkovic, V. Kozjak, B. Schonfisch, C. Lohaus, H.E. Meyer, M.P. Yaffe, B. Guiard, N. Wiedemann, and N. Pfanner, *The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane*. Dev Cell, 2004. **7**(1): p. 61-71.
51. Banci, L., I. Bertini, C. Cefaro, S. Ciofi-Baffoni, A. Gallo, M. Martinelli, D.P. Sideris, N. Katrakili, and K. Tokatlidis, *MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(2): p. 198-206.
52. Grumbt, B., V. Stroobant, N. Terziyska, L. Israel, and K. Hell, *Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37461-70.
53. Bihlmaier, K., N. Mesecke, N. Terziyska, M. Bien, K. Hell, and J.M. Herrmann, *The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain*. J Cell Biol, 2007. **179**(3): p. 389-95.
54. Dabir, D.V., E.P. Leverich, S.K. Kim, F.D. Tsai, M. Hirasawa, D.B. Knaff, and C.M. Koehler, *A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1*. EMBO J, 2007. **26**(23): p. 4801-11.
55. Farrell, S.R. and C. Thorpe, *Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity*. Biochemistry, 2005. **44**(5): p. 1532-41.
56. Curran, S.P., D. Leuenberger, E.P. Leverich, D.K. Hwang, K.N. Beverly, and C.M. Koehler, *The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 43744-51.
57. Wiedemann, N., N. Pfanner and M.T. Ryan, *The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria*. EMBO J, 2001. **20**(5): p. 951-60.
58. Curran, S.P., D. Leuenberger, E. Schmidt, and C.M. Koehler, *The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1017-27.

59. Vial, S., H. Lu, S. Allen, P. Savory, D. Thornton, J. Sheehan, and K. Tokatlidis, *Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36100-8.
60. Rehling, P., K. Model, K. Brandner, P. Kovermann, A. Sickmann, H.E. Meyer, W. Kuhlbrandt, R. Wagner, K.N. Truscott, and N. Pfanner, *Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase*. Science, 2003. **299**(5613): p. 1747-51.
61. Kerscher, O., J. Holder, M. Srinivasan, R.S. Leung, and R.E. Jensen, *The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane*. J Cell Biol, 1997. **139**(7): p. 1663-75.
62. Wagner, K., N. Gebert, B. Guiard, K. Brandner, K.N. Truscott, N. Wiedemann, N. Pfanner, and P. Rehling, *The assembly pathway of the mitochondrial carrier translocase involves four preprotein translocases*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(13): p. 4251-60.
63. Alder, N.N., R.E. Jensen and A.E. Johnson, *Fluorescence mapping of mitochondrial TIM23 complex reveals a water-facing, substrate-interacting helix surface*. Cell, 2008. **134**(3): p. 439-50.
64. Meinecke, M., R. Wagner, P. Kovermann, B. Guiard, D.U. Mick, D.P. Hutu, W. Voos, K.N. Truscott, A. Chacinska, N. Pfanner, and P. Rehling, *Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane*. Science, 2006. **312**(5779): p. 1523-6.
65. Chacinska, A., M. Lind, A.E. Frazier, J. Dudek, C. Meisinger, A. Geissler, A. Sickmann, H.E. Meyer, K.N. Truscott, B. Guiard, N. Pfanner, and P. Rehling, *Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17*. Cell, 2005. **120**(6): p. 817-29.
66. Martinez-Caballero, S., S.M. Grigoriev, J.M. Herrmann, M.L. Campo, and K.W. Kinnally, *Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23*. J Biol Chem, 2007. **282**(6): p. 3584-93.
67. Mogk, A., R. Schmidt and B. Bukau, *The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(4): p. 165-72.
68. Varshavsky, A., *The N-end rule: functions, mysteries, uses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12142-9.
69. Varshavsky, A., *The N-end rule at atomic resolution*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(12): p. 1238-40.

- 
70. Ersahin, C., A.M. Szpaderska, A.T. Orawski, and W.H. Simmons, *Aminopeptidase P isozyme expression in human tissues and peripheral blood mononuclear cell fractions*. Arch Biochem Biophys, 2005. **435**(2): p. 303-10.
71. Rawlings, N.D., F.R. Morton, C.Y. Kok, J. Kong, and A.J. Barrett, *MEROPS: the peptidase database*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D320-5.
72. Tamura, Y., Y. Harada, T. Shiota, K. Yamano, K. Watanabe, M. Yokota, H. Yamamoto, H. Sesaki, and T. Endo, *Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import*. J Cell Biol, 2009. **184**(1): p. 129-41.
73. Dienhart, M.K. and R.A. Stuart, *The yeast Aac2 protein exists in physical association with the cytochrome bc1-COX supercomplex and the TIM23 machinery*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(9): p. 3934-43.
74. van der Laan, M., N. Wiedemann, D.U. Mick, B. Guiard, P. Rehling, and N. Pfanner, *A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria*. Curr Biol, 2006. **16**(22): p. 2271-6.
75. Wiedemann, N., M. van der Laan, D.P. Hutu, P. Rehling, and N. Pfanner, *Sorting switch of mitochondrial presequence translocase involves coupling of motor module to respiratory chain*. J Cell Biol, 2007. **179**(6): p. 1115-22.
76. Lottspeich, F. and H. Zorbas, *Bioanalytik*. 2nd ed. 2006, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag. 1119.
77. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
78. Clevenger, C.V., *Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer*. Am J Pathol, 2004. **165**(5): p. 1449-60.
79. Zhu, X., H.G. Lee, A.K. Raina, G. Perry, and M.A. Smith, *The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease*. Neurosignals, 2002. **11**(5): p. 270-81.
80. Reinders, J. and A. Sickmann, *State-of-the-art in phosphoproteomics*. Proteomics, 2005. **5**(16): p. 4052-61.
81. Zahedi, R.P., A.J. Begonja, S. Gambaryan, and A. Sickmann, *Phosphoproteomics of human platelets: A quest for novel activation pathways*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(12): p. 1963-76.
82. Sickmann, A., M. Mreyen and H.E. Meyer, *Identification of modified proteins by mass spectrometry*. IUBMB Life, 2002. **54**(2): p. 51-7.

83. Urushizaki, Y. and S. Seifter, *Phosphorylation of hydroxylysine residues in collagen synthesized by cultured aortic smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(10): p. 3091-5.
84. Feramisco, J.R., B.E. Kemp and E.G. Krebs, *Phosphorylation of hydroxyproline in a synthetic peptide catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1979. **254**(15): p. 6987-90.
85. Besant, P.G. and P.V. Attwood, *Detection and analysis of protein histidine phosphorylation*. Mol Cell Biochem, 2009. **329**(1-2): p. 93-106.
86. Ross, A.R., *Identification of histidine phosphorylations in proteins using mass spectrometry and affinity-based techniques*. Methods Enzymol, 2007. **423**: p. 549-72.
87. Sun, Q. and R.R. Julian, *Probing sites of histidine phosphorylation with iodination and tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2011. **25**(15): p. 2240-6.
88. Olsen, J.V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann, *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. Cell, 2006. **127**(3): p. 635-48.
89. Zahedi, R.P., A. Sickmann, A.M. Boehm, C. Winkler, N. Zufall, B. Schonfisch, B. Guiard, N. Pfanner, and C. Meisinger, *Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(3): p. 1436-50.
90. Albuquerque, C.P., M.B. Smolka, S.H. Payne, V. Bafna, J. Eng, and H. Zhou, *A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(7): p. 1389-96.
91. Chi, A., C. Huttenhower, L.Y. Geer, J.J. Coon, J.E. Syka, D.L. Bai, J. Shabanowitz, D.J. Burke, O.G. Troyanskaya, and D.F. Hunt, *Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): p. 2193-8.
92. Gnad, F., L.M. de Godoy, J. Cox, N. Neuhauser, S. Ren, J.V. Olsen, and M. Mann, *High-accuracy identification and bioinformatic analysis of in vivo protein phosphorylation sites in yeast*. Proteomics, 2009. **9**(20): p. 4642-52.
93. Holt, L.J., B.B. Tuch, J. Villen, A.D. Johnson, S.P. Gygi, and D.O. Morgan, *Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution*. Science, 2009. **325**(5948): p. 1682-6.

- 
94. Li, X., S.A. Gerber, A.D. Rudner, S.A. Beausoleil, W. Haas, J. Villen, J.E. Elias, and S.P. Gygi, *Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested Saccharomyces cerevisiae*. J Proteome Res, 2007. **6**(3): p. 1190-7.
  95. Schmidt, O., A.B. Harbauer, S. Rao, B. Eyrich, R.P. Zahedi, D. Stojanovski, B. Schonfisch, B. Guiard, A. Sickmann, N. Pfanner, and C. Meisinger, *Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases*. Cell, 2011. **144**(2): p. 227-39.
  96. Pagliarini, D.J. and J.E. Dixon, *Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage?* Trends Biochem Sci, 2006. **31**(1): p. 26-34.
  97. Skoog, D.A., F.J. Holler and S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. 6 ed. 2006, Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole.
  98. Cannell, R.J.P., *Natural Products Isolation*. 1 ed. Methods in Biotechnology, ed. J.M. Walker. Vol. 4. 1998, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
  99. Sickmann, A., M. Mreyen and H.E. Meyer, *Mass spectrometry--a key technology in proteome research*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2003. **83**: p. 141-76.
  100. Meyer, V.R., *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 10th ed. 2009, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
  101. de Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. 2nd ed. 2002: Wiley Verlag.
  102. Hillenkamp, F., M. Karas, R.C. Beavis, and B.T. Chait, *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Anal Chem, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
  103. Fenn, J.B. and M. Yamashita, *Electrospray Ion-Source - Another variation on the free-jet theme*. J Chem Phys, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
  104. Rayleigh, L., *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*. Philos Mag 5th series, 1882(14): p. 184-185.
  105. Fenn, J.B., M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse, *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
  106. Dole, M., Mack L.L., R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, and M.B. Alice, *Molecular Beams of Macroions* J Chem Phys, 1968. **49**: p. 2240-2249.

- 
107. Mack, L.L., P. Kralik, A. Rheude, and M. Dole, *Molecular Beams of Macroions. II.* J Chem Phys, 1970. **52**: p. 4977-4986.
  108. Iribarne, J.V. and B.A. Thomson, *On the evaporation of small ions from charged droplets.* J Chem Phys, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.
  109. Nguyen, S. and J.B. Fenn, *Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1111-7.
  110. *TSQ-Series Gerätehandbuch.* 70111-97193 Ausgabe B. März 2009: Thermo Fisher Scientific.
  111. *LTQ Orbitrap Velos Hardware Manual.* Revision A - 1250580. 2009: Thermo Fisher Scientific.
  112. Kaudewitz, H., *Kann man mit der Orbitrap quantifizieren?* Thermo Fisher Scientific, 2005.
  113. Hu, Q., R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, and R. Graham Cooks, *The Orbitrap: a new mass spectrometer.* J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
  114. Beck, F., U. Lewandrowski, M. Wiltfang, I. Feldmann, J. Geiger, A. Sickmann, and R.P. Zahedi, *The good, the bad, the ugly: validating the mass spectrometric analysis of modified peptides.* Proteomics, 2011. **11**(6): p. 1099-109.
  115. Nagaraj, N., R.C. D'Souza, J. Cox, J.V. Olsen, and M. Mann, *Feasibility of large-scale phosphoproteomics with higher energy collisional dissociation fragmentation.* J Proteome Res, 2010. **9**(12): p. 6786-94.
  116. Jedrychowski, M.P., E.L. Huttlin, W. Haas, M.E. Sowa, R. Rad, and S.P. Gygi, *Evaluation of HCD- and CID-type Fragmentation Within Their Respective Detection Platforms For Murine Phosphoproteomics.* Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(12): p. M111 009910.
  117. Perry, R.H., R.G. Cooks and R.J. Noll, *Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications.* Mass Spectrom Rev, 2008. **27**(6): p. 661-99.
  118. Bendt, A.K., A. Burkovski, S. Schaffer, M. Bott, M. Farwick, and T. Hermann, *Towards a phosphoproteome map of Corynebacterium glutamicum.* Proteomics, 2003. **3**(8): p. 1637-46.
  119. MacDonald, J.A., A.J. Mackey, W.R. Pearson, and T.A. Haystead, *A strategy for the rapid identification of phosphorylation sites in the phosphoproteome.* Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(4): p. 314-22.

120. Roepstorff, P. and K. Kristiansen, *The use of Edman degradation in peptide mixture analysis by mass spectrometry*. Biomed Mass Spectrom, 1974. **1**(4): p. 231-6.
121. Ballif, B.A., J. Villen, S.A. Beausoleil, D. Schwartz, and S.P. Gygi, *Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(11): p. 1093-101.
122. Beausoleil, S.A., M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villen, J. Li, M.A. Cohn, L.C. Cantley, and S.P. Gygi, *Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12130-5.
123. Beausoleil, S.A., J. Villen, S.A. Gerber, J. Rush, and S.P. Gygi, *A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(10): p. 1285-92.
124. Ficarro, S.B., M.L. McClelland, P.T. Stukenberg, D.J. Burke, M.M. Ross, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and F.M. White, *Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to Saccharomyces cerevisiae*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(3): p. 301-5.
125. Pinkse, M.W., S. Mohammed, J.W. Gouw, B. van Breukelen, H.R. Vos, and A.J. Heck, *Highly robust, automated, and sensitive online TiO<sub>2</sub>-based phosphoproteomics applied to study endogenous phosphorylation in Drosophila melanogaster*. J Proteome Res, 2008. **7**(2): p. 687-97.
126. Pinkse, M.W., P.M. Uitto, M.J. Hilhorst, B. Ooms, and A.J. Heck, *Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns*. Anal Chem, 2004. **76**(14): p. 3935-43.
127. Olsen, J.V. and M. Mann, *Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13417-22.
128. Biemann, K., *Mass spectrometry of peptides and proteins*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 977-1010.
129. Tholey, A., J. Reed and W.D. Lehmann, *Electrospray tandem mass spectrometric studies of phosphopeptides and phosphopeptide analogues*. J Mass Spectrom, 1999. **34**(2): p. 117-23.

- 
130. Covey, T., Shushan, B., Bonner, R., Schroder, W. and Hucho, F., *LC/MS and LC/MS/MS screening for the sites of post-translational modification in proteins*, in *Methods in Protein Sequence Analysis - Proceedings of the 8th MPSA (Methods in Protein Sequencing Conference, Kiruna)*. 1991, Birkhäuser Press: Basel. p. 249-56.
131. Huddleston, M.J., Annan, R.S. and Carr, S.A., *Selective Detection of Phosphopeptides in Complex Mixtures by Electrospray Liquid Chromatography / Mass Spectrometry*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1993. **4**(9): p. 710-717.
132. Schlosser, A., R. Pipkorn, D. Bossemeyer, and W.D. Lehmann, *Analysis of protein phosphorylation by a combination of elastase digestion and neutral loss tandem mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2001. **73**(2): p. 170-6.
133. Jin, W.H., J. Dai, H. Zhou, Q.C. Xia, H.F. Zou, and R. Zeng, *Phosphoproteome analysis of mouse liver using immobilized metal affinity purification and linear ion trap mass spectrometry*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004. **18**(18): p. 2169-76.
134. Zumwalt, A., Choudhary, G., Cho, D., Hemenway, E. and Mylchreest, I., in *Proceedings of the 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. 2003: Montreal, Canada.
135. Schroeder, M.J., J. Shabanowitz, J.C. Schwartz, D.F. Hunt, and J.J. Coon, *A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2004. **76**(13): p. 3590-8.
136. Rogers, L.D. and L.J. Foster, *Phosphoproteomics--finally fulfilling the promise?* *Mol Biosyst*, 2009. **5**(10): p. 1122-9.
137. Cox, D.M., F. Zhong, M. Du, E. Duchoslav, T. Sakuma, and J.C. McDermott, *Multiple reaction monitoring as a method for identifying protein posttranslational modifications*. *J Biomol Tech*, 2005. **16**(2): p. 83-90.
138. Unwin, R.D., J.R. Griffiths, M.K. Leverentz, A. Grallert, I.M. Hagan, and A.D. Whetton, *Multiple reaction monitoring to identify sites of protein phosphorylation with high sensitivity*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. **4**(8): p. 1134-44.
139. Lange, V., P. Picotti, B. Domon, and R. Aebersold, *Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial*. *Mol Syst Biol*, 2008. **4**: p. 222.



140. Kitteringham, N.R., R.E. Jenkins, C.S. Lane, V.L. Elliott, and B.K. Park, *Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(13): p. 1229-39.
141. Bluemlein, K. and M. Ralser, *Monitoring protein expression in whole-cell extracts by targeted label- and standard-free LC-MS/MS*. Nat Protoc, 2011. **6**(6): p. 859-69.
142. Liao, P.C., J. Leykam, P.C. Andrews, D.A. Gage, and J. Allison, *An approach to locate phosphorylation sites in a phosphoprotein: mass mapping by combining specific enzymatic degradation with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal Biochem, 1994. **219**(1): p. 9-20.
143. Eyrich, B., A. Sickmann and R.P. Zahedi, *Catch me if you can: Mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies*. Proteomics, 2011. **11**(4): p. 554-70.
144. Hemmings, H.D., Jr., *Protein kinase and phosphatase inhibitors*. Neuromethods. Vol. 30. 1996, Totowa, NJ: Humana Press. 121-218.
145. Larsen, M.R., S.S. Jensen, L.A. Jakobsen, and N.H. Heegaard, *Exploring the sialome using titanium dioxide chromatography and mass spectrometry*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(10): p. 1778-87.
146. Lewandrowski, U., R.P. Zahedi, J. Moebius, U. Walter, and A. Sickmann, *Enhanced N-glycosylation site analysis of sialoglycopeptides by strong cation exchange prefractionation applied to platelet plasma membranes*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(11): p. 1933-41.
147. Han, G., M. Ye and H. Zou, *Development of phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteome analysis*. Analyst, 2008. **133**(9): p. 1128-38.
148. Tsai, C.F., Y.T. Wang, Y.R. Chen, C.Y. Lai, P.Y. Lin, K.T. Pan, J.Y. Chen, K.H. Khoo, and Y.J. Chen, *Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics*. J Proteome Res, 2008. **7**(9): p. 4058-69.
149. Hunt, D.F., J.R. Yates, 3rd, J. Shabanowitz, S. Winston, and C.R. Hauer, *Protein sequencing by tandem mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(17): p. 6233-7.
150. Zahedi, R.P., U. Lewandrowski, J. Wiesner, S. Wortelkamp, J. Moebius, C. Schutz, U. Walter, S. Gambaryan, and A. Sickmann, *Phosphoproteome of resting human platelets*. J Proteome Res, 2008. **7**(2): p. 526-34.

151. Larsen, M.R., T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P. Roepstorff, and T.J. Jorgensen, *Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(7): p. 873-86.
152. Maccarrone, G., N. Kolb, L. Teplytska, I. Birg, R. Zollinger, F. Holsboer, and C.W. Turck, *Phosphopeptide enrichment by IEF*. Electrophoresis, 2006. **27**(22): p. 4585-95.
153. Xu, C.F., H. Wang, D. Li, X.P. Kong, and T.A. Neubert, *Selective enrichment and fractionation of phosphopeptides from peptide mixtures by isoelectric focusing after methyl esterification*. Anal Chem, 2007. **79**(5): p. 2007-14.
154. Alpert, A.J., *Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides*. Anal Chem, 2008. **80**(1): p. 62-76.
155. Alpert, A.J., *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*. J Chromatogr, 1990. **499**: p. 177-96.
156. McNulty, D.E. and R.S. Annan, *Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(5): p. 971-80.
157. McNulty, D.E. and R.S. Annan, *Hydrophilic interaction chromatography for fractionation and enrichment of the phosphoproteome*. Methods Mol Biol, 2009. **527**: p. 93-105, x.
158. Sano, A. and H. Nakamura, *Titania as a chemo-affinity support for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides: application to the characterization of phosphorylation sites in proteins by combination with protease digestion and electrospray ionization mass spectrometry*. Anal Sci, 2004. **20**(5): p. 861-4.
159. Eriksson, A.I., K. Edwards, A. Hagfeldt, and V.A. Hernandez, *Physicochemical characterization of phosphopeptide/titanium dioxide interactions employing the quartz crystal microbalance technique*. J Phys Chem B, 2013. **117**(7): p. 2019-25.
160. Kweon, H.K. and K. Hakansson, *Selective zirconium dioxide-based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis*. Anal Chem, 2006. **78**(6): p. 1743-9.

161. Rivera, J.G., Y.S. Choi, S. Vujcic, T.D. Wood, and L.A. Colon, *Enrichment/isolation of phosphorylated peptides on hafnium oxide prior to mass spectrometric analysis*. *Analyst*, 2009. **134**(1): p. 31-3.
162. Ficarro, S.B., J.R. Parikh, N.C. Blank, and J.A. Marto, *Niobium(V) oxide (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): application to phosphoproteomics*. *Anal Chem*, 2008. **80**(12): p. 4606-13.
163. Leitner, A., M. Sturm, O. Hudecz, M. Mazanek, J.H. Smatt, M. Linden, W. Lindner, and K. Mechtler, *Probing the phosphoproteome of HeLa cells using nanocast metal oxide microspheres for phosphopeptide enrichment*. *Anal Chem*, 2010. **82**(7): p. 2726-33.
164. Leitner, A., M. Sturm, J.H. Smatt, M. Jarn, M. Linden, K. Mechtler, and W. Lindner, *Optimizing the performance of tin dioxide microspheres for phosphopeptide enrichment*. *Anal Chim Acta*, 2009. **638**(1): p. 51-7.
165. Mazanek, M., G. Mituloviae, F. Herzog, C. Stingl, J.R. Hutchins, J.M. Peters, and K. Mechtler, *Titanium dioxide as a chemo-affinity solid phase in offline phosphopeptide chromatography prior to HPLC-MS/MS analysis*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(5): p. 1059-69.
166. Wu, J., Q. Shakey, W. Liu, A. Schuller, and M.T. Follettie, *Global profiling of phosphopeptides by titania affinity enrichment*. *J Proteome Res*, 2007. **6**(12): p. 4684-9.
167. Bodenmiller, B., L.N. Mueller, M. Mueller, B. Domon, and R. Aebersold, *Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome*. *Nat Methods*, 2007. **4**(3): p. 231-7.
168. Thingholm, T.E., T.J. Jorgensen, O.N. Jensen, and M.R. Larsen, *Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(4): p. 1929-35.
169. Mazanek, M., E. Roitinger, O. Hudecz, J.R. Hutchins, B. Hegemann, G. Mitulovic, T. Taus, C. Stingl, J.M. Peters, and K. Mechtler, *A new acid mix enhances phosphopeptide enrichment on titanium- and zirconium dioxide for mapping of phosphorylation sites on protein complexes*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010. **878**(5-6): p. 515-24.
170. Thingholm, T.E., M.R. Larsen, C.R. Ingrell, M. Kassem, and O.N. Jensen, *TiO<sub>2</sub>-based phosphoproteomic analysis of the plasma membrane and the effects of phosphatase inhibitor treatment*. *J Proteome Res*, 2008. **7**(8): p. 3304-13.

171. Simon, E.S., M. Young, A. Chan, Z.Q. Bao, and P.C. Andrews, *Improved enrichment strategies for phosphorylated peptides on titanium dioxide using methyl esterification and pH gradient elution*. Anal Biochem, 2008. **377**(2): p. 234-42.
172. Li, Q.R., Z.B. Ning, J.S. Tang, S. Nie, and R. Zeng, *Effect of peptide-to-TiO<sub>2</sub> beads ratio on phosphopeptide enrichment selectivity*. J Proteome Res, 2009. **8**(11): p. 5375-81.
173. Ong, S.E., B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, and M. Mann, *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.
174. Zhu, H., S. Pan, S. Gu, E.M. Bradbury, and X. Chen, *Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002. **16**(22): p. 2115-23.
175. Schmidt, A., J. Kellermann and F. Lottspeich, *A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels*. Proteomics, 2005. **5**(1): p. 4-15.
176. Ong, S.E. and M. Mann, *A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2650-60.
177. Meisinger, C., T. Sommer and N. Pfanner, *Purification of Saccharomyces cerevisiae mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations*. Anal Biochem, 2000. **287**(2): p. 339-42.
178. Meisinger, C., N. Pfanner and K.N. Truscott, *Isolation of yeast mitochondria*. Methods Mol Biol, 2006. **313**: p. 33-9.
179. Alconada, A., F. Gartner, A. Honlinger, M. Kubrich, and N. Pfanner, *Mitochondrial receptor complex from Neurospora crassa and Saccharomyces cerevisiae*. Methods Enzymol, 1995. **260**: p. 263-86.
180. Meisinger, C., M.T. Ryan, K. Hill, K. Model, J.H. Lim, A. Sickmann, H. Muller, H.E. Meyer, R. Wagner, and N. Pfanner, *Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2337-48.
181. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.

- 
182. Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt, *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. *Electrophoresis*, 1988. **9**(6): p. 255-62.
183. Blum, H., H. Beier and H. Gross, *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. *Electrophoresis*, 1987. **8**(2): p. 93-99.
184. Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann, *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. *Anal Chem*, 1996. **68**(5): p. 850-8.
185. Polson, A., G.M. Potgieter, J.F. Largier, G.E. Mears, and F.J. Joubert, *The Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight*. *Biochim Biophys Acta*, 1964. **82**: p. 463-75.
186. Miller, D.W. and S.C. Elgin, *Isoelectric focusing of proteins exposed to sodium dodecyl sulfate*. *Anal Biochem*, 1974. **60**(1): p. 142-8.
187. *OMIX Datasheet*. SI-0608. 12/06: Varian Inc., USA.
188. *Manufacturers Manual (SPEC C18AR, SPEC PT C18AP)*: Varian Inc., USA.
189. *StageTips Instructions for Use*. Version 1.0. November 2008: Proxeon Biosystems, Dänemark.
190. Kyono, Y., N. Sugiyama, K. Imami, M. Tomita, and Y. Ishihama, *Successive and selective release of phosphorylated peptides captured by hydroxy acid-modified metal oxide chromatography*. *J Proteome Res*, 2008. **7**(10): p. 4585-93.
191. Stahl-Zeng, J., V. Lange, R. Ossola, K. Eckhardt, W. Krek, R. Aebersold, and B. Domon, *High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites*. *Mol Cell Proteomics*, 2007. **6**(10): p. 1809-17.
192. Olsen, J.V., L.M. de Godoy, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Pesch, A. Makarov, O. Lange, S. Horning, and M. Mann, *Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. **4**(12): p. 2010-21.
193. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(12): p. 1367-72.
194. Cox, J., I. Matic, M. Hilger, N. Nagaraj, M. Selbach, J.V. Olsen, and M. Mann, *A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(5): p. 698-705.

- 
195. Cox, J., N. Neuhauser, A. Michalski, R.A. Scheltema, J.V. Olsen, and M. Mann, *Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment*. J Proteome Res, 2011. **10**(4): p. 1794-805.
196. Wu, R., W. Haas, N. Dephoure, E.L. Huttlin, B. Zhai, M.E. Sowa, and S.P. Gygi, *A large-scale method to measure absolute protein phosphorylation stoichiometries*. Nat Methods, 2011. **8**(8): p. 677-83.
197. Broberg, A., *High-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry for analysis of oligosaccharides derivatized by reductive amination and N,N-dimethylation*. Carbohydr Res, 2007. **342**(11): p. 1462-9.
198. Gerber, S.A., J. Rush, O. Stemman, M.W. Kirschner, and S.P. Gygi, *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 6940-5.
199. Fillatre, Y., D. Rondeau, A. Jadas-Hecart, and P.Y. Communal, *Advantages of the scheduled selected reaction monitoring algorithm in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry multi-residue analysis of 242 pesticides: a comparative approach with classical selected reaction monitoring mode*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010. **24**(16): p. 2453-61.
200. Elias, J.E. and S.P. Gygi, *Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry*. Nat Methods, 2007. **4**(3): p. 207-14.
201. Ohlmeier, S., A.J. Kastaniotis, J.K. Hiltunen, and U. Bergmann, *The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 3956-79.
202. Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S.A. Beausoleil, C.E. Bakalarski, S.J. Elledge, and S.P. Gygi, *A quantitative atlas of mitotic phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10762-7.
203. Huttlin, E.L., M.P. Jedrychowski, J.E. Elias, T. Goswami, R. Rad, S.A. Beausoleil, J. Villen, W. Haas, M.E. Sowa, and S.P. Gygi, *A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression*. Cell, 2010. **143**(7): p. 1174-89.
204. Chen, R.Q., Q.K. Yang, B.W. Lu, W. Yi, G. Cantin, Y.L. Chen, C. Fearn, J.R. Yates, 3rd, and J.D. Lee, *CDC25B mediates rapamycin-induced oncogenic responses in cancer cells*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2663-8.

- 
205. Christensen, G.L., C.D. Kelstrup, C. Lyngso, U. Sarwar, R. Bogebo, S.P. Sheikh, S. Gammeltoft, J.V. Olsen, and J.L. Hansen, *Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(7): p. 1540-53.
206. Gauci, S., A.O. Helbig, M. Slijper, J. Krijgsveld, A.J. Heck, and S. Mohammed, *Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach*. Anal Chem, 2009. **81**(11): p. 4493-501.
207. Imami, K., N. Sugiyama, Y. Kyono, M. Tomita, and Y. Ishihama, *Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column*. Anal Sci, 2008. **24**(1): p. 161-6.
208. Moritz, A., Y. Li, A. Guo, J. Villen, Y. Wang, J. MacNeill, J. Kornhauser, K. Sprott, J. Zhou, A. Possemato, J.M. Ren, P. Hornbeck, L.C. Cantley, S.P. Gygi, J. Rush, and M.J. Comb, *Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases*. Sci Signal, 2010. **3**(136): p. ra64.
209. Olsen, J.V., M. Vermeulen, A. Santamaria, C. Kumar, M.L. Miller, L.J. Jensen, F. Gnad, J. Cox, T.S. Jensen, E.A. Nigg, S. Brunak, and M. Mann, *Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis*. Sci Signal, 2010. **3**(104): p. ra3.
210. Rigbolt, K.T., T.A. Prokhorova, V. Akimov, J. Henningsen, P.T. Johansen, I. Kratchmarova, M. Kassem, M. Mann, J.V. Olsen, and B. Blagoev, *System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation*. Sci Signal, 2011. **4**(164): p. rs3.
211. Rikova, K., A. Guo, Q. Zeng, A. Possemato, J. Yu, H. Haack, J. Nardone, K. Lee, C. Reeves, Y. Li, Y. Hu, Z. Tan, M. Stokes, L. Sullivan, J. Mitchell, R. Wetzel, J. Macneill, J.M. Ren, J. Yuan, C.E. Bakalarski, J. Villen, J.M. Kornhauser, B. Smith, D. Li, X. Zhou, S.P. Gygi, T.L. Gu, R.D. Polakiewicz, J. Rush, and M.J. Comb, *Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1190-203.
212. Choudhary, C., J.V. Olsen, C. Brandts, J. Cox, P.N. Reddy, F.D. Bohmer, V. Gerke, D.E. Schmidt-Arras, W.E. Berdel, C. Muller-Tidow, M. Mann, and H. Serve, *Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes*. Mol Cell, 2009. **36**(2): p. 326-39.
213. Lee, J., Y. Xu, Y. Chen, R. Sprung, S.C. Kim, S. Xie, and Y. Zhao, *Mitochondrial phosphoproteome revealed by an improved IMAC method and MS/MS/MS*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(4): p. 669-76.

214. Rinschen, M.M., M.J. Yu, G. Wang, E.S. Boja, J.D. Hoffert, T. Pisitkun, and M.A. Knepper, *Quantitative phosphoproteomic analysis reveals vasopressin V2-receptor-dependent signaling pathways in renal collecting duct cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(8): p. 3882-7.
215. Wisniewski, J.R., N. Nagaraj, A. Zougman, F. Gnad, and M. Mann, *Brain phosphoproteome obtained by a FASP-based method reveals plasma membrane protein topology*. J Proteome Res, 2010. **9**(6): p. 3280-9.
216. Yu, Y., S.O. Yoon, G. Poulogiannis, Q. Yang, X.M. Ma, J. Villen, N. Kubica, G.R. Hoffman, L.C. Cantley, S.P. Gygi, and J. Blenis, *Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling*. Science, 2011. **332**(6035): p. 1322-6.



## **7 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich ganz herzlich bei allen zu bedanken, die mir während der Durchführung dieser Arbeit mit praktischer, theoretischer, seelischer und menschlicher Unterstützung zur Seite standen.

Als Erstes danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Albert Sickmann, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, für die Nutzung der instrumentellen Ressourcen, der fachlichen Kompetenz und das in mich gesetzte Vertrauen sowie das große Verständnis besonders während der Endphase meiner Dissertation.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Oliver Kayser, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Chris Meisinger am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Freiburg und Prof. Dr. Mike T. Ryan am Department of Biochemistry der La Trobe University in Australien sowie deren Arbeitsgruppen, die freundlicherweise den TOM-Komplex, die OMVs und die Mitochondrien für die durchgeführten Analysen zur Verfügung stellten und stets auch reges Interesse an den Ergebnissen der Untersuchungen zeigten.

Dr. René Zahedi spreche ich für die fachliche Betreuung der Arbeit, die steten Diskussionen, die zahlreichen Anregungen und das Korrektur-Lesen meinen Dank aus.

Allen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe und des gesamten Institutes (es würde bei weitem zu weit führen euch alle namentlich zu erwähnen, sorry) danke ich für ein harmonische Arbeitsklima, die amüsanten Diskussionen und natürlich die zahlreichen Hilfestellungen. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit euch zusammen zu arbeiten. Speziell hervorheben möchte ich Dr. Urs Lewandrowski, Florian Beck und Thomas Premisler, die mich während meiner ganzen Zeit begleiteten, mit mir durch Höhen und Tiefen gingen, immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mehr als nur Arbeitskollegen wurden.

Ganz besonders bedanke ich mich bei den Menschen, die mir außerhalb der Wissenschaft die nötige seelisch-moralische Unterstützung gegeben haben. Dieser Dank geht an alle meine Freunde, insbesondere an Katrin Gehring, Christina Mayr, Karin Schmitt, Anina Sommer und Jessica Köster.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie, die jederzeit für mich da war und immer an mich geglaubt hat - eure Unterstützung und euer Zuspruch haben all dies erst möglich gemacht.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Beate Monika Eyrich

Adresse: Krumme Wiesen 18, 88433 Schemmerhofen, Deutschland

Geburtsdatum: 06.03.1982

Geburtsort: Wertheim

Familienstand: Ledig

### Schulbildung:

09/88 - 07/90 Grundschule, Hasloch

09/90 - 07/92 Volksschule, Kreuzwertheim

09/92 - 06/01 Balthasar-Neumann-Gymnasium, Marktheidenfeld  
Abschluss mit Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

### Studium:

10/01 - 07/07 Biologiestudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit  
Abschluss als Dipl. Biol.

09/07 - 12/08 Forschungsprojekt im Rahmen des GK 1342 „Lipid Signalling“,  
„Proteomic analysis of plasma membranes and lipid rafts (Projekt  
A2)“ am Rudolf-Virchow-Zentrum, DFG-Forschungszentrum für  
Experimentelle Biomedizin, Würzburg

ab 01/09 Promotion an der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen der TU  
Dortmund / am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften,  
„Massenspektrometrische Charakterisierung von Phosphorylierungs-  
stellen in mitochondrialen Membranen und Membran/Protein-  
Komplexen“

## **9 Eidesstattliche Erklärungen**

§ 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.

Dortmund, den

---

Beate Eyrich

---

## 10 Anhang

### 10.1 Filter- und Quantifizierungsparameter von Proteome Discoverer, Mascot Distiller und MaxQuant

#### 10.1.1 Proteome Discoverer

##### Spectrum Selector

###### 1. General Settings

Precursor Selection: Use MS1 Precursor

Use New Precursor Reevaluation: yes

###### 2. Spectrum Properties Filter

Lower RT Limit: 0

Upper RT Limit: 0

Lowest Charge State: 2

Highest Charge State: 5

Min. Precursor Mass: 300 Da

Max. Precursor Mass: 5000 Da

Total Intensity Threshold: 0

Minimum Peak Count: 10

###### 3. Scan Event Filters

Mass Analyzer: ITMS; FTMS

MS Order: MS2

Activation Type: Any

Scan Type: Full

###### 4. Peak Filters

S/N Threshold (FT-only): 3

###### 5. Replacements for Unrecognized Properties

Unrecognized Charge Replacements: Automatic

Unrecognized Mass Analyzer Replacements: FTMS

Unrecognized MS Order Replacements: MS2

Unrecognized Activation Type Replacements: HCD

Unrecognized Polarity Replacements: +

##### Spectrum Grouper

###### Spectrum Match Criteria

Precursor Mass Criterion: Same Measured Mass-to-Charge

Precursor Mass Tolerance: 3 ppm

Max. RT Difference [min]: 0.2

Allow Mass Analyzer Mismatch: no

Allow MS Order Mismatch: no

### **Mascot**

#### 1. Input Data

Protein Database: SGD

Enzyme Name: Trypsin

Maximum Missed Cleavage Sites: 2

Instrument: ESI-TRAP

Taxonomy: All entries

#### 1.1 Peptide Scoring Options

Peptide Cut Off Score: 10

#### 1.2 Protein Scoring Options

Use MudPIT Scoring: yes

Protein Relevance Threshold: 20

Protein Relevance Factor: 1

#### 2. Decoy Database Search

Decoy Search: yes

Target FDR (Strict): 0.01

Target FDR (Relaxed): 0.05

#### 3. Tolerances

Precursor Mass Tolerance: 10 ppm

Fragment Mass Tolerance: 0.4 Da

Use Average Precursor Mass: no

#### 4. Dynamic Modifications

Oxidation (M)

Phosphorylation (ST)

Phosphorylation (Y)

Label:13C(6) (R)

Label:13C(6) (K)

#### 5. Static Modifications

Carbamidomethyl (C)

### **Sequest**

#### 1. Input Data

Protein Database: sgd\_orf\_trans\_all.20100105.fasta

Enzyme Name: Trypsin (Full)

Maximum Missed Cleavage Sites: 2

### 1.1 Peptide Scoring Options

Maximum Peptides Considered: 500

Maximum Peptides Output: 10

Calculate Probability Score: yes

Absolute XCorr Threshold: 0.4

Fragment Ion Cutoff Percentage: 0.1

### 1.2 Protein Scoring Options

Maximum Protein References Per Peptide: 100

Protein Relevance Threshold: 1.5

Peptide Relevance Factor: 0.4

### 2. Decoy Database Search

Search Against Decoy Database: yes

Target FDR (Strict): 0.01

Target FDR (Relaxed): 0.05

### 3. Tolerances

Precursor Mass Tolerance: 10 ppm

Fragment Mass Tolerance: 0.4 Da

Use Average Precursor Mass: no

Use Average Fragment Masses: no

### 4. Ion Series

Use Neutral Loss a Ions: no

Use Neutral Loss b Ion: yes

Use Neutral Loss y Ion: yes

Weight of a Ions: 0

Weight of b Ions: 1

Weight of c Ions: 0

Weight of x Ions: 0

Weight of y Ions: 1

Weight of z Ions: 0

### 5. Dynamic Modifications

Max. Modifications Per Peptide: 4

Phospho / +79.966 Da (S, T, Y)

Oxidation / +15.995 Da (M)

Label:13C(6) / +6.020 Da (K, R)

### 6. Static Modifications

Carbamidomethyl / +57.021 Da (C)

**Event Detector**

## General Settings

Mass Precision: 2ppm

S/N Threshold: 1

**Precursor Ions Quantifier**

1. Quantification Method: SILAC 2plex (Arg6, Lys6)

2. Isotope Pattern Identification

RT Tolerance of Isotope Pattern Multiplets [min]: 0.2

Single-Peak/Missing Channels Allowed: 1

## Quan Channels:

Light: none

Heavy

Lys6: Label:13C(6) / +6.020 Da (K)

Arg6: Label:13C(6) / +6.020 Da (R)

## Ratio Calculation

Show the Raw Quan Values: no

Minimum Quan Value Threshold: 0

Replace Missing Quan Values With Minimum Intensity: no

Use Single-Peak Quan Channels: no

Apply Quan Value Corrections: yes

Reject All Quan Values If Not All Quan Channels Are Present: no

Fold Change Threshold for Up-/Down-Regulation: 2

Maximum Allowed Fold Change: 100

Use Ratios Above Maximum Allowed Fold Change for Quantification: no

Protein Quantification: Use Only Unique Peptides

Experimental Bias: None

Ratio Reporting: Heavy/Light

***Proteome Discoverer Quantification***

## Precursor Ions Quantifier

Quantification Method: SILAC 2plex (Arg6, Lys6)

## Isotope Pattern Identification

RT Tolerance of Isotope Pattern Multiplets [min]: 0.2

Single Peak/Missing Channels Allowed: 1

## Quan Channels:

Light: none

Heavy

Lys6: Label:13C(6) / +6.020 Da (K)

Arg6: Label:13C(6) / +6.020 Da (R)

#### Ratio Calculation

Show the Raw Quan Values: no

Minimum Quan Value Threshold: 0

Replace Missing Quan Values With Minimum Intensity: no

Use Single-Peak Quan Channels: no

Apply Quan Value Corrections: yes

Reject All Quan Values If Not All Quan Channels Are Present: no

Fold Change Threshold for Up-/Down-Regulation: 2

Maximum Allowed Fold Change: 100

Use Ratios Above Maximum Allowed Fold Change for Quantification: no

Protein Quantification: Use Only Unique Peptides

Experimental Bias: None

Ratio Reporting: Heavy/Light

#### ***Proteome Discoverer Result Filters***

Filter and Protein Grouping Set Handling: Filter SILAC

##### **Peptide Filters**

Peptide Rank Filter

Minimum Peptide Rank: 1

Include All Peptides With Same Score: yes

Peptide Confidence

Peptide Confidence-Value: High

[Relaxed False Discovery Rate: Target 0.0500, Strict False Discovery Rate: Target 0.0100]

Peptide Mass Deviation

Peptide Mass Accuracy: 4.0 ppm

##### **Protein Filters**

Peptides Per Protein

Number of Peptides: 1 (3 for gelspots, non-enriched samples)

Count Only Rank 1 Peptides: yes

Count Peptide Only in Top Scored Proteins: yes

Protein Grouping(?)

### 10.1.2 Mascot Distiller

#### ***Mascot Distiller Prozessierungseinstellungen***

Name: LTQ-FT

MS Processing

Un-centroiding



Peak half width: 0.1

Data points per Da: 20

Always uncentroid: yes

#### Aggregation

Scan group aggregation method: Sum

#### Re-gridding

Data points per Da: 200

#### Multi-Format Spectrum

Preferred Type: Profile

#### Peaks

Minimum number: 1

Maximum charge: 3

#### MS/MS Processing

##### Un-centroiding

Peak half width: 0.1

Data points per Da: 20

Always uncentroid: yes

##### Re-gridding

Data points per Da: 200

#### Multi-Format Spectrum

Preferred Type: Profile

#### Peaks

Minimum number: 10

Maximum charge: 2

Use precursor charge as minimum: no

#### Precursor Charge

1st choice: Try to re-determine charge from parent scan

2nd choice: If available, take charge from file

3rd choice: Use default charge(s)

Default charge range: 2 to 3

Ignore singly charged precursors: no

#### Precursor selection

Search within m/z tolerance of: 2.5 Da

Re-determine precursor m/z value when possible: yes

#### Aggregation

Scan group aggregation method: Time Domain

#### Time Domain

---

**Group Assignment**

Minimum precursor mass (Mr): 700  
Maximum precursor mass (Mr): 16,000  
Precursor m/z tolerance: 0.1  
Maximum intermediate time (secs): 30  
Maximum intermediate scan count: 5  
Use intermediate scan count where possible: yes  
Collapse MSn scans into precursor: no

**Group Filtering**

Minimum number of scans: 1

**MS Peak Picking****Filtering**

Correlation threshold (Rho): 0.7  
Minimum signal to noise (S/N): 10  
Minimum peak m/z: 50  
Maximum peak m/z: 100,000

**Peak Profile**

Minimum peak width (Da): 0.001  
Expected peak width (Da): 0.01  
Maximum peak width (Da): 2  
Reject width outliers: no

**General**

Apply baseline correction: no  
Fit method: Isotope Distribution  
Maximum peak iterations per scan: 500

**Single Peak Window**

Pick single peaks in this range (e.g. reporter ions): no

**MS/MS Peak Picking****General**

Same as MS Peak Picking: yes

***Distiller Mascot Search***

Database: SGD orf\_trans\_all.20100105 (6717 sequences; 3020761 residues)

Quantitation: SILAC K+6 R+6 [BE]

Enzyme: Trypsin

Max Missed Cleavages: 1

Fixed modifications: Carbamidomethyl (c)

Variable modifications: Acetyl (Protein N-term), Oxidation (M), Phosphorylation (ST), Phosphorylation (Y),

---

Label:13C(6) (K), Label:13C(6) (R)

Mass values: Monoisotopic

Protein Mass: Unrestricted

Peptide Mass Tolerance: +/- 10 ppm (# 13C = 1)

Fragment Mass Tolerance: +/- 0.5 Da

Instrument type: ESI-TRAP

**Mascot Quantitation Method**

Name: SILAC K+6 R+6 [BE]

Description: 2 component SILAC

**Method**

Constrain Search: yes

Protein Ratio Type: median

Protein score Type: mudpit

Report Detail: yes

Require bold red: yes

Minimum Peptides: 2

**Protocol**

Protocol: precursor

Allow mass time match: yes

**Component**

Component Name: light

Modifications Mode: exclusive                      Required: no

Unmodified position: Anywhere                      Site: K

Unmodified position: Anywhere                      Site: R

Component Name: heavy

Modifications Mode: exclusive                      Required: no

Modification: Label:13C(6)(K)

Modification: Label:13C(6)(R)

Corrections:

    Type: averagine

    Type: impurity

    Element: C    0

    Type: impurity

    Element: 13C 100

**Report Ratio**

Report Ratio: H/L

Numerator: heavy    Coefficient: 1.0

Denominator: light Coefficient: 1.0

Report Ratio: L/H

Numerator: light Coefficient: 1.0

Denominator: heavy Coefficient: 1.0

### **Integration**

Integration Method: trapezium

Integration Source: survey

Simple ratio: no

Allow Elution Shift: no

Elution Profile Correlation Threshold: 0.2

All Charge States: yes

All Charge States Threshold: 0.2

Matched Rho: 0.7

XIC Threshold: 0.5

XIC Max Width: 50

XIC Smoothing: 3

### **Quality**

Minimum precursor charge: 1

Isolated precursor: no

Isolated Precursor Threshold: 0.5

Minimum a(1)=0.0

Peptide Threshold Type: at least homology

Unique Pepseq: yes

### **Outliers**

Outlier method: auto

### **Normalisation**

Normalisation method: none

### ***Distiller Format Options***

#### **Mascot Search Import Options**

Maximum number hits: AUTO

Significance Threshold p<: 0.05

Scoring: Mudpit Scoring

Ion score cut-off: 35

Load unassigned list: no

Show same sets: yes

Require bold red: yes

Show sub sets: none

**Quantitation Options**

Hit Range: All hits

Quality

Correlation Threshold: 0.7

Std. Err. Threshold: 0.2

Fraction Threshold: no

Protein ratio type: median

Normalisation: none

Outlier removal: auto

Peptide threshold

Type: at least homology

**10.1.3 MaxQuant****Parameters****Raw files**

First search: yes ppm: 20

Search: yes

Identify: yes

**Modifications & sequences**

Variable modifications: Oxidation (M), Acetyl (Protein N-term), Phospho (STY)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Sequences

FASTA file: yeast\_orf\_trans\_all\_05Jan-2010.fasta

Randomize: no

Special AAs: KR

Include contaminations: no

**Labels**

Doublets

Trypsin

Light labels: none

Heavy labels: Arg6, Lys6

**MS/MS**

<i>Fragmentation type</i>	<i>MS/MS tolerance</i>	<i>Unit</i>	<i>Top peaks per 100 Da</i>	<i>De-isotoping</i>	<i>Higher charge</i>	<i>Water loss</i>	<i>Ammonia loss</i>
CID	0,5	Da	6	no	yes	yes	yes
HCD	20	ppm	10	yes	yes	yes	yes
Unknown	0,5	Da	6	no	yes	yes	yes

**AIF**

Time correlation: 0.8  
Peaks per 100 Da: 50  
SIL weight: 4  
ISO weight: 2  
MS/MS tolerance [ppm]: 15  
Low mass cutoff: 0  
Higher charges: yes  
Water losse: yes  
Ammonia losses: yes

**Identification & quantification****Identification**

Peptide FDR: 0.01  
Site FDR: 0.01  
Max. peptide PEP: 1  
Min. peptides: 1 (3 für Gelspots oder nicht-angereicherte Proben)  
Min. razor peptides: 1  
Min. unique peptides: 0  
Protein FDR: 0.01  
Apply site FDR separately: yes  
Min. peptide length: 6  
Min. score: 0  
Filter masses: yes  
Filter labeled amino acids: yes

**Protein quantification**

Use only unmodified peptides and: Oxidation (M), Acetyl (Protein N-term), Phospho (STY)  
Use Unique Peptides  
Discard unmodified counterpart peptides: no  
Min. ratio count: 2

**Site quantification**

Mode: Use least modified peptides

**Advanced**

Re-quantify: no  
Keep low-scoring versions of identified peptides: yes  
Match between runs: no  
Label-free quantification: no

## 10.2 Ergebnisse der IEF auf Peptidebene

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YPL262W	EFDHVVPEHMLGPK		x	x																					
YPL262W	EFDHVK							x	x																
YPL262W	SFQNFK																								
YPL262W	SKEFDHVK													x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
YPL262W	YWGAGTQR																								
YPL270W	KPSISPTVGHK																								
YPL271W	NGTAAASEPTITK																								
YPR001W	AMGPLTQLVDRILGLPIERP																								
YPR001W	EALENVIPK																								
YPR001W	GSLFATNYQK																								
YPR001W	ILGLPIERP																								
YPR001W	LAEIAPK																								
YPR001W	RPIEFENDK																								
YPR002W	KSWAAGDAVSR																								
YPR002W	NPEIDNLR																								
YPR002W	SSLALDTAR																								
YPR002W	SWAAGDAVSR																								
YPR002W	VDLIMKYSSK																								
YPR002W	VGLDHWLVVK																								
YPR002W	YVHETPLK																								
YPR004C	ASAFPIAEGMDSVTIEK																								
YPR004C	IVPELTK																								
YPR004C	LSNPITAVITGSK																								
YPR004C	LVIFEDSK																								
YPR006C	IIFDWDAPR																								
YPR006C	KEDLMVVK																								
YPR006C	KIIFDWDAPR																								
YPR006C	TPDLEOAR																								
YPR006C	VEEWWESAR																								
YPR024W	AELEIVDFLK																								
YPR024W	GVLTPGPGTGK																								
YPR024W	IAEELVYK																								
YPR024W	VNVVDLPDVR																								
YPR047W	EPMYEK																								
YPR047W	NIAGDLVESVK																								
YPR058W	LLANEGPR																								
YPR073C	TIEKPK																								
YPR080W	FDELLEK																								
YPR080W	FQEIVK																								
YPR080W	IGGIVPVGR																								
YPR080W	TLLAIDAIEQPSRPTDKPLR																								
YPR098C	KYTGSELEAK																								
YPR098C	YTGSELEAK																								
YPR100W	NLNIDNVENK																								
YPR124W	HYDTENNFEIQGLPK																								
YPR155C	LGSFLIPR																								
YPR165W	SQQVGNIR																								
YPR166C	LPPGFINAR																								
YPR183W	LFAGMSEMAK																								
YPR191W	ASLAQYEVLANYLTSALSELGLISSAK																								
YPR191W	ESELLGGTFK																								
YPR191W	FFLGEENR																								
YPR191W	FNFONTNTR																								
YPR191W	FVDESLSTLPAGK																								
YPR191W	IVADLK																								
YPR191W	KIVADLK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
O0050	WTYEERK				x																				
O0055	LIHEEMK										x										x				
Q0140	IGPAGNINNK		x																		x				x
YAL038W	GVNLPGTDVLDLPALSEK																								
YAL039C	AEQOPPTFK											x													
YAL039C	FMGRPGVLSR																								
YAL039C	GWFWADOK																								
YAL039C	KAEQOPPTFK																								
YAL039C	MDLPVDR		x																						
YAL039C	MISGPSSSSAP																								
YAL039C	TISSIPK																								
YAL048C	AEFIPTQDVLPPISIPR			x																					
YAL003C	AGLTFVYGR																								
YAL004W	IGGIIR																								
YBL015W	AFANWENFK																								
YBL015W	AIAGHLVEFFR																								
YBL015W	APHQVQKPIAK																								
YBL015W	AVPEALIDHVEK																								
YBL015W	DQVPPNTPSDMSR																								
YBL015W	FHTNLAEK		x	x	x	x																			
YBL015W	FNLVYGASAGPEENR																								
YBL015W	HGRLEPPELLQSGIGNIANAVIEGLAGAQFK																								
YBL015W	IEFFDK			x																					
YBL015W	LPEPLLQSGIGNIANAVIEGLAGAQFK																								
YBL015W	LSIMHAPSARPTK																								
YBL015W	MLNGLGGSADFLR																								
YBL015W	RAPHQVQKPIAK																								
YBL015W	SOVVSNNPEMIR																								
YBL015W	VIENVNTATPSFEGIHIDIMPNPFR																								
YBL015W	VVAIVESTIMR																								
YBL015W	WAEHDMIK																								
YBL022C	DNLNDWEELPDNVK		x																						
YBL022C	IKIDELFPNEEK																								
YBL022C	LEDIVVER																								
YBL022C	LSIEDSPTSSADSKPK																								
YBL022C	NYLDWLTSPWQK																								
YBL022C	SPVINALTSEILK																								
YBL022C	TGQLGDVMK																								
YBL022C	TIIFPK																								
YBL022C	TSDDIEALK																								
YBL030C	GNTANVIR																								
YBL030C	GVAGAGVISIMYDQLMILFGK																								
YBL030C	IAAEGVGSILFK																								
YBL030C	TAASPIER																								
YBL030C	TPLPAPAPK																								
YBL045C	AAFLGSEVR																								
YBL045C	EGLALSSNISR																								
YBL045C	IRSDMSNMIR																								
YBL045C	LRDDTLFK																								
YBL045C	LSLGEAFK																								
YBL045C	LTISYTDTEVER		x	x	x																				
YBL045C	NLSLQGTGKPKVLK																								
YBL045C	QVQDFEENDHPNR																								
YBL045C	SDMSNMIR																								
YBL057C	AVLDOITGDLK																								
YBL059C-A	IEEEYGEDALK		x																						



ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YBL064C	INSDAPNFDAITTVGK	x	x	x	x	x	x								x	x	x	x	x	x	x				
YBL064C	NVGFPIIGDTFR				x	x	x								x	x	x	x	x	x	x				
YBL064C	SVFVIDPK																								
YBL064C	WIQDIK																								
YBL099W	IEWTDDK		x																						
YBL099W	APGLPR																								
YBL099W	AVDALVPIGR																								
YBL099W	EGELVK			x																					
YBL099W	ELIHDR			x																					
YBL099W	GPIDAAGR																								
YBL099W	GVSDKANLNETGR	x	x	x	x	x	x																		
YBL099W	IGEFSSFLSYLK			x																					
YBL099W	LFLAQYR																								
YBL099W	SNHNELLEIR																								
YBL099W	TGNIVDPVGPGLLGR			x	x	x	x	x																	
YBL099W	VVDALGNPIDGK	x	x	x	x	x	x																		
YBR025C	LSHMSPEDAEEELKK			x	x	x	x																		
YBR026C	DRDNFEVAK	x	x	x																					
YBR026C	IDTISDFIK			x																					
YBR026C	TLAFINPNDINLQGVYPSRPEK																								
YBR037C	VPVSGTPIK																								
YBR039W	FEIDTDANVPR	x	x	x	x	x																			
YBR039W	LLSVMK																								
YBR039W	LSINGIGK																								
YBR039W	NAGDMINR																								
YBR039W	NLDVEATETGAPK	x	x																						
YBR039W	TIEQSPSFGK																								
YBR041W	FVDEIK																								
YBR041W	RGDAWYR																								
YBR044C	TYDEVDSK																								
YBR046C	LVEIIPQ																								
YBR047W	FIELVTPR																								
YBR084W	ANDEIGAIK																								
YBR084W	EDPDALTPPEVK	x																							
YBR084W	EKANDEIOAIK																								
YBR084W	IEVSPAQK																								
YBR084W	LVGDVDFDSVK	x	x																						
YBR084W	YNAGELAK																								
YBR106W	EIDSAIK																								
YBR106W	YVEPGNAIAMSGEGEK																								
YBR109C	LTDAEYDDMLR	x																							
YBR120C	EKKPSLDEIK																								
YBR120C	FTEESINEQIR																								
YBR120C	KPSLDEIK																								
YBR120C	VAGLPNVDDK																								
YBR121C	DVQEAAGSTEPIVK		x																						
YBR121C	EFLMAEIEHFVDPDK																								
YBR121C	EQLSVLIR																								
YBR121C	LDNPIEVTK																								
YBR121C	MSVEDIK																								
YBR121C	SVLSFPPLVAPTK																								
YBR121C	WEIDLTK																								
YBR122C	MELSDGWSVIR																								
YBR122C	NNPLWNPSR		x	x	x																				
YBR126C	KOLLEK																								
YBR126C	VKIHEK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YBR146W	LERLLR			x																					
YBR146W	MPTWVK			x																					
YBR146W	MPTWVKR			x																					
YBR146W	TLDEFGR			x																					
YBR184W	IPNAIR																		x						
YBR189W	KAEASGEAAEEAEE	x																							x
YBR221C	ELEDFAFDPTIVK	x	x																						
YBR222C	LOSSEIK										x														
YBR237W	LSLDNIK										x														
YBR251W	NVEFAPPYDDFTK		x																						
YBR251W	TIYGDIDFR			x																					
YBR251W	WDQVQQQLPGEKNILPPGVSLPNDGGR		x																						
YBR262C	EVPPGETR			x																					
YBR263W	AVMDLLGSELONK			x																					
YBR263W	EEFSQVAK		x																						
YBR263W	LIDYARFK			x																					
YBR263W	WVGOYVPVGDJ																								
YBR263W	YSEGYPGER		x																						
YBR263W	YGGNEIIDK																								
YBR269C	NDIGSFSEFSK		x																						
YBR269C	TIPEFEGDVNPK		x																						
YBR283C	LIDIVKILPILPELPEFK																								
YCL014W	LIER																								
YCL031C	GIEDISAMK																								
YCL043C	KADIADADVFEK			x																					
YCL043C	NHDEIVNDPK			x																					
YCL044C	DIADFTLNR		x																						
YCL044C	FFNIVK																								
YCL044C	TPTSTQDPLPGTPK																								
YCL044C	YHEGIDPTK																								
YCL057C-A	AFPVWLGIGFVGR																								
YCL057C-A	GYAEGDAIFR																								
YCR003W	DKDNYLER			x																					
YCR003W	DNYLERR			x																					
YCR003W	EKLQDHK			x																					
YCR004C	MNAPQKPEDIPVATEK																								
YCR004C	TGGLWAK																								
YCR004C	VEETLPDEVLTk																								
YCR012W	AGAEIVPK																								
YCR012W	ALDEVVK			x																					
YCR012W	LSVQDLDLK			x																					
YCR012W	YHIEEGSR																								
YCR021C	EAVPESPR																								
YCR028C-A	KLEDAEGQENAASSE	x	x																						
YCR028C-A	YSIASQPR																								
YCR031C	IEDVTPVPSDSTR																								
YCR031C	TPGPGQAALR																								
YCR032W	FVEDLK																								
YCR032W	LGEFTGDK																								
YCR046C	LDVGDLEAGLR	x	x																						
YCR046C	LDVGDLEAGLR																								
YCR046C	LDVGDLEAGLR																								
YCR046C	TIPVYPPVQR																								
YCR071C	AAEAIPFK																								
YCR071C	NDLQEQLPFIPK																								
YCR083W	LIQAYPDVR																								
YCR102C	ILEDIK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YDL004W	NLLAEAK								x																
YDL007W	OLEEIR			x							x														
YDL007W	VIMATNK			x																					
YDL007W	YLDGGR			x																					
YDL027C	ILOESETSNSK				x																				
YDL044C	IFEDNSINK		x																						
YDL044C	LGDFDFPADR																								
YDL044C	SDYDLR		x																						
YDL046W	IVEIPGEVPPGK				x																				
YDL046W	QLVEIK											x													
YDL066W	EIKSIE			x																					
YDL066W	IGDAAEAIAK			x	x	x	x																		
YDL066W	MSMLSR			x																					
YDL066W	OPVVELDGDVEMTR		x																						
YDL066W	WEKPIISR																		x						
YDL066W	YYDLSVESR			x	x														x						
YDL067C	MTIAPITGTIK																		x						
YDL067C	TIAPITGTIK																		x						
YDL072C	IQDIDDEIAR		x																						
YDL078C	FAEVLIR			x	x																				
YDL085W	LOKEVNLIR			x																					
YDL085W	VILIEALPNILNMFDK			x	x	x																			
YDL104C	DTLDSIDEGGIPTK																								
YDL130W-A	KLENLENK		x																						
YDL171C	ATSEYLK																								
YDL173W	VASNGGNEEIR																								
YDL174C	FMNNVYK																								
YDL174C	IDPVNSTLK																								
YDL174C	KIDPVNSTLK																								
YDL174C	LAIQPK																								
YDL174C	LINASESTD																								
YDL174C	TDNEPANDYR		x	x	x	x	x																		
YDL174C	VVEDLK																								
YDL174C	YVSIASSATLFGYLFQAK																								
YDL175C	GETLSLNNISK																								
YDL175C	VNVSSISEMNYGSR																								
YDL178W	LTSDLLNYFK		x	x	x																				
YDL178W	SILSQEILR																								
YDL178W	SPEEVK																								
YDL178W	VHYDPNGILNPKY																								
YDL181W	ATEDFFVR																								
YDL181W	GGSEDSFVK																								
YDL198C	FDNLSK																								
YDL198C	KDFDLNLFGEK																								
YDL198C	MPHTDQK																								
YDL198C	NFNPESGLR																								
YDL202W	TLPTKPEMQSOLVQLMLSLGLVLR																								
YDL217C	LQFTDMGKK																								
YDL217C	SEDRPPONDFK																								
YDL217C	SEDRPPONDFKE																								
YDL225W	IQELER																								
YDL225W	LEELEAGOSAK																								
YDL233W	GAFDLK																								
YDL237W	FAFLDAPLLSLEPK																								
YDR011W	VGNDFVR																								
YDR019C	LLVQVR																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YDR036C	NGTIEDIMNNLR			x	x																				
YDR038C	AVGENTLGGDDTK	x																							
YDR038C	MHPDIDSPVK		x																						
YDR041W	AWDTNPEVLQMLIAYITK			x	x																				
YDR041W	ENFERHTHK			x																					
YDR041W	NTIALRSFIR			x																					
YDR061W	LISPEGEYIGDMEN	x																							
YDR070C	IEONRPPDGGVY	x																							
YDR070C	QPGMEDLK			x																					
YDR070C	QPGMEDLKK										x	x													
YDR099W	SKIETELTK																								
YDR116C	SGEISVDFDK																								
YDR116C	YPNHLIGGADLVAK																								
YDR119W-A	IGESWVITEGR																								
YDR146C	LELELK			x																					
YDR148C	AEPPVVASNSFTPPPR																								
YDR148C	ELIEDPR																								
YDR148C	IDIEVNSPVSQVTK			x																					
YDR148C	LYKDEIHK																								
YDR148C	NVGDFFK																								
YDR148C	STSEVPPMAESLTEGSLK																								
YDR148C	TAAAKSLVK																								
YDR155C	KVESLGSFSGATK																								
YDR155C	LYNDVPK																								
YDR175C	YDHTTDIIFK																								
YDR178W	GTNDAYVPPENK	x																							
YDR178W	MLPRSMK																								
YDR178W	SLWDSSEK																								
YDR194C	LIDVLEK																								
YDR194C	LYNDGNR																								
YDR194C	SREDDDEVHFDK																								
YDR194C	YEPSEEIK																								
YDR197W	IAQLPSQPK																								
YDR218C	IDLLEK																								
YDR218C	TAHLSPLK																								
YDR226W	GTQAPNLQER																								
YDR226W	MVLIGPPGAGK																								
YDR231C	FADDLNSQLAK																								
YDR231C	ILLEDTPPK																								
YDR234W	GGLEGWVK																								
YDR237W	AQLPDHPIK																								
YDR258C	AEIESIK																								
YDR258C	IIEKDPALSR																								
YDR258C	IPDEK																								
YDR258C	IQIELESK																								
YDR258C	IVAGEVPDSLK																								
YDR258C	IWDAER																								
YDR258C	KVLEEIDK																								
YDR258C	LDPVIGR																								
YDR258C	LOHESKPDEIQK																								
YDR258C	TDGSMIDASNILKPK																								
YDR268W	FYDYPVERPGVSNLINVSGIOR																								
YDR268W	SIEDVVVEDVSR																								
YDR296W	VFENATPAEK																								
YDR297W	AMNAAENEVYK																								
YDR298C	AAAPPPVVR																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YDR298C	DRNSVIDAIVETHK																								
YDR298C	LENVVKPEIK																								
YDR298C	NLDGYVNNLLK																								
YDR298C	NSVIDAIVETHK																								
YDR298C	NSVIDAIVETHKLDGYVNNLLK																								
YDR298C	TVLDSISTK																								
YDR316W	ELEPVPPVSK																								
YDR316W	ERFEEQLR																								
YDR316W	FEEOQLR																								
YDR316W	GKPSLENEK																								
YDR316W	GOYDFINIK																								
YDR316W	KELEPVPPVSK																								
YDR322C-A	NDMILK																								
YDR322C-A	VILNAVESLK																								
YDR322W	ASLDPPSISR																								
YDR322W	YSPPEHIDEIFR																								
YDR337W	GYNIEVDK																								
YDR342C	AYGEGEEHEPVVEIPK																								
YDR342C	LWPNQDQPPSSK																								
YDR342C	YLAEVGK																								
YDR347W	EAGNLEDEMTAK																								
YDR347W	IVESRLPQR																								
YDR347W	TISNEPLTTGNER																								
YDR347W	VWDSIEWK																								
YDR375C	DKHLFDLILNEAK																								
YDR375C	HLFDDILNEAK																								
YDR376W	YGVAPDHPEVK																								
YDR381C-A	NYDNLQAVKPGFPIPK																								
YDR405W	VAQPFIPR																								
YDR430C	EGVSTVIGPQIEGK																								
YDR430C	FRGDELETK																								
YDR430C	GDTLFQDLIR																								
YDR430C	NIIDPESNIVFK																								
YDR430C	TSDYPLIGISK																								
YDR430C	TVSPNWEVKEL																								
YDR430C	WGVTDLDEAK																								
YDR494W	SPNLGILK																								
YDR494W	VHDFLTLPNFGK																								
YDR511W	DIDNPLHIVGLASWQDYLHMISNGKWK																								
YDR511W	LHQDNEIESK																								
YDR513W	HIGNSDLETLK																								
YDR529C	DELDNIEVSK																								
YDR529C	EKELDNEIVSK																								
YDR529C	LPEDESAR																								
YDR529C	RLPEDESAR																								
YDR538W	IGFTEDLITR																								
YEL002C	HLANDEYPR																								
YEL002C	LFDNIIVFPTK																								
YEL019C	MALNDNPIPK																								
YEL019C	YRTGELTAPK																								
YEL024W	TPNFDDVLK																								
YEL030W	ADQLANDTENSISK																								
YEL030W	FEDAEVQR																								
YEL030W	HIRMPFSR																								
YEL030W	HSNGDAWFEAR																								
YEL030W	MLPSWK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24	
YEL030W	RFEDAIEVQR		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
YEL030W	SOAGDEVNDDVGTGK	x																								
YEL031W	LSDIPK																									
YEL039C	ESTGFKPGSAK																									
YEL039C	VGNLHGIFGR																									
YEL050C	DDSSLNITPR	x																								
YEL050C	IEYDPR		x	x																						
YEL050C	LSKEVTOMK		x	x																						
YEL050C	QDELK		x	x																						
YER004W	DVIALDFK		x	x																						
YER004W	ELFPATDK		x	x																						
YER004W	LLGYNYGDEVGK		x	x																						
YER014W	FLDPSDK		x	x																						
YER014W	LLGVFDSVIER		x	x																						
YER017C	GAILSGPPGTGK																									
YER017C	HIGIDSPDVNGR						x	x																		
YER031C	NEFNMDSK		x	x																						
YER031C	TLEIDSK		x	x																						
YER031C	TLEIDGKR		x	x																						
YER048W-A	NDLGVLK					x																				
YER048W-A	PGFTAPTR																									
YER050C	SVNIEMGR																									
YER053C	IGFTGLWGLMVR																									
YER053C	IANEGWK																									
YER061C	IPENFQENSAINK																									
YER069W	DIEGTHGVIGGFK																									
YER069W	GSLIDEIR		x	x																						
YER069W	KDTNVPTLDK		x	x																						
YER069W	SSIGEFPSADALR		x	x																						
YER073W	IADKPIR																									
YER073W	ILDYDVAK		x	x																						
YER073W	IYGNVIDTGK																									
YER073W	KVTELEGGK																									
YER073W	LKDYTESLK																									
YER073W	LSAHPDVK																									
YER073W	LVTGAR																									
YER073W	VTELEGGK																									
YER073W	WSIVEPEVR																									
YER080W	EAGSSAELMYPK																									
YER080W	EDITDFDK	x																								
YER080W	IGPSVER																									
YER080W	KSPMDIJK																									
YER080W	KYDNVVK																									
YER080W	LITAVAPPVK																									
YER080W	NTGLLEAENAK																									
YER080W	RDAFFK																									
YER086W	LDELQDNTDPOYVR	x																								
YER086W	LNTNVLK																									
YER086W	MIGEETFR																									
YER086W	YISTVHPEIDHTK																									
YER087W	DNEDIMFSK																									
YER087W	SWPNVIEVR																									
YER120W	AVADVMSDLEAEFK																									
YER120W	EVAEPEIOPPVQVK		x	x																						
YER120W	KEEVPVQVK																									
YER141W	KDLWWR																									

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YER141W	KLDNPAIGPMR																								
YER141W	LDNPAIGPMR																								
YER141W	YKESPEFK																								
YER154W	ITEVAKPR																								
YER154W	KLOESFK																								
YER178W	GQYIPGLK																								
YER178W	GRIPEDTWDFK																								
YER178W	GTEIPTLR																								
YER178W	IPEDTWDFK																								
YER178W	IPEDTWDFKK																								
YER178W	NDPIAGLK																								
YER178W	RGQYIPGLK																								
YER178W	SKNDPIAGLK																								
YER178W	YGMGTAASR																								
YER182W	ALNTPGGVAIPPR																								
YER183C	NLFQDGGVEFLPR																								
YFL005W	EGNISINSGNSSK																								
YFL016C	KYHPDINK																								
YFL016C	LENFITNFR																								
YFL016C	LENFITNFR																								
YFL016C	YKDPNFSIK																								
YFL016C	YHPDINKPDAEK																								
YFL018C	AEEEGIAAEMLK																								
YFL018C	AKTNQDTEGFVK																								
YFL018C	EDHILDVK																								
YFL018C	PFFAANSR																								
YFL018C	GIDVNGDIK																								
YFL018C	IGKPFPAANSR																								
YFL018C	IGLEVDK																								
YFL018C	IGLEVDKR																								
YFL018C	ILGAHIGPNAGEMIAEAGLALEYGASAEVDAR																								
YFL018C	IVSSTGALSJK																								
YFL018C	LGSKVTVVEFPQIGASMDGEVAK																								
YFL018C	LVIDDQFNSK																								
YFL018C	LVIDDQFNSKFPPIK																								
YFL018C	NDDKNVVEIVEDTK																								
YFL018C	NIIVATGSEVTFPFGIEIDEEK																								
YFL018C	NIIVATGSEVTFPFGIEIDEEKIVSSTGALSJK																								
YFL018C	NVVEIVEDTK																								
YFL018C	QLTGGIELLFK																								
YFL018C	TEEQKKEAGIDYK																								
YFL018C	TNKGLENLEAVLLVAVGR																								
YFL018C	TNQDTEGFVK																								
YFL018C	VTPVDGLEGTVK																								
YFL018C	VTPVDGLEGTVKEDHILDYK																								
YFL018C	VTVVFPQIGASMDGEVAK																								
YFL018C	VVGDVTFGPMIAHKAEEEGIAAEMLK																								
YFL030W	EILEEGLHK																								
YFL030W	SHGVVYAGGHHK																								
YFL036W	LDVDEKSFK																								
YFL036W	LEIAAEK																								
YFL036W	LKEEFDQR																								
YFL036W	LNDLETSFK																								
YFL036W	MLRPAYKSLVK																								
YFL039C	AGFAGDDAPR																								
YFR011C	LSNLEVETLK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YFR016C	AELNLDAPK		x																						
YFR016C	FEITQEGDK		x																						
YFR033C	IQQQPGYADLEHK								x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
YFR044C	LDELIK			x																					
YFR044C	LVIDEAK			x																					
YFR049W	FMEYKPFRR																								
YGL008C	ADTGIAVEGATDAAR	x	x	x	x	x	x																		
YGL008C	GLDAIDK			x																					
YGL008C	KADTGIAVEGATDAAR			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
YGL008C	KGLDAIDK																								
YGL008C	KVTAVESPEGER					x																			
YGL008C	LNGKPKMK																								
YGL008C	SAADIVFLAPLSAIDALK		x	x	x	x																			
YGL008C	TVEEDHIPEDVHENYENK		x																						
YGL008C	VLEFHPFDPVSK																								
YGL031C	KGITEEVAK																								
YGL064C	KFEIPDSNIVIGK																								
YGL068W	DDVRPVPDK			x																					
YGL068W	FVEAAPK																								
YGL068W	KFVEAAPK																								
YGL068W	KTLEDLGAK																								
YGL068W	TLEDLGAK			x																					
YGL093W	ISGVLPSFTKSR																								
YGL093W	KLNEAIK																								
YGL093W	LPEIDK																								
YGL099W	EOVQNAAKAK																								
YGL099W	SSTNSLVGAK																								
YGL107C	DISDDLIGK		x																						
YGL107C	SIIDFIK																								
YGL119W	ISSVSSLSLKK																								
YGL119W	MEGTEIMK																								
YGL119W	MGASVHCAC																								
YGL129C	EDATNSFLK		x																						
YGL129C	GNVTEFEVPK																								
YGL129C	LMMDIISGETK																								
YGL129C	LVSHPYKK																								
YGL191W	DTSNMWVK																								
YGL191W	HVPDSEWPR																								
YGL191W	SKPFFWGDGDK																								
YGL210W	GPTISLTPAPK																								
YGL216W	EREK																								
YGL216W	QIEELR																								
YGL216W	TMIVIGISFSSHYDETLNLK																								
YGL226W	LEEQLR																								
YGL226W	MMGRNGIR																								
YGL244W	LGGLER																								
YGR012W	AHISLPDDTSLEK																								
YGR012W	AVFADQFENEANWK																								
YGR012W	FIDESIR																								
YGR012W	KACNELK																								
YGR012W	VNDNGAIRMAK																								
YGR021W	LNGGITDPSMNIK																								
YGR028W	INDIDDAFLR																								
YGR029W	KVDPDVEQLGR		x																						
YGR029W	MTDNPPEGLSGR																								
YGR031W	GEIAAWPLDPAK																								



ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24	
YGR031W	IGGNELVR												X													
YGR032W	VQLSGNPILGDGK										X															
YGR049W	LPOHHEVK											X														
YGR060W	LGITVEVPFSLK											X														
YGR076C	AIANPFLPNK												X													
YGR076C	LFEEK			X																						
YGR076C	YGVVEEFLPIENTK		X																							
YGR082W	SQSNPILR																									
YGR086C	DIEGSVQPSR		X																							
YGR086C	IEVLEQLVR			X																						
YGR094W	SAAGAFGPELSR																									
YGR094W	DGQITITPK																									
YGR094W	DINLDIR		X																							
YGR094W	EAVDMEFGTGAVK																									
YGR094W	GHVDIAEIAK																									
YGR094W	IVNEALDK			X																						
YGR094W	MSLDLNLPPVDPK																									
YGR094W	SLGNVIDPLDVTGIK		X																							
YGR094W	TLLSVFGYDEK																									
YGR102C	LHNIPVEGK																									
YGR110W	HILNGPEQSK																									
YGR112W	LTYEPIPLK																									
YGR132C	ANFEGIK																									
YGR132C	VLPISIGNEVLK																									
YGR134W	DNDILLK		X																							
YGR134W	FLLANK																									
YGR147C	GNFSDFIK																									
YGR150C	IITPEDVEFK			X																						
YGR150C	MDQIR			X																						
YGR150C	YMARCGPK			X																						
YGR165W	ENLSEIPVQK			X																						
YGR165W	GOSLEHPVTK																									
YGR165W	KPLQLR																									
YGR165W	LQIFK																									
YGR165W	LVSVNSWNR																									
YGR165W	MFVFDSDASFK			X																						
YGR165W	VIVGELVEGER			X																						
YGR165W	YDGTGPPVYENK		X																							
YGR174C	AEVQKEELAR			X																						
YGR174C	QSEQQALMIK			X																						
YGR174C	QSEQQALMIK			X																						
YGR174C	TGPLQSPWER																									
YGR174C	TGPLQSPWERGDNVQSR																									
YGR192C	HIIVDGK			X																						
YGR193C	KATVTPIK																									
YGR193C	YFDPIFEDLVLSR		X																							
YGR207C	ILVPVK																									
YGR207C	VDFQIKPR																									
YGR207C	YVGLPK																									
YGR215W	IFDQNFPSGIR																									
YGR220C	EHVAEFR																									
YGR222W	SILDSVEEIK		X																							
YGR231C	DYVELK		X																							
YGR231C	IVASLTGTK			X																						
YGR231C	TLGODYDER		X																							
YGR234W	DDMIHYEFGPK			X																						

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YGR234W	LSAPAGDFAINK																								
YGR234W	MIAEKTR			x																					
YGR243W	GVGTNPPIPTH																								
YGR244C	AQALTGGRGK			x																					
YGR244C	DLSOEDPDEVK																								
YGR244C	FGDDNASFR			x																					
YGR244C	GHFDITGYK																								
YGR244C	YSFDELPPAAK			x																					
YGR244C	KFSIETSK																								
YGR244C	KLINTNK			x																					
YGR244C	NVDAIFVNIQIVR																								
YGR244C	VPIVAR																								
YGR255C	ISOYDSKK																								
YGR255C	LIEDIK			x																					
YGR255C	MMIDTLGGNEK																								
YGR255C	MAANSGLDSK			x																					
YGR263C	MWQDILK																								
YGR266W	VGDVPIGIIEGQK																								
YGR286C	LQFDEILR																								
YGR286C	VDEVIK																								
YHL004W	LYDEIR																								
YHL004W	NALLEAIK																								
YHL004W	NPSLTKR																								
YHL004W	GEISNDNPTER			x																					
YHL004W	SLSOVPEDEILPELK																								
YHL004W	SVNFFLGLVAR																								
YHL012W	LIAGGK																								
YHL030W	DQQTAK																								
YHL030W	EHIVAALVSLTEK																								
YHL030W	IELELK																								
YHL030W	VMDTIQDK																								
YHL030W	WSSKYLK																								
YHL030W	YTLLSNEFTATNSK																								
YHR001W-A	FQDTLYK																								
YHR001W-A	IFLLGPTLEDHTPPEDKPN																								
YHR001W-A	KIPLGPTLEDHTPPEDKPN																								
YHR005C	NLIHEDIAK																								
YHR005C-A	MGQSFNAAGK																								
YHR008C	AIDEQFGSLDELK																								
YHR008C	AIWNVVNWIK																								
YHR008C	EPSANAR																								
YHR008C	LAGVQGSWAFIVK																								
YHR008C	VTLPLDK																								
YHR021C	TLVQGR																								
YHR023W	DAISLAEK																								
YHR024C	GSFGDVENVLK																								
YHR024C	IEDLKPDDISR																								
YHR024C	STHVEGR																								
YHR038W	VEEIDEIVNELLK																								
YHR038W	VPNNDLQK																								
YHR038W	VSLPPPTTESR																								
YHR051W	AYLDELK																								
YHR051W	RVNDLPTAIR																								
YHR051W	VNDLPTAIR																								
YHR051W	YKVENEDQYK																								
YHR063C	LPWTEEMIGK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YHR067W	MPVGEENYK			x																					
YHR083W	GGGSELLTVEG1YK			x																					
YHR091C	GDLLPLPK										x														
YHR094C	LWPNQGDQPSSK									x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
YHR097C	LPSYEEAAGTPK																								
YHR106W	QVDDEEETGYIK																								
YHR117W	AENSLLR																								
YHR117W	ALEIKPDHDK																								
YHR117W	NFNEAIK																								
YHR129C	VDLDR																								
YHR147C	GIYVNDETIK																								
YHR167W	FLENK																								
YHR174W	YLDLDFK																								
YHR179W	TDEYGGSIENR																								
YHR199C	VVPVLTGLALASIFAK																								
YHR208W	GYQQNLWLFQPEK																								
YIL022W	AWSELGK																								
YIL022W	DPEQIDDDDETEGWK																								
YIL022W	EVSEVIDDGESSR																								
YIL022W	ILDJR																								
YIL022W	KLDESEFVPR																								
YIL022W	LMDPTFSNESFTR																								
YIL022W	SPLQIFR																								
YIL022W	SQELQENIK																								
YIL022W	VGGFFAETESSR																								
YIL044C	ALSALLR																								
YIL051C	HFHTRKPAR																								
YIL051C	NILAESNSSLDNIVK																								
YIL065C	TKYDFWPTLK																								
YIL065C	VDFWPTLK																								
YIL070C	FSLVETPGK																								
YIL070C	FSLVETPGKNEAEIVR																								
YIL070C	VGDILOSELK																								
YIL075C	YISFIK																								
YIL077C	LLDSGSPSR																								
YIL077C	NGDNSSSSSWENIR																								
YIL093C	TSNPAGGSWK																								
YIL098C	IVNWGNLR																								
YIL105C	DPNPLLPNLMR																								
YIL108W	TNSTGASPIFPK																								
YIL111W	TLNNEIK																								
YIL124W	FVMFVPMWLEK																								
YIL125W	AKDYVPSOR																								
YIL125W	EINLGGILPR																								
YIL125W	FGLEGSVVPQIK																								
YIL125W	KPNESIFSEK																								
YIL125W	KWVWNLFEDEFK																								
YIL125W	LISEGTFSK																								
YIL125W	SLHAEEDAFK																								
YIL125W	VLSSWPEGFVHK																								
YIL125W	WVWNLFEDEFK																								
YIL125W	YFPSEEK																								
YIL136W	ASIEYER																								
YIL136W	FEEAVDR																								
YIL136W	FKEWNDK																								
YIL136W	IIVGSAALAAAITASIMVIR																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YJL136W	KYDEALK																								
YJL136W	RFEAVDR				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							
YJL136W	RVISPEEDAQTR					x																			
YJL136W	SVQGWGDTAQEFGR			x	x																				
YJL136W	VISPEEDAQTR		x	x	x																				
YJL155C	AFWEFSK												x	x											
YJL155C	DMGLLDVLR																								
YJL155C	DVETNELVR																								
YJL155C	LIKDPTSGK																								
YJL155C	NPSGLPDSPLDINSK		x	x	x	x																			
YJL155C	OWELEK																								
YJL155C	TPLDFLLR																								
YJL155C	VLGGTTDIPLK																								
YJL155C	VMGDFNWSK		x	x	x	x																			
YJL157C	ELPDPITTER																								
YJR038C	NGYLYVDGK																								
YJR038C	NQDFVEGEISK																								
YJL034W	LENYAHSK																								
YJL034W	LTQEEIDR																								
YJL034W	SVQKDIK																								
YJL034W	VLDGSGLEK																								
YJL045W	HTLSWQK																								
YJL045W	TQDTLDEGVR																								
YJL046W	DKGLTIK																								
YJL046W	LDLNER																								
YJL054W	HIISEDALTK																								
YJL054W	IQDPAEEDDSDFPEISK		x																						
YJL054W	KPGYTNPALK																								
YJL054W	VQDDLK/DEENSEDSOK		x																						
YJL063C	LFSEIAPR																								
YJL066C	GFYEGDDNDANTK		x	x																					
YJL104W	AGDASTAKPPPNSTNSSGADNSASSNQ		x	x																					
YJL104W	ILNIEESK																								
YJL112W	DVMSKTNER																								
YJL112W	LLTEGGENELR																								
YJL130C	QVIAEAK																								
YJL147C	ILNSNLPEVESK																								
YJL171C	MFLFEFEMPTETEK																								
YJL176C	QMEKLDKAK																								
YJL180C	GMEEFLLR																								
YJL180C	JALQLDGR																								
YJL180C	IGGNSDVIK																								
YJL180C	NAQNELYIPIIK																								
YJL180C	TMDNIVR		x																						
YJL180C	TPLNGIIVDNAK																								
YJL180C	WGEVEDTHDVKR																								
YJL208C	IVTGPLYLPK																								
YJL208C	LIVAEAPTANPAR																								
YJR003C	DLDKPSLPAIK																								
YJR003C	GKVSLEFK																								
YJR003C	VIFDGAUGEK																								
YJR016C	DGDEIIDADNKK																								
YJR016C	KQSWVAPPPR																								
YJR016C	LSPDDFGR		x	x	x	x																			
YJR016C	YSYIITEPK																								
YJR019C	HTDELDFYVK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YJR045C	ADQLANDTENSLSK	x	x	x		x																			
YJR045C	FEDAEOVR	x	x	x		x																			
YJR045C	FKTETGIDLENDR		x	x		x																			
YJR045C	HSNGDAWVEAR					x																			
YJR045C	IENAEGSR					x																			
YJR045C	LIPRNTIIPTK			x																					
YJR045C	RFEDAEOVR		x	x		x																			
YJR045C	SIFGKDPK		x	x		x																			
YJR045C	TETGIDLENDR		x	x		x																			
YJR045C	VGGEEVNAEELK		x	x		x																			
YJR045C	VRDQITSLK					x																			
YJR077C	APGGSTVGLLAQLAK																								
YJR077C	APGGSTVGLLAQLAKLQGGFAGLPT																								
YJR080C	KSNVNDNGVNLEK																								
YJR080C	SNVNDNGVNLEK																								
YJR085C	DGGLMAGASTLLGAGVIR																								
YJR095W	EHLNLSGIFK																								
YJR095W	RVAGIEHVKPPGFIK																								
YJR095W	VAGIEHVKPPGFIK																								
YJR101W	DSFNGSDWEVK																								
YJR104C	LIGPISVVGVR																								
YJR104C	SVIHAGQDDLKGGDTEESLK																								
YJR104C	THGAPIDEVR																								
YJR113C	EYLPETSLAPPGQSK																								
YJR113C	VDLLQSOAGSK																								
YJR117W	LPVLEIDEIDETPHK																								
YJR121W	IGLGGAGVGGK																								
YJR121W	TVFIQLUNNIAK																								
YJR121W	VLDTGGPISVYVGR																								
YJR122W	TWDVEVQFNLPK																								
YJR123W	GSSTSYAIKK																								
YJR123W	WSFEEVEVK																								
YJR135W-A	FLDTNIR																								
YJR144W	AFGAGGWGLVPR																								
YJR144W	DLIEPLDPK																								
YJR144W	FVEHVTTK																								
YJR144W	LGTPLETR																								
YJR144W	STADDSLNNYSK																								
YJR148W	ELVTAPLDGTILEGVTR																								
YKL002W	SLFEWVFGK																								
YKL016C	GKWDVPGYK																								
YKL016C	IKPEIDAK																								
YKL016C	VEEMVK																								
YKL029C	IEGEQVPGGAPGETVK																								
YKL029C	LSVSAARSQLTR																								
YKL029C	NDFMTSLR																								
YKL029C	TPVGSRAR																								
YKL029C	VLPVCLDVGTTNKK																								
YKL033W	LSEDMSLK																								
YKL040C	FLSTDGEMILQTR																								
YKL056C	KSFLTYIK																								
YKL056C	LOETNPEEVPK																								
YKL060C	GISNEGONASIK																								
YKL065C	LOEELR																								
YKL065C	NQPGNVAAAEASK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YKL065W-A	DFEPVIGSNPK		x	x																					
YKL065W-A	MRSNILK		x																						
YKL067W	GDFGIDLGR		x																						
YKL067W	TILGATNPLGSAAGTIR																								
YKL085W	DVIKPSFVDSPLFK		x	x	x	x	x																		
YKL085W	FISEVENTDPTQER		x	x	x	x	x																		
YKL085W	GFTPEEPDGLNALK		x	x	x	x	x																		
YKL085W	GVATDLSHIPTNSVVK		x	x	x	x	x																		
YKL085W	IQFGGDEVVK		x	x	x	x	x																		
YKL085W	RHELHHR																								
YKL094W	IDTGLDLK		x																						
YKL120W	LGFEPIR																								
YKL120W	TGAGSSVQLPIYNTAK																								
YKL134C	STHPDDAFVR																								
YKL137W	LPIWVLSPR																								
YKL138C	LINRPSVFPK																								
YKL148C	DDEHWMK																								
YKL148C	EDYPRDDDEHWMK																								
YKL148C	GEGGFLVNSEGER																								
YKL148C	TQSSLDEGVR																								
YKL150W	ALPIALGTVAIAAATAFYFANR																								
YKL150W	DFIQEHVPGPK																								
YKL150W	GHFQLVVK																								
YKL150W	KELDALK																								
YKL151C	IFSPDSEK																								
YKL151C	LDVDMDEOR																								
YKL152C	HLEGISDADIAK																								
YKL157W	ETQDALDNFTK																								
YKL157W	SSHPIEVVK																								
YKL157W	TFGIQYPLPK																								
YKL167C	MHEDIMK																								
YKL187C	FGHNLGDDDDADFEK																								
YKL187C	TELSHPDVTPK																								
YKL192C	SVGETVDYIASNPDAN																								
YKL192C	VIDVIK																								
YKL195W	KEPLNEESKP																								
YKL195W	NDETEAGPOLGGDK																								
YKL195W	QSESSDEEKEELR																								
YKL195W	SDENGDDNDSKNDETEAGPOLGGDK																								
YKL195W	TAEELSSGEGQSPENEDNNSK																								
YKL195W	VNTIESAPNVSSAK																								
YKR001C	DEHLISTINK																								
YKR001C	ELSSOELSGGAR																								
YKR001C	FYNFDEIR																								
YKR001C	VPVGDQPPDIER																								
YKR003W	IEDGVEFHPK																								
YKR016W	INNNLDPVNDIK																								
YKR016W	NLLOEVDEFK																								
YKR016W	NLLOEVDEFKENLTK																								
YKR016W	TASLLPPNSGILGLTAK																								
YKR027W	LSTELR																								
YKR035W-A	IVASNAIRK																								
YKR035W-A	LDNVPEIK																								
YKR046C	YAESLPPVER																								
YKR049C	HTDPTFGMDLQK																								
YKR049C	LDSVLK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24	
YKR049C	LVGNEPADIDK		x																							
YKR054C	ILVELK		x																							
YKR066C	EFNDPSNAGLONLQNGFK										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
YKR066C	LLENGITFPK										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
YKR066C	VDTPEDITPDNGR		x																							
YKR066C	VDTPEDITPDNGRLPDADK		x																							
YKR070W	KPIAGASDALK																									
YKR082W	LDLIEK																									
YKR085C	GLDMPVQSTK										x	x	x	x	x	x										
YKR093W	FVDEIK																									
YKR093W	MLNHPSQSGDDAQDEK																									
YLL006W	LPSMMPR																									
YLL026W	LDPVIGR																									
YLL026W	QRYNEEK																									
YLR060W	AEIVLNILTTMFSR																									
YLR060W	FVPLNQTOEFTGDK																									
YLR060W	IMDVSIK																									
YLR069C	ESITIPADFDYTHK																									
YLR069C	MDSMGLER		x																							
YLR069C	VIGTLPVDDITK		x																							
YLR069C	VKFDPESK																									
YLR077W	FKHEGEDVVR																									
YLR077W	VPNLDR																									
YLR089C	FPHHTLK																									
YLR089C	TFLAPGLEWIK																									
YLR100W	KLEWDEK																									
YLR100W	LIETEDTNR																									
YLR106C	DSDMPKILLAYR																									
YLR106C	LAFDSLCLVSK																									
YLR106C	LLEDLK																									
YLR106C	LSVLVSSCLNKN																									
YLR106C	NMLLSWLR																									
YLR139C	ETGDNLDLFGSK																									
YLR163C	LSPEEVFEQVDK																									
YLR163C	MVLGAGAVDHEK																									
YLR163C	SLQEDIPK																									
YLR163C	SVLDSAIER																									
YLR163C	YFGHVPK																									
YLR203C	AEAGLPGHVWK																									
YLR203C	IFILGAR																									
YLR203C	NALGLDPPSPEDPTPENR																									
YLR239C	FVQVER																									
YLR259C	AAVEEGLPGGGTALVK																									
YLR259C	AIFTESVK																									
YLR259C	APGFGDNR																									
YLR259C	DKFENMIGAK																									
YLR259C	DRYDDALNATR																									
YLR259C	EDTVILNGSGPK																									
YLR259C	LGVDIIR																									
YLR259C	LGGVAVIR																									
YLR259C	NVLEQPFPPK																									
YLR259C	QIENAGEEGSVIIGK																									
YLR259C	TLEDELEVTEGMR																									
YLR259C	VGGASEVEVEGK																									
YLR259C	VGGASEVEVEGKK																									
YLR259C	VLDEVVDFDQK																									

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24	
YLR259C	YDDALNATR	x	x	x	x	x									x		x	x	x	x	x					
YLR262C	IFMETSTKAGYNVK		x																							
YLR262C	WIEDVK			x																						
YLR283W	ERPGLEPEPEILAPK			x																						
YLR283W	QEKPEKENEGK			x																						
YLR290C	NIENPDFK			x																						
YLR304C	DGQLETFK		x	x	x	x	x	x							x											
YLR304C	EHAALPR								x																	
YLR304C	FLGGFAITK																									
YLR304C	GVSYLK																									
YLR304C	GYDAGENTYOAPPADR		x																							
YLR304C	MNGWTSPPK																									
YLR304C	QNVETLDIVR																									
YLR304C	TIFTVPGSEQIR																									
YLR304C	TTDTHISMAGPWLK																									
YLR304C	WVVIQDENFGEGR		x	x	x	x	x																			
YLR332W	FYDEQGNLSFR		x																							
YLR345W	EGVAFVEK																									
YLR348C	ENVIPR																									
YLR348C	ILADAVR																									
YLR348C	MONDSALEAAK																									
YLR348C	YEGGLKLTFTGWKPNMVR																									
YLR351C	JLLVGGTPELDPK																									
YLR351C	KYSEVINPK																									
YLR351C	YSEVINPK																									
YLR355C	AAEDGWVPGK		x		x	x	x																			
YLR355C	DLTHVEPPK																									
YLR355C	DNLNVIIGVR																									
YLR355C	ELDIR																									
YLR355C	GALDWYPIFK																									
YLR355C	NLFTVEDAIK																									
YLR355C	NMEWK																									
YLR355C	RGALDWYPIFK																									
YLR355C	SLEFNOPDYR																									
YLR361C-A	FPVEDTAGLLR		x	x	x	x	x																			
YLR369W	ADMISDTENLFK																									
YLR369W	LIEEANANR																									
YLR369W	LTGITPLPK																									
YLR369W	SATIENDEGOR																									
YLR390W	TDIPIEYEDGNLLK		x																							
YLR395C	DGVYENIPFK																									
YLR399C	AIDIK																									
YLR422W	LNDYELER																									
YLR422W	QFSTDDLGR																									
YLR422W	RVDIMR																									
YLR422W	VEDLVR																									
YLR422W	VLSTSLVPIR																									
YLR438C-A	LNLER																									
YLR439W	EFLODESER																									
YLR439W	FLANK																									
YLR439W	ITEPIPTSNLR																									
YLR439W	QPVLPK																									
YLR454W	AKSSHFMIDLHOR																									
YLR454W	ISEDLIK																									
YLR454W	MICINGFK																									
YML008C	ELHGDDIGK																									



ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YML008C	MDFEINTFDK	x	x																						
YML025C	EGLIKSSDPYK		x	x																					
YML025C	TAPNDYITTELPK		x	x	x																				
YML030W	MPSSFVYTER		x	x																					
YML030W	TLENEEIK	x	x	x																					
YML030W	VGLQAATLVALVAGSFYGTSGK																								
YML042W	FIEAIKDESLPVEIK			x																					
YML042W	IDNDPLIK		x	x																					
YML042W	LDVDDFMR	x																							
YML042W	SNDDQIPPLFK		x	x																					
YML048W	FGIYEPDEK			x																					
YML048W	MMAEIR			x																					
YML054C	FIDPSLTWK																								
YML054C	FLPNHPGGQDVVK																								
YML054C	ILVDVR																								
YML054C	KITDDLK																								
YML054C	LGNPLEGEK																								
YML054C	LPIVIK																								
YML078W	AEIVIEEAGEL	x																							
YML078W	FADENFYK		x	x																					
YML078W	GMDIVK																								
YML078W	HVVFGEVTK																								
YML078W	VFDPAVNGTK																								
YML086C	DTDYDDFEMR	x																							
YML086C	FLDAENDPEVFK	x	x	x																					
YML086C	KDTDYDDFEMR	x																							
YML086C	VEEWYGEDLKK		x																						
YML110C	FLVSNGEK																								
YML110C	FDDQETFK																								
YML120C	ANLLPK																								
YML120C	ARPVITDLFK																								
YML120C	GLAVNDFLOVK																								
YML120C	KYNYSIISPR																								
YML120C	LKVFFDWIK																								
YML120C	MAQIPNFQK																								
YML120C	YNYSIISPR																								
YML129C	ALEDNQQLQSPTAPTE	x																							
YMR011W	LETDESPQTK	x																							
YMR024W	EGLEKPYK																								
YMR024W	STYNEIPESVASK																								
YMR031C	DMHPGEDIDK																								
YMR035W	AITVWPPSR		x																						
YMR038C	SLNHPENEPSSVK																								
YMR066W	DEQEELPTGVK			x																					
YMR066W	SLCSSALIAKSGIR			x																					
YMR066W	TIIGPDEPEK			x																					
YMR072W	ENPTLRPAEISK																								
YMR072W	KPAGPFIK																								
YMR072W	SOLDLMK																								
YMR072W	WGNLEADIK																								
YMR072W	WQSLDQSIK																								
YMR083W	KLGGEVFIDFTK																								
YMR083W	LGGEVDFIDFTK																								
YMR083W	LPLVGGHEGAGVVK																								
YMR083W	LRTSTLFTK																								
YMR083W	NMVSIGQATK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24	
YMR083W	VGLDLAGIK										x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x				
YMR086W	DMNSILYPK			x																						
YMR086W	EKPLNSDQEDVFISEK			x																						
YMR086W	GNVGDTK			x																						
YMR086W	GQKAVQER			x																						
YMR086W	INSLTQR			x																						
YMR086W	ISYDEAGR			x																						
YMR086W	KTSSLGNTSSTQAK			x																						
YMR089C	AQDELIDDK	x																								
YMR089C	EIPTDEEVEAIR	x																								
YMR089C	EQGYFEGNNSR			x																						
YMR089C	FNTEIDVK			x																						
YMR089C	HINIDKPELEGR							x	x	x																
YMR089C	KFNTETDVK										x	x														
YMR089C	LAGEIFDLK			x																						
YMR089C	LEDVLK			x																						
YMR089C	LNHFQAIER								x																	
YMR089C	ELEIPK			x																						
YMR098C	GKNDSEHQSQR			x																						
YMR098C	IQSSSGTETHNIR			x																						
YMR108W	SVEELPLR			x																						
YMR110C	LMNDLHLIELPK			x							x	x	x	x												
YMR110C	MIHEPAYK			x																						
YMR110C	VDSPPPFMFQK										x	x														
YMR115W	TFVSEENIK																									
YMR145C	AIADLAVGEAK			x																						
YMR145C	DYVDQDLR	x																								
YMR145C	EISDAQEIR	x		x																						
YMR145C	IMSSIEK			x																						
YMR145C	KTILVLSGWSVSLIK																									
YMR145C	KVDATTITAK																									
YMR145C	KWPELSK																									
YMR145C	LAGSFTLFWK																									
YMR145C	LKNGIVK																									
YMR145C	MROSIMK																									
YMR145C	NNDYDLDLK																									
YMR145C	SFHAAR	x	x																							
YMR145C	SIVEPVR																									
YMR145C	TLVILSGWSVSLIK																									
YMR145C	TQSQIEDFK			x																						
YMR145C	TWANSRFSLSQK			x																						
YMR145C	VAPTTGVYAK																									
YMR145C	VTLVEALPNILNMFDK																									
YMR152W	FGHPYPNNFIEVGNEMIK																									
YMR157C	TTLSEEEFENVVK																									
YMR158W	GSTMGPDKDFEVTDPNISTR																									
YMR173W	IGEDRFDK																									
YMR186W	LEEVDDEEEK	x																								
YMR188C	ELLEIK																									
YMR188C	TIQDALSSGSTRK																									
YMR189W	ADVENLLK																									
YMR189W	GVEAIDVAK																									
YMR189W	HDVYDMITGIGGSK																									
YMR189W	HLGPSSDVK																									
YMR189W	IFNPDLK																									
YMR189W	RHLGPSPSDVK																									

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YMR189W	SSTNYVSLARTR			x																					
YMR192W	LIIEIK				x																				
YMR193W	IYDEIVNGSPR			x																					
YMR203W	YGESNIFK										x														
YMR203W	KQDWIFSGQLQANGALIASLWR											x									x				
YMR203W	LYGWDK											x													
YMR212C	AAEDNHLSVK																								
YMR215W	VNDDLISK		x																						
YMR241W	LVEDGIR																								
YMR241W	QMTNWSGRFGLSR																								
YMR244C-A	ADILDAMPK		x																						
YMR267W	IEEYFPGILDITR																								
YMR267W	YDNLPTNR																								
YMR282C	GLSILDSFK																								
YMR286W	SNPGFIVEK																								
YMR301C	EYDIDALR																								
YMR301C	FYDPESGR																								
YMR301C	KLPGGFDIVGER																								
YMR301C	LPGGFDIVGER																								
YMR301C	AEVILNEK																								
YMR302C	AFVSTGDGTVNVK																								
YMR302C	DQAGESNTATDTGVHKK																								
YMR302C	GSPWIEDLR																								
YMR302C	LPSTIVIK																								
YMR302C	LSESLPNQVFK																								
YMR307W	KLNTNVR																								
YML003C	TTASLGSVIIR																								
YML003C	VPAEVVK																								
YML005C	SVPFETDSTVETK																								
YML005C	YEGQDVSTGEIMIR																								
YML005C	YLLKEEER																								
YML009W	TFESEAAHGTVTR																								
YML020C	SLGSYSTR																								
YML020C	SLGSYSTRGNIK																								
YML020C	VKLHEK																								
YML026W	VNLEILR																								
YML026W	WSNELSPGK																								
YML037C	AVHETIAEGK																								
YML037C	DIGGSSSTDFTEIINK																								
YML037C	EGVYEAVESLK																								
YML037C	ENTEGEFGSLEHESVPGVLESK																								
YML037C	FTVTLIPGDGVGK																								
YML037C	LGDGLFR																								
YML052W	WENMPSTEQQDIVSK																								
YML055C	DGPLSTNVEAK																								
YML055C	LEFANLTPGLK																								
YML055C	LPNSNMIEFATR																								
YML055C	NELTSLTPGVAK																								
YML055C	NINDLLNK																								
YML055C	SPPVYSDISR																								
YML055C	YLPDASSQVK																								
YML070W	SFLPSFILSDESK																								
YML071W	ADVPFAK																								
YML071W	LLOSTQGISYIVSSK																								
YML071W	LSINDLLVK																								
YML079C	NIQLEEDLEESDTK		x																						

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YNL081C	VVHILGK																								
YNL100W	NIFNVDSENK			x																		x			
YNL104C	DYEAIVR	x	x	x	x																				
YNL104C	IPYLPDPK																					x			
YNL104C	NMLKDPSSK																								x
YNL104C	SLGLDLPR								x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
YNL104C	VGDQIVDIEGTGNGPISSLVDALSLLNVR	x																							
YNL104C	WGVGVSEVVDGSSVR		x																						
YNL111C	GLYGDVDK			x																					
YNL121C	ALEKPDYSK								x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
YNL121C	KIQETLAK																								
YNL135C	GWDVGIPIK																								
YNL135C	ISPGDGGATFPK								x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
YNL137C	KLENFEK																								
YNL137C	KLINLPWQK																								
YNL137C	MSDISDGSLLTFDPK		x																						
YNL169C	KQVSMK																								
YNL169C	LNFDDQEPVTSK			x																					
YNL178W	ALPDAVTIIEPK																								
YNL178W	IMRDPK																								
YNL178W	YVMESGAKGCEVVVSGK																								
YNL185C	LIVGAGQAAAPPPVGPALGSK																								
YNL192W	SESRTEPSYDEK																								
YNL192W	SFGNLIK																								
YNL200C	LAAEIDK																								
YNL209W	LSSEIEK																								
YNL209W	RFDDSEYQK																								
YNL209W	TGLDISDDAR		x																						
YNL211C	LLFWDEMIR																								
YNL247W	AGEPEWESPWGK																								
YNL247W	KSNNDFALWK																								
YNL247W	NFTIOGSEIK																								
YNL247W	YTIMSTPK																								
YNL252C	DDVNRVPVINDR		x																						
YNL252C	GEISEYVPK																								
YNL252C	RGLATATATASSAPPK																								
YNL284C	LGLVTGPIK																								
YNL292W	HGLDSEVAK																								
YNL292W	HLNFDDLK																								
YNL297C	KIEDK																								
YNL302C	LEVPGYVDIVK																								
YNL302C	MAGVSVR																								
YNL310C	NNSNASQLPHPSOK																								
YNL315C	FYGAMGEETPVAK																								
YNL315C	NNPIFVLPPIR																								
YNL315C	SPLDPSAPK																								
YNL315C	TLDSFLDVGK		x																						
YNR001C	ALSADLAAR																								
YNR001C	ANQEVLEWLFK																								
YNR001C	AVGAPIERPCK																								
YNR001C	DFIDLIR																								
YNR001C	GLVWEGSVLDPPEGIR		x																						
YNR001C	HFPDYELFK		x																						
YNR001C	ITSTDPNADYDK		x																						
YNR001C	TIPEIQR																								
YNR002C	EQSSGNTAFENPK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YNR017W	TPDDANAAYGGQDTTKPK	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
YNR020C	TGILGTPEEK				x																				
YNR022C	GLLDSGITIEVK	x																							
YNR036C	GAGDLSGVVNR																								
YNR037C	GNIVPLPIR																								
YNR037C	LGEFAPTR																								
YNR041C	KVLDLNPCK																								
YOL027C	AFSPLAEK			x																					
YOL027C	ENAEPDTSAEATEAEK	x																							
YOL027C	IKTEEKPEETAIPK																								
YOL027C	LLIKFAAGYELSR																								
YOL027C	MLNFAASRASCVTR																								
YOL027C	TEEKPEETAIPK																								
YOL027C	TMGDVFR																								
YOL039W	SVDELITEGNEK																								
YOL053W	KVDVYQVQK																								
YOL053W	LGEIEEGHSPNIK																								
YOL059W	LGLGEIHK																								
YOL071W	EILSMPDLSK																								
YOL077W-A	AIPPHOLAIGTLGLLLVYVNPFFK																								
YOL086C	EELFR																								
YOL086C	VLGIDGGEK																								
YOL096C	IONPEIFVGFNYK																								
YOL109W	EEQNIADGVECK	x	x																						
YOL109W	EQAEASIDNLK																								
YOL109W	KEEONADGVEQK																								
YOL109W	LEETKESLONK																								
YOL109W	NEATPEAEQVK																								
YOL109W	NEATPEAEQVKK																								
YOL121C	HIDASGSINR																								
YOL121C	LEVPGYVDIVK																								
YOL121C	MPGVSVR																								
YOR017W	KNDLDTESR																								
YOR020C	LGNDDEVILFR																								
YOR020W-A	SGESSNDAMGKDDDDVVK																								
YOR022C	AAKTPQTEVADGSNSK																								
YOR022C	IGDRPEFPNDLER																								
YOR022C	MEPLVSK																								
YOR040W	IYPGHEYTK																								
YOR056C	ADYGTGDKQK																								
YOR056C	GNRYSVASPLSK																								
YOR063W	FQTPAEK																								
YOR063W	KITPMGGFVHYGEIK																								
YOR065W	YAQDGAGIER																								
YOR065W	AAQAGALPPDLSLVK																								
YOR065W	KFVFNPPKPR																								
YOR065W	NMAEFYDDEPDEQGNPK																								
YOR089C	FVSNDFAEAK																								
YOR090C	ILGSLQPSR																								
YOR090C	SLSTDQTDGNDLDEVR																								
YOR108W	AFAPPK																								
YOR108W	DYEAVIR																								
YOR108W	ELKSEIITK																								
YOR108W	GCGVAATELGMLAGADR																								
YOR108W	TVEALTGAK																								
YOR108W	VVNIEGYGNPISLVDALSLLNVK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YOR128C	TDIPIK						x	x	x	x	x	x	x	x											
YOR130C	VIEFFDVTVK			x																					
YOR142W	DTKVIFQGFYK			x																					
YOR142W	IGIQPK																								
YOR142W	MHSGAIVGGSTDAESK	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
YOR142W	MHSGAIVGGSTDAESKK																								
YOR150W	VFDGSENPYK																								
YOR152C	LTQLISVTK			x																					
YOR158W	FLIEAFR																								
YOR158W	SPESELLK			x																					
YOR165W	IGLSESENAK																								
YOR176W	AFSENIHK																								
YOR176W	EIGGGPIR																								
YOR176W	KLOFFPOPVR																								
YOR187W	ELDSAMAGDNAGVLLR	x	x																						
YOR187W	LLDAVDEYIPTPER	x	x	x	x	x																			
YOR187W	TVGTGLIIR																								
YOR195W	EKQELLK																								
YOR196C	AGEAFIENVLK			x																					
YOR196C	SNALINTSDNASVR																								
YOR196C	VVEYKPEK																								
YOR211C	LDLVDEPK																								
YOR211C	SSVLESIVGR																								
YOR215C	KDSINEFLANK																								
YOR215C	KLLDALK																								
YOR222W	NLFNTNETTK																								
YOR228C	LGNQFESIFK																								
YOR232W	DFALQK																								
YOR232W	DVFENTLR																								
YOR232W	EASELKDR																								
YOR251C	EIVDYEEFMFLVK																								
YOR251C	FEGTEPEPR																								
YOR251C	IMPLFDLISPK																								
YOR251C	SPYPHMFPTKK																								
YOR271C	KQDSTVHPDTGK																								
YOR286W	LLVDVR																								
YOR286W	NLVEHPNDK																								
YOR295W	SLEDLTK																								
YOR301W	HQSGIGQEARL																								
YOR317W	EKPLVRPNTK																								
YOR317W	TFSDDLK																								
YOR335C	HNDLEDVYK																								
YOR335C	KVSSIIIGK																								
YOR356W	ALNEGGLQSVPK																								
YOR356W	EVWEVKPENFNK																								
YOR356W	GLPVLEEVEDAK																								
YOR356W	SDIGIPLK	x	x																						
YOR356W	VPGDMMVK																								
YOR374W	AFNSGWNQIDPIDR	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
YOR374W	EIIFGPVTVTK	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
YOR374W	FIIEFK																								
YOR374W	IVGEAITNHPK																								
YOR374W	KVTELEGGK																								
YOR374W	NEGALITGGER																								
YOR374W	VAFTGSTATGR																								
YOR374W	VTLEGGK																								

ORF	Peptid	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	Fr 6	Fr 7	Fr 8	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YOR374W	VYVEESYDK	x	x	x	x	x	x	x							x	x	x	x	x	x	x	x			
YOR374W	YIPQAGIPPGVINIVSGFGK													x	x	x	x	x	x	x	x	x			
YOR374W	YIPQAGIPPGVINIVSGFGKINGEAITNHPK													x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
YOR378W	STSSSYTQK													x											
YPL004C	IPVLEQELVR				x	x	x																		
YPL004C	NAAGNFGPELAR								x	x	x	x	x	x	x	x						x	x	x	
YPL004C	NIEASVQPSR								x	x	x	x	x	x	x							x	x	x	
YPL040C	SVGNTISPEAIR										x														
YPL058C	AEVEELHR																								
YPL058C	AVNDDEPELATR	x	x	x																					
YPL058C	DTNIFQYVGDENK	x																							
YPL058C	GHPPELGTENADAR				x	x	x																		
YPL058C	TLDIKPGYEDK				x	x	x																		
YPL063W	DWEPQSEELKK		x																						
YPL063W	ETKDDPKP																								
YPL063W	NLAEEFDHR				x																				
YPL063W	SILTDMLFK				x																				
YPL070W	INLIK																								
YPL078C	ANSINAIPGNILTK																								
YPL078C	AVLDSWVR																								
YPL078C	VQSELGNPK																								
YPL078C	VSDVLNASR																								
YPL091W	AIFPENIPGFELGSDSGFFR		x																						
YPL091W	SHLGMGSENVGK																								
YPL099C	ELDMLK																								
YPL099C	FSQEEESGHEIPVK																								
YPL104W	LQDYIFEDILK		x																						
YPL104W	LSAIYPPEFR																								
YPL109C	IEEDQDDDFVYVK																								
YPL118W	LEDYVVK																								
YPL118W	RPSVGNIGQEAANILLNIK																								
YPL118W	YISRPEDESHAK																								
YPL126W	VMKVLV																								
YPL132W	HTFDISK																								
YPL134C	IFPTNGEMTQK																								
YPL134C	LQDVNSQFK																								
YPL134C	TPIEVVK																								
YPL135W	MLPVITR																								
YPL135W	VNDSTGVIEDVK																								
YPL135W	KSTPEFMK		x																						
YPL173W	LVADIDDEK																								
YPL173W	LVADIDDEKTPGK	x	x																						
YPL174C	LLENLR																								
YPL174C	SONVVTYK																								
YPL174C	TLEENIK																								
YPL188W	SSSSADVFSPNSK																								
YPL204W	HNSPEEIK																								
YPL215W	EALGELVIR																								
YPL215W	LFEEMK																								
YPL215W	TFSDIELR																								
YPL215W	YEALDKDPK																								
YPL215W	YFYEDLK																								
YPL215W	YFYEDLKLPR																								
YPL222W	VFDANGELR																								
YPL222W	YDEFFR																								
YPL262W	AIEILGGK																								

## 10.3 Ergebnisse der IEF auf Proteinebene der SILAC + Probe

Accession	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YMR056C	AAC1																X
YMR072W	ABF2															X	
YCR088W	ABP1	X	X														
YNR016C	ACC1	X		X	X	X		X	X			X					
YBL015W	ACH1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YLR304C	ACO1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YJL200C	ACO2							X	X	X	X	X					
YKL192C	ACP1	X	X	X										X			
YAL054C	ACS1			X	X										X	X	
YFL039C	ACT1	X	X	X	X	X		X									X
YOL086C	ADH1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YMR303C	ADH2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YMR083W	ADH3			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YMR318C	ADH6							X	X								
YMR009W	ADI1	X															
YDR226W	ADK1	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X				
YCR010C	ADY2			X	X			X	X	X	X	X	X			X	X
YEL052W	AFG1			X													
YER017C	AFG3																X
YFL030W	AGX1	X	X	X							X	X	X	X	X	X	
YFR011C	AIM13	X	X	X							X	X	X				
YHL021C	AIM17	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YHR198C	AIM18							X	X								
YJR080C	AIM24																X
YML030W	AIM31							X									X
YOR215C	AIM41														X	X	X
YPR004C	AIM45								X	X	X	X	X	X	X		
YER080W	AIM9			X							X	X					
YOR335C	ALA1	X	X	X													
YOR374W	ALD4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YER073W	ALD5			X				X	X	X	X	X	X	X	X		
YML086C	ALO1	X	X														
YLR089C	ALT1	X	X	X	X	X											
YER036C	ARB1	X															
YGL105W	ARC1		X	X						X	X	X	X				
YDL192W	ARF1																X
YER069W	ARG5,6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
YOL140W	ARG8								X	X	X	X	X	X	X		
YDR376W	ARH1														X		
YHR137W	ARO9			X													X
YOR141C	ARP8																X
YMR116C	ASC1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	
YNR002C	ATO2			X	X	X		X	X	X	X	X				X	X
YDR384C	ATO3				X			X									X
YBL099W	ATP1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YNL315C	ATP11									X	X	X	X	X	X		
YJL180C	ATP12											X		X			
YPL271W	ATP15										X	X	X	X	X	X	X
YDR377W	ATP17							X									X
YML081C-A	ATP18														X	X	X
YOL077W-A	ATP19													X	X	X	
YJR121W	ATP2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YPR020W	ATP20				X									X	X	X	X



Accession	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YBR039W	ATP3			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YPL078C	ATP4			X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YDR298C	ATP5						X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Q0085	ATP6																X
YKL016C	ATP7									X	X	X	X	X	X	X	X
YHR208W	BAT1	X								X	X	X	X	X	X	X	
YJR148W	BAT2							X		X	X	X	X	X			
YER177W	BMH1	X	X														
YDR099W	BMH2	X	X														
YJR025C	BNA1	X	X	X													
YML042W	CAT2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YOR125C	CAT5								X								
YGR174C	CBP4															X	X
YCR002C	CDC10	X	X	X													
YAL038W	CDC19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YOL139C	CDC33	X				X											
YDR168W	CDC37			X													
YDL126C	CDC48	X															
YER026C	CHO1																X
YLR330W	CHS5									X							
YNR001C	CIT1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YPR001W	CIT3			X	X							X		X	X	X	X
YKL137W	CMC1															X	
YIL157C	COA1																X
Q0105	COB																X
YOL096C	COQ3		X														
YML110C	COQ5	X															
YLR201C	COQ9													X			
YBL045C	COR1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Q0045	COX1				X												
YLR038C	COX12	X	X														
YGL191W	COX13				X					X	X						
YML129C	COX14								X								
YER141W	COX15																X
Q0250	COX2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X
YDR231C	COX20																X
YGL187C	COX4	X	X	X	X												
YNL052W	COX5A				X			X			X	X	X	X	X	X	X
YHR051W	COX6	X		X	X												
YMR256C	COX7																X
YLR395C	COX8				X												X
YDL067C	COX9			X	X			X	X							X	X
YDR155C	CPR1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YML078W	CPR3						X	X	X	X	X	X	X	X			
YOR100C	CRC1			X				X									X
YDR256C	CTA1					X		X		X	X	X	X	X	X		
YML054C	CYB2							X	X	X	X	X	X	X	X		
YJR048W	CYC1														X	X	X
YAL039C	CYC3	X	X		X	X											
YEL039C	CYC7											X				X	X
YDR430C	CYM1							X		X							
YGR155W	CYS4			X					X	X	X	X	X	X	X		
YOR065W	CYT1	X	X	X	X	X		X				X				X	X
YML070W	DAK1	X															
YLR270W	DCS1			X													

Accession	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YLR348C	DIC1																X
YKR035W-A	DID2					X											
YKL002W	DID4	X	X														
YDL174C	DLD1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
YDL178W	DLD2	X	X	X	X												
YHR043C	DOG2	X	X														
YPR183W	DPM1	X															X
YFR044C	DUG1	X	X	X													
YLR390W	ECM19	X	X	X													
YBR176W	ECM31						X		X	X	X	X	X	X			
YBR078W	ECM33				X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YOR133W	EFT1	X	X	X	X	X	X	X	X			X					X
YDR036C	EHD3									X		X	X	X			
YOL071W	EMI5							X									
YGR254W	ENO1							X	X	X	X	X					
YHR174W	ENO2	X	X	X	X	X	X						X	X			
YML126C	ERG13	X		X								X					
YER044C	ERG28																X
YML008C	ERG6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
YHR190W	ERG9																X
YBR026C	ETR1		X	X				X		X	X	X	X	X	X	X	X
YOR317W	FAA1	X	X	X		X		X		X	X	X	X	X	X		X
YKL060C	FBA1	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X			
YKR016W	FCJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
YPL275W	FDH2							X									
YDR070C	FMP16	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X					
YFL046W	FMP32					X											
YGR243W	FMP43			X													X
YDL222C	FMP45							X									X
YKR049C	FMP46															X	
YER004W	FMP52																X
YKR009C	FOX2			X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X
YNL135C	FPR1	X	X	X	X	X			X		X	X					
YPL262W	FUM1							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YDR019C	GCV1							X									
YMR189W	GCV2		X	X													
YER136W	GDI1			X	X												
YHR100C	GEP4													X	X	X	
YKL104C	GFA1														X		
YDL198C	GGC1				X			X									X
YCL040W	GLK1					X											
YOR040W	GLO4								X	X							
YPL091W	GLR1										X						
YHR183W	GND1											X					
YKL152C	GPM1	X											X	X	X	X	
YDR513W	GRX2		X		X	X		X	X	X	X	X	X	X			
YMR217W	GUA1							X									
YDR454C	GUK1							X				X			X	X	
YGL245W	GUS1																X
YIL155C	GUT2			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YJR069C	HAM1	X															
YDR232W	HEM1									X			X				
YOR176W	HEM15											X					
YMR110C	HFD1															X	X
YER057C	HMF1	X															

Accession	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YDL125C	HNT1								X								
YMR186W	HSC82			X													X
YOR020C	HSP10	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YBR072W	HSP26	X	X	X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	
YCR021C	HSP30			X	X	X		X	X	X	X	X				X	X
YLR259C	HSP60	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YDR258C	HSP78	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YOL068C	HST1														X		
YFR053C	HXK1	X	X	X			X	X	X		X			X		X	X
YGL253W	HXK2	X	X	X	X												
YMR011W	HXT2			X	X	X		X									X
YHR096C	HXT5			X	X	X		X	X			X				X	X
YDR342C	HXT7		X	X	X	X		X								X	X
YEL034W	HYP2	X															
YJR122W	IBA57							X						X			
YPR006C	ICL2		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
YNL037C	IDH1		X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YOR136W	IDH2	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YDL066W	IDP1				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YLR174W	IDP2					X											
YNL009W	IDP3			X													X
YER086W	ILV1							X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YMR108W	ILV2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YJR016C	ILV3	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YLR355C	ILV5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YCL009C	ILV6	X	X	X	X						X						
YML056C	IMD4									X		X	X	X		X	
YDL181W	INH1									X	X	X	X	X	X	X	X
YBR011C	IPP1	X	X	X													
YLR247C	IRC20									X							
YER048W-A	ISD11																X
YPL135W	ISU1														X	X	
YKL217W	JEN1																X
YIL125W	KGD1	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YDR148C	KGD2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YNL071W	LAT1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YCL018W	LEU2	X	X		X												
YNL104C	LEU4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
YFL018C	LPD1				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YOR142W	LSC1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YGR244C	LSC2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YPL004C	LSP1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
YIL094C	LYS12	X							X	X	X	X	X	X	X		
YDR234W	LYS4					X							X	X	X	X	
YLR163C	MAS1			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
YHR024C	MAS2		X	X	X	X	X	X	X								
YKL150W	MCR1	X			X					X	X	X	X	X	X	X	X
YBR227C	MCX1			X													
YKL085W	MDH1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YDL078C	MDH3															X	
YPL270W	MDL2					X	X										
YPR083W	MDM36																X
YOL027C	MDM38																X
YLR069C	MEF1			X	X	X	X	X	X	X							
YGR264C	MES1								X								

Accession	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YLR303W	MET17							X									
YJR137C	MET5					X											
YLR017W	MEU1	X															
YOR232W	MGE1	X															
YJR144W	MGM101												X				
YJR077C	MIR1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YBR084W	MIS1				X										X	X	
YIL051C	MMF1				X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YGL068W	MNP1	X	X	X													
YJL066C	MPM1	X	X	X	X	X		X									
YDR033W	MRH1			X	X			X									X
YDR347W	MRP1										X	X	X	X	X	X	
YHL004W	MRP4			X	X	X						X					
YKR006C	MRPL13													X	X		
YBR268W	MRPL37															X	
YPR047W	MSF1																X
YDR194C	MSS116			X	X												X
YLR203C	MSS51								X			X			X	X	X
YDR268W	MSW1														X		
YDL044C	MTF2				X												
YGR232W	NAS6					X	X										
YPR149W	NCE102			X	X	X		X	X	X	X	X				X	X
YMR145C	NDE1	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X			X	X
YDL085W	NDE2			X	X			X	X								X
YML120C	NDI1	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YCL017C	NFS1							X	X		X	X					
YGL221C	NIF3										X						
YLR351C	NIT3										X	X					
YDR150W	NUM1	X															
YML103C	NUP188													X			
YPL134C	ODC1				X				X							X	X
YOR222W	ODC2																X
YBR025C	OLA1									X			X	X	X		
Q0130	OLI1																X
YBR230C	OM14				X	X		X	X		X	X				X	
YIL136W	OM45	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YDR071C	PAA1		X	X													
YER165W	PAB1		X	X	X	X	X	X									
YJL104W	PAM16															X	
YNL015W	PBI2									X							
YKR097W	PCK1			X				X									
YER178W	PDA1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YBR221C	PDB1	X	X														
YLR044C	PDC1	X		X			X	X		X			X	X	X	X	
YPR002W	PDH1			X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YPL058C	PDR12	X		X				X			X						X
YBR035C	PDX3										X	X					
YBL030C	PET9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YOL147C	PEX11																X
YHR185C	PFS1								X								
YBR196C	PGI1							X									
YCR012W	PGK1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YGR132C	PHB1	X	X						X	X	X	X	X	X	X	X	X
YGR231C	PHB2															X	X
YER053C	PIC2				X												X

Accession	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YGR086C	PIL1	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X			
YBL022C	PIM1		X		X	X		X									
YGL008C	PMA1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YPL036W	PMA2			X	X			X		X				X		X	X
YER003C	PMI40			X	X												
YNL055C	POR1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YGL205W	POX1																X
YMR267W	PPA2			X	X	X											
YML092C	PRE8		X														
YOR323C	PRO2	X	X														
YOR361C	PRT1			X													
YBL064C	PRX1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YDL055C	PSA1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
YDR032C	PST2	X	X	X	X	X		X									X
YCR079W	PTC6	X															
YHR076W	PTC7	X															
YHR037W	PUT2	X		X		X	X	X	X			X	X				
YGL062W	PYC1							X									
YHR001W-A	QCR10									X	X	X	X	X	X	X	X
YPR191W	QCR2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YFR033C	QCR6			X													
YDR529C	QCR7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YJL166W	QCR8																X
YDL135C	RDI1			X													
YOR285W	RDL1					X											
YOR286W	RDL2										X		X	X	X	X	
YJL217W	REE1							X	X								
YLR059C	REX2					X											
YBR052C	RFS1	X															
YPR165W	RHO1																X
YIL053W	RHR2	X	X	X													
YCR028C-A	RIM1	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X			
YEL024W	RIP1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YGR180C	RNR4	X															
YNL248C	RPA49		X														
YLR075W	RPL10											X					
YGR085C	RPL11B				X												X
YEL054C	RPL12A																X
YNL069C	RPL16B																X
YMR242C	RPL20A				X												X
YPL079W	RPL21B			X													X
YLR061W	RPL22A							X									
YBL087C	RPL23A															X	X
YOL127W	RPL25															X	X
YIL018W	RPL2B			X													
YOR063W	RPL3			X				X								X	X
YMR194W	RPL36A																X
YPL131W	RPL5																X
YML073C	RPL6A																X
YGL076C	RPL7A																X
YHL033C	RPL8A																X
YNL067W	RPL9B														X	X	X
YLR340W	RPP0					X	X								X		
YLR048W	RPS0B															X	
YMR230W	RPS10B										X		X	X	X	X	

Accession	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YDR025W	RPS11A																X
YOR369C	RPS12	X															
YDR064W	RPS13									X	X	X	X	X	X	X	X
YML026C	RPS18B			X	X	X		X		X		X			X		X
YOL121C	RPS19A		X														
YLR441C	RPS1A																X
YGL123W	RPS2																X
YHL015W	RPS20															X	
YKR057W	RPS21A	X	X														
YGR027C	RPS25A																X
YER131W	RPS26B							X									X
YHR021C	RPS27B															X	
YNL178W	RPS3																X
YLR167W	RPS31																X
YJR123W	RPS5									X						X	
YPL090C	RPS6A																X
YBL072C	RPS8A							X									X
YPL081W	RPS9A																X
YGL129C	RSM23															X	
YDR175C	RSM24												X	X	X		
YDR233C	RTN1											X			X	X	X
YDR190C	RVB1				X												
YLR180W	SAM1	X	X					X									
YDR502C	SAM2	X															
YPL218W	SAR1														X		
YBR024W	SCO2			X													
YJL080C	SCP160	X	X	X	X										X	X	
YKL148C	SDH1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YLL041C	SDH2			X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YKL141W	SDH3		X	X	X	X		X	X	X	X	X				X	X
YDR178W	SDH4				X											X	X
YKL193C	SDS22	X															
YLR208W	SEC13			X													
YMR079W	SEC14	X	X	X													
YDL195W	SEC31								X								
YFL005W	SEC4			X									X	X	X	X	X
YLR378C	SEC61																X
YDR023W	SES1	X	X						X	X	X						
YJR095W	SFC1			X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YBR263W	SHM1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
YLR139C	SLS1		X	X													
YEL026W	SNU13														X		
YJR104C	SOD1				X			X									
YHR008C	SOD2		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YEL059C-A	SOM1				X												
YGR236C	SPG1										X	X	X	X	X	X	X
YMR107W	SPG4				X												
YAL005C	SSA1	X	X	X	X	X	X	X	X								
YLL024C	SSA2	X	X	X													
YBL075C	SSA3		X	X													
YER103W	SSA4	X															
YDL229W	SSB1	X	X	X	X												
YNL209W	SSB2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YJR045C	SSC1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YPL106C	SSE1			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Accession	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YLR369W	SSQ1	X		X	X												
YDR086C	SSS1																X
YHR064C	SSZ1	X	X	X													
YDL130W-A	STF1												X	X	X	X	
YOR027W	STI1	X	X	X													
YLR150W	STM1	X															
YDL084W	SUB2	X								X							
YDR172W	SUP35	X	X														
YML052W	SUR7																X
YJL052W	TDH1											X			X		
YJR009C	TDH2							X	X	X	X	X	X	X		X	
YPR080W	TEF1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YKL081W	TEF4														X	X	X
YCL014W	BUD3																X
YDL185W	TFP1	X	X	X													
YKR059W	TIF1	X		X	X	X							X			X	X
YPR163C	TIF3	X	X	X													
YMR146C	TIF34	X	X														
YDR429C	TIF35				X			X			X	X		X	X		
YHR005C-A	TIM10	X	X	X	X												
YDR322C-A	TIM11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
YBR091C	TIM12					X	X	X	X								
YGR181W	TIM13													X	X		
YGR033C	TIM21				X												X
YIL022W	TIM44			X	X	X	X		X	X	X				X		
YPL063W	TIM50		X	X	X	X	X	X			X						
YEL020W-A	TIM9									X	X	X	X	X	X	X	
YKL056C	TMA19											X	X	X			
YGR082W	TOM20	X	X	X													
YMR203W	TOM40	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	X	
YPR133W-A	TOM5												X	X			
YNL121C	TOM70	X	X	X	X												
YDR050C	TPI1				X	X	X	X									
YKL211C	TRP3								X								
YCR083W	TRX3	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X		X	X	
YML028W	TSA1	X	X														
YOR187W	TUF1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
YOR251C	TUM1			X	X	X		X				X					
YKL210W	UBA1	X															
YKL216W	URA1			X	X	X											
YGR094W	VAS1	X															
YJR133W	XPT1				X	X											
YAR010C	YAR010C													X		X	
YAR035W	YAT1					X				X							
YBL029C-A	YBL029C-A															X	
YBR255C-A	YBR255C-A																X
YCL057C-A	YCL057C-A			X	X	X		X	X	X						X	X
YCR004C	YCP4											X					
YNL064C	YDJ1							X									
YDL124W	YDL124W			X	X	X	X	X									
YDR119W-A	YDR119W-A				X			X								X	X
YDR341C	YDR341C											X					
YLR249W	YEF3	X	X	X				X									
YDL120W	YFH1								X								
YGL041W-A	YGL041W-A												X				

Accession	Protein	Fr 9	Fr 10	Fr 11	Fr 12	Fr 13	Fr 14	Fr 15	Fr 16	Fr 17	Fr 18	Fr 19	Fr 20	Fr 21	Fr 22	Fr 23	Fr 24
YGR207C	YGR207C				X					X	X	X	X	X	X	X	
YGR234W	YHB1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
YMR241W	YHM2			X				X									X
YIL156W-B	YIL156W-B														X	X	X
YJL045W	YJL045W					X		X	X							X	
YJL171C	YJL171C							X	X	X							
YJR015W	YJR015W												X				
YJR096W	YJR096W									X							
YKL033W-A	YKL033W-A			X													
YKL065W-A	YKL065W-A														X	X	X
YKR070W	YKR070W												X		X		
YLL007C	YLL007C																X
YLR290C	YLR290C																X
YPR024W	YME1		X	X	X												
YMR302C	YME2				X			X				X					X
YMR031C	YMR031C															X	
YMR291W	YMR291W	X															
YFR049W	YMR31															X	X
YMR315W	YMR315W								X								
YKL067W	YNK1													X	X		
YNL208W	YNL208W											X	X	X	X	X	
YPR028W	YOP1																X
YOR020W-A	YOR020W-A											X	X	X	X		
YOR131C	YOR131C							X	X	X							
YOR356W	YOR356W	X						X	X	X	X	X	X	X		X	
YPR010C-A	YPR010C-A							X			X	X	X	X	X	X	
YPR098C	YPR098C																X
YDR002W	YRB1			X	X												
YBR054W	YRO2			X													
YMR089C	YTA12				X					X			X				X
YOL109W	ZEO1	X		X	X											X	
YGR285C	ZUO1								X								



## 10.4 Proteinliste der SILAC - Probe

Neben den Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank und den Proteinnamen ist jeweils die H/L-Rate des entsprechenden Auswerteprogrammes sowie die Schwankung der H/L-Rate (*Variability*) in Prozent beziehungsweise die geometrische Standardabweichung (SD<sub>geo</sub> = exponierte Standardabweichung der logarithmierten Ursprungswerte) angegeben. Hoch regulierte Proteine (H/L < 0,5) sind rosa markiert und runter regulierte (H/L > 2) hellblau. NN = Wert konnte nicht berechnet werden; n.d. = Protein wurde nicht detektiert.

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
Q0050	AI1	1,94	18,09	n.d.	n.d.	1,67	23,59
Q0055	AI2	2,56	7,16	n.d.	n.d.	2,07	12,76
Q0065	AI4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,52	15,49
Q0115	BI3	15,15	20,18	n.d.	n.d.	8,40	1,20
Q0120	BI4	1,47	4,66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Q0140	VAR1	1,64	8,16	1,71	1,08	1,26	26,03
Q0160	SCE1	12,73	4,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Q0250	COX2	1,20	7,34	n.d.	n.d.	0,91	13,48
Q0255	Q0255	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,97	117,57
YAL010C	MDM10	1,32	22,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YAL029C	MYO4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,09	13,83
YAL039C	CYC3	1,26	24,45	n.d.	n.d.	1,00	31,20
YAL054C	ACS1	0,62	8,95	n.d.	n.d.	0,50	18,82
YBL013W	FMT1	1,40	0,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBL015W	ACH1	3,00	16,20	2,73	1,12	2,58	22,91
YBL022C	PIM1	1,36	16,01	1,11	1,24	1,27	24,14
YBL030C	PET9	1,69	9,62	1,81	1,08	n.d.	n.d.
YBL038W	MRPL16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,97	26,98
YBL045C	COR1	1,29	9,40	1,28	1,18	1,11	16,75
YBL057C	PTH2	1,24	3,31	n.d.	n.d.	0,91	6,00
YBL059C-A	CMC2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,55	7,63
YBL059W	YBL059W	1,77	21,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBL064C	PRX1	1,84	17,78	1,72	1,07	1,49	20,71
YBL080C	PET112	1,25	4,86	n.d.	n.d.	1,19	13,17
YBL090W	MRP21	1,59	22,15	n.d.	n.d.	1,30	21,27
YBL098W	BNA4	0,72	4,67	n.d.	n.d.	0,57	9,88
YBL099W	ATP1	1,28	11,56	1,32	1,05	1,13	21,44
YBR003W	COQ1	1,55	21,27	n.d.	n.d.	1,38	15,29
YBR024W	SCO2	1,27	9,20	n.d.	n.d.	1,08	3,52
YBR026C	ETR1	1,29	4,15	1,25	1,07	1,08	21,89
YBR037C	SCO1	1,01	11,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBR039W	ATP3	1,24	11,93	1,29	1,17	1,02	16,56
YBR044C	TCM62	1,38	10,92	n.d.	n.d.	1,34	16,72
YBR078W	ECM33	0,36	16,24	0,39	1,08	0,39	26,41
YBR084W	MIS1	1,81	10,51	1,79	1,15	1,50	15,79
YBR085W	AAC3	n.d.	n.d.	1,68	1,02	n.d.	n.d.
YBR104W	YMC2	1,90	12,38	n.d.	n.d.	1,57	15,99

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YBR106W	PHO88	0,86	11,04	0,86	1,12	n.d.	n.d.
YBR120C	CBP6	1,42	19,87	1,29	1,16	1,33	11,19
YBR121C	GRS1	0,95	11,60	1,05	1,11	0,80	27,03
YBR129C	OPY1	0,83	38,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBR146W	MRP59	1,61	7,56	1,52	1,12	n.d.	n.d.
YBR163W	EXO5	1,07	12,76	n.d.	n.d.	1,18	24,58
YBR176W	ECM31	1,21	6,20	n.d.	n.d.	0,90	18,47
YBR177C	EHT1	1,72	13,43	1,82	NN	1,38	22,09
YBR179C	FZO1	1,37	12,98	1,57	1,06	1,18	27,60
YBR192W	RIM2	1,35	7,67	1,43	1,03	1,13	32,72
YBR196C	PGI1	0,35	11,98	n.d.	n.d.	0,39	94,11
YBR221C	PDB1	1,09	19,08	1,10	1,11	0,83	72,34
YBR227C	MCX1	0,84	11,63	0,90	1,05	0,79	17,53
YBR229C	ROT2	n.d.	n.d.	0,56	1,19	n.d.	n.d.
YBR251W	MRPS5	1,57	8,25	n.d.	n.d.	1,14	17,21
YBR262C	AIM5	1,48	21,04	1,50	NN	1,22	4,39
YBR263W	SHM1	1,05	12,88	1,08	1,05	0,93	15,95
YBR265W	TSC10	0,92	6,61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBR269C	FMP21	0,86	12,47	0,93	1,05	n.d.	n.d.
YBR282W	MRPL27	1,61	2,42	n.d.	n.d.	1,36	12,47
YBR291C	CTP1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,85	90,57
YCL004W	PGS1	1,65	22,52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YCL009C	ILV6	1,60	29,33	n.d.	n.d.	1,77	39,64
YCL017C	NFS1	1,18	20,71	1,26	1,09	1,06	10,52
YCL044C	MGR1	1,11	4,32	n.d.	n.d.	0,99	19,98
YCL057C-A	YCL057C-A	1,46	8,93	1,46	1,02	n.d.	n.d.
YCL057W	PRD1	1,34	19,91	n.d.	n.d.	1,08	20,71
YCL064C	CHA1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,46	26,38
YCR004C	YCP4	0,19	28,16	0,20	1,21	0,18	23,56
YCR010C	ADY2/ATO1	n.d.	n.d.	1,25	1,08	n.d.	n.d.
YCR012W	PGK1	0,50	18,06	0,53	1,10	0,46	31,76
YCR024C	SLM5	1,35	6,98	n.d.	n.d.	1,54	15,55
YCR028C-A	RIM1	1,00	7,01	1,06	1,06	0,82	13,35
YCR046C	IMG1	1,59	26,01	n.d.	n.d.	1,60	9,78
YCR071C	IMG2	1,52	10,67	n.d.	n.d.	1,09	19,39
YCR079W	PTC6	1,41	17,06	n.d.	n.d.	1,05	10,80
YCR083W	TRX3	1,54	5,36	1,53	1,04	1,20	11,73
YCR088W	ABP1	0,34	13,83	n.d.	n.d.	0,42	21,82
YDL027C	YDL027C	1,31	10,82	1,43	1,10	1,08	16,86
YDL033C	SLM3	1,33	7,81	n.d.	n.d.	1,22	26,32
YDL044C	MTF2	1,71	11,86	1,73	1,12	1,38	7,33
YDL066W	IDP1	1,02	9,08	n.d.	n.d.	0,90	20,88
YDL067C	COX9	0,92	5,56	0,95	1,10	0,81	9,52
YDL085W	NDE2	1,37	10,62	1,38	1,12	1,25	20,51
YDL104C	QRI7	1,53	15,25	n.d.	n.d.	1,13	6,18
YDL107W	MSS2	1,74	13,90	n.d.	n.d.	1,24	19,84

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YDL119C	YDL119C	1,18	5,10	n.d.	n.d.	0,94	6,01
YDL157C	YDL157C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,33	25,67
YDL164C	CDC9	1,58	7,45	n.d.	n.d.	1,22	21,85
YDL171C	GLT1	1,00	39,31	n.d.	n.d.	0,31	68,21
YDL174C	DLD1	1,53	22,77	1,40	1,09	1,45	29,01
YDL178W	DLD2	1,25	11,56	1,31	1,47	1,12	14,03
YDL183C	MKR1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,24	18,70
YDL198C	GGC1	1,75	11,63	1,66	1,16	1,31	17,52
YDL202W	MRPL11	1,59	17,84	1,56	1,18	1,29	43,20
YDL215C	GDH2	1,05	8,84	1,05	1,07	0,92	13,81
YDL217C	TIM22	1,28	12,76	1,36	1,10	n.d.	n.d.
YDR011W	SNQ2	0,52	12,88	0,53	1,19	0,54	13,43
YDR019C	GCV1	6,98	11,96	n.d.	n.d.	4,79	13,91
YDR032C	PST2	0,29	8,76	0,29	1,36	0,27	13,70
YDR033W	MRH1	1,62	20,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR036C	EHD3	1,54	5,05	n.d.	n.d.	1,24	14,55
YDR041W	RSM10	1,49	10,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR050C	TPI1	0,43	6,37	n.d.	n.d.	0,33	18,55
YDR058C	TGL2	1,37	14,08	n.d.	n.d.	1,02	17,08
YDR061W	YDR061W	1,04	12,77	n.d.	n.d.	1,18	19,22
YDR070C	FMP16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,38	16,55
YDR079W	PET100	n.d.	n.d.	1,36	1,04	n.d.	n.d.
YDR116C	MRPL11	1,02	6,74	n.d.	n.d.	0,82	12,98
YDR148C	KGD2	0,48	30,09	0,55	1,15	0,49	26,70
YDR150W	NUM1	0,18	9,98	0,21	1,23	0,31	38,72
YDR155C	CPR1	0,74	6,32	n.d.	n.d.	0,79	36,17
YDR175C	RSM24	1,28	8,42	1,24	1,03	1,04	25,62
YDR178W	SDH4	0,82	12,54	1,21	1,26	0,78	20,48
YDR185C	UPS3	0,37	12,45	n.d.	n.d.	0,36	4,82
YDR194C	MSS116	0,58	8,04	0,54	1,35	0,46	27,94
YDR196C	CAB5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,41	13,25
YDR197W	CBS2	0,38	13,40	n.d.	n.d.	0,28	18,92
YDR226W	ADK1	0,55	8,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR231C	COX20	0,76	20,66	0,88	1,03	0,66	31,76
YDR232W	HEM1	0,72	28,54	n.d.	n.d.	0,73	20,55
YDR233C	RTN1	0,21	34,37	n.d.	n.d.	0,20	43,32
YDR234W	LYS4	1,10	12,44	1,18	1,23	0,85	14,90
YDR256C	CTA1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,22	0,92
YDR258C	HSP78	0,47	11,12	0,51	NN	0,44	33,98
YDR268W	MSW1	1,68	6,71	n.d.	n.d.	1,32	10,96
YDR296W	MHR1	1,42	13,20	n.d.	n.d.	1,10	27,32
YDR298C	ATP5	1,03	13,40	1,07	1,09	0,94	15,54
YDR305C	HNT2	1,59	12,46	n.d.	n.d.	1,10	27,08
YDR316W	OMS1	1,55	12,69	1,70	1,05	1,45	21,26
YDR322C-A	TIM11	1,16	17,04	1,09	1,09	1,06	16,35
YDR322W	MRPL35	1,30	15,64	n.d.	n.d.	1,05	19,14
YDR332W	IRC3	1,09	4,45	n.d.	n.d.	0,91	24,97

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YDR337W	MRPS28	1,58	15,16	1,51	1,10	1,25	35,70
YDR341C	YDR341C	0,32	9,45	n.d.	n.d.	0,37	10,32
YDR342C	HXT7	45,15	60,64	326,99	20,66	n.d.	n.d.
YDR347W	MRP1	1,62	21,59	n.d.	n.d.	1,10	26,03
YDR375C	BCS1	1,96	12,77	n.d.	n.d.	1,54	10,61
YDR376W	ARH1	1,10	8,49	n.d.	n.d.	1,10	15,40
YDR377W	ATP17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,76	25,38
YDR381C-A	YDR381C-A	1,11	4,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR384C	ATO3	0,52	23,84	0,43	1,85	0,17	45,62
YDR393W	SHE9	1,45	9,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR405W	MRP20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,28	4,26
YDR430C	CYM1	1,59	16,40	1,62	1,18	1,29	16,80
YDR450W	RPS18A	0,61	5,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR462W	MRPL28	1,46	10,80	1,56	1,11	1,32	5,15
YDR470C	UGO1	1,39	15,67	n.d.	n.d.	1,29	35,62
YDR493W	MZM1	n.d.	n.d.	1,93	1,05	n.d.	n.d.
YDR494W	RSM28	1,46	25,91	1,51	1,13	1,08	51,43
YDR511W	ACN9	1,91	7,77	n.d.	n.d.	1,44	19,05
YDR513W	GRX2	1,48	19,68	n.d.	n.d.	1,26	10,08
YDR529C	QCR7	0,78	5,15	0,81	1,09	0,87	45,84
YEL020W-A	TIM9	2,73	1,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YEL024W	RIP1	0,75	10,19	0,78	1,03	0,64	26,39
YEL030W	ECM10	n.d.	n.d.	1,48	NN	n.d.	n.d.
YEL031W	SPF1	0,72	12,57	0,82	1,17	0,72	18,15
YEL039C	CYC7	n.d.	n.d.	1,92	1,17	1,34	6,49
YEL050C	RML2	1,18	22,09	n.d.	n.d.	0,88	9,12
YEL052W	AFG1	1,12	12,42	1,02	1,16	0,97	15,27
YER004W	FMP52	1,70	10,46	1,85	NN	1,29	17,50
YER014W	HEM14	1,03	15,58	n.d.	n.d.	1,06	32,89
YER015W	FAA2	0,21	7,28	n.d.	n.d.	0,17	43,29
YER017C	AFG3	1,60	6,76	1,51	1,13	1,24	22,56
YER020W	GPA2	0,52	0,33	n.d.	n.d.	0,45	38,36
YER031C	YPT31	n.d.	n.d.	1,20	1,02	n.d.	n.d.
YER048W-A	ISD11	1,24	12,34	1,29	1,12	1,03	21,41
YER053C	PIC2	2,42	13,48	2,44	1,04	2,06	36,94
YER058W	PET117	1,45	10,01	1,46	1,12	1,33	8,88
YER061C	CEM1	1,57	14,38	n.d.	n.d.	1,17	15,72
YER069W	ARG5,6	2,49	7,97	2,44	1,14	2,02	17,85
YER073W	ALD5	1,14	8,39	1,19	1,07	1,04	19,18
YER077C	YER077C	2,02	11,28	n.d.	n.d.	1,48	11,22
YER078C	ICP55	1,44	3,63	n.d.	n.d.	1,27	9,47
YER080W	AIM9	0,75	10,42	0,77	1,08	0,65	19,34
YER086W	ILV1	1,36	15,78	1,42	1,10	1,54	21,24
YER087W	AIM10	1,73	10,43	1,66	1,11	1,42	12,25
YER125W	RSP5	0,39	13,35	0,39	1,05	0,40	41,94

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YER141W	COX15	1,19	11,47	1,13	1,13	1,07	17,43
YER154W	OXA1	1,69	15,28	n.d.	n.d.	1,16	36,70
YER155C	BEM2	0,26	9,26	n.d.	n.d.	0,24	14,31
YER166W	DNF1	1,31	20,54	1,15	2,18	1,22	12,46
YER178W	PDA1	1,26	14,57	1,24	1,24	n.d.	n.d.
YER182W	FMP10	1,43	13,86	1,43	1,09	1,17	28,01
YFL005W	SEC4	1,11	12,17	1,15	1,07	0,86	19,02
YFL016C	MDJ1	1,04	10,07	n.d.	n.d.	0,94	16,56
YFL018C	LPD1	1,18	7,91	1,20	1,16	1,05	20,13
YFL030W	AGX1	1,36	9,96	1,40	1,07	1,05	14,33
YFL036W	RPO41	0,90	12,61	0,97	1,08	0,93	18,11
YFL038C	YPT1	0,84	6,55	0,84	1,02	0,77	9,73
YFL046W	FMP32	1,20	4,94	1,24	NN	1,09	5,01
YFR011C	AIM3	1,52	8,25	n.d.	n.d.	1,40	35,05
YFR044C	DUG1	0,33	8,22	0,30	1,13	0,32	68,61
YFR045W	YFR045W	1,19	14,59	n.d.	n.d.	0,92	51,21
YFR049W	YMR31	1,06	41,61	n.d.	n.d.	0,92	17,33
YFR053C	HXK1	0,22	8,63	0,20	1,24	0,22	16,05
YGL008C	PMA1	0,84	6,44	0,82	1,12	0,79	18,44
YGL020C	GET1	0,64	5,84	n.d.	n.d.	0,51	8,31
YGL057C	GEP7	0,91	7,92	0,97	1,10	0,74	11,82
YGL059W	PKP2	1,67	13,66	n.d.	n.d.	1,36	27,46
YGL064C	MRH4	1,35	15,91	n.d.	n.d.	1,32	19,73
YGL068W	MNP1	1,62	9,77	1,47	1,13	1,68	10,44
YGL080W	FMP37	0,80	8,15	0,89	1,07	0,79	14,12
YGL107C	RMD9	1,54	12,97	1,55	1,14	1,33	14,56
YGL119W	COQ8	1,46	17,72	n.d.	n.d.	1,23	10,20
YGL129C	RSM23	1,64	13,19	n.d.	n.d.	1,28	21,37
YGL187C	COX4	1,03	5,74	n.d.	n.d.	0,83	23,91
YGL191W	COX13	1,14	7,40	1,24	1,04	1,09	9,79
YGL210W	YPT32	1,06	10,66	1,17	NN	n.d.	n.d.
YGL221C	NIF3	2,08	9,73	n.d.	n.d.	1,44	8,70
YGL226W	MTC3	1,58	2,10	1,66	1,01	n.d.	n.d.
YGL236C	MTO1	1,38	9,08	n.d.	n.d.	1,09	19,44
YGL245W	GUS1	0,52	9,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YGL253W	HXK2	0,48	11,91	n.d.	n.d.	0,41	15,85
YGL256W	ADH4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,42	176,68
YGR012W	YGR012W	1,16	12,12	n.d.	n.d.	0,94	66,63
YGR021W	HAH1	2,28	10,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YGR028W	MSP1	1,54	12,56	n.d.	n.d.	1,17	7,39
YGR031W	IMO32	1,57	22,45	1,51	1,10	1,13	29,07
YGR033C	TIM21	0,96	5,63	n.d.	n.d.	0,92	13,69
YGR046W	TAM41	1,01	19,44	n.d.	n.d.	0,86	6,79
YGR049W	SCM4	1,44	11,58	1,58	1,32	1,22	23,86
YGR076C	MRPL25	1,42	13,11	n.d.	n.d.	1,33	16,66
YGR082W	TOM20	1,82	10,07	1,82	1,21	1,58	19,65
YGR084C	MRP13	1,52	9,17	n.d.	n.d.	1,07	23,72
YGR086C	PIL1	1,11	24,39	1,17	1,05	0,74	34,64

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YGR094W	VAS1	1,39	12,46	1,45	1,16	1,23	17,15
YGR102C	YGR102C	1,44	15,87	n.d.	n.d.	1,10	9,28
YGR110W	CLD1	0,66	4,14	n.d.	n.d.	0,56	38,62
YGR112W	SHY1	1,40	19,09	n.d.	n.d.	1,14	22,38
YGR132C	PHB1	1,53	8,30	n.d.	n.d.	1,27	30,61
YGR147C	NAT2	1,70	5,39	1,78	1,08	1,22	13,78
YGR150C	CCM1	1,48	12,46	1,49	NN	1,33	18,38
YGR165W	MRPS35	1,55	21,27	1,77	NN	1,07	28,48
YGR171C	MSM1	1,22	23,65	1,40	1,07	1,23	17,96
YGR174C	CBP4	1,40	7,64	n.d.	n.d.	1,22	17,78
YGR178C	PBP1	1,46	11,66	n.d.	n.d.	1,15	23,01
YGR181W	TIM13	1,79	10,15	n.d.	n.d.	1,50	19,04
YGR193C	PDX1	0,95	32,32	n.d.	n.d.	0,78	59,32
YGR207C	CIR1	1,34	15,60	1,36	1,08	1,02	31,98
YGR215W	RSM27	1,38	2,46	1,36	1,13	1,35	9,63
YGR220C	MRPL9	1,61	4,96	1,68	1,05	1,29	8,56
YGR222W	PET54	1,58	1,94	n.d.	n.d.	1,35	29,52
YGR231C	PHB2	1,48	5,68	1,54	NN	1,46	20,53
YGR234W	YHB1	2,01	20,10	1,84	1,15	1,44	51,85
YGR235C	YGR235C	1,50	22,40	1,31	1,10	1,01	19,21
YGR240C	PFK1	0,84	31,32	n.d.	n.d.	0,65	81,98
YGR243W	FMP43	5,73	70,78	0,97	4,08	0,87	12,77
YGR244C	LSC2	0,83	15,33	1,15	1,26	0,78	27,15
YGR254W	ENO1	0,48	7,58	n.d.	n.d.	0,38	6,75
YGR255C	COQ6	0,87	23,12	n.d.	n.d.	1,00	36,32
YGR266W	YGR266W	1,04	12,72	0,94	1,13	0,90	16,42
YGR286C	BIO2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,70	14,55
YHL004W	MRP4	1,60	9,51	n.d.	n.d.	1,25	11,28
YHL014C	YLF2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,93	17,69
YHL018W	YHL018W	1,32	8,84	1,51	1,36	n.d.	n.d.
YHL021C	AIM17	0,86	10,33	n.d.	n.d.	0,71	15,38
YHL032C	GUT1	1,08	11,04	n.d.	n.d.	0,84	14,03
YHL038C	CBP2	1,56	17,02	n.d.	n.d.	1,31	14,62
YHR001W-A	QCR10	0,79	2,24	n.d.	n.d.	0,76	19,87
YHR002W	LEU5	1,06	15,26	n.d.	n.d.	0,71	16,85
YHR003C	YHR003C	1,53	3,20	n.d.	n.d.	1,15	15,78
YHR005C-A	TIM10	2,70	9,74	n.d.	n.d.	1,95	24,02
YHR008C	SOD2	1,28	6,29	1,32	1,08	1,04	36,89
YHR011W	DIA4	1,44	8,60	n.d.	n.d.	1,14	16,90
YHR017W	YSC83	1,40	17,17	n.d.	n.d.	1,13	20,20
YHR024C	MAS2	1,48	8,05	n.d.	n.d.	1,19	20,30
YHR037W	PUT2	0,83	27,65	0,82	1,08	0,78	45,96
YHR038W	RRF1	1,46	11,73	n.d.	n.d.	1,14	18,36
YHR042W	NCP1	0,72	6,01	n.d.	n.d.	0,56	58,84
YHR051W	COX6	1,11	13,20	1,08	1,11	0,88	20,22
YHR067W	HTD2	1,41	17,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YHR076W	PTC7	1,23	18,84	1,09	1,12	0,99	20,64
YHR083W	SAM35	1,50	9,74	n.d.	n.d.	1,12	15,66
YHR091C	MSR1	1,05	19,42	1,08	1,10	0,98	13,99
YHR100C	GEP4	1,40	10,49	1,59	1,07	1,33	38,99
YHR106W	TRR2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,56	14,33
YHR117W	TOM71	1,24	6,35	1,28	1,11	0,96	9,50
YHR120W	MSH1	1,39	16,04	n.d.	n.d.	1,22	13,63
YHR135C	YCK1	0,62	22,82	3,01	1,22	n.d.	n.d.
YHR147C	MRPL6	1,12	16,65	1,20	1,13	0,91	23,84
YHR183W	GND1	0,27	17,28	n.d.	n.d.	0,24	39,56
YHR190W	ERG9	0,72	11,61	n.d.	n.d.	0,54	17,41
YHR198C	AIM18	1,81	21,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YHR199C	AIM46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,22	7,44
YHR208W	BAT1	1,53	12,05	1,63	1,14	1,26	17,06
YIL022W	TIM44	1,50	12,67	1,54	1,08	1,21	18,67
YIL042C	PKP1	1,13	15,95	n.d.	n.d.	0,90	11,69
YIL043C	CBR1	1,15	12,90	1,10	1,04	0,87	10,23
YIL051C	MMF1	3,41	13,58	3,17	1,12	2,56	24,44
YIL065C	FIS1	1,24	11,49	1,16	1,32	1,17	6,44
YIL070C	MAM33	1,78	11,03	n.d.	n.d.	1,45	35,49
YIL077C	YIL077C	1,18	26,64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YIL078W	THS1	0,43	21,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YIL093C	RSM25	1,70	4,73	1,67	1,13	1,20	16,69
YIL094C	LYS12	1,27	8,97	1,26	1,08	1,02	13,61
YIL098C	FMC1	1,64	10,50	n.d.	n.d.	1,44	19,25
YIL105C	SLM1	1,50	48,24	n.d.	n.d.	1,34	53,35
YIL111W	COX5B	0,68	12,42	0,80	1,20	0,62	15,61
YIL114C	POR2	3,59	9,06	n.d.	n.d.	2,48	15,45
YIL124W	AYR1	1,06	7,16	n.d.	n.d.	0,88	15,04
YIL125W	KGD1	1,27	12,45	1,51	1,08	1,16	20,86
YIL136W	OM45	1,78	24,15	1,87	1,06	1,46	30,62
YIL155C	GUT2	1,02	12,94	1,05	1,06	0,91	20,08
YIL157C	COA1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,53	10,07
YIR021W	MRS1	1,50	9,13	n.d.	n.d.	1,26	18,57
YIR024C	YIR024C	1,38	3,06	n.d.	n.d.	1,15	31,74
YIR038C	GTT1	0,66	14,45	0,71	1,07	0,56	58,17
YJL003W	COX16	0,57	11,20	n.d.	n.d.	0,52	21,03
YJL045W	YJL045W	7,34	14,56	1,49	NN	n.d.	n.d.
YJL046W	AIM22	1,46	19,20	n.d.	n.d.	1,13	22,48
YJL052W	TDH1	0,58	10,27	0,62	1,04	0,48	9,55
YJL054W	TIM54	1,29	14,92	1,28	1,05	1,31	21,04
YJL060W	BNA3	1,30	14,24	n.d.	n.d.	0,94	19,70
YJL063C	MRPL8	1,80	27,56	1,53	1,06	1,37	27,06
YJL066C	MPM1	2,05	7,21	n.d.	n.d.	1,65	23,36
YJL071W	ARG2	1,58	10,95	n.d.	n.d.	1,36	13,42
YJL082W	IML2	0,79	9,35	n.d.	n.d.	0,74	35,35
YJL096W	MRPL49	2,52	32,91	n.d.	n.d.	0,76	28,88
YJL102W	MEF2	1,80	8,10	1,90	1,03	1,71	16,06

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YJL104W	PAM16	1,71	14,19	1,68	1,25	1,50	16,42
YJL112W	MDV1	2,22	12,66	n.d.	n.d.	1,74	19,66
YJL130C	URA2	0,84	11,66	0,87	1,19	0,86	18,51
YJL131C	AIM23	1,38	5,93	n.d.	n.d.	1,00	42,22
YJL133C-A	YJL133C-A	0,63	8,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YJL147C	YJL147C	0,87	10,42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YJL171C	YJL171C	1,66	32,50	n.d.	n.d.	1,47	26,52
YJL180C	ATP12	1,66	19,85	n.d.	n.d.	1,36	18,61
YJL200C	ACO2	2,10	17,92	1,85	1,20	1,80	18,74
YJL208C	NUC1	1,31	17,35	n.d.	n.d.	1,22	14,85
YJL209W	CBP1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,14	34,13
YJR003C	YJR003C	1,22	6,72	n.d.	n.d.	1,05	16,45
YJR009C	TDH2	0,68	4,11	0,65	1,09	n.d.	n.d.
YJR016C	ILV3	0,99	10,37	1,01	1,10	0,91	17,63
YJR019C	TES1	1,18	1,67	n.d.	n.d.	0,83	227,53
YJR034W	PET191	1,70	1,82	n.d.	n.d.	1,36	18,00
YJR045C	SSC1	1,53	16,99	1,55	1,35	1,22	29,98
YJR048W	CYC1	2,14	11,32	2,24	1,07	1,81	18,38
YJR051W	OSM1	1,67	17,24	n.d.	n.d.	1,51	12,61
YJR077C	MIR1	1,19	10,45	n.d.	n.d.	1,01	26,54
YJR080C	AIM24	1,25	10,55	n.d.	n.d.	0,96	14,17
YJR091C	JSN1	0,44	8,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YJR095W	SFC1	2,04	11,17	1,95	1,02	1,47	20,45
YJR100C	AIM25	1,31	0,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YJR104C	SOD1	1,73	7,23	1,76	1,25	1,56	19,59
YJR111C	YJR111C	1,31	6,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YJR113C	RSM7	1,66	20,89	1,62	NN	1,11	17,21
YJR117W	STE24	1,13	12,37	n.d.	n.d.	0,89	11,69
YJR121W	ATP2	1,23	13,21	1,25	NN	1,10	19,31
YJR122W	IBA57	1,44	8,12	n.d.	n.d.	1,61	16,95
YJR144W	MGM101	1,09	10,23	n.d.	n.d.	0,88	15,49
YKL003C	MRP17	1,54	4,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YKL011C	CCE1	0,96	4,43	n.d.	n.d.	0,75	9,28
YKL016C	ATP7	0,99	6,64	1,08	1,06	1,03	12,30
YKL027W	YKL027W	1,37	20,99	n.d.	n.d.	1,20	16,41
YKL029C	MAE1	2,09	15,42	1,86	1,10	1,56	18,41
YKL040C	NFU1	1,45	16,88	1,41	1,10	1,27	35,27
YKL055C	OAR1	1,80	7,74	1,69	1,13	1,34	9,97
YKL060C	FBA1	0,39	30,15	n.d.	n.d.	0,45	41,25
YKL067W	YNK1	1,29	11,87	1,57	1,17	1,17	21,21
YKL081W	TEF4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,46	0,77
YKL085W	MDH1	1,57	13,90	1,57	1,14	1,21	20,10
YKL087C	CYT2	1,72	14,24	n.d.	n.d.	1,20	14,61
YKL094W	YJU3	1,31	13,36	1,26	1,05	1,06	26,41
YKL106W	AAT1	0,75	9,08	0,74	1,00	0,62	12,74
YKL113C	RAD27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,84	20,13
YKL120W	OAC1	1,45	9,27	n.d.	n.d.	1,17	17,35
YKL134C	OCT1	1,84	7,22	1,79	1,05	n.d.	n.d.



ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YKL137W	CMC1	1,92	21,14	n.d.	n.d.	1,49	10,04
YKL138C	MRPL31	n.d.	n.d.	1,72	1,06	1,44	17,53
YKL141W	SDH3	1,25	5,68	1,27	1,06	1,10	14,72
YKL148C	SDH1	1,47	11,21	1,49	1,11	1,24	14,19
YKL150W	MCR1	0,94	10,16	0,94	1,09	0,80	19,50
YKL152C	GPM1	1,84	15,80	1,69	1,31	1,46	25,31
YKL155C	RSM22	1,69	11,01	1,78	1,09	1,26	9,12
YKL157W	APE2	1,16	13,61	1,09	1,22	1,10	22,87
YKL162C	YKL162C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,09	20,85
YKL167C	MRP49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,38	11,58
YKL170W	MRPL38	1,59	9,31	1,55	1,19	1,26	14,32
YKL182W	FAS1	1,19	11,15	1,21	1,18	1,20	18,91
YKL187C	YKL187C	1,45	78,60	1,03	1,03	1,97	36,06
YKL192C	ACP1	1,32	23,50	n.d.	n.d.	1,28	8,62
YKL194C	MST1	1,50	7,39	n.d.	n.d.	1,09	32,97
YKL195W	MIA40	1,49	19,51	1,53	1,10	1,45	22,23
YKL196C	YKT6	0,41	17,52	n.d.	n.d.	0,40	6,40
YKL203C	TOR2	0,92	10,39	0,88	1,32	0,69	33,14
YKL212W	SAC1	0,66	10,96	0,74	1,30	0,58	23,282
YKL217W	JEN1	0,54	16,60	0,56	1,45	0,53	24,332
YKR001C	VPS1	0,87	21,25	n.d.	n.d.	0,76	31,058
YKR006C	MRPL13	1,69	15,22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YKR016W	FCJ1	1,49	18,99	1,55	1,16	1,33	35,47
YKR018C	YKR018C	0,38	1,82	n.d.	n.d.	0,36	15,70
YKR049C	FMP46	1,07	7,40	1,17	1,11	0,97	11,62
YKR066C	CCP1	1,65	18,59	1,75	1,08	1,25	32,77
YKR070W	YKR070W	1,27	8,22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YKR079C	TRZ1	1,41	9,66	1,42	1,16	1,25	14,42
YKR085C	MRPL20	1,51	9,36	n.d.	n.d.	1,36	13,62
YKR087C	OMA1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	18,49
YLL024C	SSA2	0,35	4,90	0,37	1,15	0,26	19,54
YLL027W	ISA1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,87	17,65
YLL040C	VPS13	0,78	49,66	0,62	1,25	0,93	27,90
YLL041C	SDH2	1,50	6,39	1,52	NN	1,19	16,12
YLR008C	PAM18	2,08	45,33	n.d.	n.d.	1,49	27,02
YLR038C	COX12	1,60	12,61	1,33	NN	1,27	23,43
YLR067C	PET309	1,41	15,90	1,31	1,09	1,09	33,54
YLR069C	MEF1	1,78	9,21	1,75	1,11	1,49	26,56
YLR077W	FMP25	1,40	8,91	1,47	1,06	1,33	20,45
YLR084C	RAX2	1,01	22,53	1,16	1,21	n.d.	n.d.
YLR087C	CSF1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,22	33,17
YLR089C	ALT1	1,19	17,15	1,32	1,19	1,31	13,53
YLR091W	GEP5	1,43	10,74	n.d.	n.d.	1,25	6,05
YLR105C	SEN2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,13	14,71
YLR139C	SLS1	1,57	9,18	n.d.	n.d.	1,20	70,22
YLR142W	PUT1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,89	12,63
YLR163C	MAS1	1,48	14,30	n.d.	n.d.	1,29	18,09
YLR188W	MDL1	1,43	10,51	1,53	1,05	1,27	36,96

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YLR190W	MMR1	0,67	23,30	n.d.	n.d.	0,72	20,71
YLR201C	COQ9	0,79	15,19	n.d.	n.d.	0,66	13,57
YLR203C	MSS51	1,38	21,91	1,11	1,36	1,11	17,28
YLR239C	LIP2	1,76	33,99	n.d.	n.d.	1,45	26,12
YLR253W	YLR253W	1,81	7,30	n.d.	n.d.	1,75	6,16
YLR259C	HSP60	1,27	11,09	1,19	1,11	1,11	23,77
YLR283W	YLR283W	1,45	1,59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YLR290C	YLR290C	1,41	20,39	n.d.	n.d.	1,15	21,04
YLR304C	ACO1	1,15	11,80	1,20	NN	1,03	17,62
YLR305C	STT4	0,56	18,30	0,55	NN	0,60	49,13
YLR312W-A	MRPL15	1,61	13,59	n.d.	n.d.	1,34	29,84
YLR342W	FKS1	n.d.	n.d.	0,33	1,33	n.d.	n.d.
YLR348C	DIC1	1,09	7,05	1,12	1,07	0,86	11,38
YLR351C	NIT3	1,33	11,42	n.d.	n.d.	1,05	9,17
YLR355C	ILV5	1,08	13,05	1,13	1,08	0,87	19,92
YLR369W	SSQ1	1,24	9,52	1,35	1,03	n.d.	n.d.
YLR382C	NAM2	1,42	13,83	1,39	1,11	1,18	14,46
YLR393W	ATP10	1,55	9,04	1,60	1,01	1,24	12,79
YLR439W	MRPL4	1,22	13,59	n.d.	n.d.	1,01	15,51
YLR454W	FMP27	0,44	6,55	0,41	1,23	0,55	17,51
YML001W	YPT7	1,05	4,45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YML008C	ERG6	0,78	16,92	0,87	NN	0,62	46,77
YML025C	YML6	1,83	26,83	1,87	1,21	1,27	22,94
YML030W	AIM31	1,64	10,29	1,72	1,18	1,45	16,61
YML042W	CAT2	1,27	8,93	1,26	1,09	1,09	18,03
YML048W	GSF2	0,60	13,28	n.d.	n.d.	0,50	12,56
YML054C	CYB2	1,14	11,01	1,15	1,13	1,10	17,65
YML061C	PIF1	0,88	2,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YML072C	TCB3	0,36	19,84	0,37	1,29	0,41	34,04
YML078W	CPR3	1,40	12,96	1,43	1,09	1,29	20,73
YML081C-A	ATP18	0,97	11,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YML086C	ALO1	1,29	14,25	1,25	1,15	1,20	22,90
YML091C	RPM2	1,45	9,46	1,56	1,11	1,18	15,67
YML110C	COQ5	1,06	6,03	n.d.	n.d.	0,96	28,82
YML120C	NDI1	1,10	9,29	1,07	1,11	1,02	21,01
YML128C	MSC1	2,42	15,00	n.d.	n.d.	2,13	11,84
YML129C	COX14	1,95	28,71	n.d.	n.d.	1,28	14,56
YMR024W	MRPL3	1,50	11,04	n.d.	n.d.	1,25	23,70
YMR031C	EIS1	0,89	35,97	0,57	1,07	0,82	27,88
YMR056C	AAC1	1,97	13,92	1,76	1,33	1,37	26,19
YMR060C	SAM37	1,47	8,67	n.d.	n.d.	1,15	23,89
YMR062C	ARG7	1,36	7,69	1,37	1,06	1,14	14,92
YMR064W	AEP1	1,19	17,97	n.d.	n.d.	1,01	10,72
YMR066W	SOV1	1,41	15,39	1,52	1,12	1,23	14,09
YMR072W	ABF2	1,29	13,38	1,33	NN	1,22	18,35
YMR083W	ADH3	1,57	9,10	1,54	1,06	1,29	19,94

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YMR089C	YTA12	1,52	10,09	1,54	1,09	1,37	22,90
YMR097C	MTG1	1,18	3,51	n.d.	n.d.	0,95	10,78
YMR098C	ATP25	1,56	34,90	n.d.	n.d.	1,21	16,95
YMR108W	ILV2	1,24	21,76	1,11	NN	1,02	42,03
YMR110C	HFD1	1,40	10,76	1,33	1,04	1,40	20,69
YMR115W	MGR3	1,24	8,24	n.d.	n.d.	1,08	10,29
YMR145C	NDE1	0,80	15,40	0,78	NN	0,79	21,96
YMR152W	YIM1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,09	16,42
YMR157C	AIM36	1,61	13,95	1,73	1,10	1,46	10,00
YMR158W	MRPS8	1,64	11,86	1,62	1,10	1,35	8,55
YMR186W	HSC82	0,47	14,54	n.d.	n.d.	0,41	18,84
YMR188C	MRPS17	1,65	17,67	1,58	1,15	1,28	28,66
YMR189W	GCV2	4,65	14,53	4,47	1,16	3,32	20,50
YMR193W	MRPL24	1,43	19,73	n.d.	n.d.	1,13	33,73
YMR203W	TOM40	1,43	7,25	n.d.	n.d.	1,18	25,14
YMR205C	PFK2	0,58	10,42	0,59	1,14	0,48	16,56
YMR207C	HFA1	2,01	12,88	1,85	NN	n.d.	n.d.
YMR212C	EFR3	1,45	95,35	n.d.	n.d.	1,35	63,04
YMR225C	MRPL44	1,55	0,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YMR228W	MTF1	1,47	14,59	n.d.	n.d.	1,08	18,19
YMR241W	YHM2	1,30	8,20	1,44	1,12	1,10	17,61
YMR257C	PET111	1,32	6,53	n.d.	n.d.	1,06	18,95
YMR267W	PPA2	1,00	11,55	n.d.	n.d.	0,95	18,79
YMR282C	AEP2	1,53	16,78	n.d.	n.d.	1,41	23,43
YMR286W	MRPL33	1,45	8,87	1,41	1,02	1,19	20,32
YMR287C	DSS1	1,38	15,79	1,44	1,18	1,04	20,04
YMR293C	HER2	1,46	15,55	n.d.	n.d.	1,11	27,05
YMR301C	ATM1	1,40	12,98	1,56	1,13	1,26	17,50
YMR302C	YME2	1,14	13,38	1,32	1,10	1,01	24,57
YMR307W	GAS1	0,39	14,03	0,39	1,14	0,39	24,51
YNL003C	PET8	0,98	21,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNL005C	MRP7	1,51	5,91	1,49	1,07	1,06	10,38
YNL009W	IDP3	1,38	8,24	1,08	NN	1,21	19,27
YNL026W	SAM50	1,00	11,81	n.d.	n.d.	1,03	14,90
YNL037C	IDH1	1,69	8,95	1,66	1,06	1,40	16,50
YNL052W	COX5A	0,97	5,28	0,98	NN	0,85	15,83
YNL055C	POR1	1,44	12,40	n.d.	n.d.	1,22	21,61
YNL071W	LAT1	1,02	21,86	1,25	1,15	0,97	25,10
YNL073W	MSK1	1,86	13,98	n.d.	n.d.	1,74	27,11
YNL100W	AIM37	1,48	10,29	1,51	1,02	1,22	16,32
YNL104C	LEU4	1,04	14,98	1,00	1,10	0,95	22,15
YNL121C	TOM70	1,72	12,84	1,60	1,17	1,30	27,55
YNL131W	TOM22	1,71	19,08	n.d.	n.d.	1,12	17,53
YNL135C	FPR1	1,19	4,72	1,14	1,09	0,97	23,83
YNL137C	NAM9	1,73	9,93	1,53	1,12	1,57	40,91
YNL168C	FMP41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,75	11,17
YNL169C	PSD1	1,28	2,82	n.d.	n.d.	0,98	13,00
YNL177C	MRPL22	1,76	16,72	n.d.	n.d.	1,36	10,27

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YNL185C	MRPL19	1,76	8,92	1,79	1,14	1,55	15,97
YNL200C	YNL200C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,70	12,68
YNL213C	RRG9	1,20	19,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNL239W	LAP3	1,18	14,93	n.d.	n.d.	0,98	12,16
YNL252C	MRPL17	1,47	9,60	n.d.	n.d.	1,20	14,92
YNL256W	FOL1	1,47	21,52	1,41	1,18	1,15	17,49
YNL284C	MRPL10	1,51	16,70	n.d.	n.d.	1,15	17,94
YNL306W	MRPS18	1,60	12,90	1,64	1,02	1,26	9,41
YNL315C	ATP11	1,41	19,48	n.d.	n.d.	1,00	25,60
YNR001C	CIT1	1,42	13,03	1,36	1,10	n.d.	n.d.
YNR002C	ATO2	0,43	18,54	0,46	1,58	0,35	23,22
YNR016C	ACC1	0,86	11,11	0,95	1,17	0,91	24,47
YNR018W	AIM38	0,57	7,31	0,61	1,05	0,58	20,75
YNR020C	ATP23	1,35	7,60	n.d.	n.d.	1,00	88,28
YNR036C	MRPS12	1,57	24,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNR037C	RSM19	1,46	1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNR040W	YNR040W	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,35	46,66
YNR041C	COQ2	1,28	9,66	1,15	1,26	1,18	18,57
YNR045W	PET494	1,34	44,64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YOL023W	IFM1	1,92	6,87	n.d.	n.d.	1,32	12,41
YOL027C	MDM38	1,46	10,30	1,47	1,10	1,29	21,23
YOL033W	MSE1	1,30	13,96	n.d.	n.d.	1,06	14,76
YOL042W	NGL1	1,14	4,45	n.d.	n.d.	0,91	8,63
YOL059W	GPD2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,25	11,16
YOL071W	EMI5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,45	13,95
YOL077W-A	ATP19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,05	12,65
YOL096C	COQ3	1,08	9,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YOL109W	ZEO1	1,07	62,74	n.d.	n.d.	0,91	53,36
YOL140W	ARG8	2,42	7,45	n.d.	n.d.	1,96	13,69
YOR017W	PET127	1,42	14,36	1,53	1,08	1,28	14,53
YOR020C	HSP10	1,41	10,15	1,50	1,05	1,17	18,27
YOR020W-A	YOR020W-A	n.d.	n.d.	1,19	1,03	n.d.	n.d.
YOR022C	YOR022C	1,24	9,43	n.d.	n.d.	1,03	14,80
YOR037W	CYC2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	20,99
YOR040W	GLO4	1,64	9,34	n.d.	n.d.	1,29	34,82
YOR065W	CYT1	1,09	18,29	1,02	1,08	0,84	13,23
YOR086C	TCB1	0,43	9,18	0,44	1,13	0,44	26,25
YOR089C	VPS21	0,83	14,11	n.d.	n.d.	0,61	23,59
YOR090C	PTC5	1,82	9,20	n.d.	n.d.	2,03	14,92
YOR093C	YOR093C	1,50	39,72	1,28	1,26	1,50	34,33
YOR100C	CRC1	2,05	6,28	1,99	1,08	1,43	17,45
YOR108W	LEU9	1,93	7,21	1,02	NN	1,58	20,05
YOR125C	CAT5	0,79	18,44	0,80	1,28	0,72	8,08
YOR130C	ORT1	1,69	7,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YOR136W	IDH2	1,60	13,74	1,63	1,14	1,23	30,94
YOR142W	LSC1	0,77	13,93	0,86	NN	0,63	26,88

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YOR150W	MRPL23	1,40	6,23	n.d.	n.d.	1,34	14,79
YOR153W	PDR5	0,80	11,11	0,67	1,35	0,78	26,48
YOR158W	PET123	1,58	9,34	n.d.	n.d.	1,33	17,76
YOR168W	GLN4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,31	7,31
YOR176W	HEM15	0,80	12,76	0,86	1,10	0,71	20,54
YOR187W	TUF1	1,86	11,15	1,85	1,10	1,40	57,91
YOR196C	LIP5	1,19	9,16	n.d.	n.d.	0,91	43,94
YOR205C	GEP3	1,63	7,35	n.d.	n.d.	1,56	12,47
YOR211C	MGM1	2,46	14,42	2,34	1,37	2,15	25,82
YOR215C	AIM41	1,46	4,62	1,49	1,05	1,33	17,23
YOR222W	ODC2	1,61	13,49	n.d.	n.d.	1,15	18,20
YOR227W	HER1	0,39	15,92	0,42	1,32	0,38	6,82
YOR232W	MGE1	1,71	11,66	1,68	NN	1,84	33,19
YOR241W	MET7	1,40	6,63	n.d.	n.d.	1,63	11,57
YOR254C	SEC63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,67	22,12
YOR266W	PNT1	1,47	17,36	n.d.	n.d.	1,21	18,68
YOR271C	FSF1	1,34	10,19	n.d.	n.d.	0,92	16,39
YOR286W	RDL2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,14	31,73
YOR301W	RAX1	1,11	23,97	1,22	1,12	1,13	21,88
YOR317W	FAA1	0,61	8,48	0,65	1,05	0,50	18,94
YOR330C	MIP1	1,77	15,02	n.d.	n.d.	1,65	36,54
YOR335C	ALA1	1,30	11,35	1,34	1,17	1,07	21,01
YOR336W	KRE5	0,35	4,43	0,37	1,17	0,36	25,01
YOR350C	MNE1	1,49	10,29	n.d.	n.d.	1,12	13,29
YOR354C	MSC6	1,62	14,24	1,70	NN	1,30	18,90
YOR356W	CIR2	0,80	13,86	0,84	NN	0,73	20,48
YOR374W	ALD4	0,87	9,98	0,84	1,09	0,80	17,76
YPL004C	LSP1	0,95	24,36	0,99	1,22	0,69	38,71
YPL005W	AEP3	1,30	16,42	n.d.	n.d.	1,21	16,93
YPL013C	MRPS16	1,50	5,59	1,50	1,23	1,42	13,52
YPL029W	SUV3	1,30	15,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YPL036W	PMA2	2,38	10,82	0,91	NN	2,12	17,57
YPL040C	ISM1	1,77	10,36	1,79	1,11	1,57	22,88
YPL059W	GRX5	1,37	9,61	1,45	1,15	1,06	8,65
YPL061W	ALD6	0,58	14,73	n.d.	n.d.	0,59	13,32
YPL063W	TIM50	0,81	20,08	0,88	1,11	0,81	31,45
YPL072W	UBP16	1,65	9,66	n.d.	n.d.	1,36	11,27
YPL078C	ATP4	1,08	9,09	1,09	1,08	0,90	17,96
YPL091W	GLR1	1,27	13,15	1,19	1,36	1,10	20,22
YPL097W	MSY1	1,52	8,69	n.d.	n.d.	1,13	7,56
YPL103C	FMP30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,45	12,12
YPL104W	MSD1	1,39	7,26	1,25	1,19	1,03	16,21
YPL109C	YPL109C	0,90	13,74	0,78	1,14	n.d.	n.d.
YPL118W	MRP51	1,51	9,97	1,55	1,13	1,28	16,27
YPL132W	COX11	1,66	30,43	n.d.	n.d.	1,25	27,77
YPL134C	ODC1	1,51	16,46	1,56	1,06	1,18	20,61
YPL168W	YPL168W	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,97	29,11
YPL173W	MRPL40	1,53	13,18	1,69	1,14	1,40	13,49

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YPL188W	POS5	1,48	20,22	n.d.	n.d.	1,19	17,39
YPL215W	CBP3	1,29	13,97	1,30	1,10	1,11	20,77
YPL222W	FMP40	1,47	13,57	1,51	1,08	1,17	20,80
YPL224C	MMT2	1,03	13,47	n.d.	n.d.	0,88	12,44
YPL231W	FAS2	0,99	14,89	1,01	1,21	0,94	21,21
YPL262W	FUM1	1,35	10,07	1,37	1,06	1,16	17,30
YPL270W	MDL2	1,24	10,77	1,25	1,12	0,95	35,65
YPL271W	ATP15	1,25	10,31	1,18	1,14	n.d.	n.d.
YPR001W	CIT3	1,34	21,76	2,01	1,32	1,18	47,81
YPR002W	PDH1	1,06	9,50	1,14	NN	0,95	16,16
YPR004C	AIM45	1,35	6,75	1,32	1,06	0,97	46,34
YPR006C	ICL2	1,12	11,89	1,18	1,08	1,14	27,24
YPR020W	ATP20	1,23	15,73	1,30	NN	1,04	19,79
YPR021C	AGC1	1,63	11,06	n.d.	n.d.	1,44	74,76
YPR024W	YME1	1,23	16,39	1,37	1,11	0,99	31,13
YPR033C	HTS1	1,66	9,76	n.d.	n.d.	1,41	17,37
YPR047W	MSF1	1,73	5,68	n.d.	n.d.	1,36	17,62
YPR058W	YMC1	1,53	11,25	1,51	1,16	1,17	14,24
YPR067W	ISA2	1,41	3,52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YPR098C	YPR098C	1,45	23,18	1,47	1,13	1,23	18,77
YPR125W	YLH47	1,20	7,74	n.d.	n.d.	1,08	14,43
YPR140W	TAZ1	1,58	16,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YPR149W	NCE102	1,13	4,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YPR155C	NCA2	1,27	7,01	1,27	1,15	1,07	15,34
YPR165W	RHO1	0,95	10,52	0,99	1,06	0,90	19,55
YPR166C	MRP2	1,38	8,14	n.d.	n.d.	1,16	13,68
YPR183W	DPM1	0,66	14,46	n.d.	n.d.	0,49	19,04
YPR191W	QCR2	1,33	26,04	1,18	1,09	1,13	52,84

## 10.5 Proteinliste der SILAC + Probe

Neben den Open reading frames (ORFs) entsprechend der SGD-Datenbank und den Proteinennamen ist jeweils die H/L-Rate des entsprechenden Auswerteprogrammes sowie die Schwankung der H/L-Rate (*Variability*) in Prozent beziehungsweise die geometrische Standardabweichung (SD<sub>geo</sub> = exponierte Standardabweichung der logarithmierten Ursprungswerte) angegeben. Hoch regulierte Proteine (H/L < 0,5) sind rosa markiert und runter regulierte (H/L > 2) hellblau. NN = Wert konnte nicht berechnet werden; n.d. = Protein wurde nicht detektiert.

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
Q0050	AI1	1,65	17,46	n.d.	n.d.	1,11	98,08
Q0055	AI2	2,22	12,81	n.d.	n.d.	1,49	26,05
Q0065	AI4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,01	33,89
Q0110	BI2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,25	12,72
Q0120	BI4	0,96	66,05	1,20	1,16	0,64	24,70
Q0140	VAR1	1,75	14,51	n.d.	n.d.	1,16	69,78
Q0250	COX2	1,49	30,78	1,83	1,32	0,94	49,30
YAL008W	FUN14	1,33	16,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YAL010C	MDM10	1,21	36,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YAL029C	MYO4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,25	34,36
YAL035W	FUN12	0,08	14,12	n.d.	n.d.	0,08	71,96
YAL039C	CYC3	1,15	25,81	1,05	NN	0,85	29,37
YAL044C	GCV3	3,25	39,00	3,36	1,25	2,99	10,33
YAL048C	GEM1	1,00	8,73	n.d.	n.d.	0,72	17,63
YAL054C	ACS1	0,13	33,90	0,11	NN	0,13	118,59
YAL062W	GDH3	0,32	9,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YAR002C-A	ERP1	0,36	12,56	0,37	1,04	0,28	52,28
YAR008W	SEN34	1,37	18,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YAR035W	YAT1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,07	12,69
YBL013W	FMT1	1,16	11,85	n.d.	n.d.	0,76	16,45
YBL015W	ACH1	3,90	19,63	3,64	1,17	3,05	33,51
YBL022C	PIM1	1,03	27,05	1,13	1,17	0,92	31,71
YBL030C	PET9	1,73	14,33	1,85	1,10	1,20	33,78
YBL038W	MRPL16	n.d.	n.d.	1,49	1,10	1,08	12,07
YBL045C	COR1	1,49	16,31	1,64	1,15	1,08	31,10
YBL057C	PTH2	1,39	33,49	n.d.	n.d.	1,08	49,62
YBL059W	YBL059W	1,80	24,43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBL064C	PRX1	1,56	36,19	1,22	1,12	1,09	53,01
YBL080C	PET112	1,63	7,03	1,58	1,24	1,15	20,28
YBL090W	MRP21	1,38	12,13	n.d.	n.d.	1,07	15,20
YBL095W	YBL095W	1,23	7,91	0,93	1,36	0,80	20,12
YBL098W	BNA4	0,98	12,48	0,98	1,03	0,75	34,18
YBL099W	ATP1	1,32	19,16	1,49	1,11	1,00	40,26
YBR003W	COQ1	1,30	13,18	1,11	1,13	0,96	27,25
YBR024W	SCO2	1,61	13,59	1,42	1,24	1,10	22,44
YBR026C	ETR1	1,67	5,33	1,74	1,22	1,13	24,46
YBR029C	CDS1	0,22	62,81	n.d.	n.d.	0,26	50,24
YBR037C	SCO1	1,20	24,29	n.d.	n.d.	0,71	22,28

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YBR039W	ATP3	1,32	14,49	1,30	1,14	0,95	26,99
YBR044C	TCM62	1,88	13,75	1,92	1,31	1,50	22,27
YBR054W	YRO2	3,58	26,55	n.d.	n.d.	0,28	124,10
YBR078W	ECM33	0,40	21,40	0,40	1,11	0,41	48,03
YBR084W	MIS1	2,41	12,88	2,84	1,16	1,66	25,85
YBR104W	YMC2	1,95	18,81	n.d.	n.d.	1,19	15,01
YBR106W	PHO88	0,47	21,95	n.d.	n.d.	0,40	29,17
YBR120C	CBP6	1,82	13,16	1,88	NN	1,38	20,51
YBR121C	GRS1	0,75	34,39	0,44	NN	0,73	55,19
YBR122C	MRPL36	1,46	18,32	1,32	1,08	1,20	30,47
YBR140C	IRA1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,94	166,44
YBR146W	MRP59	1,40	11,91	1,48	NN	0,91	18,20
YBR163W	EXO5	1,14	5,40	n.d.	n.d.	0,92	37,32
YBR176W	ECM31	2,48	14,91	2,34	1,14	1,54	78,09
YBR177C	EHT1	0,82	21,90	1,04	1,53	0,60	54,49
YBR179C	FZO1	2,43	18,89	2,46	1,66	2,19	46,30
YBR185C	MBA1	1,51	7,58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBR192W	RIM2	1,55	19,80	1,48	1,19	1,05	23,02
YBR196C	PGI1	0,15	17,48	0,16	1,30	0,14	20,74
YBR221C	PDB1	1,15	24,01	1,19	1,17	0,62	101,47
YBR227C	MCX1	0,67	15,93	0,71	1,17	0,58	23,62
YBR229C	ROT2	0,12	7,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YBR230C	OM14	2,46	10,32	2,40	1,05	1,58	22,91
YBR251W	MRPS5	1,45	12,00	1,64	1,18	0,94	24,29
YBR262C	AIM5	1,67	12,13	1,78	1,09	1,23	6,10
YBR263W	SHM1	1,15	16,82	1,22	1,11	0,84	26,28
YBR268W	MRPL37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,76	25,13
YBR282W	MRPL27	1,55	14,28	n.d.	n.d.	1,12	90,60
YBR291C	CTP1	4,48	18,12	4,94	1,14	2,84	114,88
YCL004W	PGS1	2,01	1,74	1,92	1,18	1,53	21,68
YCL009C	ILV6	1,27	22,89	1,21	1,16	0,91	21,02
YCL017C	NFS1	2,22	30,61	2,21	1,15	1,69	30,11
YCL044C	MGR1	1,43	3,73	1,36	NN	0,95	26,82
YCL057C-A	YCL057C-A	1,84	8,36	1,78	1,03	1,27	23,97
YCL057W	PRD1	1,26	8,77	n.d.	n.d.	0,92	36,33
YCL064C	CHA1	1,32	30,79	1,16	1,39	0,82	32,81
YCR004C	YCP4	0,35	50,02	0,35	1,21	0,31	44,35
YCR005C	CIT2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,08	33,48
YCR010C	ADY2/ATO1	n.d.	n.d.	2,53	1,07	n.d.	n.d.
YCR012W	PGK1	0,13	72,51	0,13	1,40	0,11	91,71
YCR024C	SLM5	1,42	20,47	1,66	1,29	1,17	27,41
YCR028C-A	RIM1	1,01	23,53	1,04	1,21	0,67	26,15
YCR046C	IMG1	1,38	22,21	1,31	1,19	n.d.	n.d.
YCR071C	IMG2	1,55	13,69	1,75	1,26	0,77	37,71
YCR079W	PTC6	1,30	9,08	1,54	1,06	0,93	15,46
YCR083W	TRX3	1,83	16,86	1,81	1,11	1,26	127,74
YCR088W	ABP1	0,05	NN	n.d.	n.d.	0,04	19,92
YDL004W	ATP16	n.d.	n.d.	1,19	1,23	n.d.	n.d.



ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YDL015C	TSC13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,51	36,65
YDL027C	YDL027C	1,96	10,39	1,84	1,09	1,32	38,12
YDL029W	ARP2	0,17	26,82	0,20	1,15	0,13	16,07
YDL040C	NAT1	0,36	28,15	n.d.	n.d.	0,31	28,61
YDL044C	MTF2	1,81	9,24	1,74	1,17	1,23	19,96
YDL066W	IDP1	1,09	15,00	1,10	1,15	0,79	39,61
YDL067C	COX9	1,55	3,21	n.d.	n.d.	0,90	17,48
YDL085W	NDE2	1,30	16,12	1,46	1,05	1,16	29,10
YDL104C	QRI7	1,96	17,20	1,91	1,65	1,22	10,91
YDL107W	MSS2	2,00	6,66	2,02	1,02	1,23	41,69
YDL119C	YDL119C	1,74	32,72	1,78	1,25	1,13	22,08
YDL157C	YDL157C	n.d.	n.d.	2,14	2,44	1,52	20,59
YDL164C	CDC9	1,87	6,99	n.d.	n.d.	1,59	54,23
YDL171C	GLT1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,21	32,18
YDL174C	DLD1	1,29	18,32	1,33	1,14	1,15	22,97
YDL178W	DLD2	1,77	25,82	1,55	1,14	n.d.	n.d.
YDL181W	INH1	1,18	4,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDL183C	MKR1	2,68	8,84	n.d.	n.d.	1,30	32,03
YDL198C	GGC1	1,66	15,15	1,62	1,11	1,05	31,54
YDL202W	MRPL11	1,49	25,82	1,50	1,19	1,06	44,59
YDL215C	GDH2	0,05	28,05	0,05	1,13	0,04	162,00
YDL217C	TIM22	1,59	12,96	1,59	1,16	1,28	64,56
YDL222C	FMP45	6,11	112,48	4,80	1,16	1,45	25,51
YDR011W	SNQ2	0,65	17,17	0,69	1,12	0,65	63,27
YDR019C	GCV1	7,86	23,17	7,84	1,16	5,38	51,19
YDR032C	PST2	0,46	6,46	0,50	1,26	0,38	30,01
YDR033W	MRH1	2,78	36,43	1,93	1,03	n.d.	n.d.
YDR036C	EHD3	1,44	10,95	1,38	1,22	0,98	20,21
YDR041W	RSM10	1,52	8,13	1,60	1,16	1,15	10,78
YDR050C	TPI1	0,13	10,49	0,13	NN	0,10	28,46
YDR058C	TGL2	1,60	16,17	1,98	1,23	1,12	39,11
YDR061W	YDR061W	1,73	27,93	1,56	1,11	1,38	30,40
YDR070C	FMP16	2,26	7,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR074W	TPS2	0,02	44,62	0,03	1,12	0,22	277,57
YDR079W	PET100	1,52	9,78	n.d.	n.d.	1,24	52,91
YDR116C	MRPL11	1,11	9,89	1,21	1,37	0,85	14,39
YDR125C	ECM18	0,90	20,77	n.d.	n.d.	0,65	97,14
YDR141C	DOP1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,20	43,06
YDR148C	KGD2	0,65	27,73	0,77	1,28	0,61	33,25
YDR150W	NUM1	0,55	136,92	n.d.	n.d.	0,48	168,10
YDR155C	CPR1	0,04	14,34	0,04	1,07	0,05	135,96
YDR175C	RSM24	1,45	14,85	1,44	1,12	1,05	18,82
YDR178W	SDH4	1,77	59,03	2,12	1,40	1,19	44,71
YDR194C	MSS116	0,50	23,28	0,57	1,12	0,33	55,89
YDR196C	CAB5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,29	28,38
YDR197W	CBS2	0,42	19,41	0,50	1,06	0,32	24,02
YDR204W	COQ4	0,71	25,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR226W	ADK1	0,02	7,24	0,03	1,11	n.d.	n.d.

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YDR231C	COX20	0,90	26,36	n.d.	n.d.	0,69	29,39
YDR232W	HEM1	0,82	13,77	0,97	1,12	0,58	36,42
YDR233C	RTN1	0,15	28,30	0,15	1,25	0,13	74,50
YDR234W	LYS4	0,86	20,69	0,97	1,16	0,55	30,77
YDR236C	FMN1	0,25	32,12	n.d.	n.d.	0,19	18,40
YDR237W	MRPL7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,56	15,29
YDR256C	CTA1	0,05	25,30	0,06	1,40	0,04	57,04
YDR258C	HSP78	0,88	18,62	0,90	1,09	0,86	37,11
YDR268W	MSW1	2,13	11,52	2,11	NN	1,43	23,34
YDR296W	MHR1	1,31	18,50	1,45	1,33	0,93	12,51
YDR298C	ATP5	1,20	18,35	1,31	1,14	0,93	25,55
YDR305C	HNT2	1,75	6,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR316W	OMS1	1,96	19,34	2,26	1,15	1,64	33,84
YDR322C-A	TIM11	1,47	22,53	1,50	1,27	1,03	26,68
YDR322W	MRPL35	1,31	25,84	1,21	1,14	0,93	18,26
YDR332W	IRC3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,83	21,86
YDR337W	MRPS28	1,67	9,39	1,67	NN	1,07	50,88
YDR341C	YDR341C	0,04	30,07	0,04	1,36	0,04	122,02
YDR342C	HXT7	12,73	NN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR347W	MRP1	1,59	14,25	1,62	1,20	0,99	24,88
YDR375C	BCS1	1,74	16,95	1,78	1,18	1,39	71,41
YDR376W	ARH1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,27	24,33
YDR377W	ATP17	0,86	38,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR381C-A	YDR381C-A	1,67	12,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR384C	ATO3	0,78	59,59	3,22	1,05	0,11	38,25
YDR393W	SHE9	2,58	2,36	n.d.	n.d.	1,90	8,27
YDR405W	MRP20	1,62	11,33	1,62	1,20	1,05	13,91
YDR430C	CYM1	1,18	24,02	1,34	1,27	0,86	34,53
YDR450W	RPS18A	0,24	42,48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YDR462W	MRPL28	1,39	14,37	1,44	1,11	0,95	16,20
YDR470C	UGO1	2,19	51,14	1,42	1,04	1,43	35,72
YDR493W	MZM1	1,61	10,92	n.d.	n.d.	0,77	29,01
YDR494W	RSM28	1,30	15,05	1,39	1,13	0,97	36,40
YDR511W	ACN9	2,47	19,24	n.d.	n.d.	1,47	14,87
YDR513W	GRX2	0,85	20,56	1,42	1,64	0,68	43,23
YDR529C	QCR7	1,15	18,26	n.d.	n.d.	0,90	28,14
YEL006W	YEA6	1,80	18,79	1,19	1,41	1,11	21,72
YEL020W-A	TIM9	2,73	6,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YEL024W	RIP1	1,13	11,48	1,12	1,16	0,81	19,81
YEL030W	ECM10	1,67	32,66	2,08	1,17	0,88	13,96
YEL031W	SPF1	0,49	22,28	0,45	1,26	0,53	31,05
YEL034W	HYP2	0,12	41,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YEL039C	CYC7	3,15	14,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YEL047C	FRD1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,43	55,09
YEL050C	RML2	1,29	11,83	1,34	1,12	0,87	18,35
YEL052W	AFG1	1,50	16,13	1,66	1,15	1,22	22,24
YER004W	FMP52	1,60	14,64	n.d.	n.d.	1,15	19,03
YER014W	HEM14	1,18	20,92	1,07	1,30	0,96	28,83

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YER015W	FAA2	0,05	25,69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YER017C	AFG3	1,81	9,25	1,83	1,06	1,13	48,27
YER019W	ISC1	2,48	11,92	2,42	NN	1,59	160,70
YER020W	GPA2	0,23	28,53	n.d.	n.d.	0,25	70,62
YER031C	YPT31	n.d.	n.d.	0,90	1,14	0,58	13,42
YER048W-A	ISD11	2,38	6,88	n.d.	n.d.	1,67	5,54
YER050C	RSM18	1,36	24,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YER053C	PIC2	3,18	20,35	2,71	1,13	2,00	28,14
YER058W	PET117	1,81	11,60	n.d.	n.d.	1,26	14,07
YER061C	CEM1	2,32	14,82	n.d.	n.d.	1,56	15,94
YER069W	ARG5,6	1,79	19,67	1,81	1,19	1,15	48,31
YER073W	ALD5	1,28	9,77	1,29	NN	0,95	13,61
YER074W	RPS24A	0,15	72,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YER077C	YER077C	2,51	11,40	2,50	1,18	1,55	11,36
YER078C	ICP55	1,56	20,10	1,20	1,36	1,17	13,90
YER080W	AIM9	0,74	18,25	0,75	1,14	0,53	52,14
YER086W	ILV1	1,41	20,91	1,48	1,18	1,23	23,43
YER087W	AIM10	2,64	8,54	2,85	1,26	1,85	28,95
YER125W	RSP5	0,16	75,43	n.d.	n.d.	0,43	84,41
YER141W	COX15	1,57	16,58	1,37	1,12	1,18	31,23
YER153C	PET122	1,96	16,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YER154W	OXA1	1,59	15,28	1,55	1,19	1,11	25,23
YER155C	BEM2	0,17	NN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YER166W	DNF1	0,25	44,68	n.d.	n.d.	0,49	64,16
YER168C	CCA1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,85	28,65
YER178W	PDA1	1,40	27,21	1,41	1,13	1,03	17,60
YER182W	FMP10	1,55	19,95	1,71	1,13	1,06	85,19
YER183C	FAU1	1,57	5,56	1,55	1,29	n.d.	n.d.
YFL005W	SEC4	1,51	25,55	1,51	1,02	1,07	43,76
YFL016C	MDJ1	1,64	24,58	1,44	1,20	1,15	88,65
YFL018C	LPD1	1,41	15,29	1,50	1,11	1,04	36,13
YFL030W	AGX1	1,08	16,39	1,10	1,22	0,80	40,31
YFL036W	RPO41	2,42	31,29	2,20	1,29	1,68	45,11
YFL038C	YPT1	0,59	21,31	0,64	1,39	0,48	39,38
YFL046W	FMP32	1,95	5,61	1,86	1,08	1,44	8,30
YFR004W	RPN11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	126,58
YFR011C	AIM13	1,79	7,79	1,86	1,13	1,46	22,58
YFR024C-A	LSB3	0,14	74,79	0,16	1,11	0,11	69,65
YFR044C	DUG1	0,33	14,20	0,33	NN	0,32	79,54
YFR045W	YFR045W	1,32	6,51	1,47	1,09	0,91	55,35
YFR049W	YMR31	1,49	19,58	1,31	1,07	1,06	9,97
YFR053C	HXK1	0,05	31,94	n.d.	n.d.	0,04	88,99
YGL002W	ERP6	0,24	5,70	n.d.	n.d.	0,19	2,91
YGL008C	PMA1	2,40	9,49	2,05	1,23	1,99	42,67
YGL018C	JAC1	n.d.	n.d.	2,18	1,22	1,50	22,24
YGL020C	GET1	0,36	10,84	0,37	1,08	0,26	18,37
YGL057C	GEP7	1,33	9,95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YGL059W	PKP2	2,07	26,16	2,44	1,21	1,46	26,08

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YGL064C	MRH4	1,37	17,37	1,28	1,17	1,07	20,58
YGL068W	MNP1	1,88	7,71	2,03	1,48	1,42	14,28
YGL080W	FMP37	2,01	18,70	1,91	1,11	1,53	60,57
YGL107C	RMD9	1,47	17,30	1,58	1,16	n.d.	n.d.
YGL119W	COQ8	1,58	34,31	n.d.	n.d.	1,25	10,62
YGL129C	RSM23	1,55	22,46	1,57	1,15	1,04	16,78
YGL136C	MRM2	1,07	41,73	n.d.	n.d.	0,87	19,04
YGL143C	MRF1	1,74	9,52	1,48	1,18	1,25	18,88
YGL187C	COX4	0,93	19,48	1,05	1,19	0,75	23,85
YGL191W	COX13	1,66	6,52	n.d.	n.d.	1,18	17,19
YGL210W	YPT32	0,87	8,36	n.d.	n.d.	0,56	31,32
YGL221C	NIF3	2,64	8,61	n.d.	n.d.	1,56	31,27
YGL226W	MTC3	1,97	4,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YGL245W	GUS1	0,08	37,47	0,08	1,27	n.d.	n.d.
YGL253W	HXK2	0,08	60,89	0,16	1,58	0,06	71,65
YGR012W	YGR012W	1,71	21,84	2,40	1,06	1,15	25,23
YGR021W	HAH1	1,95	10,79	n.d.	n.d.	1,25	9,46
YGR028W	MSP1	3,06	24,54	3,46	1,12	n.d.	n.d.
YGR029W	ERV1	1,35	1,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YGR031W	IMO32	1,48	38,52	1,85	1,23	1,19	40,33
YGR033C	TIM21	1,16	8,11	n.d.	n.d.	0,91	18,53
YGR046W	TAM41	1,86	8,76	1,92	1,26	1,20	27,92
YGR049W	SCM4	1,63	12,66	1,23	1,10	1,27	32,79
YGR076C	MRPL25	1,42	25,62	1,64	1,38	1,17	32,57
YGR082W	TOM20	1,71	61,33	1,19	1,27	1,28	58,38
YGR084C	MRP13	1,76	7,69	1,77	1,34	1,22	21,07
YGR086C	PIL1	2,01	44,01	2,36	1,35	1,44	68,43
YGR094W	VAS1	0,47	30,28	0,39	1,16	0,39	54,23
YGR096W	TPC1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,20	16,79
YGR102C	YGR102C	1,43	14,82	1,41	1,10	1,06	12,91
YGR110W	CLD1	1,35	9,84	1,44	1,21	0,85	28,57
YGR112W	SHY1	1,83	19,93	1,70	1,17	1,30	64,86
YGR116W	SPT6	0,06	NN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YGR132C	PHB1	1,44	9,70	1,47	1,07	0,92	30,94
YGR135W	PRE9	0,38	1,52	n.d.	n.d.	0,31	25,86
YGR147C	NAT2	2,39	7,09	n.d.	n.d.	1,56	17,32
YGR150C	CCM1	1,30	10,66	1,34	NN	1,45	23,46
YGR155W	CYS4	0,09	35,04	n.d.	n.d.	0,08	101,83
YGR159C	NSR1	0,22	37,63	n.d.	n.d.	0,12	51,25
YGR162W	TIF4631	0,06	72,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YGR165W	MRPS35	1,38	36,48	1,41	1,23	0,94	35,49
YGR171C	MSM1	1,78	14,03	1,68	1,15	1,03	22,99
YGR174C	CBP4	1,93	11,02	1,83	1,27	1,44	26,16
YGR178C	PBP1	1,81	30,43	n.d.	n.d.	1,14	11,75
YGR181W	TIM13	1,97	27,15	n.d.	n.d.	1,58	106,25
YGR192C	TDH3	0,59	25,35	0,71	1,22	n.d.	n.d.
YGR193C	PDX1	0,99	16,74	1,10	1,07	0,80	23,34
YGR207C	CIR1	1,70	14,97	1,83	1,22	1,15	30,02

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YGR215W	RSM27	1,36	11,09	1,31	1,08	1,04	19,38
YGR220C	MRPL9	1,61	3,35	1,65	1,02	1,09	15,85
YGR222W	PET54	1,75	24,11	2,06	NN	1,38	30,73
YGR231C	PHB2	1,51	20,89	n.d.	n.d.	1,18	34,01
YGR234W	YHB1	0,72	53,14	1,21	1,18	0,61	38,21
YGR235C	YGR235C	1,64	20,43	1,67	1,16	1,11	30,45
YGR236C	SPG1	2,54	12,65	2,57	1,09	n.d.	n.d.
YGR243W	FMP43	1,99	54,92	1,79	1,42	1,35	29,06
YGR244C	LSC2	0,82	25,34	0,53	1,29	0,60	36,90
YGR254W	ENO1	0,34	35,71	0,29	1,53	0,22	47,79
YGR255C	COQ6	1,02	21,83	1,11	1,40	1,00	32,34
YGR257C	MTM1	1,39	27,37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YGR266W	YGR266W	2,09	12,54	2,06	1,28	1,71	29,91
YGR285C	ZUO1	0,08	38,86	0,14	1,25	0,07	57,31
YGR286C	BIO2	1,42	30,86	n.d.	n.d.	0,90	38,28
YHL004W	MRP4	1,59	14,63	1,65	1,24	1,07	81,73
YHL014C	YLF2	0,89	10,80	0,91	1,18	0,60	14,44
YHL018W	YHL018W	1,70	6,56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YHL021C	AIM17	0,85	25,80	0,94	1,14	0,67	30,45
YHL032C	GUT1	1,71	16,31	1,77	1,06	1,29	27,78
YHL038C	CBP2	1,58	20,96	1,46	1,13	0,99	24,41
YHR001W-A	QCR10	1,38	6,76	0,99	1,57	1,03	38,51
YHR002W	LEU5	1,85	10,03	2,06	1,05	1,23	8,65
YHR003C	YHR003C	2,36	7,78	2,33	1,20	1,65	18,66
YHR005C-A	TIM10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,99	18,37
YHR008C	SOD2	1,69	9,05	1,61	1,15	1,16	35,98
YHR011W	DIA4	2,31	14,06	2,49	1,41	1,49	18,41
YHR017W	YSC83	1,96	13,65	2,05	1,23	1,25	46,25
YHR020W	YHR020W	0,07	NN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YHR024C	MAS2	1,14	11,29	1,15	1,14	0,81	17,06
YHR037W	PUT2	1,37	33,33	1,11	1,14	1,10	37,75
YHR038W	RRF1	2,06	4,71	2,15	NN	1,42	36,15
YHR042W	NCP1	0,73	8,74	0,84	1,11	0,46	22,37
YHR051W	COX6	1,12	15,88	n.d.	n.d.	0,83	35,66
YHR067W	HTD2	1,48	15,51	1,46	NN	0,98	24,17
YHR076W	PTC7	1,66	21,51	1,71	NN	1,09	57,67
YHR083W	SAM35	1,71	10,34	1,79	1,17	1,03	26,64
YHR091C	MSR1	1,30	15,77	1,35	1,25	1,06	196,25
YHR100C	GEP4	2,01	15,23	2,15	1,07	1,35	47,30
YHR106W	TRR2	1,04	2,71	1,05	1,35	n.d.	n.d.
YHR117W	TOM71	1,50	10,79	1,55	1,13	0,95	12,91
YHR120W	MSH1	1,53	13,41	1,47	1,07	1,15	15,66
YHR135C	YCK1	1,54	49,25	2,04	2,10	1,58	42,80
YHR147C	MRPL6	1,48	12,38	1,43	1,21	1,05	14,87
YHR168W	MTG2	0,79	18,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YHR174W	ENO2	0,19	9,13	0,16	1,21	0,14	66,73
YHR183W	GND1	0,36	42,13	0,46	1,44	0,25	35,83

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YHR189W	PTH1	2,06	26,92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YHR190W	ERG9	0,36	22,53	0,42	1,09	0,27	19,25
YHR198C	AIM18	2,10	9,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YHR199C	AIM46	3,34	11,81	2,15	1,70	2,20	46,74
YHR208W	BAT1	1,55	17,66	1,44	1,16	0,96	16,42
YIL006W	YIA6	1,68	8,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YIL016W	SNL1	0,55	9,19	0,50	1,22	n.d.	n.d.
YIL022W	TIM44	1,77	20,23	1,89	1,17	1,40	21,59
YIL042C	PKP1	1,34	16,24	1,51	1,19	n.d.	n.d.
YIL043C	CBR1	0,46	17,08	0,54	1,21	0,36	20,53
YIL051C	MMF1	5,71	40,99	5,54	1,02	3,63	33,45
YIL065C	FIS1	1,93	24,15	n.d.	n.d.	1,46	90,16
YIL070C	MAM33	1,67	9,85	1,55	1,10	1,19	19,48
YIL077C	YIL077C	1,20	33,15	1,44	1,14	0,78	29,01
YIL078W	THS1	0,06	25,22	0,05	1,81	0,07	99,34
YIL087C	AIM19	1,23	9,36	1,36	1,16	n.d.	n.d.
YIL093C	RSM25	1,73	14,71	1,73	1,12	1,02	55,57
YIL094C	LYS12	1,60	14,64	1,70	1,10	0,99	23,03
YIL098C	FMC1	1,29	2,36	1,44	1,04	1,05	15,41
YIL105C	SLM1	3,59	29,72	2,75	1,22	n.d.	n.d.
YIL111W	COX5B	1,08	21,71	n.d.	n.d.	0,76	23,05
YIL124W	AYR1	0,62	22,22	0,67	1,18	0,44	19,86
YIL125W	KGD1	1,33	22,28	1,36	1,17	1,13	31,54
YIL129C	TAO3	1,30	13,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YIL134W	FLX1	1,98	3,47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YIL136W	OM45	1,85	22,05	1,71	1,06	n.d.	n.d.
YIL155C	GUT2	1,15	28,46	1,36	1,10	0,83	28,98
YIL157C	COA1	1,49	19,54	1,48	1,07	1,10	22,89
YIR021W	MRS1	2,04	20,70	2,20	1,19	1,69	15,30
YIR024C	YIR024C	1,77	3,80	1,89	1,07	1,29	18,07
YIR038C	GTT1	0,93	13,83	0,89	1,15	0,69	41,33
YJL003W	COX16	2,37	6,99	2,35	1,21	1,74	15,73
YJL045W	YJL045W	13,70	20,21	13,28	1,29	6,50	38,99
YJL046W	AIM22	1,39	15,88	1,39	1,19	1,09	31,88
YJL052W	TDH1	2,32	8,78	2,68	1,08	1,27	25,38
YJL054W	TIM54	1,44	24,80	1,35	1,24	1,21	25,62
YJL060W	BNA3	1,47	14,40	1,49	1,57	0,77	23,66
YJL063C	MRPL8	1,39	18,16	1,43	1,11	1,10	53,68
YJL066C	MPM1	1,02	13,64	1,20	1,14	0,69	24,79
YJL071W	ARG2	1,46	13,19	n.d.	n.d.	1,16	15,43
YJL082W	IML2	0,50	9,29	n.d.	n.d.	0,45	19,27
YJL096W	MRPL49	1,66	6,30	1,76	1,26	1,68	70,37
YJL102W	MEF2	1,48	15,65	1,49	1,15	1,52	18,79
YJL104W	PAM16	1,70	7,94	n.d.	n.d.	1,43	26,91
YJL109C	UTP10	0,05	NN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YJL112W	MDV1	2,03	178,63	n.d.	n.d.	1,25	59,69
YJL130C	URA2	0,12	279,75	0,11	1,42	0,21	118,58
YJL131C	AIM23	1,64	17,81	1,61	1,10	1,20	72,92

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YJL133C-A	YJL133C-A	1,64	31,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YJL147C	YJL147C	3,30	21,22	3,49	1,31	1,99	25,86
YJL161W	FMP33	2,25	16,37	2,35	1,10	n.d.	n.d.
YJL166W	QCR8	n.d.	n.d.	1,24	1,12	n.d.	n.d.
YJL171C	YJL171C	3,39	17,04	n.d.	n.d.	2,53	32,61
YJL178C	ATG27	0,17	3,38	n.d.	n.d.	0,18	119,74
YJL180C	ATP12	1,08	16,90	1,11	1,10	0,69	21,51
YJL200C	ACO2	1,35	16,34	1,33	1,15	1,54	48,84
YJL208C	NUC1	1,34	23,48	1,23	1,16	0,91	22,62
YJL209W	CBP1	1,72	4,00	1,64	1,36	1,12	13,34
YJR003C	YJR003C	1,13	11,40	0,90	1,20	0,83	33,91
YJR009C	TDH2	n.d.	n.d.	0,37	1,04	n.d.	n.d.
YJR016C	ILV3	0,85	20,14	0,87	1,07	0,70	29,80
YJR019C	TES1	0,83	14,89	0,90	1,12	0,60	95,04
YJR045C	SSC1	1,74	27,94	2,01	1,40	1,19	42,35
YJR048W	CYC1	2,36	9,03	2,62	1,08	1,66	26,90
YJR051W	OSM1	1,92	27,75	1,73	1,81	1,44	70,74
YJR062C	NTA1	0,83	17,94	0,82	1,27	0,68	7,80
YJR073C	OPI3	0,30	17,07	0,26	1,30	0,20	47,60
YJR077C	MIR1	1,29	15,28	1,16	1,11	0,90	27,96
YJR080C	AIM24	1,39	11,92	1,39	1,15	1,04	13,14
YJR095W	SFC1	2,20	17,54	2,23	1,18	1,53	29,11
YJR100C	AIM25	1,96	23,20	1,95	1,11	1,27	23,37
YJR104C	SOD1	2,97	25,23	2,83	1,15	n.d.	n.d.
YJR111C	YJR111C	2,07	14,82	1,95	1,25	1,19	47,23
YJR113C	RSM7	1,56	19,59	1,65	1,22	1,01	22,62
YJR117W	STE24	0,60	12,79	0,57	1,28	0,43	35,49
YJR121W	ATP2	1,15	27,16	1,36	1,25	0,90	40,59
YJR122W	IBA57	1,70	11,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YJR144W	MGM101	0,93	21,49	0,89	1,13	0,68	20,02
YKL003C	MRP17	1,64	1,23	n.d.	n.d.	1,17	10,32
YKL006W	RPL14A	0,06	13,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YKL011C	CCE1	0,94	5,54	1,01	1,20	0,68	35,13
YKL016C	ATP7	1,34	14,18	1,35	1,13	1,00	13,65
YKL027W	YKL027W	2,02	10,56	1,78	1,20	1,64	37,23
YKL029C	MAE1	1,57	14,84	1,49	1,14	1,01	47,46
YKL040C	NFU1	1,06	12,83	1,08	1,09	0,76	16,75
YKL055C	OAR1	2,77	17,01	2,67	1,26	1,83	13,40
YKL056C	TMA19	0,27	51,46	0,25	1,41	0,25	56,20
YKL060C	FBA1	0,09	97,36	0,08	1,24	0,06	79,68
YKL067W	YNK1	0,70	13,46	0,82	1,38	0,49	46,21
YKL081W	TEF4	0,09	54,26	0,08	1,19	0,09	78,36
YKL085W	MDH1	2,19	24,46	1,90	1,27	1,38	32,37
YKL087C	CYT2	2,55	12,53	3,05	NN	1,69	20,11
YKL094W	YJU3	2,44	20,64	2,60	1,15	1,58	26,66
YKL106W	AAT1	0,49	12,98	0,53	NN	0,34	30,72
YKL114C	APN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,96	13,27
YKL120W	OAC1	1,47	13,07	1,31	1,14	0,92	14,87

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YKL134C	OCT1	1,64	23,78	1,92	1,23	n.d.	n.d.
YKL138C	MRPL31	n.d.	n.d.	1,56	1,05	1,22	22,43
YKL141W	SDH3	2,18	8,33	2,06	1,01	1,58	54,98
YKL148C	SDH1	1,58	28,69	1,97	1,06	1,18	29,79
YKL150W	MCR1	0,38	65,13	0,68	1,26	0,33	43,40
YKL152C	GPM1	0,23	29,85	0,26	1,53	0,18	47,54
YKL155C	RSM22	1,32	21,56	1,51	1,19	0,86	59,93
YKL157W	APE2	1,36	22,74	1,57	1,17	1,21	61,12
YKL162C	YKL162C	1,48	8,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YKL167C	MRP49	1,22	11,17	n.d.	n.d.	0,90	41,62
YKL170W	MRPL38	1,43	15,34	1,32	1,20	1,42	32,31
YKL182W	FAS1	0,42	10,94	0,47	1,11	0,65	52,46
YKL192C	ACP1	2,03	4,30	2,09	1,03	1,47	12,14
YKL194C	MST1	1,58	18,08	n.d.	n.d.	1,12	21,91
YKL195W	MIA40	1,84	22,07	1,76	1,25	1,71	24,74
YKL196C	YKT6	0,20	8,58	0,21	1,17	0,16	21,48
YKL203C	TOR2	0,61	41,25	0,51	1,32	0,77	10,46
YKL208W	CBT1	n.d.	n.d.	2,41	1,18	1,47	11,16
YKL212W	SAC1	0,47	16,98	0,54	1,10	0,33	22,07
YKL217W	JEN1	0,09	50,65	0,09	1,48	0,10	65,17
YKR001C	VPS1	0,65	67,86	0,48	1,34	0,51	60,81
YKR006C	MRPL13	1,88	17,01	2,03	1,12	1,40	31,75
YKR016W	FCJ1	1,79	17,19	1,88	1,19	1,32	25,83
YKR018C	YKR018C	0,08	36,61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YKR042W	UTH1	4,43	27,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YKR049C	FMP46	1,10	13,40	n.d.	n.d.	0,82	9,63
YKR052C	MRS4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,57	6,49
YKR066C	CCP1	1,29	13,85	1,28	1,15	0,88	37,81
YKR070W	YKR070W	1,20	17,17	1,14	1,21	0,69	62,40
YKR079C	TRZ1	1,31	0,48	1,42	1,06	1,01	6,51
YKR085C	MRPL20	1,47	24,24	1,49	1,14	1,26	24,01
YKR087C	OMA1	1,77	10,96	1,53	1,16	1,03	33,12
YKR094C	RPL40B	n.d.	n.d.	0,40	1,03	n.d.	n.d.
YLL001W	DNM1	0,04	30,25	0,05	1,61	0,58	122,69
YLL013C	PUF3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,12	21,93
YLL024C	SSA2	0,05	50,92	0,09	3,22	0,05	105,02
YLL027W	ISA1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,29	18,44
YLL040C	VPS13	0,40	24,27	0,38	1,43	0,55	99,29
YLL041C	SDH2	1,95	22,81	2,09	1,11	1,18	33,32
YLR008C	PAM18	2,34	16,27	2,03	1,03	1,62	30,89
YLR038C	COX12	n.d.	n.d.	1,97	1,31	1,07	25,46
YLR059C	REX2	1,87	6,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YLR067C	PET309	1,78	17,68	1,75	1,08	1,30	29,72
YLR069C	MEF1	1,06	25,25	1,32	1,15	0,94	31,41
YLR077W	FMP25	1,37	16,64	n.d.	n.d.	1,17	16,55
YLR084C	RAX2	1,83	24,69	1,81	1,23	n.d.	n.d.
YLR089C	ALT1	1,26	16,59	1,28	1,18	1,03	48,58
YLR091W	GEP5	0,99	4,47	n.d.	n.d.	0,65	14,45



ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YLR100W	ERG27	0,19	31,98	0,18	1,16	0,14	68,52
YLR106C	MDN1	1,02	5,54	n.d.	n.d.	0,77	42,75
YLR132C	USB1	n.d.	n.d.	1,26	1,75	1,00	21,10
YLR139C	SLS1	1,44	17,75	1,50	1,11	0,90	26,95
YLR142W	PUT1	1,59	10,33	1,67	1,10	1,11	29,90
YLR163C	MAS1	0,87	19,46	1,02	1,18	0,67	59,95
YLR164W	YLR164W	14,55	27,66	n.d.	n.d.	9,91	26,62
YLR188W	MDL1	1,61	15,29	1,67	1,09	1,22	40,37
YLR201C	COQ9	0,94	6,45	0,99	1,17	0,70	11,85
YLR203C	MSS51	1,30	22,41	1,15	1,45	0,94	25,64
YLR239C	LIP2	1,57	6,53	n.d.	n.d.	1,00	11,15
YLR253W	YLR253W	2,11	8,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YLR259C	HSP60	2,23	16,59	2,10	1,19	1,57	27,67
YLR270W	DCS1	0,06	12,66	n.d.	n.d.	0,05	163,93
YLR283W	YLR283W	1,27	65,46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YLR289W	GUF1	1,96	16,40	n.d.	n.d.	1,03	15,20
YLR290C	YLR290C	1,93	19,34	1,93	1,06	1,21	35,10
YLR291C	GCD7	0,19	8,94	n.d.	n.d.	0,16	10,00
YLR304C	ACO1	0,52	44,12	0,81	1,11	0,39	48,23
YLR305C	STT4	2,83	128,05	5,01	1,11	3,43	59,85
YLR312W-A	MRPL15	1,50	16,09	1,56	1,12	1,25	32,39
YLR342W	FKS1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,56	19,18
YLR348C	DIC1	0,73	8,30	n.d.	n.d.	0,46	16,21
YLR351C	NIT3	0,65	16,16	0,64	1,14	0,39	24,94
YLR355C	ILV5	1,27	21,81	1,39	1,18	0,81	29,31
YLR369W	SSQ1	1,50	10,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YLR370C	ARC18	0,12	6,34	n.d.	n.d.	0,12	48,99
YLR382C	NAM2	1,34	16,91	1,38	1,10	1,07	21,15
YLR393W	ATP10	1,77	14,59	1,71	1,15	1,13	30,32
YLR439W	MRPL4	1,64	16,62	1,69	1,30	0,98	26,80
YLR454W	FMP27	0,19	14,75	0,18	1,17	0,60	117,52
YML001W	YPT7	0,53	14,70	0,59	1,26	0,37	25,27
YML008C	ERG6	0,23	25,49	0,29	1,62	0,18	58,86
YML009C	MRPL39	1,37	2,51	1,48	1,16	n.d.	n.d.
YML010W	SPT5	n.d.	n.d.	0,33	5,79	n.d.	n.d.
YML013W	UBX2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,64	86,37
YML025C	YML6	1,57	18,94	1,61	1,21	1,04	25,61
YML026C	RPS18B	n.d.	n.d.	0,25	1,08	n.d.	n.d.
YML030W	AIM31	1,93	11,38	2,13	1,09	1,47	27,40
YML042W	CAT2	1,56	14,28	1,64	1,08	1,08	39,63
YML048W	GSF2	0,32	42,24	0,39	1,47	0,23	31,14
YML052W	SUR7	4,25	40,29	0,72	1,22	n.d.	n.d.
YML054C	CYB2	0,55	71,79	0,65	1,24	n.d.	n.d.
YML072C	TCB3	0,30	40,51	0,31	1,13	0,29	25,59
YML078W	CPR3	0,63	21,31	0,70	1,12	0,59	43,10
YML081C-A	ATP18	0,98	0,69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YML086C	ALO1	1,34	19,49	1,37	1,20	1,04	32,41
YML091C	RPM2	2,12	12,05	2,10	1,14	1,27	60,38

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YML092C	PRE8	0,24	7,94	0,24	1,56	0,18	284,99
YML110C	COQ5	0,99	5,04	n.d.	n.d.	0,61	12,50
YML120C	NDI1	1,27	10,23	1,40	1,14	0,99	29,48
YML128C	MSC1	0,49	13,27	0,46	1,14	0,41	16,13
YML129C	COX14	1,95	3,51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YMR024W	MRPL3	1,63	15,73	1,62	1,14	1,10	20,16
YMR031C	EIS1	1,20	57,02	1,17	1,22	0,87	79,23
YMR056C	AAC1	1,56	15,16	1,84	1,21	1,04	25,07
YMR060C	SAM37	1,56	17,77	1,76	1,18	1,03	26,20
YMR062C	ARG7	1,31	11,56	1,37	1,12	0,96	17,71
YMR064W	AEP1	1,33	24,02	1,41	1,10	1,35	20,98
YMR066W	SOV1	1,43	5,31	1,19	1,24	1,15	19,83
YMR072W	ABF2	1,47	20,22	1,53	1,22	1,09	30,12
YMR083W	ADH3	2,23	17,36	2,17	1,23	1,51	29,79
YMR089C	YTA12	1,69	10,40	1,72	1,09	1,58	31,46
YMR097C	MTG1	0,83	7,25	0,63	1,27	0,55	15,64
YMR098C	ATP25	1,55	10,60	1,60	1,22	1,03	46,53
YMR108W	ILV2	1,49	15,88	1,57	1,20	1,01	32,47
YMR110C	HFD1	1,08	18,84	1,18	1,18	0,86	23,16
YMR115W	MGR3	1,79	9,80	1,87	NN	1,28	15,47
YMR129W	POM152	0,43	26,01	0,36	1,80	0,43	29,67
YMR145C	NDE1	0,78	22,42	1,64	1,35	0,70	41,18
YMR150C	IMP1	2,24	16,86	2,23	1,13	1,66	15,81
YMR152W	YIM1	1,78	13,64	n.d.	n.d.	1,25	18,61
YMR157C	AIM36	1,79	13,53	1,88	1,17	1,34	15,79
YMR158W	MRPS8	1,36	17,10	1,42	1,26	1,21	11,56
YMR186W	HSC82	0,03	38,29	0,02	1,38	0,03	52,82
YMR188C	MRPS17	1,51	22,74	1,51	1,30	1,06	26,29
YMR189W	GCV2	3,85	10,88	3,61	1,13	2,46	12,92
YMR193W	MRPL24	1,40	21,28	1,33	1,10	0,96	24,30
YMR203W	TOM40	1,52	18,98	1,43	1,11	1,09	30,47
YMR205C	PFK2	0,15	20,67	0,16	1,06	0,11	68,37
YMR207C	HFA1	2,30	13,64	2,23	NN	1,98	43,70
YMR212C	EFR3	3,55	24,65	3,39	1,30	1,93	41,96
YMR225C	MRPL44	1,16	26,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YMR228W	MTF1	2,24	11,80	2,62	1,18	1,69	22,56
YMR241W	YHM2	1,20	21,02	1,47	1,32	0,97	28,27
YMR257C	PET111	1,43	20,34	1,55	1,37	0,93	30,00
YMR267W	PPA2	0,58	17,88	0,53	1,33	1,18	77,68
YMR282C	AEP2	1,75	9,65	1,73	1,27	1,26	16,38
YMR286W	MRPL33	1,32	4,84	1,42	1,03	0,97	35,41
YMR287C	DSS1	1,75	7,44	1,67	1,11	1,08	28,02
YMR293C	HER2	1,30	18,01	1,83	1,43	1,14	18,27
YMR301C	ATM1	1,46	17,40	n.d.	n.d.	1,17	29,94
YMR302C	YME2	1,31	30,54	1,31	1,12	1,27	33,28
YMR307W	GAS1	0,52	17,92	0,51	1,14	0,52	35,41
YMR314W	PRE5	0,47	8,38	n.d.	n.d.	0,09	89,52
YNL003C	PET8	0,97	32,09	1,03	1,13	0,67	13,33

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YNL005C	MRP7	1,42	8,08	1,45	1,10	0,96	21,81
YNL009W	IDP3	0,75	19,47	0,84	NN	0,59	31,43
YNL026W	SAM50	1,51	18,22	1,55	1,18	1,13	37,66
YNL037C	IDH1	1,71	14,16	1,88	1,08	1,13	20,11
YNL052W	COX5A	1,28	19,38	1,52	1,21	0,93	16,18
YNL055C	POR1	1,67	18,61	1,75	1,15	1,21	25,00
YNL071W	LAT1	1,51	14,53	1,54	1,20	1,07	21,66
YNL073W	MSK1	1,80	27,25	1,99	1,22	n.d.	n.d.
YNL081C	SWS2	1,69	1,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNL100W	AIM37	1,78	11,32	2,18	1,36	1,37	29,17
YNL104C	LEU4	1,13	26,17	1,37	1,17	0,83	32,58
YNL112W	DBP2	0,10	27,57	n.d.	n.d.	0,10	116,69
YNL121C	TOM70	1,81	50,56	2,53	1,13	1,10	60,35
YNL131W	TOM22	1,82	76,99	1,11	1,14	1,16	54,08
YNL135C	FPR1	0,04	20,76	n.d.	n.d.	0,04	48,47
YNL137C	NAM9	1,52	17,38	1,53	NN	1,11	26,87
YNL168C	FMP41	1,26	13,78	1,14	1,42	0,81	23,80
YNL169C	PSD1	1,28	15,18	1,21	1,18	0,98	21,63
YNL177C	MRPL22	1,62	11,20	1,62	1,17	1,06	11,94
YNL185C	MRPL19	1,50	29,19	1,26	1,43	1,35	25,60
YNL200C	YNL200C	2,01	13,47	1,64	1,66	1,36	12,78
YNL208W	YNL208W	0,61	14,45	0,53	1,24	0,49	5,55
YNL213C	RRG9	1,20	7,49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNL239W	LAP3	1,12	16,30	1,31	1,17	0,91	24,78
YNL252C	MRPL17	1,49	9,86	1,46	1,14	0,91	34,98
YNL256W	FOL1	1,90	5,34	n.d.	n.d.	2,27	22,63
YNL274C	GOR1	0,13	24,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNL284C	MRPL10	1,24	24,19	n.d.	n.d.	0,96	16,64
YNL292W	PUS4	0,54	43,25	n.d.	n.d.	0,49	44,11
YNL306W	MRPS18	1,57	8,05	1,62	1,17	1,14	25,22
YNL310C	ZIM17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,57	45,12
YNL315C	ATP11	0,74	34,20	0,86	1,24	0,54	31,69
YNL328C	MDJ2	1,81	3,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNR001C	CIT1	1,64	28,27	1,91	1,15	1,06	38,24
YNR002C	ATO2	0,39	155,60	0,88	1,29	0,31	46,34
YNR016C	ACC1	0,21	35,61	0,15	1,23	0,27	40,51
YNR017W	TIM23	1,11	9,76	1,17	1,06	0,88	36,28
YNR018W	AIM38	1,82	6,45	1,83	1,05	n.d.	n.d.
YNR020C	ATP23	3,13	16,45	2,98	1,07	1,89	23,66
YNR022C	MRPL50	1,53	14,73	1,64	1,06	1,11	21,68
YNR036C	MRPS12	1,16	23,87	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNR037C	RSM19	1,40	27,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YNR040W	YNR040W	n.d.	n.d.	2,06	1,08	1,51	15,62
YNR041C	COQ2	1,54	14,29	1,51	1,04	1,12	16,74
YOL008W	COQ10	1,10	10,79	n.d.	n.d.	0,98	13,23
YOL023W	IFM1	1,95	16,64	2,19	1,14	1,21	24,10
YOL027C	MDM38	2,08	14,39	2,18	1,14	1,60	36,77
YOL033W	MSE1	1,75	21,40	n.d.	n.d.	1,30	13,76

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YOL042W	NGL1	1,43	7,00	n.d.	n.d.	1,11	13,95
YOL059W	GPD2	2,19	20,29	n.d.	n.d.	1,57	20,27
YOL071W	EMI5	2,23	26,08	n.d.	n.d.	1,40	20,13
YOL077W-A	ATP19	1,41	6,62	n.d.	n.d.	1,07	24,64
YOL096C	COQ3	0,89	36,19	1,18	NN	0,77	26,78
YOL109W	ZEO1	1,27	85,60	n.d.	n.d.	1,25	74,60
YOL140W	ARG8	2,00	25,31	1,89	1,22	1,37	22,05
YOR017W	PET127	1,58	8,01	1,70	1,19	1,94	12,47
YOR020C	HSP10	2,69	12,31	2,71	1,12	1,77	13,16
YOR020W-A	YOR020W-A	n.d.	n.d.	1,75	1,07	n.d.	n.d.
YOR022C	YOR022C	1,57	15,57	1,83	1,16	1,40	11,08
YOR037W	CYC2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,04	28,54
YOR040W	GLO4	2,04	5,40	1,95	1,34	1,37	15,90
YOR065W	CYT1	0,98	27,00	1,14	1,20	0,68	12,55
YOR086C	TCB1	0,27	28,99	n.d.	n.d.	0,30	35,42
YOR089C	VPS21	1,12	17,79	1,22	1,11	0,80	37,85
YOR100C	CRC1	2,24	24,74	1,95	1,08	1,63	38,98
YOR108W	LEU9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,88	60,70
YOR125C	CAT5	0,99	10,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YOR130C	ORT1	1,76	19,67	1,84	1,16	1,16	17,28
YOR136W	IDH2	1,57	22,67	1,63	1,11	0,97	39,81
YOR142W	LSC1	0,77	32,33	0,86	1,16	0,51	38,55
YOR150W	MRPL23	1,50	14,12	1,67	1,16	1,11	16,50
YOR151C	RPB2	0,10	4,70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YOR153W	PDR5	1,08	17,55	1,09	1,18	1,07	14,29
YOR158W	PET123	1,46	19,20	1,68	1,15	1,02	21,20
YOR168W	GLN4	0,05	16,52	0,06	NN	0,07	130,44
YOR176W	HEM15	0,78	21,14	0,89	1,18	0,53	19,24
YOR187W	TUF1	1,84	23,24	1,92	1,13	1,27	23,32
YOR196C	LIP5	0,77	32,92	0,80	1,14	0,55	31,47
YOR205C	GEP3	1,79	21,16	n.d.	n.d.	1,33	35,23
YOR206W	NOC2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,29	10,95
YOR211C	MGM1	2,24	13,90	2,48	1,13	2,29	31,72
YOR215C	AIM41	1,38	7,28	1,44	NN	1,09	15,89
YOR221C	MCT1	1,31	19,41	1,41	1,22	0,97	22,80
YOR222W	ODC2	1,53	13,47	1,59	1,14	0,96	16,69
YOR232W	MGE1	1,46	7,61	1,51	NN	1,10	54,57
YOR241W	MET7	0,84	41,52	n.d.	n.d.	0,59	63,64
YOR254C	SEC63	0,49	34,41	0,40	1,22	0,55	40,47
YOR266W	PNT1	1,83	17,72	1,74	1,18	1,22	29,11
YOR271C	FSF1	1,65	16,35	1,73	1,18	1,02	18,06
YOR274W	MOD5	2,65	16,42	n.d.	n.d.	1,62	166,94
YOR285W	RDL1	0,41	7,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YOR286W	RDL2	1,49	29,12	1,85	1,20	1,25	39,04
YOR297C	TIM18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,62	24,23
YOR298C-A	MBF1	0,70	18,38	0,84	1,25	0,58	44,54
YOR305W	RRG7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,66	11,99

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YOR317W	FAA1	0,82	15,99	0,90	1,14	0,57	37,83
YOR330C	MIP1	0,90	4,43	n.d.	n.d.	0,94	36,93
YOR335C	ALA1	0,26	39,74	0,34	1,15	0,21	46,66
YOR350C	MNE1	1,75	13,42	1,78	1,10	1,09	11,99
YOR354C	MSC6	1,60	13,07	1,61	1,18	1,06	17,88
YOR356W	CIR2	0,84	23,41	0,93	1,19	0,63	37,06
YOR374W	ALD4	0,87	18,95	0,98	1,11	0,67	44,23
YPL004C	LSP1	1,72	47,33	2,38	1,39	0,93	84,53
YPL005W	AEP3	1,66	8,14	1,70	1,05	0,92	126,96
YPL013C	MRPS16	1,38	16,51	1,31	1,22	0,98	25,63
YPL029W	SUV3	1,51	17,39	1,36	1,29	n.d.	n.d.
YPL036W	PMA2	4,83	22,83	3,99	1,18	4,32	34,18
YPL040C	ISM1	1,52	14,65	1,64	1,12	1,05	11,63
YPL059W	GRX5	0,72	22,38	0,71	1,21	0,50	12,48
YPL061W	ALD6	0,11	34,98	n.d.	n.d.	0,11	55,99
YPL063W	TIM50	0,96	30,88	1,04	1,25	0,79	43,03
YPL072W	UBP16	2,05	20,80	n.d.	n.d.	1,73	18,82
YPL078C	ATP4	1,22	18,73	1,21	1,30	0,84	23,76
YPL091W	GLR1	1,85	20,54	1,99	1,17	1,57	21,67
YPL096W	PNG1	0,16	NN	n.d.	n.d.	0,49	146,73
YPL097W	MSY1	1,77	14,82	1,82	1,25	1,20	20,44
YPL099C	AIM43	1,34	13,22	1,36	1,18	0,89	17,81
YPL103C	FMP30	2,18	32,49	2,16	1,27	1,21	14,66
YPL104W	MSD1	1,25	17,17	1,25	1,20	0,81	27,89
YPL109C	YPL109C	0,94	14,74	0,96	1,09	n.d.	n.d.
YPL118W	MRP51	1,44	16,84	n.d.	n.d.	1,00	28,69
YPL132W	COX11	1,79	20,54	1,90	1,17	1,22	35,17
YPL134C	ODC1	1,38	20,58	1,66	1,18	0,94	26,66
YPL135W	ISU1	1,10	34,46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YPL148C	PPT2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,18	29,27
YPL154C	PEP4	0,18	45,62	0,22	4,28	0,20	86,25
YPL168W	YPL168W	1,46	31,99	1,96	2,15	1,09	115,57
YPL173W	MRPL40	1,64	23,21	1,99	1,15	1,16	18,28
YPL188W	POS5	2,29	21,55	2,38	1,22	1,67	31,19
YPL215W	CBP3	1,81	15,74	1,84	1,14	1,10	21,41
YPL222W	FMP40	0,90	13,70	0,92	NN	0,69	30,43
YPL224C	MMT2	1,31	18,11	n.d.	n.d.	0,84	12,96
YPL226W	NEW1	0,09	64,59	n.d.	n.d.	0,13	45,55
YPL231W	FAS2	0,36	31,80	0,41	1,09	0,46	64,82
YPL262W	FUM1	1,68	12,42	1,90	1,09	1,18	33,31
YPL270W	MDL2	1,29	17,06	1,30	1,18	1,01	28,68
YPL271W	ATP15	1,47	12,80	1,49	1,14	1,04	25,49
YPR001W	CIT3	1,22	20,72	1,23	1,09	0,88	25,98
YPR002W	PDH1	0,92	26,43	0,87	1,16	0,72	34,80
YPR004C	AIM45	1,79	16,48	1,75	1,19	1,18	18,73
YPR006C	ICL2	1,24	13,94	1,34	1,10	1,16	21,30
YPR011C	YPR011C	1,82	12,66	1,78	1,24	1,18	7,66
YPR020W	ATP20	1,33	12,68	1,49	1,15	0,98	31,68

ORF	Protein	Proteome Discoverer	PD H/L Variability %	Mascot Distiller	MD SD(geo)	MaxQuant	MQ H/L Variability %
YPR021C	AGC1	2,44	12,79	2,52	1,15	1,85	21,38
YPR024W	YME1	1,57	17,40	1,71	1,24	1,09	59,29
YPR033C	HTS1	1,15	14,53	1,03	1,20	0,92	141,63
YPR047W	MSF1	1,54	16,17	1,41	1,24	1,11	14,67
YPR058W	YMC1	1,55	15,50	1,47	1,10	1,16	18,86
YPR080W	TEF1	n.d.	n.d.	0,18	1,31	n.d.	n.d.
YPR098C	YPR098C	1,51	13,90	1,63	1,04	1,23	29,80
YPR100W	MRPL51	1,60	11,60	1,33	1,18	n.d.	n.d.
YPR116W	RRG8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,08	16,21
YPR125W	YLH47	1,40	13,22	n.d.	n.d.	1,30	22,56
YPR134W	MSS18	1,40	8,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YPR140W	TAZ1	1,87	19,16	1,84	1,15	1,27	12,25
YPR149W	NCE102	1,68	6,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YPR155C	NCA2	1,14	10,51	1,16	1,05	1,04	25,26
YPR165W	RHO1	1,41	19,84	1,38	1,18	1,22	19,17
YPR166C	MRP2	1,25	16,60	n.d.	n.d.	1,11	19,23
YPR183W	DPM1	0,47	16,54	0,53	NN	0,32	82,19
YPR191W	QCR2	1,48	20,34	1,46	1,18	1,03	64,87

## 10.6 Übersicht über die optimierten SRM-Parameter

Angegeben sind jeweils die Peptid ID, der Übergang aus Precursor (Q1) und Fragment (Q3), die Kollisionsenergie in Volt (CE), Anfang und Ende der Retentionszeit in Minuten sowie Sequenz und Ladung des Peptides beziehungsweise Fragmenttyp und Ladung des Fragmentes.

Peptid ID	Precursor	Fragment	CE	RT Anfang	RT Ende	Sequenz & Ladung	Fragmenttyp & Ladung
A1	415,203	472,143	14	11,48	21,48	ALELKPDYpSK 3+	[y8 -H3PO4 - H2O]+2
A1	415,203	481,116	11	11,48	21,48	ALELKPDYpSK 3+	[y8 - H3PO4]+2
A1	415,203	530,124	8	11,48	21,48	ALELKPDYpSK 3+	[y8]+2
A1	415,215	296,142	16	11,48	21,48	ALELKPDYpSK 3+	[y5 - H3PO4]+2
A1	415,215	591,277	17	11,48	21,48	ALELKPDYpSK 3+	y5 -H3PO4
A1	415,215	689,254	13	11,48	21,48	ALELKPDYpSK 3+	y5
A1	622,302	313,92	27	11,51	21,51	ALELKPDYpSK 2+	y2
A1	622,302	378,988	26	11,51	21,51	ALELKPDYpSK 2+	y3 -H3PO4
A1	622,302	573,154	19	11,51	21,51	ALELKPDYpSK 2+	y8 -H3PO4 - H2O
A1	622,302	591,144	28	11,51	21,51	ALELKPDYpSK 2+	y5 -H3PO4
A1	622,302	689,254	18	11,51	21,51	ALELKPDYpSK 2+	y5
A1	622,302	767,38	20	11,51	21,51	ALELKPDYpSK 2+	b7
A1	622,302	999,514	16	11,51	21,51	ALELKPDYpSK 2+	b9 -H3PO4
A2	388,548	481,136	12	8,71	18,71	ALELKPDYSK 3+	[y8 -H2O]+2
A2	388,548	490,136	8	8,71	18,71	ALELKPDYSK 3+	[y8]+2
A2	388,548	609,164	14	8,71	18,71	ALELKPDYSK 3+	y5
A2	388,548	737,382	17	8,71	18,71	ALELKPDYSK 3+	y6
A2	582,319	314,171	24	8,71	18,71	ALELKPDYSK 2+	y2
A2	582,319	397,008	23	8,71	18,71	ALELKPDYSK 2+	y3
A2	582,319	481,044	21	8,71	18,71	ALELKPDYSK 2+	[y8 -H2O]+2
A2	582,319	609,141	23	8,71	18,71	ALELKPDYSK 2+	y5
A2	582,319	737,382	22	8,71	18,71	ALELKPDYSK 2+	y6
A2	582,319	850,438	20	8,71	18,71	ALELKPDYSK 2+	y7
A2	582,319	979,51	19	8,71	18,71	ALELKPDYSK 2+	y8
A3	667,761	276,155	29	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	y2
A3	667,761	462,198	18	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	b4
A3	667,761	507,705	22	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	[y9 -H3PO4 - H2O]+2
A3	667,761	565,53	17	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	[y9]+2
A3	667,761	575,23	25	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	y5 -H3PO4
A3	667,761	618,603	15	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	[MH - H3PO4]+2
A3	667,761	658,638	15	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	[MH -H2O]+2
A3	667,761	688,315	22	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	y6 -H3PO4
A3	667,761	775,293	24	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	y7 -H3PO4
A3	667,761	873,323	17	12,74	22,74	GFQESLpSDDEK 2+	y7
A4	627,777	333,156	18	10,04	20,04	GFQESLSDDEK 2+	b3
A4	627,777	462,198	16	10,04	20,04	GFQESLSDDEK 2+	b4
A4	627,777	516,559	19	10,04	20,04	GFQESLSDDEK 2+	[y9 -H2O]+2

Peptid ID	Precursor	Fragment	CE	RT Anfang	RT Ende	Sequenz & Ladung	Fragmenttyp & Ladung
A4	627,777	525,531	16	10,04	20,04	GFQESLSDDEK 2+	[y9]+2
A4	627,777	593,086	19	10,04	20,04	GFQESLSDDEK 2+	y5
A4	627,777	706,325	19	10,04	20,04	GFQESLSDDEK 2+	y6
A4	627,777	793,318	18	10,04	20,04	GFQESLSDDEK 2+	y7
A4	627,777	922,469	18	10,04	20,04	GFQESLSDDEK 2+	y8
A4	627,777	1050,458	17	10,04	20,04	GFQESLSDDEK 2+	y9
A5	649,287	239,873	28	11,77	21,77	EQAEApSIDNLK 2+	b2 -H2O
A5	649,287	374,239	26	11,77	21,77	EQAEApSIDNLK 2+	y3
A5	649,287	489,266	21	11,77	21,77	EQAEApSIDNLK 2+	y4
A5	649,287	640,126	12	11,77	21,77	EQAEApSIDNLK 2+	[MH -H2O]+2
A5	649,287	742,317	23	11,77	21,77	EQAEApSIDNLK 2+	y7 -H3PO4
A5	649,287	840,386	17	11,77	21,77	EQAEApSIDNLK 2+	y7
A5	649,287	1040,466	18	11,77	21,77	EQAEApSIDNLK 2+	y9
A6	609,304	239,882	26	9,8	19,8	EQAEASIDNLK 2+	b2 -H2O
A6	609,304	310,899	20	9,8	19,8	EQAEASIDNLK 2+	b3 -H2O
A6	609,304	374,239	26	9,8	19,8	EQAEASIDNLK 2+	y3
A6	609,304	489,266	17	9,8	19,8	EQAEASIDNLK 2+	y4
A6	609,304	689,28	17	9,8	19,8	EQAEASIDNLK 2+	y6
A6	609,304	760,361	19	9,8	19,8	EQAEASIDNLK 2+	y7
A6	609,304	889,462	18	9,8	19,8	EQAEASIDNLK 2+	y8
A6	609,304	960,6	19	9,8	19,8	EQAEASIDNLK 2+	y9
B1	466,888	434,229	12	3,49	13,49	LEETKEpSLQNK 3+	[MH -H3PO4]+3
B1	466,888	520,627	16	3,49	13,49	LEETKEpSLQNK 3+	[b9 -H3PO4]+2
B1	466,888	569,626	14	3,49	13,49	LEETKEpSLQNK 3+	[b9]+2
B1	466,888	578,631	11	3,49	13,49	LEETKEpSLQNK 3+	[y9]+2
B1	466,888	585,785	15	3,49	13,49	LEETKEpSLQNK 3+	[y10 -H3PO4 -NH3]+2
B1	466,888	700,362	19	3,49	13,49	LEETKEpSLQNK 3+	y6 -H3PO4
B1	699,829	520,766	26	3,5	13,5	LEETKEpSLQNK 2+	[b9 -H3PO4]+2
B1	699,829	650,676	21	3,5	13,5	LEETKEpSLQNK 2+	[MH -H3PO4]+2
B1	699,829	669,296	21	3,5	13,5	LEETKEpSLQNK 2+	y5
B1	699,829	799,383	22	3,5	13,5	LEETKEpSLQNK 2+	b7 -H3PO4
B1	699,829	828,457	29	3,5	13,5	LEETKEpSLQNK 2+	y7 -H3PO4
B2	440,233	529,686	14	0,93	10,93	LEETKESLQNK 3+	[b9]+2
B2	440,233	538,665	13	0,93	10,93	LEETKESLQNK 3+	[y9]+2
B2	440,233	594,298	15	0,93	10,93	LEETKESLQNK 3+	[y10 -H2O]+2
B2	440,233	603,238	13	0,93	10,93	LEETKESLQNK 3+	[y10]+2
B2	659,846	529,596	23	0,93	10,93	LEETKESLQNK 2+	[b9]+2
B2	659,846	538,558	21	0,93	10,93	LEETKESLQNK 2+	[y9]+2
B2	659,846	650,76	21	0,93	10,93	LEETKESLQNK 2+	[MH -H2O]+2
B2	659,846	718,298	25	0,93	10,93	LEETKESLQNK 2+	y6
B3	711,865	356,874	25	20,7	30,7	NELITSLpTPGVAK 2+	b3
B3	711,865	470,079	18	20,7	30,7	NELITSLpTPGVAK 2+	b4
B3	711,865	471,292	28	20,7	30,7	NELITSLpTPGVAK 2+	y5
B3	711,865	652,138	15	20,7	30,7	NELITSLpTPGVAK 2+	y6



Peptid ID	Precursor	Fragment	CE	RT Anfang	RT Ende	Sequenz & Ladung	Fragmenttyp & Ladung
B3	711,865	852,422	20	20,7	30,7	NELITSLpTPGVAK 2+	y8
B3	711,865	953,554	19	20,7	30,7	NELITSLpTPGVAK 2+	y9
B3	711,865	1066,554	19	20,7	30,7	NELITSLpTPGVAK 2+	y10
B4	671,882	243,854	28	18,5	28,5	NELITSLTPGVAK 2+	b2
B4	671,882	356,904	22	18,5	28,5	NELITSLTPGVAK 2+	b3
B4	671,882	471,121	28	18,5	28,5	NELITSLTPGVAK 2+	y5
B4	671,882	572,34	16	18,5	28,5	NELITSLTPGVAK 2+	y6
B4	671,882	772,456	19	18,5	28,5	NELITSLTPGVAK 2+	y8
B4	671,882	873,449	20	18,5	28,5	NELITSLTPGVAK 2+	y9
B4	671,882	986,733	19	18,5	28,5	NELITSLTPGVAK 2+	y10
B4	671,882	1099,672	18	18,5	28,5	NELITSLTPGVAK 2+	y11
B5	775,362	235,107	25	34,1	44,1	SFLPpSFILSDESK 2+	b2
B5	775,362	348,191	18	34,1	44,1	SFLPpSFILSDESK 2+	b3
B5	775,362	601,546	21	34,1	44,1	SFLPpSFILSDESK 2+	[y10]+2
B5	775,362	726,203	16	34,1	44,1	SFLPpSFILSDESK 2+	[MH - H3PO4]+2
B5	775,362	1104,888	23	34,1	44,1	SFLPpSFILSDESK 2+	y10 -H3PO4
B5	775,362	1202,534	18	34,1	44,1	SFLPpSFILSDESK 2+	y10
B6	735,379	234,811	24	27,66	37,66	SFLPSFILSDESK 2+	y2
B6	735,379	347,893	19	27,66	37,66	SFLPSFILSDESK 2+	b3
B6	735,379	561,569	20	27,66	37,66	SFLPSFILSDESK 2+	[y10]+2
B6	735,379	618,142	19	27,66	37,66	SFLPSFILSDESK 2+	[y11]+2
B6	735,379	905,513	16	27,66	37,66	SFLPSFILSDESK 2+	b8
B6	735,379	1122,921	20	27,66	37,66	SFLPSFILSDESK 2+	y10
B6	735,379	1235,651	18	27,66	37,66	SFLPSFILSDESK 2+	y11
C1	865,867	410,132	26	13,92	23,92	ELpSPNFSQEQTENK 2+	b3
C1	865,867	491,246	28	13,92	23,92	ELpSPNFSQEQTENK 2+	y4
C1	865,867	661,304	25	13,92	23,92	ELpSPNFSQEQTENK 2+	[y11]+2
C1	865,867	695,815	26	13,92	23,92	ELpSPNFSQEQTENK 2+	[y12 - H3PO4]+2
C1	865,867	856,908	15	13,92	23,92	ELpSPNFSQEQTENK 2+	[MH -H2O]+2
C1	865,867	963,546	25	13,92	23,92	ELpSPNFSQEQTENK 2+	y8
C1	865,867	1110,506	26	13,92	23,92	ELpSPNFSQEQTENK 2+	y9
C1	865,867	1321,601	23	13,92	23,92	ELpSPNFSQEQTENK 2+	y11
C2	825,883	491,246	27	10,85	20,85	ELSPNFSQEQTENK 2+	y4
C2	825,883	661,129	24	10,85	20,85	ELSPNFSQEQTENK 2+	[y11]+2
C2	825,883	704,679	23	10,85	20,85	ELSPNFSQEQTENK 2+	[y12]+2
C2	825,883	963,516	24	10,85	20,85	ELSPNFSQEQTENK 2+	y8
C2	825,883	1110,506	26	10,85	20,85	ELSPNFSQEQTENK 2+	y9

Peptid ID	Precursor	Fragment	CE	RT Anfang	RT Ende	Sequenz & Ladung	Fragmenttyp & Ladung
C2	825,883	1321,601	23	10,85	20,85	ELSPNFSQEQTENK 2+	y11
C5	600,768	459,737	20	13,89	23,89	SPPVYpSDISR 2+	[y8 - H3PO4]+2
C5	600,768	508,429	18	13,89	23,89	SPPVYpSDISR 2+	[y8]+2
C5	600,768	551,61	15	13,89	23,89	SPPVYpSDISR 2+	[MH - H3PO4]+2
C5	600,768	722,347	24	13,89	23,89	SPPVYpSDISR 2+	y6 -H3PO4
C5	600,768	918,559	24	13,89	23,89	SPPVYpSDISR 2+	y8 -H3PO4
C5	600,768	1016,444	17	13,89	23,89	SPPVYpSDISR 2+	y8
C6	560,785	468,571	16	10,04	20,04	SPPVYSDISR 2+	[y8]+2
C6	560,785	517,109	19	10,04	20,04	SPPVYSDISR 2+	[y9]+2
C6	560,785	740,357	20	10,04	20,04	SPPVYSDISR 2+	y6
C6	560,785	839,452	20	10,04	20,04	SPPVYSDISR 2+	y7
C6	560,785	936,586	19	10,04	20,04	SPPVYSDISR 2+	y8
D1	596,747	325,932	18	10,39	20,39	DPIPSPpSER 2+	b3
D1	596,747	385,177	22	10,39	20,39	DPIPSPpSER 2+	[y7 - H3PO4]+2
D1	596,747	470,055	28	10,39	20,39	DPIPSPpSER 2+	y4 -H3PO4
D1	596,747	547,591	15	10,39	20,39	DPIPSPpSER 2+	[MH - H3PO4]+2
D1	596,747	769,297	21	10,39	20,39	DPIPSPpSER 2+	y7 -H3PO4
D1	596,747	867,344	16	10,39	20,39	DPIPSPpSER 2+	y7
D2	556,764	325,953	17	8,2	18,2	DPIPSPSER 2+	b3
D2	556,764	393,984	19	8,2	18,2	DPIPSPSER 2+	[y7]+2
D2	556,764	488,08	26	8,2	18,2	DPIPSPSER 2+	y4
D2	556,764	625,28	14	8,2	18,2	DPIPSPSER 2+	b6
D2	556,764	690,305	21	8,2	18,2	DPIPSPSER 2+	y6
D2	556,764	787,33	17	8,2	18,2	DPIPSPSER 2+	y7

## 10.7 Replikate, Mittelwerte und Standardabweichung der SRM-Messungen

	1 µg Mitos Rep1	1 µg Mitos Rep2	Mittelwert	StAbw	+ 0,25 fmol Rep1	+ 0,25 fmol Rep2	Mittelwert	StAbw
388,548	4,48E+09	1,12E+10	7,85E+09	4768021026	3,72E+09	1,18E+10	7,74E+09	5695745122
415,203	2,65E+07	7,35E+07	5,00E+07	33198663,4	2,42E+07	9,08E+07	5,75E+07	47057956,3
582,319	1,41E+09	3,64E+09	2,53E+09	1578969442	1,18E+09	3,86E+09	2,52E+09	1895046174
609,304	2,31E+08	5,86E+08	4,09E+08	250598643	2,28E+08	7,02E+08	4,65E+08	335380746
622,302	1,83E+08	6,50E+08	4,16E+08	330501710	1,87E+08	6,02E+08	3,95E+08	293520025
627,777	5,35E+08	7,32E+08	6,33E+08	139300036	2,59E+08	1,01E+09	6,35E+08	532097853
649,287	2,18E+08	6,42E+08	4,30E+08	299530433	1,82E+08	6,56E+08	4,19E+08	335027193
667,761	2,33E+08	7,01E+08	4,67E+08	331350238	1,76E+08	6,66E+08	4,21E+08	346340901
	+ 0,5 fmol Rep1	+ 0,5 fmol Rep2	Mittelwert	StAbw	+ 1 fmol Rep1	+ 1 fmol Rep2	Mittelwert	StAbw
388,548	4,17E+09	1,31E+10	8,61E+09	6276279790	4,01E+09	2,20E+10	1,30E+10	1,2748E+10
415,203	2,52E+07	1,36E+08	8,08E+07	78651487,3	4,07E+07	2,32E+08	1,36E+08	135029111
582,319	1,25E+09	4,22E+09	2,74E+09	2096571606	1,33E+09	5,41E+09	3,37E+09	2886409881
609,304	2,81E+08	7,60E+08	5,21E+08	338562727	3,25E+08	1,01E+09	6,69E+08	487550126
622,302	2,42E+08	8,73E+08	5,57E+08	446750064	3,22E+08	1,82E+09	1,07E+09	1056983217
627,777	2,56E+08	1,03E+09	6,43E+08	546522831	5,32E+08	2,85E+09	1,69E+09	1636881488
649,287	1,80E+08	7,31E+08	4,56E+08	389898679	2,22E+08	8,51E+08	5,36E+08	445123719
667,761	1,86E+08	6,77E+08	4,32E+08	347260140	2,05E+08	8,28E+08	5,16E+08	440173971
	+ 2 fmol Rep1	+ 2 fmol Rep2	Mittelwert	StAbw	+ 10 fmol Rep1	+ 10 fmol Rep2	Mittelwert	StAbw
388,548	3,59E+09	1,19E+10	7,72E+09	5842823333	4,59E+09	1,53E+10	9,93E+09	7544122248
415,203	5,52E+07	2,19E+08	1,37E+08	115979654	2,63E+08	1,47E+09	8,66E+08	852700067
582,319	1,20E+09	4,23E+09	2,71E+09	2142533547	1,51E+09	4,53E+09	3,02E+09	2134048266
609,304	4,46E+08	1,43E+09	9,38E+08	695793073	1,40E+09	5,89E+09	3,65E+09	3172788127
622,302	5,56E+08	2,14E+09	1,35E+09	1123239122	2,31E+09	1,22E+10	7,28E+09	7021570337
627,777	4,79E+08	1,80E+09	1,14E+09	932108159	1,16E+09	4,81E+09	2,98E+09	2581646858
649,287	2,75E+08	9,19E+08	5,97E+08	455518188	7,06E+08	2,91E+09	1,81E+09	1556483447
667,761	2,68E+08	1,01E+09	6,38E+08	524107546	6,37E+08	2,70E+09	1,67E+09	1456781391
	+ 50 fmol Rep1	+ 50 fmol Rep2	Mittelwert	StAbw	+ 100 fmol Rep1	+ 100 fmol Rep2	Mittelwert	StAbw
388,548	8,79E+09	3,21E+10	2,05E+10	1,6497E+10	1,54E+10	5,94E+10	3,74E+10	3,1106E+10
415,203	1,09E+09	4,67E+09	2,88E+09	2530735170	2,17E+09	1,01E+10	6,16E+09	5633519726
582,319	2,83E+09	8,38E+09	5,61E+09	3925149742	4,93E+09	1,43E+10	9,62E+09	6641853996
609,304	5,80E+09	2,48E+10	1,53E+10	1,3456E+10	1,21E+10	5,05E+10	3,13E+10	2,7153E+10
622,302	9,77E+09	5,45E+10	3,21E+10	3,16E+10	1,99E+10	1,12E+11	6,60E+10	6,511E+10
627,777	4,22E+09	1,92E+10	1,17E+10	1,0583E+10	9,44E+09	4,27E+10	2,61E+10	2,3516E+10
649,287	2,25E+09	1,13E+10	6,75E+09	6373860526	4,86E+09	2,31E+10	1,40E+10	1,2871E+10
667,761	2,16E+09	1,08E+10	6,48E+09	6110109696	4,32E+09	2,25E+10	1,34E+10	1,2828E+10