



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Gel-Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen bei  
*Artemisia pancicii* am Bisamberg (NÖ)

Verfasserin

Yang Fan Qiu

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, am 02. 05. 2011

Studienkennzahl lt.  
Studienblatt:

A 444

Studienrichtung lt.  
Studienblatt:

Ökologie

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Rudolf Maier  
Univ.-Prof. Dr. Wolfram Weckwerth



# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Pflanze <i>Artemisia panicü</i></b>	<b>1</b>
1.1.1	Geschichtlicher Hintergrund	1
1.1.2	Merkmale	1
1.1.3	Herkunft	2
1.1.4	Vorkommen	2
1.1.5	Fundort Bisamberg	3
1.1.6	Gefährdung	4
<b>1.2</b>	<b>Proteomanalyse</b>	<b>5</b>
1.2.1	Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese	6
1.2.2	“Shotgun“-Proteomics	8
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Pflanzenmaterial</b>	<b>11</b>
2.1.1	Probenentnahme	11
2.1.2	Probenaufbereitung und -lagerung	12
<b>2.2</b>	<b>Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine</b>	<b>12</b>
2.2.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	12
2.2.2	Gelanfertigung	13
2.2.3	Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese	16
2.2.4	Proteinfällung	17
2.2.4.1	Trichloressigsäure (TCA)/Aceton-Fällung	17
2.2.4.2	Phenol-Proteinfällung	17
2.2.5	Vergleich der Extraktionsmethoden „Proteinfällung“	19
2.2.6	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	20
2.2.7	SDS-Gelelektrophorese (2. Dimension)	21
<b>2.3</b>	<b>Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD 1976)</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Proteinfärbung</b>	<b>22</b>
2.4.1	Färbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blue	23
2.4.2	Silberfärbung nach Blum (1987)	24
<b>2.5</b>	<b>Charakterisierung der Proteilmuster</b>	<b>25</b>
<b>2.6</b>	<b>Gelfreie massenspektrometrische Methode</b>	<b>25</b>
2.6.1	nanoLC-MS-basierte Shotgun-Proteinanalyse	26
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Protein-Profiling</b>	<b>29</b>
3.1.1	Protein-Profiling mit SDS-PAGE	29
3.1.1.1	Protein-Profiling von Pflanzen am Standort Bisamberg	30
3.1.2	Protein-Profiling von im Glashaus Althanstrasse kultivierten Pflanzen	34
3.1.3	Protein-Profiling von Pflanzen aus dem Versuchsgarten des Botanischen Gartens der Universität Wien am Rennweg	36
<b>3.2</b>	<b>Zweidimensionale Gelelektrophorese</b>	<b>39</b>
3.2.1	Vorversuch mit <i>Arabidopsis sp.</i>	39
3.2.2	Optimierung der Proteinfärbung	40

3.2.3	Protein-Profilung der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese .....	41
<b>3.3</b>	<b>Auswertung des Gesamtproteinmusters .....</b>	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Protein Analyse von <i>Artemisia panicii</i> mittels nanoLC-MS-basierter Shotgun-Proteinanalyse ..</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von Umweltfaktoren auf Proteine.....</b>	<b>45</b>
4.1.1	Am Bisamberg .....	46
4.1.2	Botanischer Garten.....	46
4.1.3	Klimatisiertes Gewächshaus .....	47
4.1.4	Vergleich der Standorte .....	47
<b>4.2</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>59</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>61</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Artemisia panicii</i> am Standort Bisamberg, Sommer 2009 .....	1
Abbildung 2: Verbreitungsgebiet <i>Artemisia panicii</i> (NAGLER 2010) .....	3
Abbildung 3: Standort Westhang Bisamberg; Pflanzen im Gehölzsaum (links) und in offener Rasenfläche (rechts) im Sommer 2009 .....	4
Abbildung 4: Strukturformel von Natriumdodecylsulfat .....	12
Abbildung 5: Vernetzung von Acrylamid und Methylenbisacrylamid zu Polyacrylamid .....	13
Abbildung 6: Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß ( <i>Artemisia panicii</i> ) im Sommer 2009 am Standort Bisamberg. Links drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen im Gehölzsaum, rechts drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen der offenen Rasenfläche .....	31
Abbildung 7: Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß ( <i>Artemisia panicii</i> ) im Herbst 2009 am Standort Bisamberg. Links drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen im Gehölzsaum, rechts drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen der offenen Rasenfläche .....	33
Abbildung 8: Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß ( <i>Artemisia panicii</i> ) im Herbst 2009 von Gewächshaus-pflanzen. Links drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen im Warmhaus, rechts drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen im Kaltthaus ...	35
Abbildung 9: Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß ( <i>Artemisia panicii</i> ) im Herbst 2009 aus dem Versuchsgarten des Botanischen Gartens der Universität Wien .....	37
Abbildung 10: Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß ( <i>Artemisia panicii</i> ) von Gehölzsaum (A), offener Graslandschaft (B), botanischer Garten der Universität Wien (C, D), tropisches Gewächshaus (E), kaltes Gewächshaus(F) .....	38
Abbildung 11: Gesamtproteinmuster von <i>Artemisia panicii</i> (Sommer 2010, Standort Bisamberg). Aufgetrennt wurden 350 µg Gesamtproteine aus <i>Artemisia panicii</i> nach Molekulargewicht (kDa) vertikal und pH-Wert horizontal. Vergleichende Gegenüberstellung zweier Färbetechniken; links Coomassie-Blau „R250“, rechts Silber-Färbung .....	40
Abbildung 12: Gesamtproteinmuster von <i>Artemisia panicii</i> (Sommer 2010, Standort Bisamberg). Aufgetrennt wurden 350 µg Gesamtproteine aus <i>Artemisia panicii</i> nach Molekulargewicht (kDa) vertikal und pH-Wert horizontal. Vergleichende Gegenüberstellung zweier Standorte mittels Coomassie-Blau „R250“ links Gehölzsaum, rechts offene Rasenfläche .....	41
Abbildung 13: Protein-Profilung einer zweidimensionalen Auftrennung von <i>Artemisia panicii</i> (Sommer 2010, Standort Bisamberg) durch kombinierte isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE .....	42

Abbildung 14: Gesamtproteinmuster von *Artemisia panicii* - Sommer 2010, Standort Bisamberg (oben) und botanischer Garten der Universität Wien (unten). Aufgetrennt wurden 350 µg Gesamtproteine aus *Artemisia panicii* nach Molekulargewicht (kDa) vertikal und pH-Wert horizontal. Beide Gele wurden mit Silber-Färbetechniken detektiert .....43

Abbildung 15: Die Gesamtpeptide Signale der *Artemisia panicii* Sommer 2010, vom ursprünglichen Standort Bisamberg .....44

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin ( bovine serum albumin)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat
APS	Ammoniumpersulfat
cm	Zentimeter
DTT	Dithio threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
IAA	Iodoacetamid
IEF	isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilo-Dalton
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
M	Molar, mol/L
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	milliMolar
MW	Molekulargewicht
ng	nanogramm
NL	nicht linear
nm	nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
RubisCO	Ribulose 1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
SDS	sodium dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
μ	mikro
1D	eindimensionale Gelelektrophorese
2D	zweidimensionale Gelelektrophorese



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Pflanze *Artemisia panicii*

### 1.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Der erste Fund des Waldsteppen Beifußes geht auf einen serbischen Botaniker Josif PANČIĆ, aus dem deliblater Sandgebiet, im Jahr 1867 zurück.

Die korrekte systematische Stellung von *Artemisia panicii* war über viele Jahre nicht eindeutig geklärt. Nach dem Erstfund von PANČIĆ (1867) wurde die Art von JANKA (1881), WAGNER (1909) und PODPĚRA (1923) verschiedenen Gattungen innerhalb der Familie der Asteraceae zugeordnet (WENDELBERGER 1960). Erst 1938 wurde von dem Wiener Botaniker RONNINGER, die bis heute gültige taxonomische Zuordnung und die entsprechende (Um-)Benennung der Pflanzen auf *Artemisia panicii* veröffentlicht (WENDELBERGER 1960). Die erste fachbotanisch korrekte Beschreibung lieferten DANIHELKA & MARHOLD (2003).

### 1.1.2 Merkmale

*Artemisia panicii* (JANKA) RONN.

(WALDSTEPPEN-BEIFUß)

#### Systematische Stellung

*Ordnung:* Asternartige (Asterales)

*Familie:* Korbblütler (Asteraceae)

*Unterfamilie:* Asteroideae

*Tribus:* Anthemideae

*Gattung:* *Artemisia*

*Art:* *Artemisia panicii*



Abb. 1: *Artemisia panicii* am Standort Bisamberg im Sommer 2009

*Artemisia panicii* ist eine zur Familie der Asteraceae gehörende, immergrüne Halbrosettenstaude. Die Pflanze ist nicht aromatisch und meist weniger als 50 cm hoch.

Die Laubblätter sind unterseitig seidenhaarig-filzig. Weiters sind sie wechselständig, stipellos und fiederschnittig. Da die Gattung *Artemisia* der Unterfamilie der Asteroideae angehört, besitzen die Körbe von *Artemisia panicii* nur Röhrenblüten (FISCHER 2005).

Die Pflanze weist im Gegensatz zu anderen Vertretern der Sektion *Heterophyllae* keine Öldrüsen auf. Die Ausbreitung dieser Art erfolgt hauptsächlich über unterirdische Ausläufer, da es nur unregelmäßig zur Bildung von generativen Organen kommt (WENDELBERGER 1959).

### 1.1.3 Herkunft

Der Waldsteppen-Beifuß ging vermutlich neueiszeitlich aus der Kreuzung zweier Elternsippen bei Verdoppelung des Chromosomensatzes hervor (SCHRATTEHRENDORFER, SCHMIDERER 2005). Es ist anzunehmen, dass nach der letzten Eiszeit *Artemisia panicii* aus ihrem pontischen Entstehungsgebiet nach Westen bis in ihr heutiges Verbreitungsgebiet vorgedrungen ist. In ihrem einstigen Entstehungsgebiet kann die Art auf Grund der heute dort herrschenden Klimabedingung nicht mehr gefunden werden (EHRENDORFER 1964).

Das Vorkommen von *Artemisia panicii* wird von WENDELBERGER (1960) als im pannonischen Raum endemisch beschrieben. Das heutige Verbreitungsgebiet in Österreich beschränkt sich auf colline Halbtrockenrasen und Waldsteppensäume (FISCHER 2005).

### 1.1.4 Vorkommen

Der Waldsteppen-Beifuß (*Artemisia panicii*) ist ein Vertreter der artenreichen Gattung *Artemisia* aus der Familie Asteraceae, die vorwiegend in den Steppen- und Halbwüstengebieten Europas, Nord- und Mittelamerikas auftritt. Trotz weltweiter Verbreitung dieser Gattung sind einzelne Arten wiederum nur beschränkt verbreitet - seien es isolierte Grenzvorkommen an Verbreitungsgrenzen, seien es Restvorkommen als Relikte einst größerer Verbreitung.

*Artemisia panicii* ist eine der seltensten im Pannonischen endemisch vorkommenden Pflanzen. Sie kommt weltweit nur in Nordserbien (BOZA 1999), in Südmähren (DANIHELKA 1995, HOLUB & GRULICH 1999), im Burgenland (Parndorfer Platte) und in Niederösterreich auf dem Bisamberg und in den Hainburger Bergen in sehr zerstreut

liegenden (disjunkten), sehr kleinen Populationen vor (WENDELBERGER 1960, JANCHEN 1977).



Abb. 2: Verbreitungsgebiet *Artemisia panicii* (NAGLER 2010)

Als Ergebnis einer eingehenden Bearbeitung von *Artemisia panicii* wurden zwei Unterarten beschrieben: am Westrand des pannonischen Beckens, und damit auch am Bisamberg, die Subspezies *Artemisia panicii ssp. austriaca* (Österreichischer Waldsteppenbeifuß) und in der deliblater Sandpuszta im südpannonischen Raum die Subspezies *Artemisia panicii ssp. panicii* (Serbischer Waldsteppenbeifuß) (WENDELBERGER 1960).

### 1.1.5 Fundort Bisamberg

Die erste Entdeckung von *Artemisia panicii* in Österreich machte F. BERGER auf dem Bisamberg im Jahr 1933 (WENDELBERGER 1960).

Das Vorkommen von *Artemisia panicii* im bisher einzigen bekannten Bestand am Bisamberg, ist durch starke Erosion des Bodens betroffen und somit stark gefährdet. Die Erosion ist u.a. eine Folge anthropogener Störung durch einen Wandersteig (MAIER 2009).

*Artemisia panicii* bildet deutlich erkennbare Saumgesellschaften am Rande der inselförmigen Flaumeichen-Buschwälder. Die Lage im Überschneidungsbereich von Wald und Trockenrasen entspricht einer Ökoton-situation mit günstigeren Lebensbedingungen. Typische Arten dieser Saumgesellschaft sind Zwerg-Weichsel (*Prunus fruticosa*), Schlehdorn

(*Prunus spinosa*), Bibernelle-Rose (*Rosa pimpinellifolia*) und einer Reihe schönblühender Hochstauden wie Diptam (*Dictamnus albus*), Blut-Storchschnabel (*Geranium sanguineum*), Steppen-Windröschen (*Anemone sylvestris*) und auch Waldsteppen-Beifuß (*Artemisia panicii*). Solche Saumgesellschaften bilden sich auch um größere Sträucher im Trockenrasen. Da durch die Gebüsche eine Optimierung des Standorts und der Lebensbedingungen bezüglich Lichtschutz, Temperatur und geringerem Wasserstress erfolgt, beleben sie die Artenvielfalt. Dies gilt solange keine großflächigere Verbuschung stattfindet, ansonsten kommt es wiederum zu einer Verdrängung einzelner Arten und einem Verlust an Artenvielfalt. (MAIER 2009)

Der Fundort wurde schon von WENDELBERGER (1960) beschrieben daher soll hier nur eine kurze Beschreibung folgen. Der Standort liegt nahe dem Czatzka- Weg. *Artemisia panicii* kommt hier auf einer Fläche von ca. 100 m<sup>2</sup> an einem Hang mit schwacher Neigung in SW-Lage vor. Ebenso wie von WENDELBERGER (1960) geschildert, wurden wesentlich mehr sterile Blattbüschel als blühende Stämmchen vorgefunden.



Abb. 3: Standort Westhang Bisamberg; Pflanzen im Gehölzsaum (links) und in offener Rasenfläche (rechts) im Sommer 2009

### 1.1.6 Gefährdung

*Artemisia panicii* wird im Anhang II der Fauna-Flora-Habitat Richtlinie der Europäischen Union (Richtlinie 92/43/EWG), welche eine europarechtliche Grundlage für Natura 2000 darstellt, geführt. Der Bisamberg gehört seit Oktober 2007 zum Europäischen Schutzgebiet (PAAR et al. 1998).

Mit Hilfe des EU-LIFE-Natur Projekts „Bisamberg Habitat Management“ wird der Schutz der Artenvielfalt in Europa gewährleistet. Die EU-LIFE-Nature Projekte tragen besonders durch die Verbesserung des EU-weiten Netzes geschützter Gebiete „Natura 2000“ bei.

Umgesetzt wird das Projekt "Bisamberg Habitat Management" von der Wiener Umweltschutzabteilung (MA 22), dem Forst- und Landwirtschaftsbetrieb der Stadt Wien (MA 49) gemeinsam mit dem Land Niederösterreich, der Marktgemeinde Langenzersdorf und dem Distelverein, später stieß noch die Marktgemeinde Bisamberg zu diesem Projekt hinzu.

Für das LIFE-Projekt „Bisamberg Habitat Management“, wird zur Wiederherstellung von Trocken- und Halbtrockenrasen ein Maßnahmenkatalog erarbeitet, der unter anderem auch ein Verpflanzungsexperiment des Waldsteppen-Beifußes (*Artemisia panicii*) vorsieht. Nach entsprechender Durchführung der Maßnahmen soll dem örtlichen Waldsteppen-Beifuß (*Artemisia panicii*) besserer Lebensraum geboten werden können.

Im Sommer 2007 wurden an der Pflanze *Artemisia panicii*, die am Bisamberg endemisch, sowohl in den Rasenflächen wie auch im Gehölzsaum vorkommt, unter anderem die Blatttemperatur und plasmatische Hitzeresistenz untersucht. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich ein Unterschied zwischen den Standorten in den Oberflächentemperaturen der Blätter. Außerdem ist ersichtlich, dass die Pflanzen im Trockenrasen, gegenüber jenen im Gehölzsaum deutliche Blattschäden aufweisen, weil die standortspezifischen maximalen Blatttemperaturen, die im Labor ermittelte Resistenzgrenze von 53°C überschreiten (MAIER 2007).

Eine tschechische Forschungsgruppe des botanischen Instituts an der Universität Palacký in Olomouc, beschäftigt sich seit langem mit der genetischen Variabilität von *Artemisia panicii*. Die bisherigen Ergebnisse aus ihrer Arbeit zeigen, dass die genetische Variabilität innerhalb dieser Art in Zentraleuropa sehr groß ist (KITNER et al., unpubliziert).

## 1.2 Proteomanalyse

Der Begriff Proteom steht für die quantitative Darstellung des gesamten Proteinexpressionsmusters einer Zelle, eines Organismus oder einer Körperflüssigkeit unter genau definierter Bedingung und wurde von dem Australier Marc Wilkins geprägt (WILKINS et al. 1996).

Im Gegensatz zum statischen System des Genoms, welches in jeder Zelle und in jedem Entwicklungszustand des Organismus unverändert vorliegt, ist das Proteom ein dynamisches, sich ständig veränderndes Gebilde. Unter „Proteomics“ versteht man die Untersuchung ganzer Proteome oder Subproteome in großem Umfang.

Die meisten Proteine der Zelle, insbesondere die Enzyme, unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau (Protein Turnover). Die Fähigkeit der Zelle bei Reaktion auf Umwelteinflüsse und Umweltstress ihre Proteinzusammensetzung zu ändern, stellt einen generellen Aspekt des Stoffwechsels dar. Ein gesteuerter und teilweise selektiver Protein Turnover gestattet den Organismen die Enzymmenge und das gesamte Enzymmuster einem veränderten Substanzangebot und/oder veränderten Umweltbedingungen, die stets mit neuen stoffwechselbiochemischen und –physiologischen Situationen gekoppelt sind, anzupassen (SCHLEE 1992).

Diese speziellen Veränderungen der Proteinmuster können mittels gelbasierter, quantitativer Proteomanalyse, wie der ein-dimensionalen oder zwei-dimensionalen Gelelektrophorese erfasst werden. Die gelbasierte quantitative Proteomanalyse erfasst die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Proteinmischung einer Zelle bzw. eines Gewebes, ohne dessen Aktivitätszustand während des Arbeitsablaufes berücksichtigen zu müssen.

### **1.2.1 Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese**

Die wichtigste Methodik der Proteomanalyse ist bis heute die zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die meisten Proteomdaten, die heute in der Literatur zu finden sind, wurden mittels der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese erhalten. Der Ablauf solcher Analysen lässt sich in verschiedenen Abschnitte einteilen (LOTTSPREICH 2009):

- Probevorbereitung
- Trennung der Proteine
- Quantifizierung der Proteine
- Datenanalyse
- Identifizierung und Charakterisierung der Proteine

Die erste zwei-dimensionale Gelelektrophorese erfolgte von SMITHIES und POULIK im Jahr 1956. Dabei wurde die Auftrennung von Serumproteinen auf einem Filterpapier als erste Dimension gebracht und in Kombination mit Stärkegel als die zweite Dimension verwendet (SMITHIES und POULIK 1956).

Polyacrylamid wurde für die Gelelektrophorese erstmals im Jahr 1959 von RAYMOND und WEINTRAUB eingesetzt.

Mit den Arbeiten von O'FARRELL und KLOSE im Jahr 1975 publizierten diese unabhängig voneinander erstmals die Analyse komplexer Funktionszusammenhänge von Proteinen mittels zwei-dimensionaler Elektrophorese, welche eine besonders gute Auftrennung lieferte, da die Proteine in zwei voneinander unabhängigen Schritten getrennt werden.

### **Die erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Dabei werden die Proteine am isoelektrischen Punkt, dem Ort an dem ihre Nettoladung Null ist, fokussiert. Die Proteine werden dabei nach ihren unterschiedlichen Ladungen differenziert.

### **Die zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Hierbei werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MW) aufgetrennt. Nun ist es möglich komplexe Proteinmischungen in ihren Einzelkomponenten darzustellen, welche nach der Detektion (z.B. Coomassie- oder Silberfärbung) auf dem 2D-Gel als einzelne Proteinpunkte zu erkennen sind.

Voraussetzung für die Untersuchung der Proteinmusters ist eine möglichst vollständige Isolierung der Proteine aus Zellen oder Zellenverbänden in Lösungen bei einer Minimierung anderer störender Inhaltsstoffe.

Dies wird durch den häufig verhältnismäßig geringen Proteingehalt und den hohen Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen, Proteasen, Stärke, Ölen und Polysacchariden (Zellwand) im Pflanzenmaterial erschwert. Einige Proteinklassen sind im vorliegenden denaturierten Zustand schlecht löslich, weshalb es zu Störungen im 2D-Gel Proteinmuster kommen kann. (GÖRG et al. 2000)

Erst in den letzten Jahren kam es zu einer enormen technologischen Verbesserung der Protein-Extraktionsmethode. Allerdings kann aufgrund der starken biochemischen Unterschiede innerhalb der Zellprotein-Klassen mit einer einzelnen Protein-Extraktionsmethode nicht das ganze Proteom dargestellt werden (ISAACSON et al. 2006).

Die Anwendung der Protein-Profilingtechniken zur vergleichenden Charakterisierung von Zellen wird in vielen Bereichen herangezogen.

Es ist eine weitverbreitete Methode, sowohl in der Umweltforschung als auch im Gesundheitssektor:

- Identifizierung von Sortenunterschieden (z.B.: einer Apfel- oder Tabaksorte; GOEBEL 1996, JI et al. 2008)
- zur Charakterisierung verschiedener landwirtschaftlicher Anbaumethoden, z.B.: bei Getreide oder Kartoffel; (LANGENKÄMPER et al. 2007, LEHESRANTA et al. 2007).
- In der pflanzenphysiologischen Stressforschung wurde die Modellpflanze *Arabidopsis sp.* unter verschiedenen Stressbedingungen getestet, z.B. Kältestress (AMME et al. 2006) oder Salzstress (JIANG et al. 2007).

Aber auch in der Medizin ist die Proteomanalyse kaum weg zu denken:

- Vergleich von Proteinmustern von Körperflüssigkeiten oder aus verschiedenen definierten Zuständen einer Zelle (HAUBITZ et al. 2005).
- Untersuchung verschiedener Proteine mittels bestimmter Proteinmarker, die für die Reaktion von Zellen auf Allergene verantwortlich sind (POSCH et al. 1997).
- In der Krebsforschung wurden mit Hilfe der Proteomics Analysen der Einfluss von Störungen des Zellzyklus auf die Tumorentwicklung nachverfolgt (SANCHEZ et al. 1997). Dadurch wird ein wichtiger Beitrag zur Früherkennung von Erkrankungen und der Entwicklung von Wirk- und Impfstoffen geleistet.

Vor allem durch technische Neuerungen und mit Hilfe der Bioinformatik werden in der Interpretation der Proteinmuster auf 2D-Gelen noch bessere Ergebnisse erlangt.

### **1.2.2 “Shotgun”-Proteomics**

Außerdem stehen neben der 2D-PAGE noch gelfreie Methoden für die Auftrennung von intakten Proteinen mit dem Massenspektrometer, mit gutem Auflösungsvermögen zur Verfügung (SHEVCHENKO et al. 1996; WILKINS et al. 1996, GLINSKI und WECKWERTH 2005b).

Die Massenspektrometrie stellt eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum dar. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der aus einer Substanzprobe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt wird, einem Massenanalysator, der die Ionen hinsichtlich des Masse- zu- Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) auftrennt und schließlich einem Detektor, der den Ionenstrom misst. (LOTTSPREICH 2009)

Die Massenspektrometer lassen sich hinsichtlich der verwendeten Ionenquelle und des Analysators klassifizieren. Je nach Kombination dieser beiden wichtigsten Elemente lässt sich der Einsatzbereich des Gerätes spezialisieren (GROSS 2004).

Shotgun Proteomics ist eine Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) gestützte Methode zur Analyse komplexer Proteingemische (YATES 2004). Diese basieren auf enzymatisch vorverdauten Peptiden und erlauben mit Probematerial (wenige  $\mu\text{g}$  Proteine) zu arbeiten und resultieren ein viel genaueres Ergebnis.

Mit Hilfe dieser alternativen Methoden könnten in Zukunft noch weitere Erkenntnisse in der Analyse des Proteoms von *Artemisia panicii* erlangt werden. Allerdings behandelt vorliegende Arbeit in erster Linie die oben erwähnten gelbasierten Methoden.

### 1.3 Zielsetzung

Nachdem bisher noch keine Studien zu den Protein-Profilen von *Artemisia panicii* durchgeführt wurden, ist es wichtig für weiterführende Forschung Grundlagen zu schaffen. Auf Grund der Seltenheit der Pflanze, kommt dieser besondere Bedeutung zu.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist eine vergleichende Charakterisierung des Proteoms von *Artemisia panicii* mit Hilfe des Protein-Profiling. Es gilt festzustellen, inwieweit das solitäre Pflanzenvorkommen am Westhang des Bisamberges und die nachgezüchteten Pflanzen im Botanischen Garten Wien eine einheitliche Formgruppe darstellen. Damit sollen die Grundlagen für ein Verpflanzungsexperiment der LIFE-Nature Projektes geschaffen werden.

Für die gesamte Untersuchung werden die in der Proteomforschung etablierten elektrophoretischen Methoden wie die eindimensionale (1D)-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese eingesetzt.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

#### 2.1.1 Probenentnahme

Zur Untersuchung wurden voll entwickelte Blätter herangezogen, um die phänotypische Varianz in den elektrophoretischen Bandenmustern möglichst gering zu halten (MAIER 1997).

Für die Bestimmung der Proteinmuster mittels Gelelektrophorese wurden folgende Blattproben von *Artemisia panicii* gezogen:

1. von Pflanzen am Standort Bisamberg
  - a.) im Gehölzsaum jeweils Sommer am 5. Juli 2009 und 20. Juli 2010 und Herbst am 10. September 2009 und 25. September 2010
  - b.) im offenen Rasenbereich jeweils Sommer am 5. Juli 2009 und 20. Juli 2010 und Herbst am 10. September 2009 und 25. September 2010
2. von Pflanzen, die für das Verpflanzungsexperiment im Versuchsgarten des Botanischen Gartens der Universität Wien am Rennweg gezogen wurden.  
Mutterpflanzen vom Standort Bisamberg wurden Wurzelsprosse entnommen. Aus den Wurzelsprossen wurden im Freilandbereich des Botanischen Gartens der Universität Wien weitere Generationen aufgezogen.  
Die Probeentnahme erfolgte im Herbst am 15. September 2009 und im Sommer 25. Juli 2010.
3. von im Glashaus Althanstrasse kultivierten Pflanzen
  - a.) im Kalthaus (minimale Temperatur: 7°C, maximale Temperatur: 25°C)
  - b.) im Warmhaus (minimale Temperatur: 20°C, maximale Temperatur: 35°C)Die Probeentnahme erfolgte im Herbst am 15. Oktober 2009

### 2.1.2 Probenaufbereitung und -lagerung

Die Blätter wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff gegeben, um den durch Protease verursachten Abbau der Proteine zu vermeiden. Für weitere Untersuchungen wurden die Pflanzenproben im Labor bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konserviert. Für die Gelelektrophorese wurden die Blätter entweder im Porzellanmörser in flüssigem Stickstoff homogenisiert oder mit einer Retsch-Mühle zerkleinert.

## 2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine

Zur Optimierung der Methode wurde ein vertikal benutztes „Minigel“ von der Firma Hoefer (Hoefer<sup>TM</sup> miniVE) mit einem Durchmesser von 1 mm genutzt. Die Benutzung dieses Gels bringt eine Zeit- und Materialersparnis. Darauffolgend wurden zur Erlangung der Ergebnisse die Proben auf den großen Gelen (Protean<sup>TM</sup> II) der Firma Biorad aufgetrennt.

### 2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach LAEMMLI (1970) wurde zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen verwendet. Durch die SDS-PAGE ist eine genaue Identifizierung der Proteine nicht möglich, aber in vielen Arbeiten (z.B. VIERLING et al. 1996) wurden die Molekulargrößen von diversen Enzymen identifiziert, an Hand dessen war eine schätzungsweise Zuordnung der Enzyme zu den vorgefundenen Banden möglich.

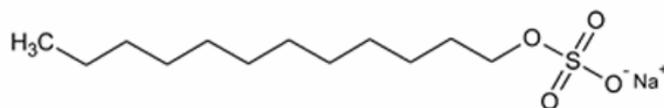


Abb. 4: Strukturformel von Natriumdodecylsulfat

Das Prinzip beruht auf der Anlagerung von SDS an die Proteine. SDS ist ein anionischer Emulgator und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und so zur

Denaturierung gebracht. Eine anschließende Aufspaltung der Disulfidbrücken unter Verwendung von  $\beta$ -Mercaptoethanol, einer reduzierenden Thiolverbindung führt zur Aufspaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur.

Das Trennmedium besteht aus Polyacrylamid-Gelen, welche durch die Copolymerisation von Acrylamid-Monomeren mit dem als Vernetzer fungierenden N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt werden. Sie zeichnen sich durch eine hohe mechanische und chemische Stabilität aus.

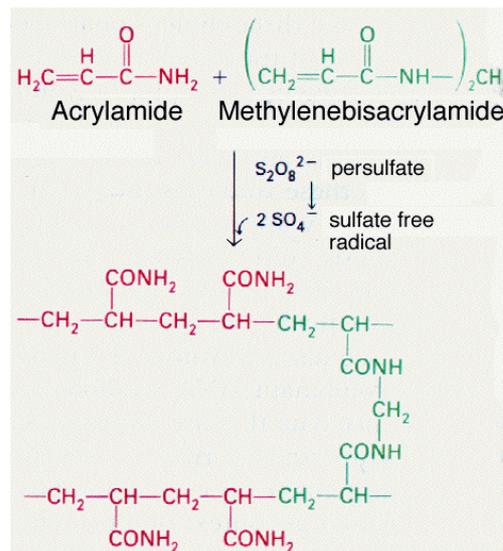


Abb. 5: Vernetzung von Acrylamid und Methylenbisacrylamid zu Polyacrylamid

Je nachdem, in welchem Größenbereich die aufzutrennenden Proteine liegen, können Gele mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acrylamid verwendet werden.

### 2.2.2 Gelanfertigung

Zur Vorbereitung der Kammern wurden die Glasplatten gründlich mit Ethanol und milliQ-Wasser gesäubert, damit sich keine Fremdpartikel auf der Glasplatte befinden, die das Ergebnis beeinträchtigen könnten. Danach wurden die ebenso mit Ethanol gereinigten „Spacer“ zwischen die Glasplatten gelegt und dicht befestigt. Das Trenngel und Sammelgel wurde nach den untenstehenden Tabellen angefertigt und für 10 min. in ein Ultraschallbad gegeben, um die von SDS hervorgerufenen Luftblasen entweichen zu lassen.

Zuerst wurde das Trenngel mit TEMED (Katalysator) und 10%iger, frisch angefertigter APS (Ammoniumpersulfat, Radikalbildner) versetzt und mit wassergesättigtem Butanol

überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, wurde das Sammelgel ebenfalls mit TEMED und 10%iger APS versetzt. Dann wurden die Kämme vorsichtig ins Sammelgel eingeschoben und das Gel über Nacht zur Auspolymerisation bei -4°C im Gefrierschrank gelagert.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde ein Hoefer™ (Mini-Gel) und Protean™ II System von Biorad (16x20 cm großes Gel) verwendet. 200 mg Frischgewicht des Blattmaterials wurden mit dem SDS-Probepuffer vermischt und für 3 min. bei 95°C unter Schütteln inkubiert. Als Molekulargewichtsmarker diente Roti®-Mark STANDARD.

Die Auftrennung der Proben erfolgte im Sammelgel bei einer Spannung von 120V, die beim Übertreten der Lauffront in das Trenngel auf 300V erhöht wurde. Im Trenngel wurde der Lauf abgebrochen, sobald die Bromphenolblau-markierte Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Zusammensetzung des Protein-Markers von Roti®-Mark STANDARD mit Molekulargewichten von 14,3-200 kDa:

<b>Protein</b>	<b>Organismus/Organ</b>	<b>Molekulargewicht (kDa)</b>
Myosin	Rind	200
Galaktosidase	<i>E. coli</i>	119
Serumalbumin	Rind	66
Ovalbumin	Huhn	43
Carboanhydrase		29
Trypsin Inhibitor	Soja	20
Lysozym	Huhn	14,3

### **Herstellung von SDS-PAGE Puffer nach LAEMMLI (1970)**

#### **Trenngelpuffer:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (100 ml)</b>
Tris	18,12 g (1,5M)
SDS	0,4 g (0,4%)
Mit HCl auf pH 8,8 einstellen!	

### **Sammelgelpuffer:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (100 ml)</b>
Tris	6,07 g (0,5M)
SDS	0,4 g (0,4%)
Mit HCl auf pH 6,8 einstellen!	

### **Laufpuffer (5x):**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (1000 ml)</b>
Tris	15,14 g (125mM)
Glycin	72,06 g (960mM)
SDS	5 g (5%)

### **Probepuffer:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (50 ml)</b>
Tris	1,51 g (250 mM)
SDS	4 g (8%)
Glycerol	10 ml (20%)
Milli Q	33 ml
Mercaptoethanol	2 µl (2%)

### **Acrylamidlösung:**

30 % Acrylamid  
0,8 % Bisacrylamid

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (1000 ml)</b>
Acrylamid	290 g
Bisacrylamid	8 g
Milli Q	Endvolumen (1000 ml)

### **Ammoniumpersulfat (APS) 10%:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (10 ml)</b>
Milli Q	Endvolumen 10 ml
APS	1 g

### **Gellösungen für 12,5% SDS-Gele:**

<b>Sammelgel</b>	<b>Mini-Gel</b>	<b>Groß-Gel</b>
Milli Q	3 ml	9 ml
Trenngelpuffer	1,25 ml	3,75 ml
Acrylamid	0,65 µl	1,95 ml
TEMED	5 µl	15 µl
10%APS	50 µl	150 µl

<b>Trenngel</b>	<b>Mini-Gel</b>	<b>Groß-Gel</b>
Milli Q	3,95 ml	16,84 ml
Trenngelpuffer	2,90 ml	12,42 ml
Acrylamid	4,73 ml	20,16 ml
TEMED	7,29 µl	31 µl
10%APS	54,6 µl	232 µl

### 2.2.3 Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese

Um die Auftrennung der Proteine von *Artemisia panicii* zu erhöhen wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese (O'FARRELL 1975, KLOSE 1975) angewandt.

Die Proteingemische werden aufgrund zwei voneinander unabhängiger Kriterien getrennt. In der ersten Dimension wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt in der isoelektrischen Fokussierung (IEF) und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht über die Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Die Trennleistung war daher um ein Vielfaches höher als bei der ein-dimensionalen Gel-Elektrophorese.

Im Laufe der Untersuchungen wurde eine Methode zur Nutzung einer zwei-dimensionalen (2D) Gelelektrophorese etabliert und für die Proteomuntersuchungen an *Artemisia panicii* optimiert.

Es existiert kein allgemeingültiges Rezept, das die Proteine aus Proben verschiedener Herkunft gleichermaßen gut auftrennt, daher wurde die Etablierung einer für *Artemisia panicii* geeignetsten Methode notwendig.

#### **Probepvorbereitung**

Für die 2D Gelelektrophorese, bei der hochkomplexe Proteingemische aufgetrennt werden, ist die wichtigste Vorbereitung für reproduzierbare Ergebnisse die korrekte Probepvorbereitung. Häufig enthalten die Proben eine Reihe störender Substanzen, wie Lipide, Polysaccharide, Nukleinsäure und feste Partikel.

Um die Ausbeute der Gesamtproteinmenge zu erhöhen, wurde in erster Linie die Menge an Material verändert. 200 mg Frischgewicht Blattmaterial wurde auf 1000 mg erhöht.

Zur Probepvorbereitung wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden getestet, um den optimalen Proteingehalt zu extrahieren.

## **2.2.4 Proteinfällung**

Voraussetzung für die Untersuchung des Proteinmusters ist eine möglichst vollständige Isolierung der Proteine.

Dies wird durch den häufig verhältnismäßig geringen Proteingehalt und den hohen Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen in den Blätter erschwert (LOOMIS 1972).

### **2.2.4.1 Trichloressigsäure (TCA)/Aceton-Fällung**

Die TCA/Aceton-Fällung ist eine sehr schnelle und einfache Fällungsmethode. Sie ist irreversibel und sehr effizient. Für diese Methode wurden 4 ml 10%iges TCA/0,07% 2-Mercaptoethanol in Aceton mit 200 mg Probematerial vermischt und für eine Stunde bei -20°C inkubiert (DAMERVAL et al. 1986). Anschließend wurden die Proben für 15 min. bei 14000g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Proteinpellet ein zweites Mal in 10%igem TCA/Aceton resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dieser Vorbehandlung ist die Probe bereit für die Aceton-Proteinfällung.

Das mit TCA/Aceton vorbehandelte Protein wurde mit 10%igem, -20°C kaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 20 min. bei einer Temperatur von 4°C und 15000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag kurz auf einem Filterpapier luftgetrocknet. Das so erhaltene Proteinpellet wurde vorsichtig in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit dem Rehydrationspuffer versetzt. Das Pellet wurde in Suspension gebracht, für 30 sek. gemixt (vortexen), nochmals abzentrifugiert und der Überstand für die isoelektrische Fokussierung (IEF) bereitgestellt.

Um die Proteinmenge festzustellen ist es notwendig zuvor eine Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD 1976) durchzuführen.

### **2.2.4.2 Phenol-Proteinfällung**

Für die Phenol-Fällung wurden 300 mg Frischgewicht in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 1500 µl Methanol-Chloroform-Wasser Puffer (2,5:1:0,5) für 20 min. bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend bei 14000g, 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt dient dazu, die wasserlöslichen Metaboliten aus der Probe zu

isolieren und zu entfernen. Durch das Entfernen der oft in höherer Konzentration vorliegenden Metaboliten ist später eine klarere Auftrennung der in der Probe verbleibenden Proteine gewährleistet.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 800 µl Extraktionspuffer suspensiert. Die Proteinsuspension wurde in einen Glashomogenisator transferiert und für 3-5 min. möglichst blasenfrei homogenisiert. Daraufhin in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß für 20 min. geschüttelt, mit 800 µl Phenol-Puffer (Rothi®-Phenol) versetzt und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension nochmals bei 14000g, 4°C abzentrifugiert. Die obere Phenolphase wurde mit fünffacher Menge kaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben 20 min. bei 15000g, 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das ausgefallene Protein mit reinem Methanol dreimal gewaschen.

Das Proteinpellet wurde vorsichtig in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit dem 2D-Puffer versetzt. Um das Pellet vollständig zu lösen hat es sich bewährt, es mit einem Hartgummistab vorsichtig zu zerreiben, oder das Eppendorf-Reaktionsgefäß für halbe Stunde bei 4°C rotieren zu lassen. Danach wurde der Überstand abgenommen und für die IEF bereit gestellt. Um die Proteinmenge festzustellen ist vorher eine Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD 1976) zu machen.

#### **Phenol-Extraktionspuffer:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (50 ml)</b>
EDTA	375 mg (25mM)
SDS	500 mg (1%)
Tris pH 7,5	605 mg (10mM)
Saccharose	15 g (30%)
Mercaptoethanol	1 ml (2%)
Protease	5 µl ( 0,1%)

Das Wanderungsverhalten eines Proteins im Gel hängt im Wesentlichen vom Grad der Denaturierung der Strukturform des Proteins ab. Die Denaturierung des Proteins erreicht man einerseits mittels der in der Pufferlösung enthaltenen SDS und Hitze. Die mögliche Ursache für eine nicht so gute Auftrennung könnte in unzureichendem Erhitzen der Probe bestehen. So wäre zu erwarten, dass die Proteine, nach längerem Erhitzen, durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und Disulfidbrückenbindungen durch die im Puffer enthaltenen Reduktionsmittel denaturiert vorliegen und dann als gut abgegrenzte Banden auf den Gelen sichtbar werden.

Eine dieser Theorie entsprechende Verlängerung der Erhitzungsdauer führte nicht zu dem erwarteten Erfolg: Bei den bearbeiteten Proben wurde selbst nach 5 minütigem Erhitzen keine bessere Auftrennung erzielt.

Daraufhin wurden die Proben direkt mit Probepuffer (z.B. LEHMANN et al. 2008) vermischt, um das Gesamtprotein zu extrahieren. Diese schnelle Methode erwies sich letztendlich als optimal. Nach einer entsprechenden Zahl an Vorversuchen wurden letztlich alle Proben nach dieser Methode behandelt und zeigten eine gute Reproduzierbarkeit.

### **2.2.5 Vergleich der Extraktionsmethoden „Proteinfällung“**

In vielen Publikationen ist zu lesen, dass die Pflanzenproteine mit einem Extraktionspuffer extrahiert, anschließend mit einem SDS enthaltenden Probepuffer vermischt auf das Gel aufgetragen und die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden (GÖRG et al. 2005, SARAVANAN et al. 2004, SARRY et al. 2004, MALDONADO et al. 2008, SHULTZ et al. 2005).

Die oben genannte Methode erwies sich für das vorliegende Probematerial als ungeeignet. Als Ergebnis waren keine Banden zu erkennen und die Vermutung fiel zuerst auf die Probe verunreinigende, ungelöste Aggregate. Daher wurden zur Aufreinigung bzw. Aufkonzentration der Proteine die Proben nochmals mit verschiedenen Chemikalien, wie Aceton (um die Lipide zu entfernen), TCA/Aceton (entsalzen oder nochmals aufreinigen; DAMERVAL et al. 1986) behandelt und erst im Anschluss mit dem Probepuffer vermengt und aufgetragen.

Auch diese zusätzlichen Behandlungen der Proben erwiesen sich nicht als optimale Methode für die SDS-PAGE, da die Banden auf den Gelen nur verschmiert zu sehen waren.

### **Phenolische Extraktion**

Sie gilt als äußerst effektive Methode, da Proteine aus vielen verschiedene Pflanzen, wie z.B. Kartoffel oder Gras damit extrahiert wurden (Tal ISAACSON et al. 2006, WANG et al. 2003, SARAVANAN et al. 2004, DELAPLACE et al. 2006).

Die Trennung der Proteine von *Arabidopsis sp.* mit diesem System erreichte eine bemerkenswert gute Auflösung. Für *Artemisia panicii* waren die Versuche weniger erfolgreich.

## **TCA/Aceton**

Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Probe nach dem Zellaufschluss schnell in einem denaturierenden Puffer (TCA/Aceton) aufgenommen wird, ohne dass Proteasen aktiv werden können (SARAVANAN et al. 2004, WANG et al. 2003, NATARAJAN et al. 2006, GÖRG et al. 2004, XU et al. 2008, SHULTZ et al. 2005).

Für *Artemisia panicii* stellte sich diese Methode ebenfalls als sehr effizient heraus. Sie führte zu einer höheren Anzahl an Proteinspots als die davor getestete Extraktionsmethode.

## **2.2.6 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)**

Die mit Aceton gefällten Proteine wurden mit Rehydrationspuffer versetzt und für kurze Zeit gemischt. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 12000g und 4°C um ungelöste Bestandteile zu entfernen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben auf ein Endvolumen von 300-400 µg Gesamtprotein/300 µl Rehydrationspuffer-Lösung eingestellt.

Zur Entfernung des Salzes wurde die Probe in Tris/HCl (pH 8) dialysiert. Hierfür wurde das gelöste Proteingemisch in einen semipermeablen Dialyseschlauch gefüllt, der verschlossen und in ca. einen Liter Dialysepuffer gelegt wurde. Die Dialyse erfolgte unter Rühren bei 4°C über 15 h mit zweimaligem Pufferwechsel, um den Konzentrationsgradienten aufrecht zu erhalten.

Das entsalzte Proteingemisch wurde in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Methanol/Chloroform/Wasser-Gemisch gewaschen und abzentrifugiert und danach noch einmal mit Methanol gewaschen.

Die Probe wurde in die IPG-Kammer pipettiert und die IPG-Strips mit immobilisiertem pH-Gradient (ReadyStrip, BioRad, 18 cm, pH 3-10, NL) vorsichtig mit der Gelseite nach unten über die Probenlösung aufgelegt, so dass sich die Probe über den gesamten Strip blasenfrei verteilte. Anschließend wurde der Strip mit 1 ml Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Die isoelektrische Fokussierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Rehydrierung 12 h mit 50V, dann 2 h mit 500V, 1 h mit 1000V und anschließend für 12 h auf 8000V. Zum Schluss wurde die Spannung von 50V gehalten, damit die Proteine auf ihrer Position blieben.

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Strips entweder sofort für die SDS-PAGE verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

### Optimierung der IEF

Mehrmals trat beim IEF-Schritt das Problem auf, dass der Durchlauf aufgrund zu hoher Salzkonzentrationen stockte. In diesem Fall mussten die bereits im Rehydrationspuffer aufgelösten Proteine, einer Dialyse unterzogen werden. Bei dieser Methode nutzt man eine semipermeable Membran, die für Proteine nicht passierbar ist, aber anorganische Salze und andere niedermolekulare Verbindungen durchlässt.

### **Rehydrationspuffer**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (10 ml)</b>
Urea	4,2 g (7M)
Thiourea	1,5 g (2M)
CHAPS	2 mg (2%)
EDTA	1 mg (1%)
DTT	50 µl von 1M DTT (50mM)
Ampholin	50 µl (2%)

### **2.2.7 SDS-Gelelektrophorese (2. Dimension)**

Im ersten Schritt wurden die Strips in jeweils 10 ml Äquilibrierungspuffer mit 200 mg Dithio-threitol (DTT) für 15 min. bei Raumtemperatur in Glasröhrchen geschüttelt. Durch die DTT Zugabe wurden die Proteine in ihrem reduzierten Zustand gehalten. Der Überstand wurde verworfen und der Schüttelvorgang mit 10 ml Äquilibrierungspuffer und 250 mg Iodoacetamid (IAA) wiederholt. Das Iodoacetamid verhindert durch Alkylierung der Thiol-Gruppen eine Reoxidation der Proteine während der Elektrophorese.

Das Trenngel wurde mit 0,5%iger, warmer, flüssiger Agarose in einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS) und einigen Körnern Bromphenolblau überschichtet, um einen besseren Übergang vom Strip in das Acrylamidgel zu ermöglichen. Markerproteine wurden auf dem Acrylamidgel neben dem Strip bei der Position „pH 3“ platziert.

### **Äquilibrierungspuffer**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (100 ml)</b>
Urea	36 g (8M)
20% SDS	10 ml (2%)
1,5M Tris/HCl, pH 8,8	3,3 ml (0,05M)
50% Glycerol	40 ml (20%)
MilliQ	Endvolumen (100 ml)

Die Trennung der Proteine nach Größe erfolgte im Laufpuffer bei 10°C für ca. 7-8 h bei einer konstanten Stromstärke von 45mA.

### 2.3 Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD 1976)

Die Bradford-Methode wird allgemein als Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen eingesetzt.

Die Bestimmungsmethode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau „G250“ von 465 nm auf 595 nm in Gegenwart von Proteinen.

Grund dafür ist die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner anionischen Form durch Bindung an Arginyl-Reste von Proteinen. Durch Messung der Absorption bei 595 nm wird die Menge des gebundenen Farbstoffes quantifiziert. Zur Proteinbestimmung wurde zuerst eine Verdünnungsreihe eines Standards (1:10; 1:100; 1:1000) erstellt und die Absorption photometrisch bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer Eichkurve (BSA) ermittelt.

#### **Bradford-Reagenz:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (500 ml)</b>
Coomassie Brilliant Blue „G250“	250 mg (0,05%)
Ethanol (99%)	25 ml (5%)
Phosphorsäure (85%)	50 ml (10%)
Milli Q	425 ml

Zuerst wurde Coomassie Brilliant Blau mit reinem Ethanol vermischt und erst dann die anderen Chemikalien beigemischt. Nach gründlicher Filtrierung kann es bei -4°C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

### 2.4 Proteinfärbung

Zur Visualisierung der elektrophoretischen Trennung der Proteine in den Gelen erfolgte die Detektion mit verschiedenen Färbemethoden. Die Wahl der Färbemethode richtete sich nach der zu erwartenden Proteinmenge bzw. der Empfindlichkeit der Methode. Die populärste Färbemethode ist mit Coomassie-Blau. Die Nachweisgrenze liegt bei 100 ng

Proteine. Eine 100fach empfindlichere Methode ist die Silberfärbung. Diese erlaubte Proteinmengen, die im 10 ng Bereich liegen (LOTTSPREICH 2009).

### 2.4.1 Färbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blue

#### Färbung mit Coomassie „R250“

Für die Coomassie-Färbung müssen zuerst Färbelösung und Entfärber angesetzt werden.

##### Färbelösung

Reagenz	Menge (1000 ml)
Ethanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
Coomassie Brilliant Blue „R250“	1 g
Milli Q	500 ml

##### Entfärber

Reagenz	Menge (1000 ml)
Ethanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
Milli Q	500 ml

Das Trenngel wurde vorsichtig in Coomassie Färbelösung gelegt und über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel in den Entfärber transferiert und entfärbt. Der Entfärber wurde dabei jede zweite bis dritte Stunde erneuert. Um eine gute Bandenfärbung neben nur schwacher Hintergrundfärbung zu bekommen, wurde das Gel schließlich in 10% Essigsäure gelegt und darin aufbewahrt.

#### Färbung mit Coomassie „G250“ nach Neuhoff (1988)

Das Trenngel wurde vorsichtig in die Fixierlösung (50% Ethanol, 10% Essigsäure) gelegt und für 30 min. unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend zweimal mit MilliQ-Wasser gewaschen. Das Gel wurde in die Inkubationslösung transferiert und über Nacht unter leichtem Schütteln gefärbt. Zum Entfärben des Gels wurde mehrmals in MilliQ-Wasser gewaschen.

## **Färbelösung für die Coomassie „G250“**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (1000 ml)</b>
Methanol	500 ml (50%)
Phosphorsäure	100 ml (10%)
Coomassie „G250“	1,2 g
Ammoniumsulfat	100 g
Milli Q	800 ml

### **2.4.2 Silberfärbung nach Blum (1987)**

Diese Methode ist um ein Vielfaches empfindlicher als die Coomassie-Blau Methode. Die Nachweisgrenze liegt bei 5-10 ng. Die Gele wurden über Nacht in den Fixierungspuffer bei Raumtemperatur eingelegt und am nächsten Tag mit 30%igem Ethanol jeweils für 20 min. gewaschen. Es folgte eine kurze Vorbehandlung des Gels in einem Sensitivierungspuffer für ca. 1 min. Das Gel wurde anschließend dreimal mit MilliQ-Wasser gewaschen und zur Imprägnierung für 20 min. in der Färbepuffer-Lösung inkubiert. Daraufhin wurde das Gel in einem Entwicklungspuffer für 4 min. inkubiert. Durch das wiederholte Waschen mit MilliQ-Wasser wurde freies Silbernitrat entfernt. Anschließend kommt das Gel für 10 min. in eine Stopppuffer-Lösung und um die dadurch hervorgerufene starke pH-Änderung zu beenden, erfolgte noch ein abschließender Waschschrift mit MilliQ-Wasser.

#### **Fixierungspuffer:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (1000 ml)</b>
Ethanol	100 ml (10%)
Essigsäure	400 ml (40%)
Milli Q	500 ml

#### **Sensitivierungspuffer:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (1000 ml)</b>
Natriumthiosulfat	200 ml (0,02%)
Milli Q	1000 ml

#### **Färbepuffer:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge (500 ml)</b>
Silbernitrat	1 g (0,02%)
Formaldehyd	5 mg (0,0005%)
Milli Q	499 ml

### Entwicklungspuffer:

Reagenz	Menge (1000 ml)
Natriumcarbonat	30 g (3%)
Natriumthiosulfat	5 mg (0.0005%)
Formaldehyd	500 µl (0,05%)
Milli Q	1000 ml

### Stoppuffer:

Reagenz	Menge (1000 ml)
Glycin	5 g (0,5%)
Milli Q	995 ml

## 2.5 Charakterisierung der Proteinmuster

Die Auftrennung und Interpretation der Proteinmuster von *Artemisia panicii* stellte eine große Herausforderung dar, da die Menge an verfügbarem Probematerial saisonal beeinflusst und darüber hinaus nur in geringen Mengen vorhanden war.

Um letztendlich ein vollständiges Proteinmuster zu erhalten, ist es zunächst notwendig eine möglichst gute und optimierte Extraktionsmethode herauszuarbeiten. Da das Proteom von *Artemisia panicii* bisher noch nicht erforscht wurde, stellte sich am Anfang der Experimente als besonders schwierig heraus, die geeignetste Extraktionsmethode zu ermitteln. Im Gegensatz dazu, wurden bei der Heilpflanze *Artemisia vulgaris*, die der gleichen Gattung angehört, wegen der allergieauslösenden Stoffe schon viel früher die Aufmerksamkeit auf die Proteinforschung gerichtet (EDELHANN 1991).

Die Versuche zum Ende der Experimente Proben von allen Standorten auf einem Gel vergleichend aufzubringen, hatten nur wenig Erfolg gebracht. Alle Proben gleichzeitig gut aufzutrennen ist kaum gelungen, da immer ein Band durch Störfaktoren stark geschmiert hat. Die Ursache für die verschwommene Auftrennung der Proteinbanden ist durch die Lagerung im gefrorenen Zustand erklärbar. Nach dem Auftauen zeigten sich weiße Niederschläge, die auf ausgefallene SDS zurückzuführen sind.

## 2.6 Gelfreie massenspektrometrische Methode

Eine genauere Charakterisierung erfolgte im Anschluss, und auch als Ausblick auf weitere Untersuchungen, mittels shot-gun Methode unter der Verwendung von „Proteom Discoverer“ und „ProtMAX“.

Die shot-gun Methode bringt im Vergleich zu gelelektrophoretischen Methoden eine deutliche Zeitersparnis und außerdem eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Da das Proteom von *Artemisia panicci* noch nicht sequenziert wurde, könnte man durch den full scan der shot-gun Methode bestimmte Homologien mit den anderen Pflanzen erfassen.

### 2.6.1 nanoLC-MS-basierte Shotgun-Proteinanalyse

Dem homogenisierten Pflanzenmaterial (10 mg) wurde 500 µl Ureapuffer zugegeben und über Nacht bei 37°C in einem „Shaker“ inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min. bei 14000g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert.

#### Ureapuffer:

Reagenz	Menge (10 ml)
Urea	4,8 g
Ammonium-Bicarbonat	78 mg
Milli Q	10 ml

Der Überstand wurde entnommen und die Proteinmenge mittels Bradford bestimmt. 200 µl wurde entnommen und mit 2 µl Lys-C Endoprotease (1:100 v/v, Roche, Mannheim, Deutschland) über Nacht bei 37°C in einem „Shaker“ inkubiert. Die Probe wurde anschließend 1:4 mit dem Trypsin-Puffer verdünnt.

#### Trypsin-Puffer :

Reagenz	Menge (10 ml)
Calciumchlorid	50 µl
Ammonium-Bicarbonat	2,5 ml
Acetonitril	1 ml
Milli Q	6,4 ml

Danach wurde Trypsin im Verhältnis 1:10 bis 1:50 v/v zugefügt und über Nacht bei 37°C im Inkubator unter langsamem Drehen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 4°C für 8 min. zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die verdauten Proteine, welche vorsichtig abpipettiert wurden.

Die erhaltenen Peptide wurden entsalzt und die Probe anschließend im Speed-vac einrotiert. Die so erhaltenen Proteinpellets wurden bis zur Messung bei -20°C im Tiefkühlschlank aufbewahrt.

Maximal 50 µg des verdauten Gesamtproteins wurden vor der massenspektrometrischen Analyse in 0,1% Ameisensäure und 5% Acetonitril gelöst. Die Peptide wurde anschliessend auf einem Orbitrap LTQ XL Massenspektrometer gemessen. Die Rohdaten wurden mittels „Proteome discoverer“ (Thermo Electron, Bremen, Deutschland) einer Datenanalyse und einer Proteinidentifizierung unterzogen.



## 3 Ergebnisse

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung des gesamten Proteinmusters vom *Artemisia panicii*. Das verwendete Pflanzenmaterial stammt vom Standort Bisamberg und aus dem botanischen Garten der Universität Wien.

Phänotypisch konnten zwischen den verschiedenen Ökotypen am Bisamberg morphologische Unterschiede bezüglich der Größe und Vitalität der Blätter festgestellt werden. Die Blätter, der am offenen Standort wachsenden Pflanzen sind deutlich kleiner als die der Pflanzen im Gehölzsaum. Allerdings konnten keine wesentlichen Abweichungen bei Verzweigung, Form und Behaarung der Blätter festgestellt werden. Bei der Probeabnahme im Sommer 2009 konnten deutlichere Unterschiede beobachtet werden als im Sommer 2010.

### 3.1 Protein-Profiling

#### 3.1.1 Protein-Profiling mit SDS-PAGE

Für das Protein-Profiling wurden vollständig entwickelte Blätter von *Artemisia panicii* entnommen.

Nach der Probeentnahme an den verschiedenen Standorten wurden die Blätter direkt in flüssigem Stickstoff konserviert und im Labor bis zur Verarbeitung bei -80°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Ein ausgereiftes Blatt der Pflanze wiegt ca. 150 mg – 200 mg. Zunächst wurde das Blattmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zermahlen, dann nochmals gefriergetrocknet und direkt mittels Probepuffer (siehe Kapitel Methode) extrahiert. Anschließend erfolgte die Denaturierungen der Proteine durch kurzzeitiges aufkochen der Probe. Die Proteinextrakte wurden auf einem 12% SDS-PAGE Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Es wurden zuerst Proben von Pflanzenmaterialien jeweils von einem der Untersuchungsstandorte separat auf je einem Gel aufgetrennt. Nachdem erste Ergebnisse vorlagen, wurden dann alle Proben zum besseren Vergleich auf einem Gel gemeinsam analysiert. Die Ergebnisse sind nachfolgend als Abbildungen beigelegt.

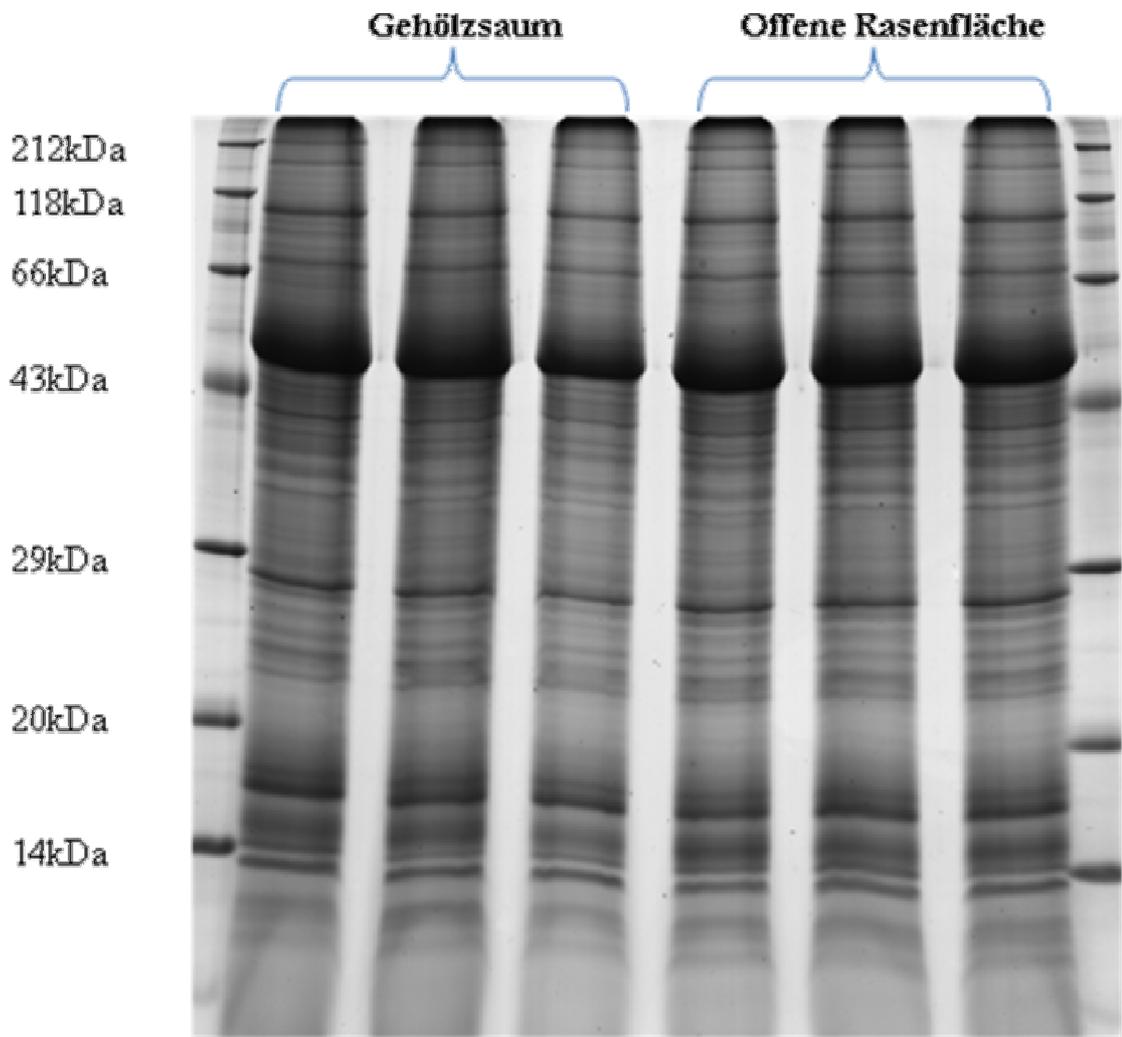
### 3.1.1.1 Protein-Profiling von Pflanzen am Standort Bisamberg

Mit den verfügbaren Proben aus der Aufsammlung im Sommer 2009 von diesem Standort wurden mehrere Replikate angefertigt, die eine gute Reproduzierbarkeit gezeigt haben.

In Abbildung 6 sind beispielhaft die Proteinmuster von sechs verschiedenen Blättern von *Artemisa panicii* vom Standort „Gehölzsaum“ und „offene Rasenfläche“ am Westhang des Bisambergs nach dem Molekulargewicht der Proteine aufgetrennt, dargestellt. Drei Blätter stammen von Pflanzen des Gehölzsaumes und drei von der offenen Rasenfläche. Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigten trotz phänotypischer Differenzierungen, im elektrophoretischen Proteinmuster, bei zeitgleichen Versuchen, im Bandenmuster von Parallelproben und Vergleichsansätzen nur Unterschiede in der Intensität einiger Banden. Die Proteinbanden wurden mittels Färbetechnik Coomassie-Blau „G250“ gefärbt.

Im Gesamtproteinmuster wurden 23 Banden detektiert dabei sind 17 leichte Banden und 6 stärkere.

- genau bei 212 kDa und direkt unterhalb zwei scharf abgegrenzte Banden
- unter 118 kDa eine stärker ausgeprägte Bande
- ca. bei 43 kDa eine sehr stark ausgeprägte Bande
- zwischen 43 kDa und 29 kDa viele schwach ausgeprägte Banden
- zwischen 29 kDa und 20 kDa eine starke und 5 schwächere Banden
- zwischen 20 kDa und 14 kDa Banden weniger scharf abgegrenzt, eine dicke Bande und zwei weniger starke Banden



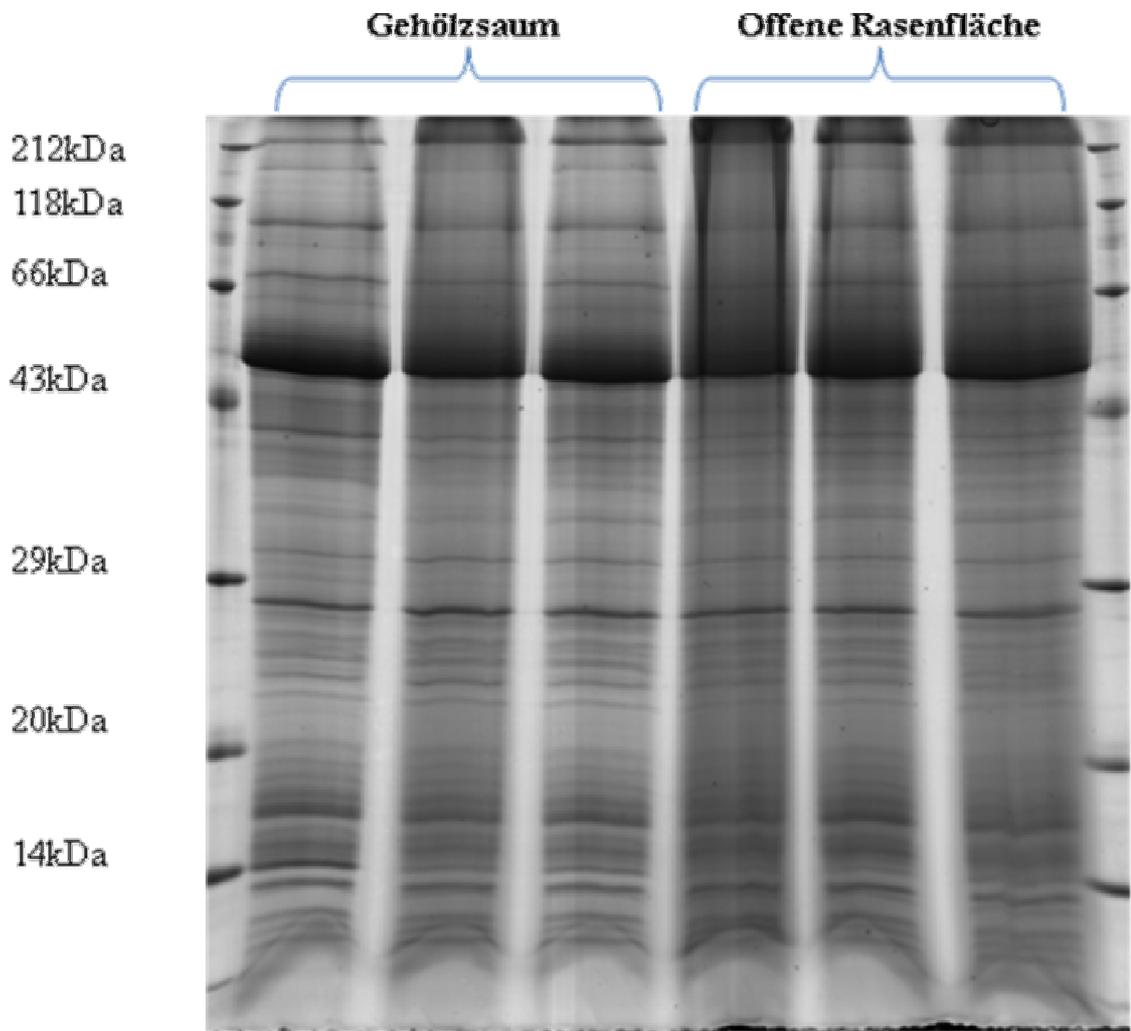
**Abb. 6:** Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß (*Artemisia panicii*) im Sommer 2009 am Standort Bisamberg. Links drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen im Gehölzsaum, rechts drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen der offenen Rasenfläche.

In Abbildung 7 werden beispielhaft sechs Blätter von Pflanzen verglichen die im Herbst beprobt wurden. Drei Blätter stammen von Pflanzen von *Artemisa panicii* vom Standort „Gehölzsaum“ am Westhang des Bisambergs und drei von der offenen Rasenfläche.

Die Gele zeigten trotz phänotypischer Differenzierungen der Pflanzen einheitliche Muster: Standort und Umweltbedingung scheinen sich nur in der Intensität der Banden niederzuschlagen, im Bandenmuster selbst ist ein Einfluss des vorherrschenden Mikroklimas praktisch nicht zu erkennen.

Im Gesamtproteinmuster sind 31 Banden ausgeprägt; 23 leichte Banden und 8 stärkere.

- genau bei 212 kDa und direkt unterhalb zwei scharf abgegrenzte Banden
- unter 118 kDa eine stärker ausgeprägte Bande
- ca. bei 43 kDa eine sehr stark ausgeprägte Bande
- zwischen 43 kDa und 29 kDa viele schwach ausgeprägte Banden
- zwischen 29 kDa und 20 kDa eine starke und 6 schwächere Banden
- zwischen 20 kDa und 14 kDa sind die Banden weniger scharf abgegrenzt, man erkennt eine dicke Bande und zwei weniger starke Banden



**Abb. 7:** Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß (*Artemisia pancicii*) im Herbst 2009 am Standort Bisamberg. Links drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen im Gehölzsaum, rechts drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen der offenen Rasenfläche.

### 3.1.2 Protein-Profilung von im Glashaus Althanstrasse kultivierten Pflanzen

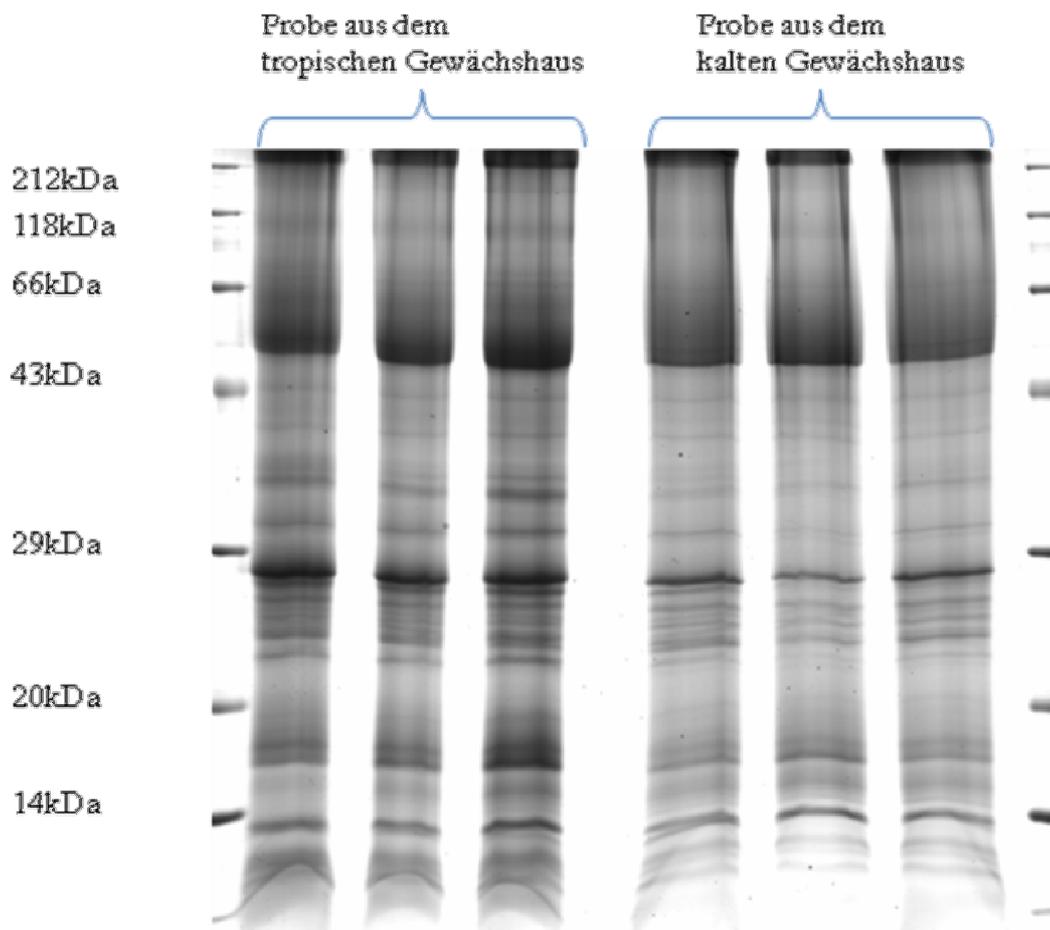
Mit den verfügbaren Proben aus der Aufsammlung im Herbst 2009 von diesem Standort wurden mehrere Replikate angefertigt, die eine gute Reproduzierbarkeit gezeigt haben.

In Abbildung 8 sind beispielhaft die Ergebnisse von Pflanzenmaterial aus dem Glashaus (Althanstrasse) der Universität Wien zu sehen. Durch die extremen Temperaturunterschiede, die die Pflanzen zu bewältigen haben, unterscheiden sie sich bereits in ihrem Phänotypus. Im Gewächshaus mit tropischen Klimabedingungen wurden die Blätter viel üppiger und breitlappiger als jene im Gewächshaus mit temperatem Klima. Die Muster der Pflanzenproteine aus dem Tropenhaus (Warmhaus) und aus dem Kalthaus wurden verglichen.

Beide Proben zeigen jeweils sehr ähnliche Muster. Die Proteinmuster der Proben aus dem Glashaus zeigen im Vergleich zur Freilandprobe vom Bisamberg teilweise unterschiedliche Stärken der Banden. Eine Varianz in der Bandenstärke legt Rückschlüsse auf eine unterschiedliche Menge an Protein nahe. Insofern wäre in den Proben aus dem Glashaus eine vergleichsweise geringere Menge an Protein vorgelegen. Eine exakte Feststellung der Menge war allerdings nicht möglich, da der verwendete Probepuffer mit Bromphenolblau versetzt war und daher eine Messung nach Bradford ausgeschlossen war.

Im Gesamtproteinmuster wurden 17 Banden detektiert, dabei sind 11 leichte Banden und 6 stärkere erkennbar.

- zwischen 212 kDa und 66 kDa eine sehr schwach angefärbte Bande
- unter 118 kDa eine stärker ausgeprägte Bande
- ca. bei 43 kDa eine sehr schwach ausgeprägte Bande
- zwischen 43 kDa und 29 kDa drei mittelschwach ausgeprägte Banden
- zwischen 29 kDa und 20 kDa mehrere schwache Banden
- zwischen 20 kDa und 14 kDa zwei gut erkennbare Banden



**Abb. 8:** Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß (*Artemisia paniculata*) im Herbst 2009 von Gewächshauspflanzen. Links drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen im Warmhaus, rechts drei Proteinmuster von Blättern der Pflanzen im Kalthaus.

### **3.1.3 Protein-Profilung von Pflanzen aus dem Versuchsgarten des Botanischen Gartens der Universität Wien am Rennweg**

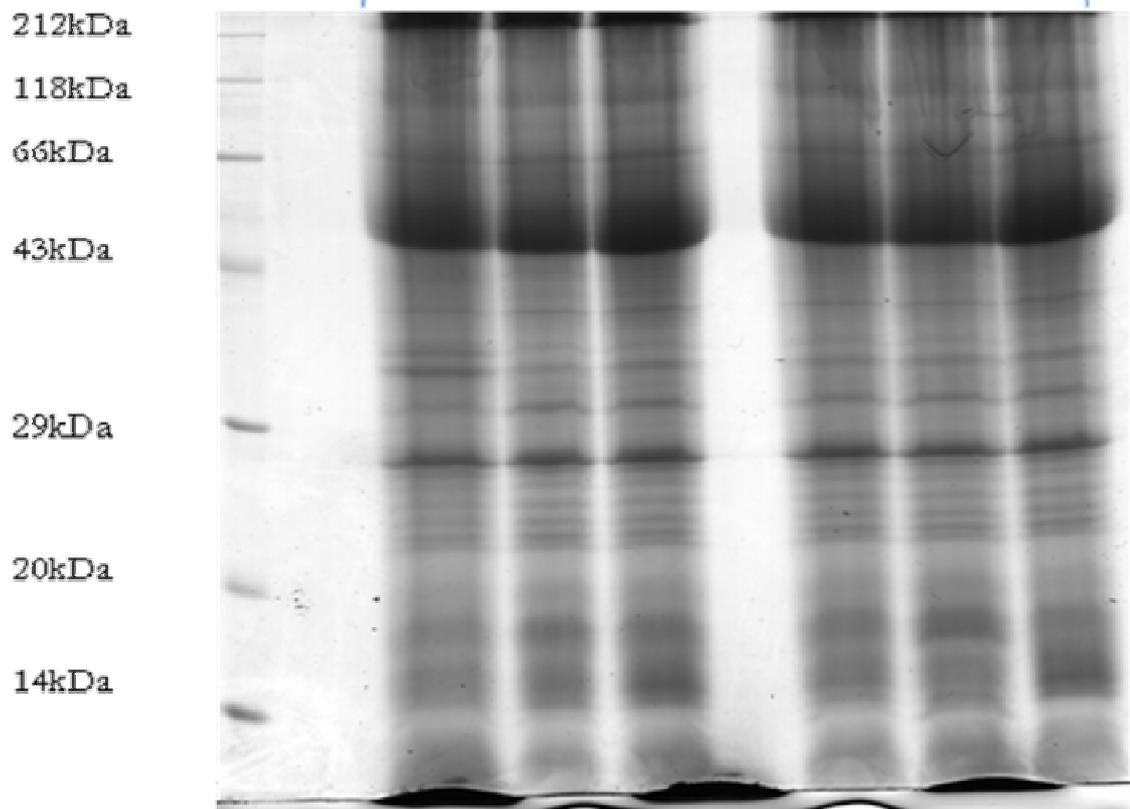
Mit den verfügbaren Proben aus der Aufsammlung im Herbst 2009 von diesem Standort wurden mehrere Replikate angefertigt, die eine gute Reproduzierbarkeit gezeigt haben.

Für das in Abbildung 9 beispielhaft gezeigte Gel wurden Proben von Pflanzenmaterial aus dem Versuchsgarten des Botanischen Gartens der Universität Wien verwendet. Alle sechs Blätter weisen etwas höhere Schmiereffekte als die Proben der Freilandpflanzen auf, dennoch sind die Banden gut erkennbar.

Im Gesamtproteinmuster wurde 17 Banden detektiert, dabei sind 15 leichte Banden und 2 stärkere erkennbar.

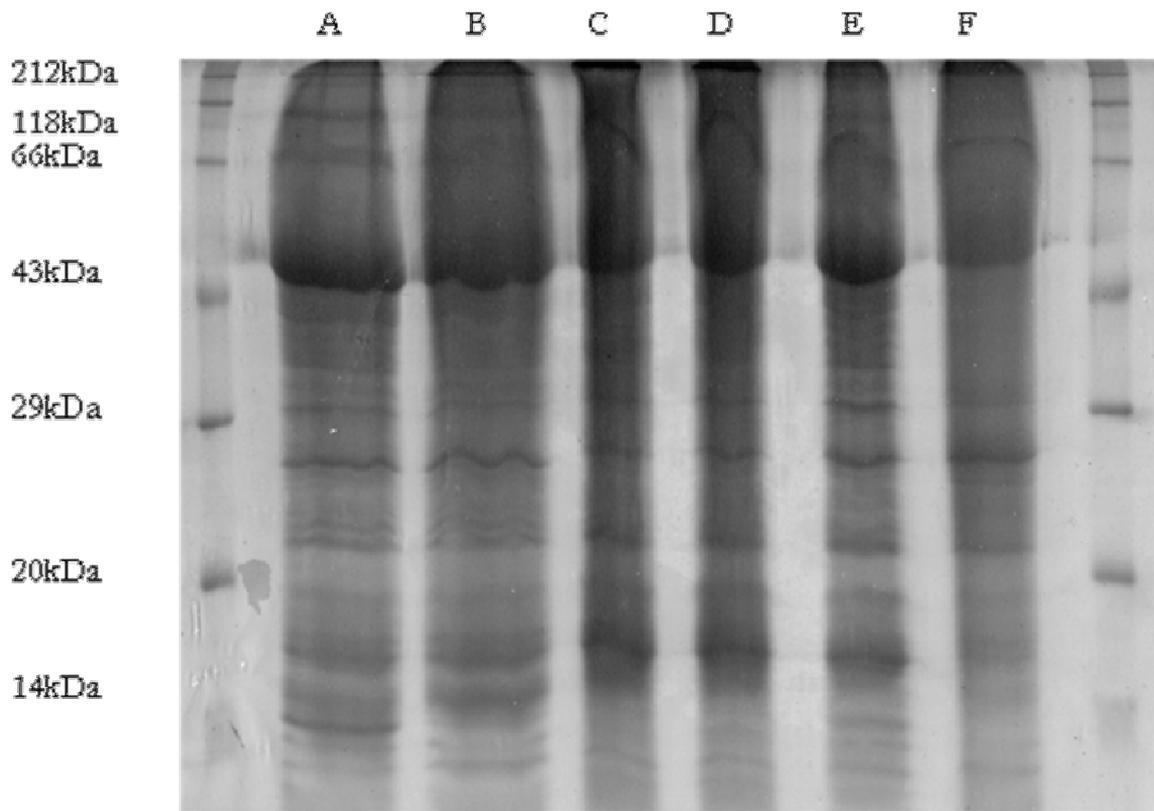
- zwischen 212 kDa und 66 kDa etwa drei sehr schwach angefärbte Banden
- zwischen 66 kDa und 43 kDa eine sehr stark ausgeprägte Bande
- zwischen 43 kDa und 29 kDa vier mittelschwach ausgeprägte Banden
- zwischen 29 kDa und 20 kDa eine stärkere Bande und mehrere schwache Banden
- zwischen 20 kDa und 14 kDa mehrere nicht scharf abgegrenzte Banden

Probe aus dem Versuchsgarten des  
Botanischen Gartens der Universität Wien



**Abb.9:** Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß (*Artemisia panicii*) im Herbst 2009 aus dem Versuchsgarten des Botanischen Gartens der Universität Wien.

Abbildung 10 zeigt ein Gel auf dem alle Proben, zu Vergleichszwecken, gemeinsam aufgetragen wurden. Die Proteine zeigen relativ einheitliche Muster, wenigstens in der niedrig auflösenden ein-dimensionalen SDS-Page. Alle stark ausgeprägten Muster sind in allen Proben gleichermaßen wiederzufinden. Die Probe aus dem botanischen Garten weist allerdings höhere Schmiereffekte auf. Die Gesamtproteinmuster sind bei den Proben aus dem Freiland (Gehölzsaum und offene Rasenfläche) am deutlichsten zu erkennen. Die vorliegenden Standort- und Umweltbedingungen scheinen sich nur in der Intensität der Banden, also der Menge eines bestimmten Proteins, niederzuschlagen, ein Einfluss auf das Bandenmuster selbst ist praktisch nicht zu erkennen.



**Abb.10:** Proteinmuster des Waldsteppen-Beifuß (*Artemisia paniculata*) von: Gehölzsaum (A), offene Graslandschaft (B), botanischer Garten der Universität Wien (C, D), tropisches Gewächshaus (E), kaltes Gewächshaus (F).

## 3.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

### 3.2.1 Vorversuch mit *Arabidopsis sp.*

Die Schwierigkeit in Bezug auf die 2D-Gelelektrophorese besteht in der Extraktion der Gesamtproteine, die eine möglichst reine Proteinprobe, mit nur einem geringen Anteil an anderen störenden Substanzen ergeben soll. Bei dem für diese Arbeit vorliegenden Pflanzenmaterial war dies sehr schwierig. Aufgrund der hohen Salzkonzentration war es zu Beginn der Optimierung kaum möglich die isoelektrische Fokussierung vollständig und unter vorgesehenen Bedingungen durchzuführen.

Wegen der Seltenheit der Pflanze und dem geringen Umfang des zur Verfügung stehenden Probematerials, wurde zur Optimierung der Extraktionsmethode die Versuchspflanze *Arabidopsis sp.* aus dem Gewächshaus (Althanstrasse) der Universität Wien herangezogen. Im Rahmen der Vorversuche wurden TCA/Aceton- und Phenol-Proteinfällungsmethoden ausprobiert. Es wurden sowohl Versuche zur ein-dimensionalen, als auch zur zwei-dimensionalen Gelelektrophorese unternommen. Es stellte sich heraus, dass die Anwendung der Phenolextraktion bei den Vorversuchen mit *Arabidopsis sp.* zu brauchbareren Ergebnissen geführt haben.

Aufgetrennt wurden aus 300 mg frischem Blattmaterial durch Phenolfällungsextraktion gewonnene Proteine. Die Proteinextrakte wurden in der ersten Dimension der isoelektrischen Fokussierung unterzogen, in der eine Auftrennung nach der Ladungseigenschaft der Proteine erfolgt. Im Anschluss wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gesamtauftragsmenge betrug 350 µg. Die Banden wurden mit Coomassie-Blau angefärbt.

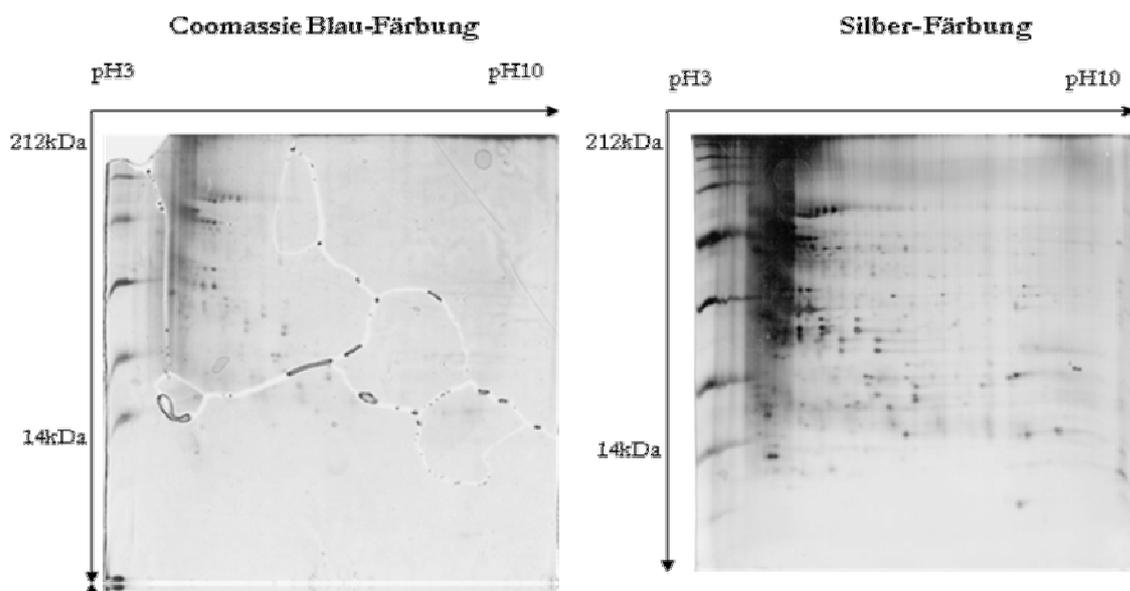
Bei der hier verwendeten Extraktionsmethode (Phenol-Extraktion) wurden die Proteine der Probe sehr gut isoliert. Daher zeigt das Gesamtproteinmuster der Versuchspflanze viele gut abgegrenzte Proteinpunkte. Sowohl die isoelektrische Fokussierung, als auch die SDS-PAGE lief unter den vorgegebenen Bedingungen gut ab.

Die Methode wurde im Folgenden auch mit Proben von *Artemisia panicii* angewendet und zeigte unerwarteterweise keine guten Ergebnisse. Trotz der weniger sensiblen Coomassie-Blau Färbung sind die Proteinmarker auf dem Gel gut erkennbar. Im Gegensatz dazu, sind die Proteinpunkte nur schwer auszumachen. Dies lässt einen Rückschluss auf eine unzureichende Extraktion zu. Für alle weiteren Versuche wurden die Proteine daher ausschließlich mit TCA/Aceton extrahiert.

Mehrmals trat beim IEF-Schritt das Problem auf, dass der Durchlauf aufgrund zu hoher Salzkonzentrationen stockte. In diesem Fall mussten die bereits im Rehydrationspuffer aufgelösten Proteine, einer Dialyse unterzogen werden. Bei dieser Methode nutzt man eine semipermeable Membran, die für Proteine nicht passierbar ist, aber anorganische Salze und andere niederemolekulare Verbindungen durchlässt. Der hohe Gehalt an Salzen in der Vakuole könnte ein Hinweis auf eine Anpassung des Wasserpotentials der Pflanze an einen trockenen Standort sein.

### 3.2.2 Optimierung der Proteinfärbung

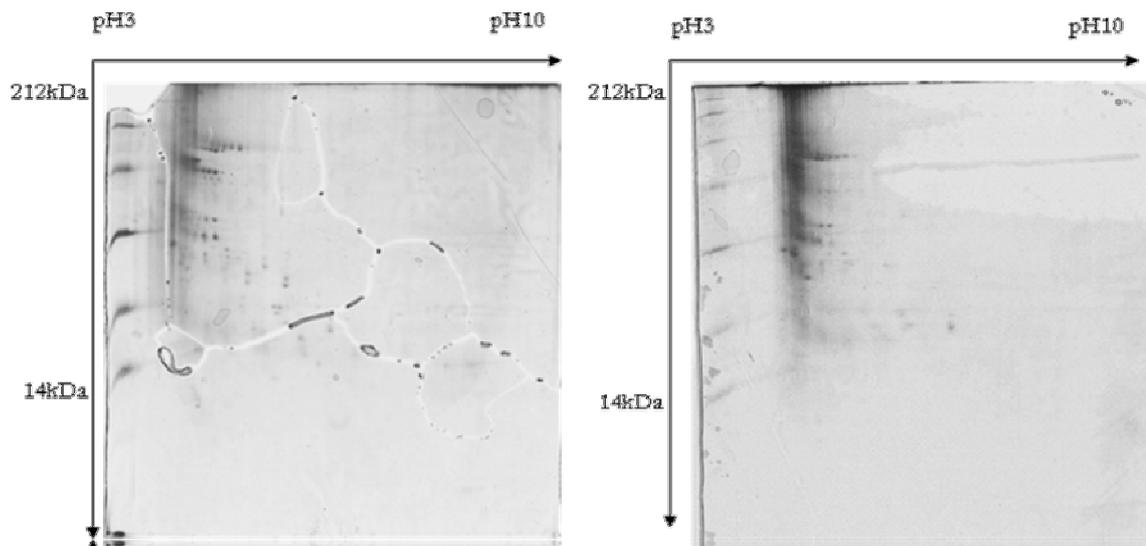
In einem weiteren Experiment wurden die Proteine mit der TCA/Aceton-Extraktionsmethode (siehe Kapitel Methode) gefällt und anschließend mit zwei verschiedene Färbemethoden detektiert. In Abbildung 11 wird beispielhaft eine Gegenüberstellung von zwei verschiedenen Färbemethoden an 2D-Gelen des Standorts „Gehölzsaum“ am Bisamberg gezeigt. Die Coomassie-Blau „R250“ Färbung erweist sich in diesem Fall als ungeeignete Färbetechnik, da die Proteinpunkte viel weniger intensiv gefärbt waren als mit der Silber-Färbung. Andererseits zeigten sich bei der Silberfärbung größere Schmiereffekte, so dass die Proteinplots deutlich unschärfer und damit weniger gut vergleichbar sind. Die Proteinmarker sind in beiden Fällen gut erkennbar.



**Abb. 11:** Gesamtproteinmuster von *Artemisia panicii* (Sommer 2010, Standort Bisamberg). Aufgetrennt wurden 350 µg Gesamtproteine aus *Artemisia panicii* nach Molekulargewicht (kDa) vertikal und pH-Wert horizontal. Vergleichende Gegenüberstellung zweier Färbetechniken; links Coomassie-Blau „R250“, rechts Silber-Färbung.

### 3.2.3 Protein-Profilung der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese

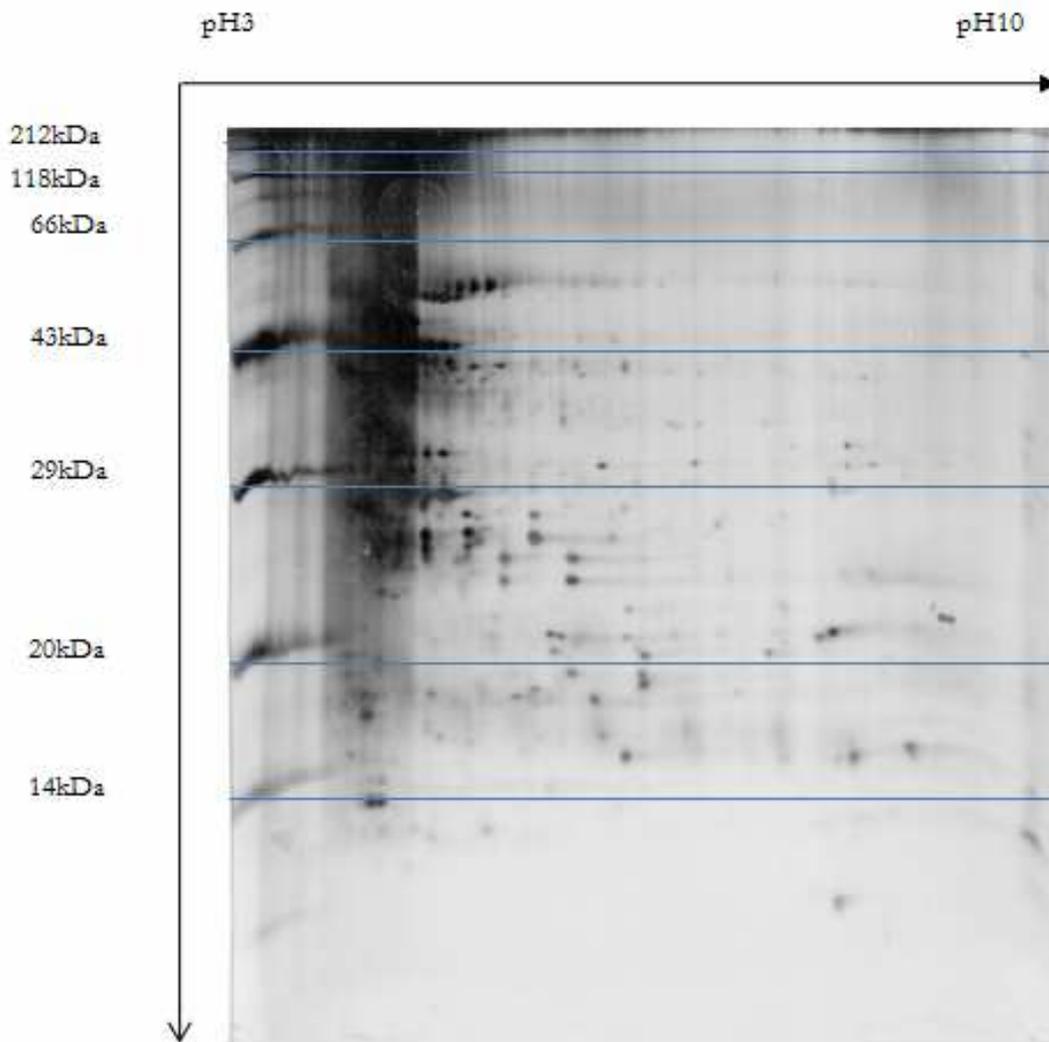
In Abbildung 12 sind die Proteinmuster aus 1000 mg verschiedener Blätter vom Standort Bisamberg zur Sommerzeit, nach dem isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht der Proteine aufgetrennt, dargestellt. Beim Vergleich der Proteinmuster von Blättern beider Standorte konnten nur wenige Unterschiede festgestellt werden.



**Abb. 12:** Gesamtproteinmuster von *Artemisia panicii* (Sommer 2010, Standort Bisamberg). Aufgetrennt wurden 350 µg Gesamtproteine aus *Artemisia panicii* nach Molekulargewicht (kDa) vertikal und pH-Wert horizontal. Vergleichende Gegenüberstellung zweier Standorte mittels Coomassie-Blau „R250“ links Gehölzsaum, rechts offene Rasenfläche.

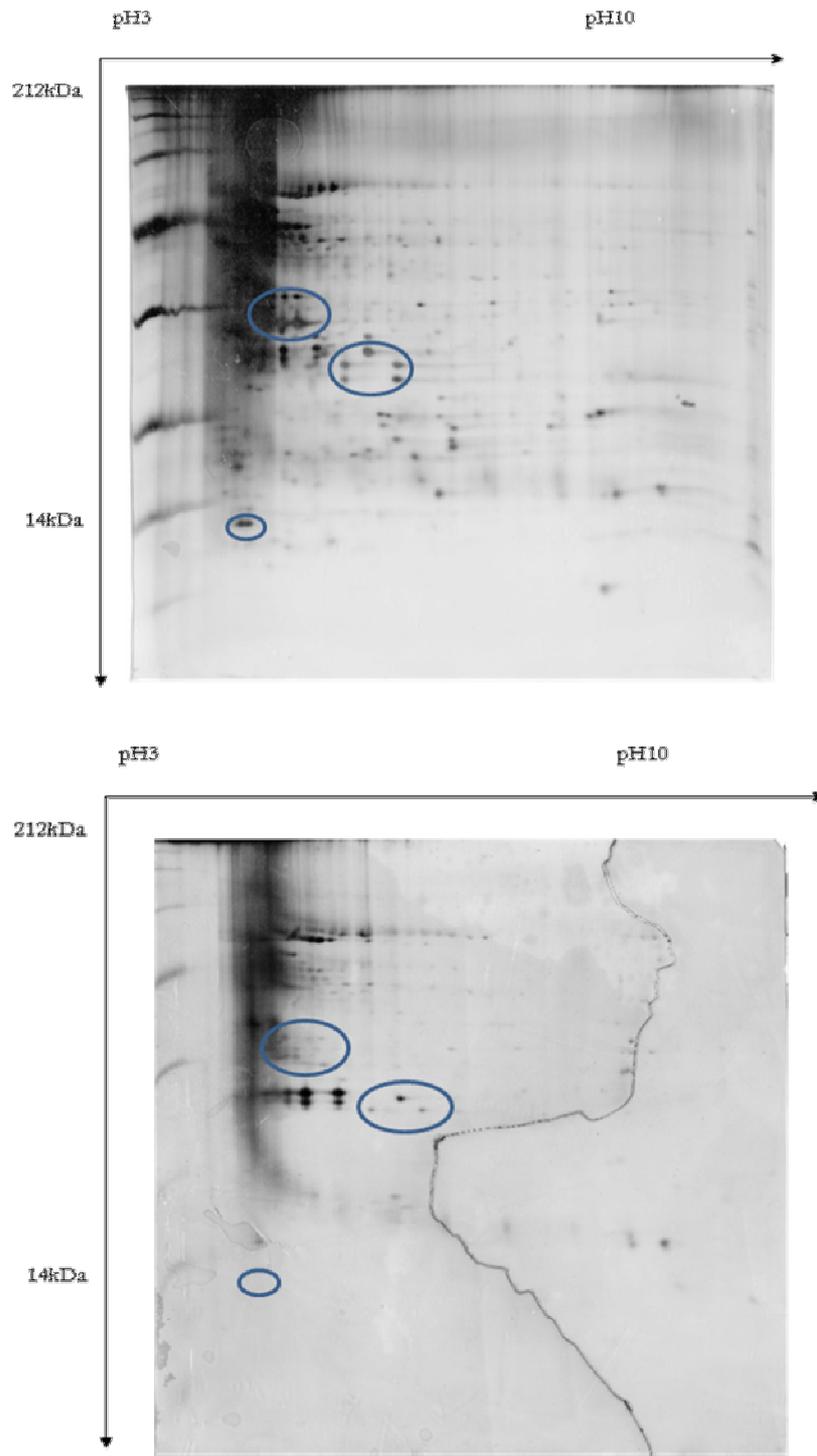
### 3.3 Auswertung des Gesamtproteinmusters

Insgesamt wurden im Gesamtproteinmuster der Blätter von *Artemisia panicii* über sechzig Proteinpunkte detektiert (Abb. 13). Die meisten Proteinpunkte befinden sich im saureren pH-Bereich (pH 3-5) und bezüglich des Molekulargewichtes in einer Größenordnung zwischen 66 kDa und 14 kDa. Die Punkte liegen im sauren Bereich viel enger zusammen als im basischen Bereich. Gerade in dem oben erwähnten Bereich mit besonders vielen Proteinpunkten, kann eine Überlagerung einiger Punkte nicht ausgeschlossen werden.



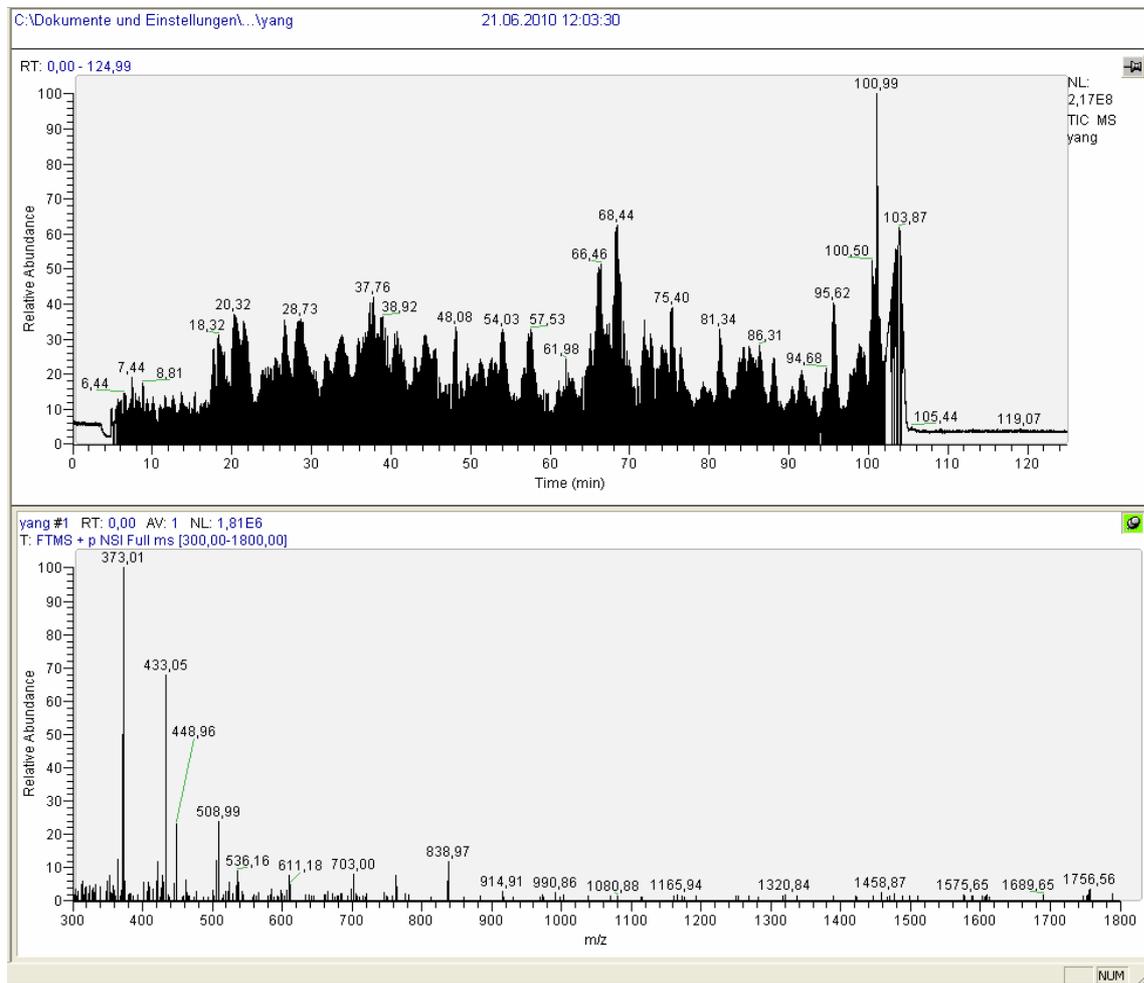
**Abb. 13:** Protein-Profilung einer zwei-dimensionalen Auftrennung von *Artemisia panicii* (Sommer 2010, Standort Bisamberg) durch kombinierte isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE.

In Abbildung 14 wird eine Gegenüberstellung von *Artemisia panicii* an ihrem natürlichen Standort am Bisamberg (Gehölzsaum) und den nachkultivierten Pflanzen des botanischen Gartens in Wien gezeigt. Die blau umrandeten Flächen zeigen die deutlicheren, optisch auszumachenden Unterschiede zwischen den beiden Gelen. Man kann feststellen, dass die nachkultivierte Pflanzenprobe, bei gleicher Proteinmenge, deutlich weniger Punkte zeigt als jene vom natürlichen Standort.



**Abb. 14:** Gesamtproteinmuster von *Artemisia panicii* - Sommer 2010, Standort Bisamberg (oben) und botanischer Garten der Universität Wien (unten). Aufgetrennt wurden 350 µg Gesamtproteine aus *Artemisia panicii* nach Molekulargewicht (kDa) vertikal und pH-Wert horizontal. Beide Gele wurden mit Silber-Färbetechniken behandelt.

### 3.4 Protein Analyse von *Artemisia panicii* mittels nanoLC-MS-basierter Shotgun-Proteinanalyse



**Abb. 15:** Gesamtpeptid-Signale von *Artemisia panicii*; Sommer 2010, vom ursprünglichen Standort Bisamberg

Mittels „Shotgun“-proteomic Methode wurden die durch Trypsin verdauten Peptide analysiert und über einen Datenbankvergleich die korrespondierende Proteine identifiziert (Abb.15).

Da das Proteom von *Artemisia panicii* noch nicht vollständig sequenziert wurde, führte eine vergleichende Identifizierung der gefundenen Proteine mit der vorliegenden Datenbank nur zu einem auf Proteine des Photosyntheseapparats (hauptsächlich RubisCo und ATPase) beschränktes Ergebnis.

Eine Liste der erfassten Proteine befindet sich im Anhang.

## 4 Diskussion

Um den Einfluss von einzelnen Umweltfaktoren auf der biochemischen Ebene zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit geeignete Methoden zur Charakterisierung der Proteinmuster von *Artemisia panicii* entwickelt.

In diesem Teil der Arbeit werden sowohl die Entwicklung der einzelnen Optimierungsschritte der Methode, auch im Hinblick auf eine gute Reproduzierbarkeit mit einer möglichst hohen Auflösung, sowie die daraus resultierenden Ergebnisse diskutiert und ein Ausblick auf mögliche Nachfolgeuntersuchung gegeben.

### 4.1 Einfluss von Umweltfaktoren auf Proteine

Pflanzenproteine sind ein wichtiger Teil der physiologischen Merkmale einer Pflanze und sind für die Funktionen zahlreicher biologischer Prozesse von entscheidender Bedeutung. Sie kontrollieren Wachstum und Differenzierung und wirken als Katalysatoren (Enzyme), dadurch kommt es je nach physiologischem Zustand zu einem charakteristischen Proteinmuster.

Das Vorkommen der seltenen im Pannonikum endemischen Pflanze *Artemisia panicii* erlangt am Bisamberg sowohl in den offenen Rasenflächen, wie auch in angrenzenden Gehölzsäumen besondere Bedeutung. Diese beiden mikroklimatisch stark unterschiedlichen Standorte bieten der angesprochenen Pflanze verschiedene Lebensbedingungen an. Die Umwelteinflüsse, wie Wasserangebot, Temperatur oder UV-Strahlung, denen die Pflanzen der offenen Rasenfläche ausgesetzt sind, unterscheiden sich von denen des Gehölzsaumes grundlegend. In der Arbeit von MAIER (2007) wurden entsprechende Parameter der beiden Standorte untersucht und das Ergebnis zeigt, dass sich die Bodentemperaturen der Standorte in 5 cm Tiefe bis zu 10°C unterscheiden, was zu einem erhöhten Stressfaktor auf jene Pflanzen in der Rasenfläche führt. Außerdem wird noch auf Avoidancestrategien bei *Artemisia panicii* hingewiesen, wie etwa einen dichten Haarfilz, sowie Transpirationskühlung, die temperaturmindernd wirken.

Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur und diverse den Boden betreffende Faktoren wirken auf die Pflanzen an ihrem Standort ein. Diese Faktoren führen zu Veränderungen

des Stoffwechsels der Pflanze, welche sowohl in einer geänderten Physiologie (z.B.: Proteinmuster, sekundäre Pflanzenstoffe) als auch in Änderungen der Morphologie sichtbar werden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollen nun zeigen, ob die Pflanzenvorkommen an den unterschiedlichen Standorten auch unterschiedliche Proteinmuster aufweisen müssten.

#### **4.1.1 Am Bisamberg**

Bei den Proben, welche in den Sommermonaten gesammelt wurden, sind zwischen jenen vom Gehölzsaum und jenen von der offenen Grasfläche, praktisch keine Unterschiede im Proteinmuster zu erkennen. Im Gegensatz dazu, gibt es erkennbare Unterschiede in der Intensität der Proteinbanden bei den im Herbst gesammelten Proben. Besonders bei den Proteinen mit niedriger Molekulargröße (ab 20 kDa) sind die Unterschiede stärker ausgeprägt. Dieser Effekt tritt vermutlich erst in den Proben vom Herbst deutlich auf, weil die Standortunterschiede nun während einem längeren Zeitraum zum Tragen kommen konnten. Der Grund dafür könnte sein, dass die Pflanzen sich während des Jahres an den beiden Standorten unterschiedlich entwickeln, was sich auch auf die Proteinexprimierung auswirkt. Am Standort ist auffällig, dass die Pflanzen im Herbst auf der Rasenfläche, im Vergleich zum Gehölzsaum, vermehrt Neutriebe ausgebildet haben.

Trotz vieler kleiner Unterschiede kann allgemein gesagt werden, dass die Proben innerhalb der ursprünglichen Standortvorkommen von *Artemisia panicii* am Bisamberg, keine relevanten Abweichungen zueinander zeigten. In beiden Fällen ist das Enzym Rubisco gut zu erkennen. Dennoch zeigten sich hierbei signifikante Unterschiede bezüglich der Reinheit der Proteine und der Intensität der Banden.

#### **4.1.2 Botanischer Garten**

Bezüglich der Proteinmuster sind zwischen den Proben der Nachzuchtpopulation im Botanischen Garten der Universität Wien keine nennenswerten Unterschiede aufgefallen. Die Proteinmuster sind weitestgehend mit denen der Freilandpflanzen übereinstimmend: Ein Effekt der auf die Gewinnung der Nachzuchtpflanzen mittels Rhizomvermehrung zurückzuführen sein kann. Dennoch war die Reinheit der Proteine und manche Proteinbanden nicht ident, was einen Rückschluss auf die Auswirkung des Standorts auf

die Proteinexprimierung zulässt. Durch die Verunreinigung - manche Banden wurden unscharf und flächenhaft - wurde ein Vergleich der Proteinmusters erschwert.

#### **4.1.3 Klimatisiertes Gewächshaus**

Durch die extremen Temperaturunterschiede, die die Pflanzen zu bewältigen haben, unterscheiden sie sich bereits in ihrem Phänotypus. Im Gewächshaus mit tropischen Klimabedingungen wurden die Blätter viel üppiger und breitlappiger als jene im Gewächshaus mit temperatem Klima. Dies zeigt, dass die Pflanzen auch schon in ihrem Phänotypus ein sehr starkes Anpassungsvermögen besitzen und die Umgebungstemperatur dabei eine wesentliche Rolle spielt.

Unter molekularbiologischen Aspekten betrachtet, waren die Proteinmuster innerhalb dieser zwei extremen Standorte ähnlich. Wie bei allen anderen untersuchten Proben auch, ist das Bandenmuster des Enzyms Rubisco stärker ausgeprägt, als das der übrigen Proteine. Einen deutlichen Unterschied zwischen den zwei Extremstandorten zeigten die Banden, die zwischen Rubisco und 29 kDa lokalisiert waren. Hier fanden sich auf den Gelen der Proben aus dem tropischen Gewächshaus zwei Banden, die im Vergleich zu allen anderen Proben am stärksten ausgeprägt waren. Allgemein war zu beobachten, dass die Proteine im tropischen Gewächshaus bei gleicher Ausgangsmenge stärker detektiert waren, als die des temperaten Gewächshauses. Allerdings muss gesagt werden, dass hier ein eindimensionales SDS-PAGE natürlich nicht ausreicht, um die Unterschiede wirklich erschöpfend herauszuarbeiten. Auch auf Proteinebene sind aufgrund des unterschiedlichen Phänotyps deutliche Unterschiede in den Proteinmustern zu erwarten. Diese Tatsache muss in zukünftigen Studien mithilfe der wesentlich empfindlicheren Shotgun-Proteomics und auch der weiteren Anwendung der 2D-Gelelektrophorese weiter untersucht werden.

Im Vergleich zu den Proben aus dem botanischen Garten, kann man sagen, dass die Nachkultivierung im Freien bezüglich des Proteinmusters den Proben vom Originalstandort am ähnlichsten war. Für eine Rückführung der Nachzüchtungen an den ursprünglichen Standort wäre dies also die optimale Variante.

#### **4.1.4 Vergleich der Standorte**

Die untersuchten Proteinmuster der Blätter von unterschiedlichen Standorten am Bisamberg zeigten, trotz phänotypischer Differenzierungen, bei den ein-dimensionalen

elektrophoretischen Proteinmustern, bei zeitgleichen Versuchen in den Parallelproben und Vergleichsansätzen, im Bandenmuster nur Unterschiede in der Intensität einiger Banden. Dies dürfte ein Hinweis auf einen einheitlichen Artemisia-Pflanzenverband am Westhang des Bisamberges sein.

Die Proteine zeigen einheitliche Muster, zumindest in der niedrig auflösenden ein-dimensionalen SDS-Page. Standort und Umweltbedingung scheinen sich nur in der Intensität der Banden niederzuschlagen, im Bandenmuster selbst ist ein Einfluss des vorherrschenden Mikroklimas praktisch nicht zu erkennen.

Da viele Proteine nur anhand ihrer molekularen Größen aufgetrennt werden können und es daher zu Überdeckung verschiedener Proteine gleicher molekularer Größe kommen kann (EDELMAAN 1991), lieferte die ein-dimensionalen SDS-Page beinahe gleiche Ergebnisse, weshalb in weiterführenden Experimenten versucht wurde die SDS-Page an eine 2D-Gelelektrophorese anzuschließen.

Der wiederholte Proteinaufreinigungsschritt erbrachte zwar gute Ergebnisse, aber die Proteinpunkte im sauren Bereich waren trotzdem nicht gut aufgetrennt. Diese erschienen auf den Gelen flächenhaft und erschwerten so den Vergleich.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, wurden verschiedene Detektionsmethoden zur Optimierung gegenüber gestellt. Es könnte sein, dass mit der Silberfärbung eine zu sensitive Methode gewählt wurde und deshalb zu viele Proteine am Gel detektiert und im Endeffekt mehrere Proteinpunkte als Fläche dargestellt wurden. Um eine Überfärbung des Gels zu verhindern, wurde daher teilweise eine Coomassie-Blau Färbemethode „R250“ angewendet. Durch die Anwendung der Coomassie-Blau „R250“ Färbemethode konnte die Flächen-Detektion minimiert werden, aber gleichzeitig wurden die anderen Proteinpunkte schwächer detektiert, so dass auch hier ein eindeutiger Vergleich kaum möglich war.

Die in Abbildung 14 durchgeführte visuelle Bildanalyse ergab wenig deutliche Unterschiede zwischen den Pflanzenproben vom ursprünglichen Standort am Bisamberg und den nachkultivierten Pflanzen des botanischen Gartens der Universität Wien. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass im Hinblick auf die Ergebnisse des Proteinprofiling, die Wahl des Standorts – offene Rasenfläche bzw. Gehölzsaum – als Quelle für Material zur Nachkultivierung und neuerlichen Verpflanzung an den natürlichen Standort keine nennenswerten Auswirkungen hat.

## 4.2 Zusammenfassung und Ausblick

Im Hinblick auf den komplexen Gesamtstoffwechsel der Pflanzen ergaben diese ersten proteomischen Untersuchungen, nach der Auftrennung auf der ein-dimensionalen- und zwei-dimensionalen Gelelektrophorese, dass die Pflanzen der beide Standorte am Bisamberg als ein einheitlicher Pflanzenverband vorliegen.

Durch die standortsbedingte unterschiedliche bodennahe Temperatur und Niederschlagsmenge und dadurch entstandene Stresswirkung auf die Pflanzen, erscheint es als notwendig die Pflanzen über mehrere Jahre zu beobachten. Ein weiterführendes Monitoring sollte sowohl die Originalstandorte, besonders aber auch die ausgewählten Standorte zur Neubepflanzung betreffen und weitere Techniken der proteomischen und genetischen Charakterisierung einbeziehen.

Als logisch fortgeführten Schritt, über den Rahmen des derzeitigen Life-Projekts hinaus, wäre ein Vergleich bestehender Populationen innerhalb Österreichs und der vielen, durch ihre klimatischen Gegebenheiten äußerst unterschiedlichen Standorte in Europa, hinsichtlich bestimmter Proteine, aber auch unterschiedlicher Proteinaktivität ein Beitrag zur weiterführenden Erforschung dieser seltenen Pflanze: *Artemisia pancicii*.



## 5 Literatur

- Amme, S., Matros, A., Schlesier, B., & Mock, H. P. (2006). Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. *Journal of Experimental Botany*, 57(7), 1537-1546.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93-99.
- Boza, P. (1999). *Artemisia panicii* (Janka) Ronniger subsp. *panicii*. In V. Stevanovic (Ed.), *Crvena knjiga flore Srbije* (Vol. 1, pp. 141-142, 444). Beograd: Ministarstvo za zivotnu sredinu R Srbije, Bioloski fakultet Univ. u Beogradu i Zavod za zastitu prirode R Srbije
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Damerval, C., Devienne, D., Zivy, M., & Thiellement, H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7(1), 52-54.
- Danihelka, J. (1995). O druhu *Artemisia panicii* v České republice a příbuzných taxonech. *Zprávy Ces. Bot. Spolecn.*, 30, 81-90.
- Delaplace, P., van der Wal, F., Dierick, J. F., Cordewener, J. H. G., Fauconnier, M. L., du Jardin, P., & America, A. H. R. (2006). Potato tuber proteomics: Comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins. *Proteomics*, 6(24), 6494-6497.
- Edelmann, H. (1991). Molekulare Charakterisierung von IgE-bindenden Proteinen aus *Artemisia vulgaris* Pollen. *Wien, Univ., Dipl.-Arb., 1991*
- Ehrendorfer, F. (1964). Notizen zur Cytotaxonomie und Evolution der Gattung *Artemisia*. *Österr. Bot. Zeitschr.* 111, 84-142.
- Fischer, M. A., Adler, W., & OSWALD, K. (2005). Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. Land Oberösterreich. *Biologiezentrum der OÖ Landesmuseen, Linz*, 1392pp
- Glinski, M., & Weckwerth, W. (2006). The role of mass spectrometry in plant systems biology. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(2), 173-214.
- Göbel, A. (1996). Gelelektrophoretische als Methode zu Identifizierung von Apfelsorten. *Diplomarbeit Universität Wien*.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., & Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21(6), 1037-1053.

- Gorg, A., Weiss, W., & Dunn, M. J. (2005). Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics (vol 4, pg 3665, 2004). *Proteomics*, 5(3), 826-827.
- Gross, J. H. (2004). *Mass Spectrometry* Berlin: Springer-Verlag
- Haubitz, M., Wittke, S., Weissinger, E. M., Walden, M., Rupprecht, H. D., Floege, J., Haller, H., & Mischak, H. (2005). Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney International*, 67(6), 2313-2320.
- Holub, J., & Grulich, V. (1999). *Artemisia panicii* (Janka) Ronn. In J. Cerovský & V. Feráková & J. Holub & S. Maglocký & F. Procházka (Eds.), *Cervená kniha obrozených a vzácných drubů rostlin a živočichů*. Bratislava: Vyšší rostliny.
- Isaacson, T., Damasceno, C. M. B., Saravanan, R. S., He, Y., Catala, C., Saladie, M., & Rose, J. K. C. (2006). Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols*, 1(2), 769-774.
- Janchen, E. (1977). *Flora von Wien, Niederösterreich und Nordburgenland* (2 ed.). Wien.
- Cui, H., Ji, H., Zhang, H., Shao, H.-F., Li, D.-X. & Chen, L. (2008). Comparative analysis of leaf proteomes between tobacco plants growing in different ecological regions of China. *Acta Ecologica Sinica*, 2008(28(10)), 4873-4880.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S., & Deyholos, M. K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany*, 58(13), 3591-3607.
- Klose, J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues- novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26(3), 231-243.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage- T4. *Nature*, 227(5259), 680-&.
- Langenkämper, G., Bruder, A., Betsche, T., & Zörb, C. (2007). Biochemische Charakterisierung von ökologisch und konventionell erzeugtem Weizen aus dem DOK-Versuch: Profiling Techniken und Analytik von Einzelverbindungen. *Landbauforschung Völkenrode* 314, 107-113.
- Lehesranta, S. J., Koistinen, K. M., Massat, N., Davies, H. V., Shepherd, L. V. T., McNicol, J. W., Cakmak, I., Cooper, J., Luck, L., Karenlampi, S. O., & Leifert, C. (2007). Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers. *Proteomics*, 7(4), 597-604.
- Lehmann U., Wienkoop S., Weckwerth W. (2008). If the antibody fails: a mass western approach. *The Plant Journal*, 55(6), 1039-1046.
- Loomis, W. D. (1974). Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol*, 31(Pt A), 528-544.
- Lottspeich, F., & Engels, J. W. (2006). *Bioanalytik* (2 ed.). Heidelberg: Springer.

- Maier R. (2009). *Der Bisamberg - Naturinsel am Rande einer Millionenstadt*. Paper presented at the 1. Fachtagung in Österreich über heimische Orchideen.
- Maldonado, A. M., Echevarria-Zomeno, S., Jean-Baptiste, S., Hernandez, M., & Jorriñovo, J. V. (2008). Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteomics*, 71(4), 461-472.
- Nagler, M. (2010). Standort und Vergesellschaftung von *Artemisia panicicii* in Österreich. *Diplomarbeit Universität Wien*.
- Natarajan, S., Xu, C. P., Caperna, T. J., & Garrett, W. A. (2005). Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry*, 342(2), 214-220.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9(6), 255-262.
- Ofarrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007-4021.
- Paar, M., Oberleitner, I., & Kutzenberger, H. (1998). Fachliche Grundlagen zur Umsetzung der Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie. Schwerpunkt Arten (Anhang II). *UBA-Reports R-146*.
- Posch, A., Chen, Z. P., Wheeler, C., Dunn, M. J., RaulfHeimsoth, M., & Baur, X. (1997). Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(3), 385-395.
- Raymond, S., & Weintraub, L. (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 33, 711.
- Sanchez, J. C., Wirth, P., Jaccoud, S., Appel, R. D., Sarto, C., Wilkins, M. R., & Hochstrasser, D. F. (1997). Simultaneous analysis of cyclin and oncogene expression using multiple monoclonal antibody immunoblots. *Electrophoresis*, 18(3-4), 638-641.
- Saravanan, R. S., & Rose, J. K. C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, 4(9), 2522-2532.
- Sarry, J. E., Sommerer, N., Sauvage, F. X., Bergoin, A., Rossignol, M., Albagnac, G., & Romieu, C. (2004). Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics*, 4(1), 201-215.
- Schlee, D. (1992). *Ökologische Biochemie*. 2. Auflage Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York

- Schratt-Ehrendorfer, L., & Schmiederer, C. (2005). Gefäßpflanzen (*Apium repens*, *Artemisia laciniata*, *Artemisia panicii*, *Botrychium simplex*, *Coleanthus subtilis*, *Cypripedium calceolus*, *Dracocephalum austriacum*, *Eleocharis carniolica*, *Eryngium alpinum*, *Ligularia sibirica*, *Liparis loeselii*, *Marsilea quadrifolia*, *Myosotis rebsteineri*, *Stipa styriaca*, *Thesium ebracteatum*, *Trifolium saxatile*), *Entwicklung von Kriterien, Indikatoren und Schwellenwerten zur Beurteilung des Erhaltungszustandes der Natura 2000-Schutzgüter* (Vol. 2).
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), 850-858.
- Shultz, R. W., Settlage, S. B., Hanley-Bowdoin, L., & Thompson, W. F. (2005). A trichloroacetic acid-acetone method greatly reduces infrared autofluorescence of protein extracts from plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23(4), 405-409.
- Smithies, O., & Poulik, M. D. (1956). Two-Dimensional Electrophoresis of Serum Proteins. *Nature*, 177(4518), 1033-1033.
- Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., & Cresti, M. (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 24(14), 2369-2375.
- Wendelberger, G. (1959). Die mitteleuropäischen Reliktorkommen der *Artemisia*-Arten aus der Sektion Heterophyllae. *Verhandlungen der kaiserlich-königlichen zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien* 98/99, 57-95.
- Wendelberger, G. (1960). Die Sektion Heterophyllae der Gattung *Artemisia*. *Biblioth. Bot.*, 125.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., HumpherySmith, I., Williams, K. L., & Hochstrasser, D. F. (1996). From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio-Technology*, 14(1), 61-65.
- Xu, C. P., Xu, Y., & Huang, B. R. (2008). Protein extraction for two-dimensional gel electrophoresis of proteomic profiling in turfgrass. *Crop Science*, 48(4), 1608-1614.
- Yates, J. R. (2004). Mass spectral analysis in proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33, 297-316.

## 6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich bei dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Rudolf Maier bedanken, für die Bereitstellung des Themas und die tolle Betreuung.

Weiters möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfram Weckwerth für die Bereitstellung des Labors und seine Geduld herzlichst bedanken.

An den Gärtner des botanischen Instituts am Rennweg, Herrn Tod, richtet sich mein Dank für die Betreuung der Zuchtpflanzen.

Auch großen Dank an das Projekt LIFE Nature für die Förderung dieser Arbeit.

Für die tolle kollegiale Zusammenarbeit und Überwindung so mancher Probleme und die ständige Hilfsbereitschaft und für die Hilfestellungen im Labor möchte ich den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe danken.

Für die emotionale Unterstützung möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken. Besonders bei: Joseph, Barbara und Negin möchte ich mich für die vielen hilfreichen Gespräche zu meiner Arbeit und seelischen Beistand bedanken.

Mag. Sabine Schmid danke ich für ihre Unterstützung bei Schwierigkeiten mit der deutschen Sprache.

Zu guter Letzt auch vielen Dank an meine Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und ihre Unterstützung.

## 7 Curriculum vitae

# YANG FAN QIU

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Yang Fan Qiu  
Alter: 27  
geb. am 02. 05. 1984  
in China, Qingtian  
Adresse: Thaliastraße 166/2/3  
1160 Wien  
E-Mail: [Qiuqiufan@hotmail.com](mailto:Qiuqiufan@hotmail.com)  
Tel: 0699/10205984

### AUSBILDUNG

---

2003 – 2011	Biologiestudium an der Universität	Wien
1997 – 2003	Bundesrealgymnasium	Wien
1995 – 1997	Hauptschule	Wien
1991 – 1995	Volksschule	Wien
1989 – 1991	Volksschule	Qingtian, China

### BERUFSERFAHRUNG

---

Seit 2007 als Tutorin der pflanzenphysiologischen Übungen des Departments für Molekulare Systembiologie.

### SPRACHKENNTNISS

---

- Chinesisch als Muttersprache
- Deutsch als 2. Muttersprache
- Englisch (fluent)

## 8 Abstract

The following study represents the first proteomic characterisation of *Artemisia panicii* on the Bisamberg. The question whether the solitary occurring plants on the Western slope of the Bisamberg form a homogenous group, which also gives us a basic insight into the transplantation experiment of the "LIFE - Nature" project, could be answered by making a profile of the protein patterns with the help of gel-electrophoretic methods.

The proteins were split by the means of one-dimensional SDS- Page according to their molecular weight. Phenotypical differences in the electrophoretic profiles of the protein patterns were mainly pronounced by the intensity of some bands. This conclusion was reached by the use of simultaneous experiments and comparisons of the band patterns of replicates.

The observations provide first hints for a homogeneous growth of *Artemisia panicii* at the Bisamberg. Furthermore , samples of the plant material , which have been cultivated and retrieved from the Department of Molecular Systems Biology and the experimental garden of the Botanical garden of the Universit of Vienna, were analysed. In all cases the samples showed a uniform protein pattern, which could at least be shown in a low resolution one-dimensional SDS-PAGE.

The influence of local and environmental conditions only appeared in the intensity of the bands whereas it was hard to recognize it in the band patterns itself.

Proteomic analysis of *A. panicii* was further performed with the means of a high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. Finally, a more thorough characterization followed, with the focus on further investigations by the means of a gel free "shotgun" proteomics method which bases on massspectrometry. With regard to the complex metabolism of the plants on the Bisamberg these investigations led to the initial conclusion that the plant-formations are uniform. However, these investigations need to be continued in the future with higher resolution and shotgun-proteomics methods.



## 9 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte eine umfassende Charakterisierung der Proteinmuster von *Artemisia panicii* am Standort Bisamberg zum Ziel. Um die Fragestellung zu beantworten, inwieweit das solitäre Pflanzenvorkommen am Westhang des Bisamberges eine einheitliche Formengruppe darstellt und damit zum Grundlagenwissen für das Verpflanzungsexperiment des „LIFE-Nature“ Projektes beizutragen, wurde eine Bestimmung des Proteinmusters mittels gelelektrophoretischem Verfahren durchgeführt.

Die Proteine wurden mittels ein-dimensionalen SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigten trotz phänotypischer Differenzierungen, im elektrophoretischen Proteinmuster, bei zeitgleichen Versuchen, im Bandenmuster von Parallelproben und Vergleichsansätzen nur Unterschiede in der Intensität einiger Banden. Dies dürfte ein erster Hinweis auf einen einheitlichen Pflanzenverband von *Artemisia panicii* am Westhang des Bisamberges sein. Des Weiteren wurde noch Pflanzenmaterial vom Untersuchungsstandort am Bisamberg im Glashaus des Departments für molekulare Systembiologie der Universität Wien, Althanstrasse und im Versuchsgarten des Botanischen Gartens der Universität Wien, Rennweg kultiviert und im Anschluss davon gezogene Proben aufgetrennt.

In allen Fällen zeigten die Proben sehr einheitliche Proteinmuster, zumindest in der niedrig auflösenden ein-dimensionalen SDS-PAGE. Standort und Umweltbedingung scheinen sich nur in der Intensität der Banden niederzuschlagen, im Bandenmuster selbst ist der Einfluss praktisch nicht zu erkennen.

Die Untersuchungen wurden durch weitere Versuche unter Einsatz einer hochauflösenden zwei-dimensionalen Gelelektrophorese ergänzt.

Im Hinblick auf den komplexen Gesamtstoffwechsel der Pflanzen, am Bisamberg im Gehölzsaum und offener Rasenfläche vorkommend, ergaben die Untersuchungen, nach der Auftrennung auf der ein-dimensionalen und zwei-dimensionalen Gelelektrophorese, soweit identifiziert, das Vorliegen eines einheitlichen Pflanzenverbands. Eine genauere Charakterisierung erfolgte im Anschluss, und auch als Ausblick auf weitere Untersuchungen, mittels gelfreier, auf Massenspektrometrie basierender „shotgun“-proteomics Methode.

Weitere zukünftige Studien sind erforderlich, um die beobachteten sehr interessanten phänotypischen Änderungen der Pflanze – z.B. dickeres Blattwachstum bei höheren

Temperaturen und Luftfeuchtigkeit - als Anpassung an den jeweiligen Standort mit den genauen Änderungen der Proteinmuster zu korrelieren.

## 10 Anhang

Accession	Coverage	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Description
Q4VZI5	50.00 %	70	498	53.8	5.20	265.52	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Cucumis sativus GN=atpB PE=3 SV=2 - [ATPB_CUCSA]
A4QKJ9	36.75 %	67	498	53.9	5.73	259.60	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Capsella bursa-pastoris GN=atpB PE=3 SV=1 - [ATPB_CAPBU]
Q1KXV2	44.18 %	67	498	53.5	5.24	254.47	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Helianthus annuus GN=atpB PE=3 SV=1 - [ATPB_HELAN]
Q9MRV8	39.96 %	63	498	53.6	5.39	240.21	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Aristolochia macrophylla GN=atpB PE=3 SV=1 - [ATPB_ARIMA]
A0ZZ42	48.59 %	48	498	53.6	5.25	184.17	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Gossypium barbadense GN=atpB PE=3 SV=1 - [ATPB_GOSBA]
B3TN59	16.39 %	51	476	52.7	6.68	182.13	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Brachypodium distachyon GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_BRADI]
Q31655	21.78 %	50	473	52.4	6.68	178.70	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Ajuga chamaepitys GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_AJUCH]
P28387	23.01 %	43	465	51.6	6.54	159.40	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Byrsonima crassifolia GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_BYRCR]
O19989	22.10 %	44	466	51.6	6.64	157.83	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Bulnesia arborea GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_BULAR]
Q31715	13.40 %	43	470	52.0	6.48	157.55	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Bertiera breviflora GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_BERBR]
A0A342	38.96 %	41	498	53.6	5.48	155.27	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Coffea arabica GN=atpB PE=3 SV=1 - [ATPB_COFAR]
P28382	22.96 %	40	466	51.6	6.48	153.94	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Barleria prionitis GN=rbcl PE=3 SV=2 - [RBL_BARPR]
Q9MU81	36.55 %	39	498	53.7	5.40	147.64	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Caryota mitis GN=atpB PE=3 SV=1 - [ATPB_CARMI]
Q31669	20.09 %	37	468	51.8	6.39	128.01	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Anthospermum herbaceum GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_ANTHE]
A0ZQ59	10.22 %	31	489	52.6	5.20	120.93	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Adenocline acuta GN=atpB PE=3 SV=1 - [A0ZQ59_9ROSI]
P19162	9.48 %	33	485	53.8	6.43	113.54	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Flaveria pringlei GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_FLAPR]
P48693	15.30 %	33	477	52.9	6.54	112.61	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Cichorium intybus GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_CICIN]
P48689	6.50 %	29	477	53.0	6.43	112.59	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Carthamus tinctorius GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_CARTI]
A0ZQA5	8.18 %	29	489	52.6	5.14	108.95	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Meineckia phyllanthoides subsp. somalensis GN=atpB PE=3 SV=1 - [A0ZQA5_9ROSI]
C0J3I8	9.36 %	26	470	50.5	5.36	100.72	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Neonotonia wightii GN=atpB PE=3 SV=1 - [C0J3I8_9FABA]
P28394	16.52 %	28	466	51.7	6.43	93.16	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Coriaria myrtifolia GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_CORMY]
Q9GI23	3.47 %	24	490	53.0	4.97	92.56	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Choristylis rhamnoides GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9GI23_9MAGN]
Q9MRU7	3.48 %	24	489	52.7	5.17	92.56	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Alangium sp. Chase 2541 GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9MRU7_9ASTE]
A0AR37	3.54 %	24	480	51.8	5.30	88.61	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Sparganium eurycarpum GN=atpB PE=3 SV=1 - [A0AR37_SPAEU]
P26958	8.63 %	20	475	52.6	6.83	84.95	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Bryopsis maxima GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_BRYMA]
O03067	22.27 %	20	476	50.9	5.00	77.47	ATP synthase subunit beta, chloroplastic (Fragment) OS=Dicksonia antarctica GN=atpB PE=3 SV=2 - [ATPB_DICAN]
Q71N62	4.21 %	21	475	52.2	6.15	70.05	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Orthilia secunda GN=rbcl PE=3 SV=2 - [Q71N62_9ERIC]
B2Y4X4	5.77 %	19	485	53.8	6.54	65.09	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Psacalium paucicapitatum GN=rbcl PE=3 SV=1 - [B2Y4X4_9ASTR]

A0ZZ20	19.72 %	17	507	55.4	5.26	61.55	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS=Gossypium barbadense GN=atpA PE=3 SV=1 - [ATPA_GOSBA]
Q68S21	19.92 %	16	507	55.5	5.34	57.48	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS=Panax ginseng GN=atpA PE=3 SV=1 - [ATPA_PANGI]
Q8MA73	46.97 %	12	132	14.4	5.54	53.98	ATP synthase epsilon chain (Fragment) OS=Boopis graminea GN=atpE PE=3 SV=1 - [Q8MA73_9ASTR]
O99007	4.29 %	16	466	51.7	6.33	53.05	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Periploca graeca GN=rbcl PE=3 SV=1 - [O99007_9GENT]
Q2MIK2	16.96 %	14	507	55.4	5.21	52.44	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS=Solanum bulbocastanum GN=atpA PE=3 SV=1 - [ATPA_SOLBU]
Q8WHV5	5.74 %	15	331	36.6	7.59	50.18	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Gunnera hamiltonii GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q8WHV5_9MAGN]
Q9GDL4	4.00 %	15	475	52.5	6.48	50.18	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Gunnera monoica GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q9GDL4_9MAGN]
Q1G4Q0	9.31 %	15	204	22.8	7.59	47.85	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Dendrobium fimbriatum GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q1G4Q0_DENFI]
O47277	4.19 %	15	454	50.3	6.58	47.85	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Hypocoum imberbe GN=rbcl PE=3 SV=1 - [O47277_9MAGN]
Q6VW30	4.50 %	15	422	46.6	7.17	47.85	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Haworthia limifolia var. stolonifera GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q6VW30_9ASPA]
P06284	18.70 %	11	492	53.1	5.17	47.38	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Marchantia polymorpha GN=atpB PE=3 SV=1 - [ATPB_MARPO]
P28425	4.93 %	12	467	51.9	6.43	47.17	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Hydrophyllum virginianum GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_HYDVI]
Q95FU2	3.62 %	4	469	50.4	5.68	46.87	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Coccoloba uvifera GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q95FU2_COCUV]
Q6VW24	4.50 %	13	422	46.6	6.64	46.52	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Aloe suprafoliata GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q6VW24_9ASPA]
Q2MII1	39.10 %	10	133	14.6	5.54	42.57	ATP synthase epsilon chain, chloroplastic OS=Solanum bulbocastanum GN=atpE PE=3 SV=1 - [ATPE_SOLBU]
B6GUT8	5.16 %	12	465	51.6	6.58	41.79	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Hedythyrus thamoideus GN=rbcl PE=3 SV=1 - [B6GUT8_9GENT]
B8R487	14.12 %	12	510	55.7	5.21	41.46	ATP synthase subunit alpha OS=Trifolium subterraneum GN=atpA PE=3 SV=1 - [B8R487_TRISU]
B7T3G6	13.69 %	12	504	55.2	5.52	41.38	ATP synthase subunit alpha OS=Geranium palmatum GN=atpA PE=3 SV=1 - [B7T3G6_9ROSI]
A5Z2K3	13.33 %	7	210	23.0	9.61	38.40	Photosystem I subunit PsaD OS=Glycine max GN=psaD PE=2 SV=1 - [A5Z2K3_SOYBN]
P94055	5.58 %	11	466	51.6	6.60	32.64	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Rudgea lorentensis GN=rbcl PE=3 SV=1 - [P94055_9GENT]
Q9GGI6	4.20 %	9	452	50.0	6.38	30.68	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Weinmannia bangii GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q9GGI6_9ROSI]
Q5TMA8	1.89 %	7	475	52.6	6.43	29.25	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Grimmia orbicularis GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q5TMA8_9BRYO]
B9TU77	4.10 %	8	366	39.6	5.20	28.58	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Cladophora sp. CHR505640 GN=atpB PE=3 SV=1 - [B9TU77_9CHLO]
Q1A5T8	3.36 %	8	387	43.2	6.71	27.84	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Leptoscyphus amphibolius GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q1A5T8_9MARC]
O03607	4.94 %	7	466	51.6	6.68	27.74	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Agathisanthemum bojeri GN=rbcl PE=3 SV=1 - [O03607_9GENT]
Q8WHW2	3.25 %	7	400	44.2	6.68	26.63	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Derbesia marina PE=3 SV=1 - [Q8WHW2_DERMA]
Q33236	5.13 %	7	448	49.5	6.64	25.94	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Tradescantia soconuscana GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q33236_9LILL]
Q8MFX9	4.43 %	5	429	46.4	5.82	25.05	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Ephedra gerardiana PE=3 SV=1 - [Q8MFX9_EPHGE]
Q36619	4.53 %	5	419	46.5	6.84	23.61	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Pteridium aquilinum GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q36619_PTEAQ]

O98577	5.27 %	5	474	50.8	5.29	23.06	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Casimiroa edulis GN=atpB PE=3 SV=1 - [O98577_CASED]
Q2LGJ2	23.08 %	7	117	12.8	5.03	22.79	ATP synthase gamma subunit (Fragment) OS=Phaseolus vulgaris GN=ATPC1 PE=2 SV=1 - [Q2LGJ2_PHAVU]
Q9MUT2	7.52 %	8	505	54.1	6.67	22.50	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS=Mesostigma viride GN=atpA PE=3 SV=1 - [ATPA_MESVI]
Q9MRW2	2.85 %	6	456	49.0	5.02	22.32	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Amaranthus hypochondriacus GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9MRW2_AMAHP]
Q537K8	4.67 %	6	407	44.9	6.89	22.24	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Schistostega pennata GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q537K8_9BRYO]
Q9XQY1	4.42 %	5	475	51.4	5.67	22.12	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Kingdonia uniflora GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9XQY1_9MAGN]
B9TTK7	11.73 %	5	162	17.8	4.73	21.67	ATP synthase beta subunit (Fragment) OS=Cornus multinervosa GN=atpB PE=3 SV=1 - [B9TTK7_9ASTE]
A7TW06	12.10 %	6	281	30.1	5.35	21.67	ATP synthase alpha chain (Fragment) OS=Radiovittaria gardneriana GN=atpA PE=3 SV=1 - [A7TW06_9FILI]
B9RAT6	6.30 %	5	460	50.1	6.40	21.54	Elongation factor Tu OS=Ricinus communis GN=RCOM_1508490 PE=3 SV=1 - [B9RAT6_RICCO]
Q8HT82	4.98 %	7	482	51.9	5.24	20.53	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Echiochilon pauciflorum GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q8HT82_9BORA]
B6GUR7	2.40 %	4	458	50.9	6.29	20.26	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Calycosiphonia spathicalyx GN=rbcl PE=3 SV=1 - [B6GUR7_9GENT]
B9TU57	3.55 %	6	366	39.5	5.78	19.93	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Pseudodictyosphaerium jurisii GN=atpB PE=3 SV=1 - [B9TU57_PSEJU]
O98914	10.29 %	5	243	26.1	6.07	19.65	ATP synthase beta-subunit (Fragment) OS=Gonium pectorale GN=atpB PE=3 SV=1 - [O98914_GONPE]
Q332W5	18.13 %	5	320	35.3	8.78	18.95	Apocytochrome f OS=Lactuca sativa GN=petA PE=3 SV=1 - [CYF_LACSA]
A8Y6T4	6.55 %	4	336	36.0	5.41	18.38	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Nolana humifusa GN=atpB PE=3 SV=1 - [A8Y6T4_NOLHU]
Q9XQX3	4.22 %	4	498	53.6	5.24	17.67	ATP synthase subunit beta OS=Tetracentron sinense GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9XQX3_9MAGN]
P92447	7.25 %	5	469	51.9	6.58	17.58	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Araucaria bidwillii GN=rbcl PE=3 SV=1 - [P92447_9CONI]
B9TU72	4.10 %	1	366	39.7	5.49	17.50	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Chaetopeltis orbicularis GN=atpB PE=3 SV=1 - [B9TU72_9CHLO]
O63147	11.51 %	5	478	52.8	6.58	17.43	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Hippotis sp. Clark and Watts 825 GN=rbcl PE=3 SV=1 - [O63147_9GENT]
O98747	5.67 %	5	476	52.5	6.76	17.35	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Adenanthos obovatus GN=rbcl PE=3 SV=2 - [O98747_ADEEO]
Q09TJ4	4.07 %	5	246	27.0	6.34	16.84	Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment) OS=Anthelia julacea GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q09TJ4_9MARC]
Q32277	2.10 %	5	477	52.9	7.02	16.84	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Gahnia deusta GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q32277_9POAL]
O19818	2.47 %	5	405	45.1	6.80	16.84	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Androya decaryi GN=rbcl PE=3 SV=1 - [O19818_9GENT]
Q9GD51	2.15 %	5	466	51.7	6.68	16.84	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Hedyotis littoralis GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q9GD51_9GENT]
Q9THW4	2.15 %	5	466	51.3	5.50	16.84	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Potalia resinifera GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q9THW4_9GENT]
B9U4J8	2.94 %	4	477	51.6	5.36	16.72	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Triodanis coloradoensis GN=atpB PE=3 SV=1 - [B9U4J8_9ASTR]
Q09R54	5.23 %	4	440	47.9	6.46	16.19	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Cedrus deodara GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q09R54_CEDDE]
Q4VZG9	18.38 %	4	136	14.8	5.54	12.95	ATP synthase epsilon chain, chloroplastic OS=Cucumis sativus GN=atpE PE=3 SV=1 - [ATPE_CUCSA]
B7S4V7	2.82 %	4	461	49.7	5.34	12.58	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Oxanthera neocaledonica GN=atpB PE=3 SV=1 - [B7S4V7_9ROSI]
Q95FP0	3.39 %	4	383	40.9	5.26	12.58	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Mouriri cyphocarpa GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q95FP0_9MYRT]
Q9XQY8	2.73 %	4	476	51.3	5.10	12.58	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Caulophyllum thalictroides GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9XQY8_CAUTH]
Q29S96	7.61 %	3	473	51.0	5.30	12.46	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Coriaria ruscifolia GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q29S96_9ROSI]

Q9MRK7	4.14 %	4	483	52.1	5.27	12.25	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Dudleya viscida GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9MRK7_DUDVI]
A0ARF9	21.82 %	3	55	6.3	4.44	11.56	Cytochrome b-559 alpha subunit (Fragment) OS=Ecdeiocolea monostachya GN=psbE PE=4 SV=1 - [A0ARF9_9POAL]
C1PGD2	9.15 %	3	306	33.6	8.60	11.53	Cytochrome f (Fragment) OS=Potamogeton distinctus GN=petA PE=4 SV=1 - [C1PGD2_POTDI]
Q33516	8.29 %	4	193	20.7	4.93	11.41	Light harvesting chlorophyll a /b binding protein (Fragment) OS=Hedera helix GN=HW101-LHP11 PE=2 SV=1 - [Q33516_HEDHE]
B9VL81	10.82 %	3	453	49.1	5.08	11.28	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Caulerpa filiformis GN=atpB PE=3 SV=1 - [B9VL81_9CHLO]
A1YN03	4.97 %	1	181	20.3	8.05	11.20	Ribulose biphosphate carboxylase small chain OS=Brassica campestris PE=2 SV=1 - [A1YN03_BRACM]
B0JD20	10.00 %	4	110	11.6	5.34	11.14	ATP synthase beta chain (Fragment) OS=Equisetum variegatum GN=atpB PE=4 SV=1 - [B0JD20_EQUVA]
Q9XQP4	2.67 %	3	412	43.3	7.88	11.10	NAD-malate dehydrogenase OS=Nicotiana tabacum PE=2 SV=1 - [Q9XQP4_TOBAC]
B3FWX7	2.86 %	3	384	41.2	6.00	10.91	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Arcangelisia flava GN=atpB PE=3 SV=1 - [B3FWX7_9MAGN]
Q9TLK3	2.30 %	3	478	51.4	5.24	10.91	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Peperomia serpens GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9TLK3_PEPSE]
Q95FT3	3.37 %	2	386	41.1	6.58	10.69	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Drypetes roxburghii GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q95FT3_9ROSI]
B7S4W0	2.36 %	3	466	50.1	5.25	10.14	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Paramignya lobata GN=atpB PE=3 SV=1 - [B7S4W0_9ROSI]
O98595	2.64 %	3	417	45.0	6.46	10.14	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Nymanina capensis GN=atpB PE=3 SV=1 - [O98595_9ROSI]
Q5K3X3	5.81 %	2	465	51.8	6.43	10.02	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Lachnaea sociorum GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q5K3X3_9ROSI]
A5PF92	4.22 %	2	450	49.8	7.05	9.80	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Acanthocladus guayaquilensis GN=rbcl PE=3 SV=1 - [A5PF92_9FABA]
Q9MV62	2.23 %	3	449	49.7	6.80	9.75	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Podophyllum peltatum GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q9MV62_PODPE]
O78327	2.02 %	1	744	80.1	6.62	9.73	Transketolase 1 OS=Capsicum annuum PE=2 SV=1 - [O78327_CAPAN]
Q9GHM4	8.80 %	2	216	24.1	6.07	8.68	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Turpinia occidentalis GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q9GHM4_9ROSI]
P94038	8.53 %	2	469	51.9	6.58	8.17	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Posoqueria latifolia GN=rbcl PE=3 SV=2 - [P94038_9GENT]
O98589	5.54 %	2	487	52.1	5.29	8.15	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Glycosmis pentaphylla GN=atpB PE=3 SV=1 - [O98589_9ROSI]
Q5SCM2	2.56 %	2	468	51.8	6.58	8.09	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Phyllanthus polyphyllus GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q5SCM2_9ROSI]
Q1X8C4	3.33 %	3	451	49.8	6.71	8.07	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Cosmarium sp. ACKU 1232 GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q1X8C4_9VIRI]
Q06RL9	7.11 %	3	211	23.3	5.19	8.02	Elongation factor Tu (Fragment) OS=Caulerpa microphysa GN=tufA PE=4 SV=1 - [Q06RL9_9CHLO]
Q9GGJ5	4.55 %	2	286	32.1	8.53	7.61	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Tetrachondra patagonica PE=3 SV=1 - [Q9GGJ5_9LAMI]
A8HG41	8.84 %	2	215	24.0	6.57	7.19	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Brachylaena elliptica GN=rbcl PE=3 SV=1 - [A8HG41_9ASTR]
Q7YLG7	2.59 %	2	464	51.3	6.80	7.05	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Polyalthia pendula GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q7YLG7_9MAGN]
Q5UF97	2.64 %	2	455	50.5	6.92	7.05	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Crematosperma bullatum GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q5UF97_9MAGN]
Q36844	5.76 %	2	469	51.9	6.58	6.94	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Uncaria rhynchophylla GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q36844_9GENT]
A8Y6V8	3.57 %	1	336	35.9	5.30	6.88	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Cestrum parqui GN=atpB PE=3 SV=1 - [A8Y6V8_9SOLA]
P18260	5.29 %	2	510	55.5	6.33	6.43	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Helianthus annuus GN=ATPA PE=3 SV=1 - [ATPAM_HELAN]

Q36800	5.88 %	2	459	50.6	6.64	6.05	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Streptopus lanceolatus GN=rbcl PE=3 SV=1 - [RBL_STRLC]
Q9GER1	2.78 %	2	432	46.4	5.07	5.68	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Samolus repens GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9GER1_9ERIC]
O98447	2.47 %	1	891	99.4	8.73	5.63	ClpC protease OS=Spinacia oleracea GN=clpC PE=2 SV=1 - [O98447_SPIOL]
B5SUJ7	2.96 %	2	372	40.3	5.08	5.33	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Salvinia natans GN=atpB PE=3 SV=1 - [B5SUJ7_9FILJ]
Q5DRG8	3.20 %	1	469	51.9	6.48	4.98	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Stilpnophyllum grandifolium GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q5DRG8_9GENT]
O24652	7.18 %	1	376	41.9	7.30	4.97	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Eudorina peripheralis GN=rbcl PE=3 SV=1 - [O24652_9CHLO]
Q8SLS8	3.34 %	1	479	51.4	5.20	4.83	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Schima superba GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q8SLS8_9ERIC]
Q8WJH4	3.35 %	1	477	51.4	5.12	4.83	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Dioscorea pentaphylla GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q8WJH4_9LILL]
Q9MRW3	3.26 %	1	491	52.9	5.24	4.83	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Apium graveolens GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9MRW3_APIGR]
Q95AM4	8.17 %	1	465	51.4	6.65	4.81	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Prunus leveilleana GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q95AM4_9ROSA]
Q9MTV5	7.86 %	1	471	50.8	5.17	4.39	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Thymelaea hirsuta GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9MTV5_THYHI]
Q9TLJ2	1.88 %	1	480	51.8	5.30	4.31	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Simmondsia chinensis GN=atpB PE=3 SV=1 - [Q9TLJ2_SIMCH]
Q96123	7.46 %	1	201	20.3	5.66	4.10	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Triticum aestivum GN=SOD1.1 PE=2 SV=1 - [Q96123_WHEAT]
Q42644	7.18 %	1	376	42.0	7.50	3.77	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Basichlamys sacculifera GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q42644_9CHLO]
Q9GI11	6.79 %	1	265	29.3	6.47	3.76	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Barnebya dispar GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q9GI11_9ROSI]
Q6EW73	11.94 %	1	134	14.7	5.26	3.71	ATP synthase epsilon chain, chloroplastic OS=Nymphaea alba GN=atpE PE=3 SV=1 - [ATPE_NYMAL]
O03639	8.52 %	1	446	49.3	6.43	3.45	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Lysinema ciliatum GN=rbcl PE=3 SV=1 - [O03639_LYSCI]
COLE60	5.88 %	1	170	19.3	8.48	3.05	AtpF OS=Jatropha curcas GN=atpF PE=3 SV=1 - [COLE60_9ROSI]
Q5WPP7	3.66 %	1	328	36.5	7.18	2.88	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Cotinus carranzae GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q5WPP7_9ROSI]
Q9TJR9	7.69 %	1	481	52.3	5.47	2.81	ATP synthase subunit beta, plastid OS=Prototheca wickerhamii GN=atpB PE=3 SV=1 - [ATPB_PROWI]
Q8HT89	3.02 %	1	430	46.9	6.87	2.73	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Selaginella martensii GN=rbcl PE=3 SV=1 - [Q8HT89_SELMA]
Q37229	4.19 %	1	191	20.7	5.59	2.70	Glutamine synthetase (Fragment) OS=Solanum lycopersicum GN=gs PE=2 SV=1 - [Q37229_SOLLC]
Q5VL37	2.88 %	1	417	44.7	6.95	2.55	ATP synthase subunit alpha (Fragment) OS=Epipactis helleborine GN=atpA PE=3 SV=1 - [Q5VL37_EPIHE]