

METHODENOPTIMIERUNG FÜR DIE AUTOMATISIERTE PROTEINIDENTIFIKATION

BJÖRN H. BENDER

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Methodenoptimierung für die automatisierte Proteinidentifikation

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Björn Heiko Bender
aus Ehringshausen

Gießen 2009

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereiches Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter:

PD Dr. G. Lochnit

Gutachter:

PD Dr. K. Reuner

Tag der Disputation:

16.12.2009

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Kongressposter

B. H. Bender, A. Wagner, J. Grabitzki, P. Kiesau, B. McGlothlen, C. Mang, P. Engel und G. Lochnit „Automated in-gel and on-membrane digest for high-throughput protein identification“ Human Proteome Organisation 7th World-Congress, 16.-20. August 2008, Amsterdam, Niederlande

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1 Einleitung	2
1.1 Proteomics	2
1.2 Proteinauftrennung.....	2
1.3 Massenspektrometrie.....	3
1.4 Automatisierungsansätze in der Proteinanalytik.....	4
1.5 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellsystem.....	5
1.6 Problemstellung.....	5
2 Material und Methoden.....	6
2.1 Material.....	6
2.2 Chemikalien.....	6
2.3 Methoden	7
2.3.1 Agarplatten für die Kultivierung von <i>C. elegans</i>	7
2.3.2 Kultivierung von <i>C. elegans</i> mit <i>Escherichia coli</i> als Nährboden	8
2.3.3 Aufreinigung der <i>C. elegans</i>	8
2.3.4 Proteinbestimmung.....	9
2.3.5 Proteinisolation	9
2.3.6 Gelelektrophorese	10
2.3.7 Silberfärbung	15
2.3.8 Comassiefärbung	16
2.3.9 Densitometrie	16
2.3.10 Spotcutter	17
2.3.11 Proteolytischer Verdau der Proben	17
2.3.12 MALDI-TOF-MS.....	19
2.3.13 Datenbanken und Suchmaschinen	21
2.3.14 Datenintegration mittels der Datenbank iDQuest.....	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Untersuchung zum Einfluss des Entfärbens von Silbergelen auf die Proteinidentifikation..	24
3.2 Methodenoptimierung des proteolytischen Verdau-Schrittes	25
3.2.1 Variation bezüglich der Verdauzeit bzw. Reaktionstemperatur	25
3.2.2 Der Einfluß von Octylglycosid und Calcium auf die Proteinidentifikation.....	26
3.2.3 Untersuchung zum Einfluß von Acetonitril im Verdaupuffer.....	26
3.3 Optimierung der Extraktionsmethode.....	27
3.3.1 Vergleich der Effizienz zwischen Ultraschall und Schüttler.....	27
3.3.2 Einfluß des Extraktionsvolumens auf die Proteinidentifikation.....	28
3.3.3 Eine zusätzliche Extraktion mit Acetonitril.....	29
3.4 MALDI-Matrices und Präparationsmethoden.....	30
3.4.1 Vergleich verschiedener Matrices	30

3.4.2	Vergleich verschiedener Matrixpräparationen bei automatischer Datenaufnahme	34
3.5	Vergleich zweier Abtastmuster bei der MALDI-Tof-MS Analyse	37
3.6	Die Proteinidentifikationen unterschiedlicher Suchprogramme und Datenbanken.....	38
3.7	Vergleich zwischen automatischem und manuellem Verdau	41
3.8	Proteinidentifikation eines Referenzlabors im Vergleich zur hier etablierten Methode.....	42
4	Diskussion	44
4.1	Anwendung und Beschränkungen der Silberfärbung	44
4.2	Verdau	45
4.2.1	Der Einfluss der Verdauzeit und der Reaktionstemperatur.....	45
4.2.2	Octylglycosid und Calcium im Verdaupuffer.....	46
4.2.3	Organische Lösungsmittel im Verdaupuffer	46
4.3	Extraktion	47
4.3.1	Das mechanische Unterstützen des Extraktionsprozesses	47
4.3.2	Volumenänderung der Extraktionslösung	48
4.3.3	Die Extraktion mit Acetonitril	48
4.4	Auswirkungen der Matrixpräparation und des Abtastmusters	49
4.5	Anwendung von Suchmaschinen und Datenbanken	50
4.6	Das automatisierte Verdauprotokoll im Vergleich	51
5	Zusammenfassung.....	53
6	Summary	54
7	Literatur.....	55
	Danksagung.....	58

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AMPS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymizsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
LC	liquid chromatography
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight
MS	Massenspektrometer
PAC	prespottet Anchorchip
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat/Polyacryamid Gelelektrophorese
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
v/v	volume/volume
V	Volumen
2D	zweidimensional

1 Einleitung

1.1 Proteomics

Auf dem Weg die Mechanismen und Pathomechanismen in einer Zelle zu verstehen, muss man die Interaktionen der Biomoleküle analysieren. Das Genom liefert die Information über alle erdenklichen Proteine, die eine Zelle in der Lage wäre zu synthetisieren. Hieraus kann man keine Informationen über den aktuellen Aktivitätszustand der Zelle gewinnen, die mit Pathogenen, mit einer veränderten Stoffwechsellage oder verschiedenen Wachstumsanforderungen konfrontiert ist. Auch die Analyse der mRNA allein hilft hier nicht immer weiter [1], da die zahlreichen posttranslationalen Modifikationen (Phosphorylierung, Methylierung, Glycosylierung, limitierte Proteolyse, etc.) letztendlich entscheidend für die aktive Form der Proteine sind. Der Ausdruck „Proteom“ wurde eingeführt, um die Gesamtheit aller Proteine, die von einer Zelle in Abhängigkeit der Umwelteinflüsse zu einem Zeitpunkt synthetisiert werden, zu beschreiben [2]. In Verbindung mit dem Wissen über die aktuelle Situation, mit der sich die Zelle gerade auseinandersetzen muss, können durch Proteomanalysen detailliertere Erkenntnisse über die Funktion der Proteine und deren Zusammenspiel in Pathomechanismen gewonnen werden. Von besonderem Interesse in der Systembiologie sind daher ganze Proteome und nicht einzelne Proteine. Die Proteinanalytik ist aus der medizinischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Die Erforschung der Veränderungen im Proteinspektrum bei Hep-B-infizierten Zellen, die zu der Entwicklung des Leberkarzinoms führen [3], oder das Verständnis für die Entwicklung der diabetischen Retinopathie [4] sind zwei von vielen aktuellen Beispielen. Auch in der Pharmaforschung sind die Wirkungen von Medikamenten nicht mehr nur am einzelnen Protein sondern am Proteom von Interesse [5].

1.2 Proteinauftrennung

Vorraussetzung für die Proteomanalyse ist die Auftrennung der Proteine eines Organismus. Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze Proteine aufzutrennen; Gelelektrophorese und Flüssigkeitschromatographie. Die gängigste Methode zur Proteintrennung ist bis heute die zweidimensionale Gelelektrophorese

(2D-SDS-PAGE) [6]. Die erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung) trennt Proteine nach dem isoelektrischen Punkt. Die Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgt anschließend in der zweiten Dimension (SDS-PAGE). Nach der Auftrennung werden die Proteine im Gel gefärbt, ausgestochen, enzymatisch verdaut und durch die resultierenden Peptide mittels Massenspektrometrie identifiziert. Eine weitere Methode um Proteine oder Peptide aufzutrennen ist die Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography, LC). Hier gibt es eine Reihe unterschiedlicher Methoden (Ionenaustauschchromatographie, Reverse-Phase-Chromatographie, etc.) [7, 8]. Eine Trennung mittels LC kann in bestimmten Fragestellungen die 2D-SDS-PAGE ersetzen (z.B. Multidimensionale-HPLC). LC-Methoden werden auch in Kombination mit Gelelektrophorese angewendet. Hier wird nach 2D-Gel-Trennung und enzymatischem Verdau eines Proteins das resultierende Peptidgemisch nochmals durch LC aufgetrennt. Dieses Verfahren bringt Vorteile bei der Analyse von komplexen Peptidgemischen, da das Peptidgemisch nun im Massenspektrometer fraktioniert gemessen wird und bestimmte Suppressionseffekte vermindert werden [9].

1.3 Massenspektrometrie

Lange Zeit konnten Proteine und Peptide nur durch ihre Aminosäuresequenz per Edman-Abbau identifiziert werden. Die kontinuierliche Weiterentwicklung der Massenspektrometrie und wachsende Einträge in Proteindatenbanken machten es nun möglich Proteine und Peptide viel zeitsparender zu analysieren [1]. Unter Verwendung der Peptidmassen eines Proteins ist eine Identifikation durch Vergleich mit den theoretischen Massen aus Datenbanken möglich. Für die Proteinanalytik haben sich zwei massenspektrometrische Techniken als besonders geeignet herausgestellt: ESI-MS (Electro-Spray-Ionisation - Mass-Spectrometry) und MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation - Time-Of-Flight - Mass-Spectrometry) [10]. Das Grundprinzip eines Massenspektrometers besteht aus einer Ionenquelle in der die Peptide ionisiert werden und dem dazugehörigen Massenanalysator (z.B. TOF). Bei der Elektro-Spray-Ionisation werden die Peptide in Lösung aus einer Kapillare in feinste Tröpfchen versprüht. Die Kapillare hat eine sehr hohe Potentialdifferenz zur Gegenelektrode. Auf diese Weise erfolgt die Ionisierung. Bei der matrixunterstützten Laser-Desorption/Ionisation wird die Peptidlösung mit

einer Matrix gemischt. Nach der Kristallisation von Matrix mit Peptiden werden die Kristalle durch einen Laserimpuls angeregt. Dabei ionisiert die angeregte Matrix die Peptide [10, 11]. Die geladenen Peptide werden nun durch Spannung beschleunigt. Im TOF-Analysator werden die unterschiedlichen Flugzeiten der Peptide gemessen. Dies führt zum Masse-Ladungsspektrum. Als Matrix-Grundsubstanz haben sich für die Protonierung von Proteinen und Peptiden 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [12] und Hydroxycyanozimtsäure (HCCA) [13] als besonders geeignet erwiesen, da sie sich besonders gut vom Stickstofflaser anregen lassen und einen hohen Protonentransfer auf Peptide haben.

1.4 Automatisierungsansätze in der Proteinanalytik

Vorraussetzung für die Identifikation eines Proteins mittels MS, ist die Analyse der proteolytischen Fragmente eines Proteins. Der gesamte Analyseprozess besteht aus dem Ausstechen der Proteine aus dem Gel, dem Waschen der Gelstückchen, dem Verdau, der Extraktion der Peptide aus dem Gelstück, der MS-Analyse und dem Vergleich der Massenliste mit Datenbankeinträgen. Dieser Prozess ist für ganze Proteome sehr zeitaufwendig. Eine Anforderung für die Analyse ganzer Proteome ist daher eine weitestgehende Automatisierung des gesamten Analyseprozess vom Gel bis zum Ergebnis. In den letzten Jahrzehnten sind Geräte entwickelt worden, die das Ausstechen von Proteinbanden oder Proteinplugs aus 2D-Gelen in kurzer Zeit übernehmen. Neuere Pipetierroboter/Verdauroboter, die das Reinigen und die Inkubation der Gelstückchen mit den Verdaupuffern durchführen, machen die Automatisierung des Verdau möglich. Zudem können Verunreinigungen der Proben durch Keratin auf diese Weise weitgehend minimiert werden [14] und die Qualität der Ergebnisse kann verbessert werden, da gegenüber dem manuellen Verdau das Protokoll genauer eingehalten werden kann [15]. Die manuelle Aufnahme der Massenspektren und die Identifikation in Datenbanken sind für ein einzelnes Protein noch möglich. Für ein ganzes Proteom sind bei den immensen Datenmengen automatische Prozeduren unerlässlich. Eine große Herausforderung stellt daher die Integration der verschiedenen Hard- und Software in einem gemeinsamen Arbeitsprozess dar.

1.5 *Caenorhabditis elegans* als Modellsystem

Bereits in den 1970er Jahren wurde der Nematode *Caenorhabditis elegans* als Modellsystem für Gen- und Mutationsanalysen eingeführt [16]. Bis heute ist *C.elegans* einer der bedeutendsten Modellorganismen für die medizinische Forschung. In der Erforschung der Nematodeninfektionen liefert *C.elegans* wertvolle Erkenntnisse über Infektionsmechanismen und therapeutische Ansatzpunkte [17]. Darüber hinaus führt die Ähnlichkeit zellulärer Signalwege zwischen Nematode und Mensch zu umfangreichen Erkenntnissen über krankheitsrelevante Gene und Signalwege. Viele Schlüsselerkenntnisse über Krankheitsmechanismen wurden an *C.elegans* gewonnen (z.B. Präseniline bei familiärer Alzheimer Erkrankung, Regulatoren im Insulin-Signaltransduktionsweg, Wirkungen von Pharmaka am Serotonin-Reuptake-Transporter) [18]. Bereits 1998 wurde das 97 Millionen Basenpaare zählende Genom von *C. elegans* fertig entschlüsselt. Über 19 000 Gene wurden annotiert [19]. Umfassende Daten zum Genom und Genprodukten wurden in der WormBase Datenbank [20] zusammengefasst. Einen Überblick über die Vielfältigkeit der *C.elegans*-Forschung gibt www.wormbook.org.

1.6 Problemstellung

Ziel der Arbeit ist die Optimierung der Identifikation von Proteinen, die mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt wurden. Da nicht nur einzelne Proteine, sondern ganze Proteome von Interesse sind, sollen die manuellen Methoden des proteolytischen Verdaus auf einem Verdauroboter automatisiert werden, um den größer werdenden Analysemengen gerecht zu werden. Es sollen dabei Arbeitsschritte wie das Entfärben der ausgestochenen Gelstücke, verschiedene Zusätze im Verdaupuffer, Temperaturvariationen des enzymatischen Verdaus, verschiedene Matrixpräparationen hinsichtlich der Identifikation von *C.elegans*-Proteinen und die Anwendungsmöglichkeiten der verschiedenen Datenbanken untersucht und optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Modulares System-Stereomikroskop Leica MS 5, Leica, Wetzlar

Universal 32 R-Zentrifuge, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen

Ultraschallbad Badelin Sonorex TK 52, Roth, Karlsruhe

Digitale Waage Mettler AJ150, Mettler PB3000, Mettler-Toledo GmbH, Giessen

Speed Vac, RC 10.22. Jouan, Thermo, Fernwald

Spektrophotometer DU 640, Beckmann, Krefeld

Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4, Christ, Osterode am Harz

Für die Gelelektrophorese:

Netzgerät: Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, GE Healthcare, Freiburg

Elektrophoresekammer: Multiphor II, GE Healthcare, Freiburg

Spotcutter ExQuest, Bio Rad, München

Microlab Starlet Pipetierroboter, Hamilton Robotics, Martinsried

Ultraflex TOF/TOF I Massenspektrometer mit Lيفةinheit, Bruker Daltonik, Bremen

Edelstahl-Target, Bruker Daltonik, Bremen

AnchorChip600-Target, Bruker Daltonik, Bremen

Prespottet AnchorChip-Target (PAC), Bruker Daltonik, Bremen

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität bezogen (Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Fluka, Neu Ulm; Serva, Heidelberg).

Wasser wurde mit dem "Milli-Q Ultra-pure water system" (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

2.3 Methoden

2.3.1 Agarplatten für die Kultivierung von *C. elegans*

Für die Kultivierung von *C. elegans* wurden Petrischalen von 145 mm Durchmesser verwendet, in die eine Agarlösung gegossen wurde.

Die Agarlösung setzt sich zusammen aus:

- 5 g Caseinhydrolysat (Pepton 140) (Merck)
 - 5 g Hefeextrakt (Life Technologie, Eggenstein)
 - 3 g NaCl
 - 20 g Agar, high gel-strength (Serva)
- auf ein 1 L mit H₂O auffüllen

Anschließend wurde die Agarlösung autoklaviert (20 Minuten, 120 °C) und es wurden folgende sterile Lösungen dazugegeben:

- 1 ml Cholesterin-Lösung (5 g Cholesterin / 1L Ethanol)
- 0,5 ml CaCl₂-Lösung (110,8 g CaCl₂ / 1L H₂O)
- 1 ml MgSO₄-Lösung (246,5 g MgSO₄ / 1L H₂O)
- 25 ml Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung
(108,3 g KH₂PO₄ und 36 g K₂HPO₄ / 1L H₂O)
- 2 ml Thiabendazol (10 mg/ml Thiabendazol in Dimethylsulfoxid)
- 2 ml 0,1 %ig Methylenblau in H₂O

Nach guter Durchmischung wurde der Agar in einer 0,5 cm dicken Schicht in die Petrischale gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.

2.3.2 Kultivierung von *C. elegans* mit *Escherichia coli* als Nährboden

Für den Bakterienrasen auf den Agarplatten wurden *E. coli*-Bakterien (OP 50) verwendet.

Bakterienmedium:

0,5 g	Caseinhydrolysat
0,5 g	Hefeextrakt
0,3 g	NaCl
100 ml	H ₂ O

Das Bakterienmedium wurde verrührt und bei 120 °C für 20 Minuten autoklaviert. Nach dem Autoklavieren kühlte die Lösung ab und wurde mit 50 µL *E. coli*-Bakterienkultur versetzt. Die Suspension wuchs über Nacht bei 37 °C. Der abgekühlte Agar wurde schließlich mit 800 µL der Bakteriensuspension angeimpft. Der Bakterienrasen wuchs anschließend über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank. Auf die bewachsenen Agarplatten wurden 500 µL *C. elegans*-Suspension (~ 2000 Würmer) aufgegeben. Die Agarplatten wurden bei 18 °C inkubiert.

2.3.3 Aufreinigung der *C. elegans*

Die Agarplatten werden mit 15 mL M9-Puffer abgespült und die Flüssigkeit in Zentrifugenröhrchen (V=50 mL) überführt.

Zusammensetzung des M9-Puffers:

250 ml	Phosphatpuffer (60 g KH ₂ PO ₄ , 120 g Na ₂ HPO ₄), pH=6,0
25 g	NaCl
5 ml	1 mol/L MgSO ₄
	auf 5 L mit H ₂ O auffüllen

C. elegans wurden im M9-Puffer auf Eis gestellt, dadurch setzten sich die Würmer als Sediment ab. Der Überstand wurde abgezogen. Da das Sediment noch Kontaminationen mit Zelltrümmern, Bakterienresten und Häutungsaggregaten enthielt, wurden die Nematoden durch eine Dichtezentrifugation [21] gereinigt.

Zur Reinigung der Würmer wurden sie mit M9-Puffer auf 15 mL aufgefüllt und mit 10 mL Saccharoselösung (30 %ig) unterschichtet. Anschließend wurden sie bei 1500 xg 7 Minuten zentrifugiert. Die Saccharoseschicht mit den *C. elegans* wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen (V=50 mL) überführt und die Würmer wurden dreimal mit M9-Puffer gewaschen.

2.3.4 Proteinbestimmung

Die Proben wurden in Küvetten mit 200 µL H₂O gegeben. Anschließend wurde das Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Bio Rad) ein Teil zu vier Teilen mit H₂O verdünnt und 800 µL des Reagenzes in die Küvetten pipettiert. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 1000 µL H₂O hinzugegeben und die Absorption der Lösung bei 578 nm gemessen.

Eine Verdünnungsreihe mit einem Albumin-Standard (Pierce, Bonn) in den Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 µg/ µL diente zur Kalibrierung.

2.3.5 Proteinisolation

15 mg lyophilisierte *C. elegans* (ca. 1 mg Protein) wurden in 500 µL Lysispuffer gelöst und 1 Stunde bei 20000 xg zentrifugiert. Um störende Agenzien oder Ionen zu entfernen, welche die Gelelektrophorese stören können und um die *C.elegans*-Proteine aufzukonzentrieren, wurde eine Chloroform/Methanol-Fällung vollzogen [22].

Hierzu wurden 90 µL des Überstandes in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 400 µL Methanol und 100 µL Chloroform gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 µL H₂O hinzugefügt und erneut gemischt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation wurde diese Probe für 5 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die Probe mit weiteren 300 µL Methanol versetzt. Anschließend wurde die Probe erneut für 5 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde für 5 Minuten in ein 40 °C warmes Wasserbad gestellt, um das restliche Methanol abzdampfen. Die Probe wurde nun mit 50 µL Probepuffer versetzt und im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurden diese Proben auf 3 x 5 mm große Probenplättchen pipettiert. Diese standen nun für die isoelektrische Fokussierung zur Verfügung.

Lysispuffer:

360 mg Urea (6 mol/ L)
152 mg Thiourea (2 mol/ L)
40 mg CHAPS (4 %)
10 mg DTT
10 µL Protease Inhibitor Cocktail
30 µL Servalyte 3-10
auf 1 mL mit H₂O auffüllen

Probenpuffer:

360 mg Urea (6 mol/ L)
152 mg Thiourea (2 mol/ L)
40 mg CHAPS (4 %)
10 mg DTT
30 µL Servalyte 3-10
auf 1 mL mit H₂O auffüllen

2.3.6 Gelelektrophorese

Die Gele wurden von Dr. Julia Grabitzki, Proteinanalytik, Biochemisches Institut Giessen, bereitgestellt.

2.3.6.1 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Acrylamidkonzentrationen betragen 12 % im Trenngel und 4 % im Sammelgel.

Acrylamidstammlösung: 100 ml Acrylamidstammlösung (Roth)

Trenngelpuffer: 36,3 g Tris (ICN)/ HCl (Merck), pH 8,8
ad 100 ml H₂O

Sammelgelpuffer: 6,0 g Tris/ HCl, pH 6,8
ad 100 ml H₂O

SDS-Lösung: 10 g SDS
ad 100 ml H₂O

Ammoniumperoxiddisulfat-Lösung: 0,1 g AMPS / ml H₂O

Elektrodenstammpuffer, zehnfach: 15 g Tris, 72 g Glycin
ad 500 ml H₂O

Elektrodenlaufpuffer: 100 ml Elektrodenstammpuffer, zehnfach
10 ml SDS-Lösung
auf 1 Liter mit H₂O auffüllen

Für zwei Gele mit 0,75 mm Dicke wurden 3,35 ml H₂O, 4,0 ml Acrylamidstammlösung und 2,5 ml Trenngelpuffer gemischt, 5 Minuten im Ultraschallbad entgast und 5 Minuten auf 50°C erhitzt. Unter gründlichem Mischen wurden 100 µl SDS-Lösung, 50 µl AMPS (Serva) und 5 µl *N,N,N,N*-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Merck) hinzugefügt. 3,4 ml der Lösung wurde zwischen zwei auf Gelplatten-Halter eingespannte Glasplatten gegeben. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngelgemisch mit H₂O-gesättigtem Butanol überschichtet und eine Stunde ruhen gelassen. Nach der Polymerisation wurde das *n*-Butanol abgegossen und die Trenngeloberfläche gründlich mit H₂O gespült.

Für das Sammelgel wurden 6,1 ml H₂O, 1,3 ml Acrylamidstammlösung und 2,5 ml Sammelgelpuffer gemischt und 5 Minuten im Ultraschallbad entgast. Anschließend wurden 100 µl SDS-Lösung, 5 µl AMPS und 10 µl TEMED hinzugegeben. Die Sammelgelmischung wurde auf das Trenngel pipettiert und der Kamm für die Proben tasche aufgesetzt. Der verwendete Kamm formte 10 Auftrags taschen für ein Probenvolumen von je maximal 40 µl. Nach einer Polymerisationszeit von 45 Minuten wurden die Kämmen entfernt, die Taschen mit H₂O gespült und die Elektrophoresekammer zusammengesetzt. In die innere Kammer wurden 125 ml und in die äußere Kammer 200 ml Elektrodenlaufpuffer eingefüllt.

Vor dem Auftrag auf das Sammelgel wurden die Proteinproben 5 Minuten bei 100°C in 40 µl Probenpuffer gekocht.

Zusammensetzung des Probenpuffers (1 ml):

62,5 µL	1 M Tris/HCl, pH 6,8
10,0 µL	100 mM Na ₂ EDTA (Roth)
100 µL	Glycerin (87%)
200 µL	SDS (10%)
25,0 µL	Bromphenolblau (0,25%)
552,5 µL	H ₂ O
50 µL	2-Mercaptoethanol (Merck)

Mit einer Hamilton-Spritze wurden Aliquots der Proben und des Standards auf das Gel aufgetragen. Als Standard für das SDS-Gel wurde BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) genommen.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 15 Minuten bei 100 V und dann für 65 Minuten bei 150 V. Danach wurden die Gele entnommen, mit Coomassie oder Silber gefärbt.

2.3.6.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Erste Dimension (IEF)

Die Anwendung der isoelektrischen Fokussierung (IEF) ist auf die Trennung solcher Moleküle beschränkt, die einen amphoteren Charakter besitzen.

Zunächst wurden IEF-Gelstrips gegossen. Auf eine Glasplatte wurden 1,5 mL H₂O gegeben. Ein GelBond PAG Film (GE Healthcare) wurde luftblasenfrei auf die Glasplatte aufgezogen. Nach 5 Minuten wurde mit einer Rolle das überschüssige H₂O entfernt und die Schutzfolie abgezogen. Eine silanisierte Glasplatte mit integrierter Gummidichtung an den Seiten wurde auf die Folie gelegt und mit Klammern fixiert. Mit einer Schlauchpumpe wurde langsam luftblasenfrei 20 mL Acrylamidlösung zwischen die Glaskammern laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel mit 70 %igen Isopropanol überschichtet. Das Gel wurde zunächst 60 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend 10 Minuten bei 60 °C polymerisiert.

Die Glasplatten wurden entfernt und das Gel mit der Folie zweimal 10 Minuten mit H₂O und einmal 15 Minuten mit 2 %igen Glycerin gewaschen. Anschließend wurde das Gel bei Raumtemperatur getrocknet und auf die entsprechende Stripgröße 3 mm x 14,4 cm zugeschnitten.

Acrylamid-Stammlösung:

29,1 g Acrylamid – PAGE (GE Healthcare)
0,9 g Bisacrylamid (GE Healthcare)
auf 100 mL mit H₂O auffüllen (filtrieren)

für ein 124 x 258 mm großes Gel:

4 mL Acrylamid-Stammlösung
16 mL H₂O
10 µL TEMED
20 µL (40 %ig) AMPS (40 mg AMPS in 1 mL H₂O)

Rehydratisierung

Die Gellösung wurde in die Spuren des „Reswelling Trays“ (GE Healthcare) mit einer Pipette perlenförmig eingefüllt, so dass möglichst keine Luftblasen entstanden.

Gellösung:

4,8 g 8 mol/ L Urea
0,1 g CHAPS
10 mg DTT
300 µL Servalyte 3-10 (iso-Dalt)
200 µL Ampholine 5-7
20 µL Bromphenolblau 2%ig
auf 10 mL mit H₂O aufgefüllt

Auf dieses Lösungsbett wurde jeweils ein Gelstrip mit der Acrylamidseite nach unten gelegt. Damit der Harnstoff aus der Lösung nicht auskristallisiert, wurde jede Spur mit 3 mL DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) bedeckt. Die Strips wurden über Nacht bei Raumtemperatur rehydratisiert.

Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Der gequollene Gelstreifen wurde aus dem Reswelling Tray herausgenommen, auf einem fussselfreien Papier (Kimberley Clark, Roth) abgetrocknet und mit der Gelseite mittig nach oben auf eine Glasplatte gelegt.

Die Elektrodenklammern wurden aufgesteckt, so dass der Elektrodendraht auf der Gelschicht der Strips auflag. Die Gelstreifen wurden mit 80 mL Cover Fluid überdeckt. Auf jeden Gelstreifen wurden bei der Anode 3 x 5 mm große Probelättchen gelegt, die jeweils 10 µL Probelösung enthielten. Der Deckel des Multiphor-Gerätes wurde aufgesetzt und die Kabel wurden mit dem Spannungsgerät verbunden.

Das Spannungsgerät wurde wie folgt programmiert:

Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Zeit [min]
2000	1	2	60
2000	2	2	165
2500	2	3	15

Nach Abschluss der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstrips herausgenommen und auf fussselfreiem Papier abgetrocknet. Die Strips wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Zweite Dimension

Die Natriumdodecylsulfat/Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde basierend auf der Methode von Laemmli durchgeführt [23]. Dabei kam ein 10%iges Trenngel zum Einsatz.

Pipettierschema für ein 10 %iges Trenngel:

29,9 mL	H ₂ O
23 mL	30 % Acrylamid
17 mL	2 mol/L Tris, pH=8,8
0,7 mL	10 %ig SDS
350 µL	10 %ig AMPS
35 µL	TEMED

Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngelgemisch mit 0,1 %ig SDS überschichtet und drei Stunden bei 60 °C ruhen gelassen. Nach der Polymerisation wurde das 0,1 %ige SDS abgegossen und die Trenngeloberfläche gründlich mit einem Filterpapier getrocknet. Nach dem Auftauen der Gelstrips wurden diese 10 Minuten in 2 mL Equilibrierungspuffer (6 mol/ L Urea 0,1 mmol/ L EDTA, 0.01 % Bromphenolblau, 50 mmol/ L Tris pH=6,8, 30 % Glycerin, v/v) gewaschen. Anschließend wurde 2 mL DTT-Lösung [100 mg 1,4-Dithio-DL-threitol (Fluka), 200 mg SDS in 10 mL Equilibrierungspuffer] auf die Gelstrips gegeben. Für weitere 15 Minuten wurden die Gelstrips anschließend in 5 mL Jodacetamid-Lösung [400 mg Jodacetamid (Fluka), 200 mg SDS in 10 mL Equilibrierungspuffer] equilibriert. Die Strips wurden auf einem fusselreien Tuch abgetrocknet und auf die Geloberkante gelegt. Auf ein 2 x 2 mm großes Probenplättchen wurde ein Precision Protein Standard (Bio Rad) aufgetragen und getrocknet. Der Gelstrip und der Standardmarker wurden mit Agarose [0,5 % IEF-Agarose (GE Healthcare), 2,5 mL 1 mol/ L Tris, pH=6,8, 7,5 mL H₂O] fixiert und in die Elektrophoreseapparatur (Protean XI, BioRad) gestellt. Diese Kammer benötigt 2 L Elektrophorese-Laufpuffer. In die innere Kammer wurden 700 mL und in die äußere Kammer 1,3 L Elektrodenlaufpuffer eingefüllt.

Elektrodenlaufpuffer:

30 g Tris
144 g Glycin
10 mL SDS (10%ig)
auf 1 L mit H₂O auffüllen

Das Gel lief mit einer Spannung von 600 V, 90 mA und 50 W für 3 Stunden bei 15°C. Danach wurden die Gele entnommen und mit Silbernitrat gefärbt.

2.3.7 Silberfärbung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Silberfärbung verwendet, die keine Glutardialdehyd-Vernetzung der Proteine verursacht und somit MS-kompatibel ist. Nach erfolgter 2D-SDS-Gelelektrophorese wurden die 2D-Gele über Nacht in Fixierlösung [500 mL Ethanol, 400 mL H₂O, 100 mL Essigsäure, 0,5 mL Formaldehyd (37 %ig)] fixiert. Am nächsten Tag wurden sie zweimal je 25 Minuten in

50 % Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte die Sensitivierung mit einer frisch angesetzten Sensitivlösung [0,1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Merck) in 500 mL H_2O] für 60 Sekunden. Nach dreimaligem Waschen für je 20 Sekunden mit H_2O wurden die 2D-SDS-PAGE für 20 Minuten in Färbelösung [0,4 g AgNO_3 in 200 mL H_2O , 150 μL Formaldehyd (37 %ig)] inkubiert. Fortführend wurde dreimal für 20 Sekunden mit H_2O gewaschen. Die 2D-SDS-PAGEs wurden mit Entwicklerlösung [15 g Na_2CO_3 , 1 mg $\text{NaS}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 250 mL H_2O , 125 μL Formaldehyd (37 %)] behandelt, bis die Spots sichtbar wurden. Zum Abstoppen der Färbung wurden die Gele für 20 Sekunden gewässert und anschließend 10 Minuten in Stopplösung (220 mL Ethanol, 220 mL H_2O , 60 mL Essigsäure) inkubiert. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte in H_2O bei 4°C.

2.3.8 Comassiefärbung

Für die Coomassiefärbung wurden 100 mg Coomassie „Brillant Blue“ R250 (Serva) in 100 ml Blitzfixierer gelöst.

Blitzfixierer:

- 40 Vol.% Methanol
- 10 Vol.% Essigsäure (96%)
- 50 Vol. % H_2O

Das Gel wurde mit dieser Lösung 15 Minuten gefärbt und, sobald Banden im Gel sichtbar waren, entfärbt.

Das Entfärben des Gels dauerte bei wiederholtem Wasserwechsel ungefähr 60 Minuten. Die gefärbten Gele wurden über Nacht in H_2O unter ständigem Schwenken gewässert. Am nächsten Morgen wurde das Gel für ungefähr 50 Minuten in 5% Glycerin-Lösung (v/v) inkubiert, um es zu konservieren.

2.3.9 Densitometrie

Die Gele wurden durch ein spezielles Densitometer (GS-800, Bio Rad, München) hochauflösend eingescannt. Die Bilddatei wurde in die PDQuest Software (BioRad) geladen.

2.3.10 Spotcutter

Das Gel wurde in den Spotcutter gelegt. In dem zuvor eingescannten Bild wurden die gewünschten Gelplugs per Mausklick angewählt. Der Spotcutter nahm ein weiteres Bild des Gels mit seiner eigenen Kamera auf. Das hochauflösende Bild mit den angewählten Gelplugs wurde in der Software mit dem Bild des Spotcutters abgeglichen. Dieser Schritt ist für die genaue Positionsbestimmung der Gelplugs notwendig. Im Anschluß wurde eine 96er Wellplatte auf eine der vier dafür vorgesehen Positionen im Spotcutter gestellt. Der Spotcutter stanzte die gewünschten Gelplugs aus (Durchmesser 1,5 mm) und überführte sie unter Abgabe von 100 µl H₂O in die Wells der Platte. Nach dem Ausstechen wurden das Bild und die Information über die Position der Gelplugs in der Wellplatte an iDQuest übermittelt (2.3.14).

2.3.11 Proteolytischer Verdau der Proben

2.3.11.1 Manuelles Verdauprotokoll

Der manuelle Verdau erfolgte nicht in 96er Wellplatten, sondern in Eppendorf LoBind Gefäßen (Eppendorf, Hamburg). Die Spots wurden durch den Spotcutter aus dem Gel ausgeschnitten, in die Eppendorf LoBind gegeben, mit 100 µL H₂O versetzt. Danach wurden die Spots 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Das Gel wurde zunächst 15 Minuten mit 100 µL 50 mmol/ L NH₄HCO₃/ Acetonitril (1:1) gewaschen und der Überstand abgenommen. Das Gelstück wurde mit 30 µL Acetonitril (ACN) vollständig bedeckt. Nach 60 Sekunden wurde das ACN entfernt. Anschließend wurde das Gelstück mit 50 µL 50 mmol/ L NH₄HCO₃ Puffer rehydriert. Nach 5 Minuten wurde es mit 50 µL ACN versetzt und weitere 15 Minuten geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen. Anschließend wurde das Gel durch Zugabe von 50 µL ACN in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für die Trypsinlösung wurde Trypsin (Promega) in 25 mmol/ L NH₄HCO₃ gelöst. Die Trypsinkonzentration betrug im Verdaupuffer 10 ng/µl. Das Gelstück wurde mit 9 µL des Verdaupuffers versetzt und zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Gelstück über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben mit 7,5 µL 1 % TFA versetzt und für

10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Die extrahierten Peptide standen nun für massenspektrometrische Analysen zur Verfügung.

2.3.11.2 Verdauprotokoll des Digesters

Die 96er Wellplatte wurde zusammen mit den Lösungsmitteln und dem jeweiligen MALDI-Target in den Digester gestellt.

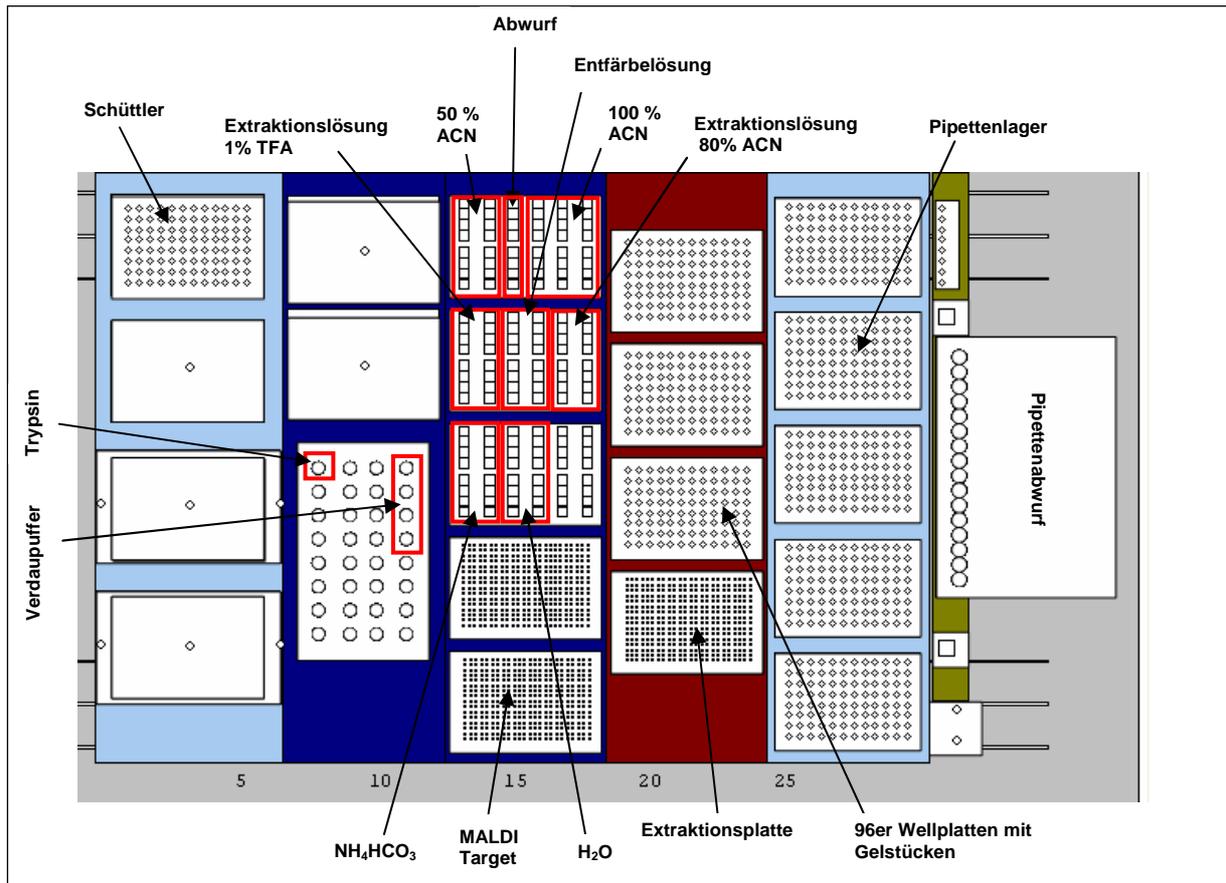


Abb. 2.1: Schema der Arbeitsplattform des Digesters

Der Digester wurde programmiert und die zu bearbeitenden Positionen auf der Wellplatte wurden aus iDQuest (2.3.14) eingelesen. Danach führte der Digester folgende Schritte aus: Zunächst wurde der Flüssigkeitsüberstand abgenommen. Nur für das Experiment 3.1 wurden die silbergefärbten Gelstücke anschließend 5 min. mit 130µl der Entfärbelösung (30mM Kaliumhexacyanoferrat + 100mM Natriumthiosulfat 1:1 in H₂O) inkubiert. In allen anderen Experimenten erfolgte direkt der Waschschrift mit 150µl H₂O. Nach 10 min wurde das Wasser wieder abgenommen. Es wurden 150µl ACN + 50mM NH₄HCO₃ (1:1) hinzugegeben und nach 10 Minuten wieder abgenommen. Anschließend wurden die Gelstücke mit 150µl ACN (100%) für 2 min

dehydriert. Nachdem das ACN wieder entfernt wurde, erfolgte für 5 min die Rehydrierung mit 150µl 50mM NH₄HCO₃. Danach wurden die Gelstückchen erneut mit 150µl ACN dehydriert und unter Verdampfen des ACN bei 56°C vollständig getrocknet. Nun folgte das Ansetzen des Verdaupuffers mit Trypsin bei 4°C. Die Stammlösung Trypsin im Digester hatte eine Konzentration von 0,1µg/µl. Sie wurde mit 25mM NH₄HCO₃ verdünnt, so dass eine Trypsin-Konzentration von 7ng/µl im Verdaupuffer vorlag. Die Menge an Stammlösung und die Menge an Verdaupuffer wurden abhängig von der Probenanzahl durch den Digester vorher berechnet. Zu jeder Probe wurden 17µl Verdaupuffer hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 15 min. Anschließend wurden 50µl 25mM NH₄HCO₃ hinzugegeben und der Überstand sofort abgenommen, um überschüssiges Trypsin außerhalb des Gelplugs zu entfernen. Der anschließende Verdau erfolgte je nach Experiment bei 38°C für 8h oder bei 45°C für 2h. Anschließend wurden die Wellplatten mit 10µl Extraktionslösung (1% TFA) versetzt. Für 20 min erfolgte im Schüttler des Digesters das Auslösen der Peptide aus dem Gelstück.

2.3.12 MALDI-TOF-MS

2.3.12.1 Matrices und Präparationsmethoden

2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) mit Phosphorsäure

10 mg DHB (Sigma) wurden in 1 ml 50% ACN und 1% Phosphorsäure gelöst. Diese Matrixlösung wurde standardmäßig in unserem Labor für MS Analysen von Peptidlösungen verwendet. 0,5µl der Matrixlösung wurde auf das Edelstahl-Target (Bruker, Bremen) aufgetragen. Noch bevor die Matrixlösung trocknen und auskristallisieren konnte, wurde je nach Experiment 0,5µl oder 1µl der Peptidlösung aufgetragen und mit der Matrixlösung vermischt. Anschließend trocknete das Matrix-Peptidgemisch bei Raumtemperatur.

Hydroxycyanozimtsäure (HCCA) Präparation als „thinlayer“

100% Aceton wurde mit HCCA gesättigt. Vom Überstand dieser Lösung wurde eine Pipettenspitze mit ca. 2 µl befüllt und unter Abgabe der Lösung über den Anchor-Chip geführt. Dabei verdampfte das Aceton sofort nach Auftreffen der Matrixlösung auf dem Chip. Dies führte zu einer sehr homogenen und dünnen Matrixschicht.

Hydroxycyanozimtsäure (HCCA) Präparation als „doublelayer“

Zunächst wurden 20 mg HCCA in 1 ml Aceton gelöst. Anschließend wurde 1 mg HCCA in 1 ml 80% Aceton gelöst. Die erste Lösung wurde in gleicher Weise wie die „thinlayer“-Präparation auf dem Anchor-Target aufgetragen. Danach wurde 0,5µl der Peptidlösung aufgetragen. Die Peptidlösung wurde sofort mit 0,5µl der zweiten Matrixschicht vermischt.

2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) ohne Phosphorsäure

7mg DHB wurden in 1ml ACN und 0,1% TFA gelöst (0,1% TFA : ACN = 2 : 1). 1µl Matrixlösung wurde auf den Anchor-Chip aufgetragen.

Mischmatrix: 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und Hydroxycyanozimtsäure (HCCA)

5mg DHB und 5mg HCCA wurden in insgesamt 1ml ACN : 0,1% TFA (1:1) aufgelöst. 1µl dieser Lösung wurde auf den Anchor-Chip aufgetragen.

Hydroxycyanozimtsäure (HCCA)/Citronensäure in Tetrahydrofuran

5mg HCCA wurden in Tetrahydrofuran aufgelöst. 90µl dieser Lösung wurden mit 10µl 1M Citronensäure, gelöst in 0,1% TFA, gemischt. 1µl der nun entstandenen Matrixlösung wurde in gleicher Weise wie die „thinlayer“-Präparation auf dem Anchor-Target aufgetragen.

PAC-Target (prespotted Anchor-Chip)

Das PAC Target ist ein kommerzielles Produkt. Auf einer Platte aus Kunststoff ist bereits die Matrix (HCCA) aufgetragen. Das Auftragen der Peptidlösung kann hier direkt erfolgen.

Direkt nach dem Auftragen der Matrixlösungen wurde je nach Experiment eine bestimmte Menge der Peptidlösung aufgebracht. Das Auskristallisieren des Matrix-Peptid-Gemisches bei Raumtemperatur wurde abgewartet. Alle Matrices mit HCCA als Grundlage (mit Ausnahme der Mischmatrix) wurden nach dem Auskristallisieren

mit einem Waschpuffer (Ammoniumphosphat 10mmol/l in 0,1% TFA) bei 4°C gewaschen, um für MALDI-Analysen störende Salze abzuwaschen.

2.3.12.2 Manuelle MALDI-TOF-MS Messung

MALDI-TOF-MS-Analysen wurden mit dem Ultraflex TOF/TOF I Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen), das mit einem Stickstofflaser und einer LIFT-MS/MS Einheit ausgestattet ist, durchgeführt. Die Messungen wurden im positiven Reflektormodus durchgeführt. Für die manuellen Messungen wurde zunächst die nötige Laserenergie an einem Spot ermittelt. Die Spektren sollten einerseits möglichst hohe Peak-Intensitäten, andererseits eine hohe Auflösung haben. Die Kalibrierung des Massen-Messfehlers erfolgte mit einem Peptid (Kalibrierungs)-Standard (~1000 - 4000 Da) von Bruker Daltonik. Darauf erfolgte die Messung mit ca. 200 – 500 Einzelspektren pro Probe. Das Summenspektrum wurde gespeichert. Als Auswertungsprogramm wurde die Compass 1.1 Software bestehend aus FlexControl 2.4, FlexAnalysis 2.4 und BioTools 3.0 (Bruker) verwendet. Bekannte Störmassen (z.B. humanes Keratin, Matrixsignale, Autolyseprodukte von Trypsin) wurden aus der Massenliste entfernt.

2.3.12.3 Automatische MALDI-TOF-MS Messung

Für die automatische Messung wurde vor Beginn die nötige Laserenergie ermittelt und in der Software gespeichert. Die Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgte automatisch anhand der Kalibrierspots auf dem Target. Es wurden zwei verschiedene Abtastverfahren für den Laser getestet. Der Laser folgte dabei entweder einem hexagonalen oder einem zirkulären Abtastmuster. Bei der automatischen Messung lief das Programm FlexAnalysis 2.4 im Hintergrund und führte selbständig die Filterung der Störmassen aus. Das Programm Biotools 3.0 übernahm die Suche in den Proteindatenbanken.

2.3.13 Datenbanken und Suchmaschinen

Die Massenlisten werden zur Identifikation durch Suchmaschinen mit Datenbankeinträgen verglichen. Jede Suchmaschine berechnet das Ergebnis mit ihrem eigenen Algorithmus aus dem Vergleich der Massenliste der Probe mit der Massenliste bei errechnetem Verdau von Proteinen aus der Datenbank mit dem angegebenen Enzym.

Bei Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) wird zu der Suche ein Schwellenwert (Mascot-Score) errechnet. Wenn das Ergebnis über dem Schwellenwert liegt, ist das Ergebnis signifikant von einem zufälligen Treffer zu unterscheiden ($p < 0,05$). Bei Aldente (<http://www.expasy.ch/tools/aldente/>) wird ebenfalls ein solcher Score aus dem Vergleich von Massenliste und errechnetem Verdau angegeben. Profound (<http://prowl.rockefeller.edu/>) berechnet Erwartungswerte für Treffer, die bei einer zufälligen Massenliste mindestens so aussagekräftige Scores, wie die Probe selbst erreichen würden. Je niedriger der Erwartungswert bei Profound, je wahrscheinlicher ist die Identifikation. Ein Schwellenwert wird hier nicht angegeben. Als Datenbanken wurden entweder MSDB, NCBIInr oder Swiss-Prot verwendet [24-27].

2.3.14 Datenintegration mittels der Datenbank iDQuest

iDQuest verwaltet die gesamten Informationen rund um einen Verdauprozess. Diese Datenbank wurde parallel zu dieser Arbeit zur Verknüpfung verschiedener Hardware unseres Labors entwickelt. iDQuest erhält Informationen vom Spotcutter über die ausgestochenen Gelplugs und deren Position auf dem Gel, welches zuvor durch ein Densitometer eingescannt wurde. Auch die Position der Gelplugs nach dem Ausstechen in der 96er Wellplatte wird übermittelt. Über die grafische Benutzeroberfläche kann man in iDQuest die zukünftige Position der einzelnen Proben auf dem MALDI-Target festlegen. Auch die automatische Messmethode für das Massenspektrometer wird dort festgelegt. Anschließend erstellt iDQuest eine Arbeitsliste für den Digester und eine für das MALDI-Tof-MS. Der Digester pipettiert am Ende des Verdauprozesses die Matrix und die Peptidlösung auf die gewünschte Position auf dem MS-Target. Nach der automatischen Messung importiert iDQuest aus dem Datenverzeichnissen des Steuerrechners des MALDI-Tof-MS die Peaklisten. Daraufhin wird die Datenbanksuche mit MASCOT gestartet. Nach der Identifikation der Proteine stellt iDQuest die Ergebnisse zusammen. Dies geschieht alles im Hintergrund ohne äußeres Eingreifen. Mit einem Mausklick auf den entsprechenden Proteinspot im Gelbild erhält man schließlich das Massenspektrum und die Identifikation [28].

3 Ergebnisse

Die folgenden Experimente beschäftigen sich mit der Automatisierung und Optimierung des proteolytischen Verdaus. Es wurden einzelne Schritte des Verdauprozesses bis hin zur MALDI-Analyse und nachfolgender Identifikation durch Datenbanksuche isoliert betrachtet und bearbeitet. Der gesamte Prozess gliedert sich in das Waschen der ausgestanzten Gelstücke, den eigentlichen Verdau durch Trypsin, die Extraktion der entstandenen Peptide aus den Gelstücken, die Probenpräparation auf dem MALDI-Target und die anschließende Messung und Auswertung/Identifikation.

Im Waschschrift wurde der Einfluss des Entfärbens von silbergefärbten Gelstücken auf die Identifikation untersucht. Die Veränderung der Reaktionszeit und der Reaktionstemperatur für das Enzym Trypsin im Verdauschrift sollte zu einer Verkürzung des gesamten Verdauprozesses führen. Verschiedene Zusätze wie Calcium, Octylglycosid oder ACN im Verdaupuffer, sollten die Aktivität des Trypsins erhöhen und vor verstärktem Eigenverdau schützen. Für den Extraktionsschrift wurden Untersuchungen zum Vergleich von Ultraschallextraktion zu Schüttlerextraktion durchgeführt, um ein optimales Auslösen der Peptide zu ermöglichen. Auch das Volumen der Extraktionslösung wurde variiert. Es wurde auch eine Extraktion mit dem hydrophoben Lösungsmittel ACN durchgeführt um die hydrophoben Peptide zu gewinnen. Auf dem Weg zur MALDI-Analyse folgte nun die Verbindung der Peptidlösung mit dem Matrixgemisch. Hier wurden die unterschiedlichsten Matrixpräparationen aus DHB und HCCA (2.3.12.1) sowie Fertigtargets (PAC) getestet. Es ging vor allen Dingen um die Frage welche Matrix sich am besten für die Identifikation von Proteinen am Beispiel des Nematoden *C. elegans* eignet. Untersuchungen zur automatischen MALDI-Messung wurden an den verschiedenen Matrices durchgeführt. Zur Auswertung wurden verschiedene Suchmaschinen und Datenbanken verwendet. Alle Experimente hatten das Ziel die einzelnen Schritte vom 2D-Gel bis zur Identifikation zu optimieren und zu automatisieren. Alle Schritte an den einzelnen Geräten und die Ergebnisse sollten am Ende in einer zentralen Datenbank (iDQuest 2.3.14) verwaltet werden. Diese Arbeit beschreibt diese einzelnen Schritte der Optimierung hin zu einem vollautomatisierten Ablauf.

3.1 Untersuchung zum Einfluss des Entfärbens von Silbergelen auf die Proteinidentifikation

In diesem Experiment wurden jeweils zweimal 1µg, 500ng, 200ng, 100ng und 50ng BSA in einem 1D-Gel aufgetrennt und anschließend mit Silber gefärbt. Aus dem Gel (Abb. 3.1) wurden jeweils 2 Spots aus jeder Bande ausgestochen und durch den Digester tryptisch verdaut. Dabei wurde eine Spotserie in einem zusätzlichen Schritt durch den Digester zwei Minuten mit der Entfärbelösung für Silbergele (siehe 2.3.11.2) inkubiert.

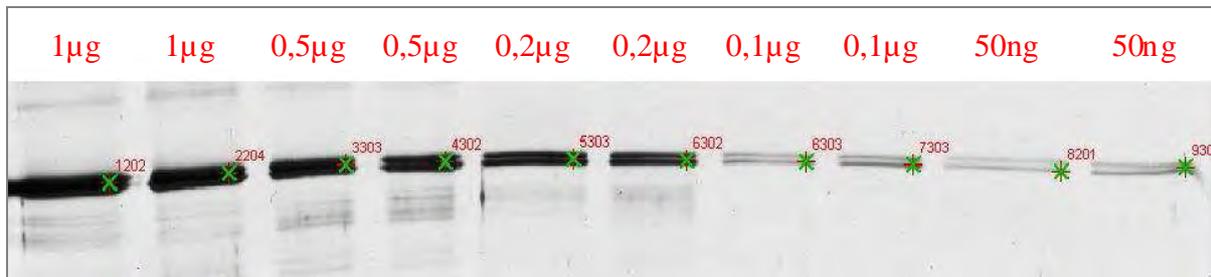


Abb. 3.1: 1D-Gel mit BSA nach Silberfärbung. Die Mengenangaben befinden sich über der Spur. Die Kreuze zeigen die Position des ausgestochenen Spots sowie die von der Software zugeordnete Identifizierungsnummer an.

			Ohne Entfärbung		Mit Entfärbung	
BSA in Bande	BSA in Verdau	BSA auf Target	Mascot-Score	Sequenz-abdeckung (%)	Mascot-Score	Sequenz-abdeckung (%)
1µg	200ng	0,3 pmol	x		144	27,4
1µg	200ng	0,3 pmol	172	31,1	155	28,3
500ng	100ng	0,15 pmol	104	18,3	x	
500ng	100ng	0,15 pmol	129	24,2	160	27
200ng	40ng	60 fmol	75,8	14,2	88,1	15,8
200ng	40ng	60 fmol	x		103	15,8
100ng	20ng	30 fmol	72,3	14,2	76,1	15,8
100ng	20ng	30 fmol	81,8	15,8	84,4	13,8
50ng	10ng	15 fmol	x		x	
50ng	10ng	15 fmol	x		x	

Tab. 3.1: Scores und Sequenzabdeckung der BSA Analyse nach Silberfärbung jeweils ohne und mit Entfärbung

Nach dem Verdau wurden die Peptidlösungen auf ein PAC-Target aufgetragen und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Ergebnisse (Tab 3.1) zeigen Mascot-Scores im statistisch signifikanten Bereich bis hinunter zu 30fmol Protein. Die Spots aus den 50ng Banden konnten durch beide Methoden nicht mehr identifiziert werden.

Fazit: Die Entfärbung von Silbergelen verbessert die Proteinidentifikation nicht wesentlich.

3.2 Methodenoptimierung des proteolytischen Verdau-Schrittes

3.2.1 Variation bezüglich der Verdauzeit bzw. Reaktionstemperatur

Im Rahmen der Automatisierung und bei größeren Probenzahlen ist die Länge der Verdauzeit ein wichtiger Punkt für den Probendurchsatz. Dieses Experiment betraf den eigentlichen Verdau Schritt. Aus einem Coomassie-gefärbten 1D-Gel wurden Gelplugs mit bovinem α 1-saurem-Glycoprotein ausgestochen und anschließend durch den Digester bei 38°C innerhalb 8h verdaut. Im Vergleich dazu wurde bei weiteren Gelplugs die Temperatur im Verdau Schritt auf 45°C angehoben und die Verdauzeit auf 2h reduziert. Die Peptidlösungen wurden durch den Digester auf ein PAC Target aufgetragen, anschließend automatisch gemessen und ausgewertet (Tab.3.2).

Verdauzeit 8h bei 38°C				Verdauzeit 2h bei 45°C		
Menge auf Target	erkannt	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)	erkannt	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)
60 fmol	α 1acidglyco	68,8	25,2	α 1acidglyco	89	34,7
60 fmol	x			α 1acidglyco	70,1	30,2
30 fmol	x			α 1acidglyco	65,8	24,3
30 fmol	x			x		

Tab. 3.2: Scores und Sequenzabdeckung der BSA Analyse bei verschiedenen Temperaturen und Verdauzeiten

Bei acht Stunden Verdauzeit konnte bei einer Menge von 60 fmol eine Identifikation erfolgen. Bei zwei Stunden Verdauzeit gelangen bei 60 fmol beide Identifikationen. Bei einer Menge von 30 fmol wurde bei acht Stunden Verdauzeit kein Spot identifiziert und bei zwei Stunden Verdauzeit wurde ein Wert knapp unterhalb der statistischen Grenze (68 in diesem Versuch) erzielt.

Fazit: Die Verkürzung der Verdauzeit bei erhöhter Reaktionstemperatur verschlechtert die Identifikation nicht.

3.2.2 Der Einfluß von Octylglycosid und Calcium auf die Proteinidentifikation

In diesem Experiment wurden BSA Gelplugs aus einem Coomassie-Gel verdaut. In 100 ml Verdaupuffer für den Digester (2.3.12.2) wurden zusätzlich noch 100 mg Octylglycosid (0,1 Gew.-%) und 55 mg Calciumchlorid (5mM) gelöst [14].

			Kontrolle		Octylglycosid und Calcium	
BSA in Bande	BSA in Verdau	BSA auf Target	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)
1µg	0,2µg	0,3 pmol	229	38,2	250 (nur mit DHB!)	35,3
1µg	0,2µg	0,3 pmol	202	33,3	X	
1µg	0,2µg	0,3 pmol	227	35,4	180 (nur mit DHB!)	25,4
1µg	0,2µg	0,3 pmol	115	18,8	X	

Tab. 3.3: Scores und Sequenzabdeckung bei Calcium und Octylglycosid im Vergleich zur Kontrolle

Anschließend wurden die Peptidlösungen automatisch auf das PAC-Target aufgetragen, gemessen sowie ausgewertet. Auf dem PAC-Target konnte mit der veränderten Methode keine sichere Identifikation erfolgen. Lediglich beim Auftragen der Peptidlösung auf die DHB Präparation konnten zwei von vier Proben identifiziert werden. In der Kontrolle wurden alle vier Proben schon auf dem PAC Target identifiziert (Tab.3.3).

Fazit: Diese Kombination von Octylglycosid und Calcium im Verdaupuffer bringt keine Verbesserung der Proteinidentifikation.

3.2.3 Untersuchung zum Einfluß von Acetonitril im Verdaupuffer

In diesem Experiment wurden Gelplugs aus dem Silbergel (Abb 3.1) unter Verwendung von 10% Acetonitril im Verdaupuffer gegen die Kontrolle ohne Acetonitril verdaut. Die Peptidlösungen wurden anschließend automatisch auf das PAC-Target aufgetragen, gemessen sowie ausgewertet. Im Vergleich zur Kontrolle erscheinen an einigen Proben mit Acetonitril höhere Mascot-Scores. Unter Verwendung von Acetonitril im Verdaupuffer wurden insgesamt vier von zehn Proben identifiziert. Ohne die Verwendung von Acetonitril konnten jedoch sechs von zehn Proben identifiziert werden. Die Ergebnisse mit ACN im Verdaupuffer erscheinen nicht reproduzierbar. Bei einer Menge von 60 fmol findet überhaupt keine Identifikation statt, wohingegen bei einer Menge von 30 fmol wieder ein statistisch relevantes Ergebnis erzielt wird. In dem Bereich von 15 fmol war bei beiden Methoden keine Identifikation möglich.

			Kontrolle		ACN im Verdaupuffer	
BSA in Bande	BSA in Verdau	BSA auf Target	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)
1µg	0,2µg	0,3 pmol	x		112	24,1
1µg	0,2µg	0,3 pmol	172	31,1	x	
0,5µg	0,1µg	0,15 pmol	104	18,3	137	25,4
0,5µg	0,1µg	0,15 pmol	129	24,2	131	18,6
0,2µg	40ng	60 fmol	75,8	14,2	x	
0,2µg	40ng	60 fmol	x		x	
0,1µg	20ng	30 fmol	72,3	14,2	72,2	14,2
0,1µg	20ng	30 fmol	81,8	15,8	x	
0,05 µg	10ng	15 fmol	x		x	
0,05 µg	10ng	15 fmol	x		x	

Tab. 3.4: Auswirkungen von Acetonitril auf die Identifikation

Fazit: 10% ACN im Verdaupuffer verbessert nicht die Proteinidentifikation.

3.3 Optimierung der Extraktionsmethode

Nach dem Verdauschritt müssen die Peptide aus dem Gel in Lösung gelangen, um auf das MALDI - Target aufgetragen zu werden. Im manuellen Verdauprotokoll wurden die Peptide mittels Ultraschallbad extrahiert. Auf der Arbeitsplattform des Digesters befindet sich hingegen ein Schüttler für 96er Wellplatten.

3.3.1 Vergleich der Effizienz zwischen Ultraschall und Schüttler

In diesem Experiment wurde die Extraktion durch den Schüttler mit der Extraktion im Ultraschallbad verglichen. Es ging dabei um die Frage, ob man mit dem Schüttler ähnlich gute Ergebnisse erzielen kann wie mit dem Ultraschallbad. Für den Vergleich wurden wieder BSA Gelpugs aus 1µg Banden ausgestochen und verdaut. Die Extraktion erfolgte mit Schüttler oder mit Ultraschallbad, jeweils in 1% TFA Extraktionslösung. Anschließend wurden jeweils 1µl der entstandenen Peptidlösungen ($\hat{=}$ 0,3 pmol) auf die verschiedenen Matrices (Tab. 3.5) aufgetragen, manuell gemessen und ausgewertet.

Unter Verwendung von DHB als Matrix gelangen bei Ultraschallextraktion und Schüttlerextraktion von 12 Proben jeweils 10 sichere Identifikationen. Auf dem PAC Target wurden diese Proben mit niedrigeren Scores identifiziert. Zehn Proben konnten bei Schüttlerextraktion und acht Proben bei Ultraschallextraktion erkannt werden.

DHB	20 min. Shaker 900rpm			10 min. Ultraschall			
	erkannt	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)	erkannt	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)	
1	x			A	BSA	255	48,8
3	BSA	197	45,5	C	BSA	284	48,1
4	BSA	212	41,7	D	BSA	273	40,5
5	BSA	248	46	E	BSA	320	47,9
6	BSA	261	50,9	F	BSA	213	34,9
7	BSA	257	43,3	G	BSA	206	41,4
8	BSA	227	44	H	BSA	203	34,4
9	BSA	288	47,4	I	BSA	190	33,4
10	BSA	254	41,4	J	BSA	244	45,6
11	BSA	261	47,6	K	BSA	204	44,2
12	BSA	238	45,5	L	x		
PAC	20 min. Shaker 900rpm			10 min. Ultraschall			
	erkannt	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)	erkannt	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)	
1	BSA	82,3	16,8	A	x		
2	BSA	152	31,8	B	BSA	127	31,5
3	BSA	151	31,5	C	x		
4	BSA	119	36,6	D	BSA	127	36,9
5	x			E	BSA	109	32,3
6	BSA	191	42,7	F	BSA	119	35,9
7	BSA	163	35,9	G	BSA	150	21,7
8	BSA	128	33,6	H	x		
9	x			I	BSA	125	27,3
10	BSA	157	35,1	J	BSA	134	37,9
11	BSA	139	37,2	K	x		
12	BSA	188	46,5	L	BSA	138	22,2

Tab. 3.5: Vergleich von Ultraschall- und Schüttlerextraktion

Fazit: Die Extraktion mit dem Schüttler wirkt sich im Vergleich zur Ultraschallextraktion nicht nachteilig auf die Proteinidentifikation aus.

3.3.2 Einfluß des Extraktionsvolumens auf die Proteinidentifikation

Im folgenden Experiment ging es um die Frage, ob man durch ein größeres Volumen der Extraktionslösung eine bessere Extraktion der Peptide aus den Gelstücken erreicht. Dazu wurden im Extraktionsschritt auf vier BSA Proben (Tab. 3.6) durch den Digester jeweils 50µl Extraktionslösung (1% TFA) gegeben. Die 50µl Peptidlösung wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet, die Peptide anschließend erneut mit 10µl der Extraktionslösung aufgenommen.

			Kontrolle 10µl		50µl Extraktion	
BSA in Bande	BSA in Verdau	BSA auf Target	Mascot-Score	Sequenz-abdeckung (%)	Mascot-Score	Sequenz-abdeckung (%)
1µg	0,2µg	0,3 pmol	229	38,2	155	28,7
1µg	0,2µg	0,3 pmol	202	33,3	156	28,7
1µg	0,2µg	0,3 pmol	227	35,4	126	22,4
1µg	0,2µg	0,3 pmol	115	18,8	x	

Tab. 3.6: Identifikationen mit 50µl Extraktionslösung im Vergleich zu 10µl Extraktionslösung

Im Vergleich zu dem Standardprotokoll ergaben sich bei 50µl fast durchgängig geringere Mascot- Scores. Eine Probe konnte überhaupt nicht identifiziert werden.

Fazit: Die Extraktion mit großen Volumen durchzuführen, bringt keine Verbesserung der Proteinidentifikation.

3.3.3 Eine zusätzliche Extraktion mit Acetonitril

Nach der ersten Extraktion mit 1% TFA sollte durch eine zweite Extraktion unter Verwendung von 80% ACN ohne TFA die Extraktion von hydrophoben Peptiden verbessert werden. In diesem Experiment wurden dazu silbergefärbte Gelstücke mit unterschiedlichen Mengen BSA verdaut und zunächst mit 10µl 1% TFA extrahiert. Nachdem diese Extraktionslösung abgenommen wurde, erfolgte eine zweite Extraktion mit 30µl 80% ACN. Der Überstand der zweiten Extraktion wurde abgenommen und mittels Vakuumzentrifuge getrocknet. Die getrockneten Peptide wurden mit 10µl 1% TFA aufgenommen. Die nun entstandene Lösung wurde mit der ersten Extraktionslösung vereint.

			Extraktion mit 1% TFA		2-fache Extraktion: 1% TFA und 80% ACN	
BSA in Bande	BSA in Verdau	BSA auf Target	Mascot-Score	Sequenz-abd. (%)	Mascot-Score	Sequenz-abdeckung (%)
1µg	0,2µg	0,3 pmol	x		83	15,8
1µg	0,2µg	0,3 pmol	172	31,1	x	
0,5µg	0,1µg	0,15 pmol	104	18,3	73,7	14,2
0,5µg	0,1µg	0,15 pmol	129	24,2	80,7	15,8
0,2µg	40ng	60 fmol	75,8	14,2	x	
0,2µg	40ng	60 fmol	x		x	
0,1µg	20ng	30 fmol	72,3	14,2	x	
0,1µg	20ng	30 fmol	81,8	15,8	x	
0,05 µg	10ng	15 fmol	x		x	
0,05 µg	10ng	15 fmol	x		x	

Tab. 3.7: Vergleich der kombinierten Extraktion mit der Standardextraktion

Mit der kombinierten Extraktion konnten lediglich drei von zehn Proben identifiziert werden, wohingegen die einfache Extraktion zu sieben Ergebnissen führte. Mit der kombinierten Extraktion konnte nichts unter einer Menge von 0,15 pmol identifiziert werden.

Fazit: Die zweifache Extraktion führt zu schlechten Ergebnissen bei der Proteinidentifikation.

3.4 MALDI-Matrices und Präparationsmethoden

Aus den Ergebnissen der Experimente 3.2.2 und 3.3.1 kann man bereits erkennen, dass die Auswahl der Matrix und die Präparationsmethoden einen deutlichen Einfluss auf die Identifikationen haben. Die folgenden Experimente gehen generell der Frage nach, welche Matrix und welche Präparationsarten besonders gut für die Identifikation von Proteinen sind. Als Modell wurden hierbei Proteine aus dem Nematoden *C. elegans* verwendet.

3.4.1 Vergleich verschiedener Matrices

In diesem Experiment wurden zufällig 50 Proteinspots aus einem silbergefärbten *C. elegans*-2D-Gel (Abb. 3.2) mit dem Spot-Cutter ausgestanzt. Zum Zeitpunkt des Experimentes stand der Digester noch nicht zur Verfügung, sodass die Experimente zum Vergleich der Matrices nach dem manuellen Verdauprotokoll bearbeitet wurden. Die Peptide wurden in 7,5µl 1% TFA Lösung extrahiert und für jeden Versuch wurde 0,5µl der Extraktionslösung auf 0,5µl der jeweiligen Matrix aufgetragen. Anschließend erfolgte die Messung am MALDI manuell bzw. automatisch. Diese Experimente sollten zeigen, ob sich eine Matrix im Vergleich zu den anderen besonders gut für die Proteinidentifikationen eignet.

Tabelle 3.8 zeigt die Ergebnisse aller Spots bei denen mindestens bei einer Matrixpräparation eine statistisch signifikante Proteinidentifikation (Mascot-Score > 57) erzielt wurde. Spots mit einem Ergebnis unter diesem Schwellenwert wurden nicht dargestellt. Zu der jeweiligen Spotnummer (Abb. 3.2) wurden Gen-Name, Gen-ID, Mascot-Score, Sequenzabdeckung (Seq), Molekulargewicht und Isoelektrischer Punkt aufgetragen. Rot hinterlegt sind die Ergebnisse, bei denen der Mascot-Score zwar im statistisch signifikanten Bereich liegt, aber das Molekulargewicht oder der pl

des Proteins nicht zu der Position im Gel passt. Grün hinterlegte Felder deuten darauf hin, dass diese Spots in mehreren Matrices das gleiche Ergebnis lieferten und einen hohen Score erzielten.

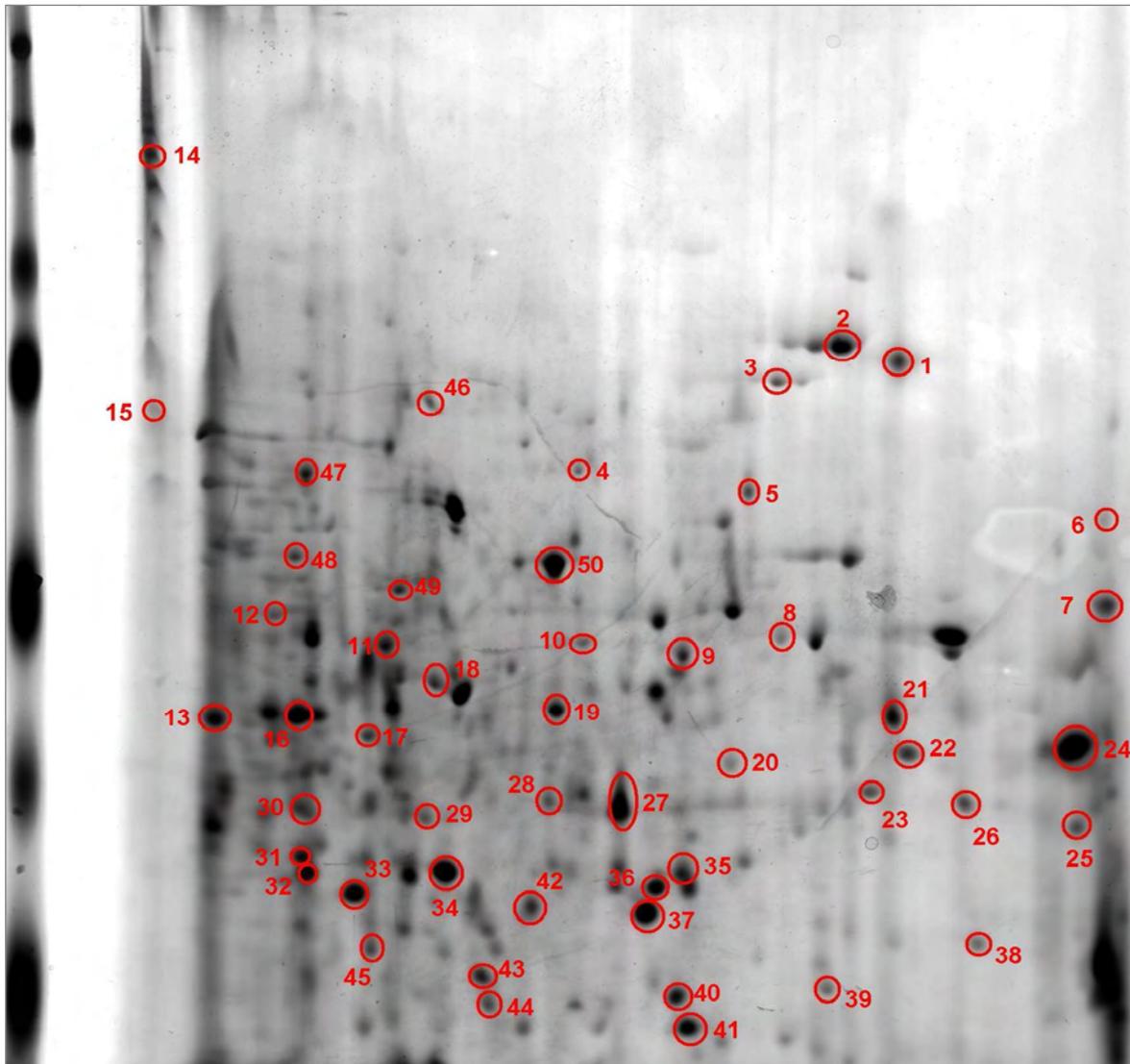


Abb. 3.2: 50 Spots aus einem 2D Gel mit *C. elegans*- Proteinen nach Silberfärbung

Zu einigen Spots (Beispiele: Nr. 1, Nr. 6) gab es bei verschiedenen Matrixpräparationen unterschiedliche Identifikationen. Der Mascot-Score war dort allerdings in der Regel nicht hoch und lag am unteren Ende des Signifikanzbereichs. Matrixpräparationen mit HCCA als Grundlage (PAC, thinlayer, doublelayer) wurden aufgrund ihrer homogenen Kristallisation (Abb. 3.3) automatisch gemessen. Bei der automatischen Messung zeigten sich geringfügige Unterschiede in der Identifikation zur manuellen Messung. Bei der doublelayer-Präparation misslang bei der automatischen Messung der Spots 24 und 36 die Identifikation. Diese wurden hingegen bei der manuellen Messung sehr deutlich identifiziert. Beim PAC-Target wurden bei der automatischen Messung der Spots 27 und 47 keine Identifikationen

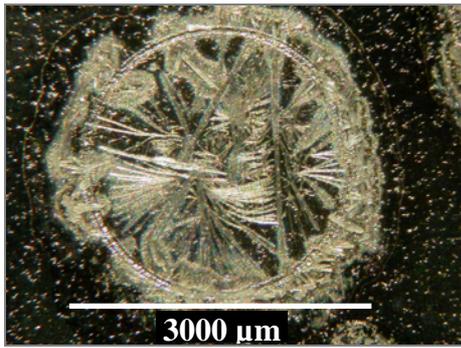
erhalten. Bei der thinlayer-Präparation ergab die Messung von Spot 18 keine Identifikation. Messungen auf dem PAC-Target und mit DHB als Grundlage ergaben die meisten Identifikationen.

PAC, manuelle Messung							PAC, automatische Messung					DHB/Phosphorsäure, Stahltarget, Manuelle Messung						
Nr	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)
1	F20G4.3	nmy-2	232,1	5,4	73,9	16,0							F37A4.8	isw-1	113,1	9,1	62,8	12,6
2	F54H12.1	aco-2	84,5	8,9	166	37,2	F54H12.1	aco-2	86,2	9,3	142	28,3	F54H12.1	aco-2	84,5	8,9	118	27,2
3	F27D9.5		80,2	8,5	72,6	29,6	F27D9.5		80,2	8,5	103	31,8						
							M6.1	ifc-2	141,7	6,5	63,3	14,9						
4	F10C1.2	ifb-1	61,2	5,5	158	39,9	F10C1.2	ifb-1	63,8	5,4	145	38,5	F10C1.2	ifb-1	61,2	5,5	72,3	16,1
5	LLC1.3		49,5	9,4	62,2	30,8							LLC1.3		49,5	9,4	62,3	36,2
6	C05D2.5	gak-1	78,8	9,9	62,3	24,6	F40A3.2		26,6	7,7	63,9	32,6						
16	C18A11.7	dim-1	75,5	9	77,7	20,9	C18A11.7	dim-1	75,5	9	71,5	19,4	C18A11.7	dim-1	75,5	9	138	24,6
18	T21B10.2	enol-1	50	5,9	122	38,9	T21B10.2	enol-1	46,6	5,5	70,8	24,9	T21B10.2	enol-1	46,6	5,5	127	38,3
19	F56D2.1		51,7	6,1	166	58,4	F56D2.1		51,7	6,1	169	48,2	F56D2.1		51,7	6,1	141	48,4
													F18C12.1	che-3	476,5	5,7	63,1	8,6
20	ZK20.4		28,8	5,4	72,8	34,9	ZK20.4		28,8	5,4	64	26,5						
21	F01F1.12		39,1	8,8	87,9	25,7	F01F1.12		39,1	8,8	109	30,1	F01F1.12		39,1	8,8	98,9	24,3
22	F27D4.1		32,8	9,4	149	57,6	F27D4.1		32,8	9,4	96,8	39,9	F27D4.1		32,8	9,4	162	49,4
	H15N14.2	nsf-1	34,4	9,7	146	54,8												
23	F44B9.2		56,2	4,7	62,7	23,7	F44B9.2		56,2	4,7	68,7	21,5						
	Y22D7AR.7		89,5	6,4	70,3	23,6												
24	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	141	59,2	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	147	57,2	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	65	24
26	F07G11.7		26,6	10,3	61,8	43,9												
27	F46H5.3		44,7	7	223	58,3							F46H5.3		44,7	7	125	36,1
	F25H2.10	rpa-0	33,7	6,3	111	43,7												
36	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	135	58,3	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	133	58,3	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	86,5	41
41	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	90,3	52,2	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	103	52,7	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	121	50
													C37H5.8	hsp-6	71,1	5,8	76,5	21,8
47	Y22D7AL.5	hsp-60	60,2	5,2	89,5	29							Y22D7AL.5	hsp-60	60,2	5,2	59,5	14,8

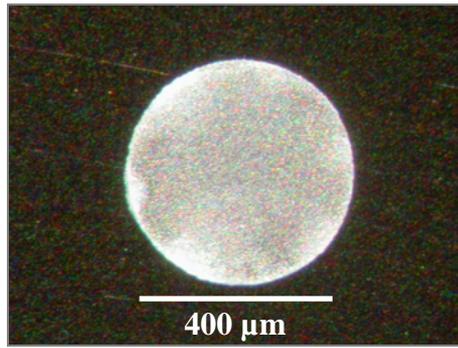
HCCA thin layer, Anchor-Chip, manuelle Messung							HCCA thin layer, Anchor-Chip, automatische Messung					
Nr	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)
2	F54H12.1	aco-2	84,5	8,9	60,4	13,4						
							F27D9.5		80,2	8,5	65,6	24,6
							R53.5		24,2	9,4	61	43,8
							R03G5.2	sek-1	39,9	9,6	57,3	32,7
6	Y92C3A.3		20,3	10,7	62	28,4	F40A3.2		26,6	7,7	63,1	32,6
15	F26A3.3	ego-1	380,2	8,8	67	7,7						
16	C18A11.7	dim-1	75,5	9	71	19,7	C18A11.7	dim-1	75,5	9	68,5	15,2
18	T21B10.2	enol-1	50	5,9	116	35,3						
19	F56D2.1		51,7	6,1	163	46,7	F56D2.1		51,7	6,1	144	39,5
24	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	117	51,6	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	94,7	42,8
							C03A7.2		35,9	5,9	73	34,9
27	F46H5.3		44,7	7	106	32,3	F46H5.3		44,7	7	106	32,6
							F25H2.10	rpa-0	33,7	6,3	57,6	27,7
36	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	125	58,3	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	136	60,8
41	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	120	48,2	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	126	48,2
47	Y22D7AL.5	hsp-60	60,2	5,2	70,1	18,3	Y22D7AL.5	hsp-60	60,2	5,2	176	46

HCCA double layer, Anchor-Chip, manuelle Messung							HCCA dbl. layer, Anchor-Chip, automatische Messung					
Nr	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)
19	F56D2.1		51,7	6,1	116	38,4	F56D2.1		51,7	6,1	73	19,5
	F18C12.1	che-3	472,3	5,7	70,4	8,3						
22	F27D4.1		32,8	9,4	58,5	23,1						
24	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	94,7	42,8						
36	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	129	36,7						
41	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	101	49,1	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	120	38,9

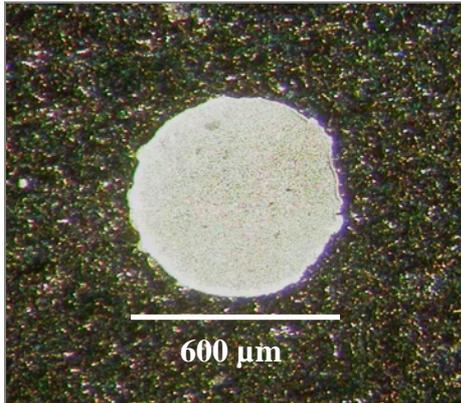
Tab. 3.8: Identifikationen der verschiedenen Matrices. Beschreibung im Text



DHB auf Stahltarget



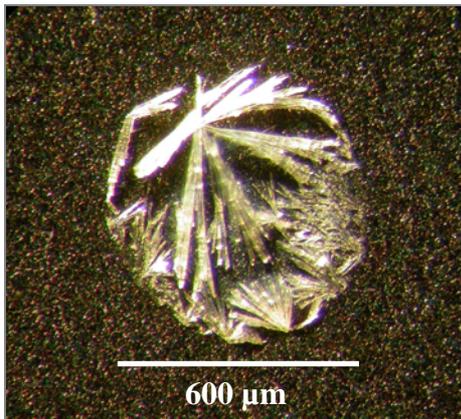
PAC Target mit HCCA



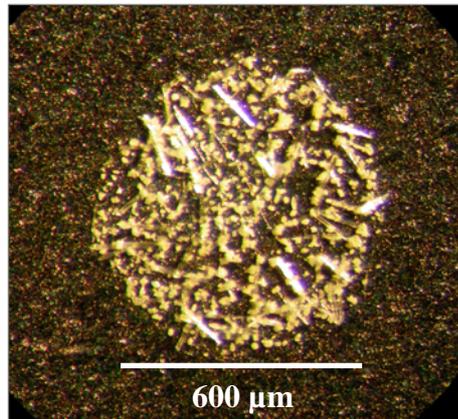
HCCA „thinlayer“-Präparation auf Anchor-Chip



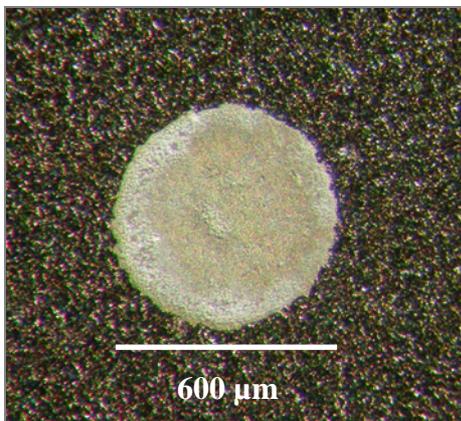
HCCA "doublelayer"-Präparation auf Anchor-Chip



DHB auf Anchor-Chip



DHB + HCCA Mischmatrix



HCCA in THF auf Anchor-Chip

Abb. 3.3: Die verschiedenen Matrixpräparationen unter dem Mikroskop

3.4.2 Vergleich verschiedener Matrixpräparationen bei automatischer Datenaufnahme

In diesem Experiment wurden erneut verschiedene Matrixpräparationen miteinander verglichen. 40 Spots wurden aus einem silbergefärbten *C.elegans*-2D-Gel ausgewählt (Abb. 3.4).

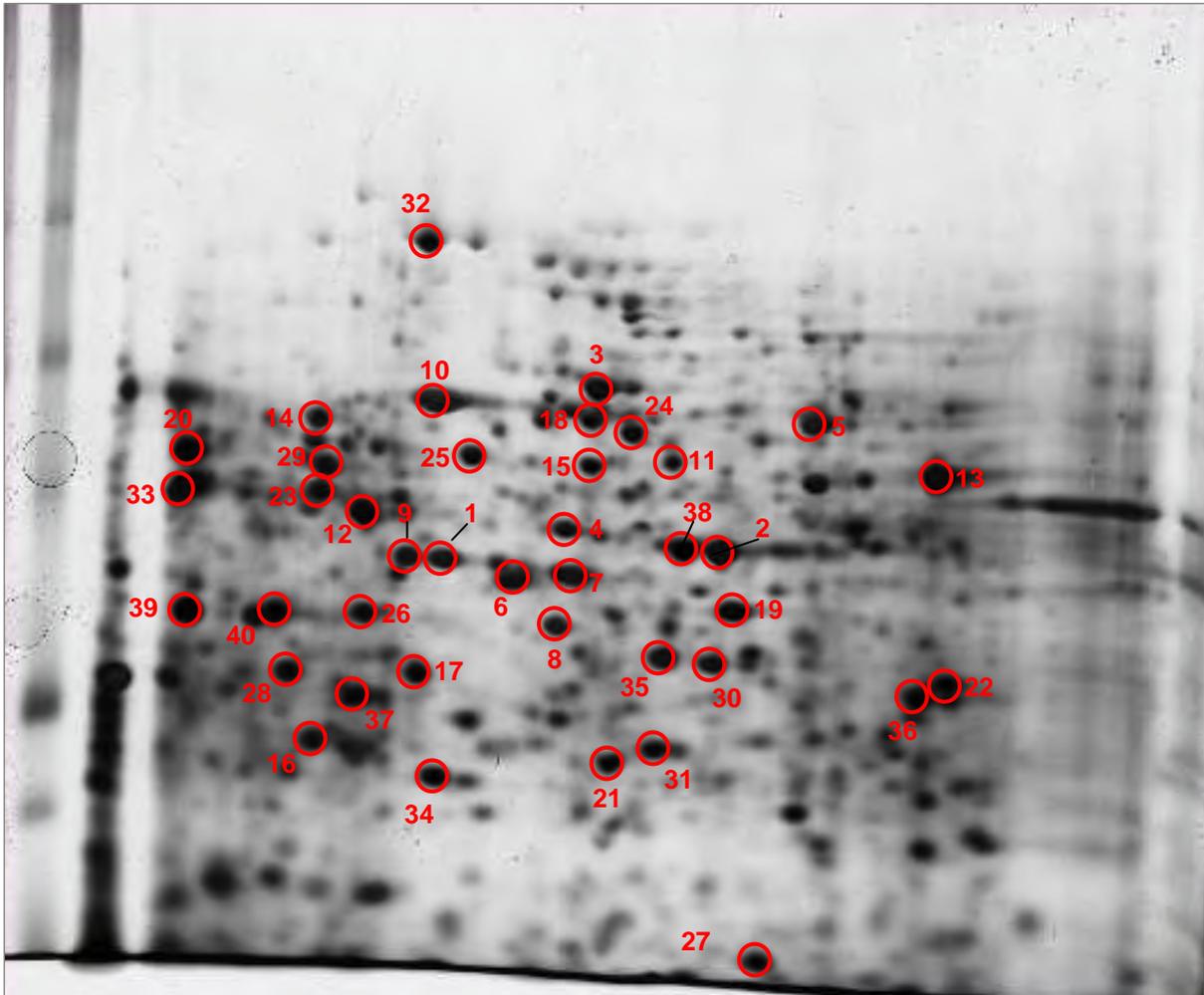


Abb 3.4: 40 Spots aus einem 2D- Gel mit *C. elegans*- Proteinen nach Silberfärbung

Gegenüber Experiment 3.4.1 wurden größere Gelstücke (2 mm Durchmesser) ausgestochen und ebenfalls nach manuellem Verdauprotokoll bearbeitet. Die Peptide wurden mit 10 μ l 1% TFA extrahiert. Auf die jeweilige Matrixpräparation wurde 1 μ l Peptidlösung gegeben. Der Fokus lag bei der massenspektrometrischen Analyse auf der automatischen Messung. Da eine automatische Messung mit der klassischen DHB Präparation auf dem Stahl-Target aufgrund der fehlenden Konzentrierung des Matrix-Peptidgemisches auf einen kleinen Bereich nicht möglich ist, wurde die DHB Präparation für den Anchor-Chip verwendet (Abb. 3.3). Beim Anchor-Chip kristallisieren die Proben in einem kleinen hydrophilen Bereich aus, der

von einem hydrophoben Bereich umgeben ist. Die Chance ist daher auf diesen Targets größer, dass der Laser bei einer automatischen Messung auf einen Bereich mit den Peptiden trifft. Da Phosphorsäure die Beschichtung des Anchor-Chips angreift, wurde bei dieser DHB-Präparation auf die Zugabe von H_3PO_4 verzichtet. In diesem Experiment wurde auch die Mischmatrix, mit HCCA und DHB als Grundlage, verwendet (Abb. 3.3). Es sollte die homogene Verteilung der HCCA mit den guten MS-Eigenschaften der DHB kombiniert werden. Darüber hinaus kam eine weitere HCCA Präparation mit THF als Lösungsmittel zum Einsatz. Zum Vergleich wurden auch manuelle Messungen mit der DHB-Präparation auf dem Stahl-Target durchgeführt.

DHB, Anchor-Chip, automatische Messung						DHB, Stahl-Target, manuelle Messung						Mischmatrix, Anchor-Chip, automatische Messung						
Nr	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)
1	K10B3.8	gpd-2	36,6	6,6	77,3	29,6	K10B3.8	gpd-2	36,6	6,6	98	31,4	K10B3.8	gpd-2	36,6	6,6	62	21,1
2	X						x						F46H5.3		40,4	6,2	248	66,6
3	ZK829.4		59,2	7,1	365	60,3	ZK829.4		59,2	7,1	313	65,9	ZK829.4		59,2	7,1	195	42,7
4	T08G2.3		45,1	9,2	63,2	22,1	T08G2.3		45,1	9,2	85,4	22,8	x					
5	H06O01.1	pdi-3	55,2	5,9	149	34,8	H06O01.1	pdi-3	55,2	5,9	205	39,5	H06O01.1	pdi-3	55,2	5,9	111	20,5
6	K10B3.8	gpd-2	36,6	6,6	142	34,6	K10B3.8	gpd-2	36,6	6,6	120	33,1	K10B3.8	gpd-2	36,6	6,6	64,3	29,9
7	X						F13D12.2	ldh-1	36,4	6,5	111	33	x					
	F46E10.10		36	6,7	82,3	24,1	F46E10.10		36	6,7	71,1	26,5	x					
8	X						x						K04D7.1	rack-1	36	6,5	68,5	26,5
10	X						H28O16.1		55,1	8,9	235	52,1	H28O16.1		55,1	8,9	105	31,9
13	T21B10.2	enol-1	46,6	5,5	262	67,4	T21B10.2	enol-1	46,6	5,5	281	76,9	T21B10.2	enol-1	46,6	5,5	277	65,4
14	X						K04D7.3	gta-1	53,4	9,4	173	36,6	K04D7.3	gta-1	53,4	9,4	109	22,8
15	T03F1.3	pgk-1	44,2	6,6	65,7	21,3	T03F1.3	pgk-1	44,2	6,6	257	59	T03F1.3	pgk-1	44,2	6,6	266	59
16	F01G4.2	ard-1	27,2	9,2	107	42,2	x					F01G4.2	ard-1	27,2	9,2	68,4	42,2	
17	B0272.3		33,5	8,8	137	47,6	B0272.3		33,5	8,8	151	65	B0272.3		33,5	8,8	183	56,6
18	X						F54D8.3	alh-1	55,3	7,8	161	34,5	F54D8.3	alh-1	55,3	7,8	131	30,4
19	X						F25H2.10	rpa-0	33,7	6,3	90,4	40,2	x					
20	X						B0303.3		54	10	110	30,4	B0303.3		54	10	89	20,5
21	X						Y17G7B.7	tpi-1	26,7	6,3	129	68,4	Y17G7B.7	tpi-1	26,7	6,3	131	59,5
23	X						T02G5.8	kat-1	42,7	9,6	95,4	49,6	T02G5.8	kat-1	42,7	9,6	80,6	31,9
24	F25H5.4	eft-2	95,3	6,1	88,1	12,1	F25H5.4	eft-2	95,3	6,1	104	17,6	F25H5.4	eft-2	95,3	6,1	115	15,2
25	X						H14A12.2	fum-1	53,8	8,8	191	30,9	x					
26	X						F27D4.1		32,8	9,4	197	51,9	F27D4.1		32,8	9,4	83,2	33,2
28	F23C8.5		27,6	9,1	149	58,4	F23C8.5		27,6	9,1	86,4	30,2	F23C8.5		27,6	9,1	124	50,2
29	X						F08B6.4	unc-87	39,9	9,7	256	67,8	F08B6.4	unc-87	39,9	9,7	269	61,6
30	W09H1.6	lec-1	31,8	6,1	219	52,3	W09H1.6	lec-1	31,8	6,1	75,9	29,7	W09H1.6	lec-1	31,8	6,1	229	60,6
31	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	152	48,7	x					C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	190	68,6	
32	X						F54H12.1	aco-2	84,5	8,9	85,6	24,8	F54H12.1	aco-2	84,5	8,9	98,9	21,6
33	F53A2.7		46,7	10	212	53,5	F53A2.7		46,7	10	220	68	F53A2.7		46,7	10	232	66,7
34	C06H2.1	atp-5	21,8	6,8	103	61,8	C06H2.1	atp-5	21,8	6,8	199	75,9	C06H2.1	atp-5	21,8	6,8	87,2	49,7
35	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	149	36	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	277	76,3	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	168	52,9
36	F46H5.3		40,4	6,2	81,2	24	F46H5.3		40,4	6,2	94,6	35,1	x					
37	F26D10.3	hsp-1	70	5,3	87,3	21,6	F26D10.3	hsp-1	70	5,3	90	23	x					
38	T05D4.1		39,4	6,3	154	47,4	T05D4.1		39,4	6,3	115	49,9	T05D4.1		39,4	6,3	94,8	35,3
39	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	348	71	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	353	83,9	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	119	34,6
40	F42A8.2	sdhb-1	33,7	9,7	122	33,6	x					F42A8.2	sdhb-1	33,7	9,7	81	22,8	
	X						F53C11.3		33,5	9,3	77,3	21,4	F53C11.3		33,5	9,3	73,9	32,3

Tab. 3.9: Identifikationen von 40 Spots durch Matrixpräparationen

Frisches PAC Target, automatische Messung							Altes PAC Target unter Argon, automatische Messung						HCCA in THF, Anchor-Chip, automatische Messung					
Nr	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)
1	K10B3.8	gpd-2	36,6	6,6	63,4	22	x						K10B3.8	gpd-2	36,6	6,6	66	20,2
2	X						x						F46H5.3		44,7	7	141	38,1
3	ZK829.4		59,2	7,1	228	44,6	x						ZK829.4		59,2	7,1	322	59,1
7	X						x						F13D12.2	ldh-1	36,4	6,5	71,8	24,6
8	X						K04D7.1	rack-1	36	6,5	64,4	20,4	x					
10	H28O16.1		55,1	8,9	82,4	24,9	H28O16.1		55,1	8,9	73,5	27,6	H28O16.1		55,1	8,9	88,8	28,6
12	F01F1.12		39,1	8,8	136	32	x						x					
13	T21B10.2	enol-1	46,6	5,5	90,6	33,3	T21B10.2	enol-1	46,6	5,5	110	29,3	x					
14	X						K04D7.3	gta-1	53,4	9,4	136	26,9	x					
15	T03F1.3	pgk-1	44,2	6,6	73,1	21,3	x						T03F1.3	pgk-1	44,2	6,6	159	37,2
16	F01G4.2	ard-1	27,2	9,2	78,7	40,7	x						F01G4.2	ard-1	27,2	9,2	59,1	23,3
17	B0272.3		33,5	8,8	107	43	x						x					
18	F54D8.3	alh-1	55,3	7,8	63,3	18	x						x					
20	B0303.3		54	10	98,6	22,3	x						B0303.3		54	10	108	21,7
21	X						x						Y17G7B.7	tpi-1	26,7	6,3	70,7	32,4
24	F25H5.4	eft-2	95,3	6,1	77,5	11,8	x						F25H5.4	eft-2	95,3	6,1	60,1	9,6
25	H14A12.2	fum-1	53,8	8,8	71,4	13	x						x					
28	F23C8.5		27,6	9,1	64,7	20,4	F23C8.5		27,6	9,1	64,8	22	F23C8.5		27,6	9,1	59,3	25,9
29	F08B6.4	unc-87	39,9	9,7	102	24,6	F08B6.4	unc-87	39,9	9,7	82,6	30,5	F08B6.4	unc-87	39,9	9,7	183	42
30	W09H1.6	lec-1	31,8	6,1	161	44,4	W09H1.6	lec-1	31,8	6,1	159	43	W09H1.6	lec-1	31,8	6,1	180	33,3
31	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	120	43,8	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	114	35,4	x					
32	X						F54H12.1	aco-2	84,5	8,9	96,6	15,3	x					
33	F53A2.7		46,7	10	91,5	34,5	x						x					
34	C06H2.1	atp-5	21,8	6,8	181	64,9	C06H2.1	atp-5	21,8	6,8	86,1	41,4	x					
35	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	169	48,6	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	111	36	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	88,6	29,1
39	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	243	66,3	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	161	44,9	x					

Tab. 3.9 Fortsetzung

Die manuelle Messung der DHB-Präparation auf dem Stahl-Target lieferte im Ergebnis (Tab. 3.9) eine Identifikation fast aller Proteine. Dabei wurden sehr gute Scores und vergleichsweise hohe Sequenzabdeckungen erzielt. Grüne Felder in Tabelle 3.9 zeigen Identifikationen mit hohen Scores, welche weit über dem statistischen Schwellenwert von 57 liegen. Die automatische Messung bei der DHB-Präparation auf dem Anchor-Chip lieferte auch hohe Scores, jedoch wurden deutlich weniger Proteine identifiziert. Im Vergleich zu einem frischen, konnten auf einem zwei Monate alten PAC-Target weniger Proteine identifiziert werden. Die Scores waren ebenfalls geringer. Die automatische Messung der Mischmatrix lieferte annähernd die gleiche Anzahl an identifizierten Proteinen wie die manuelle Messung der DHB Präparation. Die Verwendung der Mischmatrix führte bei automatischen Messungen zu den meisten Identifikationen. Die HCCA-Präparation mit THF als Lösungsmittel konnte nicht überzeugen. Es wurden nur wenige Proteine identifiziert.

Fazit: Für manuelle Messungen eignet sich die DHB-Präparation auf dem Stahltarget besonders gut. Bei automatischen Messungen liefert die Mischmatrix auf dem Anchor-Chip die besten Ergebnisse.

3.5 Vergleich zweier Abtastmuster bei der MALDI-Tof-MS Analyse

Die verschiedenen Matrixpräparationen kristallisieren unterschiedlich aus. Bei einer reinen DHB Matrix entstehen die Kristalle vorzugsweise konzentriert am Rand des Feldes in Form von langen und großen Kristallen, wohingegen eine Matrix aus HCCA eher homogen über das gesamte Feld in Form von amorphen Mikrokristallen auskristallisiert (Abb. 3.3). Da automatische Abtastmuster bei der Messung die Lage und Form der jeweiligen Kristalle nicht berücksichtigen können, sollten zwei verschiedene Abtastmuster an einer DHB und einer HCCA Präparation hinsichtlich der Qualität der resultierenden Spektren getestet werden. In diesem Experiment wurde eine DHB Präparation sowie eine HCCA-THF Präparation (2.3.12) auf einem Anchor-Chip Target verwendet. Es wurde ein hexagonales Muster verwendet, welches die Messung im zentralen Bereich des Probenfeldes beginnt und nach und nach ein sechseckiges Muster abfährt (Abb. 3.5). Daneben wurde ein Muster getestet, welches einen Kreis im äußeren Bereich des Matrixfeldes abfährt.

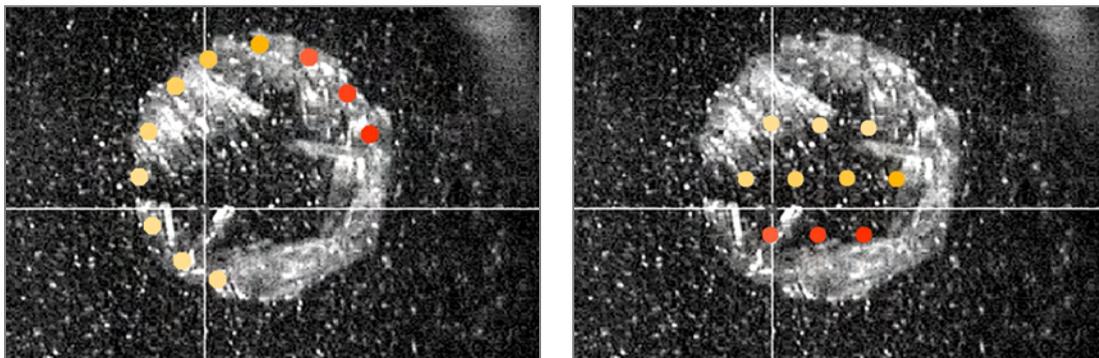


Abb. 3.5: Kreisförmiges und hexagonales Abtastmuster. Als Beispiel dient hier die DHB-Präparation für den Anchor-Chip (vgl. Abb. 3.3). Die Farbveränderung von Hellgelb nach Rot verdeutlicht die Richtung der Lasermessung.

Aus einem silbergefärbten 1D-Gel mit BSA Banden unterschiedlicher Proteinkonzentration wurden Spots durch den Spotcutter ausgestochen, anschließend durch den Digester verdaut und automatisch gemessen. 1µl der zehn Proben wurden zweifach auf die Matrixpräparationen aufgetragen. Zehn Proben der DHB-Präparation wurden hexagonal gemessen. Anschließend wurden weitere zehn Proben der DHB-Präparation kreisförmig gemessen. Bei der HCCA-Präparation wurde gleichermaßen vorgegangen. Mit DHB als Matrix wurden fünf Identifikationen beim kreisförmigen Muster und drei Identifikationen beim hexagonalen Muster erzielt. Interessanterweise führten die Messungen unter Verwendung des hexagonalen Musters gerade bei Proben mit hohem Peptidgehalt zu keiner Identifikation. Bei der

HCCA-Präparation konnten jeweils sechs Proben eindeutig identifiziert werden. Hier gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen den Abtastmustern, jedoch sind die Mascot-Scores beim kreisförmigen Muster tendenziell höher (Tab 3.10).

			Hexagonales Abtastmuster (DHB)		Kreisförmiges Abtastmuster (DHB)	
BSA in Bande	BSA in Verdau	BSA auf Target	Mascot-Score	Sequenz-abd.(%)	Mascot-Score	Sequenz-abd.(%)
1µg	0,2µg	0,3 pmol			97.2	16.3
1µg	0,2µg	0,3 pmol			76.5	11.9
0,5µg	0,1µg	0,15 pmol			71.2	15.3
0,5µg	0,1µg	0,15 pmol	196	27.7	218	32.6
0,2µg	40ng	60 fmol				
0,2µg	40ng	60 fmol	112	16.6		
0,1µg	20ng	30 fmol				
0,1µg	20ng	30 fmol	96.3	13.8	128	22.9
0,05 µg	10ng	15 fmol				
0,05 µg	10ng	15 fmol				
			Hexagonales Abtastmuster (HCCA)		Kreisförmiges Abtastmuster (HCCA)	
BSA in Bande	BSA in Verdau	BSA auf Target	Mascot-Score	Sequenz-abd.(%)	Mascot-Score	Sequenz-abd.(%)
1µg	0,2µg	0,3 pmol	181	30.6	207	36.1
1µg	0,2µg	0,3 pmol	106	23.4	109	23.9
0,5µg	0,1µg	0,15 pmol	115	22.6		
0,5µg	0,1µg	0,15 pmol	166	26.4	144	26.4
0,2µg	40ng	60 fmol	137	22.2	152	28.8
0,2µg	40ng	60 fmol	99.3	16	130	23.9
0,1µg	20ng	30 fmol			75.8	13.8
0,1µg	20ng	30 fmol				
0,05 µg	10ng	15 fmol				
0,05 µg	10ng	15 fmol				

Tab 3.10: Identifikationen mit unterschiedlichen Abtastmustern auf zwei unterschiedlich auskristallisierenden Matrices

Fazit: Für DHB-Präparationen eignet sich das kreisförmige Abtastmuster. Bei homogener Matrixverteilung (HCCA) ergibt sich kein Unterschied zwischen hexagonalem und kreisförmigem Abtastmuster.

3.6 Die Proteinidentifikationen unterschiedlicher Suchprogramme und Datenbanken

In diesem Experiment wurden die Datenbanken MSDB, NCBIInr und SwissProt und die Suchmaschinen Mascot, Aldente und Profound (2.3.13) verwendet und verglichen. Aus einem weiteren 2D-Gel (Abb. 3.6) wurden die gleichen 50 Spots wie im Experiment 3.4.1 ausgewählt und nach dem manuellen Verdauprotokoll

bearbeitet. Die Peaklisten einer Messung auf dem PAC-Target wurden nun durch die verschiedenen Suchmaschinen bearbeitet. Die ersten drei Spalten (Tab. 3.11) zeigen den Vergleich zwischen den Datenbanken NCBI, MSDB und SwissProt bei einer Mascot-Suche mit identischen Suchparametern. Bei MSDB und NCBI sind bis auf kleine Schwankungen bei den errechneten Scores keine deutlichen Unterschiede im Ergebnis festzustellen. Unter Verwendung von SwissProt werden geringere Scores erzielt, manche Proteine werden nicht identifiziert. Von den drei Datenbanken konnte bei der Suchmaschine Aldente nur SwissProt ausgewählt werden. Es wurden nur sehr wenige Identifizierungen erhalten. Dazu musste ein Ergebnis bei Aldente den Schwellenwert von 13 überschreiten. Bei der Suche mit Profound wurde NCBI als Datenbank verwendet. Hier steht die Datenbank MSDB nicht zur Verfügung. Die Werte für den Erwartungswert waren bei vielen Spots sehr klein. Jedoch lag bei Spot 20 der Erwartungswert nahe an 1. Dieses Ergebnis ist nicht sehr deutlich von einem zufälligen entfernt. Der Spot 20 wurde jedoch in der Mascot-Suche unter Verwendung der gleichen Datenbank identifiziert.

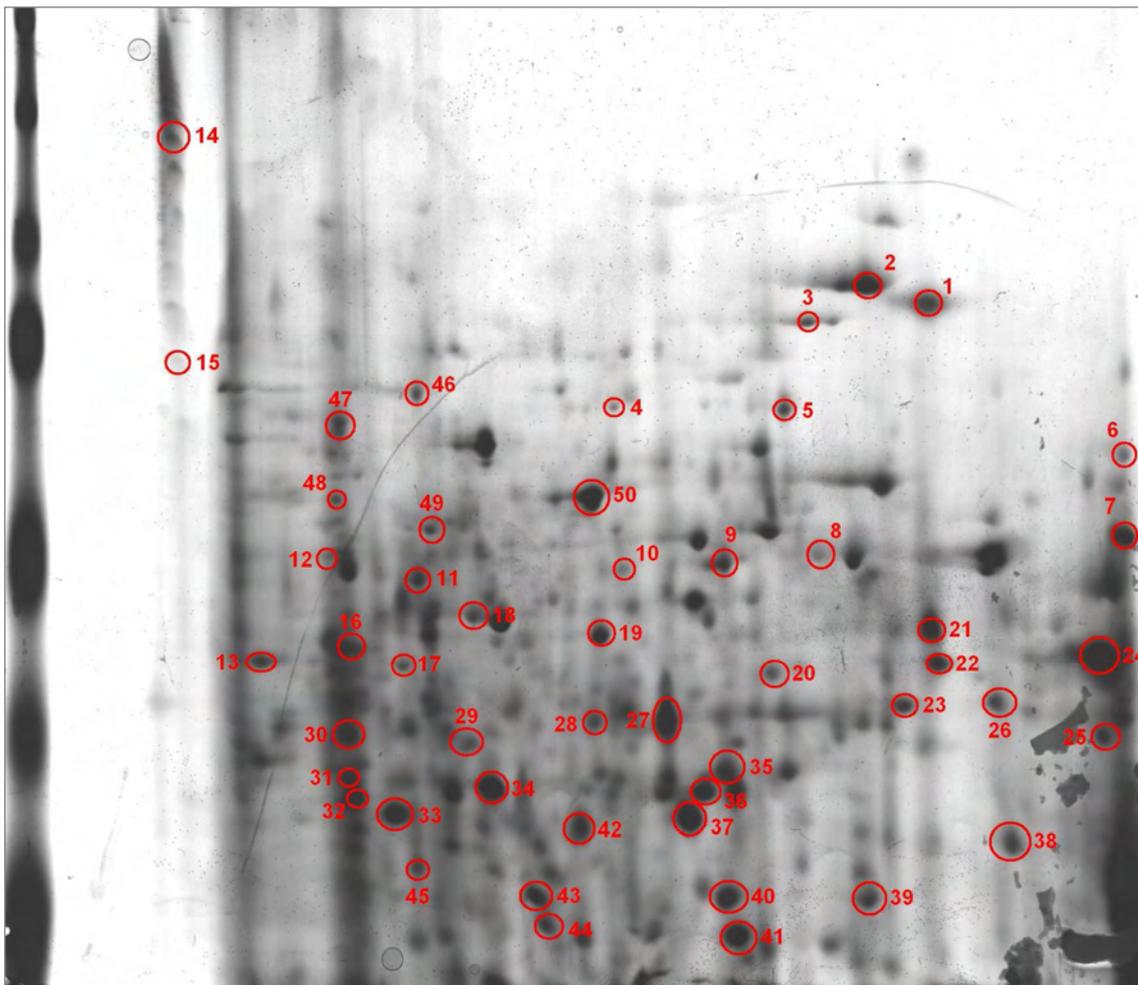


Abb 3.6: 50 Spots aus einem silbergefärbten 2D-Gel mit *C.elegans*- Proteinen für den Suchmaschinenvergleich

Programm: Mascot Datenbank: MSDB							Programm: Mascot Datenbank: NCBIInr				Programm: Mascot Datenbank: SwissProt			
Nr	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	Mascot Score	Seq (%)
2	F54H12.1	aco-2	84,5	8,9	222	33,2	F54H12.1	aco-2	222	33,2	F54H12.1	aco-2	171	28%
3	F27D9.5	pcca-1	80,2	8,5	80,4	21,3	F27D9.5	pcca-1	80,4	21,3	F27D9.5	pcca-1	78	21%
4	F10C1.2	ifb-1	67,2	5,9	332	35,7	F10C1.2	ifb-1	332	35,7	F10C1.2	ifb-1	265	35%
13	C47E12.4	pyp-1	32,3	4,8	90,8	22,6	C47E12.4	pyp-1	90,8	22,6	C47E12.4	pyp-1	64	13%
16	C18A11.7	dim-1	75,5	9,0	162	18,8	C18A11.7	dim-1	162	18,8	C18A11.7	dim-1	60	15%
18	T21B10.2	enol-1	46,6	5,5	77,5	26,1	T21B10.2	enol-1	77,4	26	T21B10.2	enol-1	79	26%
20	ZK20.4		28,8	5,4	69,7	23,3	ZK20.4		69,7	23,3	X			
21	F01F1.12		39,1	8,8	65,4	13,7	F01F1.12		65,4	13,7	F01F1.12		59	13%
22	F27D4.1		32,8	9,4	107	33,5	F27D4.1		107	33,5	F27D4.1		104	31%
24	F20H11.3	mdh-1	35,2	9,9	359	53,4	F20H11.3	mdh-1	359	53,4	F20H11.3	mdh-1	175	48%
26	T06C12.13	nhr-213	48,7	10,0	59,8	16,4	T06C12.13	nhr-213	59,8	16,4	X			
27	F46H5.3		44,7	7,0	167	43,2	F46H5.3		167	43,2	F46H5.3		104	32%
29	R10E12.1	alx-1	94,2	6,1	64,2	11,7	R10E12.1	alx-1	64,2	11,7	R10E12.1	alx-1	60	11%
36	F52H3.7	lec-2	31,3	6,2	139	39,6	F52H3.7	lec-2	139	39,6	X			
38	R13G10.1	dpy-27	170,3	5,9	58,3	7,3	R13G10.1	dpy-27	58,3	7,3	X			
40	W06F12.1	lit-1	74,1	6,8	67,5	13,9	W06F12.1	lit-1	68,4	14,4	X			
41	C17H12.14	vha-8	25,7	7,7	242	50,9	C17H12.14	vha-8	242	50,9	X			
42	F59A2.6		129,4	4,7	62,8	9,4	F59A2.6		62,8	9,4	X			
43	R53.5		24,2	9,4	58,6	20,5	R53.5		58,6	20,5	X			
50	C49C3.7		32,3	9,1	61,9	24,5	C49C3.7		61,9	24,5	X			

Programm: Aldente Datenbank: Swiss-Prot (MSDB und NCBIInr nicht auswählbar)							Programm: Profound Datenbank: NCBIInr (MSDB nicht auswählbar)			
Nr	Gen ID	Gen Name	MW (kD)	pl	Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	Score	Seq (%)
2	F54H12.1	aco-2	81	7,5	150	32	F54H12.1	aco-2	7.7×10^{-7}	31
3	X						F27D9.5		5.3×10^{-8}	21
4	X						F10C1.2	ifb-1	2.6×10^{-11}	36
13	X						C47E12.4	pyp-1	4.5×10^{-9}	18
16	C18A11.7	dim-1	72	8,1	14,1	15	C18A11.7	dim-1	0,034	15
18	X						T21B10.2	enol-1	0,019	26
20	X						ZK20.4		0,69	23
21	X						F01F1.12		0,024	14
22	X						F27D4.1	Alpha-ETF	1.9×10^{-4}	29
24	X						F20H11.3	mdh-1	2.9×10^{-19}	49
27	F46H5.3		40	6,2	85,5	46	F46H5.3		1.7×10^{-6}	43
29	X						R10E12.1	alx-1	0,063	11
36	X						F52H3.7	lec-2	9.2×10^{-5}	40
41	X						C17H12.14	vha-8	1.7×10^{-8}	51

Tab. 3.11: Ein Verdau in unterschiedlichen Suchmaschinen bzw. Datenbanken

Fazit: Zwischen den Datenbanken NCBIInr und MSDB gibt es bezüglich der Identifikationen keinen Unterschied. Ergebnisse aus Mascot lassen sich gut interpretieren.

3.7 Vergleich zwischen automatischem und manuellem Verdau

Bei der Automatisierung ist nicht nur der hohe Durchsatz, sondern auch die Qualität jedes einzelnen Ergebnisses von Interesse. Der Vergleich zwischen manuellem und automatischem Verdauprotokoll geht dieser Frage nach. Für das folgende Experiment wurden zweimal fünf Spots aus einem silbergefärbten *C. elegans*-2D-Gel ausgestochen (Abb. 3.7). Eine Serie von Spots wurde nach dem manuellen und eine Serie nach dem automatischen Protokoll verdaut. Die Messung erfolgte auf dem PAC-Target. Die Scores und die Sequenzabdeckung sind bei den Ergebnissen des automatischen Verdaus niedriger als beim manuellen Verdau (Tab. 3.12). Jedoch wurden drei von fünf Proben mit beiden Verfahren identifiziert.

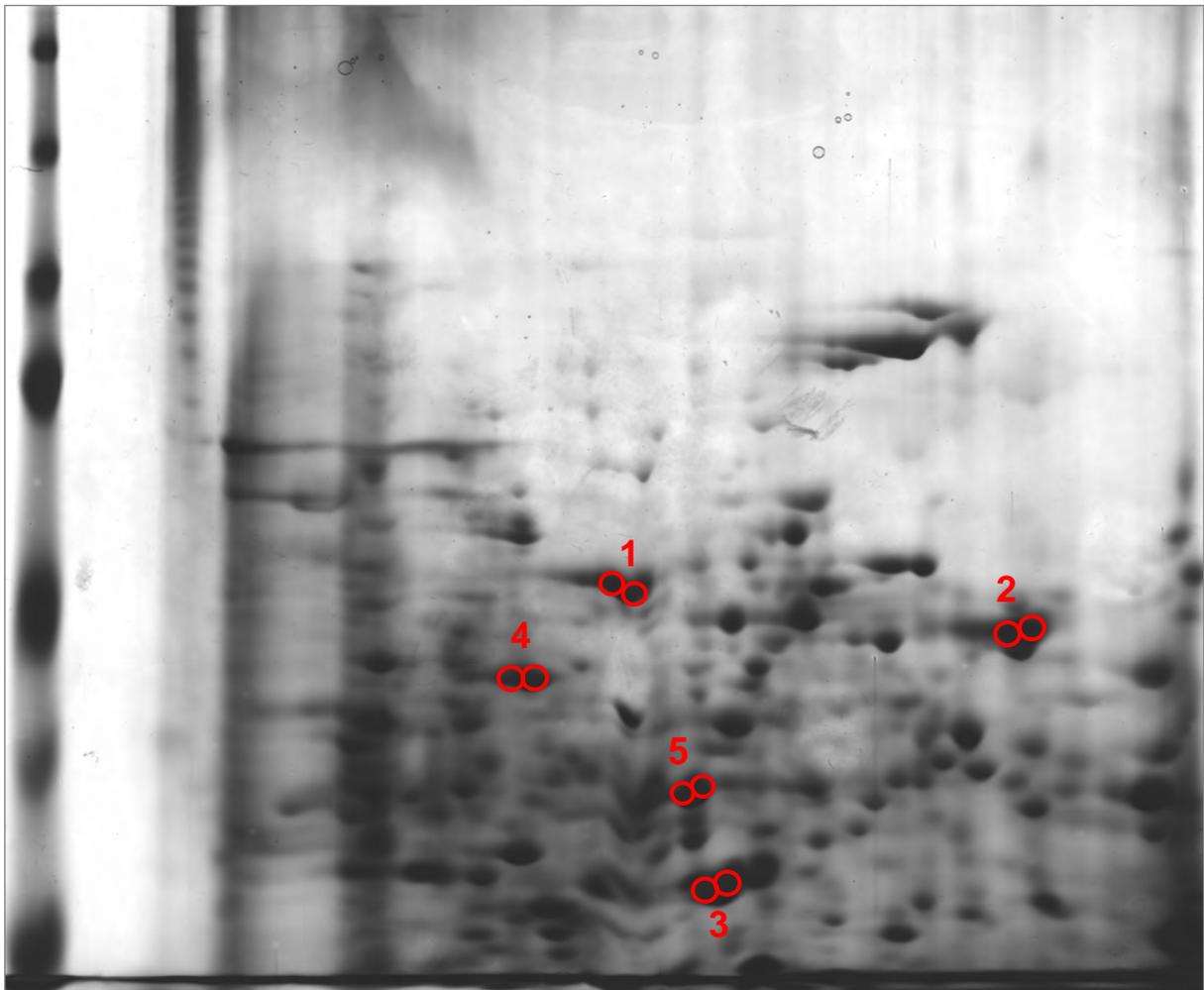


Abb. 3.7: Aus einem silbergefärbten 2D-Gel mit *C.elegans*- Proteinen wurden 2x5 Proteinspots für den Vergleich des manuellen mit dem automatischen Verdauprotokoll ausgeschnitten.

Nr	Manueller Verdau				Automatischer Verdau			
	Gen ID	Gen Name	Mascot Score	Seq (%)	Gen ID	Gen Name	Mascot Score	Seq (%)
1	X	x	x	x	x	x	x	x
2	F08B6.4a	Unc-87	107	39,8	F08B6.4a	Unc-87	78,6	33,3
3	X	x	x	x	x	x	x	x
4	T21B10.2	Enol-1	207	64,2	T21B10.2	Enol-1	78,3	27,3
5	F46H5.3		209	61,6	F46H5.3		161	44,6

Tab: 3.12: Manuell und automatisch erzielte Identifikationen

Fazit: Durch den manuellen Verdau werden höhere Scores und Sequenzabdeckungen erreicht, jedoch ist die Anzahl der identifizierten Proteine mit der des automatischen Verdau vergleichbar.

3.8 Proteinidentifikation eines Referenzlabors im Vergleich zur hier etablierten Methode

Da einige Proteinspots in den verschiedenen Experimenten nicht erkannt wurden, stellte sich die Frage nach einem Vergleich der automatisierten Methodik mit der eines anderen Proteomics-Labors. Im folgenden Experiment wurden aus jeweils zwei *C.elegans*-2D-Gelen jeweils aus fünf willkürlich ausgewählten Spots zwei Gelstückchen ausgestochen (Abb. 3.8 und 3.9). Zehn Spots wurden nach Frankfurt am Main an das Hamilton-Referenzlabor geschickt und dort mit einem Verdauroboter nach einem analogen Protokoll vollautomatisch verdaut und gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der Suchmaschine Mascot erzielt. Die anderen zehn Spots wurden in Giessen automatisch verdaut und auf dem PAC-Target gemessen. Die anschließende Suche wurde ebenfalls mit Mascot durchgeführt. Von zehn Spots konnten in Giessen vier und in Frankfurt drei Spots eindeutig identifiziert werden (Tab. 3.13). Es zeigte sich dabei, dass in beiden Laboren jeweils dieselben Proteine identifiziert wurden. Andere Proteine konnten weder in Giessen, noch in Frankfurt identifiziert werden. Die Sequenzabdeckungen wurden nicht übermittelt.

	Eigene Methode			Frankfurt		
	Gen ID	Gen Name	Mascot Score	Gen ID	Gen Name	Mascot Score
Gel 1, Spot 1	F08B6.4a	Unc-87	139	F08B6.4a	Unc-87	116
Gel 1, Spot 2	T21B10.2	enol-1	205	T21B10.2	enol-1	210
Gel 2, Spot 3	F01F1.12		117	F01F1.12		182
Gel 2, Spot 4	T21B10.2	enol-1	249	x		

Tab: 3.13: Vergleich der Methodik

Fazit: Die Methoden aus den beiden Laboren sind im Ergebnis vergleichbar.

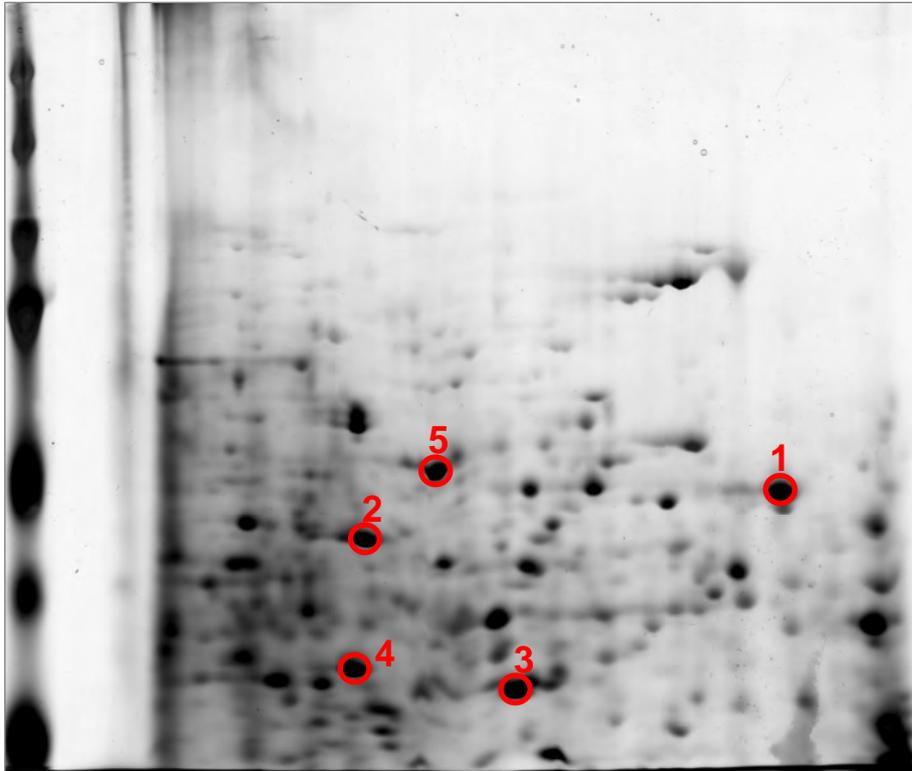


Abb. 3.8: Aus diesen fünf silbergefärbten *C.elegans*- Proteinspots wurden jeweils zwei Gelstückchen ausgeschnitten (Gel 1).

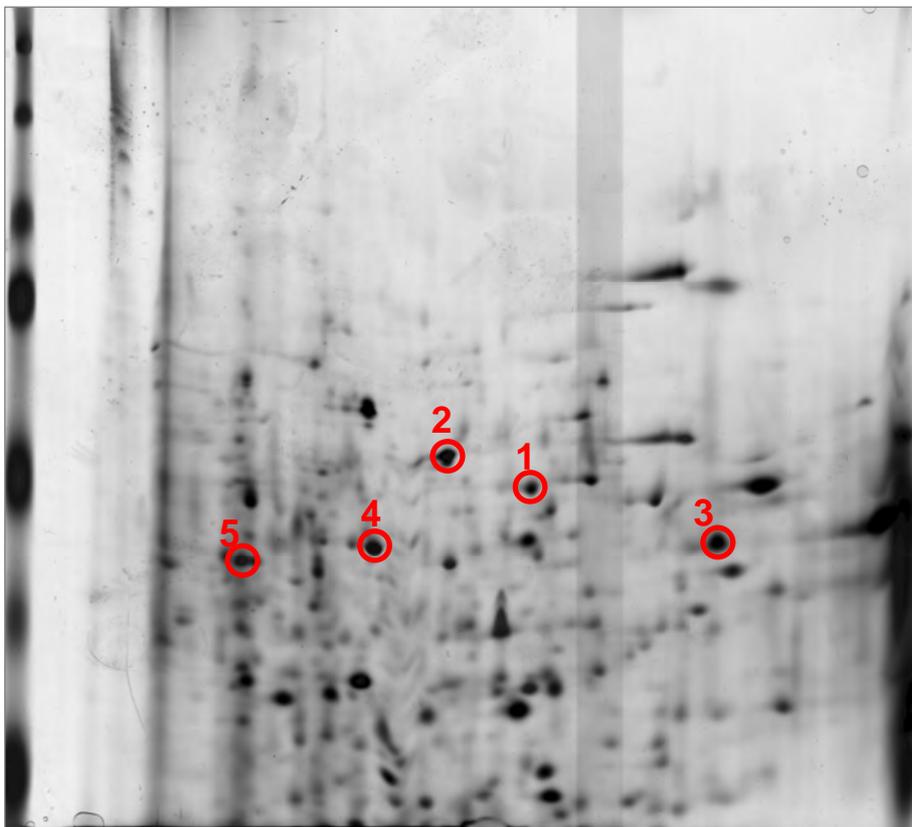


Abb. 3.9: Aus fünf weiteren Proteinspots (Gel 2) wurden ebenfalls jeweils zwei Gelstückchen ausgeschnitten.

4 Diskussion

4.1 Anwendung und Beschränkungen der Silberfärbung

Die Coomassiefärbung liefert im Vergleich zur Silberfärbung deutlich höhere Sequenzabdeckungen in der MS Analyse [29]. Der entscheidende Vorteil der Silberfärbung gegenüber der Coomassiefärbung liegt jedoch in der deutlich höheren Sensitivität für Proteine im Gel. Man kann mit Silber daher deutlich mehr Proteine in Gelen sichtbar machen [30]. Somit stehen mehr Proteine für die Analyse zur Auswahl. Eine Protein-Quantifizierung mit dem Densitometer anhand der Färbintensität im Gel ist bei Silber jedoch schwer möglich. Es hat einen geringen dynamischen Bereich und neigt schnell zur Überfärbung in Bereichen mit sehr hoher Proteinkonzentration. Zudem hat die Färbung keinen Endpunkt und benötigt einen Stopp-Schritt. Die Silberfärbung führt zwar zu keiner chemischen Veränderung der Proteine im Gel und stört daher nicht die Proteinidentifikation [31]. Silber lagert sich jedoch an die Seitenketten von Aminosäuren an und erschwert so möglicherweise die Zugänglichkeit für das Enzym bzw. die Extraktion der Peptide. Mit zunehmender Probenzahl steigt der Zeitaufwand bei einem Verdau enorm an. Ein zusätzlicher Entfärbeschritt im Verdauprozess ist daher nur gerechtfertigt, wenn dadurch ein deutlich spürbarer Informationsgewinn erzielt werden kann. Mit der in diesem Experiment verwendeten Entfärbelösung werden im allgemeinen qualitativ bessere Massenspektren erzielt [32]. Das Ergebnis aus Experiment 3.1 zeigt jedoch keine wesentlichen Unterschiede bzgl. der Qualität der Spektren oder der Identifikation. Es finden sich kaum höhere Sequenzabdeckungen und Scores. Für die Analyse schwacher Spots aus einem Gel kann das Entfärben jedoch evtl. einen entscheidenden Faktor für eine Identifizierung darstellen. Die Identifikation von BSA im Bereich von 30 fmol in dieser Arbeit ist solch ein Beispiel.

Das in dieser Arbeit verwendete Silberfärbeprotokoll enthält, wie viele andere gängige Protokolle, Formaldehyd. Formaldehyd behindert jedoch den Verdauprozess entscheidend durch die kovalente Modifikation von Aminosäureseitenketten. Der negative Effekt tritt verstärkt bei längerer Liegezeit nach der Färbung ein [33]. Eine Verbesserung der Identifikation kann daher prinzipiell auf zwei Arten erreicht werden: Den kompletten Ersatz von Formaldehyd z.B. durch Carbohydrazid [33], was jedoch meist zu schlechteren Färberesultaten führt, oder die Reduktion der

Formaldehydkonzentration auf ein absolutes Mindestmaß und die Verkürzung der Einwirkzeit. Beides wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

4.2 Verdau

4.2.1 Der Einfluss der Verdauzeit und der Reaktionstemperatur

Das Enzym Trypsin verdaut physiologisch bei ca. 38°C. In vielen Verdauprotokollen erfolgt daher die Inkubation mit Trypsin bei dieser Temperatur über Nacht. Die Geschwindigkeit Enzym-katalysierter Reaktionen kann im Allgemeinen durch eine Erhöhung um 10°C verdoppelt werden. Wird die Temperatur jedoch zu hoch gewählt denaturiert das Enzym. Unter dem Aspekt der Automatisierung mit hohem Probendurchsatz ist die Reduktion der Verdauzeit erstrebenswert. Eine weitere Überlegung spricht ebenfalls für die Reduktion der Verdauzeit: Da die Substratkonzentration am Anfang der Enzymreaktion noch hoch ist, wird zu Beginn auch sehr viel umgesetzt. Danach reduziert sich der Umsatz des Substrates sehr schnell. Von jetzt an wird Trypsin selbst verdaut und störende Autolyseprodukte entstehen.

Bei langen Verdauzeiten besteht auch die Gefahr der Austrocknung von Gelplugs. So geht ein großes Volumen der Extraktionslösung für das erneute Aufquellen des Gelspots verloren. Das reale Extraktionsvolumen ist daher viel kleiner.

Diese Überlegungen führten zu Verdauprotokollen mit nur zwei Stunden Verdauzeit bei leicht erhöhter Temperatur [14]. Mit dieser Methode zeigt sich im Experiment 3.2.1 auch eine gute Identifikation.

Um die Autolyseprodukte des Trypsins zu reduzieren gibt es noch einen weiteren Optimierungsansatz. Bei schwachen Gel-Spots mit wenig Protein kann man die Konzentration von Trypsin im Verdaupuffer auf bis zu 2ng/µl reduzieren, um den Eigenverdau zu minimieren [34]. So liegt im Vergleich zum eigentlichen Protein nicht so viel Trypsin in Lösung vor, dass die Autolyseprodukte dominieren. Verschiedene Trypsinkonzentrationen im Verdaupuffer wurden in dieser Arbeit jedoch nicht ausgetestet.

4.2.2 Octylglycosid und Calcium im Verdaupuffer

Mit Octylglycosid im Verdaupuffer erscheinen einige Peaks im Massenspektrum, die vorher noch nicht erkannt wurden. Gerade bei der Identifikation von hydrophoben Peptiden/Proteinen hat Octylglycosid einen positiven Einfluß [35]. Es fördert die Denaturierung der Proteine und verbessert so den Verdau. Darüber hinaus kann es die Extraktion von hydrophoben Peptiden aus dem Gel erleichtern.

Calcium stabilisiert und aktiviert das Enzym Trypsin [36]. Die Kombination der beiden Stoffe im Verdaupuffer wird in modernen automatischen Verdauprotokollen verwendet [14]. Im Experiment 3.2.2 auf dem PAC-Target konnte diese Kombination jedoch nicht überzeugen. Octylglycosid und Kalzium haben möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Ionisierung bei der Verwendung von HCCA PAC-Targets. Diese Zusammensetzung des Verdaupuffers erscheint daher nicht immer vorteilhaft. Nachdem nicht eine Identifikation auf dem PAC-Target erzielt wurde, wurden die Peptidlösungen nochmals auf eine DHB Matrixpräparation aufgetragen und gemessen. Unter Verwendung von DHB wurden dann bei zwei Spots sehr hohe Scores erzielt, bei den beiden anderen erfolgte jedoch überhaupt keine Identifikation, obwohl in der Kontrolle alle vier Spots sicher identifiziert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Ergebnisse bei der DHB-Präparation nicht reproduzierbar sind.

Bei HCCA Präparationen mit zusätzlich Citrat in der Matrixlösung hat Octylglycosid jedoch positive Effekte auf Sequenzabdeckung und Identifikation [37]. Möglicherweise liegt das schlechte Ergebnis aber auch an dem analysierten Protein BSA. Man kann nicht ausschließen, dass diese Kombination bei anderen Proteinen auch auf dem PAC-Target gute Erfolge erzielen kann.

4.2.3 Organische Lösungsmittel im Verdaupuffer

Die Aktivität von Trypsin kann im Verdaupuffer durch organische Lösungsmittel positiv beeinflusst werden. Acetonitril im Puffer kann daher zu einer verbesserten Proteinidentifikation führen. Auch die Sequenzabdeckung soll durch die Verwendung von Acetonitril deutlich steigen [38]. Dies soll vor allem bei hydrophoben Proteinen wie Membranproteinen der Fall sein. Im Experiment 3.2.3 trat unter Verwendung von Acetonitril keine entscheidende Verbesserung auf. Dieser Parameter sollte daher noch weiter unter Verwendung verschiedener Modellproteine mit unterschiedlicher Hydrophobizität untersucht werden.

Es gibt Protokolle, in denen die Konzentration 10% ACN im Verdauopuffer verwendet wird [39]. Möglicherweise ergeben sich aber bei unterschiedlichen Konzentrationen von Acetonitril noch bessere Identifikationsscores. Alternativ wird auch Methanol verwendet [40]. Hier hat sich aber auch gezeigt, dass es nicht unbedingt so ist, dass hydrophobere Proteine immer besser zu verdauen sind, wenn man bis zu 60% MeOH zugibt. Es ist nur eine allgemeine Tendenz. Neuere Protokolle verwenden auch 2-Phasen Systeme (z.B. Butanol/ NH_4HCO_3) mit deutlich verbesserten Ergebnissen für die Proteinidentifikation [41].

4.3 Extraktion

4.3.1 Das mechanische Unterstützen des Extraktionsprozesses

Die Extraktion ist ein sehr wichtiger Schritt. Hier kommt es darauf an, dass so viele Peptide wie möglich aus dem Gel in Lösung übergehen. Bei der automatischen Bearbeitung des Verdau ist neben der Zeitersparnis auch von Vorteil, dass der Experimentator nicht über die ganze Zeit des Versuches an diesem Arbeitsplatz gebunden ist. Auf der Arbeitsplattform des Digesters (Abb. 2.1 in 2.3.11.2) ist bereits ein Laborschüttler, passend für die Wellplatten, integriert. Daher bietet es sich an, die Extraktion der Peptide durch Schütteln zu unterstützen. Dieser Schritt ist vollautomatisch in den Arbeitsablauf des Roboters integrierbar. In manuellen Verdauprotokollen wird anstelle des Laborschüttlers gerne das Ultraschallbad zur Unterstützung der Extraktion verwendet. Es ist einfach die Eppendorf-Gefäße in das Ultraschallbad zu stellen. Beim automatischen Verdau mit Wellplatten ist es dagegen schwierig eine Wellplatte in ein Ultraschallbad zu integrieren. Die Daten aus dem Experiment 3.3.1 zeigen, dass mit dem Schüttler sehr gute Ergebnisse erzielt werden können. Daher ist die umständliche Unterbrechung des Arbeitsablaufes für das Ultraschallbad nicht nötig. Publikationen anderer Arbeitsgruppen zeigen jedoch, dass in den dort verwendeten automatisierten Protokollen die Extraktion weder durch Ultraschall noch durch Schütteln unterstützt wird [15]. Möglicherweise bietet das Unterstützen der Extraktion durch Schütteln oder Ultraschall insgesamt nur einen geringen Vorteil. Durch Verzicht auf den Schüttler lässt sich jedoch keine weitere Zeitreduktion erreichen, da die Extraktion bei Canelle [15] auch ohne Schütteln 20 Minuten in Anspruch nimmt.

4.3.2 Volumenänderung der Extraktionslösung

Durch die Verwendung von größeren Extraktionsvolumina lassen sich mehr Peptide aufgrund des osmotischen Gradienten in Lösung bringen. Die Konzentration der Peptide in der Extraktionslösung ist dann jedoch so gering, dass die Lösung getrocknet und die getrockneten Peptide mit einem geringeren Volumen wieder aufgenommen werden müssen. Dabei bleiben einige Peptide an der Wand des Gefäßes haften [39]. Der zusätzliche Schritt, die Peptide in den Wellplatten zu trocknen und anschließend mit neuer Extraktionslösung aufzunehmen, bringt daher nicht unbedingt immer einen Informationsgewinn. Der Effekt, dass möglicherweise mehr Peptide in Lösung übergehen wird offensichtlich durch die dann notwendige Aufkonzentrierung, verbunden mit dem Verlust durch Adsorption an Plastikoberflächen, wieder zunichte gemacht.

4.3.3 Die Extraktion mit Acetonitril

Um mehr hydrophobe Peptide in Lösung zu bringen und so einen Informationsgewinn zu erreichen, wurde im Experiment 3.3.3 nach der ersten Extraktion (10µl) eine weitere Extraktion mit 80% ACN durchgeführt. Die hydrophoben Peptide lösen sich in ACN besser. ACN führt außerdem dazu, dass das Gelstückchen schrumpft und so möglicherweise mehr Peptide in Lösung gebracht werden können. Auch hier wurde die zweite Extraktion mit der Vakuumzentrifuge getrocknet und erneut mit 1%TFA aufgenommen. Die Kombination der beiden Extraktionslösungen besaß ein Volumen von 20µl. Die Extraktion mit ACN wird in verschiedenen Protokollen beschrieben. Im Vergleich zu der einfachen Extraktion entsteht keine Verbesserung der Identifikationsrate oder der Sequenzabdeckung. Zu diesem Ergebnis kommen auch Finehout und Lee [42]. Dieser Schritt scheint nicht den erhofften Erfolg zu bringen. Das kann aber auch an dem Trocknungsschritt und der damit verbundenen Anheftung von Peptiden an die Plastikoberfläche liegen [39]. Im Vergleich zu den übrigen Experimenten liegt hier methodenbedingt auch eine stärkere Verdünnung der Peptide vor. Das Umfüllen und Zusammenführen der beiden Extraktionen führt ebenfalls zu Peptidverlusten und ist nur schwierig in den automatischen Ablauf des Verdauroboters zu integrieren. Insgesamt führte die Verwendung von hohen Acetonitril-Konzentrationen zu keinem nennenswerten Informationsgewinn.

4.4 Auswirkungen der Matrixpräparation und des Abtastmusters

Die Auswahl der Matrix und der Matrixpräparation ist entscheidend für die Identifikationsrate der Proteine. Gängige Matrices (HCCA und DHB) nehmen besonders gut die Energie des Stickstofflasers auf. Die Ionisierung der Matrix führt im Ergebnis zum Übergang der Peptide in die Gas-Phase und zur Übertragung von Protonen auf die Peptide. Die genauen Vorgänge der Ladungsübertragung sind noch Gegenstand wissenschaftlicher Forschung [43].

Aus den Experimenten 3.4.1 und 3.4.2 ist ersichtlich, dass die DHB-Präparation für das Stahl-Target bei manueller Messung eine sehr gute Identifikation der Proteine ermöglicht. Im Allgemeinen können unter Verwendung von DHB anstelle HCCA als Matrix höhere Mascot-Scores erzielt werden. Es gibt aber auch Ergebnisse die zeigen, dass entgegen dem Trend bei bestimmten Proteinen die Verwendung von HCCA zu besseren Ergebnissen führen kann [44]. Auch unter 3.4.1 gelingt mit dem PAC-Target (HCCA) eine bessere Identifikation mancher Proteine. Unter dem Gesichtspunkt der Automatisierung sollten die Vorteile bei den homogenen HCCA Präparationen liegen, da der Laser bei der Messung dort eine größere Chance auf einen Treffer hat. In 3.4.2 konnte auf dem Anchor-Chip eine DHB-Präparation jedoch so gut konzentriert werden, dass sogar bei einer automatischen Messung bessere Ergebnisse erzielt wurden als bei den HCCA-Präparationen. In diesem Experiment wurde auch ein älteres PAC-Target, mit einem frischen PAC verglichen. Auch unter einer Schutzatmosphäre aus Argon konnte das PAC-Target nach zwei Monaten nicht mehr gut eingesetzt werden. Hier haben möglicherweise Umwelteinflüsse (z.B. Tageslicht) einen negativen Einfluss auf Matrixsubstanz. Ein bereits geöffnetes PAC sollte, auch wenn noch freie Spots zur Verfügung stehen, nach ein paar Wochen nicht mehr benutzt werden. Als optimal für die automatische Proteinidentifikation bei *C. elegans* hat sich die Mischmatrix erwiesen (3.4.2). Hier kommen offensichtlich die Vorteile beider Matrices voll zur Geltung. Auch Laugesen und Roepstorff zeigten Vorteile einer Mischmatrix aus HCCA und DHB gegenüber HCCA oder DHB an Standardproteinen [45].

Je nach Geschwindigkeit der Kristallbildung (abhängig vom jeweiligen Lösungsmittel) von Matrix und Peptiden wird auch das Erscheinen von unterschiedlichen Peptiden im Spektrum begünstigt [46]. Es gibt für einzelne Proteine sogar jeweils ein Optimum für das Verhältnis der Lösungsmittel im Matrix-Peptidgemisch [44]. Für bestimmte Proteine aus *C. elegans* könnte daher bei Verwendung anderer

Lösungsmittelverhältnisse sowohl in Matrix- als auch Peptidlösung eine bessere Identifikation erreicht werden. Weitere Experimente zu verschiedenen Lösungsmitteln in Matrixpräparationen wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Experimente zu den verschiedenen Matrices stellen eine Optimierung bezüglich der Identifikation von *C. elegans* dar. Bei anderen Proteinen und deren Peptiden könnte möglicherweise eine andere Matrixpräparation vorteilhafter sein.

4.5 Anwendung von Suchmaschinen und Datenbanken

Es gibt verschiedene Faktoren, die auf das Ergebnis einer Suche Einfluss haben. Dabei spielt beim „probability based scoring“ neben der einfachen Anzahl der übereinstimmenden Peptide auch die unterschiedliche Gewichtung der Peptide eine Rolle. Wenn ein Peptid im Spektrum erscheint, welches sehr spezifisch ist, wird es stärker gewichtet als ein vergleichbares Peptid, welches in sehr vielen Proteinen vorkommen kann. Die Algorithmen der Suchmaschinen sind komplex und im Einzelnen nicht veröffentlicht. Für den Erfolg der Suche spielen auch die Qualität und die Menge der Datenbankeinträge eine entscheidende Rolle. Hier unterscheiden sich die verwendeten Datenbanken. MSDB und NCBI nr sind große Datenbanken mit mehr als 5 Mio. Einträgen

(<http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>).

Sie sind aus kleineren Datenbanken (u. a. auch SwissProt) zusammengesetzt. Diese Datenbanken bestehen zum größten Teil aus Proteineinträgen die aus Gensequenzen bestimmt wurden. Hier sind Splicen und posttranslationale Modifikationen nicht berücksichtigt.

SwissProt (<http://www.expasy.ch/sprot/>) ist eine kleinere Datenbank mit aktuell ca. 300.000 Einträgen. Die Einträge solcher Datenbanken werden von den Betreibern nach Wiederholungen und fehlerhaften Einträgen durchsucht. Die Einträge in den Datenbanken haben unterschiedliche Formate, z.T. unterschiedliche Taxonomie und verschiedene zusätzliche Informationen.

Durch den unterschiedlichen Aufbau der Datenbanken und die verschiedenen Algorithmen der Suchmaschinen sind die Differenzen bei den Ergebnissen zu erklären.

SwissProt gilt allgemein als gut annotierte Datenbank mit vielen Zusatzinformationen zu den Proteinen (Struktur, biologische Funktion, etc.). In SwissProt soll es auch wenige Wiederholungen und überflüssige Einträge geben. Im Experiment 3.6 erhielten SwissProt-Identifikationen von dem Suchprogramm Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) geringere Scores als NCBItr und MSDB. Dies könnte damit zusammenhängen, dass in den Datenbanken NCBItr und MSDB neben SwissProt noch viele weitere Datenbanken und somit Informationen integriert sind. Man kann z.B. bei Mascot sehr gut erkennen, dass der Schwellenwert bei NCBItr und MSDB um 57/58 liegt, während dieser Schwellenwert bei genau gleichen Suchparametern bei SwissProt nur bei 48 liegt. Auch hier zeigt sich, die unterschiedliche Informationsgrundlage.

Bei einer Suche mit Aldente (<http://www.expasy.ch/tools/aldente/>) kann man von den drei Datenbanken MSDB, NCBItr und SwissProt nur letztere auswählen. Dies könnte mit den unterschiedlichen Formaten der Datenbanken zu tun haben. Bei Aldente zeigt sich jedoch ein deutlich schlechteres Gesamtergebnis (siehe 3.6). Hier ist sicher entscheidend, dass eine Eingrenzung auf *C. elegans* fehlt. Aldente wirkt in der Bedienung insgesamt nicht so ausgereift wie Mascot.

Auch wenn man bei der Beurteilung solcher Ergebnisse einer Suchmaschine immer berücksichtigen muss, dass sich ein falsch positives Ergebnis nicht ganz ausschließen lässt, gibt Mascot mit dem Schwellenwert aber ein gutes Entscheidungskriterium. Bei ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/>) ist die Beurteilung schon schwieriger, da kein Schwellenwert genannt wird [24-27, 47].

Für die Automatisierung ist auch die Integration der Datenbanksuche in den restlichen Arbeitsprozess wesentlich. Die Softwareversion der Mascot-Suche konnte gut in den automatischen Ablauf und in die Kommunikation mit der Ergebnisdatenbank iDQest integriert werden. Softwareversionen der anderen Suchmaschinen standen für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

4.6 Das automatisierte Verdauprotokoll im Vergleich

Durch die völlige Automatisierung des Verdauprozesses entstehen weniger Möglichkeiten einer Kontamination der Proben z.B. mit humanem Keratin. Durch die Reduktion solcher Störmassen sollte ein hervorragendes Ergebnis zu erwarten sein. In automatisierten Protokollen sind die Ergebnisse bezüglich Score und

Sequenzabdeckung denen im manuellen Protokoll ebenbürtig [14, 48]. Die Ergebnisse aus Experiment 3.7 zeigen jedoch höhere Scores und Sequenzabdeckungen bei den manuell verdauten Proben. Offensichtlich gehen irgendwo im automatischen Verdauprozess Informationen verloren. Möglicherweise führt das Überführen der Extraktionslösung in eine zusätzliche 384er Wellplatte zu einem Verlust von Peptiden an zusätzlichen Plastikoberflächen (Pipettenspitzen und Wellwand). Im manuellen Verdauprotokoll wird die Extraktionslösung im Eppendorfgefäß bis zum Auftragen auf die Matrix bei dem Gelstück belassen. Letztendlich konnten jedoch mit dem automatischen Verdauprotokoll die gleichen Proteine identifiziert werden. Auffällig ist, dass bei einigen der großen Spots eine Identifikation nicht möglich war, obwohl man aufgrund des Färbeverhaltens von ausreichender Proteinmenge ausgehen kann.

Auch ein Vergleich des automatischen Verdauprotokolls mit dem Verdauprotokoll aus Frankfurt (3.8) zeigt ähnliche Ergebnisse. Möglicherweise spielt die lange Lagerzeit (bis zu ½ Jahr) der 2D-Gele oder der Formaldehydanteil der verwendeten 2D-Gele hier die entscheidende Rolle bei der vergleichsweise schlechten Identifikationsrate. Das annähernd identische Ergebnis der Analyse aus Frankfurt deutet jedenfalls darauf hin, dass die geringe Identifikationsrate bei diesem Versuch nicht an einem grundsätzlichen Fehler im Protokoll liegt.

5 Zusammenfassung

Die medizinische Forschung braucht für das Verständnis von Pathomechanismen, bei der Entwicklung von Pharmaka, bei der Erforschung der Funktionen in Infektionserregern und bei der Erforschung zellulärer Antworten auf Infektionen die Methoden der Proteinanalytik. In diesem Zusammenhang sind ganze Proteome von Interesse, da die Zusammenhänge in der Zelle für das globale Geschehen entscheidend sind. Um ein Proteom, also eine Vielzahl an Proteinen möglichst effizient analysieren zu können ist die Automatisierung und Optimierung des Analyseprozesses von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit wurden einzelne Schritte der MALDI-Analyse des proteolytischen Verdaus variiert und optimiert. Veränderungen der Proteinidentifikationsrate durch Entfärben von silbergefärbten Gelstücken wurden untersucht. Reaktionszeit und Temperatur des enzymatischen Verdaus wurden variiert. Veränderungen der Proteinidentifikation durch verschiedene Zusätze wie Calcium, Octylglycosid oder Acetonitril im Verdaupuffer wurden beobachtet. Für den Extraktionsschritt wurden Untersuchungen zum Vergleich von Ultraschallextraktion zu Schüttlerextraktion durchgeführt, um ein optimales Auslösen der Peptide zu ermöglichen. Das Volumen der Extraktionslösung wurde variiert. Der Effekt von Acetonitril auf die Extraktion wurde untersucht. Unterschiedliche Matrixpräparationen wurden an *C.elegans*-Proteinen getestet. Untersuchungen zur automatischen MALDI-Messung wurden an den verschiedenen Matrices durchgeführt. Zur Auswertung wurden verschiedene Suchmaschinen und Datenbanken verwendet. Es zeigte sich, dass automatisierte Methoden in der Proteinanalytik hervorragend einsetzbar sind. Die Anzahl der identifizierten Proteine mit einer automatisierten Methode war vergleichbar mit der eines manuellen Protokolls. In dieser Arbeit zeigte sich, dass verschiedene Zusätze zu den Verdaupuffern tendenziell eher wenig Vorteile bringen. Ein möglichst kurzer Verdauprozess mit möglichst wenigen Zwischenschritten ist von Vorteil. Für Datenbanksuchen und die Verwaltung der Proteinidentifikationen sind gute Softwarelösungen entscheidend.

6 Summary

Sophisticated protein analytical techniques are an essential for the understanding of diseases' pathogenesis, the development of new pharmaceuticals, functional investigation of infectious agents and for investigating cellular responses towards pathogens. As intracellular interactions and replies are responsible for the progress and outcome of diseases, complete proteoms are of special interest. For the efficient analysis of such a proteom, the establishment of automated and optimized methods of the analytic process is of particular importance. In this thesis, single steps of the MALDI-analysis of proteolytic digests were varied and optimized. The influences on the protein identification rate by destaining silver-gels were investigated as well as variations of the reaction time and temperature. Moreover, application of calcium, octylglycoside and acetonitrile to the digestion buffer provoked changes in the identification of proteins. Extractions by ultrasonic and by shaking were compared in order to bring more peptides in solution. The volume of the extraction buffer was varied and the effect of acetonitrile on the extraction was studied. Different matrix-preparations were examined using *C.elegans* peptides. The differences of matrix-preparations concerning automated MALDI measurements were also studied. Different protein search engines and databases were compared. It turned out that in protein analysis automated methods are very successful. The protein identification rate by the automated protocol was comparable to an established manual protocol. This work shows that most of the used buffer additives reported so far are of no remarkable positive effect on the protein identification. Instead, a short and uninterrupted protocol containing only few steps is of greater importance. For database searches and management of the results, new handy software solutions are needed.

7 Literatur

- [1]. Lottspeich, F. *Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins*. Angewandte Chemie. International Ed. In English (1999) Vol. **38**: 2476-2492
- [2]. Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. *Introduction to the Proteome*. in: *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Herausgeber: M.R. Wilkins, et al., Springer, Heidelberg (1997)
- [3]. Tong, A., Wu, L., Lin, Q., Lau, Q.C., Zhao, X., Li, J., Chen, P., Chen, L., Tang, H., Huang, C., Wei, Y. *Proteomic analysis of cellular protein alterations using a hepatitis B virus-producing cellular model*. *Proteomics* (2008) Vol. **8**: 2012-2023
- [4]. Quin, G.J., Len, A. C., Billson, F.A., Gillies, M.C. *Proteome map of normal rat retina and comparison with the proteome of diabetic rat retina: New insight in the pathogenesis of diabetic retinopathy*. *Proteomics* (2008) Vol. **7**: 2636-2650
- [5]. Witzmann, F. A., Grant, R. A. *Pharmacoproteomics in drug development*. *The Pharmacogenomics Journal* (2003) Vol. **3**: 69-76
- [6]. O'Farrell, P. H. *High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins*. *J Biol Chem* (1975) Vol. **250**: 4007-4021
- [7]. Wehr, T. *Multidimensional Liquid Chromatography in Proteomic Studies*. *LCGC North America* (2002) Vol. **20**: 954-962
- [8]. Wehr, T. *Separation Technology in Proteomics*. *LCGC* (2001) Vol. **19**: 702-711
- [9]. Wall, D. B., Berger, S. J., Finch, J. W., Cohen, S. A., Richardson, K., Chapman, R., Drabble, D., Brown, J., Gostick, D. *Continuous sample deposition from reversed-phase liquid chromatography to tracks on a matrix-assisted laser desorption/ionization precoated target for the analysis of protein digests*. *Electrophoresis* (2002) Vol. **23**: 3193-204
- [10]. Aebersold, R., Mann, M. *Mass spectrometry-based proteomics*. *Nature* (2003) Vol. **422**: 198-207
- [11]. Karas, M., Bahr, U., Gießmann, U. *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. *Mass Spectrometry Reviews* (1991) Vol. **10**: 335-357
- [12]. Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F. *2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry*. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* (1991) Vol. **111**: 89-102
- [13]. Beavis, R. C., Chaudhary, T., Chait, B. T. *α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry*. *Organic Mass Spectrometry* (1992) Vol. **27**: 156-158
- [14]. Jahn, O., Hesse, D., Reinelt, M., Kratzin, H. D. *Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry*. *Anal Bioanal Chem* (2006) Vol. **386**: 92-103
- [15]. Canelle, L., Pionneau, C., Marie, A., Bousquet, J., Bigeard, J., Lutomski, D., Kadri, T., Caron, M., Joubert-Caron, R. *Automating proteome analysis: improvements in throughput, quality and accuracy of protein identification by peptide mass fingerprinting*. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2004) Vol. **18**: 2785-94
- [16]. Brenner, S. *The genetics of Caenorhabditis elegans*. *Genetics* (1974) Vol. **77**: 71-94

- [17]. Lochnit, G., Bongaarts, R., Geyer, R. *Searching new targets for anthelmintic strategies: interference with glycosphingolipid biosynthesis and phosphorylcholine metabolism affects development of Caenorhabditis elegans*. International Journal for Parasitology (2005) Vol. **35**: 911-923
- [18]. Kaletta, T., Hengartner, M. O. *Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism*. Nat Rev Drug Discov (2006) Vol. **5**: 387-98
- [19]. Consortium, The C. elegans Sequencing *Genome Sequence of the Nematode C. elegans: A Platform for Investigating Biology*. Science (1998) Vol. **282**: 2012-2018
- [20]. Chen, N., Harris, T. W., Antoshechkin, I., Bastiani, C., Bieri, T., Blasiar, D., Bradnam, K., Canaran, P., Chan, J., Chen, C. K., Chen, W. J., Cunningham, F., Davis, P., Kenny, E., Kishore, R., Lawson, D., Lee, R., Muller, H. M., Nakamura, C., Pai, S., Ozersky, P., Petcherski, A., Rogers, A., Sabo, A., Schwarz, E. M., Van Auken, K., Wang, Q., Durbin, R., Spieth, J., Sternberg, P. W., Stein, L. D. *WormBase: a comprehensive data resource for Caenorhabditis biology and genomics*. Nucleic Acids Res (2005) Vol. **33 Database Issue**: D383-9
- [21]. Gbewonyo, K., Rohrer, S.P., Lister, L., Burgess, B., Cully, D., Buckland, B. *Large scale cultivation of the free living nematode Caenorhabditis elegans*. Biotechnology (1994) Vol. **12**: 51-54
- [22]. Wessel, D., Flugge, U. I. *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem (1984) Vol. **138**: 141-3
- [23]. Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature (1970) Vol. **227**: 680-5
- [24]. Tuloup, M., Hernandez, C., Coro, I., Hoogland, C., Binz, P-A., Appel, R D. *Aldente and BioGraph: An improved peptide mass fingerprinting protein identification environment*. Swiss Proteomics Society Congress: Understanding Biological Systems through Proteomics, Basel, Switzerland, 2-4 Dec (2003)
- [25]. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M R., Appel, R D., Bairoch, A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. in: The Proteomics Protocols Handbook, Herausgeber: J.M. Walker, Humana Press, New Jersey (2005)
- [26]. Zhang, W., Chait, B. T. *ProFound: An Expert System for Protein Identification Using Mass Spectrometric Peptide Mapping Information*. Anal Chem (2000) Vol. **72**: 2482-2489
- [27]. Perkins, D N., Pappin, D J C., Creasy, D M., Cottrell, J S. *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis (1999) Vol. **20**: 3551-3567
- [28]. Lochnit, G., Pekelis, M., McGlothlen, B. *Filtering Experimental Results with iDQuest in a Proteome Laboratory*. in HUPPO 5th Annual World Congress. 2006. Long Beach, CA, USA.
- [29]. Winkler, C., Denker, K., Wortelkamp, S., Sickmann, A. *Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS*. Electrophoresis (2007) Vol. **28**: 2095-9
- [30]. Switzer, Merril, Shifrin *A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels*. Analytical Biochemistry (1979) Vol. **98**: 231-237

- [31]. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. Anal Chem (1996) Vol. **68**: 850-8
- [32]. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., Mische, S. M. *Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity*. Electrophoresis (1999) Vol. **20**: 601-5
- [33]. Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T. *About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry*. Proteomics (2004) Vol. **4**: 909-16
- [34]. Albrecht, D. Universität Greifswald, persönliche Mitteilung
- [35]. van Montfort, BA., Canas, B., Durkens, R., Godovac-Zimmermann, J., Robillard, GT. *Improved in-gel approaches to generate peptide maps of integral membrane proteins with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. J Mass Spectrom (2002) Vol. **37**: 322-30
- [36]. Sipos, Merkel *An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin*. Biochemistry (1970) Vol. **9**: 2766-75
- [37]. Lochnit, G. Universität Gießen, persönliche Mitteilung
- [38]. Russell, W.K., Park, Z-Y, Russell, D.H. *Proteolysis in mixed organic-aqueous solvent systems: applications for peptide mass mapping using mass spectrometry*. anal chem (2001) Vol. **73**: 2682-5
- [39]. Speicher, K. D., Kolbas, Harper, Speicher, D. W. *Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies*. J. Biomol. Tech. (2000) Vol. **11**: 74-86
- [40]. Chick, J.M., Haynes, P.A., Molloy, Bjellqvist, Baker, Len *Characterization of the Rat Liver Membrane Proteome Using Peptide Immobilized pH Gradient Isoelectric Focusing*. J Proteome Res (2008) Vol.
- [41]. Zhou, J., Lin, Y., Deng, X., Shen, J., He, Q., Chen, P., Wang, X., Liang, S. *Development and Application of a Two-Phase, On-Membrane Digestion Method in the Analysis of Membrane Proteome*. J Proteome Res (2008) Vol. **7**: 1778 - 1783
- [42]. Finehout, E. J., Lee, K. H. *Comparison of automated in-gel digest methods for femtomole level samples*. Electrophoresis (2003) Vol. **24**: 3508-16
- [43]. Knochenmuss, R., Zenobi, R. *MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes*. Chem Rev (2003) Vol. **103**: 441-452
- [44]. Padliya, N. D., Wood, T. D. *A strategy to improve peptide mass fingerprinting matches through the optimization of matrix-assisted laser desorption/ionization matrix selection and formulation*. Proteomics (2004) Vol. **4**: 466-73
- [45]. Laugesen, S., Roepstorff, P. *Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis*. J Am Soc Mass Spectrom (2003) Vol. **14**: 992-1002
- [46]. Cohen, S. L., Chait, B. T. *Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins*. Anal Chem (1996) Vol. **68**: 31-37
- [47]. Appweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H. *Protein Sequence Databases*. Current Opinion in Chemical Biology (2004) Vol. **8**: 76-80
- [48]. Ashman, K., Houthaeve, T., Clayton, J., Wilm, M., Podtelejnikov, A., Jensen, O.N., Mann, M. *The application of robotics and mass spectrometry to the characterisation of the Drosophila melanogaster indirect flight muscle proteome*. Letters in Peptide Science (1997) Vol. **4**: 57-65

Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich für die Hilfe und Unterstützung durch meinen Doktorvater PD Dr. Günter Lochnit. Er hat mir auch in kritischen Situationen wieder Mut gegeben und ohne seine Geduld hätte ich diese Arbeit nicht erstellen können.

Dr. Julia Grabitzki hat für mich die Gele angefertigt und mir immer wieder Tips gegeben, auch wenn sie selbst sehr beschäftigt war. Vielen Dank!

Bei Peter Dotzauer, Michael Dreisbach, Christina Schmidt und Hans-Günter Welker bedanke ich mich für die sehr guten Infos und die Unterstützung bei der Laborarbeit!

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5564-0



9 117 8 3 8 3 5 19 5 5 6 4 6