

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Labormaterial**

#### **2.1.1. Chemikalien**

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Merck (Merck, Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Serva (Serva, Heidelberg, Deutschland). Aus anderen Quellen stammende Chemikalien sind im Folgenden alphabetisch aufgeführt.

Amidosulfobetaine 14 (Calbiochem, San Diego, CA, USA)

BCA Protein Assays (Pierce, Rockford, IL, USA)

Complete<sup>®</sup> (Roche, Mannheim, Deutschland)

Kaliumpentachloroäquat (Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland)

Nitrocellulose (Schleicher und Schuell, Düren, Deutschland)

n-Octyl- $\beta$ -D-Glycopyranosid (Fluka, Buchs, Schweiz)

Pharmalyte pH 4.0–6.5, 5.0–8.9, 6.5–9.0 und 3.5–10.0 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Sinapinsäure (Fluka, Buchs, Schweiz)

Sypro<sup>®</sup>-Ruby (Molecular Probes, Eugene, Oregon USA)

Trypsin (Promega, Madison, WI, USA)

Trypsin (Roche, Mannheim, Deutschland)

#### **2.1.2. Laborgeräte, Roboter und Maschinen**

Im Folgenden sind im Rahmen der Arbeit verwendete und im Text erwähnte Geräte alphabetisch aufgelistet.

96er Mikrotiterplatten (Costar Thermowell<sup>®</sup>, Cornis, NY, USA)

96er Mikrotiterplatten (AB Gene Thermo-Fast<sup>®</sup>, Surrey, England)

*Anchor Chip*-Probenteller (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland)

Automatischer Gelstück-Ausstanzer (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) basierend auf dem Gilson Pipettierroboter, Micro 215 Liquid Handler, (Gilson, Middleton, WI, USA)

Beckman TI 50 Ultrazentrifugen-Rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA)

Bruker Autoflex Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland)

Bruker Reflex III Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland)

Centricon T-2060 Ultrazentrifuge (Kontron, Eching, Deutschland)

Elektrophoresekammer 1D (Wita, Berlin, Deutschland)  
Elektrophoresekammer 2D (Desaphor VA300, Desaga, Wiesloch, Deutschland)  
EPS 3500XL Spannungsgerät (Ammersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland)  
Glasröhrchen 1D (Schott Glas, Mainz, Deutschland)  
Manueller Gelstück-Ausstanzer (Rosemann und Sohn, Stahnsdorf, Deutschland)  
Miniroboter zum Lochen der MTP (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland)  
Sun Ultra Computer (Santa Clara, CA, USA)  
Tischzentrifuge 4K15 (Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland)  
Typhoon 9400 Laserscanner (Pharmacia, Uppsala, Schweden)  
UMAX Mirage II DIN A 3 Durchlichtscanner (Umax, Willich, Deutschland)

## **2.2. Pflanzenmaterial**

### **2.2.1. Arabidopsis thaliana**

Die *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia, die für alle Proteinextraktionen eingesetzt wurden, stammen aus dem Gewächshäusern des Max Planck Instituts für Pflanzenphysiologie in Golm und wurden freundlicherweise von Frau Dr. Julia Kehr zur Verfügung gestellt. Diese Pflanzen waren jeweils 50 Tage (nach Aussaat) alt und wurden im Langtag gezogen. Langtagbedingungen bedeuten 16 Stunden Licht (Tag) und 8 Stunden Dunkelheit (Nacht), bei Lichtbedingungen von  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Temperatur im Gewächshaus betrug im Licht  $20^\circ \text{C}$  und  $18^\circ \text{C}$  im Dunkeln. Die Luftfeuchtigkeit betrug 80 % im Licht und 50 % im Dunkeln.

### **2.2.2. Gurke und Kürbis**

Die Phloemsaftpräparationen stammen ebenfalls aus dem Max Planck Institut für Pflanzenphysiologie in Golm und wurden von Frau Dr. Julia Kehr und Frau Dr. Christina Walz präpariert und zur Verfügung gestellt. Nähere Informationen kann man bei Walz et al. finden <sup>147,148</sup>.

### **2.2.3. Präparation von 80S Ribosomen aus *Arabidopsis thaliana*-Blättern**

Zum Zweck der Präparation der cytosolischen 80S Ribosomen aus *Arabidopsis thaliana*-Blättern wird ein modifiziertes Protokoll nach Kamp et al. <sup>149</sup> verwendet.

Hierbei werden 500 g Blattmaterial mit einem Küchenmixer homogenisiert. Hierzu werden 5 Portionen à 100 g in jeweils 300 ml Homogenisierungspuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 0,7 M Sorbitol und 10 mM DTT), mit 3 Zerkleinerungsschüben à 5–10 Sekunden homogenisiert. Dieses Homogenat wird dann durch 4 Lagen Mullverbandsbinden filtriert. Das resultierende Filtrat wird anschließend durch eine Lage Miracloth gefiltert. Dieses abschließende Filtrat wird dann 15 Minuten bei 1200 g zentrifugiert, um Organellen von Proteinkomplexen zu trennen. Das organellenhaltige Sediment kann für die Präparation von Mitochondrien, Chloroplasten oder auch Zellkernen weiterverwendet werden, während der Überstand, unter anderem die cytosolischen 80S Ribosomen enthält. Dieser Überstand wird erneut für 20 Stunden bei 45000 g zentrifugiert, um die Ribosomen zu sedimentieren und somit von kleineren Komplexen und freien cytosolischen Proteinen zu trennen. Das resultierende Sediment wird in einem nächsten Schritt in einem möglichst kleinen Volumen Puffer B (50 mM Tris-Hcl pH 7,8, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M Saccharose, 10 mM DTT und 10 mM KCO<sub>3</sub>) aufgenommen. Diese Lösung ergibt in der vorliegenden Form die erste ribosomale 80S Fraktion (E1). Aus dieser Fraktion wird ein Aliquot auf einem 0 %–30 % Saccharosegradienten in Puffer B aufgereinigt. Dies erfolgt bei einer 16stündigen Zentrifugation mit 26000 g.

Die ribosomale Fraktion, die man anhand von UV-Spektren der Wellenlänge 260 nm und 280 nm ermittelt, wird aus dem Gradienten eluiert. Diese Fraktion ergibt die im Abschnitt verwendete zweite ribosomale 80S Fraktion. Die Proteinextraktion aus 100 µl dieses Eluats erfolgt mittels einer 10minütigen Inkubation in 500 µl 200 mM Ammonimacetat bei 37° C. Nach dieser Inkubation werden 30 µl 2 M ungepuffertes Tris zugegeben. Diese Lösung inkubiert für 20 Minuten bei 60° C. Nach Zugabe von 50 µl 1,4 M Magnesiumacetat wird diese Lösung für mindestens 2 Stunden bei 4° C geschüttelt, bevor sie für 40 Minuten bei 4° C und 10000 g zentrifugiert wird.

Der proteinhaltige Überstand wird durch eine Zugabe des 5fachen Volumens an Aceton für mindestens 5 Stunden bei -20° C präzipitiert und mittels einer 45minütigen Zentrifugation mit 13000 g bei 4° C sedimentiert. Das resultierende Proteinsediment wird abschließend in 9 M Harnstoff, 10 mM DTT und 2 % CHAPS aufgenommen und ist nach Zugabe von 10 % Servalyte<sup>®</sup> 2–4 direkt für die 2-DE-Trennung einsetzbar.

### **2.3. Proteinextraktion**

Bei den für die vorliegende Arbeit angewendeten Proteinextraktionsmethoden handelt es sich zum einen um die im Rahmen dieses Forschungsprojekts speziell für die 2-DE-

Proteinextraktion entwickelte fraktionierte Extraktionsmethode <sup>150</sup>. Zum anderen wird – als Referenz dienend – die klassische, von zahlreichen Arbeitsgruppen für 2-DE eingesetzte Trichloressigsäure/Aceton-Proteinextraktionsmethode angewandt <sup>151</sup>.

Das Prinzip der fraktionierten, sequentiellen Proteinextraktionsmethode, die auf jegliche Fällung von Proteinen verzichtet, beruht darauf, unterschiedliche Proteinextrakte eines Organs oder Gewebes durch den Einsatz verschiedener Extraktionspuffer in Verbindung mit Ultrazentrifugationsschritten zu erzeugen (Abb. 1). Für eine detaillierte Beschreibung der für die Proteinextraktion verwendeten Werkzeuge und Materialien siehe Klose <sup>152</sup>.

Im Gegensatz dazu erfolgt die Proteinextraktion bei der TCA-Methode durch eine Fällung sämtlicher Proteine mit trichloressigsäurem Aceton. Nach diesem Schritt folgt eine Resolubilisierung der ausgefällten Proteine durch einen Puffer-Cocktail, der gleichzeitig als 2-DE-Laufpuffer dient (Abb. 2).

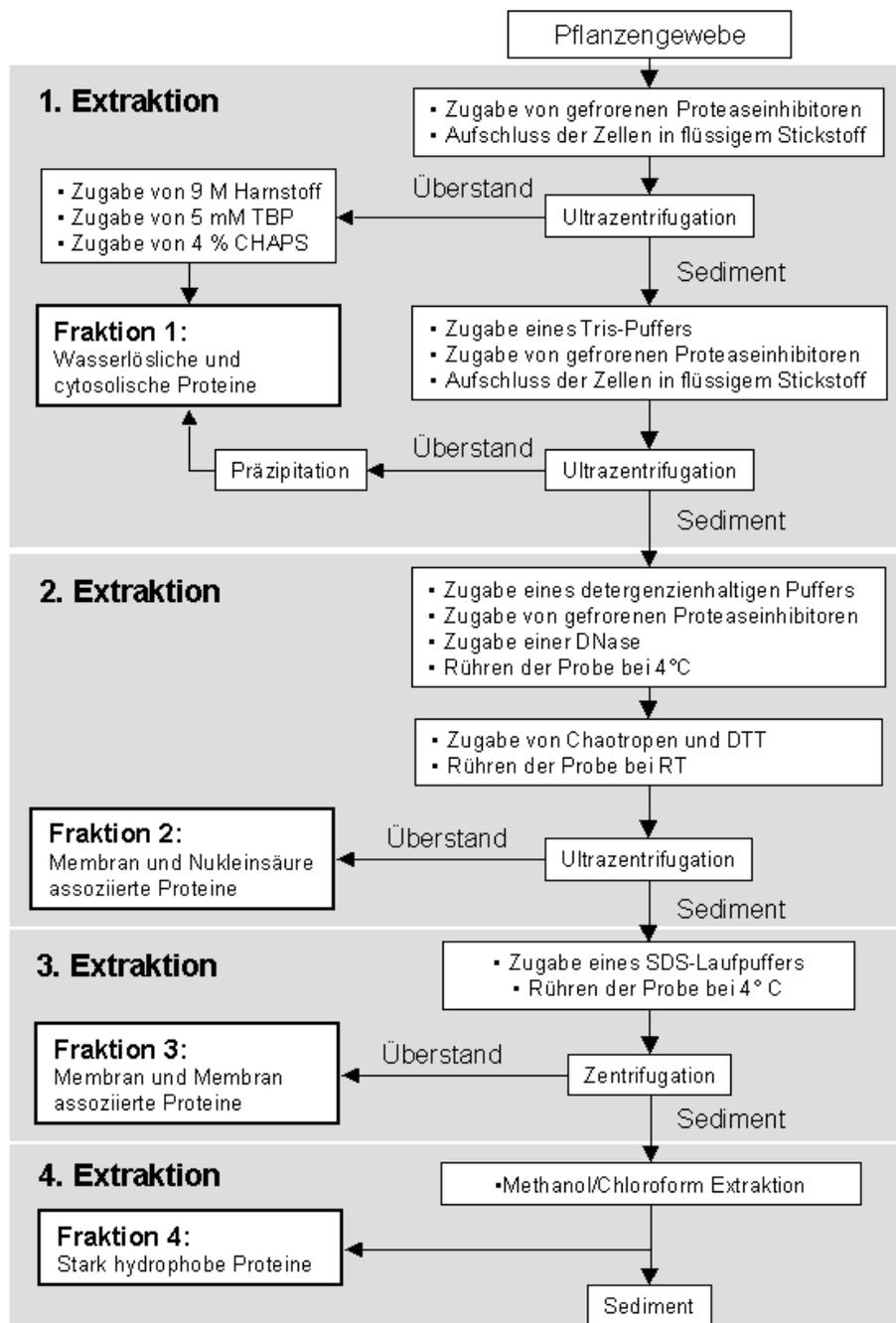
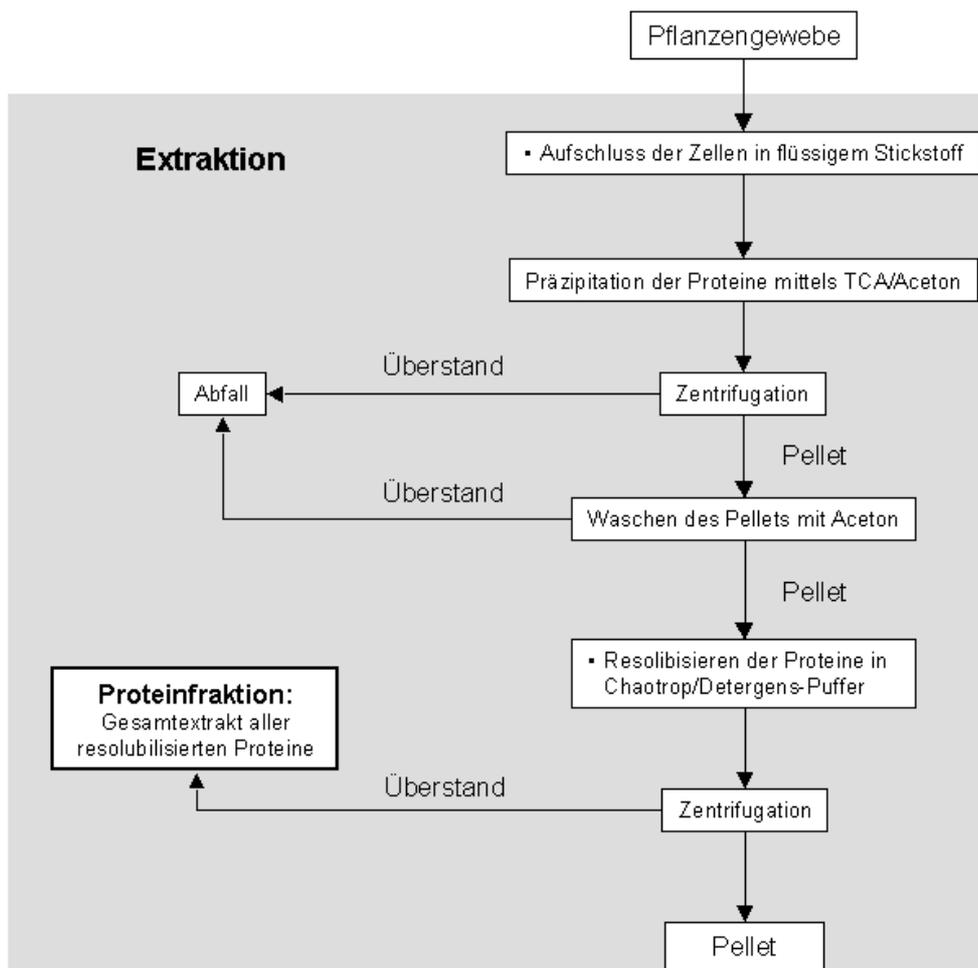


Abbildung 1: Flussdiagramm der fraktionierten Proteinextraktion.



**Abbildung 2:** Flussdiagramm der präzipitationsbasierten Proteinextraktion.

## 2.3.1. Fraktionierte Proteinextraktion

### 2.3.1.1. Fraktion 1

Für die fraktionierte Proteinextraktion können Materialmengen von ca. 25–350 mg eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird standardmäßig eine Menge von ca. 300 mg verwendet. Das Material wird hierzu in unter flüssigem Stickstoff gekühlten Quarzglasmörsern in Gegenwart von 0,08 Gewichtsanteilen (Gewicht Lösung pro Gewicht Pflanzenmaterial w/w, wobei für die Lösungen von einer idealisierten Dichte von 1 g/ml ausgegangen wird) des Proteaseinhibitor-Cocktails 1 (1 Complete™ Tablette, gelöst in 2 ml 100 mM KCl, 20 % (w/v) Glycerin und 50 mM Tris, der pH wurde auf 7,1 eingestellt) und 0,04 Gewichtsanteilen des Proteaseinhibitor-Cocktails 3 (1 mM Pepstatin A und 1,4 µM Phenylmethylsulfonylfluorid gelöst in Ethanol), mittels eines Kunststoffpistills zu einem feinen Pulver zerkleinert. Dieses Pulver wird dann in ein 13,5 ml Ultra plus™ Zentrifugenröhrchen gefüllt, wo es langsam im Eisbad auftaut. Sodann wird die Probe bei 50000 rpm (226240 g) in einer Centricon-Ultrazentrifuge in einem Beckman TI 50 Rotor für

30 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand der Probe wird nach der Zentrifugation abgenommen und in einem 1,5 ml Schraubdeckel Eppendorfgefäß überführt. Nachdem das Volumen des Überstandes bestimmt wurde, werden 9 M Harnstoff, 5 mM TBP und 4 % CHAPS zugegeben und gelöst. Dieser Extrakt wird bis zu seiner weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren

Die sedimentierte Probe aus der ersten Ultrazentrifugation wird nun ausgewogen und erneut unter flüssigem Stickstoff eingefroren. Dann wird sie Gegenwart von 1 Gewichtsanteil Puffer 1 (100 mM KCl, 20 % (w/v) Glyzerin und 50 mM Tris, der pH wurde auf 7,1 eingestellt), 0,125 Gewichtsanteilen des Proteaseinhibitor-Cocktails 1 und 0,05 Gewichtsanteilen des Proteaseinhibitor-Cocktails 3 zermörsert. Das Puder wird wieder in das Zentrifugenröhrchen gefüllt und nochmals für 30 Minuten bei 226240 g zentrifugiert. Der hieraus gewonnene Überstand wird in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gefüllt und mit dem 5fachen Volumen an eiskaltem Aceton/Methanol (12:1) präzipitiert.

Das Präzipitat wird, nachdem das Eppendorfgefäß für mindestens 30 Minuten bei -20° C gestanden hat, für 10 Minuten bei 15000 rpm in einer Eppendorfsentrifuge sedimentiert. Der hieraus resultierende Überstand kann entsorgt werden, während das sedimentierte Proteinpräzipitat in dem erneut aufgetauten ersten Überstand resolubilisiert wird.

Dieser angereicherte Überstand, der die Fraktion 1 ausmacht, kann nun in Aliquots à 50 µl abgefüllt und mit je 5 µl des Ampholinmix Servalyte® 2–4 versehen werden. Die erste Fraktion ist somit bereit für eine 2-DE-Trennung. Falls die Probe nicht unmittelbar analysiert werden soll, kann sie in diesem Zustand bei -80° C gelagert werden.

### **2.3.1.2. Fraktion 2**

Das Sediment der zweiten Ultrazentrifugation von Fraktion 1 wird nun erneut ausgewogen und mit einem Gewichtsanteil des eiskalten Probenpuffers 2 (100 mM Phosphatpuffer [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in Verhältnis 1 zu 2] pH auf 7,1 eingestellt, 200 mM KCl, 20 % (w/v) Glyzerin, 2 mM MgSO<sub>4</sub> und 4 % (w/v) 3-[(3-Chloramidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonat und 0,08 Gewichtsanteilen des Proteaseinhibitor-Cocktails 3) im gekühlten Zentrifugenröhrchen mittels eines Rührstäbchens zu einer homogenen Suspension verrührt. Statt des CHAPS kann auch 2 % (w/v) Amidosulfobetaine 14 verwendet werden. Dieser Suspension werden noch 0,025 Gewichtsanteile einer DNase (Benzonase) zugegeben, wonach diese Suspension mit einem kleinen Rührfisch für 45 Minuten bei 4° C gerührt wird. Anschließend werden 0,23 Gewichtsanteile einer 700 mM DTT-Lösung sowie 7 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff zugegeben. Die Suspension wird für weitere 60 Minuten bei

Raumtemperatur gerührt. Wenn sich nach ca. 60 Minuten der Harnstoff gänzlich gelöst hat, wird der Rührfisch entfernt und die Probe für 30 Minuten bei 226240 g, 18° C für 30 Minuten zentrifugiert.

Der hieraus resultierende Überstand ergibt die Fraktion 2. Auch dieser Überstand kann in 50 µl Aliquots präpariert werden, wobei jedem Aliquot 5µl Ampholinmix Servalyte® 2–4 beigelegt werden. Falls die Probe nicht unmittelbar analysiert werden soll, kann sie in diesem Zustand bei -80° C gelagert werden.

### **2.3.1.3. Fraktion 3**

Das Sediment der Ultrazentrifugation von Fraktion 2 wird nun erneut ausgewogen und mit einem Gewichtsanteil eines SDS-Laufpuffers (62,5 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS und einer Spur Bromphenolblau) im gekühlten Zentrifugenröhrchen mittels eines Rührstäbchens zu einer feinen Suspension verrührt. Diese Suspension wird für weitere 15 Minuten mit einem kleinen Rührfisch 4° C gerührt. Anschließend wird der Rührfisch entfernt und die Probe für 10 Minuten mit 20000 g bei 4° C zentrifugiert.

Der hieraus resultierende Überstand ergibt die Fraktion 3. Auch dieser Überstand kann in 50µl Aliquots präpariert werden, wobei bei diese Proben die Trennung der Proteine ausschließlich auf SDS-PAGE-Gelen erfolgt. Falls die Proben nicht unmittelbar analysiert werden soll, kann sie in diesem Zustand bei -80° C gelagert werden.

### **2.3.1.4. Fraktion 4**

Das Sediment aus der Ultrazentrifugation von Fraktion 3 kann zum Abschluss einer Methanol/Chloroform-Extraktion unterzogen werden. Diese Extraktion ist angelehnt an die Methanol/Chloroform-Extraktion, wie sie bei Hippler et al. auf Membrankomplexen von Chloroplasten durchgeführt wurde<sup>153</sup>.

Hierbei wird das Sediment in dem vierfachen Volumen (v/w) an Methanol suspendiert und diese Suspension wird, je nach Volumen, in Portionen à 500 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Das Eppendorfgefäß wird dann noch einmal gevortext und anschließend werden die festen Bestandteile für 20 Sekunden bei 9000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert. Es werden pro Eppendorfgefäß 200 µl wassergesättigtes Chloroform zugegeben und die Probe wird für 10 Sekunden gevortext. Anschließend werden 700 µl Millipore-Wasser zugegeben und die Probe wird erneut für 10 Sekunden gevortext, bevor sie für 1 Minute bei 9000 g zentrifugiert wird. Die Proteine präzipitieren und sammeln sich in der Interphase, sodass man den Überstand

vorsichtig abnehmen und verwerfen kann. Auf die untere Phase und das Präzipitat werden dann 300 µl Methanol gegeben und diese Lösung wird ausgiebig gevortext, bevor sie für 2 Minuten bei 12000 g zentrifugiert wird. Der Überstand wird erneut abgenommen und das sedimentierte Proteinpräzipitat zweimal mit 95 % (v/v) Methanol gewaschen. Zum Abschluss lässt man das Proteinpräzipitat 10 Minuten bei Raumtemperatur abdampfen und nimmt es in einem möglichst kleinem Volumen Resolubilierungspuffer (5 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 5 mM TBP, 2 % Servalyte® 2–4) oder aber SDS-Laufpuffer auf.

### **2.3.2. TCA/Aceton-präzipitationsbasierte Proteinextraktion**

Auch bei dieser Proteinextraktion starten wir mit einer Ausgangsmenge von ca. 300 mg Pflanzenmaterial. Das Pflanzenmaterial wird ebenfalls in einem unter flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser pulverisiert. Dieses Pulver wird unmittelbar in einem Volumen von ca. 800 µl einer 10 % (w/v) TCA-Lösung in 0,07 % (w/v) DTT-haltigem Aceton aufgenommen und gut verrührt. Die Probe wird dann für 60 Minuten bei -20° C gelagert, um die vorhandenen Proteine präzipitieren zu lassen. Das proteinhaltige Sediment wird in einem 15minütigen Zentrifugationsschritt bei 35000 g und 4° C gewonnen. Dieses Sediment wird mit einer 0,07 (w/v) % DTT-haltigen Aceton-Lösung gewaschen und erneut bei -20°C gelagert. Die Probe wird noch einmal für 10 Minuten bei 35000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wird entsorgt und das Sediment unter Vakuum für ca. 15 Minuten getrocknet. In einem letzten Schritt wird nun das Sediment ausgewogen und in einem UKS genannten Puffer (9,5 M Harnstoff, 5 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland), 1,25 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) DTT und 6 % (v/v) Triton X-100) aufgelöst. Der UKS-Puffer wird in einer Menge von 40 µl/mg Sediment zugegeben. Die entstandene Suspension wird ein wenig mit einem Rührstäbchen gerührt und abschließend für 5 Minuten bei 14000 g und 18° C zentrifugiert. Der Überstand kann in 50 µl Aliquots präpariert werden, wobei jedem Aliquot 5µl Ampholinmix Servalyte® 2–4 beigefügt werden. Falls die Probe nicht unmittelbar analysiert werden soll, lässt sie sich in diesem Zustand bei -80° C lagern.

### **2.4. Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt mittels des BCA-Protein-Assays genau nach den Angaben des Herstellers.

## 2.5. Elektrophorese

### 2.5.1. Isoelektrische Fokussierung mit Carrier Ampholyten

Die isoelektrische Fokussierung wird in 4 verschiedenen Formaten durchgeführt. Es gibt zum einen Gele der Länge 20 cm und Gele der Länge 40 cm. Beide Gellängen existieren wiederum jeweils mit einem Durchmesser von 0,9 mm bzw. 1,5 mm. Die zum Gießen dieser Gele verwendete Lösung besteht aus 3,5 % (w/v) Acrylamid, 0,3 % (w/v) Bis., 9 M Harnstoff und 2 % (v/v) einer Ampholinmischung. Letztere setzt sich zusammen aus einem Anteil Pharmalyte-Ampholinen pH 3.5–10.0 (Pharmacia, Uppsala, Schweden), einem Anteil Servalyt® pH 2.0–11.0, 3 Anteilen Pharmalyte pH 4.0–6.5, 2 Anteilen Pharmalyte pH 5.0–8.0 und einem Anteil Pharmalyte pH 6.5–9.0. Genaue Angaben zur Herstellung der Lösung finden sich bei Klose <sup>154</sup>. Die Zusammensetzung der Elektrophoresepuffer, die für die Fokussierung verwendet werden, lautet wie folgt: Anodenpuffer (4,25 % (v/v) Phosphorsäure, 2 M Harnstoff), Kathodenpuffer (5 % (v/v) Ehyldiamin, 9 M Harnstoff, 5 % (w/v) Glycerin). Alle Lösungen für die isoelektrische Fokussierung werden mit Millipore-Wasser mit einem elektrischen Widerstand von 18,2 mΩ hergestellt. Die dünnen 0,9 mm-Gele können mit einem maximalen Volumen von 12 µl Probelösung beladen werden, während die dicken 1,5 mm-Gele ein maximales Volumen von 60 µl Probelösung besitzen.

Die verschiedenen elektrischen Spannungen, die während einer isoelektrischen Fokussierung angelegt werden, sind in einem programmierbaren Spannungsgerät eingespeichert und betragen für 20 cm-IEF-Gele: 100 V 1 Stunde, 200 V 1 Stunde, 400 V 17,5 Stunden, 650 V 1 Stunde, 1000 V 30 Minuten, 1500 V 10 Minuten, 2000 V 5 Minuten. Für 40 cm-IEF-Gele betragen sie: 100 V 1 Stunde, 300 V 1 Stunde, 1000 V 22,5 Stunden, 1500 V 30 Minuten, 2000V 10 Minuten.

Nach Beendigung der Fokussierung werden die Gele mittels eines 0,8 mm- bzw. 1,4 mm-dicken Angelfadens aus der Glaskapillare in eine Equilibrierungslösung (125 mM Tris HCl pH auf 6,8 eingestellt, 40 % (w/v) Glycerin, 65 mM DTT und 3 % (w/v) SDS) ausgestoßen, aus der sie unmittelbar auf Plastikträger transferiert werden. Der Transfer der Gele erfolgt mittels Glaspipetten. 20 cm-Gele werden in einem Stück aus der Glaskapillare ausgestoßen, während 40 cm-Gele in 2 gleich große Stücke halbiert werden. Auf den Plastikträgern lassen sich die Gele dann längere Zeit bei -80° C lagern, alternativ kann man von diesen Plastikträgern unmittelbar die SDS-PAGE-Gele beladen. Detaillierte Beschreibungen der Werkzeuge und Techniken können bei Klose nachgelesen werden <sup>154</sup>.

### **2.5.2. Isoelektrische Fokussierung mit Immobilen**

Die zweite Methode zur isoelektrischen Fokussierung, die im Rahmen dieser Arbeit Anwendung findet, basiert auf der Verwendung von kommerziellen Polyacrylamidgelen, in die durch die Verwendung unterschiedlich derivatisierter Acrylamidspezies ein immobilisierter pH-Gradient (IPG) eingegossen wird. Die Methode basiert auf der Arbeit von Bjellqvist et al. von 1982<sup>155</sup> und zählt heute zu der häufigsten verwendeten IEF-Methode.

Für die isoelektrische Fokussierung mittels der IPGs werden 18 cm-Gele mit einem linearen pH-Bereich von pH 3–10 bzw. 4–7 mit ca. 160 µg Proteinprobe in 340 µl Beladungspuffer (8 M Harnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 0,8 % (v/v) Pharmalyte 3–10, 20 mM DTT) gemischt und zum Rehydrieren der dehydriert gelieferten IPG-Gele verwendet. Die Rehydratation erfolgt in speziellen Keramikelektroden, unter Verwendung des IPGphor Spannungsgerätes bei einer leichten Spannung von sowohl 30 V als auch 60 V für jeweils 6 Stunden. Anschließend wird ein Fokussierprogramm mit 500 V für 1 Stunde, 1000 V für eine weitere Stunde, einem 30minütigen Gradienten auf 8000 V und zum Abschluss 8000 V für 3,5 Stunden durchgeführt.

Nach Abschluss der Fokussierung werden die Gele in Plastikröhrchen zweimal mit je 10 ml Equilibrierungspuffer (6 M Harnstoff, 30 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,8) für 10 Minuten inkubiert. Bei der ersten Inkubation werden dem Equilibrierungspuffer 100 mg DTT zugesetzt, während bei der zweiten Inkubation 400 mg Iodacetamid zugesetzt werden. Nach diesen beiden Schritten sind die Gele für die weitere Trennung auf den SDS-PAGE-Gelen bereit und können sofort verwendet oder aber für längere Zeit bei -80° C gelagert werden.

### **2.5.3. SDS-PAGE**

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird in 23,2 cm x 30 cm x 0,75 mm bzw. x 1,5 mm Acrylamidgelen durchgeführt. Die Acrylamid-Konzentration beträgt 15 % (w/v), während die N,N'-Methylenbisacrylamid-Konzentration 0,2 % (w/v) beträgt. Die Gel-Lösung wird mit dem Standard-Laemmli-Puffer<sup>40</sup> gepuffert. Ebenso wird der Standard-Laemmli-Elektrodenpuffer für die Elektrophorese verwendet<sup>40</sup>.

Die Elektrophorese findet bei 15° C statt; nach einer Einlaufphase bei 65 mA für 15 Minuten folgt eine Trennphase bei 85 mA für ca. 5–6 Stunden. Nach dem Lauf werden die Gele in den für die anschließende Färbung geeigneten Lösungen aufbewahrt. Nähere Beschreibungen der für die SDS-PAGE verwendeten Geräte finden sich bei Klose<sup>154</sup>.

## **2.6. Färbungen**

### **2.6.1. Silber-Färbung**

In dieser Arbeit werden 3 verschiedene Silber-Färbung angewendet. Zum einen wird eine sehr sensitive, Massenspektrometrie untaugliche, analytische Silber-Färbung eingesetzt. Sie basiert auf der Färbung von Heukeshoven<sup>50,51</sup> mit einigen Modifikationen nach Jungblut et al.<sup>156</sup>. Bei der zweiten eingesetzten Silber-Färbung handelt es sich um eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Modifikation der bereits erwähnten analytischen Silber-Färbung. Ziel der Modifikationen ist es, die analytische Silber-Färbung für die Massenspektrometrie tauglich werden zu lassen. Die dritte eingesetzte Silber-Färbung ist eine Massenspektrometrie taugliche Silber-Färbung nach einem Protokoll von Shevchenko et al.<sup>157</sup>.

#### **2.6.1.1. Analytische Silber-Färbung**

Die analytische Silber-Färbung beginnt mit dem Fixieren der Proteine direkt nach der SDS-PAGE. Hierzu werden die Gele für mindestens 2 Stunden in einer 10 % (v/v) Essigsäure in einer 50 % (v/v) Ethanollösung fixiert. Die Volumen der einzelnen Lösungen betragen jeweils 1 l/Gel, die einzelnen Schritte erfolgen in Kunststoffwannen auf horizontalen Schüttlern. Anschließend werden die Gele für 2 Stunden in einer Inkubationslösung (41 g/l Natriumacetat, 200 mg/l Natriumthiosulfat, 30 % (v/v) Ethanol, 20 ml/l Gluthardialdehyd) inkubiert. Im Anschluss daran werden die Gele zweimal in Millipore-Wasser gewaschen, bevor sie für 45 Minuten in einer 0,1 % (w/v) Silbernitratlösung mit 0,01 % (v/v) Formaldehyd inkubiert werden. Die eigentliche Entwicklung der Silbergele erfolgt nach einer einige Sekunden dauernden Millipore-Wasser-Spülung und einer 1minütigen 2,5 % (w/v) Natriumcarbonat-Spülung der Gele in der Entwicklungslösung (2,5 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,02 % (v/v) Formaldehyd, 200 mg/l Thimerosal). Die Entwicklung dauert ca. 3–15 Minuten, je nach pH-Wert der Entwickler-Lösung. Gestoppt wird die Entwicklung in einer Stopp-Lösung (18,5 g/l Titriplex).

#### **2.6.1.2. Massenspektrometrie kompatible Silber-Färbung**

Die Gele werden auch bei dieser Silber-Färbung in einer 10 % (v/v) essigsäurehaltigen 50 % (v/v) Ethanol-Lösung für mindestens 1 Stunde fixiert. Ein entscheidender Unterschied zur analytischen Färbemethode ist der Verzicht auf den Sensibilisierungs-Schritt mit der Gluthardialdehyd-Lösung. Gluthardialdehyd als Dialdehyd kann Proteine im Gel über seine Aldehydgruppen miteinander vernetzen, was zum einen das Extrahieren der Peptide aus dem

Gel erschwert und zum anderen die Bestimmung und Zuordnung der Peptidmassen im Massenspektrometer nahezu unmöglich macht. Das Auslassen dieses Sensibilisierungsschritts hat zur Folge, dass die anschließenden Waschschriffe nicht in dem Umfang wie bei der analytischen Silber-Färbung durchgeführt werden können. Daher wird nach dem Fixieren der Proteine ein 15minütiger Waschschriff in einer 30 % (v/v) Ethanol-Lösung durchgeführt. Der nächste Schriff besteht aus einer einminütigen Inkubation der Gele in einer 0,01 % (w/v) Natriumthiosulfat-Lösung gefolgt von 2 einminütigen Millipore-Wasser-Spülungen. Hiernach erfolgt eine Inkubation des Gels für 45 Minuten in einer 0,15 % (w/v) Silbernitrat-Lösung. Die Entwicklung verläuft dann nach demselben Schema wie die Entwicklung bei der analytischen Silber-Färbung.

### **2.6.1.3. Silber-Färbung nach Shevchenko <sup>157</sup>**

Die Fixierung erfolgt für 20 Minuten in 10 % (v/v) Essigsäure in 50 % (v/v) Methanol-Lösung, gefolgt von einem zehnminütigen Waschschriff in 50 % (v/v) Methanol. Anschließend werden die Gele für 1 Minute in 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat geschüttelt, um dann zweimal 1 Minute mit Millipore-Wasser gewaschen zu werden. Die Silberimprägnation erfolgt für 20 Minuten in einer 0,1 % (w/v) Silbernitrat-Lösung bei 4°C. Die Gele werden dann zweimal jeweils für 1 Minute mit Millipore-Wasser gewaschen, bevor sie in 0,2 % (w/v) Natriumcarbonat mit 0,04 % (v/v) Formaldehyd entwickelt werden. Färbt sich der Entwickler nach einigen Sekunden gelblich oder trübe, wird er durch eine frische Charge ersetzt. Die Entwicklung wird in einer 5 % (v/v) Essigsäure-Lösung gestoppt.

## **2.6.2. Coomassie-Färbungen**

Auch bei den Coomassie-Färbungen werden 2 verschiedene Färbungen angewand. Anders als bei der Silber-Färbung sind beide Färbungen Massenspektrometrie tauglich. Der entscheidende Unterschied beider Färbungen liegt in ihrer Sensitivität. Die konventionelle Methode <sup>158</sup> ist zwar wesentlich schneller aber auch bei weitem weniger sensitiv als die mit mehreren Färbetagen sehr zeitaufwendige kolloidale Coomassie-Färbung <sup>53,54</sup>.

### **2.6.2.1. Konventionelle Coomassie-R250-Färbung**

Bei dieser Färbung werden die Proteine für 2 Stunden in 10 % (v/v) Essigsäure in 50 % (v/v) Ethanol fixiert. Danach erfolgt der eigentlich Färbeschriff in einer 0,05 % (w/v) Coomassie-R250-haltigen 10 % (v/v) Essigsäure in 50 % (v/v) Ethanol. Die Färbung erfolgt über Nacht und wird durch eine mehrstündige Entfärbung in 5 % (v/v) Methanol mit 12,5 % (v/v)

Essigsäure beendet. Die Gele werden nach der Entfärbung für einige Zeit in Millipore-Wasser gewaschen.

#### **2.6.2.2. Kolloidale Coomassie-G250-Färbung**

Die Fixierung bei dieser Färbung nach Doherty et al.<sup>159</sup> erfolgt mittels 2 % (v/v) Phosphorsäure in 50 % (v/v) Methanol-Lösung für mindestens 2 Stunden oder aber über Nacht. Anschließend werden die Gele in der Färbe-Lösung, die 17 % Ammoniumsulfat und 2 % Phosphorsäure in 34 % (v/v) Methanol enthält, für 1 Stunde equilibriert. Nach dieser Stunde werden 0,66 g Coomassie G250 pro Liter Färbe-Lösung zugegeben. Die Färbung kann dann für bis zu 5 Tagen durchgeführt werden. In der Regel ist sie beendet, wenn die blaue Coomassie-Lösung wässrig-klar zu werden beginnt. Nach der Färbung werden die Gele in Millipore-Wasser für 1 Stunde gewaschen.

#### **2.6.3. Zink/Imidazol-Färbung**

Bei dieser Färbung, die nach Castellanos-Sera et al.<sup>160</sup> durchgeführt wird, entfällt das Fixieren der Gele gänzlich. Die Gele werden direkt nach dem SDS-PAGE-Abbruch für einige Sekunden in Millipore-Wasser geschüttelt, bevor sie für 15 Minuten in einer 0,2 M Imidazol, 0,1 % (w/v) SDS-Lösung inkubiert werden. Nach dieser Inkubation werden die Gele für ca. 1 Minute in einer 0,3 M Zinksulfatheptahydrat-Lösung gefärbt. Trübt sich der Hintergrund der Gelmatrix milchig, können die Gele in einem Millipore-Wasserbad gelagert werden. Für die Färbung der Gele nach dieser Methode eignen sich insbesondere dunkle oder farbige Wannen, da sie eine verstärkte Kontrastierung der klaren Spots gegen den milchig weißen Hintergrund ermöglichen.

Die Zink/Imidazol-Färbung gilt als besonders Massenspektrometrie tauglich, da sie als Negativfärbung, d.h. als Färbung, die den Hintergrund und nicht die Proteinspots färbt, nicht modifizierend ist<sup>161</sup>.

#### **2.6.4. Fluoreszenz-Färbungen**

Auch bei den Fluoreszenz-Färbungen werden im Rahmen dieser Arbeit 2 verschiedene Färbungsansätze durchgeführt. Zum einen wird eine kommerziell erhältliche Fluoreszenz-Färbung durchgeführt, die zum gegenwärtigen Zeitpunkt die größte Verbreitung bei 2-DE-Anwendungen findet. Es handelt sich hierbei um die Sypro<sup>®</sup>-Farbstoffe von Molecular Probes<sup>162-164</sup>. Alternativ dazu wird ein luminiszenter Rutheniumfarbstoff, basierend auf einer

Publikation von Rabilloud et al. <sup>165</sup> synthetisiert, der ähnliche Qualität wie der kommerzielle Sypro<sup>®</sup>-Ruby-Farbstoff aufweisen soll. Der große Vorteil des selbst-synthetisierten Farbstoffs ist sein relativ geringer Preis im Vergleich zu den sehr teuren kommerziellen Farbstoffen.

#### **2.6.4.1. Sypro<sup>®</sup>-Ruby-Färbung**

Bei dieser Färbung, die nach einem Protokoll von Malone et al. durchgeführt wird <sup>166</sup>, werden die Gele nach der SDS-PAGE für 1 Stunde in einer 30 % (v/v) Ethanol-, 10 % (v/v) Essigsäure-Lösung gewaschen. Anschließend wird dieser Puffer noch dreimal gewechselt und die Gele werden jeweils für eine weitere Stunde inkubiert. Die Gele werden dann in dem zehnfachen Volumen des Gels in der Sypro<sup>®</sup>-Ruby-Lösung für mindestens 3 Stunden im Dunklen – und ganz wichtig – in Polycarbon-Wannen gefärbt. Die Färbung kann auch über Nacht oder aber über mehrere Tage hinweg erfolgen, da sie eine Endpunkt-Färbung ist und dementsprechend kein „Überfärb-Effekt“ zeigt. Nach der Färbung werden die Gele für mindestens 30 Minuten in 30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure gewaschen. Die Detektion der Spots kann in einem Laserscanner mit der Anregungswellenlängen 450 nm, 473 nm, 488 nm oder aber 532 nm erfolgen. Zur Kontrolle, ob die Färbung funktioniert hat, bzw. zum Ausstechen von gefärbten Proteinspots lässt sich aber auch ein herkömmlicher UV-Transilluminator, wie er für Ethidiumbromid gefärbte DNA-Moleküle benutzt wird, verwenden.

#### **2.6.4.2. Ruthenium-Farbstoff-Synthese**

Das Protokoll der Farbstoff-Synthese folgt der Publikation von Rabilloud et al. <sup>165</sup>. Hierbei werden 0,2 g Kaliumpentachloroäquoruthenat ( $K_2Cl_5RuH_2O$ ) in 20 ml kochendem Wasser unter Rückflusskühlung gelöst. Es entsteht eine rot-braune Lösung.

Zu dieser Lösung werden 3 M Bathophenanthrolinedisulfat-Natriumsalz zugegeben und für weitere 20 Minuten unter Rückflusskühlung gekocht. Hierbei entsteht eine Farbveränderung zu einer grün-bräunlichen Lösung, die mitunter schäumt.

Parallel dazu werden 15 ml einer 500 mM Natriumascorbat-Lösung hergestellt, von der 5 ml in die kochende grün-bräunliche Lösung gegeben werden. Die Lösung zeigt wieder einen Farbumschlag und zwar diesmal hin zu einer orange-braunen Lösung.

Nach Abkühlen der Lösung wird der pH mit Natriumhydroxyd auf pH 7 eingestellt und das Volumen auf 26 ml aufgefüllt.

Die Lösung, die einer Molarität von ca. 20 mM hat, kann mehrere Monate im Kühlschrank in einem getönten, geschlossenen Gefäß gelagert werden.

#### **2.6.4.3. Ruthenium-Färbung**

Diese Färbung basiert auf einem im Rahmen dieser Arbeit veränderten Protokoll von Rabilloud et al. <sup>165</sup>. Hierbei werden die Proteine in einer 30 % (v/v) Ethanol-, 10 % (v/v) Essigsäure-Lösung über Nacht fixiert. Anschließend werden die Gele dreimal 20 Minuten in 20 % (v/v) Ethanol gewaschen, bevor sie für 3–6 Stunden in einer Färbelösung, die 100 nM des synthetisierten Farbstoffs in 20 % (v/v) Ethanol enthält (5 µl der Stamm-Lösung in 1l des Färbepuffers), gefärbt werden.

Zum Abschluss werden die Gele für mindestens 2 Stunden (je länger desto besser) in einer 30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure-Lösung inkubiert, bevor in einem Laserscanner mit der Anregungswellenlänge 488 nm oder 532 nm Aufnahmen der Proteinspots gemacht werden können. Dieser letzte Schritt, der im Originalprotokoll durch ein Waschen in Millipore-Wasser ersetzt wird, ist von entscheidender Wichtigkeit, da der Farbstoff ohne den Waschschrift im essigsauren Alkohol keine Fluoreszenz zeigt. Darüber hinaus ist es bei der Verwendung der Farbstoffstamm-Lösung wichtig, nicht zuviel dieser Lösung zu verwenden. Andernfalls tritt eine sehr starke Hintergrundfärbung auf, welche die Sensitivität stark beeinträchtigt. In diesem Fall stimmt das Prinzip „viel hilft viel“ nicht. Zur Kontrolle, ob die Färbung funktioniert hat, oder aber zum Ausstechen von gefärbten Proteinspots lässt sich auch ein herkömmlicher UV-Transilluminator mit einer Wellenlänge von 506 nm verwenden.

### **2.7. Bildauswertung**

Die Bildauswertung der 2-DE-Gele ist nach wie vor ein kritischer Punkt bei der Proteomanalyse. Nach dem Ausprobieren mehrerer verschiedener Programme, fiel die Wahl auf das Programm Z3 von Compugen (Tel Aviv, Israel). Dieses Programm, wie alle anderen verwendeten Programme auch, erfüllt 2 grundlegende Funktionen, die für Proteomprojekte von Bedeutung sind. Zum einen dient es der Proteinspoterkennung, inklusive Flächen- und Färbungsintensitäts-Berechnung (Quantifizierung des Spots). Zum anderen ist es in der Lage, sowohl verschiedene 2-DE-Gele gegeneinander zu vergleichen und somit differentielle, d. h. neu hinzukommende und verschwindende, als auch quantitativ variierende Spots zu erkennen. Beide Funktionen laufen bis zu einem gewissen Grad automatisiert ab, wobei man in den meisten Fällen auf ein manuelles Nacheditieren nicht verzichten kann. Das bei diesem

Programm verwendete Datenformat ist das Tif-Format. Zu diesem Zweck werden die Gele auf einem Umax Mirage DIN A3-Scanner mit einer Auflösung von 150 dpi in Graustufen gescannt.

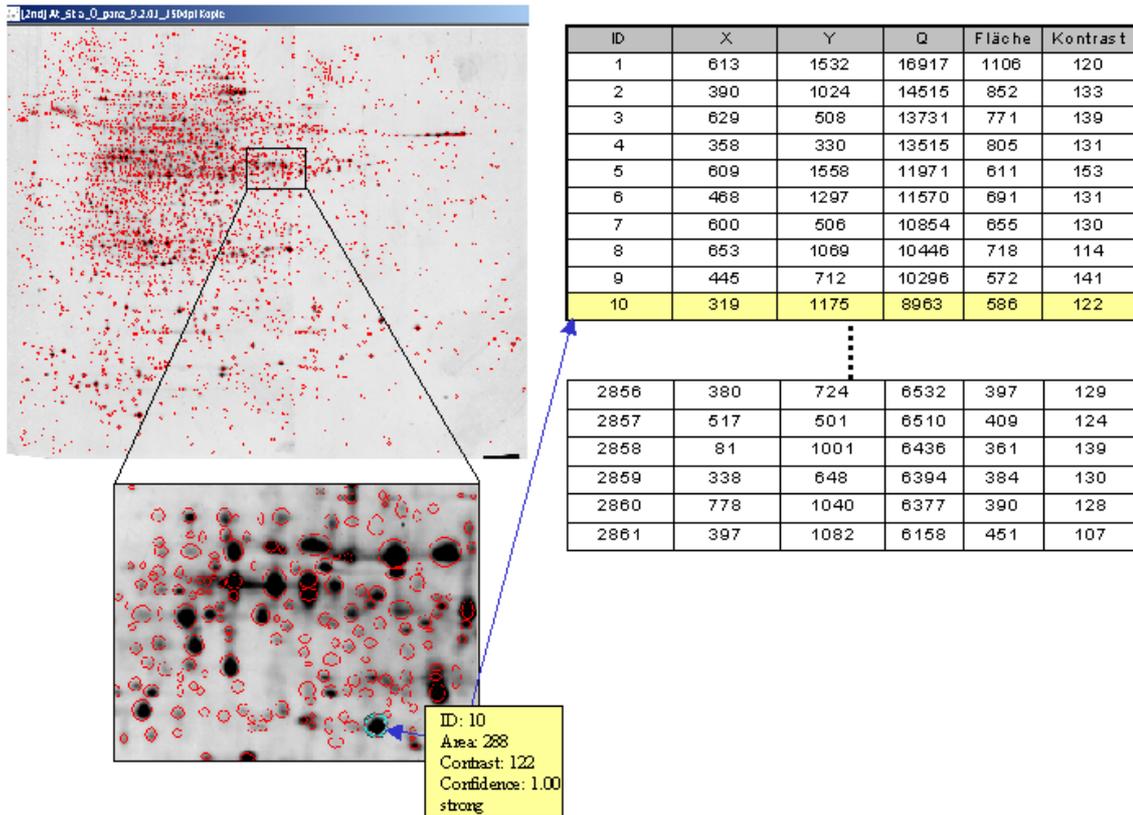
Weiterführende Informationen zur Funktionsweise des Programms und seines Detektionsalgorithmus findet man bei Smilansky <sup>167</sup>.

### **2.7.1. Spotdetektion**

Die Spotdetektion mit Z3 erfolgt im automatischen Modus unter Verwendung der automatischen Entfernfunktion von untypisch geformten oder untypisch gefärbten Spots. Darüber hinaus werden die Werte für die minimal notwendige Spotfläche des Spots mit 20 Pixel angegeben, der minimal notwendige Kontrast des Spots beträgt 9 und die Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit der Bestimmung eines Spots wird mit 98 % festgesetzt.

Ein manuelles Nacheditieren, d. h. Entfernen falsch erkannter Spot, bzw. Hinzufügen nicht erkannter Spots erfolgt unter Verwendung der Entfernen-, bzw. Hinzufügen-Werkzeuge aus dem Bearbeitungsmenu. Der Zeitaufwand für die akkurate Spoterkennung einer gut getrennten und Silber gefärbten 2-DE-Probe auf einem 20 cm-Gel kann trotz der verwendeten Software mit nach wie vor mindestens 3 Stunden veranschlagt werden und ist selbst dann nicht 100 % vollständig.

Die Ergebnisse der Spoterkennung können in einer Tabelle gespeichert werden und beinhalten Parameter wie Spotnummer (ID), X- und Y-Koordinaten des Spots auf dem Gel, einen quantitativen Wert für die Proteinmenge des Spots, die Spotfläche, den Spotkontrast und fakultativ den pI Wert, das Molekulargewicht und Kommentare zum Protein. Ein detektiertes und editiertes Gel und die korrespondierende Tabelle sind in Abb. 3 dargestellt.



**Abbildung 3:** Darstellung der Spotdetektion und deren tabellarischer Verwaltung.

### 2.7.2. Vergleich von 2-DE-Gelen

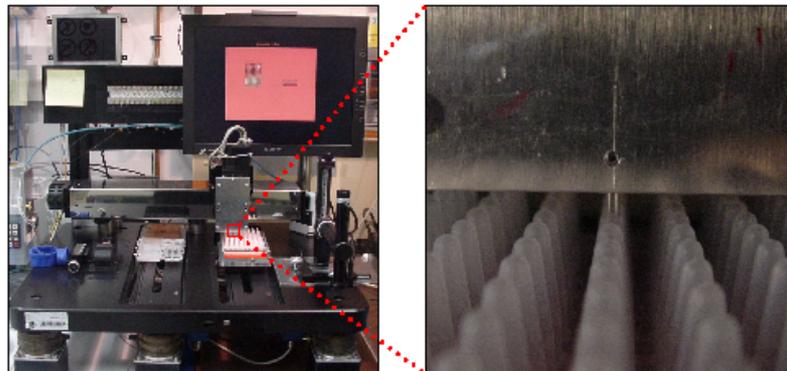
Der qualitative Vergleich verschiedener 2-DE-Gele ist mit dem hier verwendeten Programm Z3 relativ gut möglich. Das Prinzip der Visualisierung des Gelvergleichs beruht auf einer Pseudofalschfarbenüberlagerung. Hierbei werden die Proteinspots des einen Gels grün eingefärbt, während die Proteinspots des anderen Gels in Violett eingefärbt werden. Die Abbildungen dieser beiden gefärbten Bilder werden dann in einer neu generierten Abbildung übereinander gelagert, wobei die Gele bei der ersten Übereinanderlagerung nicht gleich zur Deckung gelangen. Im folgenden Schritt werden ca. 3–10 Referenzpunkte manuell ausgewählt: Einander entsprechende Proteinspots werden also durch Ziehen des violetten Proteinspots auf die Position des korrespondierenden grünen Proteinspots zur Deckung gebracht. Nachdem ein Minimum an Deckung der beiden 2-DE-Proteinspotmuster erreicht wurde, erfolgt ein automatisches Ausrichten der beiden Gele zueinander. Diese Ausrichtung ist, ebenso wie die in 2.7.1. beschriebene Proteinspoterkennung, nicht perfekt und erfordert in der Regel ein manuelles Nacheditieren.

Die Parameter, die bei dieser Art der Bildvergleiche angewendet werden, variieren von Experiment zu Experiment und werden je nach Qualität der Gele speziell angepasst.

Die Ergebnisse des Gelvergleichs können in einer Tabelle gespeichert werden und beinhalten Werte wie Spotnummer (ID), X- und Y-Koordinaten des Spots auf dem jeweiligen Gel, einen quantitativen Wert für die Proteinmenge des einzelnen Spots und einen Verhältniskoeffizienten der verglichenen Spots zueinander.

## **2.8. Präparation der Mikrotiterplatten für den tryptischen Verdau**

Die Böden der Reaktionsgefäße von 96er Mikrotiterplatten werden entweder manuell mittels Kanülen oder aber automatisiert mithilfe eines im Max Planck Institut für molekulare Genetik umgebauten Miniroboters zweimal durchlöchert (Abb. 4). Diese Präparation der MTPs ermöglicht im Folgenden den tryptischen Verdau der Proteine in den ausgestanzten Gelstücken mittels einer Durchflusszentrifugation in hochparalleler Weise.



**Abbildung 4:** Roboter für die Präparation der gelochten „Durchfluss“-MTPs für den In-Gel-Verdau.

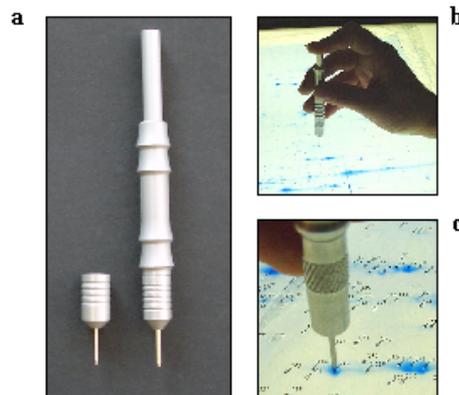
## **2.9. Ausstanzen von Proteinspots**

Das Ausstanzen der gefärbten Proteinspots erfolgt auf 2 verschiedene Arten. Bei der ersten Methode werden die Proteinspots, sofern es sich um eine geringe Anzahl handelt, manuell mittels eines Ausstanzwerkzeugs (vgl. 2.9.1) ausgestanzt. Handelt es sich hingegen um eine größere Anzahl von Proteinspots, so werden diese mittels eines umgebauten Dispensierroboters ausgestanzt (vgl. 2.9.2).

### **2.9.1. Manuelles Ausstanzen von Proteinspots**

Das manuelle Ausstanzen der Proteinspots aus 2-DE-Gelen erfolgt mit einem Spotausstanzer, der in etwa das Format eines Kugelschreibers besitzt und auf der Basis einer Eppendorfpipette arbeitet (Abb. 5a). Bei dem Gelstanzer können durch das Heben und Senken des Pumpenkolbens Luft oder aber Flüssigkeiten durch die zylindrische Ausstanzspitze

eingesogen bzw. ausgestoßen werden. Das Werkzeug besitzt 2 verschiedene Ausstanzspitzen mit einem Innendurchmesser von 1 mm bzw. 2 mm (Abb. 5a). Diese Spitzen können je nach Größe des Proteinspots variabel eingesetzt werden.

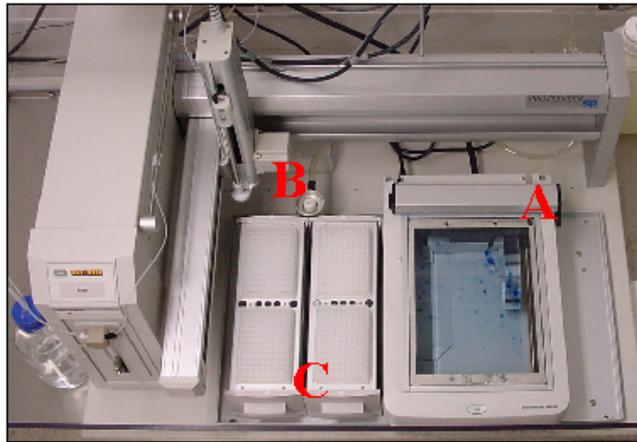


**Abbildung 5:** Manueller Spotausstanzer. (a) Gesamtansicht, (b) und (c) Ansicht beim Ausstanzen eines Proteinspots.

Zum Ausstanzen der Proteinspots wird das Gel auf einem Plexiglasträger unter Wasser gelagert (Abb. 5b, c), sodass beim Ansaugen der Gelstücke zuerst ein wenig Flüssigkeit, sodann das Gelstück und schließlich erneut ein wenig Flüssigkeit angesaugt wird. Die ausgestanzten Gelstücke werden dann in die zweifach gelochten MTPs (vgl. 2.8.) gegeben.

### 2.9.2. Automatisiertes Ausstanzen von Proteinspots

Das automatisierte Ausstanzen der Proteinspots aus dem 2-DE-Gel erfolgt im Prinzip ähnlich wie die manuelle Prozedur. Bei dem hierfür eingesetzten Roboter handelt es sich um einen Gilson Pipetierroboter, der von der Firma Bruker Daltonik so umgebaut wurde, dass er anstelle des ursprünglichen Pipetierkopfes eine Ausstanzspitze besitzt. Mittels einer 50 µl Hammiltonspritze wird Flüssigkeit bzw. Luft über die Ausstanzspitze, die einen Innendurchmesser von 2,0 mm besitzt, angesaugt bzw. ausgestoßen.



**Abbildung 6:** Übersicht des automatischen Spotausstanzers. Der Scanner ist mit A gekennzeichnet. Der Ausstanzkopf ist mit B und die MTP-Auflage mit C gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 6 ersichtlich, wird das 2-DE-Gel, das vor Beginn des automatisierten Ausstanzens für mindestens 1,5 Stunden in Wasser gequollen wird, auf einen umgebauten A4-Flachbettscanner gelegt. Das 2-DE-Gel wird hierbei erneut unter Wasser gelagert und darüber hinaus mit einem Metallrahmen über mindestens 2 Seitenkanten fixiert. Das Quellen des Gels im Vorfeld des Scannens und das Lagern des mittels des Metallrahmen fixierten Gels auf dem Scanner unter Wasser soll eine Größenveränderung des Gels durch Austrocknung (Schrumpfen des Gels) oder aber fortgesetztes Quellen (Vergrößerung des Gels) vermeiden. Dies ist überaus wichtig, da sich mit jeder Größenveränderung des Gels auch die Positionen (Koordinaten) der Proteinspots verändern und der Ausstanzer im Folgenden fehlerhaft ausstanzen würde.

Mit dem Scanner wird dann ein digitalisiertes Bild (Tif-Format) des 2-DE-Gels aufgenommen, das aufgrund der kalibrierten Position des Scanners im Koordinatensystem des Roboters ebenfalls in das kalibrierte System eingeführt wird. Das bedeutet, dass man jetzt mittels eines Spoterkennungsprogramms die Koordinaten der einzelnen Proteinspots auf dem im Koordinatensystem des Roboters gescannten 2-DE-Gels bestimmen kann. Anhand dieser Koordinaten fährt der Ausstanzkopf des Ausstanzers jeweils die einzelnen Proteinspots an und stanzt sie ähnlich wie bereits für das manuelle Werkzeug beschrieben (vgl. 2.9.1) aus. Die ausgestanzten Gelstücke werden abschließend in den doppelt gelöcherten MTPs deponiert (vgl. 2.8).

Die Koordinaten, eine Spotnummer, eine MTP-Nummer und eine MTP-Position werden automatisch in einer Tabelle gesammelt, wodurch sich direkt eine Dokumentation des Ausstanzvorgangs samt aller Informationen zu Herkunft und Verbleib des Gelstücks anlegen lässt. Diese Dokumentation ist insofern wichtig, als sie ermöglicht, im Folgenden erfasste

Massenspektrometriedaten einer bestimmten MTP einem Satz bestimmter Proteinspots auf dem 2-DE-Gel zuzuordnen.

## **2.10. Herstellung und SDS-PAGE von Proteinstandards**

Für die systematische Evaluierung des tryptischen In-Gel-Verdau wird eine 10 µM Protein-Mischung aus 4 bekannten Proteinen hergestellt. Diese Mischung besteht aus Rinderserumalbumin (66 kDa), carbonischer Anhydrase (29 kDa), Myoglobin (17,8 kDa) und Lysozym (14,3 kDa). Zum Zweck des In-Gel-Verdau werden jeweils SDS-PAGE-Gele hergestellt, welche dieselbe Zusammensetzung wie die SDS-PAGE Gele der zweiten Dimension bei der 2-DE-Prozedur aufweisen. Die Gele werden mit 10 µl Protein-Lösung in 10 µl eines SDS-Laufpuffers (62,5 mM Tris-HCl, 2 % (w/v) SDS, 20 mM DTT und eine Spur Bromphenolblau) beladen, d.h. einer Menge von 6,7 µg Rinderserumalbumin, 2,9 µg carbonischer Anhydrase, 1,78 µg Myoglobin und 1,43 µg Lysozym pro Protein-Bande. Aus den jeweiligen Protein-Banden, die mit unterschiedlichen Färbungen visualisiert werden können, werden dann unter Verwendung des manuellen Spotausstanzers (vgl. 2.9.1) Gelstücke ausgeschnitten die sich für die experimentelle Evaluierung neuer In-Gel-Verdau-Protokolle verwenden lassen.

## **2.11. Tryptischer In-Gel-Proteinverdau**

Das Ziel der Prozedur des tryptischen In-Gel-Verdau ist zum einen, das Protein im Gelstück von störenden Chemikalien, die während der 2-DE und der Färbung gebunden haben und die nachfolgende Peptidmassen-Fingerabdruck-Analyse stören würden, durch verschiedene Waschschrte zu entfernen. Die zweite wichtige Aufgabe besteht darin, das intakte Protein, das mittels 2-DE getrennt wurde, in definierte Peptide zu zerschneiden und diese dann einer Peptidmassen-Fingerabdruck-Analyse zuzuführen. Das Zerschneiden der Proteine erfolgt unter Verwendung einer Protease, die N-terminal oder C-terminal von bestimmten Aminosäuren die Spaltung von Peptidbindungen von Proteinen durch eine Hydrolyse katalysiert. In den meisten Fällen wird hierzu die Protease Trypsin verwendet, welche die Peptidbindung C-terminal der Aminosäuren Lysin und Argenin trennt, insofern die folgende Aminosäure nicht Prolin ist. Beide Ziele lassen sich dadurch erreichen, dass die ausgestanzten Gelstücke mit verschiedenen Puffern und Lösungen gewaschen und inkubiert werden. Die Applikation und das Entfernen dieser Flüssigkeiten sollte möglichst in automatisierter bzw. hochparalleler Form durchgeführt werden. Dies macht es einerseits notwendig, Roboter zur

Verfügung zu haben, die in der Lage sind, Flüssigkeiten kontakt- und kontaminationsfrei zu applizieren. Andererseits ist es unerlässlich, die Flüssigkeiten wieder möglichst kontakt- und kontaminationsfrei zu entfernen. Für die Flüssigkeitsapplikation steht ein im Max Planck Institut für molekulare Genetik konzipierter und gebauter Mini-Dispensierer zur Verfügung. Dieser Mini-Dispensierer ist in der Lage, kleinste Volumina über 8 unterschiedliche Düsen mit regulierbarem Druck kontaktfrei in MTP verschiedenster Formate zu befüllen.

Für das Entfernen der Flüssigkeiten wurde ein MTP-Durchflusssystem in Sandwichbauweise entwickelt, das erlaubt, die Flüssigkeiten aus den einzelnen Reaktionsgefäßen durch einfache Zentrifugation zu entfernen. Der Aufbau dieses Sandwiches ermöglicht, dass man unter die doppelt gelöcherte MTP (vgl. 2.8) eine gelöcherte Trennplatte legt, die einen Abstand zwischen dem Boden der zweifach gelöcherten, Gelstück tragenden und der folgenden, die Flüssigkeit auffangenden MTP gewährleistet. Diese 3 Teile werden in eine stabilere MTP gestellt, die der Stabilisierung des Sandwiches für die Abzentrifugation der verschiedenen Flüssigkeiten dient. Abschließend wird ein Deckel auf die oberste durchlöchernde MTP gelegt, der vor Staub und anderen Kontaminationen schützt.

### **2.11.1. Protokoll des tryptischen In-Gel-Verdaus**

Das Protokoll für den tryptischen Verdau verschieden gefärbter Proteinspots stimmt im Grunde genommen für die unterschiedlich gefärbten 2-DE-Gelspots überein. Es unterscheidet sich lediglich in den ersten Schritten, d. h. im Entfernen der verschiedenen Farbstoffe aus dem Gelstück und in dem anschließenden Waschschrift des Gelstücks. Die folgenden Schritte, bei denen die Schwefelwasserstoffgruppen von Cysteinen reduziert und anschließend alkyliert werden, und der abschließende tryptische Verdau sind für alle unterschiedlich gefärbten Gelspots identisch.

Der Zentrifugationsschritt, der zum Entfernen der Flüssigkeit und Puffer durchgeführt wird, dauert 2 Minuten und wird mit 700 g durchgeführt. Er erfolgt, wenn auch nicht explizit in jedem Schritt erwähnt, jedes Mal, bevor eine neue Lösung auf das Gelstück appliziert wird.

#### **2.11.1.1. Entfärbung von Silber gefärbten Proteinspots**

Zum Entfärben der Silber gefärbten Gelspots wird das reduzierte (schwarz-braune) Silber der Gelspots mittels einer 5 % (v/v) Wasserstoffperoxyd-Lösung reoxydiert, wodurch der Gelspot wieder klar und durchsichtig wird.

Zu diesem Zweck werden 75 µl einer 5 % (v/v) Wasserstoffperoxyd-Lösung mit dem Minidispenser pro Gelstück appliziert. Die zehninütige Inkubation wird abgebrochen, sobald der letzte Gelspot keine bräunliche Farbe mehr zeigt. Der Abbruch der Inkubation erfolgt durch Abzentrifugation der Lösung. Anschließend wird das Gelstück zweimal mit je 75 µl HPLC Wasser gewaschen, bevor das Gelstück noch einmal in 75 µl 50 % (v/v) Ethanol, 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat für 15 Minuten gewaschen wird. Zum Abschluss wird das Gelstück in 75 µl 100 % (v/v) Ethanol für 10 Minuten dehydriert.

#### **2.11.1.2. Waschen von Silber gefärbten Proteinspots ohne Entfärbung**

Silber gefärbte Proteinspots, die vor dem tryptischen Verdau nicht entfärbt werden, werden zweimal für 20 Minuten in 75 µl 50 % (v/v) Ethanol, 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen. Zwischen den beiden Ethanol-Waschschritten werden die Gelspots einmal für 10 Minuten in 75 µl HPLC-Wasser gewaschen. Zum Abschluss werden die Gelstücke erneut für 10 Minuten in 75 µl 100 % (v/v) Ethanol dehydriert.

#### **2.11.1.3. Entfärbung von Coomassie gefärbten Proteinspots**

Coomassie gefärbte Proteinspots werden zweimal für 30 Minuten in 75 µl 50 % (v/v) Ethanol, 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat entfärbt, bevor sie für 10 Minuten in 75 µl 100 % (v/v) Ethanol dehydriert werden.

#### **2.11.1.4. Waschen von Zink/Imidazol und Fluoreszenz gefärbten Proteinspots**

Zink/Imidazol als Negativfärbung, muss ebenso wie die schwach modifizierten Fluoreszenz gefärbten Proteinspots in erster Linie gewaschen und nicht entfärbt werden. Zu diesem Zweck werden die Gelstücke jeweils für 10 Minuten in 75 µl 50 % (v/v) Ethanol, 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen. Sodann folgt ein 20minütiger Waschschritt in 75 µl HPLC-Wasser. Danach werden die Spots noch einmal für 10 Minuten in 75 µl 50 % (v/v) Ethanol, 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen, bevor sie in 75 µl 100 % (v/v) Ethanol für 10 Minuten dehydriert werden.

### **2.11.1.5. Reduktion der Disulfidbrücken**

Nachdem die Farbstoffe weitestgehend entfärbt und andere störende Reagenzien ausgewaschen wurden, erfolgen diejenigen Schritte, die für alle unterschiedlich gefärbten Gelspots übereinstimmen.

Die Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den verschiedenen Cysteinen wird durch eine Inkubation des dehydrierten Gelstücks in 10 µl eines 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers (pH 8) mit 10 mM DTT für 60 Minuten bei 37° C durchgeführt. Zu diesem Zweck werden die MTPs in eine Plastikbox gestellt, die mit feuchten Papiertüchern ausgelegt ist. Diese Feuchtkammer sorgt dafür, dass die Verdunstung von Puffer aus den MTPs vermindert wird. Nach 60 Minuten wird die DTT-Lösung abzentrifugiert und die Gelstücke werden erneut in 75 µl 100 % (v/v) Ethanol für 10 Minuten dehydriert.

### **2.11.1.6. Alkylierung der Cystein tragenden Peptide**

Die freien Schwefelwasserstoff-Gruppen der Cysteine werden im nächsten Schritt mittels 10 µl einer 50 mM Iodacetamid-Lösung, die mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat auf pH 8 gepuffert wird, durchgeführt. Das rehydrierte Gelstück wird in dieser Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Gelstücke in 75 µl einer 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat gepuffertem 50 % (v/v) Ethanol-Lösung für 10 Minuten gewaschen, bevor die Gelstücke mit 75 µl 100 % (v/v) Ethanol für 15 Minuten dehydriert werden. Das überschüssige Ethanol wird zweimal für 2 Minuten abzentrifugiert. Die MTPs werden abschließend zum Abdampfen des restlichen Ethanols für 10 Minuten mit geöffnetem Deckel in eine Vakuum-Zentrifuge gestellt.

### **2.11.1.7. Tryptischer Verdau der Proteine**

Bevor der Verdaupuffer aufdispensiert wird, werden die MTPs, die sich unter den Gelstück tragenden MTPs befinden, durch saubere MTPs ersetzt. Der eigentliche tryptische Verdau erfolgt in 8 µl eines 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers (pH 8), in dem 15 ng/µl Trypsin gelöst sind. Als Nächstes werden die MTPs mit den rehydrierten Gelstücken erneut in die Feuchtkammerbox gestellt und für mindestens 4 Stunden oder aber über Nacht bei 37° C inkubiert.

### **2.11.1.8. Extraktion der tryptischen Peptide**

Der tryptische Verdau wird durch Zugabe von 8 µl einer 0,5 % (v/v) Trifluoressigsäure-Lösung, die 2 mM des Detergens n-Octylglycopyranosid enthält, abgestoppt. Die Gelstücke inkubieren noch weitere 60 Minuten in der Stopp-Lösung und werden dann in die saubere MTP abzentrifugiert.

Diese Lösung beinhaltet jetzt die Peptide und kann sofort auf den MALDI-Probenteller präpariert oder aber bei -20°C gelagert werden.

## **2.12. Matrixpräparation für die MALDI-MS**

Die Wahl der Matrix und die dazu passende Probenpräparation bestimmen den Erfolg der anschließenden Analyse mittels MALDI-MS. MALDI-Matrices sind in der Regel, mit wenigen Ausnahmen, bei Raumtemperatur feste organische Säuren mit einem aromatischen Ringsystem. Zu den Aufgaben einer Matrix zählt einerseits, Analytmoleküle in ein wachsendes Matrixkristallgitter einzubetten. Zu diesem Zweck beträgt das quantitative Verhältnis von Matrix zu Analyt bei einer MALDI-Präparation ca. 1000 bis 10.000 zu 1. Der hohe molare Überschuss sorgt dafür, dass die einzelnen Analytmoleküle weitestgehend isoliert im Kristallgitter vorliegen.

Andererseits soll die Matrix ermöglichen, dass ein Großteil der Laserenergie des UV-Lasers (in der Regel ein Stickstoff Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm) absorbiert wird. Diese Energieaufnahme resultiert in einer explosionsartigen Expansion der festen Matrix und der darin eingebetteten Analytmoleküle in die Gasphase. Diese hochenergetische Expansion der Matrix wird als Grundlage für die folgende Ionisation der Analytmoleküle durch die Matrix gehalten<sup>77</sup>.

Im Folgenden werden einige der gängigen Präparationsmethoden aufgezählt, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

### **2.12.1. „Dried-droplet“-Präparationsmethoden für MALDI-Matrices**

Die ursprüngliche MALDI-Matrix-Präparation ist die 1988 von Hillenkamp und Karas als „getrockneter“ Tropfen („*dried-droplet*“) eingeführte Methode<sup>69</sup>. Hierbei wird die Peptid-Probe mit der Matrix-Lösung gemischt und auf dem Probenteller aufgetragen. Im Folgenden lässt man die Flüssigkeit vollständig verdampfen, sodass die Matrix zusammen mit den Peptidmolekülen auf dem Probenteller auskristallisiert. Die so gewonnenen Kristalle zeigen

leider häufig ein inhomogenes Erscheinungsbild, das die massenspektrometrische Analyse schwierig gestaltet.

### **2.12.2. Matrixpräparation auf dem *Anchor Chip*-Proben-teller**

Die zweite in der vorliegenden Arbeit zur Matrixpräparation verwendete Methode basiert auf der „*fast-evaporation*“-Methode von Vorm et al.<sup>168</sup>. Bei dieser Methode wird die Matrix in einem schnell verdampfenden Lösungsmittel (in der Regel Aceton) gelöst. Im Unterschied zur „*dried-droplet*“-Methode, wo Peptidprobe und Matrix in flüssiger Form gemischt werden, wird bei der „*fast-evaporation*“-Methode die Matrix zunächst auf den Proben-teller aufgetragen und auskristallisiert. Erst dann erfolgt die Probenapplikation auf die bereits feste, kristalline Matrix. Das Ergebnis dieser Präparationsmethode ist eine schnelle und darüber hinaus sehr homogene Kristallisation der Matrix. Ein weiterer Vorteil der „*fast-evaporation*“-Methode gegenüber der „*dried-droplet*“-Methode besteht darin, dass die applizierte Probe bei dieser Methode lediglich auf der Matrix-Oberfläche konzentriert aufgetragen wird. Man findet also den Hauptanteil der Peptide innerhalb einiger weniger nm an der Matrixoberfläche, während die Peptide bei der „*dried-droplet*“-Methode über den gesamten Matrixbereich verteilt sind. Dementsprechend erreicht man mit der „*fast-evaporation*“-Methode eine wesentlich höhere Nachweisempfindlichkeit, die bis in den attomolaren Bereich reicht<sup>168</sup>. Basierend auf diesem Prinzip wurde am Max Planck Institut für molekulare Genetik, in Kooperation mit der Firma Bruker Daltonik ein neuer Proben-teller entwickelt, der den Vorteil der sehr homogenen Matrixpräparation mit einer extrem hohen Ortsgenauigkeit der Proben tragenden Matrix verbindet<sup>169</sup>.

Dieser spezielle Proben-teller besteht aus einer Edelstahlplatte im MTP-Format, die mit einer hydrophoben Schicht versehen ist. In diese hydrophobe Oberfläche werden im 384er MTP-Raster Positionen der hydrophoben Oberfläche entfernt, sodass hydrophile Metallanker entstehen. Appliziert man eine Matrix-Lösung auf einen solchen Anker, verdunstet das Lösungsmittel nach und nach, wobei eine Konzentration der Lösung auf den 200, 400 oder 600 µm großen hydrophilen Anker stattfindet<sup>169</sup>.

Bei dieser Matrixpräparation werden 200 µl einer gesättigten α-Cyano-4-hydroxymethylsäure-Lösung in 90 % (v/v) Aceton und 10 % (v/v) einer 0,5 % (v/v) TFA-Lösung mittels eines Teflonstäbchens mit 2 kleinen Abstandhaltern auf dem Proben-teller verteilt. Diese Prozedur ermöglicht die schnelle und gleichmäßige Präparation von bis zu 384 Analyt-Proben<sup>170</sup>.

### **2.12.3. $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure**

Diese Matrix, die erstmals von Beavis <sup>171</sup> vorgestellt wurde, gehört heute zu den am häufigsten für Peptid-Massen-Fingerabdrücke eingesetzten MALDI-Matrices. Wie in Abschnitt 2.12.2. bereits beschrieben, wird die Dünnschicht mit einer gesättigten HCCA-Lösung in 90 % (v/v) Aceton 10 % (v/v) einer 0,5 % (v/v) TFA-Lösung hergestellt. Für die „dried-droplet“-Präparation wird eine 20 mg/ml HCCA-Lösung in 90 % (v/v) Aceton 10 % (v/v) einer 0,5 % (v/v) TFA-Lösung hergestellt.

Als Alternative zu der HCCA-Dünnschichtpräparation wurde im Rahmen dieser Arbeit eine HCCA-Matrix Präparation mit Nitrocellulose (NC) als Additiv verwendet. NC ist dafür bekannt, dass sie Kontaminationen in der Probe unterdrückt und somit „sauberere“ Massenspektren erzeugt <sup>172</sup>. Zu diesem Zweck wird eine 90 % (v/v) Aceton 10 % (v/v) einer 0,5 % (v/v) TFA-Lösung hergestellt, die 4 zu 1 mit einer 50 % (v/v) Aceton 50 % (v/v) Isopropanol-Lösung gemischt wird, in der 15 mg/ml NC gelöst werden. In dieser 4 zu 1 gemischten Lösung wird HCCA zur Sättigung im Ultraschallbad gelöst. Die ungelöste HCCA wird abzentrifugiert und von dem Überstand werden 200  $\mu$ l auf dem *Anchor Chip*-Probenteller (vgl. 2.12.2) verteilt.

### **2.12.4. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB oder Gentinsäure)**

DHB, erstmals eingeführt von Strupat, Karas und Hillenkamp <sup>173</sup>, gilt als eine gut geeignete Matrix für Peptid-Fingerabdrücke. Sie wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml bzw. 20 mg/ml in 50 % (v/v) Acetonitril 50 % (v/v) einer 0,1 % (v/v) TFA hergestellt.

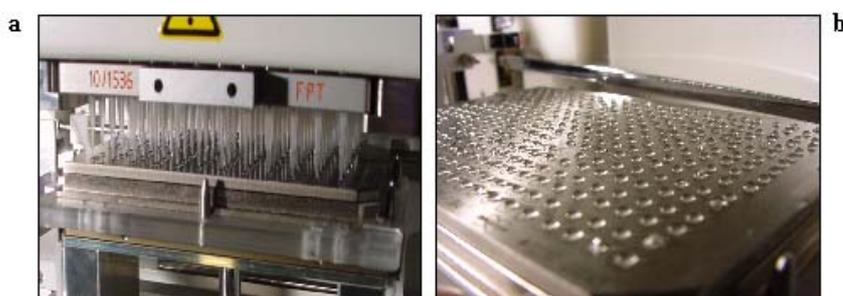
### **2.12.5. Trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure (SA oder Sinapinsäure)**

SA, die erstmals als Matrix von Beavis und Chait vorgestellt wurde <sup>174</sup>, wird in einer Konzentration von 20 mg/ml in 70 % (v/v) Acetonitril 30 % (v/v) einer 0,1 % (v/v) TFA-Lösung hergestellt. SA ist sowohl für die Analyse von Peptiden als auch für die Messung von intakten Proteinen geeignet.

## 2.13. Probenpräparation für die MALDI-Massenspektrometrie

### 2.13.1. Präparation von Peptiden auf dem *Anchor Chip*-Probentellern

Für diese Präparation, die auf den 384er *Anchor Chip*-Probenteller mit einem Ankerdurchmesser von 400  $\mu\text{m}$  durchgeführt wird, wird ein 96-Spitzen-Pipetierroboter verwendet. Diese Methode orientiert sich an der bereits publizierten Methode von Nordhoff et al.<sup>175</sup>. Der verwendete Roboter ist in der Lage, Flüssigkeiten mit Volumina von 0,5  $\mu\text{l}$  bis 10  $\mu\text{l}$  zu pipetieren. Da er über keine automatische Pipetierspitzen-Wechselfunktion verfügt, muss dies zwischen den einzelnen Pipetierschritten, sofern nötig, manuell durchgeführt werden.



**Abbildung 7:** (a) Pipetierroboter beim Beladen eines *Anchor Chip*-Probentellers. (b) Beladener *Anchor Chip*-Probenteller.

Nachdem die Anker des Probentellers wie in 2.12.2 beschrieben mit der Matrix beschichtet wurden, werden jeweils 96mal 1,2  $\mu\text{l}$  Peptid-Lösung pro MTP aufgesogen, wovon 1  $\mu\text{l}$  jeweils auf einen Anker transferiert wird (Abb. 7a). Diese Prozedur kann pro *Anchor Chip*-Probenteller bis zu viermal wiederholt werden, wobei die Probenapplikation hierbei auf 4 ineinander verschachtelte Quadranten à 96 Anker vollzogen wird. Diese quadrantenweise Beladung des Probentellers resultiert aus dem halbierten Abstand der Positionen des 384er MTP-Formats im Vergleich zu den Abständen der Positionen im 96er MTP-Format. Nachdem die Probe aufgetragen wurde (Abb. 7b), wartet man ca. 30 Minuten, bis die Flüssigkeit vollständig verdunstet ist. Als Nächstes folgen 2 Waschschrte mit 0,1 % (v/v) TFA. Hierbei werden aus einer MTP 5  $\mu\text{l}$  der Waschlösung pro Probe aufgesaugt, wovon jeweils 3,5  $\mu\text{l}$  pro Anker dreimal auf- und abpipetiert werden. Nach dem Waschen der Anker wird der Probenteller mit Druckluft abgeblasen und ist bereit für die Messung im Massenspektrometer.

### 2.13.2. Präparation von intakten Proteinen

Intakte Proteine werden in einer gesättigten SA-Lösung in 70 % (v/v) Acetonitril und 30 % (v/v) einer 0,1 % (v/v) TFA-Lösung präpariert. Die Präparation erfolgt nach der „dried-

*droplet*“-Methode, wobei 0,8 µl Protein-Lösung mit 0,6 µl der Matrix-Lösung auf dem Probeneller gemischt werden. Nachdem das Lösungsmittel verdampft ist, kann die Probe im Massenspektrometer bevorzugt im linearen Modus gemessen werden.

## 2.14. MALDI-TOF-MS

### 2.14.1. Messung von Peptiden und Proteinen

Zur Analyse und Identifikation tryptischer Peptide und intakter Proteine werden im Rahmen dieser Arbeit 2 unterschiedliche MALDI-Massenspektrometer eingesetzt. Zum einen ein Bruker Reflex III Massenspektrometer, in welchem eine SCOUT 384-Ionenquelle verwendet wird. Zum anderen wird ein Bruker Autoflex Massenspektrometer verwendet, das ebenfalls eine SCOUT 384 Ionenquelle besitzt. Zur Aufnahme von Peptidmassen-Fingerabdruck-Massenspektren wird sowohl das Reflex III- als auch das Autoflex-Massenspektrometer jeweils im Reflektor-Modus verwendet. Für die Aufnahme von Massenspektren intakter Proteine hingegen wird ausschließlich das Autoflex-Massenspektrometer im linearen Modus verwendet. Die verwendeten Messparameter und Spannungen sind in der folgenden Tabelle 1 aufgelistet.

	<b>Relex III Reflektor - Modus</b>	<b>Autoflex Reflektor- Modus</b>	<b>Autoflex linearer Modus</b>
<b>Beschleunigungsspannung gesamt</b>	25 kV	19 kV	20 kV
<b>Beschleunigungsspannung 1</b>	20.1 kV	16.4 kV	17.3 kV
<b>Ionenlinsenspannung</b>	12.3 kV	8 kV	8.3 kV
<b>Reflektorspannung</b>	28.7 kV	20 kV	0 kV
<b>Reflektor-Detektorspannung</b>	1.76 kV	1.695 kV	0 kV
<b>Lineare Detektorspannung</b>	0 kV	0 kV	1.56 kV
<b>Laserfrequenz</b>	10 Hz	20 Hz	20 Hz
<b>Attenuator Einstellung</b>	88 %	22 %	3 1 %
<b>Deflektorspannung</b>	2 kV	2 kV	0 kV
<b>Cut off Masse</b>	400 m/z	650 m/z	5000 m/z
<b>Delayed Extraction Zeit</b>	75 ns	140 ns	0 ns

**Tabelle 1:** Übersicht der verwendeten Messparameter der MALDI-Massenspektrometer.

Die Datenaufnahme erfolgt mit einem Sun Ultra Computer unter Zuhilfenahme der XACQ Software von Bruker in der Version 4.0.

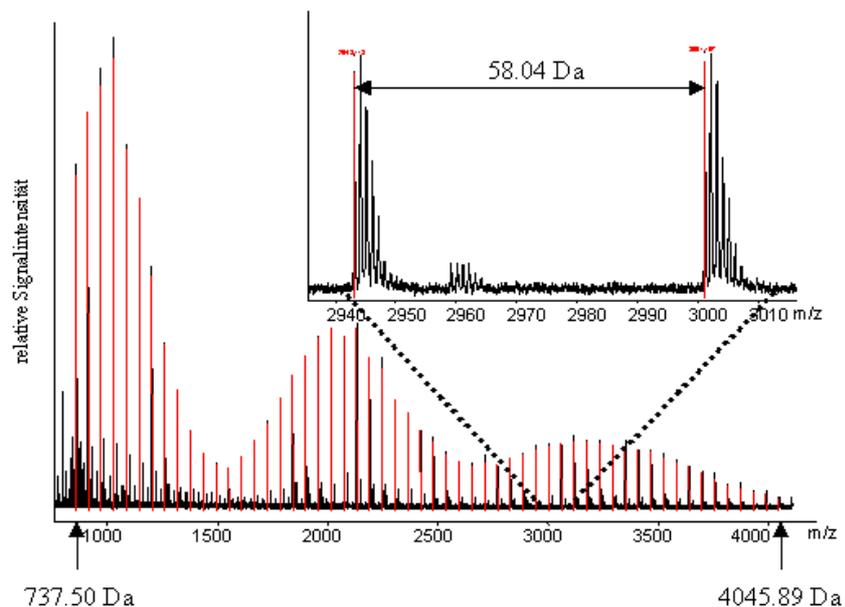
## 2.15. Kalibrierung und Auswertung der Massenspektren

### 2.15.1. Herstellung der PPG-Lösung

Die PPG-Polymer-Standards, die für die Kalibrierung der Massenspektren verwendet werden, setzen sich aus einer Mischung von 3 unterschiedlichen Polymer-Lösungen zusammen. Diese beinhalten die Polypropylenpolymere mit Massen von 53 u bis zu 1000 u (PPG 1000), von 1000 bis 2000 u (PPG 2000) und von 1000 u bis zu 2700 u (PPG 2700). Diese Polymer-Lösungen werden in 99 % (v/v) Aceton 1 % (v/v) 0,1 % TFA 1 zu 1000 verdünnt. Diese Verdünnungen werden dann im Verhältnis 1:2:3 (PPG 1000: PPG 2000: PPG 2700) gemischt und in 10 µl Portionen aliquotiert. Zu jedem Aliquot werden einige Kristalle Natriumchlorid zugegeben um bevorzugt Natrium Kationisation der PPG-Molekülonen zu erhalten. Die Aliquots können in dieser Form bei -20° C für mehrere Monate gelagert werden.

### 2.15.2. Kalibrierung der Massenspektren

Die Kalibrierung der Massenspektren der tryptisch verdauten Proteine erfolgt unter Zuhilfenahme der extern gemessenen PPG-Spektren (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Massenspektrum eines externen PPG-Kalibranten.

Hierzu werden je nach Massenspektrometer bis zu 58 monoisotopische Massensignale des PPG-Kalibranten im Bereich zwischen 737.50 Da und 4045.89 Da markiert und dann anhand einer Zweipunkteichung kalibriert.

Die automatische Ermittlung und Markierung der monoisotopischen Peaks erfolgt mittels des SNAP-Algorithmus in dem Programm XMASS Version 5.1.2 der Firma Bruker Daltoniks. Die Messwerte der PPG-Zweipunkteichung werden sodann als Messwerte für eine externe Kalibrierung der ebenfalls durch den SNAP-Algorithmus ermittelten und markierten monoisotopischen Peaks der tryptischen Peptidspektren verwendet.

In einem folgenden Schritt werden für das PPG-Spektrum in einem speziellen Programm Differenzen zwischen den gemessenen und den theoretisch erwarteten Flugzeiten berechnet, anhand derer eine Korrekturfunktion für die Massenflugzeiten im Massenspektrometer berechnet wird. Diese Korrekturfunktion spiegelt massenspektrometerimmanente, systematische Ungenauigkeiten der Messung wider und wird daher in einem folgenden Schritt auf alle Peptidmassenspektren angewandt.

In einem letzten Schritt wird unter Verwendung des gleichen Programms anhand autoproteolytischer Peptidmassen des Trypsins, die bei einem tryptischen Verdau mit diesem Enzym stets vorhanden sind, eine interne Zweipunktkalibrierung der Spektren durchgeführt. Die so kalibrierten Daten werden in einer neuen Datei gespeichert und können somit einer Datenbanksuchmaschine zugänglich gemacht werden. Detailliertere Informationen zur Funktionsweise der PPG-Kalibrierung und des Kalkulationsprogramms kann man bei Gobom et al. finden <sup>176</sup>.

## **2.16. Identifikation der Proteine**

Die Identifikation der Proteine anhand der kalibrierten Peptidmassen aus den Peptidfingerabdruck-Massenspektren erfolgt unter Verwendung des Datenbanksuchprogrammes Mascot (Version 1.8) <sup>177</sup>. Hierzu werden die Massen aus den kalibrierten Massenspektren gegen die Massen der virtuell im Computer verdauten Peptidmassen verglichen. Dabei werden verschiedene Proteindatenbanken wie die *Arabidopsis thaliana*-Proteindatenbank von TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), die NCBI nr Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>), wie auch die *Arabidopsis thaliana*-Proteindatenbank vom MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/>) verwendet. Die Ergebnisse des Vergleichs werden auf einer HTML-basierten Ergebnisseite dargestellt, die sich als Datei speichern lässt. Der Wert, der die Identifikation eines Proteins festlegt, ist der so genannter Scorewert. Dieser Scorewert setzt sich aus verschiedenen

Parametern wie Anzahl, Intensität und Massenabweichung der übereinstimmenden Peptidmassen, Anzahl der zur Datenbanksuche zugelassenen Peptidmassen und Anzahl der zugelassenen Massenmodifikationsmöglichkeiten zusammen. Letztlich ist dieser Score also ein Indikator für die Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit der Identifikation des Proteins. Bei der Mascot Suchmaschine gilt ein Protein ab einem Scorewert von 59 als möglich identifiziert. Je höher dieser Wert jedoch ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit seiner Richtigkeit.