

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Verwendete Materialien und deren Bezugsquellen

#### 2.1.1. Substanzen

Matrix	Bezugsquelle
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure ( <i>4-hydroxy-<math>\alpha</math>-cyano cinnamic acid</i> ), HCCA	Sigma- Aldrich
trans-3-Inolylacrylsäure ( <i>trans-3-indole acrylic acid</i> ), IAA	Sigma- Aldrich
2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure, HABA	Acros Organics
Sinapinsäure, SA	Sigma- Aldrich
2,4-Dihydroxybenzoesäure, DHB	Sigma- Aldrich

*Tabelle 2-1: Matrices für die MALDI-Massenspektrometrie (von Proteinen u. Peptiden)*

Peptid	Bezugs- quelle	Aminosäuresequenz	Summenformel	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>
				monoiso- topisches m/z	mittleres m/z
Angiotensin II (human)	Bachem	H-DRVYIHPF-OH	C <sub>50</sub> H <sub>72</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1046,5423	1047,2
Angiotensin I (human)	Bachem	H-DRVYIHPFHL-OH	C <sub>62</sub> H <sub>90</sub> N <sub>17</sub> O <sub>14</sub>	1296,6853	1297,5
Substance-P- methylester	Bachem	H-RPKPQQFFGLM-O-CH <sub>3</sub>	C <sub>64</sub> H <sub>100</sub> N <sub>18</sub> O <sub>13</sub> S	1362,7356	1363,7
Neurotensin (1-11)	Bachem	H-pELYENKPRRPY-OH	C <sub>66</sub> H <sub>100</sub> N <sub>19</sub> O <sub>18</sub>	1446,7494	1447,6
Neurotensin ACTH (1-17)	Bachem	H-pELYENKPRRPYIL-OH	C <sub>78</sub> H <sub>122</sub> N <sub>21</sub> O <sub>20</sub>	1672,9175	1674,0
ACTH (18-39) human (CLIP)	Bachem	H-SYSMEHFRWGKPVGKKR-OH	C <sub>95</sub> H <sub>146</sub> N <sub>29</sub> O <sub>23</sub> S	2093,0867	2094,5
ACTH (18-39) human (CLIP)	Bachem	H-RPVKVYPNGAEDESAFAEAF PLEF-OH	C <sub>112</sub> H <sub>166</sub> N <sub>27</sub> O <sub>36</sub>	2465,1989	2466,7
Somato- statin-28	Bachem	H-SANSNPAMAPRERKAGCK NFFWKTFTSC-OH	C <sub>137</sub> H <sub>208</sub> N <sub>41</sub> O <sub>39</sub> S <sub>3</sub>	3147,4715	3149,6

*Tabelle 2-2: Peptidstandards zur Kalibrierung der Massenspektrometer im Massenbereich 1000 – 3200 Da; die Stammlösungen enthalten jeweils 1,0 pmol eines jeweiligen Peptids.*

Protein	Bezugsquelle	m/z – Werte (mittleres Molekulargewicht)		
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+3H] <sup>3+</sup>
Insulin (Rind)	Sigma	5734,56	2867,78	1912,19
Cytochrom C (Pferdeherz)	Serva	12361,09	6181,05	4283,45
Ubiquitin (human)	Sigma	8565,89	4283,45	2855,97
Apo-Myoglobin (Pferd)	Perkin Elmer Sciex	16952,55	8476,78	5651,52

*Tabelle 2-3: Protein Standards zur Kalibrierung des Massenbereiches von ~ 2 bis 20 kDa*

sonstige Chemikalien	Bezugsquelle
$\beta$ -Mercaptoethanol, $\beta$ -ME	Sigma- Aldrich
4-Vinylpyridin	Sigma- Aldrich
Acrylamid ( <i>ultra pure</i> )	GIBCO BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburgh, Maryland, USA
Dichlordimethylsilan 2%-ig in Octametylcyclotetrasiloxan (=„Plusone repel silane ES <sup>®</sup> “)	Pharmacia
Dithiothreitol, DTT	Sigma- Aldrich
Glycerin	Merk, Darmstadt
Iodacetamid	Sigma- Aldrich
Lösungsmittel wie Aceton, Acetonitril, Isopropanol, EtOH, MeOH, jeweils p.a. oder <i>gradient grade</i>	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose	Schleicher & Schüll
O-Octyl- $\beta$ -D-glycopyranosid	Sigma- Aldrich
Protein Molekulargewicht-Standards für die PAGE P-6647 bis P-6649	Molekular Probes, Eugene, Oregon, USA
SDS	Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA
Sulforhodamin	Pierce
Tris-(carboxyethyl)-phosphin (TCEP)	Pierce
Trypsin, ( <i>bovine, modified and sequencing grade</i> )	Boehringer, Mannheim

Tabelle 2-4: Liste der übrigen Chemikalien und deren Bezugsquellen

### 2.1.2. Bakterienstämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*- und *Agrobacterium tumefaciens*- Stämme, samt den jeweils in ihnen enthaltenen Plasmiden (*vide infra*), wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Dr. Erich Lanka zu Verfügung gestellt. TrbC, TraF, und VirB2 exprimierende Stämme, sowie deren Mutanten, wurden von Ralf Eisenbrandt im Rahmen einer Kooperation angefertigt, und für die in dieser Arbeit vorgestellten massenspektrometrischen Untersuchungen bereitgestellt.

#### ***Escherichia coli* K12** (Bachmann, (1972))

Stammbezeichnung	beschrieben bei
HB101	Boyer & Roulland-Dussoix, (1969)
SCS1	Hanahan, (1983)
JE2571	Flagellen-frei; Bradley, (1980)
DH5 $\alpha$	Hanahan, (1983)

#### ***Agrobacterium tumefaciens***

Stammbezeichnung	beschrieben bei
A348	Lin & Kado, (1977)
NT1REB	Chesnokova, Coutinho <i>et al.</i> , (1997)

## Plasmide\*

Bezeichnung	Kommentar / beschrieben bei
RP4	R-Faktor, IncP $\alpha$ / Datta, Hedges <i>et al.</i> , (1971), Pansegrau, Lanka <i>et al.</i> , (1994)
R751	R-Faktor, IncP $\beta$ / Jobanputra & Datta, (1974), Thorsted, Macartney <i>et al.</i> , (1998)
pMS119EH	Vektor / Strack, Lessl <i>et al.</i> , (1992)
pGZ119EH/HE	Vektor / Lessl, Balzer <i>et al.</i> , (1992))
pDB126	pGZ119EH; komplette Tra1+2 <i>core</i> -Region <i>traF</i> <sup>(+)</sup> bis <i>traM</i> <sup>(+)</sup> ( <i>traN</i> <sup>(+)</sup> teilweise) und <i>trbB</i> <sup>(+)</sup> bis <i>trbM</i> <sup>(+)</sup> / Balzer, Pansegrau <i>et al.</i> , (1994)
pML123	pGZ119EH; Tra2 Region <i>trbB</i> <sup>(+)</sup> bis <i>trbM</i> <sup>(+)</sup> / Lessl, Balzer <i>et al.</i> , (1993)
pWP471	pJF119EH ( $\equiv$ Vektor); <i>traF</i> <sup>(+)</sup> ( <i>traE</i> <sup>(+)</sup> teilweise) / Waters, Strack <i>et al.</i> , (1992)
pRE178	pMS119EH; <i>trbC</i> <sup>(+)</sup> / Eisenbrandt, Kalkum <i>et al.</i> , (1999)
pJH472	pGZ119EH; <i>traF</i> <sup>(+)</sup> / Eisenbrandt, Kalkum <i>et al.</i> , (1999)
pRE123	pGZ119EH; Tra2 <i>core</i> -Region von R751 <i>trbB</i> bis <i>trbM</i> / Lessl, Balzer <i>et al.</i> , (1992)
pUCD4811	„Vektor“ / Eisenbrandt, Kalkum <i>et al.</i> , (1999)
pUCD4812	pUCD4811; <i>virB1</i> , 2, 3 und teilweise 4 <sup>(+)</sup> / Eisenbrandt, Kalkum <i>et al.</i> , (1999)
pUCD4813	pUCD4811; <i>virB2</i> <sup>(+)</sup> / Eisenbrandt, Kalkum <i>et al.</i> , (1999)
pTiA6	Octopin-Typ des Ti-Plasmids / Kalogeraki & Winans, (1995)
pTi15955	komplettes <i>virB</i> -Operon <i>virB1</i> bis <i>virB11</i> des octopinen Ti-Plasmids / Thompson, Melchers <i>et al.</i> , (1988)
pTTQ18	Vektor / Stark, (1987)
pUCD4805	pTTQ18; <i>virB2</i> <sup>(+)</sup> / Eisenbrandt, Kalkum <i>et al.</i> , (1999)

Abgeleitete, mutierte Plasmide und Plasmid-Kombinationen sind an den entsprechenden Stellen im Text beschrieben.

## 2.2. Mikrodispensiertechnik zur automatischen MALDI-MS Probenpräparation

### 2.2.1. Herstellung von Piezojet-Mikrodispensern

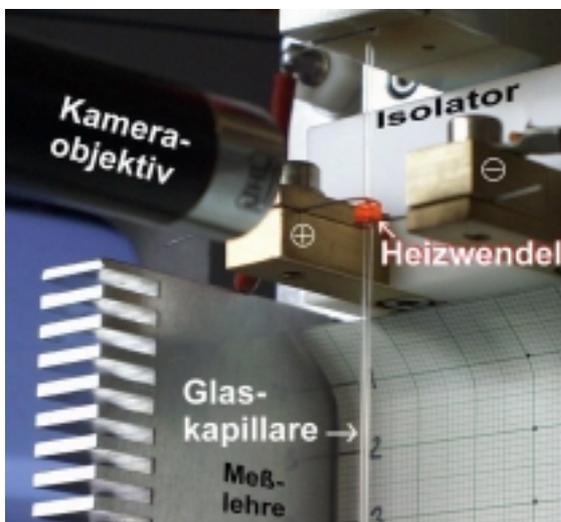
Die verwendeten Piezojets werden in Anlehnung an die piezoelektrischen\* Mikrodispenser der Firma Microdrop (Norderstedt; Deutschland) aus einer Glaskapillare und einem Piezokeramikröhrchen (Siemens; Typ 421.0007.12B) aufgebaut.

---

\* Nomenklatur der Plasmide nach Novick, Clowes *et al.*, (1976)

## 1. Bearbeitung der Glaskapillare

Zunächst werden mit einem Glasschneider 15 cm lange Kapillaren aus 30 cm langen, Borosilikatglaskapillaren (Wandstärke 41  $\mu\text{m}$ ; Außen- $\text{\O}$  1,000 mm; Firma Hilgenberg GmbH, Malsfeld) geschnitten. Wie aus Abbildung 2-2 ersichtlich, weist die Glaskapillare eines Piezojets zwei Verjüngungen auf, eine im Innern des Piezoelementes (Innen- $\text{\O}$  45  $\mu\text{m}$ ) und eine am Düsenende (Innen- $\text{\O}$  50  $\mu\text{m}$ ). Diese Verjüngungen werden durch einen kontrollierten Schmelzprozeß in einer Heizwendel erzeugt. Die Kapillaren werden dazu vertikal in einer Spannvorrichtung in eine aus 4 Wicklungen Konstantandraht bestehende Heizwendel (Thyssen, Heizleiter 0,4 mm; 8,729  $\Omega/\text{m}$ ) gehängt (s. Abbildung 2-1). Bei einem angelegten Strom von  $\sim 4$  A erhitzt sich die Wendel zur Weißglut was zu einer Erweichung des Borosilikatglases führt. Dieses zieht sich an der erhitzten Stelle langsam zu einem Tropfen zusammen. Der Prozeß wird durch einen Spalt, zwischen den Wicklungen des Konstantandrahtes hindurch, mit einer Videokamera mit Mikroskopobjektiv überwacht. Auf dem zugehörigen Beobachtungsbildschirm ist eine auf Folie gedruckte  $\mu\text{m}$ -Skala angebracht, die zuvor über einen mikroskalierten Objektträger (Zeiss) kalibriert wurde (s. Abbildung 2-1). Sobald der Innendurchmesser der Kapillare 45 bzw. 50  $\mu\text{m}$  erreicht hat, wird der Schmelzprozeß durch Stromabschaltung beendet. Die untere Verjüngungsstelle wird in deren Mitte mit einem Diamantschneider angeritzt und quer zur Kapillare in zwei Hälften gebrochen. Anschließend wird die weiter zu verarbeitende Hälfte mit einer 3  $\mu\text{m}$  gekörnten Schleifscheibe (World Precision Instruments) manuell oder auf einem Kapillarschleifer abgeschliffen. Dabei verschwindet auch der Grat, der nach dem Brechen der Kapillare gegenüber der Anritzstelle verbleibt. Schleifrückstände werden durch Spülen mit MeOH aus dem Innern der Kapillare entfernt. Um nach dem Trocknen letzte Risse und Riefen aus der Bruchstelle zu entfernen wird das abgeflachte Kapillarende durch eine kurzzeitig angelegte, blaue, Oxidationsflamme eines Hand-Propangasbrenners feuerpoliert (ca. 5 mm Flammendurchmesser). Dieser Vorgang wird mit einer Stereolupe kontrolliert und mehrmals wiederholt, bis ein völlig glattes, abgeflachtes Kapillarende entstanden ist.



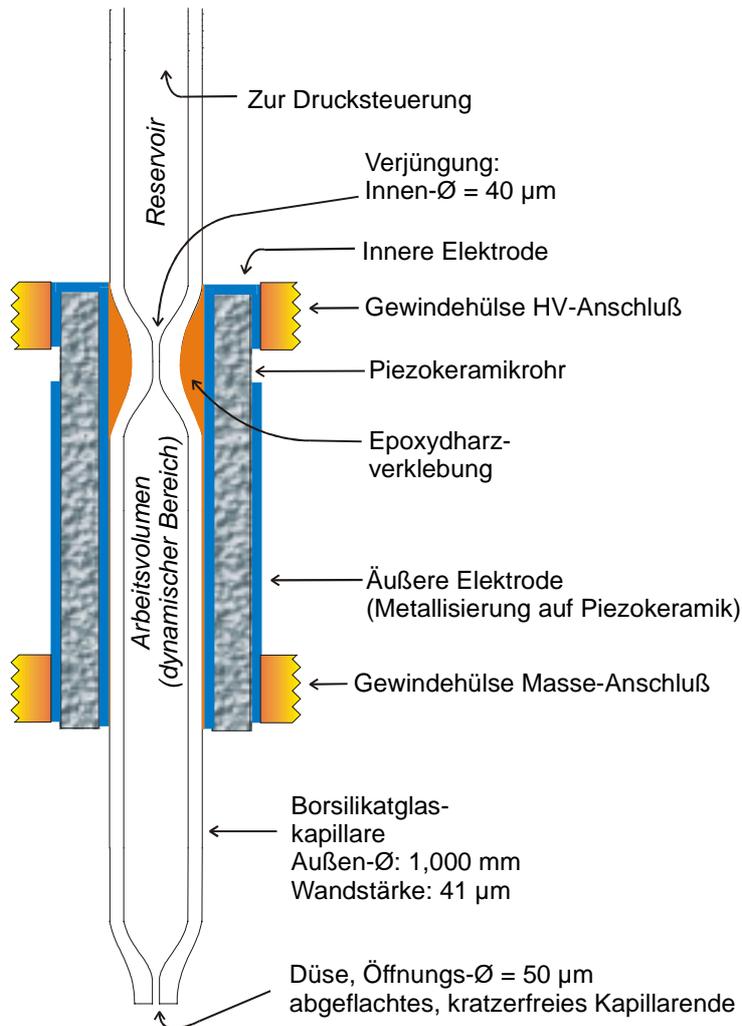
*Abbildung 2-1: Schmelzvorrichtung zur Herstellung verjüngter Borosilikatglaskapillaren für Piezojet-Mikrodispenser (links); Bildschirm zur Beobachtung des Schmelzprozesses (rechts).*

## 2. Zusammenbau, Funktionstest und Oberflächenveredelung

Das Piezokeramikröhrchen wird wie in Abbildung 2-2 dargestellt mit der Glaskapillare verklebt. Hierzu dient ein blasenfrei härtender, nichtschrumpfender Epoxidklebstoff (Structalit 5810 A&B von Panacol-Elosol). Zur genauen Einhaltung der Abstände von Piezokeramik und Düse wird zum

\* „Piezo.“ von griech.: πιέζειν = pressen

Kleben eine Lehre verwendet. Nach dem Aushärten werden die Gewindhülsen mit einem elektrisch leitendem Klebstoff (Circuit Works<sup>®</sup> conductive epoxy CW2400 von Chemtronics<sup>®</sup>) auf den metallisierten Flächen des Piezoelementes angebracht (diesmal unter Verwendung einer Schraublehre). Die Verklebungen sind ~5 min mit einer Heißluftpistole auf 120°C zu erhitzen um den geringstmöglichen elektrischen Widerstand zu erhalten. Anstelle der Gewindhülsen können die Piezoelemente auch in Lötösen geklemmt auf einer Platine angeordnet werden (Deutsche Patentanmeldung 197 52 000.7 (Kalkum, Eickhoff *et al.*, (1997))). Nach einer Mindestaushärtzeit von 24 h kann ein Funktionstest mit mikrofiltrierten, destillierten Wasser durchgeführt werden. Bei einer Pulslänge von 42  $\mu\text{s}$  sollte ein fehlerfreier Tropfenabriß bei  $\leq 60\text{ V}$  Pulsspannung erfolgen. 200  $\mu\text{s}$  nach dem Piezopuls sollte der Tropfen eine Entfernung von  $\sim 400\text{ }\mu\text{m}$  von der Düsenöffnung zurückgelegt haben ( $v_{\text{Drop}} \approx 2\text{ ms}^{-1}$ ; s. nächstes Kapitel).



**Abbildung 2-2:** Schematischer Aufbau und Fotografie eines Piezojet-Mikrodispensers. (Das Streichholz dient dem Größenvergleich.)

Sollen später wässrige Lösungen transferiert werden, dann werden die Glasoberflächen der Dispenserkapillare zuvor innen und außen silanisiert. Hierzu müssen die Mikrodispenser (am besten im fertig montierten Zustand) mit wasserfreiem EtOH ausgespült und trocken geblasen werden. Anschließend werden sie für ~5 min. in eine 2%-ige Lösung von Dichlordimethylsilan in Octametylcyclotetrasiloxan getaucht. Nach gründlicher Reinigung mit wasserfreiem EtOH sind die, jetzt mit wasserabweisenden Oberflächen versehenen Mikrodispenser, einsatzbereit.

### 2.2.2. Einstellung und Optimierung der piezoelektronischen Parameter

Tropfengröße, Volumen und Tropfengeschwindigkeit lassen sich mit Hilfe einer Videokamera mit Mikroskopoptik und einem Stroboskop ermitteln (s. Abschnitt 2.3.5 und Abschnitt 3.1.1). Nach der Befüllung des Mikrodispensers wird die Länge des an das Piezoelement angeschlossenen Steuerpulses zunächst auf 40  $\mu\text{s}$  gestellt. Die Verzögerung für das Stroboskop sollte auf etwa 60-100  $\mu\text{s}$  stehen. Anschließend wird die Steuerspannung des Piezoelementes langsam von 0 beginnend erhöht, bis sich die herausgedrückte Flüssigkeitssäule von der Dispenserdüse ablöst und einen Tropfen bildet. Sollte sich bereits ein hängender größerer Tropfen (mehrere 100  $\mu\text{m}$ ) auf dem abgeflachten Kapillarende gebildet haben, so schaltet man die Dispenserspannung ab und wartet ca. 5 s. Dabei wird der Tropfen durch den Kapillarsog wieder in den Dispenser befördert. Vor dem Wiedereinschalten der Piezospannung wird deren Sollwert um ca. 10 V erhöht. Auf diese Weise läßt sich ein durch zu hohe Spannungen bedingter Lufteintritt in den Dispenser verhindern, denn dieser läßt sich nur durch zeitraubende Entleerung und Neubefüllung beheben.

Durch Variation der Stroboskopverzögerung wird der gesamte Tropfenabriß zeitlich verfolgt (Abbildung 3-1 in Abschnitt 3.1.1). Die gewünschte Tropfengröße wird nun durch Feinabstimmung der Puls- Spannung und Dauer eingestellt. Auf diese Weise wird auch die Bildung unerwünschter Satellitentröpfchen aus dem Tropfenabriß unterbunden. Für jeden einzelnen Piezojet-Mikrodispenser und jeden Flüssigkeitstyp werden die ermittelten Werte von der Steuersoftware gespeichert.

### 2.2.3. Vorbehandlung der zu dispensierenden Flüssigkeiten

Die wie in Abschnitt 2.2.1 hergestellten Mikrodispenser haben ein Totvolumen von  $\sim 11 \mu\text{l}$ . Dieses muß mit Flüssigkeit gefüllt werden, damit der Dispenser arbeiten kann. Es ist jedoch nicht erforderlich das gesamte Totvolumen mit der zu dispensierenden Probenlösung zu füllen (dies würde dem Miniaturisierungsvorhaben widersprechen). Vielmehr wird der Dispenser mit einer sog. „Trägerflüssigkeit“ befüllt, die anschließend mit wenigen nl -  $\mu\text{l}$  der Probe unterschichtet wird.

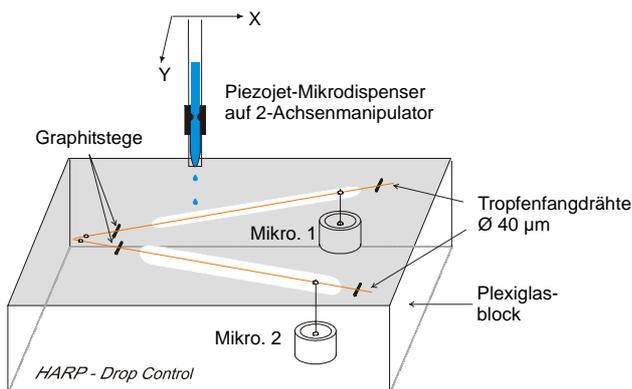
Die Trägerflüssigkeit muß vor der Befüllung der Dispenser entgast werden. Dazu wird die Flüssigkeit in einer dickwandigen, mit einer Vakuumpumpe (MZ2C/2,4 von Vacuubrand GmbH, Wertheim) evakuierten Saugflasche im Ultraschallbad ca. 20 min lang beschallt. Anschließend wird die Flüssigkeit durch einen 0,22  $\mu\text{m}$  Filter (Satorius) gepumpt (s. Nanodispensierstation in Abschnitt 2.3.5). Probenlösungen von Peptiden oder Matrices in Mikrotiterplatten werden durch Zentrifugation von Schwebeteilchen befreit.

## 2.3. Elektroakustisches Verfahren zur exakten Positionierung von Mehrfach-Mikrodispensereinheiten (HARP)

Zur Lösung der in Abschnitt 1.1.3 angeführten Positionierprobleme wurde ein Gerät erfunden, mit welchem auf elektroakustischem Wege die Auftreffposition einzelner Tropfen bestimmt wird: HARP (=Highly Accurate and Reliable Positioning System, Deutsches Patent Nr. 197 52 010.3, (Kalkum & Müller, (1997))). Der Tropfendetektor dient zur präzisen Bestimmung der Tropfenauftrittsposition. Wird ein aus mehreren Mikropipetten bestehender Pipettierkopf nach dem in 2.3.2 beschriebenen Schema über den Sensor verfahren, so lassen sich Abweichungen der einzelnen Tropfenauftrittspositionen mit dem Tropfendetektor relativ zu einer Referenzposition berechnen. Diese Abweichungen werden später während der Erzeugung von Proben- oder Substanzrastern vom vollautomatischen, PC gesteuerten Achsenpositioniersystem erfaßt und korrigiert.

### 2.3.1. Aufbau des HARP-Sensors

Der Sensor besteht aus zwei dünnen Metallfäden, die jeweils an einem Ende über eine spezielle Aufhängung mit der Membran eines Elektret-Kondensatormikrofons verbunden sind (Abbildung 2-3). Trifft ein Flüssigkeitstropfen auf einen der Fäden, so bewirkt dessen Kraftwirkung eine Auslenkung der Mikrofonmembran. Das Mikrofonsignal wird mit den Rausch- und Umgebungsschallpegel aus den anderen Mikrofonen durch Differenzverstärker verglichen. Nachfolgende Verstärkerstufen bringen das Detektorsignal auf einen, auswertbaren Pegel (z.B. TTL), der vom sonstigen Umgebungsschall nicht beeinflusst wird (s. Abbildung 2-4). Die beiden Tropfenfangfäden des Sensors sind in einem definierten Winkel von ca. 45° zueinander angebracht. Als schalldämpfende Halterung für diese Detektionsvorrichtung dient ein ober- und unterseitig exakt parallel abgefräster Plexiglasblock. Die Tropfenfangdrähte werden auf 0,5 mm dicke Stegen aus Graphit (ähnlich wie bei einer Gitarre) über die eingefrästen Vertiefungen gespannt.



*Abbildung 2-3: Aufbau des HARP-Sensors, schematisch (links);*

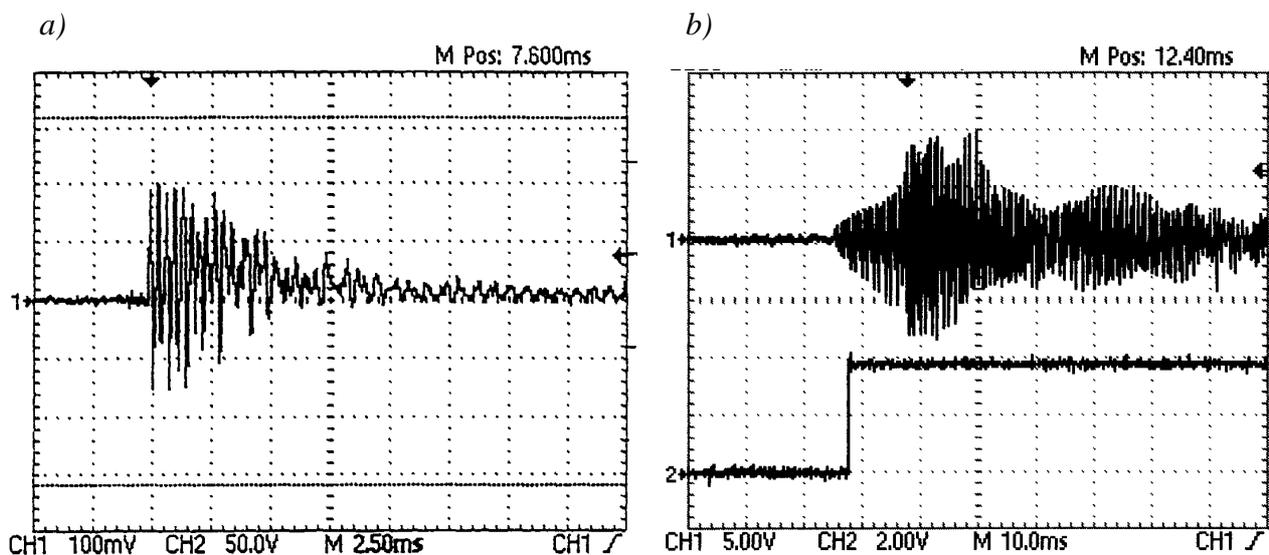
*Der Sensor beim Abgleich eines 16-fach Mikrodispensers - gezeigt ist eine ältere Bauform mit in Lötösen gelagerten Piezoelementen (rechts).*

### 2.3.2. Der Meßablauf

1. Das Achsensystem fährt kurz vor dem Tropfenfangdraht los und schießt bei konstanter Fahrgeschwindigkeit mit konstanter Frequenz Tropfen ab (z.B. 500 Tropfen pro Sekunde bei 60 µm Tropfendurchmesser und 2,5 mms<sup>-1</sup> Fahrgeschwindigkeit).
2. Beim Überfahren des 1. Tropfenfangdrahtes (Pipetten - Draht Abstand ca. 2-3 mm) wird der Fangdraht (40 µm Durchmesser) von den Tropfen getroffen. Schon das erste Streifen eines Tropfens bewirkt eine Auslenkung der Mikrofonmembran, mit welcher der Fangdraht über einen vertikalen Draht (Ø 100 µm) verbunden ist.
3. Das Mikrofonsignal wird, wie in 2.3.3 beschrieben, von der Sensorauswertschaltung registriert und an das Achsensteuersystem (oder einen angeschlossenen Computer) übergeben.
4. Der zuvor programmierte *Microcontroller* des Achsensteuersystems speichert die Position den die fahrenden Achsen zum Tropfenauftrittszeitpunkt hatten, sofern nicht gleichzeitig eine Störung vorlag (s. Abschnitt 2.3.3 unten).
5. Um die Tropfenauftrittsposition einer Referenzpipette zu bestimmen, müssen die Schritte 1-5 insgesamt mindestens 4 mal durchgeführt werden. Dazu fährt das Achsensystem nach Schritt 5 weiter zum nächsten Fangdraht, und zwar so, daß nur eine Achse verändert wird (z.B. nur die Y Achse).
6. Nach Ausführung der Schritte 1-5 wird die Mikropipette wieder vor den ersten Fangdraht zurückgefahren. Eine Position neben der ursprünglichen Ausgangsposition bildet die zweite

Startposition, von der ab die beiden Fangdrähte wieder analog zu 1-6 überfahren werden. Die vier Tropfenauffreffpositionen  $P_1$  bis  $P_4$  (s. Abbildung 2-6) werden vom Achsensteuersystem an den Computer gesendet und dienen zur Berechnung der Gerade, auf denen die Fangdrähte liegen. *De facto* werden in einem automatischen Ablauf bis zu 20 Treffer pro Fangdraht mit der Referenzpipette erzeugt, um Position der Fangdrähte genauer per Regression berechnen zu können.

7. Um die Abweichungen aller anderen Auftreffpunkte der übrigen Mikropipetten automatisch bestimmen zu lassen, muß das Achsensystem den Dispensierkopf mit den der Reihe nach angeordneten Pipetten ein weiteres Mal (wie in den Schritten 1-5) über die beiden Drähte des Sensors fahren. Dabei emittiert jede einzelne Mikropipette nacheinander Tropfen, bis der angesteuerte Fangdraht von jeder Pipette einmal getroffen wurde. Infolge der seriellen Mikropipettenanordnung ist hierzu im wesentlichen nur die Fahrt in einer Achsrichtung erforderlich. Um jedoch nicht auf einen am Draht hängengebliebenen Mikrotropfen zu dispensieren, wird der Mehrfachdispensierkopf für jede folgende Pipette ca. 0,5 mm längs zu den Fangdrähten versetzt. Hierdurch wird gewährleistet, daß die Fangdrahtposition nicht verfälscht wird. Anhand der Berechnungen in Schritt 6 lassen sich die Abweichungen der einzelnen Auftreffpunkte der jeweiligen Mikropipette bestimmen.



*Abbildung 2-4: Oszillogramme des vorverstärkten Mikrophonsignals (jeweils Kurve 1):*

- a) ein einzelner Tropfen trifft auf den Fangdraht
- b) Detektion mehrerer Tropfenereignisse; das zugehörige TTL-Signal (Kurve 2) zeigt die Digitalisierung ab der ersten Membranauslenkung

### 2.3.3. Elektronische Schaltung zur Auswertung des Sensorsignals

Die Funktionsweise der Sensorauswerteschaltung wird durch das Blockschaltbild in Abbildung 2-5 verdeutlicht, auf welches sich auch die folgende Nummerierung bezieht. Die Schaltmodule 1 bis 5 sind für die Signalverarbeitung eines jeden Fangdrahts einmal vorhanden (also insgesamt doppelt ausgeführt).

1. Auftreffen eines Tropfens auf einen Tropfenfangdraht: Auslenkung der entsprechenden Mikrofonmembran.
2. Vorverstärkung des Signals (*pre amp.*). Bei lauter Umgebung werden Störungen durch einen zusätzlichen Differenzverstärker (*diff. amp.*) und einem weiteren Mikrofon vermieden, indem der Störschallpegel mit dem Nutzsignal verglichen wird.
3. Das Tropfenfrequenzspektrum (um 3,5 kHz; s. Oszillogramme in Abbildung 2-4) wird durch den Bandpaß (*band path*) verstärkt, übrige Frequenzen werden gedämpft.
4. Gleichrichtung der Wechselfspannung zu einem Signal mit TTL Pegel (*AC to DC converter*)
5. Verlängerung des TTL Impulses vom Mikrosekunden- in den Millisekundenbereich (*Timer indicator  $\mu s$  to  $ms$* ). Impuls wird durch eine LED (*Light Emitting Diode*) visualisiert.
6. Die digitale Logik wertet die beiden Ausgänge der doppelt vorhandenen Stufen 1-5 hinsichtlich gleichzeitiger Auslösung bei Störung aus (*digital Logic*).
7. Drei LEDs (*Timer Indicator*) zeigen an, ob der rechte oder der linke Fangdraht getroffen wurde. Mit der dritten LED wird ggf. der Störpegel sichtbar gemacht. Die Verwendung der *Timer-Elemente* dient in diesem Falle nur der Verlängerung der Anzeigezeit, um dem Anwender eine Beobachtung zu ermöglichen. Die entsprechenden drei Ausgangssignale stehen dem Achsensteuersystem (oder PC) zur Verfügung.
8. Zu Beginn der Messung muß das Achsensteuersystem den "*active / reset*" auf "*high*" (also auf aktiv) setzen. Das Achsensteuersystem quittiert die akkurate Signalerfassung an den Logikausgängen 1-3, indem es den Logikeingang "*active / reset*" auf "*low*" setzt.
9. Während der Messung (*active / reset = "high"*), wird das Geräusch, welches durch den auftreffenden Tropfen erzeugt wird über einen NF-Verstärker (*audio freq. power amp.*) mit nachgeschaltetem Lautsprecher hörbar gemacht.
10. Ein zusätzlich eingebauter Geräusch- / Spracherkennungsschaltkreis (wie z.B. RSC-164 von Sensory Inc. USA) ermöglicht eine weitere Kontrolle bei der Signalauswertung (*sound recognition circuit*). Das Signal "*drop heard*" wird dann ebenfalls dem Achsensteuersystem oder PC zur Verfügung gestellt.

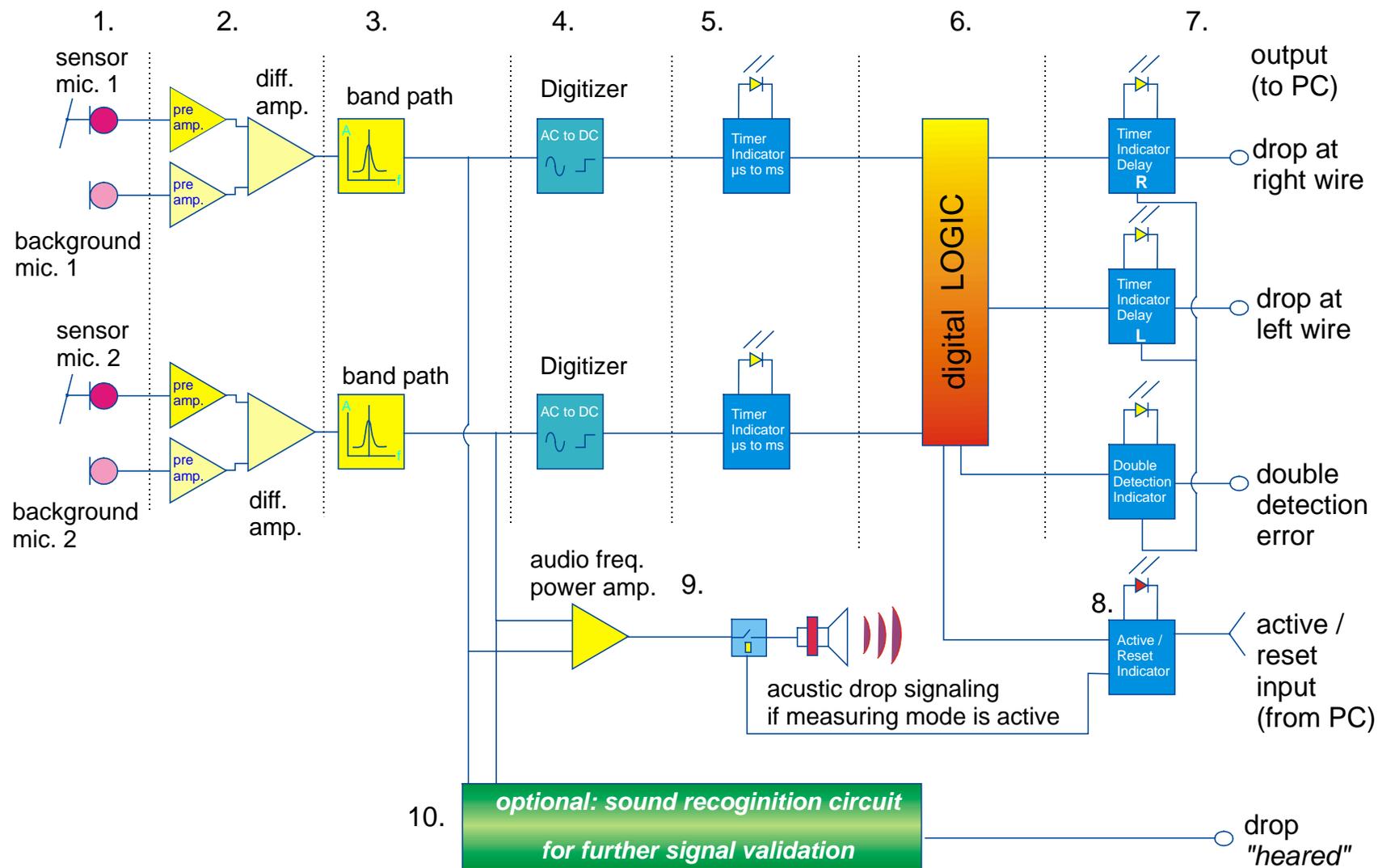


Abbildung 2-5: Schaltschema der Sensorauswert-Elektronik; Erläuterungen im Text (vide supra).

### 2.3.4. Berechnung der Abweichungen der Tropfenauffreffpositionen

Die Berechnung der Korrekturwerte  $\Delta X$  und  $\Delta Y$  für die anzupassenden Dispenserpositionen erfolgt in drei Schritten und wird durch Abbildung 2-6 verdeutlicht.:

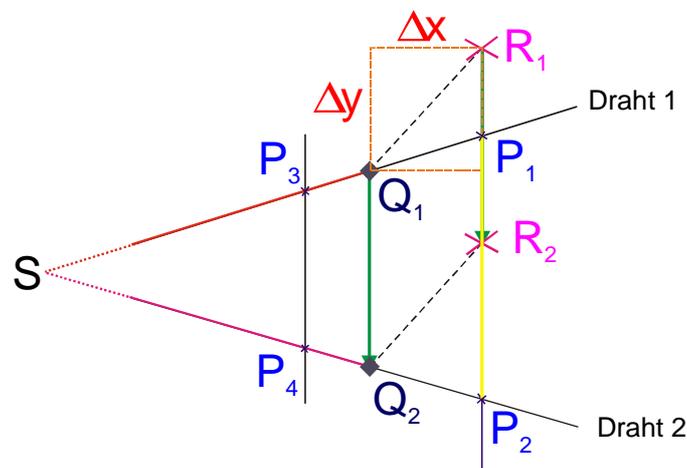
Als erstes werden die Geradengleichungen der Tropfenfangdrähte jeweils aus den Referenzdispenserkoordinaten für die Referenzauffreffpunkte  $P_1, P_2$  bzw.  $P_3, P_4$  ermittelt. Stehen mehr Referenzauffreffpunkte zur Verfügung, so werden stattdessen die Regressionsgeraden der Tropfenfangdrähte verwendet (s. Abschnitt 2.3.2. Punkt 6). Anschließend werden aus den Geradengleichungen die Koordinaten des (gedachten) Schnittpunktes  $S$  der beiden Fangdrähte ermittelt.

Im zweiten Schritt müssen die Koordinaten der Tropfenauffreffpunkte  $Q_1$  und  $Q_2$  des abzugleichenden Dispensers berechnet werden. Die Strecken  $\overline{SQ_1}$  und  $\overline{SQ_2}$  ergeben sich aus dem Strahlensatz wie folgt:

$$\overline{SQ_1} = \frac{\overline{Q_1Q_2} \cdot \overline{SP_1}}{\overline{P_1P_2}} \quad \text{und} \quad \overline{SQ_2} = \frac{\overline{Q_1Q_2} \cdot \overline{SP_2}}{\overline{P_1P_2}} \quad (I)$$

Da die Achskoordinaten  $R_1$  und  $R_2$  des auszurichtenden Dispensers bekannt sind (denn diese werden vom Achssystem zum Zeitpunkt der Tropfendetektion registriert (s. Abschnitt 2.3.2)), und die Strecken  $\overline{Q_1Q_2}$  und  $\overline{R_1R_2}$  gleich sind, kann  $\overline{Q_1Q_2}$  in den Gleichungen (I) durch  $\overline{R_1R_2}$  substituiert werden. Damit sind die Beträge der Vektoren  $\overline{SQ_1}$  und  $\overline{SQ_2}$  bekannt. Da deren Richtung wiederum mit den von  $S$  nach  $P_1$  und  $P_2$  führenden Vektoren  $\overline{SP_1}$  und  $\overline{SP_2}$  übereinstimmt, ist zur Ermittlung der Koordinaten der Punkte  $Q_1$  und  $Q_2$  lediglich das Betragsverhältnis  $\overline{SQ_1} / \overline{SP_1}$  bzw.  $\overline{SQ_2} / \overline{SP_2}$  zu berücksichtigen, das in beiden Fällen  $\overline{R_1R_2} / \overline{P_1P_2}$  beträgt.

Der letzte Schritt bestimmt die Korrekturwerte  $\Delta X$  und  $\Delta Y$ , die gleich der Abweichung der Achskoordinaten des auszurichtenden Dispensers  $R_1, R_2$  von den Tropfenauffreffpunkten dieses Dispensers  $Q_1, Q_2$  sind.



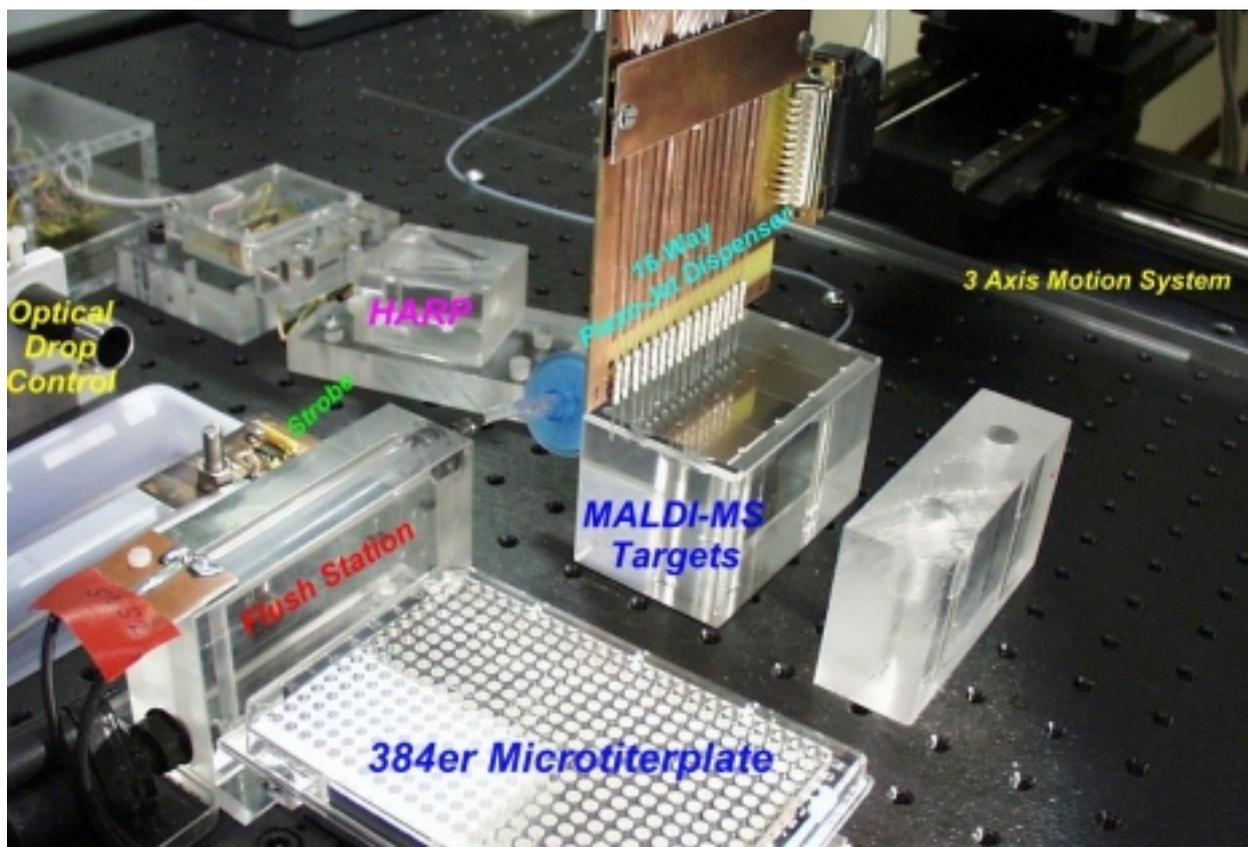
*Abbildung 2-6: geometrisches Schema zur Berechnung der Abweichungen der Tropfenauffreffpositionen. Es sind:*

- $P_1$  bis  $P_2$   $\Rightarrow$  Auftreffpositionen der Tropfen des Referenz-Piezojets auf dem Fangdraht
- $S$   $\Rightarrow$  der extrapolierte, virtuelle Schnittpunkt der beiden Tropfenfangdrähte
- $R_1$  und  $R_2$   $\Rightarrow$  die gemessene Achsposition eines auszurichtenden Dispensers, dessen Tropfen die Fangdrähte in  $Q_1$  bzw.  $Q_2$  treffen
- $\Delta X$  und  $\Delta Y$   $\Rightarrow$  die Korrekturwerte als Abweichung der Tropfenauffreffpunkte von der tatsächlichen Achsposition des auszurichtenden Dispensers

### 2.3.5. Aufbau einer semiautomatischen Nanodispensierstation zur Herstellung rasterförmig angeordneter miniaturisierter MALDI-MS Proben

Um mehrere MALDI-MS-Targets in kurzer Zeit mit Proben beladen zu können, wurde eine halbautomatische Station entwickelt, welche die bereits erwähnten Module wie Mikrodispenser, Achsensystem, HARP, optische Kontrolle, Pumpen usw. vereint (s. Abbildung 2-7). Die Proben werden mit einem 16-Wege-Mikrodispensierkopf aus den Reihen einer 384er-Mikrotiterplatte entnommen und auf das jeweils vorbestimmte MALDI-MS-Target in definierten Rastern übertragen. Reihen mit verschiedenen Substanzmengen können ebenfalls am Computer voreingestellt werden. Die anfängliche Kalibrierung der piezoelektrischen Parameter muß noch manuell über den Steuer-PC durchgeführt werden. Die Kalibrierung der Tropfenauffreffpositionen mit dem HARP-System erfolgt dagegen in einem vollautomatischen Modus.

Darüber hinaus verfügt diese „Nanodispensierstation“ über eine selbstfüllende Spülstation, mit der ständig frisch filtrierte, partikelfreie, entgaste Trägerflüssigkeit (meistens eine 5%-ige wässrige EtOH-Lösung) bereitgestellt wird. Zwei Sensoren überwachen dabei den Füllstand und regeln eine zuführende Schlauchpumpe. Sollten Schmutzpartikel trotz der Vorsichtsmaßnahmen einen Dispenser verstopfen, so kann dieser in der Regel durch Ultraschallreinigung und Spülung wieder regeneriert werden. Der Ultraschall wird hierbei durch anlegen einer Wechselspannung (150 V bei 27 kHz) an den betroffenen Piezojet erzeugt.



*Abbildung 2-7: Photographie der semiautomatischen Nanodispensierstation zur Beladung von MALDI-MS Targets.*

## 2.4. Bioanalytische Methoden

### 2.4.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Eindimensional wurden Proteine unter denaturierenden Bedingungen auf vertikalen Flachgelen (120 x 160x1 mm) nach der Methode von Schägger und von Jagow (Schägger & von Jagow, (1987)) getrennt. Es wurde dabei besonders darauf geachtet, daß Ausgangschemikalien, Puffer und Gele nicht mit Staub, Wollfusseln, Hautschuppen oder andern potentiellen Keratinquellen in Berührung kommen. Die Gele bestehen von unten nach oben aus einem Trenngel, einem Zwischengel und dem Sammelgel und werden in dieser Reihenfolge gegossen. Die Formulierung für zwei Gele kann Tabelle 2-5 entnommen werden. Die Mischungen aus Acrylamid/Bis, Glycerin und Wasser wurden vor der Zugabe des Gelpuffers\* im Vakuum entgast. Während der Polymerisation wurden Trenn- und Zwischengel mit etwas wassergesättigten n-Butanol überschichtet.

Lösung / Substanz	Trenngel 17%	Zwischengel (10%)	Sammelgel (4%)
Acrylamid/Bis (30/0,8%) [ml]	34	5	2
Glycerin	8 g	-	-
H <sub>2</sub> O [ml]		5	9,25
3x Gelpuffer* [ml];	20	5	3,75
APS (10%) [µl]	200	100	200
TEMED [µl]	20	10	20
Gesamtvolumen (2 Gele) [ml]	60	15	15

*Tabelle 2-5: Polyacrylamidgelzusammensetzung nach Schägger und Jagow*

\* 3x Gelpuffer: 3M Tris/HCl, pH 8,45 – 0,3% SDS

Anodenpuffer (unten): 0,2M Tris/HCl, pH 8,9

Kathodenpuffer (oben): 0,1M Tris, pH 8,25 – 0,1% SDS – 0,1M Tricin

Die Elektrophoresekammer wurde an ihren Rändern mit heißer Agaroselösung (bestehend aus 1,5 % Agarose mit 150 ml 3x Gelpuffer und 300 ml bidestilliertem Wasser) abgedichtet.

Proteinproben und Proteinstandards (Protein Molecular Weight Standards P-6648 bis P-6649, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) wurden mit dem halben Volumen eines reduzierenden Puffers bestehend aus 170,5 mM Tris, 27,3 % Glycerin, 5,5 % SDS, 113,6 mM DTT und 0,027 % Bromphenolblau (w/v) vermischt und 5 min lang bei 95°C auf einem Thermorüttler erhitzt.

Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V über einen Zeitraum von ca. 20 h.

### 2.4.2. Coomassiefärbung von Gelen für die massenspektrometrische Peptidkartierung

Damit die im Gel eingeschlossenen Proteine für eine proteolytisches Enzym (z.B. Trypsin) zugänglich bleiben und deren Spaltprodukte anschließend leicht extrahiert werden können, muß eine Fixierung des Proteins bzw. der Spaltpeptide im Gel vermieden werden. Die Färbungen werden unter Ausschluß von Staub, Wollfusseln, Hautschuppen und andern Keratinquellen mit geringen Farbstoffmengen durchgeführt.

Dazu wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese 1,5 bis 2,0 Stunden lang in der Färbelösung aus 0,1 % (w/v) *Coomassie blue* (Brillantblau R250), 20 % MeOH und 0,5 % Eisessig besteht. Anschließend wird das Gel für etwa zwei Stunden in 30 % MeOH (= Entfärbelösung) entfärbt. Dabei wird die Entfärbelösung mindestens 3 mal ausgewechselt (zuerst nach 20, dann nach 40 min usw.).

Die interessierenden Gelbanden werden mit einem sauberen (staubfreien) Skalpell in einer *clean bench* ausgeschnitten und in 0,5 ml Eppendorff *Cups* gefüllt.

#### 2.4.3. Silberfärbung von Gelen für die massenspektrometrische Peptidkartierung

Zur Vermeidung der Keratinverseuchung und zur Verhinderung starker Fixierung gelten dieselben Anforderungen wie bei der Coomassiefärbung. Die Färbung wurde in Anlehnung an die Methode von Shevchenko et. al. (Shevchenko, Wilm *et al.*, (1996)) durchgeführt. Nach der Elektrophorese werden die Gele für 15 min in ein „leichtes Fixierbad“ aus 50 % MeOH / 5 % Eisessig gelegt, gefolgt von 10 min in 50 % MeOH und weiteren 10 min in bidest. Wasser. Zur Fixierung und Verstärkung des Färbereffektes werden die Gele 2 min lang in 0,02 %-igem (w/v) Natriumthiosulfat und anschließend 2 x 1 min lang in Wasser gebadet. Die eigentliche Silberfärbung der Gele erfolgt nun durch 20 min langes Einwirken einer 0,1 %-igen (w/v), eiskalten Silbernitratlösung in der Dunkelheit. Nach zweimaligen, einminütigen Spülen in Wasser werden die Gele in einer Lösung aus 0,04 % Formaldehyd, 2 % Soda (w/v) entwickelt. Der Entwickler wird nach seiner Braunfärbung mindestens einmal ausgetauscht. Wenn die gewünschte Intensität erreicht ist, wird der Färbeprozess durch Verwerfen des Entwicklers und Zugabe von 5 % Eisessig (5 min) abgestoppt.

#### 2.4.4. „In-Gel“ Prozessierung und Proteolyse von Proteinen

Die Proteolyse von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen erfolgte in den Gelbanden bzw. -Spots nach einer von Shevchenko, Wilm *et al.*, (1996) abgeleiteten Methode.

**Abbaupuffer** = 50 mM Ammoniumbicarbonat (ABC)

- 1.) **Waschen und Entfärben:** Für Gelvolumina von ~5 µl Zusatz von 50-100µl Acetonitril in Abbaupuffer. Nach ca. 1-2 h wird das Lösungsmittel (LSM) ausgetauscht.
- 2.) **Reduktion und Alkylierung** (nicht unbedingt obligatorisch): Zugabe von 3-5 µl 10 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in 100 mM ABC. Nach 10 min. + 20 µl Abbaupuffer. Es wird ½ h bei 30°C auf einem Thermorüttler geschüttelt. Der Überstand wird verworfen und 20 µl 50 mM Iodacetamid in Abbaupuffer zugesetzt. Dieses Alkylierungsreagens soll 50 min. bei RT in der Dunkelheit einwirken. Anstelle des Iodacetamids sind 2 µl 4-Vinylpyridin + 20 µl Abbaupuffer verwendbar. Auf die Abdunklung kann in diesem Fall verzichtet werden. Anschließend: Überstand verwerfen.
- 3.) **Waschen:** Zugabe von 50 µl Acetonitril, dann etwa 10-15 min. warten, bis das Gel zu einem kleinen weißen Gebilde zusammengeschrumpft ist. Der Überstand wird abgesaugt und 50 µl Abbaupuffer zugegeben. Nach dem Aufquellen des Gelstücks wird der restliche Überstand entfernt. Diese Prozedur wird noch einmal wiederholt. Anschließend läßt man das Gelstückchen noch einmal in 50 µl Acetonitril schrumpfen. Das LSM wird entfernt.
- 4.) **Proteolyse:** Zugabe von 1-2 µl Trypsin (100 ng/µl) in Abbaupuffer. Nach ~5 min hat das Gelstückchen die Trypsinlösung komplett aufgesaugt. Es werden 10 µl Abbaupuffer zugesetzt. Der Abbau erfolgt über Nacht (6-8 h) bei 37°C auf dem Thermorüttler oder im Trockenschrank. Anschließend wird er Überstand entfernt und aufgehoben.
- 5.) **Elution:** Das Gelstückchen wird mindestens 6 h in 60 % Acetonitril in 0,1% TFA geschüttelt. Das Eluat wird entnommen und mit dem Überstand aus 4.) vereinigt. Das erhaltene Abbaupeptid-Extrakt kann entweder direkt gemessen (s. Kapitel 2.5), eingefroren oder weiter aufgereinigt werden. Ggf. sind die Extrakte zu lyophilisieren und im favorisierten LSM zu lösen.

#### 2.4.5. „On-Membrane“ Proteolyse von Proteinen

Auf PVDF-Membranen geblottete Proteine werden nach der Methode von Pappin, Rahman *et al.*, (1995) proteolytisch abgebaut. Hierzu wird die Membran mit Sulforhodamin B gefärbt und die jeweilig interessierende Proteinbande knapp ausgeschnitten. Das Membranstückchen wird mit bidest. Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Anschließend zerteilt man das Membranstück in kleinere Teile und benetzt diese in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 15-20 µl Abbaupuffer, bestehend aus 50 mM ABC, 1% O-Octyl-β-D-glycopyranosid, 0,4 ng/µl Trypsin. Das luftdicht verschlossene Gefäß wird 18 h bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Die Peptide werden nach dem Lyophilisieren der Membranstückchen 3 mal mit je 200 µl Extraktionslösung (Ameisensäure/EtOH 1:1 (v/v)) extrahiert. Die Extrakte werden vor der massenspektrometrischen Analyse vereinigt, lyophilisiert und im jeweils erforderlichen Lösungsmittel aufgenommen.

#### 2.4.6. „On-Target“ Proteolyse von Proteinen

Um den Verlust von hydrophoben Peptiden durch Adhäsion an Gefäßwände zu verhindern, werden gereinigte Proteine (z.B. Pili, s. Abschnitt 2.4.7 und 3.5.5) direkt auf dem MALDI-MS-Proben-träger (Target) abgebaut. Hierzu werden 0,5 µl der Protein- Lösung oder Suspension (~0,5-2,0 µg/µl) auf eine Targetposition pipettiert. In diesen Tropfen werden 0,5 µl frisch hergestellte Trypsin- oder Chymotrypsin-Lösung (0,25 µg/µl in 0,1 M ABC) eingetragen. Zusammen mit einem feuchten Streifen Filterpapier wird das Target nun in eine Kunststoffdose eingeschlossen, ohne daß der eng aufliegende Dosendeckel den Tropfen berühren kann. Während der Abbaizeit (1-6h) wird das Target durch Bestrahlung mit einer 60 W Glühbirne, die 40-50 cm über dem Target angebracht ist, auf 37° erwärmt. Nach dem Entfernen des Deckels werden 0,5 µl Matrixlösung in die noch nicht eingetrocknete Probe pipettiert. Vor der Messung werden die vakuumgetrockneten Matrix/Proben-Kristalle kurz mit 5%-iger eiskalter TFA gewaschen (s. Abschnitt 2.5.2). Ein ähnliches Verfahren für den „On-Target“-Abbau ist bei Glocker, Jetschke *et al.*, (1998) beschrieben.

#### 2.4.7. „Tryptische“ Pilus-Reinigung

Ein 10 µl Aliquot der aus mehrstufiger Gradientenzentrifugation stammenden Pilus-Präparation wird mit 0,5 µl Trypsinlösung (100 ng/µl in 0,1 M ABC) versetzt. Nach einstündigem Schütteln bei 37°C werden die Pili bei 15000g innerhalb von 4 min abzentrifugiert und 2-3 mal mit bidestilliertem Wasser gewaschen (dazu jeweils erneut zentrifugiert).

#### 2.4.8. Zellüberstände und Zellsuspensionen für die MALDI-MS Analyse

Kleine Portionen von Zellen werden von Agar-Kulturplatten mit einer Impföse geerntet und in ~1-2 ml 0,1%-iger TFA aufgenommen bis eine OD<sub>600</sub> ≈ 2 eingestellt ist (Welham, Domin *et al.*, (1998)). Ein 1 ml Aliquot wird entnommen und bei 15000g 4 min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und sedimentierten Zellen in 250 µl 0,1%-iger TFA resuspendiert. Je 0,5 µl Aliquote der Zellsuspensionen werden wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, nach der „Sandwich“-Probenpräparation, für die MALDI-MS vorbereitet und analysiert.

#### 2.4.9. Aufzucht von RP4-haltigen *E. coli* Zellen zur Proteinextraktion und 2-DE

Zur Anzucht der *E. coli* Stämme SCS1, SCS1(pGZ119EH) und SCS1(pDB126) wird YT-Medium (1%(w/v) Trypton; 0,5%(w/v) Hefeextrakt; 0,5% NaCl) nach Miller, (1972), verwendet. Für jeden Stamm werden 200 ml des autoklavierten YT-Mediums mit 2,5 ml Thiaminhydrochlorid, 0,5ml 40% Glukose und 5 ml 1 M 3-(N-Morpholino-)propansulfonsäure (mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt) eingesetzt. Den Chloramphenicol-resistenten *E. coli* Bakterien SCS1(pGZ119EH) und SCS1(pDB126) wird zusätzlich jeweils 200 µl Chloramphenicol-Lösung (10mg/ml) in das

Nährmedium gegeben. Nach ~18 h schütteln bei 37°C werden die Bakterien in einer Beckmann J2-2/M/E-Zentrifuge bei 8000 min<sup>-1</sup> mit einem JA14-Rotor (≙ 9800g) 10 min lang bei 4°C abzentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets werden bei -70°C eingefroren.

Die Proteinextraktion und vergleichende zweidimensionale Gelelektrophorese wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. Joachim Klose (Charité, Berlin) nach dem von ihm beschriebenen Verfahren durchgeführt (Klose & Kobalz, (1995)).

#### 2.4.10. Mikrosäulenaufreinigung von Peptiden

Eine Spatelspitze Poros 50 R1 und R2 - Material (PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts, USA) wird mit ~250 µl MeOH aufgeschlämmt und in einen an seiner Spitze zusammgedrückten „*GELloader*<sup>®</sup>-Tip“ (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) transferiert, so daß nach dem Durchlaufen weiteren MeOHs eine ca. 2-3 mm lange Minisäule aus Poros-Material zurückbleibt. Das Zusammendrücken des *GELloaders*<sup>®</sup> erfolgt mit einer Pinzette derart, daß das Poros-Material beim Durchpressen von Flüssigkeiten nicht herausgespült wird (Übungssache, s. Gobom, Nordhoff *et al.*, (1999)).

Die Minisäule wird durch langsames Hindurchpressen von 40 µl 0,1 %-iger TFA (v/v), gefolgt von 40 µl 50 %-igem Acetonitril und abschließenden, weiteren 40 µl 0,1 %-iger TFA konditioniert. Das Durchpressen gelingt am besten mit einer 1 ml Einwegspritze, auf die statt einer Kanüle ein kurzes Stück Silikonschlauch aufgesetzt wurde.

Auf die konditionierten Minisäulen kann nun die wässrige Lösung aufzureinigender Peptide aufgetragen werden (1-20 µl). Die Säule wird darauf hin mit 40 µl bidest. Wasser oder 0,1%-iger TFA gespült. Anschließend werden die Peptide mit 2-5 µl 40-60 %-igem Acetonitril (v/v) in 0,1%-iger TFA eluiert.

#### 2.4.11. Aufreinigung von Peptiden mit magnetischen Partikeln

50µl Aliquote von Suspensionen magnetischer Partikel 2,5 mg/ml mit Silikat-modifizierten Octadecyloberflächen und 250 nm Partikel-Ø (Sonderanfertigung von Microcaps, Rostock; Lot-Nr. 09-25 220-005) werden gewaschen und ähnlich wie das bereits beschriebene Poros-Material konditioniert (s. Abschnitt 2.4.10). Hierzu werden die Partikel zunächst in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit starken Permanentmagneten (Fe/Nd/B-Magnete, 1,4 T, von IBS-Magnet, Berlin) an der Gefäßwand immobilisiert und die überstehende Flüssigkeit mit einer Pipette abgesaugt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 50 µl 0,1 %-iger TFA (v/v) in der die Partikel resuspendiert werden. Nach erneuter magnetischer Separation werden die Partikel mit je 50 µl 60 %-igem Acetonitril (v/v) in 0,1 %-iger TFA gewaschen und wieder in 50 µl 0,1 %-iger TFA suspendiert. Diese Suspension wird mit ca. 100 µl der Lösung aufzureinigender Peptide versetzt. Nach gründlichem Schütteln wird die Flüssigkeit von den magnetisch separierten Partikeln entfernt und gegen 15 µl Wasser ersetzt. Nach erneutem Schütteln und magnetischer Immobilisierung werden ~3-5µl Elutionsmittel zugeführt (= 60 %-iges Acetonitril (v/v) in 0,1 %-iger TFA). Die eluierten Peptide können direkt der massenspektrometrisch analysiert oder eingefroren werden.

### 2.5. Massenspektrometrie

#### 2.5.1. Automatische und manuelle MALDI-TOF-MS Analysen

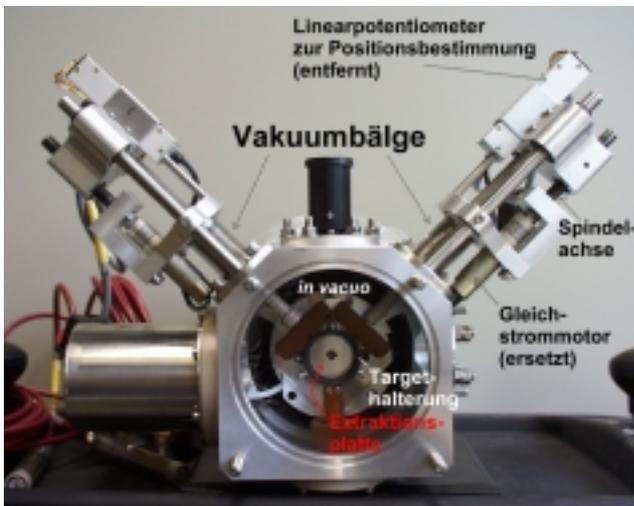
MALDI-MS Analysen werden auf einem Bruker Reflex-II Flugzeitmassenspektrometer durchgeführt (Bruker-Franzen, Bremen). Das Gerät ist mit einem UV-Stickstofflaser ( $\lambda = 337,5$  nm), einer Ionenquelle mit verzögerter Extraktionstechnologie (*delayed extraction*), einem zweistufigen Reflektor sowie mit zwei dualen Mikrokanalplatten-Detektoren (*MCPs*) ausgestattet.

Die Analyse von Peptidgemischen (z.B. zur Peptidkartierung) bis  $m/z \sim 4500$  und die Analyse von Proteinen bis  $m/z \sim 25000$  erfolgt im Reflektormodus mit eingeschalteter verzögerter Ionenextraktion. Proteine mit größerer Masse werden dagegen im linearen Modus gemessen.

Die Proben können entweder manuell oder unter Verwendung des Programms AutoXecute™ (Bruker-Franzen, Bremen) automatisch gemessen werden. Anhand vordefinierter *Fuzzy-Logic* Parameter überprüft das Programm eigenständig Signalstärke und massenspektrometrische Auflösung. Ein *Fuzzy-Logic* Algorithmus entscheidet so über die Spektrenakkumulation und regelt automatisch die Intensität des Laserpulses (Jensen, Mortensen *et al.*, (1997)).

Zur präzisen Ansteuerung kleiner, rasterförmig angeordneter Substanzspots wurde die originale, mit Gleichstrommotoren betriebene, nichtlineare Verfahreinrichtung (s. Abbildung 2-8, a) der Targethalterung der Ionenquelle durch eine Eigenkonstruktion ersetzt. Diese verfährt den an zwei Vakuumbalgstangen aufgehängten Targettisch über zwei Mikromanipulatoren (LN 25 Luigs und Neumann, Ratingen) welche von Schrittmotoren angetrieben werden (s. Abbildung 2-8, b). Das Achssystem besitzt eine Verfahrengenauigkeit von 250 nm, die durch das Spiel der aus Kunststoff gefertigten Tischführungen auf  $\sim 15 \mu\text{m}$  herabgesetzt ist. Der ovale Laserspot ist auf der Targetoberfläche zu einem Durchmesser von 50-70  $\mu\text{m}$  fokussiert. Die Motorsteuerung erfolgt über die von Luigs und Neumann gelieferte Steuerelektronik und das selbstgeschriebene LabView-Programm „MALDI-Target motion control“, welches auf dem im Massenspektrometer integrierten Sun-Computer betrieben wird. Die Kommunikation zwischen Computer und Verfahrelektronik wird über eine serielle Schnittstelle (RS232) realisiert. Für automatische Messungen unter Verwendung des AutoXecute™ Programmes wird ein ebenfalls unter LabView programmierter TCPIP-Server verwendet, der die Kommunikation zwischen dem „MALDI-Target motion control“ und der Spektrenaufnahme herstellt\*.

a)



b)



**Abbildung 2-8:** a) Vorderansicht der geöffneten Ionenquelle mit Gleichstrommotoren vor dem Umbau.

b) Eingebaute neue Ionenquelle mit Schrittmotor- und Mikromanipulatorgetriebenen Targethaltetisch (Ansicht von hinten)

\* Für die hierzu erforderliche Anpassung des AutoXecute™ danke ich herzlich Herrn Dr. Karl-Otto Kräuter von der Firma Bruker-Franzen, Bremen.

### 2.5.2. Probenpräparation für die MALDI-MS Analyse

Zur Analyse von Peptidgemischen werden als Matrixlösungen 20 mg/ml HCCA in einem Acetonitril / Isopropanol-Gemisch (1:1 v/v) verwendet. Für Proteinuntersuchungen eignen sich gesättigte Lösungen von DHB, SA, HABA in Acetonitril / 0,1% TFA (2:1 v/v) und auch Lösungen von 40 mg/ml IAA in Acetonitril / Isopropanol. Die letztgenannte Lösung wird erfolgreich zur Untersuchung von Zellsuspensionen und Zellüberständen eingesetzt.

1. **Dünnschichtpräparation:** Ein dünner Matrixfilm wird erstellt indem die Spitze einer 2  $\mu$ l Pipette mit Matrixlösung gefüllt und anschließend an den vorgesehenen Positionen auf das Target getupft wird. Dabei werden jedesmal etwa 0,1 bis 0,2  $\mu$ l Matrixlösung aufgetragen. Das Lösungsmittel verdunstet augenblicklich und hinterläßt einen dünnen Matrix-Kristallfilm von ca. 3 mm Durchmesser. Die peptidhaltigen Probenlösungen werden nun auf diese Kristalloberfläche pipettiert ( $v \approx 0,3 \mu$ l;  $c \approx 0,5$  bis  $0,1$  pmol Peptide /  $\mu$ l).
2. **„dried droplet“ Probenpräparation:** 0,3 bis 0,5  $\mu$ l Probenlösung werden vorgelegt und anschließend mit dem gleichen Volumen an Matrixlösung auf dem Target vermischt. Durch mehrmaliges Einsaugen und Abgeben der Lösung mit der Pipette wird gemischt, ohne daß die Probe über das Target verläuft.
3. **„Sandwich“ Probenpräparation:** Zunächst wird eine Matrixdünnschicht wie in 1. vorgelegt. Auf diese wird die Probe pipettiert und wie in 2. mit dem gleichen Volumen an Matrixlösung vermischt.

Die in 1. bis 3. hergestellten MALDI-MS-Proben werden nach dem Eintrocknen durch kurzzeitiges Auftäufeln und sofortiges Wegsaugen von je 0,5  $\mu$ l 4°C kalter 5 %-iger TFA gewaschen. Zur Messung von Zell- Suspensionen und Überständen wird die „Sandwich“-Präparation (3.) bevorzugt.

4. **Dünnschicht Matrixfilm für mikrodispensierte Proben:** Die 21 x 21 mm großen, aus poliertem Edelstahl bestehenden Targetplättchen (Bruker-Franzen, Bremen) werden mit Ethanol und Aceton ausgiebig gereinigt. Anschließend werden 10  $\mu$ l der Matrixlösung (20 mg/ml HCCA, 0,5 mg/ml NC in Acetonitril / MeOH [2:1 v/v]) in der Mitte des Targetplättchens aufgebracht und mit einem Objektträger bedeckt. Langsam und unter leichtem Andruck wird der Objektträger seitlich vom Targetplättchen abgezogen, während die Matrix im Luftstrom getrocknet wird. Bei diesem Vorgang wird das Targetplättchen sinnvoller Weise von der Unterseite mit einem Magneten fixiert. Der verbleibende Matrixfilm bedeckt das ganze Target und schillert aufgrund des Dispersionseffekts in den Spektralfarben. Die so beschichteten Targets lassen sich mehrere Tage im stickstoffgefüllten Exsikkator in der Dunkelheit lagern.
5. **mikrodispensierte Dünnschichtspots:** Auf die gründlich gereinigten (s. oben) Targetplättchen werden Substanzraster einer Matrixlösung dispensiert. Z.B. für Peptidanalysen: je Spot 200 Mikrotropfen (~20 nl) 1 mg/ml HCCA in 3,3 % MeOH / 16,6 % Acetonitril in 0,1 % wässriger TFA.

### 2.5.3. ESI-MS / MS

Elektrospray-massenspektrometrische MS und MS/MS Analysen werden auf einem API 300 Trippel-Quadrupol-ESI-MS Gerät von PE/Sciex (Concord, Ontario, Kanada) durchgeführt. Für alle Untersuchungen (s. Abschnitt 3.4) wurde die Mikroionspray<sup>®</sup>-Ionenquelle bei einer Flußrate von 200 nl/min verwendet. Peptide wurden in 1:1(v/v) Gemischen aus Acetonitril und 0,5%-iger Essigsäure gelöst.

Zur MS/MS Analyse eines doppelt geladenen Peptidions von MetHis<sub>6</sub>TraH bei m/z 617,7 wurden die folgenden Geräteparameter eingestellt (s. auch Abbildung 1-3): *Nebulizer*-Gas: Ventilstufe 1; *Curtain*-Gas: Ventilstufe 6; *CAD*-Gas: Ventilstufe 1; *Sprayspannung* (IS): 5500 V; *Orifice-Potential* (OR): 40 V; *Ringspannung* (RNG): 300 V; *Ion-guide* (Q0): -9 V; IQ1: -6,6 V; *Stubbies*

(ST): -13,1 V; RO1: -13,6 V; IQ2: -50 V; RO2: -30 V; IQ3: -66,9 V; RO3 -53,7 V; Deflektor (DF) - 400 V; Detektor (CEM): 2100 V.

## 2.6. Programmierung und Software

Sämtliche Computerprogramme wurde in der graphischen Programmiersprache LabView Versionen 3.1 bis 5.0.1 (National Instruments, Austin, Texas, USA) erstellt. Eine Beschreibung graphischer Programmieretechnik findet sich bei Pichlik & Klein, (1998).

LabView-Programm*	Aufgabe / Kommentar
<b>Robodrop</b>	Steuerung der semiautomatischen Nanodispensierstation zur Beladung von MALDI-MS Targets / Steuerung des Achsensystems, HARP-Positionskalibrierung, Ventile und Pumpen sowie Pulsgeneration für die PiezoJets und die <i>Strobe</i> -LED über eine Timer/Counter-Karte (NI-PC-TIO10)
<b>MALDI-Target-Motion Control</b>	Steuerung des Probenstisches in der MALDI-MS Ionenquelle
<b>MaasTool</b>	Berechnung von monoisotopischen und durchschnittlichen Massen auf der Basis von Summenformeln oder AS-Sequenzen; außerdem werden Isotopenverteilungen berechnet und graphisch dargestellt
<b>Map-It</b>	Programm zur Simulation enzymatischer und chemischer Proteolysen
<b>MALDI-MS Peak Processor</b>	Automatische Extraktion von MS-Daten / 5-facher Gaußkurvenfit zur Bestimmung monoisotopische aufgelöster und nicht aufgelöster Signale; Erstellung von Peaklisten mit S/N-Gewichtung
<b>Filter Specs</b>	Bearbeitung von Peaklisten / Subtraktion von Kontrollspektren durch Filtration von Matrix, Autoproteolyse und Keratinsignalen
<b>IsoSim</b>	Simulation von Isotopenverteilungen von Peptiden, die nach dem Zufallsprinzip generiert werden / Algorithmus der FFT-basierten Berechnung isotopischer Intensitätsmuster nach Rockwood, Van Orden <i>et al.</i> , (1996)

Ferner wurden die folgenden wissenschaftlichen Programme eingesetzt:

Programm	Verwendung / Kommentar
<b>MS-Fit</b> des web-gestützten „Protein Prospector“ Paketes von Baker, P.R. und Clauser, K.R.; <a href="http://prospector.ucsf.edu">http://prospector.ucsf.edu</a>	Datenbanksuchen zur Proteinidentifikation mit Abbaupeptidmassen
<b>SPCSAN, PILEUP, FASTA, TFASTA</b> und diverse andere Programme des <b>GCG</b> Packets der Wisconsin Genetics Computer Group Version 7.3 bis 9.0 auf DEC-System	Homologievergleiche, Vorhersage von Signalpeptiden, Darstellung mehrerer homologer Sequenzen. Formatumwandlungen
<b>IsoPro 3.0</b> von <i>MS/MS-Software</i> , Mike Senko, 243 Buena Vista Ave. #502, Sunnyvale, CA 94086, USA.	Berechnung von Isotopenverteilungen nach dem Algorithmus von Yergey, (1983)
<b>PepSeq 3.5</b> von Frank Lützenkirchen (1996) Universität-Düsseldorf	Berechnung und graph. Darstellung von PSD (und CID) Fragmentschemata

\* Diese selbsterstellten Programme sind aufgrund ihres Umfangs nicht abgedruckt, können jedoch beim Autor eingesehen werden