

3 Materialien und Chemikalien

3.1 Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen

Tabelle 4 Peptidstandards zur Kalibrierung der Massenspektrometer im Massenbereich 500 –4000 Da; Stammlösung enthält je 1,0 µmol des jeweiligen Peptids.

Peptide	Aminosäuresequenz	[M+H] ⁺ - monoisotopisch	Bezugsquelle
Angiotensin II (human)	<i>H-DRVYIHPF-OH</i>	1046,5423	Bachem
Angiotensin I (human)	<i>H-DRVYIHPFHL-OH</i>	1296,6853	Bachem
Substance-P-methylester	<i>H-RPKPQQFFGLM-O-CH₃</i>	1362,7356	Bachem
Neurotensin (1-11)	<i>H-pELYENKPRRPY-OH</i>	1446,7494	Bachem
Neurotensin	<i>H-pELYENKPRRPYIL-OH</i>	1672,9175	Bachem
ACTH(1-17)	<i>H-SYSMEHFRWGKPVG KKR-OH</i>	2093,0867	Bachem
ACTH(18-39) human (CLIP)	<i>H-RPVKVYPNGAEDESA EAFPLEF-OH</i>	2465,1989	Bachem
Somatostatin-28	<i>H-SANSNPAMAPRERKA GCKNFFWKFTTSC-OH</i>	3147,4715	Bachem

Tabelle 5 Sonstige Chemikalien und deren Bezugsquellen.

Chemikalien	Bezugsquelle
α-Cyano-4-hydroxymethylimidazoliumchlorid (CHCA)	Sigma
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol(DTT)	Sigma
Iodacetamid	Sigma
Lösungsmittel: Aceton, EtOH, Acetonitril (alle p.a oder <i>gradient grade</i>)	Merck
n-Oktylglycopyranosid	Merck
Poly(propylen)glykol (PPG)	Aldrich
Trifluoressigsäure	Fluka
TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Trypsin	Promega

3.2 Methoden

3.2.1 Massenspektrometrie

Alle MALDI-MS Analysen wurden auf Flugzeitmassenspektrometern (Scout-MTP Reflex II bzw. Bruker Reflex III) der Firma Bruker Daltonik AG (Bremen) durchgeführt. Die Geräte sind mit einem Stickstofflaser ($\lambda=337\text{nm}$) und einer Ionenquelle mit verzögerter Extraktionstechnologie („*delayed extraction*“) ausgestattet. Die Analyse der Peptidgemische erfolgte im Reflektormodus. Es wurden ausschließlich positiv geladene Ionen analysiert und zur Verbesserung des Signal-zu-Rauschverhältnisses typischerweise 100 oder 200 Einzel-schußspektren aufsummiert. Die aufsummierten Spektren wurden anschließend mit der Software XMASS 5.01 (Bruker Daltonik AG, Bremen) im „batch“-Modus vollautomatisch prozessiert. Für die automatische Massenbestimmung („*Peak Picking*“) wurde der in XMASS 5.01 verfügbare „*SNAP*“-Algorithmus verwendet. Nach einer Basislinienkorrektur wurden alle Peaks oberhalb einer minimalen relativen Signalintensität von 0,005 mit einer Empfindlichkeit von 1 und einer Güte („*Godness-Value*“ in XMASS 5.01) von > 500 analysiert.

3.2.2 Probenpräparation

Die Probenpräparation wurde wie unter [42] beschrieben durchgeführt.

3.2.3 Präparation der Kalibranten

Peptidstandard I

Der Peptidstandard I enthält die in Tabelle 4 aufgelisteten Peptidstandards in

einer Konzentration von je 1pmol/ μ l. Die Matrixlösung (α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure (CHCA) in 99% Aceton, 0,001% TFA, gesättigt) wurde mit dem Peptidstandard I im Verhältnis 4:1 gemischt.

Peptidstandard II

Der Peptidstandard II besteht aus je 1:10000 (v/v) Verdünnungen von drei Polypropylenglykollösungen (Mr 1000, 2000, und 2700) in 99% Aceton, 0,001% Trifluoressigsäure (TFA), die im Verhältnis 1:2:3 (v/v) gemischt wurden. Die Matrixlösung (CHCA in 99% Aceton, 0,001% TFA, gesättigt) wurde mit dem Polypropylenglykolgemisch (PPG) im Verhältnis 4:1 gemischt.

3.2.4 2D-Gelelektrophorese

Die untersuchten durch 2D-Gel-Analyse getrennten und mit Coomassie G250 Brilliant Blau gefärbten Proteinproben aus menschlichem Gehirn wurden freundlicherweise von Dipl. Biologe Patrick Giavalisco angefertigt und von Prof. Dr. Dr. Joachim Klose, Institut für Humangenetik, Forschungshaus, Charite CVK, Berlin, Deutschland zur Verfügung gestellt. Die Gelspots wurden mit der unter 1.4.1 bereits erwähnten, im Hause entwickelten Ausstechrobotoranlage ausgestochen und in eine 384er Mikrotiterplatte überführt. Die Proben wurden durch Zugabe von 40 μ L 25%-igen Isopropanol je Gelspot entfärbt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die gesamte Flüssigkeit durch zentrifugieren (10 min , 2500 U/min ; 5810 R Zentrifuge, Eppendorf, Deutschland) entfernt. Anschließend wurden je Probe 5 μ l Trypsin-Lösung (10 ng/ μ L in 5 mM DTT, 5 mM Tris-HCl, pH 7.8) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5h bei 37°C wurde die Trypsinspaltung durch Zugabe von 5 μ L 10 mM n-Octylglucopyranosid in 1%-iger TFA gestoppt. Nach erneuten 30min Inkubationszeit bei

Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (10 min, 2500 U/min) waren die Peptidextrakte für die massenspektrometrische Messung fertiggestellt.

3.2.5 Bioinformatik

Die Implementierung der hier vorgestellten Algorithmen und des Softwarepaketes „MS-Proteomics“ wurde mit der Programmiersprache Java [63-73] von der Firma Sun Microsystems, Inc. basierend auf dem Java Development Kit 1.1.2 [74] durchgeführt. Das Softwarepaket „MS-Proteomics“ wurde unter Verwendung objektorientierter Programmier Techniken entwickelt. Die Serveranwendung, d.h. der Teil der Anwendung, der die Datenbanksuche und die Berechnung des „Scoring“-Faktors (siehe 4.2 und 4.3) ausführt, wurde auf einem Athlon 600 MHz mit 256 MB Arbeitsspeicher und einer Festplattenkapazität von 20 GB installiert. Die Client-Anwendung, d.h. der Teil des Softwarepaketes der die Ergebnisse der Serveranwendung empfängt, aufarbeitet und darstellt (siehe 4.3) wurde auf einem 500 MHz Athlon, mit 128 MB Arbeitsspeicher und einer Festplattenkapazität von 10 GB installiert. Die Datenbanksuche wurde in den im Internet frei zugänglichen Proteinsequenzdatenbanken Swiss-Prot, European Bioinformatics Institute (EBI) und "*NCBI non-redundant*", NCBI, USA durchgeführt. Um die Geschwindigkeit eines Suchlaufes zu erhöhen, wurde der physische Zugriff auf die Daten optimiert. Dazu wurden die verwendeten Datenbanken indiziert und die für die Suche relevanten Daten (z.B. Proteinsequenz, Proteinname u.a.) über sogenannte „Record-ID's“ adressiert. Dieser Vorgang benötigte für beide Datenbanken ca. 30 min und wurde während der Installation der Server-Anwendung durchgeführt.