

Inhaltsverzeichnis

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

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