

Massenspektrometrische Analytik komplexer Peptidgemische

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sabine Metzger

aus Aachen

Düsseldorf 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. B. Spengler

Korreferent: Prof. Dr. D. Riesner

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2001

Druck und Einband: Druckerei Nowée GmbH, Düsseldorf

Danksagung

Mein grösster Dank gehört Prof. Dr. Raimund Kaufmann, nicht nur weil er es mir ermöglicht hat am Institut für Lasermedizin meine Doktorarbeit durchzuführen, sondern vor allem weil er dort eine Arbeitsatmosphäre geschaffen hat, die vom Interesse an der Sache getragen wurde, aber auch vom Spass an der Forschung und nicht zu sehr auf Kosten und Nutzen ausgerichtet war. Forschen bedeutete für ihn „mit der Eisenbahn spielen zu dürfen“. Prof. Dr. Raimund Kaufmann starb am 1. Sept. 1997. Seine Art sich mit der Wissenschaft auseinander zu setzen wird mir immer Vorbild sein.

Des weiteren danke ich Prof. Dr. Bernhard Spengler, der trotz der räumlichen Trennung Zeit für die Betreuung meiner Doktorarbeit gefunden hat und Prof. Dr. Detlev Riesner, der das Doktorat übernommen und meine Doktorarbeit vor der Fakultät vertreten hat, sowie Dr. Ralf Hoffmann der mir vor Ort bei den täglichen Problemen einer Doktorarbeit zur Seite stand.

Doch es sind nicht nur die Diskussionen mit unseren Betreuern, die uns weiterbringen oder helfen, mit dem Frust über nicht gelingende Versuche fertig zu werden. Es sind vor allem die MitdoktorandInnen und MitarbeiterInnen des Instituts. Gerade am Institut für Lasermedizin mit seiner bunten Mischung aus ChemikerInnen, PhysikerInnen, BiologInnen, MedizinerInnen und PharmazeutInnen gab es immer einen, für den das ganze gar kein Problem war. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Auch hat diese bunte Mischung noch andere Vorteile. Sie hat mich die unterschiedliche Sichtweise der gleichen Dinge gelehrt. Es ist gar nicht so einfach die „Sprache“ der Physiker zu lernen bzw. zu verstehen. Doch ich hatte ganz gute Lehrer.

Da ist Marco, der mit mir zum Schluss gemeinsam die Fahne der Massenspektrometrie in Düsseldorf hochgehalten hat, für den es kein Problem ist, mal eben schnell einen Importfilter zu schreiben oder ein kleines Programm zum UV-Daten auslesen.

Auch meine anderen Lehrer waren nicht ohne. Werner, der meine Ideen für den Probenpräparationsroboter in Platinen und Steuersoftware umgesetzt hat. Achim, der in unserer beider Spezialdisziplin ein guter Mitspieler war, sowie Dieter und Peter.

Dank Telefon und Internet standen Sie mir auch nach ihrer „Auswanderung“ jeder Zeit mit Rat und ab und zu auch mit Tat zur Seite. Ich denke wir waren ein ganz gutes interdisziplinäres Team.

Dr. Klingmüller von HorVerFit Pharma GmbH danke ich für die Überlassung des Arzneimittelwirkstoffes Polyerga.

Zum Schluss möchte ich mich auch noch bei all jenen bedanken, die auf die eine oder andere Art und Weise dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstanden ist.

INHALT

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
	Problemstellung	2
2	GRUNDLAGEN ANALYTISCHER METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG KOMPLEXER MISCHUNGEN	6
2.1	MALDI	6
2.1.1	Delayed Extraction	8
2.1.2	Matrix	9
2.1.3	Präparationstechniken.....	10
2.1.4	MALDI-MS von Peptidgemischen	11
2.2	Post-Source Decay (PSD)-MALDI	13
2.2.1	Fragmentierung / Sequenzierung.....	15
2.2.2	Strukturaufklärung von Proteinen.....	17
2.2.3	Posttranslationale Modifikationen.....	19
2.3	Kapillarelektrophorese (CE)	21
2.3.1	Allgemeine Einführung	21
2.3.2	Aufbau der Kapillarelektrophorese	22
2.3.3	Puffer	22
2.3.4	Elektroosmotischer Fluss (EOF)	23
2.3.5	Kapillare.....	23
2.3.6	Injektion	24
2.3.7	Detektion	25
2.3.8	CE Methoden.....	26
2.3.9	Beeinflussende Faktoren.....	27
2.3.10	CE-MALDI Kopplung	27
2.4	Native Peptidgemische	29
2.4.1	Arzneimittelwirkstoff Polyerga®	29
2.4.2	MHC-Klasse I Peptide	29
2.4.3	Phosphopeptide.....	34

3	ERGEBNISSE	37
3.1	Methodenentwicklung zur kapillarelektrophoretischen Trennung von Peptiden	37
3.1.1	Abhängigkeit der kapillarelektrophoretischen Trennung vom pH-Wert	39
3.1.2	Einfluß der Kapillare auf die Trennung	40
3.1.3	Steigerung der Detektionsempfindlichkeit	42
3.1.4	Einfluß der Konzentration des Elektrolyten auf die kapillarelektrophoretische Trennung	43
3.2	CE-MALDI Kopplung	44
3.2.1	Entwicklung des Präparationsroboters	44
3.2.2	Temperierbare Proben Targets	45
3.2.3	Automatisierte Probenfraktionierung	46
3.3	MALDI-MS von Peptid-Gemischen	50
3.3.1	Einfluss von Basizität und Hydrophobizität auf die Signalintensitäten von Peptidgemischen	50
3.4	Primärstrukturanalyse von Peptiden in komplexen Mischungen	59
3.4.1	Identifizierung von Peptiden im Arzneimittelwirkstoff Polyerga [®]	59
3.4.2	Identifizierung von MHC-Klasse I Peptiden eines Nierenkarzinoms	74
3.4.3	Phosphopeptide	87
4	ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION DER ERZIELTEN ERGEBNISSE	112
5	MATERIAL UND METHODEN	115
5.1	Chemikalien	115
5.2	Peptide	116
5.2.1	Synthetische MHC Klasse I Peptide	116
5.2.2	Synthetische Phosphopeptide	117
5.3	Geräte	118
5.3.1	Massenspektrometer	118
5.3.2	Kapillarelektrophorese	120
5.3.3	Präparationsroboter	121

5.4	Methoden	123
5.4.1	MALDI.....	123
5.4.2	CE.....	123
5.4.3	Peptidlösungen.....	124
5.5	Software	125
5.5.1	MASS.....	125
5.5.2	ULISSES (Universal Laser Ionization Spectrometry System's Evaluation Software)	126
5.5.3	PepSeq.....	126
5.5.4	Peptide LEGO	127
5.6	Datenbankanalyse	127
6	LITERATUR	128
7	ANHANG	143
7.1	Proteinsequenzen der gefundenen Ursprungproteine der identifizierten Peptide.	143
7.2	PSD Spektren der MHC-Klasse I Moleküle	144

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALADIM	Advanced Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometer
ATP	Adenosintriphosphat
AU	engl.: Absorption unit Absorptionseinheiten
Caps	3 [Cyclohexylamino]-1-Propansulfonsäure
CE	engl.: Capillary Electrophoresis, Kapillarelektrophorese
CI	Chemische Ionisation
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DNA	engl.: Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EI	Elektronenstoß Ionisation
EOF	Elektroosmotischer Fluß
ESI	Elektrospray Ionisation
FAB	engl.: Fast Atom Bombardment
FD	Felddesorption
FMOc	9-Fluorenylmetoxycarbonyl
H/D	Wasserstoff/Deuterium
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HPLC	engl.: High Performance Liquid Chromatography, Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
HV	engl.: High Voltage Hochspannung
LAMMA	Laser Microprobe Mass Analysis
LD	Laser Desorption
MALDI	engl.: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization, Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MHC	engl.: Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MS	Massenspektrometrie
NMR	engl.: Nuclear Magnetic Resonance,
PD	Plasma Desorption
PEEK	Polyetheretherketon
PEG	Polyethylenglykol
PHF	engl.: Paired helical Filament

PSD	engl.: Post Source Decay, Zerfall nach der Quelle
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RETOF	Reflector Time of flight
RP-HPLC	engl.: Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, Umkehrphasen Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
TAP	Transporter für Antigenpräsentation
TOF	engl.: Time of Flight, Flugzeit
ULISSES	Universal Laser Ionization Spectrometry System's Evaluation Software

1 EINLEITUNG

Die Biowissenschaften unterlagen im letzten Jahrzehnt einer sehr schnellen Entwicklung und haben das Verständnis von biologischen Zusammenhängen revolutioniert. Der Fortschritt in den Bereichen der Zell- und Molekularbiologie wie auch in der Bioinformatik hat die Nachfrage nach der Charakterisierung und Identifizierung von Proteinen und anderen Biopolymeren in immer komplexeren Systemen nach sich gezogen. Der Geschwindigkeit dieser Entwicklung in den Biowissenschaften muss die Entwicklung neuer analytischer Verfahren einher gehen. Das Beispiel der Massenspektrometrie zeigt, dass sie, obwohl sie erst seit einem Jahrzehnt in der Biologie und Biochemie eingesetzt wird, neue Strategien zur Beantwortung biologischer Fragen ermöglicht. Die moderne Analytik ist ein Zusammenspiel verschiedener Einzelverfahren, die jedes für sich nur begrenzte Informationen liefern. Im Zusammenspiel können sie aber ganz neue Antworten erbringen.

Fragen zur Proteinexpression, Interaktion posttranslationaler Modifikationen und ihre Auswirkungen auf das biologische System müssen auf der Proteinebene beantwortet werden. Proteine sind Träger der biologischen Funktion. Somit ist die Strukturaufklärung von Proteinen eine wichtige Fragestellung in der Bioanalytik.

Die Abtrennung, Isolation und Reinigung von Proteinen geschieht normalerweise aus einer großen Menge Ausgangsmaterial von einer Vielzahl anderer Proteine. Nach der Aufreinigung stehen häufig nur sehr geringe Substanzmengen zur Verfügung, so dass in allen anschließenden Analysenschritten möglichst verlustarm und mit größter Empfindlichkeit gearbeitet werden muss. Ist das Protein isoliert, wird im nächsten Schritt versucht, Information über die Aminosäuresequenz, d.h. die Primärstruktur zu erhalten. Bei diesem Schritt hat sich die Massenspektrometrie und im speziellen die MALDI-Massenspektrometrie (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation) gegenüber den chemischen und/oder enzymatischen Abbaureaktionen durchgesetzt.

Die Entwicklung der Desorptionsverfahren Fast Atom Bombardment (FAB) [1], Plasmadesorption (PD) [2] und Laserdesorption (LD) [3][4][5] hat es ermöglicht,

Biomoleküle wie Peptide zerstörungsfrei in die Gasphase zu bringen. Mit den klassischen Methoden wie Chemische Ionisation (CI) [6] und Elektronenstoss-Ionisation (EI) sind nur relativ kleine Verbindungen zugänglich, die sich beim Verdampfen nicht zersetzen und bei der Ionisation nicht zu stark fragmentieren. Die Desorptionsverfahren hingegen erlauben eine intakte Desorption und Ionisation auch von großen polaren, thermisch-labilen Biomolekülen wie Kohlenhydrate, Enzyme, Proteine und Peptide. Sie liefern das intakte Molekül-Ion und damit das Molekulargewicht einer Verbindung.

Eine Weiterentwicklung der LD ist die „Matrix assisted Laser Desorption/Ionisation“ kurz MALDI [7]. MALDI, MALDI-PSD (Post Source Decay) [8][9] und ESI (Elektrospray Ionisation) [10] haben sich in den letzten fünf Jahren bei der Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen durchgesetzt.

Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Methoden liegt darin, dass bei der ESI die Ionisation aus flüssiger Phase erfolgt, bei der MALDI hingegen aus kondensierter Phase desorbiert wird. Damit hat die ESI die Möglichkeit zur direkten on-line Kopplung mit den gängigen chromatographischen Trenn- und Aufreinigungsmethoden, wie Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) und kapillarelektrophoretischen Trennmethode (Capillary Electrophoresis, CE). Die on-line Kopplung ist ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf den Probenverlust bei Transferschritten in der Analytik. Für MALDI ist eine on-line Kopplung mit HPLC bzw. CE mit größeren Schwierigkeiten verbunden, hier hat sich die off-line Kopplung durchgesetzt.

1.1 Problemstellung

Eine entscheidende Problematik der Analyse biologischer Proben liegt in ihrer Komplexität. In solchen Proben kommen oft tausende Peptide und Proteine nebeneinander in unterschiedlichen und teils sehr geringen Konzentrationen vor, z.B. nach enzymatischer Prozessierung eines Proteins.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer Strategie zur Charakterisierung/Strukturaufklärung unbekannter Peptide in komplexen Mischungen mittels MALDI-MS.

Dazu gehört die Entwicklung einer off-line Kopplung von CE mit MALDI. Beide Methoden, die CE wie auch die MALDI, weisen eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit auf. Die Kombination von CE mit MALDI stellt gegenüber den herkömmlichen CE-Detektoren (UV, Fluoreszenz, Leitfähigkeit) einen Gewinn an

Sensitivität, Spezifität und Aussagekraft für die Strukturaufklärung kapillarelektrophoretisch getrennter Biomoleküle dar. Der Probenverbrauch beider Methoden ist sehr gering, so dass ihre Kopplung den Probenverbrauch extrem verringern kann, und damit neue Fragestellungen in der Biologie zugänglich werden.

Bei der CE ist eine einfache Fraktionierung, wie sie von der HPLC bekannt ist nicht möglich. Kapillarkräfte halten die Flüssigkeit in der Kapillare zurück. Die einzelnen Fraktionen müssen aktiv aus der Kapillare geholt werden. Hinzu kommt, dass die Volumina dieser Fraktionen im Nanoliterbereich liegen. Für die off-line Kopplung muss somit ein Interface entwickelt werden, das die CE-Fraktionen mit ihren geringen Probenvolumina auffangen und handhaben kann. Gleichzeitig soll dieser Probenroboter die Proben automatisch nach der Fraktionierung für die MALDI-MS-Analyse präparieren.

Wichtigster Aspekt einer CE-Kopplung ist die Abstimmung der beiden Methoden aufeinander. Eine off-line Kopplung bietet den großen Vorteil, dass jede Methode auf die jeweilige Fragestellung hin optimiert werden kann. Durch die Kopplung beider Methoden geht die hohe Empfindlichkeit nicht verloren. Bei biologischen Proben stehen sehr häufig nur sehr geringe Probenmengen zur Verfügung, so dass ein mehrmaliges Wiederholen ausgeschlossen ist. Das Messen der Massenspektren ist bei einer off-line Kopplung im Gegensatz zur on-line Messung unabhängig von den kurzen Elutionszeiten der Proben bei der Kapillarelektrophorese. Die präparierten Proben können außerdem über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden um gegebenenfalls Nachmessungen durchzuführen.

Ziel war somit die Entwicklung einer Methode zur Trennung von Peptiden unter der Berücksichtigung, dass sie auf möglichst viele Peptidmischungen anwendbar ist. Auch wenn solch eine Trennmethode nicht zur vollständigen Auftrennung eines unbekanntes Peptidgemisches führt, liefert sie doch erste Informationen, aufgrund derer die Trennung weiterentwickelt werden kann. Für die Kopplung ist zu berücksichtigen, dass bei der CE keine Puffergemische verwendet werden, die die nachfolgende MALDI-Analyse stören könnten.

Die CE-Trennung wurde unter Berücksichtigung der folgenden Parameter optimiert:

- chemische Zusammensetzung des Elektrolyten
- pH-Wert des Elektrolyten
- Ionenkonzentration
- Kapillare.

Für die MALDI-Massenspektrometrie wurden unter dem Aspekt der automatisierten Probenpräparation und Präparation von geringsten Probenmengen folgende Einflussfaktoren untersucht und umgesetzt:

- Präparationstechniken (*dried-droplet, layer-Technik*)
- Signalunterdrückung in Peptidgemischen
- Derivatisierungstechniken.

Der Einfluss der Matrix und der Präparationsmethoden auf den MALDI-Prozess bzw. die Ionisierung ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Was macht eine gute Matrix aus, wie lässt sich die Signalintensität über die Matrix beeinflussen? Der MALDI-Prozess ist ein Zusammenspiel von Matrix und Analyt. Die Untersuchung des Einflusses des Analyten auf den MALDI-Prozess soll die Frage klären, ob das Wissen über den Analyten bei der Auswahl der Probenpräparationsmethode und der MALDI Messung helfen kann bzw. ob sich umgekehrt aus den Massenspektren Aussagen über den Analyten machen lassen? Welche physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analyten beschreiben den Einfluss?

Ein wichtiges Hilfsmittel bei der PSD-Analyse vollkommen unbekannter Peptide sind verschiedene „on-target“ Derivatisierungstechniken, wie der H/D-Austausch [11]. Die Information aus dieser Derivatisierung reduziert drastisch die Anzahl der für eine bestimmte Masse theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen. Für die PSD-Analytik komplexer Peptidgemische stehen nur geringste Probenmengen zu Verfügung, so dass die Derivatisierungen auf den Mikromaßstab umgesetzt werden müssen. Dabei wurde besonders Wert darauf gelegt, dass diese Reaktionen reversibel sind bzw. nacheinander mit derselben Probe auf dem Probenziel durchgeführt werden können. Die Hauptproblematik liegt in dem veränderten Kristallisationsverhalten kleinster Probenvolumina.

Die entwickelten Strategien werden in einem zweiten Teil dieser Arbeit auf verschiedene Problemstellungen der Strukturcharakterisierung von Peptiden angewendet. Eine dieser Fragestellungen ist die Identifizierung und Charakterisierung verschiedener Peptide in einem Peptidextrakt eines Organs. Die zweite Problematik ist die Sequenzierung von MHC Klasse I Peptiden nach ihrer Isolierung aus Nierenkarzinomzellen.

Fast alle Proteine werden nach ihrer Biosynthese posttranslational modifiziert, sowohl an den funktionalen Seitenketten, als auch an ihren terminalen Amino- und Carboxygruppen. Über 150 verschiedene Modifikationen sind in-vivo bekannt. Dazu gehören Glycosylierung, Sulfonierung, Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung. Die Phosphorylierung ist ein dynamischer und reversibler Prozess.

Daraus ergibt sich für eine bestimmte Phosphorylierungsstelle meist ein sehr geringer Phosphorylierungsgrad, der kleiner als 5% ist. Die hohe Empfindlichkeit von MALDI-MS bietet die Möglichkeit, diese Modifizierungen zu identifizieren und die Modifizierungsstelle zu bestimmen. Der Einfluss der Phosphorylierung, auf das Fragmentierungsverhalten der Peptide bei der MALDI-PSD-MS war Gegenstand der Untersuchungen im dritten Teil dieser Arbeit. Ziel war es, Fragmentierungsregeln zu finden, die auf die Phosphorylierung zurückzuführen sind, und damit die Strukturaufklärung auch von modifizierten völlig unbekanntem Peptiden mittels MALDI-PSD-MS zu ermöglichen.

2 GRUNDLAGEN ANALYTISCHER METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG KOMPLEXER MISCHUNGEN

2.1 MALDI

Seit ihrer Einführung im Jahre 1988 hat sich die MALDI-Massenspektrometrie [7] aufgrund ihrer Einfachheit und Vielseitigkeit zu einer Standardmethode zur Charakterisierung und Strukturaufklärung von Biopolymeren, wie Peptiden, Proteinen, Oligosacchariden und –nukleotiden, entwickelt. Die MALDI-MS ist tolerant gegenüber Verunreinigungen wie Salzen und Detergentien, die sehr oft Begleiterscheinungen bei der Isolierung von Biomolekülen sind. Ihr Probenverbrauch liegt im Subfemtomolbereich und ihre Massengenauigkeit bei 30-100 ppm. Die MALDI-MS gehört wie die Feld-Desorptions Massenspektrometrie (FDMS) [12], die Plasma-Desorptions Massenspektrometrie (PDMS) [2] und Fast-atom-bombardment-MS (FAB-MS) [1] zu den sogenannten „soft ionization“ Methoden. Sie produziert vorwiegend einfach geladene Ionen bis zu einem Molekulargewicht von mehreren 100 kDa.

Der Analyt wird mit einem typischerweise 1000-fachen molaren Überschuss an Matrix gemischt und auf einem Probenträger kristallisiert. Das eingestrahelte Licht eines Laserpulses wird von der Matrix absorbiert und führt zu einer starken lokalen Aufheizung der Kristalle. Die schnelle Aufheizung führt zur Sublimation der Matrixkristalle und des Analyten in die Gasphase. Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Matrix auch eine wichtige Rolle bei der Ionisierung der Probenmoleküle spielt. Es werden verschiedene Ionisierungsprozesse für die MALDI diskutiert [13], darunter die Beteiligung von Photoionisationsprozessen (Ehring *et al.* [14], Liao und Allison [15]). Danach werden im ersten Schritt Matrix-Radikal Kationen erzeugt. Tatsächlich werden bei der Verwendung von DHB als Matrix DHB-Radikal Kationen in den MALDI Massenspektren beobachtet, Analyt-Radikal Kationen allerdings nur selten. Zwei der vier von Liao und Allison [15] postulierten Ionenbildungsprozessen beruhen auf der Photoionisation. Weitere diskutierte Modelle für die Ionenbildung sind Protonen-Transferreaktionen zwischen angeregten Matrix-Molekülen und Analytmolekülen im Grundzustand [16] sowie

zwischen protonierten Matrix-Ionen und neutralen Analytmolekülen [17], das „energy pooling“ [18] und die Clusterverdampfung [19], die thermische Ionisation und die Desorption von „preformed ions“ [20] aus dem Matrixkristall. Insgesamt ist aber der Desorptions/Ionisations-Prozess noch nicht vollständig verstanden [13].

Der typische Geräteaufbau besteht aus einer Kopplung der MALDI Ionenquelle mit einem Flugzeit-Massenspektrometer (time-of-flight MS, TOF-MS). Die Konfiguration eines TOF-MS ist ideal für einen gepulsten Ionenstrahl. Der kurze Laserpuls von 1-10 ns fungiert neben der Desorption des Analyten gleichzeitig als Startsignal für die Flugzeitmessung. Die durch den Laserpuls erzeugten Ionen werden in der Quelle auf eine kinetische Energie von einigen keV beschleunigt und durchlaufen nach dem Verlassen der Quelle eine feldfreie Flugstrecke von etwa 1-2 Metern. Hier separieren sie sich aufgrund ihrer Geschwindigkeit nach ihrem Masse/Ladungs-(m/z)-Verhältnis entsprechend der Gleichung

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{l^2} \cdot t^2$$

(m = Masse, z = Ladung, e = Elementarladung, U = von den Ionen durchlaufenen Potentialdifferenz (\approx Beschleunigungsspannung), l = Länge der feldfreien Flugstrecke, t = Flugzeit in der feldfreien Flugstrecke).

Die Anfangsgeschwindigkeit der Ionen wird hier vernachlässigt. Das Verhältnis von Masse zu Ladung ist dem Quadrat der Flugzeit proportional, d.h. die schweren Ionen mit einem großen m/z-Verhältnis erreichen den Detektor zu einem späteren Zeitpunkt als die leichten Ionen.

Da nicht alle Ionen zur gleichen Zeit am gleichen Ort desorbiert und ionisiert werden, starten Ionen gleicher Masse mit einer gewissen Verteilungsbreite der Energie und Zeit und treffen zu verschiedenen Zeiten auf den Detektor. Dies führt zu einer Signalverbreiterung der Ionensignale und damit zu einer reduzierten Auflösung. Durch einen elektrostatischen Ionenreflektor lässt sich die Energieverteilung der Ionen kompensieren. Schnellere Ionen dringen tiefer in das Bremsfeld des Reflektors ein, legen einen längeren Weg im Reflektor zurück und werden von den langsameren Ionen gleichen m/z-Verhältnisses eingeholt. Steht der Detektor in diesem Brennpunkt, so werden die Ionen gleicher Masse mit unterschiedlichen kinetischen Energien gleichzeitig detektiert. Nicht kompensierbar ist mit dieser Methode allerdings der Startzeitfehler.

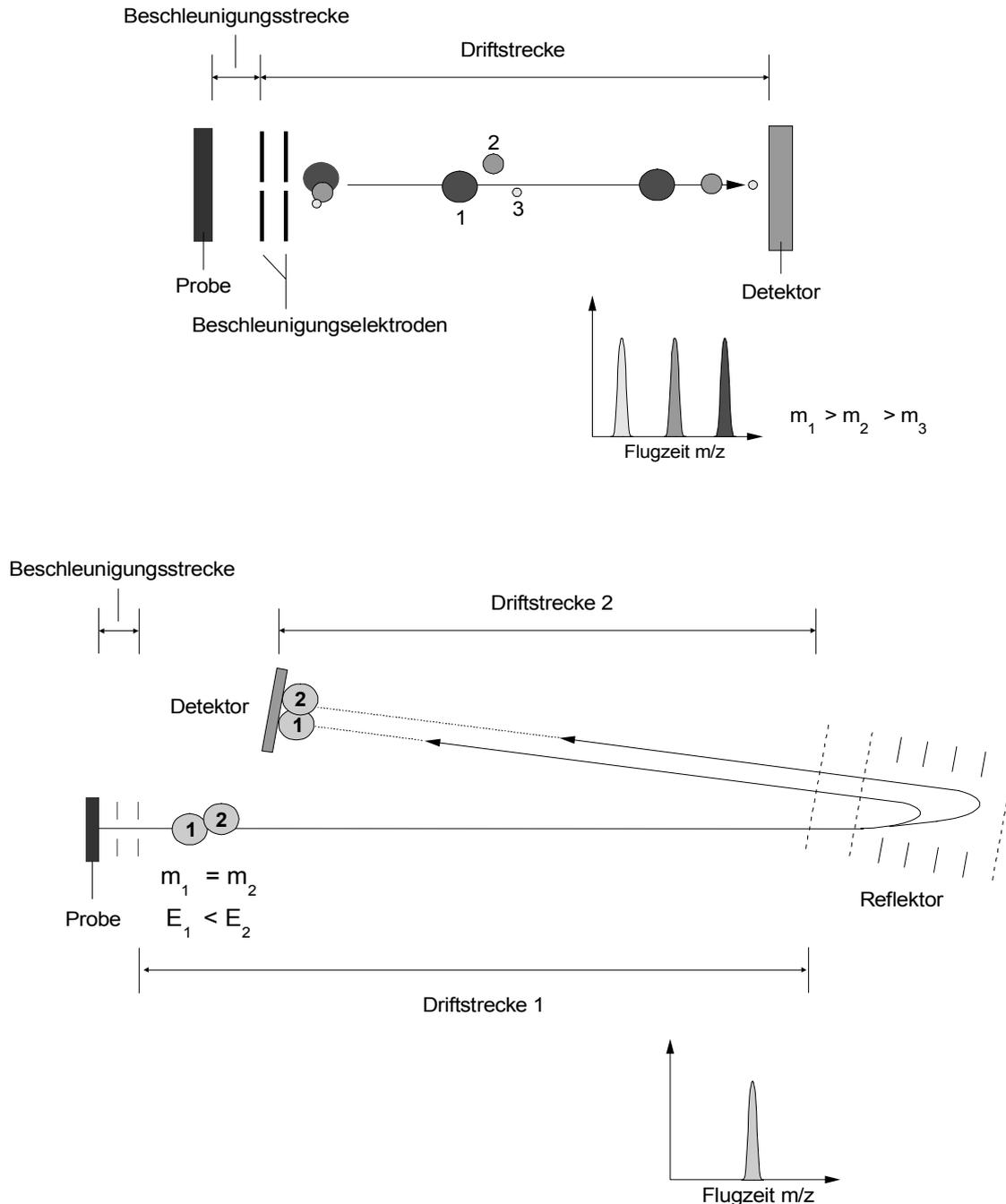


Abb. 2.1: Prinzip eines Linearen- und Reflektor-time-of-flight-Massenspektrometers

2.1.1 Delayed Extraction

Eine Möglichkeit, die aus der Startgeschwindigkeitsverteilung entstandenen Startzeitfehler zu kompensieren, ist die Nutzung der „delayed extraction“-Methode (verzögerte Ionenextraktion) [21][22][23]. Das Beschleunigungsfeld wird nicht permanent eingeschaltet, sondern zeitversetzt zum Laserimpuls. Ionen mit einer höheren Startgeschwindigkeit entfernen sich während der Verzögerungszeit weiter von

der Probenoberfläche und erhalten beim Einschalten des elektrischen Feldes eine geringere kinetische Energie als Ionen mit einer niedrigeren Startgeschwindigkeit. Bei entsprechender Wahl der Verzögerungszeit und Feldstärke führt dies zu einer Kompensation der Startzeitfehler und somit zu einer Verbesserung der Massenauflösung. Die Methode ist sowohl für den Linear- als auch für den Reflektor-Mode geeignet. Sie ist allerdings massenabhängig, so dass für die eingestellten Parameter nur in einem begrenzten Massenbereich eine Auflösungsverbesserung erzielt wird.

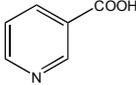
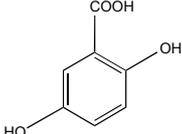
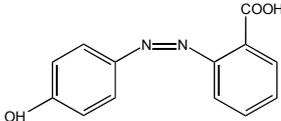
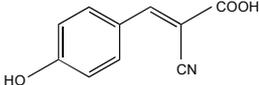
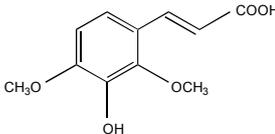
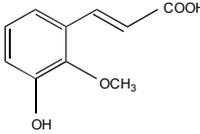
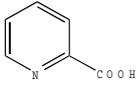
2.1.2 Matrix

Die Matrix spielt beim MALDI-Prozess eine wichtige Rolle. Die Wahl der geeigneten Matrix ist Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen. Bis heute ist ihre genaue Rolle aber noch nicht eindeutig geklärt. Die Aufgaben und Eigenschaften der Matrix lassen sich in drei wesentliche Punkte zusammenfassen:

- Sie sorgt für die notwendige Energieeinkopplung für die Desorption der Matrix- und Analytmoleküle. Das bedeutet, dass sie eine hohe spektrale Absorption im Bereich der verwendeten Laserwellenlänge aufweisen muss. Für typische UV-Matrizes liegt der molare Extinktionskoeffizient zwischen 10^3 und 10^4 L/(mol cm).
- Um intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Analytmolekülen zu minimieren wird die Matrix je nach Anwendung in einem molaren Überschuss von 1000 bis 10000 zugesetzt. Dies führt zu einer räumlichen Isolation der Analytmoleküle. Je nach Präparationstechnik sollte die Matrix eine hohe (*dried-droplet*-Methode [7]) bzw. niedrige (*layer-Technik* [24][25]) Löslichkeit im Lösungsmittel des Analyten besitzen.
- Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Ionisation. Ihre Funktion dabei ist aber noch nicht endgültig geklärt. Diskutiert werden verschiedene Gas-Phasenprozesse [13][18][13][13], bei denen die Matrix als Protonendonator bzw. akzeptor auftritt.

Obwohl eine große Anzahl von Verbindungen der verschiedensten Substanzklassen als Matrix getestet wurden [26][27][29][30][31][32][33], hat sich gezeigt, dass es nach wie vor eine universelle Matrix für alle Anwendungen nicht gibt. Die Aufklärung des Ionisationsmechanismus könnte Kriterien für die Wahl der geeigneten Matrix liefern. Bis heute wird die Matrix nach empirischen Kriterien ausgewählt. In Tabelle 2.1 sind die Matrizes aufgeführt, die routinemässig für die UV-MALDI-MS in der biochemischen Analytik verwendet werden und die Ur-Matrix Nicotinsäure.

Tabelle 2.1: Typische Matrixsubstanzen für die UV-MALDI-MS in der biochemischen Analytik.

Matrix/ Präparationsmethode		Wellenlänge	geeignet für
Nicotinsäure [7]		266 nm	Proteine, Peptide
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [27], <i>dried-droplet</i>		266 nm, 337 nm, 355 nm	Proteine, Peptide
2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoesäure (HABA) [28]			Proteine, Peptide, Glykoproteine
α -Cyano-4-hydroxycinnamsäure		337 nm, 355 nm	Peptide
3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamsäure (Sinapinsäure), [30], <i>layer-Technik</i>		266 nm, 337 nm, 355 nm	Proteine
4-Hydroxy-3-methoxycinnamsäure (Ferulasäure) [31], <i>dried-droplet</i>		266 nm, 355 nm	Proteine, Oligonukleotide
Picolinsäure [32], <i>dried-droplet</i>		337 nm, 355 nm	Proteine, Nukleinsäuren

2.1.3 Präparationstechniken

Neben Laserintensität und Matrix hat die Probenpräparation einen wesentlichen Anteil an der Effektivität der MALDI-MS. Aufgrund der unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Matrices haben sich verschiedene Präparationstechniken entwickelt, die ihrerseits wieder verschiedenen Optimierungsparametern unterliegen.

2.1.3.1 Dried-droplet-Methode

Bei der *dried-droplet*-Methode [7] wird die Matrixlösung mit der Analytlösung gemischt und auf dem Probenziel mit Heißluft getrocknet. Die optimale Präparation

hat einen möglichst breiten, flachen Kristallrand. Für die *dried-droplet*-Methode eignen sich besonders die Matrixsubstanzen, die den Analyten in den Matrixkristall einbauen.

2.1.3.2 Layer Technik

Die *layer-Technik* [24][25][34] wird bei den gering wasserlöslichen Matrices wie z.B. den Zimtsäurederivaten angewendet. Das Optimum der Präparation besteht in einer homogenen polykristallinen Fläche, die über das verwendete Lösungsmittel beeinflusst werden kann. Die für diese Technik verwendeten Matrices bauen den Analyten nicht in den Kristall ein. Der Analyt verteilt sich an der Oberfläche der feinen Matrixkristalle. Daher muss eine möglichst große Matrixoberfläche erzeugt werden. Die Vorteile dieser Präparationstechnik liegen in einer gesteigerten Empfindlichkeit, sowie in der Möglichkeit Salze und andere Verunreinigungen durch waschen des Matrix/Analyt-Layers zu entfernen.

Ein Spezialfall der *layer-Technik* ist die Sandwich Technik [35]. Hier wird auf einen Matrixlayer (*layer-Technik*) ein Tropfen Analyt, gefolgt von einem weiteren Tropfen Matrix gegeben.

Weitere Techniken sind Kombinationen der vorangestellten Methoden oder es werden verschiedene Additive wie Nitrocellulose [36] verwendet. Bei der Auswahl der Präparationsmethode muss berücksichtigt werden, dass die Toleranz der verschiedenen Techniken gegenüber Salzen, Puffer, Detergentien oder anderen Verunreinigungen sehr unterschiedlich ist.

Die sehr geringen Probenmengen in der Bioanalytik erfordern zur Aufklärung der Aminosäuresequenzen mittels MALDI-PSD-Analyse, Derivatisierungstechniken wie Acetylierung, Deuterierung, Reduktion und Oxidation. Diese Verfahren sind direkt auf dem Probeneller durchführbar, aber nicht alle sind mit den verschiedenen Präparationstechniken kompatibel.

2.1.4 MALDI-MS von Peptidgemischen

Bei MALDI-Analysen von Peptidgemischen nach sequenzspezifischem, proteolytischem Abbau von Proteinen („*peptide mapping*“) wurde die Unterdrückung einzelner Peptidsignale beobachtet. Diese Diskriminierungseffekte sind auch aus der FAB-MS [37][38][39] und PDMS [40][41][42] bekannt. Die Signalunterdrückung bei der FAB-MS und PDMS wird auf die physikalisch chemischen Eigenschaften der Peptide zurück geführt. Nach proteolytischem Abbau von Insulin konnten in den PD- und MALDI-Spektren nur die Fragmente der basischen B-Kette beobachtet werden, Fragmente der sauren A-Kette wurden dagegen nicht detektiert [39][40][43]. Für die

Strukturcharakterisierung bedeutet die Signalunterdrückung Informationsverlust, fehlende bzw. unterdrückte Peptidsignale führen zu unvollständigen Sequenzinformationen.

Diskriminierung von Peptidsignalen und die unterschiedliche Empfindlichkeit einzelner Peptide sind bei der MALDI-MS mehrfach beschrieben. Fast alle Untersuchungen dazu führen die Problematik auf die Matrix zurück. Roepstorff *et al.* [35] kommen zu dem Schluss, dass die verschiedenen Präparationsmethoden einen starken Einfluss auf die Signalintensitäten haben. Cohen und Chait zeigen [44], dass die Geschwindigkeit des Kristallwachstums der Matrix bei der Präparation sowie der pH-Wert [33] der Proben- und Matrixlösung eine entscheidende Rolle bei der Signalunterdrückung spielen. Dazu zählt auch die Kristallmorphology [45][46]. Kleine Matrixkristalle führen zu einer höheren Empfindlichkeit und einer geringeren Signalunterdrückung [34][44][45]. Zhu *et al.* [43] beschreiben den Einfluß der Kristallgitterenergie. Das sind alles Faktoren die den Desorptionsprozess beeinflussen. Nur ein geringer Teil von Untersuchungen führt die Signalunterdrückung auf Faktoren zurück, die in direktem Zusammenhang mit den Eigenschaften der Probe stehen, wie z.B. die Aminosäurezusammensetzung der Peptide und der daraus folgenden Hydrophobizität [47][48][49]. Doch wurde bis heute noch nicht systematisch der Zusammenhang der Signalunterdrückung von Peptiden mit der Probenzusammensetzung, d.h. ihre physikalisch chemischen Eigenschaften wie Hydrophobizität und Basizität untersucht. Aus den Faktoren und ihrem Ausmass bei der Diskriminierung von Signalen in Mischungen lassen sich Schlüsse über den Ionisierungsmechanismus bei der MALDI-MS ziehen. Damit liessen sich dann spezifischere auf die einzelne Probe abgestimmte Probenpräparationsprotokolle aufstellen, die auch leichter automatisierbar wären.

2.2 Post-Source Decay (PSD)-MALDI

Die Post-source decay MALDI-MS [8][9][50] ist eine Erweiterung der MALDI-Massenspektrometrie. Die ursprüngliche Annahme, dass es beim MALDI-Prozess zu vernachlässigbarer Fragmentierung der Analyt-Moleküle kommt, musste revidiert werden. Neben den wenigen Fragmenten, die direkt in der Quelle entstehen (prompte Fragmentierung), werden in weit stärkerem Masse Fragment-Ionen beobachtet, die nach der Beschleunigungs- in der feldfreien Flugstrecke durch unimolekularen oder stoßinduzierten Zerfall entstehen. Für diese Art der Fragmentierung wurde der Begriff „Post-source decay (PSD)“ geprägt.

Beim Zerfall eines Molekül-Ions entstehen in der Regel ein Neutralteilchen und ein geladenes Fragment-Ion. Die Fragmentierungsrate ist abhängig von der inneren Energie, die durch die Laserintensität, die Beschleunigungsspannung und Molekülstöße in der Gasphase beeinflusst wird. Die Zeitskala auf der der Zerfall der Molekül-Ionen stattfindet, entscheidet über die Detektierbarkeit der Fragment-Ionen im TOF-Massenspektrometer. Prompte Fragment-Ionen werden mit der dem Fragment entsprechenden Masse detektiert. PSD-Ionen, die in der feldfreien Flugstrecke gebildet werden, fliegen mit der Geschwindigkeit des ursprünglichen Molekül-Ions (Vorläufer-Ion) weiter, haben aber aufgrund ihrer kleineren Masse eine entsprechend geringere kinetische Energie. In einem linearen Flugzeitmassenspektrometer treffen die PSD-Ionen gleichzeitig mit ihren Vorläufer-Ionen auf den Detektor. Sie sind nicht von den intakten Molekül-Ionen zu unterscheiden, führen aber zu einer Signalverbreiterung und damit zu einer schlechteren Auflösung. Durch Anlegen eines Bremsfeldes oder Einbau eines Reflektors lassen sich die PSD-Fragmente und die Vorläufer-Ionen voneinander trennen.

Im Reflektor werden die PSD-Ionen entsprechend ihrer kinetischen Energie und somit ihrer Masse an unterschiedlichen Orten reflektiert. Dies führt zu einer zeitlichen Auftrennung der Vorläufer-Ionen und PSD-Ionen. Für ein vollständiges PSD-Fragment-Ionenspektrum müssen mehrere Teilspektren mit abgestuften Reflektorspannungen aufgenommen werden, da der Reflektor nur in einem kleinen Bereich mit genügend hoher Auflösung befriedigend arbeitet. Die Abb. 2.2 zeigt das Prinzip der PSD-Analyse am Beispiel eines zweistufigen Reflektors. PSD-Fragmente, die in der zweiten Stufe reflektiert werden, erscheinen als gut aufgelöstes Signal vor dem Signal des Vorläufer-Ions. Kleinere PSD-Fragmente werden schon in der ersten Stufe des Reflektors reflektiert und nur als ein breites unaufgelöstes Signal detektiert. Durch schrittweises Herunterschalten der Reflektorspannungen U_1 und U_2 werden dann die kleineren

Massen aufgelöst. Das Kombinieren der Teilspektren mittels Computer ergibt anschliessend das komplette PSD-Spektrum über den gesamten Massenbereich.

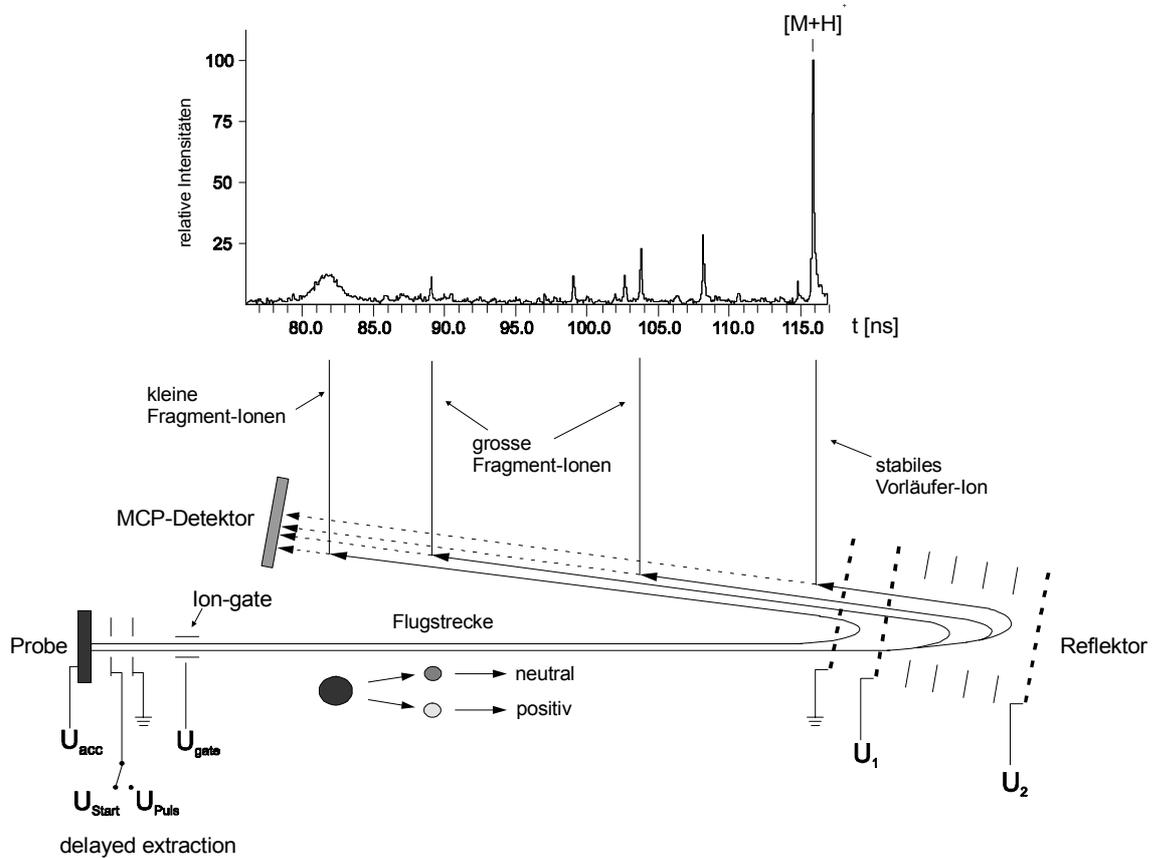


Abb. 2.2: Prinzip der MALDI-PSD-Massenspektrometrie [8].

PSD-Fragmente enthalten Strukturinformationen, da sie bevorzugt durch Brüche am Rückgrat (*back bone*) von Peptiden entstehen. Hier liegt auch die große Bedeutung der PSD-Analyse für die Bioanalytik. Mittels der PSD-Analyse lassen sich auch vollständig unbekannte Peptide sequenzieren.

2.2.1 Fragmentierung / Sequenzierung

Peptid-Ionen fragmentieren hauptsächlich an der Amidbindung entlang des Rückgrates. Enthält das Fragment den C-Terminus, spricht man von einem y-Fragment, enthält es den N-Terminus von einem b-Fragment [51] (Abb. 2.3).

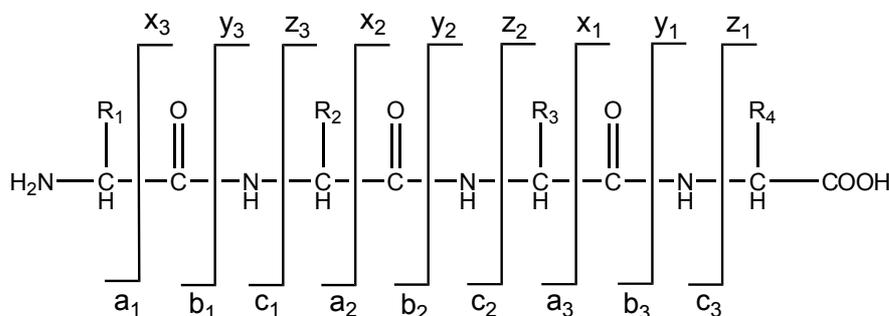


Abb. 2.3: Nomenklatur für die Bezeichnung von Fragment-Ionen nach P. Roepstorff [51] und Johnson *et al.* [52].

Der Massenabstand zwischen zwei Fragment-Ionen der gleichen Serie entspricht einer spezifischen Aminosäure. Aminosäuren mit basischen Seitenketten, wie Arginin oder Lysin, können je nach ihrer Position im Peptid die Art der Fragment-Serie bestimmen. Sind sie in der Nähe des N-Terminus lokalisiert, wird das PSD-Spektrum im allgemeinen von einer b-Serie dominiert. Befinden sie sich in der Nähe des C-Terminus, so dominieren die y-Fragmente. Peptide die durch einen tryptischen Verdau entstehen, werden fast immer von einer y-Serie dominiert, da sie C-terminal ein Arginin oder Lysin besitzen. Ist die basische Aminosäure in der Mitte eines Peptides lokalisiert oder sind mehrere basische Seitenketten vorhanden, wird das Spektrum oft sehr komplex. Die b- bzw. y-Serien sind nicht mehr vollständig vorhanden und die Zuordnung der einzelnen Fragment-Ionen zu den Serien wird erschwert. Spengler *et al.* [53] haben gezeigt, dass sich durch Ladungsfestsetzung an einem Terminus das Spektrum vereinfachen lässt. Die Derivatisierung des N-Terminus (quartäres Ammoniumsalz) und Modifizierung der Arginin-Seitenkette macht die Fragmentierung kontrollierbar, da die Ladung auf die Seite des N-Terminus verschoben wird. Somit treten verstärkt N-terminale Fragmente auf. Es gibt noch weitere Regeln, die das Interpretieren der PSD-Spektren vereinfachen. Abstände von 18 u (Abspaltung von H_2O) deuten z.B. auf das Vorhandensein von Threonin oder Serin hin. Abstände von 17 u, entsprechend einer Abspaltung von NH_3 , stammen von der Aminosäure Arginin. Prolin und Asparagin [54] wiederum führen zu einer starken Fragmentierung, die in sehr intensiven Signalen der Fragment-Ionen deutlich wird. Aus den Immonium-Ionen im unteren Massenbereich lässt sich auf die im Peptid vorhandenen Aminosäuren schließen [55]. Grundsätzlich gilt, dass die erhaltenen Fragmentierungsmuster reproduzierbar und charakteristisch für die Aminosäuresequenz sind.

Durch Nutzung von Proteindatenbanken lässt sich mit Hilfe verschiedener Computeralgorithmen schon mit Teilsequenzen (*sequence tags*) eines unbekanntes Peptides nach dem Targetprotein suchen. Proteindatenbanken enthalten heute über 360000 Einträge verschiedener Spezies. Nicht in jedem Fall führt die Datenbanksuche zu einem Ergebnis, denn viele Spezies sind dort nicht vertreten und nur von einigen Organismen ist das Genom vollständig aufgeklärt.

Neben den oben aufgeführten “Regeln”, die die Interpretation der PSD-Spektren vereinfachen und auch schon in verschiedenen Computerprogrammen implementiert sind, gibt es Derivatisierungstechniken, die weitere Sequenzinformationen liefern können. Das Schema (Abb. 2.4) zeigt, wie die PSD-Analyse eines vollständig unbekanntes Peptides durchgeführt wird. Die Interpretation des PSD-Spektrums inklusive Datenbanksuche führt nicht immer zu einer eindeutigen Sequenz. Durch Austausch der aciden Protonen am Peptid gegen Deuterium kommt es im Massenspektrum zu einer Massenverschiebung. Eventuell reicht schon diese Massenverschiebung des Mutter-Ions zur Sequenzbestätigung aus. Im PSD-Spektrum unterliegen die einzelnen Fragment-Ionen unterschiedlichen Massenverschiebungen. Der Abstand zwischen den Fragment-Ionen entspricht hier den deuterierten Aminosäuren. Wie im Beispiel gezeigt, lässt sich so zwischen Asparagin (Inkrementmasse 114 Da) und Glycin-Glycin ($2 \times 57 \text{ Da} = 114 \text{ Da}$) unterscheiden. Asparagin besitzt drei austauschbare Protonen, Glycin-Glycin nur zwei.

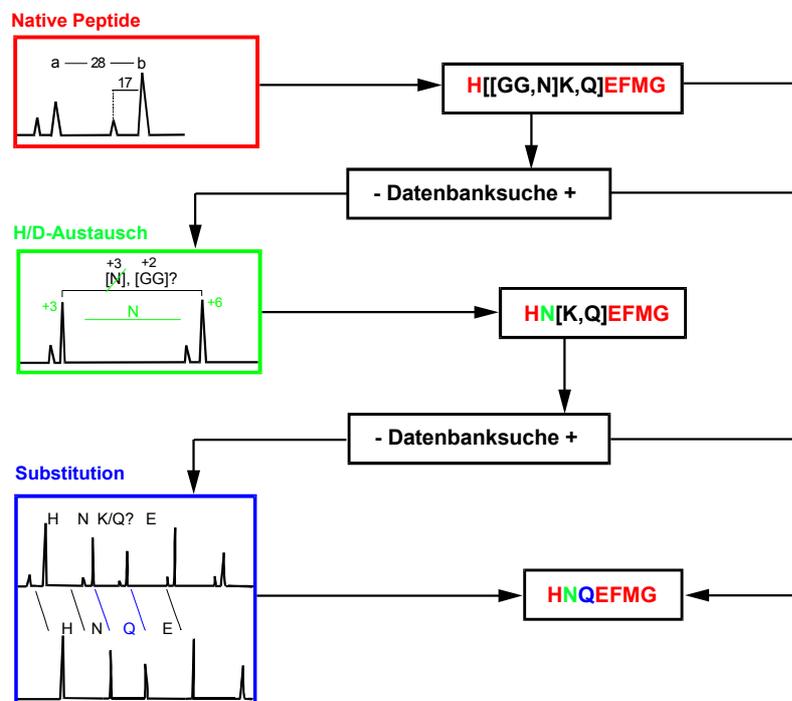


Abb. 2.4: Strategie zur massenspektrometrischen Identifizierung eines vollständig unbekanntes Peptides unter Zuhilfenahme von Datenbanken und Derivatisierungsmethoden [56].

Eine weitere Derivatisierung ist die N-terminale Acetylierung der Amino-Seitengruppen. Lysin und Glutamin lassen sich aufgrund gleicher Inkrementmassen im Massenspektrum nicht unterscheiden. Durch Acetylierung der Lysin-Seitenkette kommt es zu einer Massenverschiebung von 42 u. Disulfid-Brücken lassen sich durch Reduktion identifizieren. Eine Oxidation des Methionin-Schwefels führt zu einer Massenverschiebung von 16 u.

2.2.2 Strukturaufklärung von Proteinen

Die Aminosäuresequenz beschreibt nicht die gesamte Struktur und Funktion eines Proteins. Sie ist die Primärstruktur des Proteins aus der sich die Sekundär, Tertiär- und Quartärstruktur ergeben. Die Strukturaufklärung eines Proteins beinhaltet somit die Schritte: Bestimmung des Molekulargewichtes, *peptide mapping*, Peptidsequenzierung, Bestimmung der Disulfid-Brücken, Charakterisierung der Faltungsstruktur des Proteins, Bestimmung posttranslatiionaler Modifikationen, Untersuchung von Bindungen von Liganden usw.. Jeder dieser Bereiche repräsentiert ein eigenständiges Forschungsgebiet mit einer Vielzahl analytischer Methoden, in denen die Massenspektrometrie eine immer wichtigere Rolle spielt.

In Abb. 2.5 ist die klassische Strategie der Strukturaufklärung dargestellt, und wie die Massenspektrometrie in diese Strategie eingreift.

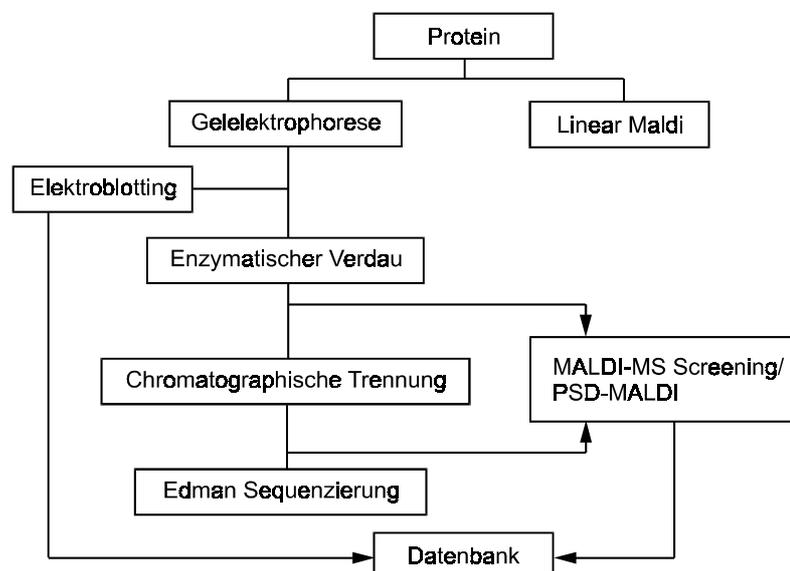


Abb. 2.5: Schema der klassischen und MS-assistierte Strategie zur Strukturaufklärung von Biopolymeren.

Proteine müssen aus einer sehr komplexen Matrix eines Organismus von einer Vielzahl anderer Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und DNA abgetrennt und isoliert werden. Dabei ist neben einer großen Ausbeute auch der Erhalt der biologischen Funktion ein

wichtiger Aspekt der Strategie. Ist ein Protein isoliert, versucht man im nächsten Schritt möglichst viele Informationen über die Primärstruktur zu erhalten. Das fängt mit der Molekulargewichtbestimmung an, die im klassischen Fall mittels Gelelektrophorese im Vergleich mit Standardproteinen abgeschätzt werden oder massenspektrometrisch mit ESI oder MALDI bestimmt werden kann. Das Molekulargewicht wird für Peptide/Proteine größer als 6000 Da bei der MALDI-MS im linearen Modus gemessen. Im Vergleich liegt die klassische Gelelektrophorese bei einer Massengenauigkeit von ca. 20 %, die Massenspektrometrie bei 0,1-0,01 %.

Bei der Gelelektrophorese lassen sich in einem Schritt die Proteine aufreinigen, trennen und das Molekulargewicht bestimmen. Die resultierenden Banden können einzeln isoliert und direkt einem enzymatischen Verdau unterzogen werden. Durch das Verdauen des Proteins mit sequenzspezifisch schneidenden Proteasen werden Peptide erhalten, die Teilsequenzen des Proteins repräsentieren. Nach chromatographischer Trennung werden diese Peptide klassisch der Edman-Sequenzierung [57] zugeführt. Die Gas-Phasen-Edman-Sequenzanalyse ist die gebräuchlichste automatisierte Methode zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen und Peptiden. Auch wenn diese Methode heute so verbessert worden ist, dass ihr Probenverbrauch durchaus im Bereich der Empfindlichkeit der Massenspektrometrie liegt, hat sie einige gravierende Nachteile. Das größte Problem stellt eine vorhandene N-terminale Blockierung dar, da für die Kopplungsreaktion eine freie Aminogruppe am N-Terminus vorhanden sein muss. Etwa 50% aller natürlich vorkommenden Proteine weisen eine solche N-terminale Modifikation auf. Modifizierte Aminosäuren innerhalb der Kette, wie z.B. glycosylierte und phosphorylierte Aminosäuren führen zwar nicht zum Abbruch der Reaktion, aber zu einer Leerstelle im Chromatogramm, so dass die Identifizierung der posttranslationalen Modifikationen ebenfalls nicht möglich ist. Eine Sequenzierung von Peptiden direkt aus Gemischen ist mit dem Edman-Abbau ebenfalls nicht möglich. Mit dem Edman-Abbau lassen sich nur Reinpeptide sequenzieren.

Für die massenspektrometrische Strukturanalyse kann der Gelspot ausgeschnitten, das Protein im Gel enzymatisch verdaut und die resultierenden Peptide direkt massenspektrometrisch untersucht werden. Das Peptide Mapping, das Auflisten der Molekulargewichte der entstandenen Peptide, ist Ausgang für eine Datenbankanalyse.

Führt die Datenbanksuche zu keinem befriedigenden Ergebnis, folgt die PSD-Analyse eines der entstandenen Verdau-Peptide. Die Möglichkeit der Sequenzierung eines Peptides direkt aus einem Peptidgemisch ohne vorherige chromatographische Trennung ist ein weiterer Vorteil der MALDI-PSD-MS gegenüber dem Edman-Abbau. Einzelne Peptide können aus dem Ionenstrahl selektiert werden. An Ablenkelektroden (*Ion Gate, beam blanker*) (siehe Abb. 2.2) wird zeitlich befristet ein statisches Feld zur

Ablenkung des Ionenstrahls angelegt. Durch Abschalten der Spannung werden in dem begrenzten Zeitfenster die Ionen der zu sequenzierenden Masse durchgelassen. So können aus einer einzigen Probenpräparation eines Proteinverdau mehrere Peptide nacheinander selektiert und sequenziert werden.

Ein anderer Ansatz der Sequenzierung mit Unterstützung der Massenspektrometrie ist das sogenannte *ladder sequencing*. 1993 beschrieb Brian Chait [58] eine Kombination von Edman-Sequenzierung und MALDI-MS. Eine Weiterführung dieses Ansatzes ist die Verwendung von N- oder C-terminal schneidenden Enzymen (Exoproteasen) an Stelle der chemischen Derivatisierungsreaktion beim Edman-Abbau mit anschließender Abspaltung der Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäure [59]. Die Reaktion kann direkt on-Target mit Einzelpeptiden, aber auch im Peptidgemisch, durchgeführt werden. Das Peptid wird im Gegensatz zum enzymatischen Gesamtverdau nur von einem Ende her enzymatisch abgebaut. Die MS-Analyse zeigt eine Mischung von terminal anverdauten Peptiden, wobei die Sequenzinformation im Massenabstand zwischen den einzelnen Signalen steckt [60].

2.2.3 Posttranslationale Modifikationen

Es wird angenommen, dass alle Proteine nach ihrer Translation auf spezifische Weise modifiziert werden. Das geschieht sowohl an den funktionellen Seitenketten, als auch an den terminalen Amino- und Carboxygruppen. Neben der Abspaltung von Aminosäuren an einem oder beiden Enden des Proteins, gibt es über 150 verschiedene Arten der Seitenketten-Modifikationen. Zu den häufigsten zählen Acetylierung, Glycosylierung, Hydroxylierung, Methylierung und Phosphorylierung. Manche posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung beeinflussen die Proteinaktivität. Die Funktion der meisten Seitenketten-Modifikationen ist jedoch noch immer unbekannt.

Viele der posttranslationalen Modifikationen sind nicht über die Aminosäuresequenz codiert und können daher nicht über die Nukleotid-Sequenzen der DNA erkannt werden. Eine vollständige Charakterisierung und Strukturaufklärung dieser Proteine ist daher zur Erkennung der posttranslationalen Modifikationen notwendig. Da alle Modifikationen in einer Veränderung des Molekulargewichtes resultieren, bietet sich die Massenspektrometrie zur Charakterisierung und Lokalisierung der Modifikationen an. Aus der Massendifferenz zwischen theoretischer und gemessener Masse ergibt sich, bei bekannter Protein- oder Peptidsequenz, die Art und Anzahl der Modifikationen. Gegenüber anderen MS-Methoden hat die MALDI-TOF-MS hier eine Reihe von Vorteilen, darunter die Möglichkeit der Analyse komplexer Peptidgemische mit direkt angeschlossener PSD-Analyse ausgewählter Peptide.

Die Bindung zwischen Protein und Modifizierung ist in der Regel schwächer als die Peptidbindung. Ihr Bruch führt zu charakteristischen Peakmustern. So lassen sich die Modifikationen durch den Massenabstand von Satellitenpeaks zum Molekülpeak identifizieren. Die Lokalisierung der Modifizierungsstelle ist nur über eine vollständige Sequenzierung des Peptides mittels MALDI-PSD-MS möglich.

2.3 Kapillarelektrophorese (CE)

Die Grundlagen der Elektrophorese, definiert als Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld, wurden zuerst von Kohlrausch (1897) [61] beschrieben. Tiselius [62] entwickelte 1930 die Elektrophorese als Analysenmethode für Proteine weiter. Eine optimale Trennung der Proteine in diskrete Zonen war jedoch aufgrund von Konvektion in freier Lösung nicht möglich. Die erste elektrophoretische Trennung in freier Lösung bei gleichzeitiger Unterdrückung der Konvektion, wurde von Hjerten 1958 [63] in einem rotierenden Quarzrohr (Innendurchmesser 3 mm) durchgeführt.

Erst in den 70er Jahren war es möglich Quarzkapillaren mit kleineren Innendurchmessern (I.D.) herzustellen. Durch den geringeren Innendurchmesser läßt sich die Konvektion effektiv unterdrücken. Mikkers *et al.* [64] verwendeten 1979 erfolgreich Teflonkapillaren mit einem I.D. von 200 µm für isotachophoretische und elektrophoretische Trennungen. Jorgenson *et al.* gelang 1981 [65][66] die Trennung derivatisierter Aminosäuren in einer 75 µm I.D. Kapillare bei 30 kV. Aus sehr dünnen Kapillaren (I.D. < 100 µm) läßt sich die Joulesche Wärme, aufgrund des großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen, besser abführen. Die Trennungen werden üblicherweise bei einem elektrischen Feld von 30-50 V/cm durchgeführt.

Heute hat sich die Kapillarelektrophorese zu einer hochleistungsfähigen mikroanalytischen Trennmethode entwickelt, die zur HPLC in vielen Bereichen als komplementäre Methode eingesetzt wird. Hauptmerkmale der CE im Unterschied zur HPLC sind die geringen Probenmengen pro CE-Analyse (nl) und die hohe Trennleistung (> 500000 theoretische Böden) zu nennen.

2.3.1 Allgemeine Einführung

Das Prinzip der Kapillarelektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die Ladung, Größe und der Elektrolyt bestimmen die Geschwindigkeit in einem gegebenen elektrischen Feld.

Die Geschwindigkeit v einer Verbindung ist proportional der Feldstärke E .

$$v = E \cdot \mu$$

Die elektrophoretische Mobilität μ ist eine stoffspezifische Konstante. Sie beschreibt die physikalisch-chemische Eigenschaft aufgrund derer die Komponenten getrennt werden. Haben zwei Verbindungen eine unterschiedliche effektive Mobilität, führt das unter gegebenen Bedingungen zu unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten

(Strecke/ Zeit), so dass die einzelnen Komponenten zu unterschiedlichen Zeiten t den Detektor erreichen

$$v = \frac{l}{t} = \mu \cdot E \qquad t = \frac{l}{(\mu \cdot E)}$$

(l = Länge der Kapillare).

2.3.2 Aufbau der Kapillarelektrophorese

Der Aufbau einer Kapillarelektrophorese ist sehr einfach. Sie besteht aus zwei Elektrolytgefäßen, die durch eine mit dem Elektrolyten gefüllte *fused silica* (amorpher Quarz) Kapillare verbunden sind, einer Hochspannungsversorgung und in der Regel einem UV-Detektor.

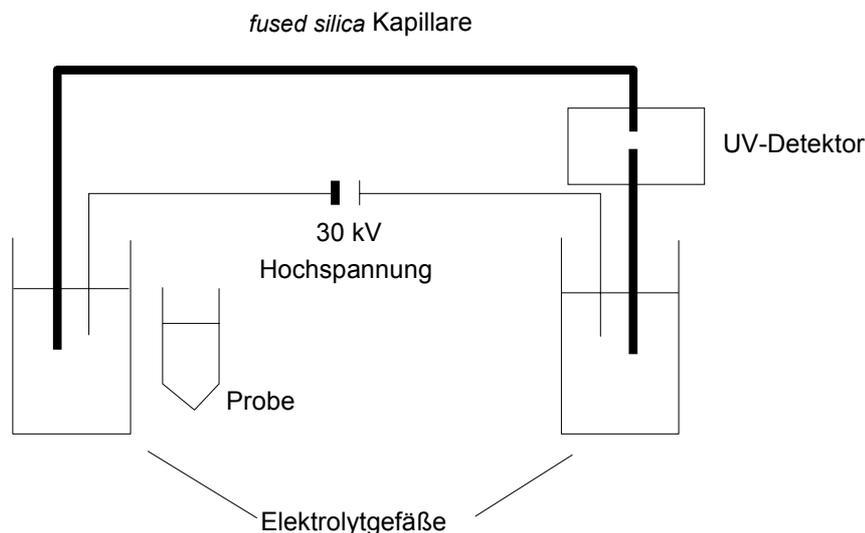


Abb. 2.6: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese.

2.3.3 Puffer

Als Elektrolyte werden in der Regel wäßrige Puffersysteme eingesetzt. Der Puffer gewährleistet den Stromtransport und hält den pH-Wert während der Trennung konstant. Häufig verwendete Puffer sind Phosphat-, Borat- und Tris-Puffer. Die Kapillarelektrophorese kann sowohl im Basischen ($\text{pH} < 13$) als auch im Sauren ($\text{pH} > 2$) durchgeführt werden. Zur Ionenstabilisierung werden sehr häufig auch Zwitterionen wie Betain, β -Alanin und ϵ -Aminocapronsäure eingesetzt.

Für Verbindungen, die sich im wäßrigem Medium nicht in ihren Mobilitäten unterscheiden, kann durch weitere Zusätze wie Micellenbildner, Ampholyte oder Gele

das Trennsystem nahezu beliebig verändert werden. In Tabelle 2.2 sind die unterschiedlichen Trennprinzipien zusammengefasst.

Die Konzentration der Elektrolytlösung richtet sich nach dem fließenden Strom. Üblicherweise liegt er bei einer 1 m langen Kapillare (75 μm Innendurchmesser) bei ca. 40 μA . Ist er zu hoch, entwickelt sich zuviel Wärme, die nicht abgeführt werden kann und somit zur Peakverbreiterung beiträgt, bis hin zum Verdampfen des Laufmittels. Durch Bildung von Gasblasen in der Kapillare wird der Strom unterbrochen und die Trennung stoppt. Fließt zu wenig Strom, kommt es zur Peakverbreiterung aufgrund der zu geringen Laufgeschwindigkeiten d.h. thermisch bedingter Longitudinaldiffusion.

2.3.4 Elektroosmotischer Fluss (EOF)

Der pH-Wert des Puffers bestimmt die Nettoladung der zu trennenden Proteine und Peptide. Bei einem niedrigen pH-Wert ($\text{pH} < \text{pI}$, isoelektrischer Punkt der Peptide) haben Peptide und Proteine eine positive Nettoladung und wandern alle in die gleiche Richtung. Als zusätzlich positive Kraft wirkt unter sauren Bedingungen der Elektroosmotische Fluss (EOF). Er entsteht durch die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht an der Phasengrenze zwischen der Kapillaroberfläche und dem Elektrolyten. Die pH-abhängige Dissoziation der freien Silanol-Gruppen an der Kapillaroberfläche bewirkt eine negative Aufladung der gesamten Oberfläche. Dadurch reichern sich die Kationen aus der Elektrolytlösung an der Kapillarwand an. Es bildet sich eine elektrische Doppelschicht. Legt man an die Kapillare ein elektrisches Feld an, so werden alle Kationen in Richtung Kathode beschleunigt und reißen aufgrund ihrer hohen Konzentration an der Grenzfläche die gesamte Flüssigkeit mit, das gesamte Puffermedium wandert in der Kapillare. Der EOF ist von pH und Ionenstärke abhängig. Bei einem basischen pH-Wert ist der EOF üblicherweise höher als die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen, bei saurem geringer. Daher können bei basischem pH auch Anionen und nicht geladene Peptide an der Kathode detektiert werden. Im Sauren belegen die Protonen die freien OH-Gruppen der Silanol-Gruppen, reduzieren damit die Oberflächenladung und den Einfluss des EOF. Die Trennungen werden reproduzierbarer [67]. Neben dem niedrigen pH verhindern ionische Zusätze oder eine höherer Ionenstärke, dass Analyt-Ionen die freien OH-Gruppen an der Oberfläche absättigen.

2.3.5 Kapillare

Die Trennung erfolgt in *fused silica* Kapillaren mit einem Innendurchmesser von üblicherweise 20 -100 μm . Eine 100 cm lange Kapillare mit einem Innendurchmesser

von 75 µm hat ein Volumen von ca. 4 µl. Für die mechanische Stabilität ist die Kapillare außen mit einer Polyimidschicht überzogen.

Die *fused silica* Oberfläche besitzt freie OH-Gruppen, die in Abhängigkeit vom pH-Wert des Elektrolyten dissoziieren. Bei einem pH-Wert > 2 ist die Oberfläche der Kapillare negativ geladen. Daraus resultiert einerseits der Elektroosmotische Fluss (EOF), andererseits kommt es zu Wechselwirkungen mit positiv geladenen Analyt-Ionen. Um die Adsorptionen zu verhindern, werden entweder die freien Silanol-Gruppen chemisch modifiziert (coating), oder positiv geladene Polymere an der Oberfläche adsorbiert. Eine weitere Möglichkeit um die Adsorption der Analyt-Ionen an der Kapillaroberfläche zu verhindern, ist der Zusatz von kationischen Detergentien im Elektrolyt oder die Erhöhung der Ionenstärke. Das führt zu einer Verdrängung der Analyt-Ionen von der negativ geladenen Oberfläche.

2.3.6 Injektion

Um die hohe Trenneffizienz der CE zu gewährleisten, muss das Injektionsvolumen sehr gering sein, damit es keinen signifikanten Beitrag zur Peakverbreiterung leistet. Bei einem Gesamtvolumen von wenigen Mikrolitern in einer Kapillare, darf das Injektionsvolumen nur einige Nanoliter betragen. Für die Routineanalytik und quantitative Bestimmung ist die Reproduzierbarkeit des Injektionsvolumens eine wichtige Forderung [68].

Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Injektionssysteme:

- hydrodynamische Injektion
- elektrokinetische Injektion

2.3.6.1 Hydrodynamische Injektion

Die Kapillare taucht in das Probengefäß ein, der Druck wird extern entweder auf das Probengefäß oder durch Vakuum auf der Detektionsseite für eine bestimmte Zeit t aufgegeben. Das Injektionsvolumen berechnet sich nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz:

$$V = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t}{8 \cdot \eta \cdot L}$$

(Δp = Druckdifferenz, r = Innenradius der Kapillare, t = Zeit, η = Viskosität, L = Gesamtlänge der Kapillare)

Das Injektionsvolumen wird beeinflusst von der Druckdifferenz Δp und der Injektionszeit t . Es ist abhängig von der Viskosität η der Lösung, dem Innenradius r und der Länge L der Kapillare. Der Vorteil dieser Injektionsmethode ist ihre gute Reproduzierbarkeit und die Möglichkeit auch große Probenmengen aufzugeben. Die injizierte Probe entspricht in ihrer Zusammensetzung der zu untersuchenden Probe, keine der Probenkomponenten wird unterdrückt. Das gilt auch für die nachfolgend beschriebene hydrostatische Injektion.

2.3.6.2 Hydrostatische Injektion

Bei der hydrostatischen Injektion wird der Druck durch Anheben des Probengefäßes für eine gewisse Zeit t auf ein erhöhtes Niveau erzeugt. Die Injektion erfolgt nach dem Prinzip der Schwerkraft. Die Druckdifferenz (Δp) ist durch den hydrostatischen Druck gegeben welcher definiert ist als:

$$\Delta p = \Delta h \cdot g \cdot \rho$$

(Δh = Höhendifferenz, g = Gravitationskonstante, ρ = Dichte des Puffers)

Die Vorteile der hydrodynamischen Injektion liegen in ihrer Einfachheit und Zuverlässigkeit.

2.3.6.3 Elektrokinetische Injektion

Hier erfolgt die Probenaufgabe durch Anlegen einer Hochspannung an das Probengefäß, wodurch die Probenkomponenten elektrophoretisch und elektroosmotisch in die Kapillare transportiert werden. Im Gegensatz zur hydrodynamischen und hydrostatischen Injektion kommt es hier zu einer Diskriminierung von Probenkomponenten entsprechend ihrer Mobilität. Diese selektive Injektion wird für gelgefüllte Kapillaren eingesetzt, da hier eine hydrodynamische oder -statische Injektion nicht möglich ist.

2.3.7 Detektion

Üblicherweise erfolgt die Probendetektion „on-column“ mit einem UV-Detektor. Die Detektionszelle ist Teil der Kapillare. Aufgrund der relativ kurzen optischen Weglänge (maximal der Innendurchmesser der Kapillare) ist die Detektionsempfindlichkeit in Bezug auf die Ausgangskonzentration (10^{-5} - 10^{-6} Mol/L) nicht sehr hoch. Aufgrund des sehr geringen Probenbedarfs (nl) wiederum ergibt sich insgesamt eine Empfindlichkeit im Femtomolbereich. Für eine höhere Empfindlichkeit bietet sich die Fluoreszenzdetektion an. Sie hat aber den Nachteil, dass die Proben vorher markiert werden müssen. Ein anderer Ansatz ist die Verlängerung der Detektionsstrecke. Dies

kann durch Aufweiten der Kapillare wie z.B. bei der „Bubble Cell“-Kapillare [69] erreicht werden. Die Kapillare ist an der Stelle des Detektionsfensters auf das drei- bis vierfache Volumen aufgeweitet. Damit lässt sich die Empfindlichkeit etwa um den Faktor sechs erhöhen. Das vergrößerte Volumen in der Detektionszelle bewirkt jedoch eine Verbreiterung der Peaks um den Faktor drei. Ein anderer Ansatz ist die Z-Zelle [70][71], sie ist eine Detektionszelle, bei der entlang der Kapillare detektiert wird. Das Detektionsfenster wird so auf 3 mm verlängert.

Die höchste Empfindlichkeit lässt sich erreichen, wenn von der „on-column“ auf eine „off-column“ Detektion umgestiegen wird. Die ESI- und MALDI-Massenspektrometrie bieten sich dafür an. Auch ist der Informationsgehalt eines Massenspektrums grösser als der eines UV-Signals.

2.3.8 CE Methoden

Mit der Kapillarelektrophorese sind nur Trennungen von Analyten unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität möglich. Durch Zusätze wie Micellenbildner, Siebmatrizes (Gele) und Ampholyte lässt sich das Elektrolytsystem so verändern, dass Verbindungen getrennt werden können, die sich in freier Lösung in ihren Mobilitäten nicht unterscheiden. Tabelle 2.2 fasst die verschiedenen Methoden der CE mit den Trennprinzipien und Anwendungsbereichen zusammen.

Tabelle 2.2: Trennprinzipien in der CE.

Trenntechnik		Trennung nach Unterschieden in	Applikation
Kapillarzonenelektrophorese	CZE	Größe/ Ladung (Mobilität)	kleine Ionen, Peptide, Proteine
Isotachophorese	ITP	Größe/ Ladung (Mobilität)	kleine Ionen, Proteine
Kapillaraffinitätslektrophorese	CAE	Größe/ Ladung (Mobilität)	Protein-Ligand-Wechselwirkung
Micellarelektrokinetische Chromatographie	MEKC	Polarität	Neutralteilchen, Aminosäuren
Kapillargelelektrophorese	CGE	Größe	Proteine, DNA
Isoelektrische Fokussierung	CIEF	Ladung (isoelektrischer Punkt)	Proteine

2.3.9 Beeinflussende Faktoren

Aus den obigen Zusammenhängen ergeben sich die Faktoren, die eine optimale Trennung beeinflussen und somit für eine Methodenentwicklung zu berücksichtigen sind.

Der *pH-Wert des Elektrolyten* (siehe Kapitel 3.1.1) bestimmt die *Nettoladung der Proben-Ionen*. Eine hohe effektive Nettoladung hat eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit zur Folge. Je nach Art der Nettoladung verringert sich der Einfluß des *EOF* auf die Trennung. Das Lösungsmittel bestimmt die *Viskosität des Elektrolyten*, von dem wiederum die effektive Wanderungsgeschwindigkeit der Proben-Ionen abhängt. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird außerdem durch die angelegte *Spannung* bzw. durch den *Strom* beeinflusst, der im direktem Zusammenhang mit der *Ionenkonzentration* des *Elektrolyten* steht. Durch Verwendung von oberflächenderivatisierten *Kapillaren* (siehe Kapitel 3.1.2) kann der *EOF* unterdrückt werden.

2.3.10 CE-MALDI Kopplung

Die Massenspektrometrie hat den Zugang zu immer komplexeren biologischen Proben in immer geringeren Probenmengen geöffnet. Es ist bekannt, dass es bei der MALDI-Analyse von Peptidgemischen, wie es z.B. enzymatische Proteinverdau sind, zu Signalunterdrückung einzelner Peptide kommt (siehe Kapitel 3.3.1.2). Eine vorgeschaltete Fraktionierung dieser Gemische steigert, nicht zuletzt durch Anreicherung der einzelnen Peptide in den Fraktionen, die Empfindlichkeit dieser Methode. Somit können Signalintensitäten erreicht werden, die für eine MALDI-PSD-Analyse notwendig sind. Unter den Trennverfahren hat die Kapillarelektrophorese das höchste Trennvermögen mit dem geringsten Probenverbrauch.

Typischerweise wird die CE als ein Trennverfahren in flüssiger Phase mit der ESI-MS gekoppelt. Die Kopplung mit der MALDI-MS ist wesentlich schwieriger, da die Probe erst mit der Matrix gemischt und getrocknet werden muss, bevor sie in das Massenspektrometer eingeführt werden kann. Grundsätzlich kann die MALDI-MS on-line oder off-line mit der CE gekoppelt werden [72].

Bei der on-line Kopplung wird die Probe kontinuierlich („continuous-flow“) oder als Aerosol in das MS eingeführt. Der Nachteil der Methoden ist die Notwendigkeit flüchtige Puffer zu verwenden, die auf spezielle Techniken der Kapillarelektrophorese beschränkt sind.

Eine off-line Kopplung ist dagegen wesentlich einfacher zu realisieren und bietet den Vorteil, dass beide Methoden unabhängig voneinander optimiert werden können. Ferner können Massenspektren unabhängig von den sehr kurzen Elutionszeiten der Proben aufgenommen werden. Die Proben können aufbewahrt werden, um gegebenenfalls Nachmessungen durchzuführen.

Off-line Kopplung bedeutet, dass die Probe nach der kapillarelektrophoretischen Trennung fraktioniert und gesammelt werden muss. In den letzten Jahren hat es einige Ansätze zur Fraktionierung gegeben. Die Schwierigkeiten bei der CE-Fraktionierung besteht darin, auch während der Fraktionierung die Kapillare elektrisch leitend verbunden zu halten. Eine Unterbrechung des Stromflusses stoppt die Trennung, und die Probenzonen beginnen verstärkt ineinander zu diffundieren. Bei der „stop-flow“ Technik wird die Trennung zur Fraktionierung unterbrochen. Das Kapillarende wird vom Elektrolytgefäß zu einem Probensammelgefäß gefahren. Die Spannung wird für eine kurze Zeit wieder angestellt, die Probe wandert in das Probengefäß. Danach taucht die Kapillare wieder in das Elektrolytgefäß ein. In dem Probengefäß ist etwas Puffer vorgelegt, was den Nachteil hat, dass die gesammelte Probe verdünnt wird. Eriksson *et al.* [73] sammeln die Fraktionen direkt auf einer feuchten Membran, z.B. Nitrocellulose oder PVDF. Das Kapillarende kontaktiert die feuchte Membran, so dass ein konstanter Stromfluß gewährleistet ist.

Das Auffangen der Tropfen am Ende der Kapillare, wie es bei der HPLC üblich ist, ist bei der CE-Fraktionierung nicht möglich. Das Elutionsvolumen liegt im Bereich von wenigen Nanolitern. Ein Flüssigkeitstropfen bildet sich erst im Mikroliterbereich. Kapillarkräfte halten die Probenfraktionen in der Kapillare, sie müssen aktiv durch Anlegen von Druck, Spannung oder durch die koaxiale Zuführung eines Flüssigkeitsstroms („*sheath-flow*“, siehe Kapitel 5.3.3.1) am Ende aus der Kapillare geholt werden. Die *sheath-flow* Technik bietet die Möglichkeit, die Proben direkt auf das MALDI-Target aufzubringen. Damit werden weitere Transferschritte, die immer mit Probenverlust einhergehen, vermieden.

2.4 Native Peptidgemische

Typische Anwendungsfelder für die Analytik komplexer Peptidgemische sind die drei folgenden Beispiele.

2.4.1 Arzneimittelwirkstoff Polyerga®

Polyerga®, ein Arzneimittel hergestellt von der Firma HorFerVit Pharma GmbH (Oldenburg), dient der Stabilisierung des Immunsystems in der unterstützenden Krebstherapie. Es wird ergänzend zur Chemotherapie oder im Anschluss an eine konventionelle Krebstherapie eingesetzt. Der Wirkstoff von Polyerga® ist ein Extrakt aus Schweinemilz, und stellt ein komplexes Gemisch von niedermolekularen Peptiden mit einem Molekulargewicht zwischen 500 und 3000 Da dar [74]. Eine Identifizierung oder Sequenzierung einzelner Komponenten war bislang nicht möglich, da das entsprechende analytische Verfahren nicht zur Verfügung stand.

2.4.2 MHC-Klasse I Peptide

Nach der Transplantation eines Organs kommt es in der Regel zu einer immunologischen Abwehrreaktion seitens des Empfängers gegen das Transplantat. Die Ursache für diese Transplantatabstossung sind die auf der Oberfläche nahezu aller Zellen präsentierten Moleküle des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (englisch major histocompatibility complex, MHC). Diese MHC-Moleküle werden von T-Lymphozyten der Immunabwehr erkannt.

Das Immunsystem unterteilt sich in ein zelluläres und ein humorales (lat. Feuchtigkeit) Abwehrsystem. Den wichtigsten Teil des zellulären Abwehrsystems stellen die T-Lymphozyten (thymusabhängige Lymphozyten) dar. Sie erkennen Antigene, die auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Als Antigene werden Substanzen bezeichnet, die eine spezifische Immunantwort induzieren. Im allgemeinen besitzen Antigene keine charakteristische oder spezifische chemische Zusammensetzung, die sie von analogen nicht-antigen wirkenden Substanzen, unterscheiden. Antigene können von Viren oder intrazellulären Bakterien stammen, die sich innerhalb der Zelle vermehren, oder von Pathogenen die Zellen aus der extrazellulären Flüssigkeit aufnehmen. T-Zellen können intrazelluläre Krankheitserreger erkennen, da infizierte Zellen an ihrer Oberfläche Peptidfragmente präsentieren, die aus den Proteinen der Krankheitserreger stammen. Peptide aus körpereigenen Proteinen sind dem Immunsystem bekannt und werden von den T-Lymphozyten ignoriert. Die fremden Peptide werden von spezialisierten Glycoproteinen der Wirtszelle, den MHC-Molekülen, an die Oberfläche gebracht. Das

Erkennen eines Antigens in Form eines kurzen Peptidfragmentes, das an ein MHC-Molekül gebunden ist und an der Zelloberfläche präsentiert wird, ist das wichtigste Merkmal der Antigenerkennung von T-Zellen. Sie erkennen immunstimulierende Peptide nur, wenn diese an das passende MHC-Molekül gebunden sind.

Es gibt zwei Arten von MHC-Molekülen, MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. MHC-I Moleküle transportieren aus dem Zytosol stammende Peptide an die Zelloberfläche, wo der Peptid-MHC-Komplex von CD8-T-Zellen erkannt wird. Die Aufgabe der CD8-T-Zellen besteht dann darin, infizierte Zellen zu töten. MHC-II Moleküle befördern dagegen Peptide aus dem vesikulären System an die Zelloberfläche, die von CD4-T-Zellen erkannt werden. Die CD4-T-Zellen sind darauf spezialisiert, andere Zellen für eine Immunantwort zu aktivieren. CD8-T-Zellen können, wie im Tiermodell gezeigt wurde, Tumore eliminieren bzw. sie in ihrem Wachstum hemmen [75][76]. Aus diesem Grund beschäftigen sich heute viele Tumorimmunologen mit der Strukturaufklärung der an MHC-Klasse I gebundenen Peptiden. Die Hoffnung ist, dass Antigene, die ausschliesslich auf bösartigen Zellen auftauchen, sich dazu verwenden lassen, die unzureichende Immunreaktion gegen sie zu verstärken oder überhaupt erst zu starten. Daraus ließe sich eine Tumor-spezifische Immuntherapie entwickeln, die auf einer Impfung mit den identifizierten Peptid-Antigenen beruht.

2.4.2.1 Prozessierung von MHC-Klasse I assoziierten Peptiden

Peptide, die von MHC-Klasse I Molekülen gebunden werden, entstehen durch Abbau zytosolischer Proteine. Die Proteine können normale zelluläre Proteine (Selbstproteine) sein, aber auch Virus-, oder Tumorproteine. Diese Proteine werden zunächst vom Proteasom, einer multikatalytischen Protease, zu Peptiden abgebaut. Diese Peptide werden durch den TAP-Transporter (Transporter associated with Antigen Processing) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) gebracht, wo sich die unbeladenen MHC-I-Moleküle befinden. Von den durch den TAP-Transporter in das ER gebrachten Peptiden kann nur ein Teil an die MHC-Moleküle binden. Peptide die an MHC-I-Moleküle binden, sind gewöhnlich acht bis zehn Aminosäuren lang. Die Bindung erfolgt nur, wenn das Peptid an bestimmten Positionen spezielle Aminosäuren als Ankerstrukturen aufweist. Diese Anker müssen nicht identisch sein, sie sind aber immer ähnlich. Diese Art der Peptiderkennung führt dazu, dass MHC-Klasse-I Moleküle ein breites Spektrum verschiedener Peptide binden können. Erfolgt die Bindung eines Peptides in die Bindungsfurche des MHC-I-Moleküls, so ändert das MHC-Molekül seine Konformation, löst sich vom ER und wird über Golgivesikel zur Zelloberfläche transportiert, wo die prozessierten Peptide den CD8-T-Zellen präsentiert werden (Abb. 2.7).

Die an das MHC-I-Molekül gebundenen Peptide sind fester Bestandteil ihrer Struktur. Ohne Peptide sind sie instabil. Die feste Bindung ist wichtig, da es sonst an der Zelloberfläche zu Peptidaustauschen kommen würde. Die Stabilität des Peptid-MHC-Klasse I-Komplexes hat den Vorteil, dass die gebundenen Peptide bei der Isolierung der MHC-I-Moleküle aus Zellen mit aufgereinigt und analysiert werden können. Dabei eluiert man die Peptide aus den MHC-I-Molekülen durch Denaturierung des Komplexes mit Säure. Anschliessend kann man sie reinigen [77] und sequenzieren (siehe Kapitel 3.4.2.1).

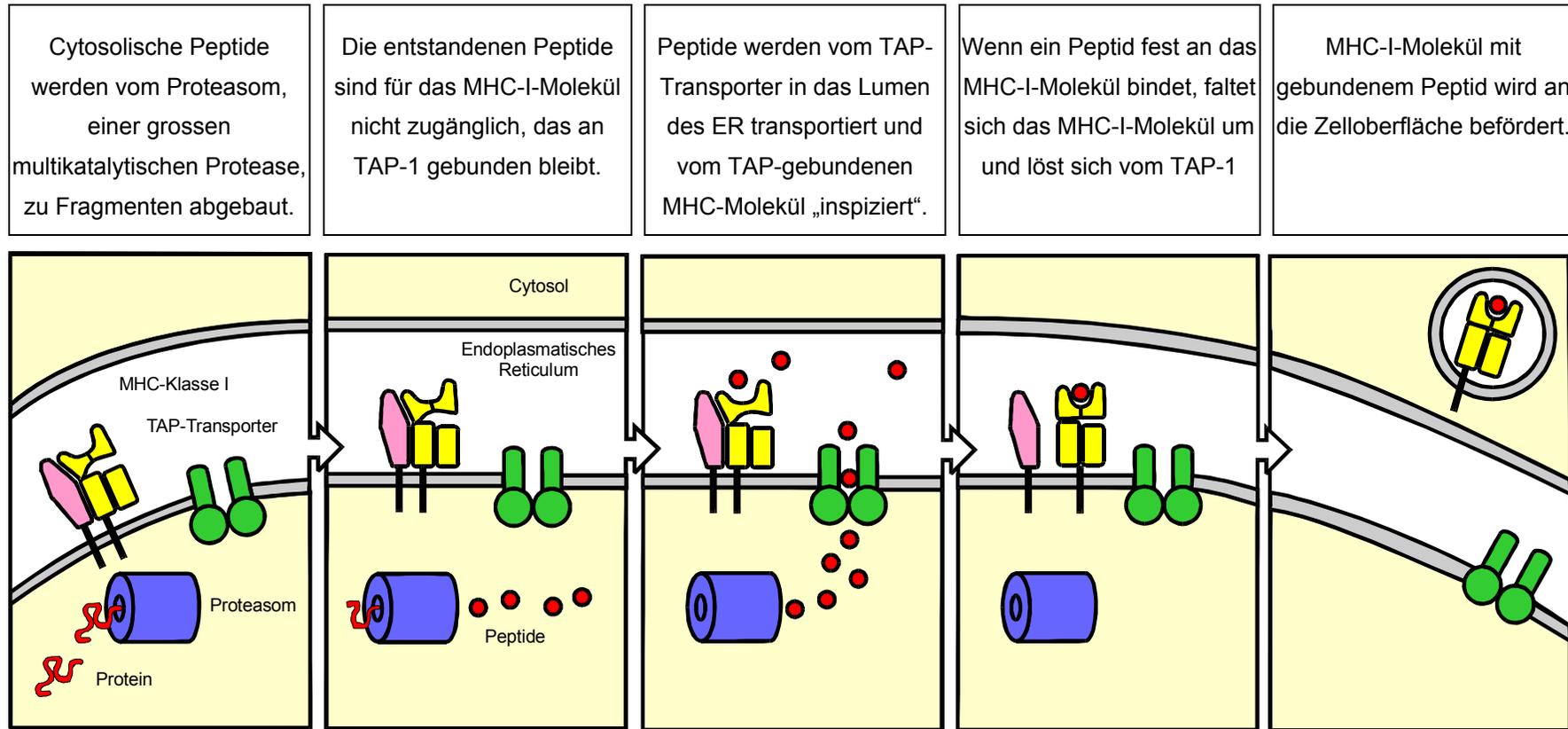


Abb. 2.7: Prozessierung von MHC-Klasse I Peptiden. [78].

2.4.2.2 Analytik von MHC-Klasse I Peptiden

Für die Identifizierung von antigenen Peptiden, die assoziiert an MHC-Klasse I Moleküle den tumorspezifischen CTL (cytotoxischen T-Lymphozyten) präsentiert werden, erwiesen sich bislang drei unterschiedliche Methoden als erfolgreich.

Die molekularbiologische Methode der Klonierung von Tumortranskripten und ihre Identifizierung mit tumorreaktiven T-Lymphozyten war diejenige, mit der die meisten bis heute bekannten humanen Tumorantigene identifiziert werden konnten [79].

Ein anderer Ansatz ist es, Proteine die eine Bedeutung für die Pathogenese von Tumoren besitzen, daraufhin zu prüfen, ob sie Sequenzen besitzen, die bekannten Bindungsmotiven von MHC-Klasse I entsprechen [80].

Bei der dritten Methode werden die MHC-Peptidkomplexe aus den Tumorzellen direkt mit einer Immunoaffinitätschromatographie isoliert. Durch eine anschließende saure Hydrolyse werden die Peptide aus den MHC-Molekülen freigesetzt und über eine RP-HPLC aufgetrennt. Diese Methode benötigt eine sehr empfindliche Analytik. Die Gesamtmenge der isolierten Peptide liegt im Bereich von 100 fmol bis einem pmol. Ein Vorteil dieses Ansatzes der direkten Charakterisierung von Tumorantigenen liegt darin, dass auch immunologisch relevante posttranslationale Modifikationen erkannt werden können, die bei dem molekularbiologischen Ansatz nicht erfasst werden.

Henderson *et al.* [81] und Cox *et al.* [82] gelang es mittels der ESI-MS, tumorassoziierte MHC-Klasse I Peptide auf Melanomen zu identifizieren. Im Vergleich mit der klassischen Sequenziermethode, dem Edman-Abbau, hat die ESI-MS den Vorteil, Peptide einzeln direkt aus Mischungen sequenzieren zu können. Ihr Nachteil ist, dass bei der on-line LC-Kopplung die gesamte Probe im ESI-MS versprüht wird. Damit sind eventuell notwendige Nachmessungen oder Vergleichsmessungen zur Verifizierung der Ergebnisse nicht möglich. Die MALDI-MS bietet aufgrund des „off-line Charakters“ die Möglichkeit, Proben mehrfach zu messen. Außerdem ist es möglich, direkt auf dem Probeneller mit der bereits untersuchten Probe Derivatisierungen der Peptide durchzuführen, die die Sequenzierung unterstützen.

Für die untersuchten MHC-Klasse I Peptide der Nierenkarzinomzelllinie A-498 war es so möglich, trotz Probenmengen im Femtomolbereich, die Proben mehrfach zu analysieren und so wichtige Sequenzinformationen zu bekommen. Durch Derivatisierungen konnten weitere Strukturdaten erhalten werden, die zur Aufklärung der Aminosäuresequenz von 14 MHC-Klasse I Peptiden führte (siehe Kapitel 3.4.2) [77][83].

2.4.3 Phosphopeptide

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen sind zwei dynamische Prozesse, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellfunktionen spielen. Die Phosphatgruppe eines ATP-Moleküls wird durch das Enzym Proteinkinase auf die Hydroxylgruppen der Seitenketten von Serin, Threonin und Tyrosin eines Proteins übertragen und durch ein weiteres Enzym, die Protein-Phosphatase entfernt. Der Phosphorylierungsgrad eines bestimmten Proteins in der Zelle hängt von den relativen Aktivitäten der Proteinkinasen und Phosphatasen ab. Bis zu einem Drittel aller Proteine, die von einer Zelle exprimiert werden, sind phosphoryliert. Neuere Ergebnisse der Genom-Sequenzierungen zeigen, dass ungefähr 4-5% aller Gene von eukaryontischen Zellen für Proteinkinasen codieren [84]. Die Aminosäuren Serin und Threonin werden unter normalen Bedingungen wesentlich häufiger phosphoryliert als Tyrosin. Phosphotyrosin macht weniger als 1% der O-phosphorylierten Seitenketten vom Gesamtprotein aus, spielt aber eine sehr wichtige Rolle bei der Zellproliferation und Zelldifferenzierung durch Hormone, Wachstumsfaktoren, regulatorische Peptiden und andere Mitogene [85].

Da jede Phosphatgruppe zwei negative Ladungen trägt, kann die kovalente Bindung einer Phosphatgruppe an ein Protein strukturelle Veränderungen des Proteins zur Folge haben, weil z.B. eine Gruppe von positiv geladenen Seitenketten angezogen wird. Dieser lokale Effekt, kann an einer anderen Stelle zur Veränderung der Tertiärstruktur führen. Die funktionelle Bedeutung der Modifikation variiert je nach Molekül. Casein, ein Protein der Milch, enthält z.B. viele Ca^{2+} -bindende Phosphoserin-Gruppen. Die Phosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste ist ein wichtiger Schritt bei der Umwandlung normaler Zellen in Krebszellen .

Zu Beginn der 90er Jahre wurde der extrem hohe Phosphorylierungsgrad des τ -Proteins in den „paired helical filaments“ (PHF) als mögliche Ursache der Neurodegeneration bei der Alzheimer Krankheit erkannt [86][87][88][89]. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung des τ -Proteins, so dass eine Bindung an die Mikrotubuli nicht mehr möglich ist [90]. Das τ -Protein in PHF aus dem Gehirn von Alzheimer Patienten besitzt 25 Phosphorylierungsstellen. Diese sind nicht über das gesamte Protein verteilt, sondern in zwei Bereichen (181-235 und 396-412) des τ -Proteins lokalisiert. In Gehirnen von Alzheimer Patienten sind mehr als 20 dieser möglichen Stellen phosphoryliert. Die meisten dieser Phosphorylierungsstellen zeigen die Erkennungssequenz Ser/Thr-Pro der Prolin-gerichteten Kinase [91]. In gesunden Gehirnen ist τ heterogen an acht bis zehn dieser 25 möglichen Stellen phosphoryliert [92].

Die Identifizierung posttranslationaler Modifikationen, wie die Phosphorylierung, ist für die vollständige Charakterisierung von Proteinen notwendig. Da die Proteine erst nach ihrer Translation modifiziert werden, lassen sich Modifikationen, wie die Phosphorylierung, nicht aus der DNA-Sequenz ableiten. Eine vollständige Proteincharakterisierung ist nur über eine Aminosäuresequenzierung möglich. Die üblicherweise angewendeten analytischen Methoden, wie ^{31}P -NMR [93][94], oder radioaktive Markierung von Phosphopeptiden mit ^{32}P [95] mit anschließender chromatographischer oder elektrophoretischer Identifizierung der markierten Proteine, haben den Nachteil, dass nur Phosphopeptide bzw. -Proteine identifiziert werden, aber keine Aussagen über die Phosphorylierungsstelle getroffen werden können.

Bei der Edman-Sequenzierung [96] ist es möglich, durch Derivatisierung der Phosphoaminosäuren, zwischen Phospho-Serin, -Tyrosin und -Threonin zu unterscheiden, und die Position der Phosphorylierung zu bestimmen. Diese Methode ist aber weit unempfindlicher als der normale Edman-Abbau.

Massenspektrometrische Methoden, wie FAB-MS [97][98][99], PDMS [100], ESI-MS im positiv- und negativ-Mode [101][102][103][104] und MALDI-MS [105][106][107][109][110], wurden zur Strukturaufklärung von Phosphopeptiden angewendet. Neben der Sequenzierung von Phosphopeptiden wurden auch deren Phosphorylierungsstellen identifiziert.

Einige MALDI-MS und MALDI-PSD Untersuchungen zeigen Unterschiede zwischen den verschiedenen Phosphoaminosäuren. Aus dem Dephosphorylierungsmuster der Vorläufer-Ionen lässt sich zwischen den aliphatischen Aminosäuren Phosphoserin und -threonin und der aromatischen Aminosäure Phosphotyrosin unterscheiden. Bei den beiden ersten kommt es zur Abspaltung von HPO_3 (-80 Da) und von H_3PO_4 (-98 Da). Die Abspaltung der Phosphorsäure wird bei Phosphotyrosin nicht beobachtet [105][109]. Diese Untersuchungen beziehen sich aber nur auf das Beobachten der Dephosphorylierung des Vorläufer-Ions. Es gibt nur wenige Publikationen die mittels massenspektrometrischer Untersuchungen nicht nur das Phosphopeptid bestimmen, sondern durch vollständige Peptidsequenzierung auch die Phosphorylierungsstelle identifizieren, wobei in der Literatur nur Spektren von Peptiden mit Phosphoserin beschrieben wurden [105][110][111]. Keine dieser Publikationen versucht, grundsätzliche Regeln der massenspektrometrischen Dephosphorylierung zu finden

In der vorliegenden Arbeit wird das Fragmentierungsverhalten von Phosphopeptiden im MALDI-PSD Mode am Beispiel von zwei τ Sequenzen (τ 224-240 und τ 390-396 [94]) untersucht. Es galt herauszufinden, in wieweit die Phosphatgruppe das Fragmentierungsverhalten von Peptiden beeinflusst, sowie neue Regeln zu finden, anhand derer die Identifizierung von Phosphopeptiden in unbekanntem, komplexen

Peptidgemischen ermöglicht wird. Hierzu wurden zum ersten Mal die PSD-Spektren von Phosphopeptiden mit den PSD-Spektren sequenzhomologer unphosphorylierter Peptide verglichen, um allgemein gültige Regeln aufstellen zu können.

3 ERGEBNISSE

3.1 Methodenentwicklung zur kapillarelektrophoretischen Trennung von Peptiden

Aus analytischer Sicht sind Peptide überaus variabel. Sie sind aus 20 verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt, die in Art und Häufigkeit beliebig kombiniert werden können. Ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften werden durch die funktionellen Seitenketten der Aminosäuren bestimmt, aus denen sie aufgebaut sind. Diese sind sauer oder basisch, hydrophil oder hydrophob. Peptide sind amphoter, d.h. sie haben sowohl saure als auch basische Eigenschaften. Ziel war es, eine universelle Methode der kapillarelektrophoretischen Trennung zu entwickeln, die auf völlig unbekannte Peptidgemische angewendet zu einer hinreichenden Auftrennung in einzelne Peptide führt. Für die Methodenentwicklung wichtigste Charakteristika der Peptide sind ihre Nettoladung und ihr Adsorptionsverhalten. Die Methode wurde unter Berücksichtigung folgender methodischer Parameter entwickelt:

- Zusammensetzung des Elektrolyten
- pH-Wert
- Konzentration des Elektrolyten
- Art der verwendeten Kapillare
- Detektionswellenlänge

Der gewählte Puffer muß für eine spätere off-line Kopplung der CE mit der MALDI-MS den Anforderungen beider Methoden genügen. Die massenspektrometrische Analyse verlangt möglichst wenig Alkalisalze, da sonst Adduktionen wie $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ auftreten, die die PSD-Analytik erschweren.

Die Methode wurde mit Modellgemischen aus fünf bzw. zehn synthetischen Peptiden (Tabelle 3.1) entwickelt.

Tabelle 3.1: Peptide des Modellgemisches und ihre pH-abhängige Nettoladung.

Peptid	Aminosäuresequenz	MW (monoisotopisch) [u]	Nettoladung*			
			pH 2	pH 4	pH 9	pH 10
Dynorphin 1-13	YGGFLRRIRPKLK	1602,99	+5,61	+5,02	+4,43	+3,19
Dynorphin 1-9	YGGFLRRIR	1136,66	+3,60	+3,01	+2,48	+1,64
Angiotensin I (Goosefish)	NRVYHPFHL	1281,61	+3,70	+3,00	+0,31	-0,40
[des Pro ²]-Bradykinin	RPGFSPFR	962,51	+2,01	+2,01	+1,55	+1,10
Melittin (Bee Venom)	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	2844,76	+4,95	+3,65	+2,74	+1,82
Substanz P	RPKPQQFFGLM-NH ₂	1346,74	+2,66	+2,02	+1,52	+0,88
[Arg ⁸]-Vasopressin	$\overline{\text{CYFQNC}}\text{PRG-NH}_2$	1083,46	+1,80	+1,02	-0,90	-2,40
Bombesin	UQRLGNQWAVGHLM-NH ₂	1618,82	+1,67	+1,01	0,00	0,00
Oxytocin	$\overline{\text{CYIENC}}\text{PLG-NH}_2$	1007,43	+0,69	+0,02	-2,90	-3,40
Delta-Sleep-inducing-Peptide (DSIP)	WAGGDASGQ	848,35	+0,58	+0,57	-1,29	-1,80

*Berechnung der Nettoladung erfolgte mit dem Programm *Mass* [112] (siehe Kapitel 5.5.1).

3.1.1 Abhängigkeit der kapillarelektrophoretischen Trennung vom pH-Wert

Der pH-Wert und die Zusammensetzung des Elektrolyten haben eine große Auswirkung auf die elektrolytische Trennung von Peptiden (siehe Kapitel 2.3.3). Im ersten Schritt der Methodenentwicklung wurden verschiedene Puffersysteme ausgehend von den aus der Literatur bekannten Puffern getestet. Typische Puffer für Peptid- und Protein-Trennungen sind Natriumborat-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 bis 10,5 und Natrium- bzw. Kaliumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert zwischen 2,5 und 7,0 [113]. Abb. 3.8 zeigt die kapillarelektrophoretische Peptidtrennung mit unterschiedlichen Puffersystemen bei verschiedenen pH-Werten. Verwendet wurden die folgenden Puffer:

- 100mMol/L CAPS (3-[Cyclohexylamino]-1-Propansulfonsäure)-Puffer, pH 9,8
- 50 mMol/L Na-Borat-Puffer, pH 9,1
- 20 mMol/L Zitronensäure/15 mMol/ NaCl-Puffer, pH 2,1

Bei einem pH von 9,8 (CAPS-Puffer) hat das Peptid Oxytocin eine Nettoladung von - 3,40 (Tabelle 3.1). In Richtung der Kathode wird es nur durch den EOF transportiert. Es kommt zu einer Überlagerung der Peaks von Bradykinin und Oxytocin. Auch bei einem pH-Wert von 9,1 können die sauren Peptide nicht getrennt werden. Erst bei einem pH von 2,1 haben alle Peptide eine unterschiedliche positive Nettoladung und trennen sich entsprechend ihrer Mobilität. Melittin wird trotz seiner hohen Nettoladung von + 4,95 aufgrund seiner Größe erst als drittes Peptid detektiert (Abb. 3.7c). Die Reihenfolge der Trennung entspricht der theoretisch erwarteten. Damit hat sich als optimaler Puffer für die Trennung des Modellpeptidgemisches der Zitronensäure-Puffer bei pH 2,1 erwiesen. Die Zitronensäure hat einen weiteren Vorteil: Sie komplexiert bei der anschließende MALDI-Analyse Na-Ionen, die in höheren Konzentrationen die MALDI-Analyse stören. Alle weiteren Trennungen werden mit dem Zitronensäure-Puffer durchgeführt.

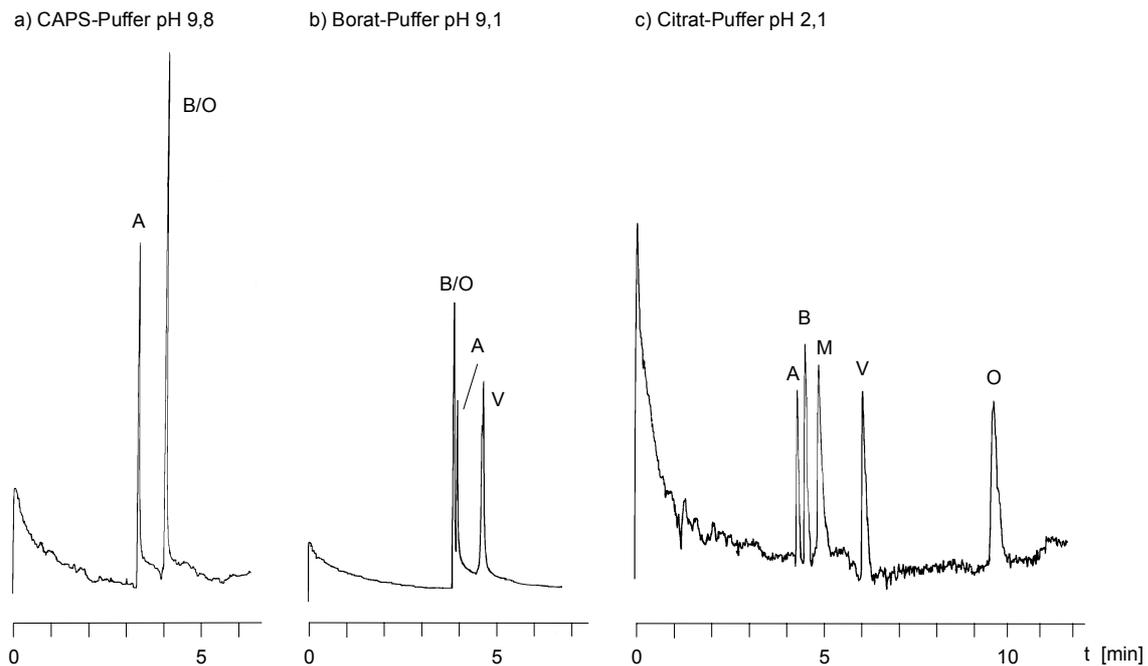


Abb. 3.8: Einfluss des pH Wertes des Puffers auf die elektrophoretische Trennung von Modellpeptiden
 a) CE-Trennung von Angiotensin (A), [des-Pro²]-Bradykinin (B) und Oxytocin (O) mit einem Caps-Puffer pH 9,8 (100 mMol/L 3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure, pH mit NaOH eingestellt);
 b) CE-Trennung von Angiotensin (A), [des-Pro²]-Bradykinin (B), [Arg⁸]-Vasopressin (V) und Oxytocin (O) mit einem 50 mMol/L Na-Borat Puffer bei einem pH von 9,1;
 c) CE-Trennung von Angiotensin, [des-Pro²]-Bradykinin, Melittin (M), [Arg⁸]-Vasopressin (V) und Oxytocin (O) mit einem Na-Citrat-Puffer bei pH 2,1. Trennbedingungen: Kapillare, *fused silica*, 75 μm x 110 mm; Detektion, 214 nm; Spannung, 30 kV; Strom, 80-90 μA .

3.1.2 Einfluß der Kapillare auf die Trennung

Durch Verwendung oberflächenderivatisierter Kapillaren läßt sich die Adsorption von Analyt-Ionen an der Wandoberfläche unterdrücken, und damit die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit erhöhen. Versuche mit *fused silica* und derivatisierten Kapillaren (Polyethylenglycol (PEG, *CElectPI75*) und Polyacrylamid (PAA)) führten zum Ergebnis, dass die reine *fused silica*-Oberfläche das beste Trennergebnis für das Modellpeptidgemisch zeigt (Abb. 3.9). Durch die Verwendung der verschiedenen Kapillaren wurde die Elutionsreihenfolge der Peptide nicht verändert. Die beiden Dynorphin-Derivate 1-13 und 1-9) eluieren als erstes, gefolgt von Angiotensin I und [des Pro²]-Bradykinin. Trotz seines im Verhältnis zu den anderen Peptiden hohen Molekulargewichtes eluiert Mellitin aufgrund seiner hohen Nettoladung (+4,95) an fünfter Stelle vor Substanz P, [Arg⁸]-Vasopressin, Bombesin, Oxytocin und DSIP. Die Trennungen wurden mit einem Zitronensäure/NaCl-Puffer, pH 2,1 (20 mMol/L Zitronensäure, 15 mMol/L NaCl, pH Einstellung mit HCl) durchgeführt. Die Kapillare

CElectP175 soll laut Herstellerangaben in ihrem Verhalten einer *fused silica* Kapillare entsprechen. Durch die Derivatisierung soll die Adsorption von Analyt-Ionen an der Kapillaroberfläche verhindert werden. Im Vergleich mit der *fused silica* Kapillare wird eine etwas höhere Empfindlichkeit erreicht, doch werden die Peaks breiter, und die Analysenzeiten verdoppeln sich. Derivatisierte Kapillaren haben dazu noch den großen Nachteil, dass ihre Oberflächen nicht regeneriert werden können. Eventuelle Adsorptionen an der Kapillaroberfläche können bei einer *fused silica* Kapillaren durch Spülen mit 0,1 molarer NaOH und anschließender Konditionierung mit verd. HCl entfernt werden. Das Modellpeptidgemisch ist eine Mischung von Peptiden verschiedenster Eigenschaften, hydrophob, hydrophil, basisch oder sauer. Es entspricht somit einer nativen Mischung wie z.B. einem tryptischen Proteinverdau. Die *fused silica* Kapillare hat sich aufgrund der Trennergebnisse und ihrer Regenerierbarkeit als die am besten geeignete Kapillare für die Trennungen eines solchen Peptidgemisches erwiesen.

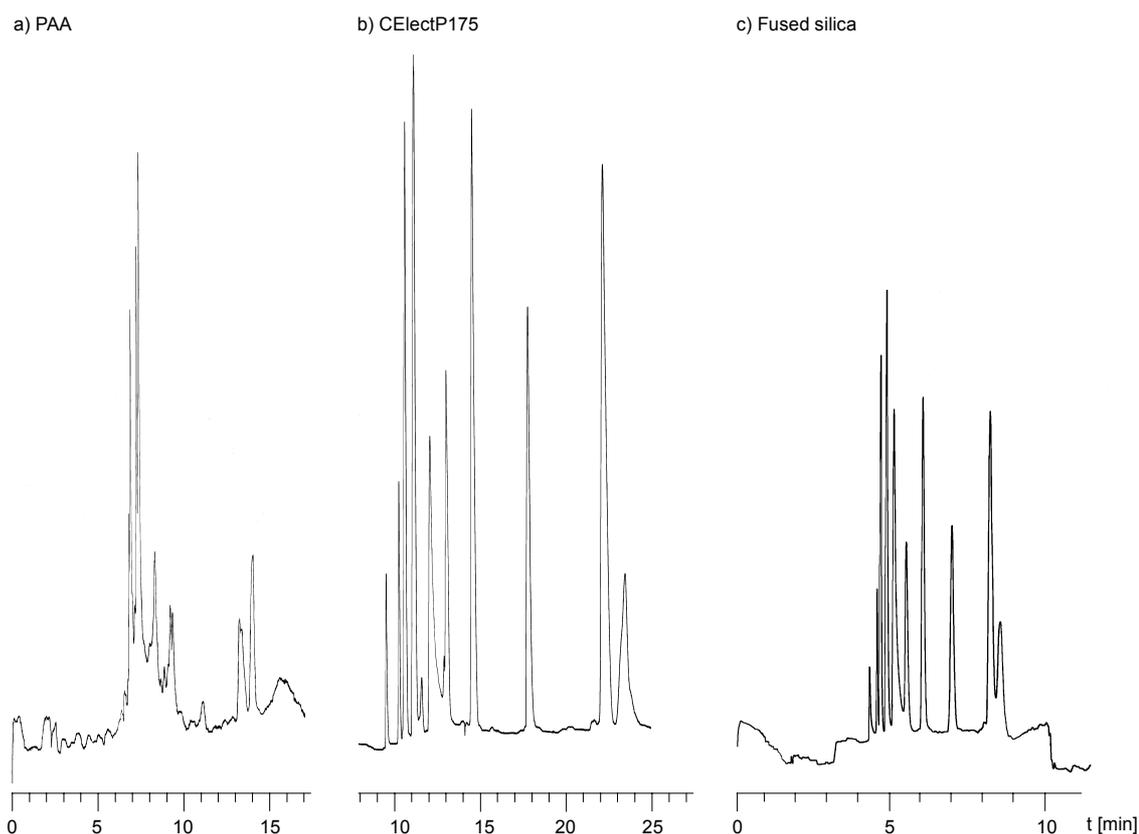


Abb. 3.9: Elektrophoretische Trennung des Modellpeptidgemisches (Dynorphin 1-13, Dynorphin 1-9, Angiotensin, [des Pro2]-Bradykinin, Melittin, Substanz P, [Arg8]-Vasopressin, Bombesin, Oxytocin, DSIP) mit verschiedenen Kapillaren a) PAA (Polyacrylamid), 75 μm x 110 mm b) CElectP175 (Polyethylenglycol), 75 μm x 110 mm c) fused silica, 75 μm x 110 mm. Trennbedingungen: Puffer, 20 mMol/L Zitronensäure/15 mMol/L NaCl, pH 2,1; Detektion, 214 nm; Spannung, 30 kV; Strom, 80-90 μA .

3.1.3 Steigerung der Detektionsempfindlichkeit

Peptide besitzen keine spezifische UV-Absorption. Üblicherweise wird die Peptidbindung bei 210-214 nm detektiert. Durch Verändern der Detektionswellenlänge von 214 nm auf 195 nm konnte die Empfindlichkeit um das bis zu 3,5-fache verstärkt werden (Abb. 3.10). Eine weitere Steigerung war nicht möglich, da bei 170 nm die Eigenabsorption der *fused silica* Kapillare beginnt. Die bei 195 nm erreichte Empfindlichkeit liegt für das Modellpeptidgemisch bei 5×10^{-6} Mol/L bei einem Aufgabevolumen von 168 nl. Für einzelne Peptide (Dynorphin 1-9, Angiotensin, [des Pro²]-Bradykinin, [Arg⁸]-Vasopressin und Oxytocin) können aufgrund der höheren UV-Absorption Nachweisgrenzen im niedrigen Femtomolbereich erreicht werden bei einer Probenlösungskonzentration von 10^{-6} Mol/L. Die sehr geringe Detektionsstrecke von 75 μm (Innendurchmesser der Kapillare) bedingt, dass die Probenlösungen eine relativ hohe Konzentration besitzen müssen, auch wenn der Probenverbrauch dann nur im Nanoliterbereich liegt.

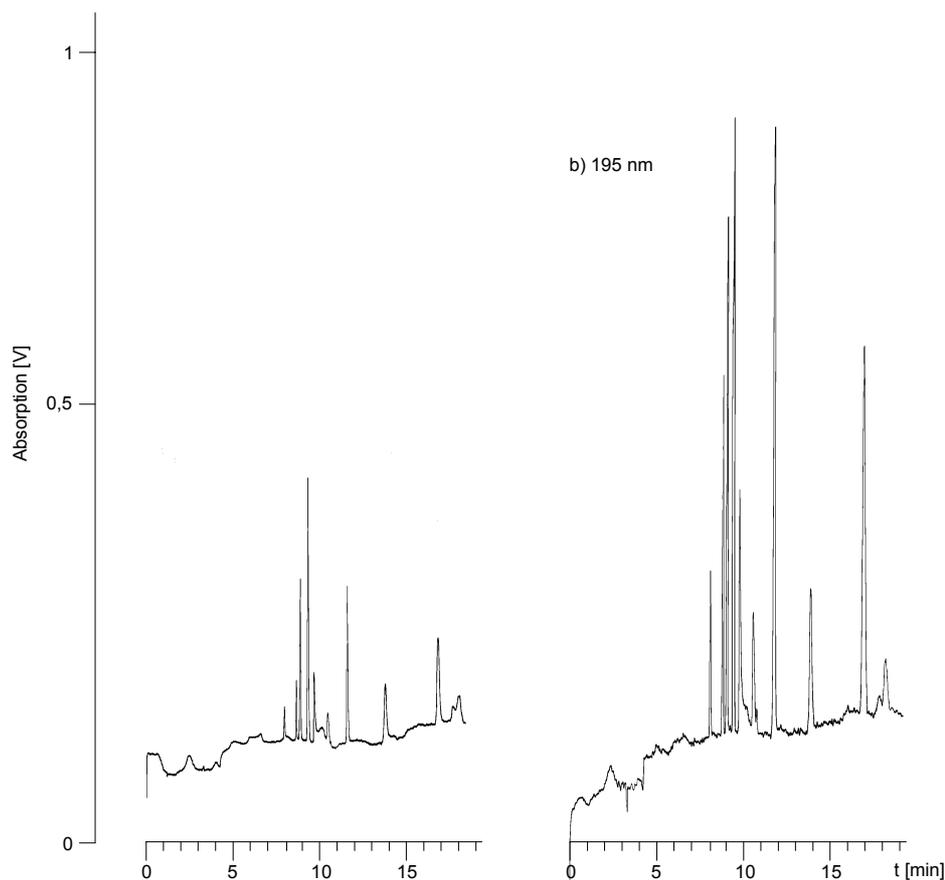


Abb. 3.10: CE-Trennung des Modellpeptidgemisches aus 10 Peptiden (siehe Tabelle 3.1) bei unterschiedlichen Detektionswellenlängen: a) 214 nm, b) 195 nm; Trennbedingungen: Puffer, 20 mMol/L Zitronensäure/ 15 mMol/L NaCl, pH 2,1; Kapillare, fused silica, 75 μm x 110 mm; Spannung, 30 kV; Strom, 80-90 μA ; Probenmenge, 168 nl, 5×10^{-6} Mol/l.

3.1.4 Einfluß der Konzentration des Elektrolyten auf die kapillarelektrophoretische Trennung

Die Ionenkonzentration des Elektrolyten bestimmt die Laufgeschwindigkeit. Für die off-line Kopplung mit der MALDI-MS wurde aus diesem Grund die Konzentration des Elektrolyten auf 15 mMol Zitronensäure und 12 mMol NaCl reduziert. Bei einer zu kurzen Trennzeit ist eine Fraktionierung des Peptidgemisches nicht möglich. Die Elution der einzelnen Peptide erfolgt zu schnell hintereinander, so dass der Präparationsroboter (siehe Kapitel 3.2.1) für eine automatische Probenfraktionierung und Präparation nicht schnell genug reagieren kann. Durch Reduzierung der Ionenkonzentration lässt sich der fließende Strom verringern und damit die Wanderungsgeschwindigkeit reduzieren.

Für die massenspektrometrische Analytik sollte NaCl durch Ammoniumchlorid ersetzt werden, um so eine $[M+Na]^+$ -Adduktionenbildung zu verhindern. Aufgrund der geringeren Ionenstärke der NH_4^+ -Ionen führt dies jedoch zu einem wesentlich schlechteren Trennergebnis. Eine hohe Ionenstärke oder Pufferkonzentration vermindert den EOF. Dadurch dass die Konzentration für die langsamere Trennung reduziert werden muss, muss die Ionenstärke hoch bleiben. Im weiteren hat sich jedoch gezeigt, dass die Konzentration der Na-Ionen durch die Zugabe der Matrix bei der Probenpräparation für die MALDI-MS hinreichend stark verdünnt wird, und es zu keiner wesentlichen Alkali-Adduktionenbildung kommt.

Aus den oben gezeigten Ergebnissen ergibt sich für die Trennung von nativen Peptidgemischen (siehe Kapitel 3.4.1) die folgende Trennmethode:

- Zitronensäure-Puffer (15 mMol Zitronensäure/12 mMol NaCl, pH 2,1, eingestellt mit HCl)
- *Fused silica* Kapillare (Innendurchmesser 75 μ m, Länge 110 cm)
- Detektionswellenlänge 195 nm.

3.2 CE-MALDI Kopplung

3.2.1 Entwicklung des Präparationsroboters

Basierend auf einem Produkt der Firma „bai Bioanalytische Instrumente“ (Bensheim) wurde eine off-line Kopplung entwickelt, bei der das CE-Eluat direkt für MALDI-MS Messungen präpariert wird. Hierbei war das Ziel ein flexibles System zu entwickeln, mit dem MALDI-Proben mit den verschiedensten Präparationstechniken präpariert werden können.

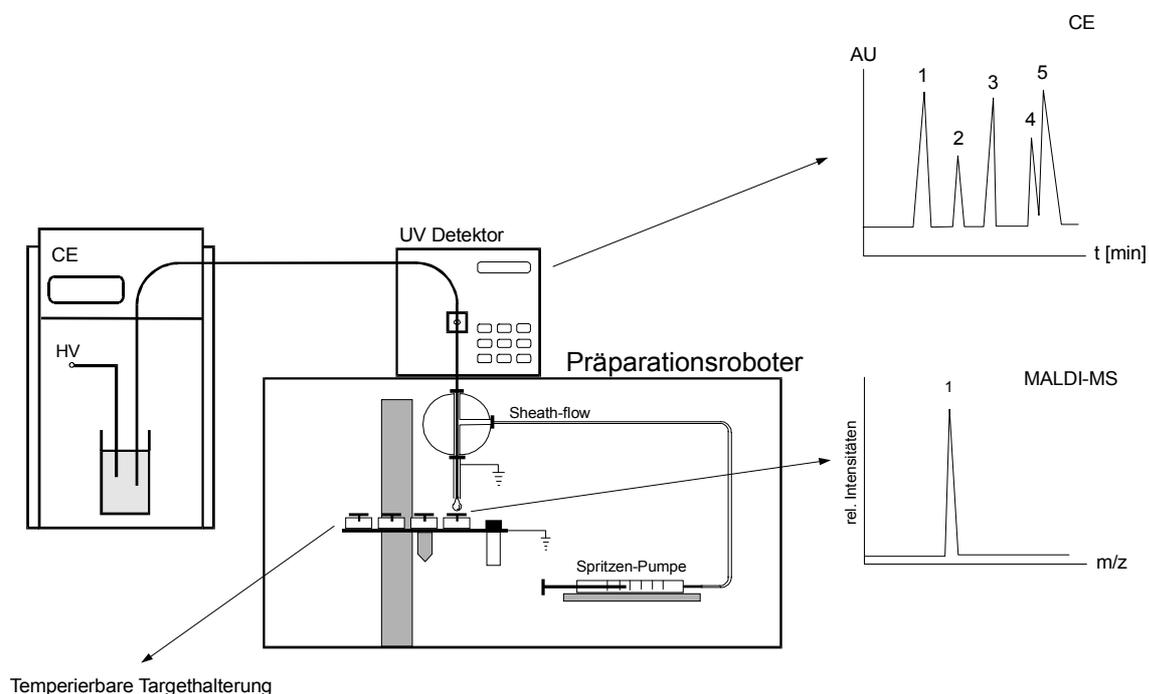


Abb. 3.11: Präparationsroboter mit Interface zum automatischen Fraktionieren und Sammeln von Proben für die MALDI-MS-Analyse aus der CE.

Das System besteht aus einer Prince-4-Tray Kapillarelektrophorese der Firma Lauerlabs (Prince Technologies Emmen, Niederlande) mit einem UV-Detektor, die on-line mit dem Präparationsroboter gekoppelt ist (Abb. 3.11). Der Präparationsroboter besteht aus einem in x-, y- und z-Richtung beweglichen Tisch mit integrierter temperierbarer Targethalterung und einem *sheath-flow*-Interface (siehe Kapitel 5.3.3.1) mit Spritzenpumpe. Über die Spritzenpumpe wird ein zusätzlicher „Flüssigkeitsstrom“ (*sheath-flow*) zugeführt um die Probe aus der Kapillare zu „ziehen“. Das *sheath-flow* Interface ist die optimale Lösung für eine flexible MALDI-Probenpräparation. Je nach Präparationstechnik kann als *sheath-flow* direkt Matrix (*dried-droplet-Methode*) oder

aber Elektrolyt (*layer*-Technik) verwendet werden. Die eluierenden Peptide werden in einem sich kontinuierlich neu bildenden Tropfen am Ende der Stahlkapillare gesammelt, und der Tropfen auf einem MALDI-Target abgesetzt. In dem Tropfen findet die Vermischung des Peptides mit der Matrix statt. Über die Flussrate des *sheath-flows* wird die Geschwindigkeit der Tröpfchenbildung bestimmt und damit die Geschwindigkeit und Auflösung der Trennung. Bei zu geringer Flussrate fallen die elektrophoretisch getrennten Peaks wieder zusammen bzw. bilden sich keine Tropfen. Bei zu großer Flußrate wird ein Peak in mehrere Spots aufgesplittet. Das reduziert die Empfindlichkeit der MALDI-Analyse. Mit diesem System ist auch eine Präparation auf einer Membran bzw. die direkte Fraktionierung auf einer Membran möglich. Eine weitere Möglichkeit ist das Elektrosprühen auf eine Nitrocellulose Membran, wie es aus der PDMS bekannt ist. Der Präparationsroboter wird von einer selbst entwickelten Steuereinheit und einer entsprechenden Steuersoftware gesteuert. Die Fraktionierung kann manuell oder automatisch (peak- oder zeitabhängig) durchgeführt werden. Das UV-Signal wird automatisch von der Software ausgelesen. Der Computer berechnet daraus die Startzeit für die Fraktionierung. Nach jeder Trennung wird die Spritze für den *sheath-flow* automatisch wieder mit Elektrolyt oder Matrix gefüllt.

3.2.2 Temperierbare Proben Targets

Die Qualität der MALDI-Messungen hängt sehr stark von der Probenpräparation ab (siehe Kapitel 2.1.3). Wichtige Einflussfaktoren sind das Matrix/Analyt-Verhältnis und die Kristallgröße. Über die Flussrate des *sheath-flow* lässt sich sehr gut das Matrix/Analyt-Verhältnis beeinflussen. Die Kristallgröße hängt direkt mit der Trocknungsgeschwindigkeit zusammen. Zu langsames Trocknen bei der *dried-droplet*-Präparation führt zu großen Kristallen, die schlechte MALDI-Signale geben. Durch Heizen bzw. Kühlen der Targets lässt sich die Kristallgröße kontrollieren. Entwickelt wurde eine temperierbare Targethalterung (Abb. 3.12). Das Heizen und Kühlen der Targets erfolgt mit Peltier-Elementen, die mit 2 V bei ca. 2,5 A betrieben werden. Von den vier Halterungen können je zwei gleichzeitig temperiert werden. Es lassen sich Temperaturen auf dem Target von 8 – 72°C erreichen, mit einer Genauigkeit von 0,5°C.

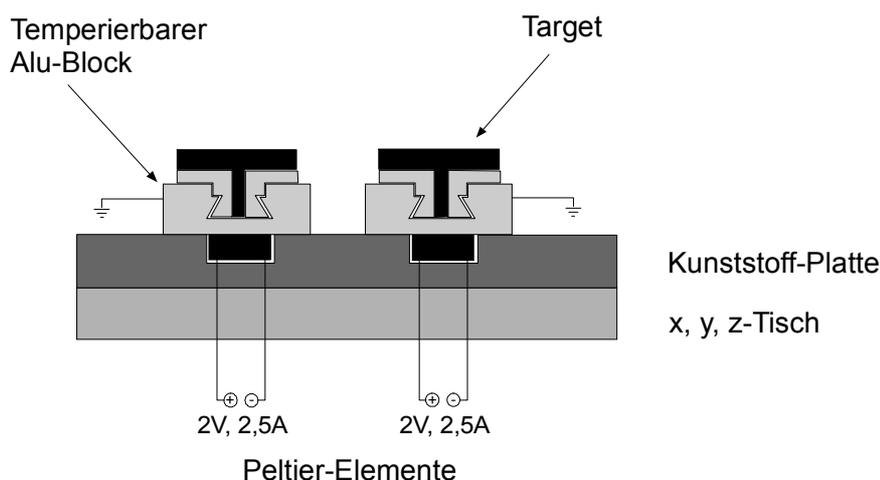


Abb. 3.12: Darstellung der heiz- und kühlbaren Targethalterung.

3.2.3 Automatisierte Probenfraktionierung

Bei der peakabhängigen Fraktionierung bestimmt das UV-Signal des Detektors, wann das Ende der Kapillare aus dem Elektrolyten ausfährt und der *sheath-flow* zugeführt wird. Ein genügend großer *sheath-flow* gewährleistet den konstanten Stromfluss. Muss das Kapillarende länger als 20 Minuten außerhalb des Elektrolyten gehalten werden bricht in den meisten Fällen der Strom zusammen. Sind die Zeitabstände zwischen den einzelnen Fraktionen groß genug, kann der Fraktionswechsler immer wieder in den Elektrolyten eintauchen, und somit den konstanten und gleichmäßigen Stromfluss für die Trennung gewährleisten.

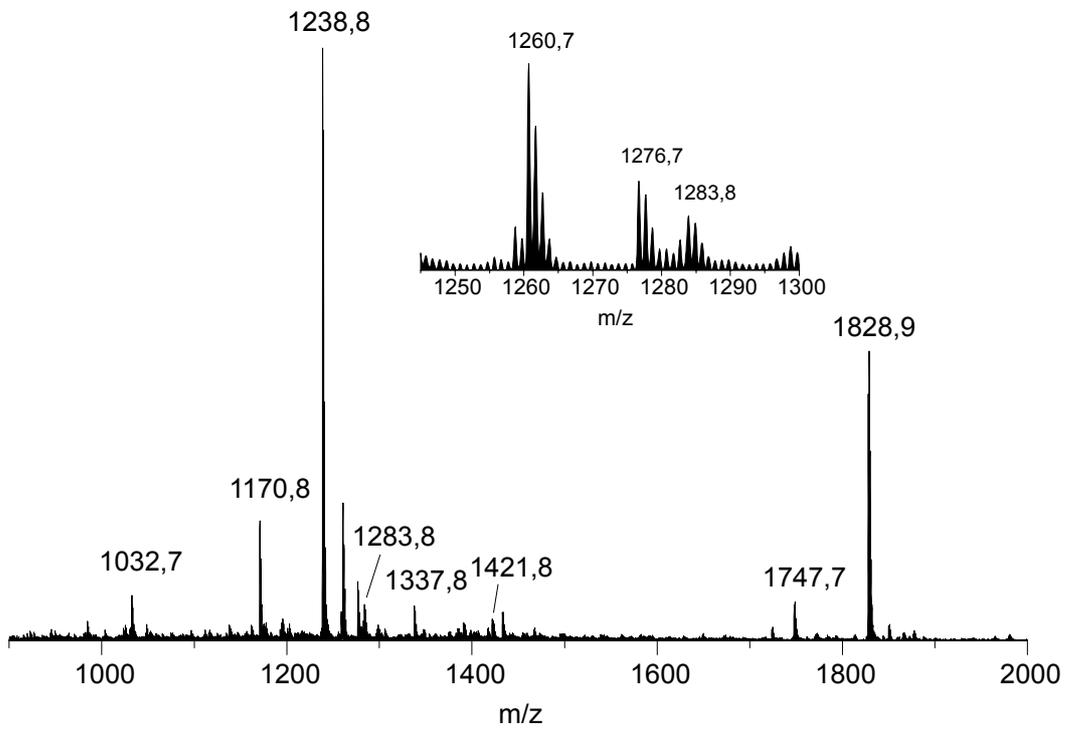
Bei den durchgeführten Trennungen des Modellpeptidgemisches und des Arzneimittelwirkstoffes Polyerga[®] wurde zeitabhängig fraktioniert. Die Proben waren für eine peakabhängige Fraktionierung zu komplex. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Fraktionen war zu gering. Die Fraktionierung erfolgte je nach Komplexität im Abstand von einer bzw. einer halben Minute. Als *sheath-flow* wurde die MALDI-Matrix DHB mit einer Flussrate von 1 µl/min zugeführt. Alle Peptide wurden mit der *dried-droplet*-Methode präpariert. Die gesamte Trennung inklusive Fraktionierung dauerte bei dem Modellpeptidgemisch 30 Minuten, für die Trennung des Arzneimittelwirkstoffes Polyerga[®] (siehe Kapitel 3.4.1) bis zu 60 Minuten.

Die Detektion erfolgt bei der CE in der Trennkapillare vor dem Kapillarende. Nach dem Detektor gelten aber weiter die elektrophoretischen Trennbedingungen. Bei den durchgeführten Trennungen hat sich gezeigt, dass sich für die getrennten Komponenten unterschiedliche Zeitverschiebungen zwischen Detektion und Elution ergeben. Der Startzeitpunkt berechnet sich aus dem Zeitpunkt der Detektion, der Kapillarlänge bis

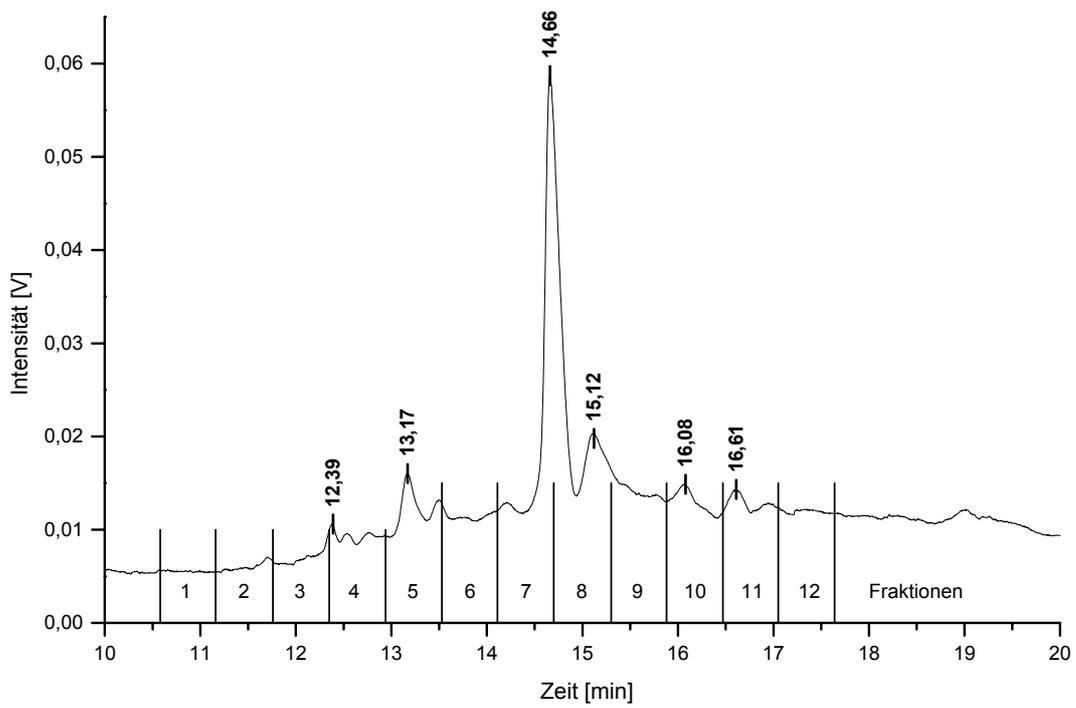
zum Detektor und der Gesamtlänge der Kapillare (siehe Kapitel 5.3.3.3). In Abb. 3.13 b und c wird deutlich, dass durch die Korrektur des Startzeitpunktes um eine Minute die UV-Signale aus der CE mit den Peptidsignalen in der MALDI-Analyse übereinstimmen. Die CE-Fraktion 4 stimmt dann genau mit dem Peak bei 13,16 Minuten überein. Die Verteilung des höchsten Peaks bei 14,66 Minuten auf die Fraktionen sechs, sieben und acht entspricht dann auch der Intensitätsverteilung im MALDI-MS. Die MALDI-Übersichtspektren der einzelnen CE-Fraktionen zeigen sehr deutlich, dass eine Separierung einzelner Peptide aus dem Arzneimittelwirkstoff Polyerga[®] mittels CE möglich ist. Im MS Spektrum der Fraktion sechs taucht ein neues Peptid $m/z = 1538,8$ u auf, das in der Mischung unterdrückt wird. Der Nachteil der zeitabhängigen Fraktionierung wird in Fraktion fünf deutlich, die noch immer drei Peptide enthält. Die Elutionsreihenfolge der Peptide entspricht der Theorie, Peptide mit einer hohen Ladung haben eine höhere Mobilität im elektrischen Feld. Das zuerst eluierende Peptid KIKAPPERK ($m/z = 1828,9$ u) mit einer Nettoladung von 4,70 bei pH 2 ist viel basischer als das zuletzt eluierende Peptid PTTKTYFPHF ($m/z = 1238,8$ u, Abb. 3.13) mit einer Nettoladung von 2,79. Aus der Elutionsreihenfolge lassen sich so erste Schlüsse über den Analyten ziehen, die in die weitere Analytik, wie die Wahl der MALDI-Matrix, einfließen können.

Diese Modelluntersuchungen zeigen deutlich den Wert und die Praktikabilität der Probenfraktionierung mittels Präparationsroboter in off-line Kombination mit der MALDI-MS zur Charakterisierung von komplexen Peptidgemischen mit anschließender selektiver Peptidsequenzierung mittels MALDI-PSD-MS.

a)



b)



c)

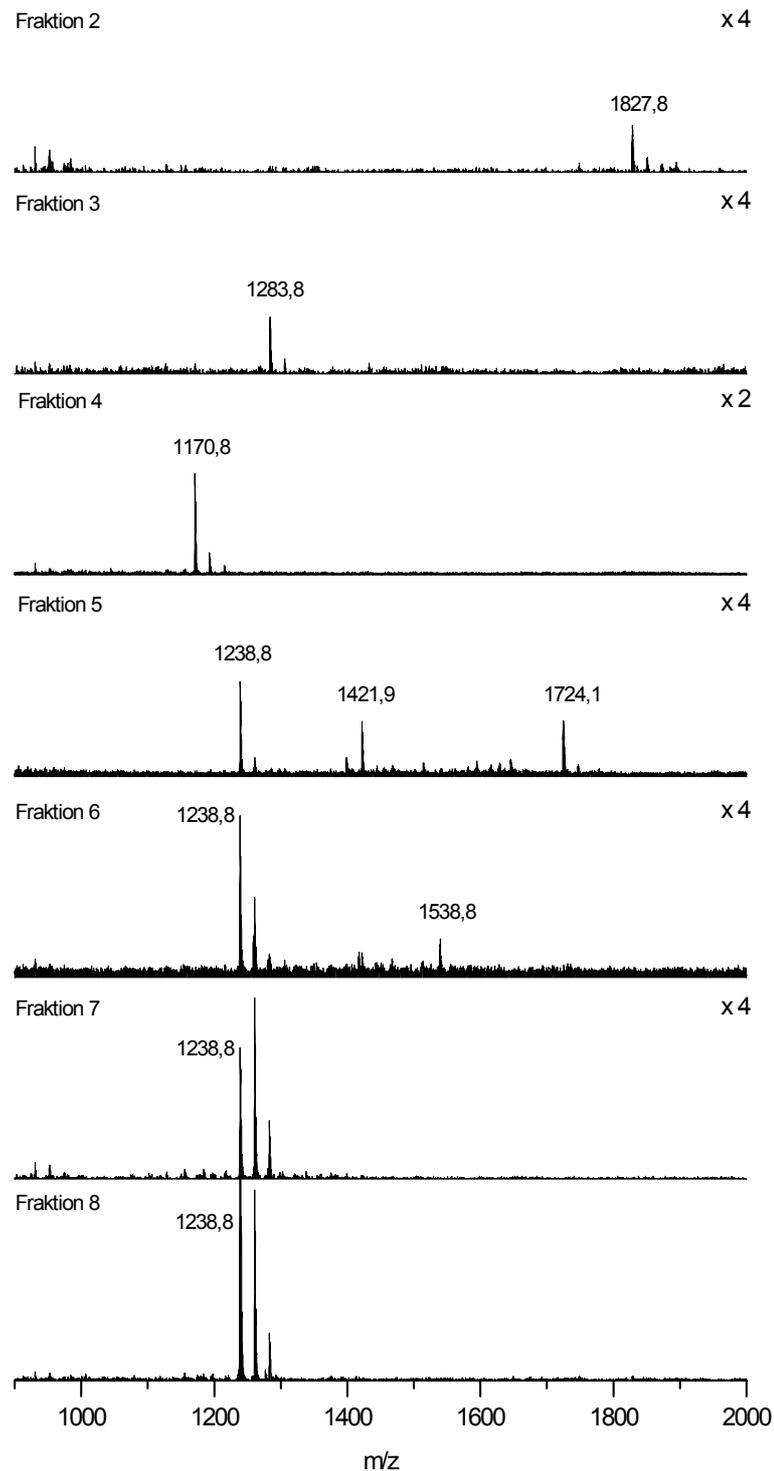


Abb. 3.13: Massenspektrometrische und Kapillarelektrophoretische Charakterisierung des Peptidextraktes Polyerga®. a) MALDI-Übersichtsspektrum der HPLC Fraktion 6 des Peptidgemisches (siehe Kapitel 3.4.1.1). Das Inset zeigt die Komplexität dieser Probe. Jede Masse in diesem Spektrum ist mit einem Peptid besetzt. b) UV-Signal der CE-Trennung der HPLC-Fraktion 6 mit eingezeichneter Fraktionierung. c) MALDI-Übersichtsspektren der einzelnen CE-Fractionen der HPLC-Fraktion 6.

3.3 MALDI-MS von Peptid-Gemischen

3.3.1 Einfluss von Basizität und Hydrophobizität auf die Signalintensitäten von Peptidgemischen

Ausgehend von Untersuchungen bei FAB-MS und PDMS [39], die den Zusammenhang der Diskriminierung von Peptidsignalen in Mischungen mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Peptide wie Hydrophobizität und Ionisierbarkeit zeigen, wurden fünf synthetische Peptide ausgewählt. Die Kriterien dabei sind ungefähr gleiches Molekulargewicht, hydrophobes bzw. hydrophiles Verhalten, sowie basische und saure Eigenschaften. Als Index für diese Eigenschaften wurde der Bull-Breese Index [114] für die Hydrophobizität und die Nettoladung [115] bei pH 2 (pH-Wert der DHB-Matrixlösung) und 6 (pH-Wert der p-Nitroanilin-Matrixlösung) als Maß der Basizität herangezogen. Als weiterer Index wurde die Gasphasenbasizität (GB) herangezogen. Gasphasenbasizitäten von Peptiden sind nicht aus der Literatur erhältlich, so dass hier die Gasphasenbasizität des Gesamtpeptides definiert wird als die Gasphasenbasizität der basischsten Aminosäure im Peptid, wie von Amster und Gorman [116] gezeigt.

Es wurde der Zusammenhang zwischen der Signalintensität bei der MALDI-MS und der Hydrophobizität sowie Basizität von Peptiden untersucht. Zusätzlich wurde dieser Zusammenhang in Abhängigkeit der Matrix und der dazugehörigen Präparationsmethode untersucht. Die verwendeten Modellpeptide sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Auswahl der Peptide richtete sich nach ihrer Hydrophobizität und ihrer Basizität. Das Peptid Lipotropin steht z.B. für sauer, hydrophil. Das schwach saure Peptid „Anti-Inflammatory Peptide“ ist dagegen hydrophob. Die basischen Peptide Dynorphin 1-9 und Oxytocin stellen hydrophobe Peptide, das Peptid [Arg⁸]-Vasopressin ein basisches, hydrophiles Peptid dar.

Als Matrices wurden 2,5-Dihydroxy-Benzoesäure mit der *dried-droplet*-Präparation und p-Nitroanilin [16][33] [43][117] für die *layer*-Technik ausgewählt. Beide Matrices sind sowohl im positiven als auch im negativen Betriebsmodus anwendbar. Spielt die Basizität von Peptiden eine wesentliche Rolle bei der Ionisierung, so sollten saure Peptide, die im positiven Messmodus nur geringe Signalintensitäten zeigen, im negativen Messmodus deutlich intensivere Signale zeigen.

Zunächst wurden für alle Peptide einzeln die Signalintensitäten bei beiden Präparationsmethoden bestimmt. Die Ergebnisse der Einzelmessungen dienen dann als Vergleich für die Messungen der Di-Peptidmischungen. Die Spektren der Einzelpeptide

zeigen bei beiden Präparationsmethoden deutliche Unterschiede in der Molekülionenintensität zwischen den verschiedenen Peptiden (Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Im negativen Messmodus ist der Unterschied für DHB in der *dried-droplet*-Präparation nicht so stark. Die Signalintensität ist generell im negativen Messmodus für DHB nicht sehr hoch.

Tabelle 3.2: Primärstruktur, Bull-Breese Indizes und Nettoladung der untersuchten Modellpeptide. Bull-Breese Indizes wurden jeweils als Summe der Beiträge der einzelnen Aminosäuren, Nettoladungen aus den pK-Wert Beiträgen der einzelnen Aminosäuren berechnet [102].

Peptid	Primärstruktur	Molekulargewicht (monoisotopisch) [u]	Bull-Breese Index* [114]	Nettoladung [115]		Gasphasenbasizität *** (GB) [kJ/Mol] [116]
				pH 2 **	pH 6**	AS mit höchster GB
Lipotropin	ELAGAPPEPA	950.5	150	+0,68	-1,97	937,5 [E]
Oxytocin	$\overline{\text{CYIQNCPLG}}\text{-NH}_2$	1006.5	-146	+1,00	1,00	929,2 [P]
Anti-Inflammatorisch	HDMNKVLDL	1083.4	-161	+2,67	-0,49	958,3 [K]
[Arg ⁸]-Vasopressin	$\overline{\text{CYFQNCPRG}}\text{-NH}_2$	1083.5	107	+1,69	+0,99	> 970,8 [R]
Dynorphin 1-9	YGGFLRRIR	1336.4	-262	+3,60	+3,00	> 970,8 [R]

*negativer Wert: hydrophob; positiver Wert: hydrophil; ** pH der DHB-Matrixlösung = 2.5, pH der p-Nitroanilin-Matrixlösung = 6 [33],

*** GB von DHB = 1329,4 kJ/Mol, von p-Nitroanilin = 1410.6 kJ/Mol [118].

3.3.1.1 Verhalten der Einzelpeptide

Im Falle der Präparation mit p-Nitroanilin als Matrix und der *layer-Technik* als Präparationsmethode ist eine direkte Korrelation zwischen der Signalintensität und der Nettoladung des Peptids zu erkennen. Die Molekülionensignale nehmen im positiven Messmodus mit zunehmender positiver Ladung des Peptides zu. Im negativen Messmodus nehmen die Signalintensitäten wie erwartet ab, mit Ausnahme von Dynorphin 1-9. Eine ähnlich gute Korrelation ergibt sich mit der Gasphasenbasizität (Abb. 3.14 a, b). Hier fällt im positiven Messmodus lediglich das Oxytocin heraus. Im negativen Messmodus ist keine Korrelation mit der Gasphasenbasizität zu erkennen.

Im Falle der Kombination von DHB als Matrix mit der *dried-droplet*-Probenpräparation ist kein Zusammenhang zwischen der Signalintensität und einem der verschiedenen Parametern direkt sichtbar. Weder die Basizität noch die Hydrophobizität allein zeigen eine Korrelation. Erst das Produkt aus der relativen Gasphasenbasizität und der relativen Hydrophobizität als eine „effektive Peptideigenschaft“ ergibt eine akzeptable Korrelation mit den beobachteten Signalintensitäten (Abb. 3.15).

Aus dem vorliegenden Ergebnissen läßt sich folgende Deutung ableiten:

Bei der Präparation mit der *layer-Technik* ist die Gasphasenbasizität der dominierende Faktor, der die Ionenausbeute bestimmt. Eine konstante Anzahl von neutralen Peptidmolekülen wird in die Gasphase desorbiert und dort durch Protonentransfer von den Matrix-Ionen protoniert.

In der *dried-droplet*-Präparation spielt das Kristallisationsverhalten eine wesentlich wichtigere Rolle für die Ionenausbeute. Die Hydrophobizität ist ein zusätzlicher Faktor der als Einfluss auf die Signalintensitäten beachtet werden muss. Bei der *dried-droplet* Präparationstechnik wird dem Einbau des Analyten in die Matrix eine wichtige Rolle zugeschrieben. Die Hydrophobizität des Analyten kann somit als Parameter für den Einbau in den Matrixkristall interpretiert werden. Das steht auch in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Beavis und Bridson am Beispiel der Matrix α -Cyanohydroxymizsäure [119]. Sie haben gezeigt, dass hydrophobe Polypeptide bevorzugt an der nicht polaren (103) Fläche des Kristalls durch hydrophobe Wechselwirkungen binden, und die hydrophilen Peptide durch den schlechten Einbau in die Matrix unterdrückt werden.

Die Signalintensitäten im Negativen korrelieren nicht mit der Gasphasenbasizität. Der wahrscheinlich relevante Faktor wäre die Gasphasenacidität. Gasphasenaciditätswerte von Peptiden sind jedoch nicht aus der Literatur verfügbar.

p-Nitroanilin
 Präparation: *layer Technik*

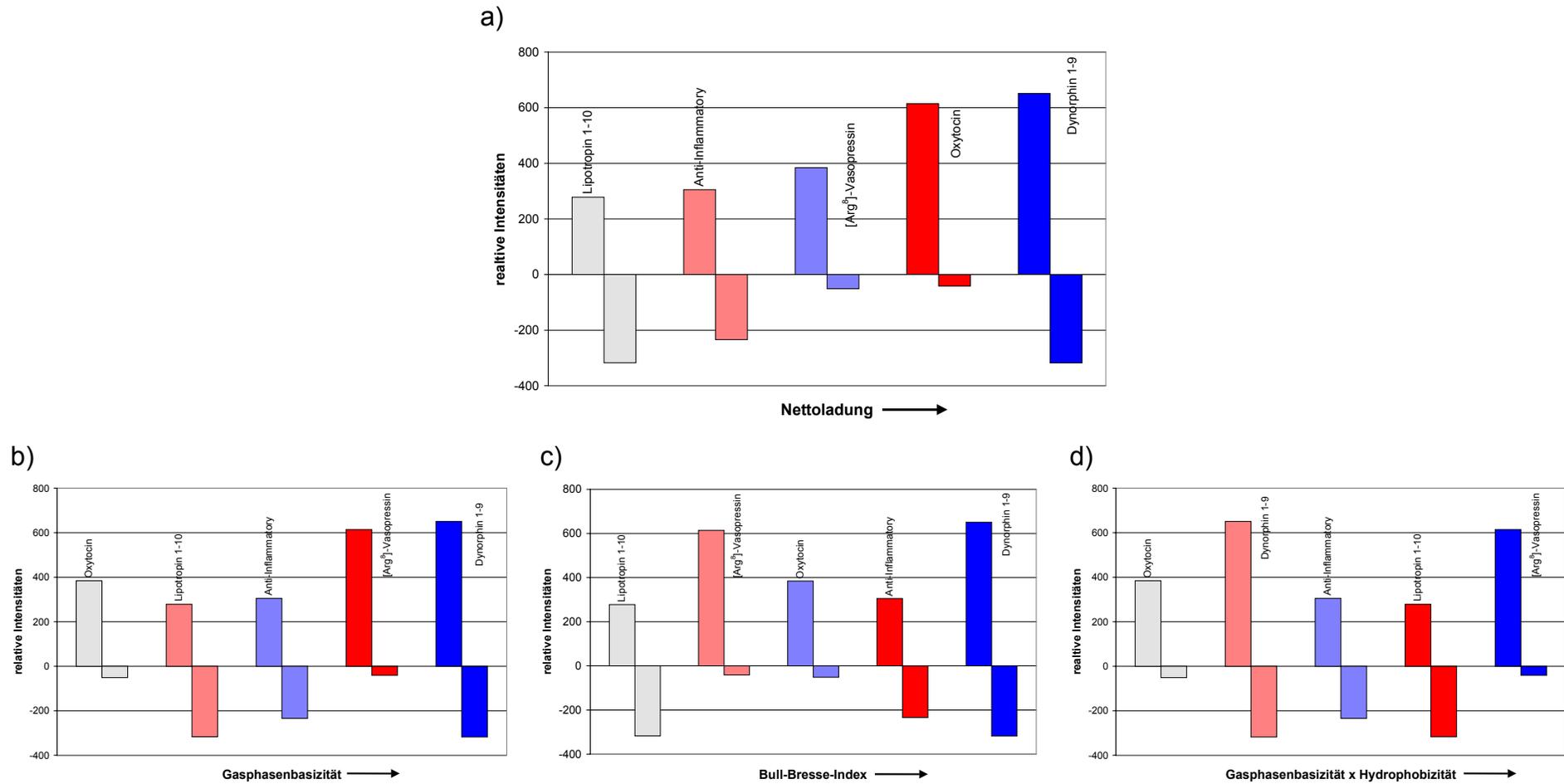


Abb. 3.14: Signalintensität der fünf Einzelpeptide als Funktion von a) Nettoladung bei pH = 6; b) Gasphasenbasizität; c) Hydrophobizität (Bull-Breese Index) und d) Faktor aus Gasphasenbasizität x Hydrophobizität. Negativ dargestellt sind die Signalintensitäten der Messungen im negativen Ionenmodus.

DHB
Präparation: *dried-droplet*

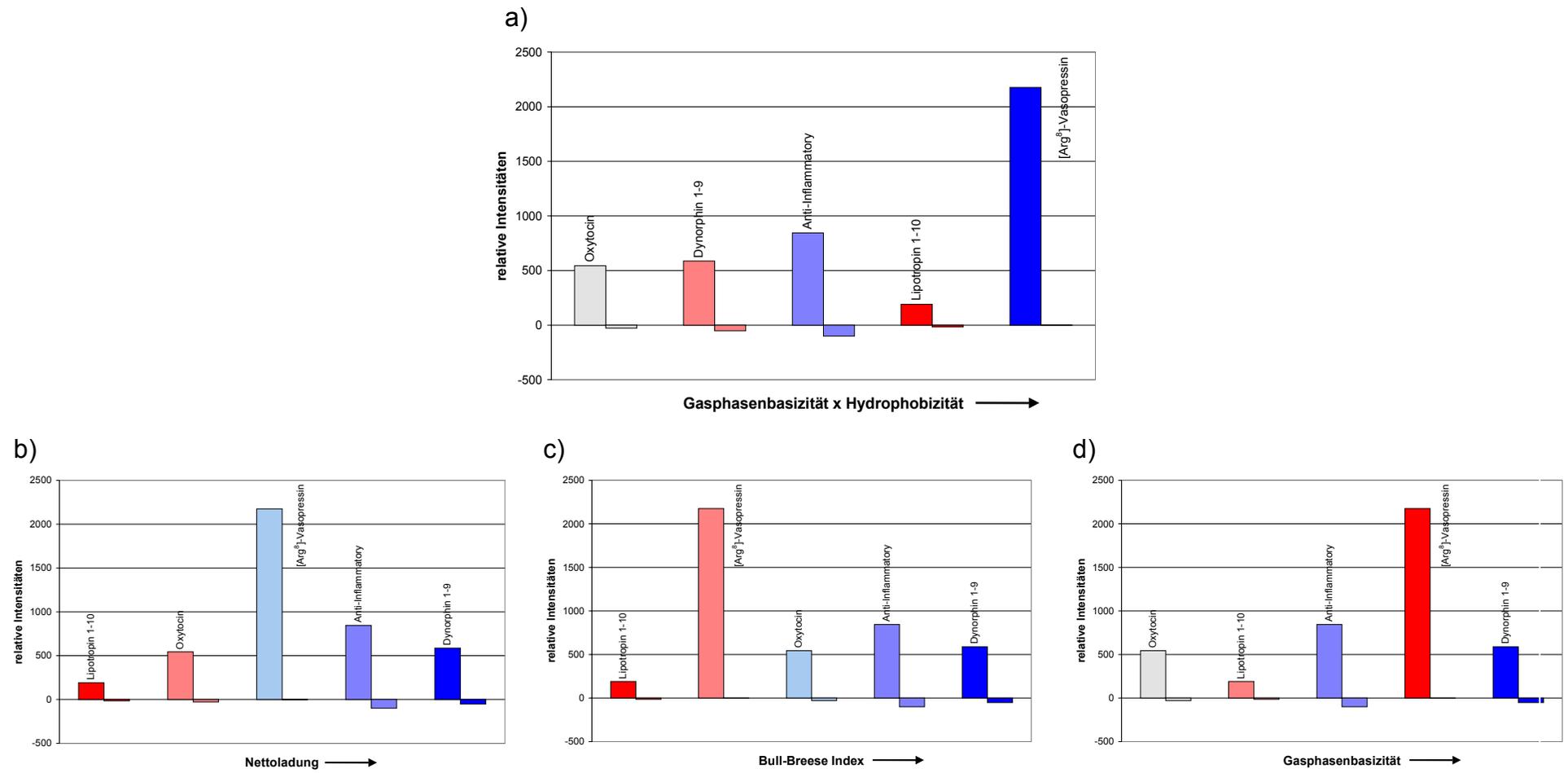


Abb. 3.15: Signalintensität der fünf Einzelpeptide als Funktion von a) Faktor aus Gasphasenbasizität x Hydrophobizität; b) Nettoladung bei pH = 2; c) Hydrophobizität (Bull-Breese Index) und d) Gasphasenbasizität. Negativ dargestellt sind die Signalintensitäten der Messungen im negativen Ionenmodus.

3.3.1.2 Signalunterdrückung in Peptidgemischen

Aus den einzelnen Peptiden unterschiedlicher Basizität und Hydrophobizität wurden definierte Peptid-Gemische hergestellt, wobei bei allen Messungen die Peptidkonzentrationen sowie das Analyt/Matrix-Verhältnis konstant gehalten wurde. In den Peptidmischungen soll die gegenseitige Beeinflussung der Peptide gezeigt werden (Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Gegenübergestellt sind die Signalintensitäten der Messungen der einzelnen Peptide (Einzel) zu denen in den Di-Peptidmischungen (Mischung). Der linke Balken entspricht dem in der jeweiligen Mischung „saureren“ Peptid. Grundlage dafür ist die Gasphasenbasizität bzw. Nettoladung der Peptide.

Layer-Technik

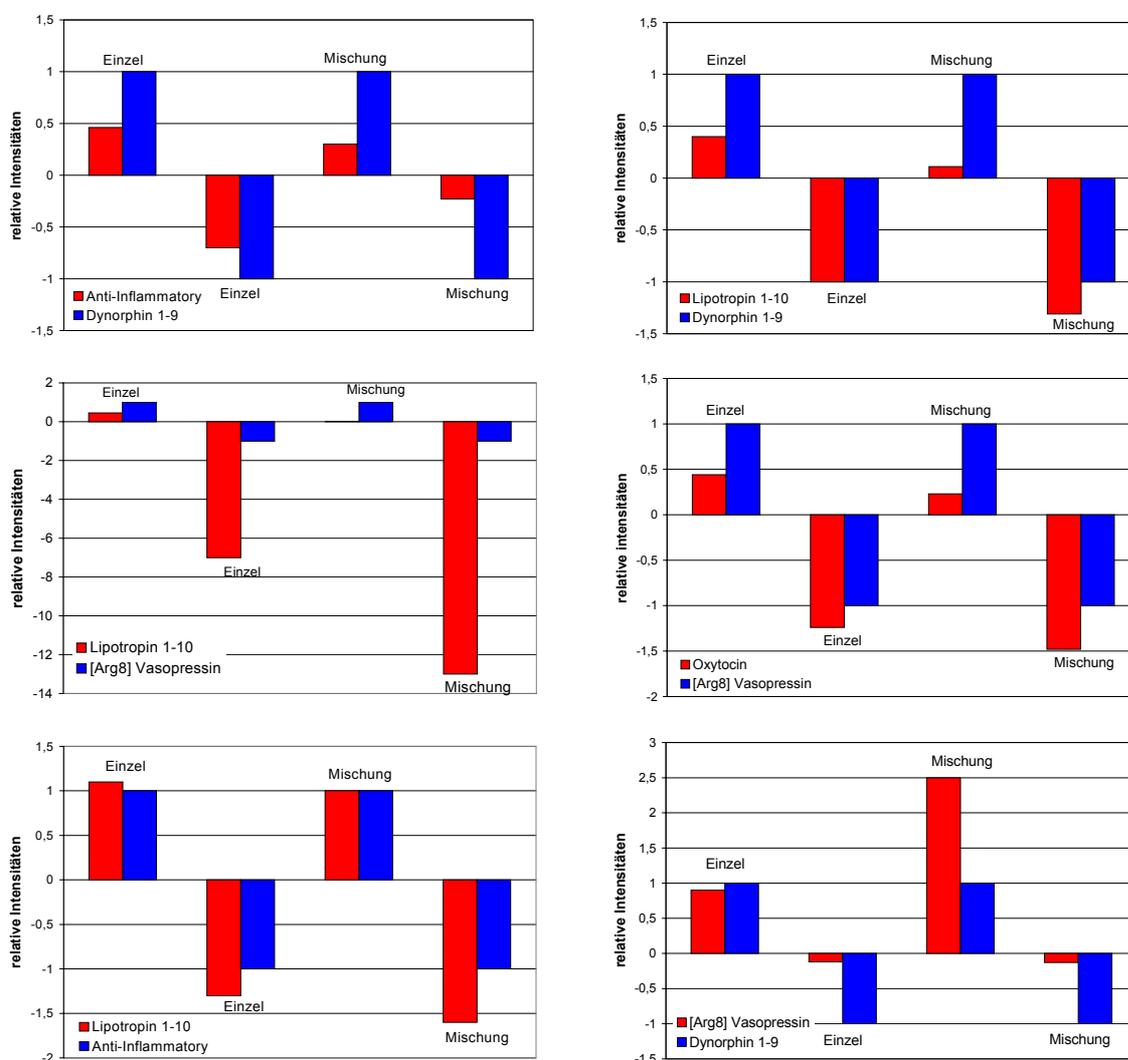


Abb. 3.16: Vergleich der Signalintensitäten der Einzelpeptide mit den Intensitäten in den Peptidgemischen bei der *layer*-Technik Präparation mit p-Nitroanilin. Negativ dargestellt sind die Signalintensitäten der Messungen im negativen Ionenmodus. Der linke Balken entspricht dem in der Peptidmischung jeweils saurerem Peptid.

Dried-droplet-Methode

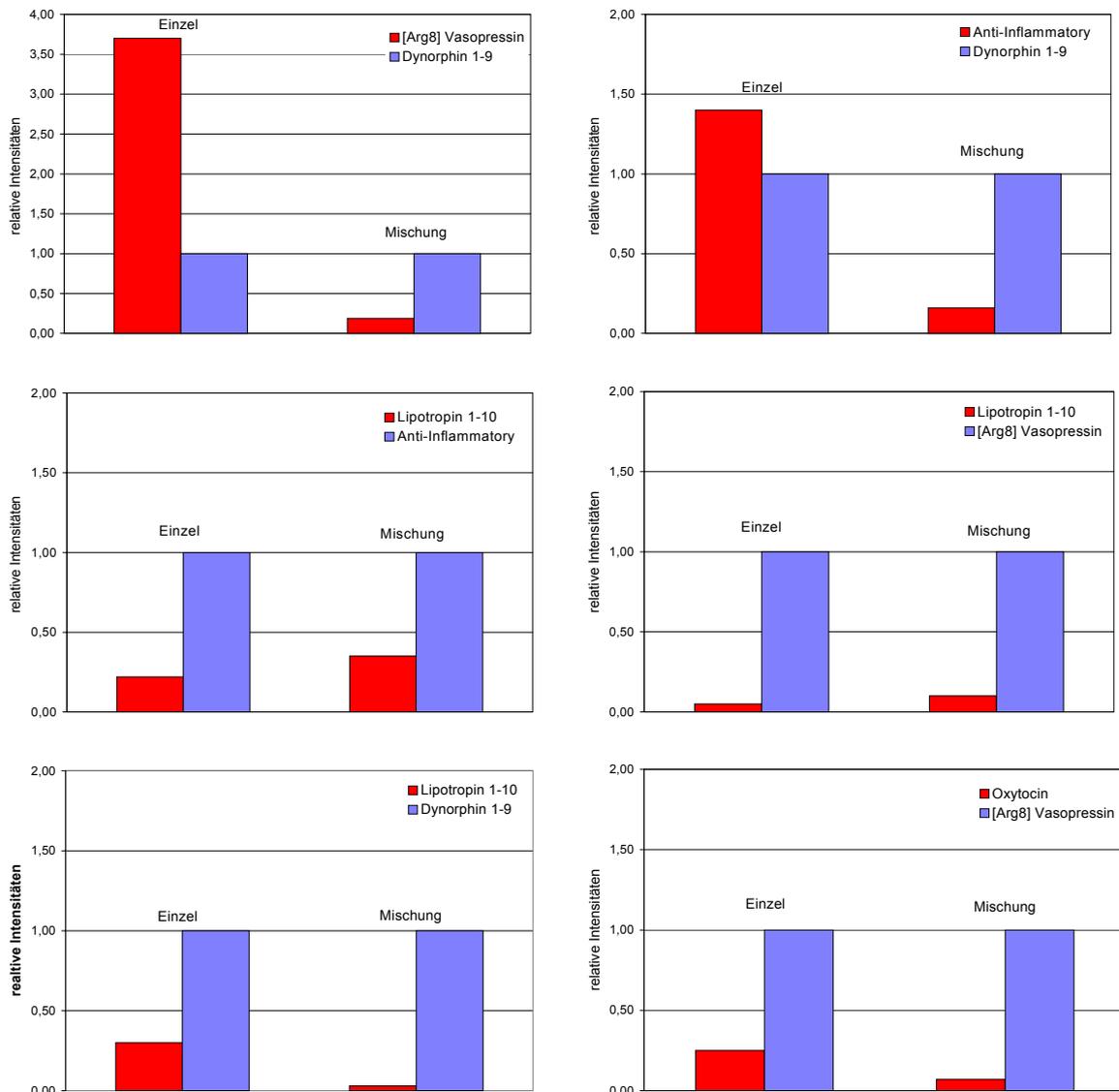


Abb. 3.17: Vergleich der Signalintensitäten der Einzelpeptide und der Peptidgemische mit DHB als Matrix und *dried-droplet*-Präparation. Der linke Balken entspricht dem in der Peptidmischung jeweils saurerem Peptid.

Die gemessenen Signalintensitäten der einzelnen Peptide in den Peptidgemischen sind nicht identisch mit denen, die bei den Messungen der Einzelpeptide beobachtet wurden.

Die Verhältnisse der Ionensignale werden in den Mischungen im positiven Ionenmodus durch die Gasphasenbasizität der einzelnen Komponenten des Peptidgemisches beeinflusst. Das Peptid mit der geringeren Gasphasenbasizität wird durch das Peptid mit der höheren Gasphasenbasizität unterdrückt. Dieselbe Korrelation ergibt sich für die Nettoladung. Das in der binären Mischung im Vergleich saure Peptid wird deutlich

(bzw. nahezu vollständig) unterdrückt, unabhängig von der Art der Präparation und der Matrix.

Die Hydrophobizität der einzelnen Komponenten hat keinen Einfluss auf das Verhältnis der Signalintensitäten. So lange die Peptidkonzentration klein genug im Verhältnis zur Matrix ist, scheint das Kristallisationsverhalten gleich dem der Einzelpeptide zu sein. Der Einfluss des Kristallisationsverhaltens in den Mischungen ist für alle Peptide gleich groß.

Die Diskriminierung einzelner Peptidsignale in Mischungen ist eher auf die Gasphasenbasizität der Peptide bzw. auf die Gasphasenbasizität der basischsten Aminosäure in einem Peptid zurückzuführen.

Diese Beobachtung wird durch die in der Literatur für die MALDI-MS diskutierten Ionisierungsprozesse unterstützt. Sowohl bei der Annahme die Ionisierung findet in der Gasphase als einen stoßinduzierten Protonentransfer von der Matrix auf den neutralen Analyten statt [14], als auch bei der von Zhu *et al.* [43] diskutierten Säure-Base-Reaktion zwischen Matrix und Analyten in der kondensierten Phase („pre formed ions“). Beide Ansätze unterstützen die Annahmen, dass die basischen Seitenketten der Peptide die Ionisierung beeinflussen.

Ein theoretischer Ansatz zur Beschreibung der Diskriminierung von Peptidsignalen muss den Einfluss der Basizität der Peptide und deren Hydrophobizität berücksichtigen.

Im Rahmen dieser Arbeit können die beschriebenen Beobachtungen zunächst nur als Hinweis dienen diese Peptideigenschaften bei der Probenpräparation zu berücksichtigen. Sowie sich immer zu vergegenwärtigen, dass ein MALDI-Übersichtsspektrum eines Peptidgemisches nicht seine genaue Zusammensetzung wiedergibt. Dieser Aspekt ist vor allem wichtig bei der Proteinidentifizierung aufgrund des „mass fingerprints“. Bei dieser Methode wird anhand einer aus dem MALDI-Übersichtsspektrum gewonnenen Massenliste in Datenbanken nach dem dazugehörigen Protein gesucht.

3.4 Primärstrukturanalyse von Peptiden in komplexen Mischungen

3.4.1 Identifizierung von Peptiden im Arzneimittelwirkstoff Polyerga®

Der Wirkstoff von Polyerga®, ein Arzneimittel der Firma HorFerVit (siehe Kapitel 2.4.1) ist ein komplexes Gemisch von niedermolekularen Peptiden mit einem Molekulargewicht zwischen 500 und 3000 Da. Die Komplexität des Peptid-Extraktes ist aus dem HPLC-Chromatogramm ersichtlich, das eine unvollständige Trennung der Peptide zeigt (Abb. 3.18). Das MALDI-Spektrum im Massenbereich zwischen 600 Da und 1500 Da zeigt, dass praktisch jede Masse von einem Peptid besetzt ist (Abb. 3.19). Es können keine Aussagen über die quantitative Zusammensetzung des Peptid-Extraktes gemacht werden. Die intensivsten Peaks entsprechen nicht notwendigerweise Peptiden mit der höchsten Konzentration, da bei Peptidgemischen eine Diskriminierung einzelner Signale bis hin zur vollständigen Unterdrückung auftreten kann (siehe Kapitel 3.3.1.2). Bevor einzelne Peptide sequenziert und charakterisiert werden können, muss daher eine weitere Trennung und Fraktionierung erfolgen.

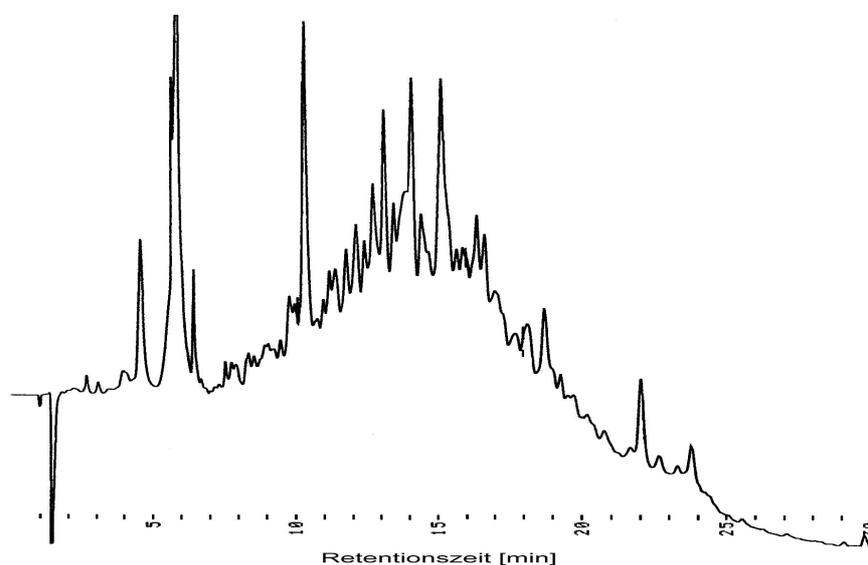


Abb. 3.18: HPLC-Chromatogramm des Wirkstoffs von Polyerga®.

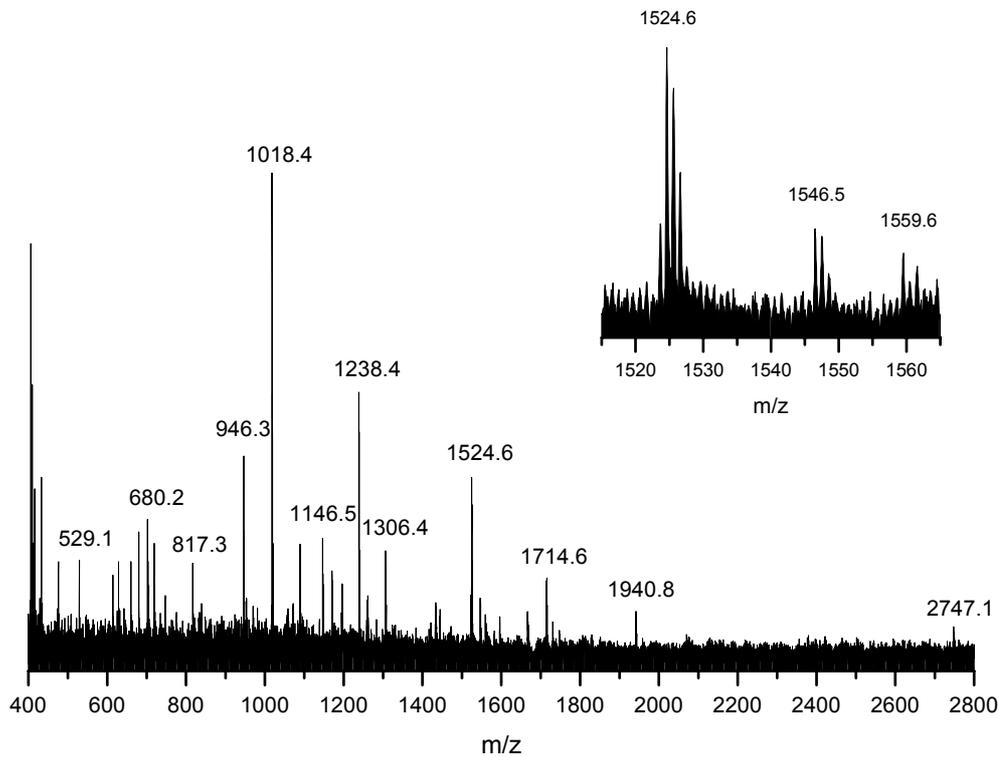
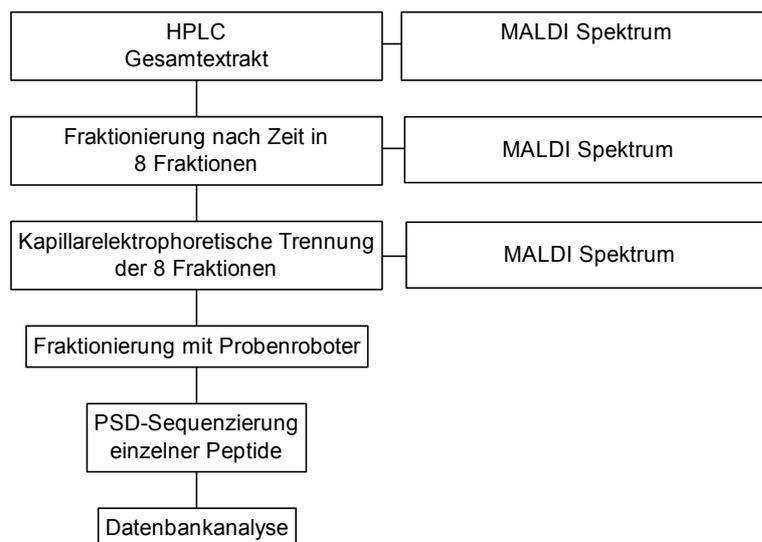


Abb. 3.19: MALDI-Spektrum des Wirkstoffs von Polyerga®. Das Inset zeigt die Komplexität des Peptidextraktes. Jede Masse ist von einem Peptid besetzt.

Zur Charakterisierung des Arzneimittelwirkstoffes Polyerga® wurde die folgende Strategie angewendet:



Im ersten Schritt werden während der HPLC-Trennung acht Fraktionen im Abstand von zwei Minuten gesammelt (Abb. 3.20). Auch die Rechromatographie von sechs der acht

Fraktionen führt zu keiner vollständigen Trennung der Peptide (Abb. 3.22 und Abb. 3.23 links). Nur in den Fraktionen eins, drei und sechs sind partiell getrennte Peaks zu erkennen. Von den Fraktionen sieben und acht reichte die vorhandene Substanzmenge nicht für eine HPLC-Untersuchung. Die Probenmengen der Fraktionen sieben und acht waren aber ausreichend für die kapillarelektrophoretischen und massenspektrometrischen Analysen.

Vergleicht man die MALDI-Spektren der acht HPLC-Fraktionen (Abb. 3.22 und Abb. 3.23 rechts) mit dem Spektrum des Gesamtextraktes (Abb. 3.20) wird deutlich, dass durch die HPLC-Fraktionierung die Komplexität der Probe wie erwartet reduziert wird. Die Spektren der Fraktionen vier, sechs, sieben und acht werden von ein bis zwei Peptiden dominiert. In diesen Fällen könnte eine direkte MALDI-PSD Sequenzierung dieser Peptide durchgeführt werden. Alle acht Spektren zusammengefasst spiegeln die Zusammensetzung des Gesamtextraktes wieder. An den Spektren der verschiedenen Fraktionen wird auch der Diskriminierungseffekt von Signalen in Peptidmischungen deutlich (siehe Kapitel 3.3.1.2). Die dominanten Signale in den MALDI-Spektren der Fraktion drei bei $m/z = 1433,4$ u und in den Fraktionen sechs, sieben und acht bei $m/z = 1827,7$ u, sind im Gesamtspektrum nicht oder nur sehr schwach zu erkennen.

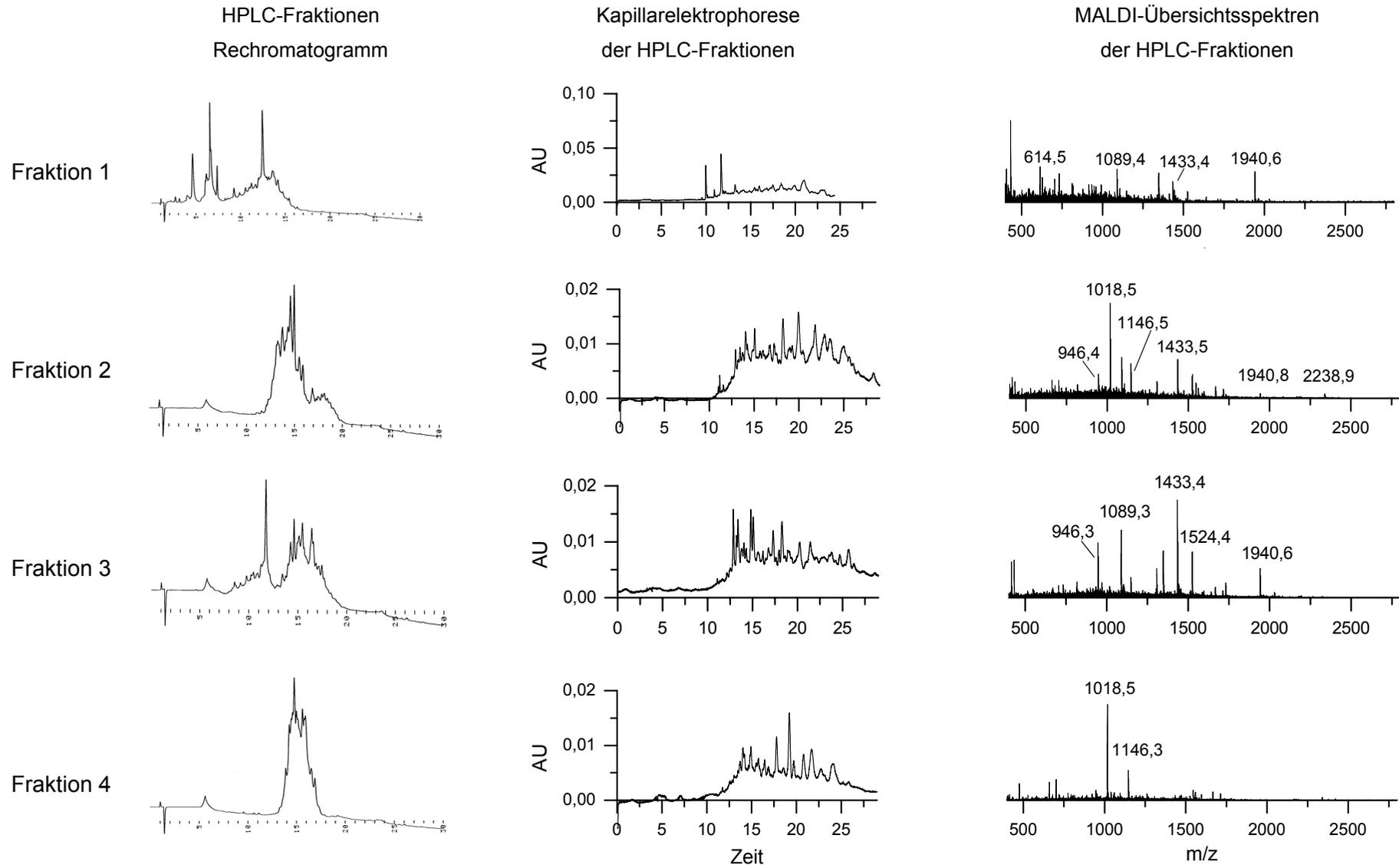


Abb. 3.20: HPLC-Chromatogramme, Kapillarelektrophoretische Trennung und MALDI-Übersichtsspektren der Fraktionen 1-4

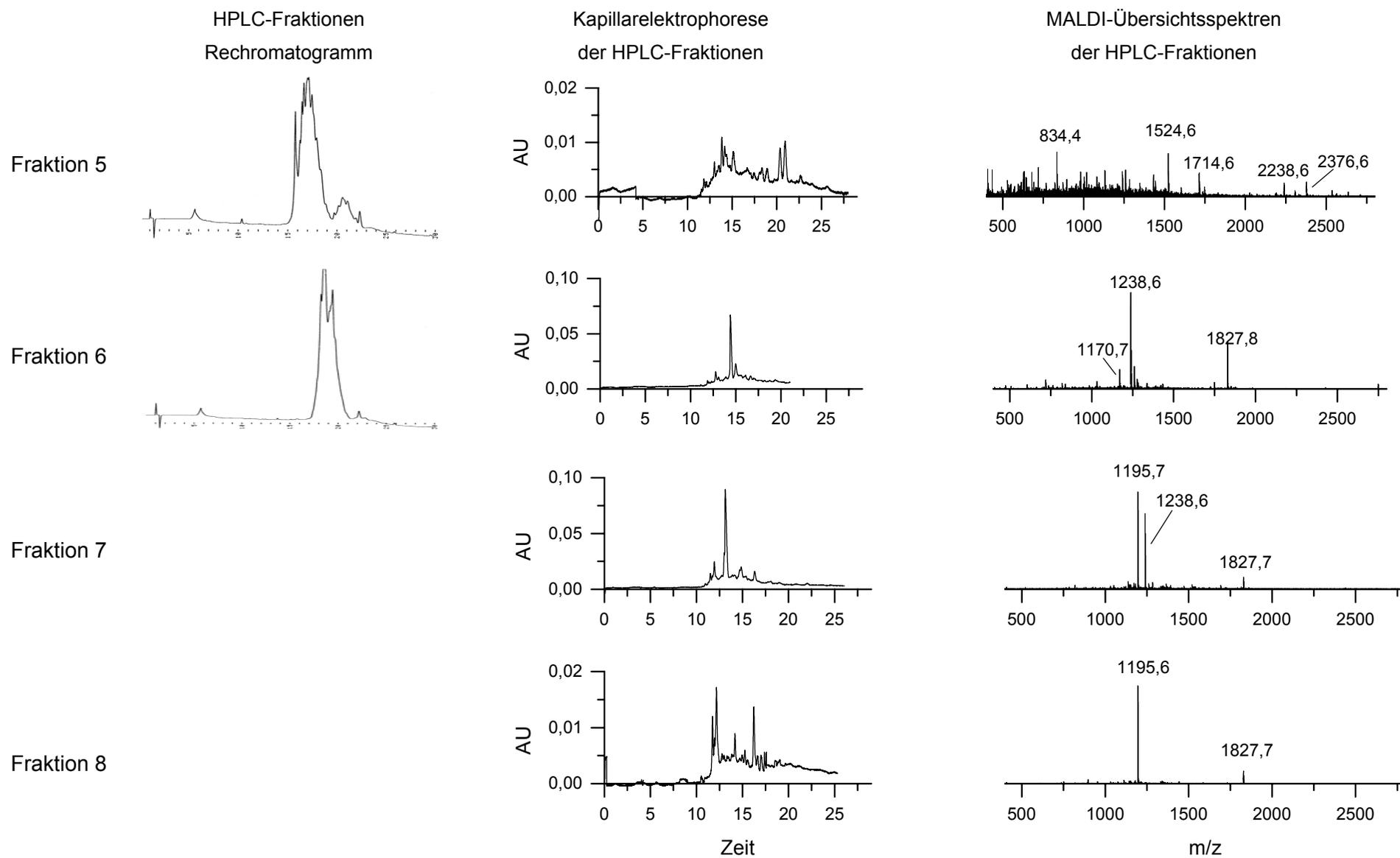


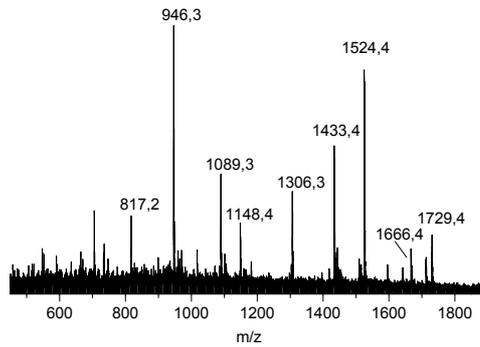
Abb. 3.21: HPLC-Chromatogramme, kapillarelektrophoretische Trennung und MALDI-Übersichtsspektren der Fraktionen 5-8, Von den Fraktionen 7 und 8 reichte die Substanzmenge nicht für eine HPLC-Rechromatographie

Auch nach der HPLC-Trennung sind einzelnen HPLC-Fractionen für eine direkte Sequenzierung der Peptide mittels MALDI-PSD zu komplex. Eine zusätzliche Trennung des Peptid-Extraktes ist für die Sequenzierung der Peptide notwendig. Wegen der unzureichenden Trennung mit RP-HPLC wurden alle acht Fractionen kapillarelektrophoretisch getrennt.

Die Kapillarelektrophorese zeigt eine deutlich bessere Auftrennung als die HPLC-Rechromatographie der einzelnen Fractionen (Abb. 3.20 und Abb. 3.21). Der breite Peak aus der RP-HPLC der Fraction 4 verteilt sich bei der CE-Trennung beispielsweise auf mehr als zehn nahezu Basislinien-getrennte Peaks. Während bei der RP-HPLC die Peptide im wesentlichen nach der Polarität getrennt werden, separiert die CE nach der Ladung und Größe (siehe Kapitel 2.3). Damit ergänzen sich die beiden Trennmechanismen, wie es für die HPLC-Fractionen mit der anschließenden CE gezeigt wurde. Peptide, die bei der RP-HPLC zur gleichen Zeit eluieren, können mittels CE getrennt werden. Die zweidimensionale Trennung mittels HPLC-Fraktionierung mit nachfolgender CE steigert das Auflösungsvermögen so stark, dass der sehr komplexe Milzpeptidwirkstoff weitgehend getrennt werden kann (Abb. 3.20 und Abb. 3.21 Mitte).

Hinter dem UV-Detektor der CE wurden die Proben on-line mit dem Präparationsroboter in Zeitabständen von einer halben Minute fraktioniert und durch den Zusatz von DHB-Matrix im *sheath-flow* Verfahren direkt für die MALDI-Analyse präpariert. In Abb. 3.22 wird das Spektrum der gesamten HPLC Fraction 3 den Spektren von sechs daraus aufgetrennten CE-Fractionen gegenüber gestellt. Alle Peptide konnten deutlich getrennt werden. Die Signalintensitäten sind im Vergleich mit der Gesamtfraction schwächer, da für die CE Analyse nur 1/10 der Peptidmenge injiziert wurde und daher entsprechend weniger für die nachfolgende MALDI-Analyse zur Verfügung stand. Diese zweidimensionale Fraktionierung aus RP-HPLC und CE der Peptide ermöglicht eine Sequenzierung einzelner Peptide mittels MALDI-PSD.

MALDI-Übersichtsspektrum der HPLC-Fraktion 3



MALDI-Übersichtsspektren der CE Fraktionen der HPLC-Fraktion 3

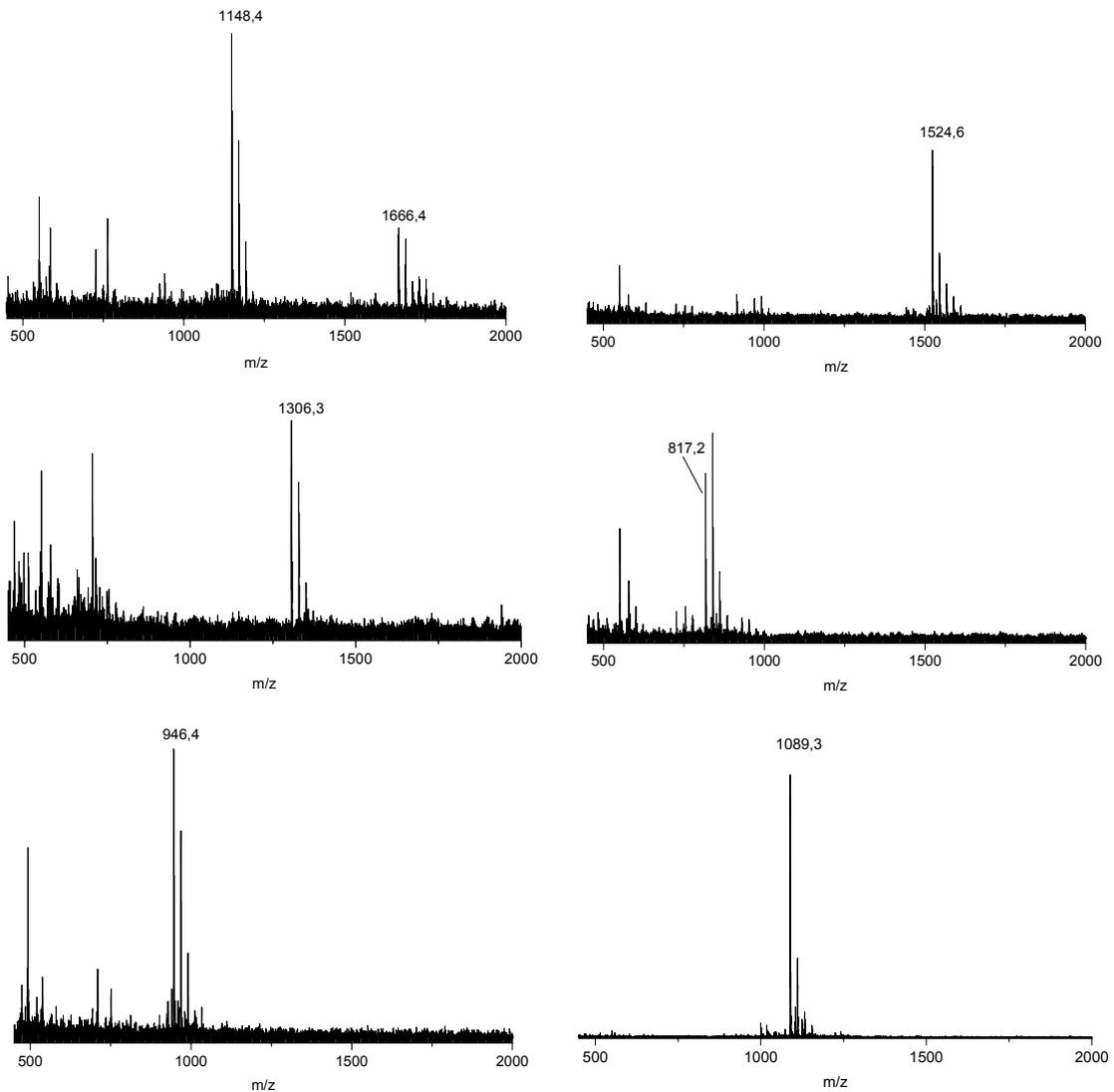


Abb. 3.22: MALDI-Übersichtsspektren der HPLC-Fraktion 3 im Vergleich mit den MALDI-Spektren der CE-Fractionen. Die CE-Fractionen wurden in Zeitabständen von 0,5 Minuten gesammelt. Es wurden nur die Peptide beschriftet, von denen MALDI-PSD-Spektren aufgenommen wurden.

3.4.1.1 MALDI- und PSD-Analyse des Arzneimittelwirkstoffes Polyerga®

3.4.1.1.1 PSD-Sequenzierung

Der on-line CE-Fraktionierung und MALDI-Analyse der CE-Fraktion schließt sich direkt die PSD-Analyse einzelner Peptide an. Abb. 3.23 zeigt das PSD-Spektrum des Mutter-Ions $[M+H]^+ = 1238,4$ u aus der CE-Fraktion 8 der HPLC-Fraktion 6 (Abb. 3.13). Aus der vollständigen b-Serie konnte die Sequenz TTKTYFPHF abgeleitet werden.

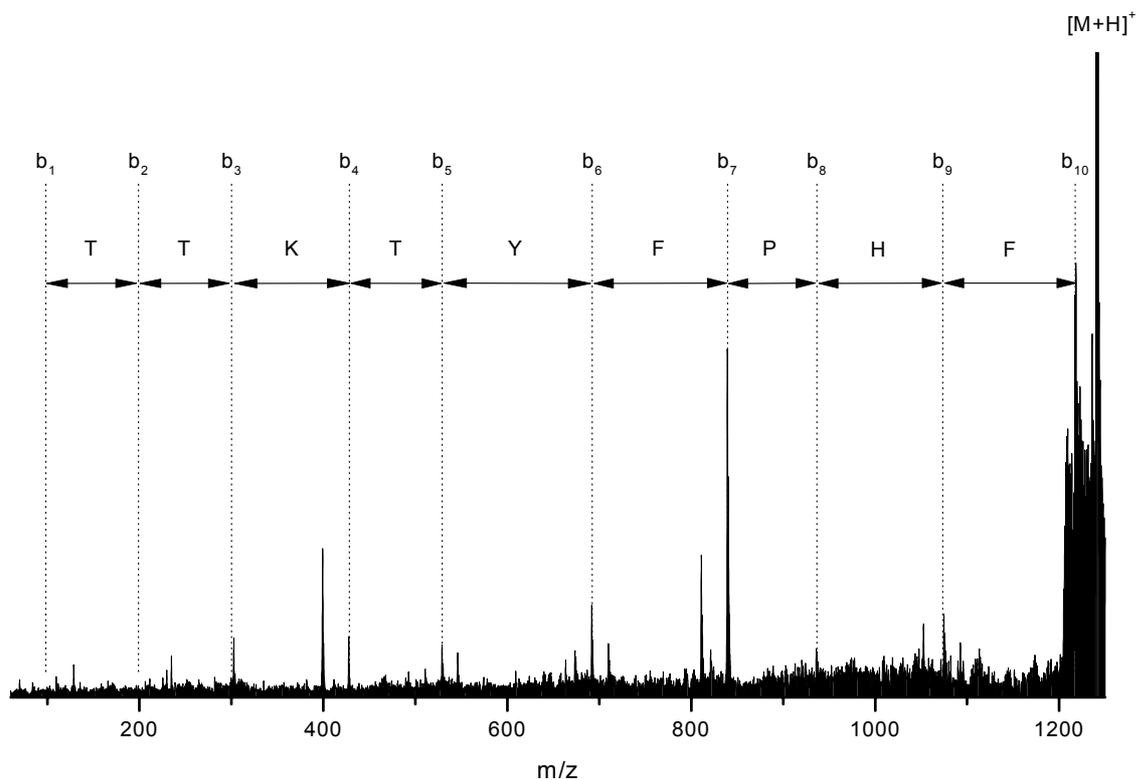


Abb. 3.23: MALDI-PSD-Spektrum des Peptides $[M+H]^+ = 1238,4$ u, eingezeichnet die Fragment-Ionen der b-Serie. Die Massenabstände zwischen zwei Fragment-Ionen entsprechen einer Aminosäure.

Bei der anschließenden Datenbankanalyse (siehe Kapitel 5.6), ergeben sich für die eingegebene Teilsequenz „TYFP“ 154 Übereinstimmungen mit der Peptidsequenz „TTKTYFPHF“. Alle gefundenen 154 Peptidsequenzen gehören zur α -Kette des Hämoglobins verschiedener Organismen, darunter auch die α -Kette des Hämoglobins vom Schwein, dem Ursprungsorganismus des Arzneimittelwirkstoffes Polyerga®.

Die Datenbankanalyse als alleiniges Mittel zur Sequenzbestätigung reicht nicht aus, da zum einen nicht alle vorkommenden Proteine in den Datenbanken erfasst sind, zum

anderen können oft mehrere Peptidsequenzen einem PSD-Spektrum zugeordnet werden. Erst der Vergleich der PSD-Spektren des nativen Peptides mit dem synthetischen Peptid gleicher Sequenz kann die angenommene Sequenz bestätigen. Dabei müssen nicht nur die Fragmente, sondern auch die relativen Intensitätsverhältnisse der Fragment-Ionen zueinander übereinstimmen.

Die folgende Abbildung zeigt als Beispiel das PSD-Spektrum des Peptides mit der Masse $m/z = 1018,3$ u. Die PSD-Sequenzanalyse ergab zwei mögliche Sequenzen, AGDDAPRAVF und (K/Q)DDAPLAAAF. Die zweite Sequenz zeigt größere Übereinstimmung bei der Betrachtung der PSD-Fragmente (Abb. 3.26 a). Der Vergleich des PSD-Spektrums des nativen Peptides mit den PSD-Spektren der zwei entsprechend der möglichen Sequenz synthetisierten Peptide (Abb. 3.26 b und Abb. 3.27 b) zeigt jedoch die eindeutige Übereinstimmung des Spektrums mit der Sequenz AGDDAPRAVF (Abb. 3.27 a). Bei dem bei dem Spektrum des synthetischen Peptids AGDDAPRAVF im oberen Massenbereich auftretendem Signal handelt es sich um eine bislang unbekanntes Artefakt aus der Synthese.

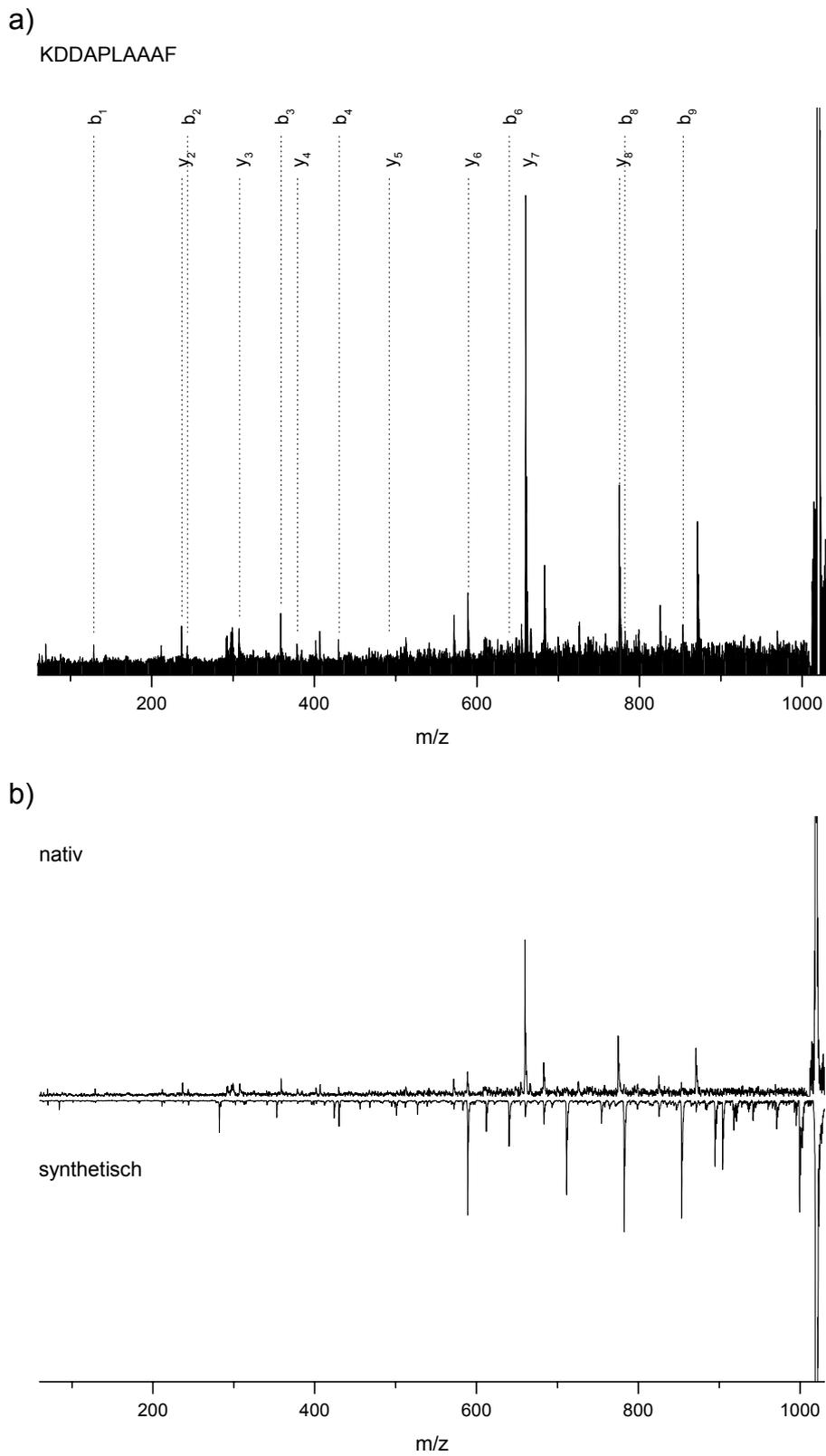
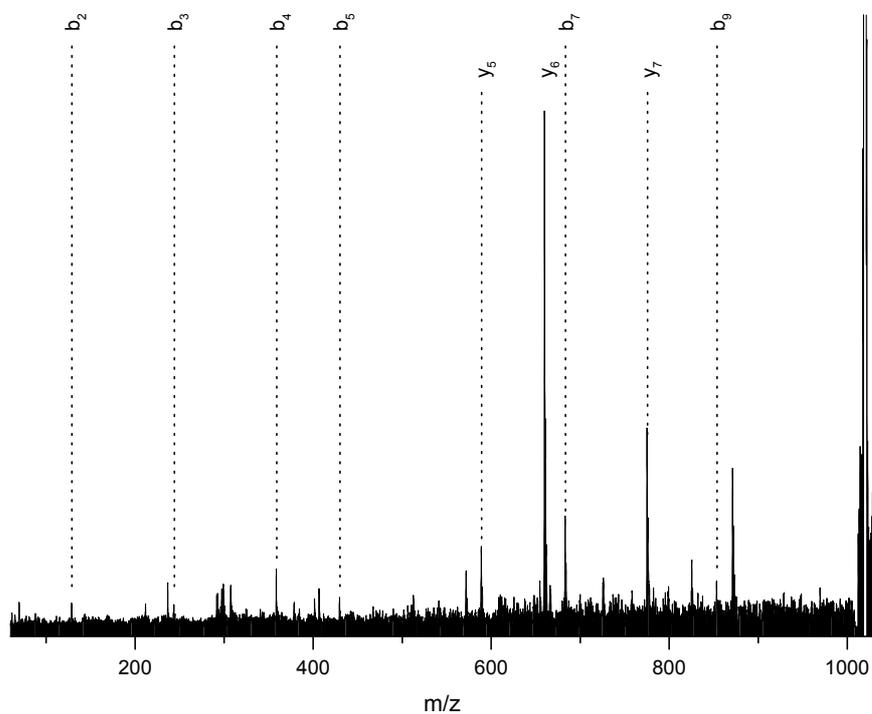


Abb. 3.24: a) PSD Spektren des nativen Peptides $m/z = 1018,3$ u mit erwarteten Fragment-Ionen der Sequenz KDDAPLAAAF, b) Vergleich des nativen Peptides (oben) mit dem synthetischen Peptid gleicher Sequenz (unten).

a)

AGDDAPRAVF



b)

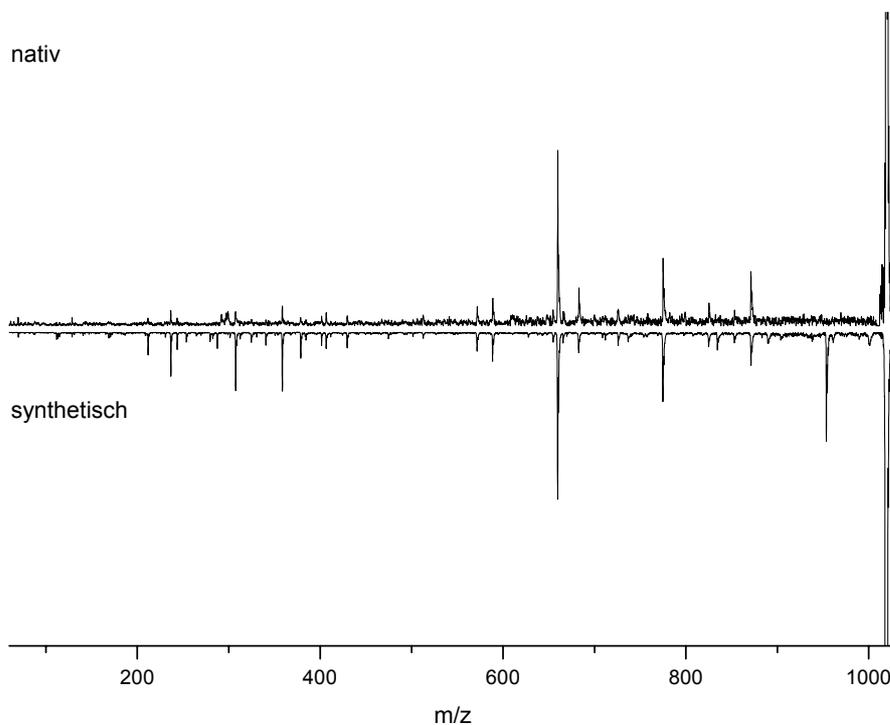


Abb. 3.25: a) PSD Spektren des nativen Peptides $m/z = 1018,3$ u mit erwarteten Fragment-Ionen der Sequenz AGDDAPRAVF, b) Vergleich des nativen Peptides (oben) mit dem synthetischen Peptid gleicher Sequenz (unten).

3.4.1.1.2 ladder sequencing

Die HPLC Fraktion 8 (Abb. 3.21) wurde direkt auf dem MALDI-Probentarget durch *ladder sequencing* (Abb. 3.26) C-terminal anverdaut. Als Enzym wurde die Carboxypeptidase Y (EC 3.4.16.1) verwendet, ein Enzym mit einer breiten Spezifität für schrittweise C-terminale Abspaltung einzelner Aminosäuren von Peptiden einschließlich der Iminosäure Prolin. Von dem Peptid der Masse $m/z = 1827,8$ u zeigen sich Abspaltungen im Massenabstand von 186 Da und 99 Da, entsprechend der Aminosäuren Tryptophan (W) und Valin (V) (Abb. 3.26 unten). Die Datenbankanalyse aufgrund der beiden C-terminalen Aminosäuren W und V ergab für mehr als 80 % der gefundenen Hits Actin als Ursprungprotein an. In diesem Fall, in der von den zwölf sequenzierten Peptiden fünf eindeutig Actin zugeordnet werden, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung des Peptides der Masse $m/z = 1827,8$ u zum Actin ebenfalls richtig ist.

Das Peptid der Masse $m/z = 1195,5$ zeigt Abspaltungen von Phenylalanin (F) und Arginin (R) (Abb. 3.26 unten). Die C-terminale Abspaltung stimmt mit der mittels PSD-Analyse gefundenen Sequenz überein.

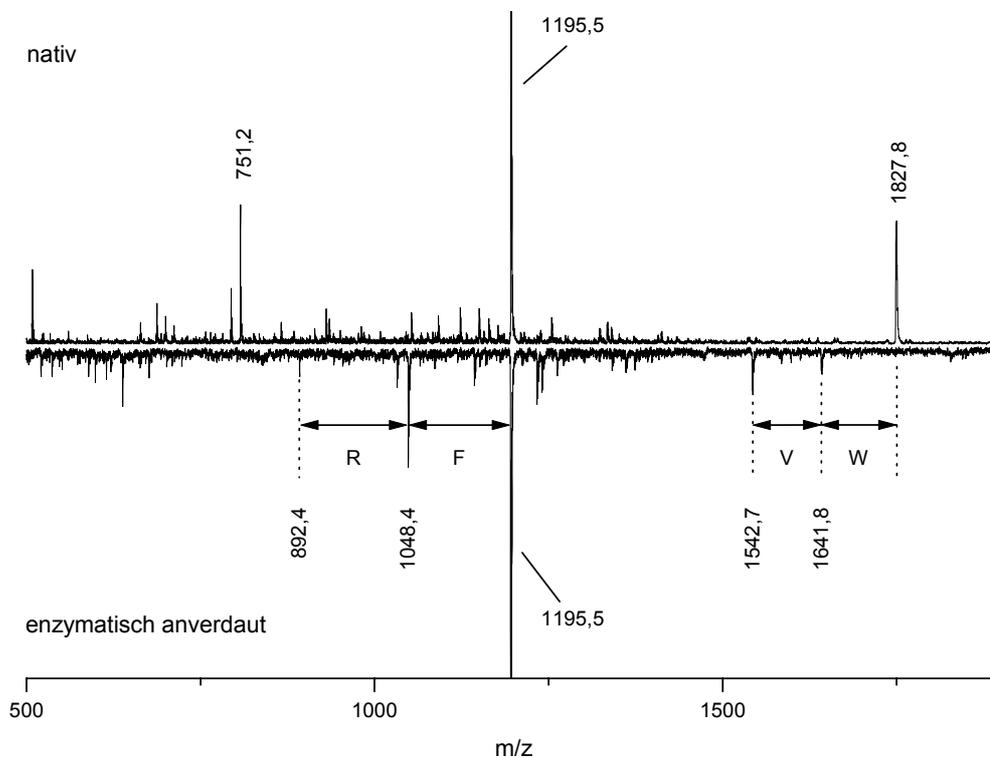


Abb. 3.26: Vergleich der MALDI-Spektren der HPLC-Fraktion 8 vor und nach dem enzymatischen Verdau mit Carboxypeptidase Y.

Durch das *ladder sequencing* wurden neben dem Peptid der Masse $m/z = 1195,6$ u aus Fraktion 8 auch die Sequenzen der Peptide $m/z = 1146,5$ u und $m/z = 946,3$ u (beide aus Fraktion 2, Abb. 3.22) bestätigt.

3.4.1.1.3 Ergebnis der MS-Untersuchungen

In dem Arzneimittelwirkstoff Polyerga[®] wurden insgesamt zwölf Peptide massenspektrometrisch untersucht und mit MALDI-PSD sequenziert. Sieben der zwölf Peptide konnten durch eine Datenbankanalyse dem Protein Actin zugeordnet werden. Drei Peptide entstammen der β -Kette und zwei der α -Kette des Hämoglobins (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Übersicht der im Arzneimittelwirkstoff Polyerga[®] untersuchten und sequenzierten Peptide.

[M+H] ⁺	Aminosäuresequenz	Protein
701,3	AGDDAPR	Actin (22-28)
660,2	APRAVF	Actin (26-31)
775,3	DAPRAVF	Actin (25-31)
1018,3	AGDDAPRAVF	Actin (22-31)
1146,5	RVAPEEHPVL	Actin (95-104)
1542,8	KIKIIAPPERKYS	Actin (326-338)
1827,7	KIKIIAPPERKYSVW	Actin (326-340)
476,1	PVNF	Hämoglobin, α -chain (95-98)
1238,4	PTTKTYFPHF	Hämoglobin, α -chain (37-46)
946,3	WGKVNVD	Hämoglobin, β -chain (15-22)
1195,6	VVYPWTQRF	Hämoglobin, β -chain (33-41)
1524,6	ARRLGHDFNPVQ	Hämoglobin, β -chain (115-127)

Die Peptide der Masse $m/z = 660,2$ u, $m/z = 775,3$ u und $m/z = 701,3$ u sind Teilsequenzen des Peptides $m/z = 1018,3$ u. Das Peptid $m/z = 1524,6$ u ist eine Teilsequenz von $m/z = 1827,7$ u.

Das Ergebnis der Charakterisierung des Arzneimittelwirkstoffes Polyerga[®] ist in Abb. 3.27 zusammengefasst. Die neun Hauptpeaks in dem Peptid-Extrakt und drei weitere

Peptide, die im Screening unterdrückt wurden, konnten sequenziert und identifiziert werden. Alle identifizierten Peptide sind mit ihrem entsprechenden Targetprotein gekennzeichnet.

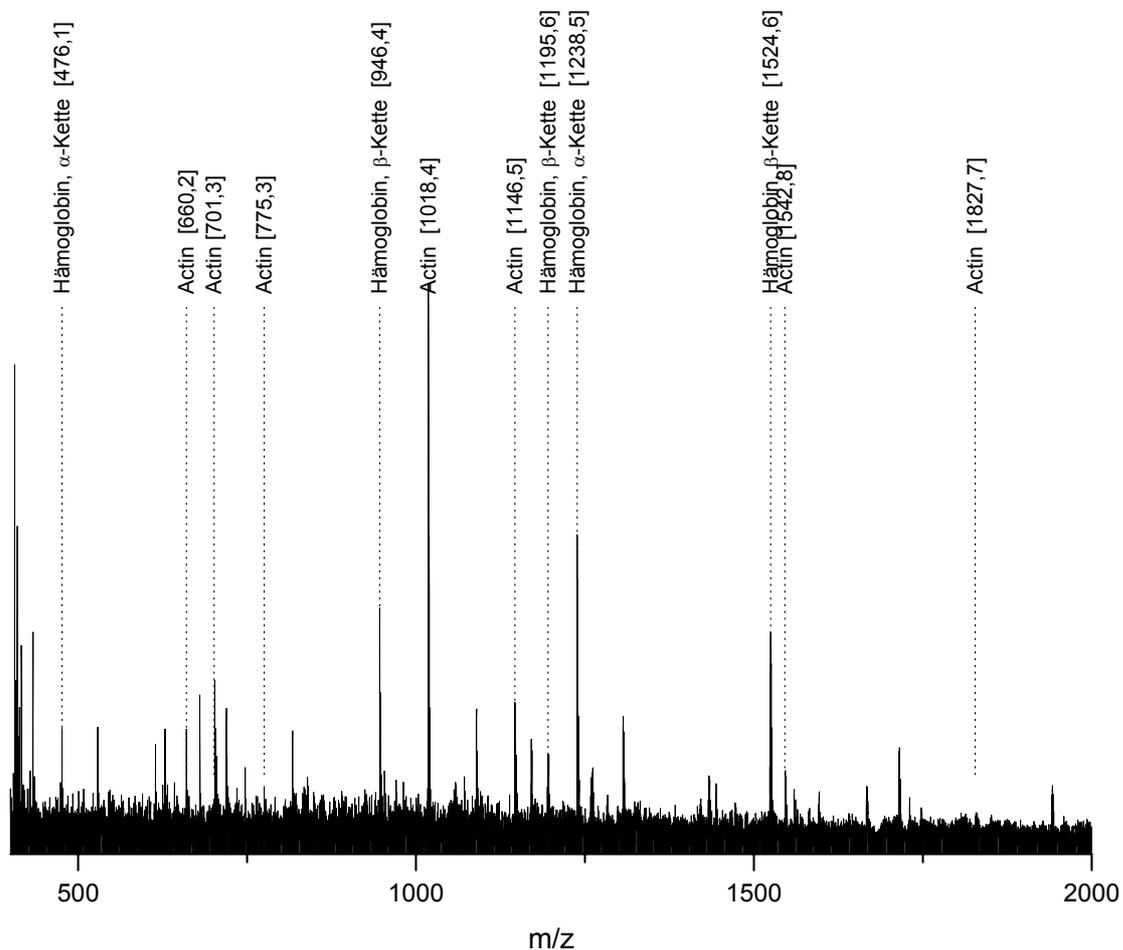


Abb. 3.27: MALDI-Spektrum des Arzneimittelwirkstoffes Polyerga®. Den identifizierten Peptiden sind ihre Ursprungproteine zugeordnet.

Etwa die Hälfte der identifizierten Peptide sind Teilsequenzen des Hämoglobins (Tabelle 3.3). In der Milz werden überalterte rote Blutkörperchen (Erythrozyten) abgebaut. Das beim Abbau der Erythrozyten frei werdende Eisen wird in der Milz gespeichert und dient dem Aufbau von neuem Hämoglobin. Ausserdem werden in der Milz Antikörper gebildet [120]. Es überrascht somit nicht, dass die identifizierten Peptide Teilsequenzen des Hämoglobins sind.

Die andere Hälfte der identifizierten Peptide sind Teilsequenzen des Actins (Tabelle 3.3). Actin wiederum ist das häufigste Protein in einer eukaryotischen Zelle. In Muskelzellen bestehen ungefähr 10 % der gesamten zellulären Proteinmasse aus Actin, in anderen Zellen etwa 1-5 %. Actin ist ein Cytoskelett-Protein, das an den meisten

Bewegungsabläufen beteiligt ist, von der Bewegung einer ganzen Zelle bis zum zellulären Transport durch das Cytoplasma. Bei den Bestandteilen des Cytoskelets unterscheidet man zwischen den 7-9 nm dicken Mikrofilamenten, den 10 nm dicken intermediären Filamenten und den 24 nm dicken Mikrotubuli. Die Mikrofilamente bestehen aus Actin G Untereinheiten, einem globulärem Protein, welches zu Actin F-Fasern polymerisiert [121]. Actin ist eines der am höchsten konservierten Proteine der Zelle. Die Aminosäuresequenz von Actin aus Amöben und höheren Tieren ist noch in 80 % der Positionen identisch (siehe Sequenz im Anhang 7.1).

Mit der Sequenzierung ausgewählter Peptide in dem komplexen Peptidgemisch des Arzneimittelwirkstoffes Polyerga[®] konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Strategie der Kombination der Trennmethoden HPLC und CE mit MALDI- und MALDI-PSD-Analysen, gekoppelt mit dem Präparationsroboter, geeignet ist Mischungen dieser Komplexität aufzuklären. Ziel war es dabei nicht, alle in dem Gemisch vorhandenen Peptide zu identifizieren. Auch lassen sich aus den Ergebnissen dieser Untersuchung keine Aussagen über die Wirksamkeit der identifizierten Peptide machen. Diese Frage muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Das Ziel der Untersuchung war die Sequenzanalyse ausgewählter Peptide in einem komplexen Gemisch. Dabei ist generell zu berücksichtigen, dass nicht die Substanz mit der höchsten Signalintensität im MALDI-Spektrum die aktive Komponente sein muss. Ausserdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es bei der MALDI-Analyse von Gemischen zu Diskriminierung einzelner Peptide kommt. Aufgrund der identifizierten Peptidsequenzen lassen sich wiederum synthetische Peptide herstellen, die dann auf ihre Wirksamkeit untersucht werden können. Erst eine solche Wirksamkeitsstudie bietet die Möglichkeit aktive Komponenten in dem Arzneimittelwirkstoff Polyerga[®] zu identifizieren. Alternativ dazu könnten einzelne Fraktionen der HPLC oder CE auf ihre Wirksamkeit getestet werden, um erst im Anschluss daran eine MALDI-Analyse der Fraktion, die Aktivität zeigt, durchzuführen.

Die Untersuchungen am Arzneimittelwirkstoff dienten zur Entwicklung einer Strategie zur Identifizierung unbekannter Peptide in Gemischen. Nach der erfolgreichen Entwicklung lassen sich nun auch noch weit komplexere Problematiken bearbeiten, wie z.B. die Identifizierung von MHC-Klasse I Peptiden eines Nierenkarzinoms. Als zusätzliche Anforderung kommt hier die Nachweisempfindlichkeit hinzu. Nach der Isolierung und Trennung liegt die Peptidkonzentration in den HPLC-Fraktionen im Femtomolbereich.

3.4.2 Identifizierung von MHC-Klasse I Peptiden eines Nierenkarzinoms

Die untersuchten Peptide wurden aus der Nierenkarzinom Zelllinie A-498 isoliert [77]. Der MHC-Peptid-Komplex wurde durch eine spezifische Immunoaffinitätschromatographie aus den Tumorzellen isoliert. Verwendet wurden hier die zwei Allelspezifischen Antikörper, W6/32.HL (HLA-A,-B,-C) und TH4 (HLA-B und -C). Nach der Isolierung des MHC-Peptid-Komplexes wurden die Peptide durch saure Hydrolyse freigesetzt und anschliessend über RP-HPLC gereinigt und fraktioniert. Aufgrund der relativ einheitlichen Länge der Peptide ist die Fraktionierung meist nur unzureichend. Fast alle Fraktionen sind Gemische aus 30-100 Peptiden. Insgesamt wurden 43 HPLC-Fraktionen aus den zwei Immunoaffinitätschromatographien erhalten (Abb. 3.28a und b)).

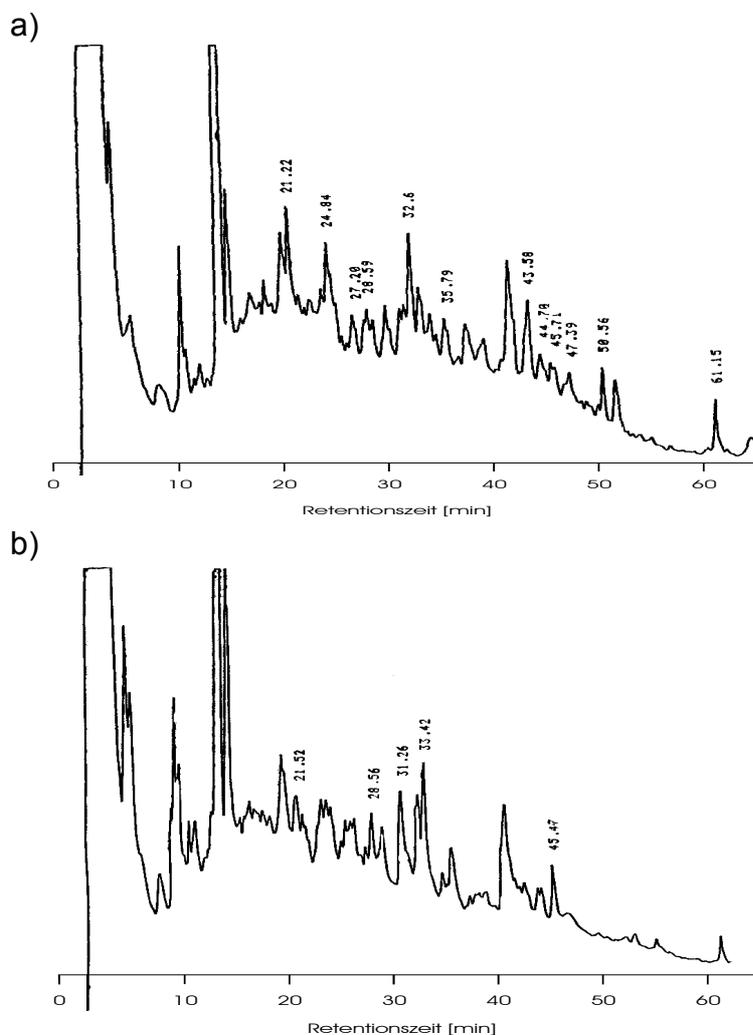


Abb. 3.28: HPLC-Chromatogramme der Peptidgemische nach der Immunoaffinitätschromatographie mit den Antikörpern a) W6/32 und b) TH4.

3.4.2.1 MALDI-Analyse einzelner Peptid Fraktionen

Zur Charakterisierung der einzelnen HPLC-Fractionen und Bestimmung ihrer Peptidzusammensetzung wurden in einem ersten Schritt MALDI-Übersichtsspektren von 31 HPLC-Fractionen der 43 HPLC-Fractionen (13 des TH4 Peptidpools, 18 des W6/32 Peptidpools) aufgenommen.

Fast alle Fractionen sind Peptidgemische aus 30-100 Peptiden, mit Molekulargewichten zwischen 700-1200 Da. Einzelne Fractionen werden von nur einem Peptid dominiert, in anderen gibt es mehrere dominante Peptide, wie in Abb. 3.29 beispielhaft zu sehen ist.

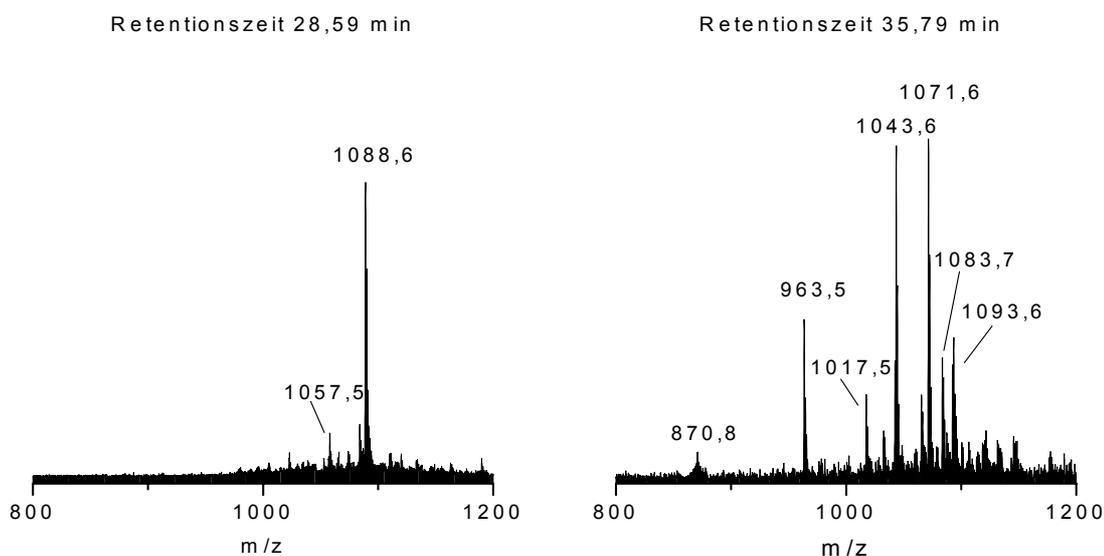


Abb. 3.29: MALDI-Übersichtsspektren von zwei HPLC-Fractionen des W6/32 Peptidpools.

Mit Hilfe des „Ion-Gate“ (siehe Kapitel 2.2.2, Abb. 2.2) ist es im MALDI-PSD-Mode möglich, einzelne Mutter-Ionen aus dem Ionenstrahl des Peptidgemisches zu selektieren und ein PSD-Spektrum aufzunehmen. Dabei ist zu beachten, dass die Auflösung der Selektierung im Bereich von $M/\Delta M \approx 30-80$ liegt. Bei einem Molekulargewicht des Mutter-Ions von 1000 Da bedeutet dies, dass die Peptide einen Massenabstand von 20-40 u zueinander haben müssen. Ansonsten kommt es zur Überlagerung zweier PSD-Fragmentspektren. Es war nur möglich, von einem Teil der Peptide PSD-Spektren aufzunehmen. Neben der Selektierbarkeit, war die Signalintensität des Mutter-Ions ein wichtiges Kriterium. Die Signalintensität der Fragment-Ionen reduziert sich auf ca. 10 % der Intensitäten des Mutter-Ions. Von insgesamt 44 aufgenommenen PSD-Spektren aus 23 verschiedenen HPLC-Fractionen gelang es, 18 Peptide komplett zu sequenzieren. Für drei weitere Peptide konnten Teilsequenzen erhalten werden.

Abb. 3.30 zeigt das PSD-Spektrum des dominanten Peptidsignals in Abb. 3.29 mit der Masse $m/z = 1088,6$ u. Indiziert sind der Übersicht halber nur die a-, b- und y-

Fragmente. Der Massenabstand zwischen den Fragment-Ionen gleicher Serie entspricht einer Aminosäure. Die Auswertung der PSD-Spektren wurde durch Computerprogramme unterstützt, die im Internet verfügbar, kommerziell erhältlich oder in der Arbeitsgruppe entwickelt wurden [56][122] (siehe Kapitel 5.5.3). Mit Teilsequenzen der Peptide wurde in verschiedenen Proteindatenbanken (siehe Kapitel 5.6) nach den Ursursprogenproteinen gesucht. Für das Peptid mit der Masse $m/z = 1088,6$ u wurde Vimetin als Ursursprogenprotein identifiziert.

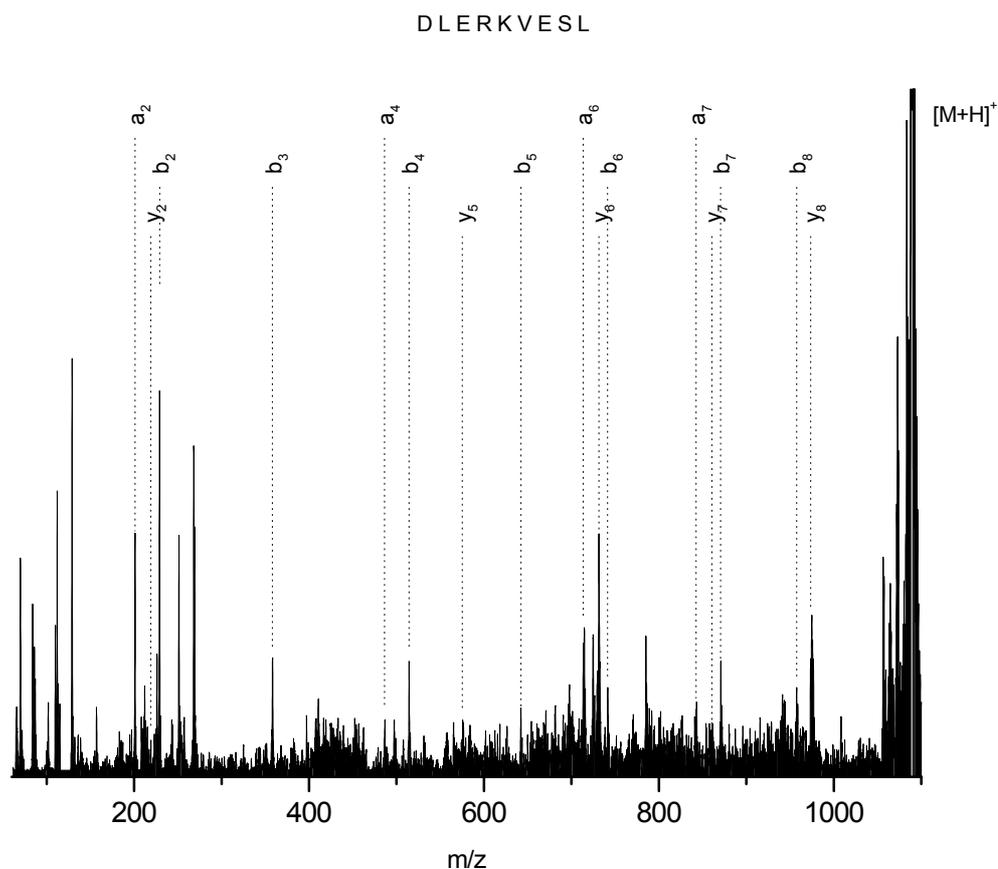


Abb. 3.30: MALDI-PSD-Spektrum des Peptides $[M+H]^+ = 1088,6$ u aus dem Peptidpool W6/32 aus der Fraktion mit der Retentionszeit 28,59 min (Abb. 3.29). Alle Fragment-Ionen der a-, b- und y-Serie, die zugeordnet werden konnten sind gekennzeichnet. Interne Fragment-Ionen sind der Übersicht halber nicht gekennzeichnet.

Ein weiteres Beispiel der PSD-Sequenzierung zeigt die Abb. 3.31. Aus dem Fragment-Ionen-Spektrum ergibt sich die Sequenz WVKEKVVVAL. Es treten Fragmente der a-, b- und y-Serie auf.

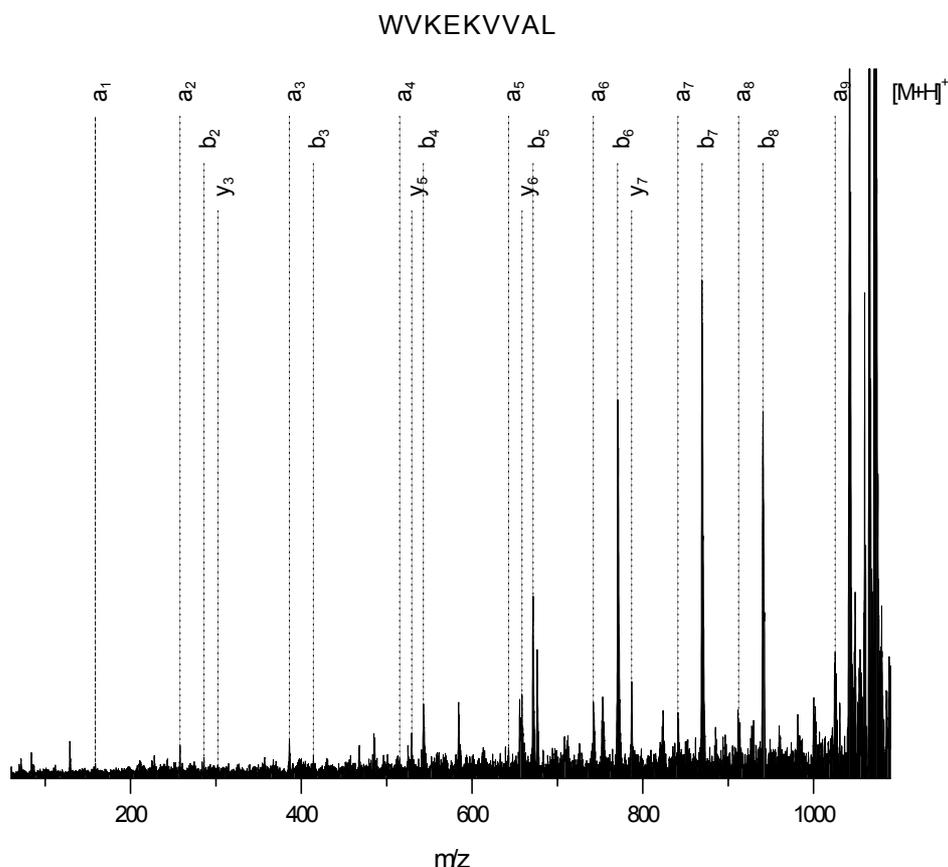


Abb. 3.31: MALDI-PSD-Spektrum des Peptides $[M+H]^+ = 1071,6$ u aus dem Peptid-Pool W6/32 aus der Fraktion mit der Retentionszeit 35,79 min. Alle Fragment-Ionen der a-, b- und y-Serie, die zugeordnet werden konnten sind gekennzeichnet. Interne Fragment-Ionen sind der Übersicht halber nicht gekennzeichnet.

3.4.2.2 H/D-Austausch

Eine einfache Methode zur Verifizierung gefundener Sequenzen ist der H/D-Austausch acider Protonen [11]. Durch die Bestimmung der Anzahl austauschbarer Protonen des Mutter-Ions wie auch der Fragment-Ionen, lässt sich die Anzahl möglicher Sequenzen stark reduzieren. Der Vorteil dieser Derivatisierungsmethode liegt in ihrer Einfachheit. Sie wird direkt auf dem MALDI-Probentarget mit der präparierten Probe in wenigen Minuten durchgeführt. Die Derivatisierung wird üblicherweise dem Messen eines MALDI-Übersichtsspektrums oder auch eines MALDI-PSD-Spektrums angeschlossen. Die Massenverschiebung der stabilen Ionen vom underivatisierten Peptid zum deuterierten Peptid entspricht der Anzahl austauschbarer Protonen des Peptides. Bei mehreren Peptidsignalen in einem Spektrum (Abb. 3.32) besteht nach dem H/D-Austausch die Schwierigkeit der Zuordnung der Peptidsignale.

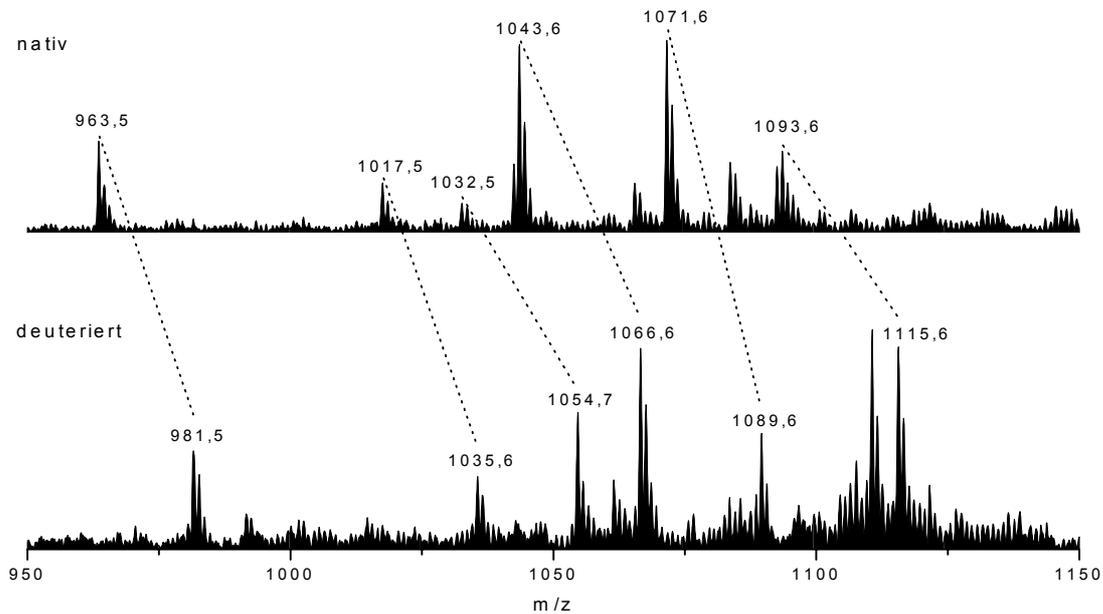


Abb. 3.32: Vergleich zweier MALDI-Übersichtsspektrum der HPLC Fraktion aus dem Pool W6/32 mit der Retentionszeit 35,79 min; oben: nativ, unten: deuteriert.

Für das Peptid der Masse $m/z = 1071,6$ u wurden 18 austauschbare Protonen bestimmt (Abb. 3.32, $m/z = 1071,6$ u \rightarrow $m/z = 1089,6$ u). Mit der Anzahl der austauschbaren Protonen konnte die vorgeschlagene Sequenz WVKEKVVVAL (Abb. 3.31), mit 18 austauschbaren Protonen, bestätigt werden.

Abb. 3.33 zeigt ein weiteres Beispiel für die Komplexität der untersuchten Proben. Durch den H/D-Austausch wurde die Überlagerung zweier Peptide identischer Masse, aber mit unterschiedlicher Anzahl austauschbarer Protonen sichtbar. Der Peak bei $m/z = 1099,6$ spaltet sich durch die Deuterierung auf in $m/z = 1117,6$ u (18 austauschbare Protonen) und $m/z = 1121,6$ u (22 austauschbare Protonen). Aufgrund der geringen Signalintensität konnten von den deuterierten Peptiden keine PSD-Spektren aufgenommen werden. Die Derivatisierung führt häufig zu einer Abnahme der Signalintensität auf ca. 10 % der ursprünglichen Intensität.

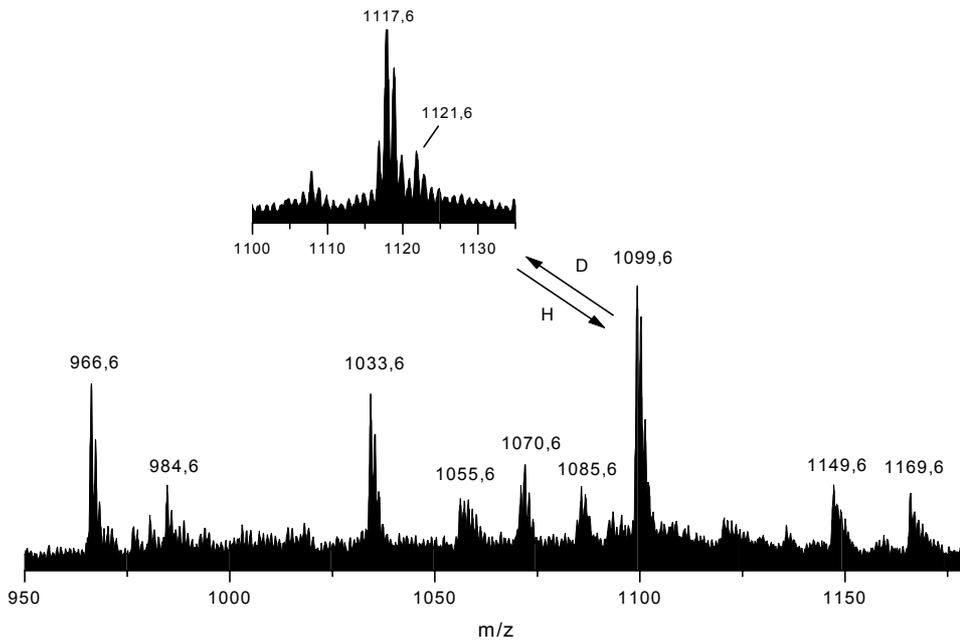


Abb. 3.33: MALDI-Übersichtsspektrum der HPLC-Fraktion mit der Retentionszeit 27,20 min aus dem Peptidpool W6/32. Es zeigt einen dominanten Peak bei $m/z = 1099,6$ u, bei dem die Deuterierung zeigt, dass er zwei Peptide gleicher Masse enthält, aber mit unterschiedlicher Anzahl austauschbarer Protonen ($m/z = 1117,6$ u und $m/z = 1121,6$).

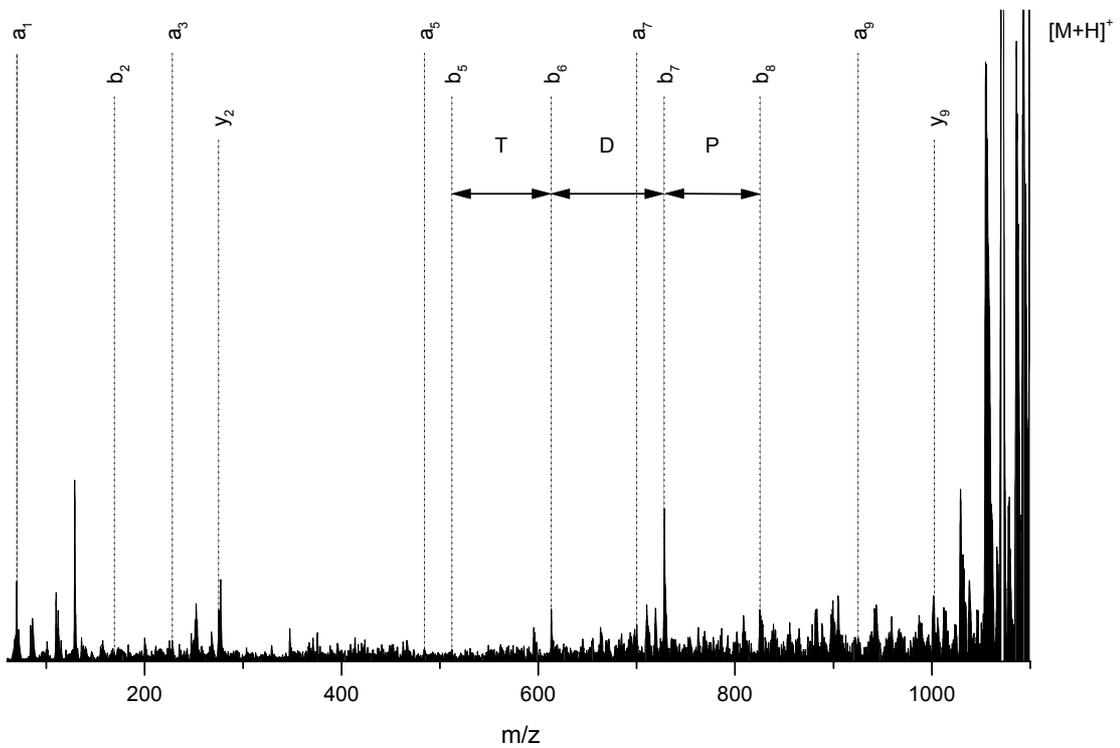


Abb. 3.34: MALDI-PSD-Spektrum der Masse $m/z = 1099,6$ u. Das Spektrum ist eine Überlagerung zweier Fragmentenspektren. Eingezeichnet der *sequence tag* „TDP“, mit dem die Datenbankanalyse durchgeführt wurde.

Aus dem PSD-Spektrum der undeuterten Peptide bei $m/z = 1099,6$ u (Abb. 3.34) wurde der *sequence tag* „TDP“ gefunden. Die Datenbankanalyse mit diesem *tag* ergab drei Sequenzen mit unterschiedlicher Anzahl austauschbarer Protonen:

KTPAITDPKK	20
PASKKTDPQK	22
PKRETDPKK	23

Die bestimmte Anzahl von 22 austauschbaren Protonen für eines der beiden Peptide bei $m/z = 1099,6$ u zusammen mit der Datenbankanalyse spricht für die Sequenz PASKKTDPQK. Dies wurde durch Vergleich des PSD-Spektrums des nativen Peptides mit dem des synthetischen Peptides gleicher Sequenz dann auch bestätigt (siehe Anhang Abb. 7.56).

Der große Vorteil des H/D-Austausches liegt in der Einfachheit der Methode und in seiner Reversibilität. Nach dem H/D-Austausch können mit der gleichen Probe weitere Derivatisierungen (z.B. Acetylierungen, Oxidation) und Messungen durchgeführt werden. Durch einfaches umkristallisieren mit H_2O wird die Probe wieder in den nativen Zustand gebracht. Die Empfindlichkeit der Methode liegt im Femtomolbereich.

In Tabelle 3.4 sind alle identifizierten Peptide mit ihren gefundenen Sequenzen zusammengefasst.

3.4.2.3 Verifizierung der identifizierten Peptidsequenzen

Nur der Vergleich der PSD-Spektren identifizierter Peptide mit PSD-Spektren von synthetischen Peptiden gleicher Sequenz ermöglicht eine sichere Sequenzbestätigung (siehe Kapitel 3.4.1.1.1). Alle 19 postulierten Sequenzen (Tabelle 3.4) wurden synthetisch hergestellt und mittels MALDI-PSD untersucht. Abb. 3.35 zeigt das Beispiel des Peptides der Masse $m/z = 1088,6$ u aus dem Peptidpool W6/32 (Abb. 3.29), bei dem beide Fragmentierungsmuster vollständig übereinstimmen. Damit wurde die vorgeschlagene Sequenz DLERKVESL (Abb. 3.30) eindeutig bestätigt.

Tabelle 3.4: Tabelle aller identifizierten MHC-Klasse I Peptidsequenzen.

Peptid*	Molekulargewicht [M+H] ⁺ (monoisotopisch) [u]	Peptidpool,	Retentionszeit [min]
HPKYKTEL	1015,55	W6/32	21,22
QKDKVAEEL	1059,56	W6/32	24,84
QKDKVAELE	1059,56	W6/32	24,84
PASKKTDPOK	1099,61	W6/32	27,20
DLERKVESL	1088,59	W6/32	28,59
ILMEHIHKL	1133,65	W6/32	32,62
ALSDHHIYL	1068,54	W6/32	32,62
WVKEKVVVAL	1071,65	W6/32	35,79
YLLPAIVHI	1038,63	W6/32	43,58
GLSEFTEYL	1058,50	W6/32	45,71
FLGENISNFL	1153,58	W6/32	50,66
PEDFIKKADS	1149,57	W6/32	44,70
ADKLRFRAL	1089,65	W6/32	44,70
DQKDHAVF	959,45	TH4	21,52
FPRLKSKL	988,63	TH4	29,54
YLVKGNVF	1067,62	TH4	31,26
YGMQRIL	977,52	TH4	33,42
RSERNMMN	1151,50	TH4	28,56
IAQDRNIAI	1013,57	TH4	45,47

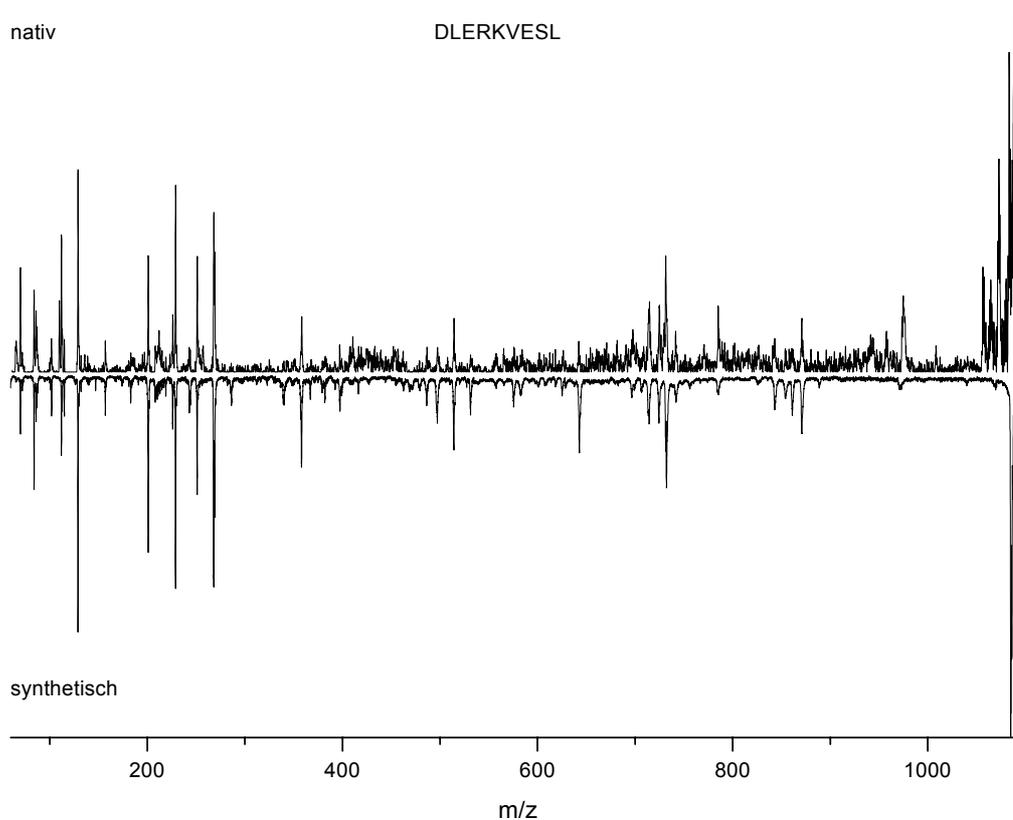


Abb. 3.35: MALDI-PSD-Spektrum des Peptides $m/z = 1088,6$ u aus dem Peptidpool W6/32 (Retentionszeit der Fraktion 28,59 min) im Vergleich mit dem synthetischen Peptid gleicher Sequenz.

Von den 19 vorgeschlagenen Gesamtsequenzen (Tabelle 3.4) wurden 14 Sequenzen durch den Vergleich der Fragmentierungsmuster bestätigt (Tabelle 3.5). Bei den restlichen fünf Peptiden (QKDKVAELE; PEDFIKKADS; ADKLRFRAL; RSERNMMN; IAQDRNIAI) zeigen die synthetischen Peptide eindeutig ein anderes Fragmentierungsverhalten (Abb. 3.36, siehe Anhang Abb. 7.57 bis Abb. 7.60).

Die Fehlinterpretation der PSD-Spektren der nativen Peptide lässt sich zum Teil durch die nicht hundertprozentige Selektierung eines einzelnen Mutter-Ions im PSD-Modus erklären. In den erhaltenen PSD-Spektren sind Fragment-Ionen verschiedener Mutter-Ionen überlagert. Zum anderen beruht die Sequenzierung dieser Peptide nur auf der Interpretation von gefundenen Teilsequenzen („*sequence tags*“), mit denen in Datenbanken nach der Gesamtpeptidsequenz gesucht wurde. Abb. 3.36 zeigt das Beispiel des Peptides $m/z = 1089,6$ u für das der *sequence tag* „ADKLR“ gefunden wurde. Die auf diesem *tag* beruhende Datenbankanalyse ergab die Gesamtsequenz ADKLRFRAL. Wie aber der Vergleich des PSD-Spektrums des nativen mit dem

synthetischen Peptid zeigt, stimmen die Fragmentierungsmuster der beiden Peptide nicht überein. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Interpretation der PSD-Spektren alleine zur Sequenzbestimmung nur bedingt einsetzbar ist, und wie wichtig die Überprüfung der gefundenen Peptidsequenzen durch den Vergleich mit synthetischen Peptiden gleicher Sequenz ist.

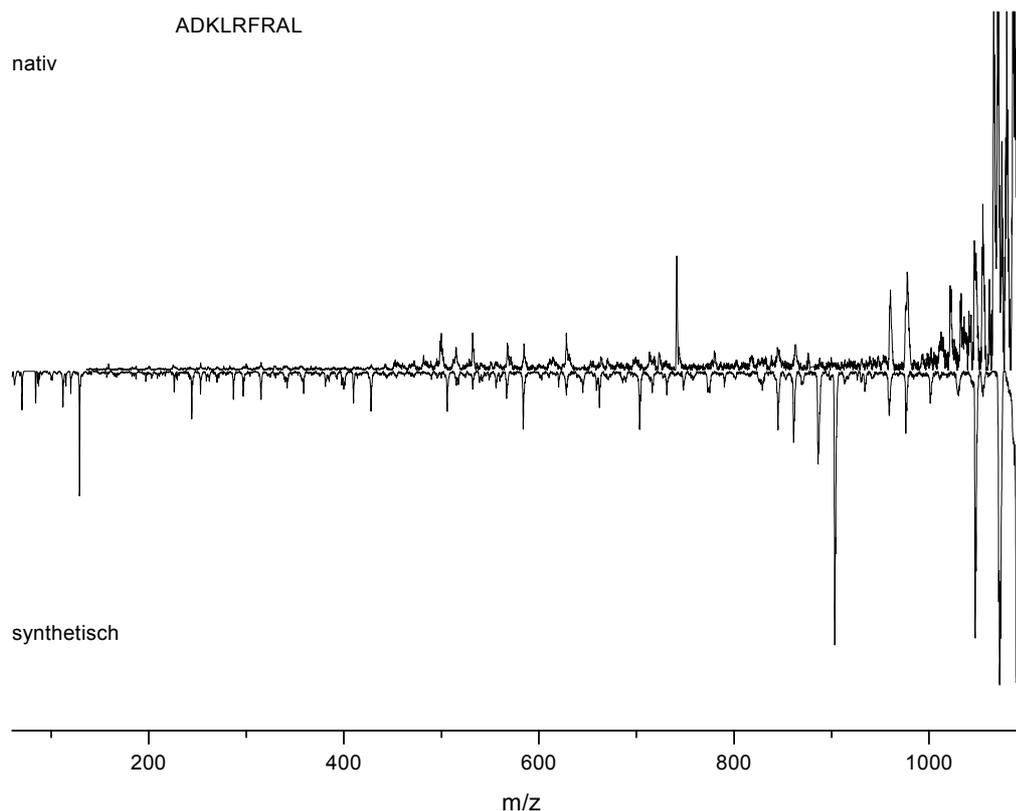


Abb. 3.36: MALDI-PSD Spektrum vom Peptid $m/z = 1089,6$ u der HPLC Fraktion (Retentionszeit 44,70 min) aus dem Peptidpool W6/32 im Vergleich mit dem Spektrum des synthetischen Peptides ADKLRFRAL.

Für die 14 bestätigten Sequenzen konnten die Ursursungsproteine durch Datenbankanalyse ermittelt werden. Alle identifizierten Sequenzen stimmen mit den Datenbanksequenzen überein. In Tabelle 3.5 sind alle identifizierten Peptide mit ihren Ursursungsproteinen zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Tabelle der isolierten und identifizierten Peptide mit ihren Ursprungproteinen.

Peptid	Protein	Position	Acc.Nr.	Verteilung	Zelluläre Expression	Literatur
YLKVKGNVF	Ribosomales Protein L19	124-132	Swiss-Prot: P14118	weit verbreitet	konstitutiv	[123]
ILMEHIHKL		137-145		Mammakarzinom	überexprimiert	[124]
QKDKVAEEL	LFA-3	59-67	Swiss-Prot: P19256	weit verbreitet	konstitutiv	[125]
DQKDHAVF	HDJ-2, DNAJ-2	244-251	Swiss-Prot: P31689	weit verbreitet	induzierbar	[126]
				abgestoßene Spenderniere	überexprimiert	
HPKYKTEL	Tristetraprolin (TTP)	139-146	Swiss-Prot: P26651	weit verbreitet	induzierbar	[127]
YLLPAIVHI	p68 Protein (p68 RNA Helicase)	148-156	Swiss-Prot: P17844	weit verbreitet	konstitutiv	[128]
DLERKVESL	Vimentin	218-226	Swiss-Prot: P08670	weit verbreitet (mesenchymale Zellen)	konstitutiv	[129]
FPRLKSKL	Apolipoprotein L	129-136	TR_NEW: G2425058	Pankreas	konstitutiv	[130]
FLGENISNFL		242-251				
ALSDHHIYL	Fructose-Bisphosphat-Aldolase A	115-123	Swiss-Prot: P04075	Muskel	konstitutiv	[131]
YGMPRQIL	SM22-Alpha Homolog	192-199	Swiss-Prot: P37802	Glatte Muskulatur	konstitutiv	[132]
WVKEKVVAL	NK-4 Präkursor-Protein	175-183	Swiss-Prot: P24001	NK-Zellen, aktivierte T-Lymphozyten	induzierbar	[133]
GLSEFTEYL	Mikrotubuli assoziiertes Prot. 1B	225-233	Swiss-Prot: P46821	Nervengewebe (Gehirn)	konstitutiv	[134]
PASKKTDPOK	RAGE-1,2,3; ORF-5	44-53	EMBL: U46191 U46192 U46193	Retina	konstitutiv	[135]
				verschiedene Tumore	tumorspezifisch	

Da die untersuchten Peptide aus Fraktionen der Immunoaffinitätschromatographie von zwei verschiedenen Antikörpern (W6/32 und TH4) stammen, die jeweils bestimmte MHC-Antigene binden (W6/32 bindet HLA-A,B,C; TH4 bindet HLA-B,C), wurden die identifizierten Peptide auf das Vorhandensein der für HLA-A2 [136] und HLA-B8 [136][137] bekannten Ankerstrukturen untersucht.

Die Peptidbindungsmotive für HLA-A2 und HLA-B8 lauten:

Position innerhalb des Peptides	1	2	3	4	5	6	7	8	9/10
HLA-A2		L/I							V/L/I
HLA-B8			K/R		K/R			(L/I/F)	L/I/F

Von den insgesamt 14 identifizierten Peptiden zeigten sechs der identifizierten HLA (Humane Leukozyten Antigene) assoziierten Peptide vollständig, das für HLA-A2 charakteristische Bindungsmotiv (ILMEHIHKL, YLLPAIVHI, DLERKVESL, FLGENISNFL, ALSDHHIYL, GLSEFTEYL). Vier zeigten vollständig das für HLA-B8 charakteristische Bindungsmotiv (YLKVKGNVF, HPKYKTEL, FPRLKSKL, WVKEKVVAI), die restlichen vier Peptide besitzen partielle Bindungsmotive entweder für HLA-A2 (QKDKVAEEL) oder HLA-B8 (DQKDHAVF, YGMQRQIL, PASKKTDPQK).

Die 14 bestätigten Peptidsequenzen lassen sich zwei Gruppen von Zellproteinen (siehe Tabelle 3.5) zuordnen. Die eine beinhaltet Strukturproteine wie Vimetin oder das ribosomale Protein L19, das man auch in sehr vielen normalen Zellen findet. Zu dieser Gruppe gehören auch das Oberflächenprotein LFA-3, das nukleäre Protein p68 und Tristetraprolin.

Zur zweiten Gruppe gehören die Proteine, die eine spezifische zelluläre Expression zeigen, wie das Apolipoprotein L, das nur im Pankreas exprimiert wird, die muskulären Proteine Fructose-Bisphosphat-Aldolase A und SM22-Alpha-Homolog, das in Nervengewebe vorkommende Protein 1B, das Lymphozyten-spezifische Präkursor-Protein NK-4 sowie das Hitzeschockprotein HDJ-2, das in abgestoßenen Spendernieren gefunden wurde.

Den offenkundigsten Zusammenhang zum Nierenkarzinom zeigte nur das bislang unbekannt, dem RAGE Tumorantigen [135] zugeordnete Peptid PASKKTDPQK. Die Identifizierung gelang nur aufgrund des H/D-Austausches, durch den die Überlagerung zweier Peptide mit identischem Molekulargewicht sichtbar wurde (Abb. 3.33). Hier

zeigt sich klar die Überlegenheit der MALDI-MS gegenüber anderen massenspektrometrischen Verfahren wie ESI.

Die hier gezeigten Ergebnisse sind die ersten Sequenzierungen von MHC-Klasse I Peptiden mittels MALDI-MS [77][83]. Sie zeigen deutlich, dass die MALDI-MS und MALDI-PSD-MS gute Alternativen zu der bis dahin zur Aufklärung von MHC-Peptiden verwendeten ESI-MS [81][82] ist. Ihre Vorteile liegen bei solch komplexen Proben und solch geringen Probenkonzentrationen in ihrem off-line Charakter. Einmal präparierte Proben können mehrfach vermessen werden. Unter anderem um zusätzliche Informationen zu erhalten, z.B. nach einer Derivatisierung (siehe Kapitel 3.4.2.2). Oder auch um neu hinzugekommenen Informationen wie z.B. aus Datenbanken verifizieren zu können.

Eine Reduzierung der Komplexität der Proben durch eine der HPLC Trennung nachgeschaltete CE Trennung, wie sie am Beispiel des Arzneimittelwirkstoffes gezeigt wurde, war hier aufgrund der sehr geringen Probenmengen nicht möglich. Gleichzeitig zeigt aber das Beispiel des MHC-Peptides $m/z = 1099,6$ wie nötig eine solche Auftrennung ist, um sich überlagernde Fragmentspektren zu verhindern. An diesem Beispiel zeigt sich auch, dass die MALDI-MS bzw. MALDI-PSD-MS an ihre Grenzen stösst, wenn es um die Sequenzierung von sich überlagernden bzw. dicht nebeneinander liegenden Mutter-Ionen geht. Hier ist eine Gerätetechnische Verbesserung z.B. des Ion-Gate notwendig. Die erfolgreiche Sequenzierung der MHC-Peptide ist nicht zuletzt auf die zuvor entwickelten und optimierten Probenpräparationen und Derivatisierungen sowie auf die Erfahrungen bei der Auswertung der PSD-Spektren zurückzuführen.

Es ist gelungen mit der MALDI-PSD Technik MHC-Peptide, die aus einer Nierenkarzinomzelllinie isoliert worden sind, direkt zu sequenzieren. Ein Teil dieser Peptide stammt aus Proteinen, die in der A-498 Nierenkarzinomzelllinie potentiell überexprimiert waren. Besitzen sie Epitope auf die tumorspezifische Cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) reagieren, liesse sich eine individuell auf den einzelnen Patienten zugeschnittenen Immuntherapie entwickeln. MHC-assoziierte Peptide würden aus Tumormaterial, das dem einzelnen Patient entnommen wurde, isoliert und anschliessend mit MALDI-PSD sequenziert. Dem Patienten würde dann ein „Cocktail“ synthetischer Peptide, beruhend auf den identifizierten Sequenzen, verabreicht. Das identifizierte RAGE-Peptid stellt so ein vielversprechendes Tumorantigen für eine potentielle Immuntherapie bei Nierenkarzinom dar [77], die auf T-zellulärer Erkennung immunogener MHC-Klasse I assoziierter Peptide auf Tumorzellen basiert.

3.4.3 Phosphopeptide

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen in der Zelle ist einer der wichtigsten Regulierungsmechanismen für die Zellteilung und –differenzierung. Im Rahmen der heutigen bioanalytischen Fragestellungen wie die Proteom-Analyse und Aufklärung des humanen Genoms kommt der Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen, wie die Phosphorylierung, eine grosse Bedeutung zu. Im Rahmen dieser Arbeit stand das Verhalten von Phosphopeptiden bei der MALDI-PSD-Analyse im Vordergrund. Die folgenden Fragen waren Gegenstand der Untersuchungen:

- Lassen sich aus dem Fragmentierungsverhalten Regeln ableiten, die die Identifizierung von unbekanntem Phosphopeptiden in komplexen Peptidmischungen erleichtern?
- Gibt es Unterschiede im Verhalten zwischen den aliphatischen Phosphoamino-säuren Phosphoserin und –threonin und der aromatischen Phosphoamino-säure Phosphotyrosin?

3.4.3.1 PSD-MS Untersuchungen von Serin- und Threonin-phosphorylierten Peptiden

Ausgehend von den zwei humanen PHF-Tau Sequenzen τ 224-240 und τ 390-396 (siehe Kapitel 2.4.3) [94], wurden die beiden unphosphorylierten, fünf einfach phosphorylierte und drei doppelt-phosphorylierte Peptide synthetisiert (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Synthetische Peptide und Phosphopeptide mit ihren Sequenzen entsprechend dem humanen PHF- τ [94].

Peptid	Sequenz*	berechnete monoisotopische Masse [M+H] ⁺ [u]	gemessene monoisotopische Masse [M+H] ⁺ [u]
Tau 224-240	K K V A V V R T P P K S P S S A K-NH ₂	1779,11	1779,08
Tau 224-240 (T231P)	K K V A V V R <u>T</u> P P K S P S S A K-NH ₂	1859,11	1859,07
Tau 224-240 (S235P)	K K V A V V R T P P K <u>S</u> P S S A K-NH ₂	1859,11	1859,05
Tau 224-240 (T231P+S235P)	K K V A V V R <u>T</u> P P K <u>S</u> P S S A K-NH ₂	1939,10	1939,08
Tau 390-408	A E I V Y K S P V V S G D T S P R H L-NH ₂	2054,10	2054,10
Tau 390-408 (S396P)	A E I V Y K <u>S</u> P V V S G D T S P R H L-NH ₂	2134,06	2134,10
Tau 390-408 (T403P)	A E I V Y K S P V V S G D <u>T</u> S P R H L-NH ₂	2134,06	2134,20
Tau 390-408 (S404P)	A E I V Y K S P V V S G D T <u>S</u> P R H L-NH ₂	2134,06	2134,10
Tau 390-408 (S396P+T403P)	A E I V Y K <u>S</u> P V V S G D <u>T</u> S P R H L-NH ₂	2214,03	2214,08
Tau 390-408 (S396P+S404P)	A E I V Y K <u>S</u> P V V S G D T <u>S</u> P R H L-NH ₂	2214,03	2214,10

* S; T markiert phosphoryliertes Serin bzw. Threonin

Die PSD-Spektren der beiden unphosphorylierten Tau-Peptide entsprachen dem erwarteten Fragmentierungsverhalten. Das Tau-Peptid τ 224-240 zeigte aufgrund der Position der basischen Aminosäure Lysin am C- und N-Terminus die fast vollständigen y- und b-Serien. Die sehr labile Bindung bei Prolin 232 und 233 führt zu dem erwarteten verstärkten Bindungsbruch b_8/y_9 (N-terminal vor Pro 232) mit den daraus folgenden intensiven Signalen der Fragment-Ionen y_9 und a_8 (Abb. 3.37).

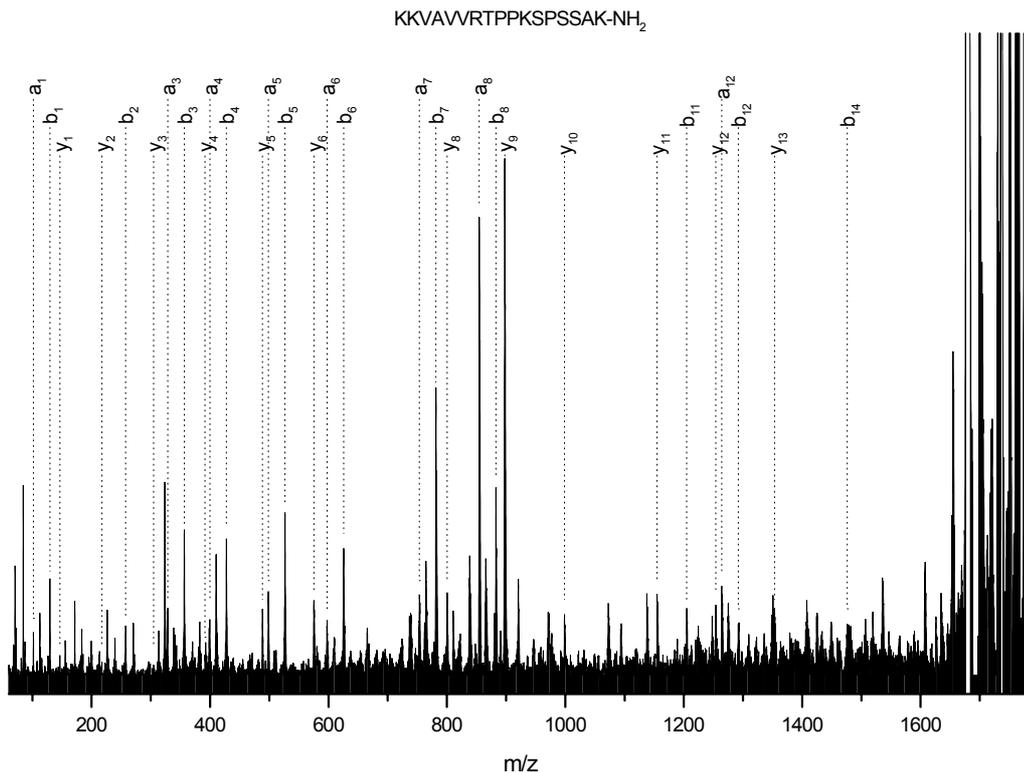


Abb. 3.37: PSD-Spektrum des unphosphorylierten τ 224-240 Peptides.

Beim Peptid τ 390-408 ist die basischste aller Aminosäuren Arginin, in der Nähe des C-Terminus lokalisiert, so dass das PSD-Spektrum von der y-Serie dominiert wurde (Abb. 3.38). Das sehr intensive Signal des Fragment-Ions y_6 ist auf den bekannten verstärkten Bindungsbruch auf der C-terminalen Seite der Asparaginsäure zurückzuführen [54].

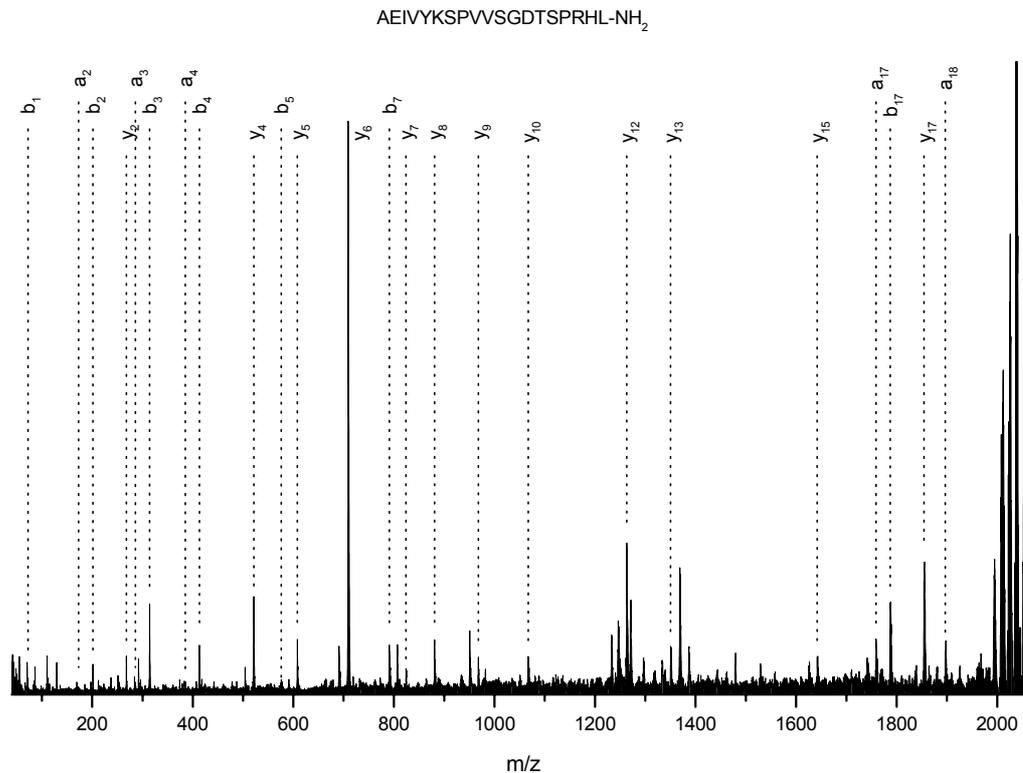


Abb. 3.38: PSD-Spektrum des unphosphorylierten τ 390-408 Peptides.

3.4.3.1.1 Dephosphorylierung der Vorläufer- und der Produkt-Ionen

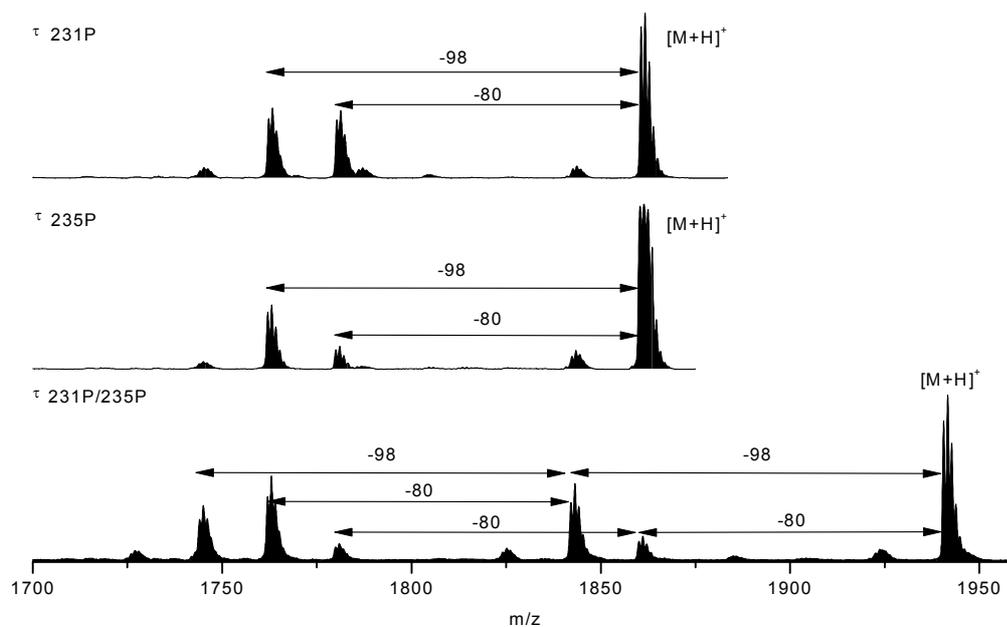
Bei allen Phosphopeptiden tritt beim Vorläufer-Ion eine intensive Abspaltung von H_3PO_4 (-98 Da) und HPO_3 (-80 Da) auf. Dieses Dephosphorylierungsmuster ist typisch für Phosphoserin und Phosphothreonin [105][110]. Die Abspaltung der Phosphorsäure erfolgt über einen sechsgliedrigen Übergangszustand mit anschließender Übertragung des Protons am benachbartem C-Atom auf die Phosphatgruppe (β -Eliminierung) [138]. Das Fragment $[\text{MH}-\text{H}_3\text{PO}_4]$ entspricht somit nicht dem dephosphorylierten Peptid, sondern enthält anstelle des Phosphoserins die Aminosäure Dehydroalanin und statt des Phosphothreonins die Aminosäure Dehydroamino-2-Buttersäure. Die Signalintensitäten der Fragment-Ionen $[\text{MH}-\text{H}_3\text{PO}_4]$ liegen bei weniger als 50% der Intensitäten der Vorläufer-Ionen sind aber deutlich höher als die normaler PSD-Fragmente ($> 10\%$), so dass Phosphopeptide auch in sehr geringen Konzentrationen als solche erkannt werden können.

Aus dem Dephosphorylierungsmuster des Vorläufer-Ions lässt sich nicht auf die phosphorylierte Aminosäure schließen. Phosphoserin und Phosphothreonin

unterscheiden sich nur wenig in den relativen Signalintensitäten der entsprechenden dephosphorylierten Vorläufer-Ionensignalen $[MH-H_3PO_4]^+$ und $[MH-HPO_3]^+$.

Das Dephosphorylierungsmuster der doppelt phosphorylierten Peptide ergibt sich aus der Überlagerung der Muster der einfach phosphorylierten Peptide (Abb. 3.39). Die Signalintensitäten der fünf Dephosphorylierungsprodukte liegen zwischen 5 und 50 % der Intensität des Vorläufersignals, wobei die Intensität des einfach dephosphorylierten Fragment-Ions $[MH-H_3PO_4]$ und des vollständig dephosphorylierten Fragment-Ions $[MH-H_3PO_4-H_3PO_4]$ gleich hoch sind und somit auch bei sehr geringen Peptidkonzentrationen eine Erkennung von mehrfach phosphorylierten Peptiden möglich ist.

a)



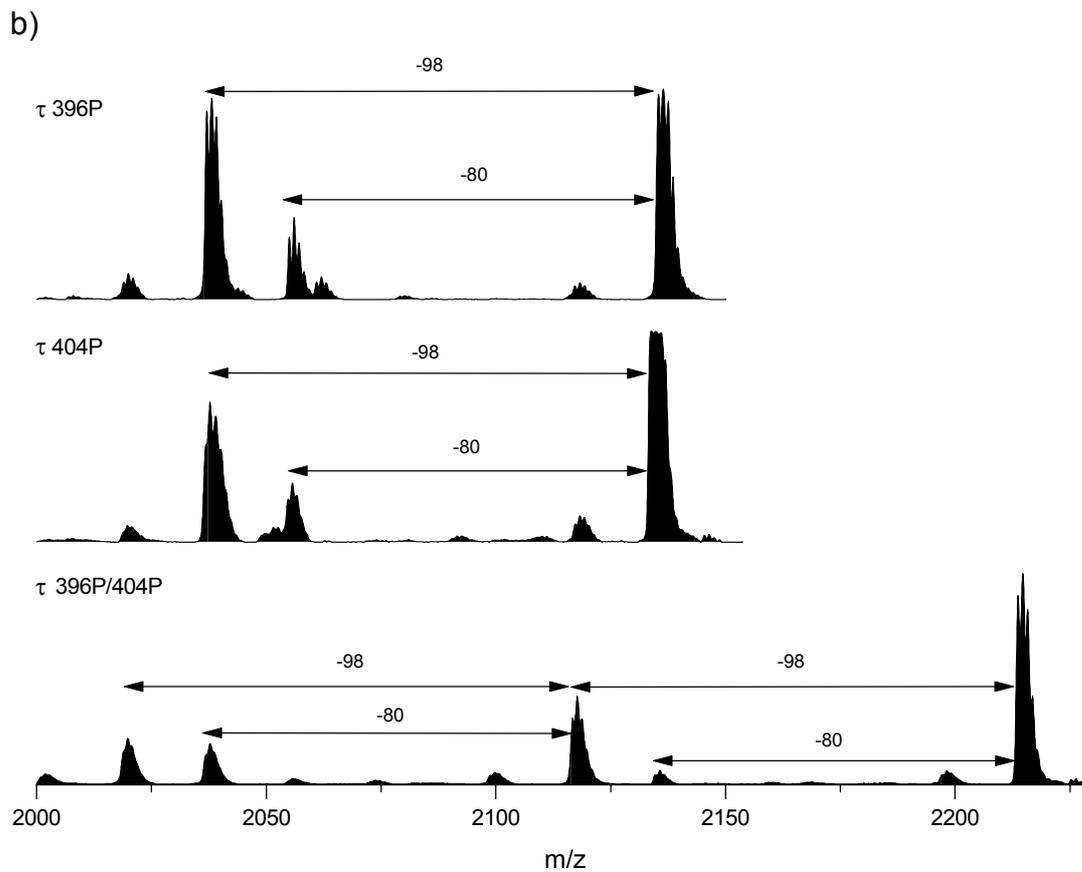


Abb. 3.39: Dephosphorylierungsmuster der Vorläufer-Ionen von a) τ 224-240 und b) τ 390-408.

Der Vergleich der PSD-Spektren (Abb. 3.40) zwischen den phosphorylierten Peptiden der τ 224-240 Serie mit dem unphosphorylierten Peptid zeigt, dass die Phosphorylierung von Serin und Threonin in Nachbarschaft zu Prolin den Bindungsbruch zwischen Ser(P)-Pro bzw. Thr(P)-Pro verstärkt. Das wird besonders deutlich beim Vergleich der beiden Fragment-Ionen b_{11} und b_{12} in den PSD-Spektren des unphosphorylierten mit dem PSD-Spektrum des an Position 235 phosphorylierten Peptids. Die Fragment-Ionen werden in ihrer Signalintensität durch die Phosphorylierung verstärkt. Dominiert werden die PSD-Spektren der phosphorylierten Peptide von den dephosphorylierten Fragment-Ionen b_{8-98} (T231P) bzw. b_{12-98} (S235P), während die Fragment-Ionen $[MH-HPO_3]^+$ (-80 Da) nur mit einer sehr geringen Intensität auftreten. Unterschiede im Fragmentierungsverhalten waren zwischen Phosphoserin und Phosphothreonin nicht festzustellen.

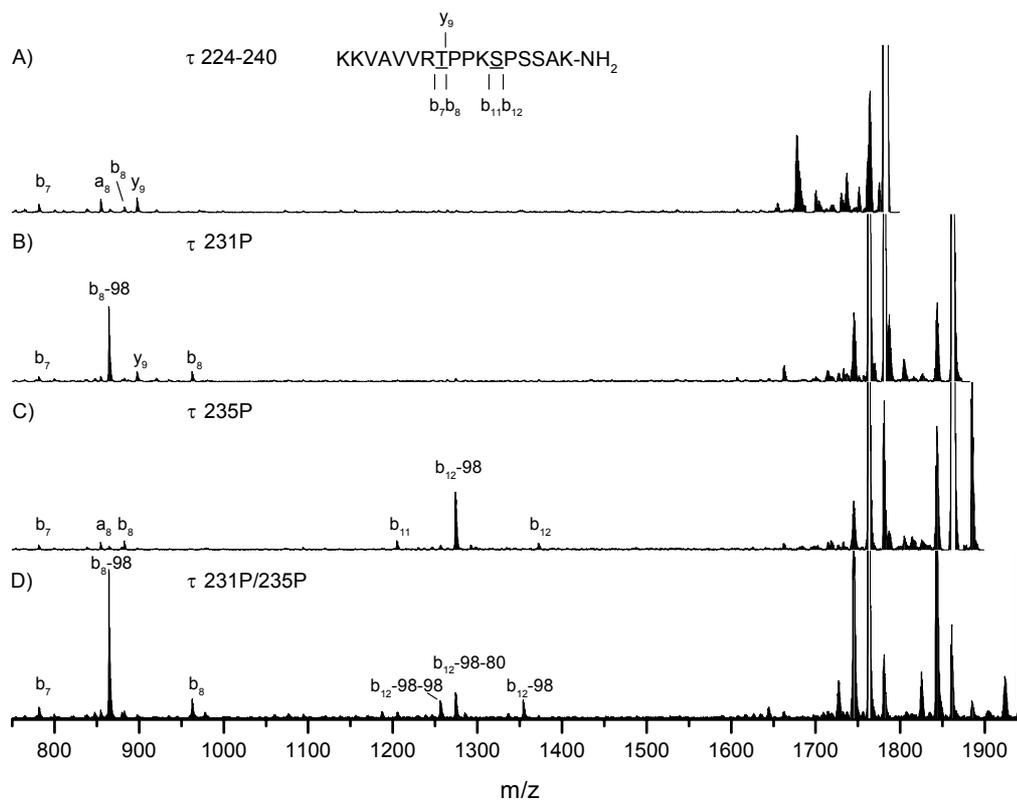


Abb. 3.40: PSD-Spektren des unphosphorylierten τ 224-240 Peptides (A), der korrespondierenden einfach phosphorylierten Peptide Thr231P (B) und Ser235P (C) und des doppelt phosphorylierten Peptides (D).

Das PSD-Spektrum des doppelt phosphorylierten τ 224-240 Peptids ist eine Kombination der einfach phosphorylierten (Abb. 3.40 D). Auch hier wird das Spektrum von den dephosphorylierten Fragment-Ionen b_8-98 und $b_{12}-98$ bzw. $b_{12}-98-80$ und $b_{12}-98-98$ dominiert.

Die Peptide der τ 390-408 Reihe (Abb. 3.41) fragmentieren nach den gleichen Regeln, wie oben für die τ 224-240 Reihe beschrieben, mit der Ausnahme, dass hier die Abspaltung der HPO_3 -Gruppe (-80 Da) deutlich hervortritt.

Alle Fragmente, die Phosphatgruppen enthielten, zeigten das gleiche Dephosphorylierungsmuster wie das Vorläufer-Ion, $b-98$ Da und $b-80$ Da bzw. $y-98$ Da und $y-80$ Da, sowie die entsprechenden Überlagerungsmuster im Falle der mehrfach phosphorylierten Peptide (Abb. 3.41). Somit lassen sich aus dem Dephosphorylierungsmuster der Vorläufer-Ionen und der Fragment-Ionen

Mehrfachphosphorylierungen einschließlich der Phosphorylierungsstelle einfach identifizieren.

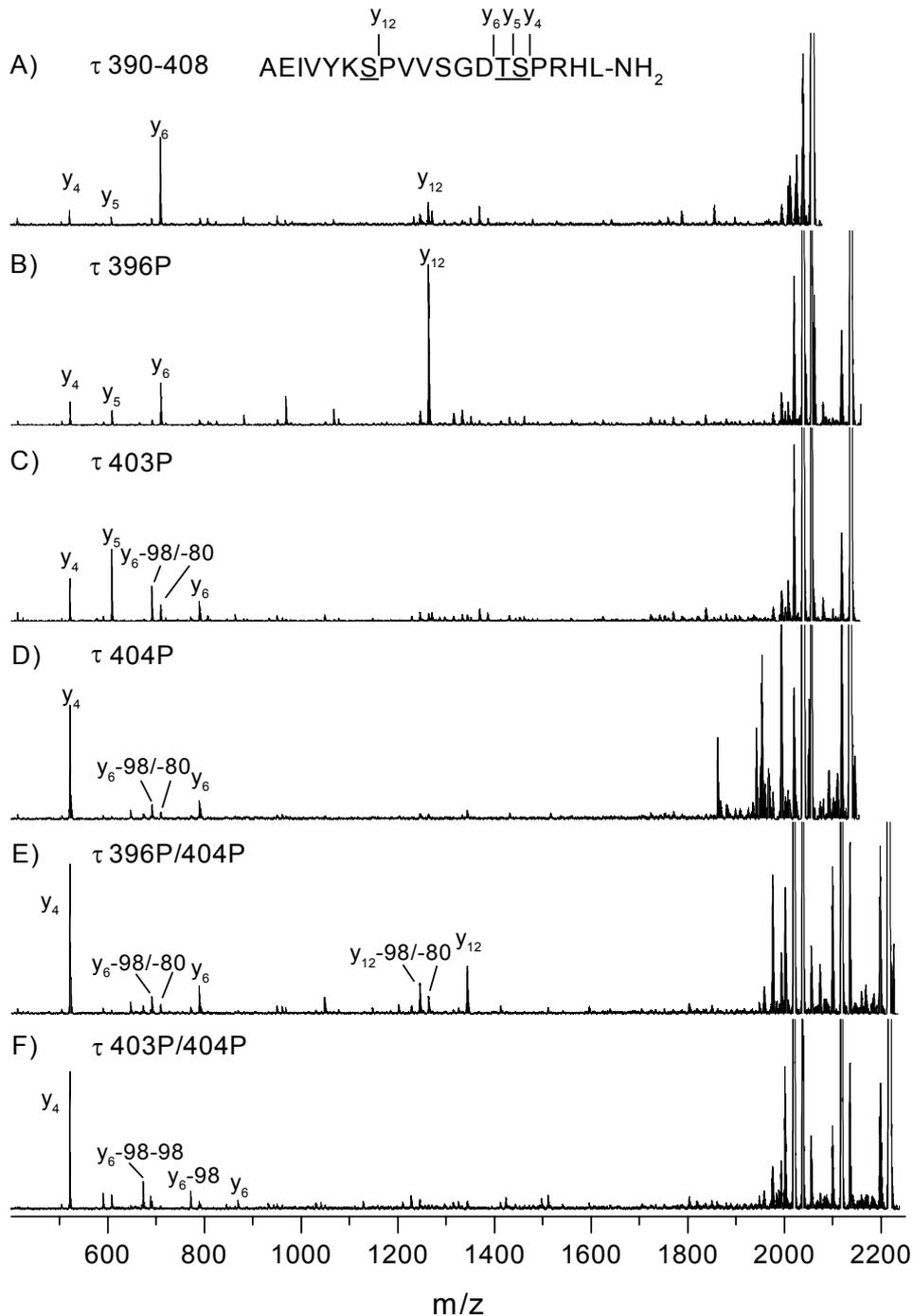


Abb. 3.41: PSD-Spektren des unphosphorylierten τ 390-408 Peptides (A), der korrespondierenden einfach phosphorylierten Peptide Ser396P (B), Thr403P (C), Ser404P (D) und der doppelt phosphorylierten Peptide Ser396P+Thr403P (E), Thr403P+Ser404P (F).

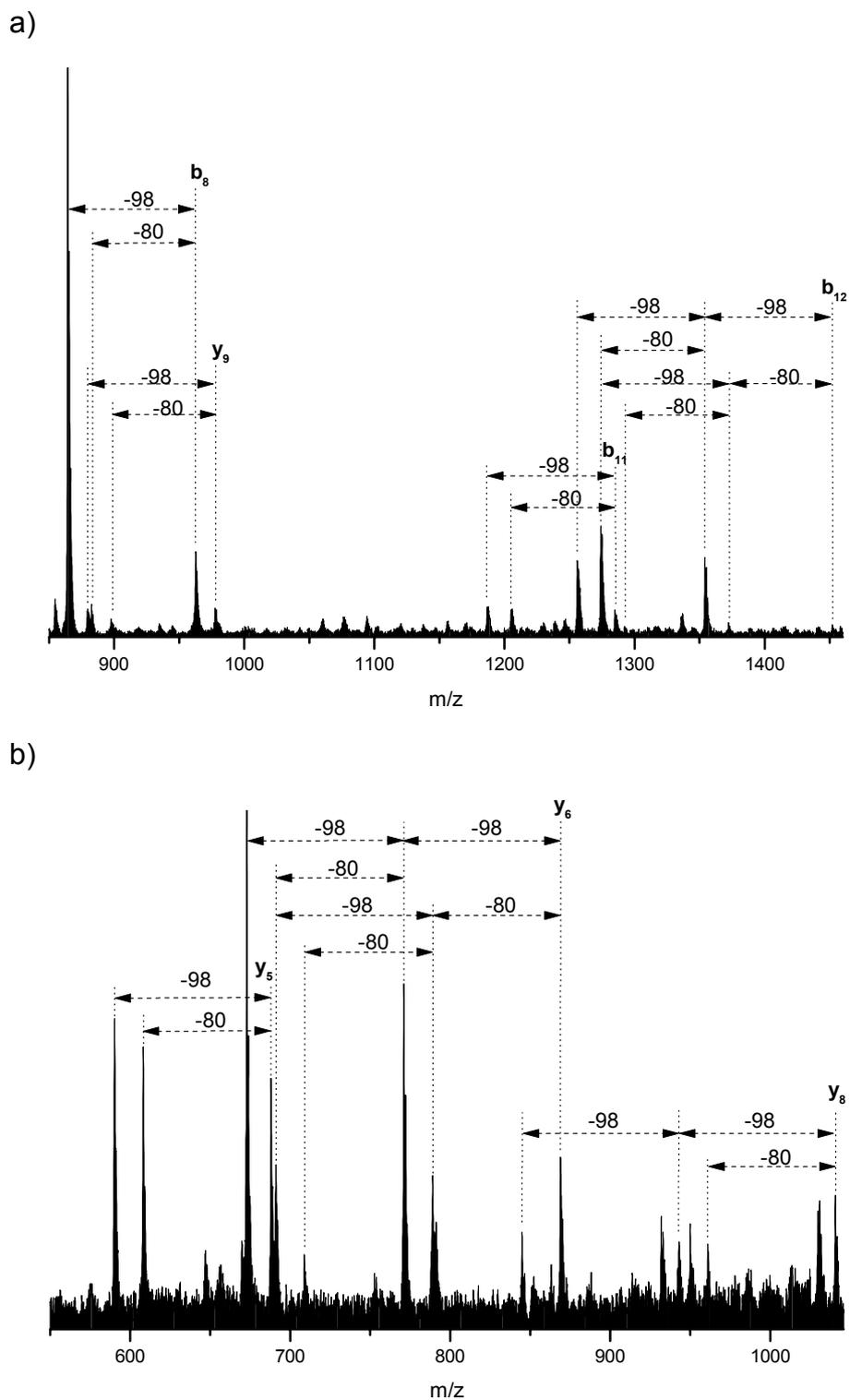


Abb. 3.42: Dephosphorylierungsmuster der Fragment-Ionen von a) τ 224–240 (S231P+T235P) und b) τ 390-408 (T403P+S404P).

Bindungsbrüche unmittelbar neben einer phosphorylierten Aminosäure resultierten in hohen Signalintensitäten für die dephosphorylierten Fragment-Ionen. Sie sind deutlich höher als die zugehörigen phosphorylierten b- bzw. y-Fragmente. Für alle anderen phosphorylierten Fragment-Ionen der b- und y-Serie wiesen die dephosphorylierten Fragmente gleiche oder etwas geringere Signalintensitäten auf, als die dazugehörigen phosphorylierten Fragmente.

Durch die zusätzlichen dephosphorylierten Fragment-Ionen werden die PSD-Spektren komplexer als die unphosphorylierter Peptide. Die Interpretation der Spektren ist aber in demselben Masse möglich wie im Falle der unphosphorylierten Spektren. Die Eindeutigkeit der Zuordnung von Ionensignalen zu Fragment-Strukturen wird durch die Phosphorylierung nicht beeinträchtigt. Das Dephosphorylierungsmuster der Vorläufer-Ionen gibt eindeutige Hinweise auf die Modifizierung und die Anzahl der Phosphatgruppen. Die verstärkten Bindungsbrüche aufgrund der Phosphorylierung und die Abspaltung der Phosphatgruppe bei den Fragment-Ionen ermöglichen eine direkte und eindeutige Identifizierung der Phosphorylierungsstelle.

3.4.3.2 Dephosphorylierung von Phosphotyrosin

Obwohl Phosphotyrosin erheblich wichtiger als Phosphoserin und -threonin für viele Regulierungsfunktionen in der Zelle ist, befassen sich nur wenige massenspektrometrischen Untersuchungen mit Phosphotyrosin [105][106][107][138].

Zur Untersuchung der Dephosphorylierung von Phosphotyrosin wurden die zwei Derivate 231Y und 235Y des τ 224-240 Peptids, jeweils in phosphorylierter und unphosphorylierter Form synthetisiert (Tabelle 3.7). Der Austausch von Threonin 231 und Serin 235 gegen Tyrosin beeinflusst schon selbst das Fragmentierungsverhalten der Peptide. Das bei den beiden aliphatischen Aminosäuren beobachtete intensive Signal des y_9 -Fragmentes wird bei den beiden Tyrosin-Derivaten nicht beobachtet (Abb. 3.43).

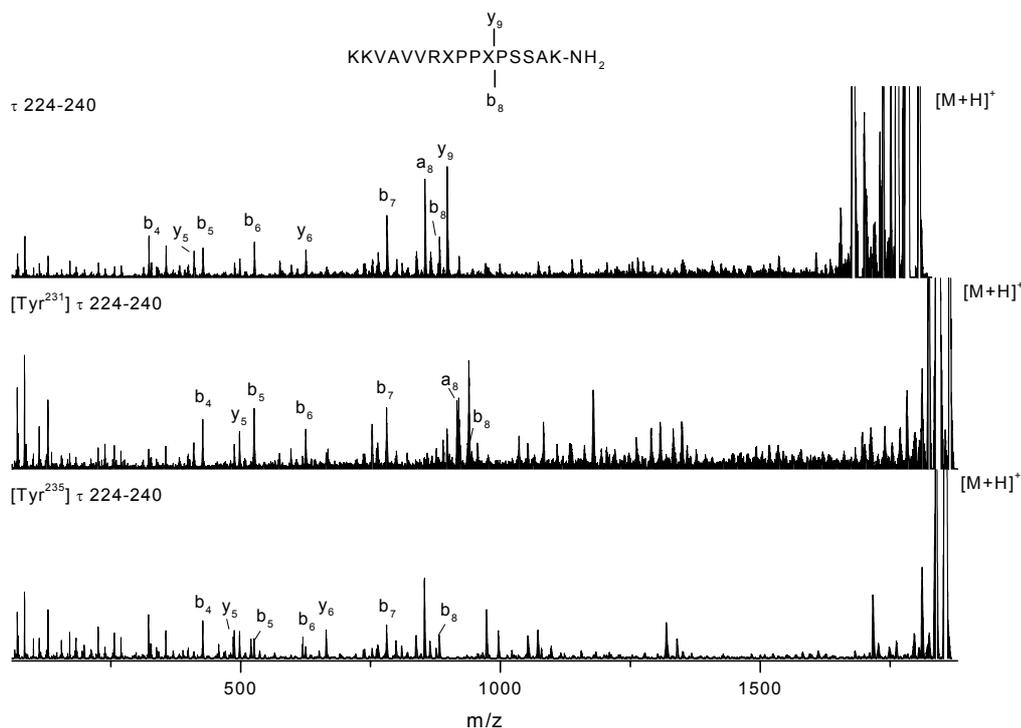


Abb. 3.43: PSD-Spektren des Peptides τ 224-240 und seiner beiden Tyrosin-Derivate 231Y (Mitte) und 235Y (unten).

Der Vergleich der beiden unphosphorylierten Peptide mit den jeweiligen phosphorylierten Peptiden ist in den Abbildungen Abb. 3.44 und Abb. 3.45 gezeigt. Im Gegensatz zu Phosphoserin und Phosphothreonin (Abb. 3.40, Abb. 3.41) hat die Phosphorylierung von Tyrosin keinen großen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten. Gegenüber dem PSD-Spektrum des unphosphorylierten Peptides enthält das Spektrum des phosphorylierten Peptides zusätzlich ein $[M+H-80]^+$ Signal, das dem Neutralverlust von HPO_3 entspricht. Die Abspaltung von HPO_3 ist wesentlich stärker als bei den beiden aliphatischen Phosphoaminosäuren. Die Fragment-Ionen der y- und b-Serie werden durch die Phosphatgruppe nicht beeinflusst. Im Gegensatz zu Phosphoserin und Phosphothreonin kommt es durch die Phosphorylierung von Tyrosin nicht zu einer Verstärkung von Bindungsbrüchen. Das PSD-Spektrum wird nicht von Signalen der dephosphorylierten b- bzw. y-Fragment-Ionen dominiert, wie es bei Phosphoserin und -threonin zu beobachten ist (Abb. 3.38). Die dephosphorylierten Fragment-Ionen beider Serien haben eine geringere Intensität als die phosphorylierten. Auch die terminal phosphorylierten Fragment-Ionen zeigen keine erhöhten Intensitäten, wie es bei den aliphatischen Aminosäuren beobachtet wird (siehe Kapitel 3.4.3.1.1, Abb. 3.40). Trotz der relativ geringen Intensität sind diese Fragmente sehr hilfreich zur

Identifizierung der Phosphorylierungsstellen im Peptid. Phosphotyrosin lässt sich zusätzlich über sein spezifisches Immonium-Ion bei 216 Da identifizieren, was weder bei Phosphoserin noch bei Phosphothreonin deutlich beobachtet wird.

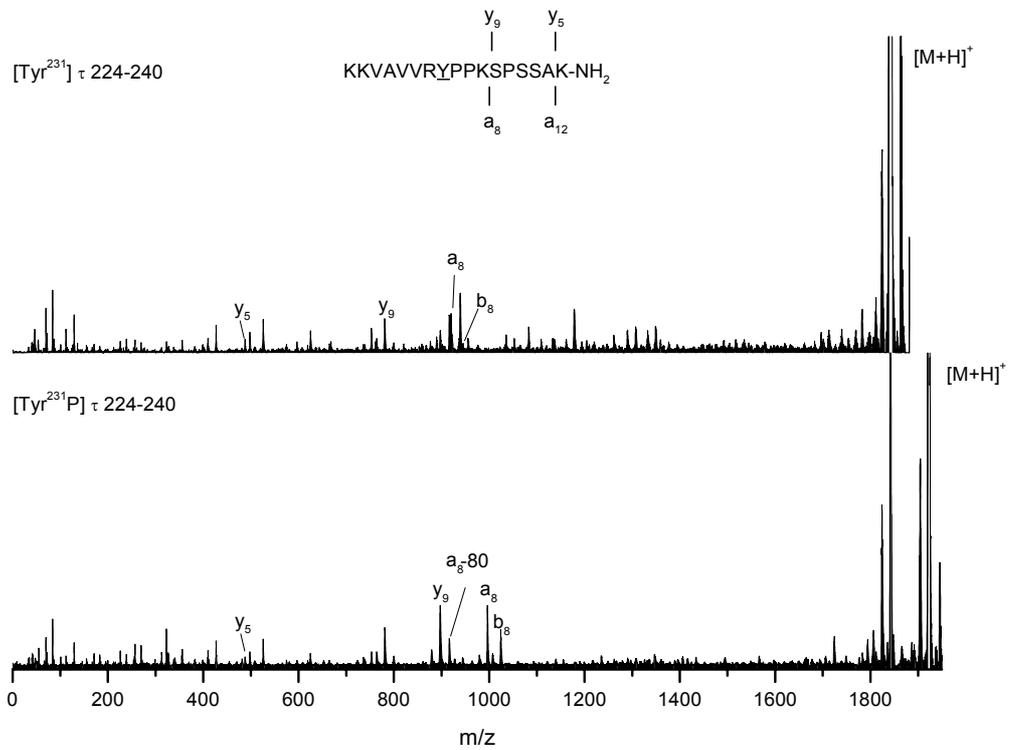


Abb. 3.44: PSD-Spektrum des $[\text{Tyr}^{231}] \tau 224-240$ Peptids, unphosphoryliert (oben), phosphoryliert (unten).

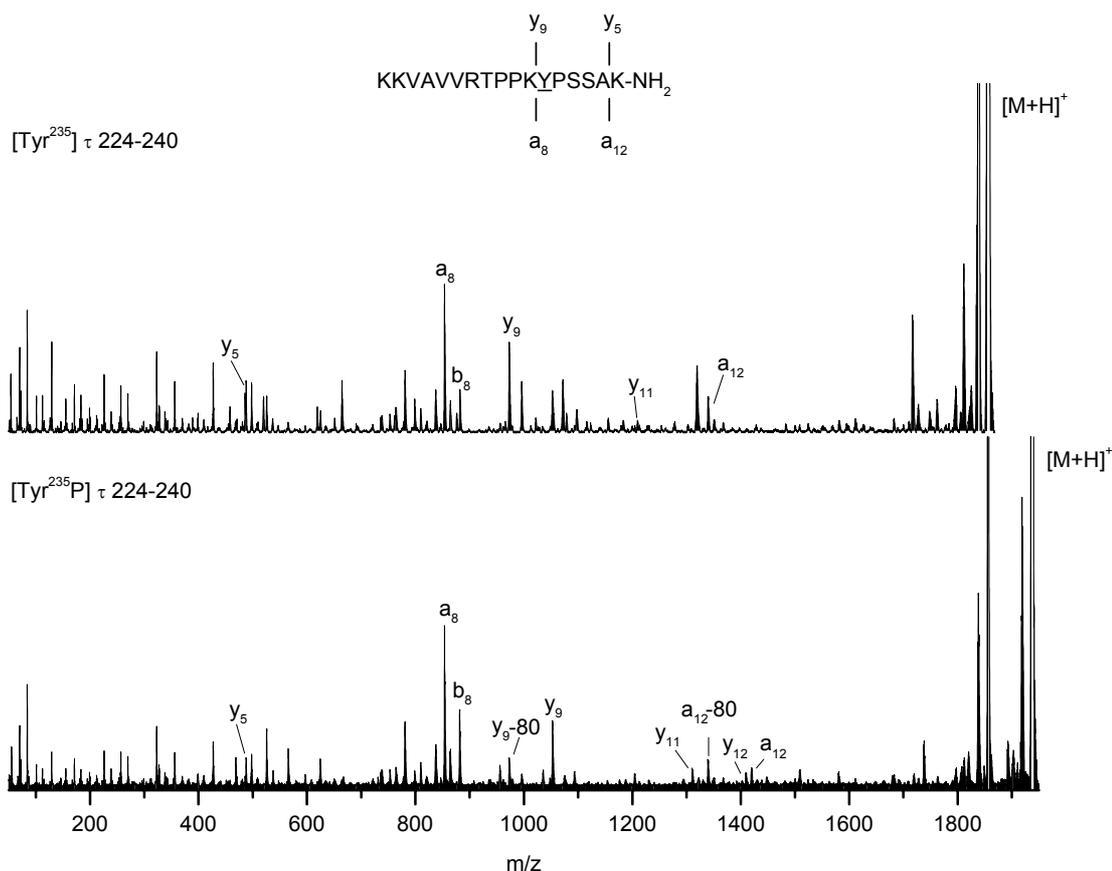


Abb. 3.45: PSD-Spektrum des $[\text{Tyr}^{235}] \tau$ 224-240 Peptids, unphosphoryliert (oben), phosphoryliert (unten).

Das Dephosphorylierungsmuster der Vorläufer-Ionen (Abb. 3.46) zeigt ein starkes Signal für die Abspaltung von 80 Da und ein weniger intensives für die Abspaltung von 98 Da. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Annan *et al.* [105] und Schnölzer *et al.* [109].

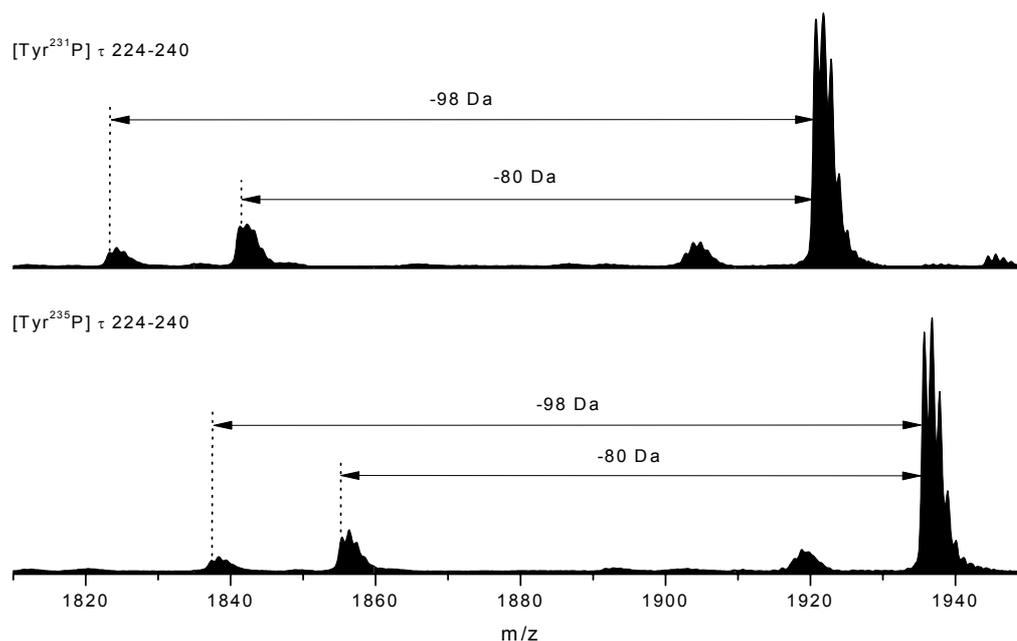


Abb. 3.46: Dephosphorylierungsmuster der Vorläufer-Ionen der τ 224-240 Derivate [Tyr231P] und [Tyr235P].

3.4.3.3 Vergleich von Phospho-Serin, -Threonin und -Tyrosin

Phosphoserin und -threonin unterscheiden sich nicht in ihrem Dephosphorylierungsverhalten. Bei beiden aliphatischen Aminosäuren erfolgt die Phosphorsäureabspaltung (-98 Da) durch β -Eliminierung. Auch bei Phosphotyrosin wird eine Abspaltung von -98 Da (Abb. 3.46, Abb. 3.47) beobachtet. Für die aromatische Aminosäure Tyrosin würde eine β -Eliminierung bedeuten, dass ein Proton aus dem aromatischen Ring übertragen werden muss. Untersuchungen von Tholey *et al.* [138] zum Arin-Mechanismus der Dephosphorylierung deuten daraufhin, dass dieser Mechanismus für Tyrosin nicht existiert. Die Abspaltung von 98 Da scheint vielmehr ein Zweistufenprozess zu sein, bei dem im ersten Schritt HPO_3 abgespalten wird, und es in einem zweiten Schritt zu einer Wasserabspaltung irgendwo im Peptid kommt.

Das unterschiedliche Dephosphorylierungs- und Fragmentierungsverhalten der aliphatischen Aminosäuren Serin und Threonin und der aromatischen Aminosäure Tyrosin war Gegenstand der folgenden Untersuchung.

Für die Untersuchung wurden zusätzlich zu den beiden Tyrosin-Derivaten des τ 224-240 Peptides (231Y und 235Y) eine Standardsequenz der Tyrosin Kinase pp60^{c-src} (Rous Sarcoma virus encoded transforming protein) ausgewählt. Für die RR-SC

Sequenz wurde Tyrosin gegen Serin und Threonin ausgetauscht. Von allen Derivaten wurden jeweils die unphosphorylierten und phosphorylierten Peptide synthetisiert. (Tabelle 3.7). Durch den einfachen Austausch der Aminosäuren Serin und Threonin gegen Tyrosin in der τ Sequenz 224-240 und Tyrosin gegen Serin und Threonin in der pp60^{c-src} Sequenz ist es möglich, die Fragmentierungscharakteristika von aliphatischen und aromatischen Phosphoaminosäuren zu vergleichen. Um auszuschliessen, dass der Massenverlust von 18 Da auf die Abspaltung von H₂O aus der Carboxy-Gruppe des C-Terminus zurück zuführen ist, wurden alle Peptide als Amid synthetisiert.

Für beide Peptidfamilien wurden wiederum die PSD-Spektren der unphosphorylierten und phosphorylierten Peptide verglichen: zum einen um Phosphat-spezifische Fragmente zu identifizieren, und zum anderen um Phosphoaminosäurespezifische Fragmente und Fragmentierungsregeln zu identifizieren.

Tabelle 3.7: Synthetische Peptide und Phosphopeptide zur Untersuchung des Dephosphorylierungsverhaltens von Phosphotyrosin.

Peptid	Sequenz*	berechnete monoisotopische Masse [M+H] ⁺ [u]		gemessene monoisotopische Masse [M+H] ⁺ [u]	
		unphosphoryliert	phosphoryliert	unphosphoryliert	phosphoryliert
[Tyr ²³¹] τ 224-240	K K V A V V R <u>Y</u> P P K S P S S A K-NH ₂	1841,11	1921,11	1840,8	1921,1
[Tyr ²³⁵] τ 224-240	K K V A V V R T P P K <u>Y</u> P S S A K-NH ₂	1855,13	1935,13	1855,0	1935,0
RR-SRC	R R L I E D A E <u>Y</u> A A R G-NH ₂	1518,81	1598,81	1518,7	1598,7
[Ser ⁹] RR-SRC	R R L I E D A E <u>S</u> A A R G-NH ₂	1442,78	1522,78	1442,8	1522,8
[Thr ⁹] RR-SRC	R R L I E D A E <u>T</u> A A R G-NH ₂	1456,80	1536,80	1456,8	1536,8
[d ₄ -Tyr ⁹] RR-SRC	R R L I E D A E <u>Y(d₄)</u> A A R G-NH ₂	1522,80	1602,80	1522,9	1602,4
[Gly ⁵] RR-SRC	R R L I G D A E <u>Y</u> A A R G-NH ₂	1447,78	1527,78	1447,78	1527,78
[Gly ⁶] RR-SRC	R R L I E G A E <u>Y</u> A A R G-NH ₂	1460,80	1540,80	1460,81	1540,78
[Gly ⁸] RR-SRC	R R L I E D A G <u>Y</u> A A R G-NH ₂	1447,78	1527,78	1447,80	1527,79

*S, T, Y markiert die phosphorylierten Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin.

Das Dephosphorylierungsmuster der Vorläufer-Ionen der RR-SRC Peptide zeigt ein starkes $[M+H-98]^+$ und ein deutlich schwächeres $[M+H-80]^+$ Signal. Das Muster ist für alle drei Phosphoaminosäuren sehr ähnlich. Auch das Tyrosin-Derivat zeigt ein starkes $[M+H-98]^+$ -Signal, was im Gegensatz zu den Beobachtungen in der Literatur [105][109] und den Beobachtungen bei den Tyrosin-Derivaten des τ 224-240 Peptides (Abb. 3.46) stehen. Obwohl die Muster der drei Phosphoaminosäuren ähnlich sind, muss ihnen nicht derselbe Mechanismus zugrunde liegen. Wie schon ausgeführt (siehe Kapitel 3.4.3.3), wird für die Abspaltung von 98 Da bei Phosphotyrosin ein Zweistufenprozess postuliert. Da die RR-SRC Peptide außer der Phosphorylierungsstelle keine weiteren Hydroxy-Aminosäuren enthalten, könnte eine Wasserabspaltung nur aus den beiden Glutaminsäuren und der Asparaginsäure erfolgen. Die Wasserabspaltung aus einer Carboxy-Seitenkette dieser Aminosäuren wurde aber noch nie in PSD-Spektren beobachtet. Auch wird weder beim Vorläufer-Ion des unphosphorylierten RR-SRC Peptides noch bei den Fragment-Ionen der b- und y-Serie eine nennenswerte Wasserabspaltung beobachtet. Aufgrund des Dephosphorylierungsmusters der Vorläufer-Ionen der RR-SRC Sequenz ist es nicht möglich zwischen aliphatischen und aromatischen Phosphoaminosäuren zu unterscheiden, wie in der Literatur beschrieben [105][109]. Danach zeigt Phosphotyrosin keine Abspaltung bzw. nur eine sehr geringe Abspaltung von 98 Da. Dieser Regel entspricht von den beiden hier untersuchten Sequenzen nur das τ Peptid (Abb. 3.39). Daher muss die Regel soweit eingeschränkt werden, dass nur das Fehlen des $[M+H-98]^+$ -Fragments auf ein Phosphotyrosin hindeutet, aber das Vorhandensein eines dominanten $[M+H-98]^+$ -Signals, Phosphotyrosin nicht ausschließt.

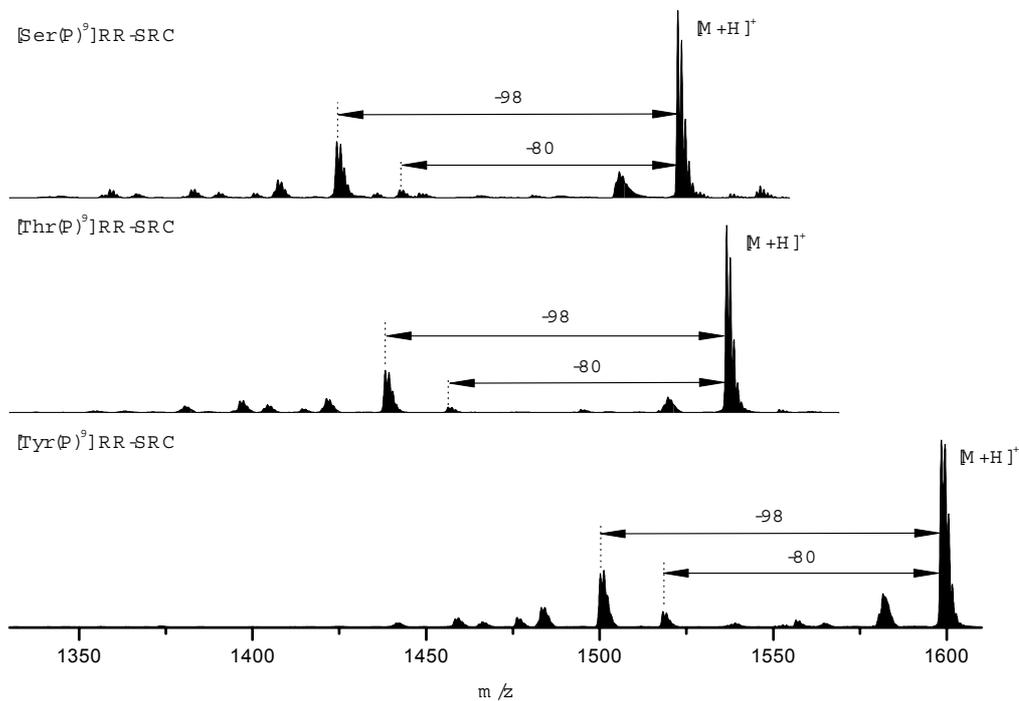


Abb. 3.47: Dephosphorylierungsmuster der Vorläufer-Ionen der RR-SRC Peptide.

Die Dephosphorylierung der Fragment-Ionen der RR-SRC Peptide entspricht im Falle von Phosphoserin und Phosphothreonin den Regeln, die bei den τ -Peptiden beobachtet wurden (siehe Kapitel 3.4.3.1.1) [106]. Die y -98 Da bzw. b -98 Da Fragmente in direkter Nachbarschaft zur Phosphorylierungsstelle sind intensiver als ihre korrespondierenden phosphorylierten y - und b -Fragmente. Intern phosphorylierte bzw. dephosphorylierte Fragmente zeigen Signale gleicher Intensität. Im Gegensatz dazu ist die Signalintensität der dephosphorylierten Fragmente bei Phosphotyrosin unabhängig von der Position der Phosphorylierungsstelle in der Fragment-Sequenz.

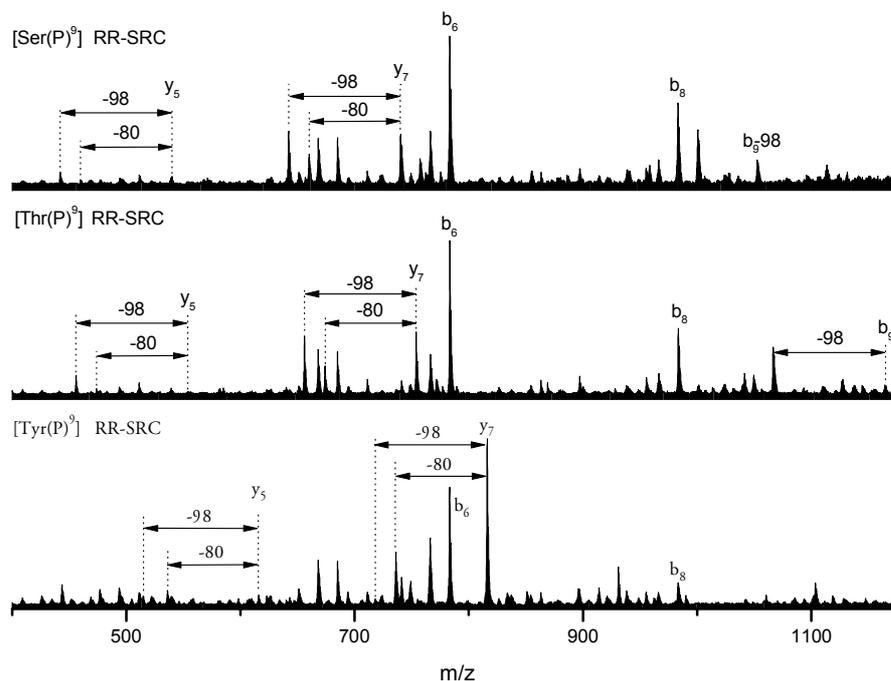


Abb. 3.48: Dephosphorylierungsmuster der Fragment-Ionen der RR-SRC Peptide.

3.4.3.4 Möglicher Dephosphorylierungsmechanismus von Phosphotyrosin

Zur Klärung des Dephosphorylierungsmechanismus wurde das [d₄-Tyr⁹] RR-SRC Derivat synthetisiert (Tabelle 3.7), bei dem alle Wasserstoffatome des aromatischen Tyrosinrings durch Deuterium ersetzt sind.

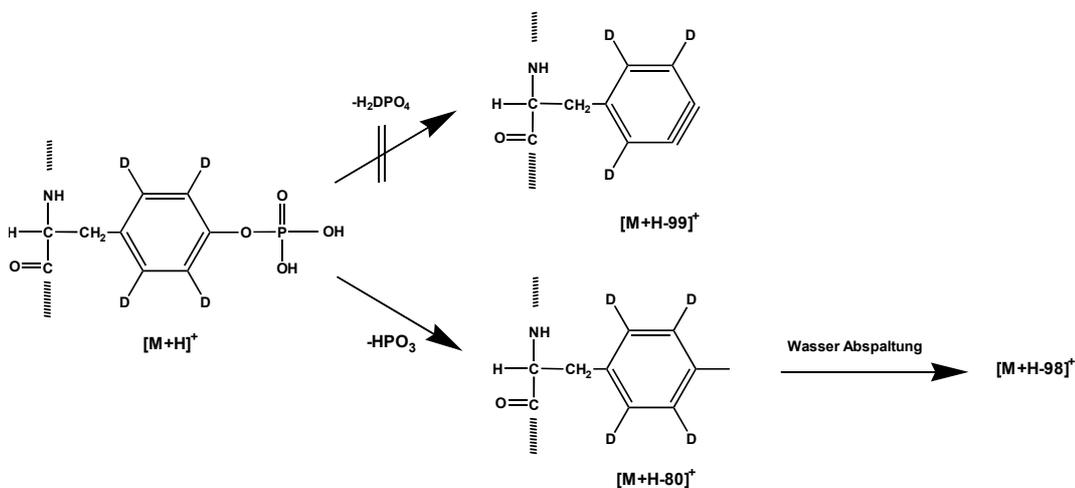


Abb. 3.49: Mögliche Dephosphorylierungsmechanismen von Phosphotyrosin.

Wenn Phosphotyrosinreste in Peptiden Phosphorsäure abspalten, sollte beim $[d_4\text{-Tyr}^9]$ RR-SRC Peptid eine Abspaltung von -99 Da beobachtet werden, entsprechend einer β -Eliminierung von HDPO_4 (Abb. 3.49). Die Deuterierung selbst hat keinen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten der Peptide wie der Vergleich der PSD-Spektren des deuterierten $[d_4\text{Tyr}^9]$ -RR-SRC und undeuterierten $[\text{Tyr}^9]$ -RR-SRC Abb. 3.50 zeigt.

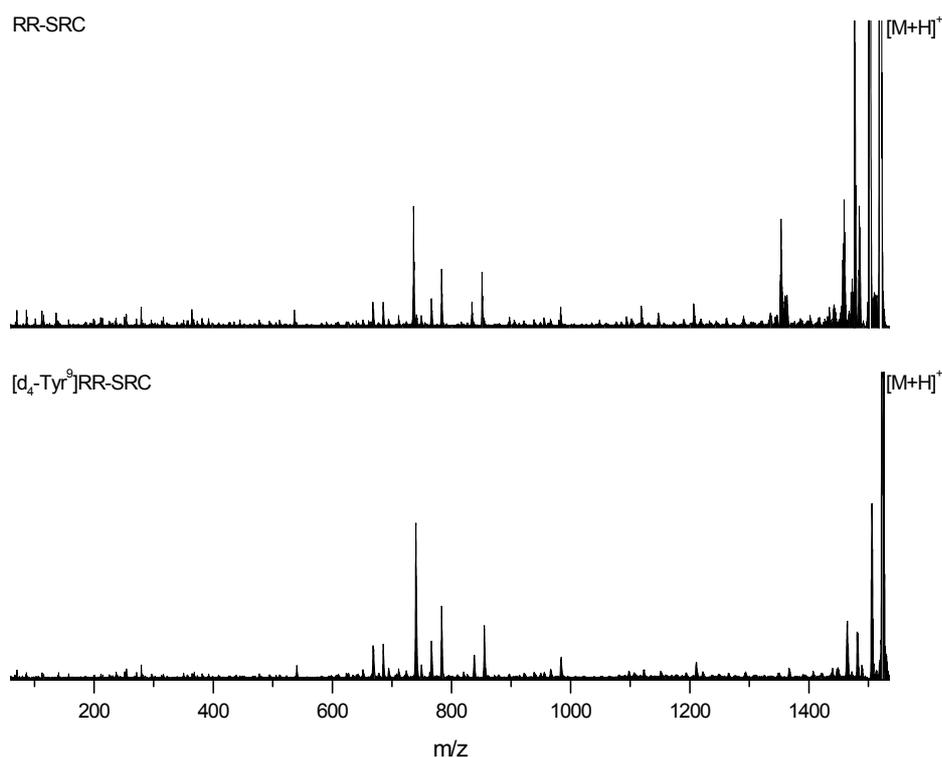


Abb. 3.50: Vergleich der PSD-Spektren des undeuterierten RR-SRC Peptids und des $[d_4\text{Tyr}^9]$ RR-SRC Peptids.

Die Deuterierung des Aromaten führt zu einer Massenverschiebung von 4 Da. Wie in Abb. 3.51 dargestellt, zeigen beide phosphorylierten RR-SRC Peptide, undeutertes und deutertes, identische Dephosphorylierungsmuster mit gleicher Intensitätsverteilung der $[M+H-80]^+$ und $[M+H-98]^+$ Fragmente.

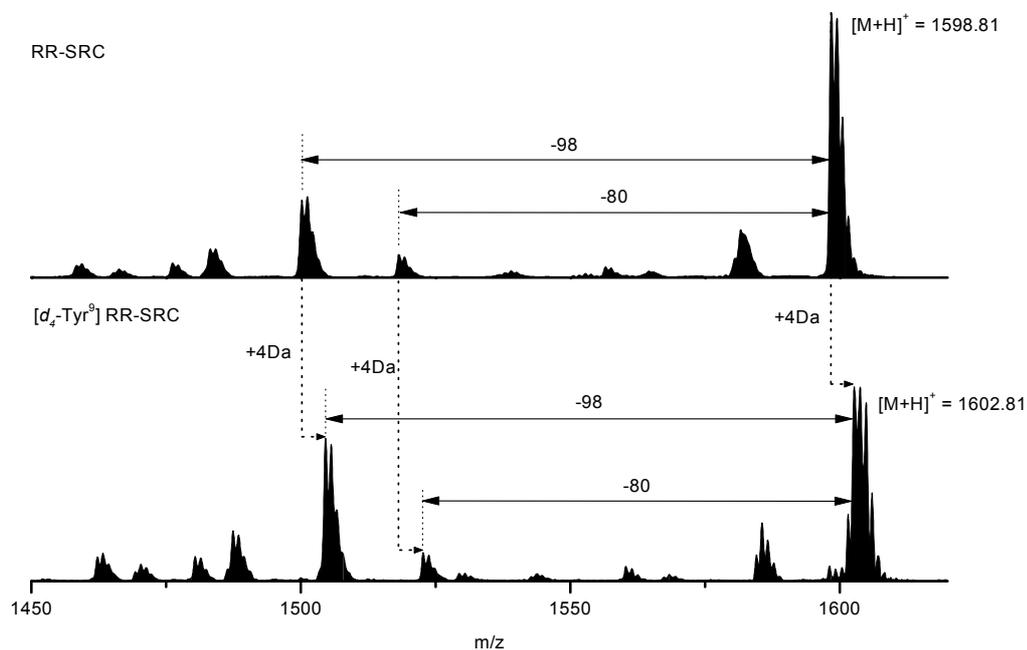


Abb. 3.51: Dephosphorylierungsmuster der Vorläufer-Ionen des phosphorylierten RR-SRC und sein korrespondierendes deuteriertes $[d_4\text{-Tyr}^9]$ RR-SRC Peptid.

Auch zeigte keines der b- bzw. y-Fragmente eine Abspaltung von 99 Da oder 19 Da, entsprechend H_2DPO_4 oder HDO (Abb. 3.52). Beide Peptide, das deuterierte und undeuterierte, zeigten das gleiche Fragmentierungsverhalten. Y-Fragmente, die Phosphotyrosin enthalten, zeigen Abspaltungen von 80 Da entsprechend HPO_3 .

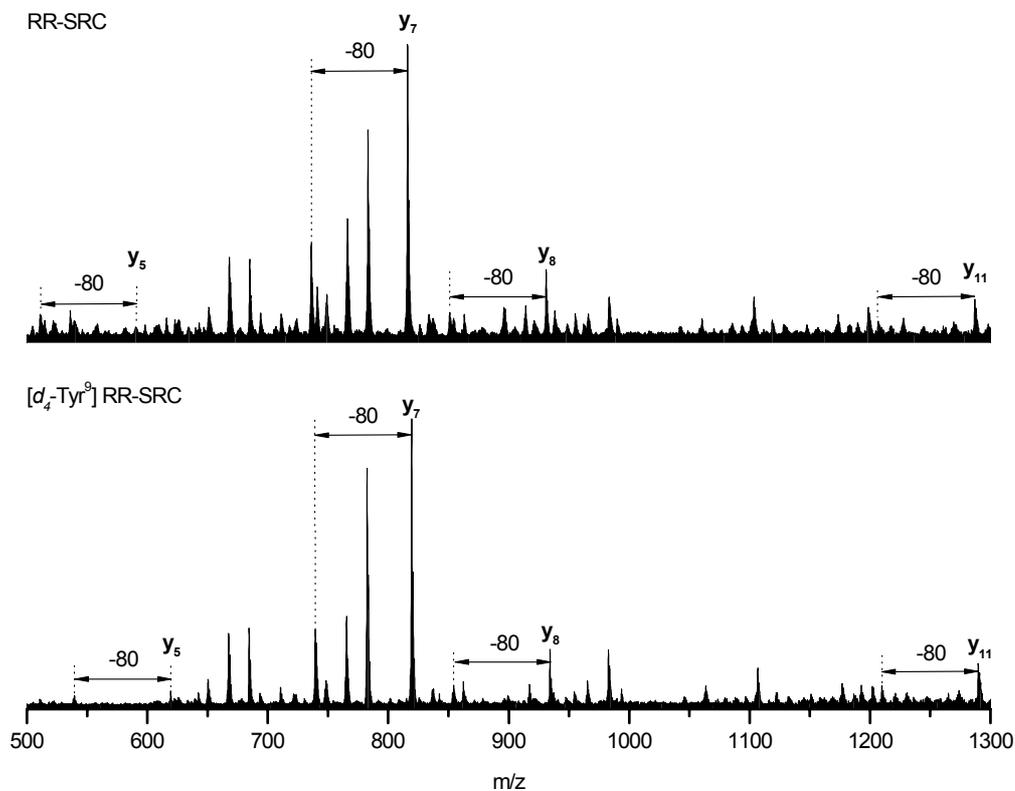


Abb. 3.52: Dephosphorylierungsmuster der Fragment-Ionen des RR-SRC und sein korrespondierendes deuteriertes [d₄-Tyr⁹] RR-SRC Peptid.

Aus den gezeigten Ergebnissen ergibt sich eindeutig, dass die Abspaltung von 98 Da nicht auf eine β -Eliminierung von Phosphorsäure zurückgeführt werden kann. Obwohl die Dephosphorylierungsmuster der aliphatischen und aromatischen Phosphoamino-säuren nahezu identisch sind, müssen ihnen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Für einen Zweistufenprozess, Neutralverlust von HPO_3 mit anschließender H_2O -Abspaltung von benachbarten Seitenketten, gibt es keinen Hinweis. Vor allem, da durch die Synthese aller Peptide als Amide eine Abspaltung von H_2O aus der C-terminalen Carboxy-Gruppe unterbunden wurde. Und auch eine Abspaltung von H_2O in dem Masse ist aus den funktionellen Seitengruppen der Glutamin- und der Asparaginsäure bei der PSD-MALDI bis dato nicht beobachtet worden. Aufgrund der hohen internen Energie eines protonierten Peptides in der Gasphase beim MALDI-Prozess wäre eine Übertragung der Phosphatgruppe vom Tyrosinrest zu einer anderen funktionellen Gruppe denkbar. Z.B. im Falle des RR-SRC Peptides auf die Carboxyl-Gruppe der Asparagin- und Glutaminsäure. Solch ein Produkt ist als Zwischenstufe bei den Kinasen bekannt.

Dieser Übertragungsmechanismus soll durch Austausch der Aminosäuren Glu⁵, Glu⁶ und Asp⁸ in der RR-SRC Sequenz gegen Glycin (siehe Tabelle 3.7) untersucht werden [107].

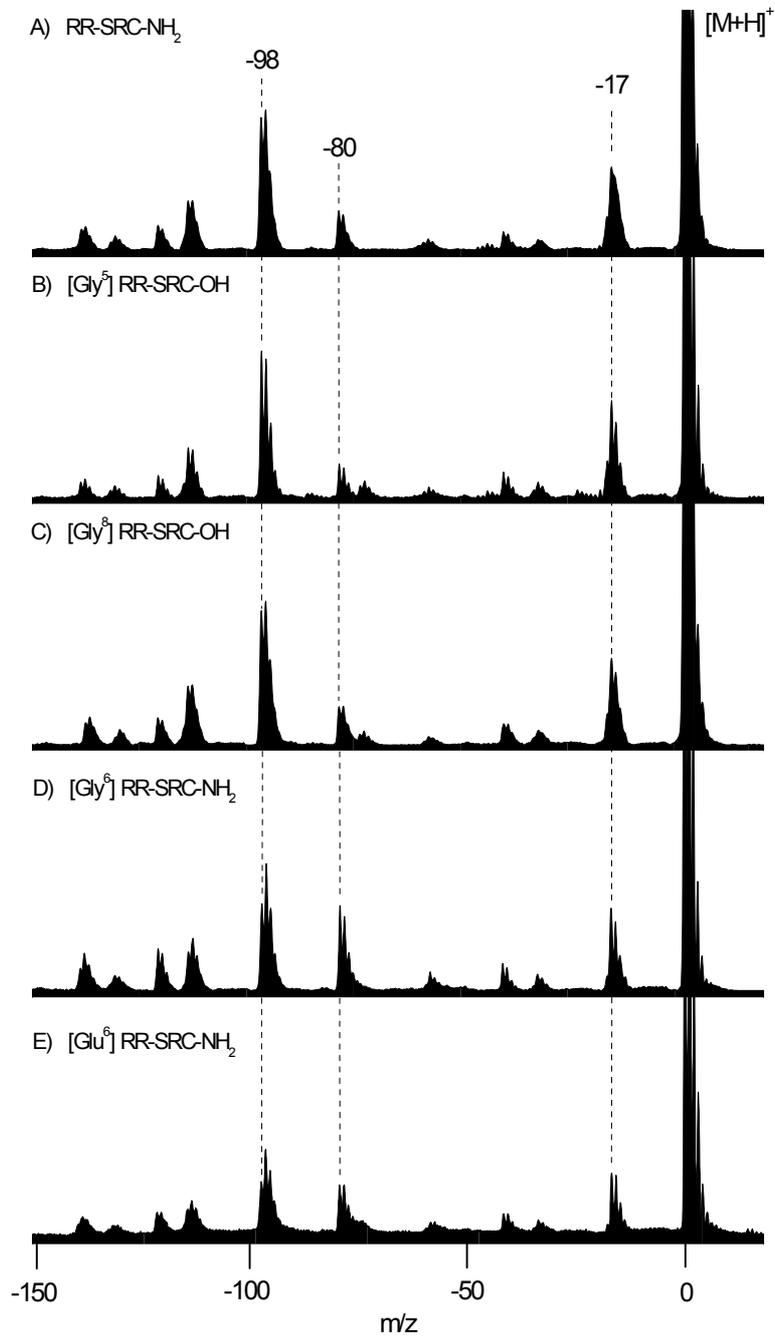


Abb. 3.53: Dephosphorylierungsmuster der Mutter-Ionen des RR-SRC Peptid und seiner korrespondierenden [Gly5], [Gly6] und [Gly8]-RR SRC Peptide.

Die Substitution in Position fünf und acht hat keinen Einfluss auf die Intensität des $[M+H-HPO_3]^+$ - und des $[M+H-H_3PO_4]^+$ -Signals im PSD-Spektrum (Abb. 3.53 C,E). Keine der beiden Aminosäuren scheint einen Einfluss auf die Phosphorsäure Abspaltung zu haben. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass beide Aminosäuren auf irgendeine Art die Abspaltung der Phosphatgruppe induzieren. Der Austausch von Asparaginsäure in Position sechs hingegen verändert das Dephosphorylierungsmuster viel stärker (Abb. 3.53 D). Relativ zu dem Dephosphorylierungsmuster des RR-SRC-NH₂ Peptids reduziert sich durch die Substitution der Aminosäure hier das $[M+H-H_3PO_4]^+$ -Signal auf ca. 50 %. Das Verhältnis des $[M+H-H_3PO_4]^+$ -Signal zum $[M+H-HPO_3]^+$ -Signal verändert sich von eins zu drei zu eins. Das zeigt klar, dass auch die von der Phosphorylierungsstelle drei Aminosäurereste entfernte Asparaginsäure bei der Abspaltung der Phosphatgruppe involviert ist. Untersuchungen mit ESI Ion Trap MS³ bestätigen diesen Nachbargruppen Effekt. Die Asparaginsäure in Position sechs und die Glutaminsäure in Position acht induzieren eindeutig die Abspaltung der Phosphorsäure [108]. Ein Übertragungsmechanismus der Phosphatgruppe auf die funktionelle Seitengruppe einer benachbarten Aminosäure, wie er von Kinasen bekannt ist, kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Phosphotyrosin unterscheidet sich in seinem Fragmentierungsverhalten von den aliphatischen Phosphoaminosäuren Serin und Threonin. Dies wird besonders deutlich bei den untersuchten τ -Peptiden. Phosphoserin und -threonin induzieren einen verstärkten Bindungsbruch zwischen Serin bzw. Threonin und Prolin. Auch werden die Spektren von dephosphorylierten Fragment-Ionen dominiert, die direkt benachbart zur Phosphorylierungsstelle sind. Die induzierte verstärkte Fragmentierung bei Phosphoserin und Phosphothreonin kann bei der Sequenzierung unbekannter Peptide eindeutig als Hinweis auf eine Phosphorylierung verwendet werden. Phosphotyrosin zeigt dieses Verhalten nicht.

Grundsätzlich ist eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Phosphoaminosäuren alleine aufgrund des Dephosphorylierungsmusters der Vorläufer-Ionen, wie es in der Literatur beschrieben wird, nicht möglich. Bei dem Phosphotyrosinderivat der RR-SRC Sequenz wurde entgegen den Beobachtungen in der Literatur ein sehr intensives $[M+H-98]^+$ Signal beobachtet. Eine Unterscheidung ist nur durch Aufnahme des gesamten PSD-Spektrums möglich.

Charakteristika und Fragmentierungsverhalten von Phosphopeptiden konnten durch den Vergleich der PSD-Spektren von unphosphorylierten und phosphorylierten Peptide aufgeklärt werden. Dadurch ist die Analyse von Phosphopeptiden auch aus komplexen Systemen zugänglich. Solche Mischungen sind insbesondere bei Enzym gesteuerten

Verdaus von Proteinen zu erwarten. Phosphoproteine sind involviert in eine Reihe von zellulären Regulierungsmechanismen. Etwa ein Drittel aller Proteine in einer Zelle sind phosphoryliert. Die Phosphorylierung selber ist ein reversibler, dynamischer Prozess. Was dazu führt, dass das Ausmass der Phosphorylierung eines Proteins zu einer bestimmten Zeit nicht klar definiert ist. Es hängt von der relativen Aktivität der Proteinkinasen und Phosphatasen ab. Das untersuchte τ -Protein hat 25 mögliche Phosphorylierungsstellen, von denen bei Alzheimer Patienten mehr als 20 Stellen, in gesunden Gehirnen aber nur acht bis zehn dieser Stellen phosphoryliert sind.

Für die Analytik von Proteinen bedeutet dies, dass jedes zelluläre Protein potentiell phosphoryliert sein kann. Die Charakterisierung des Fragmentierungsverhalten von Phosphopeptiden stellt somit einen wertvollen Beitrag zur Proteinanalytik dar.

4 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION DER ERZIELTEN ERGEBNISSE

Es wurde eine universell anwendbare Gesamtmethodik zur Identifizierung und Sequenzierung von unbekanntem Peptiden in komplexen Mischungen entwickelt. Diese Strategie berücksichtigt die Komplexität der Proben, indem verschiedene Trenntechniken wie die HPLC und CE kombiniert werden. Der zweidimensionalen Auftrennung schliesst sich eine automatisierte Fraktionierung und Präparation für die MALDI-MS Analyse mit dem entwickelten Präparationsroboter an. Eine der Hauptproblematiken in der Bioanalytik sind die sehr geringen Probenmengen. Durch die direkte Kopplung der CE, einer der empfindlichsten Trennmethode in der Bioanalytik, mit der automatischen Probenpräparation können verlustbringende Probentransferschritte vermieden werden. Der entwickelte Präparationsroboter kann neben der automatisierten Probenpräparation für die MALDI-MS auch als „intelligente Pipette“ für Probenmengen im Nanoliterbereich genutzt werden. Für die automatisierte Probenpräparation war eine Untersuchung verschiedener Präparationsmethoden für die MALDI-MS in Zusammenhang mit der Signalintensität und den Peptideigenschaften notwendig. Auch musste die Derivatisierungstechnik des H/D-Austausches auf die geringen Probenmengen angepasst werden.

Die Strategie wurde zunächst an einfachen Testsystemen aufgebaut. Anschliessend an einem „nativen“ System (Polyerga[®]), das den Vorteil der Verfügbarkeit grösserer Mengen und der Vorhersehbarkeit der Ursprungproteine aufweist, getestet. Schliesslich wurde die Methodik am System der MHC-Peptide auf seine wirkliche Leistungsfähigkeit geprüft. Es bewährte sich hier in deutlicher Weise. Für den zukünftigen Ausbau der Methodik ist insbesondere die Einbeziehung der Analytik posttranslativeller Modifikationen in der Charakterisierung komplexer Mischungen von Bedeutung. Hierzu konnten die Voraussetzungen für einen wichtigen Bereich, den der Phosphopeptide, geschaffen werden. Das spezielle Verhalten dieser Substanzklasse in der MALDI und MALDI-PSD-Analyse konnte aufgeklärt und die Ergebnisse für die Analytik komplexer Systeme nutzbar gemacht werden.

Bei den Untersuchungen zeigten sich auch klar die Grenzen der MALDI-PSD Analytik bei sehr komplexen Mischungen. Die Selektierbarkeit der Mutter-Ionen muss verbessert werden. Auch wurde deutlich, dass eine Sequenzbestimmung von Peptiden aufgrund der PSD-Daten und einer Datenbankanalyse alleine nicht ausreichend ist. Die gefundene Sequenz bedarf immer einer Sequenzbestätigung durch den Vergleich der PSD-Spektren des nativen Peptides mit dem synthetischen Peptid gleicher Sequenz. Es zeigt sich aber auch ganz klar, dass eine Sequenzierung von total unbekanntem Peptiden (d.h. die Sequenz ist in keiner Datenbank gespeichert) möglich ist. Deutlich wird dies am Beispiel der MHC-Peptide. Hier wurden die Sequenzen von zwei Peptiden bestimmt (FPRLKSKL, FLGENISNFL), von denen die zu diesem Zeitpunkt das Ursprungprotein Apolipoprotein L nicht in den Proteindatenbanken zu finden waren. Der Eintrag erfolgte erst einige Zeit später [130].

Die moderne Bioanalytik vereint so verschiedene Gebiete wie Proteinchemie, Molekularbiologie, Genomanalyse und Bioinformatik. Die Trenn- und Analysenverfahren der Bioanalytik haben einen Zugang zu immer komplexeren Fragestellungen ermöglicht. Die Massenspektrometrie und speziell die MALDI-MS haben einen wichtigen Beitrag zum heutigen Verständnis von biologischen Zusammenhängen geleistet. Durch die Entwicklung der „soft-ionization“ Techniken, wie FAB-MS, PDMS und MALDI-MS, wurde der Zugang zur Strukturaufklärung von Biopolymeren geschaffen. Die MALDI- und ESI-MS erweiterten den zugängliche Massenbereich auf über 100 kDa und der Probenbedarf sank auf unter 1 Picomol. Die Verbesserung der Auflösung durch die Einführung der *Delayed Extraction* hat eine Automatisierung der Datenauswertung ermöglicht. Was in Kombination mit Probenrobotern für eine automatisierte Probenvorbereitung und –präparation heute einen hohen Probendurchsatz ermöglicht, wie er für die Proteom-Analyse benötigt wird.

Neben der Massenanalyse ist die Sequenzbestimmung von Peptiden eines der wichtigsten Anwendungsgebiete für die MALDI-MS in der Bioanalytik. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist es mittels PSD-MALDI-MS möglich, gänzlich unbekannte Peptide bzw. Proteine, nach enzymatischem Verdau und chromatographischer Trennung, erfolgreich zu sequenzieren. Der grosse Vorteil der MALDI-MS für die Bioanalytik liegt in der Möglichkeit, die Peptide direkt aus Mischungen zu analysieren.

Hier liegen wichtige Zielgebiete für zukünftige Entwicklungen in der MALDI-MS. Ein Ziel wird sein, die Empfindlichkeit weiter zu steigern. Eine Möglichkeit bietet sich in der Miniaturisierung der Probenvorbereitung und Probenpräparation. Die Aufklärung des Ionisierungsmechanismus würde einen wichtigen Beitrag zur Optimierung der Präparation liefern und die Diskriminierung einzelner Signale verhindern können. Bei der Analyse komplexer Mischungen, die auch durch vorherige Trennungen nur zum

Teil in ihrer Komplexität reduziert werden konnten, hat sich deutlich gezeigt, wie wichtig ausserdem eine Verbesserung der Mutter-Ionen-Selektierung ist. Durch sie kann eine Überlagerung verschiedener Fragment-Ionen-Spektren verhindert werden und somit die Auswertung von PSD-Spektren vereinfacht bzw. überhaupt erst ermöglicht werden.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Chemikalien

Tabelle 5.8: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller	Bestell-Nr.
DHB p.A.	FLUKA	37550
Wasser p.A.	FLUKA	95281
3-[Cyclohexylamino]-1-Propansulfonsäure (Caps)	SIGMA	C-2632
Zitronensäure p.A.	Merck	100244
Natriumcitrat p.A.	Merck	106404
Borsäure p.A.	Merck	100165
Na-Borat p.A.	Merck	106308
Carboxypeptidase Y	SIGMA	C-4046
p-Nitroanilin	SIGMA	N-2126
D ₂ O 99.9 Atom %	Aldrich	30,875-7

5.2 Peptide

Für die Methodenentwicklung der CE-Trennung von Peptiden und die MALDI-MS Untersuchungen zur Signalunterdrückung in Peptidgemischen wurden die folgenden kommerziell erhältlichen Peptide verwendet:

Tabelle 5.9: Übersicht, der zur Methodenentwicklung der CE-Trennung und MALDI-MS Untersuchungen verwendeten Peptide.

Peptid	Aminosäuresequenz	Hersteller
[Arg ⁸]-Vasopressin	$\overline{\text{CYFQNC}}\text{PRG-NH}_2$	SIGMA V-9879
[des Pro ²]-Bradykinin	RPGFSPFR	SIGMA B-2026
Angiotensin I (Goosefish)	NRVYHPFHL	SIGMA A-9402
Anti-Inflammatory	HDMNKVLDL	SIGMA H-3021
Bombesin	UQRLGNQWAVGHLM-NH ₂	SERVA 52336
Delta-Sleep-inducing-Peptide (DSIP)	WAGGDASGQ	SERVA 52488
Dynorphin 1-9	YGGFLRRIR	SERVA 52546
Dynorphin 1-13	YGGFLRRIRPKLK	SERVA 52533
Lipotropin 1-10 (Porcine)	ELAGAPPEPA	SIGMA L-5261
Melittin (Bee Venom)	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	SIGMA M-2272
Oxytocin	$\overline{\text{CYIENC}}\text{PLG-NH}_2$	SIGMA O-6379
Substanz P	RPKPQQFFGLM-NH ₂	SERVA 51240

5.2.1 Synthetische MHC Klasse I Peptide

Die synthetischen MHC Klasse I Peptide (Tabelle 5.10) für den Vergleich der MALDI-PSD-Spektren mit den nativen Peptiden wurden im Labor von Dr. Hubert Kalbacher am Medizinisch Naturwissenschaftlichen Forschungsinstitut (MNF) der Universität

Tübingen, durch Festphasensynthese nach der Fmoc/tert-Butyl-Schutzgruppen Strategie hergestellt [77].

Tabelle 5.10: Synthetische MHC Klasse I Peptide.

IAQDRNIAI	GLSEFTEYL
HPKYKTEL	FLGENISNFL
QKDKVAEEL	PEDFIKKADS
QKDKVAELE	ADKLRFRAL
PASKKTD ^Q PQK	DQKDHAVF
DLERKVESL	FPRLKSKL
ILMEHIHKL	YLVKGNVF
ALSDHHIYL	YGM ^R PRQIL
WVKEKVVAL	RSERN ^N MMN
YLLPAIVHI	

5.2.2 Synthetische Phosphopeptide

Die Phosphopeptide und ihre jeweiligen unphosphorylierten Derivate (Tabelle 5.11) zur Untersuchung des Fragmentierungsverhalten wurden am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf von Herrn Dipl. Ing. Carsten Boehnke nach der Fmoc/tert-Butyl-Schutzgruppen Strategie synthetisiert.

Tabelle 5.11: Tabelle der synthetischen Phosphopeptide und ihren unphosphorylierten Derivate.

Peptid	Sequenz
Tau 224-240	KKVAVV ^R TPPKSPSSAK-NH ₂
Tau 224-240 (T231P)	KKVAVV ^R <u>T</u> PPKSPSSAK-NH ₂
[Tyr ²³¹] TAU 224-240	KKVAVV ^R <u>Y</u> PPKSPSSAK-NH ₂
[Tyr ²³⁵] Tau 224-240	KKVAVV ^R TPPK <u>Y</u> PSSAK-NH ₂
Tau 224-240 (S235P)	KKVAVV ^R TPPK <u>S</u> PSSAK-NH ₂
Tau 224-240 (T231P+S235P)	KKVAVV ^R <u>T</u> PPK <u>S</u> PSSAK-NH ₂

Tau 390-408	AEIVYKSPVVSGDTSPRHL-NH ₂
Tau 390-408 (S396P)	AEIVYK <u>S</u> PVVSGDTSPRHL-NH ₂
Tau 390-408 (T403P)	AEIVYKSPVVSGDT <u>S</u> PRHL-NH ₂
Tau 390-408 (S404P)	AEIVYKSPVVSGDTSPRHL-NH ₂
Tau 390-408 (S396P+T403P)	AEIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHL-NH ₂
Tau 390-408 (T403P+S404P)	AEIVYKSPVVSGDT <u>S</u> PRHL-NH ₂
RR-SRC	RRLIEDAEYAARG-NH ₂
RR-SRC	RRLIEDAE <u>Y</u> AARG-NH ₂
[Ser ⁹] RR-SRC	RRLIEDAESAARG-NH ₂
[Ser ⁹] RR-SRC (P)	RRLIEDAE <u>S</u> AARG-NH ₂
[Thr ⁹] RR-SRC	RRLIEDAETAARG-NH ₂
[Thr ⁹] RR-SRC (P)	RRLIEDAE <u>T</u> AARG-NH ₂
[d ₄ -Tyr ⁹] RR-SRC	RRLIEDAEY(d ₄)AARG-NH ₂
[d ₄ -Tyr ⁹] RR-SRC (P)	RRLIEDAE <u>Y</u> (d ₄)AARG-NH ₂

5.3 Geräte

5.3.1 Massenspektrometer

Alle MALDI-MS Messungen wurden an den beiden am Institut für Lasermedizin der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf entwickelten MALDI-TOF Massenspektrometern LAMMA1000 (Laser Microprobe Mass Analysis) und ALADIM 1 (Advanced Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometer) durchgeführt. Beide Instrumente sind speziell für die MALDI-PSD-Analyse ausgelegt. Die Datenaufnahme und -bearbeitung der Rohdaten erfolgte mit der Software Ulisses (Ulisses, Version 7.50 © Bernhard Spengler, siehe Kapitel 5.5.2)

5.3.1.1 LAMMA1000

Das verwendete RETOF-Massenspektrometer ist eine Weiterentwicklung des LAMMA 1000 Massenspektrometers von Leybold-Heraeus (Köln) [139][140][141]. Der Aufbau der Desorption, der Probenbeobachtung und der Ionenquelle sind koaxial. Der Reflektor ist gekippt. Durch Einführung der verzögerten Ionenextraktion wurde das Auflösungsvermögen wesentlich verbessert. Das Ion Gate, geschaltet über einen Hochspannungsschalter der Firma Behlke (Frankfurt), hat ein Zeitfenster von 80 ns, was bei einer Masse von $m/z = 1000$ u die Selektion des $[M+H]^+$ -Ions von dem Na-Addukt erlaubt.

5.3.1.2 ALADIM 1

Das ALADIM 1 (Advanced Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometer) ist ein in seiner gesamten Geometrie koaxial aufgebautes Massenspektrometer [122][141]. Mit einem koaxialen Laserfokus, der koaxialen Ionenbeschleunigung und -extraktion, der verzögerten Ionenextraktion, dem Ion Gate und einem zweistufigen Reflektor ist das ALADIM 1 (Abb. 5.54) speziell für die MALDI-PSD-Analyse von Peptiden ausgelegt.

Ein zusätzlicher Detektor in linearer Anordnung direkt hinter dem Reflektor erlaubt die Bestimmung von hohen Massen.

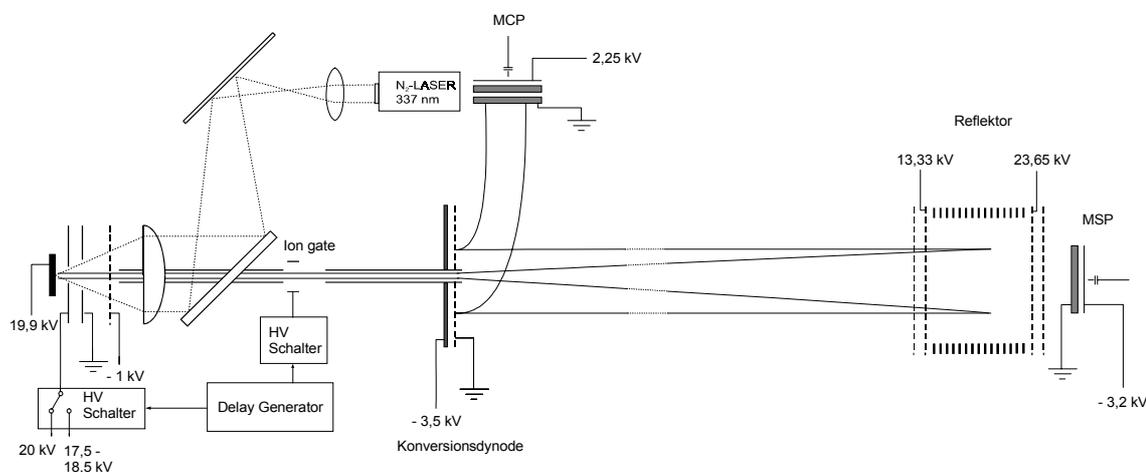


Abb. 5.54: Schematischer Aufbau des Massenspektrometers ALADIM 1 mit seinem vollständig koaxialen Aufbau. Hinter dem Reflektor der zusätzliche Detektor für den linearen Messmodus.

Durch Einbau der verzögerten Ionenextraktion konnte die Auflösung des Instrumentes auf $M/\Delta M 7000$ verbessert werden. Sie hat allerdings einen negativen Einfluss auf den PSD-Zerfall der Molekül-Ionen, der aber wiederum durch das verbesserte Signal-Rausch Verhältnis und die hohe Ionen-Transmission des Instrumentes kompensiert wird.

5.3.2 Kapillarelektrophorese

Alle beschriebenen kapillarelektrophoretischen Untersuchungen wurden mit der Kapillarelektrophorese PRINCE-4-Tray der Firma Lauer-Lab (Emmen, Niederlande) durchgeführt. Die Probenaufgabe erfolgt hydrodynamisch. Die CE ist on-line gekoppelt mit dem Präparationsroboter (siehe Kapitel 3.2.1) der Firma „bai Bioanalytische Instrumente“ (Bensheim).

5.3.2.1 Kapillare

Die *fused silica* Kapillare mit einem Innendurchmesser von 75 µm wurden von den Herstellern bai Bioanalytische Instrumente (Bensheim) und Polymicron Technologies, Inc. (Phoenix, AZ USA) als Meterware bezogen. Für das Detektionsfenster wurde die schützende Polyimidschicht auf ca. 1 cm mit einem Feuerzeug entfernt und das Fenster anschliessend mit Isopropanol gereinigt. Die Kapillarlänge betrug aufgrund der on-line Kopplung mit dem Präparationsroboter 120 cm. Zur Konditionierung der Kapillaroberfläche wurden die Kapillare direkt nach dem Einbau zuerst mit destilliertem Wasser und anschliessend 15 Minuten mit 0,1 Mol/L NaOH durchgespült. Stark verunreinigte Kapillare wurden durch Spülen mit verd. HCl von adsorbierten Peptiden befreit.

Die *CElectP175* Kapillare mit einer Polyethylenglycolschicht wurde als Spezialanfertigung mit einer Länge von 130 cm von SUPELCO (Bellefonte, PA USA) bezogen. Das Detektionsfenster wurde vom Hersteller nach Anweisung angebracht.

Die mit Polyacrylamid belegte Kapillare wurde von CS-Chromatographie Service (Langerwehe) bezogen. Hier wurde das Detektionsfenster durch Abschälen der Polyimidschicht mit einem Skalpell erzeugt.

Die belegten Kapillare wurden nur durch Spülen mit destilliertem Wasser konditioniert.

5.3.2.2 Probenaufgabe

Bei der Prince CE gibt es zwei Möglichkeiten der Probenaufgabe: elektrokinetisch oder hydrodynamisch. Für alle Trennungen erfolgte sie hydrodynamisch. Die aufgebrachte Probenmenge berechnet sich aus dem aufgebrachten Probenvolumen. Sie ist abhängig vom angelegtem Druck und der Zeit:

$$V = \frac{p \cdot \pi \cdot t \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot L}$$

(p = angelegter Druck, t = die Zeit die der Druck angelegt wird, r = Innenradius der Kapillare, η = Viskosität der Lösung, L = Gesamtlänge der Kapillare)

Für die verwendeten Kapillaren, mit einem Innendurchmesser von 75 μm und einer Gesamtlänge von 120 cm, errechnet sich das aufzugebene Probenvolumen bei z.B. einem Druck von 10 mbar und einer Injektionszeit von 12 sec zu 9,2 nl.

5.3.2.3 Pufferlösungen

Für die kapillarelektrophoretische Trennung von Peptiden wurden die folgenden Puffer verwendet.

- 100 mMol Caps-Puffer, pH 9,8
- 25 mMol Borat-Puffer, pH 9,1
- 20 mMol Zitronensäure/15 mMol Na-Citrat, pH 2,1

Für die Fraktionierung der Peptidgemische mit dem Präparationsroboter wurde die Konzentration des Zitronensäure-Puffers auf 15 mMol Zitronensäure/12 mMol Na-Citrat (pH 2,1) reduziert.

5.3.3 Präparationsroboter

5.3.3.1 Koaxialfluss-Interface

Abb. 5.55 zeigt das verwendete *sheath-flow*-Interface. Die CE-Kapillare wird durch ein T-Stück aus „PEEK“ mit 1/16“ Anschlüssen geführt und mit Schneidringen (Ferrules) abgedichtet. Am Ende wird die CE-Kapillare durch eine Stahlkapillare (AD 700 μm , ID 400 μm) geführt. Am seitlichen Eingang des T-Stücks wird ein Teflon-Schlauch, der mit der Spritzenpumpe verbunden ist, eingebaut. Hierdurch wird während der Fraktionierung kontinuierlich als *sheath-flow* MALDI-Matrix oder Puffer zugeführt. Der *sheath-flow* reißt das Eluat aus der Kapillare mit.

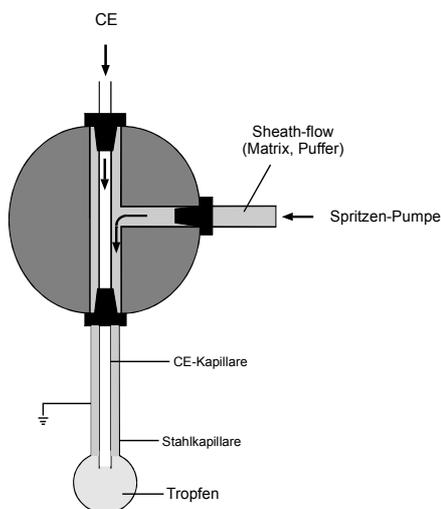


Abb. 5.55: Schema des Koaxialfluss-Interface zur CE-Probenfraktionierung.

5.3.3.2 X,Y,Z-Manipulator

Die MALDI-Targets werden im Präparationsroboter auf einem in x-, y-, und z-Richtung beweglichen Tisch befestigt. Die Targethalterung und die Stahlkapillare, die die *fused silica* Kapillare umschliesst, sind elektrisch leitend verbunden. Während der CE-Trennung taucht das Kapillarende in ein Elektrolytgefäß am Rande des x, y, z-Tisches. Der Präparationsroboter sammelt automatisch schrittweise die CE Fraktionen in definierten Zeitabständen oder peakabhängig. Das Absetzen der Tropfen in definierten Abständen auf dem MALDI-Target erlaubt bei der anschliessenden MALDI-Analyse ein automatisches Scannen der einzelnen Probenspots.

5.3.3.3 Automatisierte Probenfraktionierung

Mit dem Präparationsroboter lassen sich die CE-Fraktionen kontinuierlich auf einer feuchten Membran oder schrittweise sammeln. Schrittweise wird in definierten Zeitabständen oder peakabhängig fraktioniert. Die eluierenden Peptide sammeln sich in dem Tropfen, der sich am Ende der Metallkanüle bildet und werden in Zeitabständen von 0,5 - 1 Minuten auf dem MALDI-Probentarget automatisch abgesetzt.

Der Startzeitpunkt der Probenisolierung berechnet sich bei konstanter Stromstärke aus der *gesamten Kapillarlänge* L und der *effektiven Kapillarlänge* l (vom Anfang bis zum Detektor):

$$t_{i,s} = t_1 \cdot \frac{L}{l}.$$

Die Zeitdauer der Probenisolierung berechnet sich nach:

$$t_i = (t_2 - t_1) \cdot \frac{L}{l}.$$

Dabei wird die Migrationszeit der zu isolierenden Substanz vom Beginn der Trennung bis zum Erreichen des Detektors (Signalanfang, t_1) und dem Verlassen des Detektors (Signalende, t_2) gemessen. Bei der Berechnung müssen weitere Faktoren wie Spannungsschwankungen während der Fraktionierung oder schnelleres Wandern der Peaks hinter dem Detektor berücksichtigt werden.

5.4 Methoden

5.4.1 MALDI

5.4.1.1 Matrix-Präparation

5.4.1.1.1 DHB

Die DHB-Stammlösung wurde in einer Konzentration von 10mg/ml H₂O hergestellt.

Für die Untersuchungen mit synthetischen Peptiden wurden die Proben nach dem Standard *dried-droplet* Verfahren mit einem molaren Analyt:Matrix-Verhältnis von 1:1000 präpariert. Die auf dem Proben target total präparierte Peptidmenge betrug bei all diesen Untersuchungen ca. 500 Femtomol.

Die nativen Proben wurde auch mit der *dried-droplet* Methode präpariert. Da keine Konzentrationsangaben über die verschiedenen Proben vorlagen, können über die präparierten Peptidmengen auf dem Proben target keine Angaben gemacht werden.

Zur Unterdrückung der Alkali-Adduktionen wurde den Probenlösungen teilweise Zitronensäure zugegeben.

5.4.1.1.2 p-Nitroanilin

Zur MALDI Probenpräparation mit p-Nitroanilin wurde eine gesättigte Lösung in Aceton hergestellt. Die Präparation erfolgte nach der *Layer* Technik. Der Layer wird durch mehrfaches Auftragen von 0,2-0,5 µl Matrixlösung auf dem Target gebildet. Auf ihn wurde anschliessend 0,2-0,5 µl der Peptidlösung aufgetragen.

5.4.2 CE

5.4.2.1 Methodenentwicklung zur kapillarelektrophoretischen Trennung von Peptiden

Zur Herstellung der Peptidgemische wurden wässrige Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 nMol/µl verwendet. Aus den Stammlösungen wurden äquimolare Mischungen hergestellt.

Für die Methodenentwicklung der CE-Trennung für Peptide wurden Gemische aus 5 bzw. 10 Peptiden mit Gesamtpeptidkonzentrationen zwischen 10⁻³ und 10⁻⁶ Mol/L verwendet.

5.4.3 Peptidlösungen

5.4.3.1 Synthetische Peptide

Von den synthetischen Peptiden für die Untersuchung der Signalunterdrückung in Peptidgemischen bei der MALDI-MS (siehe Kapitel 3.3.1.2) wurden wässrige Stammlösungen mit einer Konzentration von 4×10^{-4} Mol/L hergestellt. Die Stammlösungen wurden für die binären Peptidmischungen im Verhältnis 1:1, zur Herstellung der gewünschten äquimolaren Konzentrationen gemischt.

Die Lösungen der synthetisierten Peptide zur Verifizierung gefundener Peptidsequenzen wurden in einer Konzentration von 4×10^{-4} Mol/L hergestellt.

5.4.3.2 Arzneimittelwirkstoff Polyerga[®] der Firma HorFerVit

Der Arzneimittelwirkstoff wurde von der Firma HorFerVit im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

Die chromatographischen Untersuchungen und die HPLC-Fraktionierung des Extraktes sowie die Rechromatographierung führte die Firma HorFerVit durch.

Von dem Peptidextrakt wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 0,1 mg Extrakt/ml hergestellt. Für die MALDI-MS und MALDI-PSD-Untersuchungen wurden 0,5 μ l der Stammlösungen mit 3 μ l DHB-Matrix, 1 μ l 0.3 % TFA und 1 μ l konzentrierter Zitronensäure präpariert. Der Zusatz der Zitronensäure wirkt sowohl als Säure als auch als Komplexbildner für Alkali-Ionen. Ungefähr 100 nl der Stammlösung wurden für die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen in die Kapillare injiziert.

Aus dem Lyophilisat der 8 HPLC-Fractionen wurden für die kapillarelektrophoretischen und massenspektrometrischen Untersuchungen Lösungen mit einer Konzentration von 0,3 μ g/ μ l hergestellt. Die MALDI Proben wurden mit der Matrix DHB in einem Verhältnis von 1:2 präpariert.

Bei der CE Fraktionierung der HPLC Fractionen erfolgte die MALDI-Präparation automatisch mit dem Präparationsroboter (siehe Kapitel 3.2.3 und 3.4.1).

5.4.3.2.1 Enzymatische Abbaureaktion

0,2 μ l der Peptidlösung wurden on-Target mit 0,6 μ l einer Lösung von 0,05 μ g/ μ l Carboxypeptidase Y (EC 3.4.16.1) in H₂O versetzt und abgedeckt mit einem Uhrglas 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l der sauren DHB-Matrixlösung gestoppt.

5.4.3.3 MHC

Die Extraktion, Reinigung und Fraktionierung der MHC-Peptide wurde von Herrn Dr. Thomas Flad am Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum (MNF) der Universität Tübingen durchgeführt [77].

Alle HPLC Fraktionen wurden vor der MALDI Probenpräparation lyophilisiert und mit 20 µl H₂O (entionisiert) aufgenommen. Die MALDI-MS Messungen wurden alle mit DHB als Matrix durchgeführt.

5.4.3.3.1 Deuterierung

Die Deuterierung wurde durch mehrfaches umkristallisieren der MALDI Proben in D₂O unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt [11].

5.4.3.4 Phosphopeptide

Die MALDI-MS Untersuchungen wurden mit Peptidlösungen der Konzentrationen von 4×10^{-4} Mol/L durchgeführt. Präpariert wurden die Proben nach der Standard *dried-droplet*-Methode mit DHB als Matrix und einem molaren Analyt:Matrix-Verhältnis von 1:1000.

5.5 Software

5.5.1 MASS

Die Berechnung der pH-abhängigen Nettoladung und des Bull-Breese Index erfolgten mit dem Programm MASS [112]. Es beinhaltet einen Sequenzeditor zum Erstellen von Sequenzdateien, berechnet die mittlere- und monoisotopische Masse der $[M+H]^+$ -Ionen sowie den Bull-Breese Index [114] als Maß der Hydrophobizität. Die Nettoladung kann in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen und Peptiden berechnet werden. Sie setzt sich zusammen aus den Ladungen am N-Terminus, am C-Terminus und an den Seitenketten, der in der Sequenz enthaltenen Aminosäuren. Grundlage der Berechnung ist die Henderson-Hasselbach-Gleichung aus der die folgende Beziehung entwickelt wurde:

$$Q = q_n + q_c + \sum_{i=1}^n qR_i$$

(Q = Nettoladung, q_n = Ladung am N-Terminus, q_c = Ladung am C-Terminus, R_i = Ladung an der Seitenkette der Aminosäure i, n = Sequenzlänge)

Der Einfluß von Modifikationen einzelner Aminosäuren auf die Masse und Ladung kann berücksichtigt werden.

5.5.2 ULISSES (Universal Laser Ionization Spectrometry System's Evaluation Software)

Beide MALDI-TOF Massenspektrometer (LAMMA1000, ALADIM 1) verwenden das Programm ULISSES (Version 7.50 © Bernhard Spengler) zur Datenaufnahme und Auswertung der Rohdaten [139][141][140].

Die Datenaufnahme erfolgt über einem Transientenrekorder, wobei das Programm die Möglichkeit beinhaltet, verschiedene Transientenrekorder anzusprechen. Es ist in der Lage Einzelspektren wie auch Summenspektren aufzunehmen und zu speichern. Neben der Kalibrierung für stabile Massen ist eine PSD-Kalibrierung integriert. Sie berücksichtigt die verschiedenen Einflussfaktoren des PSD-Zerfalls, wie die geometrischen Daten des Instrumentes und die verschiedenen Potentiale.

Neben der Datenaufnahme und -auswertung steuert ULISSES verschiedene Funktionen der Massenspektrometer, wie die Reflektorspannung und den Lasertrigger.

5.5.3 PepSeq

Mit Hilfe des Programms PepSeq (© Frank Lützenkirchen) [9][122] wurden die einzelnen „Segmente“ der PSD-Spektren automatisch zusammengesetzt. Die Hauptfunktionen von PepSeq sind das Zusammensetzen von PSD-Spektren (Compiler), das Editieren von Aminosäuresequenzen und PSD-Spektren (Editor) sowie das Auswerten von MALDI-PSD-Spektren (Analyze Menu).

Der „Compiler“ ist ein Interface zu ULISSES, dem Programm zur Datenaufnahme. Er transformiert die einzelnen Segmente der PSD-Spektren zu kompletten PSD-Spektren, die danach mit dem „Editor“ bearbeitet werden können, d.h. z.B. glätten der Spektren und bezeichnen der Peaks. Zur Auswertung der PSD-Spektren steht das „Analyze Menu“ zur Verfügung. Damit können Listen aller markierten Peaks erstellt werden, in denen automatisch nach Aminosäureabständen zu einzelnen Peaks und dem N- bzw. C-Terminus gesucht werden kann. PepSeq beinhaltet ausserdem einen Algorithmus zur automatischen Suche von Peptidsequenzen in Proteindatenbanken. Grundlage dafür ist die Liste aller markierten Peaks eines PSD-Spektrums.

5.5.4 Peptide LEGO

Zur Unterstützung der Auswertung von Massenspektren wurde das Programm „Peptide LEGO“ (© Bernhard Spengler) verwendet. Mit seiner Hilfe lassen sich alle zu einer bestimmten Masse gehörenden möglichen Aminosäurekombinationen berechnen. Damit läßt sich die Gesamtaminosäurezusammensetzung eines Peptides oder PSD-Fragments bestimmen. Für die Interpretation von PSD-Spektren sehr hilfreich ist die Funktion zur Berechnung von benachbarten Peaks. Kalkuliert werden ausgehend von der Masse eines Fragments alle möglichen Massen der nächsten und übernächsten bzw. der vorherigen Aminosäuren. Zusätzlich läßt sich mit Peptide LEGO die Anzahl der austauschbaren Protonen berechnen: nicht nur der verschiedenen Aminosäurekombinationen, sondern auch die Differenz der austauschbaren Protonen zwischen zwei benachbarten Signalen.

5.6 Datenbankanalyse

Die Suche der Ursprungproteine aufgrund gefundener *sequence tags* oder der ermittelten gesamten Peptidsequenz erfolgte mit dem Suchalgorithmus des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in der Proteindatenbank SwissProt (www.man.embl.heidelberg.de/Services/PeptideSearch/FR_PeptidePatternForm.html).

6 LITERATUR

- [1] Barber, M.; Bordoli, R.S.; Sedgwick, R.D.; Tyler, A.N.: Fast atom bombardment of solids (FAB): a new ion source for mass spectrometry. *Journal of the Chemical Society/ Chemical Communications*, 1981, 325-327.
- [2] Torgerson, D.F.; Skowronski, R.P.; McFarlane, D.: New approach to the mass spectroscopy of non-volatile compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **60**, 1974, 616-621.
- [3] Hillenkamp, F.; Unsoeld, E.; Kaufmann, R.; Nitsche, R.: Laser microporbe mass analysis of organic materials. *Nature*, 1975, **256**, 119-120.
- [4] Hillenkamp, F. in: Ion formation from organic solids. Hrsg. A. Benninghoven, Springer series in chemical physics **25**, Springer-Verlag Berlin u.a. 1983.
- [5] Posthumus, M.A.; Kistemaker, P.G.; Meuzelaar, H.L.C.; Ten Noever de Brauw, M.C.: Laser Desorption-Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules. *Analytical Chemistry*, 1978, **50**, 985-991.
- [6] Munson, M.S.B.; Field, F.H.: Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. Generation Introduction. *Journal of the American Chemical Society*, 1966, **88**, 2621-2630.
- [7] Karas, M.; Hillenkamp, F.: Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 1988, **60**, 2299-2301.
- [8] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.: Fundamental aspects of Postsource Decay in Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry, *Journal of Physical Chemistry*, 1992, **96**, 9678-9684.
- [9] Spengler, B.: Post-source Decay Analysis in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules. *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, **32**, 1019-1036.

- [10] Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M.: Electrospray ionization for mass spectrometry of large molecules. *Science*, 1989, **246**, 64-71.
- [11] Spengler, B.; Lützenkirchen, F.; Kaufmann, R.: On-target deuteration for peptide sequencing by laser mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 1993, **28**, 1482-1490.
- [12] Beckey, H.D.: Field Desorption mass spectrometry: A technique for the study of thermally unstable substances of low volatility. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 1969, **2**, 500-503.
- [13] Zenobi, R.; Knochenmuss, R.: Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Review*, 1998, **17**, 337-366.
- [14] Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F.: Role of Photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic Molecules and Relevance for Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, *Organic Mass Spectrometry*, 1992, **27**, 472-480.
- [15] Liao, P.-C.; Allison, J.: Ionization Processes in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Matrix-dependent Formation of $[M+H]^+$ vs $[M+Na]^+$ Ions of Small Peptides and Some Mechanistic Comments. *Journal of Mass Spectrometry*, 1995, **30**, 408-423.
- [16] Gimon, M.E.; Preston, L.M.; Solouki, T.; White, M.A.; Russell, D.H.: OMS Letters: Are Proton Transfer Reactions of Excited States Involved in UV Laser Desorption Ionization. *Organic Mass Spectrometry*, 1992, **27**, 827-830.
- [17] Bökelmann, V.; Spengler, B.; Kaufmann, R.: Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization. *European Journal of Mass Spectrometry*, 1995, **1**, 81-93.
- [18] Karbacher, V.; Knochenmuss R.: Do Single Matrix Molecules Generate Primary Ions in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, **12**, 968-974.
- [19] Spengler, B.; Bahr, U.; Karas, M.; Hillenkamp, F.: Eximer Laser Desorption Mass Spectrometry of Biomolecules at 248 nm and 193 nm. *Journal of Physical Chemistry*, 1987, **91**, 6502-6506.

- [20] Lehmann, E.; Knochenmuss R.: Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Contribution of Pre-formed Ions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1997, **11**, 1483-1492.
- [21] Wiley, W.C.; McLaren, I.H.: Time-of-flight Mass Spectrometry with improved Resolution. *Review of scientific instruments*, 1955, **26**, 1150-1157.
- [22] Brown, R.S.; Lennon, J.J.: Mass resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of Flight Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry*, 1995, **67**, 1998-2003.
- [23] Takach, E.J.; Hines, W.M.; Patterson, D.H.; Juhasz, P.; Falick, A.M.; Vestal, M.L.; Martin, S.A.: Accurate mass measurements using MALDI-TOF with delayed extraction. *Journal of Protein Chemistry*, 1997, **16**, 363-369.
- [24] Xiang, F.; Beavis, R.C.: Growing Protein-doped Sinapic Acid Crystals for Laser Desorption: an Alternative Preparation method for Difficult Samples. *Organic Mass Spectrometry*, 1993, **28**, 1424-1429.
- [25] Xiang, F.; Beavis, R.C.: A Method to Increase Contaminant Tolerance in Protein Matrix-assisted Laser Desorption/ionization by Fabrication of Thin Protein-doped Polycrystalline Films. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1994, **8**, 199-204.
- [26] Bai, J.; Liang, X.; Liu, Y.-H.; Zhu, Y.; Lubman, D.M.: Characterization of two New Matrices for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1996, **10**, 839-844.
- [27] Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F.: 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1991, **111**, 89-102.
- [28] Juhasz, P.; Costello, C.E.; Biemann, K.: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass-Spectrometry with 2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoic acid matrix, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 1993, **4**, 399.

- [29] Beavis, R.C.; Chaudhary, T.; Chait, B.T.: Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 1992, **27**, 156-158.
- [30] Beavis, R.C.; Chait, B.T.: Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1989, **3**, 432-435.
- [31] Beavis, R.C.; Chait, B.T.: Matrix-assisted Laser-desorption Mass Spectrometry Using 355nm Radiation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1989, **3**, 436-439.
- [32] Tang K.; Taranenko, N.I.; Allman, S.L.; Chen, C.H.; Chang, C.H.; Jacobson, K.B.: Picolinic acid as a matrix for laser mass spectrometry of nucleic acid and proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1993, **7**, 673-677.
- [33] Fitzgerald, M.C.; Rarr, G.R.; Smith, L.M.: Basic Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides. *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 3204-3211.
- [34] Vorm, O.; Roepstorff, P.; Mann, M.: Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation, *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 3281-3287.
- [35] Kussmann, M.; Nordhoff, E.; Rahbek-Nielsen, H.; Haebel, S.; Rossel-Larsen, M.; Jakobsen, L.; Gobom, J.; Mirgorodskaya, E.; Kroll-Kristensen, A.; Palm, L.; Roepstorff, P.: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes. *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, **32**, 593-601.
- [36] Liu, Y.A.; Bai, J.; Liang, X.; Lubman, D.M.: Use of Nitrocellulose Film Substrate in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for DNA Mapping and Screening. *Analytical Chemistry*, 1995, **67**, 3482-3490.
- [37] Barber, M.; Bordoli, R.S.; Elliott, G.J.; Sedgwick, R.D.; Tyler A.N.: Fast Atom Bombardment Mass spectrometry (FABMS). A Study of Surface Coverage Effects in FABMS. *Journal of the Chemical Society, Faraday Trans 1*, 1983, **79**, 1249-1255.

- [38] Naylor, S.; Findeis, F.; Gibson, B.W.; Williams, D.H.: An Approach toward the Complete FAB Analysis of Enzymic Digests of Peptides and Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 1986, **108**, 6359-6363.
- [39] Schneider, K.: Analytische Entwicklung der ^{252}Cf -Plasmadesorptions-Massenspektrometrie zur Strukturanalyse von Biopolymeren und synthetischen Polymeren. Inaugural-Dissertation, Universität Konstanz, 1991.
- [40] Chen, L.; Cotter, R.J.; Stults, J.T.: Plasma Desorption Mapping of the Tryptic Digest of 23-kDa Recombinant Human Growth Hormone. *Analytical Biochemistry*, 1989, **183**, 190-194.
- [41] Wang, R.; Chen, L.; Cotter, R.J.: Effects of Peptide Hydrophobicity and Charge State on Molecular Ion Yields in Plasma Desorption Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1990, **62**, 1700-1705.
- [42] Schneider, K.; Nielsen, P.F.; Suckau, D.; Przybylski, M.: Effects of Differences in Charge State and Ionic composition on 252-CF Plasma Desorption Mass Spectrometry of Polypeptide Mixtures. *Proceedings of the 38th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Tucson Arizona, 3.-8. Juni 1990, 197-198.
- [43] Zhu, Y.F.; Lee, K.L.; Tang, K.; Taranenko, A.N.I.; Chen, C.H.: Revisit of MALDI for Small Proteins, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1995, **9**, 1315-1320.
- [44] Cohen, S.L.; Chait, B.T.: Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins. *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 31-37.
- [45] Rosinke, B.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Rosenbusch, J.; Dencher, N.; Krüger, U.; Galla, H.J.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) of membrane proteins and non-covalent complexes. *Journal of Mass Spectrometry*, 1995, **30**, 1462-1468.
- [46] Chan, D.T.-W.; Colburn, A.W.; Derrick, P.J.; Gardiner, D.J.; Bowden, M.: Suppression of Matrix Ions in Ultraviolet Laser Desorption: Scanning Electron Microscopy and Raman Spectroscopy of the Solid Samples. *Organic Mass Spectrometry*, 1992, **27**, 188-194.

- [47] Kratzer, R.; Eckerskorn, Ch.; Karas, M.; Lottspeich, F.: Suppression effects in enzymatic peptide ladder sequencing using ultraviolet – matrix assisted laser desorption/ionization – mass spectrometry. *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1910-1919.
- [48] Olumee, Z.; Sadeghi, M.; Tang, X.; Vertes, A.: Amino Acid Composition and Wavelength Effects in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1995, **9**, 744-752.
- [49] Amado, F.L.; Domingues, P.N.: Acid/Base effect on FAB ionization process. *Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Atlanta Georgia, 21.-26. Mai 1995, 90.
- [50] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Jaeger, E.: Peptidesequencing by Matrix Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1992, **6**, 105-108.
- [51] Roepstorff, P.: Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1984, **11**, 601/631.
- [52] Johnson, R.S.; Martin, S.A.; Biemann, K.: Collision-Induced Fragmentation of (M+H)⁺ Ions of Peptides. Side Chain Specific Sequence Ions. *International Journal of Mass Spectrometry*, 1988, **86**, 137-154.
- [53] Spengler, B.; Luetzenkirchen, F.; Metzger, S.; Chaurand, P.; Kaufmann, R.; Jeffery, W.; Bartlet-Jones, M.; Pappin, D.J.C.: Peptide sequencing of charged derivatives by postsource decay MALDI mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1997, **169/170**, 127-140.
- [54] Yu, W./ Vath, J.E./ Huberty, M.C./ Martin, S.A.: Identification of the facile Gas-Phase Cleavage of the Asp-Pro and Asp-Xxx Peptide Bonds in Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 3015-3023.
- [55] Dookera, N.N.; Yalcin, T.; Harrison, A.G.: Fragmentation Reactions of Protonated α -Amino Acids. *Journal of Mass Spectrometry*, 1996, **31**, 500-508.
- [56] Lützenkirchen, F.; Chaurand, P.; Spengler, B.; Kaufmann, R.: On-target derivatisation and H/D exchange as essential tools for primary structure elucidation of biomolekules. *Proceedings of the 45th ASMS Conference on*

- Mass Spectrometry and Allied Topics*, Palm Springs 1.-5. Juni 1997, 1001.
- [57] Edman, P.: Methods for determination of the amino acid sequence in peptides *Acta Chemica Scandinavia*, 1950, **4**, 283-293.
- [58] Chait, B.; Wang, R.; Beavis, R.C.; Kent, St.B.H.: Protein Ladder Sequencing. *Science*, 1993, **262**, 89-92.
- [59] Edman, P.: On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. *Acta Chimica Scandinavia*, 1956, **10**, 761-768.
- [60] Patterson, D.H.; George, E.T.; Regnier, F.E.; Martin, St.A.: C-Terminal Ladder Sequencing via Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry Coupled with Carboxypeptidase Y. Time-Dependent and Concentration-Dependent Digestions. *Analytical Chemistry*, 1995, **67**, 3971-3978.
- [61] Kohlrausch, F.: Über Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen. *Annalen der Physik und Chemie*, 1897, **62**, 209-239.
- [62] Tiselius, A.: *Kolloid-Zeitschrift*, 1938, **129**, 85.
- [63] Hjerten, S.: Free zone electrophoresis. *Arkiv för Kemi*, 1958, **13**, 151-152.
- [64] Mikkers, F.E.P.; Eveaerts, F.M.; Verheggen, Th.P.E.: High-performance zone electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 1979, **169**, 11-20.
- [65] Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D.: Free-zone electrophoresis in glas capillaries. *Clinical Chemistry*, 1981, **27**, 1551-1553.
- [66] Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D.: High Resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Chromatography*, 1981, **218**, 209-216.
- [67] McCormick, M.R.: Capillary Zone Electrophoretic Separation of Peptides and Proteins Using Low pH Buffers in Modified Silica Capillaries. *Analytical Chemistry*, 1988, **60**, 2322-2328.
- [68] Ermakov, S.V.; Zhukov, M.Y.; Capelli, L.; Righetti, P.G.: Quantitative studies of different injection systems in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 1994, **15**, 1158-1166.

- [69] Heiger, D.N.: Sensitivity improvements in HPCE. *Fifth International Symposium on High Performance Capillary Electrophoresis*, Orlando, 25.–28. Januar 1993, Posterpräsentation.
- [70] Chervet, J.P.; van Soest, R.E.J.; Ursem, M.: Z-shaped Flow Cell for UV Detection in Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 1991, **543**, 439-449.
- [71] Moring, S.E.; Pairaud, C.; Albin, M.; Locke, S.; Thibault, P.; Tindall, G.W.: Enhancement of UV detection sensitivity for capillary electrophoresis. *American Laboratory*, 1993, **33**.
- [72] Murray, K.K.: Coupling Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization to Liquid Separations. *Mass Spectrometry Reviews* 1997, **16**, 283-299.
- [73] Eriksson, K.-O.; Palm, A.; Hjerten, St.: Preparative Capillary Electrophoresis Based on Adsorption of the Solutes (Proteins) onto a moving Blotting Membrane as they Migrate out of the Capillary. *Analytical Biochemistry*, 1992, **201**, 211-215.
- [74] Hartleb, M.; Leuschner, J.: Toxicological Profile of a Low Molecular Weight Spleen Peptide Formulation Used in Supportive Cancer Therapy. *Arzneimittel-Forschung/ Drug Research*, 1997, **9**, 1047-1051.
- [75] Pradoll, D.M.: Cancer vaccines: a road map for the next decade. *Current Opinion in Immunology*, 1996, **8**, 619-621.
- [76] Roth, C.; Rochlitz, C.; Kourilsky, P.: Immune response against tumors. *Advanced in Immunology*, 1994, **57**, 281-350.
- [77] Flad, Th.: Charakterisierung tumorspezifischer Antigene auf renalen Karzinomen. Inaugural-Dissertation, Universität Tübingen, 1998.
- [78] Janeway, C.A.; Travers, P.; Capra, J.D.; Walport, W.: *Immuno Biology*, Harcourt Publishers Ltd, 1999, 127.
- [79] van der Bruggen, P.; Traversari, C.; Chomez, P.; Lurquin, C.; De Plaen, E.; Van den Eynde, B.; Knuth, A.; Boon, T.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes an a human melanoma. *Science*, 1991, **254**, 1643-1647.

- [80] Sahin, U.; Türeci, Ö.; Schmitt, H.; Cochlovius, B.; Johannes, T.; Schmits, R.; Stenner, F.; Luo, G.; Schober, I.; Pfreundschuh, M.: Human neoplasms elicit multiple immune responses in autologous host, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1995, **11**, 2103-2113.
- [81] Henderson, R.A.; Cox, A.L.; Sakaguchi, K.; Appella, E.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.; Engelhard, V.H.: Direct identification of an endogenous peptide recognized by multiple HLA-A2.1 specific cytotoxic T cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 1993, **90**, 10275-10279.
- [82] Cox, A.L.; Skipper, J.; Chen, Y.; Henderson, R.A.; Darrow, T.L.; Shabanowitz, J.; Engelhard, V.H.; Hunt, D.F.; Slingluff, C.L. Jr.: Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*, 1994, **264**, 716-719.
- [83] Flad, Th.; Spengler, B.; Kalbacher, H.; Brossart, P.; Baier, D.; Kaufmann, R.; Bold, P.; Metzger, S.; Blüggel, M.; Meyer, H.E.; Kurz, B.; Müller, C.A.: Direct Identification of Major Histocompatibility Complex Class I-bound Tumor-associated Peptide Antigens of a Renal Carcinoma Cell Line by a Novel Mass Spectrometric Method. *Cancer Research*, 1998, **58**, 5803-5811.
- [84] Hubbard, M.J.; Cohen, P.: On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends in Biochemistry Science*, 1993, **18**, 172-177.
- [85] Patarca, R.: Protein Phosphorylation and Dephosphorylation in Physiologic and Oncologic Processes. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 1996, **7**, 343-432.
- [86] Vincent, I.; Jicha, G.; Rosado, M.; Dickson, D.W.: Aberrant Expression of Mitotic CDC2/Cyclin B1 kinase in degenerating Neurons of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 1997, **17**, 3588-3598.
- [87] Trojanowski, J.Q.; Schmidt, M.L.; Shin, R.W.; Bramblett, G.T.; Rao, D.; Lee, V.M.Y.: Altered tau and neurofilament proteins in neuro-degenerative disease: diagnostic implications for Alzheimer's disease and Lewy body dementia. *Brain Pathology*, 1993, **3**, 45-54.
- [88] Probst, A.; Langui, D.; Ulrich, D.: Alzheimer's disease: a description of the structural lesions. *Brain Pathology*, 1991, **1**, 229-239.

- [89] Davies, P.: Neuronal abnormalities, not Amyloid, are the cause of dementia in Alzheimer's disease. In: Alzheimer Diseases, Hrsg. Terry, R.D.; Katzman, R.; Bick, K.L., Raven Press, New York, 1994, 327-334.
- [90] Riesner, D.: Prions and their biophysical background. *Biophysical Chemistry*, 1997, **66**, 259-268.
- [91] Morishima-Kawashima, M.; Hasegawa, M.; Takios, K.; Suzuki, M.; Yoshida, H.; Titani, K.; Ihara, Y.: Proline-directed and Non-proline-directed Phosphorylation of PHF-tau. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**, 823-829.
- [92] Watanabe, A.; Hasegawa, M.; Suzuki, M.; Takio, K.; Morishima-Kawashima, M.; Titani, T.; Arai, T.; Kosik, K.S.; Ihara, Y.: In Vivo Phosphorylation Sites in Fetal and Adult Rat Tau. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**, 25712-25717.
- [93] Brauer, M.; Skyes, B.D.: *Methods in Enzymology*, 1984, **107**, 37.
- [94] Hoffmann, R.; Lee, V.M.-Y.; Leight, S.; Varga, I.; Otvos Jr., L.: Unique Alzheimer's Disease Paired Helical Filament Specific Epitopes Involve Double Phosphorylation at Specific Sites. *Biochemistry*, 1997, **36**, 8114-8124.
- [95] Harrison, J.D. in : Protein Phosphorylation - A Practical Approach. Hrsg. D.G. Hardie, Oxford University Press 1992.
- [96] Meyer, H.E.; Hoffmann-Posorke, E.; Heilmeyer, L.M.G.: Determination and location of phosphoserine in proteins and peptides by conversion S-ethylcysteine. *Methods in Enzymology*, 1991, **201**, 169-185.
- [97] Petrilli, R.; Pucci, P.; Morris, H.R.; Addeo, F.: Assignment of phosphorylation sites in buffalo beta casein by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1986, **140**, 28-37.
- [98] Nijenhuis, A.A.; Fokkens, R.H.; Nibbering, N.M.M.; van Oijen A.H.; de Bont, H.B.A.; Liskamp, R.M.J.; van Boom, J.H.: Verification of the Position of the Phosphate Group in Some Synthetic Phosphopeptides by Fast-atom Bombardment and Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1993, **7**, 774-779.

- [99] Lapko, V.; Jiang, X.-Y.; Smith, D.; Song, P.-S.: Posttranslational Modification of Oat Phytochrome A: Phosphorylation of a Specific Serine in a Multiple Serine Cluster. *Biochemistry*, 1997, **36**, 10595-10599.
- [100] Craig, A.G.; Engström, A.; Lindeberg, G.; Bennich, H.; Serwe, M.; Hoffmann-Posorke, E.; Lorte, H.; Meyer, H.E. in: *Methods in Protein Sequence Analysis*. Hrsg. Jörnvall H.; Höög J.O.; Gustavsson A.M., Birkhäuser Verlag, Basel 1991, 275.
- [101] Annan, R.S.; Carr, S.A.: The Essential Role of Mass Spectrometry in Characterizing Protein Structure: Mapping Posttranslationale Modifications. *Journal of Proteine Chemistry*, 1997, **16**, 391-402.
- [102] Zhang, X.; Herrinh, C.J.; Romano, P.R.; Szczepanowska, J.; Brzeska, H.; Hinnebusch, A.G.; Qin, J.: Identification of Phosphorylation Sites in Proteins Separated by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 1998, **70**, 2050-2059.
- [103] Busman, M.; Schey, K.L.; Oatis, J.E. Jr; Knapp, D.R.: Identification of Phosphorylation Sites in Phosphopeptides by Positive and negative Mode Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 1996, **7**, 243-249.
- [104] Ding, J.; Burckhart, W.; Kassel, D.B.: Identification of Phosphorylated Peptides from Complex Mixtures Using Negative-ion Orifice-potential Stepping and Capillary Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1994, **8**, 94-98.
- [105] Annan, R.S. and S.A. Carr: Phosphopeptide Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 3413-3421.
- [106] Hoffmann, R.; Metzger, S.; Spengler, B.; Lazlos, O. Jr : Sequencing of Peptides Phosphorylated on Serines and Threonines by Post-Source Decay in Matrix-assisted Laser desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 1999, **34**, 1195-1204.
- [107] Metzger, S.; Hoffmann, R.: Studies on the dephosphorylation of Phosphotyrosine-containing Peptides during the Post-source decay in MALDI. *Journal of Mass Spectrometry*, 2000, **35**, in Druck.

- [108] Horning, S.; Metzger, S.; Hoffmann, R.; Kilz, S.: Identification and Sequencing of O-phosphorylated Peptides. A Comparison of MALDI-PSD with ESI High Energy CID and ESI Ion Trap CID Mass Spectrometry. *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and allied Topics, Long Beach 11.-15. Juni 2000.*
- [109] Schnölzer, M.; Lehmann, W.D.: Identification of modified peptides by metastable fragmentation in MALDI mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1997, **169/170**, 263-271.
- [110] Neville, D.C.A.; Rozanas, C.R.; Price, E.M. Gruis, D.B.; Verkman, A.S.; Townsend, R.R.: Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Science*, 1997, **6**, 2436-2445.
- [111] Asara, J.M.; Allison, J.: Enhanced Detection of Phosphopeptides in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using Ammonium Salts. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 1999, **10**, 35-44.
- [112] Suckau, D.: Massenspektrometrische Methoden zur molekularen Charakterisierung von Oberflächentopographie und antigenen Determinanten in Proteinen. Inaugural-Dissertation, Universität Konstanz, 1991.
- [113] Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S.: Capillary Electrophoresis: Principles and Practice, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993.
- [114] Bull, H.B.; Breese, K.: Surface Tension of Amino Acids Solutions: A Hydrophobicity Scale of the Amino Acid residues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1974, **161**, 665–670.
- [115] Skoog, B.; Wichmann, A.: Calculation of the isoelectric points of polypeptides from the amino acid composition. *Trends in Analytical Chemistry*, 1986, **5**, 82-83.
- [116] Gorman, G.S.; Speir, J.P.; Turner, C.A.; Amster, I.J.: Proton Affinities of the 20 Common Amino Acids. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, **114**, 3986-3988.
- [117] Kinsel, G.R.; Land, C.M.; Walker, A.; Li, N.: Comparisons of Proton Transfer Reactions of MALDI Matrices *Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and allied Topics*, Atlanta Georgia, 21.-26. Mai 1995.

- [118] Breuker, K.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R.: Gas-phase basicities of deprotonated matrix-assisted laser desorption/ionization matrix molecules. *International Journal of Mass Spectrometry*, 1999, **184**, 25-38.
- [119] Beavis, R.C.; Bridson, J.N.: *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 1993, **26**, 442-447.
- [120] Faller, A.: *Der Körper des Menschen*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1984, 169-170.
- [121] Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Darnell, J.: *Molekulare Zellbiologie*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1996, 1022-1076.
- [122] Chaurand, P.; Luetzenkirchen, F.; Spengler, B.: Peptide and Protein Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI-Post-Source Decay Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 1998, **10**, 91-103.
- [123] Henry, J.L.; Coggin, D.L.; King, C.R.: High level expression of the ribosomal protein L19 in human breast tumors that overexpress erbB-2. *Cancer Research*, 1993, **53**, 1403-1408.
- [124] Davies, B.; Fried, M.: The L19 ribosomal protein gene (RPL19): gene organization, chromosomal mapping, and novel promoter region. *Genomics*, 1995, **25**, 372-380.
- [125] Wallner, B.P.; Frey, A.Z.; Tizard, R.; Mattaliano, R.J.; Hession, C.; Sanders, M.E.; Dustin, M.L.; Springer, T.A.: Primary structure of lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3). The ligand of the lymphocyte CD2 glycoprotein. *Journal of Experimental Medicine*, 1987, **166**, 923-932.
- [126] Alvey, Y.G.; Brennan, D.; Howard, T.; Mohanakumar, T.: Increased expression of the HDJ-2 heat shock protein in biopsies of human rejected kidney. *Transplantation*, 1996, **61**, 963-967.
- [127] Taylor G.A.; Thompson, M.J.; Lai, W.S.; Blackshear, P.J.: Mitogens stimulate the rapid nuclear to cytosolic translocation of tristetraprolin, a potential zinc-finger transcription factor. *Molecular Endocrinology*, 1996, **10**, 140-146.
- [128] Iggo, R.D. and D.P. Lane: Nuclear protein p68 is an RNA-dependent ATPase. *The European Molecular Biological Organization Journal*, 1989, **8**, 1827-1831.

- [129] Sabo, E.; Miselevich, I.; Bejar, J.; Segenreich, M.; Wald, M.; Moskowitz, B.; Nativ, O.: The role of vimetin expression in predicting the long-term outcome of patients with localized renal carcinoma. *British Journal of Urology*, 1997, **80**, 864-868.
- [130] Duchateau, P.N.; Pullinger, C.R.; Orellana, R.E.; Kunitake, S.T.; Naya-Vigne, J.; O'Connor, P.M.; Malloy, M.J.; Kane, J.P.: Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein I. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, 25576-25582.
- [131] Izzo, P.; Costanzo, P.; Lupo, A.; Rippa, E.; Paollela, G.; Salvatore, F.: Human aldolase A gene. Structural organization and tissue-specific expression by multiple promoters and alternate mRNA processing. *European Journal of Biochemistry*, 1988, **174**, 569-578.
- [132] Nagase, T.; Miyajima, N.; Tanaka, A.; Sazuka, T.; Seki, N.; Sato, S.; Tabata, S.; Ishikawa, K.; Kawarabayasi, Y.; Kotani, H. *et al.*: Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081-KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-I. *DNA Research*, 1995, **2**, 37-43.
- [133] Dahl, J.; Schall, R.P.; He, H.L.; Cairns, J.S.: Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells. *Journal of Immunology*, 1992, **148**, 597-603.
- [134] Lien, L.L.; Feener, C.A.; Fischbach, N.; Kunkel, L.M.: Cloning of human microtubule-associated protein 1B and the identification of a related gene on chromosome 15. *Genomics*, 1994, **22**, 273-280.
- [135] Gaugler, B.; Brouwenstijn, N.; Vantomme, V.; Szikora, J.P.; Van der Speck, C.W.; Patard, J.J.; Boon, T.; Schier, P.; Van den Eyden, B.J.: A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics*, 1996, **44**, 323-330.
- [136] Rammensee, H.G.; Friede, T.; Stevanovic, : MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 1995, **41**, 178-228.

- [137] Sutton, J.; Rowland-Jones, S.; Rosenberg, W.; Nixon, D.; Gotch, F.; Gao, X.M.; Murray, N.; Spoonas, A.; Driscoll, P.; Smith, M.; Willis, A.; Michael, A.: A sequence pattern for peptides presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA B8 revealed by analysis of epitopes and eluted peptide. *European Journal of Immunology*, 1993, **23**, 447-453.
- [138] Tholey, A.; Reed, J.; Lehmann, W.D.: Electrospray Tandem Mass Spectrometric Studies of Phosphopeptides and Phosphopeptides Analogues. *Journal of Mass Spectrometry*, 1999, **34**, 117-123.
- [139] Kaufmann, R.; Kirsch, D.; Spengler, B.: Sequencing of peptides in a time-of-flight mass spectrometer: evaluation of postsource decay following matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI). *International Journal of Mass spectrometry and Ion Processes*, 1994, **131**, 355-385.
- [140] Kaufmann, R.; Spengler, B.; Lützenkirchen, F.: Mass Spectrometric Sequencing of Linear Peptides by Product-ion Analysis in a Reflectron Time-of-flight Mass Spectrometer Using Matrix-assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1993, **7**, 902-910.
- [141] Kaufmann, R.; Chaurand, P.; Kirsch, D.; Spengler, B.: Post-Source Decay and Delayed Extraction in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometry. Are There Trade-offs? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1996, **10**, 1199-1208.
- [141] Reecy, J.M.; Briley, G.P.; Bidwell, C.A.; Grant, A.L.: *EMBL/DDJB databases*, (1994)
- [142] Braunitzer, G.; Schrank, B.; Stangle, A.; Scheitauer, U.: Hemoglobin, XXI Sequence analysis of porcine hemoglobin. *Hoope-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 1978, **359**, 137-146.

7 ANHANG

7.1 Proteinsequenzen der gefundenen Ursprungproteine der identifizierten Peptide

Proteinsequenz von Actin [141], die gefundenen Peptid-Sequenzen sind unterstrichen.

Met-Asp-Asp-Asp-Ile-Ala-Ala-Leu-Val-Val-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly-Met-Cys-Lys-Ala-Gly-Phe-Ala-Gly-Asp-Asp-Ala-Pro-Arg-Ala-Val-Phe-Pro-Ser-Ile-Val-Gly-Arg-Pro-Arg-His-Gln-Gly-Val-Met-Val-Gly-Met-Gly-Gln-Lys-Asp-Ser-Tyr-Val-Gly-Asp-Glu-Ala-Gln-Ser-Lys-Arg-Gly-Ile-Leu-Thr-Leu-Lys-Tyr-Pro-Ile-Glu-His-Gly-Ile-Val-Thr-Asn-Trp-Asp-Asp-Met-Glu-Lys-Ile-Trp-His-His-Thr-Phe-Tyr-Asn-Glu-Leu-Arg-Val-Ala-Pro-Glu-Glu-His-Pro-Val-Leu-Leu-Thr-Glu-Ala-Pro-Leu-Asn-Pro-Lys-Ala-Asn-Arg-Glu-Lys-Met-Thr-Gln-Ile-Met-Phe-Glu-Thr-Phe-Asn-Thr-Pro-Ala-Met-Tyr-Val-Ala-Ile-Gln-Ala-Val-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Thr-Gly-Ile-Val-Met-Asp-Ser-Gly-Asp-Gly-Val-Thr-His-Thr-Val-Pro-Ile-Tyr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Leu-Pro-His-Ala-Ile-Leu-Arg-Leu-Asp-Leu-Ala-Gly-Arg-Asp-Leu-Thr-Asp-Tyr-Leu-Met-Lys-Ile-Leu-Thr-Glu-Arg-Gly-Tyr-Ser-Phe-Thr-Thr-Thr-Ala-Glu-Arg-Glu-Ile-Val-Arg-Asp-Ile-Lys-Glu-Lys-Leu-Cys-Tyr-Val-Ala-Leu-Asp-Phe-Glu-Gln-Glu-Met-Ala-Thr-Ala-Ala-Ser-Ser-Ser-Ser-Leu-Glu-Lys-Ser-Tyr-Glu-Leu-Pro-Asp-Gly-Gln-Val-Ile-Thr-Ile-Gly-Asn-Glu-Arg-Phe-Arg-Cys-Pro-Glu-Ala-Leu-Phe-Gln-Pro-Ser-Phe-Leu-Gly-Met-Glu-Ser-Cys-Gly-Ile-His-Glu-Thr-Thr-Phe-Asn-Ser-Ile-Met-Lys-Cys-Asp-Val-Asp-Ile-Arg-Lys-Asp-Leu-Tyr-Ala-Asn-Thr-Val-Leu-Ser-Gly-Gly-Thr-Thr-Met-Tyr-Pro-Gly-Ile-Ala-Asp-Arg-Met-Gln-Lys-Glu-Ile-Thr-Ala-Leu-Ala-Pro-Ser-Thr-Met-Lys-Ile-Lys-Ile-Ile-Ala-Pro-Pro-Glu-Arg-Lys-Tyr-Ser-Val-Trp-Ile-Gly-Gly-Ser-Ile-Leu-Ala-Ser-Leu-Ser-Thr-Phe-Gln-Gln-Met-Trp-Ile-Ser-Lys-Gln-Glu-Tyr-Asp-Glu-Ser-Gly-Pro-Ser-Ile-Val-His-Arg-Lys-Cys-Phe-

Proteinsequenz der α -Kette von Hämoglobin [142], die gefundenen Peptid-Sequenzen sind unterstrichen.

Val-Leu-Ser-Ala-Ala-Asp-Lys-Ala-Asn-Val-Lys-Ala-Ala-Trp-Gly-Lys-Val-Gly-Gly-Gln-Ala-Gly-Ala-His-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Glu-Arg-Met-Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asn-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Asp-Gln-Val-Lys-Ala-His-Gly-Gln-Lys-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Lys-Ala-Val-Gly-His-Leu-Asp-Asp-Leu-Pro-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-Asp-Leu-His-Ala-His-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-His-Cys-Leu-Leu-Val-Thr-Leu-Ala-Ala-His-His-Pro-Asp-Asp-Phe-Asn-Pro-Ser-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-Leu-Ala-Asn-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg-

Proteinsequenz der β -Kette von Hämoglobin [142], die gefundenen Peptidsequenzen sind unterstrichen.

Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala-Val-Leu-Gly-Leu-Trp-Gly-Lys-Val-Asn-Val-Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg-Leu-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe-Phe-Glu-Ser-Phe-Gly-Asp-Leu-Ser-Asn-Ala-Asp-Ala-Val-Met-Gly-Asn-Pro-Lys-Val-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gln-Ser-Phe-Ser-Asp-Gly-Leu-Lys-His-Leu-Asp-Asn-Leu-Lys-Gly-Thr-Phe-Ala-Lys-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Gln-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Ile-Val-Val-Val-Leu-Ala-Arg-Arg-Leu-Gly-His-Asp-Phe-Asn-Pro-Asp-Val-Gln-Ala-Ala-Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-Ala-His-Lys-Tyr-His-

7.2 PSD Spektren der MHC-Klasse I Moleküle

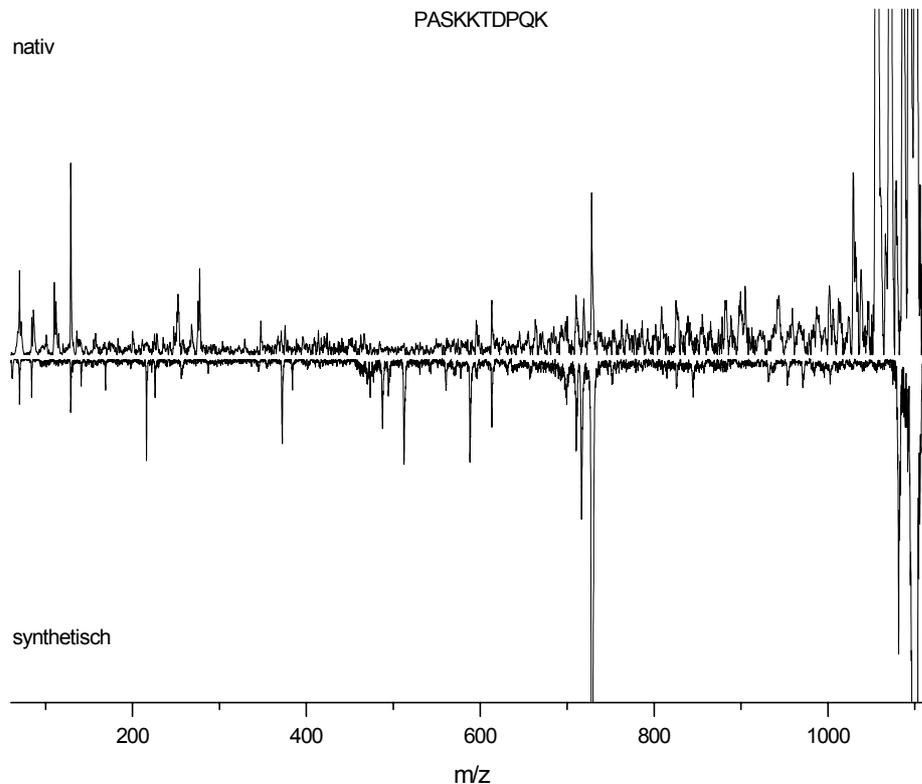


Abb. 7.56: MALDI-PSD-Spektrum des Peptides $m/z = 1099,6$ u aus dem Peptidpool W6/32 (Retentionszeit der Fraktion 27,20 min) und einer zweiten Komponente gleicher Masse, im Vergleich mit dem synthetischen Peptid der Sequenz PASKKTDPOK. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen dem synthetischen und einer der beiden Nativen Peptide, auch wenn der Vergleich der PSD-Spektren durch die Überlagerung der beiden Fragment-Spektren der nativen Peptide erschwert wird.

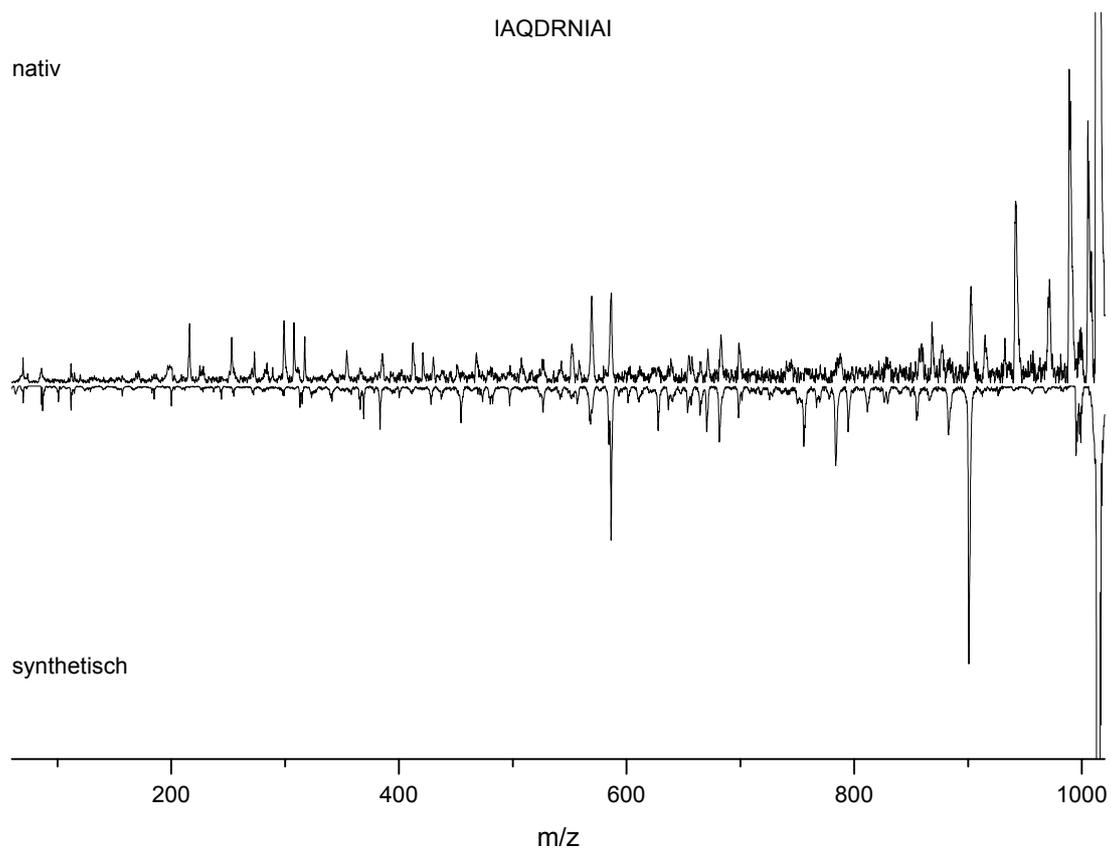


Abb. 7.57: MALDI-PSD-Spektrum des Peptides $m/z = 1013,6$ u aus dem Peptidpool TH4 (Retentionszeit der Fraktion 45,47 min) im Vergleich mit dem synthetischen Peptid gleicher Sequenz. Im oberen Massenbereich ist eine gute Übereinstimmung zwischen nativen und synthetischen Peptid zu beobachten. Insgesamt ist aber die Übereinstimmung des PSD-Spektrums des nativen Peptides mit dem der vorgeschlagenen Sequenz zu schlecht.

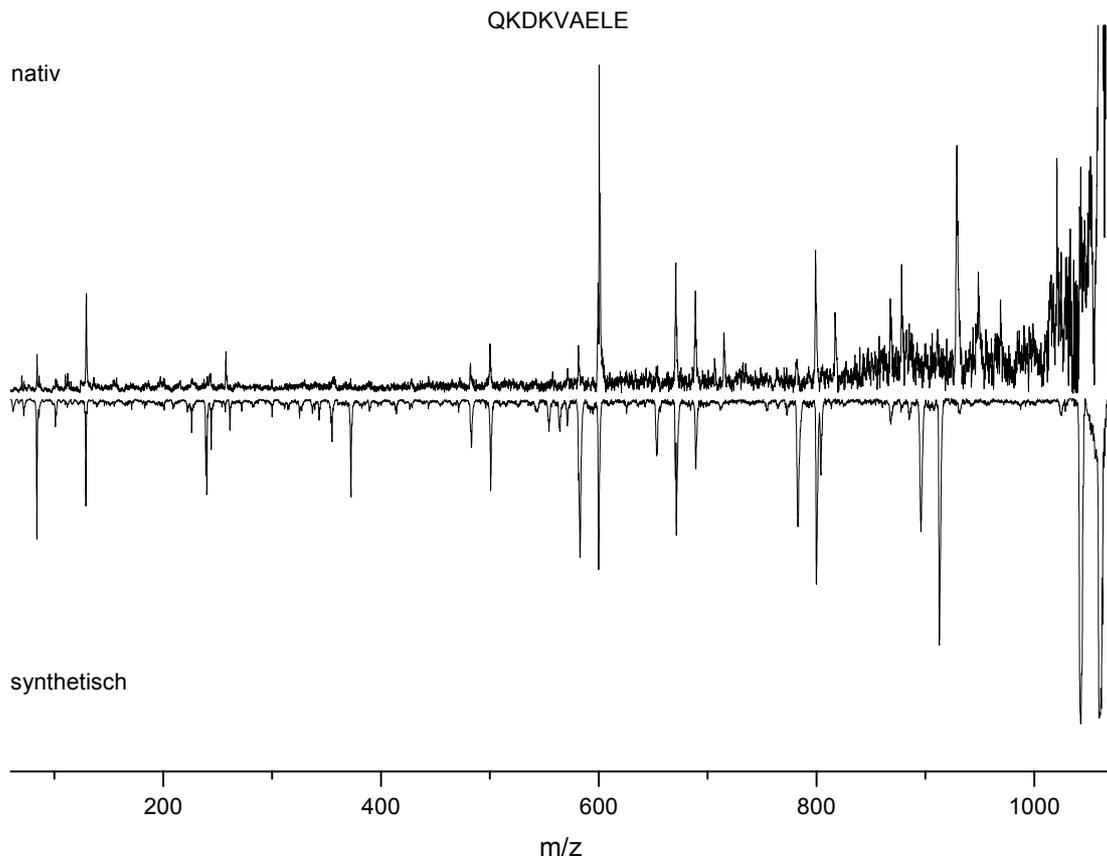


Abb. 7.58: MALDI-PSD-Spektrum des Peptides $m/z = 1059,6$ u aus dem Peptidpool W6/32 (Retentionszeit der Fraktion 24,84 min) im Vergleich mit dem synthetischen Peptid gleicher Sequenz. Nur im oberen Massenbereich ist eine gute Übereinstimmung der beiden PSD-Spektren festzustellen. Die gefundene Sequenz stimmt nicht mit dem PSD-Spektrum des nativen Peptides überein.

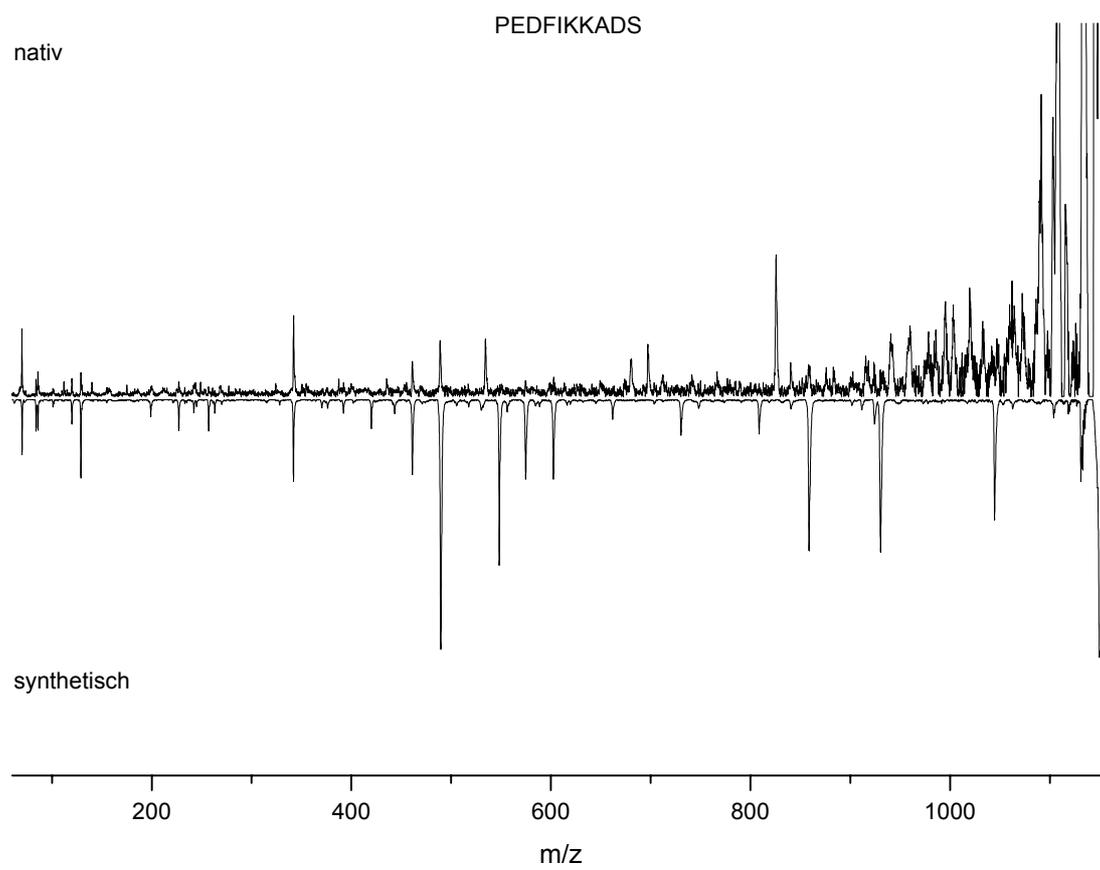


Abb. 7.59: MALDI-PSD-Spektrum des Peptides $m/z = 1049,6$ u aus dem Peptidpool W6/32 (Retentionszeit der Fraktion 44,70 min) im Vergleich mit dem synthetischen Peptid gleicher Sequenz. Es ist eine minimale Übereinstimmung zwischen den beiden PSD-Spektren entsprechend dem zur Suche verwendeten *sequenz tag* zu beobachten.

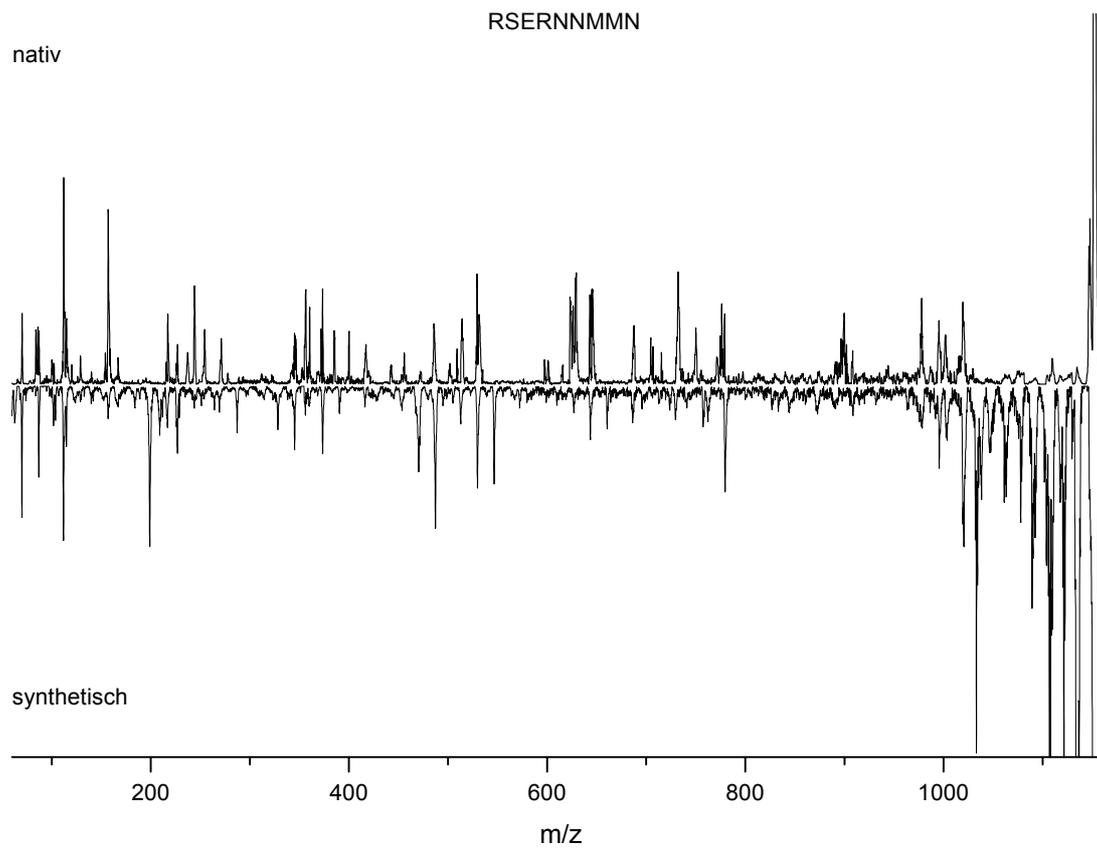


Abb. 7.60: MALDI-PSD-Spektrum des Peptides $m/z = 1151,5$ u aus dem Peptidpool TH4 (Retentionszeit der Fraktion 28,56 min) im Vergleich mit dem synthetischen Peptid gleicher Sequenz. Die Identifizierung der Sequenz beruht auf dem *sequenz tag* „RSER“. Der Vergleich zeigt nur eine minimale Übereinstimmung zwischen den beiden PSD-Spektren.