
Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Identifizierung und Quantifizierung Metall-markierter Peptide und Proteine mittels Matrix-unterstützter Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie

vorgelegt von

Barbara Gregorius,

Kiel 2015

Erster Gutachter: Prof. Dr. Andreas Tholey
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst
Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2015
Zum Druck genehmigt: 21.07.2015

Gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen und Symbole.....	IV
Zusammenfassung.....	IX
Abstract.....	XII
I. Einleitung.....	1
I.1 Proteomanalyse.....	1
I.2 Quantitative Proteomanalyse.....	5
I.3 Trennverfahren.....	12
I.3.1 2-dimensionale Gelelektrophorese.....	12
I.3.2 Chromatographische Trennverfahren.....	13
I.4 Massenspektrometrie für die Proteomanalyse.....	15
I.4.1 Sanfte Ionisierungsverfahren.....	15
I.4.2 Analysatoren.....	20
I.4.3 Detektoren.....	25
I.4.4 Peptidfragmentierung.....	26
I.5 Quantifizierung mit bifunktionellen Chelatkomplexen.....	29
I.5.1 ICP-MS und MeCAT.....	29
I.5.2 Lanthanoide.....	31
I.5.3 Chelatoren.....	33
I.5.4 DOTA-Markierung.....	34
I.6 Analyse von Proteaseaktivitäten mittels Massenspektrometrie.....	37
II. Problemstellung und Zielsetzung.....	40
III. Material und Methoden.....	42
III.1 Material.....	42
III.2 Software.....	42
III.3 Methoden.....	43

III.3.1	Amino-gerichtete Derivatisierung der Modellpeptide	43
III.3.2	Beladung der DOTA-markierten Peptide mit Metallionen	44
III.3.3	Isobares <i>Labeling</i> der Modellpeptide	44
III.3.4	Proteinverdau und Markierung für die qualitative Analyse	44
III.3.5	Proteinmischung für die LC-MALDI MS/MS-Analyse (qualitative Analyse) ..	45
III.3.6	Proteinmischung für die LC-MALDI MS/MS-Analyse (quantitative Analyse/iTRAQ-DOTA-Vergleich)	45
III.3.7	MALDI MS-Probenvorbereitung	46
III.3.8	Trennung mittels nano-IP-RP-HPLC	46
III.3.9	Analyse mittels MALDI-TOF MS und MS/MS	47
III.3.10	Proteinidentifizierung und Datenbanksuche	47
III.3.11	Einzel-Substrat-Protease-Assay	48
III.3.12	Probenvorbereitung für den Multi-Substrat-Protease-Assay	48
III.3.13	Multi-Substrat-Protease-Assay	49
III.3.14	MALDI MS-Probenvorbereitung	50
III.3.15	Trennung mittels nano-IP-RP-HPLC	50
III.3.16	Analyse mittels MALDI-TOF MS und MS/MS	50
III.3.17	Proteinidentifizierung und Datenbanksuche	51
IV.	Ergebnisse	52
IV.1	Qualitative Analyse	52
IV.1.1	Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/N)	56
IV.1.2	Fragmentierungsverhalten Metall-DOTA-markierter Peptide	63
IV.1.3	Proteinidentifizierung mittels LC-MALDI MS/MS-Analyse	74
IV.2	Quantitative Analyse	76
IV.2.1	Relative Quantifizierung von Einzelpeptiden	78
IV.2.2	Relative Quantifizierung eines 6-Protein-Verdaus	88
IV.3	Analyse von Proteaseaktivitäten mittels Massenspektrometrie	94
IV.3.1	Einzelsubstratanalyse	96

IV.3.2	Multisubstratanalyse.....	101
V.	Diskussion	106
V.1	Qualitative Analyse	106
V.1.1	Signal-zu-Rausch-Verhältnisse	108
V.1.2	Fragmentierungsverhalten Metall-markierter Peptide.....	111
V.1.3	Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Fragmentierungsverhalten der Amino- und Cystein-markierten Peptide.....	119
V.1.4	Proteinidentifizierung mittels LC-MALDI MS/MS-Analyse	121
V.1.5	Zusammenfassung.....	122
V.2	Quantitative Analyse	123
V.2.1	Relative Quantifizierung von Einzelpeptiden	123
V.2.2	Relative Quantifizierung eines 6-Protein-Verdau.....	125
V.2.3	Zusammenfassung.....	131
V.3	Analyse von Proteaseaktivitäten mittels Massenspektrometrie.....	132
V.3.1	Einzelsubstratanalyse	133
V.3.2	Multisubstrat-Analyse	134
V.3.3	Zusammenfassung.....	139
	Literaturverzeichnis.....	140
	Anhang	154
	Erklärung.....	168
	Danksagung.....	169
	Lebenslauf	171
	Publikationen.....	173
	Mitwirkung an Publikationen.....	173
	Beiträge zu Kongressen und Tagungen.....	173

Abkürzungen und Symbole

Abb.	=	Abbildung
AC	=	engl.: <i>alternating current voltage</i> ; Wechselspannung
ACN	=	Acetonitril
AEBSF	=	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AQUA	=	engl.: <i>absolute quantification of proteins</i>
APCI	=	chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
BSA	=	bovines Serumalbumin
bspw.	=	beispielsweise
bzw.	=	beziehungsweise
ca.	=	circa
CEM	=	engl.: <i>channel electron multiplier</i>
CHCA	=	engl.: <i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> ; α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure
CICCA	=	engl.: <i>4-Chlor-α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> ; 4-Chlor-α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure
(k)Da	=	(Kilo-)Dalton
CI	=	Chemische Ionisation
C.I.	=	engl.: <i>Confidential Intervalls</i>
cICAT	=	<i>cleavable isotope coded affinity tag</i>
CID	=	engl.: <i>collision induced decomposition</i> ; kollisions-induzierte Dissoziation
DC	=	engl.: <i>direct current voltage</i> ; Gleichspannung
d.h.	=	das heißt
DHB	=	engl.: <i>dihydroxybenzoic acid</i> ; Dihydroxybenzoesäure
DMSO	=	Dimehylsulfoxid
DOTA	=	1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPs	=	derivatisierte Peptide

DTPAA	=	Diethyltetra-aminpentaessigsäure-Anhydrid
DTT	=	Dithiothreitol
ESI	=	engl.: <i>electrospray ionisation</i>
ECD	=	engl.: <i>electron capture dissociation</i>
EI	=	Elektronenstoß Ionisation
EST	=	engl.: <i>expressed sequence tag</i>
ETD	=	engl.: <i>electron transfer dissociation</i>
FAB	=	engl.: <i>fast atom bombardement</i>
FHWM	=	engl. <i>full width at half maximum</i>
FPs	=	freie Peptide
FT-ICR	=	Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz
FRET	=	engl.: <i>fluorescent resonance energy transfer</i>
(2D-)GE	=	(zweidimensionale) Gelelektrophorese
GD	=	engl. <i>glow discharge</i> , Glimmentladung
GluC	=	Endoprotease GluC
HFBA	=	Heptafluorbuttersäure
HPLC	=	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> ; Hochleistungsflüssigchromatographie
HEPES	=	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IAA	=	engl.: <i>iod acetic acid</i> ; Iodessigsäure
ICAT	=	engl.: <i>isotope coded affinity tag</i>
ICP	=	engl.: <i>inductively coupled plasma</i> , Induktiv gekoppeltes Plasma
ICPL	=	engl.: <i>isotope-coded protein label</i>
I.D.	=	Innendurchmesser
IEF	=	isoelektrische Fokussierung
IEM	=	Ionenemissionsmodell
IP	=	engl.: <i>ion pair</i> ; Ionenpaar

IR-MALDI	=	Infrarot-MALDI
IRMPD	=	engl.: <i>infrared multiphoton dissociation</i>
IS	=	interner Standard
ISP	=	interner Produkt Standard
ISS	=	interner Substratstandard
ISD	=	engl.: <i>in source decay</i>
iTRAQ	=	engl.: <i>isobaric tag for relative and absolute quantitation</i>
K	=	Kalium
KEV	=	Kanalelektronenvervielfacher
kHz	=	kilo Hertz
LC	=	engl.: <i>liquid chromatography</i> ; Flüssigkeitschromatographie
LDI-MS	=	Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
LIT	=	engl.: <i>linear ion trap</i>
LMG	=	engl.: <i>low mass gate</i>
MALDI	=	engl.: <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> ; Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MCP	=	engl.: <i>multi channel plate</i> ; Vielkanalplatte
MDP	=	Metall-beladene und DOTA-derivatisierte Peptide
MeCAT	=	engl.: <i>metal-coded affinity tagging</i>
MMTS	=	Methyl-Methanthiosulfonat
MΩ	=	Megaohm
MRT	=	Magnetresonanztomographie
MS	=	Massenspektrometrie, engl.: <i>mass spectrometry</i> ; Massenspektrometer
MS/MS	=	Tandem Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	=	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
Na	=	Natrium
Nd-YAG	=	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NHS	=	N-Hydroxysuccinimid

nm	=	Nanometer
ns	=	Nanosekunde
oa	=	engl.: <i>orthogonal-acceleration</i>
PAGE	=	engl.: <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pH	=	engl.: <i>potential of hydrogen</i>
PMF	=	Peptidmassenfingerprint
PMSF	=	Phenylmethansulfonylfluorid
ppm	=	engl.: <i>parts per million</i>
<i>p</i> -SCN-Bn-	=	engl.: <i>2-(4-isothiocyanatobenzyl-)</i>
PSD	=	engl.: <i>post source decay</i> ; metastabiler Zerfall
PTM	=	posttranslationale Modifikation
RP	=	engl.: <i>reversed phase</i> ; Umkehrphase
(IP-)RPC	=	engl.: <i>(ion pair) reversed phase chromatography</i> ; (Ionenpaar-) Umkehrphasenchromatographie
RT	=	Raumtemperatur
SA	=	engl.: <i>sinapic acid</i> ; Sinapinsäure
SC	=	engl.: <i>sequence coverage</i> ; Sequenzabdeckung
SCN	=	Thiocyanat
SCX	=	engl.: <i>strong cation exchange</i> ; starker Kationenaustausch
SDS	=	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEV	=	Sekundärelektronen Vervielfacher
SILAC	=	engl.: <i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
S/N	=	engl.: <i>signal-to-noise</i> ; Signal-zu-Rausch-Verhältnis
Tab.	=	Tabelle
TCEP	=	Tris-(2-carboxyethyl)phosphine
TEAA	=	Triethylammoniumacetat
TEAB	=	Triethylammoniumbicarbonat
TFA	=	engl.: <i>trifluoroacetic acid</i> ; Trifluoressigsäure

THAP	=	Trihydroxyacetophenon
TI	=	Thermische Ionisation
TIS	=	engl.: <i>timed ion selector</i>
TMT	=	engl.: <i>tandem mass tag</i>
TOF	=	engl.: <i>time of flight</i> ; Flugzeit
TRIS	=	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	=	unter anderem
UV	=	Ultraviolett
v. a.	=	vor allem

Zusammenfassung

Neben der Identifizierung aller Proteine eines Zustandes ist die quantitative Analyse verschiedener Zustände zum Verständnis biologischer Prozesse unumgänglich. Gegenwärtig vorhandene quantitative Methoden der Proteomanalyse besitzen spezifische Vor- und Nachteile, sodass hier die Validierung vorhandener und die Entwicklung neuer Methoden von immenser Bedeutung ist. Die Quantifizierung mit MeCAT (*metal-coded affinity tags*) bietet insofern eine vielversprechende Alternative zu gängigen Methoden wie bspw. ICAT (*isotope coded affinity tags*), da hier sowohl differentielle Analysen möglich sind, aber gleichzeitig auch die absolute Quantifizierung der jeweiligen Proteine mittels ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) erfolgen kann. Die molekulare Information über die Proteine bzw. Peptide von Interesse muss jedoch immer mit sanfteren Ionisationsarten wie ESI oder MALDI Massenspektrometrie gewonnen werden.

Aber auch gegenüber isobaren Methoden, wie iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) oder TMT (*tandem mass tags*), die innerhalb der quantitativen Proteomanalyse immer mehr an Bedeutung gewinnen, bietet die Quantifizierung mit MeCAT durch den großen dynamischen Bereich der Quantifizierung mittels ICP-MS und die Möglichkeit der absoluten Quantifizierung ohne Herstellung aufwendiger interner Standards, Vorteile gegenüber den MS/MS-basierten Methoden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die erfolgreiche Identifizierung Metall-DOTA-markierter Peptide (Amino- und Sulfhydryl-gerichtete Markierung) für einzelne Peptide sowie komplexere Peptidmischungen mittels (LC-)MALDI MS und MS/MS gezeigt. Des Weiteren führte die Einführung der Metall-Markierung in einigen Fällen zu deutlich höheren S/N-Verhältnissen der derivatisierten Peptide im Vergleich zu den underivatisierten. Zudem wurden die in der MALDI MS auftretenden Nebenprodukte der Metallion-DOTA-markierten Peptide charakterisiert. Hier sind hauptsächlich Na/K-(Natrium/Kalium)-Addukte, Abspaltungen von $-\text{CO}_2$ oder $-\text{CH}_2\text{CO}_2$ (nicht aus den komplexierten Peptiden) und Hydrolyseprodukte (nur nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA) zu nennen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Position der Metall-Chelat-Markierung einen Einfluss auf die Fragmentierung des markierten Peptides hat. Sowohl für die Amino-gerichtete als auch für die Sulfhydryl-gerichtete Modifikation konnten als Markierungs-spezifische Ionen die Immoniumionen des markierten Lysins sowie des Cysteins identifiziert werden. Für die Sulfhydryl-gerichtete-Markierung konnten zwei weitere Signale Markierungs-spezifischen

Ionen/ Reporterionen zugeordnet werden. Diese könnten anhand der Fragmentspektren der einfachen Unterscheidung zwischen unmarkierten Cystein-freien Peptiden und markierten Cystein-haltigen Peptiden dienen. Dagegen konnten für die Amino-terminale Markierung keine Markierungsspezifischen Signale detektiert werden.

In der relativen Quantifizierung Metall-DOTA-markierter Einzelpeptide konnte ein linearer dynamischer Bereich von bis zu 10^3 erreicht werden und ein mittlerer relativer Fehler für Verhältnisse von 50:1 bis 0,5:1 unter 14%. Im Vergleich dazu konnte für die iTRAQ-Quantifizierung ein deutlich geringerer dynamischer Bereich und eine weniger genauere Quantifizierung erzielt werden. Auch die relative Quantifizierung einer 6-Protein-Mischung lieferte genauere Ergebnisse nach Derivatisierung mit NHS-DOTA als nach iTRAQ-Derivatisierung, wofür auch hier das Phänomen der *Underestimation* vor allem der extremeren Verhältnisse verantwortlich ist. Hinsichtlich der Anzahl der Peptididentifizierungen und der Sequenzabdeckungen lieferte die iTRAQ-Markierung jedoch bessere Ergebnisse. Die Amino-gerichtete DOTA-Derivatisierung bietet also für gezielte Fragestellungen, die eine genaue Quantifizierung extremer Verhältnisse oder umfassende Multiplexing-Kapazitäten erfordern, eine interessante Alternative zu bekannten Ansätzen.

Als applikatives Beispiel wurde die Amino-gerichtete Lanthanoid-DOTA-Markierung zur Quantifizierung des tryptischen Abbaus von Neurotensin sowie der Bildung der daraus entstehenden Spaltprodukte verwendet. Hierfür wurde ein Ansatz entwickelt der eine Proteolyse auf Basis der nativen, unmarkierten Substrate erlaubt und eine nachträgliche Derivatisierung der entstandenen Produkte bzw. verbleibenden Substrate impliziert. Zur Bestimmung der Substratkonzentrationen wurde ein Lutetium-markierter Substratstandard und dazu analog ein Ytterbium-markierter Produkt-Standard erzeugt. So konnten unter Verwendung 10 unterschiedlicher Lanthanoide die Produktbildung und der Substratabbau ausgehend von acht unterschiedlichen Substratkonzentrationen simultan untersucht werden. Zusätzlich konnten in einer komplexen Substratmischung, die aus einem GluC-Verdau einer 20 Protein-Mischung erzeugt wurde, die zeitabhängige Bildung von 71 Produkten und der Abbau von 50 Substraten mittels LC-MALDI MS und -MS/MS-Analyse bestimmt werden. Somit konnte die Kompatibilität der Methode mit dem LC-MALDI MS/MS-Arbeitsablauf nachgewiesen werden. Dies eröffnet die Möglichkeit einer ganzen Reihe verschiedener Aufgabenstellungen anhand entsprechender Peptidbibliotheken zu untersuchen. Neben verschiedenen Substratkonzentrationen könnten so auch Enzymvarianten oder verschiedene Inhibitoren untersucht werden. Wählt man entsprechende Substrate durch Anfertigung

spezieller Peptidbibliotheken, könnte bspw. auch der Einfluss benachbarter Aminosäuren auf die Enzymaktivität untersucht werden.

Abstract

Not only the identification of the expressed proteins but also the quantitative proteome analysis of an organism, a cell or tissue is a prerequisite to understand biological processes. The well-known methods of quantitative proteome analysis are characterized by a number of restrictions, advantages and disadvantages. Therefore the validation of contemporary methods and development of new sophisticated methods retain great importance. The MeCAT (*metal-coded affinity tags*) approach offers a promising alternative compared to well-established methods like ICAT (isotope-coded protein label) as it impossibles simultaneously the relative quantification of proteins by molecular MS (mass spectrometry), but also the absolute quantification of the corresponding proteins by ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry). The molecular peptide/protein information however has to be gained by soft ionization methods like ESI- (electrospray ionization-) or MALDI MS (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry). Also compared to isobaric methods like iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantification) or TMT (tandem mass tags), which are gaining more and more importance in quantitative proteomics, the MeCAT-method offers certain advantages, concerning high dynamic range in ICP-MS based quantification and straightforward absolute quantification.

In the first part of this work the successful identification of metal-DOTA labeled single peptides or digest derived peptide mixtures by (LC-)MALDI MS and MS/MS was shown for both amino-directed and sulfhydryl-directed-labeling. Furthermore the introduction of the metal label led in a number of cases to significantly increased signal-to-noise (S/N) ratios of the derivatized peptides compared to the underivatized counterparts, resulting in improved sensitivity. Occuring side-products were characterized as Na/K-adducts or loss of $-\text{CO}_2$ and $-\text{CH}_2\text{CO}_2$ (not concerning metalion loaded peptides). In some cases hydrolysis of DOTA-peptides, labeled at cysteines, was assumed, because of abundant +18 Da-adduct formation and confirmed by fragmentation behaviour. It was also shown, that the presence of the labels did alter the tandem mass spectrometric (MS/MS) behaviour regarding the sequence specific a-, b-, and y-ion series, in dependence of the label position within the peptide sequence. For cysteine-derivatized peptides several label-specific, so called reporter ions and the characteristic immonium ion of the labeled cysteine were identified, enabling a straightforward differentiation of fragment spectra between cysteine-free and cysteine peptides. For amino-directed labeling the immonium ion of ϵ -amino-labeled lysine was clearly identified, but no other label-specific ions were detected.

The relative quantification of metalion loaded DOTA-derivatized single peptides delivered an extended dynamic range up to three orders of magnitude and an average relative error of <14% for ratios ranging from 50:1 to 0.5:1. In comparison iTRAQ-quantification of single peptides was less accurate and delivered a more restricted dynamic range. Furthermore relative quantification of 6-protein mixture the amino-directed DOTA labeling approach delivered more accurate results compared to iTRAQ; most likely also due to underestimation of the more extreme ratios in iTRAQ-quantification. Regarding qualitative results, with iTRAQ quantification a significant higher number of peptide identifications and higher sequence coverages were achieved. Therefore our results clearly show, that metal-DOTA labeling offers as alternative tagging strategy certain advantages interesting for targeted issues e.g. an extended dynamic range, high multiplexing capacities and the accurate determination of extreme ratios.

Exemplarily amino-directed DOTA-labeling was used to quantify tryptic degradation of the peptide neurotensin and to determine the product concentration, which was formed during the proteolysis. In order to monitor tryptic activity starting with native substrates our approach included a quenching step followed by the derivatization procedure. To determine substrate concentration, Lutetium labeled internal standard was generated and analogously an ytterbium labeled product standard. Using 10 different lanthanoides simultaneous product formation and substrate consumption starting from 8 different substrate concentrations were analyzed in parallel. Additionally the time-dependent behaviour of 71 different products and 50 substrates was analyzed in a complex substrate environment deriving from Glu-C digest of 20 proteins. The compatibility of the method with the LC-MALDI MS/MS workflow was therefore also demonstrated. These results offer the future perspective for the monitoring of protease activities with a wide range of biochemical and biotechnological issues. Not only different substrate could be analyzed in parallel, but also enzyme variants, inhibitors or, choosing appropriate peptide libraries, the influence of neighbouring amino acids on enzyme activity.

I. Einleitung

I.1 Proteomanalyse

Während sich die klassische Proteinanalytik im Allgemeinen mit der Bestimmung von Primär- bis hin zur Quartärstruktur, sowie mit Proteinaktivitäten befasst, ist in der Proteomanalyse oder Proteomik, die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Organismus oder eines Gewebes unter genau definierten Bedingungen der Untersuchungsgegenstand (Wasinger *et al.* 1995).

In diesem Sinne wurde 1994 von Marc Wilkins auf dem Kongress "*2D Electrophoresis: from protein maps to genomes*" in Siena der Begriff **Proteom** eingeführt – mit dem genauen Wortlaut: "**Proteome**: the **PROTE**in complement expressed by a **genOME**, cell or tissue.", was übersetzt heißt: "Proteom: das **PROTE**inkomplement, das vom **GenOM** einer Zelle oder eines Gewebes exprimiert ist" (Marc Wilkins, September 5, 1994).

Im Gegensatz zum Proteom handelt es sich beim Genom um mehr oder weniger statische Baupläne, deren Wirkung erst über Proteine vermittelt werden muss. Zur Identifizierung einzelner für Krankheit, Wachstum oder Anpassung verantwortliche Proteine ist somit die genaue Analyse der Proteinzusammensetzung einer Zelle von großer Bedeutung, die bspw. in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen oder dem biologischen Zustand variiert. Während die Anzahl der Protein-kodierenden Gene des humanen Genoms nur auf ca. 22 500 geschätzt wird, können aus diesen Genen unter Berücksichtigung alternativen Spleißens und posttranslationaler Modifikationen bis zu 500 000 unterschiedliche Proteine entstehen (Pertea & Salzberg 2010; Anderson & Anderson 1998). Die Proteomanalyse hat es sich zur Aufgabe gemacht aus dieser Vielzahl von Proteinen die Präsenz oder das Fehlen einzelner Proteine, ihre Kopienanzahl oder eventuelle Modifikationen zu untersuchen (siehe Abbildung 1.1).

Um aus den komplexen Proteinmischungen Informationen zu einzelnen Proteinen gewinnen zu können, macht sich die Proteomanalyse zum einen verschiedene chromatographische (bspw. RP (*Reversed Phase*) Chromatographie) oder elektrophoretische Methoden (bspw. Gelelektrophorese, Kapillarelektrophorese und IEF (isoelektrische Fokussierung)) der Proteintrennung zunutze. Zum anderen müssen massenspektrometrische Verfahren zur Proteinquantifizierung und Identifizierung herangezogen werden. Zur Analyse der anfallenden enormen Datenmengen müssen schließlich bioinformatische Methoden zum Einsatz kommen, die einen immer größeren Stellenwert einnehmen. Der medizinische

Nutzen, bzw. das Ziel der Proteomik, ist die Rolle der Proteine in biologischen Prozessen so weit aufzuklären, dass einzelne Proteine mit Krankheiten korreliert werden können. Dadurch können sie als diagnostische Marker und schließlich auch als Angriffspunkte für Medikamente dienen. Somit ist auch eine tiefere Einsicht in die Mechanismen bzw. zellulären Reaktionsketten, in die Proteine involviert sind, notwendig.

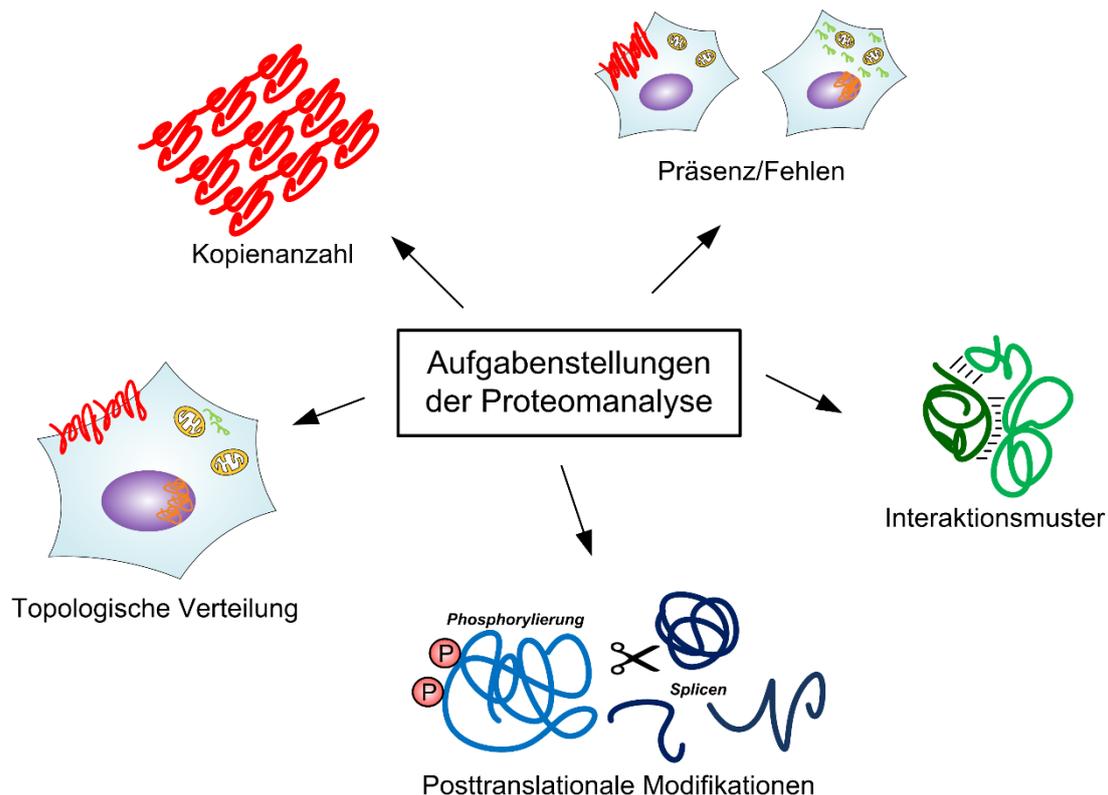


Abb. 1.1: Ausgewählte Fragestellungen der Proteomanalyse

Prinzipiell ist der Arbeitsablauf der Proteomanalyse in drei Schritte gegliedert: die Probenvorbereitung, die massenspektrometrische Analyse und die darauffolgende Datenauswertung (siehe Abbildung 1.2). Die Probenvorbereitung beginnt mit der Probenentnahme bspw. aus Zellkultur oder einem Gewebe. Darauf folgt die Proteingewinnung bzw. Proteinextraktion, die in Abhängigkeit von der Art des zu untersuchenden (Sub-)Proteoms variieren kann. Zur Extraktion des Membranproteoms bspw. können Detergenzien benötigt werden (Churchward *et al.* 2005), während die Subproteome verschiedener Organellen durch differentielle Zentrifugation voneinander getrennt werden (Casey *et al.* 2007). Nach der Proteinextraktion erfolgt dann eine Trennung der Probe auf Protein oder Peptidebene mit Hilfe der Chromatographie, Gelelektrophorese oder

Isoelektrischer Fokussierung. Die Methoden werden im Kapitel I.3 Trennverfahren näher erläutert.) Nun wird grundlegend unterschieden ob es sich bei der in das Massenspektrometer (MS) eingeführten Probe um Proteine oder Peptide handelt. Erfolgt die nachfolgende massenspektrometrische Analyse auf Ebene der intakten Proteine bezeichnet man sie als *top-down*-Ansatz. Für die Bestimmung der Proteinmassen werden hier hochauflösende Massenspektrometer wie Orbitrap-MS oder FT-ICR (Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz)-Geräte benötigt (Bondarenko *et al.* 2009; Bogdanov & Smith 2005). Im Anschluss daran kann eine Fragmentierung der Proteine durch ECD/ETD (*electron capture dissociation/ electron transfer dissociation*) oder MALDI-ISM (*matrix-assisted laser desorption/ionization-in source decay*) erfolgen (Reid & McLuckey 2002; Kevin Demeure 2007), wobei hier keine automatisierte Datenbanksuche verfügbar ist und die Auswertung über *de novo*-Sequenzierung (Horn *et al.* 2000; Horn *et al.* 2000) oder die *expressed-sequence-tag*-Methode (EST) (Mørtz *et al.* 1996) erfolgt. Die Vorteile des *top-down*-Ansatzes liegen bspw. in der Identifizierung von Spleißvarianten und posttranslationalen Modifikationen (Sze *et al.* 2002), die Nachteile in der geringeren Sensitivität und Automatisierbarkeit.

Im Gegensatz dazu werden die Proteine im *bottom-up* Ansatz vor der massenspektrometrischen Analyse einer Proteolyse, meist mit einer spezifischen Protease wie Trypsin, unterzogen. Die dabei entstandenen Peptide werden weiter untersucht (Aebersold & Mann 2003; Chait 2006). Beim klassischen Ansatz, wie der PMF (*peptide mass fingerprint*)-Analyse werden die Proteine vor dem Verdau meist mit 2-dimensionaler Gelelektrophorese getrennt und dann aus dem Gel verdaut. Werden die Proteine bereits vor der Trennung verdaut, so spricht man von einem Shotgun-Ansatz (Washburn *et al.* 2001; Wolters *et al.* 2001). Die Peptide werden meist mit *collision-induced dissociation* (CID = *collision-induced dissociation*) fragmentiert. Die Fragmentspektren dienen dann zur Identifizierung der Proteine. Die Datenauswertung erfolgt hierbei meist vollautomatisch mit Datenbanken wie Mascot (Perkins *et al.* 1999) oder Sequest (Eng *et al.* 1994). Die Shotgun-Methode bietet einerseits die Vorteile einer höheren Sensitivität und dass eine Trennung der Peptide in der Umkehrphasenchromatographie mit hoher Auflösung möglich ist. Außerdem sind verschiedene andere Trennmodi für Peptide verfügbar und gut etabliert (Gilar *et al.* 2005).

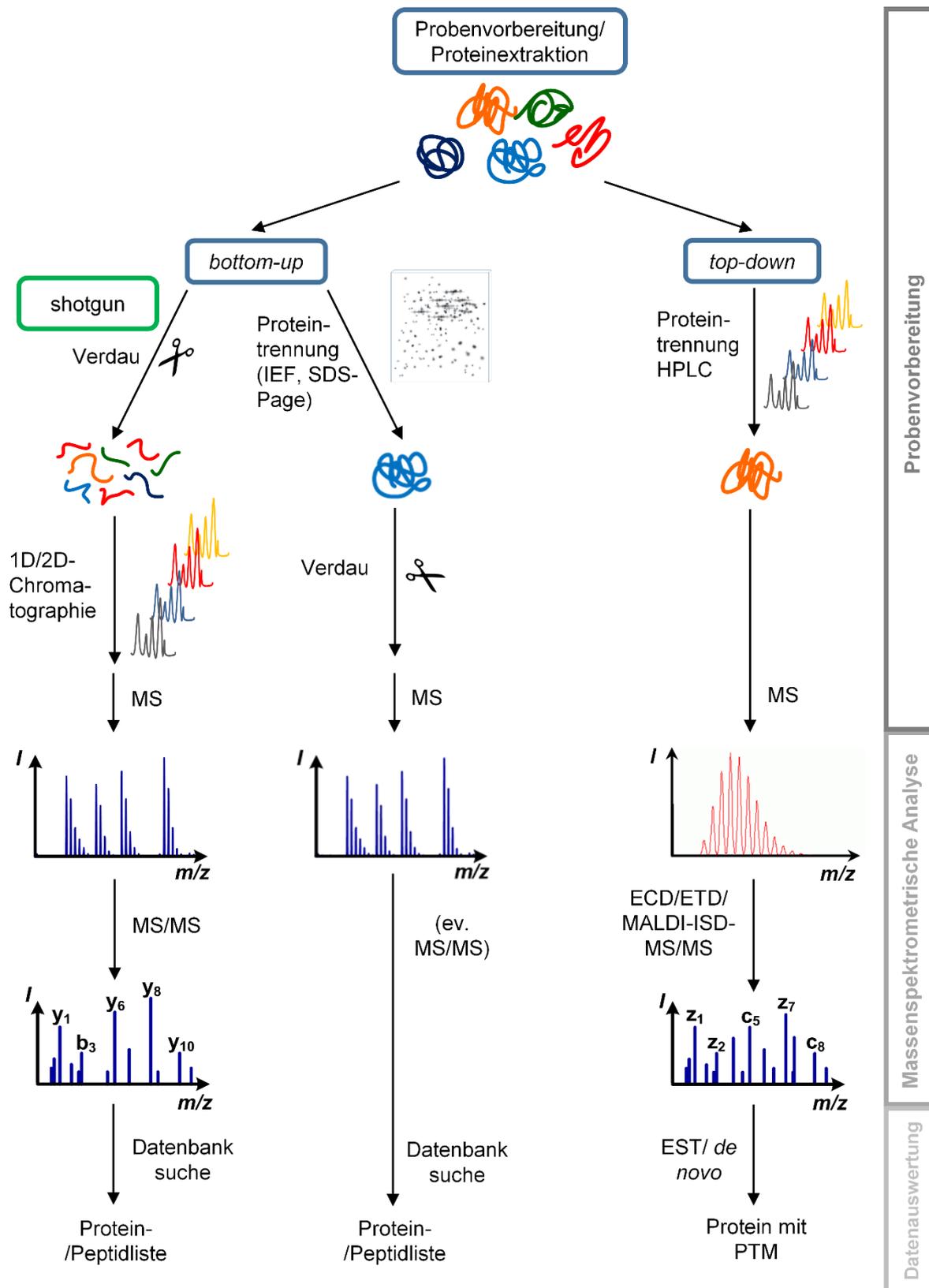


Abb. 1.2: Arbeitsablauf der Proteomanalyse. Je nach Art der ins Massenspektrometer injizierten Probe unterscheidet man zwischen *bottom-up*-Analyse (links), die von Peptiden ausgeht und *top-down*-Analyse (rechts), die auf Ebene der intakten Proteine erfolgt.

Auch durch die gute Automatisierbarkeit der Datenauswertung und die große Auswahl an Software und Suchmaschinen haben sich *bottom-up*-Ansätze immer mehr durchgesetzt. Als Nachteile sind zu nennen, dass bei der *bottom-up* Analyse keine Informationen über Spleißvarianten von Proteinen zugänglich sind und labile Modifikationen häufig verloren gehen. Außerdem werden häufig niedrig abundante Peptide bei der Analyse der hochkomplexen Proben nicht erfasst (Picotti *et al.* 2007; Picotti *et al.* 2009).

I.2 Quantitative Proteomanalyse

Für viele Fragestellungen reicht die reine Identifizierung welche Proteine zu einem gegebenen Zeitpunkt innerhalb einer Zelle exprimiert sind nicht aus. Zusätzlich zur qualitativen Analyse, die das Ziel hat möglichst alle Proteine eines bestimmten Zustandes zu erfassen, müssen quantitative Methoden herangezogen werden, die bspw. Informationen darüber liefern ob ein Protein unter bestimmten Bedingungen in verminderter oder erhöhter Kopienzahl vorliegt. Der dynamische Bereich der Proteinkonzentrationen einer Zelle ist hier sehr groß – für wenig komplexe Zellen wie Hefezellen bis zu 10^4 für menschliche Zellen jedoch bis zu 10^8 und für Plasma 10^{12} Größenordnungen. (Corthals *et al.* 2000; Anderson & Anderson 1998; Chen *et al.* 2005)– sodass leistungsfähige Trenn-Methoden benötigt werden oder eine Abreicherung der hochabundanten Proteine notwendig ist. Ganz allgemein unterscheidet man zwischen relativer bzw. differentieller Quantifizierung, die immer zwei unterschiedliche Zustände miteinander vergleicht und der absoluten Quantifizierung die zur Bestimmung der Kopienzahl oder Menge bestimmter Proteine in einer Zelle dient. Aufgrund unterschiedlicher Ionisationseffizienzen und/oder Detektierbarkeit der vielen Peptide einer Probe ist die massenspektrometrische Analyse an sich nicht quantitativ, d.h. die Peakintensität spiegelt nicht direkt die Menge eines Analyten in einer Probe (im Vergleich zu einem anderen Analyten) wieder. Somit ist eine direkte absolute Quantifizierung nicht möglich. Als interne Standards müssen darum bspw. synthetische, mit stabilen Isotopen markierte, Peptide verwendet werden. Diese werden in genau bekannten Konzentrationen der zu analysierende Probe zugegeben, denn die Unterschiede in den Peakintensitäten desselben Analyten in verschiedenen Proben spiegeln genau die relativen Konzentrationsunterschiede wieder. Diese, als AQUA-Methode (*absolute quantification of proteins*) bezeichnete Methode, erlaubt zwar auch die Quantifizierung posttranslationaler Modifikationen (PTM), ist aber sehr kostenintensiv und somit auf die Analyse weniger Proteine beschränkt (Gerber *et al.* 2003). Eine weitere, sehr gebräuchliche aber ebenfalls kosten- und zeitintensive relative Quantifizierungsmethode stellt die Markierung der Proben mit stabilen Isotopen dar.

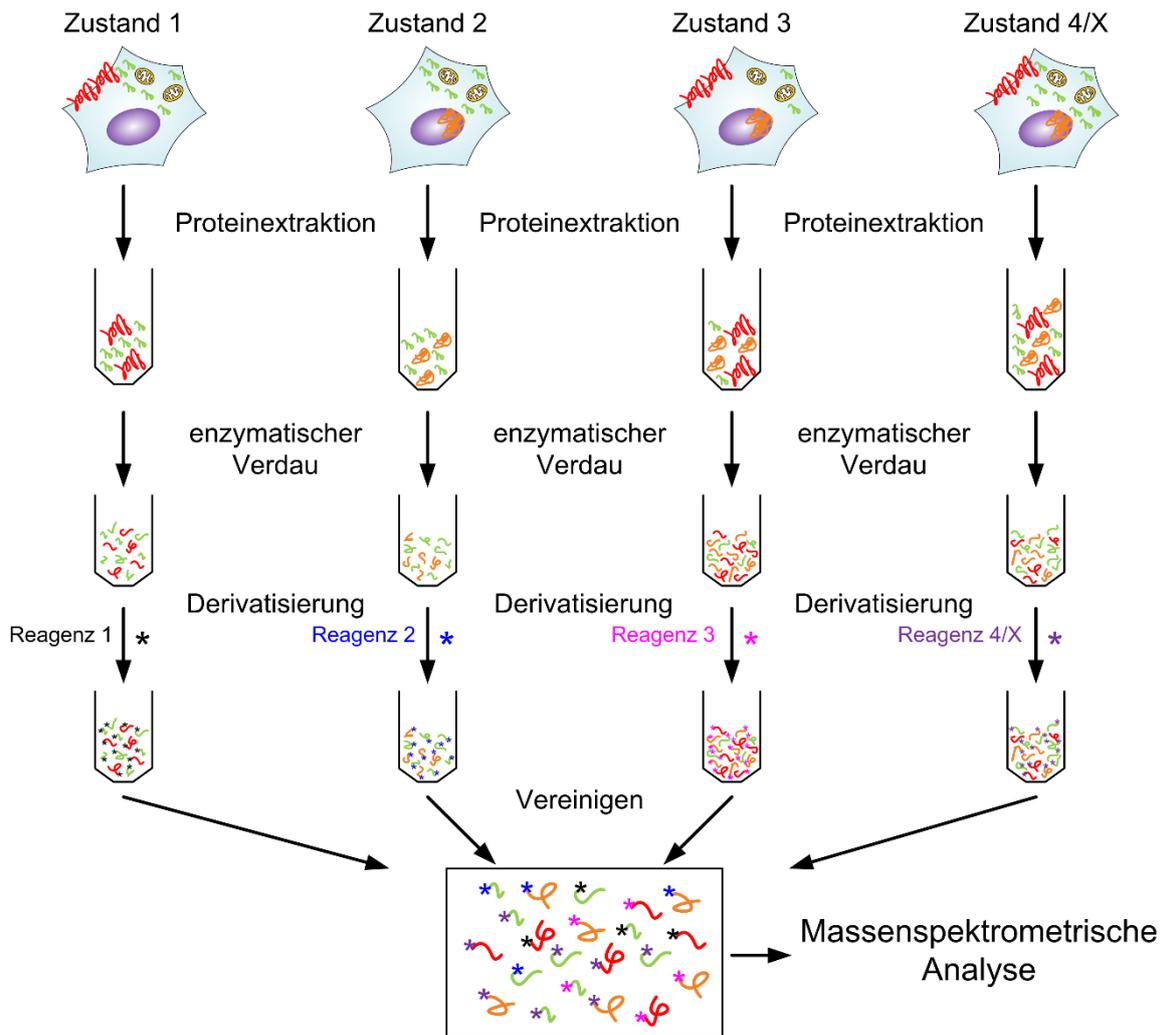


Abb. 1.3: Schematischer Arbeitsablauf zur relativen Quantifizierung unterschiedlicher Proteomproben. Die Anzahl der erhältlichen Derivatisierungsreagenzien bestimmt wie viele Proben gleichzeitig untersucht werden können. Sind vier unterschiedliche Reagenzien verfügbar können jedoch bspw. auch biologische oder technische Replikate von zwei unterschiedlichen Zuständen analysiert werden.

Diese ermöglicht eine Unterscheidung identischer Proteine aus unterschiedlichen Proben, sodass eine gemeinsame MS-Analyse erfolgen kann. Die Markierung mit stabilen Isotopen kann dabei metabolisch, chemisch oder enzymatisch erfolgen. Der schematische Arbeitsablauf zur relativen Quantifizierung unterschiedlicher Proteomproben ist exemplarisch für die chemische Derivatisierung in Abbildung 1.3 dargestellt.

Eine Übersicht über ausgewählte Methoden zur metabolischen, chemischen oder enzymatischen Einführung stabiler Isotope bietet Tabelle 1.1; die Strukturen der dazugehörigen Derivatisierungsreagenzien sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

Zur enzymatischen Markierung der Proteine macht man sich zunutze, dass bei der Spaltung der Peptidbindung formal ein (oder 2) Wassermoleküle addiert werden. Durch die Verwendung von schwerem Wasser (H_2^{18}O) wird in den Carboxyterminus, des beim Verdau entstehenden Peptids das Sauerstoffisotop ^{18}O eingeführt (Schnölzer *et al.* 1996). Dadurch entstehen Peptide die um 2, bzw. 4 Da schwerer sind als die Referenzprobe, deren Verdau in unmarkiertem Wasser durchgeführt wird. Dieser Ansatz ist auf den Vergleich zweier Proben beschränkt.

Die Einführung von ICAT (*isotope-coded affinity tag*) 1999 durch die Arbeitsgruppe Gygi war ein wichtiger Meilenstein für die Weiterentwicklung der chemischen Markierungsstrategien. Das ICAT-Reagenz wurde in einer schweren und leichten Form entwickelt und besitzt neben einer Cystein-reaktiven Gruppe einen Biotin-*tag* zur Affinitätsaufreinigung (Gygi *et al.* 1999). Danach wurden bspw. isobare Markierungsverfahren wie iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) (Ross *et al.* 2004) oder TMT (*tandem mass tags*) (Thompson *et al.* 2003) entwickelt. Bei beiden Methoden erfolgt in meistens eine Amin-gerichtete Derivatisierung auf Peptidebene. Wie in Abbildung 1.3 gezeigt werden die unterschiedlichen Zustände/Proben mit einem der unterschiedlichen Reagenzien markiert, wobei für iTRAQ bis zu 8 verschiedene (Pottiez *et al.* 2012) erhältlich sind und für TMT bis zu 10 verschiedene (McAlister *et al.* 2012; Werner *et al.* 2014). Die unterschiedlichen Massen der Reportergruppen werden durch die Balancergruppen, die sich nach Derivatisierung zwischen Peptid und Reporter befinden, ausgeglichen. Somit entstehen isobare Peptide (Abbildung 1.4). Die unterschiedlichen markierten Proben können dann vereinigt werden, chromatographisch getrennt und der MS-Analyse unterzogen werden. Erst in der MS/MS-Analyse werden die Reportergruppen (und auch die Balancergruppe) abgespalten und die Flächen der Reporterionenpeaks zur Quantifizierung miteinander verglichen werden.

Als weitere chemische Markierungsmethoden sind bspw. ICPL (*isotope-coded protein label*) und cICAT zu nennen (Schmidt *et al.* 2005; Hansen *et al.* 2003). Im *cleavable* ICAT-Reagenz (cICAT) ist eine säurespaltbare Gruppe vorhanden, sodass nach gemeinsamer Aufreinigung der differentiell markierten Proben der Biotin-*tag* zur Erleichterung der massenspektrometrischen Identifizierung abgespalten werden kann (Hansen *et al.* 2003). Eine Alternative dazu, besteht in der Verwendung eines Festphasen-ICAT Reagenz (Zhou *et al.* 2002). Beim Festphasen-ICAT sind zwei unterschiedliche *beads* verfügbar, an die entweder die leichte oder die schwere Form des Derivatisierungsreagenz gekoppelt ist. Nach

Derivatisierung mit den Cystein-haltigen Peptiden können die nicht Cystein-haltigen Peptide durch Waschen der *beads* entfernt werden. Da zwischen *beads* und Isotopen-tag eine photospaltbare Gruppe sitzt, können die derivatisierten Peptide durch Bestrahlung abgespalten und daraufhin massenspektrometrisch analysiert werden.

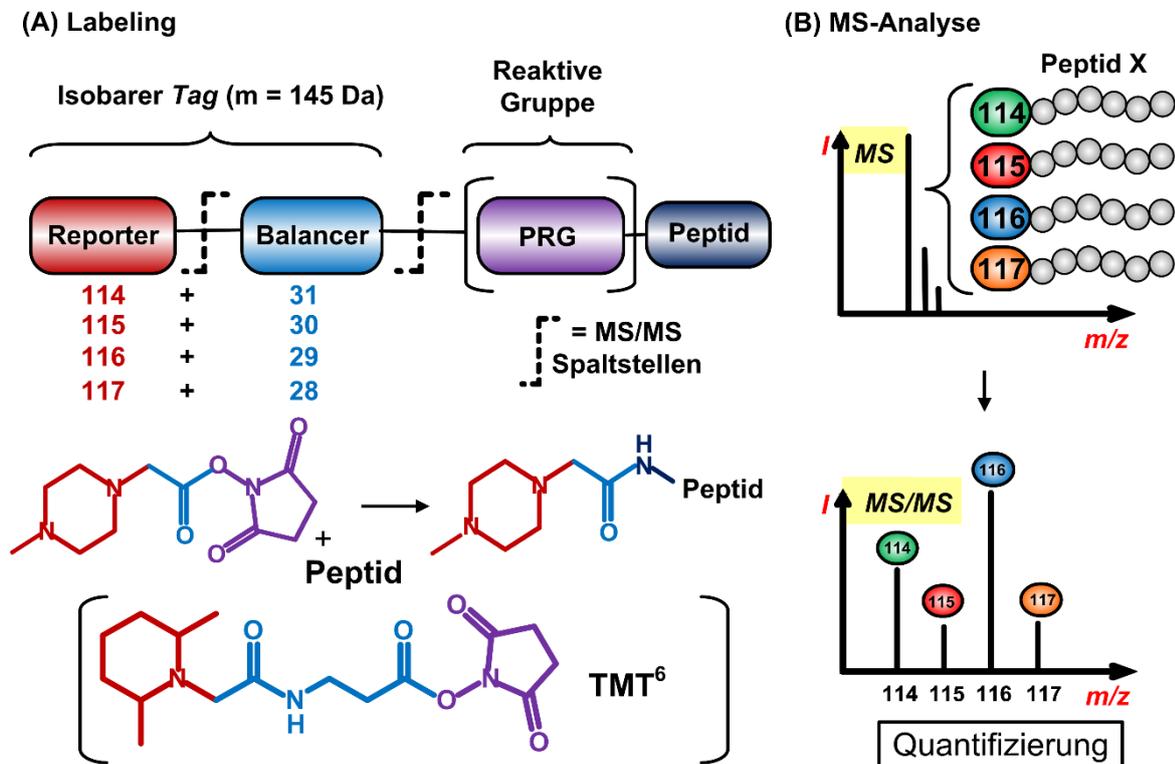


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der iTRAQ-Quantifizierungsstrategie. (A) Die Derivatisierung erfolgt durch Reaktion der primären Amine der Peptide mit dem NHS (N-Hydroxysuccinimid)-Ester der Protein-reaktiven Gruppe. (B) Da es sich bei den differenziell markierten Peptiden um isobare Peptide handelt, basiert die relative Quantifizierung auf den Peakflächen der Reporterionen aus der MS/MS-Analyse.

Wie auch bei ICAT und cICAT handelt es sich bei ICPL um eine nichtisobare Markierungsstrategie. Die reaktive Gruppe stellt hier ein NHS-Ester dar, sodass die Amino-Termini und ϵ -Aminogruppe der Lysin-Seitenkette markiert werden (Schmidt *et al.* 2005). Hinsichtlich der metabolischen Markierung ist als erstes großes Projekt die Markierung ganzer Hefe-Zellen von Brian Chait's Gruppe zu nennen. (Oda *et al.* 1999). Auch die Proteine von Säugetierorganismen wurden durch das Füttern ¹⁵N-markierter Nahrung dem *metabolic protein labeling* unterzogen (Wu *et al.* 2004). Eine Weiterentwicklung dieser Technik stellt die SILAC-Methode (*stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture*) dar, wobei Zellen dadurch markiert werden, dass sie in Zellkultur auf Aminosäuren kultiviert werden, die leichte oder schwere Isotope enthalten (Ong *et al.* 2002).

Alle im Text beschriebenen relativen Quantifizierungsmethoden sind in Tabelle 1.1 aufgelistet und eingeordnet. Die Strukturen der dazugehörigen Reagenzien sind in Abbildung 1.5 aufgeführt.

Tab. 1.1: Reagenzien zur Einführung stabiler Isotope.

Name	Reagenz	Reaktive Gruppe	Mod. funkt. Gruppe	Referenz	Einordnung	MS	MS/MS
<i>Isotope-coded affinity tags</i>	ICAT	Iod-acetamid	Thiole	Gygi 1999	chemisch, nicht isobar	X	
<i>Cleavable Isotope-coded affinity tags</i>	cICAT	Iod-acetamid	Thiole	Hansen 2003	chemisch, nicht isobar	X	
<i>Solid phase isotope tagging</i>	<i>Solid phase</i> ICAT	Iod-acetamid	Thiole	Zhou 2002	chemisch, nicht isobar		X
<i>Isobaric-tags for relative and absolute quantitation</i>	iTRAQ	NHS-Ester	Amine	Ross 2004	chemisch, isobar		X
<i>Tandem mass tags</i>	TMT	NHS-Ester	Amine	Thompson 2003	chemisch, isobar	X	
<i>Isotope-coded protein label</i>	ICPL	NHS-Ester	Amine	Schmidt 2005	chemisch, nicht isobar	X	
<i>(Metal) Element-coded affinity tags</i>	(M)ECAT	Brom-acetamid	Thiole	Whetstone 2004	chemisch, nicht isobar	X	
<i>Proteolytic ¹⁸O-labeling</i>	H ₂ ¹⁸ O		C-Termini	Schnölzer 1996	enzymatisch, nicht isobar	X	
<i>¹⁵N-labeling</i>	¹⁵ N-Medium		N-Atome	Oda 1999	metabolisch, nicht isobar	X	
<i>Stable isotope labeling for amino acids in cell culture (SILAC)</i>	Markierte Aminosäuren			Ong 2002	metabolisch, nicht isobar	X	

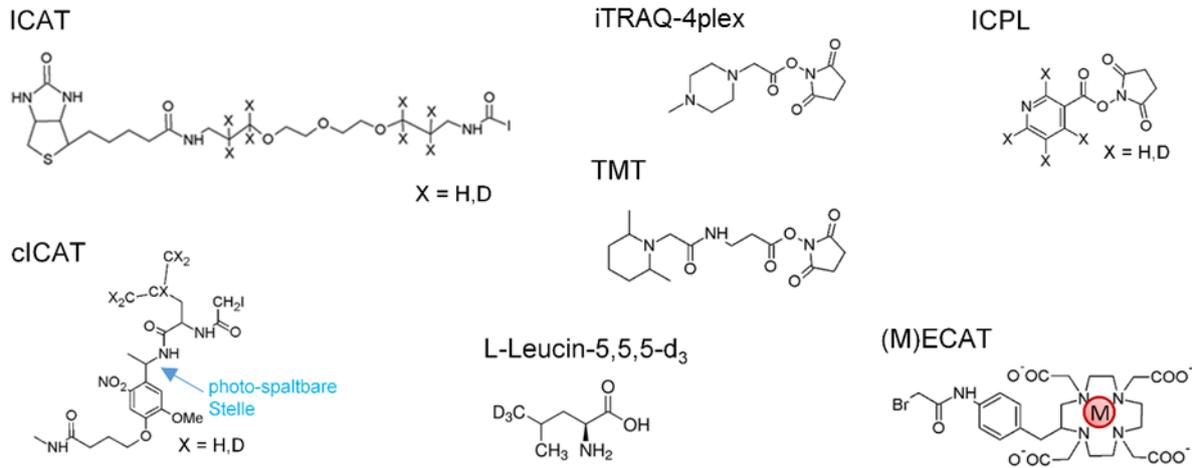


Abb. 1.5: Struktur ausgewählter Reagenzien zur Einführung stabiler Isotope.

Eine Sonderstellung nimmt die MeCAT-Methode (*metal-coded affinity tags*) ein. Es handelt sich hierbei zwar um eine chemische Markierung, jedoch werden die Proben nicht mittels stabiler Isotope differentiell markiert, sondern über bestimmte Metallionen, die bspw. über Chelatoren an die Analyten gebunden werden (Abbildung 1.6). Zum anderen nimmt die MeCAT-Methode auch deshalb eine Sonderstellung ein, da sie mit der Element-Massenspektrometrie kombinierbar ist. Dies erlaubt eine absolute Quantifizierung des am MeCAT-Reagenz gebundenen Metallions, das wiederum an das Peptid oder Protein gekoppelt ist (Whetstone *et al.* 2004; Ahrends *et al.* 2007).

Erstmals wurde die Verwendung eines MeCAT-Reagenz zur absoluten und relativen Peptid-Proteinquantifizierung mit Hilfe der ICP (*inductively coupled plasma*)-MS und ESI (*electrospray ionization*)-MS bei Ahrends *et al.* 2007 beschrieben (Ahrends *et al.* 2007). Die Kalibrierung des ICP-MS erfolgt dabei mit Hilfe von Protein- bzw. Peptidunabhängigen Metall(ionen)standards. Dadurch wird die Methode wesentlich flexibler gegenüber bspw. der AQUA-Methode. Des Weiteren bietet die Quantifizierung über die ICP-MS die Vorteile einer sehr geringen Nachweisgrenze für Lanthanoide bis in den pg/l-Bereich (<0,1-1 ng/l) (Tholey & Schaumlöffel 2010) und einen linearen dynamischen Messbereich von bis zu 12 Größenordnungen (Thermo Finnigan 2005; Ahrends *et al.* 2007). Auch die Multiplexingkapazitäten sind bei Verwendung von Lanthanoiden vergleichsweise hoch.

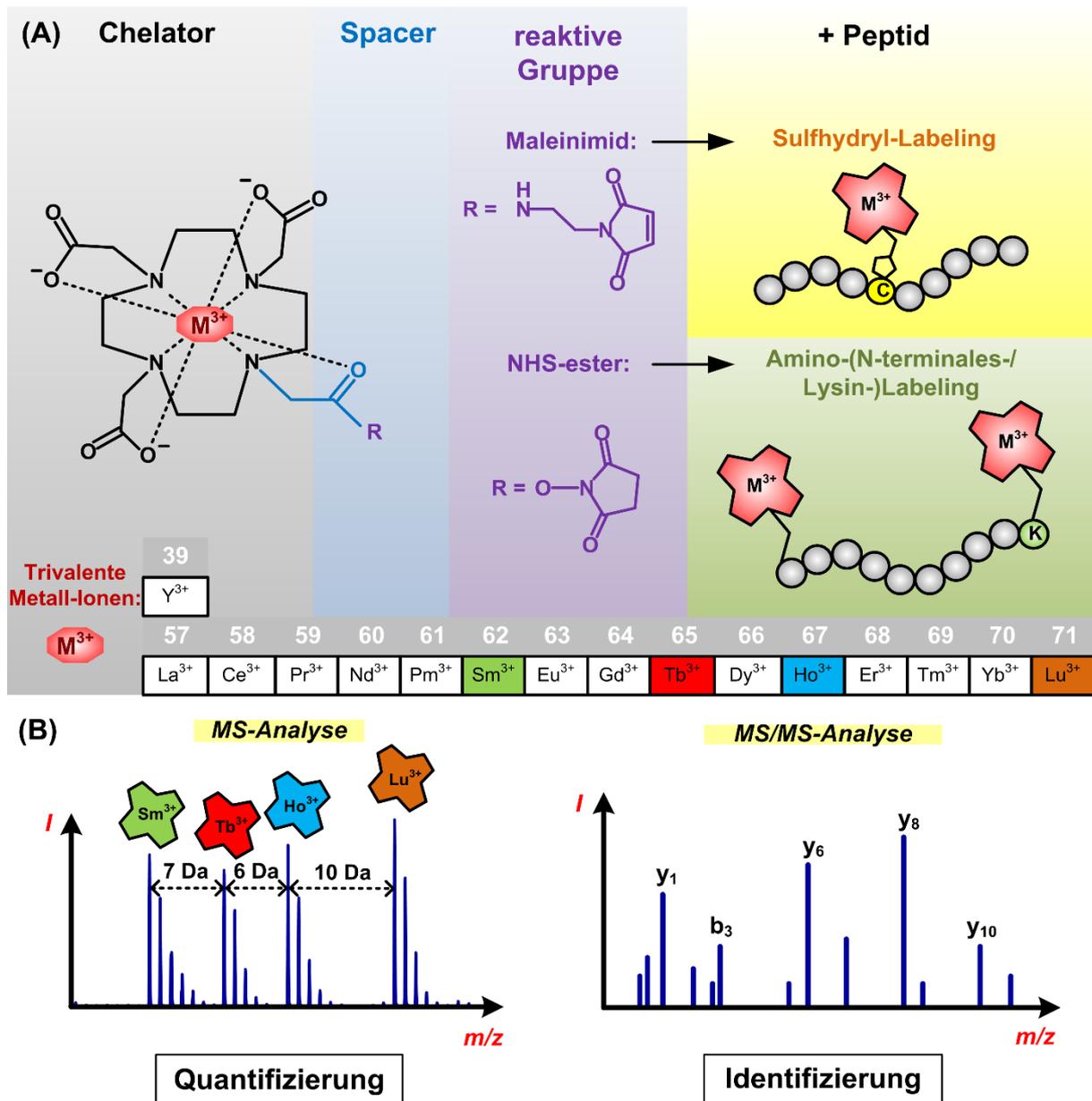


Abb. 1.6: (A) Quantifizierungsstrategie von MeCAT mittels molekularer Massenspektrometrie. Peptidmarkierungsstrategie. (B) Vorläuferionen-basierte Quantifizierung während der MS-Analyse und Erzeugung von Fragmentspektren zur Identifizierung.

In Abbildung 1.7 ist dargestellt wie die MeCAT-Methode innerhalb der anderen Quantifizierungsstrategien einzuordnen ist.

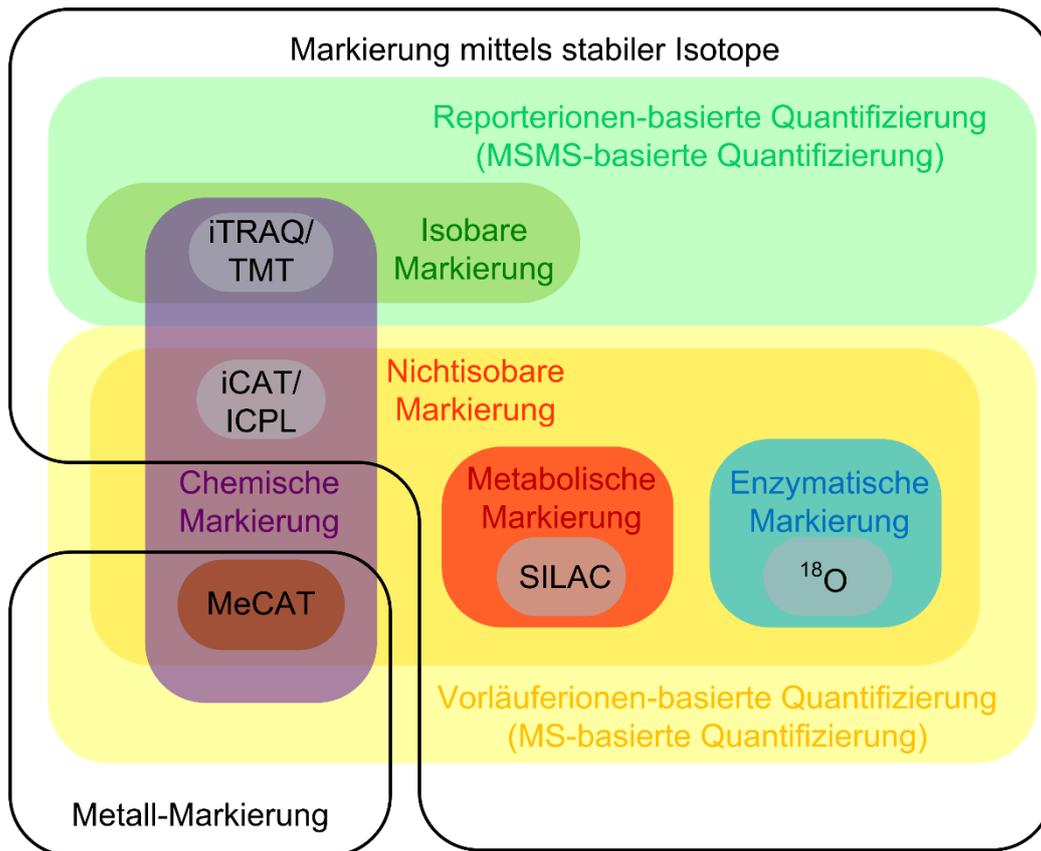


Abb. 1.7: Einordnung der MeCAT-Quantifizierung innerhalb der gängigsten Quantifizierungsstrategien.

I.3 Trennverfahren

I.3.1 2-dimensionale Gelelektrophorese

Eines der leistungstärksten Verfahren zur Trennung von Proteinen stellt die 2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) dar, die 1975 zeitgleich von Colin und O'Farrell entwickelt wurde (O'Farrell 1975; Klose 1975). Die 2D-Gelelektrophorese wurde weiterentwickelt und optimiert, so dass heutzutage eine Auflösung von bis zu 10000 Proteinen möglich ist (Galeva *et al.* 2003). Hierbei wird in der ersten Dimension eine isoelektrische Fokussierung verwendet. Die Proteine wandern entsprechend ihrer Netto-Ladung in einem pH-Gradienten an dem ein elektrisches Feld angelegt ist (Abbildung 1.8 A). Die Netto-Ladung ergibt sich aus den geladenen Aminosäureresten, sowie dem Carboxy- und Amino-Terminus und ist abhängig vom pH-Wert. Der pH-Wert an dem die Nettoladung null ist, d.h. gleich viele Säuregruppen negativ geladen sind wie Aminogruppen positiv, wird als isoelektrischer Punkt bezeichnet. An diesem Punkt wandern die Proteine nicht mehr und werden somit fokussiert. Durch die Entwicklung der immobilisierten pH-Gradienten wurde

die Reproduzierbarkeit dieser Technik erheblich erhöht (Corbett *et al.* 1994; Görg *et al.* 2004). In der zweiten Dimension erfolgt die Trennung nach der Proteinlänge (Größe). Die nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennten Proteine werden einer SDS (*sodium dodecyl sulfate*)-PAGE unterzogen. Hierbei wandern die kleineren Proteine schneller durch das als Molekularsieb wirkende Polyacrylamid-Gel als die großen Proteine (Abbildung 1.8 C). Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass die komplette Analyse im wässrigen Milieu stattfindet. Membranproteine bzw. hydrophobe Proteine können nicht oder nur schwer erfasst werden. Des Weiteren können hochabundante Proteinspots trotz hoher Trennleistung die niedrig abundanteren überlagern und damit deren Identifizierung erschweren oder deren Quantifizierung sogar verhindern. Auch die Trennung besonders basischer Proteine ist eher ineffizient.

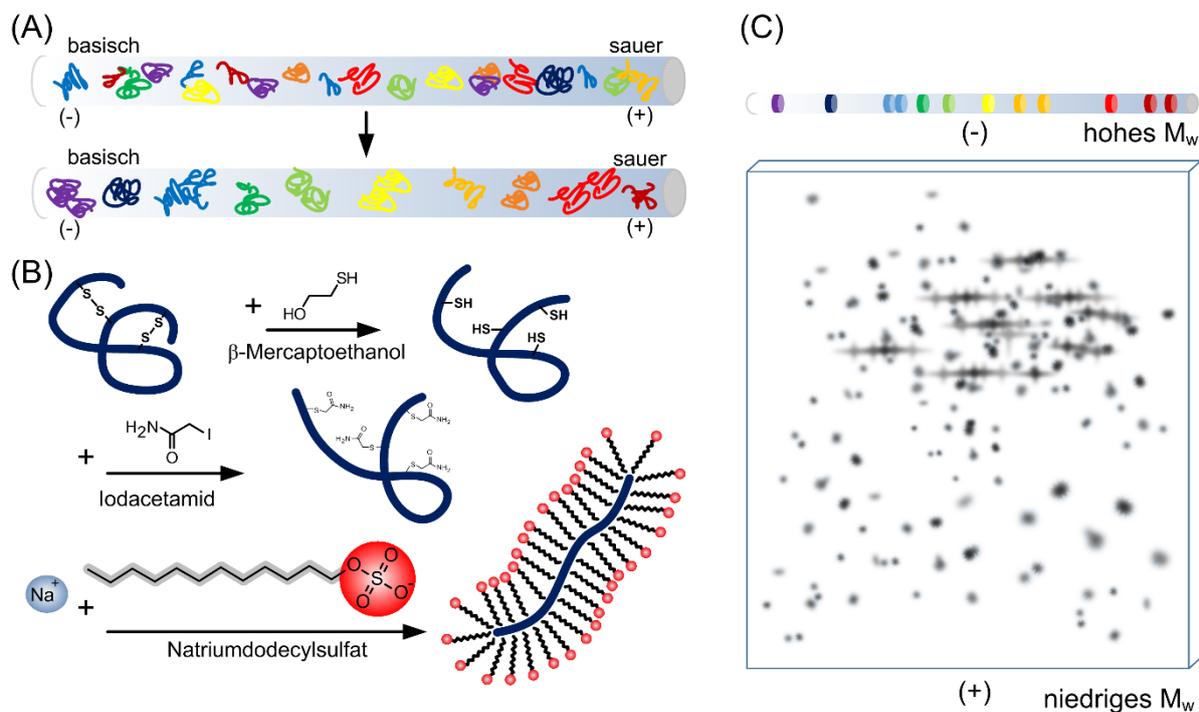


Abb. 1.8: 2D-Gelelektrophorese. (A) Isoelektrische Fokussierung der Proteine in der ersten Dimension. (B) Äquilibration vor der zweiten Dimension: Disulfidbrücken werden reduziert und bspw. mit Hilfe von Iodacetamid alkyliert. (C) Die zweite Dimension stellt die SDS-PAGE dar. Die Proteine werden nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei die kleineren Moleküle schneller durch die Poren des Gels wandern.

I.3.2 Chromatographische Trennverfahren

Im Gegensatz zur 2D-Gelelektrophorese stellte sich die chromatographische Trennung bzw. die Kombination verschiedener chromatographischer Trennmodi als geeignet zur Analyse

sowohl löslicher als auch Membranproteine dar. Häufig kommt zur Trennung von Vollproteomen eine Kombination von Kationen-Austausch-Chromatographie (*strong cation exchange* SCX) und Umkehrphasen-Hochleistungschromatographie (RP-HPLC) (Gilar *et al.* 2005) oder genauer Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie (IP-RP) (Molnár & Horváth 1977) zum Einsatz. Während sich die SCX elektrostatische Interaktionen der Proteine (oder Peptide) zunutze macht, sind bei der RP-HPLC hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären Phase das zugrunde liegende Trennprinzip. Durch den Einsatz zusätzlicher Reagenzien wie TFA (*trifluoressigsäure*) oder HFBA (Heptafluorbuttersäure) werden die hydrophoben Wechselwirkungen zusätzlich mit elektrostatischen Wechselwirkungen kombiniert. Dies wird demzufolge als Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie (IP-RP) bezeichnet (Chen *et al.* 1993; Melander *et al.* 1989). Die Wechselwirkungen zwischen Peptid und stationärer Phase bei den unterschiedlichen Trennmodi sind in Abbildung 1.9 dargestellt.

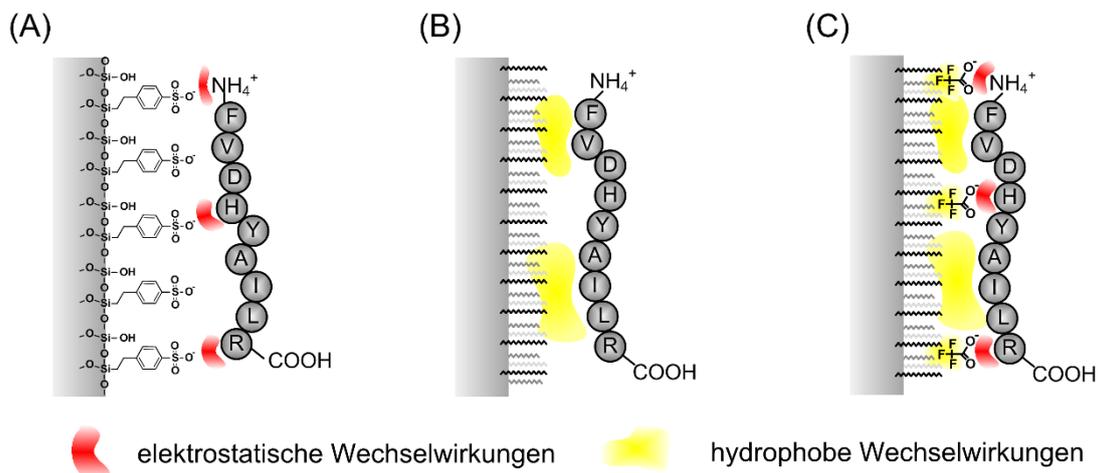


Abb. 1.9: Chromatographische Trennverfahren zur Proteomanalyse: Ionenaustausch bzw. *strong cation-exchange* Chromatographie (A), Reversed-Phase Chromatographie (B) und Ionenpaar-Reversed-Phase Chromatographie (C).

Die im Folgenden genannten Entwicklungen führten zu einer Verbesserung der Auflösung und Trenneffizienzen der chromatographischen Trennung von Peptiden. Durch die Miniaturisierung von mikro- bis hin zu nano-HPLC-Systemen wurde bspw. eine direkte Kopplung der Chromatographie mit der ESI-Massenspektrometrie ohne *Split* möglich (Whitehouse *et al.* 1985; Meiring *et al.* 2002). Die Einführung monolithischer Säulen ermöglicht eine schnelle Trennung von Peptiden und Proteinen mit sehr guter Trennleistung (Oberacher *et al.* 2004; Huber *et al.* 1997; Premstaller *et al.* 2001). Auch die Kombination verschiedener (orthogonaler) chromatographischer Trennmodi ist für die Trennkapazität entscheidend. So konnten Gilar *et al.* 2005 für eine Kombination von Umkehrphasen-

Chromatographie bei hohem pH-Wert und Umkehrphasen-Chromatographie bei niedrigem pH Wert bessere Trennkapazitäten als für klassische Kombinationen wie SCX mit IP-RP bei niedrigem pH-Wert erreichen (Gilar *et al.* 2005b). Dies konnte durch Arbeiten von Delmotte *et al.* bestätigt werden (Delmotte *et al.* 2007).

I.4 Massenspektrometrie für die Proteomanalyse

Die im nachfolgenden aufgelisteten Ionisierungsverfahren, Massenanalytoren und Detektoren bieten einen kleinen Einblick in die Vielfalt der massenspektrometrischen Technik, sowie ihrer Kombinations- und Anwendungsmöglichkeiten. Allen Apparaturen liegt jedoch ein gemeinsamer Aufbau zugrunde, bestehend aus Ionenquelle, Massenanalytator und Detektor. Analysator und Detektor befinden sich in der Regel im Hochvakuum (Abbildung 1.10) (Lehmann 1996). Bei modernen Geräten ist zudem zur Gerätesteuerung und Aufzeichnung der Spektren ein Datensystem übergeordnet.



Abb. 1.10: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.

I.4.1 Sanfte Ionisierungsverfahren

Zur massenspektrometrischen Analyse von Molekülen müssen diese erst einmal in die Gasphase gebracht werden. Die Ionisation kann auf verschiedene Arten erfolgen, bspw. durch Beschuss mit Elektronen (EI = Elektronenstoßionisation), chemische Ionisation (CI) oder Feldionisation (FI), deren Voraussetzung jedoch eine Verdampfbarkeit der Proben im Hochvakuum ist und die sich vor allem bei kleineren Molekülen anbieten (Burseley 1978). Um größere und labilere Moleküle wie Peptide oder Proteine zu ionisieren müssen softere Ionisierungsverfahren herangezogen werden. Hierfür werden die Analyten aus der kondensierten Phase heraus ionisiert, man spricht von Desorption/Ionisation. Ein Beispiel hierfür ist das *Fast Atom Bombardment* (FAB), wobei eine Lösung des Analyten in einer

schwerflüchtigen Matrix wie Glycerin mit einem Partikelstrom aus einem inerten Gas wie Argon oder Xenon beschossen wird (Barber *et al.* 1981; Morris *et al.* 1981). Durch die Weiterentwicklung der ESI- (Fenn *et al.* 1989; Meng *et al.* 1988) und der MALDI-Technik wurde es dann möglich eine ganze Reihe labiler Moleküle wie Proteine, Peptide, Lipide, Nukleinsäuren und Oligosaccharide schonend zu ionisieren, zu analysieren und dies mit chromatographischen Methoden zu koppeln (Karas & Hillenkamp 1988; Tanaka *et al.* 1988). Eine weitere relative schonende Methode ist die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI), die bspw. bei Analyten verwendet wird, die schlecht mit ESI ionisierbar sind, nur wenige reaktive Gruppen enthalten und thermisch stabil sind (Zaikin & Halket 2006).

Elektrospray-Ionisation

Mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation kann eine Vielzahl von Biomolekülen bei Atmosphärendruck schonend ionisiert werden. J. Fenn erhielt 2002 für seine Arbeit zur Elektrospray-Ionisation den Nobelpreis für Chemie. In Abbildung 1.11 ist die Erzeugung positiv geladener Ionen mittels Elektrospray-Ionisation schematisch dargestellt. Der gelöste Analyt wird über die Spitze einer Kapillare eingebracht. Zwischen der leitfähigen Kapillare und der Gegenelektrode, die zum Massenanalysator führt, ist ein elektrisches Feld angelegt. Die Anode befindet sich dabei zur Erzeugung positiver Ionen an der Kapillare und die Kathode am gegenüberliegenden Ende (Dole *et al.* 1968). Die positiven Ionen werden dabei an die Flüssigkeitsoberfläche und Richtung Kathode gezogen. Der Anziehung des elektrischen Feldes wirkt die Oberflächenspannung der Analytlösung entgegen, sodass sich der sogenannte Taylor-Konus bildet (Taylor 1964). Aus der Spitze des Konus lösen sich positiv geladene Tröpfchen ab mit Durchmessern von wenigen Mikrometern. Durch Verdunstung des Lösungsmittels nimmt der Radius der Tröpfchen ab und die Ladungsdichte zu. Wenn bei konstanter Ladung Q der Radius das so genannte Rayleigh-Limit unterschreitet, wird die Abstoßung zwischen den gleichnamigen Ladungen so groß dass es zu Coulomb-Explosionen kommt. Schließlich gibt es für die Bildung freier Ionen in der Gasphase bei der Elektrospray-Ionisation zwei Theorien: das Modell des geladenen Rückstands (engl. *charged residue model*) (Dole *et al.* 1968) und das Ionenemissionsmodell (IEM) (Iribarne & Thomson 1976).

Ein herausragendes Merkmal der Elektrospray-Ionisation ist, dass sie als sehr schonende Ionisationsmethode gilt, sodass sogar nichtkovalente Aggregate ionisiert werden können. Die einfache Kopplung mit der HPLC ist für die Analyse komplexer biologischer Proben von

großem Vorteil. Auch die Entstehung mehrfach geladener Ionen ist für bestimmte Anwendungen vorteilhaft; die Fragmentierung und Sequenzanalyse von Peptiden ist bspw. effizienter als bei der MALDI, da hier überwiegend einfach geladene Ionen entstehen. Die wichtigsten Nachteile sind die geringere Salztoleranz (Kusmann *et al.* 1997) gegenüber der MALDI.

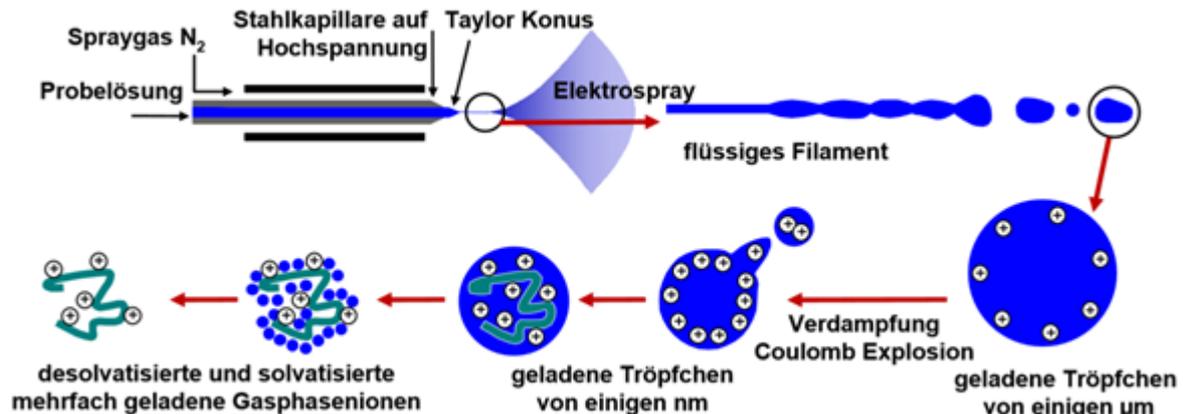


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation. (Quelle Christian G. Huber)

Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

Die Matrix-unterstützte (auch Matrix-assistierte) Laserdesorption/-ionisation geht aus der Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (LDI-MS) hervor, die auf eine direkte Desorption von Analytionen aus der kondensierten Phase abzielt. Hierzu wurden die Analyten auf einer Metalloberfläche mit einem gepulsten Laser bestrahlt, wodurch eine starke Fragmentierung der Probe resultiert und nur geringere Intensitäten der Analyten erreicht wurden (Lottspeich & Engels 2012). Michael Karas und Franz Hillenkamp stellten 1987 fest, dass sich höhere Intensitäten und geringere Fragmentierung durch Einbetten der Probenmoleküle in eine Matrix erreichen lässt (Karas & Hillenkamp 1988).

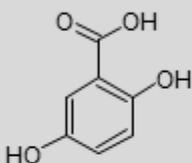
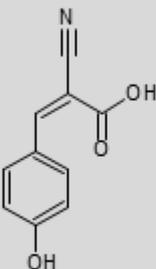
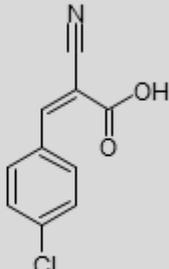
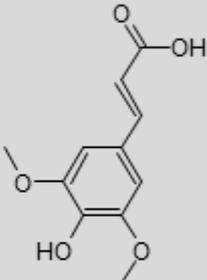
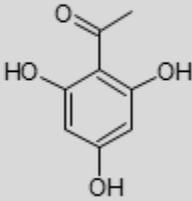
Matrizes

Als Matrix dienen kleine, organische Moleküle, die bei der eingestrahelten Laserwellenlänge (im Ultraviolett(UV)- oder Infrarot(IR)bereich) eine hohe Absorption zeigen. Daher sind bspw. für die UV-MALDI konjugierte Doppelbindungen ein Strukturmerkmal vieler Matrizes. Für die UV-MALDI werden meist Stickstofflaser mit Wellenlängen von 337 nm und Impulsdauern von 3-5 ns oder Festkörperlaser wie der Nd-YAG-Laser (Yttrium-Aluminium-Granat-Kristalle dotiert mit Neodym) mit Wellenlängen von 355 nm und Impulsdauern von 5-15 ns verwendet (Dreisewerd *et al.* 1995; Beavis *et al.* 1989; Hillenkamp

& Peter-Katalinić 2007). Die Matrixmoleküle sind zudem häufig sauer, um als Protonendonatoren zu fungieren. Schließlich muss die Matrix auch die Eigenschaft zur Kokristallbildung mit dem Analyten aufweisen. In Tabelle 1.2 sind die häufigsten Matrixsubstanzen die zur Protein- oder Peptidanalytik verwendet werden aufgelistet. Zur Analyse von Proteinverdauen wird standardmäßig α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (CHCA) verwendet. Des Weiteren wurden auch Halogen-Derivate der CHCA wie bspw. die 4-Chlor- α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (CICCA) auf ihre Performance als Matrix anhand von Verdauen mit den Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin von der Arbeitsgruppe Karas untersucht. Durch die Detektion zusätzlicher neutraler und saurer Peptide konnte mit dieser neuen Matrix eine höhere Zahl an Peptididentifizierungen und höhere Sequenzabdeckungen erreicht werden (Jaskolla *et al.* 2008).

Für die IR-MALDI Massenspektrometrie eignen sich rein hydrophile Matrices wie Glycerin und Bernsteinsäure, die Wellenlängen von 2,94 μm (Overberg *et al.* 1990) und 10,6 μm (Overberg *et al.* 1991) absorbieren. IR-Laser übertragen genügend Energie um Proteine von Blot-Membranen lösen zu können, hierdurch kann es aber auch zur Fragmentierung empfindlicher Ionen kommen.

Tab. 1.2: Matrixsubstanzen für die MALDI MS Analyse von Peptiden und Proteinen.

MALDI-Matrix	2,5-Dihydroxybenzoesäure	α -Cyano-hydroxy-zimtsäure	4-Chloro- α -Cyano-hydroxy-zimtsäure	Sinapinsäure	2, 4 ,6-Trihydroxyacetophenon
Abkürzung	DHB	CHCA	CICCA	SA	THAP
Struktur					
Anwendungsgebiet	Proteine, Peptide, Kohlenhydrate	Peptide	Peptide, Phospholipide	Proteine, größere Peptide	Proteine, Peptide, Kohlenhydrate
Referenz	Strupat et al. 1991	Beavis et al. 1992	Jaskolla et al. 2008	Beavis et al. 1989	Pieles et al. 1993

Ionisierungsprinzip

Zur massenspektrometrischen Analyse werden die Analyten entweder erst auf der Probenplatte oder vorher mit einer geeigneten Matrix in etwa 1.000 bis 10.000 fachen molaren Überschuss gemischt (Hillenkamp & Peter-Katalinić 2007). Nachdem man die Probe auf dem Target trocknen lässt, bezeichnet als *dried droplet* Methode, erfolgt die Kokristallisation, d.h. die Probenmoleküle werden in das Kristallgitter der Matrix eingebaut. Der Matrix-Analyt-Kokristall wird dann ins Hochvakuum des Massenspektrometers gebracht; es folgt der Laserbeschuss mit Pulsen von wenigen Nanosekunden (Abbildung 1.12). Die im Überschuss vorliegende Matrix nimmt die Energie des Laserpulses auf und überträgt die zur Desorption notwendige Energie auf die Analytmoleküle. Außerdem stellt sie die Protonen zur Ionisation zur Verfügung. Gleichzeitig schützt die Matrix vor photolytischer Zersetzung und reduziert die Wechselwirkung der Analytmoleküle untereinander oder mit der Metalloberfläche der Probenplatte. Die zugrunde liegenden Mechanismen der MALDI sind jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Jaskolla & Karas 2011). Wie auch für die Elektrospray-Ionisation existieren hier für die Ionisation der Analyten zwei Theorien, die *Lucky Survivor* Theorie (Karas *et al.* 2000; Karas & Krüger 2003) und das Modell der *gas phase protonation* (Zenobi & Knochenmuss 1998; Knochenmuss & Zenobi 2003; Knochenmuss 2006).

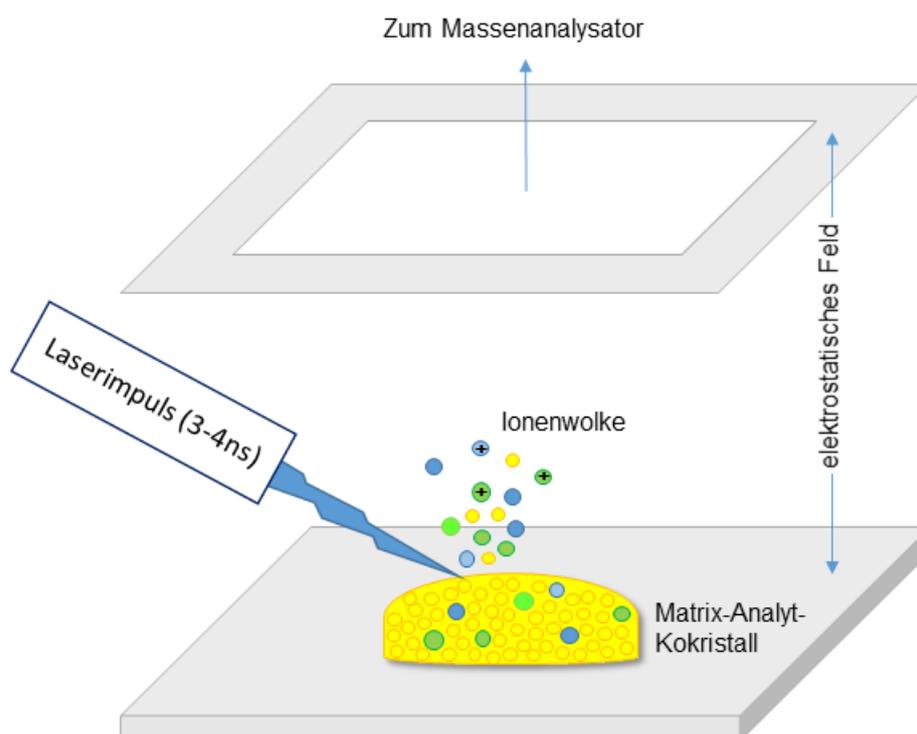


Abb. 1.12: Schematische Abbildung der Matrix unterstützten Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

ICP-MS, Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Zur Analyse der elementaren Zusammensetzung einer Probe kommen Methoden wie die thermische Ionisation (TI), die Funkenionisation (SS), induktiv-gekoppeltes Plasma (ICP) und Glimmentladung (GD) zum Einsatz, wobei das zu untersuchende Material in seine atomaren Bestandteile zerlegt wird (Gross 2011). Die ICP-MS ist dabei eine der meist genutzten Verfahren der Spurenelementanalytik. Die Probe wird hierbei in einem etwa 5000-10000°C heißen Argonplasma ionisiert, in das der Analyt in Form eines feinen Aerosols eingebracht wird. Die im Plasma erzeugten Ionen werden durch ein elektrisches Feld in Richtung des Massenanalysators beschleunigt, wo die einzelnen Elemente und ihre Isotope erfasst werden. Die strukturelle Information geht hierbei komplett verloren. Die ICP-MS bietet eine hohe Sensitivität mit Nachweisgrenzen von pg/g bis ng/g und einen hohen linearen Bereich bei der quantitativen Bestimmung von bis zu 8 Größenordnungen (Wang *et al.* 2010).

I.4.2 Analysatoren

Im Massenanalysator werden schließlich die in der Ionenquelle erzeugten Ionen nach ihrer Masse bzw. ihrem m/z -Verhältnis (Masse-zu-Ladungs-Verhältnis) getrennt. Dazu wurden im Laufe der Jahrzehnte zahlreiche Typen an Analysatoren entwickelt, die unterschiedliche Vor- und Nachteile besitzen und damit verschiedene Anforderung erfüllen. Als klassische Massenanalysatoren sind bspw. Sektorfeldgeräte, Quadrupolgeräte (Paul & Steinwedel 1953; Dawson 1976; Lehmann 1996) und Ionenfallen (Paul & Steinwedel 1953; Stafford Jr. *et al.* 1984) zu nennen. Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanzgeräte und Orbitrap-Geräte (Hu *et al.* 2005) sind modernere Analysatoren, die eine hohe Auflösung bieten (Marshall *et al.* 1998; Olsen *et al.* 2005). Heute werden die verschiedenen Analysatoren so in Hybridgeräten kombiniert, dass die erforderlichen MS/MS-, MS^n -Eigenschaften oder Massengenauigkeiten erreicht werden.

Flugzeitgeräte (TOF)

Im Flugzeitanalysator (TOF, engl. *time of flight*) werden die Ionen nach Austritt aus der Ionenquelle in einem elektrischen Feld beschleunigt. Ionen mit gleicher Ladung erhalten dann die gleiche kinetische Energie, wenn sie die gleiche Potentialdifferenz erfahren. Nach Durchlaufen der elektrischen Spannung U beträgt die kinetische Energie der Ionen:

$$E_{kin} = z \cdot e \cdot U = \frac{m \cdot v^2}{2} \quad (\text{Gleichung 1.1})$$

U = Beschleunigungsspannung

v = Geschwindigkeit nach der Beschleunigung

E_{kin} = kinetische Energie

Anschließend fliegen die Ionen durch die feldfreie Driftstrecke L im Hochvakuum des Flugrohrs. Da alle Ionen die gleiche kinetische Energie besitzen und nicht weiter beschleunigt oder abgebremst werden, fliegen kleinere Ionen schneller als größere Ionen (der gleichen Ladung).

$$v = \frac{L}{t} \quad (\text{Gleichung 1.2})$$

L = Länge der feldfreien Driftstrecke/des Flugrohrs

T = Flugzeit der Ionen

Durch Einsetzen der Gleichung 1.2 in Gleichung 1.1 erhält man:

$$z \cdot e \cdot U = \frac{1}{2} m \cdot \left(\frac{L}{t}\right)^2 \quad (\text{Gleichung 1.3})$$

$$\Leftrightarrow \frac{m}{z} = 2 \cdot e \cdot U \cdot \frac{t^2}{L^2} \quad (\text{Gleichung 1.4})$$

Bei bekannter Beschleunigungsspannung und Driftstrecke L kann somit durch Bestimmung der Flugzeit eines Ions auf sein m/z geschlossen werden ($m/z \sim t^2$). Driftstrecken von 1-4 m ergeben dabei typische Flugzeiten zwischen wenigen 1-100 μs .

Da Flugzeit-Analysatoren gepulste, diskontinuierliche Ionenstrahlen benötigen, werden sie häufig mit MALDI-Ionenquellen kombiniert, die Ionenpulse von wenigen ns erzeugen. Zur Kopplung der Flugzeit-Analysatoren mit kontinuierlichen Ionenquellen wie ESI-Quellen werden aus einem Ionenstrahl quer zur Flugrichtung Ionenpakete herausgepulst (orthogonale Extraktion) (Tang *et al.* 1994; Verentchikov *et al.* 1994).

Auflösungsvermögen

Das Auflösungsvermögen R (engl. *resolution*) eines Massenspektrometers beschreibt welche minimale Massendifferenz zwei Ionen haben müssen um getrennt voneinander registriert werden zu können.

Abhängig vom Massenspektrometer gibt es unterschiedliche Definitionen ab wann zwei Peaks als voneinander getrennt betrachtet werden. Bei hochauflösenden Sektorfeld Massenspektrometern bspw. sind zwei Peaks als getrennt voneinander zu betrachten, wenn das Tal zwischen beiden nur 10% der Signalhöhe des kleineren Peaks beträgt. Im Gegensatz zur Bestimmung der Auflösung aus zwei getrennten Peaks wird beim Flugzeitmassenspektrometer die Auflösung aus der Halbwertsbreite FWHM (engl. *full width at half maximum*) eines einzigen Peaks bestimmt (Lottspeich & Engels 2012). Das Auflösungsvermögen R ist somit definiert als Quotient aus Masse und der Signalbreite Δm bei halbmaximaler Höhe (Lottspeich & Engels 2012).

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m_2}{(m_2 - m_1)} \quad (\text{Gleichung 1.5})$$

MALDI-TOF und verzögerte Ionenextraktion

Während der Ionisation in der MALDI-Quelle und auch in der Beschleunigungsphase kann es durch verschiedene Prozesse dazu kommen, dass Ionen gleicher Masse nicht mit der exakt gleichen kinetischen Energie in die feldfreie Strecke des Flugrohrs eintreten. Dies führt dazu, dass Ionen gleicher Masse unterschiedliche Flugzeiten aufweisen und so die Massenauflösung herabgesetzt ist. Die Energieverteilung kommt bei der Ionisation dadurch zustande, dass nicht alle Ionen zur genau gleichen Zeit und am gleichen Ort desorbiert und ionisiert werden. Auch Abstoßungen der Ionen führen anfänglich zu Energieunschärfe. Durch Abschirmung der Ionen untereinander kann es dazu kommen dass bereits entstandene Ionen noch nicht das beschleunigende Feld erfahren. In der Beschleunigungsphase können zusätzlich Stöße der Ionen untereinander zur Zeit- und Energieverteilung führen.

Um die Startgeschwindigkeitsverteilung der Ionen zu umgehen wird die verzögerte Extraktion (engl. *delayed extraction*) angewendet (siehe Abbildung 1.13 A). Hierzu wird das elektrische Feld zur Ionenbeschleunigung über der Probe zeitversetzt zum Laserimpuls angeschaltet, sodass Ionen mit größerer Startgeschwindigkeit weiter vordringen und nach Einschalten des Feldes geringere Energie erhalten als Ionen mit niedrigerer Startgeschwindigkeit (Vestal *et al.* 1995; Bahr *et al.* 1997).

MALDI-TOF mit Reflektor

Zur weiteren Fokussierung der Ionen gleicher Masse, aber unterschiedlicher Startenergie werden Reflektoren oder Ionenspiegel am Ende der feldfreien Driftstrecke verwendet, wie in Abbildung 1.13 B gezeigt. Am Reflektor ist ein elektrisches Gegenfeld angelegt, das die

Ionenrichtung umkehrt. Somit wird die Flugzeit der Ionen verlängert und die Auflösung verbessert. Zusätzlich werden Ionen mit unterschiedlichen kinetischen Energien dadurch fokussiert, dass die schnelleren tiefer in den Reflektor eindringen und damit einen längeren Weg im Reflektor zurücklegen müssen.

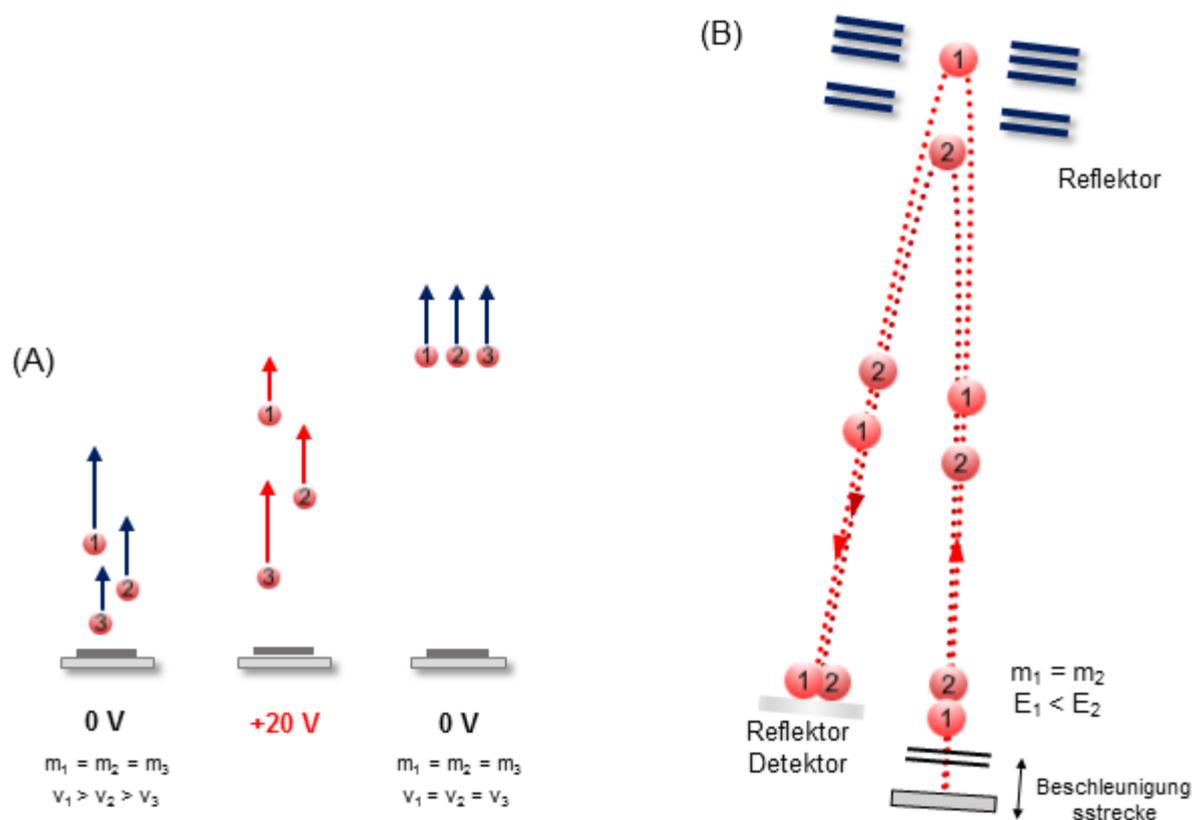


Abb. 1.13: (A) Bei der verzögerten Extraktion wird das elektrische Feld zeitversetzt zum Laserpuls angeschaltet. Der Gradient beschleunigt langsamere Ionen mehr als schnellere, so dass diese die schnelleren einholen. (B) Zusätzlich werden Ionen gleicher Masse aber unterschiedlicher Energie durch den Reflektor fokussiert. Dieser lenkt die Ionen durch ein elektrisches Feld in die Gegenrichtung um.

In Abbildung 1.14 ist der schematische Aufbau, des in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometers, das AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 System, wiedergegeben. Das Massenspektrometer kann bspw. zur Messung ganzer Proteine im Linearen Modus und zur Messung von Peptiden im oben beschriebenen Reflektormodus betrieben werden. In der Quelle 1 wird die Probe mit einem Laserstrahl aus einem 1 kHz Feststofflaser, der über Spiegel senkrecht zur Probenplatte gelenkt wird, beschossen. Die orthogonale Anordnung soll eine höhere MS- und MS/MS-Sensitivität gewährleisten (Glückmann 2009). Die entstehenden

Ionen werden dann über die verzögerte Extraktion fokussiert und durch Deflektoren am Spiegel vorbei zur Quelle 2 gelenkt. Dort erfolgt eine Entschleunigung (Abbremsen) der Ionen (Vestal & Campbell 2005). Zur MS/MS-Analyse werden die entsprechenden Vorläufer Ionen selektiv durch den *Timed-ion selector* (TIS) anhand ihrer Flugzeit ausgewählt und Richtung Kollisionszelle transmittiert. Unerwünschte Ionen werden deflektiert/ abgelenkt. Der TIS dient auch als *Low Mass Gate* (LMG), d.h. Ionen mit niedrigem Molekulargewicht aus der Matrix werden abgelenkt und damit aus der Messung eliminiert. Die Kollisionszelle kann mit verschiedenen Gasen (Stickstoff, (Raum)-Luft, Argon, Helium, Neon) und unterschiedlichen Drücken betrieben werden. Die aus der Kollisionszelle austretenden Ionen werden in Quelle 2 wieder beschleunigt und im Reflektor wie oben beschrieben fokussiert. Zur Unterdrückung weiterer, in Quelle 2 entstehenden und unerwünschten metastabilen Fragmenten, die zur Entstehung breiter unfokussierter Peaks führen, ist Quelle 2 der *metastable suppressor* nachgeschaltet, der ähnlich wie der TIS Ionen in Abhängigkeit von der Flugzeit deflektiert (Vestal & Campbell 2005).

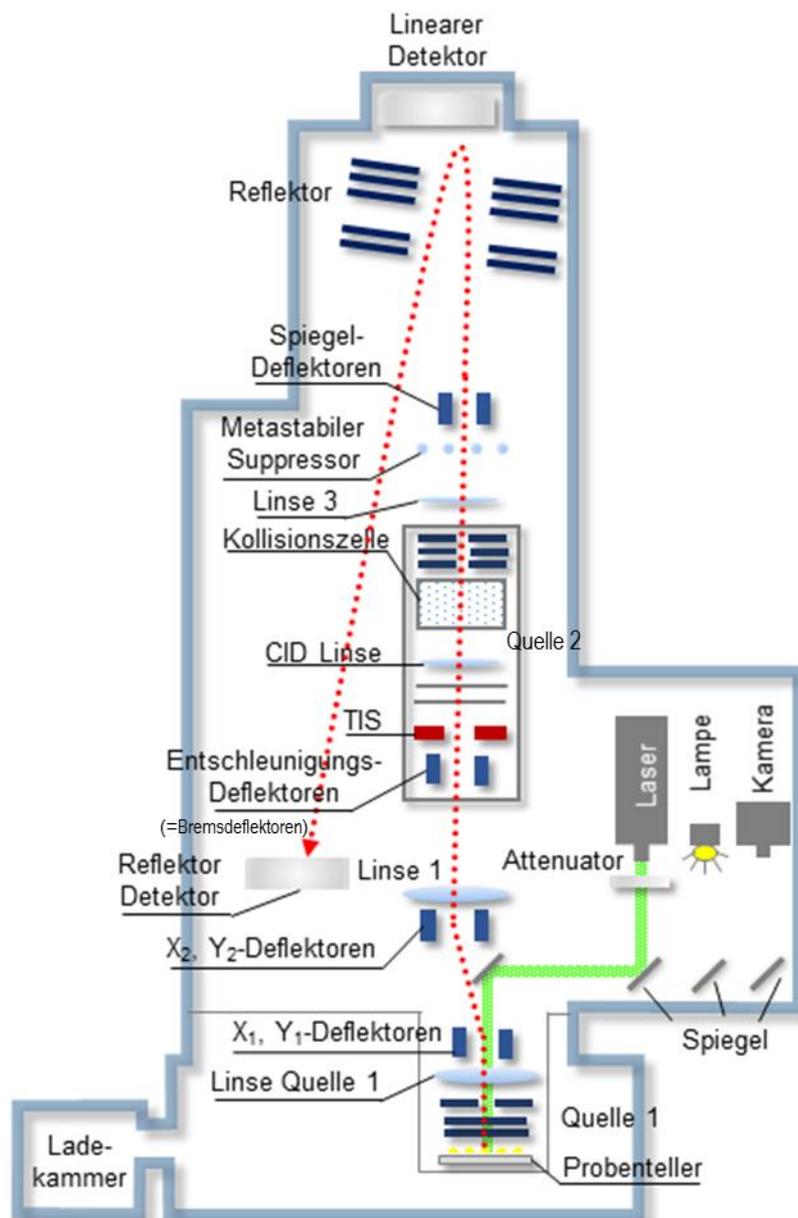


Abb. 1.14: Schematischer Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometers AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 System.

I.4.3 Detektoren

Die im Analysator separierten Ionen werden schließlich im Detektor erfasst. Hier kommen bspw. der Faraday-Auffänger, Daly-Detektoren, Sekundärelektronenvervielfacher (SEV), und Mikrokanalplatten zum Einsatz.

Während beim Faraday-Aufhänger die Ionen direkt in elektrischen Strom umgewandelt werden und kleine Ionenströme schwer detektierbar sind, arbeitet der SEV mit einer Konversionsdynode. Die auf der Konversionsdynode auftreffenden Ionen schlagen Elektronen aus dem Material, die durch ein elektrisches Feld zur nächsten Elektrode (Dynode)

beschleunigt werden, wo wiederum weitere Sekundärelektronen entstehen (Abbildung 1.15 A). Durch die hintereinandergeschalteten Dynoden können Signalverstärkungen von 10^4 bis über 10^8 erreicht werden. Sind die diskreten Elektroden durch schlecht leitende Kanäle ersetzt, in deren Innern auch Sekundärelektronen erzeugt werden können, so spricht man vom Kanalelektronenvervielfacher (KEV) oder *Channeltron* (engl. *channel electron multiplier CEM*) (Abbildung 1.15 B) (Goodrich & Wiley 1962).

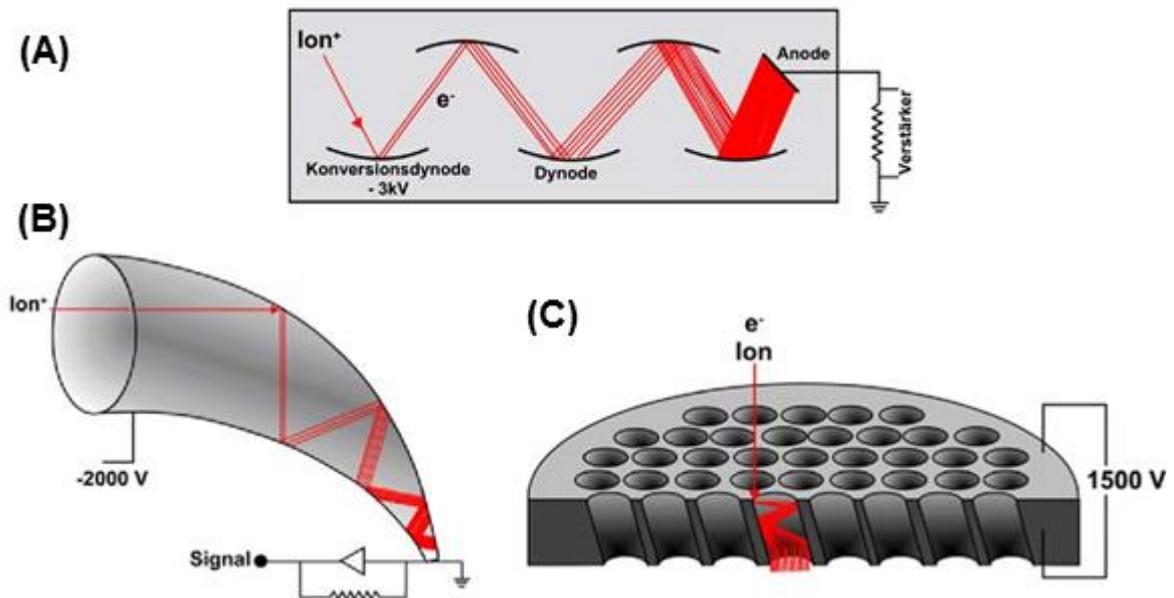


Abb. 1.15: (A) Der Sekundärelektronenvervielfacher besteht aus einer Konversionsdynode und mehreren hintereinandergeschalteten diskreten Dynoden. (B) Der Kanalelektronenvervielfacher (KEV) bzw. Channeltron besteht aus einer kontinuierlichen Dynode mit einer Signalverstärkung von bis zu 10^8 . (C) Bei der Vielkanalplatte sind mehrere KEVs, bestehend aus metalldotierten Glasröhren mit $6\text{-}25\ \mu\text{m}$ Durchmesser, als Array angeordnet. (Quelle Christian G. Huber, Universität Salzburg)

Bei einer Mikrokanalplatte oder Vielkanalplatte (engl. *micro channel plate*, MCP) handelt es sich um viele, flächenhaft angeordnete Kanalelektronenvervielfacher mit Durchmessern im Bereich von $6\text{-}25\ \mu\text{m}$ (Abbildung 1.15 C). Die FT-ICR-MS und die Orbitrap kommen ohne zusätzlich Detektor aus. Hier werden die an den äußeren Kammerplatten angelegten Signale durch Fourier-Transformation in ihre m/z -Verhältnisse umgewandelt.

I.4.4 Peptidfragmentierung

Zur Sequenzaufklärung der im Rahmen einer Proteomanalyse entstandenen Peptide wird bspw. bei der MALDI MS die kollisionsinduzierte Fragmentierung (CID) (Mitchell Wells &

McLuckey 2005; Hayes & Gross 1990) herangezogen. Die Fragmentierung erfolgt hierbei durch Stöße der Peptidionen mit den eingeleiteten Gasmolekülen. Die Translationsenergie, die die Moleküle durch die Kollision mit den Gasmolekülen erhalten, wird dann teilweise in intramolekulare Oszillationsenergie umgewandelt, die schließlich so groß wird, dass Bindungen brechen. Für die Mechanismen der Fragmentierung spielt die Bildung zyklischer Ionen wie bspw. die der für die b-Ionen beschriebenen protonierten Oxazolone eine große Rolle (Schlosser & Lehmann 2000; Yalcin *et al.* 1995). Alternativ zur CID kann ein Fragmentationsspektrum auch allein über die Analyse der metastabilen Fragmentierung, die bei der Passage der Peptidionen durch die feldfreie Driftstrecke auftritt, d.h. durch die sogenannte PSD (*post source decay*) Methode (Spengler *et al.* 1992), erhalten werden. Die metastabilen Fragmente weisen jedoch eine zu geringe kinetische Energie auf. Zur Analyse dieser Fragmente sind spezielle Reflektoren mit variabler Spannung notwendig. Um ein vollständiges PSD-Spektrum aufzunehmen müssen zeitaufwendig mehrere Teilspektren mit sich stufenweise ändernder Reflektorspannung aufgenommen und schließlich kombiniert werden. In moderneren TOF/TOF-Geräten werden die Fragmentspektren in einem einzelnen Analyseschritt durch die Verwendung zweier TOF-Analysatoren ermöglicht. Der zweiten Quelle ist hier eine Kollisionskammer vorgeschaltet, sodass die Fragmentierung optional auch stoßinduziert erfolgen kann. Nach dieser Kammer werden die metastabilen oder stoßinduzierten Fragmente in der Quelle 2 (siehe auch Abbildung 1.14) auf eine ausreichend hohe Gesamtenergie nachbeschleunigt (Samyn *et al.* 2004).

Bei beiden Methoden kommt es hauptsächlich zur sequenzspezifischen Fragmentierung im Peptidrückgrat. Die entstehenden Fragmentionen werden der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlman folgend bezeichnet (Abbildung 1.16) (Roepstorff & Fohlman 1984). Da bei der MALDI MS überwiegend einfach geladene Moleküle entstehen werden nach der Spaltung entweder N-terminal-geladene (a-, b-, c-) Ionen oder C-terminal-geladene (x-, y-, z-) Ionen in Form von Sequenzionen detektiert. Der Index der einzelnen Fragmente gibt die Anzahl der im Fragment enthaltenen Aminosäuren an. Durch höhere Kollisionsenergien kann es zusätzlich zu Bindungsbrüchen in den Aminosäureseitenketten kommen (Johnson *et al.* 1988). Unter herkömmlichen CID-Bedingungen oder PSD Bedingungen entstehen jedoch hauptsächlich a_n , b_n und y_m Fragmente. Welche Peptidbindungen bevorzugt gespalten werden, die Intensitäten der entstehenden Fragmentionen und Ionenserien hängt dabei von den verwendeten Instrumenten aber auch wesentlich von der Aminosäuresequenz oder Zusammensetzung des Peptids ab (Dongré *et al.* 1996; Tabb *et al.* 2003).

Alternativ zur CID oder PSD können Peptide auch mittels ECD oder ETD, die komplementäre Informationen liefern können, fragmentiert werden. Die ECD wurde erstmalig 1998 in der McLafferty Arbeitsgruppe auf Biomoleküle angewandt (Zubarev & Yang 2010). Hierbei werden freie Elektronen oder bei der ETD Elektronen aus Radikal Anionen (Pitteri *et al.* 2005; Syka *et al.* 2004) auf das mehrfach geladene Molekülion übertragen, wodurch es zur Fragmentierung kommt. Im Gegensatz zur CID und PSD wird das Peptidrückgrat bei der ECD zwischen Amid und α -C-Atom gespalten so dass hauptsächlich c- und z-Ionen gebildet werden (Abbildung 1.16 A). Zudem zeigt die ECD kaum Selektivität für bestimmte Aminosäuren mit Ausnahme von Prolinen. Auch Disulfidbrücken werden mittels ECD bevorzugt gespalten (Zubarev *et al.* 1999). Labilere Modifikationen wie Phosphorylierung bleiben während der Fragmentierung erhalten (Sze *et al.* 2002).

Zur Auswertung des Fragmentationenspektrums kommen prinzipiell zwei Herangehensweisen in Frage. Sofern die im MS/MS-Spektrum detektierten Signale der b- oder y-Ionen-Serie (oder auch a-Ionen Serie) zugeordnet werden können, kann aus den Massenabständen zwischen den Signalen einer Ionenserie auf die Aminosäuresequenz geschlossen werden (siehe Abbildung 1.16 C) (Papayannopoulos 1995). Diese Vorgehensweise wird als *de novo sequencing* bezeichnet. Sie wird meist häufig zur Identifizierung posttranslationaler Modifikationen angewendet. Aber auch wenn das Genom eines Organismus noch nicht vollständig sequenziert wurde, sodass noch keine Datenbank mit den entsprechenden zu erwartenden Proteinsequenzen vorliegt (Nesvizhskii *et al.* 2007; Seidler *et al.* 2010) muss auf *de novo sequencing* zurückgegriffen werden. Die zweite Möglichkeit der Fragmentspektren-Zuordnung besteht in der Datenbankanalyse, wie sie in der *bottom-up*-Analyse zur Anwendung kommt. Dazu werden alle Proteinsequenzen des verwendeten Organismus *in silico* mit der experimentell verwendeten Protease, meist Trypsin, verdaut. Von allen möglichen Peptiden wird ein theoretisches Fragmentationenspektrum unter Berücksichtigung der Fragmentierungsregeln, die abhängig vom verwendeten Massenspektrometer und der Fragmentierungsart sind, generiert. Die gemessenen Fragmentationenspektren werden mit den theoretisch erstellten Spektren mit Hilfe einer Suchmaschine verglichen und die Peptidsequenz mit der höchsten Übereinstimmung als positiv zugeordnet bezeichnet. Je mehr Signale eines Fragmentationenspektrums zugeordnet werden können und je weniger nicht zuzuordnende Signale im Spektrum vorhanden sind, desto höher fällt die jeweilige *peptide score* aus. Je höher diese *peptide score* ist, desto weniger wahrscheinlich ist es, dass die beobachtete Zuordnung ein Zufallsereignis darstellt. Häufig wird hier ein Signifikanzlevel

von 5% gewählt, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung zufällig geschieht liegt unter 5% ($p < 0.05$). Erreicht die *peptide score* (*ion score*) einen Schwellenwert so gilt die Zuordnung als signifikant. Je mehr Peptidsequenzen eines Proteins zugeordnet werden können, desto höher fällt die *protein score* aus, d.h. desto sicherer gilt das Protein in der analysierten Probe als identifiziert. Hierbei spielt eine Rolle ob es sich um einzigartige Peptide handelt, d.h. Peptide die nur in einem einzigen Protein vorkommen oder nicht. Als Suchmaschinen werden in der Proteomanalyse bspw. SEQUEST (Eng *et al.* 1994), OMSSA (Geer *et al.* 2004), Protein Prophet (Keller *et al.* 2002) und wie in der vorliegenden Arbeit Mascot (Perkins *et al.* 1999) verwendet. Es gibt jedoch eine ganz Reihe weiterer Suchalgorithmen.

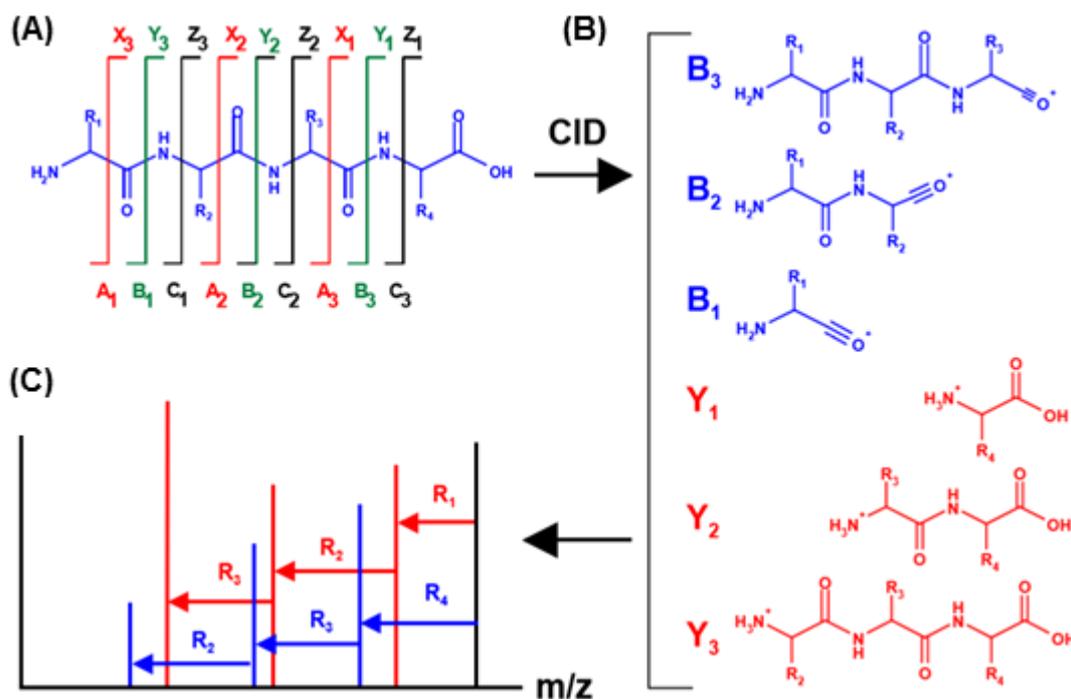


Abb. 1.16: Peptid-Fragmentierung (Nomenklatur nach Roepstorff und Fohlmann) (Quelle Christian G. Huber, Universität Salzburg)

I.5 Quantifizierung mit bifunktionellen Chelatkomplexen

I.5.1 ICP-MS und MeCAT

Wie bereits zuvor erwähnt werden quantitative Analysen von Proteom-Proben durch den hohen dynamischen Bereich der Proteine, kleine verfügbare Probenmengen, störende Bestandteile in der Probenmatrix und große strukturelle Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Proteinen erschwert. Da bei der ICP-MS jede strukturelle Information durch die Ionisation verloren geht, wird die Probenkomplexität deutlich verringert und damit

Matrixeffekte minimiert. Zusätzlich ist der dynamische Bereich (bis zu 12 Größenordnungen) im Vergleich zur elementaren Massenspektrometrie deutlich vergrößert (Prange & Pröfrock 2008). Die typischen in Proteinen vorkommenden Elemente wie Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff sind jedoch nicht oder nur bedingt (z. B.: Phosphor und Schwefel) für die ICP-MS-Analyse geeignet. Es gibt einige Arbeiten zur Quantifizierung von Proteinen anhand ihres Schwefelgehaltes (Bettmer 2010; Schaumlöffel *et al.* 2007; Wang *et al.* 2010), jedoch ist Sensitivität bei der Phosphor- und Schwefeldetektion mittels ICP-MS aufgrund von Interferenzen und Untergrundrauschen maximal so hoch wie bei der molekularen MS (Pieper 2008; Wind, Wegener, *et al.* 2003; Wind *et al.* 2001; Wind, Gosenca, *et al.* 2003).

Da nicht alle in natürlichen Systemen vorkommende Proteine Metalle (Metallionen) enthalten und somit zur ICP-MS-Analyse geeignet sind (del Castillo Busto *et al.* 2006; del Castillo Busto *et al.* 2008; Hann *et al.* 2006; Szpunar 2005), müssen Metallatome künstlich in Proteine eingeführt werden. Dies kann entweder durch die Reaktion mit einem Molekül, welches das Metall kovalent gebunden trägt oder mit einem bifunktionellen Chelator erfolgen. Es gibt nur wenige Derivatisierungs-Tags die ein kovalent gebundenes Metall tragen. Bekannte Beispiele sind der Quecksilber-Tag p-Hydroxy-Quecksilberbenzoat (siehe Abbildung 1.17 C) (Kutscher *et al.* 2008) oder Iodinisierungs-Tags (Abbildung 1.17 E) (Pereira Navaza *et al.* 2009). Nachteile hierbei sind jedoch hohes Hintergrundrauschen, hohe Kosten, die Verwendung toxischer Reagenzien und ungenügende Multiplexingkapazitäten.

Hinsichtlich der Einführung eines Metallions über einen Chelator gibt es eine ganze Reihe von Möglichkeiten. Die bifunktionellen Chelatkomplexe bestehen üblicherweise aus einem Metall-Chelator, einer Protein/Peptid-reaktiven Gruppe und gegebenenfalls einem Linker. Ein besonderes Beispiel stellen hier die sogenannten Ferrocen-Tags dar. Diese binden Eisen und sind mit unterschiedlichen Linkern und reaktiven Gruppen verfügbar (Abbildung 1.17 D) (Deng *et al.* 2002; Bomke *et al.* 2010). Die Eisen-Markierung bringt jedoch einige Nachteile für die ICP-MS-Analyse mit sich. Durch polyatomische Interferenzen ist die Sensitivität gering, das häufige Vorkommen von Eisen in biologischen Proben verursacht Hintergrundrauschen und die Beschränkung auf ein Element erschwert die Multiplexing-Kapazitäten, die nur durch Verwendung teurer Eisenisotope möglich ist.

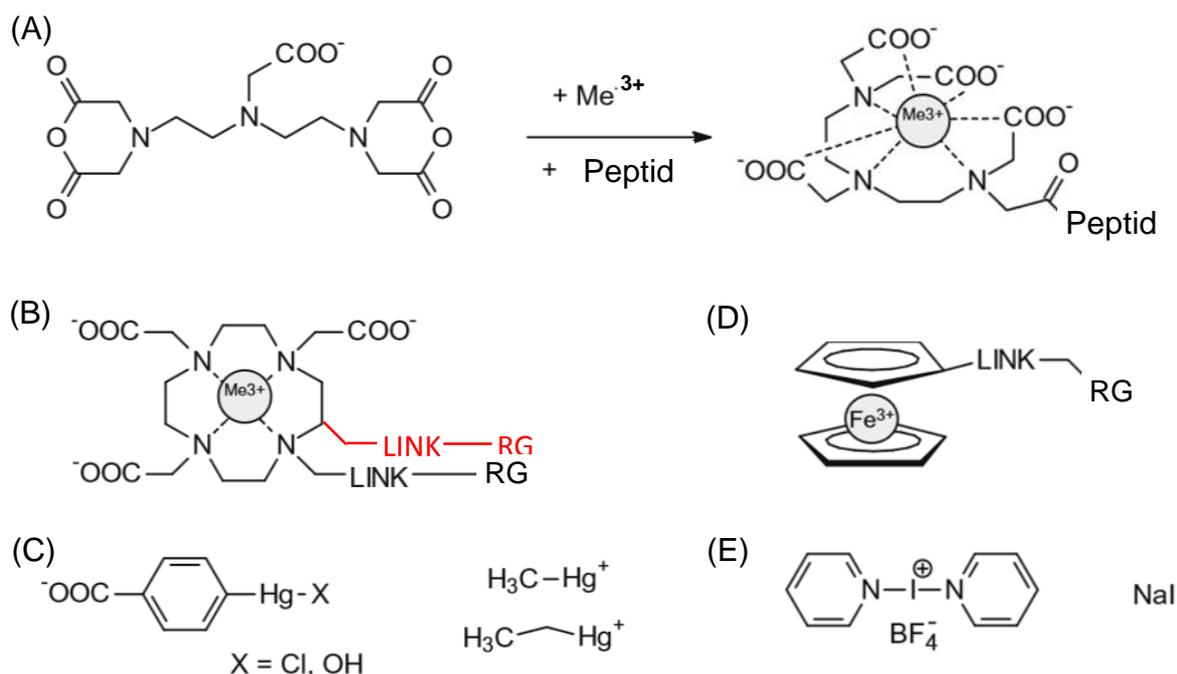


Abb. 1.17: Chemische Strukturen der unterschiedlichen Markierungsreagenzien: (A) Diethylentetraaminpentaessigsäure-Anhydrid (DTPAA) und das nach zweistufiger Reaktion entstandene derivatisierte Peptid. (B) 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA), das über unterschiedliche Linker und eine Vielzahl Protein/Peptid-reaktiver Gruppen an die Proteine/Peptide gebunden werden kann. Ist der Linker an ein N-Atom gebunden besitzt DOTA nur drei freie Acetatgruppen, ist er an ein Kohlenstoffatom des Ringes gebunden (rot markiert), besitzt es vier freie Acetatgruppen. (C) Quecksilber-Tags: p-Chlor-Quecksilberbenzoat, p-Hydroxyquecksilberbenzoat, Methyl-Quecksilber, Ethyl-Quecksilber. (D) Ferrocen-Tags: Verschiedene Linker und reaktive Gruppen sind verfügbar. (E) Iodinisierungs-Tags: Bispyridinium-Iod-Tetrafluorborat, Natriumiodid (Tholey & Schaumlöffel 2010).

I.5.2 Lanthanoide

Demgegenüber bietet die Markierung mit Lanthanoiden (ältere Bezeichnung: Lanthanide) zur ICP-MS-Detektion eine ganze Reihe von Vorteilen. Als Lanthanoide werden die sich ähnelnden 15 Elemente von Lanthan⁵⁷ bis Lutetium⁷¹ bezeichnet. Die nach Lanthan folgenden 14 Elemente der 6. Periode bilden eine Untergruppe der 3. Nebengruppe. Die Lanthanoide werden zusammen mit den Elementen Scandium, Yttrium und Lanthan als Seltenerdmetalle bezeichnet.

Die Quantifizierung mit Lanthanoiden ist zum einen besonders vorteilhaft da ihr natürlicher Hintergrund in biologischen Proben sehr gering ist. Zum anderen sind sie in ihren chemischen

Eigenschaften sehr ähnlich und haben alle sehr hohe Komplexierungs-Affinitäten zu DOTA (Schwarz *et al.* 2014). Ausgewählte Stabilitätskonstanten sind in Tabelle 1.3 dargestellt.

Tab. 1.3: Die Lanthanoide mit Angabe ihrer Ionenradien (für Ln^{3+} bei einer Koordinationszahl von 9 (R_i)) und ihrer Stabilitätskonstanten mit DOTA oder DTPA. Es sind immer nur die Isotopenhäufigkeiten des häufigsten Isotops angezeigt. Die monoisotopischen und quasi-monoisotopischen Elemente sind zusätzlich gelb markiert.

Element	Ln	R [pm]	log K (DOTA)	log K (DTPA)	Isotope
Lanthan	La	121,6	22,86	19,48	quasi monoisotopisch: $^{139}\text{La} = 99,91\%$
Cer	Ce	119,6	23,39	20,33	multi-isotopisch
Praesodym	Pr	117,9	23,01	21,07	monoisotopisch: $^{141}\text{Pr} = 100\%$
Neodym	Nd	116,3	22,99	21,60	multi-isotopisch
Promethium	Pm	114,4			radioaktiv
Samarium	Sm	113,2	23,04	22,34	multi-isotopisch
Europium	Eu	112	23,45	22,39	zwei Isotope: $^{153}\text{Eu} = 52,2\%$
Gadolinium	Gd	110,7	24,67	22,46	multi-isotopisch
Terbium	Tb	109,5	24,22	22,71	monoisotopisch: $^{159}\text{Tb} = 100\%$
Dysprosium	Dy	108,3	24,79	22,82	multi-isotopisch
Holmium	Ho	107,2	24,54	22,78	monoisotopisch: $^{165}\text{Ho} = 100\%$
Erbium	Er	106,2	24,43	22,74	multi-isotopisch
Thulium	Tm	105,2	24,41	22,72	monoisotopisch: $^{169}\text{Tm} = 100\%$
Ytterbium	Yb	104,2	25,00	22,20	multi-isotopisch
Lutetium	Lu	103,2	25,41	22,44	quasi monoisotopisch: $^{175}\text{Lu} = 97,41\%$

Außerdem weisen die Komplexe eine hohe Salz- und pH-Toleranz auf (Ahrends *et al.* 2009). Promethium ist als radioaktives Metall nicht stabil und darum nicht verwendbar. Innerhalb der anderen vierzehn Lanthanoide befinden sich vier „echte“ Mononuklide (Praesodymium, Terbium, Holmium und Thulium), wobei Lutetium (^{175}Lu) mit einem relativen Vorkommen von 97,41% und Lanthan (^{139}La) mit einer relativen Häufigkeit von 99,9% als nahezu monoisotopisch angesehen werden können. Diese Elemente weisen somit eine sehr hohe Sensitivität im ICP-MS auf und sind auch für die molekulare MS vorteilhaft, da sie die Isotopenmuster der markierten Peptide nicht wesentlich beeinflussen. Da einige andere Lanthanoide wie bspw. Gadolinium, Dysprosium und Samarium bis zu 7 Isotope besitzen (Schwarz *et al.* 2014), eignen sich diese zwar zur Isotopenverdünnungs-Analyse, aber nicht zur molekularen MS. Hier besteht allerdings die Möglichkeit die jeweiligen Isotope in angereicherter Form zu verwenden, wodurch die Multiplexing-Kapazitäten erheblich vergrößert werden (Bergmann *et al.* 2012; Gregorius *et al.* 2013). Bei Bergmann *et al.* wurden die angereicherten Isotope von Ytterbium (^{171}Yb , ^{172}Yb , ^{174}Yb und ^{176}Yb) verwendet. In

Teilen der vorliegenden Arbeit wurde durch Hinzunahme von ^{152}Sm , ^{162}Dy , ^{156}Gd , ^{172}Yb zu den monoisotopischen und nahezu monoisotopischen Metallen La, Pr, Tb, Ho, Tm und Lu ein 10-plex entwickelt.

Liu *et al.* quantifizierten bspw. ein 1:1 Gemisch von Peptiden, die mit Tb-DTPA und Y-DTPA markiert waren. Hierbei ergab sich ein Verhältnis von 0,65:1, das durch Korrekturfaktoren ausgeglichen wurde (Liu *et al.* 2006). Bei der Wahl der Metallionen sollten also Unterschiede in den Ionisationseffizienzen bedacht, bzw. gesondert untersucht werden.

Hinsichtlich der Wahl der Elemente ist für die ICP-MS-Analyse zu beachten, dass bei einigen Isotopen der schwereren Lanthanoide Interferenzen mit den Oxiden von leichteren Elementen (z. B.: ^{175}Lu und $^{159}\text{Tb}^{16}\text{O}$) entstehen können. Die Oxidbildung muss darum weitestgehend vermieden werden. Da Lanthan und Cer relativ leicht Oxide bilden, ist die Verwendung dieser Elemente bei nachfolgender ICP-MS Analyse nicht empfehlenswert (Bünzli 2006; Pieper 2008).

I.5.3 Chelatoren

Als Chelatligand kommt wie zuvor erwähnt DTPA infrage, das von Liu *et al.* zur Quantifizierung verschiedener Standard-Proteine verwendet wurde (Liu *et al.* 2006). Die Komplexe von DTPA mit Lanthanoiden weisen jedoch eine geringere Stabilität auf als Lanthanoid-DOTA-Komplexe (Magerstädt *et al.* 1986). Der Makrozyklus von DOTA bildet dagegen mit großen dreiwertigen Metallionen wie den Lanthanoiden thermodynamisch und kinetisch sehr stabile Komplexe, die ursprünglich in Form des Gadolinium-DOTA-Komplexes in der Magnetresonanztomographie (MRT) verwendet wurden (D Meyer 1988; Runge *et al.* 1988; Brown 1984). Die hohe Stabilität wird dadurch bedingt, dass DOTA als Chelator einen achtzähligen Liganden bildet. Mit einem zusätzlichen Wassermolekül liegt das Metallatom letztendlich neunfach koordiniert vor (Chang *et al.* 1993; Kumar *et al.* 1994; Bénazeth *et al.* 1998). Zum einen bilden die vier Stickstoffatome des Makrozyklus in einer Ebene 4 Koordinationsstellen. In einer weiteren Ebene bilden die Carboxylatgruppen die vier weiteren Koordinationsstellen. Die beiden Ebenen der Sauerstoff und Stickstoff-Atome liegen parallel zueinander und in ihrer Mitte liegt das Lanthanoidatom, so dass ein quadratisches Antiprisma gebildet wird. Das Wassermolekül liegt dabei über der Ebene der Carboxylatgruppe und über dem Lanthanoidion (Chang *et al.* 1993; Kumar *et al.* 1994; Bénazeth *et al.* 1998).

Zur Markierung von Peptiden kommen zwei unterschiedliche Derivate des DOTA-Chelators in Frage. Dabei ist entweder eine Carboxyleinheit des Chelators durch ein Amid mit beliebiger Seitenkette modifiziert oder die Seitenkette befindet sich an einem Kohlenstoffatom des Makrozyklus selbst (siehe Abbildung 1.17). Der Nachteil der Modifikation an der Ethyleinheit besteht darin, dass hier ein Stereozentrum vorliegt, so dass nach Komplexbildung mit den Metallionen ein Diastereomeren-Gemisch entsteht, da sich das Metallion unterhalb oder oberhalb des Ringes anlagern kann (Pieper 2008). Die beiden Diastereomere müssen dann chromatographisch voneinander getrennt werden, da keine selektive Komplexbildung möglich ist (Woods *et al.* 2004). Die Metallmarkierung muss somit immer schon vor der Reaktion mit dem Peptid erfolgen. Befindet sich die Ethyleinheit dagegen an einem Stickstoffatom des Makrozyklus ist dies nicht der Fall, es kann kein Diastereomeregemisch entstehen.

I.5.4 DOTA-Markierung

Zur Modifikation unterschiedlichster funktioneller Gruppen in Proteinen/Peptiden sind zahlreiche Derivatisierungsreagenzien und –Strategien verfügbar. d.h. einzelne Aminosäuren, die Carboxylgruppe der C-Termini oder die primären Amine der N-Termini können derivatisiert werden. Die Veresterung von Carboxylgruppen zur Modifikation der C-Termini wird selten zur Quantifizierung von Proteinen/Peptiden angewendet. Ein Nachteil besteht hier bspw. darin, dass die gebildeten Ester durch die sauren Bedingungen in der Umkehrphasen-Chromatographie leicht wieder hydrolysiert werden. Die Derivatisierung primärer Amine ist dagegen sehr verbreitet und eine Vielzahl von Derivatisierungsreagenzien greifen hier an. Eine Möglichkeit primäre Amine zu modifizieren wie sie auch bei iTRAQ, TMT oder ICPL angewendet wird besteht in der Acylierung der Peptide/Proteine. Hierzu können Aktivester, wie bspw. N-Hydroxysuccinimidester (Liu *et al.* 2001; Wiese *et al.* 2007) eingesetzt werden. Als erste Arbeitsgruppe verwendeten Kerr und McLean einen DOTA-NHS-Ester zur Derivatisierung eines tryptischen Myoglobin- und Cytochrom c-Verdaus und komplexierten die derivatisierten Peptide im Anschluss mit Lanthan, Terbium, Holmium, Thulium und Lutetium (Kerr & McLean 2010) (Abbildung 1.18 B). Eine weitere Möglichkeit primäre Amine zu derivatisieren besteht in der Verwendung von Phenylisothiocyanatderivaten (Keough *et al.* 1999), die mit primären Aminen Thioharnstoffderivate bilden (Abbildung 1.18 A). Waentig *et al.* verwendeten *p*-SCN-Bn-DOTA ((2-(4-isothiocyanatobenzyl))-DOTA) zur Derivatisierung von Lysozym und beschreiben die Möglichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert selektiv nur die Amino-Termini oder die Lysine zu markieren (Waentig *et al.* 2009). Der

Hauptvorteil der Markierung an primären Aminen liegt darin, dass nach proteolytischem Verdau jedes Peptid eines Proteins wenigstens ein *label* trägt, im Falle Lysin-haltiger Peptide sogar zwei. Unter Verwendung mehrerer Metalle werden jedoch die Spektren leicht unübersichtlich. Auch für die ICP-MS Analyse müssen die vorangeschalteten Trennmethode so leistungsstark sein, dass eine Basislinientrennung der einzelnen Peptidsignale erreicht wird. Betrachtet man die doppeltmarkierten Lysin-Peptide, so ergibt sich für die ICP-Analyse eine Signalverdopplung durch die beiden am Peptid befindlichen Metallmarkierungen. In der molekularen MS ergibt sich hierdurch jedoch ein starker Massenzuwachs der sich möglicherweise nachteilig auf die Peptidfragmentierung und damit auch auf die Identifizierung auswirken kann.

Strategien die darauf abzielen nur einzelne Aminosäuren zu markieren bieten also den Vorteil, dass sie die Probenkomplexität nicht so stark erhöhen. Sehr häufig kommt hier die Markierung von Cysteinen zum Einsatz. Hierfür müssen zuallererst Disulfidbrücken reduziert werden. Hierzu können Dithiothreitol (DTT), Mercaptoethanol oder TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)phosphine) verwendet werden. Eine Möglichkeit die Sulfhydrylgruppen zu derivatisieren besteht in der Reaktion mit Maleinimid (Abbildung 1.18 C). Hierbei wird die Doppelbindung des Maleinimids von der Thiolgruppe des Cysteins nukleophil angegriffen und ein Thioether gebildet. Für die Reaktion wird ein ca. 10facher Überschuss von Maleinimid zu Cysteinresten benötigt (Pieper *et al.* 2009). Ein Nachteil der Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA ist die oben bereits erwähnte Bildung der Diastereomeren und der damit einhergehende Sensitivitätsverlust (Esteban-Fernández *et al.* 2012). Ein weiteres Problem stellt das Auftreten von Hydrolyseprodukten der mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptide dar, wodurch es ebenfalls zum Sensitivitätsverlust kommen kann. Zur Vermeidung von Hydrolyse-Addukten sollte der pH-Wert während der Derivatisierung ≤ 7 gehalten werden (Pieper 2008).

Eine Alternative zur Derivatisierung der Cysteine mit Maleinimiden bietet die Verwendung von Halogenacetamiden, die routinemäßig zur Carbamidomethylierung von Cysteinen eingesetzt werden. Whetstone *et al.* setzten ein DOTA mit Bromacetamid als reaktiver Gruppe zur Markierung von Peptiden ein (Whetstone *et al.* 2004), wobei die Markierung durch Festphasensynthese erfolgte (Abbildung 1.18 D). Im Gegensatz dazu wurden Peptide und Proteine auch direkt in Lösung mit DOTA-Iodacetamid derivatisiert (Schwarz *et al.* 2011). Die Vorteile dieser Methode sind, dass geringere Überschüsse an Derivatisierungsreagenz benötigt werden und dass keine Diastereomere gebildet werden.

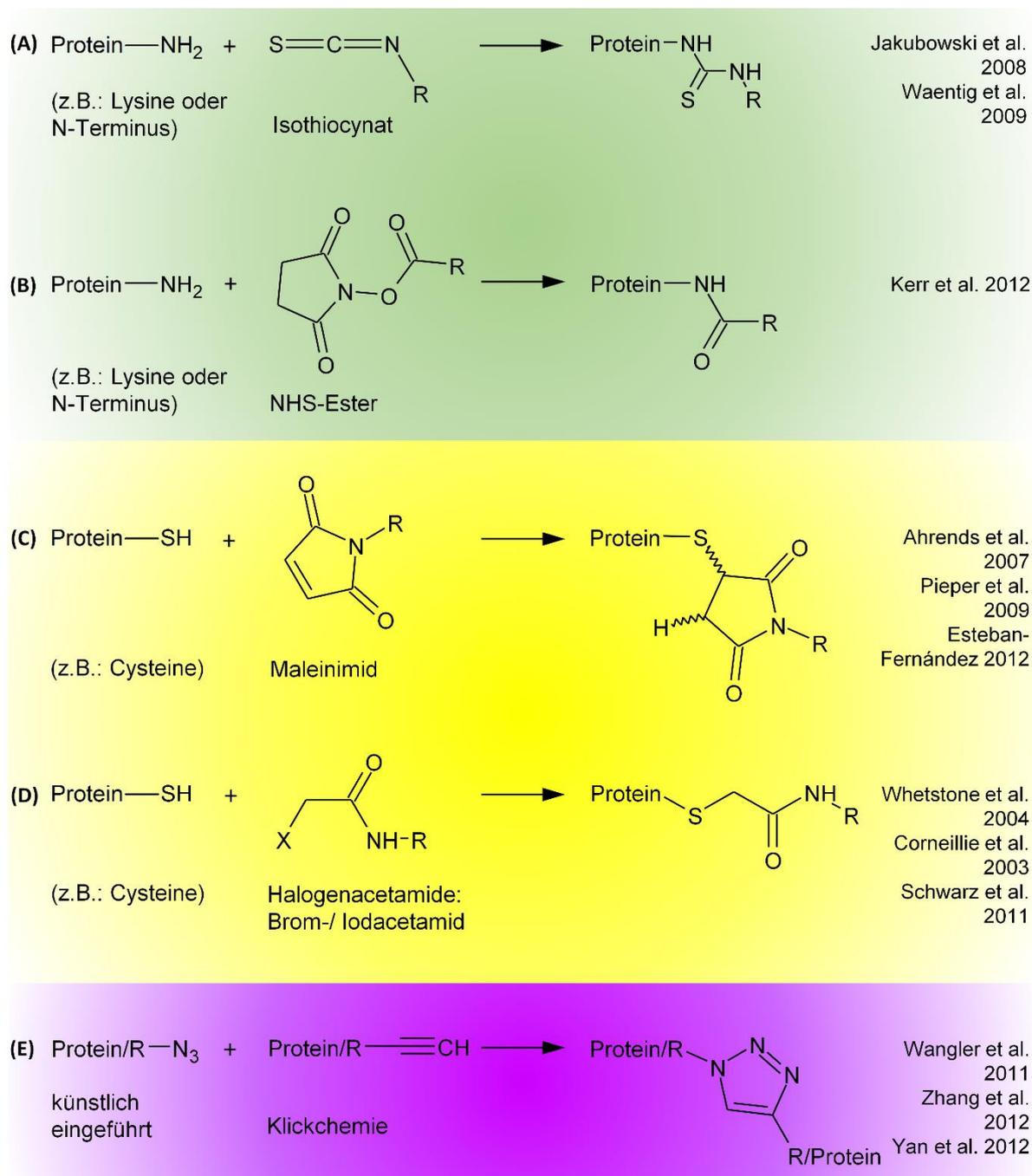


Abb. 1.18: Überblick über verschiedene Markierungs-Methoden zur kovalenten Einführung eines oder mehrerer (Metallion)-DOTA-Moleküle in Proteine oder Peptide. R steht für eines der in Abbildung 1.17 B gezeigten DOTA-Moleküle.

Eine weitere Alternative würde die, der Klick-Chemie zugeordnete, Huisgen-(3+2)-Zykloaddition zwischen Alkinen und Aziden bieten (Abbildung 1.18 D). Diese liefern gewöhnlich gute Ausbeuten und benötigen keine komplexen Aufreinigungsschritte (Kolb *et al.* 2001). Ein großer Nachteil ist jedoch, dass entweder eine Alkin- oder Azid-Gruppe in die Proteine eingeführt werden muss, so dass eine Zusatzreaktion vor der Markierung erfolgen

muss. Bis jetzt zielten die Arbeiten darauf ab DOTA-markierte Peptide oder Proteine mittels Klick-Chemie zum diagnostischen Imaging oder therapeutischen Zwecken herzustellen (Wängler *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012). In Zukunft jedoch könnten diese Strategien auch zur quantitativen Protein-/Peptidanalyse eingesetzt werden.

I.6 Analyse von Proteaseaktivitäten mittels Massenspektrometrie

Proteasen sind eine ubiquitär vorkommende Klasse von Enzymen die in Organismen mannigfaltige Funktionen ausüben. Proteolyse wird als eine der wichtigsten Post-translationalen Proteinmodifikationen betrachtet. Diese ist verantwortlich für die Proteinqualitätskontrolle und den Proteinumsatz und ist außerdem in eine Reihe pathologischer Prozesse wie bspw. Krebs oder Entzündungskrankheiten involviert. Zusätzlich repräsentieren Proteasen ein wertvolles analytisches Werkzeug, v. a. in der Proteomanalyse. Für ein tieferes Verständnis proteolytischer Reaktionen ist das Profiling und Screening neuer Proteasen und ihrer Substrate in der Biotechnologie, die Entwicklung von Inhibitoren, die Optimierung der Reaktionsbedingungen und die Kenntnis der Enzymaktivitäten eine wichtige Voraussetzung. Schnelle, genaue und sensitive analytische Methoden sind notwendig um Aktivitäts-Screenings durchzuführen und weitere Eigenschaften der Proteasen zu untersuchen.

Meistens werden Proteaseaktivitäten mittels sensitiver und schneller spektralphotometrischer Assays mit chromophoren und fluorophoren Substraten oder durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) untersucht. Der Haupt-Nachteil dieser Methoden ist, dass sie normalerweise auf ein einziges Substrat beschränkt sind. Des Weiteren benötigen optische Methoden meist eine Derivatisierung der Substrate. Diese Derivatisierungen können jedoch die Eigenschaften eines Substrates in einer enzymatischen Reaktion ungemein beeinträchtigen (Liesener & Karst 2005b). Irreführende Ergebnisse können aber auch von störenden Puffern oder Kofaktoren in der Reaktionsmischung herrühren. Außerdem ist ein Multiplexing eine große Herausforderung aufgrund überlappender Absorptionen oder Fluoreszenzen der Markierungen (Washburn *et al.*, 2001; Wolters *et al.*, 2001). Wegen dieser Beschränkungen wurden in den letzten Jahren zunehmend Methoden weiter vorangetrieben die auf der massenspektrometrischen Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentrationen beruhen. Zusammen mit Elektrospray-basierten Vorgehensweisen (Gerber *et al.* 2001; Norris *et al.* 2001; Konermann & Douglas 2002; Liesener & Karst 2005a) wurde die Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation in einer Reihe von Studien zu Screeningzwecken und um die

kinetischen Eigenschaften proteolytischer Reaktionen zu bestimmen, erfolgreich angewendet (Bothner *et al.* 2000; Schlüter *et al.* 2003; Bungert *et al.* 2004; Tholey *et al.* 2006). Da bei der MALDI MS jedoch in vielen Fällen kein linearer Zusammenhang zwischen Peptidmenge und Signalintensität besteht, verursacht bspw. durch inhomogene Probenpräparation, ist die Verwendung interner Standards für die Peptidquantifizierung empfehlenswert (Gusev *et al.* 1996; Meng & Limbach 2005). Alternativ dazu kann auch die Probenpräparation verbessert werden. Bspw. durch die Verwendung von „*ionic liquid matrices*“, die auch ein direktes Bestimmen der quantitativen Information in einem engen dynamischen Bereich erlauben (Tholey *et al.* 2006).

Interne Standards oder „*tags*“ zur relativen Quantifizierung verschiedener Proben müssen mehrere Bedingungen erfüllen. Zum einen sollten die internen Standards eine hohe molekulare Ähnlichkeit mit den Analyten haben, sowie ähnliche massenspektrometrische Eigenschaften, sodass Isotopen markierte Analoga der Analyten zu diesem Zweck bestens geeignet sind. Zum anderen muss eine genügend hohe Anzahl der unterschiedlichen Labels/Markierungen erhältlich sein, um Multiplexing-Analysen durchzuführen. Auch zur Untersuchung zeitabhängiger Verläufe oder verschiedener Reaktionsbedingungen ist eine ausreichende Anzahl unterschiedlicher Labels notwendig. Wie bereits beschrieben wurden zur absoluten oder relativen Quantifizierung im MS/MS-Modus isobare Markierungen wie iTRAQ (Ross *et al.* 2004) und TMT (Thompson *et al.* 2003) entwickelt. Diese erlauben es 4 bis 8 Kanäle im Fall von iTRAQ (Pottiez *et al.* 2012) sowie 8-10 Kanäle im Fall von TMT (Werner *et al.* 2012; Werner *et al.* 2014; McAlister *et al.* 2012) parallel zu analysieren.

So erlaubt auch die Quantifizierung mittels Lanthanoid-DOTA-markierter Peptide ein umfassendes Multiplexing. Peptide können über ihren Metallgehalt mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) mit hoher Genauigkeit und Sensitivität **absolut** quantifiziert werden (Tholey & Schaumlöffel 2010); zudem ist die ICP-MS sehr robust gegenüber vielen Matrices. Basierend auf dieser Methode haben Lathia *et al.* einen Protease-Assay etabliert, indem Element-markierte Substrate verwendet werden (Lathia *et al.* 2010). Sie demonstrieren die Sensitivität und Anwendbarkeit als Quadruplex-Assay, geeignet zur simultanen Quantifizierung vier unterschiedlich markierter Substrate (Lathia *et al.* 2011). Aber da die ICP-MS keine molekulare Information bereitstellt, impliziert dies, dass die Schnittstellenspezifitäten oder mögliche Nebenprodukte entweder bereits näher charakterisiert sein müssen oder während der gesamten Analyse unbekannt bleiben. Deswegen wird in vielen Studien eine Kombination aus ICP-MS, zur relativen oder absoluten

Quantifizierung der Peptide und Proteine, und molekularer Massenspektrometrie, insbesondere ESI oder MALDI MS, zur Identifizierung der Peptide/Proteine empfohlen (Ahrends *et al.* 2007; Rappel & Schaumlöffel 2009; Tholey & Schaumlöffel 2010; Kutscher *et al.* 2008).

II. Problemstellung und Zielsetzung

Jede der bisher etablierten Strategien zur quantitativen Proteomanalyse mit Hilfe stabiler Isotopenmarkierung hat ihre eigenen Stärken und Schwächen, sodass immer wieder neue Methoden gesucht und etabliert werden müssen. Die meisten Vorläuferionen-basierten Methoden, wie ICAT oder ICPL bspw. sind hinsichtlich der Multiplexing-Kapazitäten auf den Vergleich 2-4 unterschiedlicher Proben beschränkt. Die Verwendung isobarer Markierungsstrategien erlaubt zwar den gleichzeitigen Vergleich von bis zu 10 (TMT) (Werner *et al.* 2014; McAlister *et al.* 2012) bzw. bis zu 8 Proben (iTRAQ)(Pottiez *et al.* 2012), birgt aber andere Nachteile. Bei hochkomplexen Proben gelangen bspw. bei der Vorläuferionenselektion Peptide ähnlicher Masse aus dem Hintergrund in das Isolationsfenster und werden schließlich zusätzlich fragmentiert. Dadurch ist unklar ob das gemessene Verhältnis, dem des Peptids von Interesse oder dem Hintergrund entspricht; es kommt zur *Underestimation* der wirklichen Verhältnisse (Bantscheff *et al.* 2007). Des Weiteren müssen zur absoluten Quantifizierung mit stabiler Isotopenmarkierung aus synthetischen Peptiden zeit- und kostenintensiv interne Standards hergestellt werden.

Die Verwendung Lanthanoid-markierter Chelatkomplexe zur Protein-/Peptidmarkierung bietet demgegenüber umfassende Multiplexingkapazitäten und die Möglichkeit der absoluten Quantifizierung mittels ICP-MS. Die Quantifizierung mittels ICP-MS kann dann mit Hilfe von Protein- bzw. Peptidunabhängigen Metallstandards erfolgen.

Zur Etablierung einer *Labeling*strategie als Tool für die quantitative Proteomanalyse müssen die Derivatisierungs-Tags jedoch erst bestimmte Voraussetzungen erfüllen. So müssen die markierten Peptide ein adäquates Verhalten in der gewählten analytischen Methode, insbesondere der Massenspektrometrie, zeigen. Der Fokus dieser Arbeit lag in der qualitativen und quantitativen Analyse DOTA- und Lanthanoid-DOTA-markierter Peptide (Amino- und Sulfhydryl-gerichtete Markierung) hinsichtlich ihres Verhaltens in der MALDI MS- und MS/MS-Analyse. In der qualitativen Analyse steht an erster Stelle, dass die markierten Peptide eine ausreichende Ionisierbarkeit im Vergleich zum unmarkierten Peptid aufweisen. Somit sollten sie zuallererst mit den unmarkierten Peptiden hinsichtlich ihrer Signal-zu-Rausch-Verhältnisse ($S/N = \text{signal to noise}$) verglichen werden, denn eine hinreichende Sensitivität ist die Grundvoraussetzung jeder Methode. Des Weiteren sollte die Stabilität der derivatisierten Peptide sowie der Metallion-DOTA-Komplexe unter MALDI MS-

Bedingungen gewährleistet sein. Eventuell bei der Ionisation auftretende unerwünschte Additions- oder Zerfallsprodukte sollten untersucht werden. Das heißt, es muss die Frage beantwortet werden ob die komplexierten Metallionen während des gesamten MALDI-Prozesses, also auch während der Peptidfragmentierung, am DOTA-Makrozyklus gebunden bleiben, sowie ob der Makrozyklus selbst vollständig erhalten bleibt.

Das Fragmentierungsverhalten der Peptide wurde dahingehend untersucht, dass genügend Fragmentationen entstehen, die eine Sequenzanalyse, bzw. eine Datenbankanalyse der Fragmentspektren erlauben. Hierzu sollten Fragmentspektren freier und derivatisierter Modell-Peptide verglichen und die Fragmentierungsmuster hinsichtlich der Derivatisierungsposition analysiert werden. Darüber hinaus wurden Markierungs-spezifische Ionen ermittelt, die in unbekanntem Proben bspw. eine einfache Zuordnung der Fragmentspektren zu den inkorporierten Metallionen erlauben bzw. eine einfache Unterscheidung zwischen unmarkierten und markierten Peptiden ermöglichen.

Außerdem sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen Massentags (je nach verwendetem Lanthanoid) zur differentiellen Quantifizierung die gleiche Ionisationseffizienz besitzen. Neben der Analyse der Modellpeptide wurden auch Verdau von einzelnen Proteinen und Proteinmischungen vor und nach Derivatisierung auf die Anzahl der Peptididentifizierungen und der Sequenzabdeckung untersucht.

Hinsichtlich der quantitativen Performance der Methode wurden sowohl Einzelpeptide als auch Peptidmischungen aus einem Verdau von sechs Proteinen untersucht und gleichzeitig mit einer etablierten Methode der iTRAQ-Quantifizierung verglichen. Diesbezüglich sollten beide Methoden hinsichtlich ihrer Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und ihres dynamischen Bereichs geprüft werden.

Ferner wurde die Anwendbarkeit der Methode auch anhand eines Beispiels auf gezielte Fragestellungen, wie die Untersuchung proteolytischer Aktivitäten, geprüft. Dazu wurde die proteasekatalysierte Peptidhydrolyse durch Markierung von Substrat und Produkt mit DOTA und verschiedenen Lanthanoiden zeitaufgelöst dargestellt. Zudem wurde getestet, ob die Multiplexingkapazitäten, die Genauigkeit und der dynamische Bereich der Methode ausreichend sind, um in einem einzigen Ansatz simultan die zeitabhängige Proteolyse unterschiedlicher Substratkonzentrationen zu verfolgen. Schließlich sollte auch die Kompatibilität der Methode mit der IP-RP-HPLC anhand einer Multi-Substrat-Umgebung, erzeugt durch den Verdau einer 20 Proteinmischung, analysiert werden.

III. Material und Methoden

III.1 Material

DOTA-NHS-ester (2,2',2''-(10-(2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid) wurde von CheMatech (Dijon, France) und Maleinimido-DOTA von Macrocyclics (Dallas, Tx, USA) bezogen. Die synthetischen Peptide wurden mittels Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese (R. Pipkorn, DKFZ, Heidelberg, Deutschland) hergestellt (Tabelle 3.1). Alle Standardproteine, Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP, $\geq 98\%$), S-Methyl-Methanthiosulfonat (MMTS), Triethylammonium-bicarbonat Puffer (TEAB; 1M, puriss. P.a.), Triethylammonium-acetat Puffer (TEAA; 1M, puriss. P.a.), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), Phenylmethan-sulfonylfluorid (PMSF), Trifluoressigsäure (ca. 98%), Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril (ACN, E Chromasolv), die Lanthanoid(III)chlorid-hexahydrat Salze von Terbium, Holmium, Thulium und Lutetium, Glu1-Fibrinopeptid B, Neurotensin ($\geq 90\%$), Oxytocin, H6387, Endoprotease GluC (*Staphylococcus aureus*) und α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (CHCA) für die LC-Experimente wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die Matrix α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure für die Einzelspotanalysen wurde von Laserbiolabs (Sophia-Antipolis Cedex, France) erhalten. Trypsin (*Sus scrofa*) stammt von Promega (Madison, MI, USA), isotopenangereichertes Samarium (^{152}Sm 96,5%), Gadolinium (^{156}Gd 95,5%), Dysprosium (^{162}Dy 94,4%) und Ytterbium (^{172}Yb 95%) von Eurisotop (Saint-Aubin Cedex, France). Der Protease Inhibitor Complete Mini, EDTA (Ethylendiamintetraacetat) frei wurde von Roche Diagnostics (Basel, Schweiz) bezogen. Entionisiertes Wasser (18,2 M Ω *cm) wurde mit einem Arium®611VF System (Sartorius, Göttingen, Deutschland) hergestellt und für alle Experimente verwendet. Das zur MS-Kalibrierung verwendete 4700 Proteomics Analyzer Standard Kit sowie die iTRAQ-4plex Reagenzien wurden von AB SCIEX (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

III.2 Software

Die Peakflächen, S/N-Verhältnisse und Spektren wurden der 4000 Series *explorer software* (Version 4.0.0, AB SCIEX, Darmstadt, Deutschland) entnommen. Die Datenbank-Identifizierung aller Peptide bzw. Proteine wurde mithilfe von *Mascot server* (Version 2.2.04,

Matrix Sciences, London, England) vorgenommen. Alle LC-MALDI MS- und -MS/MS-Daten der DOTA-markierten Proben wurden mithilfe des *Ab Sciex mz converter* in mzML-Dateien umgewandelt. Die mzML-Dateien wurden mithilfe des *Proteowizards* (Version 1.6.0, SourceForge) in das mzXML-Format umgewandelt. Die quantitative Analyse der Ln^{3+} -DOTA-markierten Verdauungen in Form der mzXML-Dateien wurde mit der *Mascot distiller software* (Version 2.3.2.0, Matrix Sciences, London, England) durchgeführt. Die LC-MALDI MS/MS Daten der iTRAQ markierten Proben wurden mithilfe der *TS2Mascot software* (Matrix Sciences, London, England) in mgf-Dateien (*mascot generic format*) umgewandelt. Die Quantifizierung der iTRAQ-markierten Proben wurde ebenfalls mit *Mascot server* vorgenommen.

III.3 Methoden

III.3.1 Amino-gerichtete Derivatisierung der Modellpeptide

Die Reduktion der Cystein-haltigen Peptide (siehe Tabelle 3.1) wurde für eine Stunde bei 60°C mit einem dreifach molaren Überschuss von TCEP pro Cystein-Rest durchgeführt. Ein Aliquot der Cystein-haltigen Peptide wurde zur Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA entnommen; der Rest wurde mit einem 6fach molaren Überschuss von MMTS zu Cysteinen für 10 min bei RT alkyliert. Für das Amino-reaktive-Labeling wurden die Modellpeptide (1 mM Stock-Lösungen) mit einem 100fach molaren Überschuss von DOTA-NHS-Ester (15 mM, gelöst in wasserfreiem DMSO) zu freien Aminogruppen für 1h bei Raumtemperatur in 75% ACN+25% HEPES (pH >7,5) derivatisiert.

Tab. 3.1: Auflistung der synthetischen Peptide zur Einzelpeptid-Derivatisierung

Cystein-haltige Peptide		Cystein-freie Peptide	
Peptid	Sequenz	Peptid	Sequenz
S31	Ac-GC*NASAR	S28	Ac-GK*NASAR
S32	Ac-GANC*SAR	S29	Ac-GANK*SAR
S33	Ac-GANASC*R	S30	Ac-GANASK*R
S34	C*C*TKPESER	S35	*VLASSAR
S36	GA*CLLPK		
T2	IKC*FNC*GK		

Die Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA erfolgte in 50 mM HEPES (pH 7) bei 37 °C für 2h mit einem 20fachen Überschuss von Derivatisierungsreagenz zu Cysteinen.

III.3.2 Beladung der DOTA-markierten Peptide mit Metallionen

Zur Synthese Metall-markierter Peptide wurden die DOTA-markierten Peptidlösungen (175 μM) für 1 min mit einer der vier Lanthanoidstocklösungen (Tb^{3+} , Ho^{3+} , Tm^{3+} , Lu^{3+} ; 10 mM in 100 mM TEAA, pH 5,0) gevortext. Für die 6plex Experimente (Kapitel IV.2.1) wurden die mit NHS-DOTA oder Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptidlösungen (175 μM) für 1 min mit einer der sechs Lanthanoidstocklösungen (Pr^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , Ho^{3+} , Tm^{3+} , Lu^{3+} ; 10 mM in 100 mM TEAA, pH 5,0) gevortext. Für alle Ansätze wurde mindestens ein 2,75facher Überschuss von Lanthanoid zu Derivatisierungsreagenz verwendet (ca. 350 nmol DOTA in 20 μl , 960 nmol Ln^{3+} in 96 μl). Die Pr^{3+} -, Sm^{3+} -, Tb^{3+} -, Ho^{3+} - und Tm^{3+} -DOTA-markierten Lösungen (30 μM) wurden vereinigt und mit 5% ACN, 0,1% TFA zu 60 fmol/ μl Lösungen verdünnt. Die Lu^{3+} -markierte Lösung wurde zu 13 unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt, wonach sich Verhältnisse von 50:1 bis hin zu 0,01:1 zu den 5 anderen Metallionen ergeben.

III.3.3 Isobares Labeling der Modellpeptide

Aliquots von jeweils 20 μl der alkylierten oder nicht-Cystein-haltigen Peptidlösungen wurden dem iTRAQ 4plex Labeling (laut Hersteller) unterzogen. Die Proben wurden dazu mit iTRAQ-Reagenz (gelöst in 70 μl Ethanol, 70%) 1min gevortext und 1h bei RT inkubiert. Zur Entfernung des Ethanols wurden die Proben eingeeengt und mit 5% ACN, 0,1% TFA auf eine Konzentration von 40 pmol/ μl gebracht. Zur Bestimmung des dynamischen Bereichs wurden die 114-, 115- und 116-markierten Peptidlösungen (40 μM) vereinigt und mit 5% ACN, 0,1% TFA zu 60 fmol/ μl Lösungen verdünnt. Die iTRAQ 117-markierten Proben wurden analog zu den Lutetium-markierten Peptiden zu 13 unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt. Der schematische Arbeitsablauf zur Markierung und Quantifizierung der Einzelpeptide ist in Kapitel IV.2.1 in Abbildung 4.11 ausführlich dargestellt.

III.3.4 Proteinverdau und Markierung für die qualitative Analyse

Eine Stocklösung von Rinderserumalbumin (5 mg/ml) wurde mit einem dreifach molaren Überschuss von TCEP zu Cysteinresten (9 μl , 50 mM) in 40 mM TEAB-Puffer für 1 h bei 60°C reduziert. Die reduzierten Proteine (300 μg) wurden 10 h in 40 mM TEAB, pH 8 bei 37°C mit Trypsin (3 μg) verdaut (Gesamtvolumen 300 μl). Der Verdau wurde in drei Aliquots geteilt. Die Amino-gerichtete Derivatisierung erfolgte durch Zugabe von 1 mg DOTA-NHS-Ester (gelöst in wasserfreiem DMSO) für 1h bei Raumtemperatur in 75% ACN+25% 100 mM HEPES (pH >7,5) derivatisiert. Die Thiol-Derivatisierung erfolgte in 50 mM HEPES (pH 7)

bei 37°C für 2 h mit 800 µg Maleinimido-DOTA (~20facher Überschuss von Derivatisierungsreagenz zu Cysteinen). Zur Beladung der Peptid-gebundenen DOTA-Komplexe wurde ein 10fach molarer Überschuss der Lanthanoidionen (Tb^{3+}/Tm^{3+}) gegenüber Derivatisierungsreagenz eingesetzt und 2h bei 37°C inkubiert.

III.3.5 Proteinmischung für die LC-MALDI MS/MS-Analyse (qualitative Analyse)

Eine Mischung der sechs Proteine BSA, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Serotransferrin, humanes Transferrin und Hühnerlysozym wurde mit 12 µl TCEP (50 mM) für 1 h bei 60°C reduziert. Die Probe wurde geteilt (jeweils 300 µg Total-Protein) und ein Aliquot wurde mit 6 µl MMTS (200 mM) 10 min bei RT alkyliert. Beide Proben wurden mit jeweils 6 µg Trypsin vier Stunden lang verdaut. Ein Aliquot der nicht-alkylierten Probe (40 µg) wurde mit 400 µg Maleinimido-DOTA 2 h bei 37°C derivatisiert. Zur Beladung der Chelatoren mit Metallionen wurde ein fünffacher Überschuss Lutetium zu Derivatisierungsreagenz verwendet. Alle Proben wurden mit 5% ACN, 0,1% TFA zu 5 nM Lösungen verdünnt. Jeweils zwei technische Replikate der chromatographischen Trennung wurden durchgeführt.

III.3.6 Proteinmischung für die LC-MALDI MS/MS-Analyse (quantitative Analyse/iTRAQ-DOTA-Vergleich)

Zum Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen eines Proteins wurden aus 75 µM Proteinstocklösungen von bovinem Serumalbumin, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Serotransferrin, humanem Transferrin und Hühnerlysozym wie in Tabelle 3.2 gezeigt, 4 unterschiedlich zusammengesetzte Proteinmischungen A1-A4 hergestellt. Proteinmischung A3 simuliert ein biologisches Replikat von A2.

Tab. 3.2: Zusammensetzung der Proteinmischungen A1-A4. In Mischung A 1 liegen niedrige Konzentrationen von humanem Transferrin, Albumin, β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin vor. A2 stellt ein biologisches Replikat von A3 mit einem Verhältnis der Proteine von 1:1 dar. In Mischung A4 liegen hohe Konzentrationen von Albumin, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin vor.

	pmol/µl	A1 [µl]	A2 [µl]	A3 [µl]	A4 [µl]	A1/A2	A2/A2	A3/A3	A4/A2
Transferrin (Mensch)	75,15	2	50	50	50	0,04	1	1	1
Albumin (Rind)	75,07	10	50	50	200	0,2	1	1	4
α -Lactalbumin (Rind)	75,13	20	50	50	250	0,4	1	1	5
β -Lactoglobulin (Rind)	75,09	10	50	50	300	0,2	1	1	6
Transferrin (Rind)	74,98	50	50	50	50	1	1	1	1
Lysozym (Huhn)	75,29	50	50	50	50	1	1	1	1

Die vier Mischungen wurden mit 50 mM TEAB auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt (A1 = 450 µg Protein, A2 = A3 = 1000 µg, A4 = 2400 µg). Die Thiol-Gruppen in je 240 µl der Mischungen A1-A4 wurden mit 5 µl 50 mM TCEP in 50 mM TEAB für 1 h bei 60°C reduziert. Anschließend wurden die Proben mit 10 µg Trypsin für 16 h bei 37°C verdaut. Zur iTRAQ-Derivatisierung wurden jeweils 20 µl von den Mischungen A1-A4 entnommen und jeweils 1 µl MMTS (200 mM) und 9 µl TEAB (1 M) zugegeben. Die Blockierung der Cystein-Seitenketten erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Die iTRAQ-Reagenzien 114-117 wurden mit 70 µl Ethanol (70%) versetzt und zum Lösen der Reagenzien 1 min gevortext. Alle Proben A1-A4 wurden mit den Reagenzien wie in Tabelle 3.2 gezeigt, versetzt und 1 h bei RT inkubiert.

Zur Amino-gerichteten Derivatisierung wurden 20 µl der Verdau mit 1 µl MMTS 10 min bei RT alkyliert und die Derivatisierung erfolgte 2 h bei RT mit 200 µg NHS-DOTA-Ester (in 2% DMSO, 200 mM HEPES, pH 7,5). Zur Sulfhydryl-gerichteten-Derivatisierung wurden 20 µl der Verdau mit 100 µg Maleinimido-DOTA (in 50 mM HEPES, pH 7,0) für 2h bei 37°C inkubiert. Die Beladung mit Metallionen von je 20 µl der DOTA-derivatisierten Proben A1-A4 wurde durch Zugabe von 70 µl der Lanthanoid-Stocklösungen (10 mM in 100 mM TEAA, pH 5,0; $^{152}\text{Sm}^{3+}$ -, Tb^{3+} -, Ho^{3+} - und Lu^{3+} -) entsprechend Abbildung 4.15 (Kapitel IV.2.2) durchgeführt und anschließend 1 min gevortext.

III.3.7 MALDI MS-Probenvorbereitung

Vor der Vereinigung der derivatisierten mit den unmodifizierten Peptiden, wurden die Proben mit 10% TFA angesäuert (bis zu einem $\text{pH} < 4$). Für den Intensitäts-Vergleich der Einzelpeptide wurden je 50 fmol der Lösungen (50 nM) in CHCA auf ein Target (Opti-TOF™ 384-well plate; AB SCIEX, Darmstadt, Deutschland) gespottet. Die Verdau wurden mit 30% ACN, 0,1% TFA zu 250 pM Lösungen verdünnt und jeweils 1 µl, entsprechend 250 amol, mit 1 µl CHCA (4 mg/ml in 50% ACN, 0,1% TFA) gespottet.

III.3.8 Trennung mittels nano-IP-RP-HPLC

Die Peptide aus dem Verdau der sechs Modelproteine wurden mit einem U3000 nano HPLC-System (Dionex, Idstein, Deutschland), welches direkt an einen Probot microfraction collector (LC Packings, Amsterdam, Niederlande) gekoppelt ist, chromatographisch getrennt und auf MALDI-Targets gespottet. Volumina von 20 µl der 5 nM Peptidlösungen wurden über eine 50 µl Probenschleife mit einem Fluss von 30 µl/min (0,1% wässrige TFA, 3% ACN; 6 min) auf einer Acclaim PepMap100 C18 Trap-Säule (5 µm, 0,3x 10 mm; Dionex Idstein,

Deutschland) angereichert. Die Peptide wurden dann auf eine Acclaim PepMap100 C18 Trennsäule (5 μm , 75 μm x 150mm; Dionex Idstein Deutschland) geladen. Die Trennung der Peptide erfolgte mit einem Fluss von 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ und dem folgenden Gradienten: 6-110 min 5%-50% B, 101-111 min 50%-95% B, 111-116 min 95% B, 116-117 min 95%-5% B, 117-135 min 5% B. Eluent A setzt sich zusammen aus 0,05% wässriger TFA und Eluent B aus 80% ACN, 0,04% TFA, 20% deionisiertes Wasser (v/v/v). Die eluierten Peptide wurden direkt mit Matrixlösung in einem Verhältnis von 1:3 (v/v) gemischt (3 mg/ml CHCA in 70% ACN, 0,1% TFA, 5 nM Glu¹-fibrinopeptid B) und in 15 s Intervallen von Minute 15-125 gespottet.

III.3.9 Analyse mittels MALDI-TOF MS und MS/MS

Alle MALDI MS-Analysen wurden auf einem AB SCIEX TOF/TOFTM 5800 System (AB SCIEX, Darmstadt Deutschland) im Reflektor positiv Ionenmodus durchgeführt. Die MS-Daten wurden mit insgesamt 1000-2000 Schuss pro Spektrum (200 Schuss pro Subspektrum, Akkumulation von 10 Subspektren) mit einer Laserpulsrate von 400 Hz aufgenommen. Für die Einzel-Peptid-Messungen wurde die MS-Kalibrierung als Default Kalibration durchgeführt. Die MS-Spektren der LC-MALDI-Experimente wurden intern auf Glu¹-Fibrinopeptid B und einen Matrixcluster bei einem m/z von 877,034 kalibriert. Für die MS/MS-Spektren wurden die Signale von 2500 Schüssen gemittelt bei einer Pulsrate von 1000 Hz. Die Vorläuferionen wurden mittels zeitlicher Ionenselektion mit einer Auflösung von 300 (FWHM) isoliert. Die Peptide wurden entweder mit PSD oder CID fragmentiert, mit einer Verzögerung/ Abbremsung auf eine Energie von 1kV. Für CID Experimente wurde Raumluft mit einem mittleren Druck von 10⁻⁶ Torr verwendet. In den Proteinverdauen wurden die acht intensivsten Signale zur Fragmentierung ausgewählt. Die Fragmentspektren wurden mit dem „*Ion fragmentation calculator*“, welcher in der Data explorer software 4.10 implementiert ist, manuell analysiert. Für die LC-MALDI MS-Analyse wurden die 15 intensivsten Signale pro Spot mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mindestens 30 ausgewählt und mittels CID fragmentiert.

III.3.10 Proteinidentifizierung und Datenbanksuche

Die Datenbankanalyse der Sechs-Protein-Mischung wurde mit Hilfe von Mascot 2.2.04 in der SwissProt-Datenbank (Heruntergeladen am 15.10.2009) mit Einträgen beschränkt auf Chordata, Trypsin als Enzym, zwei erlaubte Fehlschnittstellen, Precursortoleranz von 20 ppm und eine Fragmenttoleranz von 0,5 Da durchgeführt. Die Methioninoxidation wurde als

variable Modifikation ausgewählt, sowie „Methylthio“-Cysteine“ oder „Lu-DOTA“-Cysteine jeweils als fixe Modifikation.

III.3.11 Einzel-Substrat-Protease-Assay

Zur Untersuchung des tryptischen Verdaus im Einzel-Substrat-Ansatz wurde das Peptid Neurotensin mit TEAB (25 mM) auf 8 verschiedene Konzentrationen zwischen 9,75 μM und 15 μM verdünnt. Zu 180 μl jeder Verdünnung wurden gleichzeitig 12 ng Trypsin in 20 μl 25 mM TEAB mit der Mehrkanal-Pipette gegeben, um die Enzymreaktion zu starten. Nach bestimmten Zeitintervallen (30 s, 60 s, ..., 60 min) wurden 20 μl Aliquots entnommen und sofort in 40 μl Quenching-Lösung bzw. Stopp-Lösung (250 μM PMSF, 17 μM AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzonsulfonylfluorid)) gegeben. Die Derivatisierung erfolgte schließlich durch Zugabe von 40 μl Derivatisierungslösung (12,5 mM NHS-DOTA) in 75% ACN +25% 200 mM HEPES (pH > 7,5)) und Inkubation für 2 h bei RT. Zur darauffolgenden Beladung mit Metallionen wurden jeweils 20 μl der derivatisierten Peptide entnommen und mit 50 μl der Lanthanoid-Lösungen (Tm^{3+} , Ho^{3+} , Dy^{3+} , Tb^{3+} , Gd^{3+} , Sm^{3+} , Pr^{3+} oder La^{3+} ; 5 mM in 100 mM TEAA, pH 5,0) komplexiert. Somit wurde ein 2,5fach molarer Überschuss von Lanthanoid zu Derivatisierungsreagenz bei diesen Komplexbildungs-Reaktionen gewählt. Zur Erzeugung des internen Produkt-Standards (ISP) wurde Neurotensin (15 μM) 16 h lang mit 12 ng Trypsin verdaut. Zur Erzeugung des internen Substrat-Standards (ISS) wurde Neurotensin (15 μM) mit 25 mM TEAB anstelle des Enzyms inkubiert. Das anschließende Quenching, die Derivatisierung und Metall-Beladung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Der gesamte Arbeitsablauf des Einzel-Substrat-Protease-Assays ist in Kapitel IV.3.1 Abbildung 4.20 schematisch dargestellt.

III.3.12 Probenvorbereitung für den Multi-Substrat-Protease-Assay

In 2 mg einer Mischung von 20 Proteinen (siehe Tabelle 3.3) wurden die Cysteine wie bereits beschrieben reduziert und alkyliert. Um kürzere Fragmente für den nachfolgenden tryptischen Verdau zu erzeugen wurden die Proteine erst mit der Endoprotease Glu-C in 100 mM HEPES pH 7,5 für 16 Stunden bei 37°C verdaut. Die entstandenen Peptide wurden von unverdauten Proteinen und der Protease über 10 kDa *cut off* Filter (Amicon Ultra-0,5 ml Zentrifugalfilter) abgetrennt und der die Peptide enthaltende Durchfluss wurde mit 25 mM TEAB zu Proteinkonzentrationen von $\beta_1 = 1,9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und $\beta_2 = 0,85 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($=\beta_1/2$) verdünnt.

Tab. 3.3: Zusammensetzung der 20-Proteinmischung, mit Angabe ihrer UniProtKB-ID-Nummern, der Konzentration der Stocklösung und der Stoffmengenkonzentrationen im GluC-Verdau.

Proteinname (Organismus)	UniProtKB identifier	β [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	c [$\text{pmol}/\mu\text{l}$]
Albumin (Rind)	P02769 - ALBU_BOVIN	10,06	145,11
Ovalbumin (Huhn)	P02769 - ALBU_BOVIN	10,18	229,83
Carboanhydrase 2 (Rind)	P00921 - CAH2_BOVIN	9,95	341,61
β -Lactoglobulin (Rind)	P02754 - LACB_BOVIN	9,99	546,43
Histon H1a Typ I	P0C0S9 - H2A1_BOVIN	10,23	682,14
Transferrin (Rind)	Q29443 - TRFE_BOVIN	10,29	132,30
Transferrin (Mensch)	P02787 - TRFE_HUMAN	10,13	131,49
Ubiquitin (Rind)	P0CG53 - UBB_BOVIN	5,09	275,76
Malatdehydrogenase (Schwein)	P00346 - MDHM_PIG	8,50	178,85
Lysozym (Huhn)	P00698 - LYSC_CHICK	10,10	622,15
Myoglobin (Rind)	P02192 - MYG_BOVIN	4,53	75,68
Katalase (Rind)	P00432 - CATA_BOVIN	10,26	171,28
Ribonuklease (Rind)	P61823 - RNAS1_BOVIN	10,10	613,42
Cytochrom c (Pferd)	P00004 - CYC_HORSE	10,07	850,79
α -Lactalbumin (Rind)	P00711 - LALBA_BOVIN	10,13	623,64
α -Casein (Rind)	P02662 CASA1_BOVIN	10,22	416,84
β -Casein (Rind)	P02666 - CASB_BOVIN	10,21	406,65
α -Crystallin (Rind)	P02470 - CRYAA_BOVIN, P02510 - CRYAB_BOVIN	4,59	230,44
Alkohol-Dehydrogenase (Rind)	P00327 - ADH1E_HORSE, P00328 - ADH1S_HORSE	10,19	255,13
Phosphorylase B (Kaninchen)	P00489 - PYGM_RABIT	9,46	97,23

III.3.13 Multi-Substrat-Protease-Assay

Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs einer tryptischen Proteolyse wurden zu 180 μl Aliquots jeder Verdünnung (Substratkonzentrationen β_1 , β_2) 0,6 μg Trypsin zugegeben. Das Quenching, die Derivatisierung und die Komplexierung der Lanthanoidionen erfolgten wie bereits für die Einzel-Substrat-Analyse beschrieben. Für jede Substratkonzentration wurde zusätzlich ein technisches Replikat angefertigt, d.h. für jede Substratkonzentration wurden

parallel zwei Enzymreaktionen durchgeführt. Alle Proben des zeitlichen Verlaufs wurden jeweils einmal mit Tb (β_1 -A), Dy (β_1 -B), Ho (β_2 -A), oder Tm (β_2 -B) durchgeführt. Zum reversen *Labeling* wurde β_1 -A mit Tm, β_1 -B mit Ho, β_2 -A mit Tb und β_2 -B mit Dy markiert. Die internen Standards wurden ebenfalls analog wie bei der Einzelsubstrat-Analyse unter Verwendung der höheren Substratkonzentration (β_1) generiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich noch Aliquots jeder Substratkonzentration mit Puffer anstelle der Enzym-Lösung inkubiert, im Folgenden als „0 min“-Zeitpunkt bezeichnet.

Der gesamte Arbeitsablauf des Multi-Substrat-Protease-Assays (ohne reverses *Labeling*) ist in Kapitel IV.3.2 Abbildung 4.24 schematisch dargestellt.

III.3.14 MALDI MS-Probenvorbereitung

Für alle Proben wurden jeweils 20 μ l von jedem Kanal, bzw. jeder mit einem bestimmten Lanthanoidion-markierten Probe vereinigt und mit 1 μ l 10%iger TFA angesäuert. Die Proben der Einzel-Substrat-Analyse wurden fünffach mit CHCA (5 mg/ml) verdünnt und in 1 μ l Aliquots achtmal auf ein Target gespottet.

III.3.15 Trennung mittels nano-IP-RP-HPLC

Die Proben der Multisubstrat-Analyse (jeweils etwa 100 ng) wurden mit einem Gradienten von 5-50% B über 96 min und für 5 min mit 50%-95% B getrennt. Das LC-System ist in Kapitel III.3.8 beschrieben. Von Minute 20-101 wurden die eluierenden Peptide direkt mit Matrix gemischt und in 20 s Intervallen wie zuvor beschrieben gespottet.

III.3.16 Analyse mittels MALDI-TOF MS und MS/MS

Die MS-Daten wurden wie zuvor beschrieben durch Akkumulation von 2000 Schuss (200 Schuss pro Subspektrum, Akkumulation von 10 Subspektren) in einem Massenbereich von $m/z = 800-4000$ im Reflektor positiv Ionenmodus durchgeführt. Die Kalibrierung wurde ebenfalls wie bereits beschrieben durchgeführt. Zum Multi-Substrat-Assay wurden bis zu 40 Vorläuferionen pro Fraktion (pro Spot) ausgewählt und der MS/MS-Analyse mit Hilfe des *dynamic exit algorithm* als Stoppkriterium unterzogen. Die Fragmentierung erfolgte bei einem mittleren CID-Druck von 2×10^{-6} Torr. Des Weiteren wurden nur Signale mit einem S/N-Verhältnis von >10 ausgewählt. Die Vorläuferionen-Massentoleranz zwischen Spots wurde auf ± 200 ppm gesetzt und als minimale Chromatogramm Peakbreite wurde 1 Spot gewählt.

III.3.17 Proteinidentifizierung und Datenbanksuche

Für die Einzel-Substrat-Analyse wurden die Peakflächen der differentiell markierten Neurotensinpeaks mithilfe des „*Data analysis tool*“, welches in der *4000 series explorer* Software (Version 4.0.0) implementiert ist, extrahiert und verglichen.

Die Datenbankanalyse der mzXML-Dateien wurde mit *Mascot server* 2.2.04 in einer Datenbank die alle 20 Proteinsequenzen enthält durchgeführt. Die Amino-gerichtete Ln^{3+} -DOTA-Modifikation wurde als *exclusive* Modifikation angenommen und in die Mascot-Quantifizierungsmethode implementiert. Zusätzlich wurden „*Methylthio*“-Cysteine als fixe Modifikation und Oxidation der Methionine als *variable* Modifikation ausgewählt. Eine Vorläuferionentoleranz von 25 ppm und eine Fragmenttoleranz von 0,25 Da wurde für alle Datenbanksuchen zugelassen. Die Multi-Substrat-Analysen wurden mit zwei unterschiedlichen Einstellungen für das hydrolysierende Enzym vorgenommen. Erstens wurde eine Suche mit semi-Glu-C (schneidet carboxy-terminal am D und E) durchgeführt. Zweitens wurde eine Suche mit einer Kombination von semi-Glu-C und semi-Trypsin (carboxy-terminal R und K) durchgeführt. Für beide Suchen wurde die maximale Anzahl an verpassten Schnittstellen (*missed cleavages*) auf zwei gesetzt. Nur Peptide mit einem *peptide score/ion score* ≥ 14 , die zusätzlich das *require bold red* Kriterium erfüllen, wurden weiterhin analysiert und quantifiziert. Die quantitative Analyse erfolgte schließlich wie zuvor beschrieben mit der Mascot Distiller Software (Version 2.3.2.0). Nur Peptide, die die folgende Bedingungen erfüllten wurden zur Quantifizierung zugelassen: Korrelation *threshold* $> 0,85$, Fraktion *threshold* $> 0,7$, Intensität > 2000 ; nur *unique* (einzigartige) Peptide wurden erlaubt. Weitere Parameter der Quantifizierung basierend auf den extrahierten Ionenchromatogrammen waren : Integration der extrahierten Ionenchromatogramme nach der Simpson's Regel (Atkinson 1989), keine Glättung der XIC zugelassen aber Retentionszeitunterschiede der differentiell markierten Peptide zugelassen. Peptide mit oxidierten Methioninen wurden von der Quantifizierung ausgeschlossen. In der Quantifizierungsmethode wurde keine Normalisierung der Daten vorgenommen.

IV. Ergebnisse

IV.1 Qualitative Analyse

Bevor eine Markierungsstrategie auf quantitative Fragestellungen angewendet wird, muss überprüft werden, ob die Methode rein qualitativ die bereits beschriebenen Voraussetzungen in der gewählten analytischen Instrumentierung, hier der MALDI MS und MS/MS erfüllt. Um das MS- und MS/MS-Verhalten DOTA-markierter Peptide zu untersuchen, wurde eine Reihe synthetischer Peptide mit einem oder zwei Cysteinen, sowie primären Aminogruppen derivatisiert und analysiert. Zusätzlich wurden Peptide die durch tryptischen Verdau von Rinderserumalbumin generiert wurden, untersucht. Alle Peptide sind in Tabelle 4.1 und 4.2 mit ihren monoisotopischen m/z -Werten in unmarkiertem Zustand, nach Derivatisierung mit Maleinimido- bzw. NHS -DOTA, sowie nach Beladung des Chelators mit einem der vier Metallionen (Lu^{3+} , Ho^{3+} , Tb^{3+} , Tm^{3+}) aufgelistet. Die Einführung der Metall-DOTA-Markierung wurde immer in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die reduzierten bzw. alkylierten Peptide, die im folgenden FPs (freie Peptide) genannt werden, mit Hilfe der Amino- oder Sulfhydryl-reaktiven Gruppe des Chelator-Moleküls (NHS- oder Maleinimido-DOTA) kovalent mit dem Makrozyklus verknüpft, wodurch die sogenannten DOTA-derivatisierten metallfreien Peptide (DPs) entstehen. Im zweiten Schritt wird das Metallion hinzugefügt. Dies wird durch Koordination im DOTA-Ringsystem gebunden, wodurch man Metall-beladene und DOTA-derivatisierte Peptide (MDPs) erhält. Wie bereits beschrieben ist es auch möglich die Sulfhydryl gerichtete Metall-DOTA-Markierung in einem Schritt durchzuführen (Ahrends *et al.* 2007). Das Maleinimido-DOTA-Molekül wird dazu mit dem entsprechenden Metallion vorbeladen, wonach dann die Derivatisierung der Cysteine mit dem Metall-DOTA-Molekül erfolgt. Bei der Derivatisierung mit NHS-DOTA ist dies nicht möglich, da die Halbwertszeit des NHS-Esters beschränkt ist (Kalkhof & Sinz 2008). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden in dieser Studie alle Proben nacheinander derivatisiert und komplexiert. Dies hat auch den Vorteil, dass die DPs untersucht werden können, d.h. die metallfreien DOTA-derivatisierten Peptide.

Tab. 4.1: Auflistung der mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptide, inklusive ihrer Aminosäuresequenzen und der monoisotopischen m/z-Werte des $[M+H]^+$ -Ions vor und nach Derivatisierung, sowie nach der Metallierung mit einem der vier Lanthanoidionen Lu^{3+} , Ho^{3+} , Tb^{3+} und Tm^{3+} . Die Derivatisierungsstellen sind mit einem Stern markiert.

Peptid	Sequenz	monoisotopische m/z-Werte					
		under.	DOTA	Lu-DOTA	Ho-DOTA	Tb-DOTA	Tm-DOTA
S31	Ac-GC*NASAR	720,31	1246,55	1418,47	1408,46	1402,45	1412,46
S32	Ac-GANC*SAR	720,31	1246,55	1418,47	1408,46	1402,45	1412,46
S33	Ac-GANASC*R	720,31	1246,55	1418,47	1408,46	1402,45	1412,46
S34	C*C*TKPESER	1052,45	2104,93	2448,76	2428,74	2416,73	2436,75
S36	GA*CLLPK	701,4	1578,69	1750,61	1740,6	1734,59	1744,6
T1	VKC*FNC*GK	898,42	1950,90	2294,71	2274,71	2262,71	2282,72
T2	IKC*FNC*GK	912,44	1964,92	2308,76	2288,73	2276,73	2296,74
Oxytocin	C*YIQNC*PLG-NH ₂	1009,46	2061,94	2405,78			
Inhibitor der HIV-Integrase 2	HC*KFWW	906,41	1432,65	1604,57			

Tab. 4.2: Auflistung der mit NHS-DOTA derivatisierten Peptide, inklusive ihrer Sequenzen und der monoisotopischen m/z-Werte des $[M+H]^+$ -Ions vor und nach Derivatisierung, sowie nach der Metallierung mit einem der vier Lanthanoidionen Lu^{3+} , Ho^{3+} , Tb^{3+} und Tm^{3+} . Die Derivatisierungsstellen sind mit einem Stern markiert.

Peptid	Sequenz	monoisotopische m/z-Werte					
		under.	DOTA	Lu-DOTA	Ho-DOTA	Tb-DOTA	Tm-DOTA
S28	Ac-GK*NASAR	745,40	1131,58	1303,49	1293,48	1287,48	1297,49
S29	Ac-GANK*SAR	745,40	1131,58	1303,49	1293,48	1287,48	1297,49
S30	Ac-GANASK*R	745,40	1131,58	1303,49	1293,48	1287,48	1297,49
S35	*VLASSAR	703,41	1089,59	1261,51	1251,5	1245,49	1255,5
S37	*YLYEIAR	927,49	1313,67	1485,59	1475,58	1469,58	1479,59
S38	*LGEYGFQNALIVR	1479,80	1865,98	2037,89	2027,88	2021,88	2031,89
S39	*LVNELTEFAK*	1163,63	1935,99	2279,83	2259,81	2247,8	2267,81
S40	QTALVELLK	1014,62	1786,98	2130,82	2110,80	2098,79	2118,80

Derivatisierung der Cysteine

Zunächst wurden die MS-Spektren Cystein-haltiger Peptide jeweils nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA und zusätzlich nach Komplexbildung mit einem der Lanthanoidionen analysiert. Soweit nicht anders beschrieben, wurden Lutetiumionen zur Metallierung gewählt. Im Folgenden werden die Ergebnisse für Peptid T2 (IKCFNCGK), markiert an Cys3 und Cys6, beschrieben; vergleichbare Resultate wurden jedoch für alle verwendeten Peptide und Lanthanoidionen erhalten. Die Reaktion mit Maleinimido-DOTA resultiert in einer

Massenzunahme von 526,24 Da pro derivatisiertem Cystein-Rest. Im MS-Spektrum des DP_s von T2 ist ein einzelnes Signal bei einem m/z von 1964,2 zu beobachten, das dem [T2-Peptid+2DOTA+H]⁺-Ion entspricht (Abbildung 4.1). Des Weiteren wurden einige Signale niedriger Intensität in fast allen mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptiden detektiert, die folgenden Degradationsprodukten entsprechen: Massenverluste von 58,01 Da, entsprechen einem Neutralverlust einer Actylseitenkette (-CH₂CO₂) des DOTA-Moleküls, bzw. von 43,99 Da entsprechend einem Neutralverlust von -CO₂ (bzw. auch 2 x 43,99 entsprechend einem doppelten Neutralverlust von -CO₂). Die Intensitäten dieser Signale betragen weniger als 5% der Intensitäten des vollständigen DP_s, auch bei höheren Laserenergien. Zusätzlich konnten auch weniger intensive Signale beobachtet werden, die Natrium- und Kalium-Addukte der DP_s darstellen und in den Intensitäten vergleichbar mit den Na- und K-Addukten der underivatisierten Peptide sind.

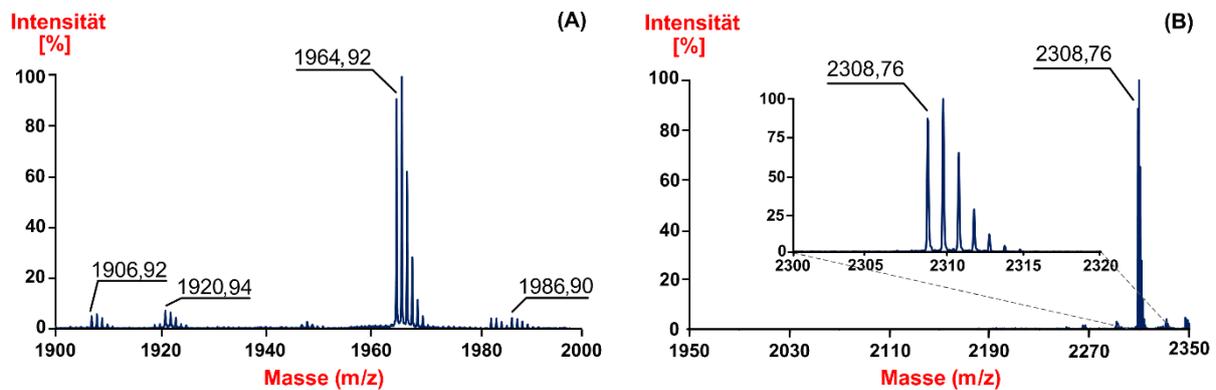


Abb. 4.1: (A) MS-Spektrum des zweifach DOTA derivatisierten Peptids T2 (T2=IKC*FNC*GK) mit einem Signal bei einem m/z von 1964,92 entsprechend dem Ion [M+2DOTA+H]⁺, sowie Signalen bei m/z 1986,90: [M+2DOTA+Na]⁺; m/z 1920,94: [M+2DOTA-CO₂+H]⁺; m/z 1906,92: [M+2DOTA-(CH₂CO₂)+H]⁺ (-58 Da-Addukt). (B) Nach der Beladung mit zwei Lutetium-Ionen verschieben sich die Signale zu einem m/z von 2308,76 entsprechend des [M+2DOTA+2Lu-5H]⁺-Ions und bei m/z 2264,73 entsprechend dem [M+2DOTA-CO₂+2Lu-5H]⁺-Ion.

Im Gegensatz zu den FP_s und DP_s wurde in den Spektren der Metall-DOTA markierten Peptide auch ein geringerer prozentualer Verlust von CO₂-Degradationsprodukten verzeichnet, wohingegen ein Verlust von 58,01 Da, entsprechend der Acetylgruppe bei Anwesenheit der Metallionen überhaupt nicht detektiert wurde.

In MS-Spektren des Peptidhormons Oxytocin, welches in derivatisierter als auch in komplexierter Form analysiert wurde, sind weitere Signale mit Abständen von nominal 18 bzw. 36 Da zum Hauptsignal zu detektieren (Abbildung 4.2). Hierbei handelt es sich um

Hydrolyseprodukte des Maleinimids, bzw. der Fünfring der nach Derivatisierung des Peptids mit Maleinimido-DOTA entsteht, wird durch Anlagerung von Wasser gespalten. Dies wird zusätzlich im Kapitel IV.1.2 Fragmentierungs-Verhalten gezeigt. In Abbildung 4.2 (A) ist deutlich zu erkennen, dass die Signale der Hydrolyseprodukte intensiver sind als die des Peptids mit nicht hydrolysiertes DOTA-Modifikation. Durch die zusätzlichen Degradationsprodukte durch Verlust von $-\text{CO}_2$ und $-\text{CH}_2\text{CO}_2$ kommt es zu 5 zusätzlichen Signalen und somit zur Erhöhung der Spektrenkomplexität.

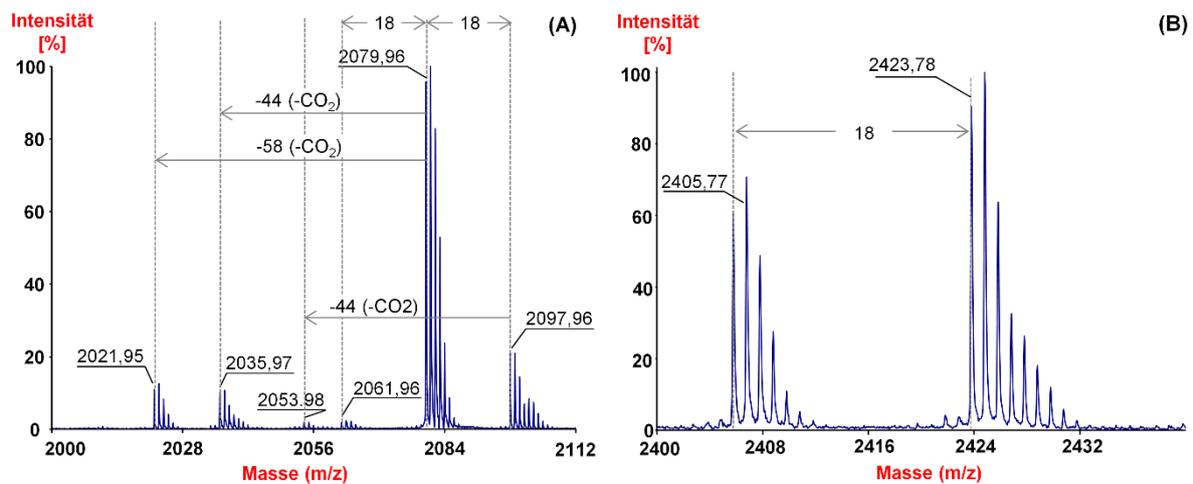


Abb. 4.2: (A) MS-Spektrum des Peptids Oxytocin (C*YIQNC*PLG) bei einem m/z von 2061,96 von $[\text{M}+2\text{DOTA}+\text{H}]^+$ und Signalen bei einem m/z von 2079,96 und 2097,96 der Hydrolyseprodukte $[\text{M}+2\text{DOTA}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ und $[\text{M}+2\text{DOTA}+2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA. (B) Nach Beladung mit Lutetium-Ionen liegt das Signal bei 2405,77 für das $[\text{M}+2\text{Lu-DOTA}+\text{H}]^+$ und das des Hydrolyseprodukts bei 2423,78 entsprechend dem $[\text{M}+2\text{Lu-DOTA}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$.

Derivatisierung der Amino-Gruppen

Die Peptidsequenzen der DOTA-derivatisierten Peptide sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Abbildung 4.3 A zeigt das MALDI MS Spektrum des synthetischen Peptids S30, Ac-GANASKR nach der Derivatisierung mit NHS-DOTA (DP). Hier ist ein intensives Signal bei 1131,58 entsprechend einem Massenzuwachs von 386,18 Da verglichen mit dem freien Peptid (FP), zu beobachten. Zusätzliche Signale in diesem Spektrum sind Verunreinigungen zuzuordnen, die bereits in den Spektren des freien Peptids beobachtet werden konnten (nicht gezeigt). Die Beladung der derivatisierten Peptide mit einem Metallion (Lu^{3+}) führte zu einem intensiven Signal bei einem m/z von 1303,49. Dies entspricht einem Massenzuwachs von 558,09 Da verglichen mit dem freien Peptid und 171,91 Da verglichen mit dem derivatisierten

Peptid (Abbildung 4.3). Wie bereits für die Cystein-haltigen Peptide beschrieben, sind die Signalintensitäten der Neutralverluste von $-\text{CO}_2$ in Anwesenheit der Metallionen, d.h. nach Metallierung der DOTA-markierten Peptide, deutlich weniger stark ausgeprägt. Der Verlust eines Acetylrestes (-58,01 Da) konnte nicht detektiert werden. Na- und K-Addukte konnten in allen Spektren relativ zum protonierten Peptid für die unmarkierten, die DOTA-derivatisierten- und die Metall-beladenen Peptide in etwa gleichem Maße beobachtet werden.

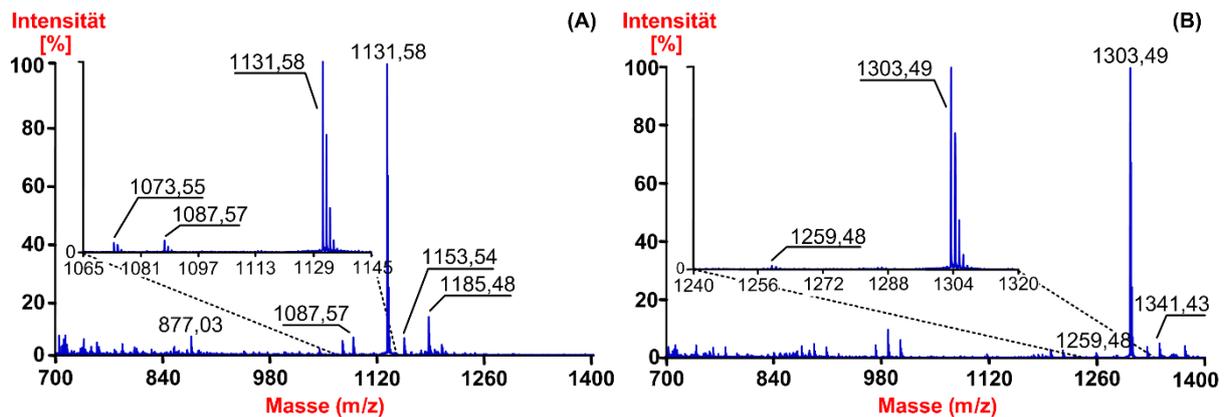


Abb. 4.3: (A) MS-Spektrum des synthetischen Peptid S30 (Ac-GANASKR) nach Derivatisierung mit DOTA-NHS-Ester zeigt Signale bei einem m/z von 1131,58 entsprechend dem Ion $[\text{M}+\text{DOTA}+\text{H}]^+$, m/z 1153,54: $[\text{M}+\text{DOTA}+\text{Na}]^+$; m/z 1185,48: $[\text{M}+\text{DOTA}+\text{Fe}-2\text{H}]^+$; m/z 1087,57: $[\text{M}+\text{DOTA}-\text{CO}_2+\text{H}]^+$; m/z 1073,55: $[\text{M}+\text{DOTA}-(\text{CH}_2\text{CO}_2)+\text{H}]^+$ (-58 Da). (B) Nach der Beladung mit Lutetium-Ionen ist eine Massenzunahme von 171,91 Da verglichen mit dem DP zu beobachten, womit das Signal von $[\text{M}+\text{DOTA}+\text{Lu}-2\text{H}]^+$ zu einem m/z von 1303,49 verschoben ist; die weiteren Signale liegen bei einem m/z von 1341,43: $[\text{M}+\text{DOTA}+\text{Lu}-\text{H}+\text{K}]^+$ und m/z 1259,48: $[\text{M}+\text{DOTA}-\text{CO}_2+\text{Lu}-2\text{H}]^+$.

Für Peptide, die mehr als eine Aminogruppe enthalten (Lysin-haltige Peptide, mit nicht-acetyliertem N-Terminus) wurden in mehreren Fällen Signale detektiert, die der einfach derivatisierten Form der Peptide entsprechen (z. B. für Peptid S36).

Des Weiteren konnte in einigen Fällen eine erhöhte Bildung von zweifach bzw. mehrfach geladenen Ionen, verglichen mit den unmarkierten Peptiden, für die DPs sowie die MDPs beobachtet werden.

IV.1.1 Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/N)

Um den Einfluss der Markierung auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) und damit die Sensitivität der MALDI-Messung zu untersuchen, wurden die MDPs mit den FPs in

äquimolaren Mengen gemischt und einer MALDI MS Analyse unterzogen. Die S/N-Werte der unterschiedlichen Spezies wurden miteinander verglichen. Die in Tabelle 4.3 gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten aus vier unabhängigen MS Experimenten für die Peptide S34, S35 und acht Messungen für S28-33, die hinsichtlich anderer Experimente mehrmals auf die Probenplatte aufgetragen wurden. Zusätzlich wurden Cystein-haltige Peptide aus einem Rinderserumalbumin-Verdau in ihrer unmarkierten sowie in ihrer Tb³⁺- oder Tm³⁺-DOTA-markierten Form (Sulphydryl-gerichtete Markierung) untersucht. Auch die S/N-Verhältnisse der Amino-gerichteten DOTA-Markierung wurden anhand eines Rinderserumalbumin-Verdaus analysiert.

Derivatisierung der Cysteine

Einzelpeptide

Für alle mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptide S31-S34 konnten im Vergleich zu den unmarkierten Peptiden leicht erhöhte S/N-Verhältnisse beobachtet werden (siehe Tabelle 4.3). Dieses ist für das zweifach derivatisierte Peptid S34 mit dem 3,4fachen S/N-Verhältnis des unmarkierten Peptids am deutlichsten zu beobachten. Nach Beladung mit einem der Metallionen (Terbium) sind die S/N-Verhältnisse um mindestens das 11fache größer als die des unmarkierten Peptides. Für das doppelt derivatisierte Peptid S34 liegt sogar ein 20fach höheres S/N im Vergleich zum underivatisierten Peptid vor. Für S32 wurden auch die Verhältnisse nach Komplexbildung der Chelatoren mit den Metallionen Holmium, Thulium und Lutetium bestimmt. Hier ergeben sich nur leichte Unterschiede zwischen den S/N-Verhältnissen der mit unterschiedlichen Metallionen (Tb³⁺, Ho³⁺, Tm³⁺, Lu³⁺) markierten Peptide.

Tab. 4.3: S/N-Verhältnisse der mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptide vor und nach der Metallierung verglichen mit den underivatisierten Peptiden. Alle Werte repräsentieren Durchschnittswerte von vier (Peptid S34) und acht unabhängigen Experimenten (Peptid S31 bis S33).

Durchschnittliches Verhältnis	Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA			
	S31	S32	S33	S34
S/N(DP)/ S/N (FP)	1,8±0,3	1,6±0,2	1,3±0,3	3,4±0,4
S/N(TbMDP)/ S/N (FP)	11,7±1,1	11,0±0,6	12,0±0,7	20,9±3,9
S/N(HoMDP)/ S/N (FP)		13,7±2,7		
S/N(TmMDP)/ S/N (FP)		13,1±1,0		
S/N(LuMDP)/ S/N (FP)		16,4±2,2		

Proteinverdau

Neben derivatisierten Einzelpeptiden sollten auch die S/N-Verhältnisse derivatisierter und underivatisierter Verdau verglichen werden. Hierzu wurde die Detektierbarkeit Cystein-haltiger Peptide unter Berücksichtigung ihrer Molekulargewichte (d.h. der m/z -Werte) analysiert. Hierzu wurden MS-Spektren von 250 amol eines Rinderserumalbumin-Verdau aufgenommen.

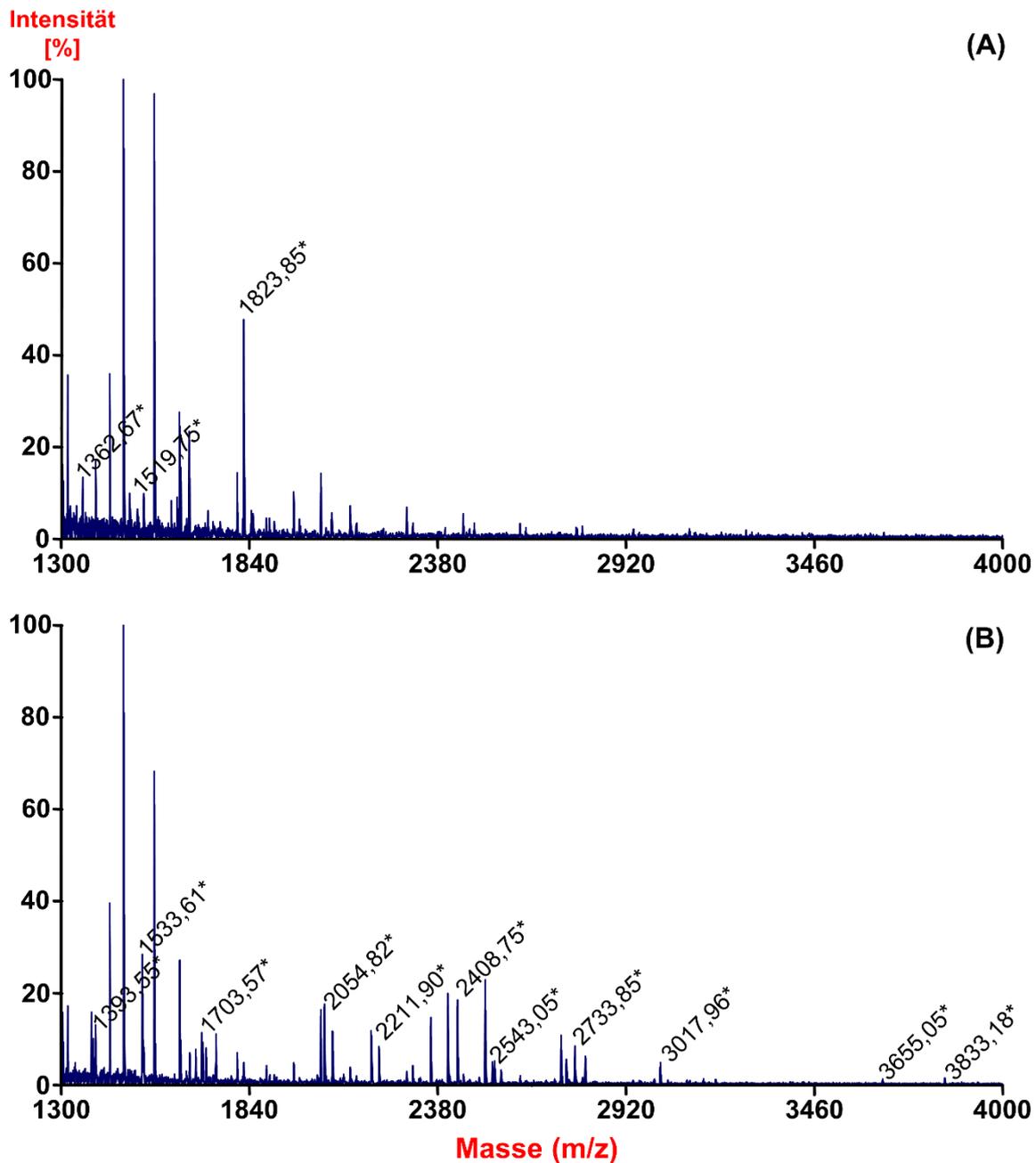


Abb. 4.4: MS-Spektrum eines tryptischen Verdau von 250 amol Rinderserumalbumin (A) vor und (B) nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA und Komplexierung von Thuliumionen. Die

Cystein-haltigen Peptide sind mit Asterisken markiert. Die entsprechenden m/z-Werte sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Insgesamt wurden in den MS-Spektren der Metall-DOTA-markierten Verdau 22 Cystein-haltige Peptide (davon drei mit einer Fehlschnittstelle) zugeordnet. Dagegen konnten in den underivatisierten Verdauen nur 8 Cystein-haltige Peptide mit einem S/N>20 detektiert werden (Tabelle 4.3, Abbildung 4.4). Im Massenbereich <800 Da wurden keine Cystein-haltigen Peptide im markierten Verdau und ein Peptid im unmarkierten Verdau detektiert. 14 Cystein-haltige Peptide konnten erst nach Derivatisierung in höheren Massenbereichen detektiert werden. Für den Massenbereich über 2000 wurden keine Peptide im unmarkierten Verdau zugeordnet und 17 im markierten Verdau. In beiden Verdauen wurden 8 gemeinsame Peptide zugeordnet. Davon wiesen in den markierten Verdauen 7 Peptide erhöhte S/N-Verhältnisse im Vergleich zu den unmarkierten auf.

Tab. 4.4: Cystein-haltige Peptide, die in MS-Spektren eines Rinderserumalbuminverdaus (250 amol) vor Derivatisierung (FPs) und nach dem *Labeling* mit Maleinimido-DOTA und Thulium zugeordnet wurden. Die rechten Spalten repräsentieren die S/N-Verhältnisse der zugeordneten Peptide mit ihren Standardabweichungen. Diese wurden aus Replikaten über acht Spots bestimmt.

Sequenz	[M+H] ⁺ (FP)	[M+H] ⁺ (Tm-DOTA)	S/N (FP)	S/N (Tm-DOTA)
LCVLHEK	841,46	1533,61	0	178,3±24,0
NECFLSHK	977,45	1669,6	0	52,7±7,1
QNCDQFEK	1011,42	1703,57	0	92,5±11,1
SHCIAEVEK	1015,49	1707,64	0	67,3±7,1
CCTESLVNR	1024,46	2408,75	0	232,5±28,5
EACFAVEGPK	1050,49	1742,64	0	28,5±5,0
CCTKPESER	1052,45	2436,75	0	201,1±35,3
ECCDKPLLEK	1177,56	2561,86	0	28,9±4,9
TCVADESHAGCEK	1349,55	2733,85	0	132,9±20,0
SLHTLFGDELCK	1362,67	2054,82	0	226,1±21,9
ETYGDMAD CCEK	1364,48	2748,78	0	69,5±9,2
YICDNQDTISSK	1386,62	2078,77	0	122,4±17,5
EYEATLEE C CAK	1388,57	2772,87	0	102,9±19,7
LKE C CDKPLLEK	1418,74	2803,04	0	81,0±18,6
DDPHACYSTVFDK	1497,63	2189,78	32,9±4,2	136,7±17,6
LKPDNTL C DEFK	1519,75	2211,9	24,2±1,3	90,4±12,9
QEPER NECFLSHK	1616,75	2308,9	36,7±7,2	41,0±7,7
YNGVFQE C QAEDK	1633,66	3017,96	59,7±12,9	72,1±10,4
MPCTEDYLSLILNR	1667,81	2359,96	146,1±20,3	162,2±23,9
RPCFSALTPDETYVPK	1823,9	2516,05	321,1±44,7	252,2±26,9
NECFLSHK DDSPDLPK	1844,85	2537	29,9±4,9	41,6±7,1
LFTFHADICTLPDTEK	1850,9	2543,05	30,0±4,7	52,2±8,0

Die intensiveren Signale der Cystein-haltigen Peptide nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA haben auch Auswirkungen auf die Sequenzabdeckung im Peptidmassenfingerprint (PMF). In Messungen von 250 amol eines Thulium-DOTA markierten Verdau von Rinderserumalbumin konnte eine höhere Sequenzabdeckung (60%) als im unmarkierten Verdau (40%) erzielt werden. In Abbildung 4.5 ist die Verteilung der detektierten Cystein-haltigen Peptide innerhalb der Sequenz des bovinen Serumalbumins markiert.

Ohne Markierung:

```
>sp|P02769|ALBU_BOVIN Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4
MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNE
LTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCEKQEPERNEFLSHKDDSPDL
PKLKPDPNTLCDEFK ADEKKFWGKYLEIARRHPYFYAPELLYANKYNGVFQECQAEDKGACLLP
KIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHG
DLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK
NYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFDKCLKHLVDEPQ
NLIKQNCQDFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYL
SLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQI
KKQTALVELLKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA
```

Thulium-DOTA Markierung:

```
>sp|P02769|ALBU_BOVIN Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4
MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNE
LTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCEKQEPERNEFLSHKDDSPDL
PKLKPDPNTLCDEFK ADEKKFWGKYLEIARRHPYFYAPELLYANKYNGVFQECQAEDKGACLLP
KIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHG
DLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCK
NYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFDKCLKHLVDEPQ
NLIKQNCQDFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYL
SLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQI
KKQTALVELLKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA
```

Abb. 4.5: Nach MALDI MS-Analyse zugeordnete Peptide in einem unmarkierten Rinderserumalbuminverdau und nach Thulium-DOTA Markierung.

Abschließend kann man sagen, dass in diesem Versuch die Metall-DOTA-Markierung zu einer verbesserten Detektion Cystein-haltiger Peptide führt.

Derivatisierung der Amino-Gruppen

Einzelpeptide

Für die mit NHS-DOTA derivatisierten Peptide S28-S30 und S34 wurden ähnliche Resultate erhalten wie im Fall der Cystein-markierten Peptide. Besonders die N-terminal acetylierten Peptide (S28-S30) zeigen deutlich höhere S/N-Werte für die Signale der Metall-markierten Spezies. Die Effekte waren zwar schwächer, aber dennoch auch für die Peptide mit freien (nicht-acetylierten) Amino-Termini detektierbar (Tabelle 4.5).

Tab. 4.5: S/N-Verhältnisse der mit NHS-DOTA derivatisierten Peptide vor und nach der Komplexierung von Lanthanoidionen verglichen mit den underivatisierten Peptiden. Alle Werte repräsentieren Durchschnittswerte von vier unabhängigen MS-Experimenten für die Peptide S34 und S35 und acht Experimenten für die Peptide S28 - S30.

Durchschnittliches Verhältnis	Derivatisierung mit NHS-DOTA				
	S28	S29	S30	S34	S35
S/N(DP)/ S/N (FP)	33,2±2,3	25,4±1,9	28,7±1,7	1,0±0,1	2,1±0,3
S/N(TbMDP)/ S/N (FP)	73,0±4,3	53,7±3,9	69,3±5,4	5,7±1,6	10,6±1,2
S/N(HoMDP)/ S/N (FP)		55,7±5,3			
S/N(TmMDP)/ S/N (FP)		57,2±8,9			
S/N(LuMDP)/ S/N (FP)		57,7±6,2			

Proteinverdau

In den Spektren von 250 amol (auf dem Target) des tryptischen Albuminverdaus derivatisiert mit NHS-DOTA wurden ähnliche Beobachtungen wie für die Cystein-gerichtete Markierung gemacht. Insgesamt wurden im Peptidmassen-Fingerprint des unmarkierten Verdaus 21 Peptide mit einem $S/N > 20$ identifiziert. Dagegen konnten im Tm^{3+} -DOTA markierten Verdau 42 Peptide zugeordnet werden (Tabelle 4.6). Im unteren Massenbereich von 800-1500 Da wurden im unmarkierten Verdau 10 Peptide und im markierten Verdau nur 2 Peptide zugeordnet. Zwischen 1500 und 2000 Da wurden ebenfalls 10 Peptide im unmarkierten Verdau und 11 Peptide im markierten Verdau zugeordnet. Für den unmarkierten Verdau wurde nur ein Peptid größer als 2000 Da identifiziert, im markierten Verdau dagegen 15. Nur 12 Peptide konnten sowohl in ihrer markierten und unmarkierten Form nachgewiesen werden. Acht davon zeigten nach dem Metall-DOTA-Labeling deutlich höhere S/N-Werte (1,5-4-fach). Die beiden längsten Peptide (MPCTEDYLSLILNR und RPCFSALTPDETYVPK; m/z 1667,77 und 1823,86) wiesen dagegen deutlich verringerte S/N-Verhältnisse in ihrer derivatisierten Form auf. Die neun Peptide, welche ausschließlich in dem unmarkierten Verdau gefunden wurden sind aus mindestens 13 Aminosäuren zusammengesetzt. Im

Gegensatz dazu sind die nach Derivatisierung zusätzlich gefundenen 30 Peptide im Schnitt aus weniger Aminosäuren zusammengesetzt und liefern damit auch weniger Sequenzinformation. Hinsichtlich der Sequenzabdeckung konnten mit 37 % im unmarkierten Verdau und 43 % im markierten keine großen Unterschiede beobachtet werden.

Tab. 4.6: Auflistung der S/N-Verhältnisse von underivatisierten und Tm³⁺-DOTA derivatisierten Peptiden (generiert aus einem 250 amol Verdau von Rinderserumalbumin). Die rechten Spalten repräsentieren die S/N-Verhältnisse der zugeordneten Peptide mit ihren Standardabweichungen, die aus Replikaten über acht Spots bestimmt wurden.

Sequenz	[M+H] ⁺ (FP)	[M+H] ⁺ (Tm-DOTA)	S/N (FP)	S/N (Tm-DOTA)
LAK	331,23	1435,42	0	67,9±7,9
VTK	347,23	1451,41	0	45,5±3,9
VHK	383,24	1487,42	0	265,4±23,9
QIK	388,26	1492,44	0	63,5±6,3
FPK	391,23	1495,42	0	111,4±11,4
SLGK	404,25	1508,43	0	34,2±5,1
YTR	439,23	991,32	0	50,8±5,5
LSQK	475,29	1579,47	0	34,6±1,7
DTHK	500,25	1604,43	0	130,6±9,8
FGER	508,25	1060,34	0	60,0±7,8
HKPK	509,32	2165,59	0	224,0±27,5
QIKK	516,35	1620,53	0	22,6±0,8
FWGK	537,28	1641,46	0	56,8±10,2
AFDEK	609,29	1713,47	0	35,7±4,2
IETMR	649,33	1201,42	0	53,4±6,5
QEPER	658,32	1210,41	0	29,3±2,3
KFWGK	665,38	2321,65	0	61,8±7,4
AWSVAR	689,37	1241,46	0	160,2±16,2
GACLLPK	701,4	1805,58	0	77,5±8,6
SEIAHR	712,37	1264,46	0	65,1±8,4
NYQEA	752,36	1856,54	0	68,7±5,2
ATEEQLK	818,43	1922,61	0	5,2±10,4
LCVLHEK	841,46	1945,64	0	44,8±4,1
LSQKFPK	847,5	1951,69	0	35,5±5,8
IETMREK	906,47	2026,65	0	27,4±0,5
YLVEIAR	927,49	1479,58	95,4±11,9	429,0±21,8
DLGEEHFK	974,46	2078,64	0	28,5±5,1
QTALVELLK	1015,62	2119,79	0	178,3±14,1
EACFAVEGPK	1050,49	2154,67	0	86,0±7,0
KQTALVELLK	1142,71	2246,9	0	24,9±5,0
LVNELTEFAK	1163,63	1715,72	26,8±4,5	67,4±8,4
FKDLGEEHFK	1249,62	2353,8	32,5±3,0	97,6±15,0
HPEYAVSVLLR	1283,71	1835,8	36,6±5,7	124,0±4,2
HLVDEPQNLIK	1306,72	2409,9	39,7±12,0	85,3±17,6

TCVADESHAGCEK	1349,55	2453,73	0	31,5±8,3
SLHTLFGDELCK	1362,67	1914,76	32,8±4,1	25,6±0,1
TVMENFVAFVDK	1399,69	2520,85	44,6±9,0	57,0±2,7
RHPEYAVSVLLR	1439,81	1991,9	67,4±16,0	257,1±18,2
LGEYGFQNALIVR	1480,8	2031,89	302,1±57,9	231,9±13,3
DDPHACYSTVFDK	1497,63	2601,81	38,7±9,6	0
LKPDPNTLCDEFK	1519,75	3176,02	24,7±6,3	0
DAFLGSFLYEYSR	1567,74	2119,83	397,7±84,2	0
QEPERNECFLSHK	1616,75	2720,93	24,4±6,3	0
YNGVFQECCQAEDK	1633,66	2737,84	51,2±15,0	0
KVPQVSTPTLVEVSR	1640,94	2744,12	133,4±27,8	184,6±7,7
MPCTEDYLSLILNR	1667,81	2219,9	112,9±20,0	31,6±1,6
RPCFSALTPDETYVPK	1823,9	2375,99	263,0±44,6	52,9±34,6
NECFLSHKDDSPDLPK	1844,85	3501,12	26,0±5,3	0
LFTFHADICTLPDTEK	1850,9	2955,08	24,6±1,0	0
HPYFYAPPELLYYANK	1888,93	2993,11	24,3±2,1	0
RHPYFYAPPELLYYANK	2045,03	3149,21	67,8±8,9	0

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Einführung der DOTA-Gruppe hier zu einer deutlichen Erhöhung der Signalintensitäten für kürzere Peptide führt, bzw. diese Peptide durch den Massenzuwachs besser detektiert werden. Längere Peptide (≥ 13 Aminosäuren) die nach Derivatisierung durchschnittlich m/z -Werte ≥ 2500 Da erreichen, weisen dagegen geringere S/N-Verhältnisse auf, werden somit schlechter detektiert. Hinsichtlich der Anzahl der zugeordneten Peptide und deren Informationsgehalt sind die Sequenzabdeckungen in beiden Ansätzen in etwa vergleichbar.

IV.1.2 Fragmentierungsverhalten Metall-DOTA-markierter Peptide

Die Gegenwart natürlich vorkommender (post- und kotranslational) oder chemisch eingeführter Modifikationen kann einen enormen Einfluss auf die Fragmentierung eines Peptids ausüben. Eine Reihe von Veröffentlichungen beschäftigt sich mit ihrer Analyse innerhalb komplexer Peptidmischungen (Yates *et al.* 1995; Bunkenborg & Matthiesen 2007; Froelich & Reid 2009; Paradela & Albar 2008). Die genaue Kenntnis des Fragmentierungsverhaltens Metall-DOTA-markierter Peptide ist unabdingbar für die Anwendung dieser Metallmarkierung in der Bioanalytik. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Untersuchung einfach geladener Vorläuferionen.

In den MS/MS-Experimenten wurden zwei Aspekte besonders untersucht. Erstens wurde der Einfluss der DOTA-Markierung und ihrer Position innerhalb der Peptidsequenz auf die Zuordnung der Hauptfragmente, d.h. hauptsächlich der a-, b-, y-Fragmente untersucht.

Außerdem wurde für die DOTA-Markierung die beiden mit TOF/TOF-Instrumenten möglichen Fragmentierungs-Bedingungen PSD (*post source decay*) und CID verglichen. Der zweite Aspekt war die Suche nach Markierungs-spezifischen Reporterionen. Die Spektren der Peptide wurden unter identischen Bedingungen in dreifachen Messungen aufgenommen. Alle Signale mit einem S/N unter 20 wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Cystein-derivatisierte Peptide

Das Fragmentierungsverhalten der mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptide wurde anhand der synthetischen Peptide S31, S32 und S33 analysiert. Diese drei isomeren Peptide sind N-terminal acetyliert, die Position des Cysteins variiert. Hiermit sollte der Einfluss der Markierungsposition untersucht werden. Es wurden jeweils dazu underivatisierte, derivatisierte und mit Lutetium oder Holmium beladene Peptide mittels CID- und PSD fragmentiert. Für die PSD-Experimente sind die S/N-Verhältnisse der b- und y-Ionen der drei Peptide (S31-S33) in Abbildung 4.6 im Säulendiagrammen dargestellt. Der Vergleich der CID-Fragmentspektren ist aus Abbildung A.1 dem Anhang zu entnehmen.

Fragmentierung der derivatisierten Peptide (DPs)

Betrachtet man im PSD-Spektrum von Peptid S31 nach Derivatisierung die S/N-Werte so sind sie für alle y-Ionen, sowie für b_4 und b_6 erhöht. Zwischen den underivatisierten und derivatisierten Versionen von S32 und S33 sind jedoch keine erkennbaren Unterschiede zu verzeichnen. Während das b_6 -Ion und mit ihm auch das a_6 -Ion für die derivatisierte Version von S32 und S33 deutlich erhöht sind, sind die S/N-Werte für das b_3 - und in Bezug auf S33 auch für das b_4 -Ion erniedrigt. Für die y-Fragmente gilt, dass sich besonders für S32 die S/N-Verhältnisse nach Derivatisierung weniger stark auf y_1 konzentrieren und die größeren Ionen besonders y_6 besser detektiert werden. Für die y-Ionen-Serien der underivatisierten und derivatisierten Peptide sind keine deutlichen Unterschiede zwischen CID- (Abbildung A.1) und PSD- Spektren zu beobachten (Abbildung 4.6). Nach Derivatisierung und CID-Fragmentierung sind für S32 die Ionen b_1 (auch a_1) und b_2 , sowie b_1 - b_3 (auch a_1) für S33 deutlich intensiver. Ein weiterer deutlicher Unterschied zu den underivatisierten Peptiden besteht im starken Auftreten des y_7 -Fragments, dessen Masse dem Vorläuferion $-\text{CO}_2+2\text{H}$ entspricht.

Fragmentierung der komplexierten Peptide (MDPs)

Nach Beladung der derivatisierten Peptide mit Lutetium- oder Holmiumionen ändern sich die Fragmentspektren deutlich.

Für Peptid S31 (Ac-GC*NASAR) sind in den PSD Spektren deutlich erhöhte Fragmentintensitäten von b_2 - b_4 zu beobachten. Das stärkste Signal eines b-Fragments konnte für die Spaltung der Bindung zwischen Ala4 und Ser5 beobachtet werden. Die y-Ionen Serie von S31 ist im Gegensatz zum underivatisierten Peptid vollständig detektierbar und alle Signalintensitäten gegenüber den unmarkierten Ionen deutlich erhöht. Besonders die Fragmente y_4 und y_5 , welche durch Spaltung von Bindungen unmittelbar C-terminal des modifizierten Cysteins entstehen, führten in den PSD Experimenten zu sehr intensiven Signalen (25fach höhere Intensitäten).

Für Peptid S32 (Ac-GANC*SAR) wurde das maximale S/N-Verhältnis der b-Fragmente am derivatisierten Rest detektiert. Dahingegen waren N- und C-terminal von der Derivatisierungsstelle im Vergleich zum unmarkierten Peptid überhaupt keine b-Fragmente mehr detektierbar. Die y-Ionen-Serie entspricht der y-Ionen-Serie des derivatisierten Peptids, wobei auch hier y_3 , das Fragment unmittelbar nach der Derivatisierungsstelle, das durch die Spaltung zwischen Cys4 und Ser5 entsteht, am stärksten gebildet wird.

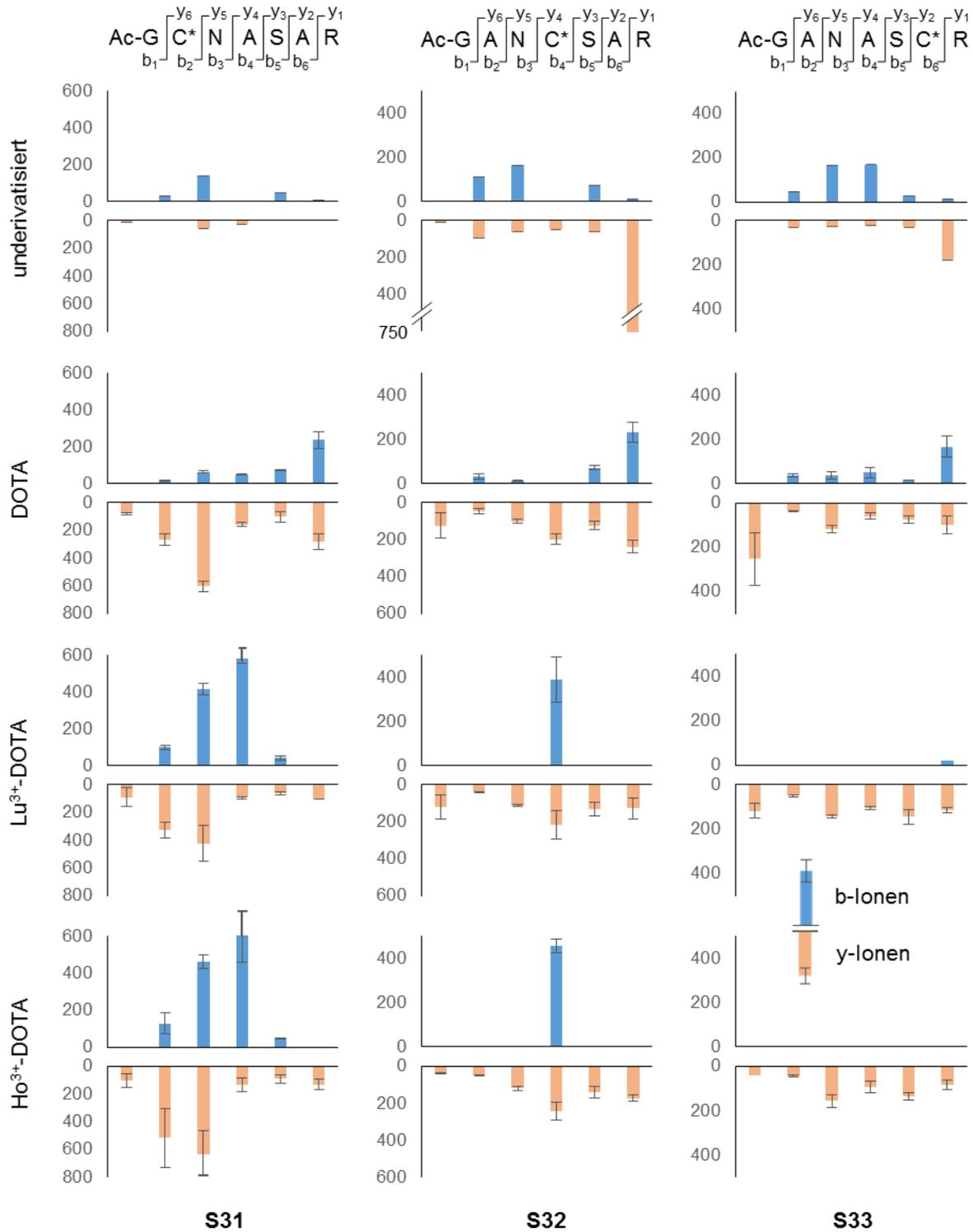
Nach Beladung mit Metallionen wurden für S33 (Ac-GANASC*R) keine b-Fragmente mehr detektiert, während sich die y-Ionen-Serie nicht wesentlich vom derivatisierten Peptid unterscheidet und die Fragmente gleichmäßig über die Serie verteilt sind. Die Dominanz des y_1 -Ions beim FP wird durch höhere S/N-Werte der y_2 -, y_3 - und y_4 -Ionen beim MDP aufgehoben.

Für die CID-Fragmentierung ergeben sich hinsichtlich der y-Ionen-Serien der komplexierten Peptide sowie für die b-Ionen von S31 (Ac-GC*NASAR) ähnliche Muster im Vergleich zur PSD-Fragmentierung mit leicht reduzierten S/N-Werten. Auch hier stellt das b_4 -Ion, das nach Spaltung der Bindung zwischen Asn3 und Ser4 gebildet wird, das stärkste b-Ion dar. Auch für die y_4 - und y_5 -Ionen waren höhere S/N-Werte im Vergleich zum unmarkierten Peptid zu beobachten. Dieser Unterschied ist aber nicht so stark ausgeprägt wie nach PSD-Fragmentierung.

Für Peptid S32 (Ac-GANC*SAR) wurde in den PSD-Spektren der komplexierten Peptide ein dominantes b_4 -Fragment detektiert. Dieses ist in den CID-Spektren wesentlich schwächer. Dafür wurden für S32 zusätzlich b-Fragmente jedoch mit sehr niedrigen S/N-Werten gefunden.

Nach CID-Fragmentierung von Peptid S33 (Ac-GANASC*R) wurden ebenfalls die b-Fragmente b_1 - b_5 mit niedrigen S/N-Werten detektiert. Diese wurden in den Experimenten mit

PSD-Fragmentierung nicht zugeordnet. Die y-Ionen-Serie weist jedoch nach CID-Fragmentierung insgesamt geringere S/N-Werte auf als nach PSD-Fragmentierung.



Lutetium verschoben sind. Bei der Verwendung von Holmium wurde bspw. ein Signal bei einem m/z von 723,15 statt bei 733,15 (Lu) detektiert; entsprechend für Tb bei 717,14 und für Tm bei 727,14.

Die drei Signale bei 774,18, 733,15 und 699,16 wurden auch in Lu^{3+} -DOTA-markierten Peptid-Fragmentspektren (Sulphydryl-gerichtete Markierung) aus Proteinverdauen beobachtet. Ihre Zuordnung erfolgte in Kapitel V.1.2. Auch hier konnten die entsprechenden Massenshifts bei der Komplexbildung anderer Metallionen beobachtet werden, sodass die Signale (1)-(3) als Metall- und Markierungs-spezifische Reporterionen betrachtet werden können. Die beiden anderen Signale (m/z 686,32 und 720,31) wurden ebenfalls in den MS/MS-Spektren von allen drei Peptiden S31, S32 und S33 vor und nach Metall-Beladung detektiert, ihre m/z Werte sind jedoch unabhängig vom verwendeten Metall. Der m/z Wert von 720,31 entspricht dem $[\text{M}+\text{H}]^+$ Ion des unmarkierten Peptides. Der Peak bei einem m/z von 686,32 weist eine Differenz von -34 Da zum $[\text{M}+\text{H}]^+$ Ion des unmarkierten Peptides auf. Die gleichen Signalpaare, entsprechend dem unmarkierten Peptid und dem entsprechenden Peak -34 Da, wurden auch in den MS/MS-Spektren Metall-markierter Peptide beobachtet, die aus Proteinverdauen stammen. In Fragmentspektren hydrolysiertes DOTA-markiertes Peptid (Sulphydryl-gerichtete Derivatisierung) wurden entsprechend den Reporterionen des unhydrolysierten Peptides bei m/z -Werten von 699,18 und 733,15 die Reporterionen bei m/z -Werten von 717,19 und 751,17 gefunden (Abbildung 4.8 (B)). Zum Teil wurden auch Fragmente, die dem unhydrolysierten Peptid zugeordnet werden können, im MS/MS-Spektrum des hydrolysierten Peptides detektiert.

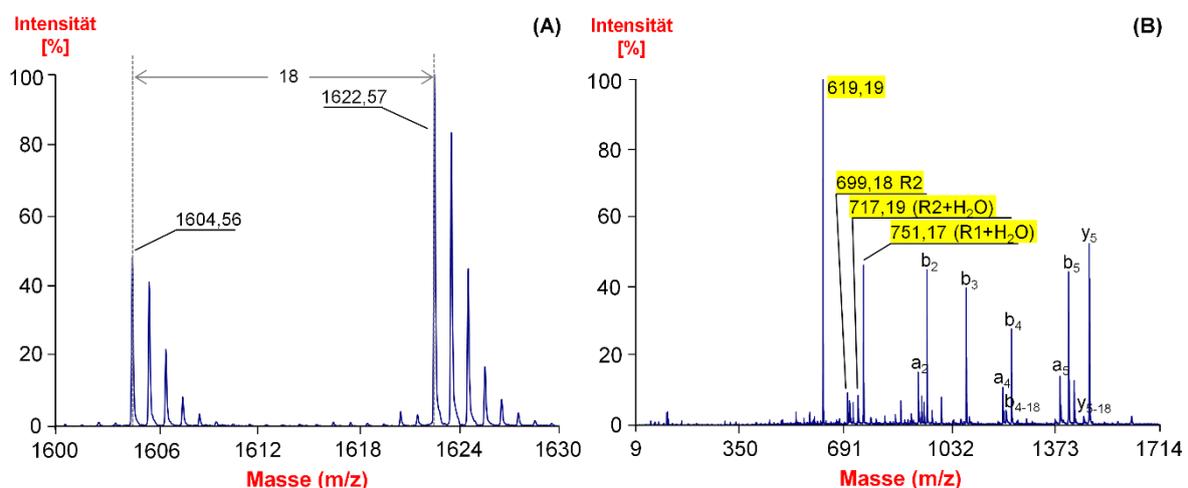


Abb. 4.8: (A) MS-Spektrum des Lu^{3+} -DOTA-markierten HIV-Integrase Inhibitor Peptids HC*KFWW (Sulfhydryl-gerichtete Markierung) bei einem m/z von 1604,56 und dem Hydrolyseprodukt bei einem m/z von 1622,57 und (B) MS/MS-Spektrum des Hydrolyseproduktes.

Amino-derivatisierte Peptide

Bei der Beschreibung des Fragmentierungsverhaltens Amino-derivatisierter Peptide müssen zwei Fälle unterschieden werden: Die Markierung der ϵ -Amino-Gruppe des Lysins sowie die Markierung der Peptid-Aminotermini.

Markierung der ϵ -Amino-Gruppe des Lysins

Zur Untersuchung der Lysin-Seitenketten-Derivatisierung wurden die N-terminal acetylierten Peptide S28 (Ac-GK*NASAR), S29 (Ac-GANK*SAR) und S30 (Ac-GANASK*R) verwendet. Diese weisen dieselben Sequenzen auf, wie die Peptide, die zur Analyse der Sulfhydryl-gerichteten Markierung verwendet wurden. Jedoch wurden hier die Cysteine durch Lysin ersetzt (Tabelle 4.2). Die jeweils von markierten und unmarkierten Peptiden stammenden b- und y-Fragmente sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Der Fokus der Analyse lag auf den b- und y-Fragmenten. Die a-Ionen Serie lieferte ähnliche Ergebnisse wie bereits für die Cystein-Markierung beschrieben.

Fragmentierung der derivatisierten Peptide (DPs)

Während die Fragmentierung der underivatisierten Cystein-haltigen Peptide weder im CID- noch im PSD-Modus vollständige b-Ionenserien lieferten, sind nach Austausch des Cysteins durch Lysin die b-Ionen-Serien in beiden Fragmentierungs-Modi für alle Peptide (mit Ausnahme von S33, PSD, b_6 -Ion) komplett zuzuordnen. Auch die y-Ionen sind bei beiden Fragmentierungsarten vollständig. Für die y_1 -Ionen wurden besonders intensive Signale beobachtet (S/N-Werte ~ 1200 -5000). Für die b_2 - b_5 -Fragmente der derivatisierten Peptide ergaben sich deutlich reduzierte S/N-Werte für Peptid S28 und S29 in den PSD-Spektren. Für S30 konnten in den PSD-Messungen überhaupt keine b-Fragmente zugeordnet werden. Die y-Ionen-Serien sind dagegen auch nach Derivatisierung vollständig detektierbar, wenn auch mit größtenteils niedrigeren S/N-Werten (vor allem für y_1 -Ionen). In den CID-Spektren sind die b-Ionenserien der derivatisierten Peptide zwar deutlich reduziert, jedoch vollständig detektierbar. Für die y-Ionen-Serien in den CID-Spektren ergeben sich ähnliche Verhältnisse wie in den PSD-Spektren mit etwas reduzierten S/N-Werten.

Fragmentierung der komplexierten Metall-beladenen Peptide (MDPs)

Auch nach Komplexierung sind in den PSD-Spektren deutlich weniger b-Ionen zu verzeichnen. Für S28 sind b_2 - b_4 vorhanden, für S29 nur b_4 und b_5 und für S30 fehlt die komplette b-Ionen Serie. Ebenfalls deutlich reduziert gegenüber den unmarkierten Peptiden ist die y-Ionen-Serie mit fehlenden bzw. besonders schwachen Signalen für y_5 und y_6 . In den CID-Spektren sind deutlich mehr b-Fragmente mit höheren Intensitäten zuzuordnen und auch die y-Ionen weisen größtenteils höhere S/N-Werte auf.

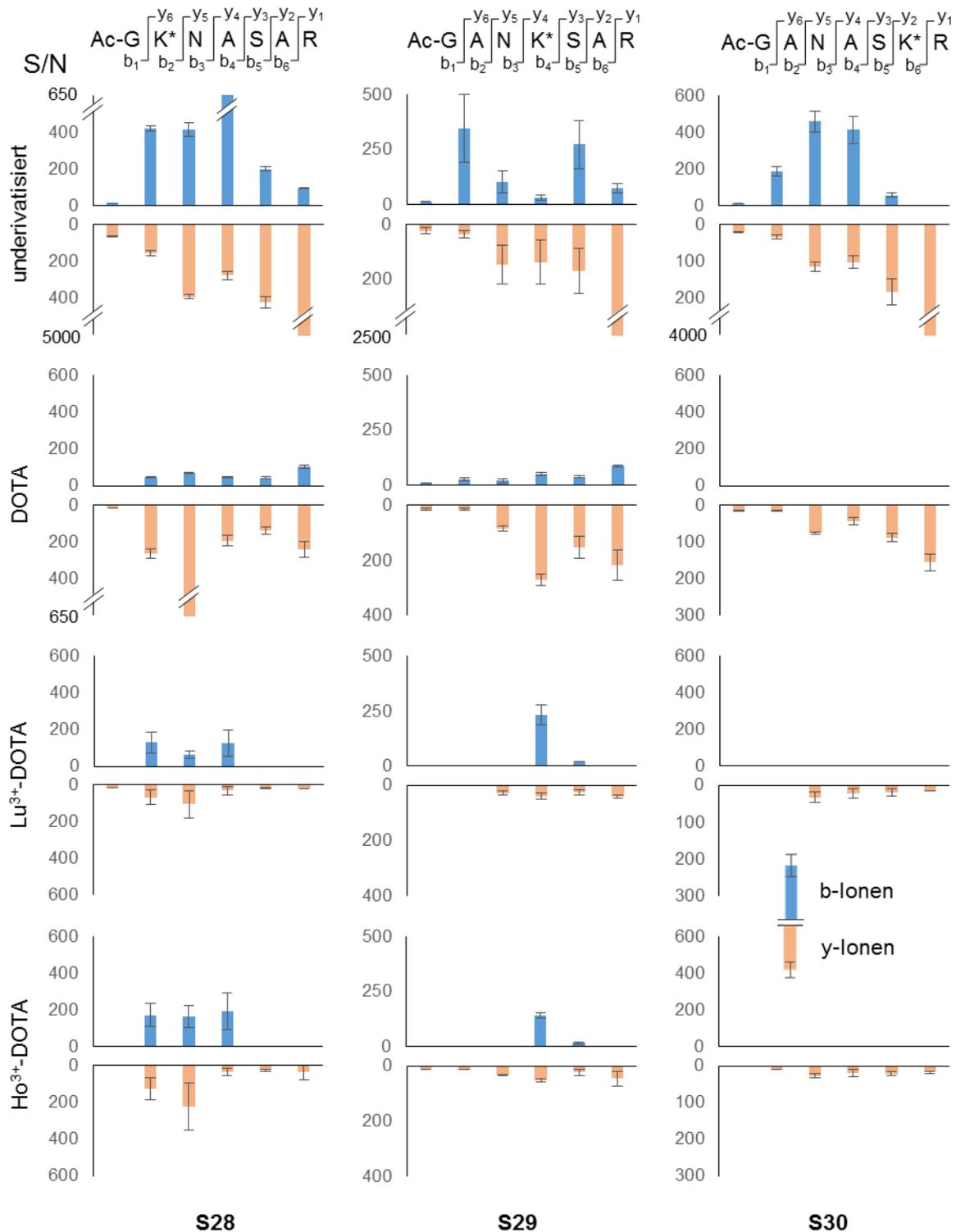


Abb. 4.9: S/N-Verhältnisse der b- und y-Ionen der drei Peptide S28, S29 und S30, welche durch Fragmentierung im PSD-Modus der freien Peptide, der derivatisierten und der Lu/Ho-DOTA-markierten Peptide entstehen.

Für S28 kann eine vollständige b- und y-Serie zugeordnet werden. Für S29 fehlt nur das b_3 -Ion, N-terminal vom markierten Lysin. Die y-Ionen Serie ist hier vollständig. Vor allem für

Peptid S30 mit der Derivatisierung am C-Terminus sind auch nach CID-Fragmentierung wenig Fragmentionen zuzuordnen, bzw. die detektierten b- und y-Ionen besitzen geringe S/N-Werte unter 100. So wird hier nur b_4 detektiert und y_1 - y_4 .

Zusammengefasst lässt sich auch hier sagen, dass sich die endständige Derivatisierung eher negativ auf die Fragmentierung sowohl im PSD- als auch im CID-Modus auswirkt. Es bleibt jedoch zu untersuchen wie sich die Modifikation auf die Fragmentierung bei gleichzeitiger amino-terminaler und carboxy-terminaler ϵ -Lysin-Markierung auswirkt.

Markierungs-spezifische Ionen (Reporterionen)

Für die derivatisierten Peptide wurden wie auch für die Sulfhydryl-gerichtete Markierung beschriebene Signale mit einem m/z von $203,1083 \pm 0,0021$ (S/N-Werte ~ 1000), $102,0658 \pm 0,0013$ (S/N-Werte ~ 600) und $304,1485 \pm 0,0035$ ((S/N-Werte ~ 150) detektiert (siehe Abbildung 4.10 A). Eine Zuordnung der Signale zu einer hypothetischen Struktur der m/z -Verhältnisse konnte nicht erfolgen, die angenommene molekulare Zusammensetzung ist in Kapitel V 1.2. wiedergegeben.

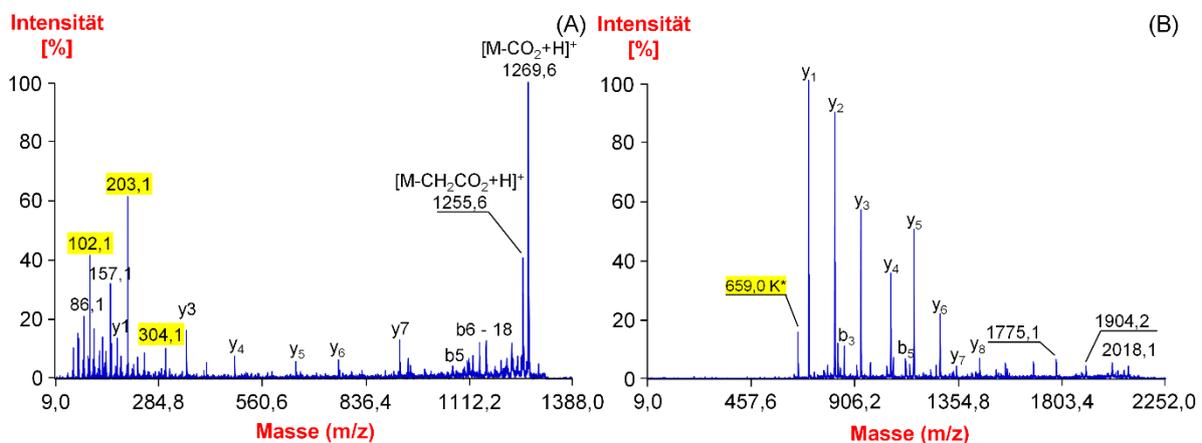


Abb. 4.10: (A) MS/MS-Spektrum von Peptid YLYEIQAR nach Derivatisierung mit NHS-DOTA am Amino-Terminus und (B) MS/MS-Spektrum von Peptid QTALVELLK nach Derivatisierung mit NHS-DOTA und Beladung der DOTA-Moleküle am Amino-Terminus und Lysin mit Lutetiumionen.

Nach Metallierung mit Lutetium konnte in allen Spektren der Lysin-Seitenketten modifizierten Peptide ein Signal bei einem m/z von 659,20 für das Immonium-Ion des markierten Lysins beobachtet werden (siehe Abbildung 4.10 B). Auch in den Spektren der Holmium-markierten Peptide konnte bei einem m/z von 649,19 das Markierungs-spezifische Immonium-Ion detektiert werden. In MS/MS-Spektren Thulium-, Terbium- oder mit anderen

Metallionen markierten Peptiden konnten ebenfalls die passenden Immonium-Ionen mit den entsprechenden Massendifferenzen zugeordnet werden, nicht jedoch in Spektren der Metallfreien DOTA-derivatisierten Peptide. Im Gegensatz zu den mit Maleinimido-DOTA derivatisierten MDPs konnten hier keine weiteren Markierungs-spezifischen Ionen detektiert werden.

N-terminal markierte Peptide

Zur Analyse von Peptiden die am N-Terminus eine DOTA-Markierung tragen, wurden das Peptid S35 (VLASSAR), sowie die aus einem Rinderserumalbumin-Verdau stammenden Peptide S37 (YLYEIAR) und S38 (LGEYGFQNALIVR) untersucht.

In Fragmentspektren des unmarkierten Peptids S35 wurden komplette b- und y-Ionenserien detektiert. Die a-Ionen a_2 - a_6 wurden zugeordnet, wobei a_2 -, b_2 - und b_3 -Ion die intensivsten Signale zeigten. Die y-Ionen-Serie ist durch das starke Signal des y_1 -Ions dominiert. Nach dem *Labeling* sind die Intensitäten von b_1 und b_4 größtenteils unbeeinflusst, wohingegen die Intensitäten von b_5 - und b_6 - Ion, inklusive ihrer Satelliten b_{x-18} , sowie vom b_3 Ion (b_3 mehr als 70%) deutlich reduziert sind. Im Gegensatz dazu ist die Intensität vom b_{4-18} um das 7fache erhöht. Der auffälligste Unterschied ist jedoch die Bildung des a_1 -Ions, das aus dem N-terminalen markierten Valin entstanden ist. Auch beim markierten Peptid wurde die komplette y-Ionen-Serie detektiert. Für das y_1 -Ion war jedoch eine Reduktion der S/N-Verhältnisse um mehr als 50% zu verzeichnen. Dahingegen sind die S/N-Verhältnisse der Ionen y_5 und y_6 um das 15fache erhöht. Die Intensitäten beider Ionen-Serien nehmen also in der Nähe der Derivatisierungsstelle zu.

Auch die MS/MS-Spektren der Peptide S37 und S38 sowie weiterer, aus Proteinverdauen stammenden Peptide wiesen die beschriebenen Charakteristika auf.

Zusammengefasst wirkt sich die Metall-DOTA-Markierung am N-Terminus in drei Aspekten auf die Peptidfragmentierung aus:

- eine verstärkte Bildung der N-terminalen Ionen einhergehend mit einer Reduktion oder sogar dem Verlust der C-terminalen b-Ionen,
- eine deutliche Tendenz verstärkt N-terminale y-Ionen zu bilden und
- die Bildung von a_1 -Ionen, in einigen Fällen auch die von b_1 -Ionen.

Im Gegensatz zu der Derivatisierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins und der damit einhergehenden Bildung des Immonium-Ions konnten keine Markierungs-spezifischen Ionen detektiert werden.

Peptide mit N-terminaler und Lysinseitenketten-Markierung

Neben Peptiden die am N-Terminus markiert sind, führt die Derivatisierung von tryptischen Verdauen auch dazu, dass man Peptide erhält, die gleichzeitig am N-Terminus und am C-terminalen Lysin markiert sind. Zu dieser Gruppe gehört auch Peptid S39 (LVNELTEFAK). Im Spektrum des unmarkierten Peptids herrscht eine gleichmäßige Verteilung aller erwarteter a-, b- und y-Ionen. Die doppelte Metall-DOTA-Markierung beeinflusst jedoch stark die b-Ionen-Serie. Die b₃-, b₄- und b₅-Ionen weisen zwar noch intensive Signale auf, während die übrigen C-terminalen b-Ionen nicht mehr detektierbar sind. Im Gegensatz dazu sind die Intensitäten der C-terminalen y-Ionen ab y₅ deutlich erhöht. Für dieses Peptid, sowie für viele andere die diesem Markierungsmuster folgen ist also eine klare Tendenz, dahingehend zu beobachten, dass die C-terminalen Ionen (von y₅-y₁, mit y₂ und y₁ als intensivste) verstärkt gebildet werden, während die N-terminalen Fragmente (y₉ und y₁₀) nicht länger beobachtet werden können. Dennoch konnte eine Zuordnung der Peptidsequenz anhand der Fragmentspektren aller hier untersuchten Peptide erfolgen.

IV.1.3 Proteinidentifizierung mittels LC-MALDI MS/MS-Analyse

Um die Anwendbarkeit der Methode zur Identifizierung von Proteinen aus komplexen Peptidmischungen zu testen, wurde ein tryptischer Verdau von sechs Modellproteinen mit Maleinimido-DOTA derivatisiert. Zur Metall-Markierung der derivatisierten Peptide wurden Lutetium Ionen verwendet. Die markierten Verdau wurden chromatographisch getrennt und mittels MALDI MS und MS/MS analysiert. Die Ergebnisse wurden mit einem identischen aber, wie in der Proteom-Analyse üblich, an den Cysteinen (methylthio-) alkyliertem Verdau verglichen.

In beiden Proben wurden alle Proteine mit mehr als einem Peptid (siehe Tabelle A.1) identifiziert. Nach der Metall-DOTA-Markierung wurden 36 Cystein-haltige Peptide identifiziert. Im Vergleich dazu konnten in der MMTS-behandelten Probe nur 20 Cystein-haltige Peptide zugeordnet werden. Diese zusätzlichen Peptide tragen zu verbesserten Sequenzabdeckungen (bspw. für α -Lactalbumin von 38% im Lu-DOTA- markierten Ansatz und 25% im methylthiolierten Ansatz) und höheren *protein scores* bei (siehe Tabelle A.1 im Anhang). Betrachtet man die Cystein-freien Peptide (insgesamt 61) so sind hier 84% in

beiden Ansätzen gemeinsam detektiert worden, sodass sich hier insgesamt eine große Übereinstimmung ergibt.

Die Länge der identifizierten Lutetium-DOTA-markierten Peptide reichte von 5-17 Aminosäuren. Trotz Massenzunahme um ca. 700 Da wirkt sich die Lu-DOTA-Markierung hier nicht negativ auf die MS/MS-basierte Identifizierung aus. In den LC-MS-Experimenten konnte die Signalreduktion für größere Cystein-Peptide aus den Einzelspot-Analysen nicht beobachtet werden.

Ansonsten zeigen die MS/MS-Spektren die bereits für die synthetischen Peptide beschriebenen Charakteristiken. Sechs Cystein-Peptide wurden in der alkylierten, nicht aber der Metall-DOTA markierten Probe identifiziert. Fünf dieser Peptide sind zwar in den MS-Spektren detektierbar, ihre MS/MS-Identifizierung scheitert jedoch daran, dass die *peptide scores* unter das Signifikanzlevel fallen. Zwei dieser fünf Peptide weisen jedoch auch in der Analyse der alkylierten Probe niedrige *scores* auf. Die übrigen drei Peptide zeigen hohe Intensitäten für die Markierungs-spezifischen Fragmente und eher niedrige für die sequenzspezifischen Fragmente, sodass auch hier die *peptide scores* zur Identifizierung nicht ausreichen.

IV.2 Quantitative Analyse

Neben den zuvor beschriebenen qualitativen Aspekten sollte eine massenspektrometrische Quantifizierungsmethode eine Reihe weiterer Voraussetzungen erfüllen. Bei der Verwendung der unterschiedlichen Tags muss gewährleistet sein, dass eine zufriedenstellende Genauigkeit und Reproduzierbarkeit erreicht werden kann. In der ersten analytischen (Trenn-)Ebene, der Chromatographie, sollten schon gleiche Retentionseigenschaften der Tags vorliegen, damit in der darauffolgende Massenspektrometrie eine gleiche Probenzusammensetzung gewährleistet werden kann. Nur so können auch gleiche Ionisationsbedingungen für die unterschiedlich markierten Analyten erreicht werden. Dies ist für eine Quantifizierung basierend auf dem Vergleich von Peakflächen absolut notwendig. In der nächsten analytischen Ebene, der Massenspektrometrie ist es wie zuvor bereits erwähnt, wichtig dass die unterschiedlichen Tags gleiche Ionisationseffizienzen aufweisen. Zudem sollten die Isotopenmuster der Peptide nicht verändert bzw. verbreitert werden, sowie bspw. bei Europium (Esteban-Fernández *et al.* 2011). Dies würde zu Intensitätsverlusten führen oder die Interpretation der Spektren erschweren.

Wahl der Lanthanoid-Ionen

Da eine ganze Reihe unterschiedlicher Lanthanoid-Ionen bzw. stabiler Isotope zur Komplexbildung mit dem DOTA-Makrozyklus verfügbar sind, besteht eine Vielzahl von Möglichkeiten eine Quantifizierung mit bspw. zwei, vier, sechs oder acht Kanälen vorzunehmen. Einige der Lanthanoidmetalle liegen schon von Natur aus in monoisotopischer Form vor (^{141}Pr äesodym, ^{159}Tb erbium, ^{165}Ho lmium, ^{169}Tm hulium) oder besitzen nur ein sehr dominantes Isotop (^{139}La nthan (99.91%), ^{175}Lu tetium (97.41%)) und wurden daher vorgezogen. Zusätzlich kann auch das den Übergangsmetallen und den seltenen Erden zugeordnete (^{89}Y ttrium) komplexiert werden. Liu *et al.* stellten jedoch fest, dass zwischen ^{89}Y und ^{159}Tb Differenzen der Ionisierbarkeit vorliegen, die jedoch durch die Einführung von Korrekturfaktoren ausgeglichen werden können (Liu *et al.* 2006). Einige der infrage kommenden Lanthanoide sind in Tabelle 4.7 aufgelistet.

Wie bereits beschrieben, muss bei der Wahl der Metalle besonders auf die sich daraus ergebenden Isotopenmuster in der MS geachtet werden. Bei der automatischen Quantifizierung spielt dies eine besondere Rolle, da in der Regel bei Vorläufer-basierten Methoden nicht nur über die Peakflächen der monoisotopischen Peaks quantifiziert wird,

sondern über das ganze Isotopenmuster. Bei automatischen Analysen wurden somit in der Quantifizierung der 6-Protein-Mischung Metalle ausgewählt deren Isotope mindestens 3 Da auseinanderliegen. Zweitens wurden vorrangig die von Natur aus monoisotopisch vorliegenden Metalle verwendet. Da bei den Analysen der Einzelpeptide nur auf den monoisotopischen Peak quantifiziert wurde, konnten hier bspw. auch ^{139}La und ^{141}Pr verwendet werden.

Tab. 4.7: Auflistung der zur Komplexbildung mit dem DOTA-Makrozyklus verwendbaren Metallionen mit Angabe der Reinheit der angereicherten Isotope. Die mit *gekennzeichneten liegen natürlich monoisotopisch oder besitzen ein dominantes Isotop. (Quelle: Eurisotop)

Element	Isotop	Reinheit [%]
Dysprosium	^{161}Dy	k.A.
Dysprosium	^{162}Dy	96,1
Dysprosium	^{164}Dy	98,4
Erbium	^{162}Er	30,0
Erbium	^{166}Er	99,9
Erbium	^{168}Er	99,9
Erbium	^{170}Er	97,0
<i>Europium</i>	^{151}Eu	97,0
Gadolinium	^{155}Gd	94,3
Gadolinium	^{156}Gd	99,8
Gadolinium	^{158}Gd	97,5
Gadolinium	^{160}Gd	98,7
Holmium*	^{165}Ho	100,0
Lanthan*	^{139}La	99,9
Lutetium*	^{175}Lu	97,4
Lutetium	^{176}Lu	68,9

Element	Isotop	Reinheit [%]
Neodym	^{145}Nd	91,0
<i>Neodym</i>	^{150}Nd	97,5
Praesodym*	^{141}Pr	100,0
Samarium	^{144}Sm	86,0
Samarium	^{152}Sm	99,4
Samarium	^{154}Sm	98,6
Terbium*	^{159}Tb	100,0
Thulium*	^{169}Tm	100,0
Ytterbium	^{171}Yb	95,0
Ytterbium	^{172}Yb	97,1
Ytterbium	^{174}Yb	98,9
Ytterbium	^{176}Yb	97,7
Yttrium*	^{89}Y	100,0

Für die Elektrospray-Analyse gilt, dass bei mehrfach geladenen Ionen die Isotopenmuster der differentiell markierten Peptide zwar näher zusammenrücken, aber insgesamt die Abstände zwischen den einzelnen Isotopen und damit das gesamte Isotopenmuster schmaler werden. Liegen die Isotopenmuster, d.h. die Massen der Metalle jedoch schließlich zu weit auseinander, besteht die Möglichkeit, dass sich die beiden Metalle in Ionisations- und Elutionseigenschaften unterscheiden. Dies wurde zuvor bereits für Yttrium und Terbium beschrieben und kann erheblich die Quantifizierung stören (Liu *et al.* 2006).

Im Folgenden wurden die beiden Peptidquantifizierungsstrategien das isobare *Labeling* mittels iTRAQ-Reagenzien und das Vorläuferionen-basierte Metallion-Chelat-*Labeling* unter Verwendung der MALDI MS und MS/MS-Analyse miteinander verglichen. Die Metall-

DOTA-Markierungsstrategie sollte dabei hinsichtlich Genauigkeit, Präzision und des dynamischen Bereichs an einer bereits etablierten Methode getestet werden. Dazu wurden Einzelpeptide sowie ein Verdau einer 6-Proteinmischung als Modell-Analyten verwendet. Ein detaillierter Ablaufplan der Experimente ist in Abbildung 4.11 und 4.15 wiedergegeben. Der grundlegende Unterschied der beiden Quantifizierungsstrategien besteht darin, dass das differentielle Metall-Labeling aufgrund der Massendifferenzen der Metalle zur Bildung nicht-isobarer Peptide führt, während die iTRAQ-Markierung isobare Peptide erzeugt. Die relative Quantifizierung der Metall-markierten Peptide erfolgt hier also im MS-Modus. Dagegen werden zur Quantifizierung mit isobaren Tags die Peakflächen der Reporterionen aus der MS/MS-Analyse herangezogen.

IV.2.1 Relative Quantifizierung von Einzelpeptiden

Drei synthetische Peptide wurden, wie in Abbildung 4.11 gezeigt, mit dem Metallion-Chelator DOTA entweder an den Amino-Gruppen oder an den Sulfhydryl-Gruppen derivatisiert und mit den folgenden Metallionen beladen: Pr^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , Ho^{3+} , Tm^{3+} und Lu^{3+} . Eine Mischung gleicher Mengen an Pr^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , Ho^{3+} , Tm^{3+} -markierten Peptiden (2 fmol pro Peptid), die in konstanter Konzentration gehalten wurden, wurde hergestellt und als Referenz bzw. interner Standard verwendet. Lu^{3+} -markierte Peptide wurden dann in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben, sodass molare Verhältnisse zwischen 0,025:1 bis 50:1 der Lu^{3+} -markierten Peptide relativ zu den fünf anderen Ln^{3+} -markierten Peptiden erzeugt wurden. Parallel dazu wurden Aliquots der drei Peptide jeweils mit einem der vier iTRAQ-Reagenzien markiert. Dementsprechend wurden die iTRAQ-114-, 115-, 116-markierten Peptide in equimolaren Mengen vereinigt (je 2 fmol). Das korrespondierende 117-markierte Peptid wurde in unterschiedlichen Mengen zugegeben, um die Verhältnisse (0,025:1 bis 50:1) relativ zu den drei anderen Peptiden zu erreichen. Die Peptid-Mischungen wurden daraufhin 8fach gespottet, im MS-Modus (Metall-markierte und iTRAQ Peptide) und im MS/MS-Mode (nur iTRAQ Peptide) analysiert.

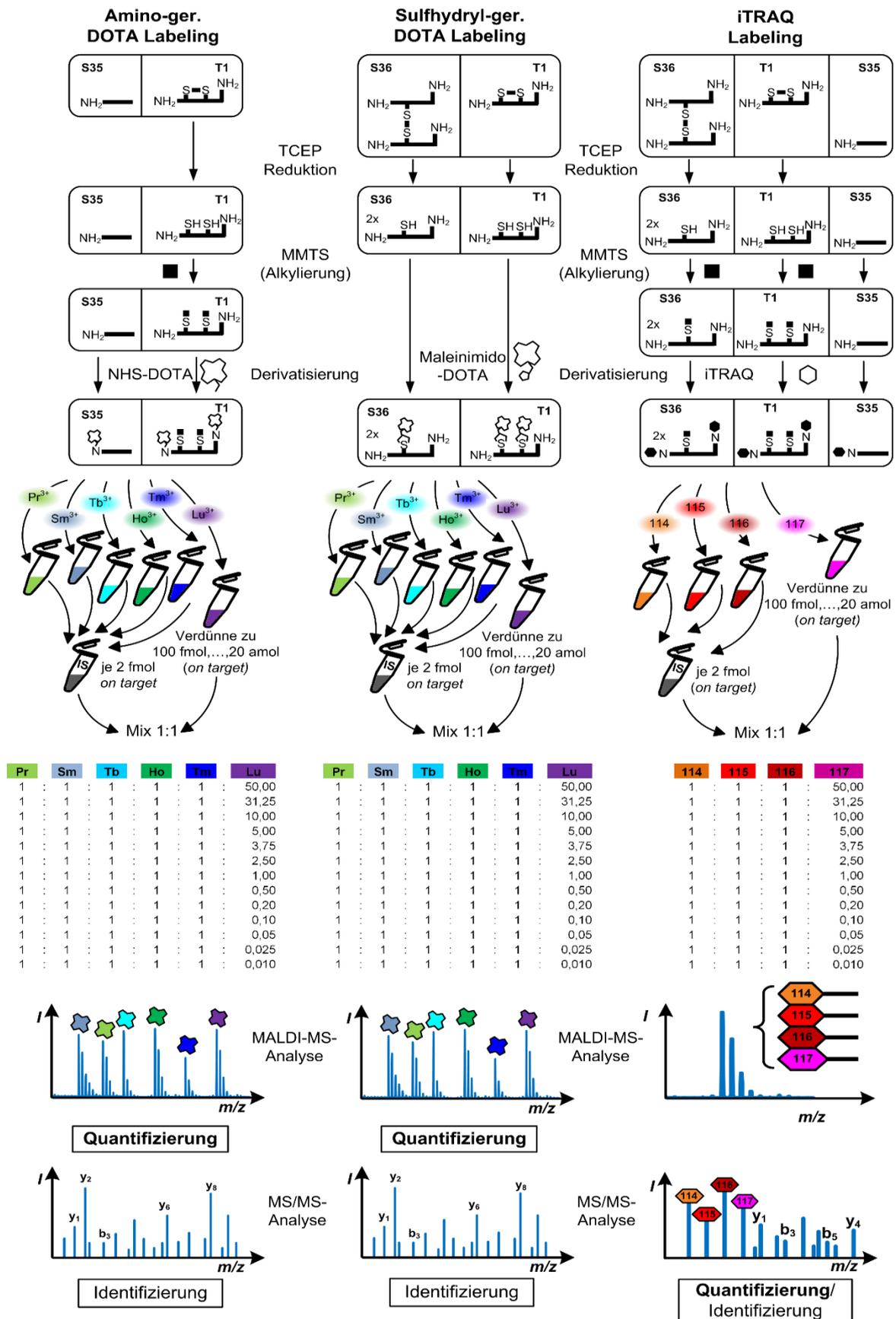


Abb. 4.11: Schematischer Arbeitsablauf zur Markierungsstrategie und Quantifizierung der Einzelpeptide S35, S36 und T1. Die Cystein-haltigen Peptide S36 und T1 wurden vor der

Derivatisierung reduziert. Für die iTRAQ-Quantifizierung wurden T1 und S36 zusätzlich alkyliert, für die Derivatisierung mit NHS-DOTA nur T1. Zur Herstellung des internen Standards wurden jeweils fünf der differentiell Metall-markierten Peptide in gleichen Mengen vereint, zur iTRAQ-Quantifizierung wurden die 114-, 115- und 116-markierten Peptide gemixt.

S35 (VLASSAR), Derivatisierung der Amino-Gruppen

Exemplarisch sind in Abbildung 4.12, die aus den Peakflächen berechneten Verhältnisse des $\text{Lu}^{3+}/\text{Ln}^{3+}$ -DOTA-markierten (A, C) und des 117/iTRAQ-markierten Peptids S35 (B, D) gegen die theoretisch zu erwartenden Werte aufgetragen. Im unteren Teil der Abbildung sind die Analyt/IS-Verhältnisse zwischen 0,01:1 und 2,5:1 vergrößert dargestellt. Bei höheren Analyt/IS-Verhältnissen (>10) sind deutliche Unterschiede zwischen DOTA und iTRAQ-Markierung festzustellen. Für das theoretische Verhältnis von 50:1 werden für die iTRAQ-Markierung nur Werte zwischen 23:1 und 34:1 erreicht; für DOTA dagegen Verhältnisse zwischen 40:1 und 48:1. Auch für das Verhältnis von 31,25:1 ist die DOTA-basierte Quantifizierung mit Werten zwischen 26:1 und 31:1 näher am Erwartungswert, als die iTRAQ-Quantifizierung mit Werten zwischen 17:1 und 25:1. Somit ergibt sich hier für iTRAQ eine geringere Genauigkeit der Quantifizierung als für DOTA. Außerdem sind für die iTRAQ-Markierung auch größere Abweichungen zwischen den einzelnen *Label* (114-116) im Vergleich zur DOTA-Quantifizierung (Pr-Tm), hinsichtlich der Verhältnisse 31,25:1 und 50:1, zu verzeichnen. Im unteren Teil der Abbildung 4.12, die die Verhältnisse von 2,5:1-0,025:1 vergrößert darstellt, ist zu erkennen, dass die Datenpunkte der iTRAQ-Quantifizierung nur bis zu einem Verhältnis von 0,5:1 reichen. Die Nachweisgrenze (=LOD; engl. *limit of detection*) ist also bei einer Menge von 1 fmol auf dem Target erreicht. Für das DOTA markierte Peptid S35 konnten Signale bis hin zu Analyt/IS-Verhältnissen von 0,025 detektiert werden, entsprechend 50 amol des Analyten (Menge auf dem Target). Hinsichtlich der Nähe zu den theoretischen erwarteten Verhältnissen ist im unteren Teil der Abbildung 4.12 kein Unterschied zwischen DOTA- und iTRAQ-Quantifizierung zu erkennen.

Zur weiteren Analyse der Quantifizierung sind die Geradengleichungen der Bestgeraden sowie das Bestimmtheitsmaß der einzelnen Datenreihen in Tabelle 4.8 aufgeführt. Sowohl für Bestimmtheitsmaß als auch für die Steigung der Bestgeraden erwartet man im Idealfall, dass die Werte möglichst nahe an 1 liegen. Betrachtet man die DOTA-Quantifizierung für die Verhältnisse von 50:1-0,025:1, so lässt sich sagen, dass hier mit einem Bestimmtheitsmaß ($>0,998$) ein starker linearer Zusammenhang für einen Konzentrationsbereich von über drei

Größenordnungen (2×10^3 von 50:1-0,025:1) gegeben ist. Für die iTRAQ-Quantifizierung liegt das Bestimmtheitsmaß dagegen nur zwischen 0,969 und 0,987.

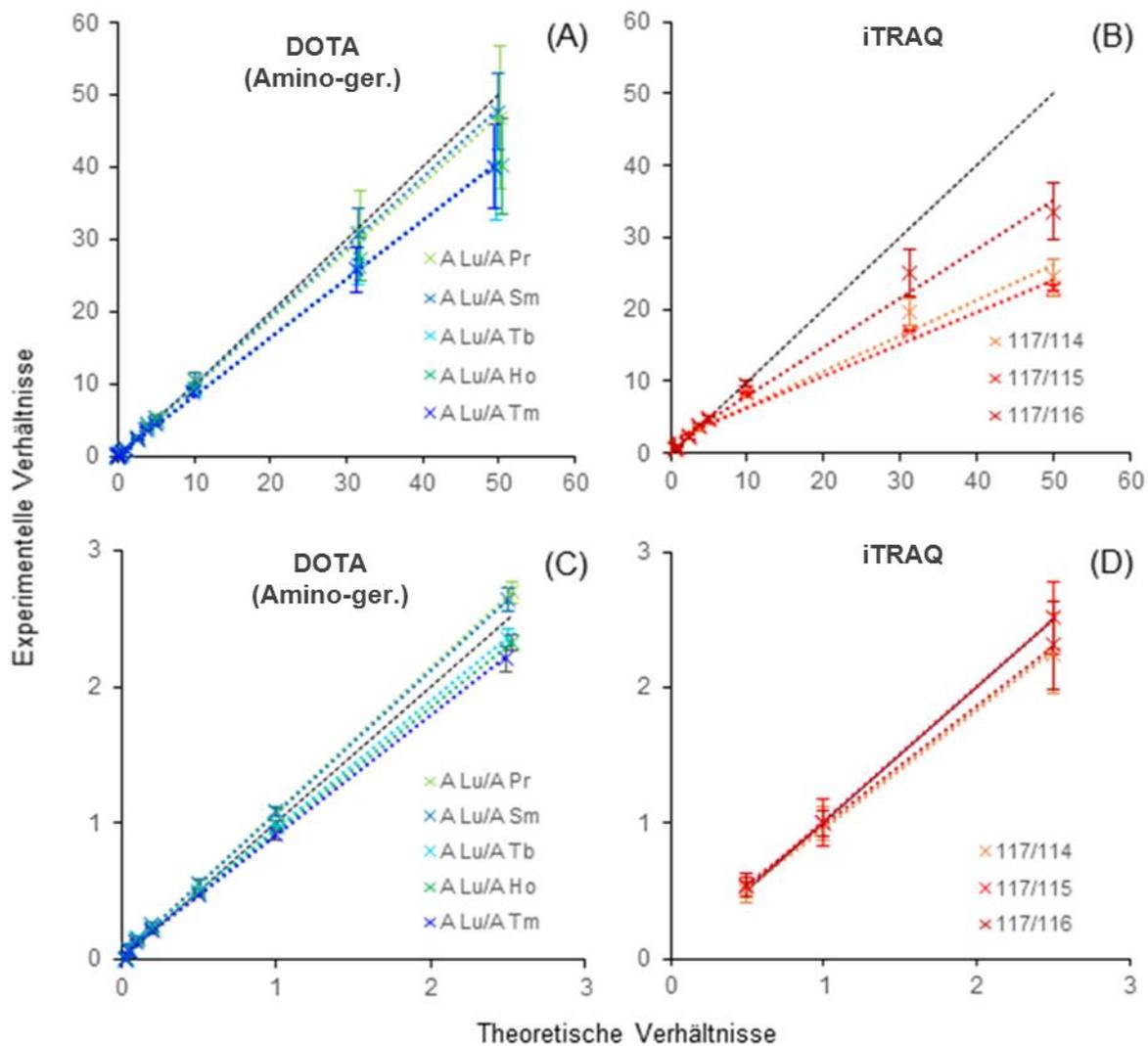


Abb. 4.12: Grafische Darstellung der experimentell ermittelten Verhältnisse (A, C) des Lu-DOTA markierten Peptids S 35 zu den internen Standards (Pr, Sm, Tb, Ho und Tm) und (B, D) des iTRAQ 117 markierten Peptids zum internen Standard 114-116 gegenüber den theoretisch zu erwartenden Verhältnissen. Die Diagramme C und D geben vergrößert die Verhältnisse bis 2,5:1 an. Die schwarze gestrichelte Linie repräsentiert die theoretisch zu erwartenden Verhältnisse, während die gepunkteten Linien die Bestgeraden der einzelnen Kanäle (Pr-Tm, 114-116) darstellt.

Während hinsichtlich der Steigung der Bestgeraden für die DOTA-basierte Quantifizierung mit Werten zwischen 0,81 und 0,94 über den gesamten Konzentrationsbereich zufriedenstellende Ergebnisse erreicht wurden, liefert die Quantifizierung mit iTRAQ nur Steigungen zwischen 0,45 und 0,68. Betrachtet man jedoch nur die Verhältnisse von 2,5:1-0,025:1, wie in Tabelle 4.8 unten dargestellt, so sind für DOTA- und iTRAQ-Quantifizierung

sowohl in Bezug auf das Bestimmtheitsmaß als auch bezüglich der Geradensteigungen gleichwertige Ergebnisse zu verzeichnen. Da mittels iTRAQ-Quantifizierung lediglich Verhältnisse bis zu 0,5:1 detektiert wurden, konnte hier nur ein starker linearer Zusammenhang über zwei Größenordnungen ermittelt werden (10^2 von 5:1-0,5:1).

Tab. 4.8: Auflistung des Bestimmtheitsmaß der Bestgeraden mit der Gleichung $y = mx+b$ für die Quantifizierung von Peptid S35, sowie ihrer Steigungen und Ordinaten. Im oberen Tabellen-Abschnitt wurden alle Daten in die Regressionsanalyse mit einbezogen, im unteren Abschnitt nur die Verhältnisse $\leq 2,5$.

50:1-0,025:1		Lu/Pr	Lu/Sm	Lu/Tb	Lu/Ho	Lu/Tm	117/114	117/115	117/116
Bestimmtheitsmaß	R^2	0,9988	0,9995	0,9989	0,9981	0,9996	0,9687	0,9745	0,987
Steigung	m	0,94	0,96	0,81	0,81	0,81	0,50	0,45	0,68
y-Achsen- abschnitt	b	0,33	0,26	0,32	0,34	0,21	1,62	1,82	1,22
2,5:1-0,025:1		Lu/Pr	Lu/Sm	Lu/Tb	Lu/Ho	Lu/Tm	117/114	117/115	117/116
Bestimmtheitsmaß	R^2	0,9994	0,9994	0,999	0,9992	0,9993	0,9985	0,9998	0,9999
Steigung	m	1,06	1,04	0,93	0,91	0,88	0,87	1,00	0,88
y-Achsen- abschnitt	b	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,10	0,02	0,11

T1 (VKCFNCGK), Derivatisierung der Amino-Gruppen

Neben Peptid S35 wurden auch die Amino-Gruppen von Peptid T1 mit NHS-DOTA derivatisiert und mit der iTRAQ-Quantifizierung verglichen. Die Ergebnisse aller Verhältnisse 117/iS (iS = 114-116) bzw. Lu/iS (iS = Pr-Ho) $\geq 0,1:1$ wurden mit den theoretisch zu erwartenden Werten in Abbildung 4.13 verglichen. Wie bereits für die iTRAQ-Quantifizierung von S35 beobachtet, liegen die experimentell ermittelten Verhältnisse von T1 mit 16-31:1 deutlich unter dem theoretisch zu erwartenden Verhältnis von 50:1. Auch für ein Verhältnis von 31,25:1 liegen die Verhältnisse mit 16-21 deutlich unter den theoretischen. Dies gilt bei diesem Peptid jedoch auch zusätzlich für die Verhältnisse 10:1 und 5:1. Die Abweichungen der einzelnen Kanäle untereinander sind auch hier für die iTRAQ markierten Peptide größer als für die DOTA-markierten Peptide.

Die Nachweisgrenze (LOD) liegt auch hier für die iTRAQ-Quantifizierung bei einem Verhältnis von 0,5:1 bzw. für 1 fmol auf der Probenplatte, für die DOTA-Quantifizierung hingegen bei 0,1:1 entsprechend 200 amol.

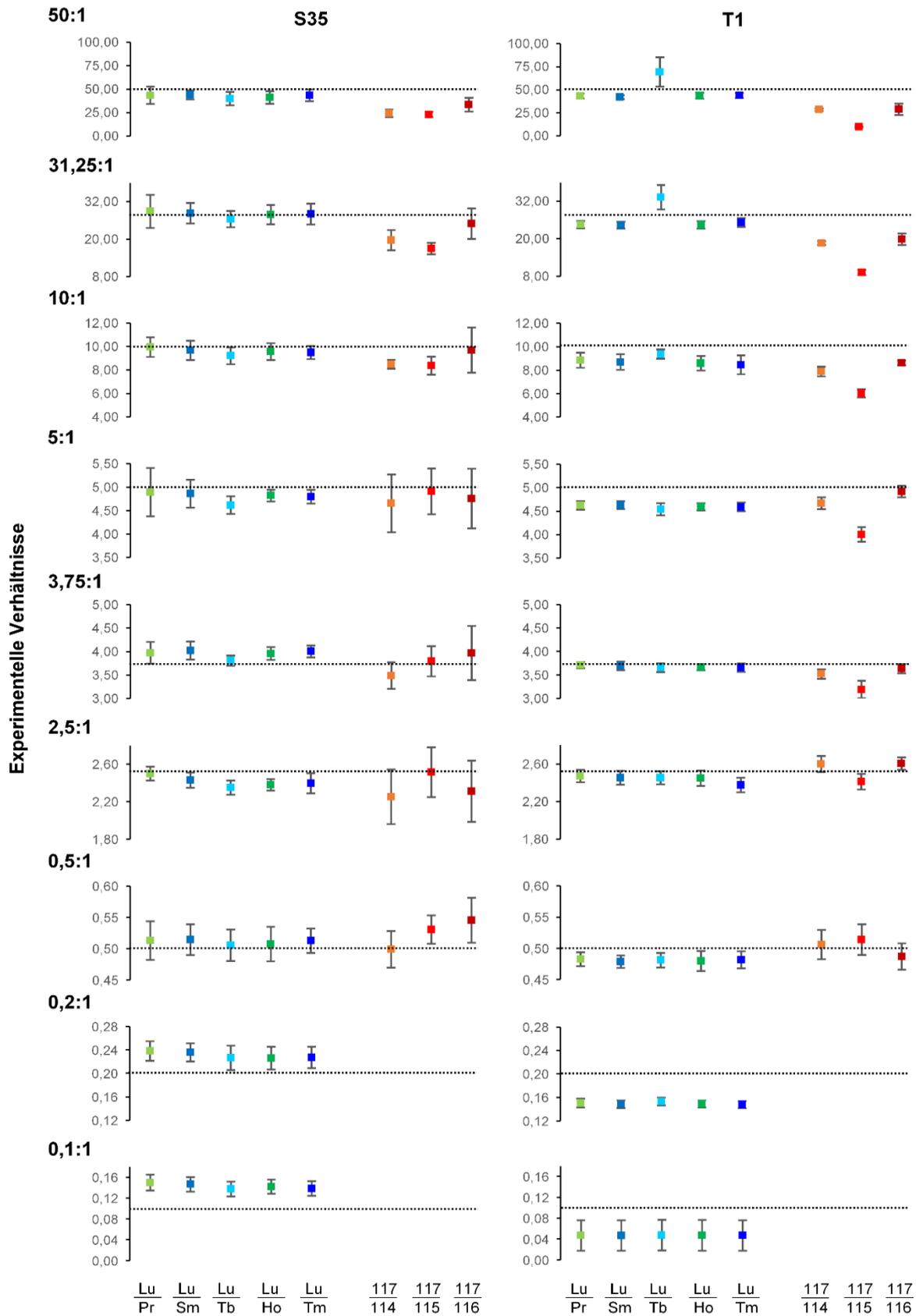


Abb. 4.13: Vergleich der experimentellen Verhältnisse von allen Lu/iS- oder 117/iS-Kombinationen für Peptid S35 und T1 nach DOTA oder iTRAQ-Quantifizierung. Die theoretisch zu erwartenden Werte sind durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.

S36 (GACLLPK) und T1 (VKCFNCGK), Derivatisierung der Cysteine

Ähnliche Beobachtungen wie für S35 und T1 konnten auch für S36 und T1 im Vergleich zwischen DOTA und iTRAQ-Quantifizierung gemacht werden. Alle experimentellen Verhältnisse ($\geq 0,1:1$) aller verwendeten Kanäle wurden für die beiden Peptide S36 und T1 in Abbildung 4.14 mit ihren theoretischen Verhältnissen verglichen. Während für die iTRAQ-Quantifizierung 0,5:1 das niedrigste detektierbare Verhältnis ist, reicht die DOTA-Quantifizierung von S36 bis zu einem Verhältnis von 0,05:1 und bis zu 0,1:1 für T1. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Quantifizierung der Verhältnisse $\leq 0,1:1$ relativ ungenau ist (siehe Tabelle A.4 im Anhang) und für T1 bspw. das experimentell ermittelte Verhältnis für 0,1:1 im Mittel bei 0,05 liegt, was einen relativen Fehler von 50% darstellt. Auch für die Cystein-haltigen Peptide wurde für die weniger großen Verhältnisse ($\leq 5:1$) in beiden Ansätzen eine hohe Genauigkeit der Quantifizierung und ein starker linearer Zusammenhang erreicht (siehe Tabelle 4.14 und A.4). Für die großen Verhältnisse wurden für Peptid S36 ebenfalls in beiden Ansätzen vergleichbare Ergebnisse erzielt. Für Peptid T1 wurden dagegen hinsichtlich der Verhältnisse $>5:1$ für die iTRAQ-basierte Quantifizierung zu niedrige Werte ermittelt.

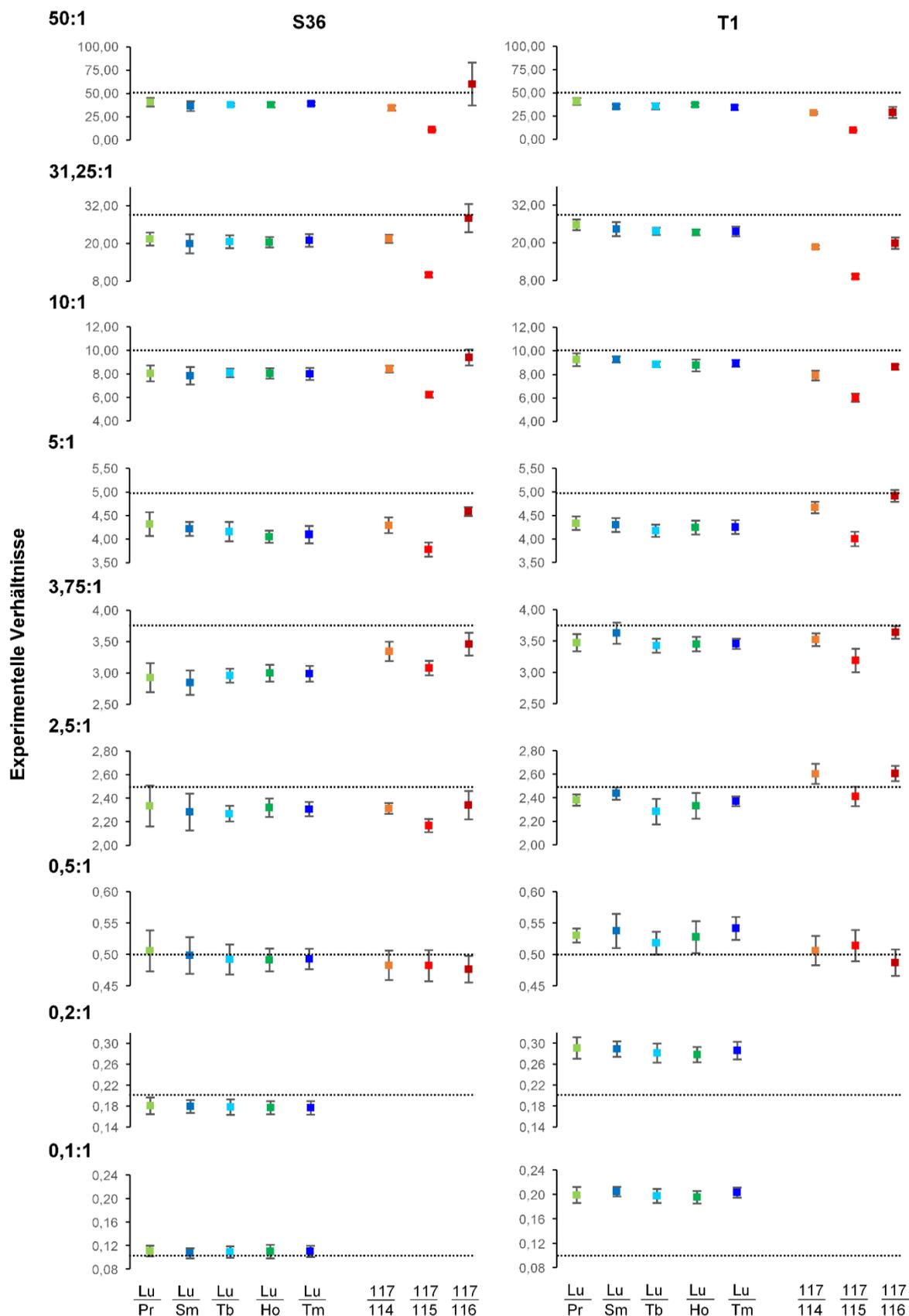


Abb. 4.14: Vergleich der experimentellen Verhältnisse von allen Lu/iS- oder 117/iS-Kombinationen für Peptid S36 und T1 nach DOTA- oder iTRAQ-Quantifizierung. Die theoretisch zu erwartenden Werte sind durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit

Aus den Lu/Ln- oder 117/iS-Verhältnissen über die verschiedenen Spots (jede Probe wurde achtmal auf die Probenplatte aufgetragen) wurde die relative Standardabweichung bestimmt. Diese stellt ein Maß für die Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit dar. Zum besseren Vergleich der beiden Quantifizierungsansätze wurde die rel. Standardabweichung für jede Metall-Markierung (Pr-Tm), bzw. jedes iTRAQ-Label (114-116) berechnet (Daten Tabelle A3 im Anhang) und gemittelt. Daraus wurde wiederum ein Mittelwert für alle Verhältnisse von 50:1-0,5:1 sowohl für die DOTA-Quantifizierung als auch für die iTRAQ-Quantifizierung bestimmt. Außer für Peptid S35 liegen alle rel. Standardabweichungen sowohl für die DOTA als auch für die iTRAQ-Quantifizierung unter 10%. Für die iTRAQ-Quantifizierung von S35 liegt die relative Standardabweichung mit 13% deutlich über der DOTA-Quantifizierung. Insgesamt sind jedoch hinsichtlich der Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit für die MS/MS-basierte iTRAQ-Quantifizierung und die MS-basierte DOTA-Quantifizierung vergleichbare Ergebnisse erzielt worden.

Zum besseren Vergleich der beiden Quantifizierungsstrategien hinsichtlich der Genauigkeit der Quantifizierung wurden die Ergebnisse der unterschiedlichen *Label*, wie in Gleichung 4.1 und Abbildung A.3 im Anhang gezeigt, gemittelt.

$$\emptyset \frac{117}{iS (= 114 - 116)} = \frac{1}{3} \times \left(\frac{A 117}{A 114} + \frac{A 117}{A 115} + \frac{A 117}{A 116} \right)$$

$$\text{bzw. } \emptyset \frac{Lu}{iS (Pr-Ho)} = \frac{1}{5} \times \left(\frac{A Lu}{A Pr} + \frac{A Lu}{A Sm} + \frac{A Lu}{A Tb} + \frac{A Lu}{A Ho} + \frac{A Lu}{A Tm} \right) \quad \text{Gleichung 4.1}$$

Die mittleren experimentellen Verhältnisse wurden für jedes Peptid mit den theoretischen Verhältnissen in einem Diagramm verglichen (Abbildung A.3 im Anhang) und die Bestgeraden mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß ermittelt (Tabelle 4.9). Zusätzlich wurden die Variationskoeffizienten zwischen den einzelnen *Label*, d.h. zwischen allen Lu/Ln bzw. 117/iS-Verhältnissen, berechnet. Diese Variationskoeffizienten spiegeln Schwankungen zwischen den unterschiedlichen Metall-Markierungen oder iTRAQ-Derivatisierungsreagenzien wieder. Sie dürfen daher nicht mit den zuvor beschriebenen rel. Standardabweichungen der einzelnen *Label* über unterschiedliche Spots, die den Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeiten entsprechen, verwechselt werden. Die Variationskoeffizienten über die Verhältnisse 50:1-0,5:1 wurden schließlich auch gemittelt und sind in Tabelle A.4 aufgeführt. Als Maß für die Genauigkeit der Quantifizierung wurden zudem die mittleren

relativen Fehler über die verschiedenen Markierungen berechnet und der Durchschnitt über die Verhältnisse 50:1-0,5:1 in Tabelle 4.9 aufgelistet.

Tab. 4.9: Zusammenfassung der Quantifizierungsergebnisse gemittelt über die einzelnen Metallmarkierungen Pr-Tm bzw. iTRAQ-Label 114-116.

		S35 VLASSAR		T1 VKCFNCGK	
		iTRAQ	DOTA (Amino-reaktiv)	iTRAQ	DOTA (Amino-reaktiv)
Bestimmtheitsmaß	R ²	0,9796	0,9988	0,9829	0,9950
Gleichung der Regressionsgeraden	y	0,54x+1,55	0,85x+0,34	0,43x+1,61	0,94x-0,18
Ø Variationskoeffizient; Verhältnisse 50-0,5	[%]	7,60	2,22	13,00	5,80
Ø relativer Fehler; Verhältnisse 50-0,5	[%]	13,99	5,88	19,14	8,66

		S36 GACLLPK		T1 VKCFNCGK	
		iTRAQ	DOTA (CYS-reaktiv)	iTRAQ	DOTA (CYS-reaktiv)
Bestimmtheitsmaß	R ²	0,9954	0,9940	0,9829	0,9981
Gleichung der Regressionsgeraden	y	0,67x+0,51	0,74x+0,13	0,43x+1,61	0,74x+0,52
Ø Variationskoeffizient; Verhältnisse 50-0,5	[%]	16,68	1,89	13,00	2,68
Ø relativer Fehler; Verhältnisse 50-0,5	[%]	17,08	13,99	19,14	9,94

Für alle Peptide mit Ausnahme von S36 ist das Bestimmtheitsmaß nach DOTA-Quantifizierung näher am Idealwert 1. Die Steigungen der Bestgeraden für die iTRAQ-Quantifizierung sind deutlich geringer als für die DOTA-basierte Quantifizierung. Die Variationskoeffizienten in den DOTA-basierten Ansätzen sind sowohl für die Cystein-Markierung als auch für die Amino-gerichtete-Markierung sehr niedrig, d.h. dass die Unterschiede zwischen den Metallionen sehr gering sind. Alle Metalle sind also in Multiplexing-Ansätzen verwendbar. Die genaueste Quantifizierung über die Verhältnisse 50:1-0,5:1 wurde mit einem relativen Fehler <9% für die Amino-gerichtete DOTA-Quantifizierung erreicht, danach für die Sulfhydryl-gerichtete DOTA-Quantifizierung mit einem Fehler <14%. Bedingt durch die niedrigen Werte die im iTRAQ-Ansatz für die extremeren Verhältnisse 50:1 und 31,25:1 errechnet wurden, schneidet die iTRAQ-Quantifizierung mit einem relativen Fehler zwischen 14-19% auch hier am schlechtesten ab.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Metall-Markierung die experimentell bestimmten Verhältnisse in guter Übereinstimmung zu den theoretisch errechneten liegen. Für die iTRAQ-Markierung gibt es für die Verhältnisse >10:1 eine deutliche Abweichung hinzu geringeren Analyt/IS-Verhältnissen, woraus sich eine geringere Genauigkeit der

Quantifizierung und ein linearer Zusammenhang über einen geringeren Konzentrationsbereich ergibt. Insgesamt liefert die Quantifizierung der mit NHS-DOTA derivatisierten Peptide genauere und präzisere Ergebnisse als die Quantifizierung der mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptide.

IV.2.2 Relative Quantifizierung eines 6-Protein-Verdaus

Um die Anwendbarkeit der Methode auf komplexe Proteinmischungen zu validieren wurde ein tryptischer Verdau von sechs Proteinen der iTRAQ bzw. DOTA (Maleinimido- und NHS) Derivatisierung unterzogen. Durch unterschiedliche Genexpression kann ein Protein in verschiedenen Proben in stark unterschiedlichen Mengen vorliegen. Man unterscheidet also hoch- und niedrig abundante Proteine. Die Produkte von Haushaltsgenen liegen dagegen unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen in gleicher Menge vor. Die folgenden Experimente dienen dazu die quantitative Proteinzusammensetzung einer Probe zu erfassen. Außerdem sollten die beiden Methoden hinsichtlich ihrer Kapazität, stark unterschiedliche Proteinabundanzen zu bestimmen, verglichen werden. Dazu wurden vier Proben in denen bestimmte Proteine in unterschiedlichen Mengen vorliegen differentiell markiert, vereinigt und mittels LC-MALDI MS und MS/MS in Triplikaten analysiert (Zusammensetzung und *Labelingschema* ist Abbildung 4.15 zu entnehmen).

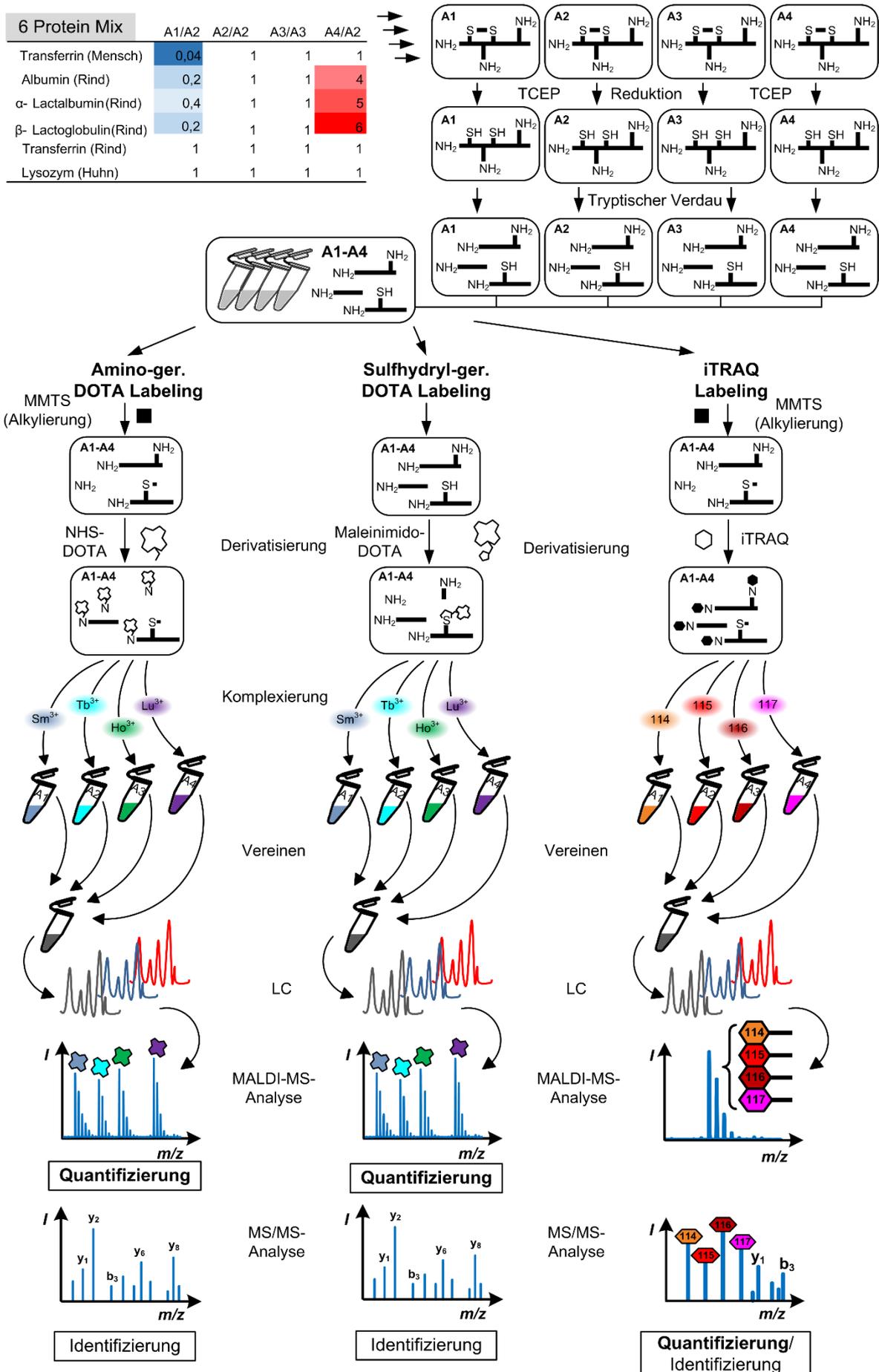


Abb. 4.15: Schematischer Arbeitsablauf zur Quantifizierung der 6-Protein-Mischung nach Derivatisierung mit NHS-DOTA-, Maleinimido-DOTA und iTRAQ. Zur Herstellung der Proben mit unterschiedlichen Proteinabundanzen wurden zuerst die Proteinmischungen A1-A4 hergestellt, die Cysteine reduziert und die Proteine mit Trypsin verdaut. Für die Derivatisierung mit iTRAQ- und NHS-DOTA wurden die Cystein-haltigen Peptide noch mit MMTS alkyliert. Nach Derivatisierung und Metallierung der DOTA-markierten Proben wurden die Peptidmischungen A1-A4 1:1 vereinigt und in Triplikaten getrennt und gespottet. Alle LC-Trennungen wurden schließlich mit MALDI MS und MS/MS analysiert.

Qualitative Ergebnisse

In Tabelle 4.10 sind die qualitativen Ergebnisse der Datenbankanalyse bezüglich der *protein scores*, der Sequenzabdeckungen und der Anzahl der Peptididentifizierungen aufgeführt. Die Sequenzabdeckungen der DOTA-basierten Ansätze mit 46% für die Amino-gerichtete DOTA-Derivatisierung und 47% für die Sulfhydryl-gerichtete DOTA-Derivatisierung sind vergleichbar.

Tab. 4.10: Zusammenfassung der qualitativen Daten aus der Mascotdatenbanksuche, inklusive der Mascot *protein score*, der Sequenzabdeckungen und der Anzahl der Peptididentifizierungen mit einem Vertrauensintervall $\geq 95\%$ ($p < 0,05$).

	<i>protein score</i>		
	iTRAQ	DOTA (Amino-reaktiv)	DOTA (CYS-reaktiv)
Transferrin (Mensch)	10716	4808	3937
Albumin (Rind)	11055	5689	4486
α -Lactalbumin (Rind)	1571	909	643
β -Lactoglobulin (Rind)	1947	800	1364
Transferrin (Rind)	11124	5402	3992
Lysozym (Huhn)	1270	1409	738
Σ <i>protein score</i>	37683	19017	15160

	Sequenzabdeckung [%]		
	iTRAQ	DOTA (Amino-reaktiv)	DOTA (CYS-reaktiv)
Transferrin (Mensch)	66	49	53
Albumin (Rind)	80	62	51
α -Lactalbumin (Rind)	47	37	39
β -Lactoglobulin (Rind)	57	44	51
Transferrin (Rind)	74	47	50
Lysozym (Huhn)	34	40	36
\emptyset Sequenzabdeckung [%]	60	46	47

	Anzahl der Peptididentifizierungen		
	iTRAQ	DOTA (Amino-reaktiv)	DOTA (CYS-reaktiv)
Transferrin (Mensch)	60	44	36
Albumin (Rind)	54	45	31
α -Lactalbumin (Rind)	8	7	6
β -Lactoglobulin (Rind)	14	12	10
Transferrin (Rind)	63	42	33
Lysozym (Huhn)	7	6	5
	206	156	121

Mit der iTRAQ-Markierung wurde eine deutlich höhere Sequenzabdeckung erreicht (60%), begleitet von höheren *protein scores* und der höchsten Anzahl an Peptididentifizierungen (206). Die Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA schneidet mit 85 identifizierten Peptiden schlechter als die Amino-gerichtete-Quantifizierung (156 identifizierte Peptide) ab (Tabelle 4.10).

Quantitative Ergebnisse

Die quantitativen Daten der Proteine die in allen Proben in gleicher Menge vorliegen zeigen keine prägnanten Unterschiede zwischen der Amino-gerichteten DOTA- und der iTRAQ-Quantifizierung (Abbildung 4.16). Bei beiden Markierungsstrategien liegen die experimentell bestimmten Verhältnisse nahe am Erwartungswert 1. Jedoch sind beträchtliche Abweichungen im Fall des iTRAQ-markierten humanen Transferrins, das in Probe A1 in geringer Menge vorliegt und damit ein niedrig abundantes Protein darstellt, beobachtet worden.

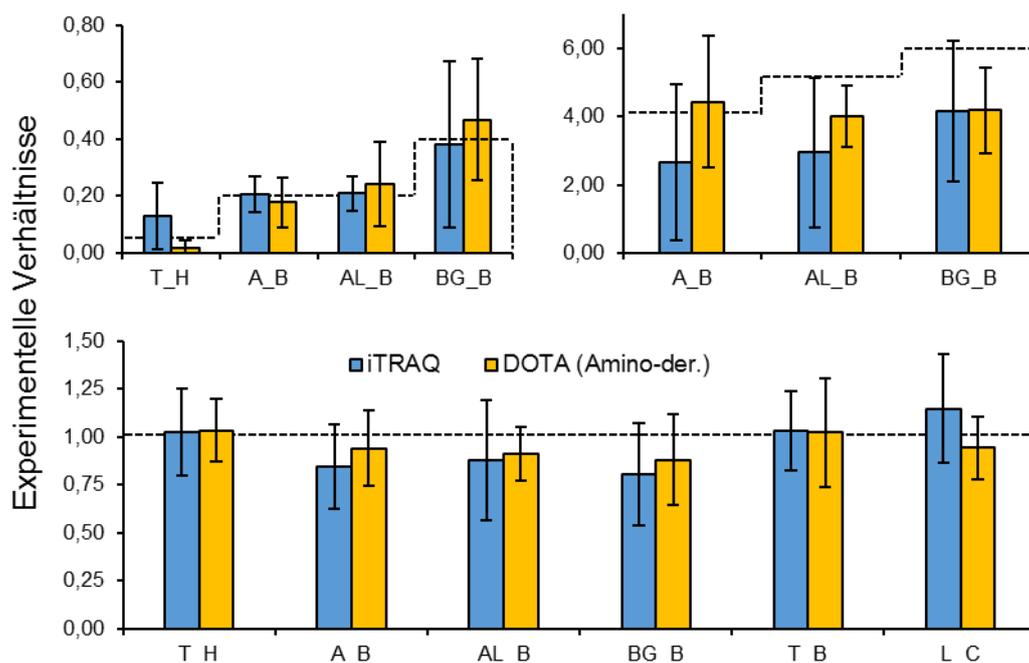


Abb. 4.16: Vergleich zwischen iTRAQ- und DOTA (Amino-gerichtete Markierung)-Verhältnissen (A) der niedrig abundanten Proteine $<0,5$, (B) der hochabundanten Proteine mit Verhältnissen ≥ 4 und (C) der Proteine, die in allen Proben in gleichen Konzentration vorlagen, mit den Verhältnissen = 1. Alle ermittelten Werte und ihre Standardabweichungen sind Durchschnittswerte aus allen bestimmten Peptidverhältnissen aus drei technischen Replikaten. Die gestrichelten Linien stellen die theoretisch zu erwartenden Werte dar.

Die Proteine Albumin, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin liegen in Probe A4 in höherer Konzentration als in den übrigen vor. Diese dienen damit zur Simulation hochabundanter Proteine. Hier zeigt die Amino-gerichtete DOTA Quantifizierung eine höhere Genauigkeit bei den Proteinen Albumin und α -Lactalbumin, sowie eine höhere Präzision als das iTRAQ-markierte β -Lactoglobulin (Abbildung 4.16 und Tabelle A.5). Ein detailliertes Beispiel einer ungenauen iTRAQ-Quantifizierung ist für ein Albumin-Peptid in Abbildung 4.17 gezeigt. Aus den Peakflächen im MS/MS-Spektrum des iTRAQ-markierten Peptids *K*VPQVSTPTLVEVSR und der Datentabelle kann man für das Verhältnis von 117/115 einen Wert von 2,75 ablesen. Dieser experimentell ermittelte Wert ist deutlich niedriger als der theoretisch erwartete Wert von 4,26. Im Gegensatz dazu folgt aus dem MS-Spektrum des DOTA-markierten Peptids und dem extrahierten Ionenchromatogramm ein Verhältnis von 4,87 von $\text{Lu}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$. Dieses Ergebnis liegt deutlich näher an dem theoretischen Wert von 4,26.

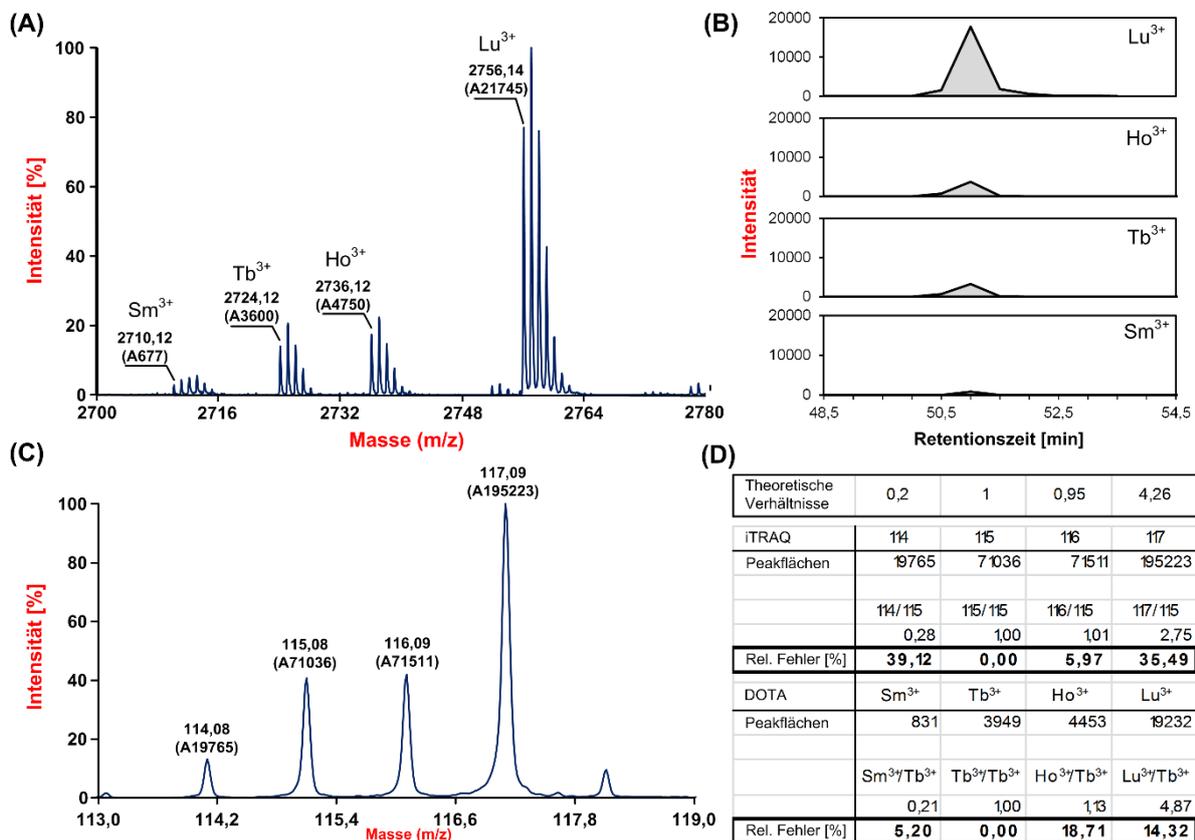


Abb. 4.17: (A) MS-Analyse des mit NHS-DOTA derivatisierten Peptids *K*VPQVSTPTLVEVSR aus Rinderserumalbumin und (B) extrahierte Ionenchromatogramme zur Quantifizierung aus Mascot Distiller. (C) Ausschnitt des Reporterionenbereiches aus dem MS/MS-Spektrum des Peptids *K*VPQVSTPTLVEVSR. (D) Die ermittelten Spektren sowie die relativen Fehler sind zum Vergleich tabellarisch aufgeführt.

Insgesamt zeigt der iTRAQ-Ansatz einen größeren relativen Fehler verglichen mit der Amino-gerichteten DOTA-Quantifizierung (15,8%). Dies ist hauptsächlich durch die ungenaue Quantifizierung des humanen Transferrins bedingt (Tabelle A.5). Obwohl die iTRAQ-Quantifizierung eine höhere Anzahl von Peptididentifizierungen und damit auch mehr quantitative Information ermöglicht, sind die durchschnittlichen Standardabweichungen sowie die Variationskoeffizienten niedriger für die Amino-gerichteten DOTA-Quantifizierung. Die Sulfhydryl-gerichtete-Quantifizierung liefert durch die geringe Anzahl quantifizierbarer Peptide (29) verglichen mit der Amino-gerichteten DOTA- (99) und der iTRAQ-Quantifizierung (190) dagegen insgesamt relativ ungenaue und unzuverlässige Ergebnisse (Tabelle A.5). Für die Quantifizierung von Lysozym wurde hier nur ein einziges Peptid gefunden, das jedoch nicht die Parameter zur positiven Identifizierung der Mascot-Distiller Software erfüllt.

Zusammengefasst, ist die Amino-gerichtete Metall-DOTA-Markierungsstrategie der isobaren *Labeling*-Strategie mit iTRAQ-Reagenzien überlegen hinsichtlich der Genauigkeit, Präzision und Sensitivität der relativen Quantifizierung. Nachteilig ist jedoch die geringere Anzahl an Peptididentifizierungen im Vergleich zur iTRAQ-Probe. In unseren Experimenten zeigte die MS/MS-basierte Quantifizierung mit iTRAQ niedrigere Sensitivität verglichen mit der MS-basierten Quantifizierung mit DOTA.

IV.3 Analyse von Proteaseaktivitäten mittels Massenspektrometrie

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellte die Verwendung der Metallmarkierung zur Quantifizierung proteolytischer Umsetzungen mit Hilfe der MALDI MS dar. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die DOTA-basierte Quantifizierung mit unterschiedlichen Metallionen über einen größeren Konzentrationsbereich unterschiedlicher Peptidverhältnisse untersucht. Die Ergebnisse belegten einen linearen Zusammenhang über mehr als 2 Größenordnungen und eine gute Genauigkeit der Quantifizierung besonders in Bezug auf die Amino-gerichtete Markierung. Um zu testen, ob sich die Methode zur Aufzeichnung proteolytischer Umsetzungen eignet, wurde eine Multiplex-Analyse der tryptischen Spaltung von Neurotensin als Substrat in acht unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. In einem zweiten Experiment wurde die Methode an einem Glu-C Verdau von 20 Proteinen als Substrat durchgeführt. Zum einen zielte dieses Experiment darauf ab zu zeigen, dass die Methode mit dem LC-MALDI Arbeitsablauf kompatibel ist. Zum anderen sollte gezeigt werden, dass auch die Quantifizierung des proteolytischen Substratabbaus und gleichzeitig der Produktbildung in einer komplexen Probe, also einer Multi-Substrat Umgebung, möglich ist.

Wie bereits zuvor beschrieben kann die Verwendung derivatisierter Substrate die proteolytische Reaktion beeinflussen. Bei Lathia *et al.* wurde gezeigt, dass die chymotryptische Umsetzung von Lu-DTPA-markierten Substraten stark verlangsamt oder verhindert ist. Die Lösung dieses Problems war die Verwendung eines künstlichen Substrates, in dem ein poly-Alanin-Spacer Derivatisierungsstelle und Spaltstelle räumlich trennt, sodass die sterische Hinderung umgangen wird (Lathia *et al.* 2010). Da diese Strategie die Verwendbarkeit der Substrate stark einschränkt, sollte in unserem Fall eine Derivatisierungsstrategie etabliert werden, die nach dem Verdau erfolgen kann. Erfolgt die Derivatisierung erst nachträglich kann die eigentlich zu untersuchende Reaktion, die Proteolyse in einer fast nativen Umgebung stattfinden und jedes Protein, Peptid oder jede Proteomprobe kann als Substrat verwendet werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Bestimmung von Proteaseaktivitäten ist das quantitative Abstoppen/Quenching der Enzymreaktion, das im Fall der *Labeling*strategie nach dem Verdau zusätzlich mit der anschließenden Derivatisierung kompatibel sein muss und abhängig vom zu untersuchenden Enzym ist. Mehrere Möglichkeiten um Proteasen zu inhibieren kommen beim Quenching infrage: Hitzeinaktivierung, pH-Erniedrigung oder Proteaseinhibitoren. Da die

Hitzeinaktivierung von Trypsin reversibel ist (Northrop 1932) und das Ansäuern sich nicht mit der nachfolgenden Derivatisierung bei pH 7-8 verträgt, sollten in diesem Ansatz Proteaseinhibitoren eingesetzt werden.

Zwei oft verwendete Serin-Proteaseinhibitoren mit ähnlichem Wirkspektrum stellen PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid) dar (Abbildung 4.18). AEBSF ist zwar in wässrigen Lösungen länger stabil als PMSF (Mintz 1993), enthält jedoch ein freies Amin und könnte daher mit der Aminogruppen-gerichteten DOTA Derivatisierung interferieren.

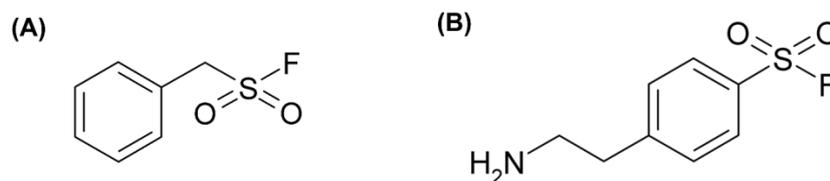


Abb. 4.18: Strukturformeln der Serinproteaseinhibitoren (A) PMSF und (B) AEBSF.

Die Verwendung von EDTA oder anderer Chelatoren sollte die Beladung des DOTA Makrozyklus mit den trivalenten Metallionen nur in geringem Ausmaß beeinflussen, da die Werte der Stabilitätskonstanten dieser Komplexe weitaus größer sind (Byegård *et al.* 1999).

In nachfolgenden Experimenten wurde eine Kombination von PMSF und AEBSF verwendet, wobei AEBSF in geringen (substöchiometrischen) Konzentrationen verwendet wurde, um die Derivatisierung nicht zu beeinflussen (PMSF:AEBSF = 15:1).

In einem Vorexperiment wurde untersucht welcher Überschuss des Proteaseinhibitors notwendig ist, um die Aktivität von Trypsin quantitativ und irreversibel zu stoppen. Um die Abhängigkeit der Restproteolyse vom Verhältnis des Inhibitors zur Protease zu veranschaulichen wurde in Abbildung 4.19 die prozentuale Produktintensität gegen das PMSF-zu-Trypsin-Verhältnis (w/w) zu den drei unterschiedlichen Inkubationszeiten aufgetragen. Aus Abbildung 4.19 ist klar abzulesen, dass bei einem 600fachen Überschuss von Inhibitor zu Enzym (w/w) entsprechend einem 78000fachen molaren Überschuss keine Restproteolyse mehr beobachtet werden konnte. Somit sind die zum quantitativen Abstoppen der Trypsinproteolyse notwendigen Bedingungen bestimmt worden.

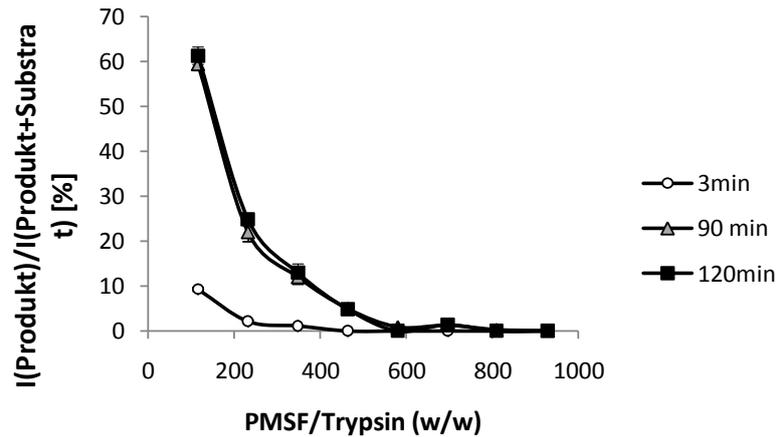


Abb. 4.19: Grafische Darstellung der Restproteolyse bei unterschiedlichen Inhibitor-zu-Protease-Verhältnissen und drei unterschiedlichen Inkubationszeiten.

IV.3.1 Einzelsubstratanalyse

Um zu testen, ob sich die Metall-DOTA-Markierungen an Peptiden dazu eignen, Produkt und Substratkonzentrationen während einer Proteolyse zeitaufgelöst zu quantifizieren wurde Neurotensin als Modellsubstrat und Trypsin als Modellprotease gewählt. Neurotensin besitzt in seiner Sequenz eine tryptische Schnittstelle, sowie zwei durch Prolin maskierte Stellen, an denen keine Spaltung erwartet wird, so dass die in Abbildung 4.20 dargestellten Produkte entstehen sollen. Der Arbeitsablauf ist in zwei Abschnitte unterteilt: (i) die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Proteolyse (Abbildung 4.20 A) und (ii) die Herstellung der internen Standards zur Bestimmung der Substrat- oder Produktkonzentration (Abbildung 4.20 B). Für den zeitlichen Verlauf wurde eine Neurotensin Stocklösung in acht verschiedenen Substratkonzentrationen verdünnt und einem tryptischen Verdau unterzogen. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden 20 μ l Aliquots der Reaktionsmischung in Enzyminhibitor-Lösung abgestoppt und die Probe anschließend mit NHS-DOTA derivatisiert und dann mit Metallionen beladen. Jede Probe die derselben Ausgangssubstratkonzentration entstammt wurde mit identischen Metallionen markiert um Produkt und Substratmenge zu einem bestimmten Zeitpunkt vergleichen zu können. Die unterschiedlich markierten Proben eines Zeitpunktes wurden schließlich vereinigt, mit ISS (interner Standard Substrat) und ISP (interner Standard Produkt) versetzt, gespottet und mit MALDI-TOF MS analysiert. Die Herstellung des ISS erfolgte durch Inkubation von Neurotensin lediglich mit dem Verdauopuffer ohne jegliche Enzymzugabe mit anschließender Derivatisierung und Lutetium-

Komplexierung, wohingegen die Herstellung der ISP durch kompletten Verdau von Neurotensin und Ytterbium-Markierung der derivatisierten Spaltprodukte erfolgte (Abbildung 4.20 B).

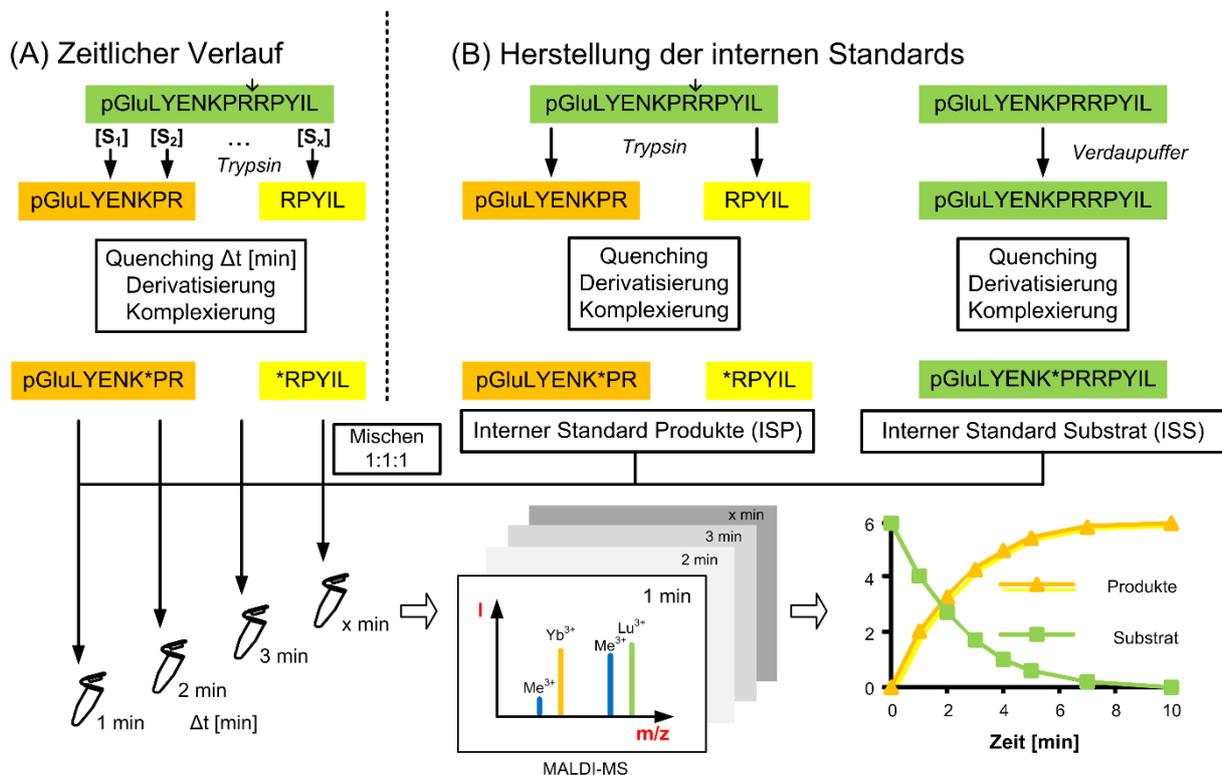


Abb. 4.20: Schematischer Arbeitsablauf der Einzel-Substrat-Analyse. (A) Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Proteolyse wurden unterschiedliche Neurotensin-Konzentrationen mit gleichen Mengen an Trypsin inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Aliquots der Verdau entnommen und in Stopplösung überführt. Nach der Derivatisierung mit NHS-DOTA und Komplexierung von Lanthanoidionen wurde jedes Aliquot, das einen bestimmten Zeitpunkt und eine bestimmte Substratkonzentration darstellt mit identischen Mengen an internem Produkt und Substrat Standard gemischt. (B) Zur Generierung des internen Produktstandards (ISP) wurde Neurotensin (ausgehend von der höchsten Konzentration) komplett mit Trypsin verdaut, die Probe anschließend derivatisiert und mit Ytterbiumionen beladen. Zur Herstellung des Substrat-Standards wurde Neurotensin mit Puffer inkubiert, derivatisiert und mit Lutetium beladen. Alle Proben wurden schließlich mit MALDI-TOF MS analysiert. Die * markieren die Derivatisierungsstellen; $[S_x]$ = Substratkonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt; $[P]$ Produktkonzentration.

In Tabelle 4.11 sind alle theoretisch vorkommenden m/z -Werte von verdautem und unverdautem Neurotensin aufgelistet. Die Intensitäten/Peakflächen aller Werte wurden zur Errechnung der Substrat bzw. Produktmengen geplottet.

Tab. 4.11: Theoretische m/z-Werte von Neurotensin und seinen tryptischen Spaltprodukten nach NHS-DOTA Derivatisierung und Beladung mit einem der unten aufgeführten Metallionen. Lutetium markierte Spaltprodukte sowie (Signale bei einem m/z von 1588,58 und 1219,50) sowie Ytterbium markiertes Substrat (2228,01) werden nicht erwartet und sind kursiv aufgeführt.

	Isotop	Neurotensin pGluLYENK*PRRPYIL	N-terminales Produkt pGluLYENK*PR	C-terminales Produkt *RPYIL
Lanthanum	¹³⁹ La	2194,98	1552,57	1183,49
Praesodym	¹⁴¹ Pr	2196,98	1554,57	1185,49
Samarium	¹⁵² Sm	2208,00	1565,57	1196,49
Gadolinium	¹⁵⁶ Gd	2212,00	1569,57	1200,49
Terbium	¹⁵⁹ Tb	2215,00	1572,57	1203,49
Dysprosium	¹⁶² Dy	2218,00	1575,58	1206,49
Holmium	¹⁶⁵ Ho	2221,00	1578,58	1209,49
Thulium	¹⁶⁹ Tm	2225,01	1582,58	1213,50
Ytterbium	¹⁷² Yb	2228,01	1585,58	1216,50
Lutetium	¹⁷⁵ Lu	2231,02	1588,58	1219,50

Der Lutetium-markierte interne Standard zeigt wie erwartet ein intensives Signal bei 2231,02 m/z (monoisotopisch) in den MS-Spektren aller Zeitpunkte. Dies ist exemplarisch für den Verdau von einer Minute in Abbildung 4.21 (A) dargestellt. Das Signal bei 1585,62 stellt das N-terminale Neurotensin-Spaltprodukt pGlu-LYENK*PR dar, das am Lysin mit Ytterbium-DOTA markiert ist, sowie das bei 1216,50 m/z entsprechend dem Ytterbium markierten C-terminalen Fragment *RPYIL, das am Amino-Terminus markiert ist. Die beiden Signale sind als ISP in allen MS-Spektren zu verzeichnen. Zusätzlich sind in Detailansicht (B) die differentiell markierten Substrate, die nach einer Minute Verdau noch ungespalten vorliegen, dargestellt. In den Detailansichten (C) und (D) sind dagegen die ausgehend von den unterschiedlichen Substratkonzentrationen bereits entstanden Produkte abgebildet.

Um zu untersuchen ob die Trypsinaktivität in den Stopplösungen komplett inhibiert wurde, wurden alle Spektren nach Lutetium markierten Produkten untersucht, bzw. die Intensitäten bei 1588,58 m/z und 1219,50 m/z geplottet. Zusätzlich wurden alle Spektren nach Ytterbium-markiertem Substrat bei einem m/z von 2228,01 untersucht, das auf einen unvollständigen Verdau des ISP hinweisen würde. Wie auch in den Detailansichten von Abbildung 4.21 (B), (C) und (D) ersichtlich, konnten jedoch in keinem der Spektren Signale für Lutetium-markierte Produkte oder Ytterbium markierte Substrate beobachtet werden und auch in Einzelspektren der ISP und ISS wurden diese Signale nicht detektiert.

In fast allen Spektren konnten jedoch unmarkierte Peptide detektiert werden (zum Beispiel Abbildung 4.21 (A); 1672,92 m/z). Dies deutet darauf hin, dass die Derivatisierungsreaktion nicht quantitativ erfolgt ist. Die unvollständige Derivatisierung wird in Kapitel V 3.1 diskutiert.

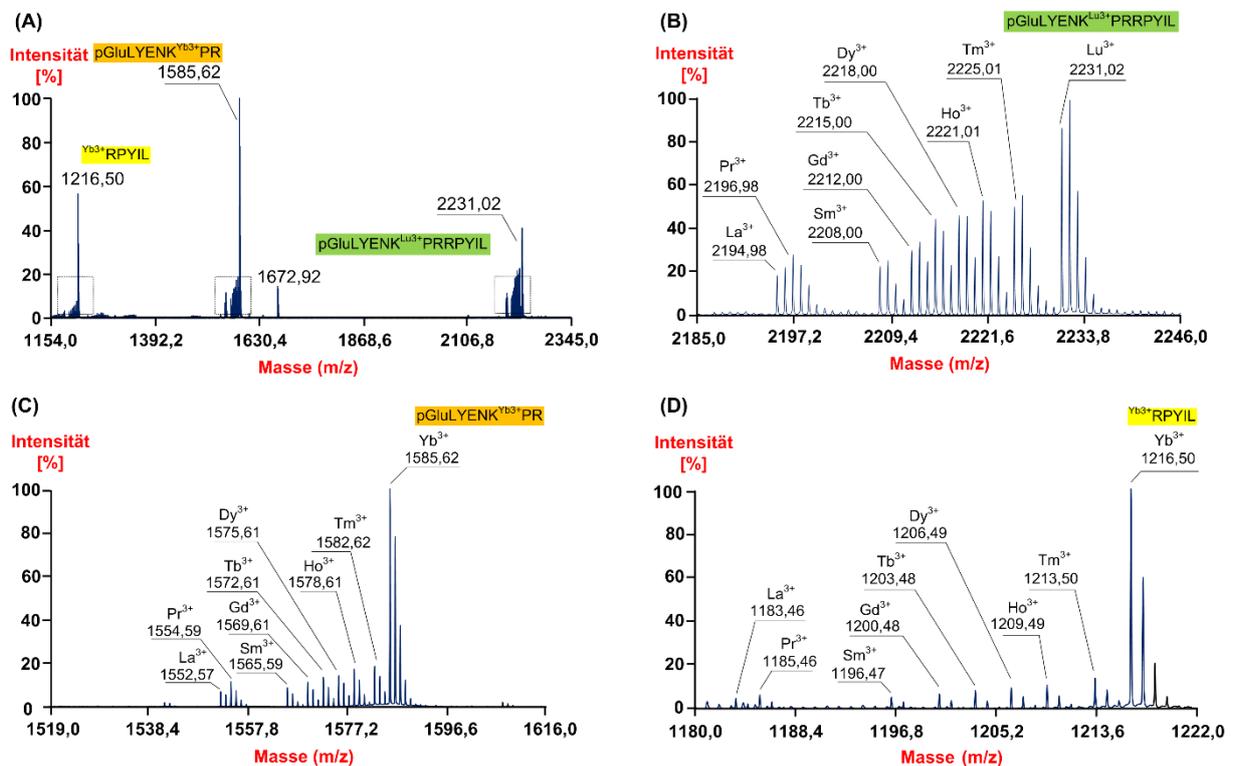


Abb. 4.21: (A) MALDI MS Spektrum von Neurotensin nach 1 Minute Verdau. Das Signal bei 2231,02 m/z stellt den Lutetium-markierten internen Substrat-Standard dar, das Signal bei 1672,92 entspricht unmarkiertem Neurotensin. (B) Detailansicht der nach einer Minute verbleibenden, unterschiedlich markierten Substratmengen ausgehend von 8 verschiedenen Substratkonzentrationen. (C) Das nach einer Minute entstandene N-terminale und am Lysin markierte Produkt pGluLYENK*PR bei einem Signal von 1216,50. (D) Das C-terminale am N-Terminus markierte Produkt *RPYIL mit einem Signal von 1585,62 für den Ytterbium-markierten, internen Standard.

In Abbildung 4.22 (A) ist der Substratabbau und die Produktbildung von einer Neurotensin-Ausgangskonzentration von 15 μ M über einen Zeitraum von 60 min gezeigt. Die Konzentrationen der Produkte bzw. Substrate werden aus den Verhältnissen der Thulium-markierten Peptid-Peakflächen zu denen der internen Standards berechnet. Wie erwartet (siehe Abbildung 4.22) entwickeln sich die Konzentrationen der beiden Produkte über die Zeit

in etwa gleich. Es wurden jedoch auch Abweichungen von bis zu 13% zwischen beiden Produkten beobachtet.

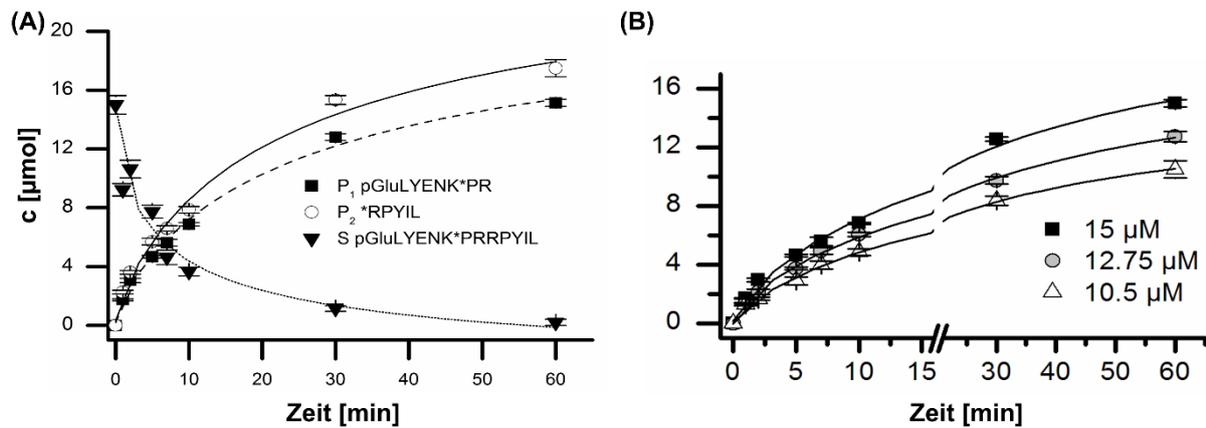


Abb. 4.22: (A) Zeitabhängige Bildung der Tm^{3+} -DOTA-markierten Produkte pGlu-LYENK*PR und *RPYIL ausgehend von einer Substratkonzentration von 15 μM . Der Abbau des Substrates, berechnet aus den $\text{Tm}^{3+}/\text{Lu}^{3+}$ -Verhältnissen ist ebenfalls dargestellt. (B) Zeitlicher Verlauf der Bildung des N-terminalen Spaltprodukts ausgehend von drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen: 15 μM Tm^{3+} -markiert; 12,75 μM Tb^{3+} -markiert; 10,5 μM Pr^{3+} -markiert.

Da die errechnete Produktkonzentration nach 60 min 15 μM beträgt, bzw. das Tm/Yb -Verhältnis 1 beträgt, kann man davon ausgehen, dass die Reaktion in diesem Zeitraum vollständig abgelaufen ist. Dies setzt voraus, dass bei der Herstellung des internen Produktstandards die Reaktion komplett abgelaufen ist.

Eine Alternative zur Anwendung des Metall-Labeling als Multiplexing-Strategie zur Bestimmung von Proteaseaktivitäten über eine bestimmte Zeitspanne ausgehend von **einer** einzelnen Substratkonzentration, wie zuvor beschrieben, ist die parallele Bestimmung von Produkt-/Substratkonzentration während der proteolytischen Reaktion ausgehend von **unterschiedlichen** Substratkonzentrationen. Die entsprechende Produktbildung ausgehend von 3 unterschiedlichen Substratkonzentrationen ist in Abbildung 4.22 (B) gezeigt.

Die zusätzliche Identifizierung und Charakterisierung der gebildete Produkte ist ein wichtiger Vorteil der MS-basierten Enzymassays, v. a. da in enzymatischen Reaktionen unerwünschte Nebenprodukte aufgrund suboptimaler Reaktionsbedingungen oder Kontaminationen in den Substrat oder Enzymlösungen auftreten können. Zur Verdeutlichung ist deshalb in Abbildung 4.23 das MS/MS-Spektrum des N-terminalen Yb^{3+} -markierten Neurotensin Spaltprodukts pGluLYENK*PR dargestellt, womit dessen Sequenz und damit auch die erwartete Spaltstelle bestätigt werden konnten.

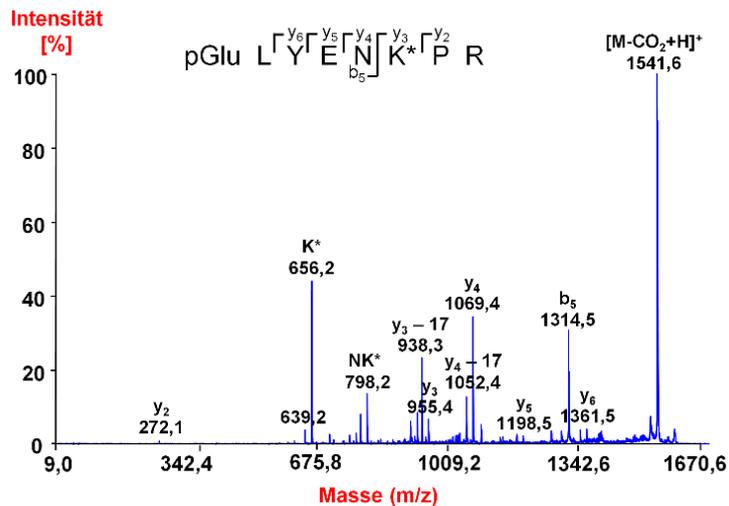


Abb. 4.23: MS/MS-Spektrum des Yb³⁺-DOTA markierten Spaltprodukt pGluLYENK*PR. Das K* markierte Fragment stellt das Immonium-Ion des Ytterbium-DOTA markierten Lysin dar.

IV.3.2 Multisubstratanalyse

Um die Verwendbarkeit der Methode in einer Probe die eine Vielzahl möglicher Substrate enthält (=“Multi-Substrat-Umgebung“) zu testen, wurde ein Glu-C Verdau einer Mischung von 20 Proteinen angefertigt. Die so erzeugte „Peptidbibliothek“ dient als Pool von Substraten für die unmittelbar anschließende Analyse des zeitlichen Verlaufs einer von Trypsin katalysierten Proteolyse.

Der angewendete Arbeitsablauf ist bis auf zwei Ausnahmen identisch mit dem der Einzelsubstratanalyse: (i) es wurden nur zwei Ausgangssubstratkonzentrationen verwendet, dafür wurden zusätzlich zwei technische Replikate des Verdaus erzeugt, die im Nachfolgenden mit unterschiedlichen Metallen markiert wurden; (ii) alle vereinigten Proben wurden vor der Messung chromatographisch getrennt. Der komplette Workflow ist in Abbildung 4.24 dargestellt. Diese Experimente zielten darauf ab, zu untersuchen ob der gesamte Arbeitsablauf kompatibel mit der LC-Trennung ist und sich am Ende bei den Produkten der tryptischen Spaltung ein graduelles Ansteigen der Konzentration erkennen lässt, während die Peptide mit tryptischen Spaltstellen wie erwartet in ihrer Konzentration über die Zeit abnehmen. 51 „Substrate“ und 70 „Produkte“ die in Tabelle A.7 und A.8 aufgelistet sind, konnten auf diese Weise in mindestens 2 LC-Läufen (entsprechen 2 Zeitpunkten/ Verdauintervalle) identifiziert und quantifiziert werden, was zur Bestimmung eines zeitabhängigen Verhaltens eine wichtige Voraussetzung darstellt.

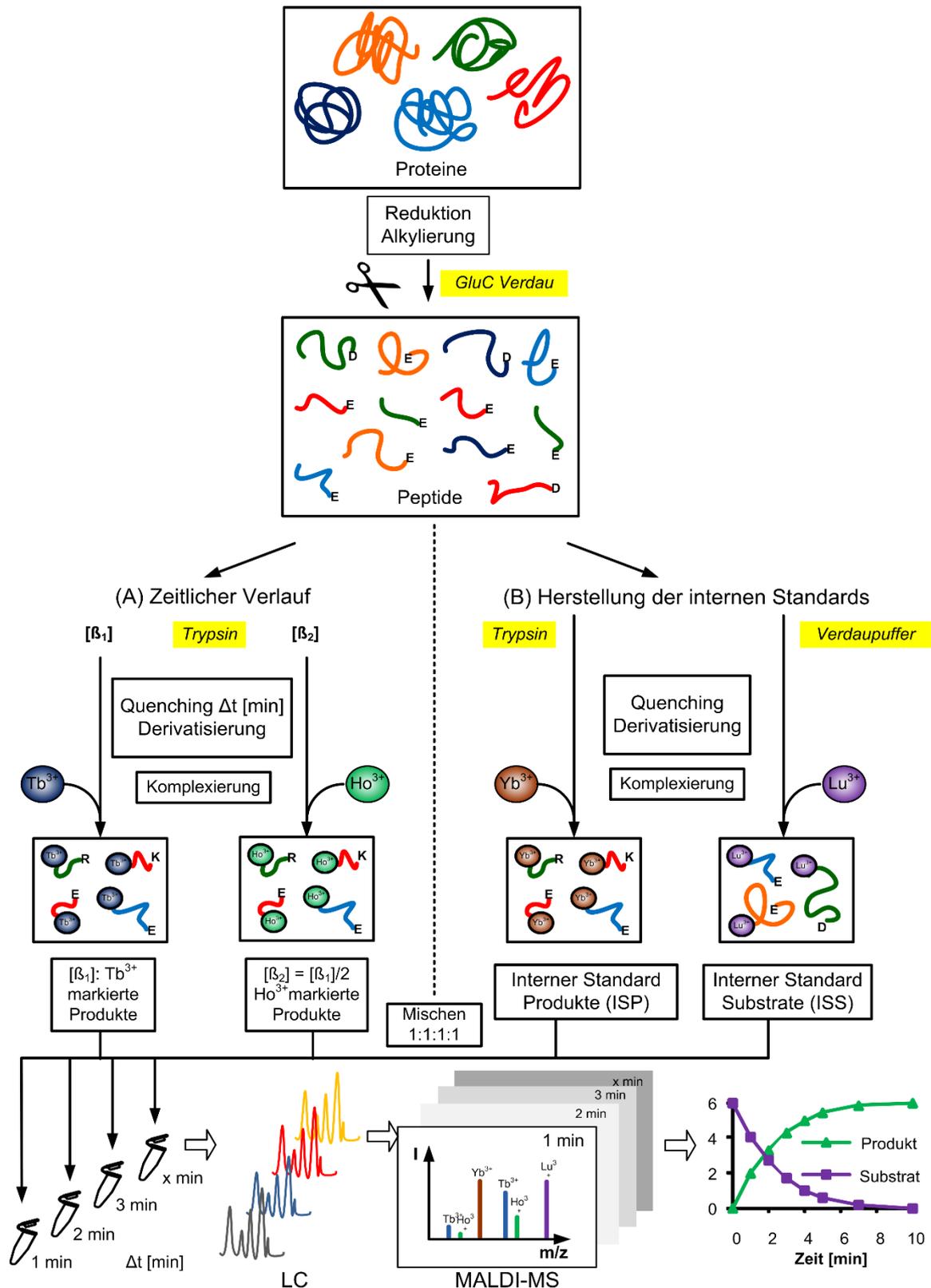


Abb. 4.24: Ablauf des Multisubstrat-Assays. Für die Herstellung der Substrate (der „Peptid-Bibliothek“) wurde eine Mischung von 20 Proteinen reduziert, mit MMTS alkyliert und mit der Protease Glu-C verdaut. Die Entfernung verbleibender, intakter Proteine mit Cut-off Filtern, die nach dem Verdau mit GluC erfolgte, ist nicht gezeigt. (A) Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs werden

die so erzeugten Peptide zu zwei Ausgangs-Substratkonzentrationen verdünnt. Beide wurden geteilt und zur Erzeugung eines technischen Replikates parallel verdaut. (B) Die Herstellung der internen Standards erfolgt wie bereits für die Einzelsubstratanalyse beschrieben, indem die Produkte mit Ytterbium und die Substrate mit Lutetium markiert wurden. Nach bestimmten zeitlichen Intervallen wurden Aliquots entnommen, in Stopplösung gegeben, mit NHS-DOTA derivatisiert und mit Metallionen beladen. Die Proben eines bestimmten Verdau-Zeitpunktes wurden in gleichen Volumina gemischt und mit ISP und ISS versetzt. Jede dieser Proben, die einen bestimmten Zeitpunkt repräsentiert wurde chromatographisch getrennt und mittels MALDI MS und MS/MS analysiert.

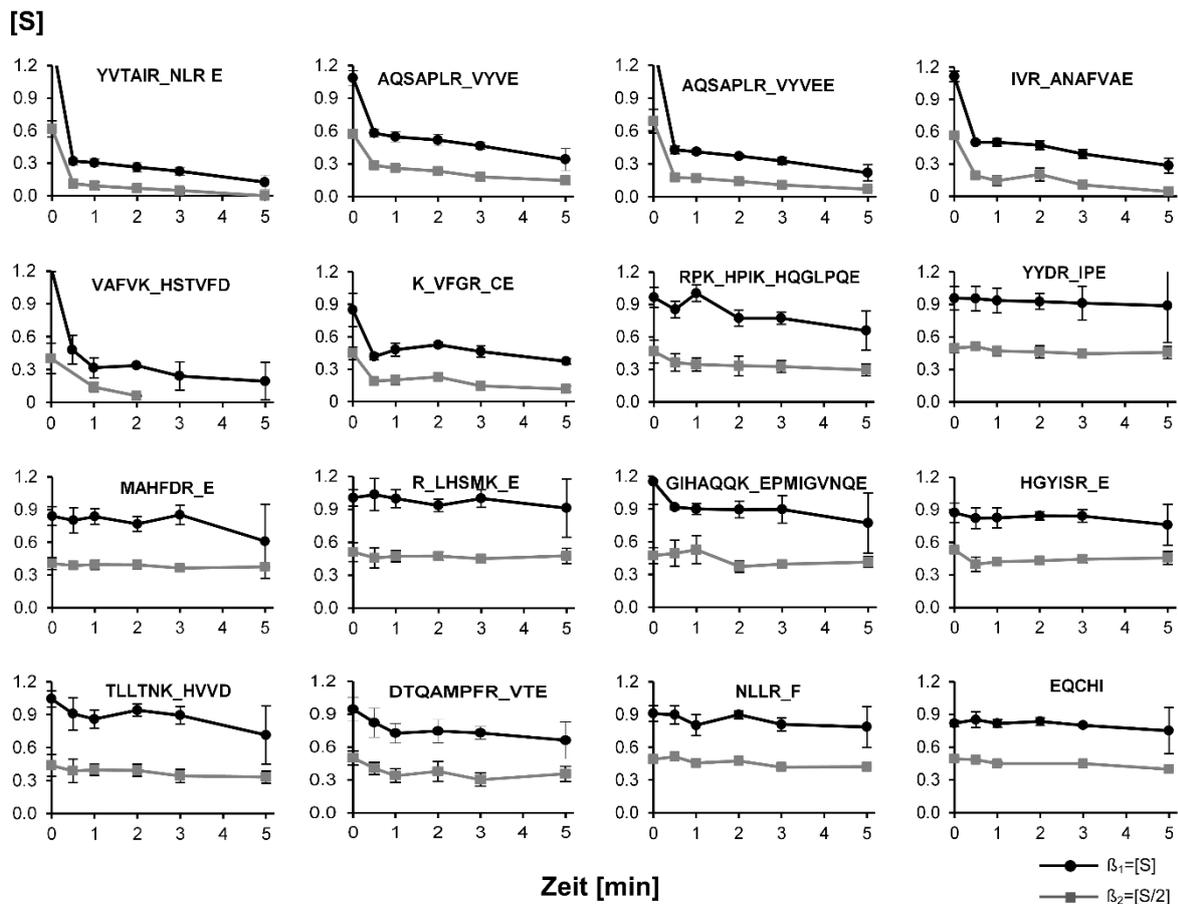


Abb. 4.25: Zeitabhängige Signalintensitäten der Peptide mit interner tryptischer Spaltstelle („echte Substrate“). Die y-Achsen zeigen das $\text{Ln}^{3+}/\text{Lu}^{3+}$ -Verhältnis ($\text{Ln}^{3+} = \text{Terbium, Dysprosium, Holmium und Thulium}$). Die Daten repräsentieren die Durchschnittswerte von 4 verschiedenen Metallen, einschließlich der technischen Replikate und des inversen *Labeling* mit seinen biologischen Replikaten. Die Unterstriche in den Peptidsequenzen zeigen die potentiellen tryptischen Spaltstellen. Das Peptid EQCHI ist als einziges Beispiel für ein nicht spaltbares Peptid aufgeführt.

In Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26 ist die zeitabhängige Bildung von 20 Produkten und der Abbau von 15 Substraten aufgeführt. Während bspw. Das Peptid AQSAPLRVYVE nach 30 s bereits in klar erkennbarem Maß abgebaut wurde, erfolgt die Spaltung des Substrat

LLFRDD sehr langsam. Dementsprechend erfolgt die Bildung des Produkts TGPLNHGLFGR, das aus zwei tryptischen Spaltungen eines Cytochrom c Peptids entstehen muss, wesentlich langsamer, als die Bildung des Peptids ACTFR, welches das Amino-terminale Produkt aus der Spaltung der R-R-Bindung des Substrats ACTFRRP darstellt.

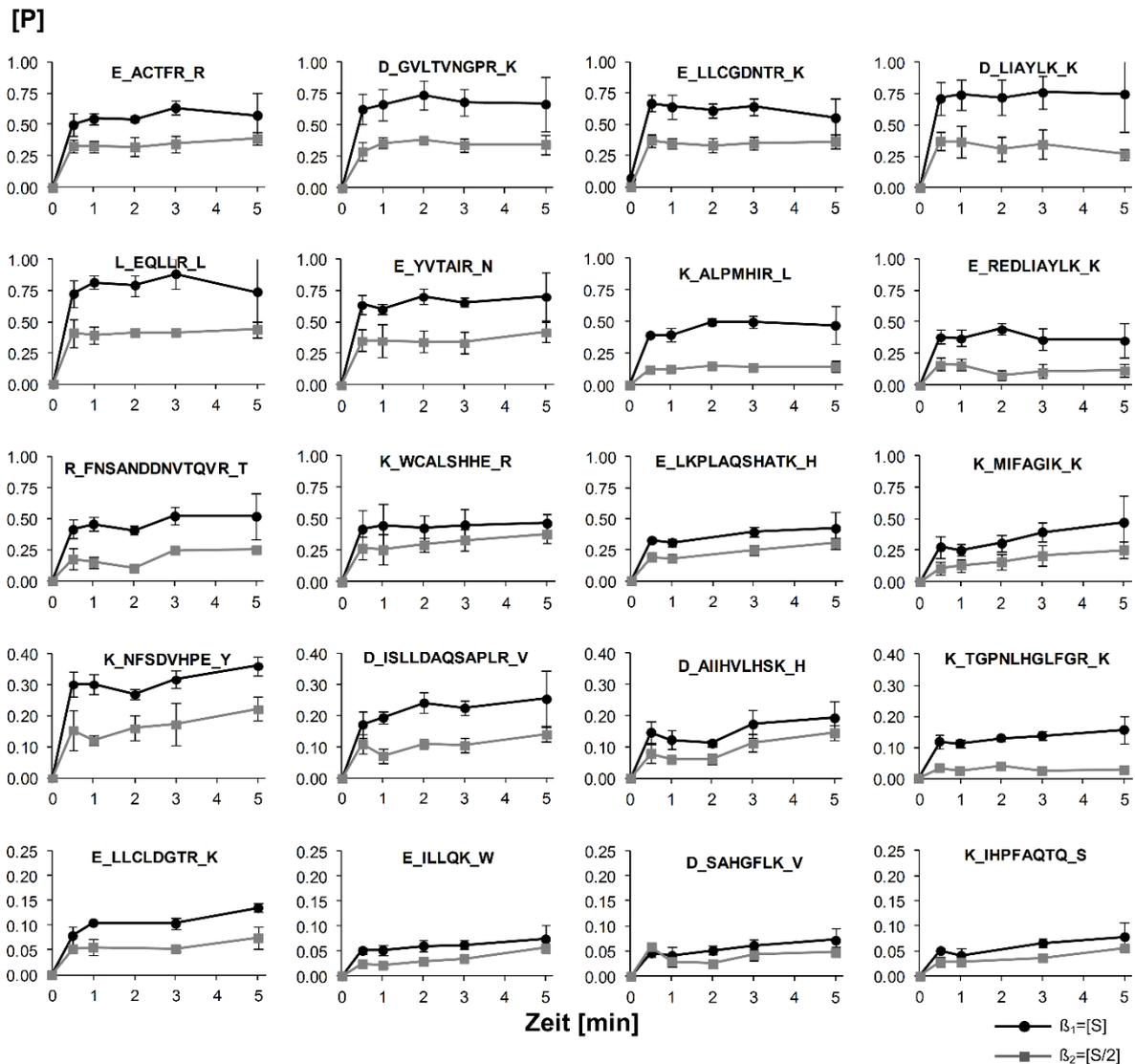


Abb. 4.26: Zeitabhängige relative Signalintensitäten der Peptide mit mindestens einer Spaltstelle („Produkte“). Die y-Achsen zeigen die $\text{Ln}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ -Verhältnisse (Ln^{3+} = Terbium, Dysprosium, Holmium und Thulium). Die Daten sind Mittelwerte von vier unterschiedlichen Metallen, die die technischen Replikate sowie das inverse *Labeling* mit technischen Replikaten beinhaltet. Die Unterstriche an beiden Peptidenden markieren die benachbarten Aminosäuren, um die N- und C-terminalen Schnittstellen zu demonstrieren.

In den MS-Spektren können die Substrate einfach dadurch zugeordnet werden, dass sie ein Lutetium-Signal aufweisen, während ein Ytterbium-Signal fehlt. Dagegen besitzen die

Produkte ein Ytterbium-Signal, während ihnen ein Lutetium-Signal fehlt. Somit ist bereits in den MS-Spektren anhand der Signalaare zu erkennen, ob es sich um ein Produkt oder um ein Substrat handelt. Die Zuordnung der Produkte und Substrate anhand der Massenabstände zwischen den Metallen wird zusätzlich in Kapitel V.3.2 diskutiert.

Abbildung 4.27 zeigt als Beispiel für den zeitlichen Verlauf die Bildung des Produkts *ALPMHIR ausgehend von zwei unterschiedlichen Ausgangssubstratkonzentrationen. Dieses Peptid repräsentiert das N-terminale Spaltprodukt des Glu-C-Verdau des β -Lactoglobulin Peptids ALPMHIRLSFNPTQLE. Wie erwartet beträgt die Produktkonzentration ausgehend von der Substratkonzentration $[S/2]$ am Ende der Reaktion nur die Hälfte des Wertes von $[P]$.

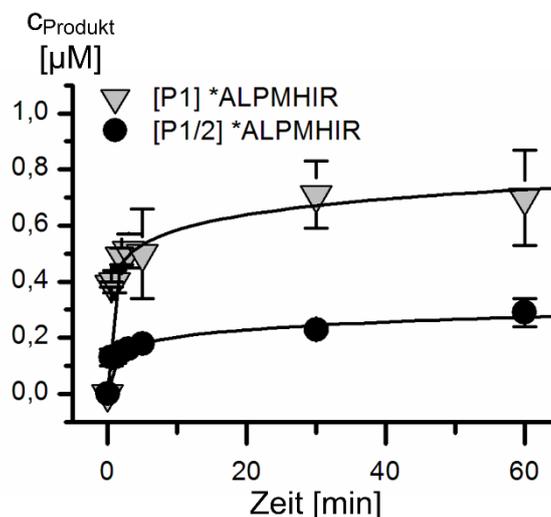


Abb. 4.27: Zeitabhängige Bildung des N-terminalen Spaltproduktes aus dem β -Lactoglobulin Peptid ALPMHIRLSFNPTQLE, ausgehend von 2 unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

Dies bestätigt wiederum, dass mit unserer Methode innerhalb eines Multisubstrat-Assay zwei unterschiedliche proteolytische Reaktionen oder zwei Reaktionen unter verschiedenen Bedingungen aufgezeigt und auch unterschieden werden können.

V. Diskussion

V.1 Qualitative Analyse

In Kapitel IV.1 der qualitativen Analyse wurde der Einfluss der DOTA-Markierung sowie der zusätzlichen Beladung mit dreiwertigen Metallionen anhand synthetischer Peptide untersucht. Auch aus Verdauen stammende Peptide wurden vor und nach dem *Labeling* hinsichtlich ihrer Ionisierbarkeit bzw. ihren Signalintensitäten untersucht. Bei allen Peptiden wurden die zu erwartenden Massenabstände nach der Derivatisierung mit DOTA-NHS-Ester oder Maleinimido-DOTA erreicht.

Die zusätzlich identifizierten Addukte mit Massenabständen von +21,98 und +38,09 wurden als Natrium- und Kalium-Addukte der jeweiligen analysierten freien, derivatisierten oder Metall-DOTA markierten Peptidspezies identifiziert. Natrium und Kalium bilden als ubiquitäre Kontaminationen Cluster mit Matrix-Molekülen und führen dadurch zu verminderter Sensitivität in der MALDI MS-Messung, besonders im Massenbereich von 650-1300 Da (Smirnov *et al.* 2004). Durch Waschen mit deionisiertem Wasser (Keller & Li 2000) oder Ammoniumcitrat (Smirnov *et al.* 2004) kann der Anteil der unerwünschten Nebenprodukte vermindert werden. Vor allem Peptide mit sauren Aminosäuren bilden auch nicht-kovalente Komplexe mit Alkaliionen (Cerdea *et al.* 1999). Aus den Ergebnissen der markierten Verdauung ist jedoch ersichtlich, dass bei komplexeren Proben das Auftreten von Natrium und Kalium-Addukten letztendlich oft vernachlässigt werden kann.

Neben den Natrium- und Kalium-Addukten wurden noch Degradationsprodukte mit Abständen von 43,99 und 58,01 Da zu den DPs detektiert, entsprechend einem Verlust von CO₂ oder einer Acetylgruppe. Nach Beladung mit einem der Metallionen ist das Auftreten der CO₂-Degradationsprodukte deutlich vermindert, während Acetylverluste nicht mehr beobachtet werden. Es ist also davon auszugehen, dass das DOTA-Molekül selbst nicht so stabil in der Gasphase vorliegt, wie nach Koordination mit einem trivalenten Metallion.

Die Detektion der +18 Da-Addukte in den Spektren von Oxytocin und Peptid HCKFWW ist höchstwahrscheinlich auf die Probenvorbereitung zurückzuführen. Experimente mit schwerem Wasser, sowie Fragmentspektren der hydrolysierten Peptide zeigen, dass sich die zusätzliche Masse von +18 Da am Derivatisierungstag (DOTA-Makrozyklus+Linker) selbst befinden muss. Da die +18-Produkte nach Derivatisierung mit NHS-DOTA nicht detektiert werden konnten, ist anzunehmen dass die zusätzliche Masse nicht am Makrozyklus sondern

am Linker sitzt. Es wird somit vermutet, dass eine (alkalische) Hydrolyse am Fünfring stattgefunden hat. Es konnte auch gezeigt werden, dass Produkte aus der Reaktion von Maleinimiden und Cysteinen leichter hydrolysiert werden als die underivatisierten Maleinimide (Knight 1979). Die Hydrolyse des Maleinimids ist bei neutralem pH-Wert zu vernachlässigen (Gregory 1955) und nimmt mit steigenden OH⁻-Konzentrationen und Temperaturen zu (Khan 1984), sodass durch die Vermeidung von pH-Werten über 7 und hohen Temperaturen die Bildung hydrolysierter Maleinimide weitestgehend umgangen werden sollte.

In den Spektren der Metall-beladenen und derivatisierten Peptide lässt die Abwesenheit von Signalen die dem derivatisierten Peptid zuzuordnen sind schließen, dass zum einen die Komplexierungsreaktion quantitativ abgelaufen ist. Zum anderen weist sie darauf hin, dass die Metallionen während des Ionisierungsprozess bzw. der gesamten massenspektrometrischen Analyse stabil im DOTA-Ringsystem gebunden bleiben. Auch bei höheren Laserenergien konnten keine Signale der DPs beobachtet werden. Zudem wirkt sich die Komplexierung insgesamt eher stabilisierend auf den DOTA-Peptid-Komplex aus. Denn wie bereits beschrieben, sind in den Spektren der komplexierten Peptide anteilig weniger CO₂-Degradationsprodukte zu verzeichnen. Verluste von Acetylgruppen konnten dementsprechend überhaupt nicht mehr detektiert werden.

Da bspw. in den Spektren von S31-33, S36 und S28-30, S35 nach Derivatisierung keine Signale der freien Peptide beobachtet werden konnten, weisen diese Experimente ebenfalls darauf hin, dass die DOTA-Peptid-Bindung während der MALDI Probenpräparation und Messung stabil bleibt. Lediglich die Peptide mit mehr als einer Derivatisierungsstelle (S34 und T2) weisen in ihren Spektren Signale auf, die nur der einfach derivatisierten Form entsprechen. Diese Signale sind höchstwahrscheinlich durch unvollständige Derivatisierung bedingt, welche möglicherweise durch sterische Hinderung oder suboptimale Derivatisierungsbedingungen verursacht wurde. Ein Verlust der Markierung während der MALDI MS Probenvorbereitung oder Messung ist eher unwahrscheinlich, weil es in der Mehrzahl der MS-Spektren von vollständig und mehrfach markierten Peptiden keinen Hinweis auf den Verlust der Markierung gibt.

Hinsichtlich der Derivatisierung sollte erwähnt werden, dass die Optimierung der Derivatisierungsbedingungen nicht im Fokus dieser Arbeit stand. Eigene Vorversuche ergaben keine wesentlichen Unterschiede in der Derivatisierungseffizienz unter Verwendung

von HEPES-Puffer (pH 7,5) oder 100 mM/ 200 mM TEAB pH 8,0, pH 8,5) (Daten nicht gezeigt). Die im Derivatisierungsreagenz enthaltenen Mengen an Säure (Hexafluorphosphorsäure, Trifluoressigsäure; in teilweise schwankenden Konzentrationen) führten zu Komplikationen im Einstellen des pH-Wertes, der häufig in den Ansätzen nachträglich mit Basen korrigiert werden musste. Aufgrund des pK_s Wertes der ϵ -Aminogruppe von Lysin bei 10,28 empfiehlt es sich jedoch die Derivatisierung bei höheren pH-Werten vorzunehmen. Bei Bergmann *et al.* wurde ein pH-Wert von 8,5 verwendet der in 100 mM TEAB mit Triethylamin eingestellt wurde (Bergmann *et al.* 2012). Auch in der Arbeit von Wang *et al.* wird ein pH-Wert von 8,5 zur vollständigen Derivatisierung als ausreichend betrachtet (X. Wang *et al.* 2012). Kerr und McLean verwenden zur Derivatisierung einen pH von 11 (Kerr & McLean 2010) bzw. Boratpuffer bei pH 10 (Kerr *et al.* 2011).

Die Probleme bei der Derivatisierung von Peptiden mit mehr als einer Derivatisierungsstelle können jedoch auch damit im Zusammenhang stehen, dass es sich bei beiden DOTA-Molekülen um sterisch anspruchsvolle Derivatisierungsreagenzien handelt.

Bedingt durch die hohe Affinität des DOTA-Systems für trivalente Metallionen, sowie die nachgewiesene Stabilität der Metallion-Komplexe während der Ionisation konnte eine qualitative Analyse der Metallion-DOTA-Komplexe mittels MALDI MS erfolgen.

V.1.1 Signal-zu-Rausch-Verhältnisse

Der Vergleich der S/N-Verhältnisse der synthetischen freien Cystein-Peptide mit den Peptiden nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA lieferte leicht höhere S/N-Werte für die DPs. Nach Derivatisierung der synthetischen Lysin-Peptide mit NHS-DOTA ergaben sich sogar deutlich höhere S/N-Verhältnisse im Vergleich zu den FPs. Diese Signalverstärkung wird noch deutlicher, wenn die DOTA-Gruppen an den derivatisierten Peptiden zusätzlich mit Lanthanoidionen besetzt sind. Die Unterschiede in den S/N-Verhältnissen der differentiell markierten Peptide S32 und S29 (d.h. mit unterschiedlichen Metallionen beladen) sind nicht auf unterschiedliches Ionisationsverhalten der Metalle zurück zu führen, sondern wahrscheinlich auf Pipettier- und Messfehler.

Für die verstärkten S/N-Verhältnisse der derivatisierten und besonders der zusätzlich mit Metallionen-beladenen DOTA-Peptide können zwei Faktoren verantwortlich sein. Zum einen kann die deutliche Massenzunahme nach DOTA-Derivatisierung der Amino-Gruppen um 386,18 Da bzw. der Cysteine um 526,24 Da dazu führen, dass die zu analysierenden Peptide

eine für die MALDI MS-Analyse günstigere Masse erhalten. Dies sollte insbesondere für die Peptide kleiner als 800 Da der Fall sein. Für kleine Moleküle sind zum einen die hier gegebenen Bedingungen nicht optimal, da sie zur optimalen Ionisation kleinere Matrix:Analyt-Verhältnisse benötigen (Kang *et al.* 2000). Zum anderen sind die verwendeten instrumentellen Parameter bspw. hinsichtlich der *Delayzeit* auf einen Massenbereich von 800-4000 m/z optimiert. Aufgrund von Matrixclustern und ihren Alkalimetall-Addukten werden Signale niedrig abundanter Peptide im Bereich von >500 Da und <2000 Da (Keller & Li 2000) bzw. zwischen 650-1300 Da (Smirnov *et al.* 2004) supprimiert und damit die MALDI-TOF-Peptidfingerprint-Analyse und Proteinzuzuordnung erschwert.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die angehängte DOTA-Gruppe die Ionisierungseigenschaften des Peptids verbessert. Die Einführung Signal-verstärkender Gruppen in der (MALDI) MS wie bspw. durch Guanidierung der Lysine zu Homoargininen (Brancia *et al.* 2000) oder die Einführung quaternärer Ammoniumgruppen durch Trimethylierung der Amine (Stewart *et al.* 2002) bewirken eine höhere Gasphasenbasizität. Auch für die Einführung aromatischer Strukturen wie bspw. Picolin konnte eine verbesserte Ionisation nachgewiesen werden (Kim *et al.* 2008).

Betrachtet man die S/N-Verhältnisse nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA, so kann man davon ausgehen, dass hier nicht allein die Massenzunahme eine entscheidende Rolle für den beobachteten Effekt spielt. Nach Derivatisierung erhalten die Peptide hier bereits eine zusätzliche Masse von mindestens 500 Da, für S34 mit zwei derivatisierten Cysteinen, sogar über 1000. Dennoch ist hier nur ein leichter, Ionisierungs-steigender Effekt zu beobachten. Nach Beladung der DOTA-derivatisierten Peptide mit einem der vier Lanthanoide ist ein signalverstärkender Einfluss um das 6-10fache im Vergleich zu den lediglich derivatisierten Peptiden zu verzeichnen, obwohl die Peptide hier nur eine zusätzliche Masse von 159-175 bzw. das Doppelte für S34 erhalten.

Zusätzlich zur Analyse der einzelnen, synthetischen Peptide wurden auch die S/N-Verhältnisse von underivatisierten Rinderserumalbumin-Verdauen mit Tm^{3+} -DOTA-markierten Verdauen in geringen Konzentrationen verglichen (250 amol). Innerhalb der MS-Analyse eines Verdaus unterliegen die Cystein-haltigen Peptide nicht nur supprimierenden Matrixeffekten, sondern auch der Suppression durch die Nicht-Cystein-haltigen Peptide. Auch hier ergab sich eine wesentlich bessere Detektierbarkeit der Cystein-haltigen Peptide nach Derivatisierung, hauptsächlich Cystein-Peptide im Massenbereich von 800-1400 Da

betreffend. Als mögliche Ursache kommt auch hier infrage, dass die derivatisierten Peptide durch den Massenzuwachs in einen günstigeren Messbereich geraten oder dass sich durch die Modifikation die Ionisierungs-Eigenschaften verbessern. Die größeren Cystein-Peptide sind in beiden Ansätzen mit vergleichbaren S/N-Verhältnissen detektierbar. Der positive Effekt der Ln³⁺DOTA-Markierung könnte hier wieder nivelliert werden, da die Massenzunahme relativ zur Größe des Peptids nicht so stark ins Gewicht fällt.

Nach Analyse eines mit NHS-DOTA derivatisierten und Thuliumionen markierten Verdaus wurde festgestellt, dass nach Derivatisierung eine ganze Reihe zusätzlicher Peptide zugeordnet werden konnten, die jedoch hauptsächlich aus 5 oder weniger Aminosäuren zusammengesetzt sind. Die Einführung der DOTA-Gruppe führte außerdem zu einer Erhöhung der S/N-Verhältnisse für einige der kürzeren Peptide und dagegen zu einer Abnahme der S/N-Verhältnisse für Peptide deren m/z-Werte nach Derivatisierung ≥ 2500 Da erreichen.

Zwar werden im derivatisierten Verdau doppelt so viele Peptide zugeordnet (42) als im underivatisierten (21), die Sequenzabdeckung ist jedoch aufgrund des geringen Informationsgehalt dieser Peptide mit 43% nur 6% höher als die des unmarkierten Verdaus (37%). Dadurch lässt sich das Zustandekommen der für beide Verdaue annähernd gleichen Sequenzabdeckungen, erklären.

Für die zusätzliche Detektion der Peptide mit bis zu 5 Aminosäuren ist eher die Massenzunahme als eine verbesserte Ionisation verantwortlich. Der Großteil der im markierten Verdau zusätzlich zugeordneten Peptide gelangen allein durch den Massenzuwachs in einen Massenbereich >1300 Da, sodass sie dadurch besser detektiert wurden. Unabhängig von der Suppression durch Matrixcluster liegen 21 der zusätzlich zugeordneten Peptide vor Derivatisierung außerhalb des Messbereiches (<800 Da) und können somit im underivatisierten Verdau gar nicht zugeordnet werden.

Die Neigung größerer, markierter Peptide mehrfach geladen Ionen zu bilden, stellt eine mögliche Ursache für die schlechtere Detektion größerer Peptide dar. Bei größeren, mehrfach markierten Peptiden konnten in Einzelpeptidspektren ein Anteil von bis zu 50% zweifach geladener Ionen detektiert werden, deren Signale damit der Peptidmassenfingerprint-Analyse verloren gehen. Die Software des hier verwendeten MALDI-Gerätes ist routinemäßig nicht auf die Analyse mehrfach geladener Ionen eingestellt. Dies erklärt sich dadurch, dass die „peak picking“ Software auf das Isotopenmuster einfach geladener Ionen ausgelegt ist,

mehrfach geladene werden gar nicht als Peptidsignal erkannt und somit auch nicht zugeordnet. Auch für eine MS/MS-Analyse müssten die Signale manuell zur Fragmentierung ausgewählt werden. Die Detektion der Fragmente erfolgt hier aber nur bis zum m/z des Vorläuferions. Da die Fragmente eines zweifach geladenen Peptids jedoch größere m/z -Werte annehmen können, würde immer nur ein Teil des MS/MS-Spektrums aufgezeichnet.

Außerdem ist die Detektion größerer Peptide auch daher schwieriger, da am Detektor auf eine größere Fläche nur eine Ladung kommt. Kleinere Peptide nehmen dagegen weniger Raum und Fläche in Anspruch.

Für die erhöhten S/N-Verhältnisse markierter Peptide die in beiden Ansätzen zugeordnet wurden, wird eine verbesserte Ionisation angenommen. Derivatisierungen, die zur Erhöhung der In-Lösung- oder Gas-Phasen-Basizität führen bzw. zur Protonen-Stabilisierung führen, bewirken auch eine Signalverstärkung im positiven Ionenmodus. Die Signalverstärkung im MS-Modus kann jedoch Fragmentierungsprobleme im MS/MS nach sich ziehen (Pashkova *et al.* 2004). Die Abnahme der S/N-Verhältnisse bestimmter Fragmente wird in Kapitel V.1.2 diskutiert.

Die verbesserte Ionisation, die durch Derivatisierung der Peptide erreicht wurde, gleicht in den meisten Fällen die negativen Effekte, die durch den Massenzuwachs in der MALDI MS-Analyse für größere Peptide entstehen, aus. Dies konnte besonders für mehrfach markierte Peptide beobachtet werden. Die Signalverstärkungen der Metall-markierten Peptide sind unabhängig vom eingeführten Metallion (Lu, Ho, Tm oder Tb) und gelten sowohl für die Derivatisierung mit NHS-DOTA als auch für die Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA. Außerdem sollte erwähnt werden, dass die Überschüsse der Derivatisierungsreagenzien oder der verwendeten Metalle zu keinen erkennbaren Suppressioneffekten geführt haben, da sich die Signalintensitäten zwischen unbehandelten Proben, sowie mittels C18ZipTips entsalzene Proben nicht wesentlich unterscheiden. Dennoch ist die Entsalzung und Trennung komplexerer Proben bspw. durch eine LC-MALDI-Kopplung empfehlenswert.

V.1.2 Fragmentierungsverhalten Metall-markierter Peptide

Cystein-haltige Peptide

Für die derivatisierten Peptide konnte keine klare Abhängigkeit des Fragmentmusters von der Position der derivatisierten Aminosäure ermittelt werden.

Im Gegensatz dazu konnte für die MDPs in einigen Fällen eine starke Änderung des Fragmentmusters in Abhängigkeit von der Derivatisierungsposition nach Komplexbildung beobachtet werden. Für die Peptide S31 und S32 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Fragmentierung unmittelbar C-terminal oder 1-2 Aminosäuren weiter um die Derivatisierungsstelle fokussiert. Für Peptid S32 ist die stärkste Fragmentierung zwischen Cys4 und Ser5 zu beobachten, resultierend in einem abundantem b_4 - und y_3 -Ion. Dieser Effekt ähnelt dem Protonen-immobilisierenden Verhalten von Arginin, das dazu führt, dass das verfügbare Proton an einer Stelle gebunden bleibt und die Fragmente nicht gleichmäßig über das Peptidrückgrat verteilt sind (Wysocki *et al.* 2000). So entsteht bei unterderivatisierten Peptiden mit endständigem Arginin meist ein abundantes y_1 -Ion. Man kann also vermuten, dass die Ln^{3+} -DOTA modifizierte Aminosäure ähnlich wie Arginin eine protonenaffine und eventuell auch bindende Wirkung ausübt. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich die Modifikation mit komplexiertem Metall positiv auf die Fragmentierung von S31 ausübt, was besonders deutlich in den PSD-Spektren zu erkennen ist. Die Modifikation in der Mitte des Peptids wirkt sich nicht so stark negativ auf die Fragmentierung aus wie die Modifikation am vorletzten Aminosäurerest bei S33; hier konnten in den PSD-Spektren außer einem sehr schwachen Signal von b_6 keine weiteren b-Fragmente mehr detektiert werden.

Markierungs-spezifische Ionen (Reporterionen)

Für die derivatisierten Peptide sind vor der Komplexbildung mit Metallen die Ionen bei m/z -Werten von 102,07, 203,11, und 304,15 detektiert worden (siehe Abbildung 4.7 und 4.10). Diese Ionen treten unabhängig von der reaktiven Gruppe auf, d.h. sie sind sowohl bei der Amino- als auch bei der Cystein-Derivatisierung beobachtet worden, sodass es sich hierbei wahrscheinlich um Fragmente des Makrozyklus selbst handelt. Da diese Fragmente sehr abundant sind, lässt sich vermuten, dass ein Großteil der Kollisionsenergie für die Spaltung des Makrozyklus aufgebraucht wird. Nach Metall-Beladung der Peptid-gebundenen Makrozyklen konnten diese Fragmente nicht mehr beobachtet werden, sodass man davon ausgehen kann, dass das im Ring gebundene Metall unter den MS/MS-Bedingungen eine stabilisierende Wirkung auf den Makrozyklus ausübt. Dies wird auch dadurch unterstrichen, dass in den MS-Spektren nach Komplexbildung weniger CO_2 bzw. CH_2CO_2 -Degradationsprodukte zu beobachten sind als in den Spektren der DPs.

Den intensivsten Signalen in den MS/MS-Spektren der Ln^{3+} -DOTA markierten Peptide sind in den meisten Fällen Markierungs-spezifische Ionen zuzuordnen. Als Basepeak in den Fragmentspektren tritt bspw. häufig das Signal bei einem m/z von 774,17 auf; hierfür wird als

Struktur das interne Immonium-Ion des Lu^{3+} -DOTA markierten Cysteins vorgeschlagen (siehe Abbildung 5.1).

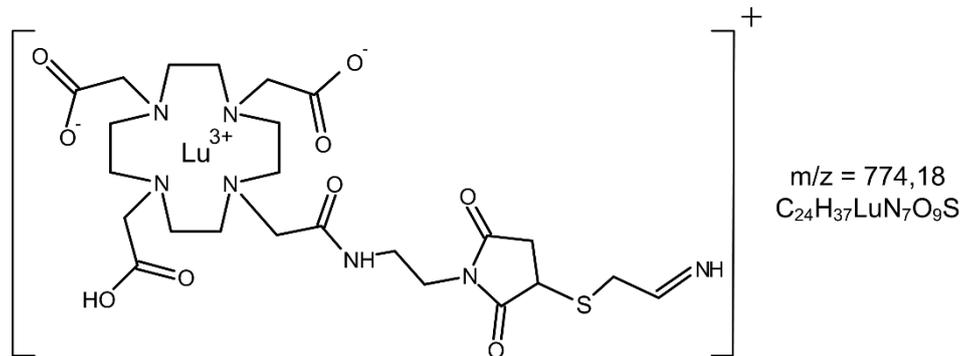


Abb. 5.1: Immonium-Ion des Lu^{3+} -DOTA markierten Cysteins.

In einer Studie von Benda *et al.* wird nach HCD-Fragmentierung eines Tb^{3+} -MeCAT-markierten β -Lactoglobulin Peptids ein charakteristisches Fragment gefunden, das ebenfalls auf das interne Immonium-Ion des markierten Cystein zurückgeführt wird (Benda *et al.* 2014). Des Weiteren wurden in Abhängigkeit von der Masse des verwendeten Lanthanoids die charakteristischen Fragmente bei einem m/z von 733,15 und 699,16 (für Lutetium) gefunden. Für die Entstehung der charakteristischen Fragmente wird folgender Mechanismus vorgeschlagen. Nach der Aktivierung durch Kollisionsenergie entstehen in der modifizierten, d.h. Ln^{3+} -DOTA-markierten Cystein-Seitenkette zwei Spaltstellen (Abbildung 5.2). Die Spaltung der Kohlenstoff-Schwefel Bindung am Derivatisierungsreagenz führt zur Bildung eines Ions mit einem m/z von 720,31, das dem unmarkierten Peptid entspricht -und dessen m/z in Abhängigkeit vom derivatisierten Peptid variiert. Dies wird dadurch unterstützt, dass ein Signal für das abgehende Metall-markierte Reagenz bei einem m/z von 699.16 für Lu^{3+} -DOTA, detektiert wird, wenn auch mit geringer Signalintensität. Dieses Signal wird entweder durch ein Karbokation, das durch die Spaltung der C-S-Bindung entsteht, oder durch die protonierte Maleinimidogruppe mit einer rückgebildeten Doppelbindung, verursacht (Abbildung 5.2).

Die zweite Hauptspaltstelle befindet sich an der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung innerhalb der Cystein-Seitenkette. Dies wird zum einen dadurch belegt, dass ein DOTA-spezifisches Fragment (Sulfhydryl-gerichtete Markierung) mit m/z-Werten, die von der Wahl des Metalls abhängen (im Fall von Lutetium mit einem m/z von 733.15) freigesetzt wird. Die Bildung dieses DOTA-spezifischen Fragments wird auch in Experimenten mit *Electrospray-infrared multiphoton dissociation* (IRMPD) von Pieper beschrieben (Pieper *et al.* 2009). Mit Hilfe der

hohen Massengenauigkeit und Auflösung eines FTICR-Instrumentes konnte dem Fragment mit einem m/z von 867,1896 die molekulare Zusammensetzung von $C_{30}H_{40}O_{11}N_6LuS$ zugeordnet werden. Da das hier verwendete Reagenz um 134 Da leichter ist konnte in Anlehnung an die von Pieper *et al.* vorgeschlagene Struktur für Reporterion 1 die in Abbildung 5.2 vorgeschlagene Struktur mit der molekularen Zusammensetzung $C_{22}H_{36}O_9N_6LuS$ ermittelt werden. Der zweite Hinweis ist das Vorkommen eines relativ starken Signals, das dem freien Peptid -34 Da entspricht (für S31-S33 m/z 686,32) und ebenfalls in Abhängigkeit vom untersuchten Peptid variiert. Höchstwahrscheinlich entspricht dieses Signal dem Dehydroalanin-Produkt des Peptids, das durch β -Eliminierung der S-H-Gruppe, die sich am R1-Ion (733,15) befindet, entsteht. Zur exakten Aufklärung dieses Mechanismus wären jedoch weitere Experimente notwendig. Eine Möglichkeit zur weiteren Untersuchung wäre je nach instrumentellen Gegebenheiten die Durchführung eines Produkt-Ionenscans des Dehydroalanin-Fragments. Die entstehenden Fragmentationen könnten die Lokalisation des Verlusts von 34 Da (wahrscheinlich am Cystein) genauer eingrenzen. Die Verwendung hochauflösender Massenspektrometer könnte die vorgeschlagenen Strukturen ebenfalls weiter absichern. Auch beim Neutralverlust von H_3PO_4 aus Phosphoserin wird Dehydroalanin gebildet. Diese Mechanismen wurden u .a. mithilfe von H/D-Austausch-Experimenten untersucht (Tholey *et al.* 1999). Die H-Atome von Interesse sind hier jedoch kovalent an die Kohlenstoff-Atome gebunden und können somit in schwerem Wasser nicht ausgetauscht werden.

Die zuvor beschriebenen Ionen sind in allen untersuchten Fragmentspektren der Ln-DOTA derivatisierten Peptide zu finden, sodass die Anwesenheit des Immonium-Ions zusammen mit dem DOTA-spezifischen Reporterionen R1 und R2 ein klares Muster für die Identifizierung von Metall-DOTA-markierten, Cystein-haltigen Peptiden liefert. Die potentielle Gefahr der Spektren-Fehlinterpretation wird diesbezüglich verringert. Ein Nachteil hierbei ist jedoch, dass ein Großteil der Kollisionsenergie zur Bildung der charakteristischen Fragmente verbraucht wird, sodass im Verhältnis weniger sequenzspezifische Fragmente detektiert werden, die jedoch für die Peptididentifizierung unerlässlich sind.

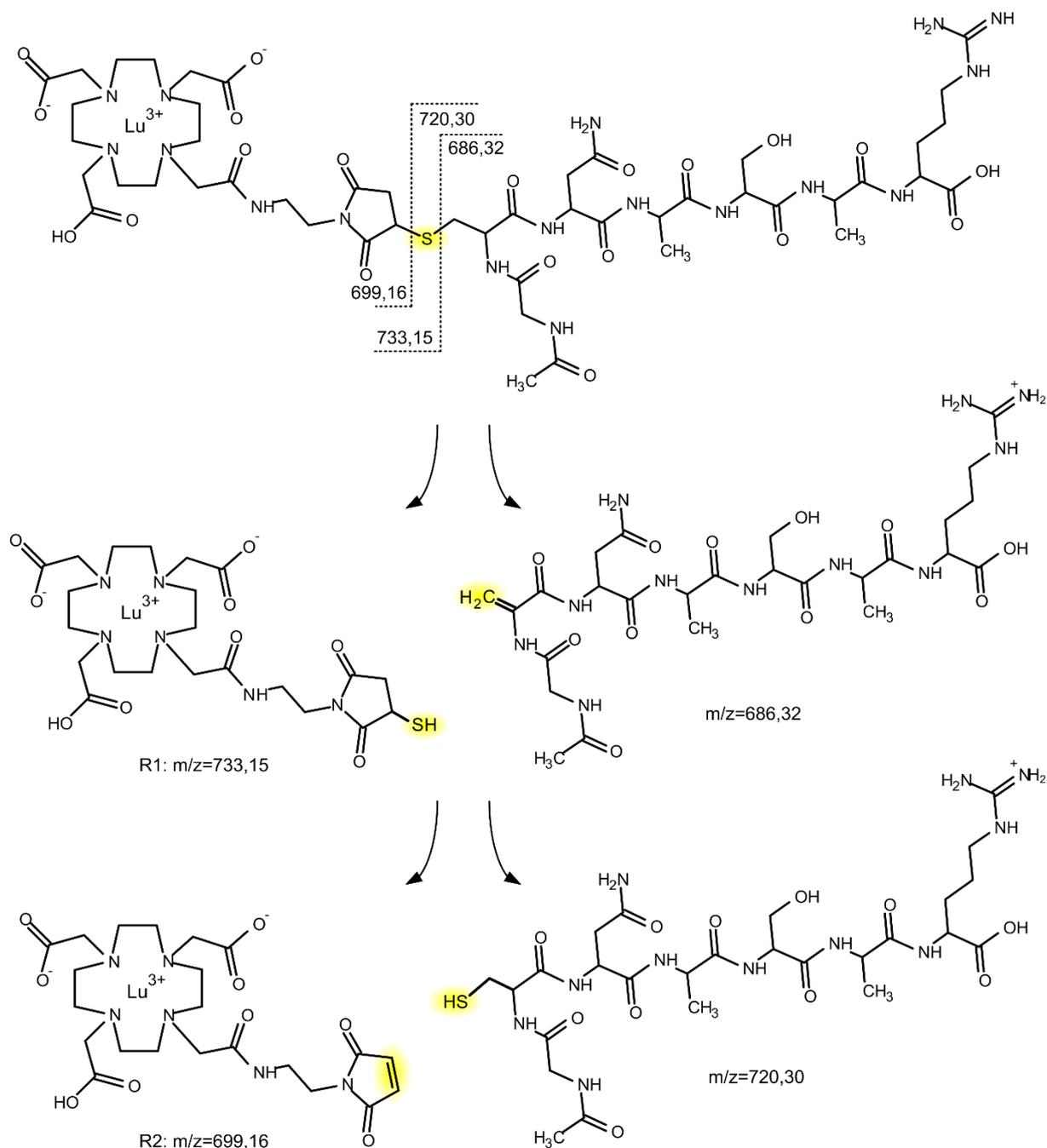


Abb. 5.2: Vorgeschlagene Entstehung der Reporterionen R1 und R2 und weiterer charakteristischer Ionen nach Fragmentierung des Lu³⁺-DOTA derivatisierten Peptids S31 (GCNASAR) mit einem m/z von 1418,47. Die Ladungen sind vereinfacht an den markierten Stellen eingezeichnet und können auch anderweitig lokalisiert sein.

In Kapitel IV.1 und V.1 wurde bereits das Auftreten der +18-Addukte in den Spektren DOTA-derivatisierter Peptide (Sulfhydryl-gerichtete Markierung) beschrieben, die höchstwahrscheinlich auf eine Hydrolyse des Maleinimidrings zurückzuführen sind. Auch nach Hydrolyse des Ln³⁺-DOTA-Peptids können die charakteristische Fragmente R1 und R2 wie in Abbildung 4.8 (Kapitel IV.1.2.) gezeigt, mit einem m/z + 18 Da (H₂O) detektiert

werden. Für diese Fragmente werden die in Abbildung 5.3 aufgeführten Strukturen vorgeschlagen. Theoretisch kann die Hydrolyse jedoch an zwei Positionen des Fünfrings stattfinden. Des Weiteren wurden bspw. im Fragmentspektrum des hydrolysierten und Lu-DOTA derivatisierten Peptids HCKFWW (Sulphydryl ger.) zwei weitere Signale mit den m/z Werten 619,17 und 1004,41 beobachtet, die sich weder sequenzspezifischen noch den bisher ermittelten Reporterionen zuordnen lassen. Betrachtet man die Struktur des Vorläuferions, so lässt sich leicht erkennen, dass nach Hydrolyse der Ringstruktur eine Amid-Bindung (ein sekundäres Carbonsäureamid) entsteht. Fragmentiert diese, entsteht auf der Seite des DOTA-Makrozyklus eine Art γ -Ion mit einem m/z von 619,17 und auf der Seite des Peptids ein b -Ion mit einem m/z von 1004,41.

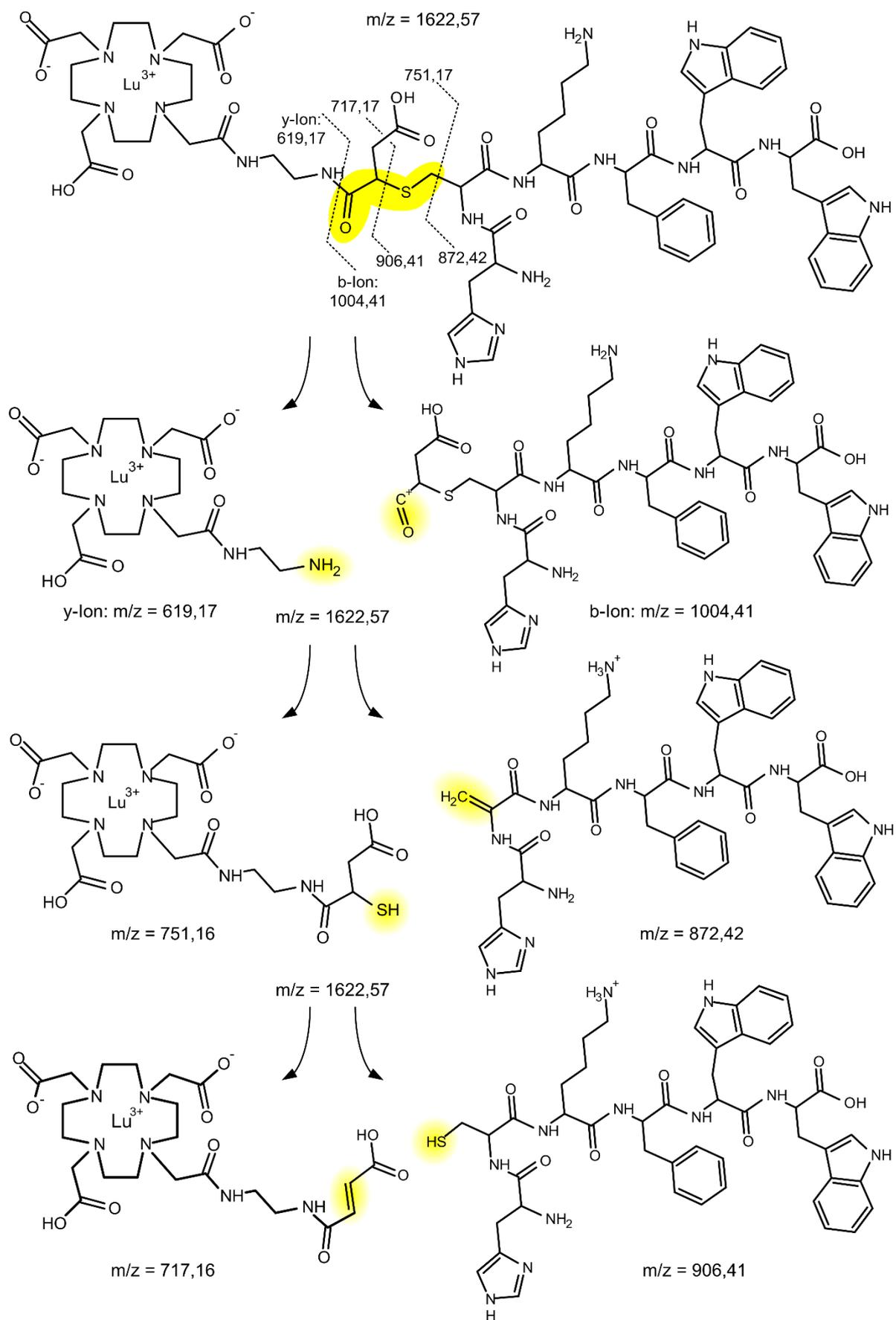


Abb. 5.3: Hypothetische Struktur des hydrolysierten und Lu^{3+} -DOTA-markierten Peptids (Sulfhydryl-gerichtete Markierung) HC*KFWW, sowie seiner charakteristischen Fragmente.

Amino-derivatisierte Peptide

Nach Derivatisierung mit NHS-DOTA ergeben sich deutlich verringerte Signalintensitäten der sequenzspezifischen Ionen, vor allem der b-Ionen. Wie auch für die Sulfhydryl-gerichtete Markierung beschrieben, konnten hier die charakteristischen Fragmente mit den m/z-Werten von 102,07, 203,11, und 304,15 (siehe auch Abbildung 4.7 und 4.10) detektiert werden. Da diese Fragmente sowohl nach Maleinimido- als auch nach NHS-DOTA-Derivatisierung beobachtet werden können, stammen sie wahrscheinlich vom DOTA-Molekül selbst. Man kann somit vermuten, dass ein Großteil der Kollisionsenergie für die Spaltung des Makrozyklus aufgebraucht wird.

Auch für die am Lysin Ln^{3+} -DOTA-markierten Peptide konnte eine Änderung des Fragmentmusters in Abhängigkeit von der Derivatisierungsposition beobachtet werden. Eine Modifikation nahe des N-Terminus führt zur verstärkten Bildung der N-terminalen b- und y-Ionen. Dies konnte auch an aus tryptischen Verdauen stammenden Peptiden beobachtet werden, die nur am Amino-Terminus modifiziert sind und ein C-terminales Arginin enthalten. Hier werden die Spektren der underivatisierten Peptide wie bereits beschrieben von den C-terminalen kleineren y_1 -Fragmenten dominiert. Nach Derivatisierung und Beladung mit Metallionen ist die Ladung wahrscheinlich statt am C-terminalen Arginin eher in der Nähe des modifizierten N-Terminus lokalisiert, sodass diese Fragmente verstärkt gebildet werden.

Außerdem wurden die Fragmentspektren von tryptischen Peptiden mit einem C-terminalem Lysin untersucht. Bei den underivatisierten Peptiden erhält man hier meistens eine mehr oder weniger gleichförmige Verteilung der b- und y-Ionen, abhängig davon welche Aminosäuren in der Sequenz enthalten sind. Nach Derivatisierung des Amino-Terminus und des C-terminalen Lysins verschiebt sich das Fragmentmuster dahingehend, dass verstärkt N-terminale b-Ionen und C-terminale y-Ionen gebildet werden, sodass die Ladung möglicherweise zu gleichen „Anteilen“ am N- oder am C-Terminus lokalisiert ist. Für kürzere Peptide kann durch Überlappung der N-terminalen b-Fragmente und C-terminalen y-Fragmente so meistens eine zur Identifizierung ausreichende Sequenzabdeckung erreicht werden. Zur Identifizierung von Peptid HLVDEPQNLIK reichen bspw. die N-terminalen Fragmente von b_1 - b_{10} und die C-terminalen von y_1 - y_8 . Für längere Peptide besteht die

Möglichkeit, dass sich die N- und C-terminalen Fragmente nicht überlappen, sodass die Sequenzabdeckung unvollständig ist.

Markierungs-spezifische Ionen

Wie bereits erwähnt, sind für die unbeladenen Peptide nach der Amino-gerichteten DOTA-Derivatisierung die gleichen charakteristischen Fragmente zu detektieren wie nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA ($m/z = 102,07, 203,11, \text{ und } 304,15$).

Nach Reaktion mit Lutetiumionen ist wie bereits beschrieben in den Spektren Lysin-haltiger Peptide ein charakteristisches Fragment bei einem m/z von 659,20 zu beobachten, wobei es sich höchstwahrscheinlich um das Immonium-Ion des markierten Lysins handelt (siehe Abbildung 5.4).

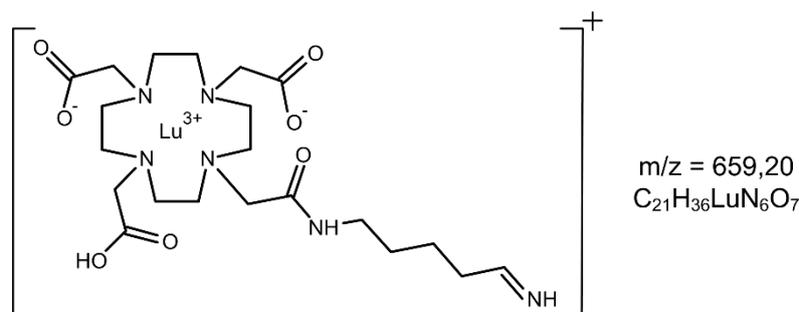


Abb. 5.4: Immonium-Ion des Lu^{3+} -DOTA-markierten Lysin (Amino-gerichtete Markierung).

Mit Hilfe des Immonium-Ions können also lediglich Lysin-haltige Peptide identifiziert werden. In den Spektren von Arginin-Peptiden sind keine Markierungs-spezifischen Signale zu verzeichnen, was für die Identifizierung aber eher von Vorteil ist. Da nicht zugeordnete Signale die *peptide score* erniedrigen und somit die Identifizierung erschweren, müssen die Reporterionensignale der Sulfhydryl-gerichteten Markierung bei der Datenbankanalyse berücksichtigt werden.

V.1.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Fragmentierungsverhalten der Amino- und Cystein-markierten Peptide

Bei der Fragmentierung einfach geladener Ionen in MS/MS-Experimenten entstehen neben einfach geladenen Fragment-Ionen auch neutrale, nicht detektierbare Fragmente. Des Weiteren werden zur Fragmentierung einfach geladener Ionen normalerweise höhere Kollisionsenergien benötigt als für zwei- oder mehrfach geladene Ionen (Wysocki *et al.* 2000). Die Fragmentierung zweifach (oder mehrfach) geladener Vorläuferionen ist auch deshalb effektiver, da hier aus einer Spaltung, je nach Lage der Spaltstelle und der Ladungen,

zwei detektierbare Fragmente entstehen können, die Sequenzinformation liefern. Da in der ESI-MS/MS meist die mehrfach geladenen Peptidionen zur Fragmentierung herangezogen werden, sind MALDI MS/MS-Spektren häufig signalärmer und signalschwächer. Ein Vorteil bei der MALDI MS-Analyse ist jedoch, dass ein Analyt nur in einem Ladungszustand vorliegen kann und damit eine höhere Sensitivität erreicht wird.

Trotz dieser vorgegeben Nachteile zeigen unsere Ergebnisse deutlich, dass die Metall-markierten DOTA-Peptide interpretierbare MS/MS-Spektren liefern. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung der Metall-Markierung in der Proteom- und Peptidanalyse. Das MS/MS-Verhalten der Cystein- und Amino-derivatisierten Peptide zeichnet sich durch eine Reihe von Gemeinsamkeiten aus, zeigt aber auch einige klare Unterschiede. Sowohl für die Cystein- als auch für die Lys- ϵ -amino-modifizierten Peptide wurden intensive Signale der Immonium-Ionen, die aus den markierten Aminosäuren entstehen und als eindeutige Reporterionen dienen können, beobachtet. Zusätzlich wurden im Fall der Cystein-derivatisierten Peptide zwei weitere Markierungs-spezifische Ionen identifiziert. Für die N-terminal markierten Peptide konnten keine Markierungs-spezifischen Ionen beobachtet werden. Im Vergleich zu den unmarkierten Peptiden zeigen die MS/MS-Spektren in Gegenwart der Metall-DOTA-Modifikation deutliche Abweichungen hinsichtlich der Abdeckung und der sequenzspezifischen a-, b- und y-Ionen. Diese Beobachtungen sind für beide Fragmentierungsarten (CID oder PSD) ähnlich und auch von der Wahl des Metallions (Lu, Tm, Tb, Ho) unabhängig. Jedoch werden nach CID-Fragmentierung vor allem deutlich mehr b-Ionen erhalten.

Sowohl für die Cystein- als auch die Lysin- ϵ -amino-derivatisierten Peptide hat die Position der Metall-DOTA-Markierung einen deutlichen Einfluss auf die Fragmentierung des Peptidrückgrates. Wenn sich die Seitenkettenmodifikation in der Nähe des N-Terminus befindet, werden bevorzugt die amino-terminalen b- und y- Ionen gebildet. Während die y-Ionen-Serien meistens noch komplett zu beobachten sind und damit eine ausreichende Sequenzabdeckung bereitstellen, sind die b-Ionen nahe am Carboxy-Terminus stark reduziert oder vollständig abwesend. Ein ähnliches Fragmentierungsverhalten konnte auch bei tryptischen Peptiden mit einem C-terminalen Arginin beobachtet werden, deren einzige Derivatisierungsstelle der Amino-Terminus darstellt. Obwohl sich die Fragmentierung hauptsächlich auf den modifizierten N-Terminus konzentriert, konnten die C-Termini mithilfe der verbleibenden Ionen interpretiert werden.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen liefert die Derivatisierung nahe des C-Terminus ähnlich den derivatisierten Modellpeptiden S33 und S30 (Ac-GANASC*R, Ac-GANASK*R) sehr intensive C-terminale γ -Ionen. In diesem Fall sind die Intensitäten fast aller b-Ionen reduziert oder nicht mehr zu detektieren. Die gleichen Beobachtungen hinsichtlich der γ -Ionen Serien wurden für Peptide mit C-terminalen Lysinen gemacht. Jedoch besitzen diese Peptide normalerweise bei einer Amino-gerichteten Derivatisierung eine zweite Derivatisierungsstelle am N-Terminus, resultierend in einer gut interpretierbaren Fragmentierung an diesem. Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass in den doppelt markierten Peptiden durch die verstärkte N-terminale b-Ionen-Bildung und die verstärkte C-terminale γ -Ionen Bildung eine gute Sequenzabdeckung beobachtet wurde. Ist die Derivatisierungsstelle in der Mitte der Peptidsequenz lokalisiert (für die Sulfhydryl-gerichtete Markierung), sind erhöhte Intensitäten der Fragmente C-terminal von der Derivatisierungsstelle zu beobachten, begleitet mit einer Reduktion der Fragmente auf der N-terminalen Seite. Dieser Effekt ist besonders für die b-Ionen sehr stark, sodass einige N-terminale b-Ionen überhaupt nicht mehr detektierbar sind, während die γ -Ionen größtenteils noch intensive und interpretierbare Signale liefern.

V.1.4 Proteinidentifizierung mittels LC-MALDI MS/MS-Analyse

Für die LC-MALDI MS/MS-Analyse einer 6 Protein-Mischung wurden vergleichbare Ergebnisse, bzw. leicht bessere Sequenzabdeckungen und *protein scores* für die Lu^{3+} -DOTA-markierten Peptide (Sulfhydryl-gerichtete Markierung) als für die mit MMTS alkylierten Peptide gefunden (Kapitel IV.1.3). Der Unterschied zwischen den Proben ist hauptsächlich auf die Cystein-haltigen Peptide zurückzuführen. Die geringen Abweichungen bei der Identifizierung der Nicht-Cystein-haltigen Peptide ergeben sich vermutlich aus einer nicht-idealen Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen chromatographischen Trennungen. Dies tritt bei LC/MS-Experimenten komplexer Mischungen häufig auf (Delmotte *et al.* 2009). Die bessere Identifizierung der Cystein-haltigen Peptide ist wahrscheinlich auf die verbesserte Detektion der Vorläuferionen in den MS-Spektren zurückzuführen. Die Länge der identifizierten Lu^{3+} -DOTA-markierten Peptide reichte von 5-17 Aminosäuren Länge. Im Gegensatz zu den Einzelspot-Analysen konnte in den LC-MS Experimenten keine Signalreduktion der längeren Cystein-Peptide beobachtet werden. Die verschlechterte Identifizierung der größeren Cystein-Peptide in den Einzelspot-Analysen wird somit wahrscheinlich eher durch Suppressionseffekte verursacht.

V.1.5 Zusammenfassung

Die hier gezeigten Daten präsentieren die Anwendbarkeit der MALDI MS und MS/MS-Analyse zur Charakterisierung/Identifizierung Metall-DOTA markierter Peptide, was als Voraussetzung zur Verwendung der Methode in der qualitativen und quantitativen Proteomanalyse gilt. Genau wie für andere Quantifizierungsmethoden, die auf einer chemischen Markierung basieren, ist die Einführung des Metall-DOTA-Labels mit einigen Nachteilen verbunden: Probleme die durch unvollständige Derivatisierung oder Nebenreaktionen entstehen, Probenverluste und materieller wie zeitlicher Aufwand. Jedoch bietet die Verwendung der Metall-Markierung eine Reihe von Vorteilen, die den Aufwand rechtfertigen.

Die erhöhte Sensitivität, die für Peptide im unteren und mittleren m/z -Bereich und insbesondere für mehrfach markierte Peptide beobachtet wurde, kann einen großen Vorteil für die Analyse niedrig abundanter Proteine oder Peptide darstellen. Die Ergebnisse, die in der LC-MALDI Analyse des mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Proteinverdaus erzielt wurden, zeigen, dass der Aufwand während der Einführung der Markierung durch den Sensitivitätsgewinn ausgeglichen werden kann. In diesem Beispiel konnten in der markierten Probe deutlich mehr Peptide zugeordnet werden, als in der unmarkierten Kontrolle.

Trotz des geänderten Fragmentierungsverhaltens der Metall-markierten Peptide ist die Interpretation der Fragmentspektren und damit auch die Identifizierung unkompliziert. Zusätzlich erleichtert die Bildung der Markierungs-spezifischen Fragmente die Zuordnung der Cystein-markierten Peptide. Der Unterschied zwischen α - und ϵ -Amino-derivatisierten Peptiden in der Bildung des Marker-Immonium-Ions erlaubt weiterhin eine einfache Unterscheidung zwischen Peptiden mit endständigem Lysin und Arginin. Während sich die Analyse der mit NHS-DOTA derivatisierten Peptide als relativ unkompliziert heraus gestellt hat, gibt es nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA einige Schwierigkeiten. Zum einen besteht nach Maleinimido-Derivatisierung die Möglichkeit dass, wie bei Pieper *et al.* beschrieben, Diastereomere auftreten, die zur Signalaufspaltung und damit zum Sensitivitätsverlust führen (Pieper *et al.* 2009; Esteban-Fernández *et al.* 2011). Ein weiterer Nachteil ist die mögliche Hydrolyse des Maleinimids und die damit einhergehende Bildung der +18 Da-Addukte, die wie in Abbildung 4.2 und 4.8 gezeigt, zu deutlich komplexeren MS- und auch MS/MS-Spektren führen kann. In den Arbeiten von Schwarz *et al.* wird anstelle von

Maleinimido-DOTA ein Derivatisierungsreagenz mit Iodacetamid als reaktiver Gruppe verwendet. Hierdurch konnte eine deutliche Steigerung der Derivatisierungseffizienz erreicht und das Auftreten von Diastereomeren vermieden werden (Schwarz *et al.* 2011; Esteban-Fernández *et al.* 2012; Benda *et al.* 2014)

V.2 Quantitative Analyse

V.2.1 Relative Quantifizierung von Einzelpeptiden

Für die relative Quantifizierung von Einzelpeptiden konnten mithilfe der MS-basierten DOTA-Quantifizierung im Gegensatz zur MS/MS-basierten iTRAQ-Quantifizierung Verhältnisse unter 0,5:1 bestimmt werden. Die Nachweisgrenze (=LOD) lag damit für den DOTA-basierten Ansatz zwischen 50 und 200 amol, für iTRAQ bei 1 fmol. Für die MS-basierte Methode ist jedoch auch eine höhere Sensitivität zu erwarten, denn der MS-Modus ist deutlich sensitiver als der MS/MS-Modus. Speziell bei der MALDI MS kann ausgehend von einfach geladenen Vorläuferionen immer nur eine Hälfte der Fragmente detektiert werden. Die Ladung kann nur an einem der beiden entstehenden Fragmente verbleiben, so dass sich das andere Fragment als neutrales Teilchen der Analyse entzieht. Zum anderen wird nicht jedes Vorläuferion tatsächlich auch fragmentiert, sondern nur ein Teil der Ionen (etwa 10-50%) (Lottspeich & Engels 2012).

Während die Nachweisgrenze hier die niedrigste Stoffmenge definiert die noch ein detektierbares Signal liefert, beschreibt die Bestimmungsgrenze (=LOQ, engl. *limit of quantification*) den niedrigsten Gehalt eines Analyten der mit festgelegter Genauigkeit und Präzision bestimmt werden kann (Meyer 2009). Bspw. wird häufig eine maximale Standardabweichung von 33 % für die Präzision an der Bestimmungsgrenze festgelegt (Kromidas & Kuss 2012). Für die DOTA-basierte Quantifizierung sind jedoch alle rel. Standardabweichungen kleiner als 33% sodass hier nach diesen Gesichtspunkten Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze zusammenfallen (siehe Tabelle A.4 im Anhang). Legt man für die Bestimmungsgrenze zusätzlich eine bestimmte Genauigkeit fest wie bspw. einen rel. Fehler von max. 33%, so müssen einige Verhältnisse von der Quantifizierung ausgeschlossen werden. Zum Beispiel für Peptid S35 können zwar Verhältnisse <0,2:1 detektiert werden, aber nicht mit ausreichender Genauigkeit quantifiziert werden (siehe Tabelle A.4 im Anhang).

Wie bereits beschrieben könnte auch die verbesserte Ionisation der Metall-DOTA-markierten Peptide eine Ursache für die höhere Sensitivität des DOTA-Ansatzes sein. Hier wäre jedoch zu erwarten, dass das mehrfach derivatisierte Peptid T1 die höchste Sensitivität aufweist. Dies war jedoch für die DOTA-Quantifizierung von S35 der Fall, das nur eine Markierung am Amino-Terminus trägt. Zudem sind die Messungen nicht komplett vergleichbar, da nur eine Laserintensität gesetzt wurde, die eventuell nicht für jedes Peptid optimal ist. Dies gilt jedoch genauso für die MS-Messungen.

Der Bereich, in dem ein Detektor bei Änderung der Masse/Konzentration des Analyten eine signifikante Änderung des Signals liefert ist der dynamische Bereich des Detektors. Innerhalb des dynamischen Bereichs liegt der lineare Bereich (Meyer 2009). In diesem Bereich ist die Empfindlichkeit des Detektors konstant, sodass die Signalintensitäten oder Peakflächen proportional zur Konzentration der Analyten sind. Die unteren Grenzen des linearen Bereichs sind die hier ermittelten Nachweisgrenzen. Die obere Grenze ist dann erreicht, wenn die Empfindlichkeit des Detektors nicht mehr konstant ist, d.h. der Detektor ist gesättigt.

Neben der Sensitivität konnte vor allem auch eine geringere Genauigkeit der iTRAQ-Quantifizierung hinsichtlich großer Verhältnisse ($>10:1$) festgestellt werden. Für die Verhältnisse wurden geringere Werte als erwartet, ermittelt. Als mögliche Ursache hierfür käme die Detektorsättigung bei großen Mengen des iTRAQ-117-markierten Peptids infrage. Hierfür spricht, dass die Peakflächen des Reporterions bei einem m/z von 117 ab Verhältnissen $>5:1$ nicht mehr konstant zunehmen, sondern eine Art Plateau annehmen. Dagegen spricht jedoch, dass die genaueste Quantifizierung für das Verhältnis von 50:1 für Peptid S36 erreicht wurde, das auch die intensivsten Signale (größten Peakflächen) für dieses Verhältnis aufweist. Man würde eher erwarten, dass das Peptid, dessen Reporterionensignale die größten Peakflächen aufweisen, die ungenaueste Bestimmung der Verhältnisse $>10:1$ liefert, da sich hier die Detektorsättigung am stärksten auswirken würde.

Die ungenaue Quantifizierung könnte auch durch fehlerhafte Bestimmung der Peakflächen der internen Standards, die für jedes Verhältnis in gleichen Mengen vorliegen, zustande kommen. Diese weisen bei großen Verhältnissen im Vergleich zum in variablen Mengen hinzugefügten Peptid geringe Intensitäten auf. Peaks geringer Signalintensität sind im MS-Spektrum oft schlecht aufgelöst und erscheinen dann breiter als sie sein sollten. Da diese Peakflächen bei der Berechnung der Verhältnisse im Nenner stehen, bewirken die größeren Flächen eine Verringerung der Verhältnisse. Das Phänomen, dass extreme Verhältnisse

weniger extrem detektiert werden, d.h. eher zu Verhältnissen von 1:1 tendieren, wird als *Underestimation* bezeichnet und im folgenden Kapitel V.2.2 weiter diskutiert.

Zur weiteren Analyse der beiden Quantifizierungsstrategien wurde das Bestimmtheitsmaß und die Steigungen der Bestgeraden für alle iTRAQ und DOTA-derivatisierten Peptide bestimmt. Sowohl die Steigung als auch das Bestimmtheitsmaß liegen für die DOTA-basierte Quantifizierung näher am Erwartungswert 1. Dies ist auch hauptsächlich auf die ungenaue iTRAQ-basierte Quantifizierung der Verhältnisse >5:1 bzw. die *Underestimation* dieser Verhältnisse zurück zu führen.

V.2.2 Relative Quantifizierung eines 6-Protein-Verdaus

Die Anwendung des Metall-DOTA-Labeling (Amino-gerichtete Markierung) erlaubte eine genaue und präzise relative Quantifizierung über einen dynamischen Bereich von bis zu drei Größenordnungen in den Einzelpeptidmessungen. Die Sulfhydryl-gerichtete-DOTA Markierung lieferte insgesamt schlechtere Ergebnisse. Im Fall der 6-Protein-Mischung ist dies hauptsächlich durch die geringe Anzahl quantifizierbarer Peptide bedingt, ein Nachteil aller Quantifizierungsmethoden, deren Derivatisierungsstrategien auf eine einzelne Aminosäure abzielen.

Nach der Datenbankanalyse der unterschiedlich markierten 6 Protein-Mischung wurden für die iTRAQ-Derivatisierung bessere Ergebnisse in Bezug auf die Sequenzabdeckung, den *protein score* und die Anzahl der identifizierten Peptide erhalten, als für DOTA-markierten Ansätze (Amino- und Sulfhydryl-gerichtete DOTA-Derivatisierung). Da es sich bei DOTA um eine nichtisobare Markierung handelt gilt für die MS/MS-Analyse der mit NHS-DOTA derivatisierten Peptide, dass pro Spektrum nur ein Viertel der Fragmente vorliegen, die für die Analyse eines iTRAQ-markierten Peptids vorhanden sind. Dies bedeutet, dass für die DOTA-Markierung für jedes Peptid die MS/MS-Sensitivität um 75% im Vergleich zur iTRAQ-Messung herabgesetzt ist (gilt nur für die 1:1:1:1 Verhältnisse). Es liegt also pro Fragmentspektrum nur ein Viertel der Vorläuferionen vor, im Vergleich zur iTRAQ-Quantifizierung. Diese Vorläuferionen können schließlich auch nur 25% der Fragmentationen liefern. In der Probe, die nur mit Maleinimido-DOTA derivatisiert wurde, gilt dies nur für die Cystein-haltigen Peptide.

Des Weiteren gilt für die nichtisobare Metallmarkierung, dass durch die vier MS-Signale die für jedes Peptid aufgrund der unterschiedlichen Metalle entstehen, die Spektrenkomplexität erhöht wird. Für die MALDI MS/MS-Analyse wird immer nur eine vorher festgelegte Anzahl an Vorläuferionen ausgewählt. So wird bei der wiederholten Fragmentierung desselben aber differentiell markierten Peptids weniger Sequenzinformation gewonnen und große redundante Datenmengen entstehen. Die Anzahl der pro Spot analysierten Vorläuferionen, bzw. die Anzahl der pro Spot aufgenommenen MS/MS-Spektren kann jedoch aufgrund des Spotabtrags nicht beliebig erhöht werden. Nach einer bestimmten Anzahl an Schüssen ist das komplette Material eines Spots aufgebraucht. Die Entwicklung einer geeigneten Software würde hier helfen die differentiell markierten Multiplets während der MS-Analyse zu erkennen. Dadurch könnten die Messzeiten erheblich verkürzt werden und die Erzeugung redundanter Datenmengen verhindert werden. Dies wurde zur Analyse von Daten aus ICPL-Experimenten bereits eingeführt (Brunner *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu werden die vier isobaren, iTRAQ-markierten Peptide in der MS-Analyse zwangsläufig als ein Signal detektiert. Dies reduziert die Spektrenkomplexität (im MS-Modus). Gleichzeitig wird die Vorläuferionen-Statistik erhöht, aufgrund dessen, dass wie bereits erwähnt pro MS/MS-Spektrum viermal so viel Vorläuferionen (und damit auch Fragmentionen) vorliegen, als nach Metal-DOTA-Markierung. Es ist jedoch auch wahrscheinlich, dass sich die Spektrenkomplexität nicht nur durch die Erzeugung redundanter MS/MS-Daten negativ auf die Sequenzabdeckung auswirkt, sondern auch, dass durch die Verwendung der vier *Label* weniger abundante Vorläuferionen komplett unterdrückt werden. Wie in Kapitel IV.1.3 gezeigt, konnte unter Verwendung nur eines Metalls zur Beladung der DOTA-Komplexe keine Suppression beobachtet werden. Für die qualitative Analyse der Tm-DOTA-markierten 6-Proteinmischung (Sulphydryl-gerichtete Markierung) wurden sogar bessere Sequenzabdeckungen erreicht, als im alkylierten Ansatz. Man kann also davon ausgehen, dass die Anzahl der verwendeten Metalle einen negativen Einfluss auf die qualitativen Ergebnisse wie Sequenzabdeckung und Anzahl der identifizierten Peptide hat. Hierbei ist auch zu bedenken, dass nach Verwendung von ^{152}Sm - ^{175}Lu ein einzelnes Peptid einen größeren Bereich im MS-Spektrum abdeckt. Die Isotopenmuster der differentiell markierten Peptide überspannen einen Bereich von mehr als 23 Da im Falle der einfach markierten Peptide. Doppelt markierte Peptide, d.h. die Lysin-Peptide überspannen somit sogar mehr als 46 Da. Die MS-Spektrenkomplexität bei Verwendung von vier Kanälen ist somit nicht unbedingt viermal so groß, als die der unmarkierten oder einfach markierten Peptide (wie bspw. im Fall der Tm-DOTA-Markierung), sondern eher 20-40mal so groß.

Beide Sachverhalte erklären jedoch nicht, dass die Anzahl der identifizierten Peptide nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA wesentlich geringer ist als nach Derivatisierung mit NHS-DOTA, während die Sequenzabdeckungen annähernd gleich sind. Ein mögliches Problem bei der Sulfhydryl-gerichteten Markierung könnte das Auftreten der Diastereomere sein. Die Diastereomere eines Peptids können während der Chromatographie getrennt werden, sodass die Sensitivität für diese Peptide verringert ist. Es ist auch möglich, dass die Identifizierung der mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptide schwieriger ist, als die der mit NHS-DOTA derivatisierten Peptide. Eine mögliche Ursache hierfür wäre bspw. dass größere Modifikation wie bspw. ICAT zu einem größeren Anteil der Modifikations-spezifischen Fragmente im Vergleich zu den Sequenz-spezifischen Fragmenten führen, sodass die Zuordnung der Fragmentspektren erschwert ist (Hansen *et al.* 2003). Solange die Markierungs-spezifischen Ionen zugeordnet werden können oder herausgefiltert werden, ist dies nicht problematisch, da diese Ionen dann nicht die *ion score* und damit die Identifizierung verschlechtern. Dennoch ist auch nicht auszuschließen, dass die hochabundanten Reporterionen, die nach der Maleinimido-Derivatisierung auftreten, die weniger intensiven Fragmentationen noch zusätzlich unterdrücken. Dies kann jedoch auch bei der Fragmentierung iTRAQ-markierter Peptide, wenn besonders hoch abundante Reporterionen entstehen, auftreten. Nach Derivatisierung mit NHS-DOTA ist dagegen nur das Immonium-Ion als dominierendes Ion zu nennen, das keine Sequenzinformation liefert.

Höchstwahrscheinlich wird die geringere Anzahl identifizierter Peptide nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA dadurch ausgeglichen, dass hier eine größere Anzahl längerer Peptide (vor allem nicht Cystein-haltige Peptide) identifiziert werden können. Diese liefern entsprechend mehr Sequenzinformation. Nach Derivatisierung mit NHS-DOTA liegen diese Peptide ebenfalls derivatisiert vor und können somit außerhalb des gemessenen Massenbereichs liegen. Jedes einfach markierte Peptid erhält hier bspw. einen Massenzuwachs von 552,09 Da (nach Derivatisierung mit NHS-DOTA und Beladung mit Samarium) und jedes zweifach markierte Peptid sogar um 1104,18 Da. In der qualitativen Analyse des Ln³⁺-DOTA (Amino-gerichtete Markierung) derivatisierten BSA-Verdau wurde bereits festgestellt, dass nach Derivatisierung mit NHS-DOTA eher kürzere zusätzliche Peptide zugeordnet werden können. In Abbildung 5.5 ist die Anzahl der identifizierten Peptide einer bestimmten Länge (Anzahl an Aminosäuren) in den verschiedenen Derivatisierungsansätzen dargestellt. Die Verschiebung zu kürzeren Peptiden ist für die Derivatisierung mit NHS-DOTA deutlich zu erkennen. Im iTRAQ-Ansatz werden mit dem

geringsten zusätzlichen Molekulargewicht der Modifikation die längsten Peptide identifiziert, die Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA liegt dazwischen.

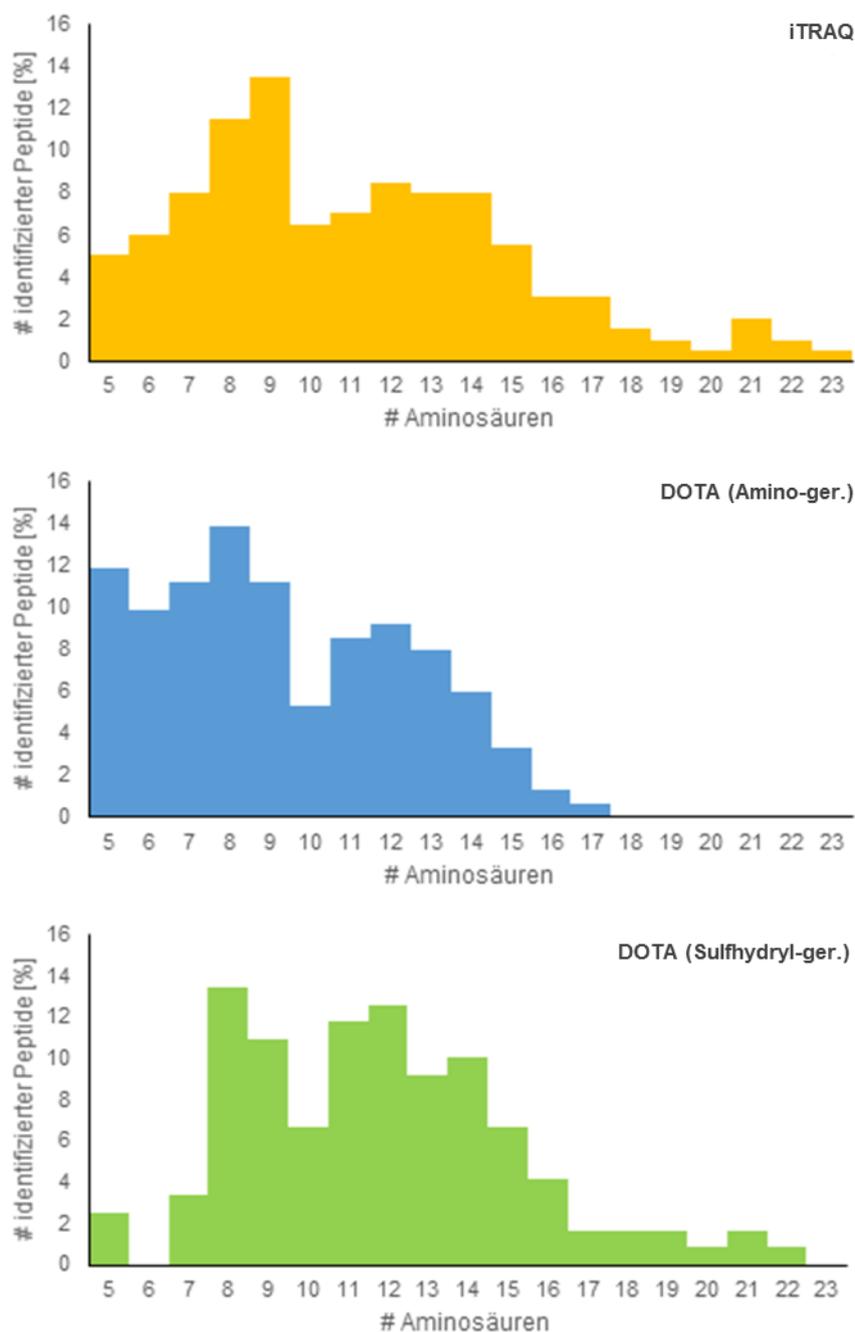


Abb. 5.5: Vergleich der Häufigkeit der Peptidlängen in den unterschiedlichen Derivatisierungsansätzen. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der drei chromatographischen Trennungen dar, jede Peptidsequenz wurde unabhängig von der Anzahl der Identifizierungen nur einmal gezählt.

Ein möglicher Nachteil der Metall-DOTA-Markierungsstrategie ist das mögliche Auftreten von Retentionszeitunterschieden zwischen den markierten Peptiden. Durch die

Retentionszeitunterschiede der differentiell markierten Peptide liegen ihre Elutionsmaxima bei der LC-MALDI-Kopplung möglicherweise in unterschiedlichen Spots. In diesen Spots liegt daher eine unterschiedliche Zusammensetzung vor, sodass damit auch eine unterschiedliche Ionensuppression auf die differentiell markierten Peptide vorliegt. Dies könnte die Genauigkeit der Quantifizierung beeinflussen. In Studien von Ahrends *et al.* wurde jedoch bereits das Retentionsverhalten für DOTA-markierte Peptide (Sulphydryl-gerichtete-Markierung) in der LC-ESI MS als zur Quantifizierung geeignet beschrieben. In dem in diesen Studien verwendeten chromatographischen Aufbau eluieren die unterschiedlich markierten Peptide meist innerhalb eines Zeitfensters von jeweils 90 s (Ahrends *et al.* 2009). In unseren Experimenten betragen die Abweichungen der Elutionsmaxima zwischen den differentiell markierten Peptiden nur bis zu 15 s, entsprechend einem Spot auf dem MALDI-Target. Dieses Problem kann dadurch minimiert werden, dass man Retentionszeittoleranzen für die unterschiedlich markierten Peptide erlaubt, wie das bereits für ICPL (*isotope-coded protein labeling*) gezeigt wurde (Brunner *et al.* 2010). Die Verwendung von Retentionszeittoleranzen ist auch eine Option in der Mascot Distiller Software. Dennoch muss das Retentionszeitfenster abhängig von den chromatographischen Gegebenheiten optimiert werden, um eine möglichst genaue Quantifizierung zu gewährleisten.

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Quantifizierung, besteht auch in der Variation der Spotfrequenz, also eine Variation der Zeitintervalle der Spotfraktionierung. Eine höhere Spotfrequenz von bspw. 12 Spots pro min (1 Spot in 5 s), würde bedeuten, dass das extrahierte Ionenchromatogramm aus mehr Datenpunkten zusammengesetzt ist und somit genauer bestimmt werden könnte. Durch die Verteilung eines Peptidsignals auf eine höhere Anzahl an Spots könnte es jedoch zu Sensitivitätsverlusten und damit schlechteren Identifizierungsraten kommen, aber auch zu einer erheblichen Verlängerung der Messzeit.

Ein allgemeinerer Sachverhalt, der bei allen Derivatisierungsstrategien beachtet werden muss ist der erreichbare Grad der Derivatisierung und das Auftreten von Nebenreaktionen. Dies kann einen deutlichen Einfluss auf die Qualität der Quantifizierung haben. Das isobare *i*TRAQ-Labeling, sowie das NHS-aktivierte Metall-Labeling liefern ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Derivatisierungseffizienz. Die Reaktivität des NHS-DOTA-Esters ist jedoch nach eigenen Beobachtungen anfälliger gegenüber einer Hydrolyse. Die Verwendung frischer Lösungen ist zwingend erforderlich. Für die Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA, die insgesamt zwar weniger empfindlich ist, stellen die bereits erwähnten Probleme der begrenzten Anzahl Cystein-haltiger Peptide, sowie die Bildung von Isomeren das

Hauptproblem der Anwendbarkeit dar. In den letzten Jahren wurde, wie bereits beschrieben, zur Einführung eines DOTA-Ringsystems an Cysteine in mehreren Studien Iodacetamid als reaktive Gruppe verwendet. Dies bietet den Vorteil, dass keine störenden Stereoisomere entstehen und dass die Derivatisierungseffizienz gegenüber der Maleinimido-Derivatisierung erhöht ist. Dadurch werden geringere Überschüsse an Derivatisierungsreagenz benötigt. Die Beschränkung und das Hauptproblem der Quantifizierung basierend auf Cystein-haltigen Peptiden, die in vielen Proteinen in zu geringer Zahl oder gar nicht vorliegen, um eine verlässliche Quantifizierung erreichen zu können, bleibt jedoch weiterhin bestehen.

Als *Underestimation* wird die Tendenz mehr oder weniger großer Verhältnisse von differentiell markierten Peptiden während der relativen Quantifizierung unterschiedlicher Proben bezeichnet, sich Verhältnissen von 1:1 anzunähern. So kann bspw. ein theoretisches Verhältnis von 0,2:1 experimentell als 0,4:1, bzw. ein Verhältnis von 20:1 als 10:1 gemessen werden. In der Literatur wird als Ursache für die *Underestimation* oft der Hintergrund in Proteomproben angegeben (Bantscheff *et al.* 2008; Ow *et al.* 2009). Damit sind viele niedrig abundante Proteine gemeint, die im Hintergrund in Verhältnissen von 1:1 vorliegen und bei der Auswahl der Vorläuferionen in ähnlichen Massenbereichen liegen. Diese werden dann in der MS/MS-Analyse mit fragmentiert. Für die Auswertung von iTRAQ-Daten wird aus diesem Grund bspw. eine Hintergrundkorrektur vorgeschlagen (Proteinpilot) (H. Wang *et al.* 2012). Ow *et al.* empfehlen dagegen die Verwendung hochauflösender chromatographischer Trennungen zur Reduktion der Hintergrundionen (Ow *et al.* 2011) oder hochauflösender Massenspektrometer um eine möglichst scharfe Vorläuferionen-Auswahl zu erreichen (Ow *et al.* 2009). Der Hintergrund in Proteomproben erklärt jedoch nicht die bei der Analyse der Einzelpeptide auftretende *Underestimation* der Verhältnisse $\geq 10:1$. Es ist wie bereits diskutiert, eher anzunehmen, dass die schwächeren Reportersignale des 114-markierten Peptids (bzw. 115 und 116) nicht korrekt dargestellt werden, da schwächere Signale oft einer Peakverbreiterung unterliegen. Dies verhindert die genaue Integration/Bestimmung der Peakflächen bzw. führt dazu, dass die Peakflächen zu große Werte erhalten. Zur relativen Quantifizierung werden diese Peakflächen ins Verhältnis gesetzt. Wenn die aufgrund der schlechten Signale zu groß geschätzten Flächen im Nenner stehen, resultiert ein kleineres Verhältnis, als erwartet. Das Verhältnis tendiert gegen 1 und ist somit „unterschätzt“. Die Bestimmung dieser Verhältnisse ist wegen der Verwendung von Signalen niedriger Intensität damit besonders fehleranfällig. Die untersten S/N-Grenzen müssten (jedoch auf Kosten der Sensitivität) hochgesetzt werden, d.h. nur Signale mit höheren S/N-Werten zur Analyse

zugelassen werden. Um für die iTRAQ-Quantifizierung in diesen Fällen eine genauere Quantifizierung zu erreichen, wurde die Verwendung anspruchsvoller Isotopenkorrekturen, sowie die Verwendung hochauflösender Instrumente vorgeschlagen (Ow *et al.* 2009). Da die Flächen der extrahierten Ionenchromatogramme bei der DOTA-Quantifizierung der 6-Protein-Mischung meist über mehrere Spots bestimmt werden, könnten die Flächen hier möglicherweise genauer bestimmt werden. Wie zuvor erwähnt müsste hier jedoch die Spotfrequenz hinsichtlich Genauigkeit der Quantifizierung aber auch unter Berücksichtigung der Sensitivität optimiert werden.

V.2.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Metall-Markierungsstrategie nicht nur zu quantitativen Fragestellungen in der Element-Massenspektrometrie herangezogen werden kann, sondern auch eine Alternative in der molekularen MS darstellt. Sie bietet bestimmte Vorteile, wie bspw. den großen dynamischen Bereich und die umfassenden Multiplexing Kapazitäten. Diese Vorteile müssen nicht unbedingt nur auf die quantitative Analyse von, aus Proteinen stammenden Peptiden beschränkt sein, sie könnten auch an anderen Biomolekülen wie z.B. Aminosäuren und Peptidhormonen erprobt werden, insofern diese eine entsprechende Derivatisierungsstelle enthalten.

Die MS-basierte Quantifizierung kann also eher als MS/MS-basierte (isobare) Markierungsstrategien empfohlen werden, wenn sehr stark unterschiedliche Peptid- oder Proteinverhältnisse zu erwarten sind, bspw. wenn Peptidkonzentrationen während enzymatischer oder chemischer Reaktionen bestimmt werden. Die Ergebnisse, die in der Quantifizierung der niedrig komplexen Probe erzielt wurden, weisen darauf hin, dass die Methode möglicherweise zur relativen Quantifizierung proteomischer Proben herangezogen werden könnte. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die Strategie eher für zielgerichtete Fragestellungen in der Proteomanalyse nützlich. Um die Methode jedoch an komplexen Proteomen anwenden zu können, wird noch eine Reihe weiterer Entwicklungen notwendig, vor allem in Bezug auf die Datenanalyse. Für die MALDI MS basierte Messung als Offline-Methode wäre eine automatisierbare Methode zur intelligenten Auswahl der Vorläuferionen anhand der Massenabstände zwischen den differentiell-(Lanthanoid) markierten Peptiden sinnvoll. So würden weniger redundante Daten generiert werden, bzw. eine höhere Anzahl an Identifizierungen wäre möglich. Bei der Messung von chromatographischen Replikaten könnten bspw. in der ersten Trennung nur die Lutetium markierten Peptide, im nächsten Lauf nur die Holmium markierten Peptide usw. fragmentiert werden, sodass durch die Messung der

Replikate sich unterstützende Daten gewonnen werden. Anhand der Massenabstände zwischen den unterschiedlich markierten Peptiden kann noch vor der MS/MS-Analyse die Anzahl der Modifikationen ermittelt werden. So lässt sich auch erkennen ob es sich um Peptide mit endständigem Lysin oder Arginin handelt.

Eine automatisierte Auswahl der Vorläuferionen anhand ihrer Massenabstände ist bspw. für ICAT-Analysen in der GPS-Software möglich und kann auch auf Metall-DOTA-markierte Proben angepasst werden. Die Analyse ist hier jedoch nur auf zwei Kanäle beschränkt und lässt zudem keine Retentionszeitunterschiede zu. Sie ist also nicht mit Multiplexing-Ansätzen kompatibel. Auch für ICPL-Analysen ist eine Software erhältlich die eine Auswahl der Vorläuferionen anhand ihrer Massenabstände erlaubt. Hier ist die Analyse jedoch auf vier unterschiedliche Kanäle beschränkt (Brunner *et al.* 2010; Rainczuk *et al.* 2013). Zur Analyse von Vollproteomen sollte die Verwendung unterschiedlicher Trennungsmodele wie bspw. zweidimensionale Trennungen (Kombinationen aus Kationenaustausch-Chromatographie und Umkehrphasen-Chromatographie, bzw. Umkehrphasen-Chromatographie bei hohem pH-Wert und Umkehrphasen-Chromatographie bei niedrigem pH Wert) erprobt werden und die Elutionsverhalten in Abhängigkeit vom Metall genauer untersucht werden.

V.3 Analyse von Proteaseaktivitäten mittels Massenspektrometrie

Da Proteasen eine große Rolle in fast allen zellulären Prozessen spielen, besteht ein großes Interesse daran, sowohl ihre Substratspezifitäten als auch ihre kinetischen Eigenschaften genau zu charakterisieren. Der im zweiten Teil der Arbeit gefundene große lineare Bereich der DOTA-basierten relativen Quantifizierung sollte hier für die zeitaufgelöste Bestimmung proteolytischer Aktivitäten verwendet werden. Mit Hilfe der umfassenden Multiplexing-Kapazitäten des Metal-Chelat-Labelings konnte die proteolytische Neurotensin-Umsetzung anhand 8 verschiedener Substratkonzentrationen simultan quantifiziert werden. Unter Berücksichtigung der Lutetium- und Ytterbium-markierten internen Standards konnte somit ein 10plex-Ansatz gemessen werden. Für den Einsatz in einem Multisubstrat-Ansatz mit anschließender chromatographischer Trennung sollten jedoch keine, in Bezug auf die Masse zu weit auseinander liegende Lanthanoide verwendet werden, da sich diese deutlich in ihren Retentionszeiten unterscheiden können. Im zweiten Teil der Arbeit wurde jedoch auch gezeigt, dass eine ausreichend genaue Quantifizierung trotz Retentionszeitunterschieden für die gleichzeitige Verwendung von ^{152}Sm und ^{175}Lu (die 13 Da auseinanderliegen) zusammen mit ^{159}Tb und ^{165}Ho erreicht wurde. Andererseits sollten die Metalle wegen überlappender

Isotopenmuster so gewählt werden, dass ihre m/z Werte mindestens 3 Da auseinander liegen. In Abbildung 4.21 (B) und (C) ist bspw. gut zu erkennen, dass sich der Peak des +2-Isotopen von ^{139}La und der monoisotopische Peak von ^{141}Pr überschneiden. Des Weiteren ist in den Spektren der gesamten Abbildung 4.21 zu erkennen, dass die gleichzeitige Verwendung 10 unterschiedlicher Lanthanoide einen größeren Massenbereich des Spektrums ausfüllt. Dies ist für die Analyse eines Multi-Substrat-Ansatzes problematisch. Hier ist nämlich die Wahrscheinlichkeit groß, dass mehrere Produkte und Signale im ähnlichen Massenbereich entstehen. Sich überlappende Produkte und Substrate würden die Quantifizierung eines zeitabhängigen Verhaltens unterschiedlichster Produkte und Substrate erschweren/verhindern.

V.3.1 Einzelsubstratanalyse

Ein wichtiger Punkt bei der quantitativen Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentrationen ist das Abstoppen der Enzymaktivität. Die Bedingungen zur irreversiblen Enzymaktivierung wurden wie beschrieben in Vorexperimenten untersucht. Insbesondere während der Derivatisierung ist es wichtig, dass die Enzymaktivität vollständig abgestoppt wird, da hier bei neutralem pH ideale Bedingungen für das Enzym vorliegen. Des Weiteren wurden die Spektren der Neurotensin-Proteolyse auf Restproteaseaktivität nach der Derivatisierung untersucht.

Bei unvollständiger Inaktivierung des Trypsins könnte der ISS bspw. nach Vereinigung mit ISP und den anderen Proben durch die Restaktivität des Trypsins gespalten werden. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Verdau von DOTA-markierten und auch komplexierten Neurotensin zwar langsamer erfolgt, aber durchaus detektierbar ist. Außerdem würden sich dann die Produktkonzentrationen der einzelnen Zeitpunkte kaum unterscheiden, denn nach dem Abstoppen der Proben in Inhibitorlösung erfolgt eine mindestens einstündige Inkubation der Proben mit dem Derivatisierungsreagenz bei $\text{pH} > 7,5$ in welcher Restaktivitäten von Trypsin den größten Teil des Substrats verdauen würden. Diese Restaktivität kann weitestgehend also ausgeschlossen werden.

Die bereits zuvor beschriebenen Signale des underivatisierten Neurotensins, die in allen Spektren zu finden sind, werden nicht durch einen Verlust des angehängten *Labels* während der MS-Analyse verursacht. Diese Signale sind höchstwahrscheinlich auf eine unvollständige Derivatisierung zurück zu führen. Die Menge an underivatisiertem Neurotensin ist in den einzelnen Ansätzen noch klein in Bezug auf die Signalintensitäten der derivatisierten internen

Substrat- und Produktstandards (3-5%). Nach Vereinigung aller Ansätze und Hinzufügen des internen Substratstandards, summieren sich diese Signale jedoch zu einem größeren. Da jedoch für alle Ansätze die gleiche Derivatisierungslösung verwendet wurde, stört dies die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Proteolyse nur wenig. Werden jedoch Proben niedrigerer Konzentration untersucht, sollte die Derivatisierung komplett sein, da es sonst zur Suppression und verschlechterten Detektion der Signale von Interesse kommen kann.

Wie bereits beschrieben sind kleinere Unterschiede (bis zu 13%) bei der Konzentrationsbestimmung von N-terminalem und C-terminalem Produkt aufgetreten. In Abbildung 4.22 ist zu erkennen, dass die Konzentrationen des C-terminalen Produktes die des N-terminalen Produktes zu jedem bestimmten Zeitpunkt der Analyse überschreiten – in der Theorie sollten jedoch beide gleich sein. Eine mögliche Ursache hierfür ist bspw., dass das Signal des Ytterbium-markierten N-terminalen Standards, durch Verunreinigungen oder Matrixcluster in diesem Massenbereich, supprimiert ist. Das Verhältnis von Tm-markiertem Produkt zu Yb-markiertem Produkt-Standards, das der Produktkonzentration eines bestimmten Zeitpunktes entspricht, wird somit größer.

V.3.2 Multisubstrat-Analyse

Insgesamt wurden in Tabelle A.7 und A.8 im Anhang 70 Produkte und 51 Substrate in mehreren LC-Trennungen, d.h. zu mehreren Verdauzeitpunkten zugeordnet. Nach der Datenbankanalyse und Auswertung mithilfe der Mascot-Distiller-Software wurden insgesamt 203 unterschiedliche Peptidsequenzen zugeordnet. Alle Verhältnisse $\text{Ln}/\text{Yb} > 2$ oder $\text{Ln}/\text{Lu} > 2$ wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Des Weiteren wurde jede Substratkonzentration zu jedem Zeitpunkt mit zwei unterschiedlichen Lanthanoiden komplexiert und nach inversem *Labeling* ergeben sich pro Zeitpunkt und Substratkonzentration vier verschiedene Lanthanoid/IS-Verhältnisse. Bei zwei Substratkonzentrationen und neun untersuchten Zeitpunkten ergeben sich also pro Peptid maximal 72 Datenpunkte. Alle Peptidsequenzen mit weniger als 40 Datenpunkten (um eine ausreichende Statistik zu gewährleisten) wurden ebenfalls nicht weiter untersucht, sodass die restlichen 121, in Tabelle A.7 und A.8 aufgeführten Sequenzen, verbleiben. Im Vergleich zu den 156 Peptiden die im zweiten Teil, der relativen Quantifizierung eines Ln^{3+} -DOTA-markierten Verdaus (Amino-gerichtete Markierung) von 6 Proteinen erreicht wurden, liegt hier eine geringere Anzahl an Peptididentifizierungen vor. Hierfür gibt es jedoch eine ganze Reihe möglicher Ursachen.

Zum einen entstehen durch den Verdau mit zwei Proteasen eine ganze Reihe kleiner Peptide, die entweder aus dem Massenbereich der Analyse fallen oder deren *ion score* nicht für eine eindeutige Zuordnung ausreichen. In Kapitel IV.1.1 konnte in einer MS-Analyse (PMF-Analyse) gezeigt werden, dass nach Ln^{3+} -DOTA Markierung (Amino-gerichtete Derivatisierung) viele Peptide mit weniger als 5 Aminosäuren mit hohen Signalintensitäten zugeordnet werden, die durch die Markierung den erforderlichen Massenbereich überschreiten. Diese sind jedoch in der MS/MS-Analyse nicht zuzuordnen, da sie den erforderlichen „*ion score cut off*“ nicht überschreiten. Für jede MS/MS-Messung müssen in Abhängigkeit von der Komplexität der Probe optimale Messbedingungen gefunden werden. Hier spielt die Anzahl der Laserschüsse pro MS/MS-Spektrum und die max. Anzahl an Vorläuferionen, die pro Spot ausgewählt werden eine große Rolle. Wird die Zahl der Laserschüsse pro Fragmentspektrum zu gering gewählt, entstehen eventuell zu viele Spektren mit niedriger Qualität – bei einer hohen Zahl von Laserschüssen ist die Probe eventuell bereits nach wenigen Fragmentspektren aufgebraucht bzw. der Spot durch den Laserbeschuss abgetragen. Um den Spotabtrag durch die Fragmentierung abundanter Peptide mit hohen Schusszahlen gering zu halten, wurde bei der MS/MS-Analyse, der in der Gerätesoftware enthaltene *DynamicExit*TM-Algorithmus als Stoppmethode verwendet. Mithilfe des Algorithmus bestimmt die Software anhand des spektralen Rauschens die Spektrenqualität und beendet die MS/MS-Messung des Vorläuferions, sobald ein benutzerdefiniertes Niveau überschritten wird. Hierdurch wird der Probenverbrauch pro Spot und die Messzeit reduziert. Die Einstellungen des *DynamicExit*TM-Algorithmus müssten eventuell für die vorliegende Fragestellung neu evaluiert werden. Eine weitere Möglichkeit um den Spotabtrag zu minimieren wäre bspw. zuerst die Peptide in einem höheren Massenbereich (bspw. ab 1500 Da) zu fragmentieren. Diese enthalten wahrscheinlich mehr Sequenzinformation, aber weniger hohe MS-Signalintensitäten. Ferner ist anzunehmen, dass die hohe Abundanz der kleineren Peptide auch zur (Ionen-) Suppression der längeren Peptide (in der Quelle) führen.

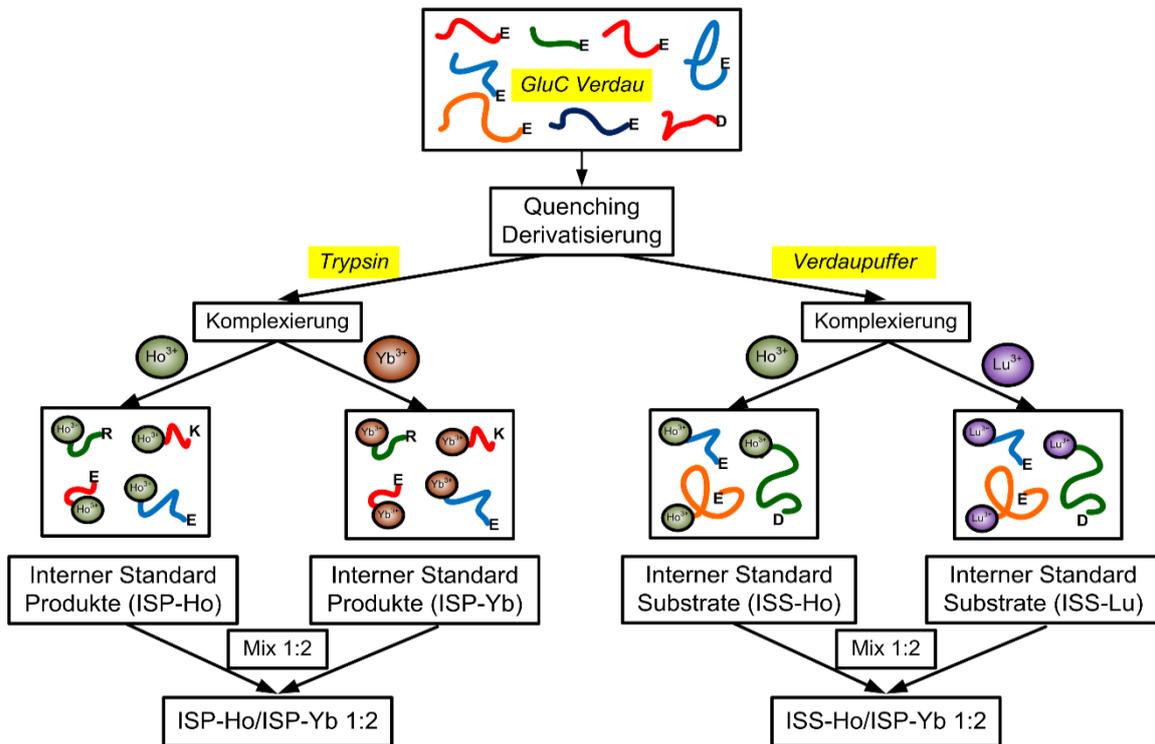
Zum anderen ist die automatische Vorläuferionenauswahl, wie bereits beschrieben, ein Grund dafür, dass ein großer Anteil redundanter Daten erzeugt wird, sodass ein mit unterschiedlichen Metallen markiertes Peptid mehrmals fragmentiert wird. Weniger abundante Peptide hingegen werden dann möglicherweise überhaupt nicht mehr fragmentiert. Jedoch kann wie bereits erwähnt aufgrund des Spotabtrags die Anzahl der pro Spot ausgewählten Vorläuferionen nicht beliebig erhöht werden. Die effizienteste Auswahl der Vorläuferionen zur Analyse des zeitlichen Verlaufs, wäre vorab eine Liste der entstehenden

Produkte und der abgebauten Substrate zu erstellen. Dazu wurden einige Vorexperimente durchgeführt. Der Grundgedanke ist, dass anhand der Massenabstände der differentiell (d.h. mit unterschiedlichen Lanthanoiden) markierten Peptide zwischen echten Substraten, echten Produkten und nichtspaltbaren Peptiden unterschieden werden soll, d.h. die Detektion von Substrat und Produkt schon in der MS-Analyse ohne Fragmentierung erfolgen kann. Dazu wurde wie in Kapitel IV.3.2 beschrieben jeweils interner Produkt- und interner Substratstandard hergestellt. Nach Derivatisierung der Standards mit NHS-DOTA wurden beide Standards gesplittet. Der ISP wurde neben Ytterbium noch mit Holmium markiert und der ISS neben Lutetium ebenfalls mit Holmium. Für den ISP wurden die Ansätze mit Holmium und Ytterbium im Verhältnis 1:2 vereinigt, für den ISS entsprechend (Abbildung 5.6 A). Das Verhältnis von 1:2 ist insofern notwendig, dass zur Detektion der Paare und zur Erstellung der *Inclusion*-Listen die „ICAT-pair selection“-Funktion der GPS-Explorer Software verwendet wurde. Hier wurde die Option gewählt nur Paare mit einem Verhältnis von 1:2 (mit einer gewissen Toleranz) zur weiteren Analyse auszusuchen und davon jeweils das intensivere Signal auf die *Inclusion*-Liste zur MS/MS-Messung zusetzen. Nach chromatographischer Trennung und MS-Analyse ergeben sich für die Substrate und Produkte die in Abbildung 5.6 B gezeigten Signalaare, d.h. Produkte sind über einen Massenabstand von $x \cdot 7$ Da (x entspricht der Anzahl an Ln^{3+} -DOTA-Modifikationen) zuzuordnen. Für Substrate beträgt dieser Abstand den Wert von $x \cdot 10$ Da. So erhält man eine Liste zur MS/MS-Analyse der Produkte und eine Liste zur Analyse der Substrate. Neben den spaltbaren Substraten die ein internes Lysin oder Arginin enthalten und den nach Spaltung entstandenen Produkten, sind in der Analyse auch nichtspaltbare Peptide vorhanden.

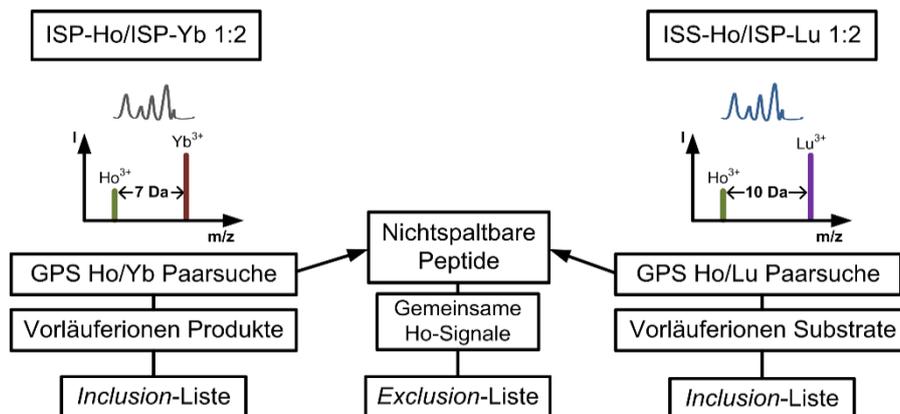
Von allen Paaren auf beiden Listen werden schließlich die Holmium-Signale verglichen. Die Duplikate auf beiden Listen entsprechen dann den nicht-spaltbaren Peptiden und werden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Neben der getrennten Analyse besteht auch die Möglichkeit den differentiell markierten ISP und ISS zu vereinen und in einem einzigen Lauf zu trennen. Hier ergeben sich nach MS-Analyse die in Abbildung 5.6 C gezeigten Signalaare oder Signaltupletts. Entsprechend der Analyse in separaten Trennungen sind auch hier die Produkte über einen Massenabstand von $x \cdot 7$ Da und ein Verhältnis von 1:2 (Ho/Yb) zuzuordnen. Die Substrate entsprechend über einen Abstand von $x \cdot 10$ Da und ebenfalls ein Verhältnis von 1:2 (Ho/Lu). Die nichtspaltbaren Peptide können hier jedoch einfach durch ein Signaltuplett mit einem 1:1:1 Verhältnis vom Ho:Yb:Lu zugeordnet werden und somit von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden.

(A) Herstellung der internen Standards



(B) Getrennte Analyse von ISP und ISS



(C) Gemeinsame Analyse von ISP und ISS

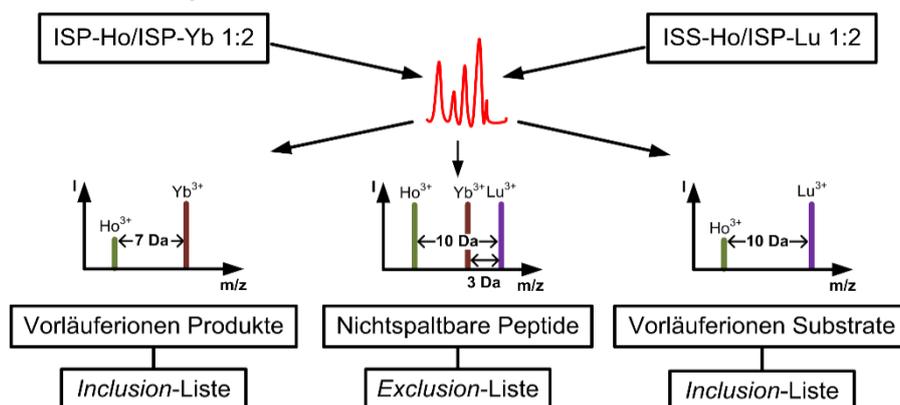


Abb. 5.6: Schematische Darstellung möglicher Methoden zur Identifizierung potentieller Substrate und Produkte. Diese können lediglich der Massendifferenzen (und der Intensitätsverhältnisse) der differentiell markierten Peptide zugeordnet werden. (A) Nach Herstellung der internen Standards, werden jeweils die beiden Ansätze ISP (interner Standard Produkt) und ISS (interner Standard Substrat) gesplittet und mit zwei unterschiedlichen Lanthanoiden komplexiert und die differentiell markierten Ansätze im Verhältnis 1:2 vereinigt. (B) Nach getrennter Analyse von ISP und ISS müssen die nichtspaltbaren Peptide durch den Vergleich der in beiden Ansätzen gefundenen Ho-Signale ausgesondert werden. (C) Nach gemeinsamer Analyse von ISP und ISS können die nichtspaltbaren Peptide durch ein Signaltuplett mit Intensitätsverhältnissen von 1:1:1 zugeordnet werden.

Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. Die Erstellung der Produkt- und Substratlisten ist in beiden Fällen durch die GPS-Explorer-Suche nach 1:2 Verhältnissen mit den entsprechenden Massenabständen möglich. Die Zuordnung der nichtspaltbaren Peptide bei separater Trennung ist jedoch nicht möglich und muss manuell vorgenommen werden. Bei gemeinsamer Trennung ist die Zuordnung der nichtspaltbaren Peptide über die GPS-Explorer-Software bspw. über ein 1:1 Verhältnis von Yb/Lu möglich. Die Identifizierung von Signaltupletts jedoch nicht. Zudem ist die gemeinsame Analyse von Produkten und Substraten weniger sensitiv, da die Probe hier durch die Vereinigung von ISP und ISS wesentlich komplexer ist.

Ein Problem der gesamten Analyse sind die bereits erwähnten Beschränkungen der GPS-Explorer-Software. Zum einen können bei jeder Analyse nur zwei Metalle, d.h. zwei unterschiedliche Markierungen analysiert werden. Zum anderen werden die Verhältnisse nur anhand der Intensitäten oder Flächen des Signalaars in einem einzigen Spot berechnet. Da jedoch bei der Derivatisierung mit NHS-DOTA Retentionszeitunterschiede zwischen den markierten Peptiden auftreten liegen ihre Elutionsmaxima häufig nicht innerhalb eines Spots, sodass die Bestimmung der Verhältnisse ungenau ist. Die Verhältnisse müssten also wie bei der Mascot Distiller Software, aus den extrahierten Ionenchromatogrammen berechnet werden und Retentionszeitunterschiede (mit definierten Grenzen) müssten zugelassen werden. Die ungenaue Berechnung der Verhältnisse resultierte schließlich in einer breiten Streuung um den Erwartungswert, sodass die Strategie zur vorab Bestimmung der Substrate und Produkte nicht weiter verfolgt wurde. Hier würde somit eine Software benötigt die in der Lage ist die Signalaare (Duplets) nicht nur anhand eines einzigen Massenspektrums zu identifizieren, sondern auch innerhalb einer chromatographischen Trennung, wo die

entsprechenden Signale über mehrere Spots bzw. Massenspektren verteilt sind, wie das bspw. bei ICPL*Quant* der Fall ist (Brunner *et al.* 2010).

V.3.3 Zusammenfassung

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Ln³⁺-DOTA-Derivatisierung (Amino-gerichtete Markierung) viele flexible Möglichkeiten zur Identifizierung proteolytischer Substrate und Produkte sowie der Untersuchung proteolytischer Aktivitäten bietet, die jedoch aufgrund fehlender anspruchsvoller Software bislang nicht ausreichend genutzt werden können. Da die zu untersuchende proteolytische Reaktion vor der Derivatisierung erfolgt, können hier native Substrate verwendet werden. Somit kommen alle möglichen Arten von Substraten infrage, vom synthetischen Peptid bis hin zu komplexen Proteomen. Auch die Wahl der Protease ist lediglich auf die Verfügbarkeit einer geeigneten Stoppmethode beschränkt. Die gleichzeitige Untersuchung von Substrat und Produkt wurde sowohl in Einzelspotanalysen als auch in einem LC-MALDI-Arbeitsablauf durchgeführt. Da die Quantifizierung der Proteaseaktivitäten auf Peptidebene erfolgt, muss eine ausreichende Anzahl an Replikaten generiert werden. Dies ist durch die Multiplexing-Kapazitäten der Metall-Markierung gegeben.

Literaturverzeichnis

- Aebersold, Ruedi & Mann, Matthias 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 6928, 198–207.
- Ahrends, Robert *et al.* 2007. A Metal-coded Affinity Tag Approach to Quantitative Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 11, 1907–1916.
- Ahrends, Robert *et al.* 2009. Metal-Coded Affinity Tag Labeling: A Demonstration of Analytical Robustness and Suitability for Biological Applications. *Analytical Chemistry* 81, 6, 2176–2184.
- Anderson, N. Leigh & Anderson, Norman G. 1998. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *ELECTROPHORESIS* 19, 11, 1853–1861.
- Atkinson, Kendall E. 1989. *An introduction to Numerical Analysis*. 2. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Bahr, U. *et al.* 1997. Delayed extraction time-of-flight MALDI mass spectrometry of proteins above 25000 Da. *Journal of Mass Spectrometry* 32, 10, 1111–1116.
- Bantscheff, Marcus *et al.* 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 4, 1017–1031.
- Bantscheff, Marcus *et al.* 2008. Robust and Sensitive iTRAQ Quantification on an LTQ Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics* 7, 9, 1702–1713.
- Barber, M. *et al.* 1981. Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry. *Nature* 293, 5830, 270–275.
- Beavis, Ronald C., Chait, Brian T. & Standing, K. G. 1989. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 3, 12, 436–439.
- Bénazeth, Simone *et al.* 1998. Temperature and pH Dependence XAFS Study of Gd(DOTA)- and Gd(DTPA)₂- Complexes: Solid State and Solution Structures. *Inorganic Chemistry* 37, 15, 3667–3674.
- Benda, David *et al.* 2014. Quantification of intact covalently metal labeled proteins using ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 49, 1, 13–18.
- Bergmann, U. *et al.* 2012. Application of Metal-Coded Affinity Tags (MeCAT): Absolute Protein Quantification with Top-Down and Bottom-Up Workflows by Metal-Coded Tagging. *Analytical Chemistry* 84, 12, 5268–5275.
- Bettmer, Jörg 2010. Application of isotope dilution ICP–MS techniques to quantitative proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 8, 3495–3502.
- Bomke, Susanne *et al.* 2010. Liquid chromatography with complementary electrospray and inductively coupled plasma mass spectrometric detection of ferrocene-labelled peptides and proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 8, 3503–3513.

- Bothner, Brian *et al.* 2000. Monitoring Enzyme Catalysis with Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 275, 18, 13455–13459.
- Brancia, Francesco L., Oliver, Stephen G. & Gaskell, Simon J. 2000. Improved matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of proteins following guanidination of lysine-containing peptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14, 21, 2070–2073.
- Brown, Mark A. 1984. Transition metal–chelate complexes as relaxation modifiers in nuclear magnetic resonance. *Medical Physics* 11, 1, 67.
- Brunner, Achim *et al.* 2010. ICPLQuant – A software for non-isobaric isotopic labeling proteomics. *PROTEOMICS* 10, 2, 315–326.
- Bungert, Ditte, Heinzle, Elmar & Tholey, Andreas 2004. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the determination of enzyme activities. *Analytical Biochemistry* 326, 2, 167–175.
- Bunkenborg, Jakob & Matthiesen, Rune 2007. Interpretation of Collision-Induced Fragmentation Tandem Mass Spectra of Posttranslationally Modified Peptides. In R. Matthiesen *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 169–194. <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59745-275-0%3A169> [Stand 2014-11-10].
- Bünzli, Jean-Claude G. 2006. Benefiting from the Unique Properties of Lanthanide Ions. *Accounts of Chemical Research* 39, 1, 53–61.
- Bursey, Maurice M. 1978. H. D. Beckey. Principles of field ionization and field desorption mass spectrometry. Pergamon Press, Oxford, 1977. *Biological Mass Spectrometry* 5, 7, iii–iii.
- Byegård, J., Skarnemark, G. & Skålberg, M. 1999. The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 241, 2, 281–290.
- Casey, Tammy M., Meade, Josephine L. & Hewitt, Eric W. 2007. Organelle Proteomics Identification of the Exocytic Machinery Associated with the Natural Killer Cell Secretory Lysosome. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 5, 767–780.
- Del Castillo Busto, M. Estela *et al.* 2008. Stable isotope labelling and FPLC–ICP–SFMS for the accurate determination of clinical iron status parameters in human serum. *The Analyst* 133, 3, 379.
- Del Castillo Busto, M. Estela, Montes-Bayón, Maria & Sanz-Medel, Alfredo 2006. Accurate Determination of Human Serum Transferrin Isoforms: Exploring Metal-Specific Isotope Dilution Analysis as a Quantitative Proteomic Tool. *Analytical Chemistry* 78, 24, 8218–8226.
- Cerda, Blas A, Cornett, Leticia & Wesdemiotis, Chrys 1999. Probing the interaction of alkali and transition metal ions with bradykinin and its des-arginine derivatives via matrix-assisted laser desorption/ionization and postsorce decay mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 193, 2–3, 205–226.

- Chait, Brian T. 2006. Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? *Science* 314, 5796, 65–66.
- Chang, C. A. *et al.* 1993. Synthesis, Characterization, and Crystal Structures of M(do3a) (m = Fe, Gd) and Na[m(dota)] (m = Fe, Y, Gd). *Inorganic Chemistry; (United States)* 32:16, . <http://www.osti.gov/scitech/biblio/5110644> [Stand 2014-09-24].
- Chen, Hsuan-shen *et al.* 2005. Enhanced characterization of complex proteomic samples using LC-MALDI MS/MS: exclusion of redundant peptides from MS/MS analysis in replicate runs. *Analytical Chemistry* 77, 23, 7816–7825.
- Chen, Jian-Ge *et al.* 1993. Electrical double-layer models of ion-modified (ion-pair) reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 656, 1–2, 549–576.
- Churchward, Matthew A. *et al.* 2005. Enhanced detergent extraction for analysis of membrane proteomes by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteome Science* 3, 1, 5.
- Corbett, Joseph M. *et al.* 1994. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: An interlaboratory comparison. *ELECTROPHORESIS* 15, 1, 1205–1211.
- Corthals, Garry L. *et al.* 2000. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. *ELECTROPHORESIS* 21, 6, 1104–1115.
- Dawson, P. H. 1976. Quadrupole mass spectrometry and its applications. *Elsevier* 215.
- Delmotte, Nathanaël *et al.* 2009. Repeatability of peptide identifications in shotgun proteome analysis employing off-line two-dimensional chromatographic separations and ion-trap MS. *Journal of Separation Science* 32, 8, 1156–1164.
- Delmotte, Nathanaël *et al.* 2007. Two-Dimensional Reversed-Phase × Ion-Pair Reversed-Phase HPLC: An Alternative Approach to High-Resolution Peptide Separation for Shotgun Proteome Analysis. *Journal of Proteome Research* 6, 11, 4363–4373.
- Deng, An-Ping *et al.* 2002. Reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay using ferrocene tethered hydroxysuccinimide ester as label for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Analytica Chimica Acta* 472, 1-2, 55–61.
- D Meyer, M. Schaefer 1988. Gd-DOTA, a potential MRI contrast agent. Current status of physicochemical knowledge. *Investigative radiology* 23 Suppl 1, S232–5.
- Dole, Malcolm *et al.* 1968. Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* 49, 5, 2240–2249.
- Dongré, Ashok R. *et al.* 1996. Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model. *Journal of the American Chemical Society* 118, 35, 8365–8374.

- Dreisewerd, Klaus *et al.* 1995. Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 141, 2, 127–148.
- Eng, Jimmy K., McCormack, Ashley L. & Yates III, John R. 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 5, 11, 976–989.
- Esteban-Fernández, Diego, Ahrends, Robert & Linscheid, Michael W. 2012. MeCAT peptide labeling for the absolute quantification of proteins by 2D-LC-ICP-MS. *Journal of Mass Spectrometry* 47, 6, 760–768.
- Esteban-Fernández, Diego, Scheler, Christian & Linscheid, Michael W. 2011. Absolute protein quantification by LC-ICP-MS using MeCAT peptide labeling. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 2, 657–666.
- Fenn, J.B. *et al.* 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 4926, 64–71.
- Froelich, Jennifer & Reid, Gavin 2009. The Effect of Post-Translational and Process-Induced Modifications on the Multistage Gas-Phase Fragmentation Reactions of Protonated Peptides. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 12, 2, 175–184.
- Galeva, Nadezhda *et al.* 2003. Direct Identification of Cytochrome P450 Isozymes by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight-Based Proteomic Approach. *Drug Metabolism and Disposition* 31, 4, 351–355.
- Gerber, S. A. *et al.* 2001. Direct profiling of multiple enzyme activities in human cell lysates by affinity chromatography/electrospray ionization mass spectrometry: application to clinical enzymology. *Analytical Chemistry* 73, 8, 1651–1657.
- Gerber, Scott A. *et al.* 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 12, 6940–6945.
- Gilar, Martin *et al.* 2005a. Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* 77, 19, 6426–6434.
- Gilar, Martin *et al.* 2005b. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *Journal of Separation Science* 28, 14, 1694–1703.
- Glueckmann, Matthias 2009. OptiBeam™ On-Axis Laser Irradiation on the AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 System. *Applied Biosystems and MDS Inc. Joint Owners* .
- Goodrich, G. W. & Wiley, W. C. 1962. Continuous Channel Electron Multiplier. *Rev. Sc. Instr.* 33, 7, 761–762.
- Görg, Angelika, Weiss, Walter & Dunn, Michael J. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *PROTEOMICS* 4, 12, 3665–3685.

- Gregory, John D. 1955. The Stability of N-Ethylmaleimide and its Reaction with Sulfhydryl Groups. *Journal of the American Chemical Society* 77, 14, 3922–3923.
- Gross, Jürgen H. 2011. *Mass Spectrometry*. 2nd ed. Springer.
- Gusev, Arkady I. *et al.* 1996. Direct quantitative analysis of peptides using matrix assisted laser desorption ionization. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 354, 4, 455–463.
- Gygi, Steven P. *et al.* 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* 17, 10, 994–999.
- Hann, Stephan *et al.* 2006. Studying metal integration in native and recombinant copper proteins by hyphenated ICP-DRC-MS and ESI-TOF-MS capabilities and limitations of the complementary techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21, 11, 1224–1231.
- Hansen, Kirk C. *et al.* 2003. Mass Spectrometric Analysis of Protein Mixtures at Low Levels Using Cleavable ¹³C-Isotope-coded Affinity Tag and Multidimensional Chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics* 2, 5, 299–314.
- Hillenkamp, Franz & Peter-Katalinić, Jasna 2007. Front Matter. In *MALDI MS*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, I–XVI. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527610464.fmatter/summary> [Stand 2014-07-28].
- Horn, David M., Zubarev, Roman A. & McLafferty, Fred W. 2000. Automated de novo sequencing of proteins by tandem high-resolution mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 19, 10313–10317.
- Huber, C. G., Kleindienst, G. & Bonn, G. K. 1997. Application of micropellicular polystyrene/divinylbenzene stationary phases for high-performance reversed-phase liquid chromatography electrospray-mass spectrometry of proteins and peptides. *Chromatographia* 44, 7-8, 438–448.
- Hu, Qizhi *et al.* 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* 40, 4, 430–443.
- Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. 1976. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics* 64, 6, 2287–2294.
- Jaskolla, Thorsten W. & Karas, Michael 2011. Compelling Evidence for Lucky Survivor and Gas Phase Protonation: The Unified MALDI Analyte Protonation Mechanism. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 22, 6, 976–988.
- Jaskolla, Thorsten W., Lehmann, Wolf-Dieter & Karas, Michael 2008. 4-Chloro- α -cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 34, 12200–12205.
- Johnson, Richard S., Martin, Stephen A. & Biemann, Klaus 1988. Collision-induced fragmentation of (M + H)⁺ ions of peptides. Side chain specific sequence ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 86, 137–154.

- Kalkhof, Stefan & Sinz, Andrea 2008. Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392, 1-2, 305–312.
- Kang, M. J., Tholey, A. & Heinzle, E. 2000. Quantitation of low molecular mass substrates and products of enzyme catalyzed reactions using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 14, 21, 1972–1978.
- Karas, Michael, Glückmann, Matthias & Schäfer, Jürgen 2000. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 1, 1–12.
- Karas, Michael & Hillenkamp, Franz 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60, 20, 2299–2301.
- Karas, Michael & Krüger, Ralf 2003. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chemical Reviews* 103, 2, 427–440.
- Keller, Andrew *et al.* 2002. Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search. *Analytical Chemistry* 74, 20, 5383–5392.
- Keller, Bernd O & Li, Liang 2000. Discerning matrix-cluster peaks in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra of dilute peptide mixtures. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11, 1, 88–93.
- Keough, T., Youngquist, R. S. & Lacey, M. P. 1999. A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsource decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 13, 7131–7136.
- Kerr, Thomas J., Gant-Branum, Randi L. & McLean, John A. 2011. Multiplexed analysis of peptide functionality using lanthanide-based structural shift reagents. *International Journal of Mass Spectrometry* 307, 1–3, 28–32.
- Kerr, Thomas J. & McLean, John A. 2010. Peptide quantitation using primary amine selective metal chelation labels for mass spectrometry. *Chemical Communications* 46, 30, 5479–5481.
- Kevin Demeure, Loïc Quinton 2007. Rational selection of the optimum MALDI matrix for top-down proteomics by in-source decay. *Analytical chemistry* 79, 22, 8678–85.
- Khan, M. Niyaz 1984. Kinetics and mechanism of the alkaline hydrolysis of maleimide. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 73, 12, 1767–1771.
- Kim, Jong-Seo, Kim, Ji-Hyun & Kim, Hie-Joon 2008. Matrix-assisted laser desorption/ionization signal enhancement of peptides by picolinamidation of amino groups. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 4, 495–502.
- Klose, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 3, 231–243.

- Knight, P 1979. Hydrolysis of p-NN'-phenylenebismaleimide and its adducts with cysteine. Implications for cross-linking of proteins. *Biochemical Journal* 179, 1, 191–197.
- Knochenmuss, Richard 2006. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* 131, 9, 966–986.
- Knochenmuss, R. & Zenobi, R. 2003. MALDI ionization: the role of in-plume processes. *Chemical Reviews* 103, 2, 441–452.
- Konermann, Lars & Douglas, Donald J. 2002. Pre-steady-state kinetics of enzymatic reactions studied by electrospray mass spectrometry with on-line rapid-mixing techniques. In Daniel L. Purich *Methods in Enzymology*. Enzyme Kinetics and Mechanism Part F: Detection and Characterization of Enzyme Reaction Intermediates. Academic Press, 50–64. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687902540052> [Stand 2014-08-8].
- Kromidas, Stavros & Kuss, Hans -Joachim 2012. *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*. Weinheim: Wiley-VCH. <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:101:1-201408153766> [Stand 2015-05-17].
- Kumar, Krishan *et al.* 1994. Synthesis, Stability, and Structure of Gadolinium(III) and Yttrium(III) Macrocyclic Poly(amino carboxylates). *Inorganic Chemistry* 33, 16, 3567–3575.
- Kussmann, Martin *et al.* 1997. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Peptide Mapping of the Neural Cell Adhesion Protein Neurolin Purified by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis or Acidic Precipitation. *Journal of Mass Spectrometry* 32, 5, 483–493.
- Kutscher, Daniel J. *et al.* 2008. Protein labelling with mercury tags: fundamental studies on ovalbumin derivatised with p-hydroxymercuribenzoic acid (pHMB). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23, 10, 1359–1364.
- Lathia, Urja S. *et al.* 2010. Development of inductively coupled plasma–mass spectrometry-based protease assays. *Analytical Biochemistry* 398, 1, 93–98.
- Lathia, Urja S. *et al.* 2011. Multiplexed protease assays using element-tagged substrates. *Analytical Biochemistry* 408, 1, 157–159.
- Lehmann, W. D. 1996. *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Liesener, André & Karst, Uwe 2005a. Assessing protease activity pattern by means of multiple substrate ESI-MS assays. *Analyst* 130, 6, 850–854.
- Liesener, André & Karst, Uwe 2005b. Monitoring enzymatic conversions by mass spectrometry: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382, 7, 1451–1464.
- Liu, Huiling *et al.* 2006. Method for Quantitative Proteomics Research by Using Metal Element Chelated Tags Coupled with Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 78, 18, 6614–6621.

- Liu, Xin *et al.* 2001. 4:3- β -naphthopyrone-4-acetic acidN-hydroxysuccinimidyl ester as a fluorescent labeling reagent for amino acids and oligopeptides in high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 53, 5-6, 326–330.
- Lottspeich, Friedrich & Engels, Joachim W. 2012. *Bioanalytik*. 3. Aufl. Springer. <http://www.springer.com/springer+spektrum/biowissenschaften/biochemie/book/978-3-8274-2942-1> [Stand 2014-09-24].
- Magerstädt, Michael *et al.* 1986. Gd(DOTA): An alternative to Gd(DTPA) as a T1,2 relaxation agent for NMR imaging or spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 3, 5, 808–812.
- Marshall, Alan G., Hendrickson, Christopher L. & Jackson, George S. 1998. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews* 17, 1, 1–35.
- McAlister, Graeme C. *et al.* 2012. Increasing the multiplexing capacity of TMT using reporter ion isotopologues with isobaric masses. *Analytical chemistry* 84, 17, 7469–7478.
- Melander, W. R., el Rassi, Z. & Horváth, C. 1989. Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions in biopolymer chromatography. Effect of salts on the retention of proteins. *Journal of Chromatography* 469, 3–27.
- Meng, C. K., Mann, M. & Fenn, J. B. 1988. Of protons or proteins. *Zeitschrift für Physik D Atoms, Molecules and Clusters* 10, 2-3, 361–368.
- Meng, Zhaojing & Limbach, Patrick A. 2005. Quantitation of Ribonucleic Acids Using ¹⁸O Labeling and Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 77, 6, 1891–1895.
- Meyer, Veronika R. 2009. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 10., vollst. überarb. und erw. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Mintz, G. R. 1993. Technical note: an irreversible serine protease inhibitor. 6, 34–38.
- Molnár, Imre & Horváth, Csaba 1977. Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phases by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 142, 623–640.
- Morris, Howard R. *et al.* 1981. Fast atom bombardment: A new mass spectrometric method for peptide sequence analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 101, 2, 623–631.
- Mørtz, E. *et al.* 1996. Sequence tag identification of intact proteins by matching tandem mass spectral data against sequence data bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 16, 8264–8267.
- Norris, Andrew J. *et al.* 2001. Analysis of Enzyme Kinetics Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Multiple Reaction Monitoring: Fucosyltransferase V†. *Biochemistry* 40, 13, 3774–3779.
- Northrop, John H. 1932. CRYSTALLINE TRYPSIN. *The Journal of General Physiology* 16, 2, 323–337.

- Oberacher, Herbert, Premstaller, Andreas & Huber, Christian G. 2004. Characterization of some physical and chromatographic properties of monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene) columns. *Journal of Chromatography*. A 1030, 1-2, 201–208.
- Oda, Y. *et al.* 1999. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 12, 6591–6596.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250, 10, 4007–4021.
- Olsen, Jesper V. *et al.* 2005. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. *Molecular & Cellular Proteomics* 4, 12, 2010–2021.
- Ong, Shao-En *et al.* 2002. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 5, 376–386.
- Overberg, A. *et al.* 1990. Matrix-assisted infrared-laser (2.94 μm) desorption/ionization mass spectrometry of large biomolecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 4, 8, 293–296.
- Overberg, A. *et al.* 1991. Matrix-assisted laser desorption of large biomolecules with a TEA-CO₂-laser. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5, 3, 128–131.
- Ow, Saw Yen *et al.* 2009. iTRAQ Underestimation in Simple and Complex Mixtures: “The Good, the Bad and the Ugly”. *Journal of Proteome Research* 8, 11, 5347–5355.
- Ow, Saw Yen *et al.* 2011. Minimising iTRAQ ratio compression through understanding LC-MS elution dependence and high-resolution HILIC fractionation. *PROTEOMICS* 11, 11, 2341–2346.
- Papayannopoulos, Ioannis A. 1995. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrometry Reviews* 14, 1, 49–73.
- Paradela, Alberto & Albar, Juan Pablo 2008. Advances in the Analysis of Protein Phosphorylation. *Journal of Proteome Research* 7, 5, 1809–1818.
- Pashkova, Anna, Moskovets, Eugene & Karger, Barry L. 2004. Coumarin Tags for Improved Analysis of Peptides by MALDI-TOF MS and MS/MS. 1. Enhancement in MALDI MS Signal Intensities. *Analytical Chemistry* 76, 15, 4550–4557.
- Paul, W. & Steinwedel, H. 1953. A new mass spectrometer without magnetic field. *Zeitschrift für Naturforschung* 448–50.
- Pereira Navaza, Ana *et al.* 2009. Capillary HPLC–ICPMS and Tyrosine Iodination for the Absolute Quantification of Peptides Using Generic Standards. *Analytical Chemistry* 81, 13, 5390–5399.
- Perkins, David N. *et al.* 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 18, 3551–3567.

- Pertea, Mihaela & Salzberg, Steven L. 2010. Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. *Genome Biology* 11, 5, 206.
- Picotti, Paola *et al.* 2009. Full Dynamic Range Proteome Analysis of *S. cerevisiae* by Targeted Proteomics. *Cell* 138, 4, 795–806.
- Picotti, Paola, Aebersold, Ruedi & Domon, Bruno 2007. The Implications of Proteolytic Background for Shotgun Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 9, 1589–1598.
- Pieper, Stefan *et al.* 2009. Fragmentation behavior of metal-coded affinity tag (MeCAT)-labeled peptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 13, 2045–2052.
- Pieper, Stefan 2008. *Metallchelatkompelxe für die element-massenspektroetrische Quantifizierung von Peptiden und Proteinen*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Pitteri, Sharon J., Chrisman, Paul A. & McLuckey, Scott A. 2005. Electron-Transfer Ion/Ion Reactions of Doubly Protonated Peptides: Effect of Elevated Bath Gas Temperature. *Analytical chemistry* 77, 17, 5662–5669.
- Pottiez, Gwenael *et al.* 2012. Comparison of 4-plex to 8-plex iTRAQ Quantitative Measurements of Proteins in Human Plasma Samples. *Journal of Proteome Research* 11, 7, 3774–3781.
- Prange, Andreas & Pröfrock, Daniel 2008. Chemical labels and natural element tags for the quantitative analysis of bio-molecules. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23, 4, 432–459.
- Premstaller, Andreas *et al.* 2001. High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using Monolithic Capillary Columns for Proteomic Studies. *Analytical Chemistry* 73, 11, 2390–2396.
- Rainczuk, Adam *et al.* 2013. The utility of isotope-coded protein labeling for prioritization of proteins found in ovarian cancer patient urine. *Journal of Proteome Research* 12, 9, 4074–4088.
- Rappel, Christina & Schaumlöffel, Dirk 2009. Absolute Peptide Quantification by Lutetium Labeling and NanoHPLC–ICPMS with Isotope Dilution Analysis. *Analytical Chemistry* 81, 1, 385–393.
- Reid, Gavin E. & McLuckey, Scott A. 2002. ‘Top down’ protein characterization via tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 37, 7, 663–675.
- Roepstorff, P. & Fohlman, J. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* 11, 11, 601.
- Ross, Philip L. *et al.* 2004. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Molecular & Cellular Proteomics* 3, 12, 1154–1169.
- Runge, V M *et al.* 1988. MR imaging of rat brain glioma: Gd-DTPA versus Gd-DOTA. *Radiology* 166, 3, 835–838.

- Samyn, Bart *et al.* 2004. A case study of de novo sequence analysis of N-sulfonated peptides by MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 15, 12, 1838–1852.
- Schaumlöffel, Dirk *et al.* 2007. Precolumn Isotope Dilution Analysis in nanoHPLC–ICPMS for Absolute Quantification of Sulfur-Containing Peptides. *Analytical Chemistry* 79, 7, 2859–2868.
- Schlüter, Hartmut *et al.* 2003. Detection of protease activities with the mass-spectrometry-assisted enzyme-screening (MES) system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377, 7-8, 1102–1107.
- Schmidt, Alexander, Kellermann, Josef & Lottspeich, Friedrich 2005. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *PROTEOMICS* 5, 1, 4–15.
- Schnölzer, M., Jedrzejewski, P. & Lehmann, W. D. 1996. Protease-catalyzed incorporation of ^{18}O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* 17, 5, 945–953.
- Schwarz, Gunnar *et al.* 2014. DOTA based metal labels for protein quantification: a review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29, 2, 221–233.
- Schwarz, Gunnar *et al.* 2011. MeCAT—new iodoacetamide reagents for metal labeling of proteins and peptides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 4, 1203–1209.
- Smirnov, I. P. *et al.* 2004. Suppression of α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Matrix Clusters and Reduction of Chemical Noise in MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 76, 10, 2958–2965.
- Spengler, Bernhard *et al.* 1992. Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 6, 2, 105–108.
- Stafford Jr., G. C. *et al.* 1984. Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 60, 1, 85–98.
- Stewart, N. A. *et al.* 2002. Improved peptide detection with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry by trimethylation of amino groups. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16, 15, 1448–1453.
- Syka, John E. P. *et al.* 2004. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 26, 9528–9533.
- Sze, Siu Kwan *et al.* 2002. Top-down mass spectrometry of a 29-kDa protein for characterization of any posttranslational modification to within one residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 4, 1774–1779.
- Szpunar, Joanna 2005. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *The Analyst* 130, 4, 442.

- Tabb, David L. *et al.* 2003. Statistical Characterization of Ion Trap Tandem Mass Spectra from Doubly Charged Tryptic Peptides. *Analytical Chemistry* 75, 5, 1155–1163.
- Tang, Xue-Jun *et al.* 1994. Investigation of protein-protein noncovalent interactions in soybean agglutinin by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 8, 9, 750–754.
- Taylor, Geoffrey 1964. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 280, 1382, 383–397.
- Thermo Finnigan 2005. Finnigan ELEMENT XR: Extended Dynamic Range High Resolution ICP-MS.
- Tholey, Andreas, Reed, Jennifer & Lehmann, Wolf D. 1999. Electrospray tandem mass spectrometric studies of phosphopeptides and phosphopeptide analogues. *Journal of Mass Spectrometry* 34, 2, 117–123.
- Tholey, Andreas & Schaumlöffel, Dirk 2010. Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively-coupled plasma mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29, 5, 399–408.
- Tholey, Andreas, Zabet-Moghaddam, Masoud & Heinzle, Elmar 2006. Quantification of Peptides for the Monitoring of Protease-Catalyzed Reactions by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using Ionic Liquid Matrixes. *Analytical Chemistry* 78, 1, 291–297.
- Thompson, Andrew *et al.* 2003. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry* 75, 8, 1895–1904.
- Verentchikov, A. N., Ens, W. & Standing, K. G. 1994. Reflecting time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ion source and orthogonal extraction. *Analytical Chemistry* 66, 1, 126–133.
- Vestal, Marvin L. & Campbell, Jennifer M. 2005. Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometry. In A. L. Burlingame *Methods in Enzymology*. Biological Mass Spectrometry. Academic Press, 79–108. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687905020033> [Stand 2014-09-23].
- Vestal, M. L., Juhasz, P. & Martin, S. A. 1995. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 9, 11, 1044–1050.
- Waentig, Larissa, Roos, Peter H. & Jakubowski, Norbert 2009. Labelling of antibodies and detection by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24, 7, 924–933.
- Wang, Hongxia, Hicks, Leslie M. & Alvarez, Sophie 2012. Tips for Data Processing of iTRAQ Labeling Quantitative Proteomics Using ProteinPilot and its Background Correction Factor. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* 23, Suppl, S55.

- Wängler, Carmen *et al.* 2011. DOTA derivatives for site-specific biomolecule-modification via click chemistry: Synthesis and comparison of reaction characteristics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 12, 3864–3874.
- Wang, Meng *et al.* 2010. ICP-MS-Based strategies for protein quantification. *Mass Spectrometry Reviews* 29, 2, 326–348.
- Wang, Xin *et al.* 2012. Multiplex relative quantitation of peptides and proteins using amine-reactive metal element chelated tags coupled with mass spectrometry. *Analytical Methods* 4, 6, 1629–1632.
- Washburn, Michael P., Wolters, Dirk & Yates, John R. 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* 19, 3, 242–247.
- Wasinger, Valerie C. *et al.* 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *ELECTROPHORESIS* 16, 1, 1090–1094.
- Werner, Thilo *et al.* 2012. High-Resolution Enabled TMT 8-plexing. *Analytical Chemistry* 84, 16, 7188–7194.
- Werner, Thilo *et al.* 2014. Ion Coalescence of Neutron Encoded TMT 10-Plex Reporter Ions. *Analytical Chemistry* 86, 7, 3594–3601.
- Whetstone, Paul A. *et al.* 2004. Element-Coded Affinity Tags for Peptides and Proteins. *Bioconjugate Chemistry* 15, 1, 3–6.
- Wiese, Sebastian *et al.* 2007. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *PROTEOMICS* 7, 3, 340–350.
- Wind, Mathias, Gosenca, Darko, *et al.* 2003. Stable isotope phospho-profiling of fibrinogen and fetuin subunits by element mass spectrometry coupled to capillary liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 317, 1, 26–33.
- Wind, Mathias, Wegener, Ansgar, *et al.* 2003. Sulfur as the Key Element for Quantitative Protein Analysis by Capillary Liquid Chromatography Coupled to Element Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition* 42, 29, 3425–3427.
- Wind, Mathias, Wesch, Horst & Lehmann, Wolf D. 2001. Protein Phosphorylation Degree: Determination by Capillary Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 73, 13, 3006–3010.
- Wolters, Dirk A., Washburn, Michael P. & Yates, John R. 2001. An Automated Multidimensional Protein Identification Technology for Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry* 73, 23, 5683–5690.
- Woods, Mark *et al.* 2004. Solution Dynamics and Stability of Lanthanide(III) (S)-2-(p-Nitrobenzyl)DOTA Complexes. *Inorganic Chemistry* 43, 9, 2845–2851.
- Wu, Christine C. *et al.* 2004. Metabolic Labeling of Mammalian Organisms with Stable Isotopes for Quantitative Proteomic Analysis. *Analytical Chemistry* 76, 17, 4951–4959.

- Wysocki, Vicki H. *et al.* 2000. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 12, 1399–1406.
- Yates, John R. *et al.* 1995. Method to Correlate Tandem Mass Spectra of Modified Peptides to Amino Acid Sequences in the Protein Database. *Analytical Chemistry* 67, 8, 1426–1436.
- Zaikin, Vladimir G. & Halket, John M. 2006. Derivatization in mass spectrometry--8. Soft ionization mass spectrometry of small molecules. *European Journal of Mass Spectrometry (Chichester, England)* 12, 2, 79–115.
- Zenobi, Renato & Knochenmuss, Richard 1998. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 17, 5, 337–366.
- Zhang, Wei-Jie *et al.* 2012. Site-specific DOTA/europium-labeling of recombinant human relaxin-3 for receptor-ligand interaction studies. *Amino Acids* 43, 2, 983–992.
- Zhou, Huilin *et al.* 2002. Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry. *Nature Biotechnology* 20, 5, 512–515.
- Zubarev, Roman A. *et al.* 1999. Electron Capture Dissociation of Gaseous Multiply-Charged Proteins Is Favored at Disulfide Bonds and Other Sites of High Hydrogen Atom Affinity. *Journal of the American Chemical Society* 121, 12, 2857–2862.
- Zubarev, Roman A. & Yang, Hongqian 2010. Multiple soft ionization of gas-phase proteins and swift backbone dissociation in collisions with ≤ 99 eV electrons. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 49, 8, 1439–1441.

Anhang

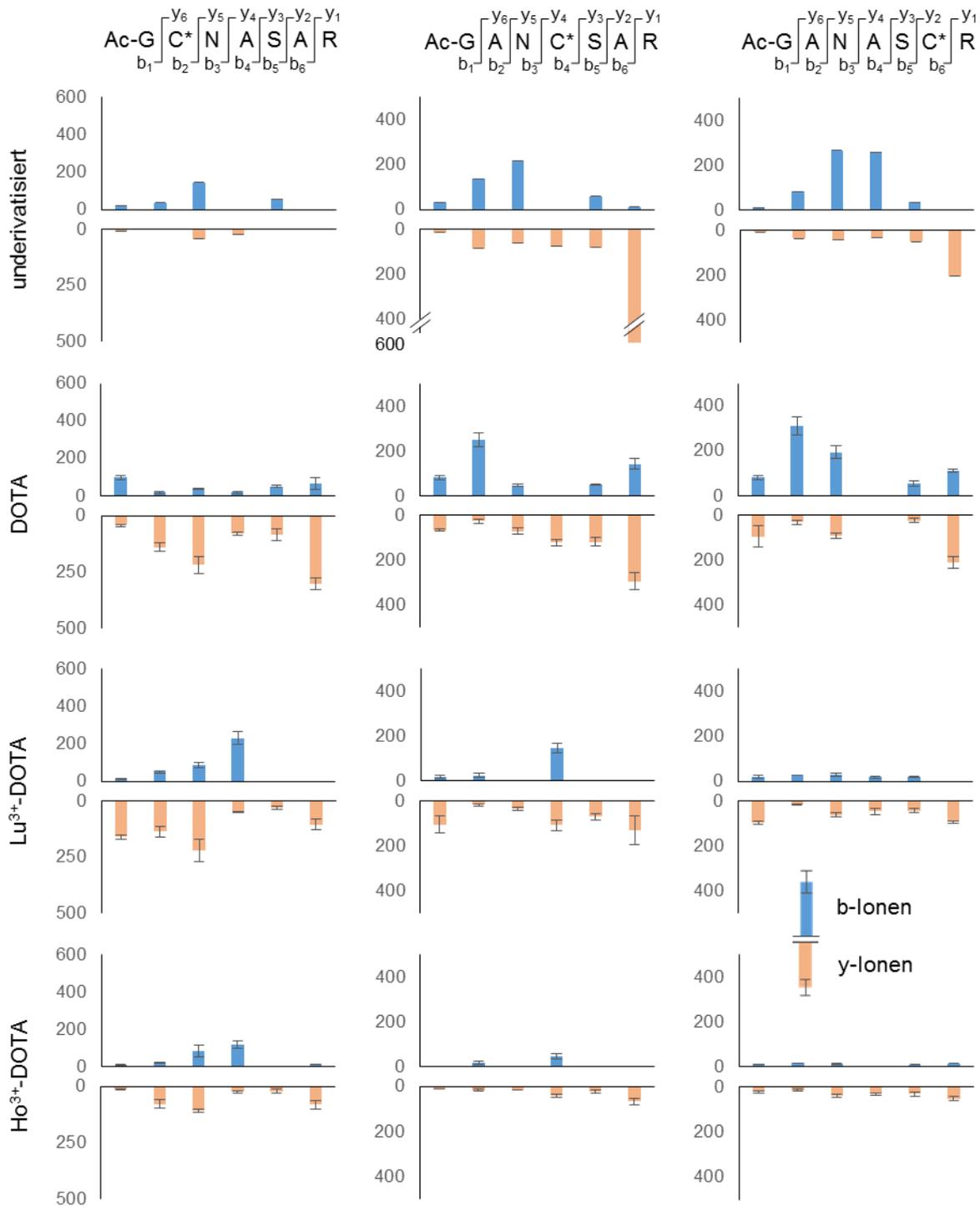


Abb. A.1: S/N-Verhältnisse der b- und y-Ionen der drei Peptide S31, S32 und S33 vor und nach Derivatisierung mit Maleinimido-DOTA und Beladung mit Ln³⁺-Ionen, dargestellt im Säulendiagramm, welche durch Fragmentierung mittels CID entstehen.

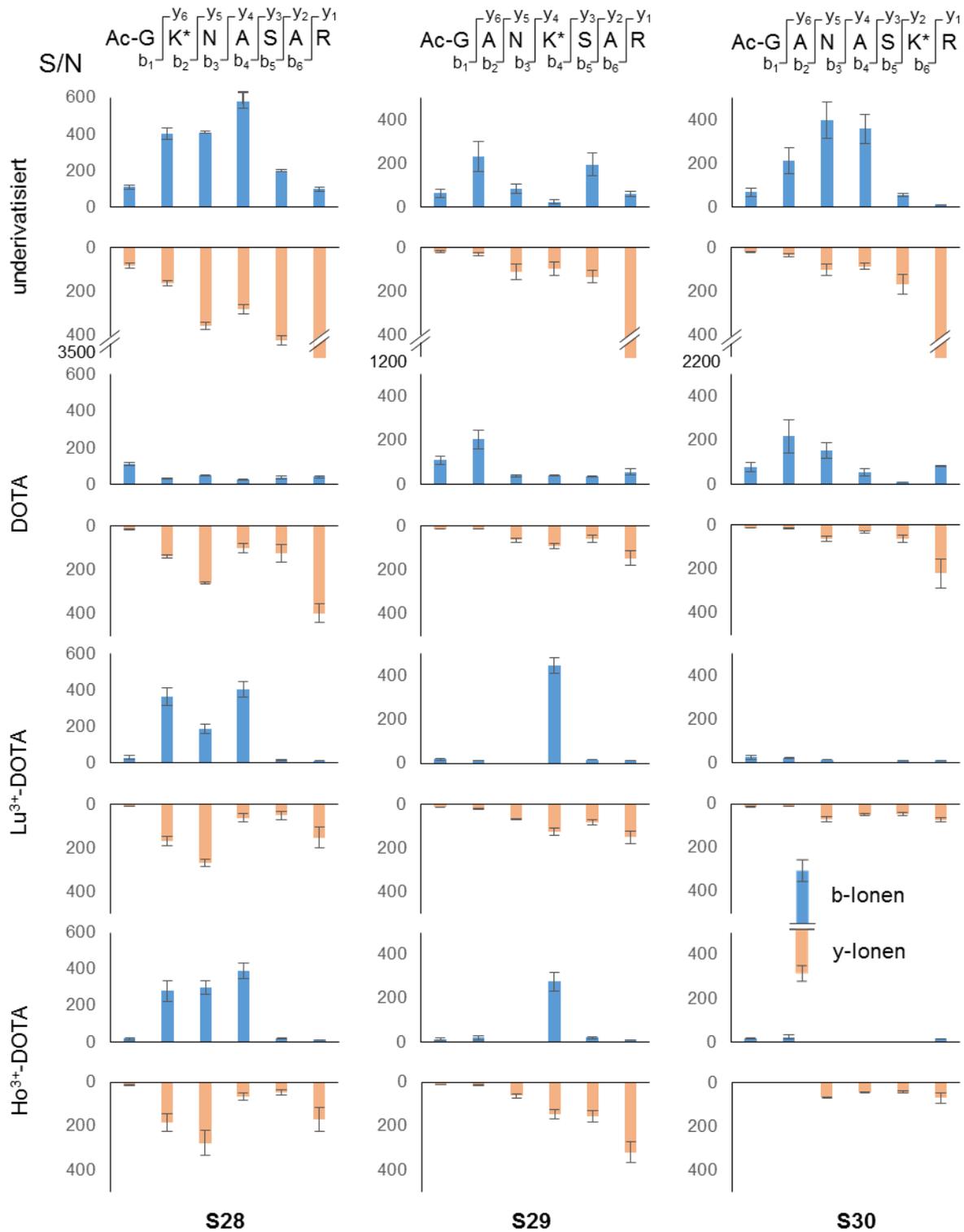


Abb. A.2: S/N-Verhältnisse der b- und y-Ionen der drei Peptide S28, S29 und S30, dargestellt im Säulendiagramm vor und nach Derivatisierung mit NHS-DOTA und Beladung mit Ln^{3+} -Ionen, welche durch Fragmentierung mittels CID entstehen.

Tab. A.1: Ergebnisse der LC-MALDI MS/MS-Analyse der 6-Protein-Mischung nach Methylthiolierung mit MMTS bzw. Lu³⁺-DOTA Markierung (Sulfhydryl-gerichtete Derivatisierung). Die aufgelisteten identifizierten Peptide beziehen sich nur auf Peptide, deren *ion score* über dem *identity threshold* ($p < 0.05$) liegt. In Klammern ist die Anzahl der identifizierten und derivatisierten Cystein-haltigen Peptide angegeben. Die markierten Cysteine sind innerhalb der Peptidsequenz hervorgehoben und mit Asterisken markiert. Ein “X” gibt eine Peptididentifizierung an, für ein “-“ gilt keine Identifizierung mittels MS/MS-Analyse.

Proteinname	Protein ID	# Identifizierter Peptide (Cystein-Peptide)		<i>protein score</i>		Sequenzabdeckung [%]	
		MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA
Serotransferrin	TRFE_BOVIN	23 (4)	31 (12)	2070	2663	30,7	40,5
	Peptidsequenz	MMTS	Lu-DOTA				
	C*LVEK	-	X				
	C*LASIAK	-	X				
	TSHMDC*IK	-	X				
	ENFEVLC*K	-	X				
	KTSHMDC*IK	-	X				
	LLEAC*TFHKP	-	X				
	ILESGPFVSC*VK	X	X				
	WC*TISTHEANK	X	X				
	C*GLVPVLAENYK	-	X				
	C*LMEGAGDVAFVK	X	X				
	ILESGPFVSC*VKK	-	X				
	ESKPPDSSKDEC*MVK	-	X				
	NYELLC*GDNTR	X	-				
	DSADGFLK	-	X				
	GYLAVAVVK	X	X				
	YYGYTGAFR	X	X				
	DLLFRDDTK	-	X				
	DTDFKLNELR	X	X				
	WCTISTHEANK	X	X				
	NYELLCGDNTR	X	X				
	ILNKQQDDFGK	X	-				
	ELPDPQESIQR	X	X				
	KDTDFKLNELR	X	-				
	TSDANINWNNLK	X	X				
	KNYELLCGDNTR	-	X				
	TYDSYLGDDYVR	X	X				
	DLLFKDSADGFLK	-	X				
	KTYDSYLGDDYVR	X	X				
	DNPQTHYYAVAVVK	X	X				
	HSTVFDNLPNPEDR	-	X				
	LYKELPDPQESIQR	X	X				
	DNPQTHYYAVAVVKK	X	X				
	DKPDNFQLFQSPHGK	X	X				
	TSDANINWNNLKDKK	X	X				
	HSTVFDNLPNPEDRK	X	X				
	CACSNHEPYFGYSGAFK	X	X				
	DQTVIQNTDGNNNEAWAK	X	X				

Proteinname	Protein ID	# Identifizierter Peptide (Cystein-Peptide)		<i>protein score</i>		Sequenzabdeckung [%]	
		MMTS	Lu DOTA	MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA

Serotransferrin TRFE_BOVIN 23 (4) 31 (12) 2070 2663 30,7 40,5

Peptidsequenz	MMTS	Lu-DOTA
C*LVEK	-	X
C*LASIAK	-	X
TSHMDC*IK	-	X
ENFEVLC*K	-	X
KTSHMDC*IK	-	X
LLEAC*TFHKP	-	X
ILESGPFVSC*VK	X	X
WC*TISTHEANK	X	X
C*GLVPVLAENYK	-	X
C*LMEGAGDVAFVK	X	X
ILESGPFVSC*VKK	-	X
ESKPPDSSKDEC*MVK	-	X
NYELLC*GDNTR	X	-
DSADGFLK	-	X
GYLAVAVVK	X	X
YYGYTGAFR	X	X
DLLFRDDTK	-	X
DTDFKLNELR	X	X
WCTISTHEANK	X	X
NYELLCGDNTR	X	X
ILNKQQDDFGK	X	-
ELPDPQESIQR	X	X
KDTDFKLNELR	X	-
TSDANINWNNLK	X	X
KNYELLCGDNTR	-	X
TYDSYLGDDYVR	X	X
DLLFKDSADGFLK	-	X
KTYDSYLGDDYVR	X	X
DNPQTHYYAVAVVK	X	X
HSTVFDNLPNPEDR	-	X
LYKELPDPQESIQR	X	X
DNPQTHYYAVAVVKK	X	X
DKPDNFQLFQSPHGK	X	X
TSDANINWNNLKDKK	X	X
HSTVFDNLPNPEDRK	X	X
CACSNHEPYFGYSGAFK	X	X
DQTVIQNTDGNNNEAWAK	X	X

Proteinname	Protein ID	# Identifizierter Peptide (Cystein-Peptide)		protein score		Sequenzabdeckung [%]	
		MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA
Serotransferrin	TRFE_HUMAN	23 (9)	25 (10)	1728	1834	30,9	33,1
Peptidsequenz	MMTS	Lu-DOTA					
KASYLDC*IR	X	-					
WC*ALSHHER	X	-					
ASYLDC*IR	-	X					
C*DEWSVNSVGK	X	X					
WC*AVSEHEATK	X	X					
C*LKDAGDVAFVK	X	X					
SVIPSDGPSVAC*VK	X	X					
LKC*DEWSVNSVGK	-	X					
DQYELLC*LDNTR	-	X					
FDEFFSEGC*APGSK	X	X					
DC*HLAQVPSHTVVAR	X	X					
SDNC*EDTPEAGYFAVAVVK	-	X					
KPVEEYANC*HLAR	X	-					
NPDPWAK	X	X					
DSAHGFLK	X	X					
ASYLDCIR	-	X					
DGAGDVAFVK	X	X					

YLGEELYVK	X	X
DSGFQMNQLR	X	X
SASDLTWDNLK	X	X
HSTIFENLANK	X	X
YLGEELYVK	X	X
DSGFQMNQLR	X	X
SASDLTWDNLK	X	X
HSTIFENLANK	X	X
MYLGYEYVTAIR	X	X
SKEFQLFSSPHGK	X	X
EDPQTFYYAVAVVK	X	X

Proteinname	Protein ID	# Identifizierter Peptide (Cystein-Peptide)		protein score		Sequenzabdeckung [%]	
		MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA
Serumalbumin	ALBU_BOVIN	15 (2)	21 (6)	1266	1377	22,2	29,8
	Peptidsequenz	MMTS	Lu-DOTA				
LC*VLHEK	-	X					
QNC*DQFEK	-	X					
SHC*IAEVEK	-	X					
SLHTLFGDELK	-	X					
YIC*DNQDTISSK	X	X					
DDPHAC*YSTVFDK	-	X					
TC*VADESHAGC*EK	X	-					
LSQKFPK	X	-					
AEFVEVTK	X	X					
YLVEIAR	X	X					
DLGEEHFK	X	X					
QTALVELLK	X	X					
KQTALVELLK	X	X					
LVNELTEFAK	X	X					
FKDLGEEHFK	X	X					
HPEYAVSVLLR	-	X					
HLVDEPQNLK	X	X					
EYEATLEECCA	-	X					
TVMENFVAFVDK	-	X					
RHPEYAVSVLLR	X	X					
LGEYGFQNALIVR	X	X					
VPQVSTPTLVEVSR	X	X					
KVPQVSTPTLVEVSR	X	X					

Proteinname	Protein ID	# Identifizierter Peptide (Cystein-Peptide)		protein score		Sequenzabdeckung [%]	
		MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA
Lysozym	LYSC_CHICK	7 (2)	7 (2)	775	692	53,1	58,5
	Peptidsequenz	MMTS	Lu-DOTA				
C*ELAAAMK	-	X					
GYSLGNWVC*AAK	X	X					
WWC*NDGR	X	-					
HGLDNYR	X	X					
GTDVQAWIR	X	X					
FESNFNTQATNR	X	X					
IVSDGNGMNAWVAWR	X	X					

Proteinname	Protein ID	# Identifizierter Peptide (Cystein-Peptide)	protein score	Sequenzabdeckung [%]
-------------	------------	---	---------------	----------------------

		MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA
β -Lactoglobulin	LACB_BOVIN	7 (1)	8 (2)	928	517	27,0	34,8
Peptidsequenz		MMTS	Lu-DOTA				
WENGE C *AQK		X	X				
LSFNPTQLEE QC *HI		-	X				
ALPMHIR		X	X				
TKIPAVFK		X	X				
VLVLDTDYK		X	X				
VLVLDTDYKK		X	X				
TPEVDDEALEK		X	X				
TPEVDDEALEKFDK		X	X				
Proteinname	Protein ID	# Identifizierter Peptide (Cystein-Peptide)		protein score		Sequenzabdeckung [%]	
		MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA	MMTS	Lu-DOTA
α -Lactalbumin	LALBA_BOVIN	3 (2)	5 (4)	176	457	24,6	38,0
Peptidsequenz		MMTS	Lu-DOTA				
C *EVFR		-	X				
LDQW L *EK		X	X				
FLDDDLTDD I M C *VK		-	X				
DDQNP H SS N I C * N I S C * D K		X	X				
VGINYWLAHK		X	X				

Tab. A.2: Ergebnisse der Einzelpeptid-Quantifizierung von S35. Die Bestgeraden wurden in den Diagrammen erstellt, die sich aus dem Vergleich der theoretischen mit den experimentellen Verhältnissen ergeben.

5:1-0,025:1		Lu/Pr	Lu/Sm	Lu/Tb	Lu/Ho	Lu/Tm	117/114	117/115	117/116
Bestimmtheitsmaß	R ²	0,9959	0,9931	0,994	0,9938	0,9917	0,9992	0,9995	0,9905
Steigung	m	1,07	1,08	0,94	0,95	0,91	0,92	0,98	0,97
y-Achsenabschnitt	b	0,03	0,02	0,06	0,02	0,03	0,04	0,04	0,04

Tab. A.3: Zusammenfassung der rel. Standardabweichungen, die sich nach Quantifizierung der Einzelpeptide ergeben.

Ø Standardabweichung [%] (Verhältnisse 50:1-0,5:1)	
	iTRAQ
	DOTA

S35 NHS	7,32	13,31
T1 NHS	4,34	6,70
T1 CYS	4,53	4,97
S36 CYS	6,12	6,75

Tab. A.4: Auflistung der durchschnittlichen experimentellen Verhältnisse die sich aus den Peakflächen der Signale der Metall-DOTA- oder iTRAQ markierten Peptiden S35, T1 und S36 ergeben, sowie Auflistung der relativen Quantifizierungsfehler und der Variationskoeffizienten. Für iTRAQ berechnen sich die experimentellen Verhältnisse aus dem Mittelwert von 117/114, 117/115 und 117/116. Für die Quantifizierung mit DOTA ergeben sich die experimentellen Verhältnisse aus dem Mittelwert von $\text{Lu}^{3+}/\text{Pr}^{3+}$, $\text{Lu}^{3+}/\text{Sm}^{3+}$, $\text{Lu}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$, $\text{Lu}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ und $\text{Lu}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$. 114-117 bzw. Pr^{3+} - Lu^{3+} stehen dabei für die Peakflächen der jeweils 114-117- oder Pr^{3+} - Lu^{3+} -markierten Peptide.

Theoretische Verhältnisse	Experimentelle Verhältnisse		Ø relativer Fehler [%]		Variationskoeffizient [%]	
	iTRAQ	DOTA	iTRAQ	DOTA	iTRAQ	DOTA
S35 (Amino-derivatisiert)						
50:1	27,01 ± 5,73	42,39 ± 1,73	45,97	15,09	21,19	4,08
31,25:1	20,54 ± 4,07	27,90 ± 0,92	34,26	11,78	19,81	3,28
10:1	8,86 ± 0,72	9,58 ± 0,27	11,37	4,50	8,16	2,86
5:1	4,78 ± 0,13	4,80 ± 0,11	4,44	4,35	2,70	2,24
3,75:1	3,75 ± 0,24	3,95 ± 0,08	4,65	5,07	6,49	2,15
2,5:1	2,36 ± 0,14	2,41 ± 0,06	6,02	3,91	5,85	2,36
1:1	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,07	0,57	0,00	0,00
0,5:1	0,53 ± 0,02	0,51 ± 0,00	5,16	1,79	4,54	0,78
0,2:1		0,23 ± 0,01		14,97		2,53
0,1:1		0,14 ± 0,01		42,28		3,65
0,05:1		0,07 ± 0,00		32,45		2,20
0,025:1		0,01 ± 0,00		66,58		4,00
Ø relativer Fehler [%]; Verhältnisse 50-0,5			13,99	5,88		
Ø Variationskoeffizient [%]; Verhältnisse 50-0,5					7,60	2,22

Theoretische Verhältnisse	Experimentelle Verhältnisse		Ø relativer Fehler [%]		Variationskoeffizient [%]	
	iTRAQ	DOTA	iTRAQ	DOTA	iTRAQ	DOTA
T1 (Amino-derivatisiert)						
50:1	22,35 ± 10,97	48,43 ± 11,71	55,29	18,91	49,08	24,19
31,25:1	15,90 ± 5,82	26,35 ± 3,90	49,14	18,98	36,60	14,81
10:1	7,52 ± 1,34	8,80 ± 0,35	24,78	13,69	17,87	4,03
5:1	4,53 ± 0,47	4,59 ± 0,04	9,43	8,54	10,43	0,79
3,75:1	3,45 ± 0,23	3,68 ± 0,03	8,08	2,48	6,77	0,70
2,5:1	2,54 ± 0,11	2,44 ± 0,04	3,94	2,89	4,37	1,52
1:1	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,00	0,47	0,00	0,00
0,5:1	0,50 ± 0,01	0,48 ± 0,00	2,21	3,35	2,77	0,32
0,2:1		0,15 ± 0,00		25,06		1,41
0,1:1		0,05 ± 0,00		52,95		0,43
0,05:1						
0,025:1						
Ø relativer Fehler [%]; Verhältnisse 50-0,5			19,11	8,66		
Ø Variationskoeffizient [%]; Verhältnisse 50-0,5					13,00	5,80

Theoretische Verhältnisse	Experimentelle Verhältnisse		Ø relativer Fehler [%]		Variationskoeffizient [%]	
	iTRAQ	DOTA	iTRAQ	DOTA	iTRAQ	DOTA
T1 (Cysteine derivatisiert)						
50:1	22,35 ± 10,97	36,65 ± 2,57	55,29	22,65	49,08	7,00
31,25:1	15,90 ± 5,82	24,12 ± 0,97	49,14	19,59	36,60	4,00

10:1	7,52 ± 1,34	9,02 ± 0,23	24,78	5,24	17,87	2,56
5:1	4,53 ± 0,47	4,26 ± 0,06	9,43	10,44	10,43	1,41
3,75:1	3,45 ± 0,23	3,48 ± 0,08	8,08	3,05	6,77	2,30
2,5:1	2,54 ± 0,11	2,36 ± 0,06	3,94	1,84	4,37	2,43
1:1	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,00	5,10	0,00	0,00
0,5:1	0,50 ± 0,01	0,53 ± 0,01	2,21	11,61	2,77	1,71
0,2:1		0,28 ± 0,01		49,68		1,87
0,1:1		0,20 ± 0,00		110,01		1,95
0,05:1						
0,025:1						
Ø relativer Fehler [%]; Verhältnisse 50-0,5			19,14	9,94		
Ø Variationskoeffizient [%]; Verhältnisse 50-0,5					13,00	2,68

Theoretische Verhältnisse	Experimentelle Verhältnisse		Ø relativer Fehler [%]		Variationskoeffizient [%]	
	iTRAQ	DOTA	iTRAQ	DOTA	iTRAQ	DOTA
S36 (Cysteine derivatisiert)						
50:1	35,13 ± 24,66	38,35 ± 1,59	43,36	19,98	70,20	4,15
31,25:1	19,85 ± 9,15	20,66 ± 0,58	35,90	31,90	46,11	2,82
10:1	8,01 ± 1,62	8,00 ± 0,09	19,09	16,90	20,20	1,17
5:1	4,22 ± 0,41	4,17 ± 0,11	14,81	13,43	9,67	2,53
3,75:1	3,29 ± 0,20	2,94 ± 0,06	11,36	18,49	5,93	2,08
2,5:1	2,27 ± 0,09	2,30 ± 0,03	8,19	4,33	4,10	1,15
1:1	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,96	3,89	0,00	0,00
0,5:1	0,48 ± 0,00	0,50 ± 0,01	3,01	3,03	0,70	1,22
0,2:1		0,18 ± 0,00		7,43		0,93
0,1:1		0,11 ± 0,00		13,42		1,41
0,05:1		0,06 ± 0,00		30,90		5,57
0,025:1						
Ø relativer Fehler [%]; Verhältnisse 50-0,5			17,08	13,99		
Ø Variationskoeffizient [%]; Verhältnisse 50-0,5					16,68	1,89

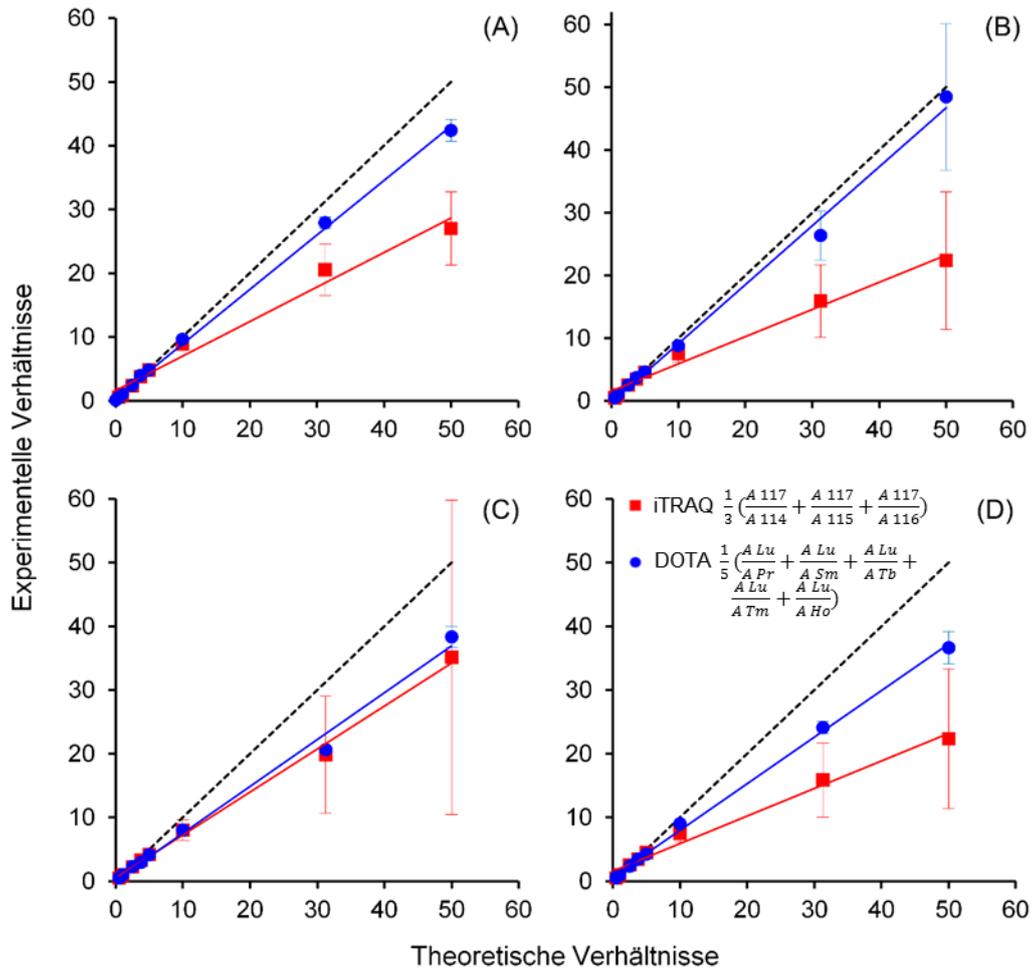


Abb. A.3: Grafische Darstellung der experimentellen Verhältnisse gemittelt über die unterschiedlichen *Label* gegenüber den theoretisch zu erwartenden Verhältnissen für die mit NHS-DOTA derivatisierten Peptide (A) S35, (B) T1 und die mit Maleinimido-DOTA derivatisierten Peptide (C) S36 und (D) T1. Die schwarze gestrichelte Linie repräsentiert die theoretisch zu erwartenden Verhältnisse, während die durchgezogenen Linien die Bestgeraden darstellen.

Tab. A.5: Auflistung der experimentell ermittelten Verhältnisse nach iTRAQ und DOTA-Quantifizierung (mit Amino-gerichteter und Sulfhydryl-gerichteter Markierung) der 6-Proteinmischung, verglichen mit den theoretisch zu erwartenden Verhältnissen, sowie die sich daraus ergebenden relativen Fehler. Proteinverhältnisse die hochabundante Proteine simulieren sind rot markiert, die niedrig abundante Proteine darstellen sind blau markiert.

iTRAQ Proteinname	Theoretische Verhältnisse			Experimentelle Verhältnisse			Relativer Fehler [%]		
	114/115	116/115	117/115	114/115	116/115	117/115	114/115	116/115	117/115
Transferrin (Mensch)	0,04	0,97	0,98	0,13 ± 0,12	1,02 ± 0,23	1,01 ± 0,46	190,01	5,77	2,77
Albumin (Rind)	0,20	0,95	4,26	0,21 ± 0,06	0,84 ± 0,22	2,66 ± 2,30	7,03	11,67	37,47
α-Lactalbumin (Rind)	0,37	0,98	5,17	0,38 ± 0,29	0,88 ± 0,31	2,95 ± 2,20	1,56	10,27	43,04
β-Lactoglobulin (Rind)	0,18	0,97	6,28	0,21 ± 0,06	0,80 ± 0,27	4,16 ± 2,07	13,95	17,17	33,77
Transferrin (Rind)	0,93	1,01	1,01	0,88 ± 0,52	1,03 ± 0,20	0,92 ± 0,45	5,38	2,53	8,90
Lysozym (Huhn)	1,00	1,00	1,00	1,02 ± 0,05	1,15 ± 0,28	1,10 ± 0,18	1,79	14,64	10,11

DOTA (Amino-derivatisiert) Proteinname	Theoretische Verhältnisse			Experimentelle Verhältnisse			Relativer Fehler [%]		
	Sm/Tb	Ho/Tb	Lu/Tb	Sm/Tb	Ho/Tb	Lu/Tb	Sm/Tb	Ho/Tb	Lu/Tb
Transferrin (Mensch)	0,04	0,97	0,98	0,02 ± 0,02	1,03 ± 0,12	1,32 ± 0,73	52,08	4,04	32,23
Albumin (Rind)	0,20	0,95	4,26	0,24 ± 0,15	0,94 ± 0,17	4,43 ± 1,92	24,13	2,06	3,52
α-Lactalbumin (Rind)	0,37	0,98	5,17	0,47 ± 0,21	0,91 ± 0,13	4,01 ± 0,89	24,99	7,05	22,40
β-Lactoglobulin (Rind)	0,18	0,97	6,28	0,18 ± 0,09	0,88 ± 0,19	4,18 ± 1,27	8,53	11,07	38,73
Transferrin (Rind)	0,93	1,01	1,01	1,07 ± 0,37	1,02 ± 0,19	0,97 ± 0,45	16,77	1,06	14,52
Lysozym (Huhn)	1,00	1,00	1,00	0,88 ± 0,11	0,94 ± 0,14	1,18 ± 0,17	11,67	5,89	18,26

DOTA (Cysteine derivatisiert) Proteinname	Theoretische Verhältnisse			Experimentelle Verhältnisse			Relativer Fehler [%]		
	Sm/Tb	Ho/Tb	Lu/Tb	Sm/Tb	Ho/Tb	Lu/Tb	Sm/Tb	Ho/Tb	Lu/Tb
Transferrin (Mensch)	0,04	0,97	0,98	0,03 ± 0,03	1,23 ± 0,25	1,35 ± 0,30	42,45	26,87	37,65
Albumin (Rind)	0,20	0,95	4,26	0,11 ± 0,06	1,05 ± 0,34	4,48 ± 3,03	44,16	9,71	5,36
α-Lactalbumin (Rind)	0,37	0,98	5,17	0,14 ± 0,14	0,72 ± 0,43	8,16 ± 5,00	61,91	26,10	57,66
β-Lactoglobulin (Rind)	0,18	0,97	6,28	0,04 ± 0,01	0,84 ± 0,06	7,98 ± 0,00	78,40	13,20	27,09
Transferrin (Rind)	0,93	1,01	1,01	1,09 ± 0,19	1,13 ± 0,16	1,32 ± 0,58	17,23	12,60	30,07
Lysozym (Huhn)	1,00	1,00	1,00	0,37 ± 0,31	0,71 ± 0,08	8,97 ± 0,95	62,80	28,81	797,48

Tab. A.6: Zusammenfassung der gemittelten Werte des relativen Fehler der Quantifizierung und der Standardabweichung jeweils für die hoch abundanten (rot markiert), die niedrig abundanten (blau markiert) und die Proteine gleicher Konzentration.

	iTRAQ	DOTA (Amino-derivatisiert)	DOTA (Cysteine derivatisiert)
Mittlerer rel. Fehler der niedrig abundanten Proteine [%]	53,14	27,27	56,73
Mittlerer rel. Fehler der Proteine gleicher Konzentration [%]	8,27	10,47	96,59
Mittlerer rel. Fehler der hoch abundanten Proteine [%]	38,10	20,02	30,04
Mittlerer rel. Fehler [%]	23,21	15,80	76,64
Mittlere Standardabweichung der niedrig abundanten Proteine	0,13	0,12	0,06
Mittlere Standardabweichung der Proteine gleicher Konzentration	0,29	0,25	0,33
Mittlere Standardabweichung der hoch abundanten Proteine	2,19	1,36	4,01
Mittlere Standardabweichung	0,57	0,41	0,70

Tab. A.7: Peptide mit interner tryptischer Spaltstelle („echte Substrate“) und Peptide ohne tryptische Schnittstelle nach *Labeling* mit Lu³⁺-DOTA (Amino-gerichtete Markierung). Die nicht-spaltbaren Peptide weisen ein Ytterbium-Signal im MS auf und zeigen damit, dass sie im Gegensatz zu den echten Substraten nicht gespalten werden können.

Proteinname	Protein ID	Peptidsequenz und potentielle Schnittstelle
Serumalbumin	ALBU_BOVIN	IARIRIHPYFYAPE
Carboanhydrase 2	CAH2_BOVIN	HWHKIDFPI ANGE
α -S1-Casein	CASA1_BOVIN	ERILHSMKIE GIHAQQKIEPMIGVNQE NLLRIF RILHSMKIE RPKIHPIKIHQGLPQE VFGKIEKIVNE
β -Casein	CASB_BOVIN	LQDKIHPFAQTQ SITRIINKIKIIE VMGVSKIVKIE
Katalase	CATA_BOVIN	MAHFDRIE NIAGHLKID
α Crystallin A Kette	CRYAA_BOVIN	HGYISRIE RIIPVSRIE RIQDDHGYISRIE VKIHFSPE
α Crystallin	CRYAB_BOVIN	GVLTVNGPRIKIQASGPE

B Kette		HGFISRIE RITIPITRIE
β -Lactoglobulin	LACB_BOVIN	AQSAPLRIVYVE AQSAPLRIVYVEE EQCHI ILLQKIWE
α -Lactalbumin	LALBA_BOVIN	EQLTKICE
Lysozym	LYSC_CHICKEN	KIVFGRICE
Malat-Dehydrogenase	MDHM_PIG	IAHTPGVAAD IVRIANAFVAE
Myoglobin	MYG_HORSE	VLIRILF
Ovalbumin	OVAL_CHICKEN	DTQAMPFRIVTE TQAMPFRIVTE
Glycogenphosphorylase	PYGM_RABBIT	YYDRIPE
Ribonuklease (Pankreas)	RNAS1_BOVIN	GNPYVPVHFD GNPYVPVHFDASV KIETAAAKIFE SYSTEMSITDCRIE
Glutamyl-Endopeptidase	SSPA_STAAU	TLLTNKIHVVD VILPNNDRIHQITD
Transferrin (Rind)	TRFE_BOVIN	LLFRID LLNHAQE NFQLFQSPHGKID NVLRIILE VAFVKIHSTVFD VLCKID YVTALQNLRIE
Transferrin (Mensch)	TRFE_HUMAN	ACTFRIRP FQLFSSPHGKID LLCLD LLFRIDD NLANKIADRIDQYE YVTAIRINLRIE

Tab. A.8: Auflistung von Peptiden mit mindestens einer tryptischen Schnittstelle („Produkte“), die in mindestens einem LC-Lauf (=Verdauintervall) identifiziert und quantifiziert werden konnten.

Tryptische Schnittstellen sind fett markiert, unspezifische Schnittstellen, die im Glu-C- oder Trypsin-Verdau entstehen sind kursiv dargestellt.

Proteinname	Protein ID	Peptidsequenz	N-terminale Spaltstelle	C-terminale Spaltstelle
Serumalbumin	ALBU_BOVIN	AWSVAR	K <i>A</i>	R <i>L</i>
		YGFQNALIVR	<i>E</i> Y	R <i>Y</i>
Carboanhydrase 2	CAH2_BOVIN	MVNNGHSFNVE	R <i>M</i>	<i>E</i> Y
		NWRPAQPLK	<i>A</i> / <i>N</i>	K <i>N</i>
		RQSPVDIDTK	E <i>R</i>	K <i>A</i>
α -S1-Casein	CASA1_BOVIN	EQLLR	<i>L</i> / <i>E</i>	R <i>L</i>
		HPIKHQGLPQE	K <i>H</i>	<i>E</i> V
		QFYQLD	R <i>Q</i>	<i>D</i> A
		RLHSMK	<i>E</i> R	K <i>E</i>
		YLGYLE	R <i>Y</i>	<i>E</i> Q
β -Casein	CASB_BOVIN	AVPYPQRD	K <i>A</i>	<i>D</i> M
		IHPFAQTQ	K <i>I</i>	<i>Q</i> / <i>S</i>
		MPFPK	<i>E</i> M	K <i>Y</i>
		VMGVSK	<i>E</i> V	K <i>V</i>
		YQEPVLGPVR	<i>L</i> / <i>Y</i>	R <i>G</i>
Katalase	CATA_BOVIN	FNSANDDNVTQVR	R <i>F</i>	R <i>T</i>
		NFSDVHPE	K <i>N</i>	<i>E</i> Y
α -Crystallin B Kette	CRYAB_BOVIN	GVLTVNGPR	<i>D</i> G	R <i>K</i>
		HGFISR	<i>E</i> H	R <i>E</i>
		RTIPITR	<i>E</i> R	R <i>E</i>
Cytochrom c	CYC_HORSE	DLIAYLK	<i>E</i> D	K <i>K</i>
		LIAYLK	<i>D</i> L	K <i>K</i>
		MIFAGIK	K <i>M</i>	K <i>K</i>
		REDLIAYLK	<i>E</i> R	K <i>K</i>
		TGPNLHGLFGR	K <i>T</i>	R <i>K</i>
Elongationsfaktor TU 1	EFTU1_ECO24	NVGVLLR	<i>E</i> N	R <i>G</i>
Histon H2A Typ 1	H2A1_BOVIN	AGLQFPVGR	R <i>A</i>	R <i>V</i>
		HLQLAIR	R <i>H</i>	R <i>N</i>
β -Lactoglobulin	LACB_BOVIN	ALPMHIR	K <i>A</i>	R <i>L</i>
		ISLLDAQSAPLR	<i>D</i> I	R <i>V</i>
		QSLACQCLVR	<i>E</i> Q	R <i>T</i>
Lysozym	LYSC_CHICKEN	HGLDNYR	R <i>H</i>	R <i>G</i>
Myoglobin	MYG_HORSE	AIIHVLHSK	<i>D</i> A	K <i>H</i>

		HPGDFGADAQQGAMTK	K↓H	K↓A
		LFTGHPE	R↓L	E↓T
		LKPLAQSHATK	E↓L	K↓H
Ovalbumin	OVAL_CHICKEN	DTQAMPFR	E↓D	R↓V
		IGLFR	<i>Q//</i>	R↓V
Glycogenphosphorylase	PYGM_RABBIT	IWGVPEPSR	E↓I	R↓Q
Ribonuklease (Pankreas)	RNAS1_BOVIN	SLADVQAVCSQK	E↓S	K↓N
		VQAVCSQK	D↓V	K↓N
		YPNCAYK	K↓Y	K↓T
Glutamyl-Endopeptidase	SSPA_STAAU	LAIVK	D↓L	K↓F
Transferrin	TRFE_BOVIN	CASFRE	K↓C	E↓N
		CYLAMVPSHAVVAR	E↓C	R↓T
		DNPQTHYYAVAVVK	K↓D	K↓K
		FFSAGCAPGSPR	E↓F	R↓N
		LLCGDNTR	E↓L	R↓K
		NCHLAR	E↓N	R↓G
		NFQLFQSPHGK	D↓N	K↓D
		SGPFVSCVK	E↓S	K↓K
		SYLGDDYVR	D↓S	R↓A
		TSHMDCIK	K↓T	K↓A
		VAFVK	D↓V	K↓H
		WCAIGHQE	K↓W	E↓R
		YYGYTGAFR	R↓Y	R↓C
Transferrin	TRFE_HUMAN	ACTFR	E↓A	R↓R
		CHLAQVPSHTVVAR	D↓C	R↓S
		FQLFSSPHGK	E↓F	K↓D
		YYGYTGAFR	E↓G	R↓C
		LLCLDGTR	E↓L	R↓K
		LLCLDNTR	E↓L	R↓K
		SAHGFLK	D↓S	K↓V
		WCALSHHE	K↓W	E↓R
		YANCHLAR	E↓Y	R↓A
		YVTAIR	E↓Y	R↓N
Trypsin	TRYP_PIG	VATVSLPR	R↓V	R↓S
Ubiquitin	UBB_BOVIN	GIPPDQQR	E↓G	R↓L
		LIFAGK	R↓L	K↓Q
		MQIFVK	<i>G/M</i>	K↓T

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Barbara Gregorius, dass ich die vorliegende Arbeit „Identifizierung und Quantifizierung Metall-markierter Peptide und Proteine mittels Matrix-unterstützter Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie“ abgesehen von den genannten Hilfsmitteln und der Beratung durch meinen Betreuer eigenständig verfasst habe. Sie wurde bisher weder in dieser Form noch in einer anderen einer Prüfungskommission vorgelegt. Diese Arbeit wurde unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft verfasst.

Barbara Gregorius.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich besonders bei dem Betreuer meiner Doktorarbeit Herrn Prof. Dr. Andreas Tholey bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante Thema in meiner Doktorarbeit zu bearbeiten. Schon während der Diplomarbeit konnte ich sehr eigenständig an den verschiedensten wissenschaftlichen Projekten arbeiten. Seine Tür stand zu Diskussionen jederzeit offen und seine kreativen Denkanstöße haben meine Arbeit immer wieder voran gebracht. Ich freue mich sehr, dass sich die Systematische Proteomics und Bioanalytik als so produktive und gut ausgestattete Arbeitsgruppe in Kiel etabliert hat.

Weiterhin möchte ich Frau Prof. Thisbe Lindhorst für die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten danken.

Zudem möchte ich mich bei der Kieler Arbeitsgruppe für die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Besonderer Dank geht hier an Christian Treitz, Dr. Thorsten Overath und Dr. Chien-Wen Hung für die produktiven Diskussionen, wissenschaftlichen Rat und die gute Zusammenarbeit. Bei Dr. Dennis Linke möchte ich mich für die Tipps zu Zotero herzlich bedanken. Dann möchte ich mich bei der guten Seele der Arbeitsgruppe Jana Schlenk für ihr außergewöhnliches Engagement bei jeder Art von Feier und für die kurzweilige Bürozeit bedanken. Ich hoffe sie wird mir noch sehr lange mehr als eine ehemalige Arbeitskollegin sein.

Besonderer Dank sei noch an Dr. Dominik Bäumlisberger und Dr. Marion Bäumlisberger aus dem Arbeitskreis Karas gerichtet, die mir als absolute MALDI-Experten viele wertvolle Tipps gegeben haben.

Auch für die Unterstützung meiner Schwiegereltern bei der Kinderbetreuung und vielem mehr möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Selbstverständlich wären die Dissertation und auch mein Studium ohne die Hilfe meiner Mutter, die mir in vielerlei Hinsicht immer ein großes Vorbild war, unmöglich gewesen. Meinen Brüdern danke ich besonders für ihre Hilfsbereitschaft gegen Ende der Korrekturzeit.

Schließlich muss ich mich auch noch bei meinen Kindern Immanuel, Jolina und der kleinen Malina bedanken, die meine Dissertation zwar „ein wenig“ hinaus gezögert, sie aber zu einer echten Herausforderung gemacht haben. Oft genug waren sie verständnisvoll, wenn Mama wieder mal keine Zeit zum Spielen hatte.

Zuallerletzt möchte ich mich bei meinem ehemaligen, hochgeschätzten Arbeitskollegen und ehrenwerten Ehemann Dr. Thomas Jakoby-Gregorius bedanken, der mir auch seit der Zeit der Diplomarbeit schon beigestanden und mir immer wieder geholfen hat mich selbst zu motivieren und weiter zu machen. Die fachlichen Diskussionen, untergebracht im häuslichen Alltag, waren und sind ein steter Gewinn. Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle auch für seine Bereitschaft bedanken, sich nach einer anstrengenden Arbeitswoche noch als Manager für den gesamten Haushalt zu betätigen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Gregorius, Barbara
Geburtsdatum: 29.08.1979
Geburtsort: Neunkirchen
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1985 – 1989 Grundschule Bachschule, Neunkirchen
1989 – 2000 Gymnasium am Steinwald, Neunkirchen
Schulabschluss: Abitur

Auslandsaufenthalte

1995 – 1996 Schüleraustausch in Tomaszow Mazowiecki, Polen

Studium

10/2000 – 07/2003 Studium der Biochemie (Diplom) an der Freien
Universität Berlin
10/2003 – 10/2008 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität
des Saarlandes
Abschluss: Diplom-Biologin

Promotion

Seit 11/2008 Universität des Saarlandes, innerhalb des
Exzellenzclusters „Multimodal Computing and
Interaction“
Seit 01/2010 Christian-Albrechts Universität zu Kiel
innerhalb des Exzellenzclusters
„Inflammation at Interfaces“
05.12.2011-11.02.2012 Eintritt in den Mutterschutz

12.02.2012-31.06.2012	Wiederaufnahme der wissenschaftlichen Arbeit an der CAU
01.07.2012-04.12.2012	Elternzeit
Seit 12/2012	Anfertigung der Dissertation

Publikationen

Gregorius B, Jakoby T, Schaumlöffel D, Tholey A (2013). Monitoring of protease catalyzed reactions by quantitative MALDI MS using metal labeling. *Anal Chem*, **85**: 5184-5190.

Gregorius B, Jakoby T, Schaumlöffel D, Tholey A (2013). Metal labeling for accurate multiplexed peptide quantification via matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **405**: 2735-2741.

Gregorius B, Schaumlöffel D, Hildebrandt A. & Tholey A (2010). Characterization of metal labelled peptides by MALDI MS and MS/MS. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **24**: 3279-3289.

Mitwirkung an Publikationen

Slawski M, Hussong R, Tholey A, Jakoby T, Gregorius B, Hildebrandt A, Hein M (2012). Isotope pattern deconvolution for peptide mass spectrometry by non-negative least squares/least absolute deviation template matching. *BMC Bioinformatics*, **13**: 291.

Hussong R, Gregorius B, Tholey A, Hildebrandt A (2009). Highly accelerated feature detection in proteomics data sets using modern graphics processing units. *Bioinformatics*, **25**: 1937-1943.

Beiträge zu Kongressen und Tagungen

Qualitative and Quantitative analysis of metal-labeled peptides by MALDI MS, EuPA 2010, Estoril, Portugal.

Qualitative and Quantitative analysis of metal-labeled peptides by MALDI MS, DGMS 2011, Dortmund.